

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-515081

(P2013-515081A)

(43) 公表日 平成25年5月2日(2013.5.2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/61 (2006.01)</b>	C07K 14/61 ZNA	4C084
<b>A61P 5/06 (2006.01)</b>	A61P 5/06	4H045
<b>A61P 31/00 (2006.01)</b>	A61P 31/00	
<b>A61P 31/04 (2006.01)</b>	A61P 31/04	
<b>A61P 31/10 (2006.01)</b>	A61P 31/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 215 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-546169 (P2012-546169)	(71) 出願人	508048481
(86) (22) 出願日	平成22年12月21日 (2010.12.21)		アンブルックス、インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成24年8月17日 (2012.8.17)		Ambrx, Inc.
(86) 国際出願番号	PCT/US2010/061671		アメリカ合衆国, 92037 カリフォル
(87) 国際公開番号	W02011/087810		ニア州, ラ ホーヤ, スイート 100,
(87) 国際公開日	平成23年7月21日 (2011.7.21)		ノース トーレイ パインズ ロード 1
(31) 優先権主張番号	61/288, 820		0975
(32) 優先日	平成21年12月21日 (2009.12.21)		10975 North Torrey
(33) 優先権主張国	米国 (US)		Pines Road, Suite 100,
		(74) 代理人	110000338
			特許業務法人原謙三国際特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾されているブタのソマトトロピンポリペプチドおよびそれらの使用

(57) 【要約】

修飾されているブタのソマトトロピンポリペプチドおよびその使用が提供される。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

天然にコードされていない 1 つ以上のアミノ酸を含んでいる、p S T ポリペプチド。

## 【請求項 2】

1 つ以上の翻訳後修飾を含んでいる、請求項 1 に記載の p S T ポリペプチド。

## 【請求項 3】

リンカー、重合体または生物学的に活性な分子と連結されている、請求項 1 に記載の p S T ポリペプチド。

## 【請求項 4】

水溶性重合体と連結されている、請求項 3 に記載の p S T ポリペプチド。

10

## 【請求項 5】

請求項 1 に記載の p S T ポリペプチドであって、二機能性の重合体、二機能性のリンカーまたは少なくとも 1 つのさらなる p S T ポリペプチドと連結されている、p S T ポリペプチド。

## 【請求項 6】

上記二機能性のリンカーまたは二機能性の重合体は第 2 のポリペプチドと連結されている、請求項 5 に記載の p S T ポリペプチド。

## 【請求項 7】

上記第 2 のポリペプチドは p S T ポリペプチドである、請求項 6 に記載の p S T ポリペプチド。

20

## 【請求項 8】

上記水溶性重合体はポリ（エチレングリコール）部分を含んでいる、請求項 4 に記載の p S T ポリペプチド。

## 【請求項 9】

上記水溶性重合体は、上記 b - G C S F ポリペプチドに存在している天然にコードされていないアミノ酸と連結されている、請求項 4 に記載の p S T ポリペプチド。

## 【請求項 10】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、1 位より前（すなわち N 末端）、1 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位、10 位、11 位、12 位、13 位、14 位、15 位、16 位、17 位、18 位、19 位、20 位、21 位、23 位、24 位、25 位、26 位、27 位、28 位、29 位、30 位、31 位、32 位、33 位、34 位、35 位、36 位、37 位、38 位、39 位、40 位、41 位、42 位、43 位、44 位、45 位、46 位、47 位、48 位、49 位、50 位、51 位、52 位、53 位、54 位、55 位、56 位、57 位、58 位、59 位、60 位、61 位、62 位、63 位、64 位、65 位、66 位、67 位、68 位、69 位、70 位、71 位、72 位、73 位、74 位、75 位、76 位、77 位、78 位、79 位、80 位、81 位、82 位、83 位、84 位、85 位、86 位、87 位、88 位、89 位、90 位、91 位、92 位、93 位、94 位、95 位、96 位、97 位、98 位、99 位、100 位、101 位、102 位、103 位、104 位、105 位、106 位、107 位、108 位、109 位、110 位、111 位、112 位、113 位、114 位、115 位、116 位、117 位、118 位、119 位、120 位、121 位、122 位、123 位、124 位、125 位、126 位、127 位、128 位、129 位、130 位、131 位、132 位、133 位、134 位、135 位、136 位、137 位、138 位、139 位、140 位、141 位、142 位、143 位、144 位、145 位、146 位、147 位、148 位、149 位、150 位、151 位、152 位、153 位、154 位、155 位、156 位、157 位、158 位、159 位、160 位、161 位、162 位、163 位、164 位、165 位、166 位、167 位、168 位、169 位、170 位、171 位、172 位、173 位、174 位、175 位（すなわちタンパク質のカルボキシル末端）、およびこれらの任意の組合せ（配列番号 1、または配列番号 2 における対応するアミノ酸）の残基からなる群から選択される位置において置換されている、請求項 1 に記載の p S T ポリペプチド。

30

40

50

## 【請求項 1 1】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、3位、7位、11位、33位、43位、58位、62位、67位、69位、98位、99位、123位、124位、125位、133位、134位、136位、141位、159位、166位、169位、170位、173位、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1、または配列番号2における対応するアミノ酸）の残基からなる群から選択される位置において置換されている、請求項10に記載のp S Tポリペプチド。

## 【請求項 1 2】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、3位、7位、33位、43位、58位、62位、67位、69位、99位、123位、124位、133位、134位、141位、166位、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1、または配列番号2における対応するアミノ酸）の残基からなる群から選択される位置において置換されている、請求項10に記載のp S Tポリペプチド。

10

## 【請求項 1 3】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、3位、7位、62位、133位、166位、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1、または配列番号2における対応するアミノ酸）の残基からなる群から選択される位置に置換されている、請求項10に記載のp S Tポリペプチド。

## 【請求項 1 4】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、62位（配列番号1、または配列番号2における対応するアミノ酸）において置換されている、請求項10に記載のp S Tポリペプチド。

20

## 【請求項 1 5】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、133位（配列番号1、または配列番号2における対応するアミノ酸）において置換されている、請求項10に記載のp S Tポリペプチド。

## 【請求項 1 6】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、1位より前（すなわちN末端）、1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、23位、24位、25位、26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、37位、38位、39位、40位、41位、42位、43位、44位、45位、46位、47位、48位、49位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、56位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、67位、68位、69位、70位、71位、72位、73位、74位、75位、76位、77位、78位、79位、80位、81位、82位、83位、84位、85位、86位、87位、88位、89位、90位、91位、92位、93位、94位、95位、96位、97位、98位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位、130位、131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位、138位、139位、140位、141位、142位、143位、144位、145位、146位、147位、148位、149位、150位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、157位、158位、159位、160位、161位、162位、163位、164位、165位、166位、167位、168位、169位、170位、171位、172位、173位、174位、175位（すなわちタンパク質のカルボキシル末端）、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1、または配列番号2における対応するアミノ酸）の残基からなる群から選択される位置において置換されている、請求項4に記載のp S Tポリペプチド。

30

40

50

## 【請求項 17】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、3位、7位、11位、33位、43位、58位、62位、67位、69位、98位、99位、123位、124位、125位、133位、134位、136位、141位、159位、166位、169位、170位、173位、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1、または配列番号2における対応するアミノ酸）の残基からなる群から選択される位置において置換されている、請求項16に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項 18】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、3位、7位、33位、43位、58位、62位、67位、69位、99位、123位、124位、133位、134位、141位、166位、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1、または配列番号2における対応するアミノ酸）の残基からなる群から選択される位置において置換されている、請求項16に記載のpSTポリペプチド。

10

## 【請求項 19】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、3位、7位、62位、133位、166位、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1、または配列番号2における対応するアミノ酸）の残基からなる群から選択される位置に置換されている、請求項16に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項 20】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、62位（配列番号1、または配列番号2における対応するアミノ酸）において置換されている、請求項16に記載のpSTポリペプチド。

20

## 【請求項 21】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、133位（配列番号1、または配列番号2における対応するアミノ酸）において置換されている、請求項4に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項 22】

請求項1に記載のpSTポリペプチドであって、pST受容体に対する当該pSTポリペプチドの親和性を調節する1つ以上のアミノ酸置換、アミノ酸付加またはアミノ酸欠失を含んでいる、pSTポリペプチド。

30

## 【請求項 23】

請求項1に記載のpSTポリペプチドであって、当該pSTポリペプチドの安定性または可溶性を増大させる1つ以上のアミノ酸置換、アミノ酸付加またはアミノ酸欠失を含んでいる、pSTポリペプチド。

## 【請求項 24】

請求項1に記載のpSTポリペプチドであって、当該pSTポリペプチドの組換え宿主細胞における発現またはインピトロにおける合成を向上させる1つ以上のアミノ酸置換、アミノ酸付加またはアミノ酸欠失を含んでいる、pSTポリペプチド。

## 【請求項 25】

請求項1に記載のpSTポリペプチドであって、当該pSTポリペプチドのプロテアーゼ耐性を向上させる1つ以上のアミノ酸置換、アミノ酸付加またはアミノ酸欠失を含んでいる、pSTポリペプチド。

40

## 【請求項 26】

請求項1に記載のpSTポリペプチドであって、天然にコードされていない上記アミノ酸は、リンカー、重合体または生物学的に活性な分子に対して反応性であり、当該リンカー、重合体または生物学的に活性な分子は、当該ポリペプチドにおける通常の20のアミノ酸のうちいずれかに対して非反応性である、pSTポリペプチド。

## 【請求項 27】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基、セミカルバジド基、アジド基またはアルキン基を含んでいる、請求

50

項 1 に記載の p S T ポリペプチド。

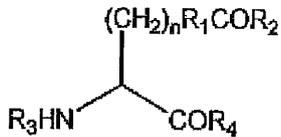
【請求項 28】

天然にコードされていない上記アミノ酸はカルボニル基を含んでいる、請求項 27 に記載の p S T ポリペプチド。

【請求項 29】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、以下の構造：

【化 1】



10

(ここで、n は 0 ~ 10 であり；R 1 は、アルキル、アリール、置換されているアルキルまたは置換されているアリールであり；R 2 は、H、アルキル、アリール、置換されているアルキルまたは置換されているアリールであり；R 3 は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり；R 4 は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である)

を有している、請求項 28 に記載の p S T ポリペプチド。

【請求項 30】

天然にコードされていない上記アミノ酸はアミノオキシ基を含んでいる、請求項 27 に記載の p S T ポリペプチド。

20

【請求項 31】

天然にコードされていない上記アミノ酸はヒドラジド基を含んでいる、請求項 27 に記載の p S T ポリペプチド。

【請求項 32】

天然にコードされていない上記アミノ酸はヒドラジン基を含んでいる、請求項 27 に記載の p S T ポリペプチド。

【請求項 33】

天然にコードされていない上記アミノ酸残基はセミカルバジド基を含んでいる、請求項 27 に記載の p S T ポリペプチド。

【請求項 34】

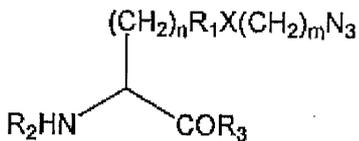
天然にコードされていない上記アミノ酸残基はアジド基を含んでいる、請求項 27 に記載の p S T ポリペプチド。

30

【請求項 35】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、以下の構造：

【化 2】



(ここで、n は 0 ~ 10 であり；R 1 は、アルキル、アリール、置換されているアルキルもしくは置換されているアリールであるか、または存在しておらず；X は、O、N もしくは S であるか、または存在しておらず；m は 0 ~ 10 であり；R 2 は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり；R 3 は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である)

40

を有している、請求項 34 に記載の p S T ポリペプチド。

【請求項 36】

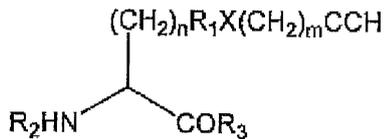
天然にコードされていない上記アミノ酸はアルキン基である、請求項 27 に記載の p S T ポリペプチド。

【請求項 37】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、以下の構造：

50

## 【化 3】



(ここで、nは0～10であり；R1は、アルキル、アリール、置換されているアルキルまたは置換されているアリールであり；Xは、O、NもしくはSであるか、または存在しておらず；mは0～10であり；R2は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり；R3は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である)

を有している、請求項36に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項38】

上記水溶性重合体は約0.1kDaから約100kDaの分子量を有している、請求項4に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項39】

上記水溶性重合体は約0.1kDaから約50kDaの分子量を有している、請求項38に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項40】

カルボニル含有アミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドを、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基またはセミカルバジド基を含んでいる水溶性重合体と反応させることによって作製されている、請求項4に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項41】

上記アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基またはセミカルバジド基は、アミド結合を介して上記水溶性重合体と連結されている、請求項40に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項42】

カルボニル基を含んでいる水溶性重合体を、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基またはセミカルバジド基を含んでいる天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるポリペプチドと反応させることによって作製されている、請求項4に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項43】

アルキン含有アミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドを、アジド部分を含んでいる水溶性重合体と反応させることによって作製されている、請求項4に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項44】

アジド含有アミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドを、アルキン部分を含んでいる水溶性重合体と反応させることによって作製されている、請求項4に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項45】

上記アジド基またはアルキン基はアミド結合を介して水溶性重合体と連結されている、請求項27に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項46】

上記水溶性重合体は分枝鎖状またはマルチアームの重合体である、請求項4に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項47】

上記水溶性重合体の分枝鎖のそれぞれは約1kDaから約100kDaの分子量を有している、請求項46に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項48】

pSTアンタゴニストである、請求項1に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項49】

10

20

30

40

50

1つ以上の翻訳後修飾、リンカー、重合体または生物学的に活性な分子を含んでいる、請求項48に記載のpSTポリペプチド。

【請求項50】

上記重合体は水溶性重合体およびポリ(エチレングリコール)からなる群から選択される部分を含んでいる、請求項49に記載のpSTポリペプチド。

【請求項51】

pST受容体の活性化を阻止する、請求項48に記載のpSTポリペプチド。

【請求項52】

天然にコードされていない上記アミノ酸は糖部分を含んでいる、請求項1に記載のpSTポリペプチド。

10

【請求項53】

請求項3に記載のpSTポリペプチドであって、上記リンカー、重合体または生物学的に活性な分子は糖部分を介して当該pSTポリペプチドと連結されている、pSTポリペプチド。

【請求項54】

配列番号1または2をコードしているポリヌクレオチド配列とストリンジェントな条件のもとにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含んでいる単離されている核酸であって、当該ポリヌクレオチドは少なくとも1つのセクターコドンを含んでいる、単離されている核酸。

【請求項55】

上記セクターコドンは、アンバーコドン、オーカーコドン、オパールコドン、ユニークコドン、レアコドンおよび4塩基コドンからなる群から選択される、請求項54に記載の単離されている核酸。

20

【請求項56】

天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる単離されているpSTポリペプチドを、天然にコードされていない当該アミノ酸と反応する部分を含んでいるリンカー、重合体または生物学的に活性な分子と接触させることを包含している、請求項3に記載のpSTポリペプチドを作製する、方法。

【請求項57】

上記重合体は、水溶性重合体およびポリ(エチレングリコール)からなる群から選択される部分を含んでいる、請求項56に記載の方法。

30

【請求項58】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジド基、ヒドラジン基、セミカルバジド基、アジド基またはアルキン基を含んでいる、請求項56に記載の方法。

【請求項59】

天然にコードされていない上記アミノ酸はカルボニル部分を含んでおり、上記リンカー、重合体または生物学的に活性な分子は、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基またはセミカルバジド基を含んでいる、請求項56に記載の方法。

【請求項60】

上記アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基またはセミカルバジド基は、アミド結合を介して上記リンカー、重合体または生物学的に活性な分子と連結されている、請求項59に記載の方法。

40

【請求項61】

天然にコードされていない上記アミノ酸はアルキン部分を含んでおり、上記リンカー、重合体または生物学的に活性な分子はアジド部分を含んでいる、請求項56に記載の方法。

【請求項62】

天然にコードされていない上記アミノ酸はアジド部分を含んでおり、上記リンカー、重合体または生物学的に活性な分子はアルキン部分を含んでいる、請求項56に記載の方法

50

。

【請求項 6 3】

上記アジド部分またはアルキン部分は、アミド結合を介してリンカー、重合体または生物学的に活性な分子と連結されている、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 4】

上記ポリ(エチレングリコール)部分は約 0.1 kDa から約 100 kDa の平均分子量を有している、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 5】

上記ポリ(エチレングリコール)部分は分枝鎖状またはマルチアームの重合体である、請求項 5 7 に記載の方法。

10

【請求項 6 6】

請求項 1 に記載の p S T ポリペプチドおよび薬学的に受容可能な担体を含んでいる、組成物。

【請求項 6 7】

天然にコードされていない上記アミノ酸は水溶性重合体と連結されている、請求項 6 6 に記載の組成物。

【請求項 6 8】

p S T によって調節される疾患を有している動物を処置する方法であって、請求項 6 6 に記載の組成物の治療有効量を当該動物に投与することを包含している、方法。

20

【請求項 6 9】

請求項 5 4 に記載の核酸を含んでいる、細胞。

【請求項 7 0】

直交性の t R N A 合成酵素または直交性の t R N A を含んでいる、請求項 6 9 に記載の細胞。

【請求項 7 1】

p S T ポリペプチドをコードしておりかつセクターコドンを含んでいる 1 つ以上のポリヌクレオチド、直交性の R N A 合成酵素および直交性の t R N A を含んでいる細胞を、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる当該 p S T ポリペプチドの発現を可能にする条件において培養すること；ならびに p S T ポリペプチドを精製することを包含している、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる p S T ポリペプチドを製造する、方法。

30

【請求項 7 2】

p S T ポリペプチドの血中半減期または循環時間を調節する方法であって、当該 p S T ポリペプチドにおける天然に存在するアミノ酸の 1 つ以上を天然にコードされていないアミノ酸の 1 つ以上と置換することを包含している、方法。

【請求項 7 3】

配列番号 1 または 2 として示されているポリペプチドをコードしている配列を有しているポリヌクレオチドによってコードされている p S T ポリペプチドであって、当該ポリヌクレオチドはセクターコドンを含んでおり、天然にコードされていないアミノ酸を少なくとも 1 つ含んでいる、p S T ポリペプチド。

40

【請求項 7 4】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、リンカー、重合体、水溶性重合体または生物学的に活性な分子と連結されている、請求項 7 3 に記載の p S T ポリペプチド。

【請求項 7 5】

上記水溶性重合体はポリ(エチレングリコール)部分を含んでいる、請求項 7 4 に記載の p S T ポリペプチド。

【請求項 7 6】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、1 位より前(すなわち N 末端)、1 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位、10 位、11 位、12 位、13 位、14 位、15 位、16 位、17 位、18 位、19 位、20 位、21 位、23 位、24 位、25 位、

50

26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、  
 36位、37位、38位、39位、40位、41位、42位、43位、44位、45位、  
 46位、47位、48位、49位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、  
 56位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、  
 66位、67位、68位、69位、70位、71位、72位、73位、74位、75位、  
 76位、77位、78位、79位、80位、81位、82位、83位、84位、85位、  
 86位、87位、88位、89位、90位、91位、92位、93位、94位、95位、  
 96位、97位、98位、99位、100位、101位、102位、103位、104位  
 、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位  
 、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位 10  
 、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位  
 、129位、130位、131位、132位、133位、134位、135位、136位  
 、137位、138位、139位、140位、141位、142位、143位、144位  
 、145位、146位、147位、148位、149位、150位、151位、152位  
 、153位、154位、155位、156位、157位、158位、159位、160位  
 、161位、162位、163位、164位、165位、166位、167位、168位  
 、169位、170位、171位、172位、173位、174位、175位(すなわち  
 タンパク質のカルボキシル末端)、およびこれらの任意の組合せ(配列番号1、または配  
 列番号2における対応するアミノ酸)の残基からなる群から選択される位置において置換  
 されている、請求項73に記載のpSTポリペプチド。 20

【請求項77】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、3位、7位、11位、33位、43位、5  
 8位、62位、67位、69位、98位、99位、123位、124位、125位、13  
 3位、134位、136位、141位、159位、166位、169位、170位、17  
 3位、およびこれらの任意の組合せ(配列番号1、または配列番号2における対応するア  
 ミノ酸)の残基からなる群から選択される位置において置換されている、請求項76に記  
 載のpSTポリペプチド。

【請求項78】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、3位、7位、33位、43位、58位、6  
 2位、67位、69位、99位、123位、124位、133位、134位、141位、 30  
 166位、およびこれらの任意の組合せ(配列番号1、または配列番号2における対応す  
 るアミノ酸)の残基からなる群から選択される位置において置換されている、請求項76  
 に記載のpSTポリペプチド。

【請求項79】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、3位、7位、62位、133位、166位  
 、およびこれらの任意の組合せ(配列番号1、または配列番号2における対応するアミノ  
 酸)の残基からなる群から選択される位置において置換されている、請求項76に記載の  
 pSTポリペプチド。

【請求項80】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、62位(配列番号1、または配列番号2に  
 おける対応するアミノ酸)において置換されている、請求項76に記載のpSTポリペプ  
 チド。 40

【請求項81】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、113位(配列番号1、または配列番号2  
 における対応するアミノ酸)において置換されている、請求項73に記載のpSTポリペ  
 プチド。

【請求項82】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジ  
 ド基、ヒドラジン基、セミカルバジド基、アジド基またはアルキン基を含んでいる、請求  
 項73に記載のpSTポリペプチド。 50

## 【請求項 83】

上記ポリ(エチレングリコール)部分は約0.1 kDaから約100 kDaの分子量を有している、請求項75に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項 84】

上記ポリ(エチレングリコール)部分は分枝鎖状またはマルチアームの重合体である、請求項75に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項 85】

上記ポリ(エチレングリコール)部分は約1 kDaから約100 kDaの分子量を有している、請求項84に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項 86】

請求項73に記載のpSTポリペプチドおよび薬学的に受容可能な担体を含んでいる、組成物。

## 【請求項 87】

pSTポリペプチドであって、組換え宿主細胞における当該pSTポリペプチドの発現を向上させる1つ以上のアミノ酸置換、アミノ酸付加またはアミノ酸欠失を含んでいる、pSTポリペプチド。

## 【請求項 88】

pSTポリペプチドであって、単一のアミノ酸において当該pSTポリペプチドと共有結合によって連結されている水溶性重合体を含んでいる、pSTポリペプチド。

## 【請求項 89】

上記水溶性重合体はポリ(エチレングリコール)部分を含んでいる、請求項88に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項 90】

上記水溶性重合体と共有結合的に連結されている上記アミノ酸は天然にコードされていないアミノ酸である、請求項88に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項 91】

天然にコードされていない上記アミノ酸はポリ(エチレングリコール)分子と連結されている、請求項10に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項 92】

少なくとも1つのリンカー、重合体または生物学的に活性な分子を含んでいるpSTポリペプチドであって、当該リンカー、重合体または生物学的に活性な分子は、当該ポリペプチドにリボソームによって組み込まれている天然にコードされていないアミノ酸の官能基を介して当該ポリペプチドと結合されている、pSTポリペプチド。

## 【請求項 93】

1つのPEGが付加されている、請求項92に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項 94】

天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上と結合されているリンカー、重合体または生物学的に活性な分子を含んでいるpSTポリペプチドであって、天然にコードされていない当該アミノ酸はあらかじめ選択されている部位において当該ポリペプチドにリボソームによって組み込まれている、pSTポリペプチド。

## 【請求項 95】

1つのリンカー、重合体または生物学的に活性な分子を含んでいる、請求項94に記載のpSTポリペプチド。

## 【請求項 96】

請求項1に記載のpSTポリペプチドであって、当該ポリペプチドの投与後に動物における血液形成を調節する1つ以上のアミノ酸置換、アミノ酸付加またはアミノ酸欠失を含んでいる、pSTポリペプチド。

## 【請求項 97】

請求項1に記載のpSTポリペプチドであって、当該pSTポリペプチドの血中半減期または循環時間を向上させる1つ以上のアミノ酸置換、アミノ酸付加またはアミノ酸欠失

10

20

30

40

50

を含んでいる、p S Tポリペプチド。

【請求項 98】

請求項 1 に記載の p S Tポリペプチドであって、当該ポリペプチドの投与後に動物における好中球の増殖を調節する 1 つ以上のアミノ酸置換、アミノ酸付加またはアミノ酸欠失を含んでいる、p S Tポリペプチド。

【請求項 99】

天然にコードされているアミノ酸の置換を含んでいる、請求項 1 に記載の p S Tポリペプチド。

【請求項 100】

請求項 1 に記載の p S Tポリペプチドであって、当該ポリペプチドの投与後に動物における好中球の成熟を調節する 1 つ以上のアミノ酸置換、アミノ酸付加またはアミノ酸欠失を含んでいる、p S Tポリペプチド。

10

【請求項 101】

請求項 1 に記載の p S Tポリペプチドであって、当該ポリペプチドの投与後に動物における好中球の機能を調節する 1 つ以上のアミノ酸置換、アミノ酸付加またはアミノ酸欠失を含んでいる、p S Tポリペプチド。

【請求項 102】

p S Tによって調節される感染症を有している動物を処置する方法であって、請求項 6 に記載の組成物の治療有効量を当該動物に投与することを包含している、方法。

【請求項 103】

20

請求項 4 に記載の p S Tポリペプチドであって、上記水溶性重合体はオキシム結合によって当該ポリペプチドと連結されている、p S Tポリペプチド。

【請求項 104】

動物における感染症を予防する方法であって、請求項 6 に記載の組成物の治療有効量を当該動物に投与することを包含している、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、天然にコードされていないアミノ酸の少なくとも 1 つを用いて必要に応じて修飾されている、ブタのソマトトロピン ( p S T ) ポリペプチドに関する。

30

【背景技術】

【0002】

生物学的に活性な ( 生理活性のある ) いくつかのポリペプチドの長期に及ぶ活性は、非常にわずかな用量のみを非経口的に投与することによって実現され得る一方で、他の点について、十分な血中濃度が必要であるか、および / または大きな用量が長期間 ( 例えば一週間以上 ) にわたる所望の生物学的な作用をもたらすために投与される必要があるような血清における非常に短い半減期を有している。ソマトトロピン ( 成長ホルモン ) はそのようなポリペプチドの一例である。

【0003】

動物の血流への所望されない急速な放出を防ぐために、特定のポリペプチドは、水和抑制剤 ( 抗水和剤 ) を必要に応じて含有し得るか、または体液におけるそれらの可溶性をさらに低下させる金属もしくは金属化合物と会合している液体ビヒクルにおいて非経口的に投与され得る。許容不可能な大量のそのようなビヒクルの必要性を回避するために、かつ他の理由 ( 優れた長期の放出特性が挙げられる ) のために、例えば、James C. Mitchell に対する米国特許第 5, 739, 108 号、Eli Lilly に譲渡されている米国特許第 4, 977, 140 号、Lucky, Ltd. に譲渡されている米国特許第 5, 520, 927 号、および LG Chemicals Ltd. に譲渡されている米国特許第 5, 744, 163 号に示されているように、ビヒクルにおける上記ポリペプチドの高い濃度を採用することは有利である。しかし、そのようなポリペプチドが生物学的に活性な形態において動物の血流に放出される効率 ( “ 生体利用効率 ” )、および / またはいくつかの効用において、動物における所

40

50

望の生理学的な応答をもたらす効力（“有効性”）を向上させる必要がある。これらの要因のそれぞれは、所望の生物学的な作用を実現するために投与すべきポリペプチドの量、および必然的に各投与の費用に実質的に影響し得る。ポリペプチド（例えばソマトトロピン）は、組換えDNAを用いて形質転換されている原核生物において製造され得るが、改良されたソマトトロピンポリペプチド（より長い血中半減期が挙げられる）をもたらすタンパク質の調合が必要であり続けている。生理活性組成物を投与する種々の方法および手段はこれまでに存在しており、これらの例示的な公開物としては、Christensen et al.の国際公開第97/03692号が挙げられ、当該公開物は、亜鉛イオン、および必要に応じてリジンもしくはカルシウム成長ホルモンの調合を開示している。そのようにして調合された成長ホルモンは、脱アミド化に対する耐性を示した。

10

#### 【0004】

Dong et al.の国際公開第00/13674号は、薬物の時限放出のための手段を開示している。上記手段は、薬物製剤、ピストンおよび浸透圧性の組成物を含んでいるカプセルを格納する半透性の壁つきの容器を含んでいる。投与手段は、24時間を超えずに制御された速度において、通路を介して薬物製剤を放出する。Ekwuribeの米国特許第5,359,030号、米国特許第5,438,040号、および米国特許第5,681,811号は、抱合によって重合体と結合されているペプチドを含んでいる、安定化されている抱合されたペプチド複合体を開示している。当該重合体は、非経口投与および経口投与の両方において安定な脂肪親和性部分および疎水性部分を含んでいる。Ferguson et al.の米国特許第4,977,140号は、担体においてブタのソマトトロピンを含んでいる徐放性製剤を開示している。当該担体は蜜蝋（約1~20重量%）およびオイル（約80~99重量%）を含んでいる。乳牛への注入によって、上記製剤は、28日にわたって乳の生成量の多大な向上をもたらす。Hamilton et al.の米国特許第4,816,568号は、動物の成長ホルモンおよび安定化剤の組成物を開示している。教示されている上記安定化剤は、水性溶液に可溶性であり、一般的に大きな極性を示す。教示されている上記安定化剤は、ポリオール、アミノ酸、生理学的なpHにおいて荷電する側鎖基を有しているアミノ酸重合体、およびクロリン誘導体を含んでいる。上記組成物の水性製剤は、(i)水性溶液に上記安定化剤を分散させること、および(ii)続く成長ホルモンの添加によって形成され得る。固体製剤は、(i)上記安定化剤および成長ホルモンを混合させること、(ii)必要に応じて補助剤、結合剤などを上記組成物に加えること、ならびに(iii)上記組成物を圧縮して、錠剤または丸薬を形成することによって形成され得る。

20

30

#### 【0005】

Kim et al.の米国特許第5,520,927号は、ソマトトロピン、少なくとも1つのトコフェノール化合物、および放出遅延剤を含んでいる、経口的に投与される生理活性のある徐放性の薬学的組成物を開示している。Kim et al.の米国特許第5,744,163号は、動物の成長ホルモンを徐放させる製剤を開示している。上記製剤は、生分解可能な重合体およびポリオキサマーのフィルムを有しているソマトトロピン被覆を含んでいる丸薬を含んでいる。Magruder et al.の米国特許第5,034,229号は、動物に対して有益な作用物質（例えば成長ホルモン）を送達する方策を開示している。また、上記方策は、粘度調節手段としてのポリオールを送達し得る。MartinのEP 0 216 485は、遷移金属を有している成長ホルモン複合体を調製する方法を開示している。また、遷移金属と複合化されている成長ホルモンを有しているそれら进行处理することによって動物における成長を促進する方法が開示されている。Mitchellの米国特許第5,739,108号は、生体適合性のオイルに約10重量%~約50重量%が分散されているポリペプチドを含んでいる生理活性のあるポリペプチドを長期にわたって放出する製剤を開示している。上記ポリペプチドは無毒の金属または金属塩と会合され得る。また、上記製剤は抗水和剤（例えばモノステアリン酸ナトリウム）を含み得る。Pikal, et al.の米国特許第5,612,315号は、ヒトの成長ホルモン、グリシンおよびマンニトールを含んでいる、ヒトの成長ホルモンの非経口投与用の製剤を開示している。開示されている製剤は、タンパク質の凝集に対する安定化をもたらすと説明されている。Raman et al.の米国特許第

40

50

5, 356, 635号は、生物学的に活性な作用物質（例えばソマトトロピン）；例えばソマトトロピンが全体に分散されている、生分解可能な非晶質なガラス質の炭水化物の基材；および疎水性の物質を含んでいる徐放性の組成物を開示している。非晶質なガラス質の炭水化物の上記基材は、非晶質な炭水化物および結晶化抑制剤を含んでおり、上記組成物の約60重量%～約90重量%を構成している。上記組成物は少なくとも約18%まで下がると固体である。

【0006】

Raman et al.の国際公開第93/13792号は、遷移金属の可溶化物質と組み合わせた遷移金属-ソマトトロピンの複合体を含んでいる埋め込み可能な手段を開示している。上記遷移金属は、亜鉛、マンガンまたは銅であり得る。金属の可溶化物質はアミノ酸であり得る。スクロースはソマトトロピンを安定化させるために使用され得る。上記手段はシリコンの管材料または蜜蝋を含み得る。Seely et al.の国際公開第93/19773号は、(i)ソマトトロピンおよびアルギニンHClを含んでいる凍結乾燥された組成物、ならびに(ii)EDTA、非イオン性の界面活性剤および必要に応じて緩衝液もしくは非緩衝作用の物質（例えば、スクロースまたはトレハロース）を含んでいる水性溶液を開示している。Sivaramakrishnan et al.の米国特許第5,219,572号は、巨大分子（例えばソマトトロピン）を制御放出する手段を開示している。上記手段は、不均質なビードレッツ（beadlets）を含んでいる内部区画を完全に囲んでいる水溶性の外覆を含んでいる。ビードレッツは、コアのマトリクスを囲んでいる蜜蝋の殻を含んでいる。コアのマトリクスは、例えばソマトトロピン、および必要に応じて賦形剤、安定化剤および結合剤など（例えば、ステアリン酸マグネシウムまたはスクロース）を含んでいる。動物内の液性環境における上記外覆の溶解によって、ビードレッツは、液性環境にばくろされ、ばくろ後の種々の時点に破れる。S.O slashed.rensen et al.の国際公開第93/12812号は、成長ホルモンがヒスチジンまたはヒスチジン誘導体の存在下において安定化され得ることを教示している。また、成長ホルモンが凍結乾燥される場合、組成物は、充填剤（すなわち、糖アルコール、二糖およびこれらの混合物）を含み得る。S.O slashed.rensen et al.の米国特許第5,849,704号は、成長ホルモン、ならびに脱アミド化、酸化、もしくは成長ホルモンにおけるペプチド結合の切断に対する安定性をもたらすために加えられている添加剤または緩衝作用物質としてのヒスチジンもしくはヒスチジンの誘導体を含んでいる薬学的製剤を開示している。また、開示されているのは、ヒスチジンまたはそれらの誘導体の存在下における成長ホルモンの結晶化が、公知の方法より高い純度を有している結晶のより高い収率をもたらすことである。

【0007】

Steber et al.の欧州特許出願公開第0 523 330号は、部分的に被覆されている埋め込み可能な、凹凸のある小型の組成物を開示している。当該組成物は、生物学的に活性なポリペプチド（例えばソマトトロピン）；脂肪、蜜蝋またはこれらの混合物；ならびに糖（例えば、単糖、二糖または三糖）を含んでいる。Storrs, et al.の米国特許第5,986,073号は、生物学的に活性なソマトトロピンの単量体を精製し、回収する方法を開示している。この業績は、重複する等電点を有しているソマトトロピンの単量体および低重合体が、非常に狭いpH範囲における選択的な沈殿によって分離され得るという発見に基づいている。所望されない不純物はこの過程によって除去され、回収されかつ精製されたソマトトロピンは、さらなる精製なしに標的の動物に対する非経口投与にとって好適である。Tyleの米国特許第4,857,506号は、成長ホルモンを徐放させる複合的な水中油中水型（water-in-oil-in-water）のエマルションを開示している。成長ホルモンは内部の水相に分散されており；当該内部の水相は水と混和しない液相または油相に分散されており；水と混和しない相は外部の水相に分散されている。内部の水相は、40重量%までのポリオール、グリコールまたは糖を含んでいる。Viswanathan et al.の米国特許第4,917,685号は、安定化された動物の成長ホルモンにとっての送達手段を開示している。上記手段は、リザーバを囲んでおり、規定する壁を含んでいる。上記壁の少なくとも一部は、多孔質であり、成長ホルモンおよび安定化剤の通過を可能にしている

10

20

30

40

50

。成長ホルモンおよび安定化剤の製剤は、上述のHamilton et al.において実質的に開示されている。

【0008】

以上において要約した公開物に説明されている試みにもかかわらず、技術上の多大な改良の余地がある。本発明は、改良されたブタのソマトトロピン(pST)ポリペプチドを提供することによってこの必要性を充足させる。本発明は、とりわけpSTポリペプチドの活性および生成に関連する問題を解決し、向上した生物学的もしくは薬理的な特性および/または向上した治療半減期を有しているpSTポリペプチドの生成に関する。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、天然にコードされていない1つ以上のアミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドを提供する。

【0010】

いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは1つ以上の翻訳後修飾を含んでいる。いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、リンカー、重合体または生物学的に活性な分子と連結されている。いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、二機能性のリンカー、二機能性の重合体または少なくとも1つのさらなるpSTポリペプチドと連結されている。

【0011】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸は、水溶性重合体と連結されている。いくつかの実施形態において、上記水溶性重合体はポリ(エチレングリコール)部分を含んでいる。いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸は、リンカーを用いて上記水溶性重合体と連結されているか、または上記水溶性重合体と結合されている。いくつかの実施形態において、上記ポリ(エチレングリコール)分子は二機能性の重合体である。いくつかの実施形態において、上記二機能性の重合体は第2のポリペプチドと連結されている。いくつかの実施形態において、上記第2のポリペプチドはpSTポリペプチドである。

【0012】

いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、ポリ(エチレングリコール)部分を含んでいる水溶性重合体と連結されている少なくとも2つのアミノ酸を含んでいる。いくつかの実施形態において、1つ以上のアミノ酸は天然にコードされていないアミノ酸である。

【0013】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、pSTにおける以下の位置：1位より前(すなわちN末端)、1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、23位、24位、25位、26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、37位、38位、39位、40位、41位、42位、43位、44位、45位、46位、47位、48位、49位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、56位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、67位、68位、69位、70位、71位、72位、73位、74位、75位、76位、77位、78位、79位、80位、81位、82位、83位、84位、85位、86位、87位、88位、89位、90位、91位、92位、93位、94位、95位、96位、97位、98位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位、130位、131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位、138位、139位、140位、141位、142位、143位、144位、145位、146位

10

20

30

40

50

、 147位、148位、149位、150位、151位、152位、153位、154位  
 、 155位、156位、157位、158位、159位、160位、161位、162位  
 、 163位、164位、165位、166位、167位、168位、169位、170位  
 、 171位、172位、173位、174位、175位、176位、177位、178位  
 、 179位、180位、181位、182位、183位、184位、185位、186位  
 、 187位、188位、189位、190位、191位、192位（すなわちタンパク質  
 のカルボキシル末端）、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1）の1つ以上に組み込  
 まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上  
 は、p S Tにおける以下の位置：1位より前（すなわちN末端）、1位、3位、4位、  
 5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、1  
 6位、17位、18位、19位、20位、21位、23位、24位、25位、26位、2  
 7位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、3  
 7位、38位、39位、40位、41位、42位、43位、44位、45位、46位、4  
 7位、48位、49位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、56位、5  
 7位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、6  
 7位、68位、69位、70位、71位、72位、73位、74位、75位、76位、7  
 7位、78位、79位、80位、81位、82位、83位、84位、85位、86位、8  
 7位、88位、89位、90位、91位、92位、93位、94位、95位、96位、9  
 7位、98位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位  
 、 106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位  
 、 114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位  
 、 122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位  
 、 130位、131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位  
 、 138位、139位、140位、141位、142位、143位、144位、145位  
 、 146位、147位、148位、149位、150位、151位、152位、153位  
 、 154位、155位、156位、157位、158位、159位、160位、161位  
 、 162位、163位、164位、165位、166位、167位、168位、169位  
 、 170位、171位、172位、173位、174位、175位、176位、177位  
 、 178位、179位、180位、181位、182位、183位、184位、185位  
 、 186位、187位、188位、189位、190位、191位、192位（すなわち  
 タンパク質のカルボキシル末端）、およびこれらの任意の組合せ（配列番号2）の1つ以上  
 に組み込まれている。

10

20

30

40

50

【0014】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S  
 Tにおける以下の位置：29位、30位、33位、34位、35位、37位、39位、4  
 0位、49位、57位、59位、66位、69位、70位、71位、74位、88位、9  
 1位、92位、94位、95位、98位、99位、101位、103位、107位、10  
 8位、111位、122位、126位、129位、130位、131位、133位、13  
 4位、135位、136位、137位、139位、140位、141位、142位、14  
 3位、145位、147位、154位、155位、156位、159位、183位、18  
 6位、および187位（配列番号1）の1つ以上において置換されている。いくつかの実  
 施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tにおける以下  
 の位置：29位、30位、33位、34位、35位、37位、39位、40位、49位、  
 57位、59位、66位、69位、70位、71位、74位、88位、91位、92位、  
 94位、95位、98位、99位、101位、103位、107位、108位、111位  
 、 122位、126位、129位、130位、131位、133位、134位、135位  
 、 136位、137位、139位、140位、141位、142位、143位、145位  
 、 147位、154位、155位、156位、159位、183位、186位、および1  
 87位（配列番号2）の1つ以上において置換されている。いくつかの実施形態において  
 、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、以下の位置：ブタの成長ホルモンタ

ンパク質の 29 位、30 位、33 位、34 位、35 位、37 位、39 位、40 位、49 位、57 位、59 位、66 位、69 位、70 位、71 位、74 位、88 位、91 位、92 位、94 位、95 位、98 位、99 位、101 位、103 位、107 位、108 位、111 位、122 位、126 位、129 位、130 位、131 位、133 位、134 位、135 位、136 位、137 位、139 位、140 位、141 位、142 位、143 位、145 位、147 位、154 位、155 位、156 位、159 位、183 位、186 位、および 187 位の 1 つ以上において置換されている。

【0015】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の 1 つ以上は、以下の位置：29 位、33 位、35 位、37 位、39 位、49 位、57 位、69 位、70 位、71 位、74 位、88 位、91 位、92 位、94 位、95 位、98 位、99 位、101 位、103 位、107 位、108 位、111 位、129 位、130 位、131 位、133 位、134 位、135 位、136 位、137 位、139 位、140 位、141 位、142 位、143 位、145 位、147 位、154 位、155 位、156 位、186 位、および 187 位（配列番号 1）の 1 つ以上において置換されている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の 1 つ以上は、以下の位置：29 位、33 位、35 位、37 位、39 位、49 位、57 位、69 位、70 位、71 位、74 位、88 位、91 位、92 位、94 位、95 位、98 位、99 位、101 位、103 位、107 位、108 位、111 位、129 位、130 位、131 位、133 位、134 位、135 位、136 位、137 位、139 位、140 位、141 位、142 位、143 位、145 位、147 位、154 位、155 位、156 位、186 位、および 187 位（配列番号 2）の 1 つ以上において置換されている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の 1 つ以上は、以下の位置：ブタの成長ホルモタンパク質の 29 位、33 位、35 位、37 位、39 位、49 位、57 位、69 位、70 位、71 位、74 位、88 位、91 位、92 位、94 位、95 位、98 位、99 位、101 位、103 位、107 位、108 位、111 位、129 位、130 位、131 位、133 位、134 位、135 位、136 位、137 位、139 位、140 位、141 位、142 位、143 位、145 位、147 位、154 位、155 位、156 位、186 位、および 187 位の 1 つ以上において置換されている。

【0016】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の 1 つ以上は、以下の位置：35 位、88 位、91 位、92 位、94 位、95 位、99 位、101 位、103 位、111 位、131 位、133 位、134 位、135 位、136 位、139 位、140 位、143 位、145 位、および 155 位（配列番号 1）の 1 つ以上において置換されている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の 1 つ以上は、以下の位置：35 位、88 位、91 位、92 位、94 位、95 位、99 位、101 位、103 位、111 位、131 位、133 位、134 位、135 位、136 位、139 位、140 位、143 位、145 位、および 155 位（配列番号 2）の 1 つ以上において置換されている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の 1 つ以上は、以下の位置：ブタの成長ホルモタンパク質の 35 位、88 位、91 位、92 位、94 位、95 位、99 位、101 位、103 位、111 位、131 位、133 位、134 位、135 位、136 位、139 位、140 位、143 位、145 位、および 155 位の 1 つ以上において置換されている。

【0017】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の 1 つ以上は、以下の位置：30 位、74 位、103 位（配列番号 1）の 1 つ以上において置換されている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の 1 つ以上は、以下の位置：35 位、92 位、143 位、145 位（配列番号 1）の 1 つ以上において置換されている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の 1 つ以上は、以下の位置：30 位、74 位、103 位（配列番号 2）の 1 つ以上において置換されて

いる。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、以下の位置：35位、92位、143位、145位（配列番号2）の1つ以上において置換されている。

【0018】

いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、対応するpST（例えば、置換、付加または欠失のないpST）の親和性と比べたときに、pST受容体（例えばpghポリペプチド受容体）に対する当該pSTポリペプチドの親和性を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、pST（例えばpSTポリペプチド）は、置換、付加または欠失のない対応するpSTの安定性と比べたときに、当該pSTポリペプチドの安定性を向上させる置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、pSTは、置換、付加または欠失のない対応するpSTの免疫原性と比べたときに、当該pSTポリペプチドの免疫原性を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、pSTは、置換、付加または欠失のない対応するpSTの血中半減期または循環時間と比べたときに、当該pSTポリペプチドの血中半減期または循環時間を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、本発明は、置換、付加または欠失のない対応するpghの親和性と比べたときに、pghポリペプチド受容体に対する当該pghポリペプチドの親和性を調節する置換、付加または欠失を含んでいるpghポリペプチドを、包含している。いくつかの実施形態において、pghポリペプチドは、置換、付加または欠失のない対応するpghの安定性と比べたときに、当該pghポリペプチドの安定性を向上させる置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、pghポリペプチドは、置換、付加または欠失のない対応するpghの免疫原性と比べたときに、当該pghポリペプチドの免疫原性を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、pghポリペプチドは、置換、付加または欠失のない対応するpghの血中半減期または循環時間と比べたときに、当該pghポリペプチドの血中半減期または循環時間を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。

10

20

30

【0019】

親水性重合体のポリ（エチレングリコール）（PEGと省略される）の共有結合は、多くの生物学的に活性な分子（タンパク質、ペプチドおよび特定の疎水性分子が挙げられる）の水溶性を向上させるか、生体利用効率を向上させるか、血中半減期を上昇させるか、治療半減期を上昇させるか、免疫原性を調節するか、生物学的な活性を調節するか、または循環時間を延長させる方法である。PEGは、生体適合性であることが重要である場合、無毒性であることが重要である場合、および免疫原性のないことが重要である場合に、医薬品、人工移植片および他の用途において広く使用されている。PEGの所望の特性を最大化させるために、PEG重合体または生物学的に活性な分子に結合されている重合体の総分子量および水素化状態は、PEG重合体結合と一般的に関連している有利な性質（例えば、高い水溶性および長い循環半減期）を、親分子の生理活性に悪影響を与えることなく付与するために、十分に高い必要がある。

40

50

【0020】

PEG誘導体は、反応性の化学官能基（例えば、リジン残基、システイン残基、ヒスチジン残基、N末端部分および糖部分）を介して、生物学的に活性な分子としばしば連結される。多くの場合、タンパク質および他の分子は、重合体結合のために利用可能な反応性部位をわずかな数だけ有している。多くの場合、重合体結合を介した修飾に最も好適な部位は、受容体結合において重要な役割を果たしており、分子の生物学的な活性の維持に必須である。結果として多くの場合、生物学的に活性な分子上にあるそのような反応性部位に対する重合体鎖のランダムな結合は、重合体によって修飾された分子の生物学的な活性の有意な低下または完全な消失さえもたらさず（R. Clark et al., (1996), J. Biol. Chem., 271:21969-21977.）。所望の利点を標的分子に付与するために十分な重合体の分子量を有している抱合体を形成するために、従来技術の手法は、多くの重合体の腕の、分子に対するランダムな結合に典型的に関しており、これによって親分子の生理活性の低下また

は完全な喪失のリスクを増大させる。

【0021】

タンパク質に対するPEG誘導体の結合のための位置を形成する反応性部位は、タンパク質の構造によって決定される。タンパク質（酵素が挙げられる）は、 $H_2N-CHR-COOH$ の一般式を有している - アミノ酸の種々の配列物によって構成されている。1つのアミノ酸のアミノ部分( $H_2N-$ )は、隣接するアミノ酸のカルボキシ部分( $-COOH$ )と繋がって、 $-(NH-CHR-CO)_n-$ と表され得るアミド結合を形成する（ここで、下付き文字“n”は数百または数千に相当し得る）。Rによって表されるフラグメントは、タンパク質の生物学的な活性およびPEG誘導体の結合のための、反応性部位を含み得る。

10

【0022】

例えば、アミノ酸リジンの場合、 $\alpha$ 位および $\omega$ 位に $-NH_2$ 部分が存在している。 $\alpha$ 位の $-NH_2$ は、塩基性pHの条件における反応に使用可能である。PEGを用いたタンパク質の誘導体化の分野における技術の多くは、タンパク質に存在しているリジン残基の $\alpha$ 位の $-NH_2$ 部分に対する結合のためのPEG誘導体の開発に向けられている（“Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation”, Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, pp. 1-17）。しかし、これらのPEG誘導体のすべては、タンパク質の表面上に存在している多くのリジン残基のなかから選択的にそれらが導入され得ないという共通の制限を有している。これは、リジン残基がタンパク質の活性にとって重要である（例えば、酵素活性部位に存在している）場合、またはリジン残基が他の生物学的な分子とのタンパク質の相互作用を媒介する役割を果たしている場合に、重大な制限であり得る。

20

【0023】

タンパク質のPEG付加についてのこれまでの方法に対する等しく重要な第2の制限要因は、PEG誘導体が、所望の部位以外の残基との所望されない副反応を受け得ることである。ヒスチジンは、 $-N(H)-$ と構造的に表される反応性のイミノ部分を含んでおり、 $\alpha$ 位の $-NH_2$ と反応する化学的に反応性の多くの種はまた、 $-N(H)-$ と反応し得る。同様に、アミノ酸システインの側鎖は、 $-SH$ と構造的に表される自由なジスルフィド基を有している。いくつかの場合に、リジンの $\alpha$ 位の $-NH_2$ 基に向けられているPEG誘導体はまた、システイン、ヒスチジンまたは他の残基と反応する。これは、PEGによって誘導体化された生理活性分子の不均質かつ複合的な混合物を生成し得、標的化されている生理活性分子の活性の破壊のリスクをもたらし得る。タンパク質の単一部位に化学官能基を導入させ、それからタンパク質表面上の予想可能かつ明確な特定の部位における生理活性分子に対する1つ以上のPEG重合体の選択的な結合を可能にするPEG誘導体の開発が、所望されている。

30

【0024】

リジン残基に加えて、当該技術における多くの試みは、他のアミノ酸残基（システイン、ヒスチジンおよびN末端が挙げられる）を標的にする活性化されているPEG試薬の開発に向けられている（例えば、参照によってその全体が本明細書に援用される米国特許第6,610,281号、および“Polyethylene Glycol and Derivatives for Advanced PEGylation”, Nektar Molecular Engineering Catalog, 2003, pp. 1-17を参照すればよい）。システイン残基は、部位特異的な変異生成および当該技術に公知の他の手法を用いて、タンパク質の構造に部位特異的に導入され得、生じた使用可能なスルフィドリル部分は、チオール反応性の官能基を有しているPEG誘導体と反応させられ得る。しかし、この手法は、使用可能なジスルフィド基の導入が、生じたタンパク質の発現、フォールディングおよび安定性を悪化させ得る点において困難である。したがって、本発明は、タンパク質に対する1つ以上のPEG重合体の選択的な連結を可能にする化学官能基をpSTおよびpghに導入する好ましい手段を提供する。当該化学官能基は、同時に、タンパク質において典型的に見られるスルフィド基および他の化学官能基と、両立する（すなわち当該化学官能基と所望されない副反応を起こさない）。

40

50

## 【 0 0 2 5 】

当該技術の抽出から理解され得るように、タンパク質の側鎖（特に、リジンアミノ酸の側鎖上における -NH<sub>2</sub> 部分およびシステイン側鎖上における -SH 部分）に対する結合のために開発されているこれらの誘導体の多くは、それらの合成および使用において問題のあることが証明されている。これらのいくつかは、加水分解を受ける（したがって変質、分解する）か、または水性環境（例えば血流）において不安定な、タンパク質との不安定な結合を形成する。それらのいくつかは、安定な結合を形成するが、当該結合が形成される前に加水分解を受け、PEG 誘導体上における反応性基がタンパク質と結合し得る前に不活性化され得ることを意味する。いくつかは、いくらかの毒性を示し、したがってインビボにおける用途にとっての好適さに劣っている。いくつかは、実用的に有用であるには反応が緩やか過ぎる。いくつかは、タンパク質の活性を担っている部位に対する結合によってタンパク質の活性の消失を生じる。いくつかは、それらが結合する部位に特異的ではなく、所望の活性の消失および結果の再現性の不足を生じ得る。ポリ（エチレングリコール）部分を用いたタンパク質の修飾に関連する課題を克服するために、より好適な PEG 誘導体（例えば、参照によって本明細書に援用される米国特許第 6,602,498 号）とか、または分子および表面上にあるチオール部分と選択的に反応する PEG 誘導体（例えば、参照によって本明細書に援用される米国特許第 6,610,281 号）が、開発されている。選択的に反応して好適な化学結合を形成することを所望されるまで、生理学的環境において化学的に不活性な PEG 誘導体に対する当該技術における明らかな必要性が存在している。

10

20

## 【 0 0 2 6 】

ポリペプチドと共有結合的に連結される、ヒドロキシアルカリルスターチの抱合の使用および特にヒドロキシエチルスターチ（HES）の使用は、ポリペプチドの免疫原性および/またはアレルゲン性を大きく変更するために開示されている。HES 付加は、Fresenius Kabi AB に譲渡されている一連の特許出願（参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第 20050063943 号、米国特許出願公開第 20060121073 号、米国特許出願公開第 20010100163 号、米国特許出願公開第 20050234230 号、米国特許出願公開第 20050238723 号、米国特許出願公開第 20060019877 号、米国特許出願公開第 20070134197 号、米国特許出願公開第 20070087961 号、および米国特許第 7,285,661 号が挙げられる）に開示されている代替的な技術である。HES は、血漿量の上昇剤として臨床的に使用されている修飾されている天然の重合体であり、HES 付加は、薬剤の性質（例えば、薬物動態または水溶性）を変更するために製剤原料を HES 誘導体と結合する技術を代表している。また、これは、分子の向上した安定性および低下した腎クリアランスを介したタンパク質の血漿循環の延長を包含しており、向上した生物学的活性を生じる。さらに、免疫原性またはアレルゲン性は低減され得る。異なるパラメータ（例えば HES の分子量）を変更することによって、種々の HES 抱合体は特別に製造され得る。それにもかかわらず、ヒドロキシエチルスターチは、現在、利用可能な他の重合体のすべてと共通の不利益（多分散性）を共有している。重合体の抱合物は、平均値を中心にして分散している分子量を有している分子の混合物である。この均質性の不足は、低いレベルの化学的性質および生物学的性質を生じ、薬学的に活性な成分がその作用部位（受容体、酵素など）に到達することを妨げる。これらの場合、活性であるべき薬剤は、抱合されていない本来の形態における送達を必要としており、したがって代謝反応による重合体の切断は、薬学的有効性に必要とされている。

30

40

## 【 0 0 2 7 】

本発明のタンパク質技術は、タンパク質の他の部位特異的な修飾と関連する多くの制限を克服する。特に、新たな構成要素が、原核生物（*E. coli*）（例えば、L. Wang, et al., (2001), *Science* 292:498-500）および真核生物の *Saccharomyces cerevisiae*（*S. cerevisiae*）（例えば、J. Chin et al., *Science* 301:964-7 (2003)）のタンパク質の生合成機構に加えられている。当該生合成機構は、遺伝的にコードされていないアミノ酸の、タ

50

ンパク質に対するインピボにおける組込みを可能にしている。新規な化学的、物理的または生物学的な特性を有している新たなアミノ酸は、この方法論を用いて、E. coliおよび酵母におけるタンパク質に対して高い忠実さを有して効率的に組み込まれている（例えば、参照によってその全体が本明細書に援用される、J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027 ; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), ChemBioChem 3(11):1135-1137 ; J. W. Chin, et al., (2002), PNAS United States of America 99:11020-11024 ; およびL. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. Comm., 1:1-11を参照すればよい）。当該アミノ酸としては、光親和性標識の光異性化可能なアミノ酸、光架橋するアミノ酸（例えば、Chin, J. W., et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99:11020-11024 ; およびChin, J. W., et al., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027参照すればよい）、ケトアミノ酸、重原子を含有しているアミノ酸、および糖修飾されているアミノ酸が挙げられる。これらの研究は、タンパク質に見られない化学官能基（例えば、ケトン基、アルキン基およびアジド部分）を選択的かつ型通りに導入することが可能であることを証明している。当該化学官能基は、遺伝的にコードされている通常の20のアミノ酸に見られるすべての官能基に対して不活性であり、選択的かつ効率的に反応して、安定な共有結合を形成させるために使用され得る。

10

## 【0028】

遺伝的にコードされていないアミノ酸をタンパク質に組み込む能力は、天然に存在する官能基（例えば、リジンの位の $-NH_2$ 、システインのスルフィドリル $-SH$ 、およびヒスチジンのイミノ基など）に対する有用な代替物をもたらし得る化学官能基の導入を可能にする。一部の化学官能基は、遺伝的にコードされている通常の20のアミノ酸に見られる官能基に対して不活性であるが、効率的かつ正確に反応して安定な結合を形成すると知られている。例えば、アジド基およびアセチレン基は、触媒量の銅の存在下における水性条件においてヒュイゲン[3+2]環付加反応を受けると、当該技術において知られている（例えば、Tornoe, et al., (2002) J. Org. Chem. 67:3057-3064 ; およびRostovtsev, et al., (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599を参照すればよい）。例えば、タンパク質の構造にアジド部分を導入することによって、タンパク質に見られるアミン基、スルフィドリル基、カルボキシル基、水酸基に対して化学的に不活性であるが、効率的かつ速やかにアセチレン部分と反応して環付加生成物を形成する化学官能基を組み込むことが可能である。重要なことに、アセチレン部分の非存在下において、アジドは、他のタンパク質の側鎖の存在下および生理学的条件において化学的に不活性かつ非反応性であり続ける。

20

30

## 【0029】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの以下の位置：3位、7位、11位、33位、43位、58位、62位、67位、69位、98位、99位、123位、124位、125位、133位、134位、136位、141位、159位、166位、169位、170位、173位、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1）の1つ以上に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの以下の位置：3位、7位、11位、33位、43位、58位、62位、67位、69位、98位、99位、123位、124位、125位、133位、134位、136位、141位、159位、166位、169位、170位、173位、およびこれらの任意の組合せ（配列番号2）の1つ以上に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p g hの以下の位置：3位、7位、11位、33位、43位、58位、62位、67位、69位、98位、99位、123位、124位、125位、133位、134位、136位、141位、159位、166位、169位、170位、173位、およびこれらの任意の組合せの1つ以上に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの以下の位置：3位、7位、33位、43位、58位、62位、67位、69位、99位、123位、124位、133位、134位、141位、166位、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1）の1つ

40

50



1つ以上は、p S Tの98位(配列番号1)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの98位(配列番号2)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p g hの98位に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの99位(配列番号1)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの99位(配列番号2)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p g hの99位に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの103位(配列番号1)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの103位(配列番号2)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p g hの103位に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの105位(配列番号1)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの105位(配列番号2)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p g hの105位に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの137位(配列番号1)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの137位(配列番号2)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p g hの137位に組み込まれている。

10

20

#### 【0032】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの以下の位置：35位、91位、92位、94位、95位、99位、101位、133位、134位、138位、139位、140位、142位、144位、149位、150位、154位、またはこれらの任意の組合せ(配列番号1)の1つ以上に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの以下の位置：35位、91位、92位、94位、95位、99位、101位、133位、134位、138位、139位、140位、142位、144位、149位、150位、154位、またはこれらの任意の組合せ(配列番号2)の1つ以上に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p g hの以下の位置：Tyr35、Gln91、Phe92、Ser94、Arg95、Asn99、Leu101、Arg133、Ala134、Leu138、Lys139、Gln140、Tyr142、Lys144、Leu149、Arg150、Ala154、およびこれらの任意の組合せの1つ以上に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの138位(配列番号1)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの138位(配列番号2)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p g hの138位に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの142位(配列番号1)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの142位(配列番号2)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p g hの143位(配列番号1)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの143位(配列番号2)に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1

30

40

50

つ以上は、p S Tの1 4 4位（配列番号1）に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの1 4 4位（配列番号2）に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p g hの1 4 4位に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの1 4 6位（配列番号1）に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの1 4 6位（配列番号2）に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p g hの1 4 6位に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの1 4 8位（配列番号1）に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの1 4 8位（配列番号2）に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p g hの1 4 8位に組み込まれている。

10

## 【0033】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの1 5 3位（配列番号1）に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの1 5 3位（配列番号2）に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p g hの1 5 3位に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの1 5 4位（配列番号1）に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの1 5 4位（配列番号2）に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p g hの1 5 4位に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの1 5 8位（配列番号1）に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの1 5 8位（配列番号2）に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、p S Tの1 5 8位に組み込まれている。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドは、天然アミノ酸の置換、付加または欠失を1つ以上含んでいる。いくつかの実施形態において、非天然アミノ酸は、配列番号1または他のp S T配列もしくはp g h配列に対するN末端またはC末端にあるリーダー配列またはシグナル配列に組み込まれている。

20

30

## 【0034】

いくつかの実施形態において、これらの位置（1位より前（すなわちN末端）、1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、23位、24位、25位、26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、37位、38位、39位、40位、41位、42位、43位、44位、45位、46位、47位、48位、49位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、56位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、67位、68位、69位、70位、71位、72位、73位、74位、75位、76位、77位、78位、79位、80位、81位、82位、83位、84位、85位、86位、87位、88位、89位、90位、91位、92位、93位、94位、95位、96位、97位、98位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位、130位、131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位、138位、139位、140位、141位、142位、143位、144位、145位、146位、147位、148位、149位、150位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、157位、158位、159位、160

40

50

位、161位、162位、163位、164位、165位、166位、167位、168位、169位、170位、171位、172位、173位、174位、175位、176位、177位、178位、179位、180位、181位、182位、183位、184位、185位、186位、187位、188位、189位、190位、191位、192位（すなわちタンパク質のカルボキシル末端）、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1）が挙げられるが、これらに限定されない）の1つ以上における天然に存在しないアミノ酸は、水溶性重合体と連結されている。いくつかの実施形態において、これらの位置（1位より前（すなわちN末端）、1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、23位、24位、25位、26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、37位、38位、39位、40位、41位、42位、43位、44位、45位、46位、47位、48位、49位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、56位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、67位、68位、69位、70位、71位、72位、73位、74位、75位、76位、77位、78位、79位、80位、81位、82位、83位、84位、85位、86位、87位、88位、89位、90位、91位、92位、93位、94位、95位、96位、97位、98位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位、130位、131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位、138位、139位、140位、141位、142位、143位、144位、145位、146位、147位、148位、149位、150位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、157位、158位、159位、160位、161位、162位、163位、164位、165位、166位、167位、168位、169位、170位、171位、172位、173位、174位、175位、176位、177位、178位、179位、180位、181位、182位、183位、184位、185位、186位、187位、188位、189位、190位、191位、192位（すなわちタンパク質のカルボキシル末端）、およびこれらの任意の組合せ（配列番号2）が挙げられるが、これらに限定されない）の1つ以上における天然に存在しないアミノ酸は、水溶性重合体と連結されている。

10

20

30

【0035】

いくつかの実施形態において、これらの位置（35位、91位、92位、94位、95位、99位、101位、133位、134位、138位、139位、140位、142位、144位、149位、150位、154位、またはこれらの任意の組合せ（配列番号1）が挙げられるが、これらに限定されない）の1つ以上における天然に存在しないアミノ酸は、水溶性重合体と連結されている。いくつかの実施形態において、これらの位置（35位、91位、92位、94位、95位、99位、101位、133位、134位、138位、139位、140位、142位、144位、149位、150位、154位、またはこれらの任意の組合せ（配列番号2）が挙げられるが、これらに限定されない）の1つ以上における天然に存在しないアミノ酸は、水溶性重合体と連結されている。いくつかの実施形態において、これらの位置（Tyr35、Gln91、Phe92、Ser94、Arg95、Asn99、Leu101、Arg133、Ala134、Leu138、Lys139、Gln140、Tyr142、Lys144、Leu149、Arg150、Ala154、またはこれらの任意の組合せのpghの位置が挙げられるが、これらに限定されない）の1つ以上における天然に存在しないアミノ酸は、水溶性重合体と連結されている。

40

【0036】

いくつかの実施形態において、これらの位置（3位、7位、11位、33位、43位、58位、62位、67位、69位、98位、99位、123位、124位、125位、1

50

33位、134位、136位、141位、159位、166位、169位、170位、173位、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1）が挙げられるが、これらに限定されない）の1つ以上における天然に存在しないアミノ酸は、水溶性重合体と連結されている。いくつかの実施形態において、これらの位置（3位、7位、11位、33位、43位、58位、62位、67位、69位、98位、99位、123位、124位、125位、133位、134位、136位、141位、159位、166位、169位、170位、173位、およびこれらの任意の組合せ（配列番号2）が挙げられるが、これらに限定されない）の1つ以上における天然に存在しないアミノ酸は、水溶性重合体と連結されている。いくつかの実施形態において、これらの位置（3位、7位、11位、33位、43位、58位、62位、67位、69位、98位、99位、123位、124位、125位、133位、134位、136位、141位、159位、166位、169位、170位、173位、およびこれらの任意の組合せのpghの位置が挙げられるが、これらに限定されない）の1つ以上における天然に存在しないアミノ酸は、水溶性重合体と連結されている。いくつかの実施形態において、天然に存在しないアミノ酸は、pgh、配列番号または他のpST配列に対するN末端またはC末端のリーダー配列またはシグナル配列にあり、水溶性重合体と連結されている。

10

20

30

40

50

**【0037】**

いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、受容体または結合パートナー（タンパク質、ポリペプチド、小分子または核酸が挙げられるが、これらに限定されない）に対する当該pSTポリペプチドの親和性を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するpSTの安定性と比べて、当該pSTポリペプチドの安定性を向上させる置換、付加または欠失を含んでいる。安定性および/または可溶性は、当業者にとって公知の異なる多くのアッセイを用いて測定され得る。そのようなアッセイとしては、SE-HPLCおよびRP-HPLCが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するpSTの免疫原性と比べて、当該pSTポリペプチドの免疫原性を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するpSTの血中半減期または循環時間と比べて、当該pSTポリペプチドの血中半減期または循環時間を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。

**【0038】**

いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するpSTの水溶性と比べて、当該pSTポリペプチドの水溶性を向上させる置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するpSTの可溶性と比べて、宿主細胞において生成される当該pSTポリペプチドの可溶性を向上させる置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するpSTの発現または合成と比べて、当該pSTポリペプチドの、宿主細胞における発現またはインビボにおける合成を向上させる置換、付加または欠失を含んでいる。この置換を含んでいるpSTポリペプチドは、アゴニスト活性を維持しているか、または宿主細胞における発現レベルを維持しているか、もしくは向上させている。いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するpSTのプロテアーゼ耐性と比べて、当該pSTポリペプチドのプロテアーゼ耐性を向上させる置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するpSTとの相互作用による受容体の活性と比べて、受容体のシグナル伝達活性を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するpSTの結合と比べて、他の分子に対する当該pSTポリペプチドの結合を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するpSTの血液形成と比べて、血液形成を調節する置換、付加または欠

失を含んでいる。いくつかの実施形態において、p S Tポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp S Tの好中球の増殖と比べて、好中球の増殖を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、p S Tポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp S Tの好中球の成熟と比べて、好中球の成熟を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。

【0039】

いくつかの実施形態において、p S Tポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp S Tの適合性と比べて、薬学的な保存剤（例えば、m - クレゾール、フェノール、ベンジルアルコール）との当該p S Tポリペプチドの適合性を向上させる置換、付加または欠失を含んでいる。向上したこの適合性は、タンパク質の物理化学的特性および生物学的活性を保存期間中に維持する保存用の薬学的製剤の調製を可能にする。

10

【0040】

いくつかの実施形態において、操作されている結合の1つ以上は、1つ以上の非天然アミノ酸を用いて生成される。分子内結合は、多くの方法（好適な条件に基づくタンパク質における2つのアミノ酸の間における反応（1つまたは両方のアミノ酸は非天然アミノ酸であり得る）；リンカー、重合体または他の分子を用いた、好適な条件に基づく2つのアミノ酸（いずれもが天然にコードされ得るか、または天然にコードされ得ない）を用いた反応などが挙げられるが、これらに限定されない）において生成され得る。

【0041】

いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドは、受容体または結合パートナー（タンパク質、ポリペプチド、小分子または核酸が挙げられるが、これらに限定されない）に対する当該p g hポリペプチドの親和性を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp g hの安定性と比べて、当該p g hポリペプチドの安定性を向上させる置換、付加または欠失を含んでいる。安定性および/または可溶性は、当業者にとって公知の異なる多くのアッセイを用いて測定され得る。そのようなアッセイとしては、S E - H P L CおよびR P - H P L Cが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp g hの免疫原性と比べて、当該p g hポリペプチドの免疫原性を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp g hの血中半減期または循環時間と比べて、当該p g hポリペプチドの血中半減期または循環時間を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。

20

30

【0042】

いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp g hの水溶性と比べて、当該p g hポリペプチドの水溶性を向上させる置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp g hの可溶性と比べて、宿主細胞において生成される当該p g hポリペプチドの可溶性を向上させる置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp g hの発現または合成と比べて、当該p g hポリペプチドの、宿主細胞における発現またはインビボにおける合成を向上させる置換、付加または欠失を含んでいる。この置換を含んでいるp g hポリペプチドは、アゴニスト活性を維持しているか、または宿主細胞における発現レベルを維持しているか、もしくは向上させている。いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp g hのプロテアーゼ耐性と比べて、当該p g hポリペプチドのプロテアーゼ耐性を向上させる置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp g hとの相互作用による受容体の活性と比べて、受容体のシグナル伝達活性を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp g hの結合と比べて、他の分子に対する当該p g hポリペプチドの結合を調節する置換、付加または欠失

40

50

を含んでいる。いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp g hの血液形成と比べて、血液形成を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp g hの好中球の増殖と比べて、好中球の増殖を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp g hの好中球の成熟と比べて、好中球の成熟を調節する置換、付加または欠失を含んでいる。

【0043】

いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドは、置換、付加または欠失なしの対応するp g hの適合性と比べて、薬学的な保存剤（例えば、m-クレゾール、フェノール、ベンジルアルコール）との当該p g hポリペプチドの適合性を向上させる置換、付加または欠失を含んでいる。向上したこの適合性は、タンパク質の物理化学的特性および生物学的活性を保存期間中に維持する保存用の薬学的製剤の調製を可能にする。

10

【0044】

いくつかの実施形態において、p S Tポリペプチドにおける1つ以上のアミノ酸置換は、天然に存在するアミノ酸または天然に存在しないアミノ酸を用い得る。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの置換が天然にコードされていないアミノ酸を用いている場合、p S Tポリペプチドにおける上記アミノ酸置換は、天然に存在するアミノ酸または天然に存在しないアミノ酸を用い得る。いくつかの実施形態において、p S Tポリペプチドにおける1つ以上のアミノ酸置換は、天然に存在するアミノ酸の1つ以上を用い得、さらに少なくとも1つの置換は天然にコードされていないアミノ酸を用いている。

20

【0045】

いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドにおける1つ以上のアミノ酸置換は、天然に存在するアミノ酸または天然に存在しないアミノ酸を用い得る。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの置換が天然にコードされていないアミノ酸を用いている場合、p g hポリペプチドにおける上記アミノ酸置換は、天然に存在するアミノ酸または天然に存在しないアミノ酸を用い得る。いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドにおける1つ以上のアミノ酸置換は、天然に存在するアミノ酸の1つ以上を用い得、さらに少なくとも1つの置換は天然にコードされていないアミノ酸を用いている。

30

【0046】

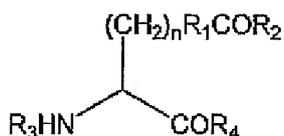
いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸は、カルボニル基、アセチル基、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基、セミカルバジド基、アジド基またはアルキン基を含んでいる。

【0047】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸はカルボニル基を含んでいる。いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上述アミノ酸は、以下の構造：

【0048】

【化1】



40

【0049】

（ここで、nは0～10であり；R1は、アルキル、アリール、置換されているアルキルまたは置換されているアリールであり；R2は、H、アルキル、アリール、置換されているアルキルまたは置換されているアリールであり；R3は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり；R4は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である）

を有している。

50

## 【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸はアミノオキシ基を含んでいる。いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸はヒドラジド基を含んでいる。いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸はヒドラジン基を含んでいる。いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸残基はセミカルバジド基を含んでいる。

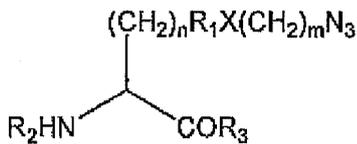
## 【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸はアジド基を含んでいる。いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸は、以下の構造：

10

## 【 0 0 5 2 】

## 【 化 2 】



## 【 0 0 5 3 】

(ここで、nは0～10であり；R1は、アルキル、アリール、置換されているアルキルもしくは置換されているアリールであるか、または存在しておらず；Xは、O、NもしくはSであるか、または存在しておらず；mは0～10であり；R2は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり；R3は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である)

20

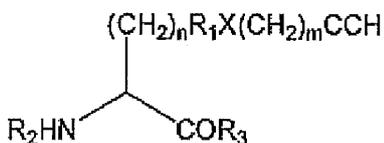
を有している。

## 【 0 0 5 4 】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸はアルキン基を含んでいる。いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸は、以下の構造：

## 【 0 0 5 5 】

## 【 化 3 】



30

## 【 0 0 5 6 】

(ここで、nは0～10であり；R1は、アルキル、アリール、置換されているアルキルまたは置換されているアリールであり；Xは、O、NもしくはSであるか、または存在しておらず；mは0～10であり；R2は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり；R3は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である)

40

を有している。

## 【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドは、pSTポリペプチドのアゴニスト、部分アゴニスト、アンタゴニスト、部分アンタゴニスト、または逆アゴニストである。いくつかの実施形態において、pSTポリペプチドのアゴニスト、部分アゴニスト、アンタゴニスト、部分アンタゴニスト、または逆アゴニストは、水溶性重合体と連結されている天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記水溶性重合体はポリ(エチレングリコール)部分を含んでいる。いくつかの実施形態において、アゴニスト、部分アゴニスト、アンタゴニスト、部分アンタゴニスト、または逆

50

アゴニストは、天然にコードされていないアミノ酸、および1つ以上の翻訳後修飾、リンカー、重合体もしくは生物学的に活性な分子を含んでいる。

【0058】

また、本発明は、配列番号1のポリペプチドをコードしている核酸と、ストリンジェントな条件のもとにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含んでいる単離されている核酸を提供する。また、本発明は、配列番号1として示されているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件のもとにハイブリダイズし、少なくとも1つのセクターコドンを含んでいるポリヌクレオチドを含んでいる単離されている核酸を提供する。また、本発明は、配列番号1として示されているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含んでいる単離されている核酸を提供する。また、本発明は、配列番号1として示されており、天然にコードされていないアミノ酸を1つ以上有しているポリペプチドをコードしているポリヌクレオチドを含んでいる単離されている核酸を提供する。多くの異なるポリヌクレオチドが本発明の任意のポリペプチドをコードし得ることは、当業者にとって容易に理解できる。

10

【0059】

いくつかの実施形態において、上記セクターコドンは、アンバーコドン、オーカーコドン、オパールコドン、ユニークコドン、レアコドン、5塩基コドン、および4塩基コドンからなる群から選択される。

【0060】

また、本発明は、水溶性重合体と連結されているpSTポリペプチドを作製する方法を提供する。いくつかの実施形態において、上記方法は、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる単離されているpSTポリペプチドを、天然にコードされていない当該アミノ酸と反応する部分を含んでいる水溶性重合体と接触させることを包含している。いくつかの実施形態において、上記pSTポリペプチドに組み込まれている天然にコードされていない上記アミノ酸は、水溶性重合体に対して反応性であり、通常20アミノ酸のうちいずれかに対して非反応性である。いくつかの実施形態において、上記pSTポリペプチドに組み込まれている天然にコードされていない上記アミノ酸は、リンカー、重合体または生物学的に活性な分子に対して反応性であり、通常20アミノ酸のうちいずれかに対して非反応性である。

20

【0061】

いくつかの実施形態において、上記水溶性重合体と連結されている上記pSTポリペプチドは、カルボニル含有アミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドを、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基またはセミカルバジド基を含んでいるポリ(エチレングリコール)分子と反応させることによって作製されている。いくつかの実施形態において、上記アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基またはセミカルバジド基は、アミド結合を介して上記ポリ(エチレングリコール)分子と連結されている。いくつかの実施形態において、上記アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基またはセミカルバジド基は、カルバメート結合を介して上記ポリ(エチレングリコール)分子と連結されている。

30

【0062】

いくつかの実施形態において、上記水溶性重合体と連結されているpSTポリペプチドは、カルボニル基を含んでいるポリ(エチレングリコール)分子を、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるポリペプチドと反応させることによって作製されている。天然にコードされていない当該アミノ酸は、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基またはセミカルバジド基を含んでいる。

40

【0063】

いくつかの実施形態において、上記水溶性重合体と連結されているpSTポリペプチドは、アルキン含有アミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドを、アジド部分を含んでいるポリ(エチレングリコール)分子と反応させることによって作製されている。いくつかの実施形態において、上記アジドまたはアルキン基は、アミド結合を介して上記ポリ(エチレングリコール)分子と連結されている。

50

## 【0064】

いくつかの実施形態において、上記水溶性重合体と連結されているpSTポリペプチドは、アジド含有アミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドを、アルキン部分を含んでいるポリ(エチレングリコール)分子と反応させることによって作製されている。いくつかの実施形態において、上記アジドまたはアルキンは、アミド結合を介して上記ポリ(エチレングリコール)分子と連結されている。

## 【0065】

また、本発明は、水溶性重合体と連結されているpghポリペプチドを作製する方法を提供する。いくつかの実施形態において、上記方法は、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる単離されているpghポリペプチドを、天然にコードされていない当該アミノ酸と反応する部分を含んでいる水溶性重合体と接触させることを包含している。いくつかの実施形態において、上記pghポリペプチドに組み込まれている天然にコードされていない上記アミノ酸は、水溶性重合体に対して反応性であり、通常20アミノ酸のうちいずれかに対して非反応性である。いくつかの実施形態において、上記pghポリペプチドに組み込まれている天然にコードされていない上記アミノ酸は、リンカー、重合体または生物学的に活性な分子に対して反応性であり、通常20アミノ酸のうちいずれかに対して非反応性である。

10

## 【0066】

いくつかの実施形態において、上記水溶性重合体と連結されている上記pghポリペプチドは、カルボニル含有アミノ酸を含んでいるpghポリペプチドを、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基またはセミカルバジド基を含んでいるポリ(エチレングリコール)分子と反応させることによって作製されている。いくつかの実施形態において、上記アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基またはセミカルバジド基は、アミド結合を介して上記ポリ(エチレングリコール)分子と連結されている。いくつかの実施形態において、上記アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基またはセミカルバジド基は、カルバメート結合を介して上記ポリ(エチレングリコール)分子と連結されている。

20

## 【0067】

いくつかの実施形態において、上記水溶性重合体と連結されているpghポリペプチドは、カルボニル基を含んでいるポリ(エチレングリコール)分子を、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるポリペプチドと反応させることによって作製されている。天然にコードされていない当該アミノ酸は、アミノオキシ基、ヒドラジン基、ヒドラジド基またはセミカルバジド基を含んでいる。

30

## 【0068】

いくつかの実施形態において、上記水溶性重合体と連結されているpghポリペプチドは、アルキン含有アミノ酸を含んでいるpghポリペプチドを、アジド部分を含んでいるポリ(エチレングリコール)分子と反応させることによって作製されている。いくつかの実施形態において、上記アジドまたはアルキンは、アミド結合を介して上記ポリ(エチレングリコール)分子と連結されている。

## 【0069】

いくつかの実施形態において、上記水溶性重合体と連結されているpghポリペプチドは、アジド含有アミノ酸を含んでいるpghポリペプチドを、アルキン部分を含んでいるポリ(エチレングリコール)分子と反応させることによって作製されている。いくつかの実施形態において、上記アジドまたはアルキンは、アミド結合を介して上記ポリ(エチレングリコール)分子と連結されている。

40

## 【0070】

いくつかの実施形態において、上記ポリ(エチレングリコール)分子は、約0.1kDaから約100kDaの分子量を有している。いくつかの実施形態において、上記ポリ(エチレングリコール)分子は、約0.1kDaから約50kDaの分子量を有している。

## 【0071】

いくつかの実施形態において、上記ポリ(エチレングリコール)分子は分枝鎖状の重合

50

体である。いくつかの実施形態において、上記ポリ（エチレングリコール）の枝分かれしている重合体の各分枝鎖は、1 k D a から 1 0 0 k D a または 1 k D a から 5 0 k D a の分子量を有している。

【0072】

いくつかの実施形態において、上記 p S T ポリペプチドと連結されている上記水溶性重合体は、ポリアルキレン部分を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記 p S T ポリペプチドに組み込まれている天然にコードされていない上記アミノ酸残基は、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジド基、ヒドラジン基、セミカルバジド基、アジド基またはアルキン基を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記 p S T ポリペプチドに組み込まれている天然にコードされていない上記アミノ酸残基は、カルボニル部分を含んでおり、上記水溶性重合体は、アミノオキシ基ヒドラジド基、ヒドラジン基またはセミカルバジド基を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記 p S T ポリペプチドに組み込まれている天然にコードされていない上記アミノ酸残基は、アルキン部分を含んでおり、上記水溶性重合体はアジド部分を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記 p S T ポリペプチドに組み込まれている天然にコードされていない上記アミノ酸残基は、アジド部分を含んでおり、上記水溶性重合体はアルキン部分を含んでいる。

10

【0073】

また、本発明は、p S T ポリペプチドおよび薬学的に受容可能な担体を含んでいる組成物を提供する。ここで、当該 p S T ポリペプチドは天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる。いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸は水溶性重合体と連結されている。

20

【0074】

また、本発明は、p S T ポリペプチドをコードしており、セレクターコドンを含んでいるポリヌクレオチドを含んでいる細胞を提供する。いくつかの実施形態において、上記細胞は、上記 p S T ポリペプチドに天然にコードされていないアミノ酸を置換するための直交性の（orthogonal）R N A 合成酵素および/または直交性の t R N A を含んでいる。

【0075】

また、本発明は、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる p S T ポリペプチドを作製する方法を提供する。いくつかの実施形態において、上記方法は、p S T ポリペプチドをコードしておりかつセレクターコドンを含んでいる1つ以上のポリヌクレオチド、直交性の R N A 合成酵素および直交性の t R N A を含んでいる細胞を、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる当該 p S T ポリペプチドの発現を可能にする条件において培養すること；ならびに上記細胞および/または培養培地から p S T ポリペプチドを精製することを包含している。

30

【0076】

また、本発明は、p S T ポリペプチドの治療半減期、血中半減期または循環時間を向上させる方法を提供する。また、本発明は、p S T ポリペプチドの免疫原性を調節する方法を提供する。いくつかの実施形態において、上記方法は、天然に存在する p S T ポリペプチドにおける1つ以上のアミノ酸を、天然にコードされていないアミノ酸に置換すること、および/または p S T ポリペプチドを、リンカー、重合体、水溶性重合体または生物学的に活性な分子と連結させることを包含している。

40

【0077】

また、本発明は患者を処置する方法を提供する。当該患者は、本発明の p S T ポリペプチドの治療有効量を用いたそのような処置を必要としている。いくつかの実施形態において、上記方法は、p S T ポリペプチドおよび薬学的に受容可能な担体を含んでいる薬学的組成物の治療有効量を上記患者に投与することを包含している。当該 p S T ポリペプチドは天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる。いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸は水溶性重合体と連結されている。いくつかの実施形態において、上記 p S T ポリペプチドは糖鎖付加されている。いくつかの実施形態において、上記 p S T ポリペプチドは糖鎖付加されていない。

50

## 【0078】

いくつかの実施形態において、p g hポリペプチドと連結されている上記水溶性重合体は、ポリアルキレングリコール部分を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記p g hポリペプチドに組み込まれている天然にコードされていない上記アミノ酸残基は、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジド基、ヒドラジン基、セミカルバジド基、アジド基またはアルキン基を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記p g hポリペプチドに組み込まれている天然にコードされていない上記アミノ酸残基は、カルボニル部分を含んでおり、上記水溶性重合体は、アミノオキシ基、ヒドラジド基、ヒドラジン基、またはセミカルバジド基を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記p g hポリペプチドに組み込まれている天然にコードされていない上記アミノ酸残基は、アルキン部分を含んでおり、上記水溶性重合体はアジド部分を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記p g hポリペプチドに組み込まれている天然にコードされていない上記アミノ酸残基は、アジド部分を含んでおり、上記水溶性重合体はアルキン部分を含んでいる。

10

## 【0079】

また、本発明は、p g hポリペプチドおよび薬学的に受容可能な担体を含んでいる組成物を提供する。当該p g hポリペプチドは天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる、いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸は水溶性重合体と連結されている。

## 【0080】

また、本発明は、p g hポリペプチドをコードしており、セレクターコドンを含んでいるポリヌクレオチドを含んでいる細胞を提供する。いくつかの実施形態において、上記細胞は、上記p g hポリペプチドに天然にコードされていないアミノ酸を置換するために、直交性のRNA合成酵素および/または直交性のtRNAを含んでいる。

20

## 【0081】

また、本発明は、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるp g hポリペプチドを作製する方法を提供する。いくつかの実施形態において、上記方法は、p g hポリペプチドをコードしておりかつセレクターコドンを含んでいる1つ以上のポリヌクレオチド、直交性のRNA合成酵素および直交性のtRNAを含んでいる細胞を、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる当該p g hポリペプチドの発現を可能にする条件において培養すること；ならびに上記細胞および/または培養培地からp g hポリペプチドを精製することを包含している。

30

## 【0082】

また、本発明は、p g hポリペプチドの治療半減期、血中半減期または循環時間を向上させる方法を提供する。また、本発明は、p g hポリペプチドの免疫原性を調節する方法を提供する。いくつかの実施形態において、上記方法は、天然に存在するp g hポリペプチドにおける1つ以上のアミノ酸を天然にコードされていないアミノ酸に置換すること、および/またはp g hポリペプチドを、リンカー、重合体、水溶性重合体または生物学的に活性な分子と連結させることを包含している。

## 【0083】

また、本発明は患者を処置する方法を提供する。当該患者は、本発明のp g hポリペプチドの治療有効量を用いたそのような処置を必要としている。いくつかの実施形態において、上記方法は、p g hポリペプチドおよび薬学的に受容可能な担体を含んでいる薬学的組成物の治療有効量を上記患者に投与することを包含している。当該p g hポリペプチドは天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる。いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸は水溶性重合体と連結されている。いくつかの実施形態において、上記p g hポリペプチドは糖鎖付加されている。いくつかの実施形態において、上記p g hポリペプチドは糖鎖付加されていない。

40

## 【0084】

また、本発明は、少なくとも1つのアミノ酸が天然にコードされていないアミノ酸によって置換されている点を除いて、配列番号1に示されている配列または任意の他のp S T

50

ポリペプチド配列を含んでいる p S T ポリペプチドを提供する。いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸は水溶性重合体と連結されている。いくつかの実施形態において、上記水溶性重合体はポリ（エチレングリコール）部分を含んでいる。いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸は、カルボニル基、アミノオキシ基、ヒドラジド基、ヒドラジン基、セミカルバジド基、アジド基またはアルキン基を含んでいる。

**【 0 0 8 5 】**

また、本発明は、薬学的に受容可能な担体および p S T ポリペプチドを含んでいる薬学的組成物を提供し、当該 p S T ポリペプチドは、配列番号 1 に示されている配列または任意の他の p S T ポリペプチド配列を含んでいる。ここで、少なくとも 1 つのアミノ酸は天然にコードされていないアミノ酸によって置換されている。また、本発明は、薬学的に受容可能な担体および p S T ポリペプチドを含んでいる薬学的組成物を提供する。当該 p S T ポリペプチドは、配列番号 1 に示されている配列を含んでいる。いくつかの実施形態において、天然にコードされていない上記アミノ酸は糖部分を含んでいる。いくつかの実施形態において、水溶性重合体は糖部分を介して上記ポリペプチドと連結されている。いくつかの実施形態において、リンカー、重合体または生物学的に活性な分子は、糖部分を介して上記 p S T ポリペプチドと連結されている。

10

**【 0 0 8 6 】**

また、本発明は、水溶性重合体を含んでいる p S T ポリペプチドを提供する。当該水溶性重合体は、単一のアミノ酸における p S T ポリペプチドとの共有結合によって連結されている。いくつかの実施形態において、上記水溶性重合体はポリ（エチレングリコール）部分を含んでいる。いくつかの実施形態において、上記水溶性重合体と共有結合的に連結されている上記アミノ酸は、上記ポリペプチドに存在している天然にコードされていないアミノ酸である。

20

**【 0 0 8 7 】**

本発明のいくつかの実施形態において、p S T ポリペプチドは、p S T ポリペプチドとの共有結合によって連結されている H E S を含んでおり、単一のアミノ酸において連結されている。いくつかの実施形態において、H E S と共有結合的に連結されている上記単一のアミノ酸は、上記 p S T ポリペプチドに存在している天然にコードされていないアミノ酸である。本発明のいくつかの実施形態において、p S T ポリペプチドは、複数の H E S 分子および / または P E G 分子と連結され得る天然にコードされていない複数のアミノ酸を含んでいる。

30

**【 0 0 8 8 】**

本発明は、少なくとも 1 つのリンカー、重合体または生物学的に活性な分子を含んでいる p S T ポリペプチドを提供する。ここで、上記リンカー、重合体または生物学的に活性な分子は、リボソームによって上記ポリペプチドに組み込まれている天然にコードされていないアミノ酸の官能基を介して、上記ポリペプチドと結合されている。いくつかの実施形態において、上記ポリペプチドには 1 つの P E G が付加されている。また、本発明は、天然にコードされていない 1 つ以上のアミノ酸と結合されているリンカー、重合体または生物学的に活性な分子を含んでいる p S T ポリペプチドを提供する。ここで、天然にコードされていない当該アミノ酸は、あらかじめ選択された部位において上記ポリペプチドにリボソームによって組み込まれている。

40

**【 0 0 8 9 】**

本発明の範囲に包含されるのは、p S T のコード領域とつながれている p S T のリーダー配列またはシグナル配列、ならびに p S T のコード領域とつながれている異種のシグナル配列である。選択される異種のリーダー配列またはシグナル配列は、例えば分泌するための宿主細胞の分泌系によって、認識されかつ処理され、おそらくシグナルペプチダーゼによって切断される配列である。本発明の p S T を用いて疾患または障害を処置する方法は、シグナル配列またはリーダー配列のあり、またはなしの p S T を用いて処置を実施することを意図されている。

50

## 【0090】

本発明は、動物における感染症を処置する方法を提供する。また、本発明は、ウシ科の動物における乳腺炎および輸送熱を処置するか、または予防する方法を提供する。また、本発明は、細菌の耐性株を形成することなく動物における感染症を処置する方法を提供する。また、本発明は、天然に存在する p S T または p g h の、一次構造配列の一部もしくはすべておよび 1 つ以上の生物学的な特性を有している、精製されかつ単離されているポリペプチド、ならびにそのような p S T または p g h をコードしている DNA 配列を提供する。

## 【0091】

本発明の他の実施形態において、1 つ以上のさらなるコロニー刺激因子は、ソマトロピンおよび/または成長ホルモン ( G - C S F、G M - C S F、M - C S F、およびマルチ C S F ( I L - 3 ) が挙げられるが、これらに限定されない) とともに、感染動物に対して投与される。これらは同時または別々に投与され得る。他の実施形態において、p S T 処理は予防的な様式において使用される。p S T は、ソマトロピンの上昇した血中濃度によって生じる促進された体重増加、向上した乳の生産、または生理学的な任意の所望の応答をもたらすために使用され得る。

10

## 【0092】

他の実施形態において、天然に存在しない 1 つ以上のアミノ酸を含んでいる p S T ポリペプチドの、他の分子 ( P E G が挙げられるが、これに限定されない) に対する抱合は、非天然アミノ酸に対する抱合のために利用される特異な化学反応のために、実質的に精製されている p S T をもたらす。天然に存在しない 1 つ以上のアミノ酸を含んでいる p S T ポリペプチドの、他の分子 (例えば P E G) に対する抱合は、実質的に同質の p S T をもたらすための抱合段階の前または後に実施される他の精製技術を用いて実施され得る。

20

## 【0093】

他の実施形態において、天然に存在しない 1 つ以上のアミノ酸を含んでいる p g h ポリペプチドの、他の分子 ( P E G が挙げられるが、これに限定されない) に対する抱合は、非天然アミノ酸に対する抱合のために利用される特異な化学反応のために、実質的に精製されている p g h をもたらす。天然に存在しない 1 つ以上のアミノ酸を含んでいる p g h ポリペプチドの、他の分子 (例えば P E G) に対する抱合は、実質的に同質の p S T をもたらすための抱合段階の前または後に実施される他の精製技術を用いて実施され得る。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0094】

【図 1】以下の位置 : Y 3 5、F 9 2、Y 1 1 1、G 1 3 1、R 1 3 4、K 1 4 0、Y 1 4 3 または K 1 4 5 のそれぞれにおいて、天然にコードされていないアミノ酸 p - アセチルフェニルアラニンを含んでいる h G H の発現を証明している、クーマシーブルー染色した S D S - P A G E を示す図である。

【図 2】パネル A および B は、天然にコードされていないアミノ酸 (パネル B) および野生型の h G H (パネル A) を含んでいる h G H の、I M 9 細胞における生物活性を示す図である。

【図 3】天然にコードされていないアミノ酸に対する P E G ( 5、2 0 および 3 0 k D a ) の共有結合によって P E G 付加されている天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる h G H の生成を証明している、クーマシーブルー染色した S D S - P A G E を示す図である。

40

【図 4】天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる h G H の種々の P E G 付加されている形態の、I M 9 細胞における生物活性を証明している図である。

【図 5】パネル A は、示されているトリプシン切断部位、および矢印を用いて特定されている非天然アミノ酸置換 F 9 2 p A F を有している h G H の一次構造を示す図である ( Becker et al. Biotechnol Appl Biochem. (1988) 10(4):326-337 から修正した図)。パネル B は、P E G 付加されている天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる h G H ポリペプチドから生成されたペプチド (表示 A)、天然にコードされていないアミノ酸を含

50

んでいる hGH ポリペプチドから生成されたペプチド (表示 B)、および WHO の rhGH から生成されたペプチド (表示 C) の重ね合わせたトリプシンマップを示す図である。

【図 6】パネル A および B は、精製された PEG - hGH ポリペプチドの、クーマシーブルー染色した SDS - PAGE 分析を示す図である。

【図 7】IM9 細胞における hGH の 2 量体分子の生物活性を示す図である。

【図 8】パネル A は、G120R 置換を有している hGH アンタゴニストによる pSTAT のリン酸化を測定する IM9 アッセイのデータを示す図である。パネル B は、同じ位置 (G120) に組み込まれている非天然アミノ酸を有している hGH ポリペプチドによる pSTAT のリン酸化を測定する IM9 アッセイのデータを示す図である。

【図 9】図 8 のパネル B に示されている hGH アンタゴニストの二量体が IM9 アッセイにおける生物活性を欠いていることを示す図である。

【図 10】PEG 付加されている天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる、hGH ポリペプチドのラットにおける血中半減期を、PEG 付加されていない hGH ポリペプチドのラットにおける血中半減期と比較する図である。

【図 11】PEG 付加されている天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる、hGH ポリペプチドのラットにおける血中半減期を比較する図である。

【図 12】PEG 付加されている天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる、hGH ポリペプチドのラットにおける血中半減期を比較する図である。ラットは 1 回に 2.1 mg/kg を用いて投与された。

【図 13】パネルは A、PEG 付加されている天然にコードされていないアミノ酸 (35 位、92 位) を含んでいる、hGH ポリペプチドの単回投与量の投与後におけるラットの体重増加に対する影響を示す図である。パネル B は、PEG 付加されている天然にコードされていないアミノ酸 (35 位、92 位) を含んでいる、hGH ポリペプチドの単回投与量の投与後における循環している血漿の IGF - 1 レベルに対する影響を示す図である。パネル C は、PEG 付加されている天然にコードされていないアミノ酸 (92 位、134 位、145 位、131 位、143 位) を含んでいる、hGH ポリペプチドの単回投与量の投与後におけるラットの体重増加に対する影響を示す図である。パネル D は、PEG 付加されている天然にコードされていないアミノ酸 (92 位、134 位、145 位、131 位、143 位) を含んでいる、hGH ポリペプチドの単回投与量の投与後における循環している血漿の IGF - 1 レベルに対する影響を示す図である。パネル E は、PEG 付加されている天然にコードされていないアミノ酸 (92 位、134 位、145 位、131 位、143 位) を含んでいる、hGH ポリペプチドの、ラットにおける血中半減期に対する影響を示す図である。

【図 14】30 kDa の直鎖状のモノメトキシ - ポリ (エチレングリコール) - 2 - アミノオキシエチルアミンカルバメートの塩酸塩の構造を示す図である。

【図 15】カルバメートが連結されている、オキシアミノ誘導体化 PEG の合成を例証している図である。

【図 16】非天然アミノ酸ポリペプチドを修飾して、PEG を含有している、オキシム連結された非天然アミノ酸ポリペプチドを形成するために使用され得る、PEG を含有している試薬の非限定的かつ例証的な例を示す図である。

【図 17】非天然アミノ酸ポリペプチドを修飾して、PEG を含有している、オキシム連結された非天然アミノ酸ポリペプチドを形成するために使用され得る、PEG を含有している試薬の合成の非限定的かつ例証的な例を示す図である。

【図 18】非天然アミノ酸ポリペプチドを修飾して、PEG を含有している、オキシム連結された非天然アミノ酸ポリペプチドを形成するために使用され得る、アミドに基づくヒドロキシアミン PEG を含有している試薬の合成の非限定的かつ例証的な例を示す図である。

【図 19】非天然アミノ酸ポリペプチドを修飾して、PEG を含有している、オキシム連結された非天然アミノ酸ポリペプチドを形成するために使用され得る、カルバメートに基づく PEG を含有している試薬の合成の非限定的かつ例証的な例を示す図である。

10

20

30

40

50

【図20】非天然アミノ酸ポリペプチドを修飾して、PEGを含有している、オキシム連結された非天然アミノ酸ポリペプチドを形成するために使用され得る、カルバメートに基づくPEGを含有している試薬の合成の非限定的かつ例証的な例を示す図である。

【図21】非天然アミノ酸ポリペプチドを修飾して、PEGを含有している、オキシム連結された非天然アミノ酸ポリペプチドを形成するために使用され得る、単純なPEGを含有している試薬の合成の非限定的かつ例証的な例を示す図である。

【図22】非天然アミノ酸ポリペプチドを修飾して、PEGを含有している、オキシム連結された非天然アミノ酸ポリペプチドを形成するために使用され得る、分枝鎖状のPEGを含有している試薬の合成、およびカルボニルに基づく非天然アミノ酸ポリペプチドを修飾するためのそのような試薬の1つの使用の非限定的かつ例証的な例を示す図である。

【図23】ヒト成長ホルモンおよびpSTの配列の整列化を示す図である。

【図24】例えば1つ以上の位置がpAFを用いて置換されている一実施形態において、置換され得るpSTにおける位置の構造を示す図である。

【図25】ヒト成長因子受容体を用いてモデル化されているブタのソマトトロピンの構造を示す図である。

【図26】ヒト成長因子受容体を用いてモデル化されているブタのソマトトロピンの代替的な構造を示す図である。

【図27】pST発現のために使用されたE9RSを有しているpVK10-pSTを示す図である。

【図28】天然にコードされていない関連するアミノ酸（パラ-アセチルPhe（すなわち、パラ-アセチルフェニルアラニン、pAFまたはpAcF）；パラ-アミノPhe（すなわち、パラ-アミノフェニルアラニン、pAF2またはpAnF）；パラ-アジドPhe（すなわち、パラ-アジドフェニルアラニン、pAF3またはpAzF）が挙げられるが、これらに限定されない）を用いた化学反応を示す図である。

【図29】標準的な処理条件のもとに（パネルA）か、および処理内に可溶化還元段階を有している（パネルB）、pST-F92材料の実施例3から得られたRP-HPLC分析を示す図である。

【図30】各ゲルの最も左にあるコントロールおよび標識されている列1~4を有している、実施例3から得られたPEG反応のSDS-PAGE分析を示す図である。列1~4は、（1）あらかじめPEG付加した材料；（2）0.9：1のPEG：タンパク質の比を有しているPEG反応；（3）1：1のPEG：タンパク質の比を有しているPEG反応；（4）1.5：1のPEG：タンパク質の比を有しているPEG反応である。

【発明を実施するための形態】

【0095】

〔定義〕

本発明は、本明細書に記載の特定の方法論、手順、細胞株、コンストラクトおよび試薬に制限されず、よって変更可能であることが理解されるべきである。また、本明細書に使用されている専門用語は、特定の実施形態のみを説明することを目的としており、添付の特許請求の範囲によってのみ制限される本発明の範囲を制限することを意図されていないことが理解される。

【0096】

本明細書および添付の特許請求の範囲に使用されるとき、単数形“a”、“an”、および“the”は、前後関係から1つのものを明確に示している場合を除いて、複数を指すことを包含している。したがって例えば、“pST”、“ウシST”、“ブタのソマトトロピン”、“b.ソマトトロピンポリペプチド”または“STポリペプチド”ならびに種々のハイフンありの形式およびハイフンなしの形式に対する言及は、1つ以上のそのようなタンパク質を指し、当業者にとって公知のこれらの等価物などを包含している。

【0097】

特に規定のない限り、本明細書に使用されている技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって通常に理解されるような、同じ意味を有している。任意

10

20

30

40

50

の方法、装置および物質、本明細書に記載のそれらの類似物または等価物が、本発明の実施または試験に使用され得るが、好ましい方法、装置および材料が、これから説明される。

#### 【0098】

本明細書に述べられている公報および特許は、例えば、現在、説明されている本発明と関連して使用され得る公報に説明されているコンストラクトおよび方法論を説明し、開示することを目的として、参照によって本明細書に援用される。本明細書に述べられている公報において、本願の出願日の前における開示内容が単に規定される。本明細書において、先の発明によって当該開示に先立つためにか、または任意の他の理由によって、発明者に権利が与えられないことの承認として解釈されるべきではない。

10

#### 【0099】

“実質的に精製された”という用語は、天然に存在する環境（すなわち、天然の細胞またはpSTポリペプチドが組換え的に生成される場合における宿主細胞）に見られるときに、pSTタンパク質と付随するか、または相互作用する化合物を、実質的にか、またはほとんど含み得ないpSTポリペプチドを指す。細胞性物質を実質的に含み得ないpSTポリペプチドとしては、混入しているタンパク質が、（乾燥重量として）約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、または約1%未満である、タンパク質の調製物が挙げられる。pSTポリペプチドまたはこれらのバリエーションが、宿主細胞において組換え的に生成される場合に、タンパク質は、細胞の乾燥重量の約30%、約25%、約20%、約15%、約10%、約5%、約4%、約3%、約2%、または約1%もしくはそれ未満において存在し得る。pSTポリペプチドまたはこれらのバリエーションが、宿主細胞において組換え的に生成される場合に、タンパク質は、細胞の乾燥重量の約5g/l、約4g/l、約3g/l、約2g/l、約1g/l、約750mg/l、約500mg/l、約250mg/l、約100mg/l、約50mg/l、約10mg/l、または約1mg/lもしくはそれ未満において培養培地に存在し得る。したがって、本発明の方法によって生成される“実質的に精製された”pSTポリペプチドは、適切な方法（例えば、SDS/PAGE分析、RP-HPLC、SECおよびキャピラリー電気泳動）によって決定されるときに、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%の純度、詳細には少なくとも約75%、80%、85%の純度、そしてより詳細には少なくとも約90%の純度、少なくとも約95%の純度、少なくとも約99%またはそれ以上の純度を有している。

20

30

#### 【0100】

“組換え宿主細胞”または“宿主細胞”は、挿入に使用される方法（例えば、直接的な取り込み、形質導入、f-交配（f-mating）、または組換え宿主細胞を作り出すために使用される他の公知の方法）にかかわらず、外来性のポリヌクレオチドを含んでいる細胞を指す。外来性のポリヌクレオチドは、宿主のゲノムに組み込まれないベクター（例えばプラスミド）として維持され得るか、または宿主のゲノムに組み込まれ得る。

#### 【0101】

本明細書に使用されるとき、“培地”または“培養液”という用語は、任意の宿主細胞（細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、植物宿主細胞、真核生物宿主細胞、哺乳類宿主細胞、CHO細胞、原核生物宿主細胞、E. coli宿主細胞、またはPseudomonas宿主細胞が挙げられる）、および細胞内容物を保持し得るか、または含有し得る任意の培養培地、溶液、固体、半固体、または固定担体を包含している。したがって、当該用語は、宿主細胞が培養されている培地（例えば、pSTポリペプチドが分泌されている培地（増殖段階の前または後のいずれかにおける培地））を包含し得る。また、当該用語は、pSTポリペプチドが細胞内において生成され、宿主細胞が溶解されるか、または崩壊させられてpSTポリペプチドを放出する場合に、宿主細胞溶解液を含有している緩衝液または試薬を包含し得る。

40

50

## 【0102】

タンパク質のフォールディングに関して本明細書に使用されるとき、“還元剤”は、還元状態においてスルフィドリル基を維持し、分子内または分子間のジスルフィド結合を還元する、任意の化合物または物質と定義づけられる。好適な還元剤としては、ジチオスレイトール(DTT)、2-メルカプトエタノール、ジチオエリスリトール、システイン、システアミン(2-アミノエタンチオール)および還元グルタチオンが挙げられるが、これらに限定されない。広範な還元剤が本発明の方法および組成物における使用に好適であることは、当業者にとって容易に理解される。

## 【0103】

タンパク質のフォールディングに関して本明細書に使用されるとき、“酸化剤”は、酸化される化合物から電子を除去できる任意の化合物または物質と定義づけられる。好適な酸化剤としては、酸化グルタチオン、シスチン、シスタミン、酸化ジチオスレイトール、酸化エリスレイトールおよび酸素が挙げられるが、これらに限定されない。広範な酸化剤が本発明の方法における使用に好適であることは、当業者にとって容易に理解される。

10

## 【0104】

本明細書に使用されるとき、“変性剤(denaturing agent)”“変性剤(denaturant)”は、タンパク質の可逆的な変性を引き起こす任意の化合物または物質と定義づけられる。変性剤または変性剤の強さは、特定の変性剤または変性剤の性質および濃度の両方によって決定される。好適な変性剤または変性剤は、カオトロップ、界面活性剤、有機溶媒、水混和性溶媒、リン脂質または当該試薬の2つ以上の組合せであり得る。好適なカオトロップとしては、尿素、グアジニンおよびチオシアン酸ナトリウムが挙げられるが、これらに限定されない。有用な界面活性剤としては、ドデシル硫酸ナトリウム、またはポリオキシエチレンエーテル(例えば、TweenまたはTriton界面活性剤)といった強力な界面活性剤、サルコシル(Sarkosyl)、穏やかな非イオン性の界面活性剤(例えば、ジギトニン)、N->2,3-(ジオレイオキシ)-プロピル-N,N,N-トリメチルアンモニウムといった穏やかなカチオン性の界面活性剤、穏やかなイオン性の界面活性剤(例えば、コール酸ナトリウムまたはデオキシコール酸ナトリウム)または両性イオン性の界面活性(スルホベタイン(ツヴァイタージェント)、3-(3-クロルアミドプロピル)ジメチルアンモニオ-1-プロパン硫酸塩(CHAPS)、3-(3-クロルアミドプロピル)ジメチルアンモニオ-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホン酸塩(CHAPSO)が挙げられるが、これらに限定されない)が挙げられ得るが、これらに限定されない。アセトニトリル、低級アルカノール(特にエタノールまたはイソプロパノールといったC<sub>2</sub>~C<sub>4</sub>アルカノール)、または低級アルカンジオール(特にエチレングリコールといったC<sub>2</sub>~C<sub>4</sub>アルカンジオール)といった水混和性の有機溶媒が、変性剤として使用され得る。本発明において有用なリン脂質は、天然に存在するリン脂質(例えばホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリンおよびホスファチジルイノシトール)であり得るか、または合成リン脂質の誘導体(例えばジヘキサノイルホスファチジルコリンまたはジヘプタノイルホスファチジルコリン)もしくはバリエーションであり得る。

20

30

## 【0105】

本明細書に使用されるとき、“リフォールディング”は、ジスルフィド結合を含んでいるポリペプチドを、不適切に折りたたまれた状態または変性された状態から、ジスルフィド結合に関して本来の立体構造または適切に折りたたまれた立体構造に変形させる任意の過程、反応または方法を説明する。

40

## 【0106】

本明細書に使用されるとき、“コフォールディング(cofolding)”は、互いに相互作用する少なくとも2つのポリペプチドをとともに、変性されたポリペプチドまたは不適切に折りたたまれたポリペプチドを、本来の適切に折りたたまれたポリペプチドに変形させるリフォールディングの過程、反応または方法を特に指す。

## 【0107】

50

本明細書に使用されるとき、“ブタのソマトトロピン”、“ウシST”または“pST”は、pSTの少なくとも1つの生物学的な活性を有しているそれらのポリペプチドおよびタンパク質、ならびにその生物学的な活性、およびさらにそれらの合成方法もしくは作製方法（組換え法（cDNA、ゲノムDNA、合成DNAまたは核酸の他の形態のいずれかから生成される）、合成法、遺伝子導入法および遺伝子活性化法が挙げられるが、これらに限定されない）にかかわらず、pgh、pgh類似物、pSTのアイソフォーム、pghのアイソフォーム、pSTの模倣物、pghの模倣物、pSTの断片、pghの断片、ハイブリッドpSTタンパク質、ハイブリッドpghタンパク質、融合タンパク質のオリゴマー、融合タンパク質の多量体、相同物、糖鎖付加型のバリエーション、および突然変異タンパク質を包含する。pSTの特定の例としては、pST変異体、改変されている糖鎖付加されたpST、およびPEG付加されているpST類似物が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

**【0108】**

“ブタのソマトトロピン”または“pST”は、本願を通して説明されている上述のようなウシpSTまたはブタのソマトトロピン、ならびに天然に存在するpSTの少なくとも1つの生物学的活性を維持しているポリペプチドを指す。pSTポリペプチドは、天然に存在するブタのソマトトロピンの薬学的に受容可能な塩およびプロドラッグ、および当該塩のプロドラッグ、多形体、水和物、溶媒和物、生物学的に活性な断片、生物学的に活性なバリエーションおよび立体異性体、このほかに天然に存在するブタのソマトトロピンのアゴニスト、模倣物およびアンタゴニストならびにこれらのポリペプチド融合物を包含している。アミノ末端、カルボキシ末端、またはその両方にさらなるアミノ酸を含んでいる融合物が“pSTポリペプチド”という用語によって包含される。例示的な融合物としては、例えば、pSTの成熟形態の組換え発現から生じるpST（例えば、配列番号1または2におけるポリペプチド）のN末端にメチオニンが連結されているメチオニルpST、精製のための融合物（ポリヒスチジンまたは親和性エピトープとの融合物が挙げられるが、これらに限定されない）、血清アルブミン結合ペプチドとの融合物、および血清タンパク質（例えば血清アルブミン）との融合物が挙げられるが、これらに限定されない。全長および成熟形態にとっての天然に存在するpSTの核酸配列およびアミノ酸配列は、バリエーション（例えば、単一アミノ酸のバリエーションおよびスプライスバリエーション）として公知である。例えば、成熟pSTのアミノ酸配列およびメチオニルpSTのアミノ酸配列については、本明細書の配列番号1を参照すればよい。

**【0109】**

pSTにおける種々のアミノ酸位置における置換が説明されている。置換（薬学的な安定性を調節する置換、アゴニスト活性を増大させる置換、プロテアーゼ耐性を増大させる置換、ポリペプチドをアンタゴニストに変換する置換などが挙げられるが、これらに限定されない）は、“pSTポリペプチド”、“ブタのソマトトロピンポリペプチド”、“ウシのST”または“pST”という用語によって包含されている。

**【0110】**

さらなる局面において、本発明は、バリエーションタンパク質をコードしている組換え核酸、バリエーション核酸を含んでいる発現ベクター、バリエーション核酸および/または発現ベクターを含んでいる宿主細胞、ならびにバリエーションタンパク質を生成する方法を提供する。さらなる局面において、本発明は、治療有効量のバリエーションタンパク質を、通常は薬学的な担体とともに動物に対して投与することによって、感染症を処置することを提供する。

**【0111】**

いくつかの実施形態において、本発明のpSTポリペプチドは、配列番号1またはpSTポリペプチドの任意の他の配列と実質的に同一である。変異体を含めたpSTポリペプチドをコードしている核酸分子、およびpSTポリペプチドを発現させ、精製する方法は公知である。

**【0112】**

また、“pSTポリペプチド”という用語は、薬学的に受容可能な塩およびプロドラッ

グ、ならびに塩のプロドラッグ、天然に存在する p S T の多形体、水和物、溶媒和物、生物学的に活性な断片、生物学的に活性なバリエーションおよび立体異性体、この他に天然に存在する p S T のアゴニスト、模倣物およびアンタゴニストバリエーションおよびこれらの融合ポリペプチドを包含している。アミノ末端、カルボキシル末端または両方に付加的なアミノ酸を含んでいる融合物は、“ p S T ポリペプチド ” という用語によって包含されている。例示的な融合物としては、例えば、リーダー配列もしくはシグナル配列またはこれらの一部を欠いている成熟形態の p S T の組換え体発現を生じる p S T の N 末端にメチオニンが結合しているメチオニル p S T (メチオニンが p S T の N 末端に結合しており、組換え体発現によって生じる)、精製を目的とする融合物 (ポリヒスチジンまたは親和性エプープが挙げられるが、これらに限定されない)、血清アルブミン結合ペプチドとの融合物 10 および血清タンパク質 (例えば、血清アルブミン) との融合物が挙げられるが、これらに限定されない。参照によって本明細書に援用される米国特許第 5,750,373 号には、それぞれの受容体分子に対する変更されている結合特性を有している新規なタンパク質 (例えば成長ホルモン) および抗体断片のバリエーションを選択する方法について記載されている。当該方法は、所望のタンパク質をコードしている遺伝子を、糸状ファージ M13 の遺伝子 I I I コートタンパク質のカルボキシル末端ドメインと融合させることを包含している。キメラ分子は p S T および 1 つ以上の他の分子を含んでいる。キメラ分子は、p S T ならびに (複数の) 他の分子の一方または両方の特定の領域または断片を含んでいる。そのような任意の断片は、標準的な生化学的方法、または断片をコードしているポリヌクレオチドを発現させることによって、タンパク質から調製され得る。p S T またはこれら 20 の断片は、ヒト血清アルブミン (HSA)、Fc またはこれらの一部を含んでいる融合タンパク質として生成され得る。そのような融合構築物は、真核宿主細胞における p S T またはこれら断片の発現を増強するために好適である。例示的な HSA タンパク質としては、参照によって本明細書に援用される米国特許第 5,766,883 号および国際公開第 97/24445 号に開示されているような N 末端のポリペプチド (1~369 位のアミノ酸、1~419 位のアミノ酸、および 1 位のアミノ酸から始まる中間の長さのアミノ酸) が挙げられる。他のキメラタンパク質は、HSA の C 末端および N 末端のそれぞれに結合されている p S T をともなった HSA タンパク質、またはこれら断片を含み得る。他の融合物は、p S T の、(a) 免疫グロブリンの Fc 部分、(b) 免疫グロブリンの Fc 部分の類似物および (c) 免疫グロブリンの Fc 部分の断片との融合によって作製され 30 得る。

#### 【0113】

種々の参考文献には、重合体の抱合または糖鎖付加によるポリペプチド修飾が開示されている。“ p S T ポリペプチド ” という用語は、重合体 (例えば PEG) と抱合されているポリペプチドを包含しており、システイン、リジンまたは他の残基の付加的な 1 つ以上の誘導体化によって構成され得る。さらに、p S T ポリペプチドは、リンカーまたは重合体を含み得、リンカーまたは重合体が抱合されているアミノ酸は、本発明に係る非天然アミノ酸であり得るか、または当該 p S T ポリペプチドは、当該分野に公知の技術 (例えば、リジンまたはシステインに対する結合) を用いて天然にコードされているアミノ酸と抱合されている。 40

#### 【0114】

ポリペプチドの重合体修飾について報告がなされている。IFN は、成長ホルモンスーパーファミリーに属するポリペプチドの一例として述べられている。国際公開第 00/23114 号には、糖鎖付加または PEG 付加されている IFN が開示されている。国際公開第 00/23472 号には IFN の融合タンパク質が開示されている。米国特許第 4,904,584 号には、PEG 付加されているリジン減少ポリペプチドが開示されており、少なくとも 1 つのリジンが、欠失されているか、または任意の他のアミノ酸残基を用いて置換されている。国際公開第 99/67291 号には、タンパク質を PEG と抱合する手法が開示されており、ここで、タンパク質における少なくとも 1 つアミノ酸残基が欠失されており、タンパク質は、タンパク質に対する抱合を実現する十分な条件におい 50

てPEGと抱合されている。国際公開第99/03887号には、成長ホルモンスーパーファミリーに属すポリペプチドのPEG付加バリエーションが開示されており、ここで、システイン残基は、ポリペプチドの特定の領域に位置している非必須のアミノ酸残基を用いて置換されている。国際公開第00/26534号には、少なくとも1つの付加的な糖鎖付加部位を含んでいる対応する親ポリペプチドと比べて、低いアレルギー性を有している糖鎖付加されているポリペプチドを生成する方法が開示されている。

#### 【0115】

また、“pSTポリペプチド”という用語は、糖鎖付加されているpST（任意のアミノ酸位置に糖鎖付加されているポリペプチド、N結合型またはO結合型のポリペプチドの糖鎖付加形態が挙げられるが、これらに限定されない）を包含している。また、単一のヌクレオチドの変更を含んでいるバリエーションは、pSTポリペプチドの生物学的に活性なバリエーションと見なされる。さらに、スプライスバリエーションもまた包含されている。また、“pSTポリペプチド”という用語は、化学的な手法によって結合されているか、または融合タンパク質として発現されている、任意の1つ以上のpSTもしくは他のポリペプチド、タンパク質、炭化水素、重合体、小分子、リンカー、リガンド、または任意の種類他の活性な分子の、pSTのヘテロ二量体、ホモ二量体、ヘテロ多量体またはホモ多量体（参照によって本明細書に援用される、米国特許第6,261,550号；米国特許第6,166,183号；米国特許第6,204,247号；米国特許第6,261,550号；米国特許第6,017,876号を参照すればよい）、この他に、例えば特定の欠失または他の修飾を含んでいる、生物学的な活性を維持しているポリペプチド類似物（参照によって本明細書に援用される、米国特許第6,261,550号；米国特許第6,004,548号；米国特許第6,632,426号）を包含している。

10

20

#### 【0116】

本明細書に記載のpSTにおけるアミノ酸位置に対するすべての言及は、特に指定（すなわち対照が配列番号2または他のpST配列に基づくとの記載）がない限り、配列番号1における位置に基づいている。例えば、配列番号1の1位におけるアミノ酸はスレオニンであり、対応するスレオニンは配列番号2の2位に位置している。当業者は、配列番号1における位置に対応するアミノ酸位置が、任意の他のpST分子（例えば配列番号2）において容易に同定され得ることを理解する。当業者は、配列番号1または任意の他のpST配列の位置に対応するアミノ酸位置が、任意の他のpST分子（例えば、pSTの融合物、バリエーション、断片など）において容易に同定され得ることを理解する。例えば、配列整列化プログラム（例えばBLAST）を利用して、整列化し、配列番号1または他のpST配列における位置と対応するタンパク質における特定の位置を同定し得る。また、配列番号1または他のpST配列における、本明細書に記載のアミノ酸の置換、欠失または付加は、本明細書に記載されているか、または当該分野に公知であるpSTの融合物、バリエーション、断片などの対応する位置における置換、欠失または付加を指すことを意図されており、本発明によって明らかに包含されている。

30

#### 【0117】

“pSTポリペプチド”または“pST”という用語は、1つ以上のアミノ酸の置換、付加または欠失を含んでいるpSTポリペプチドを包含している。本発明のpSTポリペプチドは、1つ以上の非天然アミノ酸修飾と関連している、天然アミノ酸の1つ以上の修飾から構成され得る。天然に存在するpSTポリペプチドにおける広範な位置にある例示的な置換が説明されており、当該置換としては、pSTポリペプチドの薬学的な安定性を調節する置換、生物学的な活性の1つ以上を調節する（例えば、アゴニスト活性を向上させる、ポリペプチドの可溶性を向上させる、プロテアーゼ感受性を低下させる、ポリペプチドをアンタゴニストに変換するなどが挙げられるが、これらに限定されない）置換が挙げられるが、これらに限定されない。当該置換は“pSTポリペプチド”という用語によって包含されている。いくつかの実施形態において、pSTアンタゴニストは、pST分子の受容体結合領域に存在しており、水溶性重合体と連結されている天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる。

40

50

## 【0118】

いくつかの実施形態において、p S Tポリペプチドは、p S Tポリペプチドの生物学的な活性を調節する付加、置換または欠失をさらに含んでいる。いくつかの実施形態において、p S Tポリペプチドは、p S Tポリペプチドによる好中球の増殖、機能および/または分化を調節する付加、置換または欠失をさらに含んでいる。例えば、当該付加、置換または欠失はp S Tの1つ以上の性質または活性を調節し得る。例えば、当該付加、置換または欠失は、ポリペプチドの受容体に対する親和性を調節し得るか、循環半減期を調節し得るか、治療半減期を調節し得るか、安定性を調節し得るか、プロテアーゼによる分解を調節し得るか、用量を調節し得るか、放出もしくは生体利用効率を調節し得るか、精製を容易にし得るか、または特定の投与経路を改善し得るか、もしくは変更し得る。同様に、p S Tポリペプチドは、プロテアーゼ切断配列、反応性基、抗体結合領域（F L A GまたはポリH i sが挙げられるが、これらに限定されない）、または他の親和性に基づく配列（F L A G、ポリH i s、G S Tなどが挙げられるが、これらに限定されない）、もしくはポリペプチドの検出（G F Pが挙げられるが、これに限定されない）、精製もしくは他の特質を向上させる連結分子（ビオチンが挙げられるが、これに限定されない）を含み得る。

10

## 【0119】

また、“p S Tポリペプチド”という用語は、同じかもしくは異なる天然にコードされていないアミノ酸側鎖のいずれかに対して、天然にコードされていないアミノ酸を介して直接的にか、またはリンカーを介して間接的に連結されているp S Tのホモ二量体、ヘテロ二量体、ホモ多量体またはヘテロ多量体を包含している。例示的なリンカーとしては、水溶性重合体（例えば、ポリ（エチレングリコール）、ポリデキストランまたはポリペプチド）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

## 【0120】

“天然にコードされていないアミノ酸”は、通常20のアミノ酸のうちの一つ、ピロールリジンまたはセレノシステインではないアミノ酸を指す。“天然にコードされていないアミノ酸”という用語は、“天然にコードされるアミノ酸（通常20のアミノ酸、ピロールリジンまたはセレノシステインが挙げられるが、これらに限定されない）の修飾（例えば翻訳後修飾）によって天然に生じるが、翻訳複合体によって伸張されるポリペプチド鎖に対して天然には組み込まれないアミノ酸を包含しているが、これらに限定されない。天然に存在しないアミノ酸の例としては、N - アセチルグルコサミニル - L - セリン、N - アセチルグルコサミニル - L - スレオニンおよびO - ホスホチロシンが挙げられるが、これらに限定されない。

30

## 【0121】

“アミノ末端修飾基”は、ポリペプチドのアミノ末端に結合され得る任意の分子を指す。同様に、“カルボキシル末端修飾基”は、ポリペプチドのカルボキシル末端に結合され得る任意の分子を指す。末端修飾基としては、種々の水溶性重合体、ペプチドまたはタンパク質（例えば、血清アルブミン、またはペプチドの血中半減期を増加させる他の分子）が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0122】

“官能基”、“活性部分”、“活性化基”、“切断基”、“反応性部分”、“化学反応性基”および“化学反応性部分”という用語は、当該技術において用いられており、ある分子における明確に識別可能な部分または単位を、本明細書において指す。当該用語は、化学の分野においていくらか同義であり、いくつかの機能もしくは活性を担い、他の分子と反応性を示す分子の部分の部分を指すために本明細書に用いられる。

40

## 【0123】

本明細書に使用されるとき、“連結”または“リンカー”という用語は、通常、化学反応の結果として形成される原子団または結合を指し、共有結合を一般的に指す。加水分解に安定な結合とは、長期にわたって（おそらく永久にでさえ）、生理学的環境において当該結合が水において実質的に安定であり、有用なp H値において水と反応しないことを意

50

味する。加水分解に不安定な結合または分解可能な結合は、当該結合が水または水性溶液（例えば血液が挙げられる）において分解可能であることを意味する。酵素的に不安定な結合または分解可能な結合は、当該結合が1つ以上の酵素によって分解され得る結合であることを意味する。PEGおよび関連する重合体が、重合体骨格、または重合体骨格と重合体分子の1つ以上の末端官能基との間のリンカー基における分解可能な結合を含み得ることは、当該技術分野において理解されている。例えば、PEGカルボキシル酸または活性化されたPEGカルボキシル酸と、生物学的に活性な作用物におけるアルコール基との反応によって形成されるエステル結合は、一般に、当該作用物を放出するための生物学的環境において加水分解する。加水分解可能な他の結合としては、炭酸結合；アミンとアルデヒドとの反応から生じるイミン結合；アルコールとリン酸基との反応によって形成されるリン酸エステル結合；ヒドラジドおよびアルデヒドの反応生成物であるヒドラゾン結合；アルデヒドとアルコールとの反応生成物であるアセタール結合；ギ酸とアルコールとの反応生成物であるオルトエステル結合；アミン基によって形成されるペプチド結合（PEGといった重合体の末端における結合が挙げられるが、これらに限定されない）；およびホスホラミダイト基において形成されるオリゴヌクレオチド結合（オリゴヌクレオチドの5'ヒドロキシル基が挙げられるが、これに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない。

10

#### 【0124】

本明細書に使用されるとき、“生物学的に活性な分子”、“生物学的に活性な部分”または“生物学的に活性な作用物”という用語は、生物学的な生物（ウイルス、細菌、菌類、植物、動物およびヒトが挙げられるが、これらに限定されない）の物理的または生化学的な任意の特性に影響を及ぼし得る任意の物質を意味する。特に、本明細書に使用されるときに生物学的に活性な分子としては、ヒトもしくは他の動物における疾患の診断、治療、鎮静、処置もしくは予防、またはそうでなければヒトまたは他の動物の肉体的もしくは精神的な健康の増進を対象にした任意の物質が挙げられるが、これらに限定されない。生物学的に活性な分子の例としては、ペプチド、タンパク質、酵素、小分子薬、色素、脂質、ヌクレオシド、オリゴヌクレオチド、細胞、ウイルス、リボソーム、微小粒子およびミセル体が挙げられるが、これらに限定されない。本発明をともなった使用に好適な生物学的に活性な作用物の分類としては、抗生物質、殺真菌剤、抗ウイルス薬、抗炎症誘発因子、抗腫瘍薬、心血管作動薬、抗不安薬、ホルモン、成長因子およびステロイド剤などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

#### 【0125】

“二機能性重合体”は、他の部分と特異的に反応して、共有的または非共有的な結合を形成可能な2つの別個の官能基を含んでいる重合体を指す。当該部分としては、アミノ酸側鎖基が挙げられるが、これに限定されない。二機能性リンカーは、生物学的に活性な特定の成分における官能基との反応性を示す1つの官能基、および第2の生物学的な成分における官能基と反応性を示す他の官能基を有している。よって、当該二機能性リンカーは、第1の生物活性成分、二機能性リンカーおよび第2の生物活性成分を含んでいる抱合物の形成に使用され得る。種々の化合物をペプチドに結合させる多くの手法およびリンカー分子が知られている。例えば、参照によって本明細書に援用される、欧州特許出願公開第188,256号；米国特許第4,671,958号、米国特許第4,659,839号、米国特許第4,414,148号、米国特許第4,699,784号；米国特許第4,680,338号；米国特許第4,569,789号；および米国特許第4,589,071号を参照すればよい。“多機能性重合体”は、他の部分と特異的に反応して、共有的または非共有的な結合を形成可能な2つ以上の別個の官能基を含んでいる重合体を指す。当該部分としては、アミノ酸側鎖基が挙げられるが、これに限定されない。

40

#### 【0126】

左から右に書かれる従来の化学式によって、置換基が特定される場合に、それらは、右から左に構造を記載することによって生じる化学的に同一な置換基を等しく包含している（例えば、 $-CH_2O-$ は $-OCH_2-$ と等価である）。

50

## 【0127】

“置換基”という用語は、“非干渉性の置換基”を包含するが、これに限定されない。“非干渉性の置換基”は安定な化合物を生じるこれらの基である。安定な非干渉性の置換基またはラジカルとしては、ハロ、 $C_1 \sim C_{10}$  アルキル、 $C_2 \sim C_{10}$  アルケニル、 $C_2 - C_{10}$  アルキニル、 $C_1 \sim C_{10}$  アルコキシ、 $C_1 \sim C_{12}$  アラルキル、 $C_1 \sim C_{12}$  アルカリル、 $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルキル、 $C_3 \sim C_{12}$  シクロアルケニル、フェニル、置換フェニル、トルオイル、キシレニル、ピフェニル、 $C_2 \sim C_{12}$  アルコキシアルキル、 $C_2 \sim C_{12}$  アルコキシアリール、 $C_7 \sim C_{12}$  アリールオキシアルキル、 $C_7 \sim C_{12}$  オキシアリール、 $C_1 \sim C_6$  アルキルスルフィニル、 $C_1 \sim C_{10}$  アルキルスルフォニル、 $-(CH_2)_m-O-(C_1 \sim C_{10} \text{ アルキル})$  (ここで、 $m$  は 1 から 8 である)、アリール、置換アリール、置換アルコキシ、フルオロアルキル、ヘテロ環ラジカル、置換ヘテロ環ラジカル、ニトロアルキル、 $-NO_2$ 、 $-CN$ 、 $-NRC(O)-(C_1 \sim C_{10} \text{ アルキル})$ 、 $-C(O)-(C_1 \sim C_{10} \text{ アルキル})$ 、 $C_2 \sim C_{10}$  アルキルチオアルキル、 $-C(O)O-(C_1 \sim C_{10} \text{ アルキル})$ 、 $-OH$ 、 $-SO_2$ 、 $=S$ 、 $-COOH$ 、 $-NR_2$ 、カルボニル、 $-C(O)-(C_1 \sim C_{10} \text{ アルキル})-CF_3$ 、 $-C(O)-CF_3$ 、 $-C(O)NR_2$ 、 $-(C_1 \sim C_{10} \text{ アリール})-S-(C_6 \sim C_{10} \text{ アリール})$ 、 $-C(O)-(C_1 \sim C_{10} \text{ アリール})$ 、 $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_m-O-(C_1 \sim C_{10} \text{ アルキル})$  (ここで、 $m$  のそれぞれは 1 から 8 である)、 $-C(O)NR_2$ 、 $-C(S)NR_2$ 、 $-SO_2NR_2$ 、 $-NRC(O)NR_2$ 、 $-NRC(S)NR_2$ 、これらの塩などが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に使用されるとき、 $R$  のそれぞれは、 $H$ 、アルキルもしくは置換アルキル、アリールもしくは置換アリール、アラルキル、またはアルカリルである。

10

20

## 【0128】

“ハロゲン”という用語は、フッ素、塩素、ヨウ素、および臭素を包含している。

## 【0129】

それ自身によってか、または他の置換基の一部として、“アルキル”という用語は、特に断りがない限り、完全に飽和され得るか、一価不飽和され得るか、または多価不飽和され得る、直鎖状もしくは分枝鎖状の鎖、または環状炭化水素ラジカル、またはこれらの組合せを意味しており、所望の炭素原子数(すなわち、 $C_1 \sim C_{10}$  は 1 から 10 の炭素を意味する)を有している二価または多価のラジカルを含み得る。飽和炭化水素ラジカルの例としては、メチル、エチル、 $n$ -プロピル、イソプロピル、 $n$ -ブチル、 $t$ -ブチル、イソブチル、 $sec$ -ブチル、シクロヘキシル、(シクロヘキシル)メチル、シクロプロピルメチル、類似物および異性体(例えば  $n$ -ペンチル、 $n$ -ヘキシル、 $n$ -ヘプチルおよび  $n$ -オクチルなどの類似物および異性体)といった基が挙げられるが、これらに限定されない。不飽和アルキル基は 1 つ以上の 2 重結合または 3 重結合を有しているアルキル基である。不飽和アルキル基の例としては、ビニル、2-プロペニル、クロチル、2-イソペンテニル、2-(ブタジエニル)、2,4-ペンタジエニル、3-(1,4-ペンタジエニル)、エチニル、1-および 3-プロピニル、3-ブチニルならびにより高級な類似物および異性体が挙げられるが、これらに限定されない。また、“アルキル”という用語は、特に断りがない限り、“ヘテロアルキル”といった以下においてより詳細に定義づけられるアルキルの誘導体を含んでいると意図されている。炭化水素基に限定されるアルキル基は“ホモアルキル”と称される。

30

40

## 【0130】

それ自身によってか、または他の置換基の一部として“アルキレン”という用語は、構造  $-CH_2CH_2-$  および  $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$  によって例示されるような、アルカンから得られる二価のラジカルを意味し、“ヘテロアルキレン”として以下に記載されているこれらの基をさらに包含しているが、これらに限定されない。典型的に、アルキル(またはアルキレン)基は 1 から 24 の炭素原子を有しており、これらの基は本発明において好ましい 10 以下の炭素原子を有する基である。“低級アルキル”または“低級アルキレン”は、8 以下の炭素原子を一般的に有している、より短い鎖状のアルキル基また

50

はアルキレン基である。

【0131】

“アルコキシ”、“アルキルアミノ”および“アルキルチオ”(またはチオアルコキシ)という用語は、それらの従来の意味において使用され、酸素原子、アミノ基、または硫黄原子をそれぞれ介して分子の残余部分と連結されているこれらのアルキル基を指す。

【0132】

それ自身によってか、または他の用語との組合せにおいて、“ヘテロアルキル”という用語は、特に断りがない限り、一定の数の炭素原子、ならびにO、N、SiおよびSからなる群から選択される少なくとも1つの異種原子(ここで、窒素原子および硫黄原子は任意に酸化され、窒素異種原子は任意に四級化される)から構成される安定な直鎖状、分枝鎖状、または環状の炭化水素ラジカルを意味する。(複数の)異種原子であるO、NおよびSおよびSiは、ヘテロアルキル基の任意の内部位置、またはアルキル基が分子の残余部と連結される位置に配置され得る。例としては、 $-CH_2-CH_2-O-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$ 、 $-CH_2-S-CH_2-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$ 、 $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$ 、 $-CH=CH-O-CH_3$ 、 $-Si(CH_3)_3$ 、 $-CH_2-CH=N-O-CH_3$  および  $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$  が挙げられるが、これらに限定されない。最大で2つの異種原子が、例えば $-CH_2-NH-O-CH_3$  および  $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$  のように連続し得る。同様に、それ自身によってか、または他の置換基の一部として、“ヘテロアルキレン”という用語は、ヘテロアルキルから得られる二価のラジカル( $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$  および  $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$  に例示されるが、これらに限定されない)を意味する。また、ヘテロアルキレン基に関して、同じかまたは異なる異種原子は、鎖の末端のいずれかまたは両方を占有し得る(アルキレンオキシ、アルキレンジオキシ、アルキレンアミノ、アルキレンジアミノおよびアミノオキシアルキレンなどが挙げられるが、これらに限定されない)。また、アルキレン連結基およびヘテロアルキレン連結基に関して、連結基の方向は連結基の式が書かれている方向によって意味されない。例えば、式 $-C(O)_2R'$ は、 $-C(O)_2R'$  および  $R'C(O)_2-$  の両方を意味する。

【0133】

それら自身によってか、または他の用語との組合せにおいて、“シクロアルキル”および“ヘテロシクロアルキル”という用語は、特に断りがない限り、“アルキル”および“ヘテロアルキル”のそれぞれの環状の型を表す。したがって、シクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルは、飽和環結合および不飽和の環結合を含んでいる。さらに、ヘテロシクロアルキルに関して、異種原子は、複素環が分子の残余部と連結されている位置を占有し得る。シクロアルキルの例としては、シクロペンチル、シクロヘキシル、1-シクロヘキセニル、3-シクロヘキセニル、およびシクロヘプチルなどが挙げられるが、これらに限定されない。ヘテロシクロアルキルの例としては、1-(1,2,5,6-テトラヒドロピリジル)、1-ピペリジニル、2-ピペリジニル、3-ピペリジニル、4-モルホリニル、3-モルホリニル、テトラヒドロフラン-2-イル、テトラヒドロフラン-3-イル、テトラヒドロチエン-2-イル、テトラヒドロチエン-3-イル、1-ピペラジニル および 2-ピペラジニルなどが挙げられるが、これらに限定されない。

【0134】

本明細書に使用されるとき、“水溶性重合体”という用語は水性溶媒に可溶性を示す任意の重合体を指す。pSTポリペプチドに対する水溶性重合体の連結は、変化(非修飾形態と比べて増強されたかもしくは調節された血中半減期または増強されたかもしくは調節された治療半減期、調節された免疫原性、調節された物理的な会合特性(例えば、凝集および多量体形成)、変更された受容体結合、ならびに変更された二量体化もしくは多量体化が挙げられるが、これらに限定されない)をもたらし得る。水溶性重合体は、特有の生物活性を有し得るか、または有し得ない。好適な重合体としては、ポリエチレングリコール、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、モノC1~C10アルコキシ誘導体

10

20

30

40

50

もしくはモノC<sub>1</sub>～C<sub>10</sub>アリーールオキシ誘導体（参照によって本明細書に援用される米国特許第5,252,714号に記載されている）、モノメトキシポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリアミノ酸、ジビニルエーテルマレイン酸無水物、N-(2-ヒドロキシプロピル)-メタクリルアミド、デキストラン、デキストラン誘導体（硫化デキストランが挙げられる）、ポリプロピレングリコール、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール、ヘパリン、ヘパリン断片、多糖、オリゴ糖、グリカン、セルロースおよびセルロース誘導体（メチルセルロースおよびカルボキシメチルセルロースが挙げられるが、これらに限定されない）、スターチおよびスターチ誘導体、ポリペプチド、ポリアルキレングリコールおよびこれらの誘導体、ポリアルキレングリコールおよびこれらの誘導体、ポリビニルエチルエーテル、ならびにアルファ-ベータ-ポリ[(2-ヒドロキシエチル)-DL-アスパルトアミドなどの共重合体、またはこれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。当該水溶性重合体の例としては、ポリエチレングリコールおよび血清アルブミンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

#### 【0135】

本明細書に使用されるとき、“ポリアルキレングリコール”という用語は、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリブチレングリコールおよびこれらの誘導体を指す。“ポリアルキレングリコール”という用語は、0.1kDaから100kDaの間の平均分子量を有している、直鎖状および分枝鎖状の重合体の両方を包含する。他の例示的な実施形態は、例えば、株式会社Shearwaterのカatalog “Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications” (2001)といった商業的な供給業者のカatalogに挙げられている。

#### 【0136】

“アリーール”という用語は、特に断りがない限り、ともに融合されるか、または共有的に結合される単環または多環（好ましくは、1から3つの環）であり得る、多価不飽和の芳香族炭化水素の置換基を意味する。“ヘテロアリーール”という用語は、N、OおよびSから選択される1から4つの異種原子を含んでいるアリーール基（または環）を指す。ここで、窒素原子および硫黄原子は任意に酸化され、（複数の）窒素原子は任意に四級化されている。ヘテロアリーール基は、異種原子を介して分子の残余部と連結され得る。アリーール基またはヘテロアリーール基の非限定的な例としては、フェニル、1-ナフチル、2-ナフチル、4-ピフェニル、1-ピロリル、2-ピロリル、3-ピロリル、3-ピラゾリル、2-イミダゾリル、4-イミダゾリル、ピラジニル、2-オキサゾリル、4-オキサゾリル、2-フェニル-4-オキサゾリル、5-オキサゾリル、3-イソキサゾリル、4-イソキサゾリル、5-イソキサゾリル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、5-チアゾリル、2-フリル、3-フリル、2-チエニル、3-チエニル、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、2-ピリミジル、4-ピリミジル、5-ベンゾチアゾリル、プリニル、2-ベンズイミダゾリル、5-インドリル、1-イソキノリル、5-イソキノリル、2-キノキサリニル、5-キノキサリニル、3-キノリルおよび6-キノリルが挙げられる。上述のアリーール環系およびヘテロアリーール環系のそれぞれに関する置換基は、以下に記載される受容可能な置換基の群から選択される。

#### 【0137】

簡単に説明すると、他の用語との組合せにおいて使用される場合の“アリーール”という用語（アリーールオキシ、アリーールチオキシ、アリーールアルキルが挙げられるが、これらに限定されない）は、上記定義づけの通りのアリーール環およびヘテロアリーール環の両方を包含している。したがって、“アリーールアルキル”という用語は、アリーール基がアルキル基と連結されているこれらのラジカル（ベンジル、フェネチルおよびピリジルメチルなどが挙げられるが、これらに限定されない）であって、当該アルキル基が、炭素原子が例えば酸素原子によって置換されているこれらのアルキル基（メチレン基が挙げられるが、これに限定されない）を包含しているこれらのラジカル（フェノキシメチル、2-ピリジルオキシメチルおよび3-(1-ナフチルオキシ)プロピルなどが挙げられるが、これらに限

定されない)を包含することが意図されている。

【0138】

上述の用語のそれぞれ(“アルキル”、“ヘテロアルキル”、“アリール”および“ヘテロアリール”が挙げられるが、これらに限定されない)は、示されているラジカルの置換形態および非置換形態の両方を包含することを意図されている。それぞれの種類のラジカルにとっての例示的な置換基が以下に規定されている。

【0139】

アルキルラジカルおよびヘテロアルキルラジカル(アルキレン、アルケニル、ヘテロアルキレン、ヘテロアルケニル、アルキニル、シクロアルキル、ヘテロシクロアルキル、シクロアルケニルおよびヘテロシクロアルケニルとしばしば呼ばれるこれらの基が挙げられる)にとっての置換基は、0から(2m'+1)の範囲の数における(ここで、m'は当該ラジカルにおける炭素原子の総数である)、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO<sub>2</sub>R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR'C(O)R'、-NR'-C(O)NR'R''、-NR'C(O)<sub>2</sub>R'、-NR-C(NR'R''R''')=NR''''、-NR-C(NR'R''R''')=NR''''、-S(O)R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>NR'R''、-NRSO<sub>2</sub>R'、-CNおよび-NO<sub>2</sub>から選択される種々の群の1つ以上であり得るが、これらに限定されない。R'、R''、R'''およびR''''はそれぞれ独立して、水素、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のアリール(1-3のハロゲンに置換されたアリールが挙げられるが、これに限定されない)、置換もしくは非置換のアルキル、アルコキシもしくはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を指す。本発明の化合物が1つ以上のR基を含んでいる場合に、例えばR基はそれぞれ独立して、1つ以上のこれらの基が存在する場合にR'、R''、R'''およびR''''基のそれぞれであるように選択される。R'およびR''が、同じ窒素原子に連結される場合に、それらは、5-、6-、7-員環を形成するために窒素原子と組み合わせられ得る。例えば、-NR'R''は、1-ピロリジニルおよび4-モルホリニルを包含していることを意図されているが、これらに限定されない。置換基の上述の議論から、当業者は、“アルキル”という用語が、水素基以外の基(例えば、ハロアルキル基(-CF<sub>3</sub>および-CH<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>が挙げられるが、これらに限定されない)およびアシル(-C(O)CH<sub>3</sub>、-C(O)CF<sub>3</sub>、および-C(O)CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>などが挙げられるが、これらに限定されない))に対して結合される炭素原子を含むことを意図されていることを理解する。

【0140】

アルキルラジカルに関して記載される置換基と同様に、アリール基およびヘテロアリール基にとっての置換基は、変更され、0から芳香族環系における空いている原子価の総数の範囲の数において、ハロゲン、-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-ハロゲン、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO<sub>2</sub>R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR'C(O)R'、-NR'-C(O)NR'R''、-NR'C(O)<sub>2</sub>R'、-NR-C(NR'R''R''')=NR''''、-NR-C(NR'R''R''')=NR''''、-S(O)R'、-S(O)<sub>2</sub>R'、-S(O)<sub>2</sub>NR'R''、-NRSO<sub>2</sub>R'、-CNおよび-NO<sub>2</sub>、-R'、-N<sub>3</sub>、-CH(Ph)<sub>2</sub>、フルオロ(C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>)アルコキシ、ならびにフルオロ(C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>)アルキルから選択されるが、これらに限定されない。ここで、R'、R''、R'''およびR''''は独立して、水素、アルキル、ヘテロアルキル、アリールおよびヘテロアリールから選択される。本発明の化合物が1つ以上のR基を含む場合に、例えば、R基のそれぞれは独立して、1つ以上のこれらの基が存在する場合に、R'、R''、R'''およびR''''のそれぞれであるように、選択される。

【0141】

10

20

30

40

50

本明細書に使用されるとき、“調節された血中半減期”という用語は、その非修飾形態に比べて、修飾された生物学的に活性な分子の循環半減期における正または負の変化を意味する。血中半減期は、生物学的に活性な分子の投与後における種々の時点において血液試料を採取すること、および試料のそれぞれにおける分子の濃度を決定することによって測定される。時間と血清濃度との相関関係によって、血中半減期の算出が可能である。増強された血中半減期は、少なくとも約2倍を好ましく有しているが、例えば、十分な投与計画を可能にするか、または毒作用を避ける場合には、より小さな増強が有用であり得る。いくつかの実施形態において、増強は少なくとも約3倍、少なくとも約5倍または少なくとも約10倍である。

#### 【0142】

本明細書に使用されるとき、“調節された治療半減期”という用語は、その非修飾形態に比べて、治療有効量の修飾された生物学的に活性な分子の半減期における正または負の変化を意味する。治療半減期は、投与後における種々の時点において分子の薬物動態特性および/または薬理学的特性を測定することによって測定される。増強された治療半減期は、特に利益をもたらす投与計画または特に利益をもたらす総投与量を好ましく可能にするか、または好ましくない影響を好ましく回避する。いくつかの実施形態において、増強された治療半減期は、増強された有効性、修飾された分子のその標的に対する増強されたかもしくは低減された結合、または非修飾分子の作用の他の要素もしくは機序の増強もしくは減弱を生じる。

#### 【0143】

核酸またはタンパク質に適用されるとき“単離された”という用語は、核酸またはタンパク質が、天然の状態において会合される他の細胞性構成要素から十分に遊離していることを表す。それは均質な状態にあり得る。単離された物質は、乾燥状態もしくは半乾燥状態、または溶液（水性溶液が挙げられるが、これに限定されない）内のいずれかにあり得る。純度および均質性は、分析化学的技術（例えば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィー）を用いて典型的に決定される。調製物に存在する優勢種であるタンパク質は、実質的に精製されている。特に、単離された遺伝子は、遺伝子に隣接し、所定の遺伝子以外のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームから分離されている。“精製されている”という用語は、核酸またはタンパク質が電気泳動ゲルにおいて実質的に1つのバンドを生じることを表す。特に、それは、核酸またはタンパク質が少なくとも85%の純度、少なくとも90%の純度、少なくとも95%の純度、少なくとも99%がそれ以上の純度であることを意味し得る。

#### 【0144】

“核酸”という用語は、一本鎖の形態または二本鎖の形態のいずれかとしての、デオキシリボヌクレオチド、またはリボヌクレオチド、ならびにこれらの重合体を指す。特に断りがない限り、当該用語は、基準の核酸と同様の結合特性を有しており、天然に存在するヌクレオチドと同様の様式において代謝される天然ヌクレオチドの公知の類似物を含んでいる核酸を包含している。また、特に断りがない限り、特定の核酸配列は、これらの保存的に修飾されたバリエーション（変性コドン置換が挙げられるが、これに限定されない）および相補的な配列、これらと同様に明確に示されている配列を暗に包含している。特に、変性コドン置換は、1つ以上の選択された（またはすべての）コドンの3番目の位置が混合塩基および/またはデオキシイノシン残基に置換される配列を生成することによって達成され得る（Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); Cassol et al. (1992); Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)）。

#### 【0145】

“ポリペプチド”、“ペプチド”および“タンパク質”という用語は、本明細書において交換可能に使用されて、アミノ酸残基の重合体を指す。すなわち、ポリペプチドを対象とする記載は、ペプチドおよびタンパク質の記載に等しく適用され、逆の場合も同様である。当該用語は、天然に存在するアミノ酸重合体および1つ以上の残基が天然にコードさ

10

20

30

40

50

れていないアミノ酸であるアミノ酸重合体に適用される。本明細書に使用されるとき、当該用語は、任意の長さ（全長のタンパク質（例えば抗原）が挙げられる）のアミノ酸鎖を包含しており、ここでアミノ酸残基は共有的なペプチド結合によって連結されている。

【0146】

“アミノ酸”という用語は、天然に存在するアミノ酸および天然に存在しないアミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と類似の様式において機能するアミノ酸類似物およびアミノ酸模倣物を指す。天然にコードされるアミノ酸は、通常の20のアミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリン）、ピロールリジンおよびセレノシステインである。アミノ酸類似物は、天然に存在するアミノ酸と同じ基本の化学構造を有する化合物（すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、およびR基（例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルフォキシド、メチオニンメチルスルフォニウム）に対して結合されている炭素）を指す。当該類似物は、修飾されたR基（例えば、ノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有しているが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本の化学構造を維持している。

10

【0147】

アミノ酸は、本明細書において、国際純正および応用化学連合 - 国際生化学連合生化学命名委員会によって推奨されている、一般的に知られる3文字表記、または1文字表記のいずれかによって示される。同様に、ヌクレオチドは一般的に受け容れられているそれらの1文字符号によって示される。

20

【0148】

“保存的に修飾されたバリエーション”は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、“保存的に修飾されたバリエーション”は、同一もしくは本質的に同一なアミノ酸配列をコードしているか、または核酸がアミノ酸配列をコードしていない場合に実質的に同一な、それらの核酸を指す。遺伝暗号の縮重のために、非常に多数の機能的に同一な核酸が所定のタンパク質のいずれかをコードしている。実際に、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUのすべては、アミノ酸のアラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンによって特定されるすべての位置において、コドンは、コードされるポリペプチドを変更せずに、記載されている対応するコドンのうちいずれかのコドンに変更され得る。このような核酸の変異は、保存的に修飾される変異の1種である“サイレント変異である”。また、ポリペプチドをコードする本明細書における核酸配列のすべては、核酸の見込みのあるサイレント変異のすべてについて説明している。当業者は、核酸におけるコドンのそれぞれ（通常、メチオニンに対する唯一のコドンであるAUG、および通常、トリプトファンに対する唯一のコドンであるTGGを除いて）が変更されて、機能的に同一な分子を生成し得ることを認識している。したがって、ポリペプチドをコードする核酸のサイレント変異のそれぞれは、記載されている配列のそれぞれにおいて暗に示されている。

30

【0149】

アミノ酸配列については、当業者は、コードされるアミノ酸における単一のアミノ酸または低い割合のアミノ酸を変更するか、付加するかもしくは欠失する核酸配列、ペプチド配列、ポリペプチド配列またはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失または付加が、変更が化学的に類似のアミノ酸とのアミノ酸の置換を結果として生じる場合に、“保存的に修飾されているバリエーション”であることを認識する。機能的に類似のアミノ酸を規定する保存的な置換の表は、当業者に公知である。当該保存的に修飾されたバリエーションは、加えて、本発明の多形バリエーション、種間相同物および対立因子を除外しない。

40

【0150】

以下の8つの群のそれぞれ：

- (1) アラニン (A)、グリシン (G)；
- (2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；

50

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

は、他の1つのアミノ酸に対して保存的な置換であるアミノ酸を含んでいる (例えば、Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993)を参照すればよい)。

#### 【0151】

2つ以上の核酸配列またはポリペプチド配列において、“同一の”または“同一性の”割合は、同じである2つ以上の配列または部分配列を指す。以下の配列比較アルゴリズムの1つを用いてか、もしくは手動の整列化および目視検査によって測定されるような比較領域または所望の領域の全体にわたって最大の一致に関して比較されるときに、複数の配列がアミノ酸配列またはヌクレオチドの同じである百分率 (すなわち、特定の領域の全体にわたって約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95の同一性) を有している場合に、当該複数の配列は“実質的に同一”である。また、この定義づけは試験配列の相補性を指す。同一性は、少なくとも約50のアミノ酸もしくはヌクレオチドの長さである領域の全体にわたってか、または75~100のアミノ酸もしくはヌクレオチドの長さである領域の全体にわたってか、または特に特定されないが、

#### 【0152】

配列比較に関して、1つの配列は、比較される試験配列に対する基準配列としての役目を一般的に果たす。配列比較アルゴリズムを用いる場合に、試験配列および基準配列がコンピュータに入力され、配列座標が指定され、必要に応じて配列アルゴリズムのプログラム変数が指定される。初期設定のプログラム変数が使用され得るか、または代替の変数が指示され得る。それから、配列比較アルゴリズムは、プログラム変数に基づいて基準配列と比較した、試験配列に関する配列同一性の割合を算出する。

#### 【0153】

本明細書に使用されるとき、“比較領域”は、2つの配列が最適に整列化された後に、配列が連続する位置の同じ数の基準領域に対して比較され得る20から600、一般的に約50から約200、より一般的に約100から約150からなる群から選択される多くの連続する位置のいずれか1つの区分に対する参照を包含している。比較に関する配列整列化の方法は当業者にとって公知である。比較に関する最適な配列整列化は、Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482cの局所的な相同性アルゴリズム、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443の相同性整列化アルゴリズム、Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性に関する検索方法、これらのアルゴリズムのコンピュータ化された実施 (the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WIにおけるGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)、または手動の整列化および目視検査 (例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement)を参照すればよい) (これらが挙げられるが、限定されない) によって、実施され得る。

#### 【0154】

配列同一性および配列類似性の割合の決定に好適なアルゴリズムの一例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムである (それぞれ、Altschul et al. (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402、およびAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されている)。BLAST分析を実施するソフトウェアは、全米バイオテクノロジー情報センターを通して一般に利用可能である。BLASTアルゴリズムの変数W、TおよびXは整列化の感度および速度を決定する。BLASTNプログラム (ヌクレオチド用) は、11のワード長 (W)、10の期待値 (E)、M = 5、N = -4を初期設定として

10

20

30

40

50

使用し、両方の鎖を比較する。アミノ酸配列に関して、BLASTPプログラムは、3のワード長、および10の期待値(E)、BLOSUM62採点マトリクス(Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915を参照すればよい)、50の整列化(B)、10の期待値(E)、M=5、N=-4を初期設定として使用し、両方の鎖を比較する。BLASTアルゴリズムは、無効にされる“低い複雑性”のフィルタを用いて典型的に実施される。

#### 【0155】

また、BLASTアルゴリズムは、2つの配列間の類似性の統計的な分析を実施する(例えば、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787を参照すればよい)。BLASTアルゴリズムによって与えられる類似性の指標の1つは、2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列の間の適合が偶然に生じる確率の指標を提供する、最小の総和確率(P(N))である。例えば、核酸は、基準核酸に対する試験核酸の比較において最小の総和確率が約0.2未満、より好ましくは約0.01未満、および最も好ましくは約0.001未満である場合に、基準配列に対して類似であるとみなされる。

10

#### 【0156】

“~に対して選択的に(または特異的に)ハイブリダイズする”という表現は、配列が複合混合物(全体の細胞またはライブラリのDNAまたはRNAが挙げられるが、これらに限定されない)に存在している場合に、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件における特定のヌクレオチド配列のみとの、分子の結合、分子の2重鎖化、または分子のハイブリダイズを指す。

20

#### 【0157】

“ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件”という表現は、当該技術において知られるように、低いイオン強度および高い温度の条件を指す。典型的に、ストリンジェントな条件において、プローブは、核酸の複合混合物(全体の細胞またはライブラリのDNAまたはRNAが挙げられるが、これらに限定されない)においてその標的配列とハイブリダイズするが、複合混合物における他の配列とはハイブリダイズしない。ストリンジェントな条件は、配列依存的であり、異なる環境において異なる。より長い配列は、より高い温度において特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションに対する広範にわたる指針は、Tijssen, Techniques in Biochemistry and Molecular Biology - Hybridization with Nucleic Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993)に見られる。一般的に、ストリンジェントな条件は、規定のイオン強度pHにおける、特定の配列に関する熱溶融点( $T_m$ )よりも約5-10低く選択される。 $T_m$ は、標的に対して相補的なプローブの50%が平衡状態において標的配列とハイブリダイズする(標的配列が $T_m$ において過剰に存在し、プローブの50%が平衡状態にあるような)、温度である(規定のイオン強度、pH、および核酸の濃度の条件下)。ストリンジェントな条件は、塩濃度がpH7.0から8.3において約1.0M未満のナトリウムイオン濃度、典型的に約0.01から1.0Mのナトリウムイオン濃度(または他の塩)であり、短いプローブ(10から50のヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない)に関して温度が少なくとも約30°Cの条件、および長いプローブ(50を超えるヌクレオチドが挙げられるが、これらに限定されない)に関して少なくとも約60°Cの条件であり得る。また、ストリンジェントな条件はホルムアミドといった不安定化剤の添加を伴って実現され得る。選択的または特異的なハイブリダイゼーションに関して、正のシグナルは、バックグラウンドの少なくとも2倍の、状況に応じてバックグラウンドの10倍のハイブリダイゼーションであり得る。例示的なストリンジェントなハイブリダイゼーション条件は、以下の通り: 65°Cにおいて0.2×SSC、および0.1%のSDSにおける洗浄を伴う、42°Cにおいてインキュベートする50%のホルムアミド、5×SSC、および1%のSDSか、または65°Cにおいてインキュベートする5×SSC、1%SDSであり得る。当該洗浄は、5、15、30、60、120分、またはそれ以上にわたって実施され得る。

30

40

50

## 【0158】

本明細書に使用されるとき、“真核生物”という用語は、動物（哺乳類、昆虫、爬虫類、鳥類などが挙げられるが、これらに限定されない）、繊毛虫類、植物（単子葉植物、双子葉植物、藻類などが挙げられるが、これらに限定されない）、菌類、酵母、鞭毛虫、微孢子虫、原生生物といった、真核生物界の系統学的な領域に属する生体を指す。

## 【0159】

本明細書に使用されるとき、“非真核生物”という用語は、非真核生物の生体を指す。例えば、非真核生物の生体は、系統学的な領域の真正細菌（*Escherichia coli*、*Thermus thermophilus*、*Bacillus stearothermophilus*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas putida*などが挙げられるが、これらに限定されない）、または

10

## 【0160】

本明細書に使用されるとき、“対象”という用語は、処置、観察または実験の対象である動物、いくつかの実施形態では哺乳類、別の実施形態ではヒトを指す。動物は、ペット（例えば、イヌ、ネコなど）、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマなど）、または実験動物（例えば、ラット、マウス、モルモットなど）であり得る。

## 【0161】

本明細書に使用されるとき、“有効量”という用語は、処置されるべき疾患、健康状態または不調の症状の1つ以上をいくらか軽減する、投与されるべき修飾されている非天然アミノ酸ポリペプチドの量を指す。本明細書に記載の修飾されている非天然アミノ酸ポリペプチドを含有している組成物は、予防処置、処置の促進および/または治療処置を目的として投与され得る。

20

## 【0162】

“増強”または“増強すること”は、所望の効果を、有効性または持続期間に関して向上するか、または延ばすことを意味する。したがって、治療薬の効果を増強することに関して、“増強すること”という用語は、系における他の治療薬の効果を、有効性または持続期間に関して向上させるか、または延ばすことを指す。本明細書に使用されるとき、“増強有効量”は、所望の系におけるもう1つの治療薬の効果を十分に増強する量を指す。動物に使用される場合に、この使用に有効な量は、疾患、不調もしくは健康状態の重篤度および経過、以前の治療、動物の健康状態および薬物に対する応答、ならびに処置する獣医の判断に依存する。

30

## 【0163】

本明細書に使用されるとき、“修飾”という用語は、所定のポリペプチドに対してなされる任意の変更（例えば、ポリペプチドの長さ、アミノ酸配列、化学構造、翻訳同時修飾、またはポリペプチドの翻訳後修飾に対する変更）を指す。ポリペプチドについて述べられている“(修飾)”形態という用語は、任意に修飾されており、すなわち、述べられている項目におけるポリペプチドが修飾され得るか、または修飾され得ないことを意味する。

40

## 【0164】

“翻訳後修飾”という用語は、ポリペプチド鎖に組み込まれた後に当該アミノ酸に生じる、天然または非天然のアミノ酸の任意の修飾を指す。当該用語は、一例として、インピボにおける翻訳後修飾、インピトロにおける翻訳所修飾（例えば、無細胞翻訳系）、インピボにおける翻訳同時修飾、インピボにおける翻訳後修飾、およびインピトロにおける翻訳後修飾を包含している。

## 【0165】

予防的な用途において、p S Tポリペプチドを含有する組成物は、特定の疾患、不調または健康状態に影響を受けやすいか、またはさもないければそのリスクの高い動物に対して

50

投与される。そのような量は“予防有効量”と定義づけされる。また、この利用において、正確な量は動物の健康状態および体重などに依存する。日常的な実験による当該予防有効量（例えば、用量の段階的増大の臨床試験）の決定は、当業者の範囲内にあると十分にみなされる。

【0166】

“保護”という用語は、ある反応条件における化学的に反応性の官能基の反応を防止する“保護基”または保護部分の存在を指す。保護基は、保護される化学的に反応性の基の種類に依存して変わる。例えば、化学的に反応性を示す基がアミンまたはヒドラジドである場合に、保護基は、tert-ブチルオキシカルボニル(t-Boc)および9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)からなる群から選択され得る。化学的に反応性を示す基がチオールである場合に、保護基はオルトピリジルジスルフィドであり得る。化学的に反応性を示す基がブタン酸もしくはプロピオン酸といったカルボキシル酸、またはヒドロキシル基である場合に、保護基は、ベンジル基またはメチル、エチルもしくはtert-ブチルといったアルキル基であり得る。また、当該分野に公知の他の保護基は、本明細書に記載の方法および組成物においてか、またはともに使用され得る。当該保護基としては、NvocおよびMevocといった感光性基が挙げられる。また、当該分野に公知の他の保護基は、本明細書に記載の方法および組成物においてか、またはこれらとともに使用され得る。

10

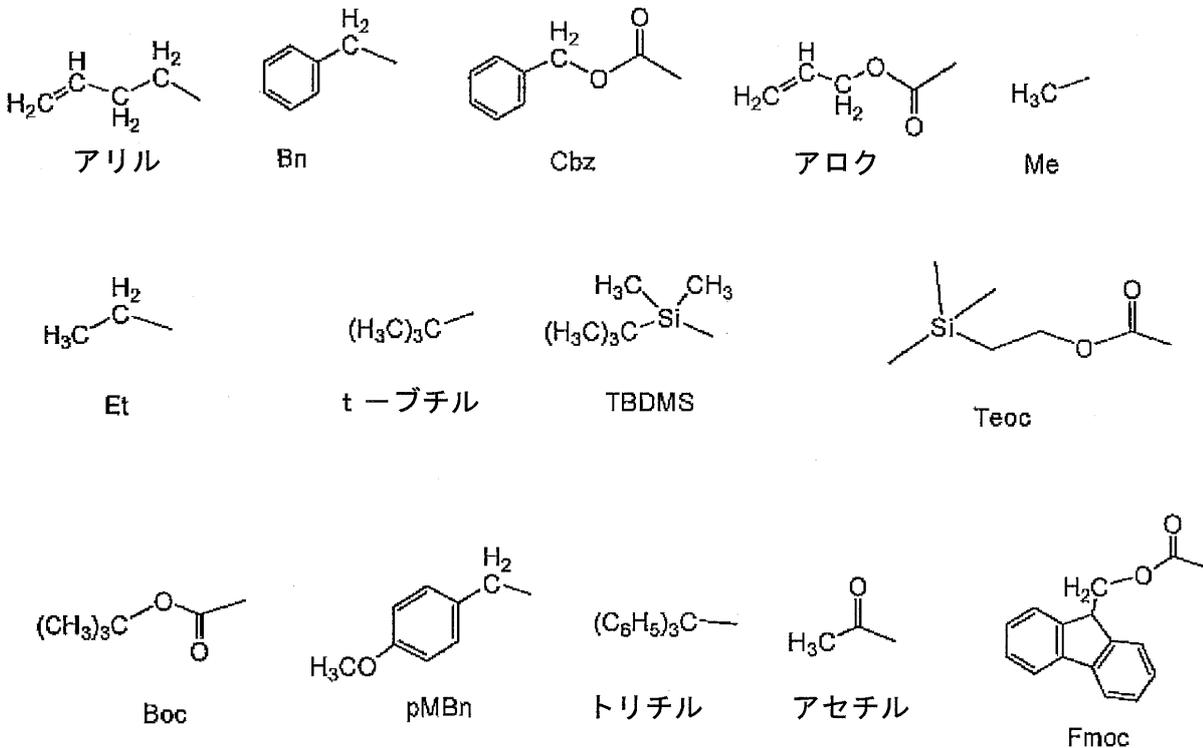
【0167】

一例として、封鎖基/保護基は、

20

【0168】

【化4】



30

40

【0169】

から選択され得る。

【0170】

他の保護基は、参照によってその全体が本明細書に援用されるGreene and Wuts, Protective Groups in Organic Synthesis, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999に記載されている。

【0171】

治療適用において、修飾されている非天然アミノ酸ポリペプチドを含有している組成物

50

は、すでに疾患、健康状態または不調になっている動物に対して、疾患、不調または障害の症状を治療するか、または少なくとも部分的に進行を押さえるために十分な量が、患者に投与される。当該量は、“治療有効量”と定義され、疾患、不調もしくは障害の重篤度および経過、以前の治療、動物の健康状態および薬物に対する応答、ならびに処置する獣医の判断に依存する。日常的な実験によって当該治療有効量を（例えば、用量の段階的増大の臨床試験）を決定することは、当業者の範囲内にあると十分にみなされる。

【0172】

“処置”という用語は、予防的処置および/または治療的処置のいずれかを指して使用される。

【0173】

本明細書に示されている天然にコードされていないアミノ酸は、通常、天然に見られる原子量または質量とは異なる原子量または質量を有している原子と置き換えられる1つ以上の原子を含有する、同位体標識された化合物を含み得る。本発明の化合物に組み込まれ得る同位体の例としては、水素、炭素、窒素、酸素、フッ素および塩素の同位体（例えば、それぞれ、 $^2\text{H}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{18}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{36}\text{Cl}$ ）が挙げられる。本明細書に記載のいくつかの同位体標識された化合物は、薬および/または基質組織分布アッセイにおいて有用であり得る。当該化合物は、例えば放射性同位体（例えば、 $^3\text{H}$ および $^{14}\text{C}$ ）に組み込まれる。さらに、重水素（すなわち、 $^2\text{H}$ ）などの同位体との置換は、より高い代謝安定性（例えば、増強されたインビボにおける半減期または低減された投与必要量）によってもたらされる所定の薬学的な利点を提供し得る。

10

20

【0174】

すべての異性体（ジアステレオマー、エナンチオマー、およびそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない）が、本明細書に記載の組成物の一部とみなされる。付加的な実施形態またはさらなる実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸ポリペプチドは、代謝産物を生成する必要がある生物に投与されると代謝され、その後、生成された代謝産物が利用されて、所望の効果（所望の薬学的な効果が挙げられる）がもたらされる。さらなる実施形態または付加的な実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸ポリペプチドの活性な代謝産物である。

【0175】

ある場合に、天然にコードされていないアミノ酸ポリペプチドは、互変異性体として存在している。また、本明細書に記載の天然にコードされていないアミノ酸ポリペプチドは、薬学的に受容可能な溶媒（例えば、水およびエタノールなど）と、溶媒和されていない形態および溶媒和されている形態において存在し得る。また、溶媒和されている形態は本明細書に記載されているとみなされる。当業者は、本明細書における化合物がいくつかの互変異性体の形態において存在し得ることを理解する。上記互変異性体のすべての形態は本明細書に記載し組成物の一部とみなされる。

30

【0176】

指定がない限り、当該技術の範囲内の質量分析、HPLC、タンパク質化学、生化学、組換えDNA技術、薬理学といった従来の方法が用いられる。

40

【0177】

〔詳細な説明〕

I. 導入

非天然アミノ酸を少なくとも1つ含んでいるb-GCSF分子が、本発明において提供される。本発明のある実施形態において、非天然アミノ酸を少なくとも1つ有しているb-GCSFポリペプチドは、少なくとも1つの翻訳後修飾を含んでいる。1つの実施形態において、少なくとも1つの翻訳後修飾は、分子（ヒドロキシアルキルスターチ（HAS））、ヒドロキシエチルスターチ（HES）、標識、色素、重合体、水溶性重合体、ポリエチレングリコールの誘導体、光架橋剤、放射線核種、細胞毒性化合物、薬物、親和性標識、光親和性標識、反応性化合物、樹脂、第2のタンパク質もしくはポリペプチドもしくはは

50

ポリペプチド類似物、抗体もしくは抗体断片、金属キレート剤、補助因子、脂肪酸、含水炭素、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、アンチセンスポリヌクレオチド、多糖類、水溶性 dendrimer、シクロデキストリン、抑制性リボ核酸、生体適合物質、ナノ粒子、スピン標識、蛍光団、金属を含有する部分、放射性部分、新規な官能基、他の分子と共有的もしくは非共有的に相互作用する基、光ケージド部分、化学線励起部分、光異性体化可能な部分、ビオチン、ビオチンの誘導體、ビオチン類似物、重元素を組み込んでいる部分、化学的に切断可能な基、光切断可能な基、延長された側鎖、炭素結合型の糖、酸化還元活性のある物質、アミノチオ酸、毒性部分、同位体によって標識された部分、生物物理学的なプローブ、燐光性の基、化学発光性の基、電子密度の高い基、磁性基、インターカレートする基、発色団、エネルギー転移物質、生物学的に活性な物質、検出可能な標識、小分子、量子ドット、ナノ伝達物質、放射性ヌクレオチド、放射性伝達物質、中性子捕獲物質、または上述のものの任意の組合せもしくは特定の反応性にとって好適であることが当業者に知られている化学方法論に利用される第1の反応性基を備える少なくとも1つの非天然アミノ酸に対して反応性の第2の基を含んでいる、他に所望する任意の化合物もしくは物質が挙げられるが、これらに限定されない)の連結を含んでいる。例えば、第1の反応性基が、アルキニル部分(非天然アミノ酸 p - プロパルギルオキシフェニルアラニン(プロパルギル基はアセチレン部分とも呼ばれる)におけるアルキニル部分が挙げられるが、これに限定されない)であり、第2の反応性基がアジド部分であり、[3 + 2]付加環化化学方法論が利用される。他の例において、第1の反応性基が、アジド部分(非天然アミノ酸 p - アジド - L - フェニルアラニンが挙げられるが、これに限定されない)であり、第2の反応性基がアルキニル部分である。本発明の修飾された b - G C S F ポリペプチドのある実施形態において、少なくとも1つの翻訳後修飾を含んでいる、少なくとも1つの非天然アミノ酸(ケト官能基を含有する非天然アミノ酸が挙げられるが、これに限定されない)が、使用される(ここで、少なくとも1つの翻訳後修飾が、糖鎖部分を含んでいる)。ある実施形態において、翻訳後修飾は真核細胞または非真核細胞のインビボにおいてなされる。リンカー、重合体、水溶性重合体または他の分子は、当該ポリペプチドに対してその分子を結合し得る。当該分子はポリペプチドに直接結合され得る。

#### 【0178】

ある実施形態において、タンパク質は、1つの宿主細胞によってインビボにおいてなされる少なくとも1つの翻訳後修飾を含んでおり、ここで、当該翻訳後修飾は他の宿主によって通常なされない。ある実施形態において、タンパク質は、真核細胞によってインビボにおいてなされる少なくとも1つの翻訳後修飾を含んでおり、ここで、当該翻訳後修飾は非真核細胞によって通常なされない。翻訳後修飾の例としては、糖鎖付加、アセチル化、アシル化、脂質修飾、パルミトイル化、パルミチン酸付加、リン酸化、および糖脂質結合修飾などが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0179】

いくつかの実施形態において、b - G C S F ポリペプチドは、ポリペプチドの糖鎖付加、アセチル化、アシル化、脂質修飾、パルミトイル化、パルミチン酸付加、リン酸化、または糖脂質結合修飾に関する天然にコードされていない1つ以上のアミノ酸を含んでいる。いくつかの実施形態において、b - G C S F ポリペプチドは、ポリペプチドの糖鎖付加に関する天然にコードされていない1つ以上のアミノ酸を含んでいる。いくつかの実施形態において、b - G C S F ポリペプチドは、ポリペプチドの糖鎖付加、アセチル化、アシル化、脂質修飾、パルミトイル化、パルミチン酸付加、リン酸化または糖脂質結合修飾のための天然にコードされる1つ以上のアミノ酸を含んでいる。いくつかの実施形態において、b - G C S F ポリペプチドは、ポリペプチドの糖鎖付加のための天然にコードされる1つ以上のアミノ酸を含んでいる。

#### 【0180】

いくつかの実施形態において、b - G C S F ポリペプチドは、ポリペプチドの糖鎖付加を促進させる天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上の付加および/または置換を含んでいる。いくつかの実施形態において、b - G C S F ポリペプチドは、ポリペプチド

10

20

30

40

50

の糖鎖付加を促進させる1つ以上の欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、b - G C S Fポリペプチドは、ポリペプチドにおける種々のアミノ酸における糖鎖付加を促進させる天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上の付加および/または置換を含んでいる。いくつかの実施形態において、b - G C S Fポリペプチドは、ポリペプチドにおける種々のアミノ酸における糖鎖付加を促進させる1つ以上の欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、b - G C S Fポリペプチドは、ポリペプチドにおける天然にコードされていないアミノ酸における糖鎖付加を促進させる天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上の付加および/または置換を含んでいる。いくつかの実施形態において、b - G C S Fポリペプチドは、ポリペプチドにおける天然にコードされるアミノ酸における糖鎖付加を促進させる天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上の付加および/または置換を含んでいる。いくつかの実施形態において、b - G C S Fポリペプチドは、ポリペプチドにおける異なるアミノ酸における糖鎖付加を促進させる1つ以上の天然にコードされるアミノ酸の付加および/または置換を含んでいる。いくつかの実施形態において、b - G C S Fポリペプチドは、ポリペプチドにおける天然にコードされるアミノ酸における糖鎖付加を促進させる天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上の付加および/または置換を含んでいる。いくつかの実施形態において、b - G C S Fポリペプチドは、ポリペプチドにおける天然にコードされていないアミノ酸における糖鎖付加を促進させる天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上の付加および/または置換を含んでいる。

10

#### 【0181】

一実施形態において、翻訳後修飾は、G l c N A c - アスパラギン酸結合によるアスパラギン酸に対するオリゴ糖（オリゴ糖が（G l c N A c - M a n）<sub>2</sub> - M a n - G l c N A c - G l c N A cなどを包含する場合は挙げられるが、これに限定されない）の連結を含んでいる。他の実施形態において、翻訳後修飾は、G a l N A c - セリン、G a l N A c - スレオニン、G l c N A c - セリン、またはG l c N A c - スレオニン結合による、セリンまたはスレオニンに対するオリゴ糖（G a l - G a l N A c、G a l - G l c N A cなどが挙げられるが、これらに限定されない）の連結を含んでいる。ある実施形態において、本発明のタンパク質またはポリペプチドは、分泌シグナル配列もしくは局在配列、エピトプタグ、F L A Gタグ、ポリヒスチジンタグおよび/またはG S T融合などを含み得る。分泌シグナル配列の例としては、原核生物の分泌シグナル配列、真核生物の分泌シグナル配列、細菌発現のために5' - 最適化された真核生物の分泌シグナル配列、新規の分泌シグナル配列、ペクチン酸リアーゼ分泌シグナル配列、O m p A分泌シグナル配列、およびファージ分泌シグナル配列が挙げられるが、これらに限定されない。分泌シグナル配列の例としては、S T I I（原核生物）、F d G I I IおよびM 1 3（ファージ）、B g 1 2（酵母）、およびトランスポゾン由来のシグナル配列b l aが挙げられるが、これらに限定されない。そのような任意の配列が、所望の結果をポリペプチドによってもたらすために修飾され得る。当該修飾としては、種々のシグナル配列を含んでいるあるシグナル配列の置換、種々のリーダー配列を含んでいるリーダー配列の置換などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

#### 【0182】

所定のタンパク質またはポリペプチドは、少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、または10以上の非天然アミノ酸を含有し得る。非天然アミノ酸は、同じであり得るか、または異なり得る（例えば、1、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の異なる非天然アミノ酸を含んでいるタンパク質における1、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の異なる部位にあり得る）。ある実施形態において、タンパク質の天然に存在する型に存在している特定のアミノ酸のすべてではないが、少なくとも1つは非天然アミノ酸に置換されている。

40

#### 【0183】

本発明は、天然にコードされていないアミノ酸を少なくとも1つ含んでいるb - G C S Fを用いた方法および組成物を提供する。b - G C S Fに対する天然にコードされてい

50

いアミノ酸の少なくとも1つの導入は、通常に存在する20のアミノ酸と反応しないが、天然にコードされていない1つ以上のアミノ酸と反応する（これが挙げられるが、限定されない）、特定の化学反応に関する抱合化学反応の適用を可能にする。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるb-GCSFは、水溶性重合体（例えばポリエチレングリコール（PEG））と、天然にコードされていないアミノ酸の側鎖を介して連結される。本発明は、PEG誘導体を用いてタンパク質を選択的に修飾する高効率な方法を提供する。当該方法は、遺伝的にコードされないアミノ酸のセクターコドンに応じたタンパク質への効率的な組み込み、および好適な反応性のPEG誘導体を用いたこれらのアミノ酸の一連の修飾に関する。ここで、遺伝的にコードされないアミノ酸としては、天然に組み込まれる20のアミノ酸に見られない官能基または置換基（ケトン部分、アジド部分またはアセチレン部分が挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない。組み込まれると、それから、アミノ酸側鎖は、天然にコードされたアミノ酸に存在する特定の官能基または置換基にとって好適であると当業者に知られる、化学方法論を利用することによって修飾され得る。種々の公知の化学方法論が、水溶性重合体をタンパク質に組み込むために、本発明における使用にとって好適である。当該方法論としては、ヒュイゲン[3+2]付加環化反応（アセチレン誘導体またはアジド誘導体のそれぞれとのヒュイゲン[3+2]付加環化反応が挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない（例えば、Padwa, A. in *Comprehensive Organic Synthesis*, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; およびHuisgen, R. in *1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry*, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176を参照すればよい）。

10

20

## 【0184】

ヒュイゲン[3+2]付加環化法は求核置換反応よりむしろ付加環化に関するもので、タンパク質は非常に高い選択性をともなって修飾され得る。反応は、室温および水性の条件において、非常に良好な位置選択性（1,4>1,5）をともなって、反応混合物に触媒量のCu(I)塩を添加することによって実施され得る。例えば、Tornoe, et al., (2002) *Org. Chem.* 67:3057-3064; and, Rostovtsev, et al., (2002) *Angew. Chem. Int. Ed.* 41:2596-2599および国際公開第03/101972号を参照すればよい。[3+2]付加環化を介して本発明のタンパク質に加えられ得る分子としては、好適な官能基または置換基（アジド誘導体またはアセチレン誘導体が挙げられる）を有している実質的に任意の分子が挙げられるが、これらに限定されない。これらの分子は、アセチレン基またはアジド基を有している非天然アミノ酸のそれぞれに対して付加され得る。アセチレン基を有している非天然アミノ酸としては、p-プロパルギルオキシフェニルアラニンが挙げられるが、これに限定されない。アジド基を有する非天然アミノ酸としては、p-アジド-フェニルアラニンが挙げられるが、これに限定されない。

30

## 【0185】

ヒュイゲン[3+2]付加環化から生じる5員環は、還元性環境において一般的に不可逆的であり、水性環境において長期にわたって加水分解に対して安定である。結果として、種々の物質の物理的および化学的な特性は、厳しい水性条件において、本発明の活性PEG誘導体を変更され得る。さらに重要なことに、アジド部分およびアセチレン部分が互いに特異的である（そして、例えば遺伝的にコードされる通常20のアミノ酸のいずれとも反応しない）ので、タンパク質は非常に高い選択性をともなって1つ以上の特定の部位において修飾され得る。

40

## 【0186】

また、本発明は、PEG誘導体の加水分解に対して安定な水溶性の誘導体を提供し、1つ以上のアセチレン部分またはアジド部分を有している親水性重合体に関する。アセチレン部分を含有しているPEG重合体の誘導体は、セクターコドンに応じてタンパク質に選択的に導入されているアジド部分と結合する高い選択性を有している。同様に、アジド部分を含有しているPEG重合体の誘導体は、セクターコドンに応じてタンパク質に選択的に導入されているアセチレン部分と結合する高い選択性を有している。

50

## 【 0 1 8 7 】

より詳細には、アジド部分は、アルキルアジド、アリールアジドおよびこれらのアジドの誘導体を包含しているが、これらに限定されない。アルキルアジドおよびアリールアジドの誘導体は、アセチレン特異的な反応性が維持される限り、他の置換基を含み得る。アセチレン部分は、アルキルアセチレン、アリールアセチレンおよびそれぞれの誘導体を包含しているが、これらに限定されない。アルキルアセチレンおよびアリールアセチレンの誘導体は、アジド特異的な反応性が維持される限り、他の置換基を含み得る。

## 【 0 1 8 8 】

本発明は、他の物質（ヒドロキシアルキルスターチ（H A S）；ヒドロキシエチルスターチ（H E S）；標識；色素；重合体；水溶性重合体；ポリエチレングリコールの誘導体；光架橋剤；放射線核種；細胞毒性化合物；薬物；親和性標識；光親和性標識；反応性化合物；樹脂；第2のタンパク質もしくはポリペプチドもしくはポリペプチド類似物；抗体もしくは抗体断片；金属キレート剤；補助因子；脂肪酸；含水炭素；ポリヌクレオチド；DNA；RNA；アンチセンスポリヌクレオチド；多糖類；水溶性デンドリマー；シクロデキストリン；抑制性リボ核酸；生体適合物質；ナノ粒子；スピン標識；蛍光団；金属を含有する部分；放射性部分；新規な官能基；他の分子と共有的もしくは非共有的に相互作用する基；光ケージド部分；化学線励起部分；光異性体化可能な部分；ビオチン；ビオチン類似物；ビオチン類似物；重元素を組み込んでいる部分；化学的に切断可能な基；光切断可能な基；延長された側鎖；炭素結合型の糖；酸化還元活性のある物質；アミノチオ酸；毒性部分；同位体によって標識された部分；生物物理学的なプローブ；燐光性の基；化学発光性の基；電子密度の高い基；磁性基；インターカレートする基；発色団；エネルギー転移物質；生物学的に活性な物質；検出可能な標識；小分子；量子ドット；ナノ伝達物質；放射性ヌクレオチド；放射性伝達物質；中性子捕獲物質；または上述のものの任意の組合せ、もしくは他に所望される任意の化合物もしくは物質が挙げられるが、これらに限定されない）との、種々の官能基、置換基または部分を有する物質の抱合物を提供する。また、本発明は、対応するアセチレンまたはアジド部分を有しているPEG重合体誘導体との、アジドまたはアセチレン部分を有している物質の抱合物を包含している。例えば、アジド部分を含んでいるPEG重合体は、アセチレン機能性基を有している遺伝的にコードされないアミノ酸を含んでいるタンパク質における位置において、生物学的に活性な分子に連結され得る。PEGおよび生物学的に活性な分子が連結される結合としては、ヒュイゲン[3+2]付加環化生成物が挙げられるが、これに限定されない。

## 【 0 1 8 9 】

PEGを用いて生体材料の表面を修飾し得ることは、当該技術において十分に確立されている。例えば、参照によって本明細書に援用される米国特許第6,610,281号；Mehvar, R., J. Pharmaceut. Sci., 3(1):125-136 (2000)を参照すればよい。また、本発明は、1つ以上のアジド反応性部位もしくはアセチレン反応性部位を有している表面、およびヒュイゲン[3+2]付加環化結合を介して当該表面に結合されている本発明のアジド含有重合体もしくはアセチレン含有重合体を含んでいる生体材料を包含している。また、生体材料および他の物質は、アジド結合またはアセチレン結合以外の結合を介してアジドまたはアセチレン活性化重合体に対して結合され得る。当該結合は、例えば、後の反応に利用可能なアジド部分またはアセチレン部分を残しておくための、カルボン酸、アミン、アルコールまたはチオール部分を含んでいる結合である。

## 【 0 1 9 0 】

本発明は、本発明のアジド含有重合体およびアセチレン含有重合体を合成する方法を包含している。アジド含有のPEG誘導体の場合には、アジドは、重合体の炭素原子に対して直接的に結合され得る。他の方法として、アジド含有のPEG誘導体は、生成される重合体はその末端にアジド部分を有するように、1つの末端にアジド部分を有している連結剤を従来の活性化重合体と連結させることによって調製され得る。アセチレン含有のPEG誘導体の場合には、アセチレンは重合体の炭素原子に対して直接的に結合され得る。他の方法として、アセチレン含有のPEG誘導体は、生成される重合体はその末端にアセチ

レン部分を有するように、1つの末端にアセチレン部分を有している連結剤を従来の活性化重合体と連結させることによって調製され得る。

【0191】

より詳細には、アジド含有のPEG誘導体の場合には、少なくとも1つの活性ヒドロキシ部分を有する水溶性重合体は、より反応性の高い部分を有している置換重合体を生成するための反応を受ける。より反応性の高い部分は、例えば、水溶性重合体上にあるメシレート基、トレシレート基、トシレート基またはハロゲン離脱基である。ハロゲン化スルフォニル酸、ハロゲンおよび他の離脱基を含んでいるPEG誘導体の調製および使用は、当業者にとって公知である。それから、生成される置換重合体は、重合体の末端におけるアジド部分をより反応性の高い部分に置換するための反応を受ける。他の方法としては、少なくとも1つの活性な求核部分または求電子部分を有している水溶性重合体は、1つの末端にアジド部分を有している連結剤との反応を受ける。当該連結剤は、1つの末端にアジド部分を有しているため、PEG重合体と連結剤との間に共有結合が形成され、アジド部分が重合体の末端に配置される。求核部分および求電子部分は当業者に公知であり、求核部分および求電子部分としては、アミン、チオール、ヒドラジド、ヒドラジン、アルコール、カルボン酸塩、アルデヒド、ケトンおよびチオエステルなどが挙げられる。

10

【0192】

より詳細には、アセチレン含有のPEG誘導体の場合には、少なくとも1つの活性なヒドロキシ部分を有している水溶性重合体は、アセチレン部分を含んでいる前駆体からハロゲンまたは活性な離脱基を置換するための反応を受ける。代替的に、少なくとも1つの活性な求核部分または求電子部分を有している水溶性重合体は、1つの末端にアセチレン部分を有している連結剤との反応を受ける。当該連結剤は、1つの末端にアセチレン部分を有しているため、PEG重合体と連結剤との間に共有結合が形成され、アセチレン部分が重合体の末端に配置されることを可能にする。PEG誘導体の有機合成、調製および使用に関する、ハロゲン部分、活性化脱離基、求核部分および求電子部分の使用は、当該分野において十分に確立されている。

20

【0193】

また、本発明は、修飾されているタンパク質に他の物質を加えるために、タンパク質を選択的に修飾する方法を提供する。他の物質としては、水溶性重合体（例えば、アジド部分もしくはアセチレン部分を含有するPEGおよびPEG誘導体）が挙げられるが、これらに限定されない。アジド含有のPEG誘導体およびアセチレン含有のPEG誘導体を使用して、表面を修飾し得、分子の特性を調節し得る。ここで、当該特性としては、生体利用効率、安定性、溶解性および欠失した免疫原性が重要である。同時に、タンパク質に対してPEG誘導体をより選択的に連結させる手段は、当該技術において以前から公知であった。

30

【0194】

II. ブタのソマトトロピン

本発明のpSTポリペプチドは、ブタにおける成長を調節するために使用され得る。pSTの生物学的な活性およびpSTの生物学的な活性を性質決定するためのアッセイは、当業者にとって公知である。

40

【0195】

III. 本発明とともに使用するための一般的な組換え核酸法

本発明の多くの実施形態において、所定のpSTポリペプチドをコードする核酸は、単離され、クローン化され、しばしば組換え法を用いて変更される。当該実施形態は、これらに限定されないが、pSTポリペプチドから得られるバリエーション、誘導体、発現カセットまたは他の配列の、タンパク質発現または生成の間を含めて使用される。いくつかの実施形態において、本発明のポリペプチドをコードする配列は、異種のプロモータと作動可能に連結されている。

【0196】

天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドをコードするヌク

50

レオチド配列は、親ポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて合成され得る（配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有し、それから関連する（複数の）アミノ酸残基の導入（すなわち組み込みまたは置換）または除去（すなわち欠失または置換）をもたらすようにヌクレオチド配列を変えている、が挙げられるが、これらに限定されない）。ヌクレオチド配列は、従来の方法にしたがった部位特異的な変異生成によって簡便に修飾され得る。代替的に、ヌクレオチド配列は、化学合成（オリゴヌクレオチド合成機を用いること、および好ましくは組換えポリペプチドが生成される宿主細胞に好まれるこれらのコドンを選択することが挙げられるが、これらに限定されない）によって調製され得る（ここで、オリゴヌクレオチドは、所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて設計される）。例えば、所望のポリペプチドの部分をコードする種々の小さなオリゴヌクレオチドが合成され、PCR、ライゲーションまたはライゲーション連鎖反応によって組み立てられ得る。例えば、参照によって本明細書に援用されるBarany, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88: 189-193 (1991); 米国特許第 6, 521, 427 号を参照すればよい。

10

**【0197】**

本発明は、組換え遺伝学の分野における通常の技術を利用している。本発明に使用する一般的な方法を開示する基本的な教科書としては、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd ed. 2001); Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990); および Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994) が挙げられる。

20

**【0198】**

分子生物学的な技術について記載している一般的な教科書としては、Berger and Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology volume 152 Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrook et al., Molecular Cloning - A Laboratory Manual (2nd Ed.), Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 (“Sambrook”) および Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (supplemented through 1999) (“Ausubel”) が挙げられる。これらの教科書には、変異生成、ベクター、プロモータおよび他の関連性のある多くの原理（非天然アミノ酸、直交性の tRNA、直交性の合成酵素、およびこれらの対を含んでいるタンパク質生成用のセクターコドンを含んでいる、遺伝子の生成と関連性のあるものが挙げられるが、これらに限定されない）の利用について記載されている。

30

**【0199】**

多くの種類の変異生成が本発明において種々の目的に使用される。当該目的としては、新規の合成酵素または tRNA を生成すること、tRNA 分子を変異させること、合成酵素をコードしているポリヌクレオチドを変異させること、tRNA のライブラリを生成すること、合成酵素のライブラリを生成すること、セクターコドンを生成すること、所定のタンパク質またはポリペプチドにおける非天然アミノ酸をコードするセクターコドンを挿入することが挙げられるが、これらに限定されない。変異生成としては、部位特異的な変異生成、ランダムな点変異生成、相同性組換え、DNA シャッフリングもしくは他の反復的な変異生成、キメラ構築、鋳型を含有するウラシルを用いた変異生成、オリゴヌクレオチド特異的な変異生成、ホスホロチオネート修飾 DNA 変異生成、もしくはギャップ 2 本鎖 DNA を用いた変異生成、PCT を介した変異生成など、またはこれらの任意の組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。付加的な好適な方法としては、点不一致対、修復欠失宿主株を用いた変異生成、制限選択および制限精製、欠失変異生成、全体の遺伝子合成による変異生成、ならびに 2 本鎖切断修復などが挙げられるが、これらに限定されない。また、キメラ構築に関する変異生成が本発明に包含されるが、これに限定されない。一実施形態において、変異生成は、天然に存在する分子、または変更されるかもしくは変異された天然に存在する分子の公知の情報（配列、配列比較、物理的性質、2 次構造、3 次構造、4 次構造または結晶構造などが挙げられるが、これらに限定されない）によ

40

50

って導かれ得る。

【 0 2 0 0 】

本明細書に見られる教科書および例は、これらの手法について記載している。付加的な情報は、以下の公刊物および引用文献：Ling et al., Approaches to DNA mutagenesis: an overview, *Anal Biochem.* 254(2): 157-178 (1997); Dale et al., Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method, *Methods Mol. Biol.* 57:369-374 (1996); Smith, In vitro mutagenesis, *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462 (1985); Botstein & Shortle, Strategies and applications of in vitro mutagenesis, *Science* 229:1193-1201 (1985); Carter, Site-directed mutagenesis, *Biochem. J.* 237:1-7 (1986); Kunkel, The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis, in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin) (1987); Kunkel, Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492 (1985); Kunkel et al., Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection, *Methods in Enzymol.* 154, 367-382 (1987); Bass et al., Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities, *Science* 242:240-245 (1988); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500 (1982); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 100:468-500 (1983); Zoller & Smith, Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template, *Methods in Enzymol.* 154:329-350 (1987); Taylor et al., The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764 (1985); Taylor et al., The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA, *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8785 (1985); Nakamaye & Eckstein, Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698 (1986); Sayers et al., 5' -3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucl. Acids Res.* 16:791-802 (1988); Sayers et al., Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide, (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814; Kramer et al., The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction, *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456 (1984); Kramer & Fritz Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA, *Methods in Enzymol.* 154:350-367 (1987); Kramer et al., Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations, *Nucl. Acids Res.* 16: 7207 (1988); Fritz et al., Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro, *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999 (1988); Kramer et al., Different base/base mismatches are corrected with different efficiencies by the methyl-directed DNA mismatch-repair system of *E. coli*, *Cell* 38:879-887 (1984); Carter et al., Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, *Nucl. Acids Res.* 13: 4431-4443 (1985); Carter, Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, *Methods in Enzymol.* 154: 382-403 (1987); Eghtedarzadeh & Henikoff, Use of oligonucleotides to generate large deletions, *Nucl. Acids Res.* 14: 5115 (1986); Wells et al., Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A* 317: 415-423 (1986); Nambiar et al., Total synthesis and cloning of a gene coding for

the ribonuclease S protein, *Science* 223: 1299-1301 (1984); Sakmar and Khorana, Total synthesis and expression of a gene for the alpha-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin), *Nucl. Acids Res.* 14: 6361-6372 (1988); Wells et al., Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites, *Gene* 34:315-323 (1985); Grundstroem et al., Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis, *Nucl. Acids Res.* 13: 3305-3316 (1985); Mandeck, Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of *Escherichia coli*: a method for site-specific mutagenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:7177-7181 (1986); Arnold, Protein engineering for unusual environments, *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455 (1993); Sieber, et al., *Nature Biotechnology*, 19:456-460 (2001); W. P. C. Stemmer, *Nature* 370, 389-91 (1994); および I. A. Lorimer, I. Pastan, *Nucleic Acids Res.* 23, 3067-8 (1995)に見出される。上述の方法に関する付加的な詳細は、種々の変異生成方法に伴う問題を解決する有用な管理についても記載している *Methods in Enzymology Volume 154*に見出され得る。

10

20

30

40

50

#### 【0201】

例えば、本発明の変異生成（例えば、合成酵素のライブラリを変異させること、または tRNA を改変すること）に用いるオリゴヌクレオチドは、Beaucage and Caruthers, *Tetrahedron Letts.* 22(20):1859-1862, (1981) e.g., using an automated synthesizer, as described in Needham-VanDevanter et al., *Nucleic Acids Res.*, 12:6159-6168 (1984)に記載される固相ホスホラミダイトリエステル法にしたがって、典型的に化学合成される。

#### 【0202】

また、本発明は、直交性の tRNA / RS 対を介した非天然アミノ酸のインピボにおける組み込み用の、真核生物宿主細胞、非真核生物宿主細胞および生体に関する。宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含んでいる構築物（クローニングベクターまたは発現ベクターであり得る本発明のベクターが挙げられるが、これらに限定されない）を用いて、遺伝的に改変される（形質転換されるか、形質導入されるか、またはトランスフェクトされる、が挙げられるが、これらに限定されない）。例えば、直交性の tRNA、直交性の tRNA 合成酵素、および誘導体化されたタンパク質に関するコード領域は、遺伝子発現制御エレメントに対して作動可能に連結される。ここで、遺伝子発現制御エレメントは、所望の宿主細胞において機能する。ベクターは、例えば、プラスミド、コスミド、ファージ、細菌、ウイルス、裸のポリヌクレオチド、または抱合されたポリヌクレオチドの形態であり得る。ベクターは、標準的な方法（エレクトロポレーション（From et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 5824 (1985)）、ウイルスベクターによる感染、小さなビーズもしくは粒子のマトリクスの内部、または表面のいずれかに核酸を有している小粒子による高速弾丸侵入（high velocity ballistic penetration）（Klein et al., *Nature* 327, 70-73 (1987)）などが挙げられる）によって細胞および/または微生物に導入される。インピボにおける細胞内への核酸の転移にとって好適な技術としては、リポソーム、マイクロインジェクション、細胞融合、DEAE-デキストラン、リン酸カルシウム沈降法などの使用が挙げられる。インピボにおける遺伝子転移技術としては、ウイルス（典型的にレトロウイルス）ベクターによるトランスフェクション、およびウイルスのエンベロープタンパク質 - リポソームを用いたトランスフェクション（Dzau et al., *Trends in Biotechnology* 11:205-210 (1993)）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの場合、標的細胞を対象にする作用物質（例えば、細胞表面の膜タンパク質または当該標的細胞に特異的な抗体、標的細胞上の受容体に対するリガンドなど）を核酸入手源に付与することが好ましい。リポソームが用いられる場合、エンドサイトーシスに関連のある細胞表面の膜タンパク質と結合するタンパク質が、標的化および/または容易な取込みのために用いられ得る。そのようなタンパク質としては、例えば、特定の細胞種に向性を示すカプシドタンパク質もしくはその断片、循環において内部移行するタ

ンパク質に対する抗体、細胞内において局在化させ、細胞内半減期を増強させるタンパク質が挙げられる。

【0203】

改変された宿主細胞は、例えば、スクリーニング段階、プロモータの活性化または形質転換体の選択といった活性に適するように改変された、従来の培養液において培養され得る。これらの細胞は遺伝子導入された生体において任意に培養され得る。他の有用な参考文献（細胞の単離および培養にとって（例えば、続く核酸の単離にとって）の、が挙げられるが、これらに限定されない）としては、Freshney (1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, third edition, Wiley-Liss, New York およびこれに引用されている参考文献 ; Payne et al. (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John Wiley & Sons, Inc. New York, NY ; Gamborg and Phillips (eds.) (1995) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture ; Fundamental Methods* Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin Heidelberg New York)、ならびにAtlas and Parks (eds.) *The Handbook of Microbiological Media* (1993) CRC Press, Boca Raton, FLが挙げられる。

【0204】

標的の核酸を細胞に導入する種々の周知の方法は、本発明に使用される任意の方法に利用可能である。当該方法としては、DNAを含有する細菌の原形質体との受容細胞の融合、エレクトロポレーション、粒子衝撃法 (projectile bombardment)、およびウイルスベクターを用いた感染（以下にさらに論じられている）などが挙げられる。細菌細胞は、本発明のDNAコンストラクトを含有するプラスミドの数を増幅するために使用され得る。細菌は、対数期まで増殖され、細菌内におけるプラスミドは、当該技術において公知の種々の方法（例えばSambrookを参照すればよい）によって単離され得る。さらに、細菌からのプラスミドの精製にとってのキットは市販されている（例えば、いずれもPharmacia Biotechから得られるEasyPrep（商標）、FlexiPrep（商標）；Stratageneから得られるStrataClean（商標）；およびQiagenから得られるQIAprep（商標））。それから、単離され、精製されたプラスミドは、さらに操作されて他のプラスミドを生成するか、細胞のトランスフェクションに使用されるか、または関連するベクターに組み込まれて生体に感染させる。典型的なベクターは、特定の標的核酸の発現の制御に有用な、転写ターミネータおよび翻訳ターミネータ、転写開始配列および翻訳開始配列、ならびにプロモータを含んでいる。ベクターは、少なくとも1つの独立したターミネータ配列を含んでいる遺伝的な発現カセット、真核生物もしくは原核生物もしくはこの両方におけるカセットの複製を可能にする配列（シャトルベクターが挙げられるが、これに限定されない）、および原核生物系もしくは真核生物系の両方にとっての選択マーカーを任意に含んでいる。ベクターは、原核生物、真核生物または好ましくは両方における複製および組み込みに好適である。例えば、Giliman & Smith, *Gene* 8:81 (1979) ; Roberts, et al., *Nature*, 328:731 (1987) ; Schneider, B., et al., *Protein Expr. Purif.* 6435:10 (1995) ; Ausubel, Sambrook, Berger（すべて上述されている）を参照すればよい。クローニングに有用な細菌およびバクテリオファージのカタログは、例えば、ATCCによって提供される（例えば、ATCCによって公開されるThe ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna et al. (eds)）。また、配列決定、クローニング、および分子生物の他の局面に関する付加的な基本的な手法ならびに基礎になる論理的な考察は、Watson et al. (1992) *Recombinant DNA Second Edition* Scientific American Books, NYに見られる。さらに、実質的に任意の核酸（および、らせん構造であるか否かにかかわらず、実質的に任意の標識核酸）は、任意の種々の販売元（例えば、the Midland Certified Reagent Company (Midland, TX、ワールドワイドウェブのmcrc.comにおいて利用可能である）、The Great American Gene Company (Ramona)、CA、ワールドワイドウェブのgenco.comにおいて利用可能である）、ExpressGen Inc. (Chicago, IL)、ワールドワイドウェブのexpressgen.comにおいて利用可能である）、Operon Technologies Inc. (Alameda)、CA) および多くの他社) から、特別または通常に注文して提供され得る。

## 【0205】

(セクターコドン)

本発明のセクターコドンは、タンパク質の生合成機構の遺伝学的なコドンの枠組みを拡張する。例えば、セクターコドンとしては、固有の3塩基コドン、ナンセンスコドン(例えば、ストップコドン(アンバーコドン(UAG)、オーカーコドン、またはオパールコドン(UGA)が挙げられるが、これらに限定されない)、非天然コドン、4塩基以上のコドン、またはレアコドン(rare codon)などが挙げられるが、これらに限定されない。所望の遺伝子またはポリヌクレオチドに導入され得るセクターコドンの数が、広範囲に及ぶ(少なくともpSTの一部を少なくともコードする単一のポリヌクレオチドにおける1以上、2以上、3以上、4、5、6、7、8、9、10以上が挙げられるが、これらに限定されない)ことは、当業者にとって容易に理解される。

10

## 【0206】

一実施形態において、方法は、真核細胞のインビボにおける1つ以上の非天然アミノ酸の組み込み用のストップコドンである、セクターコドンの使用に関する。例えば、ストップコドン(UAGが挙げられるが、これに限定されない)を認識するO-tRNAが生成され、O-RSによって所望の非天然アミノ酸とともにアミノアシル化される。このO-tRNAは、天然に存在する宿主のアミノアシルtRNA合成酵素によって認識されない。従来、部位特異的な突然変異生成は、所定のポリペプチドにおける所定の部位に対するストップコドン(TAGが挙げられるが、これに限定されない)の導入に使用され得る。例えば、Sayers, J.R.,ら(1988), 5'-3' Exonuclease in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 791-802を参照すればよい。O-RS、O-tRNAおよび所定のポリペプチドをコードする核酸がインビボにおいて組み合わされると、非天然アミノ酸は、UAGコドンに応じて組み込まれて、特定の位置に非天然アミノ酸を含んでいるポリペプチドを生じさせる。

20

## 【0207】

非天然アミノ酸のインビボにおける組み込みは、宿主細胞を大きく乱すことなくなされ得る。例えば、UAGコドンの抑制効率は、O-tRNA(アンバーサプレッサtRNAが挙げられるが、これらに限定されない)と、(ストップコドンに対して結合し、リボソームからの成長しつつあるペプチドの放出を開始する)真核細胞放出因子(eRFが挙げられるが、これに限定されない)との間の競合に依存するので、抑制効率は、O-tRNAおよび/またはサプレッサtRNAの発現レベルを増強することによって調節され得るが、これらに限定されない。

30

## 【0208】

また、非天然アミノ酸は、レアコドンによってコードされ得る。例えば、インビトロにおけるタンパク質合成反応においてアルギニン濃度が減少した場合、レアアルギニンコドン(AGG)は、アラニンによってアシル化された合成RNAによるアラニンの挿入に有効であることが証明されている。例えば、Ma et al., *Biochemistry*, 32:7939 (1993)を参照すればよい。この場合、合成tRNAは、天然に存在するtRNAアルギニン(大腸菌において少数の種として存在する)と競合する。いくつかの生物は、すべての三塩基コドンを使用しない。*Micrococcus luteus*において割り当てられていないコドンAGAは、インビトロの転写/翻訳の抽出物における、アミノ酸の挿入に利用されている。例えば、Kowal and Oliver, *Nucl. Acid. Res.*, 25:4685 (1997)を参照すればよい。本発明の構成要素は、インビトロにおいてこれらレアコドンを使用するために生成され得る。

40

## 【0209】

また、セクターコドンは、拡張されたコドン(4以上の塩基コドン(例えば、4、5、6以上の塩基コドン)が挙げられるが、これらに限定されない)を包含している。4塩基コドンの例としては、AGGA、CUAG、UAGA、およびCCCUなどが挙げられるが、これらに限定されない。5塩基コドンの例としては、AGGAC、CCCCU、CCCUC、CUAGA、CUACU、およびUAGGCなどが挙げられるが、これらに限定されない。本発明の特徴は、フレームシフト抑圧に基づいて延長されたコドンの使用を

50

包含する。4以上の塩基コドンは、同じタンパク質に1つまたは複数の非天然アミノ酸（例として挙げられるが、これらに限定されない）を挿入可能である。例えば、突然変異したO-tRNA（特別なフレームシフトサプレッサtRNAが挙げられるが、これに限定されない）の存在下において、アンチコドンループ（少なくとも8~10ntのアンチコドンループが挙げられるが、これらに限定されない）を用いて、4以上の塩基コドンが単一のアミノ酸として解読される。他の実施形態において、アンチコドンループは、少なくとも4塩基コドン、少なくとも5塩基コドン、または少なくとも6塩基コドン（例として挙げられるが、これらに限定されない）を翻訳可能である。見込みのある4塩基コドンが256あるので、複数の非天然アミノ酸は、4以上の塩基コドンを用いて同じ細胞においてコードされ得る。Anderson et al, (2002) Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size, Chemistry and Biology. 9:237-244 ; Magliery, (2001) Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of "Shifty" Four-base Codons with a Library Approach in Escherichia coli, J. Mol. Biol. 307: 755-769を参照すればよい。

10

**【0210】**

例えば、4塩基コドンは、インビトロ生合成方法を用いたタンパク質への非天然アミノ酸の組み込みに使用されている。例えば、Ma et al, (1993) Biochemistry. 32:7939、およびHohsaka et al, (1999) L Am. Chem. Soc. 121: 34を参照すればよい。CGGGおよびAGGUは、化学的にアシル化された2つのフレームシフトサプレッサtRNAを用いて、2-ナフチルアラニンおよびリジンNB D誘導体をストレプトアビジンに対して、インビトロにおいて同時に組み込むために使用された。例えば、Hohsaka et al, (1999) J. Am. Chem. Soc. 121: 12194を参照すればよい。インビボにおける研究において、Moore et alは、NCUAアンチコドンを有しているtRNA<sup>Leu</sup>誘導体のUAGNコドン（Nは、U、A、GまたはCであり得る）を抑圧する能力を試験し、クワドラプレットUAGAが、0または-1フレームの状態に少なく翻訳して、13から26%の効率において、UCAアンチコドンを有するtRNA<sup>Leu</sup>によって翻訳され得ることを見出した。例えば、Moore et al, (2000) J. Mol. Biol., 298:195を参照すればよい。一実施形態において、レアコドンまたはナンセンスコドンに基づいて延長されたコドンは、読み過ぎのミスセンス、および他の不要な部位におけるフレームシフト抑圧を低減し得る本発明に使用され得る。

20

30

**【0211】**

また、所定の系に関して、内因性の系が天然の塩基コドンを使用しない（またはまれにしか使用しない）場合に、セクターコドンは天然の3塩基コドンの1つを包含し得る。この例としては、天然の3塩基コドンを認識するtRNAを欠損している系、および/または3塩基コドンがレアコドンである系が挙げられる。

**【0212】**

セクターコドンは非天然の塩基対を任意に包含する。これらの非天然の塩基対は存在する遺伝子アルファベットをさらに拡張する。1つの追加塩基対は、64から125までトリプレットの数を増加させる。第3の塩基対の性質としては、安定かつ選択的な塩基対形成、ポリメラーゼによる高い正確さにおけるDNAへの効率的な酵素的組み込み、および新生の非天然塩基対の合成後における効率的な連続するプライマー伸張が挙げられる。方法および組成物に適合し得る非天然の塩基対の記述の例としては、例えばHirao et al, (2002) An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein, Nature Biotechnology, 20:177-182が挙げられる。また、Wu, Y., et al., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:14626-14630を参照すればよい。他の関連する刊行物は以下に挙げられている。

40

**【0213】**

インビボにおける使用法に関して、非天然ヌクレオシドは、膜透過性であり、リン酸化されて対応する3リン酸塩を形成する。その上に、増加した遺伝情報は、安定であり、細胞性の酵素によって破壊されない。Bennerおよびその他によるこれまでの試みは、もっと

50

も注目すべき例であるイソ - C : イソ - G 対という、基準の Watson-Crick 対における水素結合様式とは異なる水素結合様式を巧く活用した。例えば、Switzer et al, (1989) J. Am. Chem. Soc, 111 :8322 ; および Piccirilli et al, (1990) Nature, 343:33 ; Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602 を参照すればよい。これらの塩基は、通常、ある程度まで天然塩基と誤対合し、酵素的に修復され得ない。Kool および共同研究者らは、塩基間の疎水性パッキング相互作用 (hydrophobic packing interactions) が水素結合と入れ替わって、塩基対の形成を生じ得ることを証明した。例えば、Kool, (2000) Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602、および Guckian and Kool, (1998) Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 36, 2825 を参照すればよい。上述した条件のすべてを満たす非天然の塩基対を開発する試みにおいて、Schultz、Romesberg および共同研究者らは、一連の非天然の疎水性塩基を体系的に合成し、研究している。P I C S : P I C S 自己対は、天然塩基対より安定であることが見出されており、Escherichia coli の DNA ポリメラーゼ I のクレノー断片 (K F) によって、DNA に効率的に組み込まれ得る。例えば、McMinn et al, (1999) J. Am. Chem. Soc. 121: 11586 ; および Ogawa et al, (2000) J. Am. Chem. Soc. 122:3274 ; を参照すればよい。3 M N : 3 M N 自己対は、生物学的機能に対して十分な効率性および選択性を有して、K F によって合成され得る。例えば、Ogawa et al, (2000) J. Am. Chem. Soc, 122:8803 を参照すればよい。しかし、両方の塩基は、さらなる複製に対して連鎖ターミネータとして作用する。近年、突然変異体の DNA ポリメラーゼは、P I C S 自己対の複製に使用され得るように、開発されている。さらに、7 A I 自己対は複製され得る。例えば、Tae et al, (2001) J. Am. Chem. Soc. 123:7439 を参照すればよい。また、C u ( I I ) との結合によって安定な対を形成する新規な金属塩基対である D i p i c : P y が開発されている。例えば、Meggers et al, (2000) J. Am. Chem. Soc 122:10714 を参照すればよい。拡張されたコドンおよび非天然コドンが、天然コドンに対して本来的に直交性であるので、本発明の方法は、この性質を活かして非天然アミノ酸用の直交性の t R N A を生成し得る。

10

20

30

40

50

#### 【0214】

また、翻訳回避系 (translational bypassing system) が、所望のポリペプチドにおける非天然アミノ酸の組み込みに使用され得る。翻訳回避系において、大きな配列が遺伝子に組み込まれるが、タンパク質に翻訳されない。当該配列は、リボソームに当該配列を跳び越えさせ、挿入の下流にある翻訳を再開させる合図としての機能を果たす構造を含んでいる。

#### 【0215】

ある実施形態において、本発明の方法および/または組成物における所定のタンパク質またはポリペプチド (またはこれらの一部) は、核酸によってコードされている。典型的に、核酸は、少なくとも1つのセクターコドン、少なくとも2つのセクターコドン、少なくとも3つのセクターコドン、少なくとも4つのセクターコドン、少なくとも5つのセクターコドン、少なくとも6つのセクターコドン、少なくとも7つのセクターコドン、少なくとも8つのセクターコドン、少なくとも9つのセクターコドン、少なくとも10またはそれ以上のセクターコドンを含んでいる。

#### 【0216】

所定のタンパク質またはポリペプチドをコードする遺伝子は、例えば、非天然アミノ酸を組み込むための1つ以上のセクターコドンを含めるために、当業者に公知の方法、ならびに変異生成および分子生物学技術に基づいて本明細書に記載の方法を用いて、突然変異生成され得る。例えば、所定のあるタンパク質に関する核酸は、1つ以上の非天然アミノ酸の組み込みをもたらす1つ以上のセクターコドンを含めるために、突然変異される。本発明は、そのようなバリエーション (例えば非天然アミノ酸を少なくとも1つ含んでいる突然変異体、任意のタンパク質の型が挙げられるが、これらに限定されない) のいずれかを包含している。また同様に、本発明は、対応する核酸 (すなわち、1つ以上の非天然アミノ酸をコードする1つ以上のセクターコドンを含む任意の核酸) を包含している。

#### 【0217】

所定のタンパク質（例えば p S T ポリペプチド）をコードする核酸分子によって、ポリペプチドの所望される任意の位置にシステインを導入する突然変異が容易になされ得る。システインは、反応性分子、水溶性重合体、タンパク質、または種々の他の分子を所定のタンパク質に導入するために広く使用されている。ポリペプチドの所望の位置へのシステインの組込みに好適な方法は、当業者に公知であり（例えば、引用によって本明細書に援用される米国特許第 6,608,183 号に記載の方法）、標準的な技術である。

【0218】

IV. 天然にコードされていないアミノ酸

非常に広範囲に及ぶ天然にコードされていないアミノ酸が本発明における使用に好適である。天然にコードされていない種々の任意のアミノ酸は、p S T ポリペプチドに導入され得る。一般的に、導入された天然にコードされていないアミノ酸は、遺伝的にコードされる通常の 20 のアミノ酸（すなわち、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、スレオニン、トリプトファン、チロシン、およびバリン）に対して化学的に、実質的に不活性である。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸は、通常の 20 のアミノ酸に見られない官能基と効率的かつ選択的に反応して安定な抱合物を形成する側鎖官能基（アジド、ケトン、アルデヒドおよびアミノオキシ基が挙げられるが、これらに限定されない）を含んでいる。例えば、アジド官能基を含んでいる天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる p S T ポリペプチドは、重合体（ポリ(エチレングリコール)が挙げられるが、これに限定されない)と反応してか、または代替可能にアルキン部分を含有する第 2 のポリペプチドと反応して、ヒュイゲン [3 + 2] 付加環化生成物を形成するためのアジドおよびアルキン官能基の選択的な反応によって生じる安定な抱合物を形成し得る。

10

20

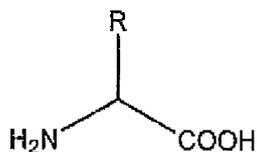
【0219】

- アミノ酸の一般的な構造は、以下の(式 I) :

【0220】

【化 5】

I



30

【0221】

のように示される。

【0222】

天然にコードされていないアミノ酸は、典型的に、上述の式を有する構造のいずれかであり（ここで、R 基は 20 の天然アミノ酸に用いられている官能基以外の任意の置換基である）、本発明における利用に好適であり得る。本発明の天然にコードされていないアミノ酸が、側鎖の構造のみにおいて天然アミノ酸と典型的に異なるので、天然にコードされていないアミノ酸は、それらが天然に存在するポリペプチドにおいて形成される同じ様式において、他のアミノ酸（天然または天然にコードされていないアミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない）とアミド結合を形成する。しかし、天然にコードされていないアミノ酸はこれらを天然のアミノ酸と区別する側鎖基を有している。例えば、R は、アルキル -、アリール -、アシル -、ケト -、アジド -、ヒドロキシル -、ヒドラジン、シアノ -、ハロ -、ヒドラジド、アルケニル、アルキル、エーテル、チオール、セレノ -、スルフォニル -、ボレート、ボロネート、ホスホ、ホスホノ、ホスフィン、ヘテロ環、エノン、イミン、アルデヒド、エステル、チオ酸、ヒドロキシルアミン、もしくはアミノ基、

40

50

またはこれらの組合せを任意に包含している。本発明における使用に好適であり得る他の所定の天然に存在しないアミノ酸としては、光活性化架橋を含んでいるアミノ酸、スピ  
ン標識されたアミノ酸、蛍光性のアミノ酸、金属が結合しているアミノ酸、金属を含有し  
ているアミノ酸、放射性のアミノ酸、新規な官能基を有するアミノ酸、他の分子と共有  
的または非共有的に相互作用するアミノ酸、光ケージドおよび/または光異性体化アミノ酸  
、ピオチンまたはピオチン類似体を含んでいるアミノ酸、糖鎖付加されたアミノ酸（例  
えば糖置換化セリン）、他の炭水化物によって修飾されたアミノ酸、ケト含有アミノ酸、ポ  
リエチレングリコールまたはポリエーテルを含んでいるアミノ酸、重元素によって置換さ  
れたアミノ酸、化学的に切断可能および/または光によって切断可能なアミノ酸、天然ア  
ミノ酸と比べて延長された側鎖（ポリエーテルまたは長鎖炭化水素（約5または約10を  
10 超える炭素が挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定され  
ない）を有しているアミノ酸、炭素結合型の糖を含有しているアミノ酸、酸化還元活性の  
アミノ酸、アミノチオ酸含有アミノ酸、ならびに1つ以上の毒性部分を含んでいるアミノ  
酸が挙げられる。

#### 【0223】

本発明における使用に好適であり得、水溶性重合体との反応に有用である例示的な天然  
にコードされていないアミノ酸としては、カルボニル反応性基、アミノオキシ反応性基、  
ヒドロキシルアミン反応性基、ヒドラジド反応性基、セミカルバジド反応性基、アジド反  
応性基およびアルキン反応性基を有するアミノ酸が挙げられるが、これらに限定され  
ない。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸は、糖鎖部分を含  
20 んでいる。そのようなアミノ酸の例としては、N-アセチル-L-グルコサミンニル-L-セ  
リン、N-アセチル-L-ガラクトサミンニル-L-セリン、N-アセチル-L-グルコサ  
ミンニル-L-スレオニン、N-アセチル-L-グルコサミンニル-L-アスパラギンおよび  
O-マンノサミンニル-L-セリンが挙げられるが、これらに限定されない。また、そのよ  
うなアミノ酸の例としては、アミノ酸と糖鎖との間に天然に存在するN型またはO型の結  
合が、天然には通常に見られない共有結合（アルケン、オキシム、チオエーテルおよびア  
ミドなどが挙げられるが、これらに限定されない）によって置換されている場合の例が挙  
げられる。また、そのようなアミノ酸の例は、天然に存在するタンパク質に通常は見られ  
ない糖鎖（例えば、2-デオキシ-グルコース、および2-デオキシガラクトース）を含  
30 んでいる。

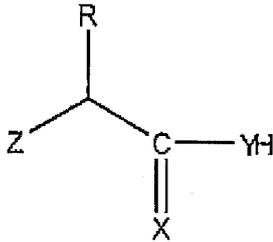
#### 【0224】

本明細書に規定される天然にコードされていないアミノ酸の多くは、市販されている（  
例えば、Sigma-Aldrich（St.Louis、MO、USA）、Novabiochem（EMD Biosciences部門、Da  
rmstadt、ドイツ）、またはPeptech（Burlington、MA、USA）から得られる）。市販され  
ていない天然にコードされていないアミノ酸は、本明細書に規定されているようにか、ま  
たは当業者にとって公知の標準的な方法を用いて任意に合成される。有機合成技術に関し  
ては、例えば、Organic Chemistry by Fessenden and Fessenden, (1982, Second Editio  
n, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry by March (Thir  
d Edition, 1985, Wiley and Sons, New York); およびAdvanced Organic Chemistry by  
40 Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)  
を参照すればよい。また、参照によって本明細書に援用される、米国特許第7,045,  
337号および米国特許第7,083,970号を参照すればよい。また、新規な側鎖を  
含有する非天然アミノ酸に加えて、本発明における使用に好適であり得る非天然アミノ酸  
は、これらに限定されないが、式I IおよびI I I:

#### 【0225】

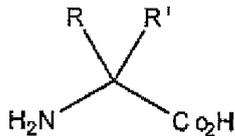
【化 6】

II



10

III



【0226】

(ここで、Zは、OH、NH<sub>2</sub>、SH、NH-R'、またはS-R'を典型的に含んでおり；同じかまたは異なり得るXおよびYは、SまたはOを典型的に含んでおり、任意に同じであるか、または異なるRおよびR'は、水素だけでなく式Iを有する非天然アミノ酸に関して上述したR基にとっての置換基の同じ一覧から任意に選択される)の構造が挙げられる修飾された骨格構造を任意に含んでいる。例えば、本発明の非天然アミノ酸は、式IIおよびIIIによって示されるようなアミノ基またはカルボキシル基において置換基を任意に含んでいる。この種の非天然アミノ酸としては、通常の20の天然アミノ酸または非天然アミノ酸に対応する側鎖を有している(限定されないが、これらが挙げられる)、  
 - ヒドロキシ酸、  
 - チオ酸、  
 - アミノチオカルボキシレートが挙げられるが、これらに限定されない。さらに、  
 - 炭素における置換基としては、L、D、または  
 - 2置換アミノ酸(例えば、D-グルタメート、D-アラニン、D-メチル-O-チロシン、およびアミノブチル酸など)が任意に挙げられるが、これらに限定されない。他の構造的な代替物としては、環状アミノ酸(例えば、プロリン類似物ならびに3、4、5、6、7、8および9員環のプロリン類似物など)、ならびに  
 および  
 アミノ酸(例えば、置換  
 -アラニンおよび  
 -アミノブチル酸など)が挙げられる。

20

30

【0227】

多くの非天然アミノ酸は、天然アミノ酸(例えば、チロシン、グルタミンおよびフェニルアラニン)に基づいており、本発明における使用に好適である。チロシン類似物としては、置換チロシンが、ケト基(アセチル基が挙げられるが、これに限定されない)、ベンゾイル基、アミノ基、ヒドラジン基、ヒドロキシアミン基、チオール基、カルボキシ基、イソプロピル基、メチル基、C<sub>6</sub>~C<sub>20</sub>の直鎖状または分枝鎖状の炭化水素、飽和もしくは不飽和の炭化水素、O-メチル基、ポリエーテル基、ニトロ基、またはアルキニル基など(限定されないが、これらが挙げられる)を含んでいる場合の、パラ位置換チロシン、オルト位置換チロシン、およびメタ位置換チロシンが挙げられるが、これらに限定されない。さらにまた、多置換アリアル環が意図される。本発明における利用に好適なグルタミン類似物としては、  
 - ヒドロキシ誘導体、  
 - 置換誘導体、環状誘導体、およびアミド置換グルタミン誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。本発明における利用に好適なフェニルアラニン類似物の例としては、置換基が、ヒドロキシ基、メトキシ基、メチル基、アリル基、アルデヒド、アジド、ヨード、プロモ、ケト基(アセチル基が挙げられるが、これに限定されない)、ベンゾイル、またはアルキニル基など(限定されないが、これらが挙げられる)を含んでいる場合の、パラ位置換フェニルアラニン、オルト位置換フェニルアラニン、およびメタ位置換フェニルアラニンが挙げられるが、これらに限定

40

50

されない。本発明における利用に好適な非天然アミノ酸の特定の例としては、p - アセチル - L - フェニルアラニン、O - メチル - L - チロシン、L - 3 - ( 2 - ナフチル ) アラニン、3 - メチル - フェニルアラニン、O - 4 - アリル - L - チロシン、4 - プロピル - L - チロシン、トリ - O - アセチル - G l c N A c - セリン、L - ドーパ、フッ化フェニルアラニン、イソプロピル - L - フェニルアラニン、p - アジド - L - フェニルアラニン、p - アシル - L - フェニルアラニン、p - ベンゾイル - L - フェニルアラニン、L - ホスホセリン、ホスホノセリン、ホスホノチロシン、p - ヨード - フェニルアラニン、p - プロモフェニルアラニン、p - アミノ - L - フェニルアラニン、およびイソプロピル - L - フェニルアラニン、および p - プロパルギルオキシ - フェニルアラニンなどが挙げられるが、これらに限定されない。本発明における使用に好適な非天然アミノ酸の変形の構造の例は、例えば、国際公開第 2 0 0 2 / 0 8 5 9 2 3 号 ( 名称 : “ In vivo incorporation of unnatural amino acids ” ) に規定されている。また、さらなるメチオニン類似物に関しては、参照によって本明細書に援用される Kiick et al., (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24 を参照すればよい。参照によって本明細書に援用される国際出願第 P C T / U S 0 6 / 4 7 8 2 2 ( 名称 “ Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides ” ) には、芳香族アミン部分 ( p - アミノ - フェニルアラニンが挙げられるが、これに限定されない ) の還元的なアルキル化、および還元的なアミン化について記載されている。

10

20

30

40

50

#### 【 0 2 2 8 】

一実施形態において、非天然アミノ酸 ( 例えば p - ( プロパルギルオキシ ) - フェニルアラニン ) を含んでいる p S T ポリペプチドの組成物が、提供される。また、p - ( プロパルギルオキシ ) - フェニルアラニンを含んでいる種々の組成物 ( タンパク質および / または細胞が挙げられるが、これらに限定されない ) が、提供される。1つの局面において、p - ( プロパルギルオキシ ) - フェニルアラニン非天然アミノ酸を含んでいる組成物は、直交性の t R N A をさらに含んでいる。非天然アミノ酸は、直交性の t R N A に対して共有結合的に ( 限定されないが、これが挙げられる ) 結合され得る ( アミノアシル結合を介して直交性の t R N A に対して共有結合的に結合される、直交性の t R N A の末端リボース糖の 3 ' O H または 2 ' O H に対して共有結合的に結合されるなど、が挙げられるが、これらに限定されない ) 。

#### 【 0 2 2 9 】

タンパク質に組み込まれ得る非天然アミノ酸を介する化学部分は、タンパク質の種々の利点および操作をもたらす。例えば、ケト官能基の固有の反応性は、多くのヒドラジン含有試薬またはヒドロキシアミン含有試薬のいずれかを用いた、インビボおよびインビトロにおけるタンパク質の選択的な修飾を可能にする。重原子非天然アミノ酸は、例えば、X線構造データの位相合わせに有用であり得る。また、非天然アミノ酸を用いた重原子の部位特異的な導入は、重原子にとっての位置の選択に選択性および自由度をもたらす。光反応性非天然アミノ酸 ( ベンゾフェノンおよびアリールアジド ( フェニルアジドが挙げられるが、これらに限定されない ) 側鎖を有するアミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない ) は、例えば、タンパク質のインビボおよびインビトロにおける効率的な光架橋を可能にする。光反応性アミノ酸の例としては、p - アジド - フェニルアラニンおよび p - ベンゾイル - フェニルアラニンが挙げられるが、これらに限定されない。光反応性アミノ酸を有するタンパク質は、その結果として、光反応性基を供給する一時的な制御の励起によって自在に光架橋され得る。1つの例において、非天然アミノ酸のメチル基は、核磁気共鳴および振動顕微鏡の利用を伴う ( 限定されないが、これらが挙げられる ) 、局所的な構造および動態のプロープとして、放射線標識されたメチル基 ( 限定されないが、これが挙げられる ) に置換され得る。アルキニル官能基またはアジド官能基は、例えば、[ 3 + 2 ] 付加環化反応を介したタンパク質の選択的な修飾を可能にする。

#### 【 0 2 3 0 】

アミノ末端においてポリペプチドに組み込まれる非天然アミノ酸は、20の天然のアミ

ノ酸に用いられる官能基以外の任意の置換基であるR基、および - アミノ酸において通常に存在するNH<sub>2</sub>基とは異なる第2の反応性基から構成され得る(式Iを参照すればよい)。類似の非天然アミノ酸が、カルボキシル末端において、 - アミノ酸に通常に存在するCOOH基と異なる第2の反応性基を用いて、組み込まれ得る(式1を参照すればよい)。

#### 【0231】

本発明の非天然アミノ酸は、20の天然アミノ酸において得られない付加的な特性を提供するために選択されるか、または設計され得る。例えば、非天然アミノ酸は、タンパク質(例えば、非天然アミノ酸が組み込まれているタンパク質)の生物学的な特性を修飾するために、必要に応じて設計され得るか、または選択され得る。例えば、タンパク質へのアミノ酸の挿入によって、以下の特性が任意に調節され得る。当該特性としては：毒性、体内分布、可溶性、安定性(例えば、熱的な安定性、加水分解に対する安定性、酸化的な安定性および酵素分解に対する耐性など)、精製および処理の容易さ、構造的な特性、分光学的特性、化学的および/または光化学的な特性、触媒活性、酸化還元電位、半減期、ならびに他の分子と反応するための能力(例えば、共有結合的か、または非共有結合的)などが挙げられる。

10

#### 【0232】

(非天然アミノ酸の構造および合成：カルボニル基、カルボニル様基、マスクされているカルボニル基、保護されているカルボニル基およびヒドロキシアミン基)

いくつかの実施形態において、本発明は、オキシム結合によって水溶性重合体(例えば、PEG)と結合されているpSTを提供する。

20

#### 【0233】

多くの種類の天然にコードされていないアミノ酸は、オキシム結合の形成にとって好ましい。当該アミノ酸としては、カルボニル基、ジカルボニル基またはヒドロキシルアミン基を含有する天然にコードされていないアミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない。また、当該アミノ酸は、参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2006/0194256号、米国特許出願公開第2006/0217532号、および米国特許出願公開第2006/0217289号、ならびに国際公開第2006/069246号(名称：“天然アミノ酸およびポリペプチドを含有する組成物、非天然アミノ酸およびポリペプチドに関する方法、ならびに非天然アミノ酸およびポリペプチドの使用”)に記載されている。

30

#### 【0234】

本発明のいくつかの実施形態は、1つ以上の位置においてパラ-アセチルフェニルアラニンアミノ酸を用いて置換されているpSTポリペプチドを使用する。p-アセチル-(+/-)-フェニルアラニンおよびm-アセチル-(+/-)-フェニルアラニンの合成については、参照によって援用されるZhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003)に記載されている。カルボニルまたはジカルボニルを含有する他のアミノ酸が、当業者によって同様に調製され得る。さらに、本明細書に含まれる非天然アミノ酸の非限定的な例としては、参照によって本明細書に援用される米国特許第7,083,970号の図4、24~34および36~39に示されている。

40

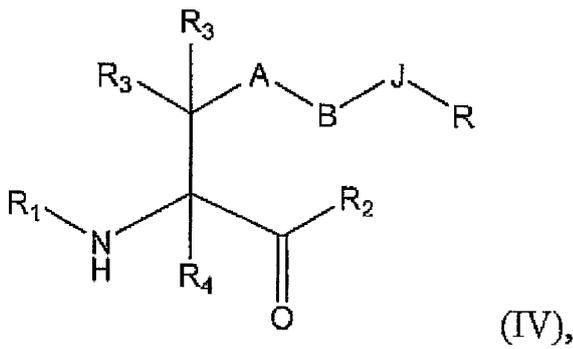
#### 【0235】

求電子反応性基を有するアミノ酸は、種々の反応が可能であり、他の分子との間の求核付加反応を介して分子を連結し得る。当該求電子反応性基としては、カルボニル基(ケト基およびジカルボニル基が挙げられる)、カルボニル様基(カルボニル基(ケト基およびジカルボニル基が挙げられる)と同様の反応性を有しており、カルボニル基と構造的に類似している)、マスクされたカルボニル基(カルボニル基(ケト基およびジカルボニル基が挙げられる)に直ちに交換され得る)、または保護されたカルボニル基(脱保護されると、カルボニル基(ケト基およびジカルボニル基が挙げられる)と同様の反応性を有する)が挙げられる。そのようなアミノ酸としては、化学式(IV)の構造を有するアミノ酸が挙げられる：

50

【0236】

【化7】



10

【0237】

(ここで、

Aは任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

20

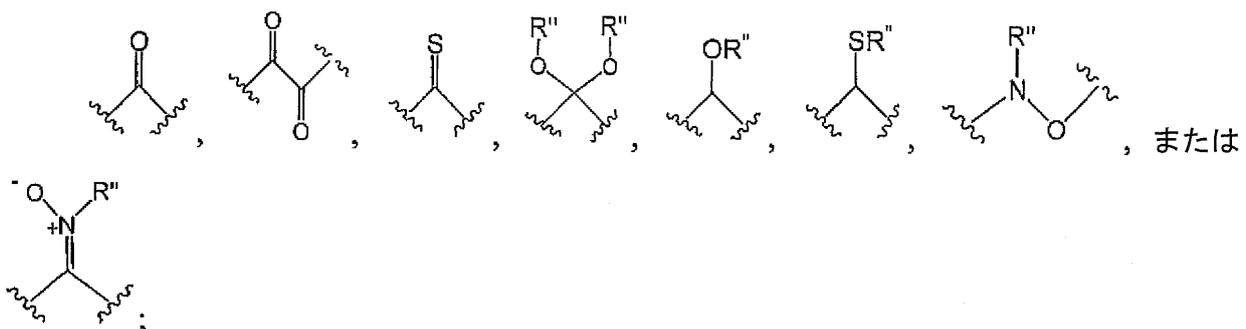
Bは任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、 $-O-$ 、 $-O-$  (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-S-$ 、 $-S-$  (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-S(O)_k-$  (ここで、 $k$ は1または3である)、 $-S(O)_k$  (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$  (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$  (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-N(R')$ 、 $-NR'$  (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')$  (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R')$  (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-N(R')CO-$  (アルキレンまたは置換アルキレン)、 $-N(R')C(O)O-$ 、 $-S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')C(O)N(R')$ 、 $-N(R')C(S)N(R')$ 、 $-N(R')S(O)_kN(R')$ 、 $-N(R')-N=$ 、 $-C(R')=N-$ 、 $-C(R')=N-N(R')$ 、 $-C(R')=N-N=$ 、 $-C(R')_2-N=N-$ 、および $-C(R')_2-N(R')-N(R')$  (ここで、 $R'$ はそれぞれ独立してH、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択されるリンカーであり；

30

Jは、

【0238】

【化8】



40

【0239】

であり；

50

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R' はそれぞれ独立してH、アルキル、置換アルキル、もしくは保護基、または1つ以上のR' 基が存在している場合、2つのR' がヘテロシクロアルキルを形成してもよい；

R<sub>1</sub> は任意であり、存在している場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

R<sub>2</sub> は任意であり、存在している場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

R<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> は、それぞれ独立してH、ハロゲン、低級アルキル、もしくは置換低級アルキルであるか、またはR<sub>3</sub> および R<sub>4</sub> が、もしくは2つのR<sub>3</sub> 基がシクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルを形成してもよい；または、

A - B - J - R 基がともに、少なくとも1つのカルボニル基（ジカルボニル基、保護されたカルボニル基（保護されたジカルボニル基を含む）、またはマスクされたカルボニル基（マスクしたジカルボニル基を含む）が挙げられる）を含有する二環性もしくは三環性シクロアルキルか、またはヘテロシクロアルキルを形成し；または、

J - R 基がともに、少なくとも1つのカルボニル基（ジカルボニル基、保護されたカルボニル基（保護されたジカルボニル基を含む）、またはマスクされたカルボニル基（マスクされたジカルボニル基を含む）が挙げられる）を含有する二環性もしくは三環性シクロアルキルか、またはヘテロシクロアルキルを形成する；

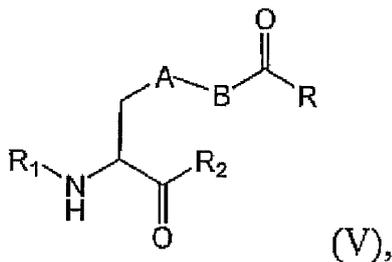
ただし、A がフェニレンであり、R<sub>3</sub> がそれぞれHであるとき、B は存在し；A が - (CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub> - であり、R<sub>3</sub> がそれぞれHであるとき、B は - NHC(O)(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>) - ではなく；また、A および B が存在せず、R<sub>3</sub> がそれぞれHであるとき、R はメチルではない。

【0240】

また、化学式(V)の構造を有するアミノ酸が含まれる；

【0241】

【化9】



【0242】

(ここで、

A は任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

B は任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、-O-、-O-（アルキレンまたは置換アルキレン）、-S-、-S-（アルキレンまたは置換アルキレン）-S(O)<sub>k</sub>-（ここで、k は1または3である）、-S(O)<sub>k</sub>（アルキレンまたは置換アルキレン）-、-C(O)-、-C(O)-（アルキレンまたは置換アルキレン）-、-C(S)-、-C(S)-（アルキレンまたは置換アルキレン）-

、 - N ( R ' ) - 、 - N R ' - ( アルキレンまたは置換アルキレン ) - 、 - C ( O ) N ( R ' ) - 、 - C O N ( R ' ) - ( アルキレンまたは置換アルキレン ) - 、 - C S N ( R ' ) - 、 - C S N ( R ' ) - ( アルキレンまたは置換アルキレン ) - 、 - N ( R ' ) C O - ( アルキレンまたは置換アルキレン ) - 、 - N ( R ' ) C ( O ) O - 、 - S ( O )<sub>k</sub> N ( R ' ) - 、 - N ( R ' ) C ( O ) N ( R ' ) - 、 - N ( R ' ) C ( S ) N ( R ' ) - 、 - N ( R ' ) S ( O )<sub>k</sub> N ( R ' ) - 、 - N ( R ' ) - N = 、 - C ( R ' ) = N - 、 - C ( R ' ) = N - N ( R ' ) - 、 - C ( R ' ) = N - N = 、 - C ( R ' )<sub>2</sub> - N = N - 、 および - C ( R ' )<sub>2</sub> - N ( R ' ) - N ( R ' ) - ( ここで、 R ' はそれぞれ独立して H、アルキル、または置換アルキルである ) からなる群から選択されるリンカーであり；

R は、 H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R<sub>1</sub> は任意であり、存在している場合は、 H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

R<sub>2</sub> は任意であり、存在している場合は、 OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

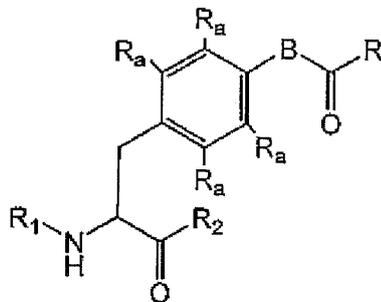
R<sub>a</sub> のそれぞれは独立して、 H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、 - N ( R ' )<sub>2</sub>、 - C ( O )<sub>k</sub> R ' ( ここで、 k は 1 または 3 である )、 - C ( O ) N ( R ' )<sub>2</sub>、 および - S ( O )<sub>k</sub> R ' ( ここで、 R ' のそれぞれは独立して、 H、アルキルまたは置換アルキルである ) からなる群から選択される ) 。

【 0 2 4 3 】

また、化学式 ( VI ) の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【 0 2 4 4 】

【 化 1 0 】



(VI),

【 0 2 4 5 】

( ここで、

B は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、 - O - 、 - O - ( アルキレンまたは置換アルキレン )、 - S - 、 - S - ( アルキレンまたは置換アルキレン ) - S ( O )<sub>k</sub> - ( ここで、 k は 1 または 3 である )、 - S ( O )<sub>k</sub> ( アルキレンまたは置換アルキレン ) - 、 - C ( O ) - 、 - C ( O ) - ( アルキレンまたは置換アルキレン ) - 、 - C ( S ) - 、 - C ( S ) - ( アルキレンまたは置換アルキレン ) - 、 - N ( R ' ) - 、 - N R ' - ( アルキレンまたは置換アルキレン ) - 、 - C ( O ) N ( R ' ) - 、 - C O N ( R ' ) - ( アルキレンまたは置換アルキレン ) - 、 - C S N ( R ' ) - 、 - C S N ( R ' ) - ( アルキレンまたは置換アルキレン ) - 、 - N ( R ' ) C O - ( アルキレンまたは置換アルキレン ) - 、 - N ( R ' ) C ( O ) O - 、 - S ( O )<sub>k</sub> N ( R ' ) - 、 - N ( R ' ) C ( O ) N ( R ' ) - 、 - N ( R ' ) C ( S ) N ( R ' ) - 、 - N ( R ' ) S ( O )<sub>k</sub> N ( R ' ) - 、 - N ( R ' ) - N = 、 - C ( R ' ) = N - 、 - C ( R ' ) = N - N ( R ' ) - 、 - C ( R ' ) = N - N = 、 - C ( R ' )<sub>2</sub> - N = N - 、 および - C ( R ' )<sub>2</sub> - N ( R ' ) - N ( R ' ) - ( ここで、 R ' はそれぞれ独立して H、アルキル、または置換アルキルである ) からなる群から選択されるリンカーであり；

R は、 H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであ

り；

$R_1$  は任意であり、存在している場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

$R_2$  は任意であり、存在している場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

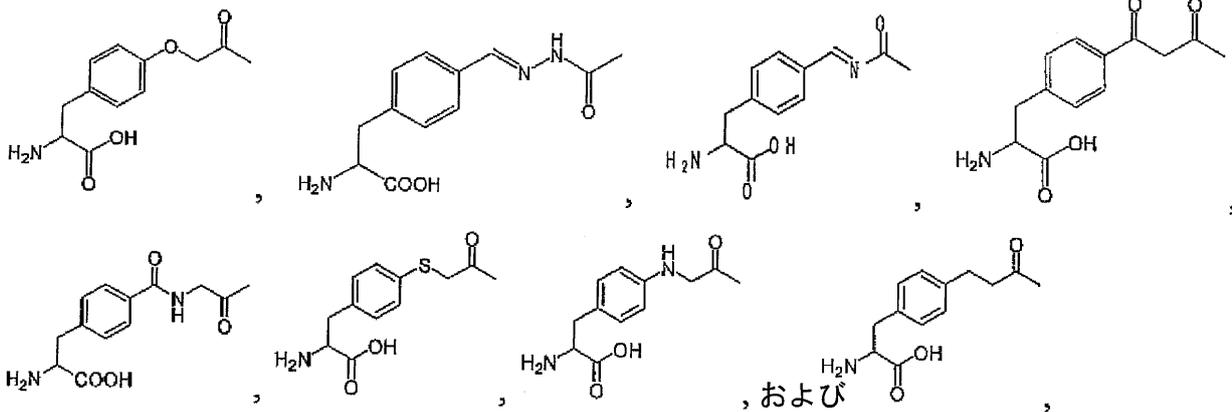
$R_a$  は、それぞれ独立してH、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、 $-N(R')$ <sub>2</sub>、 $-C(O)_k R'$ （ここで、kは1または3である）、 $-C(O)N(R')$ <sub>2</sub>、 $-OR'$ 、および $-S(O)_k R'$ （ここで、 $R'$ はそれぞれ独立してH、アルキル、置換アルキル）からなる群から選択される）。

【0246】

また、下記のアミノ酸が含まれる：

【0247】

【化11】



【0248】

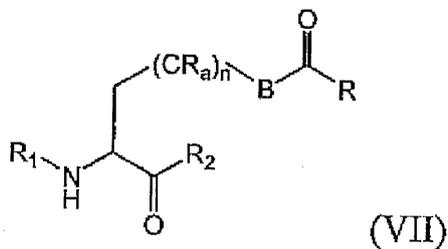
（ここで、上記化合物は必要に応じて、アミノ保護基、カルボキシル保護基、またはそれらの塩である）。また、下記の任意の非天然アミノ酸が、非天然アミノ酸ポリペプチドに組み込まれ得る。

【0249】

また、化学式(VII)の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【0250】

【化12】



【0251】

（ここで、

Bは、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、 $-O-$ 、 $-O-$ （アルキレンまたは置換アルキレン）、 $-S-$ 、 $-S-$ （アルキレンまたは置換アルキレン）、 $-S(O)_k-$ （ここで、kは1、2、もしくは3である）、 $-S(O)_k$ （アルキレンまたは置換アルキレン）、 $-C(O)-$ 、 $-C(O)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン）、 $-C(S)-$ 、 $-C(S)-$ （アルキレンまたは置換アルキレン）、 $-N(R')$ 、 $-NR'$ （アルキレンまたは置換アルキレン）、 $-C(O)N(R')$ 、 $-CON(R')$ （アルキレンまたは置換アルキレン）、 $-CSN(R')$ 、 $-CSN(R)$

10

20

30

40

50

' ) - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - N ( R ' ) C O - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - N ( R ' ) C ( O ) O -、 - S ( O )<sub>k</sub> N ( R ' ) -、 - N ( R ' ) C ( O ) N ( R ' ) -、 - N ( R ' ) C ( S ) N ( R ' ) -、 - N ( R ' ) S ( O )<sub>k</sub> N ( R ' ) -、 - N ( R ' ) - N =、 - C ( R ' ) = N -、 - C ( R ' ) = N - N ( R ' ) -、 - C ( R ' ) = N - N =、 - C ( R ' )<sub>2</sub> - N = N -、および - C ( R ' )<sub>2</sub> - N ( R ' ) - N ( R ' ) - (ここで、R' はそれぞれ独立してH、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択されるリンカーであり；

R はH、アルキル、置換アルキル、シクロアルキルまたは置換シクロアルキルであり；

R<sub>1</sub> は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

10

R<sub>2</sub> は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

R<sub>a</sub> は、それぞれ独立してH、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、- N ( R ' )<sub>2</sub>、- C ( O )<sub>k</sub> R' (ここで、k は1、2、もしくは3である)、- C ( O ) N ( R ' )<sub>2</sub>、- O R'、および - S ( O )<sub>k</sub> R' (ここで、R' はそれぞれ独立してH、アルキル、置換アルキル) からなる群から選択され；n は0 ~ 8 である；

ただし、A が - ( C H<sub>2</sub> )<sub>4</sub> - であるとき、B は - N H C ( O ) ( C H<sub>2</sub> C H<sub>2</sub> ) - ではない)。

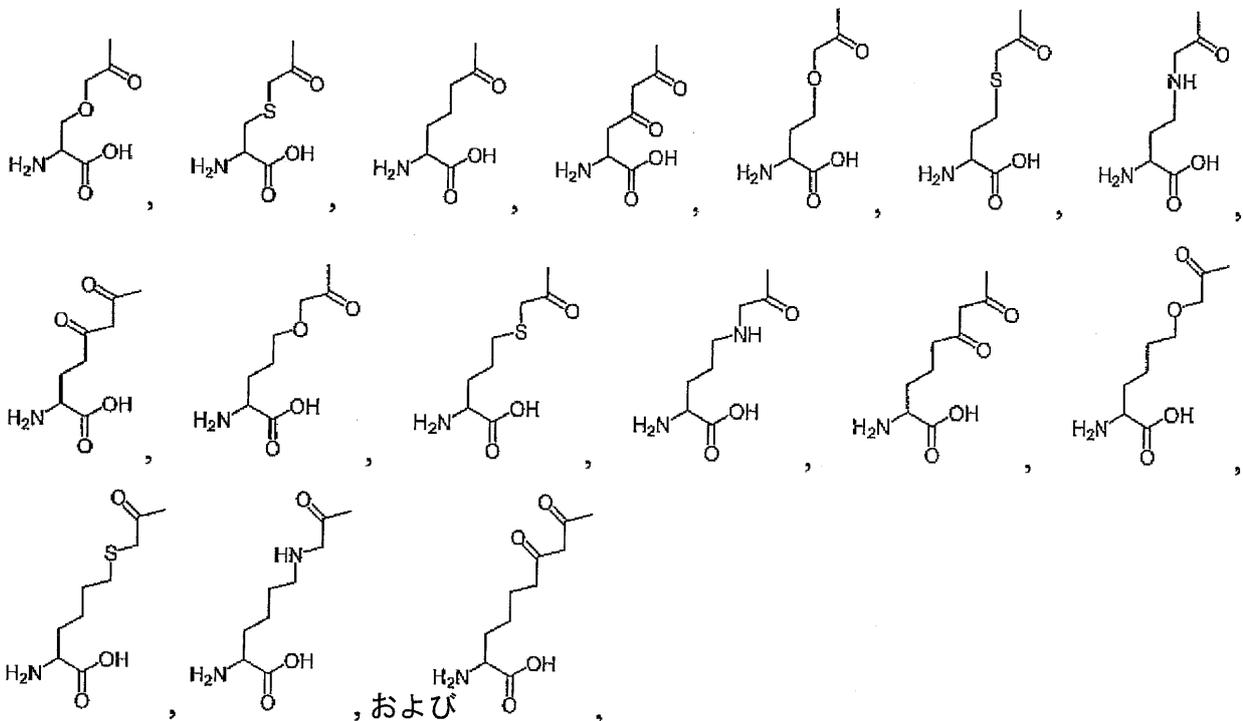
【 0 2 5 2 】

また、下記のアミノ酸が含まれる：

20

【 0 2 5 3 】

【 化 1 3 】



30

40

【 0 2 5 4 】

(ここで、

上記化合物は、アミノ保護基であり得、カルボキシル保護基であり得、アミノ保護基とカルボキシル保護基とであり得、またはそれらの塩である)。さらに、これらの非天然アミノ酸および下記の任意の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸ポリペプチドに組み込まれ得る。

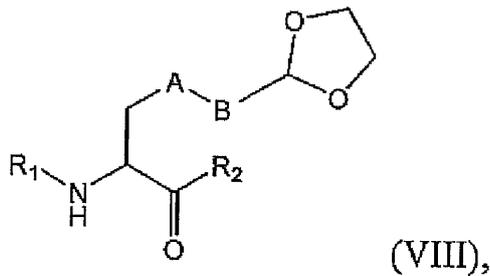
【 0 2 5 5 】

また、化学式 ( V I I I ) の構造を有するアミノ酸が含まれる：

50

【0256】

【化14】



10

【0257】

(ここで、

Aは任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

Bは任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、  
 - O -、 - O - (アルキレンまたは置換アルキレン)、 - S -、 - S - (アルキレンまたは置換アルキレン) - S ( O )<sub>k</sub> - (ここで、kは1または3である)、 - S ( O )<sub>k</sub> (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - C ( O ) -、 - C ( O ) - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - C ( S ) -、 - C ( S ) - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、  
 - N ( R ' ) -、 - N R ' - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - C ( O ) N ( R ' ) -、 - C O N ( R ' ) - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - C S N ( R ' ) -、 - C S N ( R ' ) - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - N ( R ' ) C O - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - N ( R ' ) C ( O ) O -、 - S ( O )<sub>k</sub> N ( R ' ) -、 - N ( R ' ) C ( O ) N ( R ' ) -、 - N ( R ' ) C ( S ) N ( R ' ) -、 - N ( R ' ) S ( O )<sub>k</sub> N ( R ' ) -、 - N ( R ' ) - N =、 - C ( R ' ) = N -、 - C ( R ' ) = N - N ( R ' ) -、 - C ( R ' ) = N - N =、 - C ( R ' )<sub>2</sub> - N = N -、および - C ( R ' )<sub>2</sub> - N ( R ' ) - N ( R ' ) - (ここで、R'はそれぞれ独立してH、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択されるリンカーであり；

R<sub>1</sub>は任意であり、存在している場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

R<sub>2</sub>は任意であり、存在している場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドである)。

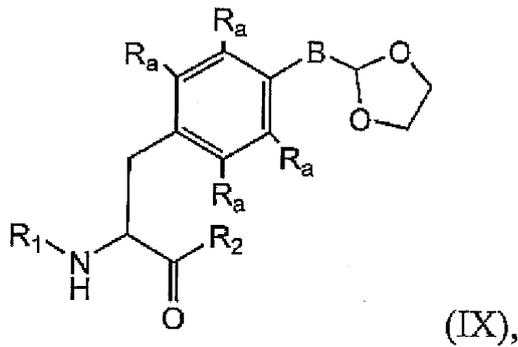
【0258】

また、化学式 ( I X ) の構造を有する下記のアミノ酸が含まれる：

【0259】

40

## 【化15】



10

## 【0260】

(ここで、

Bは任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、  
 -O-、-O-(アルキレンまたは置換アルキレン)、-S-、-S-(アルキレンまたは置換アルキレン)  
 -S(O)<sub>k</sub>- (ここで、kは1または3である)、-S(O)<sub>k</sub>(アルキレンまたは置換アルキレン)-、  
 -C(O)-、-C(O)-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-C(S)-、-C(S)-(アルキレンまたは置換アルキレン)-  
 -N(R')-、-NR'(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、  
 -CSN(R')-、-CSN(R')-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-N(R')CO-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、  
 -N(R')C(O)O-、-S(O)<sub>k</sub>N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、  
 -N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')=N-N=、  
 -C(R')<sub>2</sub>-N=N-、および-C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-(ここで、R'はそれぞれ独立してH、アルキル、または置換アルキルである)からなる群から選択されるリンカーであり；

20

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキルまたは置換シクロアルキルであり；

30

R<sub>1</sub>は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

R<sub>2</sub>は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

ここで、R<sub>a</sub>は、それぞれ独立してH、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、-N(R')<sub>2</sub>、-C(O)<sub>k</sub>R' (ここで、kは1または3である)、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-OR'、および-S(O)<sub>k</sub>R' (ここで、R'はそれぞれ独立してH、アルキル、置換アルキル)からなる群から選択される)。

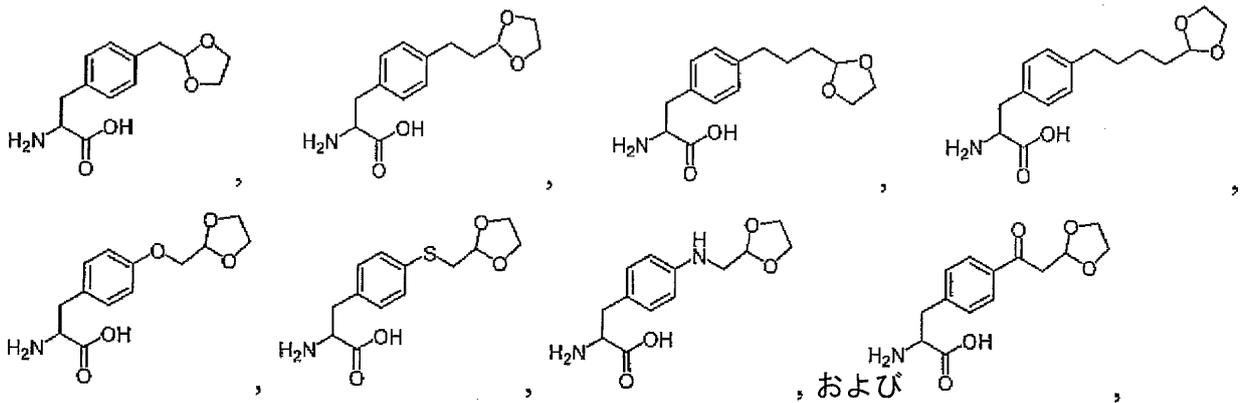
## 【0261】

また、下記のアミノ酸が含まれる：

40

## 【0262】

## 【化16】



## 【0263】

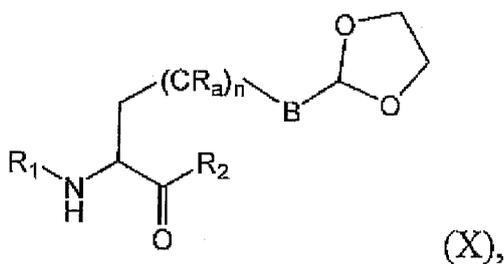
(ここで、上記化合物は、アミノ保護基であり得、カルボキシル保護基であり得、アミノ保護基とカルボキシル保護基とであり得、またはそれらの塩である)。さらに、これらの非天然アミノ酸および下記の任意の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸ポリペプチドに組み込まれ得る。

## 【0264】

また、化学式(X)の構造を有するアミノ酸が含まれる：

## 【0265】

## 【化17】



## 【0266】

(ここで、

Bは任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、-O-、-O-(アルキレンまたは置換アルキレン)、-S-、-S-(アルキレンまたは置換アルキレン)-S(O)<sub>k</sub>- (ここで、kは1または3である)、-S(O)<sub>k</sub>(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-C(O)-、-C(O)-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-C(S)-、-C(S)-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-N(R')-、-NR'(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-C(O)N(R')-、-CON(R')-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-CSN(R')-、-CSN(R')-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-N(R')CO-(アルキレンまたは置換アルキレン)-、-N(R')C(O)O-、-S(O)<sub>k</sub>N(R')-、-N(R')C(O)N(R')-、-N(R')C(S)N(R')-、-N(R')S(O)<sub>k</sub>N(R')-、-N(R')-N=、-C(R')=N-、-C(R')=N-N(R')-、-C(R')<sub>2</sub>-N=N-、および-C(R')<sub>2</sub>-N(R')-N(R')-(ここで、R'はそれぞれ独立してH、アルキル、または置換アルキルである)からなる群から選択されるリンカーであり；

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキルまたは置換シクロアルキルであり；

R<sub>1</sub>は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

40

50

$R_2$  は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

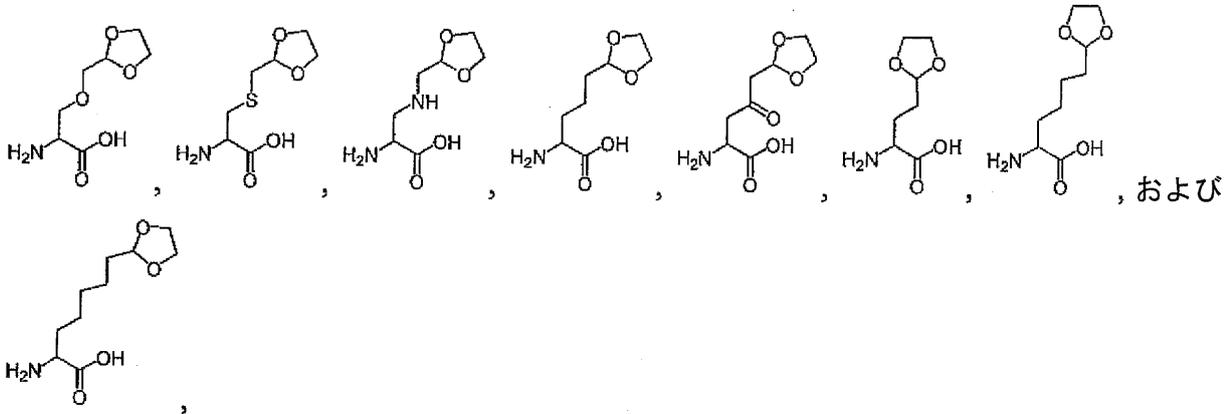
$R_a$  はそれぞれ独立して、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、 $-N(R')$ <sub>2</sub>、 $-C(O)_k R'$ （ここで、 $k$  は1または3である）、 $-C(O)N(R')$ <sub>2</sub>、 $-OR'$ 、および  $-S(O)_k R'$ （ここで、 $R'$  はそれぞれ独立してH、アルキル、置換アルキル）からなる群から選択され； $n$  は0から8である）。

【0267】

また、下記のアミノ酸が含まれる：

【0268】

【化18】



10

20

【0269】

（ここで、上記化合物は、アミノ保護基であり得、カルボキシル保護基であり得、アミノ保護基とカルボキシル保護基とであり得、またはそれらの塩である）。さらに、これらの非天然アミノ酸および下記の任意の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸ポリペプチドに組み込まれ得る。

【0270】

本明細書に記載されている非天然アミノ酸は、モノカルボニル構造に加えて、ジカルボニル基、ジカルボニル様基、マスクされたジカルボニル基および保護されたジカルボニル基などの基を含み得る。

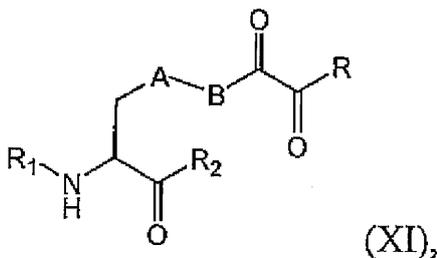
30

【0271】

また、化学式(XI)の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【0272】

【化19】



40

【0273】

（ここで、

A は任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換

50

アラルキレンであり；

Bは任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、  
 - O -、 - O - (アルキレンまたは置換アルキレン)、 - S -、 - S - (アルキレンまたは置換アルキレン) - S (O)<sub>k</sub> - (ここで、kは1または3である)、 - S (O)<sub>k</sub> (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - C (O) -、 - C (O) - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - C (S) -、 - C (S) - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - N (R') -、 - NR' - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - C (O) N (R') -、 - CON (R') - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - CSN (R') -、 - CSN (R') - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - N (R') CO - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - N (R') C (O) O -、 - S (O)<sub>k</sub> N (R') -、 - N (R') C (O) N (R') -、 - N (R') C (S) N (R') -、 - N (R') S (O)<sub>k</sub> N (R') -、 - N (R') - N =、 - C (R') = N -、 - C (R') = N - N (R') -、 - C (R') = N - N =、 - C (R')<sub>2</sub> - N = N -、および - C (R')<sub>2</sub> - N (R') - N (R') - (ここで、R'はそれぞれ独立してH、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択されるリンカーであり；

10

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R<sub>1</sub>は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

20

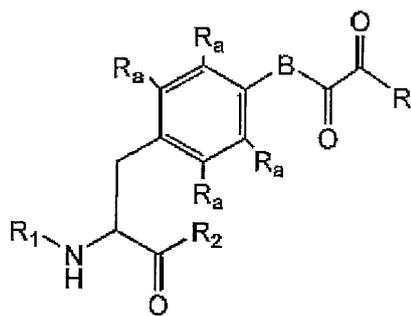
R<sub>2</sub>は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドである)。

【0274】

また、化学式(XII)の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【0275】

【化20】



30

【0276】

(ここで、

Bは任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、  
 - O -、 - O - (アルキレンまたは置換アルキレン)、 - S -、 - S - (アルキレンまたは置換アルキレン) - S (O)<sub>k</sub> - (ここで、kは1または3である)、 - S (O)<sub>k</sub> (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - C (O) -、 - C (O) - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - C (S) -、 - C (S) - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - N (R') -、 - NR' - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - C (O) N (R') -、 - CON (R') - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - CSN (R') -、 - CSN (R') - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - N (R') CO - (アルキレンまたは置換アルキレン) -、 - N (R') C (O) O -、 - S (O)<sub>k</sub> N (R') -、 - N (R') C (O) N (R') -、 - N (R') C (S) N (R') -、 - N (R') S (O)<sub>k</sub> N (R') -、 - N (R') - N =、 - C (R') = N -、 - C (R') = N - N (R') -、 - C (R') = N - N =、 - C (R')<sub>2</sub> - N = N -、および

40

50

び - C ( R ' )<sub>2</sub> - N ( R ' ) - N ( R ' ) - (ここで、R' はそれぞれ独立して H、アルキル、または置換アルキルである) からなる群から選択されるリンカーであり；

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R<sub>1</sub> は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

R<sub>2</sub> は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

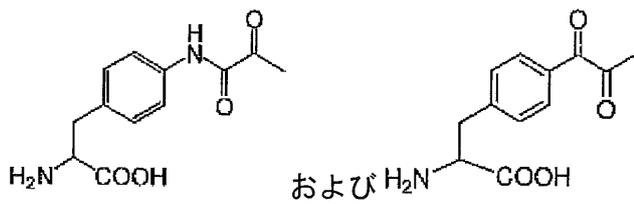
ここで、R<sub>a</sub> はそれぞれ独立して、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、- N ( R ' )<sub>2</sub>、- C ( O )<sub>k</sub> R' (ここで、k は 1 または 3 である)、- C ( O ) N ( R ' )<sub>2</sub>、- O R'、および - S ( O )<sub>k</sub> R' (ここで、R' はそれぞれ独立して H、アルキル、置換アルキル) からなる群から選択される)。

【0277】

また、下記のアミノ酸が含まれる：

【0278】

【化21】



【0279】

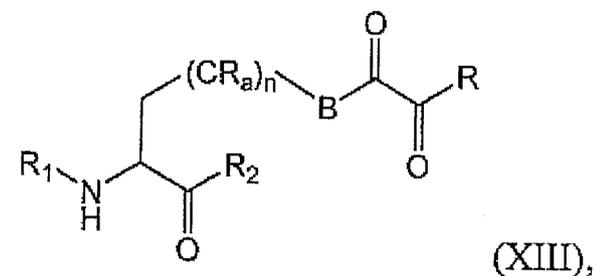
(ここで、上記化合物は、アミノ保護基であり得、カルボキシル保護基であり得、アミノ保護基とカルボキシル保護基とであり得、またはそれらの塩である)。さらに、これらの非天然アミノ酸および下記の任意の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸ポリペプチドに組み込まれ得る。

【0280】

また、化学式 (XIII) の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【0281】

【化22】



【0282】

(ここで、

B は任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換低級ヘテロアルキレン、- O -、- O - (アルキレンまたは置換アルキレン)、- S -、- S - (アルキレンまたは置換アルキレン)、- S ( O )<sub>k</sub> - (ここで、k は 1 または 3 である)、- S ( O )<sub>k</sub> (アルキレンまたは置換アルキレン)、-、- C ( O ) -、- C ( O ) - (アルキレンまたは置換アルキレン)、-、- C ( S ) -、- C ( S ) - (アルキレンまたは置換アルキレン)、-、- N ( R ' ) -、- N R' - (アルキレンまたは置換アルキレン)、-、- C ( O ) N ( R ' ) -、- C O N ( R ' ) - (アルキレンまたは置換アルキレン)、-、- C S N ( R ' )

10

20

30

40

50

) -、 - C S N ( R ' ) - ( アルキレンまたは置換アルキレン ) -、 - N ( R ' ) C O - ( アルキレンまたは置換アルキレン ) -、 - N ( R ' ) C ( O ) O -、 - S ( O )<sub>k</sub> N ( R ' ) -、 - N ( R ' ) C ( O ) N ( R ' ) -、 - N ( R ' ) C ( S ) N ( R ' ) -、 - N ( R ' ) S ( O )<sub>k</sub> N ( R ' ) -、 - N ( R ' ) - N =、 - C ( R ' ) = N -、 - C ( R ' ) = N - N ( R ' ) -、 - C ( R ' ) = N - N =、 - C ( R ' )<sub>2</sub> - N = N -、および - C ( R ' )<sub>2</sub> - N ( R ' ) - N ( R ' ) - ( ここで、 R ' はそれぞれ独立して H、アルキル、または置換アルキルである ) からなる群から選択されるリンカーであり；

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R<sub>1</sub> は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

R<sub>2</sub> は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

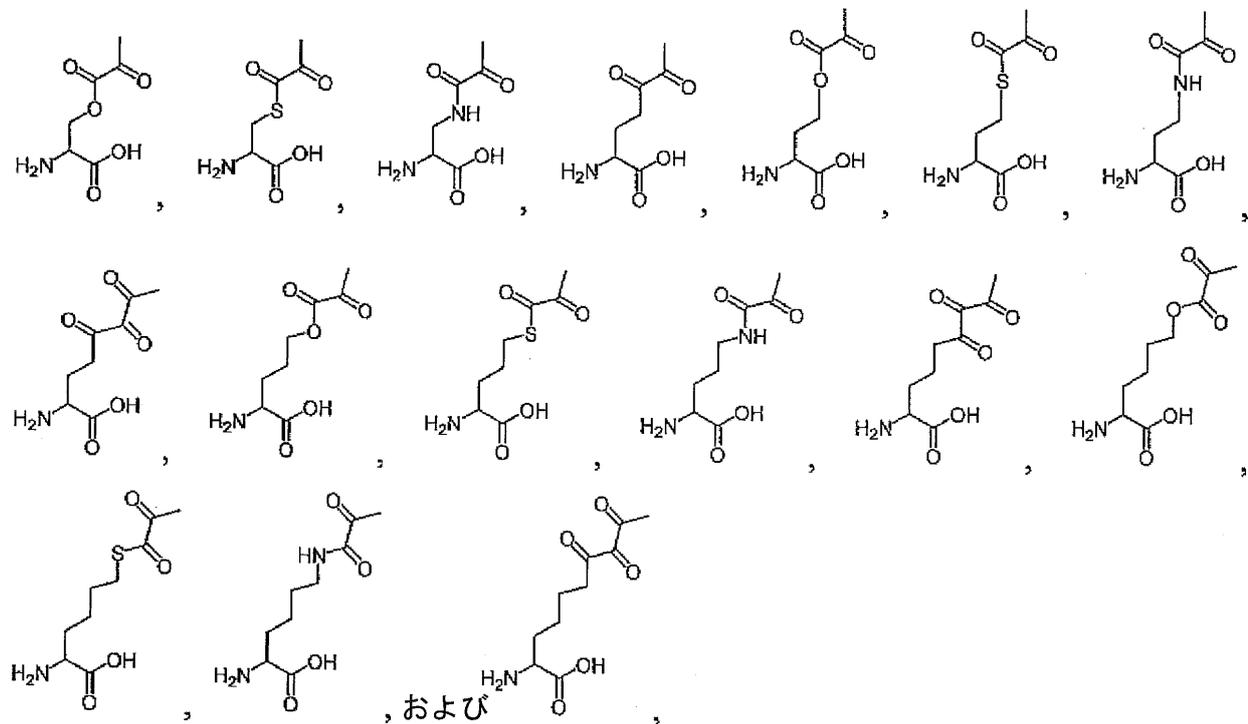
R<sub>a</sub> はそれぞれ独立して、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、- N ( R ' )<sub>2</sub>、- C ( O )<sub>k</sub> R ' ( ここで、k は 1 または 3 である )、- C ( O ) N ( R ' )<sub>2</sub>、- O R '、および - S ( O )<sub>k</sub> R ' ( ここで、R ' はそれぞれ独立して H、アルキル、置換アルキル ) からなる群から選択され；および n は 0 から 8 である ) 。

【 0 2 8 3 】

また、下記のアミノ酸が含まれる：

【 0 2 8 4 】

【 化 2 3 】



【 0 2 8 5 】

( ここで、上記化合物は、アミノ保護基であり得、カルボキシル保護基であり得、アミノ保護基とカルボキシル保護基とであり得、またはそれらの塩である )。さらに、これらの非天然アミノ酸および下記の任意の非天然アミノ酸が非天然アミノ酸ポリペプチドに組み込まれ得る。

【 0 2 8 6 】

また、化学式 ( X I V ) の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【 0 2 8 7 】

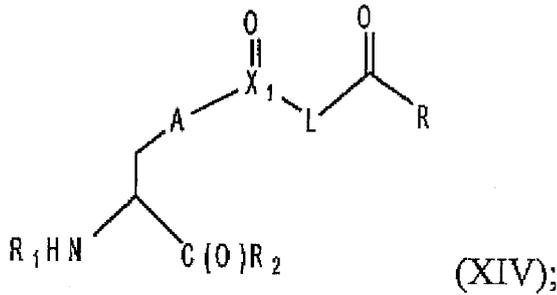
10

20

30

40

【化24】



【0288】

(ここで、

Aは任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R<sub>1</sub>は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

R<sub>2</sub>は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

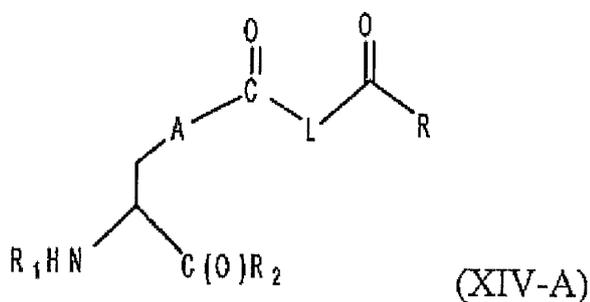
X<sub>1</sub>はC、S、またはS(O)であり；およびLは、アルキレン、置換アルキレン、N(R') (アルキレン)、またはN(R') (置換アルキレン) (ここで、R'は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである)である)である。

【0289】

また、化学式(XIV-A)の構造を有するアミノ酸が含まれる；

【0290】

【化25】



【0291】

(ここで、

Aは任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

10

20

30

40

50

$R_1$  は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

$R_2$  は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

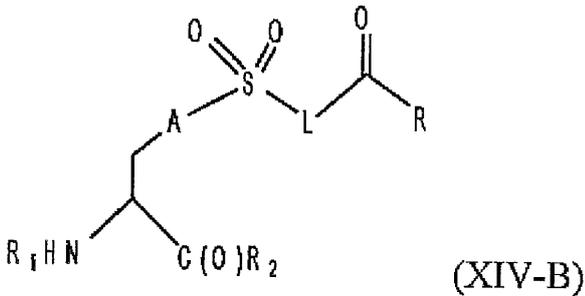
L は、アルキレン、置換アルキレン、N( $R'$ ) (アルキレン)、またはN( $R'$ ) (置換アルキレン) (ここで、 $R'$  は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである) である)。

【0292】

また、化学式(XIV-B)の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【0293】

【化26】



【0294】

(ここで、

A は任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

$R_1$  は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

$R_2$  は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

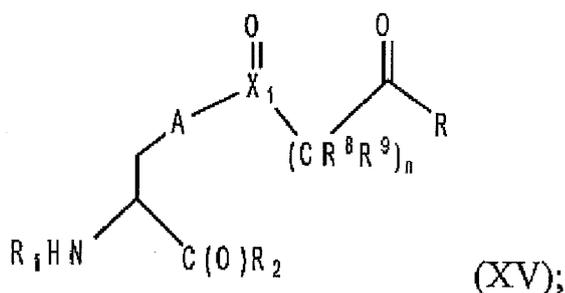
L は、アルキレン、置換アルキレン、N( $R'$ ) (アルキレン)、またはN( $R'$ ) (置換アルキレン) (ここで、 $R'$  は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである) である)。

【0295】

また、化学式(XV)の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【0296】

【化27】



【0297】

(ここで、

A は任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R<sub>1</sub> は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

R<sub>2</sub> は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

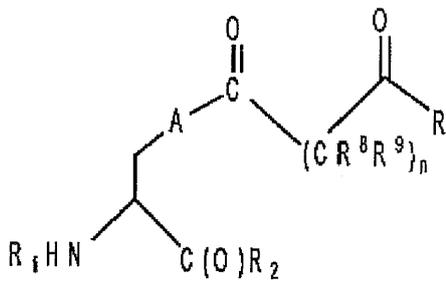
X<sub>1</sub> はC、S、またはS(O)であり；n は、0、1、3、4、または5であり；および各CR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>基におけるR<sup>8</sup>およびR<sup>9</sup>は、それぞれ独立して、H、アルコキシ、アルキルアミン、ハロゲン、アルキル、アールからなる群から選択されるか、任意のR<sup>8</sup>およびR<sup>9</sup>がともに=Oもしくはシクロアルキルを形成し得るか、またはR<sup>8</sup>に隣接する任意の基がともにシクロアルキルを形成し得る)。

【0298】

また、化学式(XV-A)の構造を有するアミノ酸が含まれる；

【0299】

【化28】



【0300】

(ここで、

A は任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R<sub>1</sub> は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

R<sub>2</sub> は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

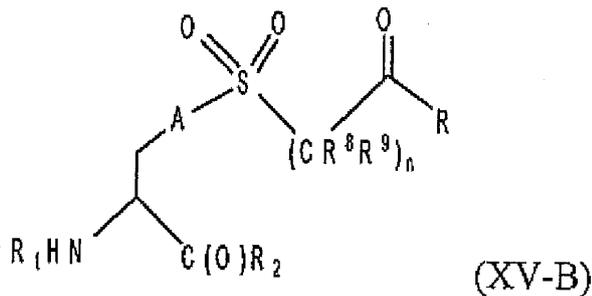
n は、0、1、3、4、または5であり；および各CR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>基におけるR<sup>8</sup>およびR<sup>9</sup>は、それぞれ独立して、H、アルコキシ、アルキルアミン、ハロゲン、アルキル、アールからなる群から選択されるか、任意のR<sup>8</sup>およびR<sup>9</sup>がともに=Oもしくはシクロアルキルを形成し得るか、またはR<sup>8</sup>に隣接する任意の基がともにシクロアルキルを形成し得る)。

【0301】

また、化学式(XV-B)の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【0302】

【化29】



10

【0303】

(ここで、

Aは任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

20

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R<sub>1</sub>は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

R<sub>2</sub>は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

nは、0、1、3、4、または5であり；および各CR<sup>8</sup>R<sup>9</sup>基におけるR<sup>8</sup>およびR<sup>9</sup>は、それぞれ独立して、H、アルコキシ、アルキルアミン、ハロゲン、アルキル、アリーールからなる群から選択されるか、任意のR<sup>8</sup>およびR<sup>9</sup>がともに=Oもしくはシクロアルキルを形成し得るか、またはR<sup>8</sup>に隣接する任意の基がともにシクロアルキルを形成し得る)。

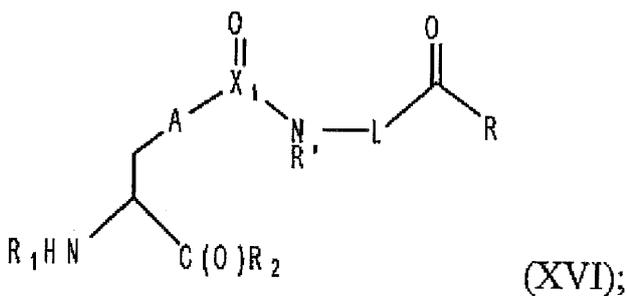
30

【0304】

また、化学式(XVI)の構造を有するアミノ酸が含まれる：

【0305】

【化30】



40

【0306】

(ここで、

Aは任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレ

50

ン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R<sub>1</sub> は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

R<sub>2</sub> は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

X<sub>1</sub> はC、S、またはS(O)であり；およびLは、アルキレン、置換アルキレン、N(R') (アルキレン)、またはN(R') (置換アルキレン) (ここで、R' は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである) である)

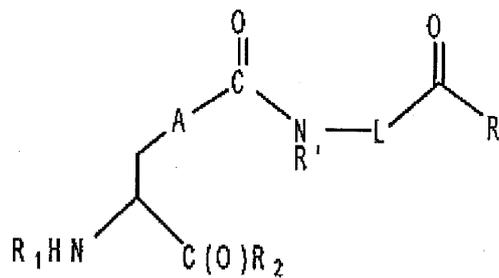
10

【0307】

また、化学式(XVI-A)の構造を有するアミノ酸が含まれる；

【0308】

【化31】



20

【0309】

(ここで、

A は任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルケニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

30

R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R<sub>1</sub> は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

R<sub>2</sub> は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

L は、アルキレン、置換アルキレン、N(R') (アルキレン)、またはN(R') (置換アルキレン) (ここで、R' は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである) である)。

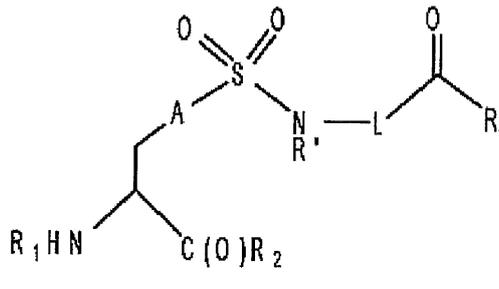
40

【0310】

また、化学式(XVI-B)の構造を有するアミノ酸が含まれる；

【0311】

## 【化32】



## 【0312】

(ここで、

Aは任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R<sub>1</sub>は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

R<sub>2</sub>は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

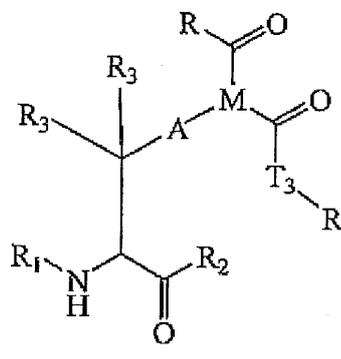
Lは、アルキレン、置換アルキレン、N(R') (アルキレン)、またはN(R') (置換アルキレン) (ここで、R'は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである)である)。

## 【0313】

また、化学式(XVII)の構造を有するアミノ酸が含まれる；

## 【0314】

## 【化33】



## 【0315】

(ここで、

Aは任意であり、存在する場合は、低級アルキレン、置換低級アルキレン、低級シクロアルキレン、置換低級シクロアルキレン、低級アルケニレン、置換低級アルケニレン、アルキニレン、低級ヘテロアルキレン、置換ヘテロアルキレン、低級ヘテロシクロアルキレン、置換低級ヘテロシクロアルキレン、アリーレン、置換アリーレン、ヘテロアリーレン、置換ヘテロアリーレン、アルカリレン、置換アルカリレン、アラルキレン、または置換アラルキレンであり；

Mは、-C(R<sub>3</sub>)-、

## 【0316】

10

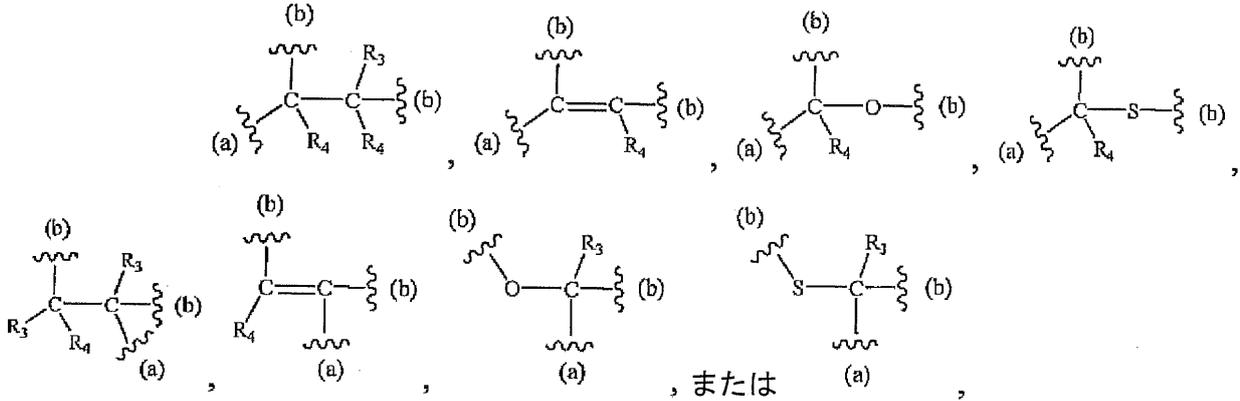
20

30

40

50

## 【化34】



10

## 【0317】

(ここで、(a)はA基と結合することを示し、また、(b)はそれぞれカルボニル基と結合することを示しており、 $R_3$ および $R_4$ は独立して、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、もしくは置換シクロアルキルであるか、または、 $R_3$ および $R_4$ が、または2つの $R_3$ 基もしくは $R_4$ 基がシクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルを形成してもよい)であり；

$R$ は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

20

$T_3$ は、結合、 $\text{C}(\text{R})(\text{R})$ 、O、またはSであり、また、 $R$ はH、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

$R_1$ は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

$R_2$ は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドである)。

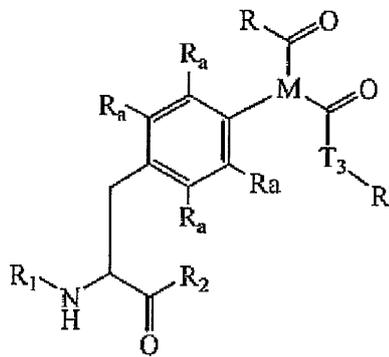
## 【0318】

また、化学式(XVIIII)の構造を有するアミノ酸が含まれる；

## 【0319】

## 【化35】

30



(XVIII),

40

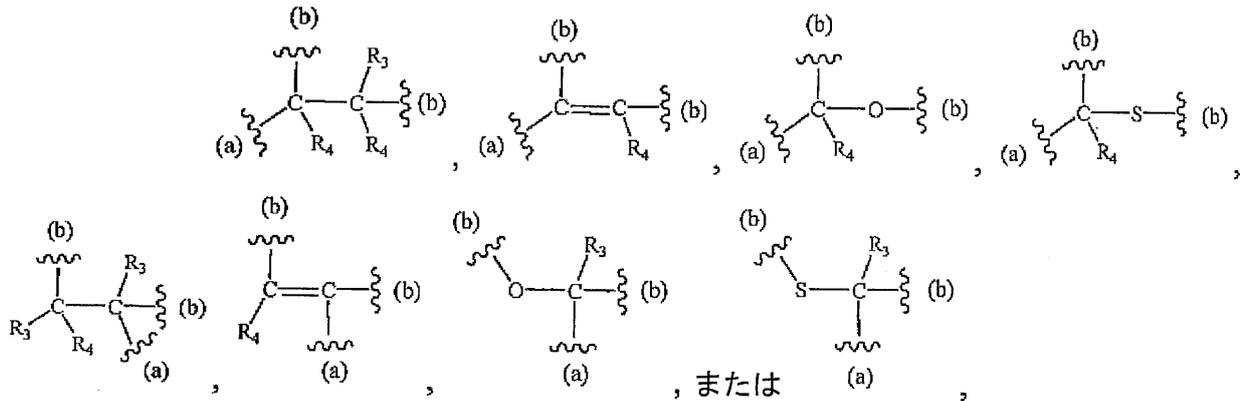
## 【0320】

(ここで、

$M$ は、 $-\text{C}(\text{R}_3)-$ 、

## 【0321】

## 【化36】



10

## 【0322】

(ここで、(a)はA基と結合することを示し、また、(b)はそれぞれカルボニル基と結合することを示しており、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は独立して、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、もしくは置換シクロアルキルであるか、または、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>が、または2つのR<sub>3</sub>基もしくはR<sub>4</sub>基がシクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルを形成してもよい)であり；

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

T<sub>3</sub>は、結合、C(R)(R)、O、またはSであり、また、RはH、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

R<sub>1</sub>は任意であり、存在する場合は、H、アミノ保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；および、

R<sub>2</sub>は任意であり、存在する場合は、OH、エステル保護基、樹脂、アミノ酸、ポリペプチド、またはポリヌクレオチドであり；

R<sub>a</sub>はそれぞれ独立して、H、ハロゲン、アルキル、置換アルキル、-N(R')<sub>2</sub>、-C(O)<sub>k</sub>R' (ここで、kは1または3である)、-C(O)N(R')<sub>2</sub>、-OR'、および-S(O)<sub>k</sub>R' (ここで、R'はそれぞれ独立してH、アルキル、または置換アルキル)からなる群から選択される)。

20

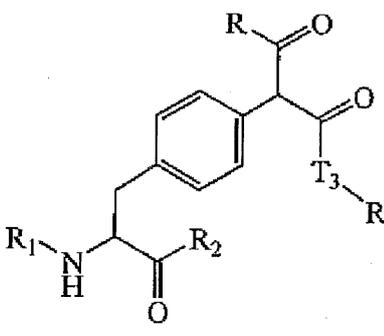
30

## 【0323】

また、化学式(XIX)の構造を有するアミノ酸が含まれる：

## 【0324】

## 【化37】



40

## 【0325】

(ここで、

Rは、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルであり；

T<sub>3</sub>は、OまたはSである)。

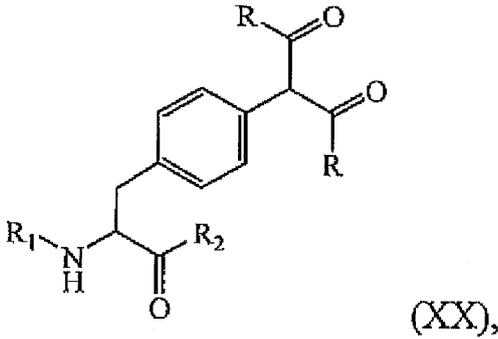
## 【0326】

50

また、化学式 ( X X ) の構造を有するアミノ酸が含まれる :

【 0 3 2 7 】

【 化 3 8 】



10

【 0 3 2 8 】

(ここで、

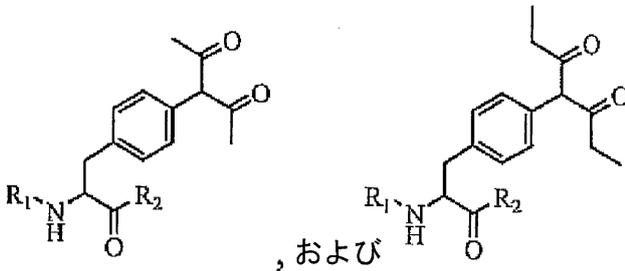
R は、H、アルキル、置換アルキル、シクロアルキル、または置換シクロアルキルである)。

【 0 3 2 9 】

また、化学式 ( X X I ) の構造を有するアミノ酸が含まれる。

【 0 3 3 0 】

【 化 3 9 】



20

【 0 3 3 1 】

いくつかの実施形態において、非天然アミノ酸を含有するポリペプチドは、化学的に修飾されて、反応性カルボニル官能基または反応性ジカルボニル官能基を生成する。例えば、抱合反応に有用なアルデヒド官能基は、隣接するアミノ基およびヒドロキシル基を有している官能基から生成され得る。生物学的に活性な分子がポリペプチドである場合、例えば N - 末端のセリンまたはスレオニンが使用されて、過ヨウ素酸を用いた穏やかな酸化切断条件の下に、アルデヒド官能基を生成し得る。なお、N - 末端のセリンまたはスレオニンは、通常に存在し得るか、または化学的もしくは酵素的な分解によって露出され得る。例えば、Gaertner, et. al., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992); Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992); Gaertner et al., J. Biol. Chem. 269:7224-7230 (1994)を参照すればよい。しかし、当該分野に公知の方法は、ペプチドまたはタンパク質の N - 末端におけるアミノ酸に限定されている。

30

40

【 0 3 3 2 】

本発明において、隣接するヒドロキシル基およびアミノ基を有している非天然アミノ酸は、“マスクされている”アルデヒド官能基としてポリペプチドに組み込まれ得る。例えば、5 - ヒドロキシリジンは 5 位のアミンと結合するヒドロキシル基を有している。アルデヒドを生成する反応条件は、ポリペプチドにおける他の部位における酸化を回避するために、穏やかな環境下における過剰なモル濃度のナトリウムメタ過ヨウ素酸の添加を包含している。酸化反応の pH は典型的に約 7 . 0 である。通常反応は、ポリペプチドの緩衝溶液に約 1 . 5 モル濃度の過剰なナトリウムメタ過ヨウ素酸を添加すること、次いで暗所において約 1 0 分間インキュベートすることを包含している。例えば、米国特許第 6 ,

50

4 2 3 , 6 8 5 号を参照すればよい。

【 0 3 3 3 】

カルボニル官能基またはジカルボニル官能基は、穏やかな環境下の水性溶液においてヒドロキシルアミン含有試薬と選択的に反応され得、それにより対応するオキシム結合を形成する。このオキシム結合は生理学的な環境下において安定である。例えば、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)を参照すればよい。さらに、カルボニル基またはジカルボニル基の特有の反応性は、別のアミノ酸側鎖の存在下における選択的な修飾を可能にする。例えば、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)を参照すればよい。

【 0 3 3 4 】

(非天然アミノ酸：ヒドロキシルアミン含有アミノ酸の構造および合成)

米国仮特許第 6 0 / 6 3 8 , 4 1 8 号は参照によって本明細書に援用される。したがって、米国仮特許第 6 0 / 6 3 8 , 4 1 8 号のセクション V ( “ Non-natural Amino Acids ” と題された ) の部分 B ( “ Structure and Synthesis of Non-Natural Amino Acids: Hydroxylamine-Containing Amino Acids ” と題された ) に示されている開示事項は、当該開示事項があたかも本明細書に全て示されていると同程度に、本明細書に記載されている非天然アミノ酸、非天然アミノ酸ポリペプチド、および修飾されている非天然アミノ酸ポリペプチドの生成、精製、性質決定および使用のための方法、組成物 ( 化学式 I - X X X V が挙げられる )、技術および方策に対して全体的に適用される。また、米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 1 9 4 2 5 6 号、米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 2 1 7 5 3 2 号、および米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 2 1 7 2 8 9 号、ならびに国際公開第 2 0 0 6 / 0 6 9 2 4 6 号 ( 名称 : “ Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides ” ) は、参照によって本明細書に援用される。

【 0 3 3 5 】

本発明における使用に好適な非天然アミノ酸の多くは、例えば、Sigma ( USA ) または Aldrich ( Milwaukee, WI, USA ) から市販されている。市販されていない非天然アミノ酸は、本明細書に規定されているように、または各種の刊行物に規定されているように、または当業者に公知の標準的な方法を用いて、任意に合成される。有機合成技術について、例えば、Organic Chemistry by Fessenden and Fessenden, (1982, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass.); Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York); and Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg (Third Edition, Parts A and B, 1990, Plenum Press, New York)を参照すればよい。非天然アミノ酸の合成について記載しているさらなる刊行物としては、例えば、国際公開第 2 0 0 2 / 0 8 5 9 2 3 号 ( 名称 : “ In vivo incorporation of Unnatural Amino Acids ” ) ; Matsoukas et al., (1995) J. Med. Chem., 38, 4660-4669; King, F. E. & Kidd, D.A.A. (1949) A New Synthesis of Glutamine and of  $\alpha$ -Dipeptides of Glutamic Acid from Phthylated Intermediates. J. Chem. Soc., 3315-3319; Friedman, O. M. & Chatterji, R. (1959) Synthesis of Derivatives of Glutamine as Model Substrates for Anti-Tumor Agents. J. Am. Chem. Soc. 81, 3750-3752; Craig, J.C. et al. (1988) Absolute Configuration of the Enantiomers of 7-Chloro-4 [[4-(diethylamino)-1-methylbutyl]amino]quinoline (Chloroquine). J. Org. Chem. 53, 1167-1170; Azoulay, M., Vilmont, M. & Frappier, F. (1991) Glutamine analogues as Potential Antimalarials, Eur. J. Med. Chem. 26, 201-5; Koskinen, A.M.P. & Rapoport, H. (1989) Synthesis of 4-Substituted Prolines as Conformationally Constrained Amino Acid Analogues. J. Org. Chem. 54, 1859-1866; Christie, B.D. & Rapoport, H. (1985) Synthesis of Optically Pure Pipecolates from L-Asparagine. Application to the Total Synthesis of (+)-Apovincamine through Amino Acid Decarbonylation and Iminium Ion Cyclization. J. Org. Chem. 50:1239-1246; Barton et al., (1987) Synthesis of N

ovel alpha-Amino-Acids and Derivatives Using Radical Chemistry: Synthesis of L- and D-alpha-Amino-Adipic Acids, L-alpha-aminopimelic Acid and Appropriate Unsaturated Derivatives. Tetrahedron 43:4297-4308; and, Subasinghe et al., (1992) Quisqualic acid analogues: synthesis of beta-heterocyclic 2-aminopropanoic acid derivatives and their activity at a novel quisqualate-sensitized site. J. Med. Chem. 35:4602-7が挙げられる。米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 1 9 8 6 3 7 号 (名称 "Protein Arrays") を参照すればよい。

【 0 3 3 6 】

A. カルボニル反応性基

カルボニル反応性基を有しているアミノ酸は、求核性の付加を介して分子 (PEG または他の水溶性分子が挙げられるが、これらに限定されない) を連結するための種々の反応、または特にアルドール縮合反応を可能にする。

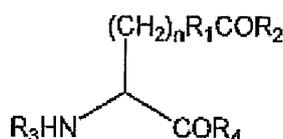
10

【 0 3 3 7 】

例示的なカルボニル含有アミノ酸は、以下のように表され得る：

【 0 3 3 8 】

【 化 4 0 】



20

【 0 3 3 9 】

(ここで、n は 0 - 10 であり；R<sub>1</sub> は、アルキル、アリール、置換アルキル、または置換アリールであり；R<sub>2</sub> は、H、アルキル、アリール、置換アルキル、および置換アリールであり；R<sub>3</sub> は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、R<sub>4</sub> は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である)。いくつかの実施形態において、n は 1 であり、R<sub>1</sub> はフェニルであり、R<sub>2</sub> は単純アルキル (すなわち、メチル、エチルまたはプロピル) であり、ケトン部分はアルキル側鎖に対してパラ位に位置している。いくつかの実施形態において、n は 1 であり、R<sub>1</sub> はフェニルであり、R<sub>2</sub> は単純アルキル (すなわち、メチル、エチルまたはプロピル) であり、ケトン部分はアルキル側鎖に対してメタ位に位置している。

30

【 0 3 4 0 】

p - アセチル - (+ / -) - フェニルアラニンおよび m - アセチル - (+ / -) - フェニルアラニンの合成は、参照によって本明細書に援用される Zhang, Z. et al, Biochemistry 42: 6735-6746 (2003) に記載されている。他のカルボニル含有アミノ酸は当業者によって同様に調製され得る。

【 0 3 4 1 】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるポリペプチドは、化学的に修飾されて反応性のカルボニル官能基を生成する。例えば、抱合反応に有用なアルデヒド官能基は、隣接しているアミノ基およびヒドロキシル基を有している官能基から生成され得る。生物学的に活性な分子がポリペプチドである場合、例えば、N 末端のセリンまたはスレオニン (通常に存在し得るか、または化学的もしくは酵素的な消化を介して露出され得る) は、過ヨウ素酸塩を用いた穏やかな酸化切断条件においてアルデヒド官能基を生成するために使用され得る。例えば、Gaertner, et al, Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992) ; Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992) ; Gaertner et al, J. Biol. Chem. 269:7224-7230 (1994) を参照すればよい。しかし、当該技術において公知の方法は、ペプチドまたはタンパク質の N 末端におけるアミノ酸に制限される。

40

【 0 3 4 2 】

本発明において、隣接しているヒドロキシル基およびアミノ基を有している、天然にコ

50

ードされていないアミノ酸アミノ酸は、“マスクされた”アルデヒド官能基としてポリペプチドに組み込まれ得る。例えば、5 - ヒドロキシリジンはイブシロンアミンと隣接するヒドロキシル基を有している。アルデヒドを生成する反応条件は、典型的に、ポリペプチド内の他の部位における酸化を回避するための穏やかな反応条件における、過剰なモル濃度のメタ過ヨウ素酸ナトリウムの添加に関する。酸化反応のpHは、典型的に約7.0である。典型的な反応は、ポリペプチド緩衝化溶液に対する、1.5モル濃度を越えるメタ過ヨウ素酸ナトリウムの添加に続いて、暗所における約10分間のインキュベーションを含んでいる。例えば、参照によって本明細書に援用される米国特許第6,423,685号を参照すればよい。

【0343】

カルボニル官能基は、水性溶液における穏やかな条件の下に、ヒドラジン含有試薬、ヒドラジド含有試薬、ヒドロキシルアミン含有試薬、またはセミカルバジド含有試薬と選択的に反応して、生理学的条件においてそれぞれに対して安定な対応するヒドラゾン、オキシム、またはセミカルバゾン連結を形成し得る。例えば、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)を参照すればよい。さらに、カルボニル基に固有の反応性は、他のアミノ酸側鎖の存在下において選択的な修飾を可能にする。例えば、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)を参照すればよい。

【0344】

B. ヒドラジン反応性基、ヒドラジド反応性基またはセミカルバジド反応性基

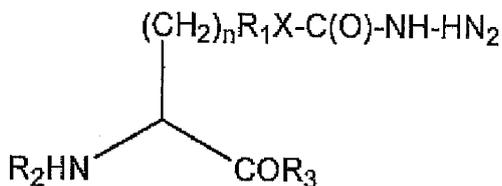
求核性基（例えば、ヒドラジン、ヒドラジドまたはセミカルバジド）を含んでいる天然にコードされていないアミノ酸は、PEGまたは他の水溶性重合体（限定されないが、これらが挙げられる）との抱合物を形成するための種々の求電子基との反応を可能にする。

【0345】

例示的なヒドラジン含有アミノ酸、ヒドラジド含有アミノ酸、またはセミカルバジド含有アミノ酸は、以下のように表され得る：

【0346】

【化41】



【0347】

（ここで、nは0 - 10であり；R<sub>1</sub>は、アルキル、アリール、置換アルキル、または置換アリールであるか、または存在しないかであり；Xは、O、NまたはSであるか、または存在しないかであり；R<sub>2</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはアミノ末端修飾基であり、R<sub>3</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチド、またはカルボキシ末端修飾基である）。

【0348】

いくつかの実施形態において、nは4であり、R<sub>1</sub>は存在せず、XはNである。いくつかの実施形態において、nは2であり、R<sub>1</sub>は存在せず、Xは存在しない。いくつかの実施形態において、nは1であり、R<sub>1</sub>はフェニルであり、XはOであり、酸素原子は、アリール環上における脂肪族基に対してパラ位に位置している。

【0349】

ヒドラジド含有アミノ酸、ヒドラジン含有アミノ酸、またはセミカルバジド含有アミノ酸は、市販の供給元から入手可能である。例えば、L - グルタミン酸 - ヒドラジドは、Sigma Chemical (St. Louis, MO) から入手可能である。市販されていない他のアミノ

10

20

30

40

50

酸は当業者によって調製され得る。例えば、参照によって本明細書に援用される米国特許第 6, 281, 211 号を参照すればよい。

【0350】

ヒドラジド反応性基、ヒドラジン反応性基またはセミカルバジド反応性基を有している天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるポリペプチドは、アルデヒドまたは類似の化学反応性を有する他の官能基を含んでいる種々の分子と効率的かつ選択的に反応し得る。例えば Shao, J. and Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995) を参照すればよい。ヒドラジド官能基、ヒドラジン官能基およびセミカルバジド官能基に固有の反応性は、通常の 20 のアミノ酸に存在する求核性基（セリンもしくはスレオニンのヒドロキシ基、またはリジンおよび N 末端のアミノ基が挙げられるが、これらに限定されない）と比較して、アルデヒド、ケトンおよび他の求電子性基に対してより著しい反応を起こさせる。

10

【0351】

C. アミノオキシ含有アミノ酸

アミノオキシ（ヒドロキシアミンとも呼ばれる）基を含んでいる天然にコードされていないアミノ酸は、PEG または他の水溶性重合体（限定されないが、これらが挙げられる）との抱合物を形成するための求電子性基との反応を可能にする。ヒドラジン、ヒドラジドおよびセミカルバジドと同様に、アミノオキシ基の増強された求核性は、アミノオキシ基がアルデヒドまたは類似の化学反応性を有している他の官能基と効率的かつ選択的に反応することを可能にする。例えば、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) を参照すればよい。ヒドラジン基との反応の結果として生じるのは、対応するヒドラゾンであるが、これに対してオキシムは一般的にカルボニル含有基（例えばケトン）とアミノオキシ基の反応から生じる。

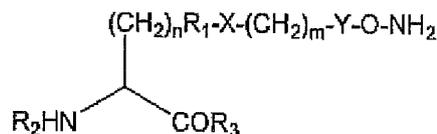
20

【0352】

例示的なアミノオキシ基を含むアミノ酸は以下のように表され得る：

【0353】

【化 4 2】



30

【0354】

（ここで、n は 0 ~ 10 であり、R<sub>1</sub> は、アルキル、アリール、置換アルキルまたは置換アリールであるか、または存在せず；X は、O、N または S であるか、または存在せず；m は 0 ~ 10 であり；Y は C (O) であるか、または存在せず；R<sub>2</sub> は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり、R<sub>3</sub> は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である）。いくつかの実施形態において、n は 1 であり、R<sub>1</sub> はフェニルであり、X は O であり、m は 1 であり、Y は存在する。いくつかの実施形態において、n は 2 であり、R<sub>1</sub> および X は存在せず、m は 0 であり、Y は存在しない）。

40

【0355】

アミノオキシ含有アミノ酸は、容易に入手可能なアミノ酸前駆体（ホモセリン、セリンおよびスレオニン）から調製され得る。例えば、M. Carrasco and R. Brown, J. Org. Chem. 68: 8853-8858 (2003) を参照すればよい。ある種のアミノオキシ含有アミノ酸（例えば、L-2-アミノ-4-(アミノオキシ)ブチル酸）は、天然源から単離されている（Rosenthal, G, et al., Life Sci. 60: 1635-1641 (1997)）。他のアミノオキシ含有アミノ酸は当業者によって調製され得る。

【0356】

D. アジド反応性基およびアルキン反応性基

アジド官能基およびアルキン官能基の固有な反応性は、ポリペプチドおよび他の生体分

50

子の選択的な修飾にとって、それらを極めて有効にさせる。有機アジド、特に脂肪族のアジド、およびアルキンは、通常の反応性の化学的条件に対して一般的に安定である。特に、アジド官能基およびアルキン官能基の両方は、天然に存在するポリペプチドに見られる通常の20のアミノ酸の側鎖（すなわちR基）に対して不活性である。しかし、非常に近づくと、アジド基およびアルキン基の“ばね荷重”性質が現れ、それらは、ヒュイゲン[3+2]付加環化反応を介して選択的かつ効率的に反応して対応するトリアゾールを生成する。例えば、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)を参照すればよい。

## 【0357】

ヒュイゲン付加環化反応が、求核置換よりむしろ選択的な付加環化反応に関与するので（例えば、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を参照すればよい）、アジド含有側鎖およびアルキン含有側鎖を有している天然にコードされていないアミノ酸の組み込みによって、生じるポリペプチドが、天然にコードされていないアミノ酸の位置において選択的に修飾されることが可能になる。アジド含有pSTポリペプチドまたはアルキン含有pSTポリペプチドに関する付加環化反応は、室温における水性条件の下に、Cu(II)（触媒量のCuSO<sub>4</sub>の形態が挙げられるが、これに限定されない）の付加によって、インシチュ(in situ)においてCu(II)をCu(I)に還元する触媒量の還元物質の存在下において、達成され得る。例えば、Wang, Q., et al, J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003) ; Tornøe, C. W., et al, J. Org. Chem. 67:3057-3064 (2002) ; Rostovtsev, et al, Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599 (2002)を参照すればよい。例示的な還元物質としては、アスコルビン酸塩、金属銅、キニーネ、ヒドロキノン、ビタミンK、グルタチオン、システイン、Fe<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>および印加された電位が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0358】

いくつかの場合に、アジドとアルキンとの間におけるヒュイゲン[3+2]付加環化反応が所望される場合に、pSTポリペプチドは、アルキン部分を含んでいる天然にコードされていないアミノ酸を含んでおり、当該アミノ酸に連結されるべき水溶性重合体はアジド部分を含んでいる。また代替的に、逆反応（すなわち、アミノ酸上におけるアジド部分および水溶性重合体上に存在するアルキン部分を用いる）が実現され得る。

## 【0359】

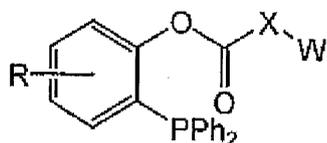
また、アジド官能基は、アリアルエステルを含んでいる水溶性重合体と選択的に反応し、アリアルホスフィン部分を用いて適切に機能付与されて、アミド結合を生成する。アリアルホスフィン基は、インシチュにおいてアジドを還元し、それから生じたアミンは、近接するエステル結合と効率的に反応して対応するアミドを生成する。例えばE. Saxon and C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000)を参照すればよい。アジド含有アミノ酸は、アルキルアジド（2-アミノ-6-アジド-1-ヘキサン酸が挙げられるが、これに限定されない）またはアリアルアジド（p-アジド-フェニルアラニン）のいずれかであり得る。

## 【0360】

アリアルエステルおよびホスフィン部分を含んでいる例示的な水溶性重合体は、以下のように表され得る：

## 【0361】

## 【化43】



10

20

30

40

50

## 【0362】

(ここで、Xは、O、NまたはSであり得るか、または存在しない場合があり得、Phはフェニルであり、Wは水溶性重合体であり、Rは、H、アルキル基、アリール基、置換アルキル基および置換アリール基であり得る)。例示的なR基としては、 $-CH_2$ 、 $-C(CH_3)_3$ 、 $-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、ハロゲン、 $-C(O)R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-CN$ および $-NO_2$ が挙げられるが、これらに限定されない。R'、R''、R'''およびR''''のそれぞれは独立して、水素基、置換もしくは非置換のヘテロアルキル基、置換もしくは非置換のアリール基(1-3のハロゲンと置換されたアリールが挙げられるが、これに限定されない)、置換もしくは非置換のアルキル基、アルコキシ基もしくはチオアルコキシ基、またはアリールアルキル基を指す。本発明の化合物が2つ以上のR基を含む場合に、例えば2つ以上のこれらの基が存在する場合に、R基のそれぞれは、R'、R''、R'''およびR''''のそれぞれであるように、独立して選択される。R'およびR''が同じ窒素原子に結び付けられている場合に、それらは窒素原子と組み合わせさせて、5員環、6員環または7員環を形成し得る。例えば、 $-NR'R''$ は、1-ピロリジニルおよび4-モルホリニルを包含している(これらに限定されない)と意図されている。置換体の上述の議論から、当業者は、“アルキル”という用語が、水素基以外の基(例えば、ハロアルキル( $-CF_3$ および $-CH_2OCH_3$ が挙げられるが、これらに限定されない)およびアシル( $-C(O)CH_3$ 、 $-C(O)CF_3$ 、および $-C(O)CH_2OCH_3$ などが挙げられるが、これらに限定されない))と結合された炭素原子を包含していると意図されていることを理解する。

10

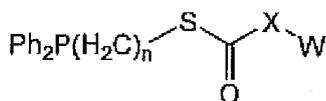
20

## 【0363】

また、アジド官能基は、チオエステルを含んでいる水溶性重合体と選択的に反応し、アリールホスフィン部分を用いて適切に機能付与されてアミド結合を生成し得る。アリールホスフィン基は、インシチュにおいてアジドを還元し、それから生じるアミンは、チオエステル結合と効率的に反応して対応するアミドを生成する。チオエステル部分およびホスフィン部分を含んでいる例示的な水溶性重合体は、以下のように表され得る：

## 【0364】

## 【化44】



30

## 【0365】

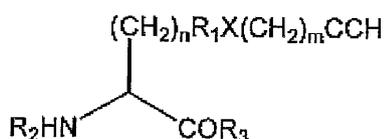
(ここで、nは1~10であり、XはO、NまたはSであり得るか、または存在しない場合があり得、Phはフェニルであり、Wは水溶性重合体である)。

## 【0366】

例示的なアルキン含有アミノ酸は、以下のように表され得る：

## 【0367】

## 【化45】



40

## 【0368】

(ここで、nは0~10であり；R<sub>1</sub>は、アルキル、アリール、置換アルキルまたは置換アリールであるか、または存在せず；Xは、O、NまたはSであるか、存在せず；mは0~10であり、R<sub>2</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり、R<sub>3</sub>は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である)。いくつかの実

50

施形態において、 $n$ は1であり、 $R_1$ はフェニルであり、 $X$ は存在せず、 $m$ は0であり、アセチレン部分はアルキル側鎖に対してパラ位に位置している。いくつかの実施形態において、 $n$ は1であり、 $R_1$ はフェニルであり、 $X$ はOであり、 $m$ は1であり、プロパルギルオキシ基はアルキル側鎖に対してパラ位に位置している（すなわちO-プロパルギルチロシン）。いくつかの実施形態において、 $n$ は1であり、 $R_1$ および $X$ は存在せず、 $m$ は0である（すなわちプロパリルグリシン）。

【0369】

アルキン含有アミノ酸は市販されている。例えばプロパルギルグリシンはPeptech (Burlington, MA) から市販されている。代替的に、アルキン含有アミノ酸は標準的な方法にしたがって調製され得る。例えば、*p*-プロパルギルオキシフェニルアラニンは、例えば、Deiters, A. et al, J. Am. Chem. Soc. 125: 11782-11783 (2003)に記載されているように合成され得、4-アルキニル-L-フェニルアラニンは、Kayser, B., et al, Tetrahedron 53(7): 2475-2484 (1997)に記載されているように、合成され得る。他のアルキン含有アミノ酸は当業者によって調製され得る。

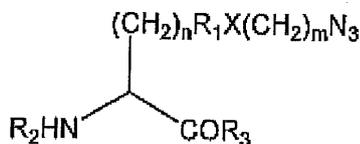
10

【0370】

例示的なアジド含有アミノ酸は以下のように表され得る：

【0371】

【化46】



20

【0372】

(ここで、 $n$ は0~10であり； $R_1$ は、アルキル、アリール、置換アルキルまたは置換アリールであるか、または存在せず； $X$ は、O、NまたはSであるか、または存在せず； $m$ は0~10であり； $R_2$ は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはアミノ末端修飾基であり、 $R_3$ は、H、アミノ酸、ポリペプチドまたはカルボキシ末端修飾基である)。いくつかの実施形態において、 $n$ は1であり、 $R_1$ はフェニルであり、 $X$ は存在せず、 $m$ は0であり、アジド部分はアルキル側鎖に対してパラに位置している。いくつかの実施形態において、 $n$ は0-4であり、 $R_1$ および $X$ は存在せず、 $m=0$ である。いくつかの実施形態において、 $n$ は1であり、 $R_1$ はフェニルであり、 $X$ はOであり、 $m$ は2であり、アジドエトキシ部分はアルキル側鎖に対してパラ位に位置している。

30

【0373】

アジド含有アミノ酸は商業的な供給元から入手可能である。例えば、4-アジドフェニルアラニンは、Chem-Impex International (Wood Dale, IL) から入手され得る。市販されていないこれらのアジド含有アミノ酸に関して、アジド基は、適切な脱離基（ハロゲン化物、メシラート、トシレートが挙げられるが、これらに限定されない）の排除を介した、または適切に保護されたラク톤の開環を介した（限定されないが、これらが挙げられる）、当業者に公知の標準的な方法を用いて、比較的容易に調製され得る。例えば、Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)を参照すればよい。

40

【0374】

E. アミノチオール反応性基

ベータ置換アミノチオール官能基に固有の反応性は、チアゾリジンの形成を介した、アルデヒド基を含んでいるポリペプチドおよび他の生体分子の選択的な修飾にとって、それらを極めて有効にする。例えばJ. Shao and J. Tam, J. Am. Chem. Soc. 1995, 117 (14) 3893-3899を参照すればよい。いくつかの実施形態において、ベータ置換アミノチオールアミノ酸は、*p*STポリペプチドに組み込まれ得、それからアルデヒド官能基を含んでいる水溶性重合体と反応し得る。いくつかの実施形態において、水溶性重合体、薬剤抱合物または他のペイロード (payload) は、チアゾリジンの形成を介したベータ置換アミノチ

50

オールアミノ酸を含んでいる p S T ポリペプチドと連結され得る。

【0375】

F. さらなる反応性基

本発明の p S T ポリペプチドに組み込まれ得る、付加的な反応性基および天然にコードされていないアミノ酸（パラ - アミノ - フェニルアラニンが挙げられるが、これに限定されない）は、以下の特許文献に記載されており、それらは参照によって本明細書に援用される。当該特許文献は、米国特許出願公開第 2006/0194256 号、米国特許出願公開第 2006/0217532 号、米国特許出願公開第 2006/0217289 号、米国仮特許第 60/755,338 号、米国仮特許第 60/755,711 号、米国仮特許第 60/755,018 号、国際公開第 06/49397 号、国際公開第 2006/069246 号、米国仮特許第 60/743,041 号、米国仮特許第 60/743,040 号、国際公開第 06/47822 号、米国仮特許第 60/882,819 号、米国仮特許第 60/882,500 号、および米国仮特許第 60/870,594 号である。また、これらの文献では、PEG または他の重合体（結合のためのヒドロキシルアミン（アミノオキシ）基が挙げられるが、これに限定されない）に存在し得る反応性基について述べられている。

10

【0376】

（非天然アミノ酸の細胞の取込み）

真核細胞による非天然アミノ酸の取込みは、タンパク質への組込みを目的として（限定されないが、これが挙げられる）、非天然アミノ酸を設計および選択するとき典型的に考慮される 1 つの課題である。例えば、 $\alpha$ -アミノ酸の高い電荷密度は、これらの化合物が細胞透過性ではあり得ないことを意味する。天然アミノ酸はタンパク質に基づく輸送系の収集を介して真核細胞に取り込まれる。非天然アミノ酸が少しでも細胞によって取り込まれるならば、これを評価する急速なふるいが行われ得る。例えば、特許文献（代理人整理番号：P1001US00、名称：“Protein Arrays”、出願日：2002年12月22日）；ならびに Liu, D.R. & Schultz, P.G. (1999) Progress toward the evolution of an organism with an expanded genetic code. PNAS United States 96:4780-4785 における、例えば、毒性アッセイを参照すればよい。取込みは、種々のアッセイを用いて容易に分析されるが、細胞性の取込み経路に受け入れられる非天然アミノ酸の設計のための代替案は、インピボにおいてアミノ酸を作り出す生合成経路をもたらすことである。

20

30

【0377】

（非天然アミノ酸の生合成）

多くの生合成経路が、アミノ酸および他の化合物を生成するために細胞にすでに存在している。特定の非天然アミノ酸のための生合成方法は、天然（真核細胞内）が挙げられるが、これに限定されない）に存在し得ない一方で、本発明はそのような方法を提供する。例えば、非天然アミノ酸のための生合成経路は、新しい酵素の添加、または存在する宿主細胞経路の改変によって宿主細胞において生成され得る。追加の新しい酵素は、必要に応じて、天然に存在する酵素または人工的に開発された酵素である。例えば、p - アミノフェニルアラニンの生合成（国際公開第 2002/085923 号（名称：“In vivo incorporation of unnatural amino acids”）における一例に示されるように）は、他の生物に由来する公知の酵素の組合わせの追加を基にしている。これらの酵素に関する遺伝子は、当該遺伝子を含んでいるプラスミドを用いた真核細胞の形質転換によって、当該細胞に導入され得る。細胞において発現される場合に、当該遺伝子は所望の化合物を合成する酵素経路をもたらす。必要に応じて添加されるこの種の酵素の例は、以下の実施例に示されている。追加の酵素の配列は例えばジーンバンクに見出される。また、人工的に開発した酵素は同様の方法において細胞の中に加えられ得る。この方法において、細胞性機構および細胞資源は非天然アミノ酸を生成するために操作される。

40

【0378】

種々の方法が、生合成経路に使用するための新規な酵素の生成、または存在する経路の発展に利用可能である。例えば Maxygen (maxygen.com) のワールドワイドウェブ上において

50

利用可能である)によって開発されたような(限定されないが、これが挙げられる)、反復的な組換えは、新規の酵素および経路の開発に使用され得る。例えば、Stemmer (1994), Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling, Nature 370(4):389-391、およびStemmer, (1994), DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91:10747-10751を参照すればよい。同様に、Genencor (genencor.comのワールドワイドウェブ上において利用可能である)によって開発されたDesignPath(商標)は、代謝経路操作(細胞においてO-メチル-L-チロシンを作り出す経路の操作が挙げられるが、これに限定されない)に任意に使用される。この技術は、新しい遺伝子(機能的なゲノミクスを介して同定された遺伝子が挙げられるが、これに限定されない)、ならびに分子進化および設計の組合わせを用いて、宿主生物に存在する経路を再構築する。また、Diversa Corporation (diversa.comのワールドワイドウェブ上において利用可能である)は、新しい経路を作り出すための(限定されないが、これが挙げられる)、遺伝子および遺伝子経路のライブラリを迅速にスクリーニングする技術を提供している。

10

## 【0379】

典型的に、本発明の設計された生合成経路を用いて生成された非天然アミノ酸は、タンパク質の効率的な生合成に十分な濃度(天然の細胞における量が挙げられるが、これに限定されない)において生成されるが、他のアミノ酸の濃度に影響するか、または細胞性の資源を枯渇させない。この方法においてインピボにおいて生成される典型的な濃度は、約10 mMから0.05 mMである。ひとたび、特定の経路に関して所望される酵素の生成に使用される遺伝子を含んでいるプラスミドを用いて、細胞が形質転換され、非天然アミノ酸が生成されると、リボソームタンパク質の合成および細胞増殖の両方に対して、非天然アミノ酸の生成をさらに最適化するために、必要に応じてインピボセレクションが使用される。

20

## 【0380】

(非天然アミノ酸を有しているポリペプチド)

非天然アミノ酸の組込みは、種々の目的(タンパク質構造および/または機能の変化の修正、大きさの変更、酸性度の変更、求核性の変更、水素結合の変更、疎水性の変更、プロテアーゼ標的部位の接触性の変更、部分に対する標的化(タンパク質アレイ用が挙げられるが、これらに限定されない)、生物学的に活性な分子の付加、重合体の結合、放射線核種の結合、血清半減期の調節、組織浸透の調節(例えば、腫瘍)、活性な輸送の調節、組織、細胞もしくは器官の特異性または分布の調節、免疫原性の調節、プロテアーゼ耐性の調節などが挙げられるが、これらに限定されない)のためになされ得る。非天然アミノ酸を含んでいるタンパク質は、増強されたかもしくは完全に新しい触媒的、または生物学的な性質を有し得る。例えば、以下の性質: 毒性、体内分布、構造的性質、分光性質、化学的および/または光化学的な性質、触媒能、半減期(血中半減期が挙げられるが、これに限定されない)、ならびに他の分子との共有結合的または非共有結合的な(限定されないが、これらが挙げられる)反応能などは、タンパク質への非天然アミノ酸の含有によって任意に調節される。少なくとも1つの非天然アミノ酸を含んでいるタンパク質を含有している組成物は、新規の治療、診断、触媒酵素、工業的な酵素、結合タンパク質(抗体が挙げられるが、これに限定されない)、ならびにタンパク質の構造および機能に関する研究(限定されないが、これらが挙げられる)に有用である。例えば、Dougherty, (2000) Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology, 4:645-652を参照すればよい。

30

40

## 【0381】

本発明の1つの局面において、組成物は、少なくとも1(少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、または少なくとも10以上が挙げられるが、これらに限定されない)の非天然アミノ酸を有している少なくとも1つのタンパク質を含んでいる。非天然アミノ酸は、同じであり得るか、または異なり得る(1、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以

50

上の異なる、または同じ非天然アミノ酸を含んでいるポリペプチドにおける、1、3、4、5、6、7、8、9、10もしくはそれ以上の異なる部位があり得ることが挙げられるが、これらに限定されない)。他の局面において、タンパク質に存在する特定のアミノ酸のすべてではないが、少なくとも1つが非天然アミノ酸と置換されているタンパク質を含んでいる。2つ以上の非天然アミノ酸を有している所定のタンパク質に関して、当該非天然アミノ酸は、同一であり得るか、または異なり得る(タンパク質が2つ以上の異なる種類の非天然アミノ酸を含み得るか、または2つの同じ非天然アミノ酸を含み得ることが挙げられるが、これらに限定されない)。3つ以上の非天然アミノ酸を有している所定のタンパク質に関して、当該非天然アミノ酸は、同じであり得るか、異なり得るか、または少なくとも1つの非天然アミノ酸と複数の同種の非天然アミノ酸との組合せであり得る。

10

**【0382】**

少なくとも1つの非天然アミノ酸を有している所定のタンパク質またはポリペプチドは本発明の特徴である。また、本発明は、本発明の組成物および方法を用いて生成された少なくとも1つの非天然アミノ酸を有しているポリペプチドまたはタンパク質を包含している。また、賦形剤(薬学的に受容可能な賦形剤が挙げられるが、これに限定されない)はタンパク質と共に存在し得る。

**【0383】**

少なくとも1つの非天然アミノ酸を有している所定のタンパク質またはポリペプチドを真核細胞において生成することによって、タンパク質またはポリペプチドは、真核細胞の翻訳後修飾を一般的に含んでいる。ある実施形態において、タンパク質は、少なくとも1つの非天然アミノ酸、および真核細胞によってインピボにおいてなされた少なくとも1つの翻訳後修飾を含んでおり、ここで、当該翻訳後修飾は原核細胞によってなされない。例えば、翻訳後修飾としては、アセチル化、アシル化、脂質修飾、パルミトイル化、パルミチン酸付加、リン酸化、糖脂質結合修飾、および糖鎖形成などが挙げられるが、これらに限定されない。1つの局面において、翻訳後修飾としては、GlcNAc-アスパラギン連結による、アスパラギンに対するオリゴ糖( $(\text{GlcNAc}-\text{Man})_2-\text{Man}-\text{GlcNAc}-\text{GlcNAc}$ が挙げられるが、これに限定されない)の付加が挙げられる。また、真核細胞タンパク質のN結合型オリゴ糖のいくつかの例を挙げている表1を参照すればよい(付加的な残基が存在し得るが、示されていない)。他の局面において、翻訳後修飾としては、GalNAc-セリン連結もしくはGalNAc-スレオニン連結、またはGlcNAc-セリン連結もしくはGlcNAcスレオニン連結による、セリンまたはスレオニンに対するオリゴ糖(Gal-GalNAc、Gal-GlcNAcなどが挙げられるが、これらに限定されない)の付加が挙げられる。

20

30

**【0384】**

【表1】

表1: GlcNAc結合を介したオリゴ糖の例

型	基本構造
高マンノース	
ハイブリッド	
複合体	
キシロース	

10

20

## 【0385】

さらなるもう1つの局面において、翻訳後修飾としては、前駆体（カルシトニン前駆体、カルシトニン遺伝子関連ペプチド前駆体、プレプロ副甲状腺ホルモン、プレプロインシュリン、プロインシュリン、プレプロオピオメラノコルチン、およびプロオピオメラノコルチンなどが挙げられるが、これらに限定されない）のタンパク質分解性のプロセッシング、多サブユニットタンパク質への集合もしくは巨大分子への集合、細胞における他の部位への移動（細胞小器官（例えば、小胞体、ゴルジ装置、核、リソソーム、ペルオキシソーム、ミトコンドリア、葉緑体、液胞など）または分泌経路の通過が挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられる。ある実施形態において、ポリペプチドは、分泌配列または局在化配列であるエピトープタグ、FLAGタグ、ポリヒスチジンタグ、またはGST融合などを含んでいる。

30

## 【0386】

非天然アミノ酸の利点の1つは、非天然アミノ酸が付加的な分子の付加に使用され得る付加的な化学部分を与えることである。これらの修飾は、真核細胞もしくは原核細胞のインピボまたはインピトロにおいてなされ得る。したがって、ある実施形態において、翻訳後修飾は非天然アミノ酸を介する。例えば、翻訳後修飾は求核-求電子反応を介し得る。タンパク質の選択的な修飾に現在、使用されるほとんどの反応は、求核反応パートナーと求電子反応パートナーとの間における共有結合（ $\alpha$ -ハロケトンのヒスチジン側鎖またはシステイン側鎖との反応が挙げられるが、これらに限定されない）の形成に関する。これらの場合における選択性はタンパク質における求核性残基の数および接触性によって決定される。本発明のポリペプチドにおいて、より選択的な他の反応は、例えば、インピボおよびインピトロにおける、ヒドラジド化合物またはアミノオキシ化合物との非天然ケトアミノ酸の反応に使用され得る。例えば、すべてが参照によって本明細書に援用される、Cornish, et al., (1996) J. Am. Chem. Soc., 118:8150-8151; Mahal, et al., (1997) Science, 276:1125-1128; Wang, et al., (2001) Science 292:498-500; Chin, et al., (2002) J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027; Chin, et al., (2002) Proc. Natl. Acad. Sc

40

50

i., 99:11020-11024; Wang, et al., (2003) Proc. Natl. Acad. Sci., 100:56-61; Zhang, et al., (2003) Biochemistry, 42:6735-6746; and, Chin, et al., (2003) Science, 301:964-7を参照すればよい。これは、多くの試薬（蛍光団、架橋剤、糖誘導体および細胞毒性分子が挙げられるが、これらに限定されない）を用いた実質的に任意のタンパク質の選択的な標識を可能にする。また、参照によって本明細書に援用される米国特許第6,927,042号（名称：“Glycoprotein synthesis”、出願日：2003年1月16日）を参照すればよい。また、アジドアミノ酸を介した（限定されないが、これが挙げられる）翻訳後修飾は、トリアリールホスフィン試薬を用いた（限定されないが、これが挙げられる）シュタウディングー連結を介してなされ得る。例えば、Kiick et al, (2002) Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99: 19-24を参照すればよい。

10

## 【0387】

本発明は、タンパク質にアジド部分またはアルキニル部分（限定されないが、これらが挙げられる）を含んでいる非天然アミノ酸の、セクターコドンに応じた遺伝的組込みに関する、タンパク質の選択的な修飾のための他の高効率な方法を提供する。それから、これらのアミノ酸側鎖は、アジド誘導体またはアルキニル誘導体（限定されないが、これらが挙げられる）を別々に用いて、ヒュイゲン[3+2]付加環化反応（限定されないが、これが挙げられる）（例えば、Padwa, A. in Comprehensive Organic Synthesis. Vol. 4. (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109; およびHuisgen, R. in 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry. (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176を参照すればよい）によって修飾され得る。この方法は、求核性置換よりむしろ付加環化に関するもので、タンパク質は極めて高い選択性を有して修飾され得る。この反応は、反応混合物に対する触媒量のCu(I)塩の添加によって、室温の水性条件下において、優れた位置選択性（1,4>1,5）を有して達成され得る。例えば、Tornoe et al, (2002) Org. Chem. 67:3057-3064およびRostovtsev et al, (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41: 2596-2599を参照すればよい。使用され得る他の方法は、テトラシステインモチーフを有しているビス砒素化合物におけるリガンド交換である（例えば、Griffin et al, (1998) Science 281 :269-272を参照すればよい）。

20

## 【0388】

[3+2]付加環化を介して本発明のポリペプチドに加えられ得る分子としては、アジド誘導体またはアルキニル誘導体を有している実質的に任意の分子が挙げられる。当該分子としては、色素、蛍光団、架橋剤、糖誘導体、重合体（ポリエチレングリコールの誘導体が挙げられるが、これに限定されない）、光架橋剤、細胞毒性化合物、親和性標識、ピオチンの誘導体、樹脂、ビーズ、第2のタンパク質もしくはポリペプチド（もしくはそれ以上）、ポリヌクレオチド（DNA、RNAなどが挙げられるが、これらに限定されない）、金属キレート剤、補助因子、脂肪酸、および炭水化物などが挙げられるが、これらに限定されない。これらの分子は、アルキニル基（p-プロパルギルオキシフェニルアラニンが挙げられるが、これに限定されない）またはアジド基（p-アジド-フェニルアラニンが挙げられるが、これに限定されない）を別々に有している非天然アミノ酸に加えられ得る。

30

40

## 【0389】

V. 遺伝的にコードされていないアミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドのインピボ生成

本発明のpSTポリペプチドは、天然に存在する系にコードされていないアミノ酸を加えるか、または置換するために、修飾されたtRNAおよびtRNA合成酵素を用いてインピボにおいて生成され得る。

## 【0390】

天然に存在する系にコードされていないアミノ酸を使用するtRNAおよびtRNA合成酵素を生成する方法は、参照によって本明細書に援用される、米国特許第7,045,337号および米国特許第7,083,970号に記載されている。これらの方法は、翻

50

訳系に対して内因性の合成酵素および tRNA と独立して機能する（そして、このためにときに“直交性の”と呼ばれる）、翻訳機構の生成に関与する。典型的に、当該翻訳系は、直交性の tRNA (O-tRNA) および直交性のアミノアシル tRNA 合成酵素 (O-RS) を含んでいる。典型的に、O-RS は、翻訳系における少なくとも 1 つの天然に存在しないアミノ酸を用いて O-tRNA を好ましくアミノアシル化し、O-tRNA は、当該系における他の tRNA によって認識されない少なくとも 1 つのセクターコドン を認識する。したがって、当該翻訳系は、コードされたセクターコドンに応じて、当該系において生成されるタンパク質に天然にコードされていないアミノ酸を挿入して、これによってコードされたポリペプチドにおける所定の位置にアミノ酸を“置換する”。

#### 【0391】

広範な直交性の tRNA およびアミノアシル tRNA 合成酵素は、ポリペプチドに特定の合成アミノ酸を挿入する当該技術において説明されており、本発明における使用にとって一般的に好適である。例えば、ケト特異的 O-tRNA / アミノアシル tRNA 合成酵素は、Wang, L. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:56-61 (2003)、および Zhang, Z. et al, Biochem. 42(22):6735-6746 (2003) に記載されている。例示的な O-RS またはこれらの一部は、それぞれ、参照によって本明細書に援用される米国特許第 7, 045, 337 号および米国特許第 7, 083, 970 号に開示されている、ポリヌクレオチド配列にコードされており、アミノ酸配列を含んでいる。また、O-RS と共に使用するための対応する O-tRNA 分子は、参照によって本明細書に援用される米国特許第 7, 045, 337 号および米国特許第 7, 083, 970 号に記載されている。O-tRNA / アミノアシル-tRNA 合成酵素対のさらなる例は、国際公開第 2005/007870 号、国際公開第 2005/007624 号、および国際公開第 2005/019415 号に記載されている。

#### 【0392】

アジド特異的な O-tRNA / アミノアシル tRNA 合成酵素の系の例は、Chin, J. W., et al, J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002) に記載されている。p-アジド-L-Phe 用の例示的な O-RS 配列としては、参照によって本明細書に援用される米国特許第 7, 083, 970 号に記載されているように、配列番号 14 ~ 16 および 29 - 32 のヌクレオチド配列、ならびに配列番号 46 ~ 48 および 61 ~ 64 のアミノ酸配列が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の使用に好適な例示的な O-tRNA 配列としては、参照によって本明細書に援用される米国特許第 7, 083, 970 号に開示されているように、配列番号 1 ~ 3 のヌクレオチド配列が挙げられるが、これらに限定されない。天然にコードされていない特定のアミノ酸に特異的な O-tRNA / アミノアシル tRNA 合成酵素の他の例が、参照によって本明細書に援用される米国特許第 7, 083, 970 号に記載されている。S. cerevisiae においてケト含有アミノ酸およびアジド含有アミノ酸の両方を組み込む、O-RS および O-tRNA について、Chin, J. W. et al, Science 301 :964-967 (2003) に記載されている。

#### 【0393】

他の直交性対がいくつか報告されている。S. cerevisiae の tRNA 由来のグルタミン系（例えば、Liu, D. R., and Schultz, P. G. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:4780-4785 を参照すればよい）、アスパルチル系（例えば、Pastrnak, M., et al., (2000) Helv. Chim. Acta 83:2277-2286 を参照すればよい）、およびチロシル系（例えば、Ohno, S., et al., (1998) J. Biochem. (Tokyo, Jpn.) 124:1065-1068; および Kowal, A. K., et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273 を参照すればよい）、ならびに合成酵素は、E. coli における非天然アミノ酸の考えられる取込みに関して記載されている。E. coli のグルタミン系（例えば、Kowal, A. K., et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273 を参照すればよい）および E. coli のチロシル（例えば、Edwards, H., and Schimmel, P. (1990) Mol. Cell. Biol. 10:1633-1641 を参照すればよい）由来の系の合成酵素が、S. cerevisiae において用いるために記載されている。E. coli のチロシル系は、哺乳細胞のインピボにおける 3-ヨード-L-

10

20

30

40

50

チロシンの取込みのために用いられている。Sakamoto, K., et al., (2002) *Nucleic Acids Res.* 30:4692-4699を参照すればよい。

【0394】

O-tRNA / アミノアシル tRNA 合成酵素の使用は、天然にコードされていないアミノ酸をコードする特異的なコドンの選択に關与する。任意のコドンが使用され得るが、一般的にO-tRNA / アミノアシル tRNA 合成酵素が発現されている細胞において、まれにしか使用されないか、または決して使用されないコドンを選択することが好ましい。例えば、例示的なコドンとしては、ナンセンスコドン（例えば、ストップコドン（アンバー、オーカー、およびオパール））、4以上の塩基コドン、ならびにまれにしか使用されない、または使用されない他の天然の3塩基コドンが挙げられる。

10

【0395】

特異的なセクターコドンは、当該技術において公知の突然変異生成方法（部位特異的突然変異生成、カセット突然変異生成、制限選択突然変異生成などが挙げられるが、これらに限定されない）を用いて、pSTポリヌクレオチドのコード配列における適切な位置に導入され得る。

【0396】

タンパク質の生合成機構の構成要素（例えば、非天然アミノ酸を組み込むために使用され得るO-RS、O-tRNAおよび直交性のO-tRNA / O-RS対）を生成する方法は、Wang, L., et al *Science* 292: 498-500 (2001); Chin, J. W. et al, *J. Am. Chem. Soc.* 124:9026-9027 (2002) ;Zhang, Z. et al, *Biochemistry* 42: 6735-6746 (2003)に

記載されている。天然にコードされていないアミノ酸のインピボにおける組み込みのための方法および組成物は、参照によって本明細書に援用される米国特許第7,045,337号に記載されている。また、生体のインピボにおける翻訳系に使用する、直交性のtRNA-tRNA合成酵素対を選択する方法は、参照によって本明細書に援用される米国特許第7,045,337号および米国特許第7,083,970号に記載されている。参照によって本明細書に援用される国際公開第04/035743号（名称：“Site Specific Incorporation of Keto Amino Acids into Proteins”）には、ケトアミノ酸の取込みのための直交性のRSおよびtRNAの対が記載されている。参照によって本明細書に援用される国際公開第04/094593号（名称“Expanding the Eukaryotic Genetic Code”）には、真核生物の宿主細胞における天然にコードされていないアミノ酸の取り

20

30

【0397】

少なくとも1つの直交性の組換えアミノアシル tRNA 合成酵素（O-RS）を生成する方法は：（a）第1の生物（原核生物（例えば、*Methanococcus jannaschii*, *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Halobacterium*, *Escherichia coli*, *A. fulgidus*, *P. furiosus*, *P. horikoshii*, *A. pernix*または*T. thermophilus*など）または真核生物が挙げられるが、これらに限定されない）から、少なくとも1つのアミノアシル tRNA 合成酵素から誘導体化されたRS（必要に応じて変異体）のライブラリを生成すること；（b）非天然アミノ酸および天然アミノ酸の存在下において直交性のtRNA（O-tRNA）をアミノアシル化する構成要素のためのRS（任意に突然変異したRS）のライブラリを選択（および/またはスクリーニング）し、これによって活性なRS（必要に応じて変異体）のプールをもたらすこと；および/または（c）非天然アミノ酸の非存在下においてO-tRNAを好ましくアミノアシル化する活性なRS（突然変異体RSが挙げられるが、これに限定されない）のプールを、（任意にネガティブ選択を介して）選択し、これによって少なくとも1つの組換えO-RSをもたらすことを包含しており；ここで、少なくとも1つの当該組換えO-RSは、非天然アミノ酸を用いて当該O-tRNAを好ましくアミノアシル化する。

40

【0398】

一実施形態において、RSは不活性RSである。不活性RSは活性なRSを突然変異させることによって生成され得る。例えば、不活性RSは、異なるアミノ酸（アラニンが挙

50

げられるが、これに限定されない) に対して、少なくとも約 1 つ、少なくとも約 2 つ、少なくとも約 3 つ、少なくとも約 4 つ、少なくとも約 5 つ、少なくとも約 6 つ、または少なくとも約 10 以上のアミノ酸を突然変異させることによって生成され得る。

#### 【0399】

突然変異体 R S のライブラリは、当該分野に公知の種々の技術 (三次元の R S 構造に基づいた合理的な設計、またはランダムもしくは合理的な技術における R S ヌクレオチドの突然変異生成が挙げられるが、これらに限定されない) を用いて生成され得る。例えば、突然変異体 R S は、部位特異的な突然変異生成、ランダムな突然変異生成、多様性生成組換え突然変異、キメラ構築、合理的な設計、ならびに本明細書に記載されているか、もしくは当該技術において公知の他の方法によって、生成され得る。

10

#### 【0400】

一実施形態において、活性な構成要素 (非天然アミノ酸および天然アミノ酸の存在下において直交性の tRNA (O-tRNA) をアミノアシル化する構成要素が挙げられるが、これに限定されない) のための R S (任意に突然変異した R S) のライブラリを選択 (および/またはスクリーニング) することは、ポジティブ選択またはスクリーニングマーカー (抗生物質耐性遺伝子などが挙げられるが、これに限定されない)、および R S (必要に応じて変異体) のライブラリを、複数の細胞に導入すること (ここで、ポジティブ選択マーカーおよび/またはスクリーニングマーカーは、少なくとも 1 つのセクターコドン (アンバーコドン、オーカーコドン、オパールコドンが挙げられるが、これらに限定されない) を含んでいる) ; 選択薬剤の存在下において複数の細胞を成長させること ; ポジティブ選択マーカーまたはスクリーニングマーカーにおける少なくとも 1 つのセクターコドンを抑圧することによって、選択薬剤および/またはスクリーニング薬剤の存在下において、生存する (または特異的な反応を示す) 細胞を同定し、これによって活性な R S (必要に応じて変異体) のプールを含んでいるポジティブに選択された細胞の一部をもたらすことを包含している。選択薬剤および/またはスクリーニング薬剤の濃度は任意に変更され得る。

20

#### 【0401】

1 つの局面において、ポジティブな選択マーカーは、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子であり、セクターコドンは、CAT 遺伝子におけるアンバーストップコドンである。必要に応じて、ポジティブ選択マーカーは - ラクタマーゼ遺伝子であり、セクターコドンは - ラクタマーゼ遺伝子におけるアンバーストップコドンである。他の局面において、ポジティブな選択マーカーは、蛍光もしくは発光のスクリーニングマーカー、または親和性に基づくスクリーニングマーカー (細胞表面マーカーが挙げられるが、これに限定されない) を含んでいる。

30

#### 【0402】

一実施形態において、非天然アミノ酸の非存在下において O-tRNA を好ましくアミノアシル化する活性な R S (必要に応じて変異体) に関するプールの、ネガティブ選択またはネガティブスクリーニングは : ポジティブ選択またはスクリーニングマーカーからの活性な R S (必要に応じて変異体) のプールと共に、ネガティブ選択マーカー、またはネガティブスクリーニングマーカーを、第 2 の生物の複数の細胞に導入すること (ここで、ネガティブ選択マーカー、またはネガティブスクリーニングマーカーは、少なくとも 1 つのセクターコドン (抗生物質耐性遺伝子 (クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子が挙げられるが、これに限定されない) が挙げられるが、これに限定されない) を含んでいる) ; ならびに非天然アミノ酸、およびスクリーニング薬剤もしくは選択薬剤を補った第 1 の培地において生存するか、または特異的なスクリーニング反応を示すが、非天然アミノ酸およびスクリーニング薬剤もしくは選択薬剤を補っていない第 2 の培地において生存できないか、または特異的なスクリーニング反応を示さない細胞を同定し、これによって少なくとも 1 つの組換え O-R S を有する生存細胞または選別された細胞をもたらすことを包含している。例えば、CAT 同定手順は、適切な O-R S 組換え体の決定において、ポジティブおよび/またはネガティブな選択として必要に応じ

40

50

て役割を果たす。例えば、クローンのプールは、1つ以上の非天然アミノ酸を有しているか、または有していないCAT（少なくとも1つのセクターコドンを含んでいる）を含んでいる成長プレート上において、必要に応じて複製される。したがって、非天然アミノ酸を含んでいるプレート上において排他的に成長するコロニーは、組換えO-RSを含んでいるとみなされる。1つの局面において、選択（および/またはスクリーニング）薬剤の濃度は変更される。いくつかの実施形態において第1および第2の生物は異なる。したがって、第1および/または第2の生物は、原核生物、真核生物、哺乳類、*Escherichia coli*、菌類、酵母、古細菌、真正細菌、植物、昆虫、原生生物などを任意に包含する。他の実施形態において、スクリーニングマーカーは、蛍光もしくは発光のスクリーニングマーカー、または親和性に基づくスクリーニングマーカーを含んでいる。

10

#### 【0403】

他の実施形態において、活性なRS（必要に応じて変異体）に関するプールのスクリーニングまたは選択（ネガティブ選択が挙げられるが、これに限定されない）は：ポジティブ選択の段階（b）から活性な突然変異体RSのプールを単離することと；ネガティブ選択マーカー、またはネガティブスクリーニングマーカー（ここで、ネガティブ選択マーカー、またはネガティブスクリーニングマーカーは、少なくとも1つのセクターコドン（少なくとも1つのセクターコドンを含んでいる毒性マーカー遺伝子（リボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子が挙げられるが、これに限定されない）が挙げられるが、これに限定されない）を含んでいる）、ならびに活性なRS（必要に応じて変異体）のプールを、第2の生物の複数の細胞に導入することと；非天然アミノ酸を補っていない第1の培地において生存するか、または特異的なスクリーニング反応を示すが、非天然アミノ酸を補った第2の培地において生存できないか、または特異的なスクリーニング反応を示さない細胞を同定し、これによって少なくとも1つの組換えO-RSを有する生存細胞、または選別細胞をもたらすことを包含しており、ここで、少なくとも1つの組換えO-RSは天然にコードされていないアミノ酸に特異的である。1つの局面において、少なくとも1つのセクターコドンは約2つ以上のセクターコドンを含んでいる。そのような実施形態は、少なくとも1つのセクターコドンが2つ以上のセクターコドンを含んでいる場合、ならびに第1および第2の生物が異なる場合（それぞれの生物が、任意に原核生物、真核生物、哺乳類、*Escherichia coli*、菌類、酵母、古細菌、真正細菌、植物、昆虫、原生生物など（限定されないが、これらが挙げられる）である場合が挙げられるが、これらに限定されない）を任意に含み得る。また、いくつかの局面は、ネガティブな選択マーカーが、リボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子（少なくとも1つのセクターコドンを含んでいる）を含んでいる場合を包含している。他の局面は、スクリーニングマーカーが蛍光もしくは発光のスクリーニングマーカー、または親和性に基づくスクリーニングマーカーを任意に含んでいる場合を包含している。本明細書における実施形態において、スクリーニングおよび/または選択は、スクリーニングおよび/または選択のストリンジェンシーの変更を任意に包含している。

20

30

#### 【0404】

一実施形態において、直交性の組換えアミノアシルtRNA合成酵素（O-RS）を少なくとも1つを生成する方法は：（d）少なくとも1つの組換えO-RSを単離すること；（e）少なくとも1つの組換えO-RSから誘導体化されたO-RS（必要に応じて変異体）の第2のセットを生成すること；ならびに（f）O-tRNAを好ましくアミノアシル化する能力を備える突然変異したO-RSが得られるまで、段階（b）および（c）を繰り返すことをさらに包含している。段階（d）～（f）は、必要に応じて繰り返される（少なくとも2回が挙げられるが、これに限定されない）。1つの局面において、少なくとも1つの組換えO-RSから誘導体化された突然変異したO-RSの第2のセットは、突然変異生成（ランダムな突然変異生成、部位特異的な突然変異生成、組換え、またはこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない）によって生成され得る。

40

#### 【0405】

選択/スクリーニングの段階（上述した方法における、ポジティブな選択/スクリーニ

50

ングの段階 ( b ) か、ネガティブな選択 / スクリーニングの段階 ( c ) か、ポジティブおよびネガティブな選択 / スクリーニングの段階 ( b ) および ( c ) の両方かのいずれかが挙げられるが、これらに限定されない) のストリンジェンシーは、選択 / スクリーニングのストリンジェンシーの変更を必要に応じて包含している。他の実施形態において、ポジティブな選択 / スクリーニングの段階 ( b ) か、ネガティブな選択 / スクリーニングの段階 ( c ) か、ポジティブおよびネガティブな選択 / スクリーニングの段階 ( b ) および ( c ) の両方かのいずれかは、蛍光標示式細胞分取器 ( F A C S ) によって検出されるか、または発光によって検出されるレポーターを使用することを包含している。レポーターは、細胞表面、またはファージディスプレイなどに並び、非天然アミノ酸または類似体に関する親和性、または触媒活性に基づいて選択される。一実施形態において、突然変異した合成酵素は、細胞表面またはファージディスプレイなどに提示される。

10

## 【 0 4 0 6 】

組換え直交性の t R N A ( O - t R N A ) を生成する方法は : ( a ) 第 1 の生物に由来する少なくとも 1 つの t R N A ( サプレッサ t R N A が挙げられるが、これに限定されない ) から誘導体化された突然変異体 t R N A のライブラリを生成すること ; ( b ) 第 1 の生物に由来する R S の非存在下において、第 2 の生物に由来するアミノアシル t R N A 合成酵素 ( R S ) によってアミノアシル化される t R N A ( 必要に応じて変異体 ) に関するライブラリを選択 ( ネガティブ選択が挙げられるが、これに限定されない ) 、またはスクリーニングし、これによって t R N A ( 必要に応じて変異体 ) のプールをもたらすこと ; ならびに ( c ) 導入された直交性の R S ( O - R S ) によってアミノアシル化される構成要素に関する t R N A ( 必要に応じて変異体 ) のプールを選択またはスクリーニングし、これによって少なくとも 1 つの組換え O - t R N A をもたらすことを包含しており ; ここで、少なくとも 1 つの組換え O - t R N A は、セクターコドン を認識し、第 2 の生物に由来する R S によって効率的に認識されず、O - R S によって好ましくアミノアシル化される。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つの t R N A は、サプレッサ t R N A であり、および / または、天然および / または非天然の塩基の固有な 3 塩基コドンを含んでいるか、ナンセンスコドン、レアコドン、非天然コドン、少なくとも 4 塩基を含んでいるコドン、アンバーコドン、オーカーコドン、もしくはオパールストップコドンである。一実施形態において、組換え O - t R N A は向上した直交性を有している。いくつかの実施形態において、O - t R N A が修飾を必要とせず、第 2 の生物から第 1 の生物に任意に取り込まれることが理解される。種々の実施形態において、第 1 および第 2 の生物は、同じであるか、または異なり、原核生物 ( Methanococcus jannaschii、Methanobacterium thermoautotrophicum、Escherichia coli、Halobacterium などが挙げられるが、これらに限定されない ) 、真核生物、哺乳類、菌類、酵母、古細菌、真正細菌、植物、昆虫、原生生物など ( 限定されないが、これらが挙げられる ) から任意に選択される。付加的に、組換え t R N A は、遺伝子操作を介してインピボにおいてか、または天然に生合成される非天然アミノ酸によって、任意にアミノアシル化される。非天然アミノ酸は少なくとも第 1 または第 2 の生物に使われる成長培地に任意に加えられる。

20

30

## 【 0 4 0 7 】

1 つの局面において、アミノアシル t R N A 合成酵素によってアミノアシル化される ( 突然変異されている場合がある ) t R N A に関するライブラリの選択 ( ネガティブ選択が挙げられるが、これに限定されない ) またはスクリーニング ( 段階 ( b ) ) は、毒性マーカー遺伝子 ( ここで、毒性マーカー遺伝子が、少なくとも 1 つのセクターコドンを含んでいる ( または少なくとも 1 つのセクターコドンを含んでいる毒性マーカー遺伝子が、毒性薬剤もしくは静止薬剤の生成を導く遺伝子か、生物に必須の遺伝子を含んでいる ) ) 、および t R N A のライブラリ ( 必要に応じて変異体 ) を、第 2 の生物に由来する複数の細胞に導入すること ; ならびに生存細胞を選択すること ( ここで、生存細胞は、少なくとも 1 つの直交性の t R N A または非機能的 t R N A を有している t R N A ( 必要に応じて変異体 ) のプールを含んでいる ) を包含している。例えば、生存細胞は比較比率細胞密度アッセイ ( comparison ratio cell density assay ) を用いることによって選択され得る

40

50

。

## 【0408】

他の局面において、毒性マーカー遺伝子は、2つ以上のセクターコドンを含み得る。上記方法の他の実施形態において、毒性マーカー遺伝子は、少なくとも1つのアンバーコドンを含んでいるリボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子である。リボヌクレアーゼバルナーゼ遺伝子は2つ以上のアンバーコドンを任意に含み得る。

## 【0409】

一実施形態において、導入された直交性のRS(O-RS)によってアミノアシル化される構成要素に関するtRNA(必要に応じて変異体)のプールの選択またはスクリーニングは、ポジティブ選択マーカー遺伝子またはポジティブスクリーニングマーカー遺伝子(ここで、ポジティブマーカー遺伝子は、薬剤耐性遺伝子(少なくとも1つのセクターコドン(例えば、少なくとも1つのアンバーストップコドン)を含んでいる - ラクタマゼ遺伝子が挙げられるが、これに限定されない)、または生物に必須の遺伝子、またはO-RSと共に毒性薬剤の無毒化を導く遺伝子を含んでいる)、およびtRNA(必要に応じて変異体)のプールを、第2の生物に由来する複数の細胞に導入すること; ならびに選択薬剤またはスクリーニング薬剤(抗生物質が挙げられるが、これに限定されない)の存在下において成長された、生存細胞または選択細胞を同定し、これによって少なくとも1つの組換えtRNAを含んでいる細胞のプールをもたらすこと(ここで、少なくとも組換えtRNAは、O-RSによってアミノアシル化され、少なくともセクターコドンに応じて、ポジティブマーカー遺伝子によってコードされる転写産物にアミノ酸を挿入する)を包含し得る。他の実施形態において、選択薬剤および/またはスクリーニング薬剤の濃度は変更される。

10

20

## 【0410】

特定のO-tRNA/O-RS対を生成する方法が提供される。当該方法は:(a)第1の生物に由来する少なくとも1つのtRNAから得られた突然変異体tRNAのライブラリを生成すること;(b)第2の生物に由来するアミノアシルtRNA合成酵素(RS)によってアミノアシル化されるtRNA(必要に応じて変異体)に関するライブラリを、第1の生物に由来するRSの非存在下において、ネガティブ選択またはネガティブスクリーニングし、これによってtRNA(必要に応じて変異体)のプールをもたらすこと;(c)導入された直交性のRS(O-RS)によってアミノアシル化される構成要素に関するtRNA(必要に応じて変異体)のプールを選択またはスクリーニングし、これによって少なくとも1つの組換えO-tRNAをもたらすことを包含している。少なくとも1つの組換えO-tRNAは、セクターコドンを認識し、第2の生物に由来するRSによって効率的に認識されず、O-RSによって好ましくアミノアシル化される。また、当該方法は、(d)第3の生物に由来する少なくとも1つのアミノアシルtRNA合成酵素(RS)から誘導体化されたRS(必要に応じて変異体)のライブラリを生成すること;(e)少なくとも1つの組換えO-tRNAを好ましくアミノアシル化する構成要素に関する突然変異体RSのライブラリを、天然にコードされていないアミノ酸および天然アミノ酸の存在下において選択またはスクリーニングし、これによって活性なRS(必要に応じて変異体)のプールをもたらすこと; ならびに(f)少なくとも1つの組換えO-tRNAを好ましくアミノアシル化する活性なRS(必要に応じて変異体)に関するプールを、天然にコードされていないアミノ酸の非存在下において、ネガティブ選択またはネガティブスクリーニングし、これによって少なくとも1つの特異的なO-tRNA/O-RS対をもたらすこと(ここで、少なくとも1つの特異的なO-tRNA/O-RS対は、天然にコードされていないアミノ酸および少なくとも1つの組換えO-tRNAに対して特異的な、少なくとも1つの組換えO-RSを含んでいる)を包含している。当該方法によって生成される特異的なO-tRNA/O-RS対が包含される。例えば、特異的なO-tRNA/O-RS対としては、mutRNA<sup>Tyr</sup>-mut<sup>Tyr</sup>RS対(例えば、mutRNA<sup>Tyr</sup>-SS12<sup>Tyr</sup>RS対)、mutRNA<sup>Leu</sup>-mut<sup>Leu</sup>RS対、mutRNA<sup>Thr</sup>-mut<sup>Thr</sup>RS対、またはmutRNA<sup>Glu</sup>-mut<sup>Glu</sup>R

30

40

50

S対などが挙げることができるが、これらに限定されない。付加的に、そのような方法は、第1および第3の生物が同じ生物（*Methanococcus jannaschii*が挙げられるが、これに限定されない）である場合を包含している。

#### 【0411】

また、第2の生物のインピボにおける翻訳系に使用するための直交性のtRNA-tRNA合成酵素対を選択する方法が、本発明に包含される。当該方法は、マーカー遺伝子、第1の生物から単離されたか、得られたtRNAおよびアミノシルtRNA合成酵素（RS）を、第2の生物に由来する第1の細胞のセットに導入すること；第2の生物に由来する対をなす細胞のセットにマーカー遺伝子およびtRNAを導入すること；ならびに対をなす細胞のセットにおいて生存することができない第1のセットにおける生存細胞を選択すること、または対をなす細胞のセットにおいて特異的なスクリーニング反応を示すことができないそのような反応を示す細胞を選択すること（ここで、第1のセットおよび対をなす細胞のセットは、選択薬剤またはスクリーニング薬剤の存在下において成長され、ここで、生存細胞または選択細胞は、第2の生物のインピボにおける翻訳系に使用するための直交性のtRNA-tRNA合成酵素対を含んでいる）を包含している。一実施形態において、比較、および選択もしくはスクリーニングは、インピボ相補的アッセイを包含している。選択薬剤またはスクリーニング薬剤の濃度は変更され得る。

10

#### 【0412】

本発明の生物は、種々の生物および種々の組合せを包含している。例えば、本発明の方法の第1および第2の生物は、同じであり得るか、または異なり得る。一実施形態において、生物は、必要に応じて原核生物（*Methanococcus jannaschii*、*Methanobacterium thermoautotrophicum*、*Halobacterium*、*Escherichia coli*、*A. fulgidus*、*P. furiosus*、*P. horikoshii*、*A. pernix*、*T. thermophilus*などが挙げられるが、これらに限定されない）である。代替的に、生物は、任意に真核生物（植物（複合体植物（例えば、単子葉植物または双子葉植物）が挙げられるが、これらに限定されない）、藻類、原生生物、菌類（酵母が挙げられるが、これに限定されない）、または動物（哺乳類、昆虫、節足動物などが挙げられるが、これらに限定されない））が挙げられるが、これらに限定されない）などである。他の実施形態において、第2の生物は、原核生物（*Methanococcus jannaschii*、*Methanobacterium thermoautotrophicum*、*Halobacterium*、*Escherichia coli*、*A. fulgidus*、*Halobacterium*、*P. furiosus*、*P. horikoshii*、*A. pernix*、*T. thermophilus*などが挙げられるが、これらに限定されない）である。代替的に、第2の生物は、真核生物（酵母、動物細胞、植物細胞、菌類、または哺乳類細胞などが挙げられるが、これらに限定されない）であり得る。種々の実施形態において、第1および第2の生物は異なる。

20

30

#### 【0413】

本発明は、天然に存在しない1つ以上のアミノ酸のpSTポリペプチドに対する組込みを意図している。天然に存在しない1つ以上のアミノ酸はpSTポリペプチドの活性を破壊しない特定の位置に組み込まれ得る。これは、“保存的な”置換（疎水性アミノ酸を用いた疎水性アミノ酸の置換、かさ高いアミノ酸のかさ高いアミノ酸への置換、親水性アミノ酸の親水性アミノ酸への置換が挙げられるが、これらに限定されない）、および/または活性に必要な位置における天然に存在しないアミノ酸の挿入の生成によって実現され得る。

40

#### 【0414】

種々の生化学的手法および構造的な手法は、pSTポリペプチド内における天然に存在しないアミノ酸を用いた置換に所望される部位を選択するために使用され得る。ポリペプチド鎖の任意の位置が天然に存在しないアミノ酸を組み込むための選択に好適であり、選択が合理的な設計、または任意の目的もしくは特に所望されていない目的のための任意の選択に基づき得ることは、当業者にとって容易に理解される。所望の部位の選択は、所望される任意の特性もしくは活性を有しているpSTポリペプチド分子（アゴニスト、スーパーアンタゴニスト、逆アゴニスト、アンタゴニスト、受容体結合分子、受容体活性調節物質が挙げられるが、これらに限定されない）の生成、未処理の分子と比べて変化のない活

50

性もしくは特性を有している、二量体または多量体の生成、またはポリペプチドの物理的な任意の特性もしくは化学的な任意の特性（例えば可溶性、凝集または安定性）の操作のためであり得る。例えば、p S Tポリペプチドの生物学的な活性に必要な、ポリペプチドにおける位置は、当該分野に公知の点変異分析、アラニンスキニング、飽和変異生成、および当該分野に公知の生物学的活性に関するスクリーニングもしくは相同性スキニング法を用いて同定され得る。他の方法が使用されて、p S Tポリペプチドの修飾のための残基を同定し得る。当該方法としては、配列のプロファイリング、回転異性体ライブラリの選択、残基の対電位、およびProtein Design Automation（登録商標）技術を用いた合理的な設計が挙げられるが、これらに限定されない（参照によって本明細書に援用される米国特許第6,188,965号、米国特許第6,269,312号、米国特許第6,403,312号および国際公開第98/47089号を参照すればよい）。p S Tポリペプチドの生物活性にとって重要な残基、薬学的な安定性に関与している残基、抗体エピトープ、または受容体結合残基が変異され得る。参照によって本明細書に援用される、米国特許第5,580,723号、米国特許第5,834,250号、米国特許第6,013,478号、米国特許第6,428,954号および米国特許第6,451,561号には、標的物質を用いてポリペプチドの活性に影響する活性ドメインを同定することによって、ポリペプチド（例えばp S T）の構造および機能の組織的な分析の方法について記載されている。代替的に、生物学的な活性にとって重要であると同定された残基以外の残基は、ポリペプチドに求められている所望の活性に応じた、天然にコードされていないアミノ酸を用いた置換にとって良好な候補であり得る。また代替的に、生物学的な活性にとって重要であると同定された部位は、ポリペプチドに求められている所望の活性に応じた、天然にコードされていないアミノ酸を用いた置換にとって良好な候補であり得る。他の代替法は、天然にコードされていないアミノ酸を用いたポリペプチド上の各位置における一連の置換を単に生成すること、およびポリペプチドの活性に対する影響を観察することである。任意のポリペプチドに対する非天然アミノ酸を用いた置換のための部位を選択する任意の手法、技術または方法が本発明における使用にとって好適であることは、当業者にとって容易に理解される。

10

20

#### 【0415】

また、欠失を含んでいるp S Tポリペプチドの変異体の構造および活性が試験されて、天然にコードされていないアミノ酸を用いた置換を許容し得るタンパク質の領域を決定し得る。類似の手法において、プロテアーゼ消化およびモノクローナル抗体が使用されて、受容体との結合を担うp S Tの領域を同定し得る。天然にコードされていないアミノ酸を用いた置換を許容し得る残基が排除されると、残り部分のそれぞれにおいて提案されている置換の影響が試験され得る。モデルは、他のC S FファミリーのメンバーおよびC S F受容体の三次元の結晶構造から生成され得る。Protein Data Bank（P D B、ワールドワイドウェブrcsb.orgにおいて利用可能である）は、タンパク質および核酸の多数の分子の三次元構造を含んでいる集中化されているデータベースである。三次元構造のデータが利用可能ではない場合、ポリペプチドの二次元構造および三次元構造を調査するモデルが作成される。p S T / p G HのX線結晶構造およびN M R構造は、Protein Data Bankにおいて利用可能であり、参照によって本明細書に援用される。したがって当業者は、天然にコードされていないアミノ酸を用いて置換され得るアミノ酸位置を容易に同定し得る。

30

40

#### 【0416】

いくつかの実施形態において、本発明のp S Tポリペプチドは、当該ポリペプチドの構造を破壊しないタンパク質の領域に配置されている天然に存在しない1つ以上のアミノ酸を含んでいる。

#### 【0417】

天然にコードされていないアミノ酸の組込みの例示的な残基は、受容体結合領域として見込みのある領域から除外される残基、完全または部分的に溶媒に露出され得る残基、近傍の残基との水素結合相互作用を最小に有しているか、もしくは有していない残基、近傍の反応性残基に対して最小に露出され得る残基、1つ以上の露出表面にあり得る残基、第

50

2のpSTまたは他の分子もしくはこれらの断片に対して並列されている(複数の)部位であり得る残基、受容体と結合するか、もしくは結合しないか、または他の生物学的に活性な分子と結合するか、もしくはpSTの三次元構造、二次構造、三次構造もしくは四次構造によって当該分子と結合しないと予測されるような、柔軟性の高い領域もしくは構造的に堅固な領域にあり得る残基、または所望される完全な構造の柔軟性もしくは剛性を変化させることによって、pST自身または1つ以上のpSTを含んでいる二量体もしくは多量体の立体構造を調節し得る残基である。

【0418】

当業者は、そのようなpSTの分析が、タンパク質の三次構造内に埋もれているアミノ酸残基と比べて表面に露出しているアミノ酸残基の決定を可能にすることを認識する。したがって、表面に露出している残基であるアミノ酸を天然にコードされていないアミノ酸に置換することは、本発明の一実施形態である。

10

【0419】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、pSTの以下の位置：1位より前(すなわちN末端)、1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、23位、24位、25位、26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、37位、38位、39位、40位、41位、42位、43位、44位、45位、46位、47位、48位、49位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、56位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、67位、68位、69位、70位、71位、72位、73位、74位、75位、76位、77位、78位、79位、80位、81位、82位、83位、84位、85位、86位、87位、88位、89位、90位、91位、92位、93位、94位、95位、96位、97位、98位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位、130位、131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位、138位、139位、140位、141位、142位、143位、144位、145位、146位、147位、148位、149位、150位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、157位、158位、159位、160位、161位、162位、163位、164位、165位、166位、167位、168位、169位、170位、171位、172位、173位、174位、175位、176位、177位、178位、179位、180位、181位、182位、183位、184位、185位、186位、187位、188位、189位、190位、191位、192位(すなわちタンパク質のカルボキシル末端)、およびそれらの任意の組合せ(配列番号1)の1つ以上に組み込まれている。いくつかの実施形態において、1つ以上の非天然にコードしているアミノ酸は、STにおける以下の位置：1位より前(すなわちN末端)、1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、23位、24位、25位、26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、37位、38位、39位、40位、41位、42位、43位、44位、45位、46位、47位、48位、49位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、56位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、67位、68位、69位、70位、71位、72位、73位、74位、75位、76位、77位、78位、79位、80位、81位、82位、83位、84位、85位、86位、87位、88位、89位、90位、91位、92位、93位、94位、95位、96位、97位、98位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位

20

30

40

50

、 1 1 5 位、 1 1 6 位、 1 1 7 位、 1 1 8 位、 1 1 9 位、 1 2 0 位、 1 2 1 位、 1 2 2 位  
 、 1 2 3 位、 1 2 4 位、 1 2 5 位、 1 2 6 位、 1 2 7 位、 1 2 8 位、 1 2 9 位、 1 3 0 位  
 、 1 3 1 位、 1 3 2 位、 1 3 3 位、 1 3 4 位、 1 3 5 位、 1 3 6 位、 1 3 7 位、 1 3 8 位  
 、 1 3 9 位、 1 4 0 位、 1 4 1 位、 1 4 2 位、 1 4 3 位、 1 4 4 位、 1 4 5 位、 1 4 6 位  
 、 1 4 7 位、 1 4 8 位、 1 4 9 位、 1 5 0 位、 1 5 1 位、 1 5 2 位、 1 5 3 位、 1 5 4 位  
 、 1 5 5 位、 1 5 6 位、 1 5 7 位、 1 5 8 位、 1 5 9 位、 1 6 0 位、 1 6 1 位、 1 6 2 位  
 、 1 6 3 位、 1 6 4 位、 1 6 5 位、 1 6 6 位、 1 6 7 位、 1 6 8 位、 1 6 9 位、 1 7 0 位  
 、 1 7 1 位、 1 7 2 位、 1 7 3 位、 1 7 4 位、 1 7 5 位、 1 7 6 位、 1 7 7 位、 1 7 8 位  
 、 1 7 9 位、 1 8 0 位、 1 8 1 位、 1 8 2 位、 1 8 3 位、 1 8 4 位、 1 8 5 位、 1 8 6 位  
 、 1 8 7 位、 1 8 8 位、 1 8 9 位、 1 9 0 位、 1 9 1 位、 1 9 2 (すなわちタンパク質の  
 カルボキシル末端)、およびそれらの組合せ(配列番号2)の1つ以上に組み込まれてい  
 る。

10

## 【0420】

いくつかの実施形態において、これらの位置の天然にコードされていない1つ以上のア  
 ミノ酸は、ヒスチジン、アルギニン、リジン、イソロイシン、フェニルアラニン、ロイシ  
 ン、トリプトファン、アラニン、システイン、アスパラギン、バリン、グリシン、セリン  
 、グルタミン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、スレオニン、または天然に存  
 在する非タンパク質新生性のアミノ酸(アラニン、オルニチンなどが挙げられる)以  
 外のアミノ酸であり、1つ以上の以下の位置: 3 5 位、 9 1 位、 9 2 位、 9 4 位、 9 5 位  
 、 9 9 位、 1 0 1 位、 1 3 3 位、 1 3 4 位、 1 3 8 位、 1 3 9 位、 1 4 0 位、 1 4 2 位、  
 1 4 4 位、 1 4 9 位、 1 5 0 位、 1 5 4 位、または任意のこれらの組合せ(配列番号1)  
 に存在している。いくつかの実施形態において、1つ以上のこれらの位置の天然にコード  
 されていないアミノ酸の1つ以上は、ヒスチジン、アルギニン、リジン、イソロイシン、  
 フェニルアラニン、ロイシン、トリプトファン、アラニン、システイン、アスパラギン、  
 バリン、グリシン、セリン、グルタミン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、ス  
 レオニン、または天然に存在する非タンパク質新生性のアミノ酸(アラニン、オルニ  
 チンなどが挙げられる)以外のアミノ酸であり、以下の位置の: 3 位、 7 位、 1 1 位、 3  
 3 位、 4 3 位、 5 8 位、 6 2 位、 6 7 位、 6 9 位、 9 8 位、 9 9 位、 1 2 3 位、 1 2 4 位  
 、 1 2 5 位、 1 3 3 位、 1 3 4 位、 1 3 6 位、 1 4 1 位、 1 5 9 位、 1 6 6 位、 1 6 9 位  
 、 1 7 0 位、 1 7 3 位、およびこれらの1つ以上の任意の組合せ(配列番号1)の1つ以  
 上に存在している。いくつかの実施形態において、1つ以上のこれらの位置の天然にコード  
 されていないアミノ酸の1つ以上は、ヒスチジン、アルギニン、リジン、イソロイシン  
 、フェニルアラニン、ロイシン、トリプトファン、アラニン、システイン、アスパラギン  
 、バリン、グリシン、セリン、グルタミン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、  
 スレオニン、または天然に存在する非タンパク質新生性のアミノ酸(アラニン、オル  
 ニチンなどが挙げられる)以外のアミノ酸であり、以下の位置: 3 5 位、 9 1 位、 9 2 位  
 、 9 4 位、 9 5 位、 9 9 位、 1 0 1 位、 1 3 3 位、 1 3 4 位、 1 3 8 位、 1 3 9 位、 1 4  
 0 位、 1 4 2 位、 1 4 4 位、 1 4 9 位、 1 5 0 位、 1 5 4 位、またはこれらの任意の組合  
 せ(配列番号2)の1つ以上に存在している。いくつかの実施形態において、1つ以上の  
 これらの位置の天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、ヒスチジン、アルギ  
 ニン、リジン、イソロイシン、フェニルアラニン、ロイシン、トリプトファン、アラニン、  
 システイン、アスパラギン、バリン、グリシン、セリン、グルタミン、チロシン、アスパ  
 ラギン酸、グルタミン酸、スレオニン、または天然に存在する非タンパク質新生性のアミ  
 ノ酸(アラニン、オルニチンなどが挙げられる)以外のアミノ酸であり、以下の位置  
 : 3 位、 7 位、 1 1 位、 3 3 位、 4 3 位、 5 8 位、 6 2 位、 6 7 位、 6 9 位、 9 8 位、 9  
 9 位、 1 2 3 位、 1 2 4 位、 1 2 5 位、 1 3 3 位、 1 3 4 位、 1 3 6 位、 1 4 1 位、 1 5  
 9 位、 1 6 6 位、 1 6 9 位、 1 7 0 位、 1 7 3 位、およびこれらの任意の組合せ(配列番  
 号2)の1つ以上に存在している。いくつかの実施形態において、p g h リペプチドにお  
 ける1つ以上のこれらの位置における、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は  
 、ヒスチジン、アルギニン、リジン、イソロイシン、フェニルアラニン、ロイシン、トリ

20

30

40

50

プトファン、アラニン、システイン、アスパラギン、バリン、グリシン、セリン、グルタミン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、スレオニン、または天然に存在する非タンパク質新生性のアミノ酸（ アラニン、オルニチンなどが挙げられる ）以外のアミノ酸であり、以下の位置：Tyr 35、Gln 91、Phe 92、Ser 94、Arg 95、Asn 99、Leu 101、Arg 133、Ala 134、Leu 138、Lys 139、Gln 140、Tyr 142、Lys 144、Leu 149、Arg 150、Ala 154、またはこれらの任意の組合せの1つ以上に存在している。

#### 【0421】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、pST（配列番号1）の1つ以上の位置にリボソームによって組み込まれており、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、ヒスチジン、アルギニン、リジン、イソロイシン、フェニルアラニン、ロイシン、トリプトファン、アラニン、システイン、アスパラギン、バリン、グリシン、セリン、グルタミン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、スレオニン、または天然に存在する非タンパク質新生性のアミノ酸（ アラニン、オルニチンなどが挙げられる ）を包含していない。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、pST（配列番号2）の1つ以上の位置にリボソームによって組み込まれており、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、ヒスチジン、アルギニン、リジン、イソロイシン、フェニルアラニン、ロイシン、トリプトファン、アラニン、システイン、アスパラギン、バリン、グリシン、セリン、グルタミン、チロシン、アスパラギン酸、グルタミン酸、スレオニン、または天然に存在する非タンパク質新生性のアミノ酸（ アラニン、オルニチンなどが挙げられる ）を包含していない。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、pST（配列番号1）の1つ以上の位置に組み込まれ、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、内因性のRSによって認識されない（複数の）官能基を有している。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、pST（配列番号2）の1つ以上の位置に組み込まれ、内因性のRSによって認識されない（複数の）官能基を有している。

#### 【0422】

pSTまたはpSTファミリーの（複数の）メンバーの結晶構造の試験、およびpSTおよび/またはpgh受容体との相互作用の試験によって、完全または部分的に溶媒と接触可能な側鎖を有しているアミノ酸残基を含んでいることが示され得る。これらの位置における天然にコードされていないアミノ酸の側鎖は、タンパク質の表面の外側および溶媒内に向かい得る。

#### 【0423】

天然にコードされていない種々のアミノ酸は、pSTポリペプチドにおける所定の位置のアミノ酸と置換され得るか、この所定の位置に組み込まれ得る。一般に、特定の天然にコードされていないアミノ酸は、（i）pST受容体をともなうpSTポリペプチドおよび他の成長ホルモンファミリーのメンバーの三次元結晶構造の調査、（ii）保存的置換（すなわち、アリールに基づく天然にコードされていないアミノ酸（p-アセチルフェニルアラニンまたはO-プロパルギルチロシンなど）をPhe、Tyr、またはTrpと置換すること）を優先させること、ならびに（iii）pSTポリペプチドに導入することが望まれる特異的な共役の化学的性質に基づいて組み込むために選択される（例えば、アルキン部分を有する水溶性重合体とのヒュイゲン[3+2]付加環化を引き起こしたい場合、4-アジドフェニルアラニンを導入する。また、アリールエステルを有しており、次いでホスフィン部分を組み込む水溶性重合体とアミド結合を形成したい場合、4-アジドフェニルアラニンを導入する）。

#### 【0424】

一実施形態において、上記方法は、第1の反応性基を含んでいる非天然アミノ酸をタンパク質に組み込むこと；およびタンパク質を第2の反応性基を含んでいる分子と接触させることを包含している。当該分子としては、ヒドロキシアルキルスターチ（HAS）、ヒ

10

20

30

40

50

ドロキシエチルスターチ ( H E S )、標識、色素、重合体、水溶性重合体、ポリエチレングリコールの誘導体、光架橋リンカー、放射性核種、細胞毒性化合物、薬物、親和性標識、光親和性標識、反応性化合物、樹脂、もう1つのタンパク質もしくはポリペプチドもしくはポリペプチド類似物、抗体もしくは抗体断片、金属のキレート剤、補足因子、脂肪酸、含水炭素、ポリヌクレオチド、DNA、RNA、アンチセンスポリヌクレオチド、糖、水溶性のデンドリマー、シクロデキストリン、阻害性のリボヌクレオチド、生体材料、ナノ粒子、スピン標識、蛍光団、金属を含有する部分、放射性部分、新規の官能基、ほかの分子に、共有結合的に、または非共有結合的に相互作用する基、光ケージド ( photocaged ) 部分、光線性放射反応性の部分、光異性化可能な部分、ピオチン、ピオチンの誘導体、ピオチンの類似物、重原子を組み込みこんでいる部分、化学切断可能な基、光切断可能な基、延長された側鎖、炭素結合型の糖、酸化還元活性の剤、アミノチオ酸、毒性部分、同位体によって標識された部分、生物物理学的なプローブ、燐光性の基、化学発光性の基、電子密度の高い基、磁性基、インターカレートする基、発色団、エネルギー転移剤、生物学的に活性な薬剤、検出可能な標識、小分子、量子ドット、放射性ヌクレオチド、放射性伝達物質、中性子補足剤、または上記の組合せ、または任意の他の所望の化合物もしくは物質)などが挙げられるが、これらに限定されない。上記第1の反応性基は、上記第2の反応性基と反応して、[ 3 + 2 ] 環付加を介して非天然アミノ酸に上記分子を結合させる。一実施形態において、上記第1の反応性基はアルキン部分またはアジド部分であり、上記第2の反応性基はアジド部分またはアルキン部分である。例えば、上記第1の反応性基は、アルキン部分 ( 非天然アミノ酸 p - プロパルギルフェニルアラニンにおけるアルキン部分が挙げられるが、これに限定されない ) であり、上記第2の反応性基はアジド部分である。他の例において、上記第1の反応性基は、アジド部分 ( 非天然アミノ酸 p - アジド - L - フェニルアラニンにおけるアジド部分が挙げられるが、これに限定されない ) であり、上記第2の反応性基はアルキン部分である。

#### 【 0 4 2 5 】

いくつかの場合に、天然にコードされていないアミノ酸の ( 複数の ) 置換または ( 複数の ) 組込みは、p S T ポリペプチドの生物学的な他の性質に p S T ポリペプチド内の他の付加、置換または欠失と組み合わせられる。いくつかの場合に、上記他の付加、置換または欠失は p S T ポリペプチドの安定性 ( タンパク質分解性の分解に対する耐性が挙げられるが、これに限定されない ) を増大させ得るか、または p S T ポリペプチドの受容体に対する p S T ポリペプチドの親和性を増大させ得る。いくつかの場合に、他の付加、置換または欠失は、p S T ポリペプチドの薬学的な安定性を増強し得る。いくつかの場合に、他の付加、置換または欠失は、p S T ポリペプチドの生物学的な活性を増強し得る。いくつかの場合に、他の付加、置換または欠失は、p S T ポリペプチドの可溶性 ( E. coli または他の宿主細胞において発現される場合が挙げられるが、これらに限定されない ) を増強し得る。いくつかの実施形態において、付加、置換または欠失は、E. coli または他の宿主細胞における発現の後における p S T ポリペプチドの可溶性を増強し得る。いくつかの実施形態において、E. coli または他の宿主細胞における発現の後における p S T ポリペプチドの可溶性を生じる非天然アミノ酸の組込みのための他の部位に加えて、天然にコードされていないアミノ酸を用いた置換のための部位が選択される。いくつかの実施形態において、p S T ポリペプチドは、受容体、結合タンパク質もしくは会合するリガンドに対する親和性を調節するか、受容体との結合後におけるシグナル伝達を調節するか、循環半減期を調節するか、精製を容易にするか、特定の投与経路を改善するか、または変更する他の付加、置換または欠失を含んでいる。いくつかの実施形態において、p S T ポリペプチドは、その受容体に対する p S T バリエーションの親和性を増強する付加、置換または欠失を含んでいる。同様に、p S T ポリペプチドは、化学的または酵素的な切断配列、プロテアーゼ切断配列、反応性基、抗体結合ドメイン ( F L A G またはポリ - H i s が挙げられるが、これらに限定されない ) もしくは他の親和性に基づく配列 ( F L A G、ポリ - H i s、G S T など挙げられるが、これらに限定されない )、または連結分子 ( ピオチンが挙げられるが、これに限定されない ) を含み得る。当該連結分子は、検出を向上させる分子

(GFPが挙げられるが、これに限定されない)、精製、組織もしくは細胞膜を介した輸送、プロドラッグの放出もしくは活性化、pSTのサイズの低下またはポリペプチドの他の特色を向上させる分子である。

【0426】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の置換によってpSTアンタゴニストが生成される。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸は、受容体結合に関与する領域に置換されているか、または付加されている。いくつかの実施形態において、pSTアンタゴニストは、pSTをアンタゴニストとして作用させる少なくとも1つの置換を含んでいる。いくつかの実施形態において、pSTアンタゴニストは、水溶性重合体と連結されている天然にコードされていないアミノ酸を含んでおり、当該アミノ酸がpST分子の受容体結合領域に存在している。

10

【0427】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の置換によってpSTアンタゴニストが生成される。いくつかの実施形態において、pSTアンタゴニストは、水溶性重合体と連結されている天然にコードされていないアミノ酸を含んでおり、当該アミノ酸がpST分子の受容体結合領域に存在している。

【0428】

いくつかの場合に、1、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上のアミノ酸は、天然にコードされていない1つ以上のアミノ酸を用いて置換される。いくつかの場合に、pSTポリペプチドは、天然にコードされていない1つ以上のアミノ酸による天然に存在するアミノ酸の、1、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の置換をさらに含んでいる。例えば、いくつかの実施形態において、pSTにおける1つ以上の残基が、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上を用いて置換されている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上が、直鎖状または分枝鎖状のより低分子量の複数のPEGと連結されており、これによって単一のより高分子量のPEGと結合されている種と比べて、結合親和性を増強し、匹敵する血中半減期を実現する。

20

【0429】

いくつかの実施形態において、2つ以上の下記のpSTは天然にコードされていない1つ以上のアミノ酸を用いて置換される。

30

【0430】

VII. 非真核生物および真核生物における発現

クローン化されたpSTポリヌクレオチドを高レベルに発現させるために、直接転写にとって強力なプロモータ、転写/翻訳ターミネータ、および(タンパク質をコードする核酸用の場合に)翻訳開始用のリボソーム結合部位を含んでいる発現ベクターに対して、本発明のpSTポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを一般的にサブクロニングする。適切な細菌プロモータは、当業者に周知であり、Sambrook et alおよびAusubel et alに説明されている。

【0431】

本発明のpSTポリペプチドの発現を目的とした細菌発現系は、例えば*E. coli*、*Bacillus sp.*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas putida*、および*Salmonella*において利用可能であるが、これらに限定されない(Palva et al., *Gene* 22:229-235 (1983); Mosbach et al., *Nature* 302:543-545 (1983))。そのような発現系用のキットは市販されている。また、哺乳動物細胞、酵母および昆虫細胞にとっての真核発現系は、当業者に周知であり、市販もされている。直交性のtRNAおよびアミノアシル化tRNA合成酵素(上述されている)を使用して、本発明のpSTポリペプチドを発現する場合、発現用の宿主細胞は、直交性の構成要素を使用する当該宿主細胞の能力に基づいて選択される。例示的な宿主細胞としては、グラム陽性細菌(*B. brevis*または*B. subtilis*、*Pseudomonas*または*Streptomyces*が挙げられるが、これらに限定されない)、およびグラム陰性細菌(*E. coli*、*Pseudomonas fluorescens*、*Pseudomonas aeruginosa*、

40

50

*Pseudomonas putida*) だけでなく、酵母および他の真核細胞が挙げられる。O - t R N A / O - R S 対を含んでいる細胞は、本明細書に記載のように使用され得る。

【0432】

本発明の真核生物の宿主細胞または非真核生物の宿主細胞は、非常に有効な量の非天然アミノ酸を含んでいるタンパク質の合成能を有している。1つの局面において、組成物は、必要に応じて、少なくとも10マイクログラム、少なくとも50マイクログラム、少なくとも75マイクログラム、少なくとも100マイクログラム、少なくとも200マイクログラム、少なくとも250マイクログラム、少なくとも500マイクログラム、少なくとも1ミリグラム、少なくとも10ミリグラム、少なくとも100ミリグラム、少なくとも1グラム、もしくはそれ以上（これらに限定されない）の、非天然アミノ酸を含んでいるタンパク質を含んでいるか、またはインピボにおけるタンパク質の製造方法（組換えタンパク質の製造および精製についての詳細が本明細書に与えられている）を用いて達成され得る量のタンパク質を含んでいる。他の局面において、タンパク質は、（これに限定されないが、1nL~100Lなどの任意の量の）細胞溶解液、緩衝液、薬学的緩衝液または他の液体懸濁液に、1リットルごとに少なくとも10マイクログラムのタンパク質、1リットルごとに少なくとも50マイクログラムのタンパク質、1リットルごとに少なくとも75マイクログラムのタンパク質、1リットルごとに少なくとも100マイクログラムのタンパク質、1リットルごとに少なくとも200マイクログラムのタンパク質、1リットルごとに少なくとも250マイクログラムのタンパク質、1リットルごとに少なくとも500マイクログラムのタンパク質、1リットルごとに少なくとも1ミリグラムのタンパク質、1リットルごとに少なくとも10ミリグラムのタンパク質、またはそれ以上の濃度（これらに限定されない）において、組成物に必要に応じて存在する。少なくとも1つの非天然アミノ酸を含んでいるタンパク質の真核細胞における大量生産（典型的に限定されないが、インピボにおける翻訳を含む他の方法を用いて可能な量よりも多い量が挙げられるが、これに限定されない）は、本発明の1つの特徴である。

10

20

【0433】

本発明の真核生物の宿主細胞または非真核生物の宿主細胞は、非天然アミノ酸を含んでいるタンパク質を非常に有効な量において生合成する能力を備えている。例えば、非天然アミノ酸を含んでいるタンパク質は、細胞抽出物、細胞溶解液、培地、および/または緩衝液などに、例えば、少なくとも10μg/リットル、少なくとも50μg/リットル、少なくとも75μg/リットル、少なくとも100μg/リットル、少なくとも200μg/リットル、少なくとも250μg/リットル、少なくとも500μg/リットル、少なくとも1mg/リットル、少なくとも2mg/リットル、少なくとも3mg/リットル、少なくとも4mg/リットル、少なくとも5mg/リットル、少なくとも6mg/リットル、少なくとも7mg/リットル、少なくとも8mg/リットル、少なくとも9mg/リットル、少なくとも10mg/リットル、少なくとも20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900mg/リットル、1g/リットル、5g/リットル、10g/リットル、またはそれ以上の濃度において、製造され得る。

30

40

【0434】

pSTの発現に好適な多数のベクターは商業的に入手可能である。真核生物の宿主細胞に対して有効な発現ベクターは、SV40、ウシ乳頭種ウイルス、アデノウイルスおよび巨細胞ウイルス由来の発現調節配列を含むベクターが挙げられるが、これに限定されない。そのようなベクターとしては、pCDNA3.1(+)/Hyg (Invitrogen, Carlsbad, Calif., USA) および pCI-neo (Stratagene, La Jolla, Calif., USA) が挙げられる。細菌のプラスミド（例えばE.coli由来のプラスミド（pBR322、pET3aおよびpET12aが挙げられる）、より幅広い宿主の範囲のプラスミド（例えばRP4、ファージDNA（例えばファージラムダの多数の誘導体（例えばNM988および他のDNAファージ（例えばM13および線状1本鎖DNAファージ）が使用され得る。2μプラスミドおよびその誘導体、POT1ベクター（参照に援用されるU.S. Pat. No

50

. 4,931)、(Okkels, Ann. New York Acad. Sci. 782, 202-207, 1996)に記載されている p J S O 3 7 ベクター、および p P I C Z A、p P I C Z B または p P I C Z C (Invitrogen) は、酵母の宿主細胞に用いられ得る。昆虫細胞用のベクターとしては、p V L 9 4 1、p B G 3 1 1 (Cate et al., "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance And Expression of the Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, pp. 685-98 (1986)、p B l u e b a c 4 . 5 および p M e l b a c (Invitrogen, Carlsbad, CA) が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0435】

また、p S T ポリペプチドは、シグナルペプチドをコードしている配列を含み得るか、または含み得ない。シグナルペプチドは、上記ポリペプチドが発現される細胞から分泌されるときに存在している。シグナルペプチドは原核性または真核性であり得る。Coloma, M (1992) J. Imm. Methods 152:89-104)には、哺乳動物の細胞における使用のためのシグナルペプチド(マウスの I g カップ軽鎖のシグナルペプチド)について記載されている。他のシグナルペプチドとしては、S. cerevisiae由来の a - 因子シグナルペプチド(参照によって本明細書に援用される米国特許第 4, 870, 008号)、マウスの唾液アミラーゼのシグナルペプチド(O. Hagenbuchle et al., Nature 289, 1981, pp. 643-646)、修飾されたカルボキシペプチダーゼ(L. A. Valls et al., Cell 48, 1987, pp. 887-897)、酵母 B A R 1 シグナルペプチド(参照によって本明細書に援用される国際公開第 87/02670号)、および酵母のアスパラギン酸プロテアーゼ 3 (Y A P 3) シグナルペプチド(M. Egel-Mitani et al., Yeast 6, 1990, pp. 127-137を参照)が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

#### 【0436】

好適な哺乳動物の宿主細胞の例は当業者に知られている。そのような宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)細胞(例えばCHO-K1; ATCC CCL-61)、ミドリザルの細胞(COS)(例えばCOS1(ATCC CRL-1650)、COS7(ATCC CRL-1651));マウスの細胞(例えばNS/O)、仔ハムスター腎(BHK)細胞株(例えばATCC CRL-1632またはATCC CCL-10)、およびヒトの細胞(例えばHEK 293(ATCC CRL-1573))、ならびに組織培養における植物細胞であり得る。これらの細胞株および他のものは、公的な保管所(例えばAmerican Type Culture Collection, Rockville, Mdが挙げられる)から入手可能である。p S T ポリペプチドの改良されたグリコシル化を与えるために、シアル酸転移酵素(例えば、参照によって本明細書に援用される米国特許第 5, 047, 335号に記載されている、例えば、1, 6 - シアル酸転移酵素)を発現するために修飾され得る。

30

#### 【0437】

哺乳動物の宿主細胞への外来性DNAの導入のための方法(リン酸カルシウム仲介性の形質移入、エレクトロポレーション、DEAE-デキストラン仲介性の形質移入、リポソーム仲介性の形質移入が挙げられるが、これに限定されない)、Lipofectamin 2000を用いたLife Technologies Ltd, Paisley, UK、およびFuGENE 6を用いたRoche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USAによって説明されているウイルスのベクターおよびおよび形質移入の方法が挙げられるが、これらに限定されない。これらの方法は、当業者によく知られており、Ausbel et al. (eds.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USAによって説明されている。哺乳動物の細胞の培養は、確立されている方法(例えば、Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Edited by Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc. Totowa, N.J., USA and Harrison Mass. and Rae IF, General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press 1997に開示されている方法)によって行われ得る。

40

#### 【0438】

##### I . 発現系、培養および単離

任意の数の適切な発現系において、p S T ポリペプチドを発現させ得る。当該発現系と

50

しては、例えば、酵母、昆虫細胞、哺乳動物細胞および細菌が挙げられる。典型的な発現系の例を以下に示す。

【0439】

(酵母)

本明細書に使用されるとき、“酵母”という用語は、pSTポリペプチドをコードする遺伝子を発現可能な種々の酵母のいずれかを包含している。そのような酵母としては、子嚢胞子を生じる(ascosporogenous)酵母(Endomycetales)、担子胞子を生じる(basidiosporogenous)酵母、および不完全真菌(Blastomycetes)の群に属する酵母などが挙げられるが、これらに限定されない。子嚢胞子を生じる酵母は、2のファミリー(SpermothoraceaeおよびSaccharomycetaceae)に分けられる。後者は、4のサブファミリー(Schizosaccharomycoideae (Schizosaccharomyces属など)、Nadsonioideae、Lipomycoideae、およびSaccharomycoideae (Pichia属、Kluyveromyces属およびSaccharomyces属など))から構成されている。担子胞子を生じる酵母としては、Leucosporidium属、Rhodosporidium属、Sporidiobolus属、Filobasidium属およびgenus Filobasidiella属が挙げられる。不完全真菌(Blastomycetes)の群に属する酵母は、2のファミリー(Sporobolomycetaceae (Sporobolomyces属およびBullera属など)およびCryptococcaceae (Candida属など))に分けられる。

10

【0440】

本発明と一緒に使用するために、特に興味深い酵母は、Pichia属、Kluyveromyces属、Saccharomyces属、Schizosaccharomyces属、Hansenula属、Torulopsis属およびCandida属に含まれる種であり、当該酵母としては、P. pastoris、P. guilliermondii、S. cerevisiae、S. carlsbergensis、S. diastaticus、S. douglasii、S. kluyveri、S. norbensis、S. oviformis、K. lactis、K. fragilis、C. albicans、C. maltosa、およびH. polymorphaが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0441】

pSTポリペプチドの発現に好適な酵母の選択は当業者の技術範囲にある。発現用の酵母宿主の選択において、好適な宿主としては、例えば良好な分泌能、低いタンパク質分解活性、および総合的な強健さを有していることが示されている酵母が挙げられ得る。酵母は、一般的に種々の供給源から入手でき、カリフォルニア大学生物物理学および医学物理学分野(Department of Biophysics and Medical Physics, University of California)のYeast Genetic Stock Center (Berkeley, CA)、およびthe American Type Culture Collection (“ATCC”) (Manassas, VA)などから入手できるが、これらに限定されない。

30

【0442】

“酵母宿主”または“酵母宿主細胞”という用語は、組換えベクターまたは他のトランスファーDNAの受容物として使用し得るか、または使用されている酵母を包含している。この用語は、組換えベクターまたは他のトランスファーDNAを受け容れている元の酵母宿主細胞の子孫を包含している。1つの親細胞の子孫は、形態において、またはゲノムDNAもしくは全DNAの補体(complement)において、偶発的な突然変異、もしくは計画的な突然変異に起因して、元の親細胞と必ずしも完全に一致しなくてもよいことが理解される。関連する性質(例えば、pSTポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の存在)によって特徴付けられる親細胞と十分に類似する親細胞の子孫は、この定義によって意図される子孫に包含される。

40

【0443】

発現ベクターおよび形質転換ベクター(染色体外レプリコンまたは組込みベクターが挙げられる)は、多くの酵母宿主を形質転換するために開発されている。例えば、参照によって本明細書に援用されるS. cerevisiae (Sikorski et al, GENETICS (1998) 112:19、Ito et al, J. BACTERIOL. (1983) 153:163、Hinnen et al, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1978) 75:1929)、C. albicans (Kurtz et al, MOL. CELL. BIOL. (1986) 6:142)、C. albicans (Kunze et al, J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141)、H. polymorpha (Gleeson et al, J. GEN. MICROBIOL. (1986) 132:3459、Roggenkamp et al., MOL. GENETICS

50

AND GENOMICS (1986) 202:302)、K. fragilis(Das et al, J. BACTERIOL. (1984) 158:165)、K. lactis(De Louvencourt et al, J. BACTERIOL. (1983) 154:737、Van den Berg et al, BIO/TECHNOLOGY (1990) 8:135)、P. guillermondii(Kunze et al, J. BASIC MICROBIOL. (1985) 25:141)、P. pastoris(米国特許第5,324,639号、米国特許第4,929,555号、および米国特許第4,837,148号、Cregg et al, MOL. CELL. BIOL. (1985) 5:3376、Schizosaccharomyces pombe(Beach and Nurse, NATURE (1981) 300:706)、およびY. lipolytica(Davidow et al., Curr. Genet. (1985) 10:380 (1985); Gaillardin et al., Curr. Genet. (1985) 10:49)、A. nidulans(Balance et al, BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. (1983) 112:284-89、Tilburn et al, GENE (1983) 26:205-221、およびYelton et al, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1984) 81:1470-74)、A. niger(Kelly and Hynes, EMBO J. (1985) 4:475479)、T. reesia(欧州特許出願公開第0244234号)、および糸状菌(例えば、Neurospora、Penicillium、Tolypocladium(国際公開第91/00357号)などのための発現ベクターが開発されている。

10

#### 【0444】

酵母ベクター用の制御配列は当業者に周知であり、当該制御配列としては、アルコールデヒドロゲナーゼ(ADH)(欧州特許出願公開第0284044号)、エノラーゼ、グルコキナーゼ、グルコース-6リン酸イソメラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸-デヒドロゲナーゼ(GAPまたはGAPDH)、ヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、およびピルビン酸キナーゼ(PyK)(欧州特許出願公開第0329203号)といった遺伝子に由来するプロモータ領域などが挙げられるが、これらに限定されない。また、酸性ホスファターゼをコードしている酵母のPHO5遺伝子は、有用なプロモータ配列を提供し得る(Myanochara et al, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1983) 80:1)。酵母宿主との使用に適切な他のプロモータ配列としては、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ(Hitzeman et al, J. BIOL. CHEM. (1980) 255:2073)、および他の解糖系の酵素(例えば、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、およびホスホグルコースイソメラーゼ(例えば、Holland et al, BIOCHEMISTRY (1978) 17:4900、Hess et al, J. ADV. ENZYME REG. (1968) 7:149)が挙げられ得る。増殖条件によって制御される転写のさらなる利点を有している、酵母の誘導性プロモータとしては、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、ならびにマルトースおよびガラクトースの利用を担っている酵素にとってのプロモータ領域が挙げられ得る。酵母発現における使用に適切なベクターおよびプロモータは、欧州特許出願公開第0073657号に、さらに記載されている。

20

30

#### 【0445】

また、酵母エンハンサーを、酵母プロモータと共に用い得る。さらに、合成プロモータは酵母プロモータとして機能し得る。例えば、酵母プロモータの上流活性化配列(UAS)を別の酵母プロモータの転写活性化領域につないで、合成混成プロモータを作製し得る。混成プロモータとしては、例えばGAPの転写活性化領域に連結されたADH調節配列が挙げられる。米国特許第4,880,734号および米国特許第4,876,197号を参照すればよい。混成プロモータの他の例としては、解糖系酵素の遺伝子(例えば、GAPまたはPyK)の転写活性化領域と組み合わせたADH2、GAL4、GAL10、またはPHO5の遺伝子の調節配列からなるプロモータが挙げられる。欧州特許出願公開0164556号を参照すればよい。さらに、酵母プロモータとしては、酵母のRNAポリメラーゼとの結合能および転写開始能を有している、非酵母由来の天然に存在するプロモータが挙げられ得る。

40

#### 【0446】

酵母発現ベクターの一部を構成し得る他の制御要素としては、例えば、GAPDHまたはエノラーゼ遺伝子に由来するターミネータ(Holland et al, J. BIOL. CHEM. (1981) 256:1385)が挙げられる。さらに、2μプラスミドの起点に由来する複製開始点は、酵母にとって適切である。酵母に使用するための適切な選択遺伝子は、酵母プラスミドに存在

50

する *trp1* 遺伝子である。Tschemper et al, GENE (1980) 10:157、Kingsman et al, GENE (1979) 7:141を参照すればよい。*trp1* 遺伝子は、トリプトファン存在下において増殖能を欠如している酵母の突然変異株に対する選択マーカーを提供する。同様に *Leu2* 欠損酵母株 (ATCC 20,622 または 38,626) は、*Leu2* 遺伝子を有する公知のプラスミドによって補完される。

#### 【0447】

外来性 DNA を酵母宿主に導入する方法は、当業者に周知の技術であり、当該方法としては、アルカリ性陽イオンを用いて処理された天然の酵母宿主細胞またはスフェロプラストのいずれかの形質転換が一般的に挙げられるが、これらに限定されない。例えば、酵母の形質転換は、Hsiao et al, PROC. NATL. ACAD. SCI. USA (1979) 76:3829 および Van Soelingen et al, J. BACT. (1977) 130:946 に記載の方法にしたがって、実施され得る。しかし、例えば、核注入、エレクトロポレーションまたは原形質融合によって DNA を細胞に導入する他の方法も、SAMBROOK et al, MOLECULAR CLONING: A LAB. MANUAL (2001) に記載の通りに使用され得る。それから、酵母宿主細胞を当業者に公知の標準技術を用いて培養してもよい。

10

#### 【0448】

酵母宿主細胞において異種タンパク質を発現させる他の方法は、当業者に公知の技術である。一般的に、米国特許出願公開第 2002/0055169 号、米国特許第 6,361,969 号、米国特許第 6,312,923 号、米国特許第 6,183,985 号、米国特許第 6,083,723 号、米国特許第 6,017,731 号、米国特許第 5,674,706 号、米国特許第 5,629,203 号、米国特許第 5,602,034 号、および米国特許第 5,089,398 号、米国再発行特許発明第 RE37,343 号、および米国再発行特許発明第 RE35,749 号、国際公開第 99/07862 号、国際公開第 98/37208 号、および国際公開第 98/26080 号、欧州特許出願公開第 0946736 号、欧州特許出願公開第 0732403 号、欧州特許出願公開第 0480480 号、国際公開第 90/10277 号、欧州特許出願公開第 0340986 号、欧州特許出願公開第 0329203 号、欧州特許出願公開第 0324274 号、および欧州特許出願公開第 0164556 明細書を参照すればよい。また、参照によって本明細書に援用される、Gellissen et al, ANTONIE VAN LEEUWENHOEK (1992) 62(1-2):79-93、Romanos et al, YEAST (1992) 8(6):423-488、Goeddel, METHODS IN ENZYMOLOGY (1990) 185:3-7 を参照すればよい。

20

30

#### 【0449】

酵母宿主株は、当業者に周知である標準の給飼バッチ発酵方法 (feed batch fermentation method) を用いて、増幅段階の間に発酵槽において増殖され得る。上記発酵方法は、特定の酵母宿主の炭素利用経路、または発現制御の様式の差異に起因して適合され得る。例えば、サッカロミセス酵母宿主の発酵は、1つのグルコース飼料、複合的な窒素源 (カゼイン加水分解物など)、および複数のビタミン補助物を必要とし得る。これに対して、メチロトロフ酵母である *P. pastoris* は、グリセロール、メタノール、および微量の無機化合物飼料を必要とし得、最適な増殖および発現については単純なアンモニウム (窒素) 塩だけを必要とする。例えば、参照によって本明細書に援用される、米国特許第 5,324,639 号、Elliott et al, J. PROTEIN CHEM. (1990) 9:95、および Fieschko et al, BIOTECH. BIOENG. (1987) 29:1113 を参照すればよい。

40

#### 【0450】

しかし、上記発酵方法は、用いられる酵母宿主株とは無関係な特定の共通の特徴を有し得る。例えば、成長限界栄養素 (通常は炭素) を発酵槽に増幅段階の間に添加して、最大限の成長を可能にし得る。さらに、発酵方法は、十分な量の炭素、窒素、基本塩、リンおよび他の微量栄養素 (ビタミン、微量無機物、および塩など) を含むように調製された発酵培地を一般的に用い得る。*Pichia* を用いた使用に適切な発酵培地の例が、参照によって本明細書に援用される、米国特許第 5,324,639 号および米国特許第 5,231,178 号に記載されている。

50

## 【 0 4 5 1 】

(バキュロウイルス感染昆虫細胞)

“昆虫宿主”または“昆虫宿主細胞”という用語は、組換えベクターまたは他のトランスファーDNAの受容物として使用し得るか、または使用されている昆虫を指す。この用語は、トランスフェクトされた元の昆虫宿主細胞の子孫を包含している。1つの親細胞の子孫が、形態において、またはゲノムDNAもしくは全DNAの補体において、偶発的な突然変異、もしくは計画的な突然変異に起因して、元の親細胞と必ずしも完全に一致していなくてもよいことは理解される。関連する性質により特徴付けられる親細胞と十分に類似する親細胞の子孫は、この定義によって意図される子孫に含まれる。ここで、関連する性質は、例えば、pSTポリペプチドをコードしているヌクレオチド配列の存在である。

10

## 【 0 4 5 2 】

pSTポリペプチドの発現に好適な昆虫細胞の選択は当業者に周知である。いくつかの昆虫種は、当該分野において十分に説明されており、例えば、市販されている*Aedes aegypti*、*Bombyx mori*、*Drosophila melanogaster*、*Spodoptera frugiperda*、および*Trichoplusia ni*が挙げられる。発現用の昆虫宿主の選択において、適切な宿主としては、特に、良好な分泌能、低いタンパク質分解活性、および総合的な強健さを有していることが示されている宿主が挙げられ得る。昆虫は、Insect Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA)、およびthe American Type Culture Collection (“ATCC”) (Manassas, VA)を含む、種々の供給源から通常に入手することができるが、これらに限定されない。

20

## 【 0 4 5 3 】

一般的に、バキュロウイルス - 感染昆虫の発現系の構成要素は、バキュロウイルスのゲノム断片、および発現される異種遺伝子の挿入に便利な制限酵素認識部位の両方を含んでいるトランスファーベクター（普通は細菌のプラスミド）；当該トランスファーベクターにおけるバキュロウイルスに特異的な断片に対して、相同な配列を有している（これによって、バキュロウイルスゲノムに対する異種遺伝子の相同組換えが可能になる）野生型バキュロウイルス；ならびに適切な昆虫宿主細胞および増殖培地を含んでいる。ベクターの構築、細胞のトランスフェクション、ブランクの選択、または培養における細胞の増殖などに用いられる材料、方法および技術は公知であり、これらの技術が記載されている手引書が利用可能である。

30

## 【 0 4 5 4 】

異種遺伝子をトランスファーベクターに挿入した後に、このベクターおよび野生型ウイルスゲノムを、ベクターとウイルスゲノムとが組換えを起こす昆虫宿主細胞にトランスフェクションする。パッケージされた組換えウイルスが発現され、組換え体のブランクが同定および精製される。バキュロウイルス / 昆虫細胞発現系にとっての材料および方法は、例えば、Invitrogen Corp (Carlsbad, CA) が提供している、キットの様式において市販されている。これらの技術は、一般的に当業者に公知であり、SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987)に十分に記載されている。なお、この文献は参照によって本明細書に援用される。また、RICHARDSON, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY: BACULOVIRUS EXPRESSION PROTOCOLS (1995); AUSUBEL ET AL., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY 16.9-16.11 (1994); KING AND POSSEE, THE BACULOVIRUS SYSTEM: A LABORATORY GUIDE (1992); および O'REILLY ET AL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS: A LABORATORY MANUAL (1992)を参照すればよい。

40

## 【 0 4 5 5 】

バキュロウイルス / 昆虫細胞発現系を用いた、種々の異種タンパク質の製造は、当業者にとって周知である。例えば、参照によって本明細書に援用される、米国特許出願第 6, 368, 825号、米国特許出願第 6, 342, 216号、米国特許出願第 6, 338, 846号、米国特許出願第 6, 261, 805号、米国特許出願第 6, 245, 528号、米国特許出願第 6, 225, 060号、米国特許出願第 6, 183, 987号、米国特許出願第 6, 168, 932号、米国特許出願第 6, 126, 944号、米国特許出願第

50

6, 096, 304号、米国特許出願第6, 013, 433号、米国特許出願第5, 965, 393号、米国特許出願第5, 939, 285号、米国特許出願第5, 891, 676号、米国特許出願第5, 871, 986号、米国特許出願第5, 861, 279号、米国特許出願第5, 858, 368号、米国特許出願第5, 843, 733号、米国特許出願第5, 762, 939号、米国特許出願第5, 753, 220号、米国特許出願第5, 605, 827号、米国特許出願第5, 583, 023号、米国特許出願第5, 571, 709号、米国特許出願第5, 516, 657号、米国特許出願第5, 290, 686号、国際公開第02/06305号、国際公開第01/90390号、国際公開第01/27301号、国際公開第01/05956号、国際公開第00/55345号、国際公開第00/20032号、国際公開第99/51721号、国際公開第99/45130号、国際公開第99/31257号、国際公開第99/10515号、国際公開第99/09193号、国際公開第97/26332号、国際公開第96/29400号、国際公開第96/25496号、国際公開第96/06161号、国際公開第95/20672号、国際公開第93/03173号、国際公開第92/16619号、国際公開第92/03628号、国際公開第92/01801号、国際公開第90/14428号、国際公開第90/10078号、国際公開第90/02566号、国際公開第90/02186号、国際公開第90/01556号、国際公開第89/01038号、国際公開第89/01037号、国際公開第88/07082号を参照すればよい。

10

#### 【0456】

バキュロウイルス/昆虫細胞の発現系に有用なベクターは、公知であり、例えば、バキュロウイルスのAutographacalifornica核多角体ウイルス(AcNPV)に由来する、ヘルパー非依存性のウイルス発現ベクターである昆虫の発現およびトランスファーベクターを包含している。この系に由来するウイルス発現ベクターは、一般的に、異種遺伝子の発現を誘導するために、ウイルスの強力なポリヘドリン遺伝子プロモータを使用する。一般的には、O'Reilly ET AL., BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS:A LABORATORY MANUAL(1992)を参照すればよい。

20

#### 【0457】

外来の遺伝子をバキュロウイルスのゲノムに挿入する前に、上記構成要素(プロモータ、リーダー(必要に応じて)、目的のコード配列、および転写終結配列を含んでいる)は、集合して中間のトランス配置コンストラクト(intermediate transplacement construct)(トランスファーベクター)を構築する。中間トランス配列コンストラクトはレプリコンにしばしば維持される。このレプリコンは、例えば、細菌などの宿主において安定な維持が可能な染色体外エレメント(例えば、プラスミド)などである。レプリコンは複製系を有しており、このため、クローニングおよび増幅に適切な宿主における当該レプリコンの維持を可能にする。より詳細には、プラスミドは、ポリヘドリンポリアデニル化シグナル(Miller et al., ANN. REV. MICROBIOL. (1988) 42:177)およびE. coliにおける選択および増殖に関する、原核生物のアンピシリン耐性(am<sup>r</sup>)遺伝子と複製開始点とを含み得る。

30

#### 【0458】

AcNPVへ外来遺伝子を導入するために一般的に使用されるトランスファーベクターの1つは、pAc373である。また、当業者に公知である他の多くのベクターが設計されており、例えば当該ベクターとしてはpVL985が挙げられる。このベクターにおいて、ポリヘドリン開始コドンがATGからATTに変えられ、ATTの下流の32塩基対にBamHIクローニング部位が導入されている(Luckow and Summers, 17 VIROLOGY 31 (1989)を参照すればよい)。市販されている他のベクターとしては、例えば、PB1ueBac4.5/V5-His、PB1ueBacHis2、pMelBac、PB1ueBac4.5(Invitrogen Corp、Carlsbad、CA)が挙げられる。

40

#### 【0459】

異種遺伝子を挿入した後に、トランスファーベクターおよび野生型バキュロウイルスのゲノムを、昆虫細胞宿主に同時トランスフェクションする。異種DNAをバキュロウイル

50

スの所望の部位に導入するための方法は公知である。SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987); Smith et al., MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156; Luckow and Summers, VIROLOGY (1989) 17:31を参照すればよい。例えば、二重交差型相同組換えによって、ポリヘドリン遺伝子などの遺伝子に挿入し得る。また、所望のバキュロウイルス遺伝子に設けられた、制限酵素認識部位に挿入してもよい。Miller et al., BIOESSAYS (1989) 4:91を参照すればよい。

#### 【 0 4 6 0 】

トランスフェクションを、エレクトロポレーションによって実現し得る。TROTTER AND WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995)、Mann and King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501を参照すればよい。代替的に、リポソームを使用して、組換え発現ベクターとバキュロウイルスとを用いて昆虫細胞をトランスフェクションし得る。例えば、Liebman et al., BIOTECHNIQUES (1999) 26(1):36、Graves et al, BIOCHEMISTRY (1998) 37:6050、Nomura et al, J. BIOL. CHEM. (1998) 273(22): 13570、Schmidt et al, PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1998) 12:323、Siffert et al, NATURE GENETICS (1998) 18:45、TILKINS et al, CELL BIOLOGY: A LABORATORY HANDBOOK 145-154 (1998)、Cai et al, PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION (1997) 10:263、Dolphin et al, NATURE GENETICS (1997) 17:491、Kost et al, GENE (1997) 190:139、Jakobsson et al, J. BIOL. CHEM. (1996) 271:22203、Rowles et al, J. BIOL. CHEM. (1996) 271(37): 22376、Reversey et al, J. BIOL. CHEM. (1996) 271(39) :23607- 10、Stanley et al, J. BIOL. CHEM. (1995) 270:4121、Sisk et al, J. VIROL. (1994) 68(2):766、およびPeng et al, BIOTECHNIQUES (1993) 14.2:274を参照すればよい。市販されているリポソームとしては、例えば、Cellfectin (登録商標)、およびLipofectin (登録商標) (Invitrogen Corp、Carlsbad、CA) が挙げられる。また、リン酸カルシウムトランスフェクションを用いてもよい。TROTTER AND WOOD, 39 METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY (1995)、Kitts, NAR (1990) 18(19):5667、およびMann and King, J. GEN. VIROL. (1989) 70:3501を参照すればよい。

10

20

#### 【 0 4 6 1 】

バキュロウイルス発現ベクターは、バキュロウイルスプロモータを一般的に含んでいる。バキュロウイルスプロモータは、バキュロウイルスのRNAポリメラーゼが結合可能であり、mRNAにおけるコード配列(例えば、構造遺伝子)の下流(3')への転写開始する任意のDNA配列である。プロモータは、コード配列の5'末端近傍に配置される転写開始領域を一般的に有している。この転写開始領域は、RNAポリメラーゼ結合部位および転写開始部位を一般的に含んでいる。また、バキュロウイルスのプロモータは、エンハンサーと呼ばれる2次ドメインを有し得る。この2次ドメインは、存在する場合、構造遺伝子から遠位に存在し得る。また、発現は、調節され得るか、または恒常的であり得る。

30

#### 【 0 4 6 2 】

感染サイクルの後期に多量に転写される構造遺伝子は、特に有用なプロモータ配列を提供する。有用なプロモータ配列の例としては、ウイルスポリヘドリンタンパク質をコードする遺伝子由来の配列(FRIESEN ET AL., The Regulation of Baculovirus Gene Expression in THE MOLECULAR BIOLOGY OF BACULOVIRUSES (1986)、欧州特許出願公開第0127839号、および欧州特許出願公開第0155476号)、およびp10タンパク質をコードする遺伝子由来の配列(Vlak et al., J. GEN. VIROL. (1988) 69:765)が挙げられる。

40

#### 【 0 4 6 3 】

新しく形成されたバキュロウイルス発現ベクターは、感染性の組換えバキュロウイルスにパッケージされる。その後、成長したプラークは当業者に公知の方法によって精製され得る。Miller et al, BIOESSAYS (1989) 4:91、SUMMERS AND SMITH, TEXAS AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION BULLETIN NO. 1555 (1987)を参照すればよい。

#### 【 0 4 6 4 】

50

組換えバキュロウイルス発現ベクターは、いくつかの昆虫細胞に感染させるために開発されている。例えば、とりわけ *Aedes aegypti* (ATCC 番号 CCL-125)、*Bombyx mori* (ATCC 番号 CRL-8910)、*Drosophila melanogaster* (ATCC 番号 1963)、*Spodoptera frugiperda* および *Trichoplusia ni* のための組換えバキュロウイルスが開発されている。Wright, NATURE (1986) 321:718、Carbonell et al, J. VIROL. (1985) 56:153、Smith et al, MOL. CELL. BIOL. (1983) 3:2156 を参照すればよい。Fraser et al, IN VITRO CELL. DEV. BIOL (1989) 25:225 を一般的に参照すればよい。より詳細には、バキュロウイルス発現ベクターの系に用いられる細胞株としては、通常、Sf9 (*Spodoptera frugiperda* (ATCC 番号 CRL-1711))、Sf21 (*Spodoptera frugiperda*) (Invitrogen Corp、カタログ番号 11497-013 (Carlsbad, CA))、Trich-368 (*Trichoplusia ni*)、および High-Five (登録商標)、BTI-TN-5B1-4 (*Trichoplusia ni*) が挙げられるが、これらに限定されない。

10

## 【0465】

バキュロウイルス / 発現における異種ポリペプチドの直接発現および融合発現の両方にとっての細胞および培地は、市販されている。また、細胞培養技術は当業者に公知である。

## 【0466】

(*E. Coli*、*Pseudomonas* 種および他の原核生物)

細菌における発現技術は当業者に周知である。種々のベクターが細菌宿主における使用に利用可能である。これらのベクターは、1コピーベクター、またはコピー数が少ない多コピー型ベクター (low multicopy vectors) もしくはコピー数が多い多コピー型ベクター (high multicopy vectors) であり得る。ベクターはクローニングおよび / または発現に役立つ。ベクターに関する豊富な文献、多くの市販のベクター、ならびにベクター、その制限酵素地図およびその特徴について記載している手引書を考慮すれば、本明細書ではこれ以上論じる必要がない。よく知られているように、ベクターは、通常は選択を可能にするマーカーを含んでいる。このマーカーは、細胞毒性剤への耐性、原栄養性、または免疫を提供し得るものである。しばしば、異なる特徴を提供する複数のマーカーが存在する。

20

## 【0467】

細菌プロモータは、細菌のRNAポリメラーゼと結合可能であり、mRNAのコード配列 (例えば、構造遺伝子) を下流 (3') に向かって転写開始できる任意のDNA配列である。プロモータは、コード配列の5'末端近傍に通常、配置される転写開始領域を有している。この転写開始領域は、RNAポリメラーゼ結合部位および転写開始部位を典型的に含んでいる。また、細菌プロモータは、オペレーターと呼ばれる2次ドメインを有し得る。この2次ドメインは、RNA合成が始まる隣接したRNAポリメラーゼ結合部位と重複し得る。遺伝子リプレッサタンパク質がオペレーターに結合することによって、特定の遺伝子の転写を阻害し得るように、オペレーターは負に調節される (誘導性の) 転写を可能にする。恒常性発現は、負の調節エレメント (オペレーターなど) が無いときに起こり得る。正の調節が、遺伝子アクチベータタンパク質の結合配列によってさらにもたらされ得る。当該結合配列は、存在する場合、通常、RNAポリメラーゼ結合配列よりも遠位 (5') に存在する。遺伝子アクチベータタンパク質としては、例えば、カタボライト活性化タンパク質 (CAP) が挙げられる。このCAPは、*Escherichia coli* (*E. coli*) の *lac* オペロンの転写開始を助ける (Raibaud et al, ANNU. REV. GENET. (1984) 18:173)。したがって、調節された発現は、正または負のいずれかであり得、これによって転写を増強または抑制させ得る。

30

40

## 【0468】

代謝経路の酵素をコードしている配列は、特に有用なプロモータ配列を提供する。このプロモータ配列としては、例えば、ガラクトース、ラクトース (*lac*) (Chang et al, NATURE (1977) 198:1056)、およびマルトースなどの糖代謝酵素に由来するプロモータ配列が挙げられる。さらなる例としては、トリプトファン (*trp*) などの生合成酵素に

50

由来するプロモータ配列が挙げられる（参照によって本明細書に援用される、Goeddel et al, Nuc. ACIDS RES. (1980) 8:4057、Yelverton et al, NUCL. ACIDS RES. (1981) 9:731、米国特許第4,738,921号、欧州公開第036776号、欧州公開第121775号）。また、*β*-ガラクトシダーゼ (*bla*) のプロモータ系 (Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." In Interferon 3 (Ed. I. Gresser))、バクテリオファージラムダの PL (Shimatake et al, NATURE (1981) 292:128)、および T5 (米国特許第4,689,406号) のプロモータ系は、有用なプロモータ配列をもたらす。本発明の好ましい方法は、pSTポリペプチドを高レベルに誘導するための T7プロモータなどの強力なプロモータを利用する。そのようなベクターの例は、当業者に周知であり、pET29のシリーズ (Novagen)、および参照によって本明細書に援用される国際公開第99/05297号に記載の pPOPベクターなどが挙げられる。そのような発現系は、宿主細胞の生存能力または増殖パラメータに支障をきたすことなく、宿主において pSTポリペプチドを高レベルに産生する。pET19 (Novagen) は他の当業者に知られているベクターである。

10

## 【0469】

また、天然に存在しない合成プロモータは、細菌プロモータとして機能する。例えば、ある細菌またはバクテリオファージのプロモータの転写活性化配列を、別の細菌またはバクテリオファージのプロモータのオペロン配列に結合して、合成混成プロモータを作製し得る（参照によって本明細書に援用される米国特許第4,551,433号）。例えば、tacプロモータは、trpプロモータ配列、および lacリプレッサによって調節される lacオペロン配列を含んでいる混成の trp-lacプロモータである (Amann et al, GENE (1983) 25:167、de Boer et al, PROC. NATL. ACAD. SCI. (1983) 80:21)。さらに、細菌プロモータは、細菌の RNAポリメラーゼとの結合能、および転写開始能を有している非細菌起源の天然に存在するプロモータを含み得る。また、非細菌起源の天然に存在するプロモータを、適合する RNAポリメラーゼに結合させることによって、原核生物においていくつかの遺伝子を高レベルに発現させ得る。バクテリオファージの T7 RNAポリメラーゼ/プロモータ系は、共役型プロモータ系の例である (Studier et al, J. MOL. BIOL. (1986) 189:113、Tabor et al, Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82:1074)。さらに、混成プロモータは、バクテリオファージプロモータ、および E. coli のオペレータ領域を含み得る (EP267851)。

20

30

## 【0470】

また、機能するプロモータ配列に加えて、効率的なリボソーム結合部位は、外来遺伝子を原核細胞において発現させるために有効である。E. coliにおいて、リボソーム結合部位は、シャイン-ダルガルノ (SD) 配列と呼ばれ、開始コドン (ATG)、および当該開始コドンから 3 ~ 11ヌクレオチド上流に位置している 3 ~ 9の長さのヌクレオチドの配列を含んでいる (Shine et al, NATURE (1975) 254:34)。SD配列は、SD配列と E. coli の 16S rRNA の 3' との間において塩基対を形成することによって、mRNA とリボソームとの結合を促進すると考えられている (Steitz et al "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA", In Biological Regulation and Development: Gene Expression (Ed. R. F. Goldberger, 1979))。真核生物の遺伝子および原核生物の遺伝子を、弱いリボソーム結合部位によって発現すること (Sambrook et al Expression of cloned genes in Escherichia coli, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989)。

40

## 【0471】

“細菌宿主”または“細菌宿主細胞”という用語は、組換えベクターまたは他のトランスファ DNA にとっての受容物として使用され得るか、または使用されている細菌のことを指す。この用語は、トランスフェクションされている元の細菌宿主細胞の子孫を包含している。1つの親細胞の子孫が、形態、ゲノム DNA または全 DNA の補体において、偶発的な突然変異、または計画的な突然変異に起因して、元の親細胞と必ずしも完全に一致していなくてもよいことは理解される。関連する性質（例えば、pSTポリペプチドを

50

コードするヌクレオチド配列の存在)により特徴付けられる親細胞と十分に類似する親細胞の子孫は、この定義によって意図される子孫に含まれる。

#### 【0472】

pSTポリペプチドの発現にとって適切な細菌宿主の選択は当業者に周知である。発現のための細菌宿主の選択において、適切な宿主としては、とりわけ良好な封入体形成能、低いタンパク質分解活性、および全体的に強健さを有していることが示されている宿主が挙げられ得る。細菌宿主は、一般的に種々の供給源から入手することができ、例えば、Bacterial Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California (Berkeley, CA)、およびthe American Type Culture Collection (“ATCC”) (Manassas, VA) から入手することができるが、これらに限定されない。K株に由来する細菌(W3110など)、またはB株に由来する細菌(BL21など)は、一般的に工業的/製薬的な発酵に用いられる。これらの株は、増殖パラメータが極めてよく知られており、強健であるから特に有用である。さらに、これらの株は非病原性であり、このことは安全性および環境的理由にとって工業的に重要である。本発明の方法の一実施形態において、E. coli宿主は、BL21株、DH10B、またはそれらの派生物である。本発明の方法の他の一実施形態において、E. coli宿主は、プロテアーゼが欠失した株(OMP-、およびLON-が挙げられるが、これらに限定されない)である。宿主細胞株はPseudomonas種(Pseudomonas fluorescens、Pseudomonas aeruginosaおよびPseudomonas putidaが挙げられるが、これらに限定されない)であり得る。MB101を改変したPseudomonas fluorescens biovar 1は組換えに有効であることが知られており、治療学的なタンパク質の生成過程に利用可能である。Pseudomonasの発現系の例としては宿主株として、The Dow Chemical Companyから入手可能な系が挙げられる(ワールドワイドウェブのdow.comにおいて利用可能なMidland, MI)。

10

20

#### 【0473】

組換え宿主細胞株が、確立される(すなわち、発現コンストラクトが、宿主細胞に導入され、適切な発現コンストラクトを有する宿主細胞が単離される)と、当該組換え宿主細胞株は、pSTポリペプチドの生成に適切な条件下において培養される。当業者にとって明らかなように、組換え宿主細胞株の培養方法は、利用される発現コンストラクトの性質、および宿主細胞の個性に依存する。組換え宿主株は、当業者に周知の方法を用いて一般的に培養される。組換え宿主細胞は、通常、炭素、窒素および無機塩の吸収可能な源を含んでおり、任意にビタミン、アミノ酸、増殖因子、および当業者にとって周知のタンパク質性の他の培養補助物を含んでいる液体培養基において一般的に培養される。また、宿主細胞を培養するための液体培養基は、所望されない微生物および/または化合物の増殖を阻害するための抗生物質、または抗真菌剤(発現ベクターを含んでいる宿主細胞を選択するための抗生物質が挙げられるが、これに限定されない)を必要に応じて含み得る。

30

#### 【0474】

組換え宿主細胞は、バッチ式もしくは連続式のいずれかにおいて、細胞の回収(pSTポリペプチドが細胞内に蓄積する場合に)、または培養上清の回収のいずれかを伴う、バッチ式または連続式において培養され得る。原核生物の宿主細胞における生成にとって、バッチ式培養および細胞収集が好ましい。

40

#### 【0475】

本発明のpSTポリペプチドは、組換え系における発現の後に、一般的に精製される。pSTポリペプチドは、当該技術分野に公知の種々の方法によって宿主細胞から精製され得る。参照によってそれらの全体が本明細書に援用される米国特許第5,849,883号および国際公開第89/10932は、b-GCSFおよびそのアナログの宿主細胞へのクローニングならびに単離および精製のための方法を説明している。細菌宿主細胞において生成されたpSTポリペプチドは、(封入体の形態において)溶解性に乏しいか、または不溶性であり得る。本発明の一実施形態において、当該技術において公知の方法だけでなく、本明細書に記載の方法を利用して、組換えによって生成されるタンパク質の溶解性の向上を目的として選択されたアミノ酸の置換は、pSTポリペプチドにおいて容易に

50

行われ得る。不溶性のタンパク質の場合、このタンパク質は、宿主細胞溶解液から遠心分離によって回収され得、それから細胞のホモジナイゼーションがさらに行われ得る。溶解性に乏しいタンパク質の場合、化合物（ポリエチレンジイミン（PEI）が挙げられるが、これに限定されない）が、部分的に可溶性のタンパク質の沈殿を引き起こすために加えられ得る。その後、沈殿したタンパク質は、遠心分離によって首尾よく回収され得る。当業者にとって周知の種々の方法により、組換え宿主細胞が破壊またはホモジナイズされて、当該細胞内から封入体が放出され得る。宿主細胞の破壊またはホモジナイゼーションは、周知の技術（酵素的な細胞の破壊、超音波処理、ダウンス型ホモジナイゼーション（*dounce homogenization*）、または高圧放出破壊が挙げられるが、これらに限定されない）を用いて実施され得る。本発明の方法の一実施形態では、高圧放出技術をE. coli宿主細胞の破壊に使用することによって、pSTポリペプチドの封入体を放出させる。pSTポリペプチドの封入体を取り扱うときに、繰返しのホモジナイゼーション時間を最小化することが好都合であり得る。これによって、可溶化、器械的なせん断またはタンパク質分解などの要因による損失を無くし、封入体の収量が最大になる。

10

20

30

40

50

#### 【0476】

それから、不溶性のpSTポリペプチドまたは沈殿したpSTポリペプチドは、当該技術にとって公知の適切な多くの可溶化試薬のいずれかを用いて可溶化され得る。pSTポリペプチドは尿素またはグアニジン塩酸塩を用いて好ましく可溶化され得る。バッチの大きさが都合よく扱いやすいものを用いて、大規模なバッチが生成され得るように、可溶化されたpSTポリペプチドの容積は最小化されるべきである。組換え宿主細胞が数千リットルの容積であるバッチにおいて増殖され得るとき、この要因は大規模な工業的設定において重要であり得る。また、特にヒトへの薬学的な使用のために大規模な工業的設定においてpSTポリペプチドを製造するとき、機械および容器、またはタンパク質産物自体のいずれかを損うおそれのある過酷な化学物質の回避は、可能であれば、避けられるべきである。過酷な変性試薬であるグアニジン塩酸塩の代わりに、穏やかな変性試薬である尿素をpSTポリペプチドの封入体の可溶化に使用し得ることが、本発明の方法に示されている。尿素の使用は、pSTポリペプチドの製造過程および精製過程に利用されるステンレス鋼の設備に対する損傷の危険度を顕著に低減すると同時に、pSTポリペプチドの封入体を効率的に可溶化する。

#### 【0477】

可溶性のpSTタンパク質の場合、pSTは、細胞周辺腔または培養培地に分泌され得る。さらに、可溶性のpSTは宿主細胞の細胞質に存在し得る。精製段階を行う前に、可溶性のpSTタンパク質を濃縮することが所望され得る。当業者に知られている標準的な技術が、例えば、細胞溶解物または培養培地から可溶性のpSTタンパク質を濃縮するために用いられ得る。さらに、宿主細胞を破碎し、宿主細胞の細胞質または細胞周辺腔から可溶性のpSTを遊離させるために、当業者に知られている標準的な技術が用いられ得る。

#### 【0478】

pSTポリペプチドが融合タンパク質として生成されるとき、融合配列は除去されることが好ましい。融合配列の除去は、酵素的切断または化学的切断によって、好ましくは酵素的切断によって実現され得る。融合配列の酵素的除去は当業者に周知の方法を用いて実現され得る。当業者にとって明らかなように、融合配列を除去するための酵素の選択は融合の個性によって決定され、反応条件は酵素の選択によって特定される。化学的切断は、当業者に公知の試薬（臭化シアン、TEVプロテアーゼ、および他の試薬が挙げられるが、これらに限定されない）によって実現され得る。切断されたpSTポリペプチドは、当業者に周知の方法によって、切断された融合配列から精製されることが好ましい。そのような方法は、当業者にとって明らかなように、融合配列およびpSTポリペプチドの個性および性質によって決定される。精製方法としては、サイズ排除クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、もしくは透析、またはこれらの任意の組合せが挙げられ得るが、これらに限定されない。

## 【0479】

また、p S Tポリペプチドは、タンパク質の溶液からDNAを除去するために、精製されることが好ましい。DNAは、当業者に公知の任意の適切な方法（例えば、沈殿またはイオン交換クロマトグラフィー）によって除去され得るが、核酸沈殿試薬（例えば硫酸プロタミンが挙げられるが、これに限定されない）を用いた沈殿によって除去することが好ましい。p S Tポリペプチドは、標準的な周知の方法（遠心分離またはろ過が挙げられるが、これらに限定されない）を用いて、沈殿されたDNAから分離され得る。p S Tポリペプチドが動物またはヒトの治療に用いられる設定、および本発明の方法が薬学的に許容可能なレベルまで宿主細胞のDNAを低下させる設定において、宿主核酸分子の除去は重要な要因である。

10

## 【0480】

また、小規模または大規模な発酵方法は、タンパク質の発現（発酵槽、振とうフラスコ、流動床バイオリアクター、中空系バイオリアクター、ローラーボトル培養系、および攪拌タンクバイオリアクター系が挙げられるが、これらに限定されない）に使用され得る。これらの方法のそれぞれは、バッチ処理、給飼バッチ処理、連続様式処理において実施され得る。

## 【0481】

本発明のp S Tポリペプチドは、当該分野における標準的な方法を用いて一般的に回収され得る。例えば、培地または細胞溶解液は、細胞破片を除去するために遠心分離またはろ過され得る。上清は、濃縮され得るか、所望の容積に希釈され得るか、またはさらなる精製のために調製物の状態を整える適切な緩衝液へ透析され得る。本発明のp S Tポリペプチドのさらなる精製としては、脱アミド化され、短縮された形態のp S Tポリペプチドバリエーションを、損なわれていない形態（intact form）のp S Tポリペプチドから分離されることが挙げられる。

20

## 【0482】

以下の例示的な手法のいずれかが、本発明のp S Tポリペプチドの精製に採用され得る。当該手法は、アフィニティークロマトグラフィー；陰イオン交換クロマトグラフィーもしくは陽イオン交換クロマトグラフィー（DEAE SEPHAROSEを用いたものが挙げられるが、これに限定されない）；シリカ上におけるクロマトグラフィー；逆相H P L C；ゲルろ過（SEPHADEX G-75を用いたものが挙げられるが、これに限定されない）；疎水性相互作用クロマトグラフィー；サイズ排除クロマトグラフィー；金属キレートクロマトグラフィー；限外ろ過/ダイアフィルトレーション；エタノール沈殿；硫酸アンモニウム沈殿；等電電気泳動（chromatofocusing）；置換クロマトグラフィー；電気泳動的な手法（分離用の等電電気泳動（preparative isoelectric focusing）が挙げられるが、これに限定されない）、差別的溶解性（differential solubility）（硫酸アンモニウム沈殿が挙げられるが、これに限定されない）、S D S - P A G Eまたは抽出である。

30

## 【0483】

本発明のタンパク質（非天然アミノ酸を含んでいるタンパク質、非天然アミノ酸を含んでいるタンパク質に対する抗体、非天然アミノ酸を含んでいるタンパク質に対する結合パートナーなどが挙げられるが、これらに限定されない）は、使用する標準的な、当業者にとって公知の手法にしたがって、部分的または実質的に均質に精製される。したがって、本発明のポリペプチドは、当業者に周知の任意の方法の多く（硫酸アンモニウム沈殿もしくはエタノール沈殿、酸抽出もしくは塩基抽出、カラムクロマトグラフィー、アフィニティークラムクロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィーもしくは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィー、およびゲル電気泳動などが挙げられるが、これらに限定されない）によって、回収および精製され得る。タンパク質をリフォールディングする工程は、正確に折りたたまれた成熟タンパク質を作製するときに、必要に応じて使用され得る。高速液体クロマトグラフィー（H P L C）、アフィニティークロマトグラフィー、または他の適切な方法は、高い純度

40

50

が所望される場合に、最終的な精製工程において採用され得る。一実施形態において、非天然アミノ酸（または非天然アミノ酸を含んでいるタンパク質）に対して作製された抗体は、1つ以上の非天然アミノ酸を含んでいるタンパク質の親和性に基づく精製などのための精製試薬として使用され得るが、これに限定されない。必要に応じて、部分的にまたは均質にまで精製されると、ポリペプチドは、種々の有用物（例えば、アッセイの構成要素、治療学、予防法、診断学、研究試薬として、および/または抗体生成用の抗原としてであるが、これらに限定されない）に関して、任意に使用される。

#### 【0484】

また、本発明のポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、ワクチンとして用いられ得る。したがって、さらなる態様において、本発明は、哺乳類における免疫学的な応答を誘発する方法に関する。当該方法は、本発明のポリペプチドによって哺乳類をワクチン接種して、適度の抗体免疫応答および/またはT細胞免疫応答（例えば、サイトカイン産生T細胞または細胞毒性T細胞が挙げられる）を引き起こすことを包含しており、それによって、個体内に疾患がすでに生じているか、生じていない当該動物を疾患から保護する。また、哺乳類における免疫学的な応答は、インビボにおけるポリヌクレオチドの発現を目的としている、ポリペプチドをコードするベクターによって、本発明のポリペプチドを送達することを包含する方法によって誘導され得る。本発明のポリペプチドの送達によって、当該免疫学的な応答を誘導して抗体を産生させ、本発明の疾患から当該動物を保護する。ベクターの投与方法の1つは、ベクターを活性化させて、粒子上の被覆物または他の形態として所望の細胞内への当該ベクターの移動を促進させることである。そのような核酸ベクターは、DNA、RNA、修飾された核酸、またはDNA/RNAハイブリッドを含み得る。ワクチンとして利用するために、ポリペプチドまたは核酸ベクターは、ワクチン製剤（組成物）として一般的に提供される。当該製剤は適切な担体をさらに含み得る。ポリペプチドは、胃において分解され得るので、非経口的に投与（例えば、皮下注入、筋肉内注入、静脈内注入、または皮内注入）され得る。非経口的な投与にとって好適な製剤は、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、および受容物である血液と等張な製剤にする溶質を含み得る水性または非水性の滅菌注射液、ならびに懸濁化剤または増粘剤を含み得る水性または非水性の滅菌懸濁液を含んでいる。また、ワクチン製剤は、製剤の免疫原性を増強するための、当業者に公知のアジュバント系を含み得る。投与量は、ワクチンの特定の活性に依存し、日常的な試験によって容易に決定され得る。

#### 【0485】

本明細書に言及されている他の参考文献に加えて、種々の精製/タンパク質フォールディング方法が、当業者に周知である（R. Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982); Deutscher, Methods in Enzymology Vol. 182: Guide to Protein Purification, Academic Press, Inc. N.Y. (1990); Sandana, (1997) Bioseparation of Proteins, Academic Press, Inc.; Bollag et al. (1996) Protein Methods, 2nd Edition Wiley-Liss, NY; Walker, (1996) The Protein Protocols Handbook Humana Press, NJ, Harris and Angal, (1990) Protein Purification Applications: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England; Harris and Angal, Protein Purification Methods: A Practical Approach IRL Press at Oxford, Oxford, England; Scopes, (1993) Protein Purification: Principles and Practice 3rd Edition Springer Verlag, NY; Janson and Ryden, (1998) Protein Purification: Principles, High Resolution Methods and Applications, Second Edition Wiley-VCH, NY; and Walker (1998), Protein Protocols on CD-ROM Humana Press, NJならびにこれらに引用されている参考文献に記載されている方法が挙げられるが、これらに限定されない）。

#### 【0486】

真核生物の宿主細胞または非真核生物の宿主細胞において、非天然アミノ酸を用いて目的のタンパク質またはポリペプチドを生成することの1つの利点は、通常、当該タンパク質またはポリペプチドが、それらの本来の立体構造に折りたたまれることである。しかし、本発明のある実施形態において、当業者は、合成、発現および/または精製の後に、タ

10

20

30

40

50

ンパク質が、関連するポリペプチドの所望の立体構造とは異なる立体構造を有し得ることを認識している。本発明の1つの局面において、発現されたタンパク質は、任意に変性され、それから還元される。これは、当該分野に公知の方法を利用して（目的のタンパク質またはポリペプチドに対するシャペロニンの添加によってか、カオトロピック剤（例えば、グアニジンHCl）にタンパク質を可溶化することによってか、またはプロテインジスルフィドイソメラーゼを用いてなどが挙げられるが、これらに限定されない）なされ得る。

#### 【0487】

一般的に、発現したポリペプチドを変性または還元して、その後当該ポリペプチドを好ましい立体構造へとリフォールディングさせることが望ましいことがある。例えば、グアニジン、尿素、DTT、DTEおよび/またはシャペロニンは、目的の翻訳産物に加えられ得る。タンパク質の還元、変性および復元の方法は、当業者に周知である（上記参考文献、Debinski, et al, (1993) J. Biol. Chem., 268: 14065- 14070)、Kreitman and Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585、およびBuchner, et al, (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270を参照すればよい）。Debinski, et alには、例えばグアニジン - DTEにおける封入体タンパク質の変性および還元が記載されている。タンパク質は、レッドックス緩衝剤（これらに限定されないが、酸化型グルタチオンおよびL-アルギニンなどを含む）においてリフォールディングされ得る。リフォールディング剤は、流されるか、またはそうでなければ、移動されて、1つ以上のポリペプチドもしくは他の発現産物と接触させられ得る。また、その逆もあり得る。

10

20

#### 【0488】

pSTポリペプチドを原核生物において生成させる場合、そのように生成されるpSTポリペプチドは、誤って折りたたまれることがある。このため、ポリペプチドの生物活性が欠失または低下していることがあり得る。タンパク質の生物活性は“リフォールディング”によって回復され得る。一般に、誤って折りたたまれたpSTポリペプチドは、例えば、1つ以上のカオトロピック剤（例えば、尿素および/またはグアニジン）およびジスルフィド結合を還元可能な還元剤（例えば、ジチオスレイトール（DTT）、または2メルカプトエタノール（2-ME））を用いて、（pSTポリペプチドも不溶性である場合に）ポリペプチド鎖を可溶化し、アンフォールディングし、そして還元することによってリフォールディングされ得る。それから、穏やかな濃度のカオトロップにおいて、ジスルフィド結合の再形成を可能にする酸化剤（例えば、酸素、シスチンまたはシスタミン）が添加される。pSTポリペプチドは、当該分野に公知の標準的な方法（例えば、米国特許第4,511,502号、米国特許第4,511,503号、および米国特許第4,512,922号に記載の方法）を用いてリフォールディングされ得る。また、pSTポリペプチドは、他のタンパク質とコフォールディングされて、ヘテロ二量体またはヘテロ多量体を形成し得る。

30

#### 【0489】

リフォールディングの後にpSTはさらに精製され得る。pSTの精製は、当業者に知られている種々の技術（疎水性相互作用クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆相高速液体クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、およびそれらの組合せが挙げられる）を用いて実現され得る。また、さらなる精製は、精製されたタンパク質の乾燥工程または沈降工程を含み得る。

40

#### 【0490】

精製後、pSTは、当該技術分野に公知の種々の方法（ダイアフィルトレーションおよび透析が挙げられるが、これらに限定されない）のいずれかによって、種々の緩衝液に交換され得るか、および/または濃縮され得る。単一の精製タンパク質として提供されるpSTは、凝集および沈降され得る。

#### 【0491】

精製されたpSTは、少なくとも90%の純度（逆相高速液体クロマトグラフィー、RP-HPLC、またはドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動、SDS

50

- P A G Eによって測定される場合)、少なくとも95%の純度、少なくとも98%の純度、少なくとも99%の純度、またはそれ以上の純度であり得る。p S Tの純度の正確な数値に関わらず、p S Tは、医薬品としての用途またはさらなる処理(水溶性重合体(P E Gなど)との結合など)にとって十分に純粋である。

【0492】

あるp S T分子は、他の活性な成分またはタンパク質(賦形剤、担体および安定剤以外のもの、血清アルブミンなど)の非存在下において、治療剤として使用され得るか、または他のタンパク質もしくは重合体と複合化され得る。

【0493】

(一般的な精製方法)

種々の単離工程のいずれか1つが、p S Tポリペプチドを含んでいる細胞溶解物、または任意の単離工程から生じた任意のp S Tポリペプチドの混合物に対して実施され得る。このような単離工程としては、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー(“H P L C”)、逆相H P L C(“P R - H P L C”)、発泡床吸着(expanded bed adsorption)、あるいはそれらの任意の組合せおよび/または繰り返し、ならびに任意の適切な順序でのそれらの任意の組合せおよび/または繰り返しが行われるが、これらに限定されない。

10

【0494】

本明細書に記載の技術の実施に使用される設備、および他の必要な材料は、市販されている。ポンプ、フラクションコレクター、モニター、記録器、および全体のシステムは、例えば、Applied Biosystems(Foster City, CA)、BioRad Laboratories, Inc.(Hercules, CA)、およびAmersham Biosciences Inc.(Piscataway, NJ)から入手し得る。また、クロマトグラフィーの材料(交換基質材料、溶剤および緩衝液が挙げられるが、これらに限定されない)は、そのような企業から入手可能である。

20

【0495】

本明細書に記載のカラムクロマトグラフィー手法における平衡および他の工程(例えば洗浄および溶出)は、特殊な設備(例えばポンプ)を用いてより迅速に実施され得る。市販のポンプとしては、HILOAD(登録商標) Pump P-50、Peristaltic Pump、ポンプP-901、およびポンプP-903(Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ)が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0496】

フラクションコレクターの例としては、REDIFRACフラクションコレクター、F R A C - 100およびF R A C - 200フラクションコレクター、ならびにSUPERFRAC(登録商標)フラクションコレクター(Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ)が挙げられるが、これらに限定されない。また、混合器は、p H勾配および直線的な濃度勾配の形成に利用可能である。市販の混合器としては、グラジエントミキサー(Gradient Mixer) G M - 1およびイン-ラインミキサーズ(In-Line Mixers)(Amersham Biosciences Inc., Piscataway, NJ)が挙げられる。

40

【0497】

クロマトグラフィー過程は、任意の市販のモニターを用いて観察され得る。そのようなモニターは、U V、p Hおよび導電率のような情報の収集に使用され得る。検出器の例としては、Monitor UV-1、UVICORD(登録商標) S I I、Monitor UV-II、Monitor UV-900、Monitor UPC-900、Monitor pH/C-900、およびコンダクティビティモニター(Conductivity Monitor)(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)が挙げられる。実際に、全体のシステムは、市販されている(例えば、Amersham Biosciences Inc.(Piscataway, NJ))から提供されているAKTA(登録商標)システムズが挙げられる。

【0498】

本発明の一実施形態において、例えば、p S Tポリペプチドは、得られた精製されたp S Tポリペプチドを、尿素を用いてまず変性によって還元し、変性して、続いて適切なp

50

Hにおいて還元剤（例えばDTT）を含んでいる緩衝液に希釈され得る。他の実施形態において、pSTポリペプチドは、約2M～約9Mの濃度の尿素によって変性され、続いて約5.0～約8.0のpHのTRIS緩衝液に希釈される。それから、この実施形態のリフォールディング混合物はインキュベートされ得る。一実施形態において、リフォールディング混合物は、室温において4～24時間にわたってインキュベートされる。還元されかつ変性されたpSTポリペプチド混合物は、それからさらに単離され得るか、または精製され得る。

#### 【0499】

本明細書に述べられているように、第1のpSTポリペプチド混合物のpHは、その後の任意の単離工程を実施する前に調整され得る。また、第1のpSTポリペプチド混合物、またはその後生じた任意の混合物は、当該分野に公知の技術を用いて濃縮され得る。さらに、第1のpSTポリペプチド混合物、またはその後生じた任意の混合物のいずれかを含む溶出緩衝液は、当業者に周知の技術を用いて、次の単離工程に好適な緩衝液に交換され得る。

10

#### 【0500】

（イオン交換クロマトグラフィー）

一実施形態において、イオン交換クロマトグラフィーは、さらなる工程として必要に応じて、第1のpSTポリペプチド混合物に対して実施され得る。一般的に、ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY: PRINCIPLES AND METHODS（カタログ番号18-1114-21、Amersham Biosciences Inc.（Piscataway, NJ））を参照すればよい。市販のイオン交換カラムとしては、HITRAP（登録商標）カラム、HIPREP（登録商標）カラム、およびHILOAD（登録商標）カラム（Amersham Biosciences Inc.、Piscataway, NJ）が挙げられる。そのようなカラムは、強い陰イオン交換体（例えば、Q SEPHAROSE（登録商標）Fast Flow）、Q SEPHAROSE（登録商標）High Performance、およびQ SEPHAROSE（登録商標）XL）；強い陽イオン交換体（例えば、SP SEPHAROSE（登録商標）High Performance、SP SEPHAROSE（登録商標）Fast Flow、およびSP SEPHAROSE（登録商標）XL）；弱い陰イオン交換体（例えば、DEAE SEPHAROSE（登録商標）Fast Flow）；および弱い陽イオン交換体（例えば、CM SEPHAROSE（登録商標）Fast Flow）（Amersham Biosciences Inc.、Piscataway, NJ）を利用している。陰イオンまたは陽イオン交換カラムクロマトグラフィーは、実質的に精製されたpSTポリペプチドを単離するために、精製過程の任意の工程において、pSTポリペプチドに対して実施され得る。陽イオン交換クロマトグラフィー工程は、任意の適切な陽イオン交換基質を用いて実施され得る。有用な陽イオン交換基質としては、繊維状の陽イオン交換基質材料、多孔質の陽イオン交換基質材料、非多孔質の陽イオン交換基質材料、微粒子状の陽イオン交換基質材料、ビーズ状の陽イオン交換基質材料、または架橋された陽イオン交換基質材料が挙げられるが、これらに限定されない。このような陽イオン交換基質材料としては、セルロース、アガロース、デキストラン、ポリアクリレート、ポリビニル、ポリスチレン、シリカ、ポリエーテル、または上述のものの何れかの混合材料が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

#### 【0501】

陽イオン交換基質は、適切な任意の陽イオン交換体（強い陽イオン交換体および弱い陽イオン交換体が挙げられる）であり得る。強い陽イオン交換体は、広範囲のpHにわたってイオン化状態を維持し得、したがって、広範囲のpHにわたってpSTと結合し得る。しかし、弱い陽イオン交換体はpHに応じてイオン化状態を消失し得る。例えば、弱い陽イオン交換体は、pHは約4または5をしたまわって低下すると、電荷を消失し得る。好適な強い陽イオン交換体としては、荷電した官能基（スルホニル（SP）、メチルスルホン酸（S）、またはスルホエチル（SE）など）が挙げられるが、これらに限定されない。陽イオン交換基質は、強い陽イオン交換体（好ましくは、約2.5から約6.0pH範囲におけるpST結合を示す）であり得る。代替的に、強い陽イオン交換体は、約2.5から約5.5のpH範囲においてpST結合を示し得る。陽イオン交換基質は、約3.0のpHにおいてpST結合を示す強い陽イオン交換体であり得る。代替的に、陽イオン交

40

50

換基質は、強い陽イオン交換体（好ましくは、約 6.0 から約 8.0 の pH 範囲において p S T 結合を示す）であり得る。陽イオン交換基質は、好ましくは、約 8.0 から約 12.5 の pH 範囲において p S T 結合を示す強い陽イオン交換体であり得る。代替的に、強い陽イオン交換体は、約 8.0 から約 12.0 の pH 範囲において p S T 結合を示し得る。

#### 【0502】

p S T を充填する前に、例えばカラム容積の数倍量の希弱酸（例えば、カラム体積の 4 倍量の 20 mM の酢酸（pH 3））を用いて、陽イオン交換基質が平衡化され得る。平衡化に続いて p S T は、加えられ得、十分に精製された p S T の溶出前に、同様に弱酸溶液（弱酢酸または弱リン酸の溶液など）を用いてカラムが 1 回から数回にわたって洗浄され得る。例えば、カラム容積の約 2 ~ 4 倍量の 20 mM の酢酸（pH 3）を用いてカラムが洗浄され得る。また、例えば、カラム容積の約 2 ~ 4 倍量の 0.05 M の酢酸ナトリウム（pH 5.5）、または 0.1 M の塩化ナトリウムと混合した 0.05 M（pH 5.5）を用いて、さらに洗浄し得る。代替的に、当該分野に公知の方法を用いて、陽イオン交換基質がカラム体積の数倍量の希弱塩基によって平衡化され得る。

10

#### 【0503】

代替的に、十分に精製した p S T は、十分に低い pH またはイオン強度を有する緩衝液と陽イオン交換基質を接触させることによって溶出されて、当該基質から p S T を除去し得る。溶出緩衝液の pH は約 2.5 から約 6.0 の範囲であり得る。より詳細には、溶出緩衝液の pH は、約 2.5 から約 5.5 の pH、約 2.5 から約 5.0 の pH の範囲であり得る。溶出緩衝液は約 3.0 の pH であり得る。さらに、溶出緩衝液の量は、広範に変更され得、通常、カラム体積の約 2 ~ 約 10 倍量の範囲である。

20

#### 【0504】

陽イオン交換基質への p S T ポリペプチドの吸着に続いて、十分に精製した p S T ポリペプチドは、十分に低い pH またはイオン強度を有する緩衝液と当該基質を接触させることによって溶出されて、基質から p S T ポリペプチドを除去し得る。十分に精製された p S T ポリペプチドの高 pH の溶出に使用するために好適な緩衝液としては、少なくとも約 5 mM から少なくとも約 100 mM の濃度範囲にあるクエン酸塩、リン酸塩、蟻酸塩、酢酸塩、H E P E S、および M E S 緩衝液が挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【0505】

（逆相クロマトグラフィー）

R P - H P L C は、当業者に公知の適切なプロトコールにしたがって、タンパク質を精製するために実施され得る。例えば、Pearson et al, ANAL BIOCHEM. (1982) 124:217-230 (1982)、Rivier et al, J. CHROM. (1983) 268:112-119、Kunitani et al, J. CHROM. (1986) 359:391-402 を参照すればよい。R P - H P L C を p S T ポリペプチドに対して実施して、実質的に精製された p S T ポリペプチドを単離し得る。この点に関して、種々の長さ（少なくとも C<sub>3</sub> ~ 少なくとも C<sub>30</sub>、少なくとも C<sub>3</sub> ~ 少なくとも C<sub>20</sub>、または少なくとも C<sub>3</sub> ~ 少なくとも C<sub>18</sub> の長さが挙げられるが、これらに限定されない）を有しているアルキル官能基を用いた、シリカ誘導体化樹脂が使用され得る。代替的に、重合体化樹脂が使用され得る。例えば、スチレン重合体樹脂である TosoHaas Amberchrome C G 1000 s d 樹脂が使用され得る。また、種々の長さのアルキル鎖を有するシアノ樹脂または重合体樹脂が使用され得る。さらに、R P - H P L C カラムは、溶媒（例えばエタノール）を用いて洗浄され得る。Source R P カラムは、R P - H P L C カラムの他の例である。

40

#### 【0506】

イオン対を形成する剤および有機修飾物質（例えば、メタノール、イソプロパノール、テトラヒドロフラン、アセトニトリル、またはエタノール）を含んでいる適切な溶出緩衝液が、p S T ポリペプチドを R P - H P L C カラムから溶出するために使用され得る。最も一般的に使用されるイオン対を形成する剤としては、酢酸、蟻酸、過塩素酸、リン酸、トリフルオロ酢酸、ヘプタフルオロブチル酸、トリエチルアミン、テトラメチルアンモニ

50

ウム、テトラブチルアンモニウム、酢酸トリエチルアンモニウムが挙げられるが、これらに限定されない。溶出は、分離時間の短縮、およびピーク幅の縮小に好ましい勾配条件を有している、1つ以上の勾配条件または定組成条件 (isocratic condition) を用いて実施され得る。他の方法は、異なる溶媒濃度範囲を有する2つの勾配を使用することを包含している。本明細書における使用に適した溶出緩衝液の例としては、酢酸アンモニウム溶液およびアセトニトリル溶液が挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0507】

(疎水性相互作用クロマトグラフィー精製技術)

疎水性相互作用クロマトグラフィー (HIC) が、pSTポリペプチドに対して実施され得る。参照によって本明細書に援用されるHYDROPHOBIC INTERACTION CHROMATOGRAPHY HANDBOOK: PRINCIPLES AND METHODS (カタログ番号18-1020-90、Amersham Biosciences Inc. (Piscataway, NJ)) を、一般的に参照すればよい。適切なHIC基質としては、アルキルによって置換された基質もしくはアリアルによって置換された基質 (例えば、ブチルによって置換された基質、ヘキシルによって置換された基質、オクチルによって置換された基質、またはフェニルによって置換された基質 (アガロース基質、架橋されたアガロース基質、セファロース基質、セルロース基質、シリカ基質、デキストラン基質、ポリスチレン基質、ポリ(メタクリレート)基質が挙げられる))、および混合された形式の基質 (ポリエチレンアミン樹脂基質、またはブチルもしくはフェニルで置換されたポリ(メタクリレート)基質が挙げられるが、これらに限定されない) が挙げられるが、これらに限定されない。疎水性相互作用クロマトグラフィーに関する市販の原料としては、HITRAP (登録商標) カラム、HIPREP (登録商標) カラム、およびHILOAD (登録商標) カラム (Amersham Biosciences Inc.、Piscataway, NJ) が挙げられるが、これらに限定されない。

10

20

30

#### 【0508】

簡単に説明すると、装填の前に、HICカラムは、当業者に公知の標準的な緩衝液 (例えば、酢酸溶液 / 塩化ナトリウム溶液、または硫酸アンモニウムを含んでいるHEPES) を用いて、平衡化され得る。それから、pSTポリペプチドを装填した後に、カラムは、不要な物質を取り除くための標準的な緩衝液と条件とを用いて洗浄され得るが、pSTポリペプチドはHICカラムに保持されている。pSTポリペプチドは、カラム容積の約3倍~約10倍の標準的な緩衝液 (例えば、とりわけ、EDTAと平衡化緩衝液よりも低濃度の硫酸アンモニウムとを含んでいるHEPES緩衝液、または酢酸 / 塩化ナトリウム緩衝液) を用いて溶出され得る。また、例えば、リン酸カルシウムの勾配を有している塩が減少する直線勾配を用いて、pST分子を溶出し得る。それから、この溶出物は、例えば、ダイアフィルトレーション、または限外ろ過といったろ過によって濃縮され得る。ダイアフィルトレーションは、pSTポリペプチドの溶出に使用される塩を除くために利用され得る。

#### 【0509】

(他の精製技術)

例えば、ゲルろ過 (参照によって本明細書に援用されるGEL FILTRATION: PRINCIPLES AND METHODS (カタログ番号18-1022-18、アマシャムバイオサイエンス (ピスカタウェイ、NJ))、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィー (好適な基質としての、HA-ウルトロゲル、高解像度 (カルパイオケム)、CHTセラミックハイドロキシアパタイト (バイオレッド)、バイオ-ゲルHTPハイドロキシアパタイト (バイオレッド))、HPLC、発泡床吸着、限外ろ過、ダイアフィルトレーション、および凍結乾燥などを用いたさらなる他の単離工程を、第1のpSTポリペプチド混合物または当該ポリペプチド混合物の後に生じた任意の混合物に対して行い、任意の過剰な塩を除去したり、緩衝液を、次の単離工程または最終的な製剤の処方さえも好適な緩衝液と交換したりし得る。

40

#### 【0510】

pSTポリペプチド (実質的に精製されたpSTポリペプチドを含んでいる) の収率は

50

、本明細書に記載の各工程において、当業者に公知の技術を用いてモニターされ得る。また、そのような技術は、最後の単離工程の後に、実質的に精製されたp S Tポリペプチドの収率を評価するために使用され得る。例えば、p S Tポリペプチドの収率は、陽イオン交換クロマトグラフィーおよびゲルろ過だけでなく、種々のアルキル鎖長を有するいくつかの逆相高圧液体クロマトグラフィーのいずれか（例えば、シアノPR - H P L C、C<sub>18</sub> RP - H P L C；同様に、陽イオン交換H P L Cおよびゲルろ過H P L C）を用いて、モニターされ得る。

#### 【0511】

本発明の特定の実施形態において、各精製工程後のp S Tの収率は、各精製工程のため  
の出発材料に含まれるp S Tの少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも4  
0%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約6  
0%、少なくとも約65%、少なくとも約70%、少なくとも約75%、少なくとも約8  
0%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約91%、少なくとも約9  
2%、少なくとも約93%、少なくとも約94%、少なくとも約95%、少なくとも約9  
6%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、少なくとも約9  
9.9%、または少なくとも約99.99%であり得る。

10

#### 【0512】

精製は、標準的な技術（例えば、SDS - PAGE）を用いることによってか、または  
ウエスタンブロットおよびELISAアッセイを用いてp S Tポリペプチドを測定するこ  
とによって、決定され得る。例えば、ポリクローナル抗体は、ネガティブコントロールの  
酵母を発酵させ、陽イオン交換による回収によって単離されたタンパク質に対して生成さ  
れ得る。また、抗体は宿主細胞のタンパク質の夾雑物の存在を探索するために使用され得  
る。

20

#### 【0513】

PR - H P L C材料であるVydac C4 (Vydac) は、シリカゲル粒子からなり、シリカゲ  
ル粒子の表面にC4 - アルキル鎖が保持されている。タンパク質性の不純物からのp S T  
ポリペプチドの分離は、疎水性相互作用の強度の差に基づく。アセトニトリル勾配の希釈  
されたトリフルオロ酢酸を用いて、溶出を行う。ステンレス鋼カラム（2.8 ~ 3.2リ  
ットルのVydac C4シリカゲルが充填されている）を用いて、調製用H P L Cを行う。ヒド  
ロキシアパタイトウルトロゲルの溶出物を、トリフルオロ酢酸を加えることによって酸性  
化し、そして、Vydac C4カラム上に添加する。洗浄および溶出のために、アセトニトリル  
勾配の希釈されたトリフルオロ酢酸を使用する。画分を収集し、ただちにリン酸緩衝液を  
用いて中性化する。I P C限界内にあるp S Tポリペプチドの画分をプールの。

30

#### 【0514】

DEAE Sepharose (Pharmacia) 材料は、セファロースビーズの表面と共有結合されるジ  
エチルアミノエチル (DEAE) 基からなる。DEAE基に対するp S Tポリペプチドの  
結合はイオン性相互作用によって媒介される。アセトニトリルおよびトリフルオロ酢酸は  
、保持されることなくカラムを通過する。これらの物質が洗い流された後に、低p Hの酢  
酸緩衝液を用いてカラムを洗浄することによって微量の不純物を除去する。それから、カ  
ラムを中性のリン酸緩衝液を用いて洗浄する。そして、イオン強度が増加した緩衝液を用  
いてp S Tポリペプチドを溶出する。カラムに、デアエセファロスファストフローを充  
填する。3 ~ 10 mgのp S Tポリペプチド / 1 mlのゲルの範囲において、p S Tポリ  
ペプチドを添加することを保障するように、カラム容積を調整する。水および平衡化緩衝  
液（リン酸ナトリウム / カリウム）を用いてカラムを洗浄する。H P L C溶出物のプールの  
された画分を添加し、平衡化緩衝液を用いてカラムを洗浄する。それから、洗浄緩衝液（  
酢酸ナトリウム緩衝液）を用いてカラムを洗浄し、その後、平衡化緩衝液を用いてカラム  
を洗浄する。続いて、溶出緩衝液（塩化ナトリウム、リン酸ナトリウム / カリウム）を用  
いてp S Tポリペプチドを、カラムから溶出し、基本の溶出プロファイルにしたがって、  
単一の画分に収集する。デアエセファロスカラムの溶出物を、特定の伝導性に調整する  
。結果として生じる製剤原料を、Teflon（登録商標）ボトルの中に無ろ過し、-70℃に

40

50

おいて保存する。

【0515】

使用され得るさらなる方法としては、エンドトキシンを除去する工程が挙げられるが、これに限定されない。エンドトキシンは、グラム陰性の宿主細胞（例えば、大腸菌など）の外膜に位置しているリポ多糖（LPS）である。エンドトキシンの値を低下させる方法は当業者に公知であり、シリカ担体、ガラス粉末またはハイドロキシアパタイトを用いた精製技術、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、およびこれらの方法の組合せが挙げられるが、これらに限定されない。改良された方法または追加の方法が、関連のあるポリペプチドからの共遊走性タンパク質などの混入物を除去するために必要とされ得る。エンドトキシンの値を測定する方法は当業者に公知であり、当該方法としてはカプトガニアメーバ様細胞溶解液（LAL）アッセイが挙げられるが、これに限定されない。Endosafe（登録商標）-PTSアッセイは、比色分析すなわち、携帯用分光光度計と共に、LAL試薬、発色基質、および標準物質であるエンドトキシンのコントロールがあらかじめ充填されたカートリッジを利用する単一のチューブシステムである。代替的な方法は比濁法であり、当該方法としては96ウェルの形式を用いる動態LAL法が挙げられるが、これに限定されない。

10

【0516】

種々の方法および手法が、天然にコードされていない1つ以上のアミノ酸を含んでいるpSTタンパク質の収率および純度を評価するために使用され得る。このような方法および手法としては、ブラッドフォードアッセイ、SDS-PAGE、銀染色したSDS-PAGE、クーマシーブルー染色したSDS-PAGE、質量分析（MALDI-TOFが挙げられるが、これらに限定されない）、および当業者に公知のタンパク質の性質を決定するための他の方法が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0517】

さらなる方法としては、タンパク質染色法と組み合わせたSDS-PAGE、免疫ブロッキング、マトリックス支援レーザー脱離/イオン化質量分析（MALDI-MS）、液体クロマトグラフィー/質量分析、等電点電気泳動、分析的イオン交換、等電点電気泳動、および円偏光二色性が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0518】

VIII. 代替系における発現

種々の方策が、非組換え宿主細胞、変異された宿主細胞または無細胞の系においてタンパク質に非天然アミノ酸を導入するために使用されている。また、これらの系は本発明のpSTポリペプチドの作製における使用に好適である。反応性の側鎖（例えば、Lys、CysおよびTyr）を有するアミノ酸を誘導体化することによって、リジンをN<sup>2</sup>-アセチル-リジンに転換させる。また、化学合成は非天然アミノ酸を組み込むための簡便な方法を提供する。ペプチドの断片の酵素的ライゲーションおよびネイティブな化学的ライゲーションの近年の発展に伴って、巨大タンパク質の作製が可能である。例えば、P. E. Dawson and S. B. H. Kent, *Annu. Rev. Biochem.*, 69:923 (2000)を参照すればよい。酵素的ライゲーションおよびネイティブな化学的ライゲーションは、参照によって本明細書に援用される、米国特許第6,184,344号、米国特許出願公開第2004/0138412号、米国特許出願公開2003/0208046号、国際公開第02/098902号、国際公開第03/042235号に説明されている。所望の非天然アミノ酸によって化学的にアシル化されたサブレッサtRNAが、タンパク質生合成を支持し得るインビトロ抽出物に添加される、通常のインビトロ生合成方法は、実質的に任意の大きさを有する種々のタンパク質に100を超える非天然アミノ酸を部位特異的に組み込むために、使用されている。例えば、V. W. Cornish, D. Mendel and P. G. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1995, 34:621 (1995); C.J. Noren, S.J. Anthony-Cahill, M.C. Griffith, P.G. Schultz, A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science* 244:182-188 (1989);およびJ.D. Bain, C.G. Gl

40

50

abe, T.A. Dix, A.R. Chamberlin, E.S. Diala, Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am. Chem. Soc.* 111:8013-8014 (1989)を参照すればよい。広範な官能基が、タンパク質の安定性、タンパク質のフォールディング、酵素機序およびシグナル伝達を研究するために、タンパク質に組み込まれている。

#### 【0519】

選択圧 (selective pressure) 組込みと呼ばれるインビボの方法が、野生型合成酵素のランダムさを活用するために開発された。例えば、N. Budisa, C. Minks, S. Alefelder, W. Wenger, F. M. Dong, L. Moroder and R. Huber, *FASEB J.*, 13:41 (1999)を参照すればよい。特定の天然アミノ酸を細胞に供給する関連代謝経路が断たれている栄養要求株は、制限された濃度の天然アミノ酸を含有している最小培地において増殖する一方で、標的遺伝子の転写が抑制されている。増殖の定常期に入ると、天然アミノ酸が枯渇して、非天然アミノ酸類似物と置き換えられる。組換えタンパク質の発現の誘導は、非天然の類似物を含んでいるタンパク質の蓄積を生じる。例えば、この方策を用いて、*o*、*m*および *p*-フルオロフェニルアラニンは、タンパク質に組み込まれ、容易に同定され得るUVスペクトルにおける2つの特徴的な肩を示し(例えば、C. Minks, R. Huber, L. Moroder and N. Budisa, *Anal. Biochem.*, 284:29 (2000)を参照すればよい); トリフルオロメチオニンが、 $^{19}\text{F}$  NMRによってチトオリゴ糖のリガンドとの相互作用を研究するために、バクテリオファージのT4ライソザイム内のメチオニンを置換するために使用されており(例えば、H. Duewel, E. Daub, V. Robinson and J. F. Honek, *Biochemistry*, 36:3404 (1997)を参照すればよい); トリフルオロロイシンがロイシンの代わりに組み込まれて、ロイシンジッパータンパク質の増強された熱的および化学的な安定性をもたらしている。例えば、Y. Tang, G. Ghirlanda, W. A. Petka, T. Nakajima, W. F. DeGrado and D. A. Tirrell, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 40:1494 (2001)を参照すればよい。さらに、セレノメチオニンおよびテルルメチオニンが、種々の組換えタンパク質に組み込まれて、X線結晶解析における位相の解像を容易にしている。例えば、W. A. Hendrickson, J. R. Horton and D. M. Lemaster, *EMBO J.*, 9:1665 (1990); J. O. Boles, K. Lewinski, M. Kunkle, J. D. Odom, B. Dunlap, L. Lebioda and M. Hatada, *Nat. Struct. Biol.*, 1:283 (1994); N. Budisa, B. Steipe, P. Demange, C. Eckerskorn, J. Kellermann and R. Huber, *Eur. J. Biochem.*, 230:788 (1995); およびN. Budisa, W. Karnbrock, S. Steinbacher, A. Humm, L. Prade, T. Neufeind, L. Moroder and R. Huber, *J. Mol. Biol.*, 270:616 (1997)を参照すればよい。また、アルケンまたはアルキンの官能基を有しているメチオニン類似物が効率的に組み込まれて、化学的手段によるタンパク質のさらなる修飾を可能にしている。例えば、参照によって本明細書に援用される、J. C. M. van Hest and D. A. Tirrell, *FEBS Lett.*, 428:68 (1998); J. C. M. van Hest, K. L. Kiick and D. A. Tirrell, *J. Am. Chem. Soc.*, 122:1282 (2000); およびK. L. Kiick and D. A. Tirrell, *Tetrahedron*, 56:9487 (2000); 米国特許第6,586,207号; 米国特許出願公開第2002/0042097号を参照すればよい。

#### 【0520】

この方法の成功は、タンパク質翻訳の忠実度を保証するために高い選択性を一般的に必要とする、アミノアシルtRNAによる非天然アミノ酸類似物の認識に依存する。この方法の有効範囲を拡張するための1つの方法は、アミノアシルtRNAの基質特異性を緩和することであるが、この緩和は限られた事例にしか実現されていない。例えば、*Escherichia coli*のフェニルアラニル合成酵素(Ph e R S)内のAla<sup>294</sup>のGlyによる置換は、基質結合ポケットの大きさを増加させ、*p*-Cl-フェニルアラニン(*p*-Cl-Ph e)によってtRNA Ph eがアシル化されることをもたらす。M. Ibba, P. Kast and H. Hennecke, *Biochemistry*, 33:7107 (1994)を参照すればよい。この変異Ph e R Sを内部に有している*Escherichia coli*株は、フェニルアラニンの代わりに、*p*-Cl-フェニルアラニンまたは*p*-Br-フェニルアラニンの組込みを可能にする。例えば、M. Ibba and H. Hennecke, *FEBS Lett.*, 364:272 (1995); およびN. Sharma, R. Furter, P.

10

20

30

40

50

Kast and D. A. Tirrell, FEBS Lett., 467:37 (2000)を参照すればよい。同様に、Escherichia coliのチロシル-tRNA合成酵素のアミノ酸結合部位の近傍の点変異 P h e 1 3 0 S e r によって、アザチロシンがチロシンよりも効率的に組み込まれることが可能になることが、示されている。F. Hamano-Takaku, T. Iwama, S. Saito-Yano, K. Takaku, Y. Monden, M. Kitabatake, D. Soll and S. Nishimura, J. Biol. Chem., 275:40324 (2000)を参照すればよい。

#### 【 0 5 2 1 】

インビボにおいて非天然アミノ酸をタンパク質に組み込む他の方策は、校正機序を有している合成酵素を修飾することである。これらの合成酵素は、同種の天然アミノ酸と構造的に類似するアミノ酸を区別できず、それゆえ当該類似するアミノ酸を活性化する。この誤りは別の部位において訂正されて、誤ってチャージしたアミノ酸をtRNAから脱アシル化し、タンパク質翻訳の正確さを維持する。合成酵素の校正活性が無効にされると、誤って活性化される構造的類似物が、編集機能を免れて組み込まれることがある。この方法は、近年、バリン-tRNA合成酵素(Va1RS)を用いて証明されている。V. Dorin g, H. D. Mootz, L. A. Nangle, T. L. Hendrickson, V. de Crecy-Lagard, P. Schimmel and P. Marliere, Science, 292:501 (2001)を参照すればよい。Va1RSは、C y s、T h r、アミノブチレート(A b u)によってtRNA Va1を誤ってアシル化でき；その後これら非同種のアミノ酸が編集ドメインによって加水分解される。Escherichia coliの染色体のランダム変異生成の後に、Va1RSの編集部位に変異を有している変異体Escherichia coli株が選択された。この編集を欠損したVa1RSは、C y sを用いてtRNA Va1を不正確にチャージする。また、A b uがC y sと立体的に類似している(C y sの-S H基がA b uにおいて-C H 3に置換されている)ので、変異体Va1RSは、この変異体Escherichia coli株がA b uの存在下において増殖されると、タンパク質にA b uを組み込む。質量分析に基づく解析は、本来のタンパク質におけるバリンの位置のそれぞれにおいて、バリンの約24%がA b uに置換されることを示している。

#### 【 0 5 2 2 】

また、固相合成法および固相半合成法は、新規のアミノ酸を含んでいる多くのタンパク質の合成を可能にしている。例えば、以下の刊行物および引用される参考文献を参照すればよい：Crick, F.J.C., Barrett, L. Brenner, S. Watts-Tobin, R. General nature of the genetic code for proteins. Nature, 1227-1232 (1961); Hofmann, K., Bohn, H. Studies on polypeptides. XXXVI. The effect of pyrazole-imidazole replacements on the S-protein activating potency of an S-peptide fragment, J. Am Chem, 5914-5919 (1966); Kaiser, E.T. Synthetic approaches to biologically active peptides and proteins including enzymes, Acc Chem Res, 47-54 (1989); Nakatsuka, T., Sasaki, T., Kaiser, E.T. Peptide segment coupling catalyzed by the semisynthetic enzyme thiosubtilisin, J Am Chem Soc, 3808-3810 (1987); Schnolzer, M., Kent, S B H. Constructing proteins by dovetailing unprotected synthetic peptides: backbone-engineered HIV protease, Science, 221-225 (1992); Chaiken, I.M. Semisynthetic peptides and proteins, CRC Crit Rev Biochem, 255-301 (1981); Offord, R.E. Protein engineering by chemical means? Protein Eng., 151-157 (1987); and, Jackson, D.Y., Burnier, J., Quan, C., Stanley, M., Tom, J., Wells, J.A. A Designed Peptide Ligase for Total Synthesis of Ribonuclease A with Unnatural Catalytic Residues, Science, 243 (1994)。

#### 【 0 5 2 3 】

化学的修飾は、インビトロにおいてタンパク質に種々の非天然な側鎖(補助因子、スピン標識およびオリゴヌクレオチドが挙げられる)を導入するために、使用されている。例えば、Corey, D.R., Schultz, P.G. Generation of a hybrid sequence-specific single-stranded deoxyribonuclease, Science, 1401-1403 (1987); Kaiser, E.T., Lawrence D .S., Rokita, S.E. The chemical modification of enzymatic specificity, Rev Biochem, 565-595 (1985); Kaiser, E.T., Lawrence, D.S. Chemical mutation of enzyme acti

10

20

30

40

50

ve sites, *Science*, 505-511 (1984); Neet, K.E., Nanci A, Koshland, D.E. Properties of thiol-subtilisin, *J Biol. Chem*, 6392-6401 (1968); Polgar, L.B., M.L. A new enzyme containing a synthetically formed active site. Thiol-subtilisin. *J. Am Chem Soc*, 3153-3154 (1966); and, Pollack, S.J., Nakayama, G. Schultz, P.G. Introduction of nucleophiles and spectroscopic probes into antibody combining sites, *Science*, 1038-1040 (1988)を参照すればよい。

#### 【 0 5 2 4 】

代替的に、化学的に修飾されたアミノアシル - tRNAを採用する生合成方法は、インビトロにおいて合成されるタンパク質に種々の生物物理的なプローブを組み込むために使用されている。以下の刊行物および引用される参考文献：Brunner, J. New Photolabeling and crosslinking methods, *Annu. Rev Biochem*, 483-514 (1993); and, Krieg, U.C., Walter, P., Hohnson, A.E. Photocrosslinking of the signal sequence of nascent preprolactin of the 54-kilodalton polypeptide of the signal recognition particle, *Proc. Natl. Acad. Sci*, 8604-8608 (1986)を参照すればよい。

10

#### 【 0 5 2 5 】

これまでに、所望のアンバーナンセンス変異を含んでいる遺伝子を用いて計画されたタンパク質合成反応に対して、化学的にアミノアシル化されたサブレッサtRNAを加えることによって、非天然アミノ酸がインビトロにおいて部位特異的に組み込まれ得ることが示されている。これらの方法を用いて、特定のアミノ酸に対して栄養要求性の株を用いて通常のアミノ酸の多くを構造的に近い相同物（例えば、フェニルアラニンに対するフルオロフェニルアラニン）に置換し得る。例えば、Noren, C.J., Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins, *Science*, 244: 182-188 (1989); M.W. Nowak, et al., *Science* 268:439-42 (1995); Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide, *J. Am Chem Soc*, 111:8013-8014 (1989); N. Budisa et al., *FASEB J.* 13:41-51 (1999); Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins, *Methods in Enz.*, 301-336 (1992); and, Mendel, D., Cornish, V.W. & Schultz, P.G. Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code, *Annu Rev Biophys. Biomol Struct.* 24, 435-62 (1995)を参照すればよい。

20

30

#### 【 0 5 2 6 】

例えば、UAGストップコドンを認識するサブレッサtRNAが調製され、非天然アミノ酸によって化学的にアミノアシル化された。従来の部位特異的な変異生成が、タンパク質遺伝子における目的の部位に、ストップコドンTAGを導入するために使用された。例えば、Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5', 3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis, *Nucleic Acids Res*, 791-802 (1988)を参照すればよい。アミノアシル化サブレッサtRNAおよび変異体遺伝子が、インビトロの転写/翻訳系において組み合わせられる場合、非天然アミノ酸は、UAGコドンに応じて組み込まれ、特定の位置においてアミノ酸を含んでいるタンパク質が生じる。[<sup>3</sup>H]-Pheを用いた実験および - ヒドロキシ酸を用いた実験によって、所望のアミノ酸のみがUAGコドンによって特定される位置に組み込まれ、このアミノ酸は、タンパク質における任意の他の部位に組み込まれないことが証明された。例えば、Noren, et al, supra; Kobayashi et al., (2003) *Nature Structural Biology* 10(6):425-432;およびEllman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins, *Science*, 197-200 (1992)を参照すればよい。

40

#### 【 0 5 2 7 】

tRNAは、任意の方法または技術（化学的または酵素的アミノアシル化が挙げられるが、これらに限定されない）によって所望のアミノ酸とともにアミノアシル化され得る。

#### 【 0 5 2 8 】

50

アミノアシル化は、アミノアシル tRNA 合成酵素または他の酵素性の分子（リボザイムが挙げられるが、これに限定されない）によってなされ得る。“リボザイム”という用語は“触媒性のRNA”と交換可能である。Cechおよび共同研究者らは、触媒（リボザイム）として機能し得る天然に存在するRNAの存在を証明した（Cech, 1987, Science, 236:1532-1539; McCorkle et al., 1987, Concepts Biochem. 64:221-226）。しかし、これら天然のRNA触媒が開裂および切断に関するリボ核酸基質において作用することを示されているにすぎないが、近年における人工的なリボザイムの進化によって、触媒の種類は種々の化学反応にまで及んでいる。研究によって、自身の(2')3'-末端に対するアミノアシル-RNA結合を触媒し得るRNA分子（Illangakekare et al., 1995 Science 267:643-647）、およびあるRNA分子から別のRNA分子にアミノ酸を転移させ得るRNA分子（Lohse et al., 1996, Nature 381:442-444）が同定されている。

10

## 【0529】

米国特許出願公開第2003/0228593号（参照によって本明細書に援用される）には、リボザイムの構築方法、ならびに天然にコードされているアミノ酸および天然にコードされていないアミノ酸をともなったtRNAのアミノアシル化におけるそれらの使用について記載されている。tRNAをアミノアシル化し得る酵素性の分子（リボザイムが挙げられるが、これに限定されない）の担体に不動化されている形態は、アミノアシル化された生成物の効率的な親和性精製を可能にする。好適な担体の例としては、アガロース、セファロースおよび磁性ビーズが挙げられる。アミノアシル化のためのリボザイムの担体に不動化されている形態の生成および使用について、Chemistry and Biology 2003, 10:1077-1084、および米国特許出願公開第2003/0228593号（参照によって本明細書に援用される）に記載されている。

20

## 【0530】

化学的なアミノアシル化の方法としては、アミノアシル化における合成酵素の使用を避けるための、Hechtおよび共同研究者ら（Hecht, S. M. Acc. Chem. Res. 1992, 25, 545; Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. Biochemistry 1988, 27, 7254; Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. J. Biol. Chem. 1978, 253, 4517）、ならびにSchultz、ChamberlinおよびDoughertyら（Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, 621; Robertson, S. A.; Ellman, J. A.; Schultz, P. G. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 2722; Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G. Science 1989, 244, 182; Bain, J. D.; Glabe, C. G.; Dix, T. A.; Chamberlin, A. R. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8013; Bain, J. D. et al. Nature 1992, 356, 537; Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. Chem. Biol. 1997, 4, 740; Turcatti, et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 19991; Nowak, M. W. et al. Science, 1995, 268, 439; Saks, M. E. et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 23169; Hoshaka, T. et al. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 34）（これらは参照によって本明細書に援用される）によって紹介されている方法が挙げられるが、これらに限定されない。このような方法または他の化学的なアミノアシル化の方法が、tRNA分子をアミノアシル化するために使用され得る。

30

## 【0531】

触媒性のRNAを生成する方法は、ランダム化されたリボザイム配列の分離プールを生成すること、当該プールにおいて定方向の進化を実施すること、所望のアミノアシル化活性について当該プールをスクリーニングすること、および所望のアミノアシル化活性を示すリボザイム配列を選択することを包含し得る。

40

## 【0532】

リボザイムは、アシル化活性を促進するモチーフおよび/または領域（GGUモチーフおよびUに富んだ領域など）を含み得る。例えば、Uに富んだ領域はアミノ酸基質の認識を容易にし得ること、およびGGUモチーフはtRNAの3'末端とともに塩基対を形成し得ることが報告されている。GGUモチーフおよびUに富んだ領域は共同して同時に、アミノ酸およびtRNAの両方の同時認識を容易にし、それによってtRNAの3'末端

50

のアミノアシル化を促進する。

【0533】

リボザイムは、 $tRNA^{Asn}$   $ccccg$  と抱合されており、部分的にランダム化されている  $r24mini$  を用いたインビトロ選択、続く活性なクローンに見られる共通配列の組織的な改変によって、生成され得る。この方法によって得られる例示的なリボザイムは、“F×3リボザイム”と呼ばれ、米国特許出願公開第2003/0228593号（その内容は参照によって本明細書に援用される）に記載されており、同種の非天然アミノ酸とともに荷電している種々のアミノアシル- $tRNA$ の合成にとっての多目的な触媒としての役割を果たす。

【0534】

基材に対する不動化が利用されて、アミノアシル化されている  $tRNA$  の効率的な親和性精製を可能にする。適切な担体の例としては、アガロース、セファロース、および磁性ビーズが挙げられるが、これらに限定されない。リボザイムは  $RNA$  の化学構造を利用して樹脂に不動化され得る。例えば、 $RNA$  のリボースにおける 3'-シス-ジオールは、過ヨウ素酸を用いて酸化されて、樹脂に対する  $RNA$  の不動化を容易にするための対応するジアルデヒドを生じ得る。種々の種類の樹脂（安価なヒドラジド樹脂が挙げられる）が用いられ得る。なお、還元性のアミノ化は、樹脂とリボザイムとの相互作用を不可逆結合にする。アミノアシル- $tRNA$ の合成は、このカラムアミノアシル化技術によって非常に容易にされ得る。Kourouklis et al. Methods 2005; 36:239-4には、カラムに基づくアミノアシル化系が記載されている。

【0535】

アミノアシル化されている  $tRNA$  の単離は、種々の方法においてなされ得る。1つの好適な方法としては、緩衝液（例えば、10 mM の EDTA を有している酢酸ナトリウム溶液、50 mM の N-(2-ヒドロキシエチル)ピペラジン-N'-(3-プロパンスルホン酸)、12.5 mM の KCl (pH 7.0)、10 mM の EDTA を含んでいる緩衝液、または単純な EDTA 緩衝化水 (pH 7.0) ) を用いてカラムからアミノアシル化されている  $tRNA$  を溶出することである。

【0536】

アミノアシル化されている  $tRNA$  が翻訳反応に加えられて、翻訳反応によって生成されているポリペプチドにおける選択部位に、ともにアミノアシル化されたアミノ酸を組み込み得る。本発明のアミノアシル化されている  $tRNA$  が使用され得る翻訳系の例としては、細胞溶解物が挙げられるが、これに限定されない。細胞溶解物は、投入した  $mRNA$  に由来するポリペプチドのインビトロ翻訳に必須の反応成分を供給する。そのような反応成分の例としては、リボソームタンパク質、 $rRNA$ 、アミノ酸、 $tRNA$ 、GTP、ATP、翻訳開始因子、伸張因子および翻訳と関連する付加的な因子が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、バッチ (batch) 翻訳または区画化 (compartmentalized) 翻訳であり得る。バッチ式翻訳の系は、単一の区画において反応成分を組み合わせる一方において、区画化翻訳の系は、翻訳効率を抑制し得る反応生成物から翻訳反応成分を分ける。当該翻訳系は市販されている。

【0537】

さらに、複合化された転写/翻訳系が使用され得る。複合された転写/翻訳系は、反応成分によって次々に翻訳される対応する  $mRNA$  への、投入する  $DNA$  の転写の両方を可能にする。市販の複合化された転写/翻訳の例は、ラピッドトランスレーションシステム (Rapid Translation System) (RTS, Roche Inc.) である。系としては、リボソームおよび翻訳因子といった翻訳の成分を供給する *E. coli* の溶菌液を含有する混合物が挙げられる。付加的に、 $RNA$  ポリメラーゼは、翻訳において使用する  $mRNA$  鋳型への、挿入する  $DNA$  の転写に含められる。RTSは、反応区画（供給/廃棄区画および転写/翻訳区画が挙げられる）の間に挿入される膜を用いて反応成分の区画化を使用し得る。

【0538】

$tRNA$  のアミノアシル化は、他の物質（トランスフェラーゼ、ポリメラーゼ、触媒抗

10

20

30

40

50

体および多機能タンパク質などが挙げられるが、これらに限定されない)によって実施され得る。

【0539】

Stephan in Scientist 2005 Oct 10; pages 30-33 には、天然にコードされていないアミノ酸をタンパク質に組み込むさらなる方法について記載されている。Lu et al. in Mol Cell. 2001 Oct;8(4):759-69には、タンパク質が、非天然アミノ酸を含んでいる合成ペプチドと化学的に連結される方法(タンパク質連結と言われる)について記載されている。

【0540】

また、微量注入技術はタンパク質への非天然アミノ酸の組み込みに使用されている。例えば、M. W. Nowak, P. C. Kearney, J. R. Sampson, M. E. Saks, C. G. Labarca, S. K. Silverman, W. G. Zhong, J. Thorson, J. N. Abelson, N. Davidson, P. G. Schultz, D. A. Dougherty and H. A. Lester, Science, 268:439 (1995) ; および D. A. Dougherty, Curr. Opin. Chem. Biol., 4:645 (2000) を参照すればよい。アフリカツメガエルの卵母細胞は、インビトロにおいて作製された2つのRNA種: 所定のアミノ酸位置にUAG ストップコドンを有している標的タンパク質をコードするmRNA、および所望の非天然アミノ酸と共にアミノアシル化されたアンバーサプレッサ tRNA を用いて同時注入された。それから、卵母細胞の翻訳機構は、UAGによって特定される位置に非天然アミノ酸を挿入する。この方法は、一般的にインビトロの系に受け入れられない膜内在性膜タンパク質の構造-機能研究を可能にしている。例としては、蛍光共鳴エネルギー転移によって距離を測定するための、タキキニン ニューロキニン-2 受容体への蛍光アミノ酸の組み込み(例えば、G. Turcatti, K. Nemeth, M. D. Edgerton, U. Meseth, F. Talabot, M. Peitsch, J. Knowles, H. Vogel and A. Chollet, J. Biol. Chem., 271:19991 (1996) を参照すればよい) ; イオンチャネルにおける表面露出残基を同定するための、ピオチン化アミノ酸の組み込み(例えば、J. P. Gallivan, H. A. Lester and D. A. Dougherty, Chem. Biol., 4:739 (1997) を参照すればよい) ; 実時間におけるイオンチャネルの立体配置の変化を観察するための、ケージ化チロシン類似物の使用(例えば、J. C. Miller, S. K. Silverman, P. M. England, D. A. Dougherty and H. A. Lester, Neuron, 20:619 (1998) ) を参照すればよい) ; およびそれらのゲート機構を調べるためにイオンチャネル骨格を変更するための、ヒドロキシアミノ酸の使用が挙げられる。例えば、P. M. England, Y. Zhang, D. A. Dougherty and H. A. Lester, Cell, 96:89 (1999) ; および T. Lu, A. Y. Ting, J. Mainland, L. Y. Jan, P. G. Schultz and J. Yang, Nat. Neurosci., 4:239 (2001) を参照すればよい。

【0541】

インビボにおいてタンパク質に非天然アミノ酸を組み込む能力は、利点(変異タンパク質の高い収率、技術的な容易さ、細胞もしくはおそらく生体における変異タンパク質を研究する見込み、および治療的な処置におけるこれらのタンパク質の利用が挙げられる)をもたらす。種々の大きさ、酸性度、求核性、疎水性および他の特性を有している非天然アミノ酸をタンパク質に含める能力は、タンパク質の機能を調べること、および新規の性質を有している新たなタンパク質もしくは生体を作り出すことの両方を目的として、タンパク質の構造を合理的かつ体系的に操作するわれわれの能力を大きく拡張し得る。

【0542】

パラ-F-Phe を部位特異的に組み込むための1つの試みにおいて、酵母アンバーサプレッサ tRNA Phe CUA / フェニルアラニル-tRNA 対が、p-F-Phe 耐性の、Phe 要求性の Escherichia coli 株に使用された。例えば、R. Furter, Protein Sci., 7:419 (1998) を参照すればよい。

【0543】

また、無細胞(インビトロ)翻訳系を用いて、本発明のpSTポリペプチドを発現させ得る。翻訳系は、細胞性および無細胞であり得、かつ原核生物および真核生物であり得る。細胞性翻訳系としては、全細胞調製物(例えば、所望の核酸配列がmRNAに転写され

得、mRNAが翻訳され得る透過処理の施された細胞および培養細胞)が挙げられるが、これらに限定されない。無細胞翻訳系は、市販されており、多くの異なる種類および系がよく知られている。無細胞翻訳系の例としては、原核生物溶菌液(例えば*Escherichia coli*の溶菌液)、および真核生物溶解液(例えば、大麦抽出物、昆虫細胞溶解液、ウサギの網赤血球溶解液、ウサギの卵母細胞溶解液およびヒト細胞溶解液)が挙げられるが、これらに限定されない。真核細胞の抽出物または溶解液は、生じたタンパク質が糖鎖付加されるか、リン酸化されるか、またはそれとは別に修飾される場合に、当該修飾は、真核生物の系においてのみ可能であるため、好ましくあり得る。これらの抽出物および溶解液のいくつかは、市販されている(Promega, Madison, Wis.; Stratagene, La Jolla, Calif.; Amersham, Arlington Heights, Ill.; GIBCO/BRL, Grand Island, N.Y.)。また、膜性抽出物(例えば、ミクロソーム膜を含んでいるイヌの膵臓抽出物)は、分泌タンパク質の翻訳にとって有用に利用可能である。mRNA(インビトロ翻訳)またはDNA(インビトロ転写および翻訳の組合せ)のいずれかを、鋳型として含み得るこれらの系において、インビトロ合成はリボソームによって導かれる。無細胞タンパク質発現系の開発に、多大な努力がなされている。例えば、参照によって本明細書に援用される、Kim, D.M. and J. R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 74 :309-316 (2001); Kim, D.M. and J. R. Swartz, *Biotechnology Letters*, 22, 1537-1542, (2000); Kim, D.M., and J.R. Swartz, *Biotechnology Progress*, 16, 385-390, (2000); Kim, D.M., and J.R. Swartz, *Biotechnology and Bioengineering*, 66, 180-188, (1999); およびPatnaik, R. and J.R. Swartz, *Biotechniques* 24, 862-868, (1998); 米国特許第6,337,191号; 米国特許出願公開第2002/0081660号; 国際公開第00/55353号国際公開第90/05785号を参照すればよい。天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドの発現に適用され得る他の方法としては、mRNA-ペプチド融合技術が挙げられる。例えば、R. Roberts and J. Szostak, *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 94:12297-12302 (1997); A. Frankel, et al., *Chemistry & Biology* 10:1043-1050 (2003)を参照すればよい。この方法において、ピューロマイシンと連結されたmRNAの鋳型はリボソーム上において翻訳される。1つ以上のtRNA分子が修飾されると、非天然アミノ酸は同様にペプチドに組み込まれ得る。最後のmRNAコドンが読まれた後に、ピューロマイシンはペプチドのC末端を捕捉する。生じたmRNA-ペプチド抱合物は、インビトロアッセイにおいて所定の性質を有することを見出されている場合に、その同一性は、mRNA配列から容易に明らかになり得る。この方法において、所望の性質を有しているポリペプチドを同定するために、天然にコードされていない1つ以上のアミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドのライブラリをスクリーニングし得る。より最近に、精製成分を用いたインビトロのリボソーム翻訳は、天然にコードされていないアミノ酸に置換されたペプチドの合成を可能にすることが、報告されている。例えば、A. Forster et al., *Proc. Natl Acad. Sci. (USA)* 100:6353 (2003)を参照すればよい。

10

20

30

#### 【0544】

また、再生翻訳系が使用され得る。また、精製された翻訳因子の混合物だけでなく、溶解液の組合せ、または精製された翻訳因子(例えば、開始因子1(IF-1)、IF-2、IF-3(または)、伸張因子T(EF-Tu)または終結因子)を補った溶解液が、mRNAをタンパク質に翻訳するために首尾よく使用されている。また、無細胞系は転写/翻訳系と組合せられ得る。ここで、参照によって本明細書に特に援用される、*Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel et al. editors, Wiley Interscience, 1993)に記載されているように、DNAは、系に導入され、mRNAに転写され、mRNAは翻訳される。真核生物転写系において転写されるRNAは、ある翻訳系において有利であり得る、異核RNA(hnRNA)の形態であり得るか、または5'末端キャップ(7-メチルグアノシン)および3'末端ポリAを尾部につないだRNAの形態であり得る。例えば、キャップ付きのmRNAは、網赤血球溶解液の系において高い効率を有して翻訳される。

40

#### 【0545】

50

### IX. pSTポリペプチドと結合されている巨大分子重合体

本明細書に記載されている非天然アミノ酸のポリペプチドに対する種々の修飾は、本明細書に記載されている組成物、方法、技術および方策を用いてもたらされ得る。これらの修飾としては、ポリペプチドの非天然のアミノ酸成分上にさらなる機能性の抱合物が挙げられ、当該分子としては、ヒドロキシアルキルスターチ(HAS)；ヒドロキシエチルスターチ(HES)；標識；色素；重合体；水溶性重合体；ポリエチレングリコールの誘導体；光架橋リンカー；放射性核種；細胞毒性化合物；薬物；親和性標識；光親和性標識；反応性化合物；樹脂；もう1つのタンパク質もしくはポリペプチドもしくはポリペプチド類似物；抗体もしくは抗体断片；金属のキレート剤；補足因子；脂肪酸；含水炭素；ポリヌクレオチド；DNA；RNA；アンチセンスポリヌクレオチド；糖；水溶性のデンドリマー；シクロデキストリン；阻害性のリボヌクレオチド；生体材料；ナノ粒子；スピン標識；蛍光団；金属を含有する部分；放射性部分；新規の官能基；ほかの分子に、共有結合的に、または非共有結合的に相互作用する基、光ケージド(photocaged)部分；光線性放射反応性の部分；光異性化可能な部分；ピオチン；ピオチンの誘導体；ピオチンの類似物；重原子を組み込みこんでいる部分；化学切断可能な基；光切断可能な基；延長された側鎖；炭素結合型の糖；酸化還元活性の剤；アミノチオ酸；毒性部分；同位体によって標識された部分；生物物理学的なプローブ；燐光性の基；化学発光性の基；電子密度の高い基；磁性基；インターカレートする基；発色団；エネルギー転移剤；生物学的に活性な薬剤；検出可能な標識；小分子；量子ドット；放射性ヌクレオチド；放射性伝達物質；中性子補足剤；または上記の組合せ、または任意の他の所望の化合物もしくは物質)などが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載されている組成物、方法、技術および方策の、例証である非限定的な例として、以下の記載は、非天然アミノ酸ポリペプチドに対する巨大分子重合体の付与に主眼をおいている。当該付与は、それらに対して記載されている組成物、方法、技術および方策は、他の機能性(以上に列挙されている機能性が挙げられるが、これらに限定されない)の付与に(必要な場合に、当業者が本明細書の開示を用いてなし得る適切な変更とともに)適用可能であるとの理解をとまなっている。

10

20

#### 【0546】

種々の巨大分子重合体および他の分子は、pSTポリペプチドの生物学的な機能を調節するためか、および/またはpST分子に新たな生物学的な性質を付与するために、本発明のpSTポリペプチドと結合され得る。これらの巨大分子重合体は、天然にコードされているアミノ酸を介してか、天然にコードされていないアミノ酸、または天然のもしくは非天然のアミノ酸の任意の置換基、または天然アミノ酸もしくは非天然アミノ酸に対して加えられる任意の官能基を介して、pSTポリペプチドと連結され得る。当該重合体の分子量は、広範であり得、約100Daおよび約100000Daまたはそれ以上の間が挙げられるが、これに限定されない。当該重合体の分子量は、約100Daおよび約100000Daの間(100000Da、95000Da、90000Da、85000Da、80000Da、75000Da、70000Da、65000Da、60000Da、55000Da、50000Da、45000Da、40000Da、35000Da、30000Da、25000Da、20000Da、15000Da、10000Da、9000Da、8000Da、7000Da、6000Da、5000Da、4000Da、3000Da、2000Da、1000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、および100Daが挙げられるが、これらに限定されない)であり得る。いくつかの実施形態において、当該重合体の分子量は約100Daおよび約50000Daの間である。いくつかの実施形態において、当該重合体の分子量は約100Daおよび約40000Daの間である。いくつかの実施形態において、当該重合体の分子量は約5000Daおよび約40000Daの間である。いくつかの実施形態において、当該重合体の分子量は約10000Daおよび約40000Daの間である。

30

40

#### 【0547】

本発明は、重合体：タンパク質の抱合物の実質的に均質な調製物を提供する。本明細書

50

に使用されるとき、“実質的に均質な”は、重合体：ポリペプチドの抱合物がタンパク質の総量の半分より多く認められることを意味する。重合体：タンパク質の抱合物は、生物活性を有しており、本明細書に規定される“実質的に同質な”PEG付加pST調製物は、均質な調製物の利点（例えば、1組の薬物動態に対する1組の予想における臨床的な適用における容易さ）を示すために十分に均質である抱合物である。

**【0548】**

また、重合体：タンパク質の抱合物分子の混合物を調製するために選択し得、本明細書に規定されている利点は、混合物に含まれているモノ-重合体：タンパク質の抱合物の比率を選択し得ることである。したがって、必要に応じて、種々の数（すなわち、ジ-、トリ-、テトラ-など）の重合体部分と連結した状態の種々のタンパク質の混合物を調製し得、本発明の方法を用いて調製されたモノ-重合体：タンパク質の抱合物と上記抱合物を組み合せ得、かつ所定の割合のモノ-重合体：タンパク質の抱合物を有している混合物を有し得る。

10

**【0549】**

選択される重合体は、重合体の連結されるタンパク質が水性環境（例えば、生理学的環境）において沈殿しないように、水溶性重合体であり得る。重合体は、分枝鎖状であり得るか、または非分枝鎖状であり得る。最終的に生成される調製物の治療的利用に関して、重合体は薬学的に受容可能であることが好ましい。

**【0550】**

重合体の例としては、ポリアルキルエーテルおよびアルコキシキャップされているそれら類似物（例えば、ポリオキシエチレングリコール、ポリオキシエチレン/プロピレングリコール、およびメトキシまたはエトキシキャップされているそれらの類似物、特にポリオキシエチレングリコール（ポリエチレングリコールまたはPEGとして知られている）；ポリビニルピロリドン；ポリビニルアルキルエーテル；ポリオキサゾリン、ポリアルキルオキサゾリンおよびポリヒドロキシアルキルオキサゾリン；ポリアクリルアミド、ポリアルキルアクリルアミド、およびポリヒドロキシアルキルアクリルアミド（例えば、ポリヒドロキシプロピルメタクリルアミドおよびこれらの誘導体）；ポリヒドロキシアルキルアクリレート；ポリシアル酸およびこれらの類似物；親水性ペプチド配列；多糖およびそれらの誘導体（デキストランおよびデキストランの誘導体（例えば、カルボキシメチルデキストラン、硫酸デキストラン、アミノデキストラン）が挙げられる）；セルロースおよびその誘導体（例えば、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシアルキルセルロース）；キチンおよびその誘導体（例えば、キトサン、スクシニルキトサン、カルボキシメチルキチン、カルボキシメチルキトサン）；ヒアルロン酸およびその誘導体；スターチ；アルギン酸塩；硫酸コンドロイチン；アルブミン；プルランおよびカルボキシメチルプルラン；ポリアミノ酸およびそれらのそれらの誘導体（例えば、ポリグルタミン酸、ポリリジン、ポリアスパラギン）；無水マレイン酸の共重合体（例えば、スチレン無水マレイン酸の共重合体、ジビニルエーテル無水マレイン酸の共重合体）；ポリビニルアルコール；これらの共重合体；これらの三元重合体；ヒドロキシアルキルスターチ（HAS）（ヒドロキシエチルスターチ（HES）が挙げられるが、これに限定されない）；または上述のものの誘導体が挙げられるが、これらに限定されない。

20

30

40

**【0551】**

タンパク質分子に対するポリエチレングリコールの比率は、反応混合物におけるそれらの濃度にしたがって変化する。最適な比率（余剰の未反応のタンパク質または重合体が最小である反応の効率に関する）は、選択されるポリエチレングリコールの分子量によって、かつ有用な反応性基の利用可能な数に基づいて一般的に決定され得る。分子量に関連するときに、タンパク質と連結されるのは、典型的に、より分子量の高い重合体分子、より少ない数の重合体分子である。同様に、重合体の分枝鎖は、これらの要因を最適化する場合に計算に入れられるべきである。一般的に、分子量が高いほど（分枝鎖が多いほど）、重合体：タンパク質の割合が高くなる。

**【0552】**

50

本明細書に使用されるとき、および PEG : pST の抱合物について検討される場合に、“治療有効量”は患者に利益を与える量を指す。当該量は、個体間において変わり、かつ要因（患者の全体的な体調および処置される症状の原因が挙げられる）の数に依存する。治療のために使用される pST ポリペプチドの量は、変化に関して受容可能な変化率を生じ、所望の反応を有益なレベルに維持する。本発明の組成物の治療有効量は、一般的に利用可能な材料および手法を用いて当業者によって容易に確認され得る。

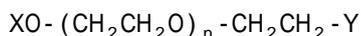
【0553】

水溶性重合体は、任意の構造的な形態（直鎖、分岐鎖または分枝鎖が挙げられるが、これらに限定されない）であり得る。水溶性重合体は、典型的にポリ（エチレングリコール）（PEG）といったポリ（アルケングリコール）であるが、他の水溶性重合体も採用され得る。一例として、PEG は本発明のある実施形態を説明するために使用される。

10

【0554】

PEG は、市販されているか、または当業者に公知の方法（Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161）にしたがってエチレングリコールの開環重合によって調製され得る、周知の水溶性重合体である。“PEG”という用語は、PEG の大きさまたは末端における修飾に関係なく、任意のポリエチレングリコール分子を包含するために広く使用され、かつ pST ポリペプチドと連結されるときに、式：



（ここで、n は 2 から 10000 であり、X は、H または末端修飾（C<sub>1-4</sub> アルキルが挙げられるが、これらに限定されない）、保護基および末端官能基である）によって表され得る。

20

【0555】

いくつかの場合に、本発明に使用される PEG は、ヒドロキシまたはメトキシを有している末端が終端になる（すなわち、X は H または CH<sub>3</sub>（“メトキシ PEG”）である）。代替的に、PEG は、これによって二機能性重合体を形成する反応性基が終端になる。典型的な反応性基としては、通常に見られる 20 のアミノ酸における官能基と反応させるために通常に使用されるこれらの反応性基（マレイミド基、活性化カルボン酸塩（p-ニトロフェニルエステルが挙げられるが、これに限定されない）、活性化エステル（N-ヒドロキシスクシニミド、p-ニトロフェニルエステルが挙げられるが、これらに限定されない）、およびアルデヒドが挙げられるが、これらに限定されない）だけでなく、通常 20 のアミノ酸に対して不活性であるが、天然にコードされていないアミノ酸に存在する補完的な官能基と特に反応する官能基（アジド基、アルキン基が挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられ得る。なお、上記式において Y によって示されている PEG の他の末端は、天然に存在するアミノ酸または天然にコードされていないアミノ酸を介して pST ポリペプチドに対して直接的または間接的に連結している。実際に、Y は、ポリペプチドのアミン基（リジンまたは N 末端のイプシロンアミンが挙げられるが、これらに限定されない）との、アミド結合、カルバメート結合または尿素結合であり得る。代替的に、Y は、チオール基（システインのチオール基が挙げられるが、これに限定されない）とのマレイミド結合であり得る。代替的に、Y は、通常 20 のアミノ酸を介して通常には接近できない残基との結合であり得る。例えば、PEG におけるアジド基は、pST ポリペプチドにおけるアルキン基と反応して、ヒュイゲン [3 + 2] 環付加生成物を形成し得る。代替的に、PEG におけるアルキン基は、天然にコードされていないアミノ酸に存在するアジド基と反応して、同様の生成物を形成し得る。いくつかの実施形態において、強い求核基（ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシアミン、セミカルバジドが挙げられるが、これらに限定されない）は、天然にコードされていないアミノ酸に存在するアルデヒド基またはケトン基と反応して、必要に応じていくつかの場合に適切な還元剤を用いた処理によってさらに還元されるヒドラゾン、オキシムまたはセミカルバゾンを形成し得る。代替的に、強い求核基は、天然にコードされていないアミノ酸を介して pST ポリペプチドに組み込まれ得、水溶性重合体に存在するケトン基またはアルデヒド基と好適に反応する

30

40

50

ために使用され得る。

【0556】

PEGに関する任意の分子量が、実際に所望されるように、約100ダルトン(Da)から100000Daまたは必要に応じてそれ以上(0.1~50kDaまたは10~40kDaが挙げられるが、これらに限定されない)まで(これらが挙げられるが、限定されない)使用され得る。PEGの分子量は広範(約100Daおよび約100000Daまたはそれ以上の間が挙げられるが、これらに限定されない)であり得る。PEGは約100Daおよび約100000Daの間(100000Da、95000Da、90000Da、85000Da、80000Da、75000Da、70000Da、65000Da、60000Da、55000Da、50000Da、45000Da、40000Da、35000Da、30000Da、25000Da、20000Da、15000Da、10000Da、9000Da、8000Da、7000Da、6000Da、5000Da、4000Da、3000Da、2000Da、および1000Daが挙げられるが、これらに限定されない)であり得る。いくつかの実施形態において、PEGは約100Daおよび約50000Daの間である。いくつかの実施形態において、PEGは約100Daおよび約40000Daの間である。いくつかの実施形態において、PEGは約1000Daおよび約40000Daの間である。いくつかの実施形態において、PEGは約5000Daおよび約40000Daの間である。いくつかの実施形態において、PEGは約10000Daおよび約40000Daの間である。また、分枝鎖状のPEG(10~100kDa(1~50kDaまたは5~20kDaが挙げられるが、これらに限定されない)の範囲にあるMWを有しているそれぞれの鎖を含んでいるPEG分子が挙げられるが、これらに限定されない)が使用され得る。分枝鎖状のPEGのそれぞれの鎖の分子量は約100Daおよび約100000Daの間またはそれ以上の間が挙げられ得るがこれらに限定されない。PEGは約100Daおよび約100000Daの間(100000Da、95000Da、90000Da、85000Da、80000Da、75000Da、70000Da、65000Da、60000Da、55000Da、50000Da、45000Da、40000Da、35000Da、30000Da、25000Da、20000Da、15000Da、10000Da、9000Da、8000Da、7000Da、6000Da、5000Da、4000Da、3000Da、2000Da、および1000Daが挙げられるが、これらに限定されない)であり得る。いくつかの実施形態において、分枝鎖状のPEGのそれぞれの鎖の分子量は約1000Daおよび約50000Daの間である。いくつかの実施形態において、分枝鎖状のPEGのそれぞれの鎖の分子量は約1000Daおよび約40000Daの間である。いくつかの実施形態において、分枝鎖状のPEGのそれぞれの鎖の分子量は約5000Daおよび約40000Daの間である。いくつかの実施形態において、分枝鎖状のPEGのそれぞれの鎖の分子量は約5000Daおよび約20000Daの間である。種々のPEG分子は、参照によって本明細書に援用されるShearwater Polymers, Inc. catalog, Nektar Therapeutics catalog(これが挙げられるが、限定されない)に記載されている。

【0557】

一般的に、PEGの少なくとも1つの末端は、天然にコードされていないアミノ酸との反応に利用可能である。例えば、アミノ酸側鎖との反応のためのアルキン部分およびアジド部分は、本明細書に記載のような天然にコードされていないアミノ酸とPEGを連結させるために使用され得る。天然にコードされていないアミノ酸がアジドを含んでいる場合に、そのときのPEGは、ヒュイゲン[3+2]環付加生成物の形成をもたらすためのアルキン部分、またはアミド結合の形成をもたらすための活性化PEG種(すなわち、エステル、カルボン酸塩)のいずれかを典型的に含んでいる。代替的に、天然にコードされていないアミノ酸がアルキンを含んでいる場合に、そのときのPEGは、[3+2]ヒュイゲン環付加生成物の形成をもたらすためのアジド部分を典型的に含んでいる。天然にコー

10

20

30

40

50

ドされていないアミノ酸がカルボニル基を含んでいる場合に、PEGは、対応するヒドラゾン、ヒドロキシアミン、またはセミカルバゾン結合のそれぞれをもたらすために、強力な求核基（ヒドラジド、ヒドラジン、ヒドロキシアミンまたはセミカルバジド基能性基が挙げられるが、これらに限定されない）を典型的に含んでいる。他の代替物において、上述される反応性基の逆の方向性が使用され得る（すなわち、天然にコードされていないアミノ酸におけるアジド基がアルキンを含有するPEG誘導体と反応され得る）。

#### 【0558】

いくつかの実施形態において、PEG誘導体を有しているpSTポリペプチドのバリエーションは、天然にコードされていないアミノ酸の側鎖に存在する化学的な官能基と反応性である化学的な官能基を含んでいる。

10

#### 【0559】

本発明は、いくつかの実施形態において、約800Daから約100000Daまでの平均分子量を有している水溶性重合体骨格を含んでいるアジド含有重合体およびアセチレン含有重合体を提供する。水溶性重合体の重合体骨格はポリ（エチレングリコール）であり得る。しかし、広範な水溶性重合体（ポリ（エチレン）グリコールおよび他の関連する重合体（ポリ（デキストラン）およびポリ（プロピレングリコール））が挙げられるが、これらに限定されない）はまた、本発明の実践における使用に好適であること、PEGまたはポリ（エチレングリコール）という用語は、そのような分子のすべてを包含しており、含んでいると意図されていることが理解される。PEGという用語としては、その形態のいずれか（二機能性のPEG、マルチアームのPEG、誘導体化PEG、分岐状のPEG、分枝鎖状のPEG、ぶら下がりのPEG（すなわち、重合体骨格に対してぶら下がっている1つ以上の官能基を有しているPEGまたは関連重合体）、またはこれらに分解可能な結合を有しているPEGが挙げられるが、これらに限定されない）であるポリ（エチレングリコール）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

#### 【0560】

PEGは、典型的に透明であり、無色であり、無臭であり、水溶性であり、熱に安定であり、多くの化学物質に対して不活性であり、加水分解されないか、または劣化されず、一般的に無毒である。ポリ（エチレングリコール）は、生体適合性である（PEGが、損傷の原因になることなく、生きている組織または生体と共存可能であることを意味する）とみなされる。より詳細には、PEGは実質的に非免疫原性である（PEGが身体に免疫応答を生じさせる傾向を示さないことを意味する）。身体においていくつかの所望の機能を有している分子（例えば生物学的に活性な分子）と連結される場合に、PEGは、物質をマスクする傾向にあり、生体が物質の存在を許容し得るように任意の免疫応答を低減可能か、または排除できる。PEG抱合物は、実質的な免疫応答を生じないか、または凝固もしくは他の好ましくない影響を引き起こさない傾向を示す。式 -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-（ここで、nは約3から4000、典型的に約20から約2000である）を有しているPEGは、本発明における使用に好適である。約800Daから約100000Daまでの分子量を有しているPEGは、本発明のいくつかの実施形態において重合体骨格として特に有用である。PEGの分子量は、広範（約100Daおよび約100000Daまたはそれ以上の間）が挙げられるが、これらに限定されない）であり得る。PEGは約100Daおよび約100000Daの間（100000Da、95000Da、90000Da、85000Da、80000Da、75000Da、70000Da、65000Da、60000Da、55000Da、50000Da、45000Da、40000Da、35000Da、30000Da、25000Da、20000Da、15000Da、10000Da、9000Da、8000Da、7000Da、6000Da、5000Da、4000Da、3000Da、2000Da、および1000Da）が挙げられるが、これらに限定されない）であり得る。いくつかの実施形態において、PEGは約100Daおよび約50000Daの間である。いくつかの実施形態において、PEGは約100Daおよび約4

30

40

50

0000Daの間である。いくつかの実施形態において、PEGは約1000Daおよび約4000Daの間である。いくつかの実施形態において、PEGは約5000Daおよび約4000Daの間である。いくつかの実施形態において、PEGは約1000Daおよび約4000Daの間である。

【0561】

重合体骨格は直鎖状または分枝鎖状であり得る。分枝鎖状の重合体骨格は一般的に当該技術において公知である。典型的に、分枝鎖状の重合体は、中心の分枝核部分および中心の分枝核と連結された複数の直鎖状の重合体鎖を有している。PEGは、種々のポリオール（例えば、グリセロール、グリセロールオリゴマー、ペンタエリスリトールおよびソルビトール）に対するエチレンオキシドの付加によって調製され得る、分枝鎖状の形態において通常に使用される。また、中心の分枝核部分は種々のアミノ酸（例えばリジン）から誘導体化され得る。分枝鎖状のポリ（エチレングリコール）は、 $R(-PEG-OH)_m$ （Rは、グリセロール、グリセロールオリゴマー、またはペンタエリスリトールといった核部分から誘導体化され、mは腕の数を表す）として通常の形態において表され得る。また、マルチアームのPEG分子（例えば、参照によってその全体が本明細書に援用される、米国特許第5,932,462号；米国特許第5,643,575号；米国特許第5,229,490号；米国特許第4,289,872号；米国特許出願公開第2003/0143596号；国際公開第96/21469号；および国際公開第93/21259号に記載のそれら）は、重合体骨格として使用され得る。

10

【0562】

また、分枝鎖状のPEGは、 $PEG(-YCHZ_2)_n$ （ここで、Yは結合基であり、Zは所定の長さの原子の鎖によってCHと連結される活性化末端基である）によって表される分岐状のPEGの形態であり得る。

20

【0563】

さらなる分枝鎖状の形態、ぶら下がりのPEGは、PEG鎖の末端ではなくPEG骨格に沿って存在する反応性基（例えばカルボキシル）を有している。

【0564】

またPEGのこれらの形態に加えて、重合体は、骨格において弱い結合または分解可能な結合を有して調製され得る。例えば、PEGは、重合体骨格に加水分解を受けやすいエステル結合を有して調製され得る。以下に示すように：

30



この加水分解は、重合体のより低い分子量の断片への切断を結果として生じる。ポリ（エチレングリコール）またはPEGという用語は、当該技術において公知の形態のすべて（本明細書に開示されるそれらが挙げられるが、これらに限定されない）を表すが、または含むことは、当業者によって理解される。

【0565】

また、他の重合体は本発明における使用にとって好適である。いくつかの実施形態において、2から約300の末端を有しており、水溶性重合体である重合体骨格は、本発明において特に有用である。好適な重合体の例としては、ポリ（プロピレングリコール）（“PPG”）、これらの共重合体（エチレングリコールおよびプロピレングリコールの共重合体が挙げられるが、これに限定されない）、これらの三元重合体、およびこれらの混合物などといった、他のポリ（アルキレングリコール）が挙げられるが、これらに限定されない。重合体骨格のそれぞれの鎖の分子量は、変更可能であるが、典型的に約800Daから約10000Daまで、しばしば約6000Daから約80000Daまでの範囲である。当該重合体骨格のそれぞれの鎖の分子量は、約100Daおよび約10000Daの間（10000Da、9500Da、9000Da、8500Da、8000Da、7500Da、7000Da、6500Da、6000Da、5500Da、5000Da、4500Da、4000Da、3500Da、3000Da、2500Da、2000Da、1500Da、1000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、

40

50

3000Da、2000Da、1000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、および100Daが挙げられるが、これらに限定されない)であり得る。いくつかの実施形態において、当該重合体の分子量は約100Daおよび約5000Daの間である。いくつかの実施形態において、当該重合体の分子量は約100Daおよび約4000Daの間である。いくつかの実施形態において、当該重合体の分子量は約5000Daおよび約4000Daの間である。いくつかの実施形態において、当該重合体の分子量は約10000Daおよび約40000Daの間である。

#### 【0566】

当業者は、水溶性重合体に関して以上に挙げたものは、決して網羅的なものではなく、単に例示であること、および上述のような品質を有している重合体材料のすべてが、本発明における使用に好適であると考えられ得ることを認識する。

10

#### 【0567】

本発明のいくつかの実施形態において、重合体誘導体は、重合体骨格が官能基を用いて官能性化されたか、または活性化された少なくとも2つの末端、おそらく約300もの末端を有することを意味する、“多機能性”である。多機能性重合体の誘導体としては、2つの末端(末端のそれぞれが、同じであり得るか、または異なり得る官能基に対して結合されている)を有している直鎖状の重合体が挙げられるが、これに限定されない。

#### 【0568】

一実施形態において、重合体誘導体は、構造：

20

X-A-POLY-B-N=N=N

(ここで、

N = N = Nはアジド部分であり；

Bは、存在し得るか、または存在しない場合があり得る連結部分であり；

POLYは、水溶性の非抗原性の重合体であり；

Aは、存在し得るか、または存在し得ず、Bと同じであり得るか、または異なり得る連結部分であり；

Xは第2の官能基である)を有している。

AおよびBに関する連結部分の例は、18まで含有している多重官能性化アルキル基を含んでおり、より好ましくは1~10の炭素原子を含有しているが、これらに限定されない。異種原子(例えば、窒素、酸素または硫黄)は、アルキル鎖に含まれ得る。また、アルキル鎖は異種原子において枝分かかれし得る。AおよびBに関する結合部分の他の例は、10まで含有している多重官能性化アリール基を含んでおり、より好ましくは5~6の炭素原子を含有しているが、これに限定されない。アリール基は、1つ以上の炭素原子、窒素原子、酸素原子または硫黄原子を用いて置換され得る。好適な連結基の他の例としては、参照によって本明細書にその全体が援用される、米国特許第5,932,462号；米国特許第5,643,575号；および米国特許出願公開第2003/0143596号に記載されているこれらの連結基が挙げられるが、これらに限定されない。当業者は、連結部分に関して以上に挙げたものが、決して網羅的ではなく、かつ単に例示であること、および上述の品質を有する結合部分のすべてが、本発明における使用に好適であると考えられることを認識する。

30

40

#### 【0569】

Xとしての使用に好適な官能基の例としては、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、アルコキシル、活性化エステル(例えば、N-ヒドロキシスクシニミジルエステルおよび1-ベンゾトリアゾリルエステル)、活性化カルボネート(例えば、N-ヒドロキシスクシニミジルカルボネートおよび1-ベンゾトリアゾリルカルボネート)、アセタール、アルデヒド、アルデヒド水和物、アルケニル、アクリレート、メタクリレート、アクリルアミド、活性化スルホン、アミン、アミノオキシ、保護されたアミン、ヒドラジド、保護されたヒドラジド、保護されたチオール、カルボキシル酸、保護されたカルボキシル酸、イソシアネート、イソチオシアネート、マレイミド、ビニルスルホン、ジチオピリジン、

50

ビニルピリジン、ヨードアセトアミド、エポキシド、グリオキサール、ジオン、メシレート、トシレート、トレシレート、アルケン、ケトンおよびアジドなどが挙げられるが、これらに限定されない。当業者によって理解されるように、選択されるX部分は、アジド基との反応が生じないように、アジド基と適合性であるべきである。アジド含有重合体誘導体は、第2の官能基（すなわち、X）がまたアジド部分であることを意味する同種の二機能性であり得るか、または第2の官能基が異なる官能基であることを意味する異種二機能性であり得る。

【0570】

“保護された”という用語は、特定の反応条件下における化学的に反応性の官能基の反応を妨げる保護基または保護部分の存在を指す。保護基は、保護される化学的に反応性の基の種類に依存して変わる。例えば、化学的に反応性の基がアミンまたはヒドラジドである場合に、保護基は、tert-ブチルオキシカルボニル(t-Boc)および9-フルオレニルメトキシカルボニル(Fmoc)の群から選択され得る。化学的に反応性の基がチオールである場合に、保護基は、オルトピリジルジスルフィドであり得る。化学的に反応性の基がカルボキシル酸（例えば、ブタン酸またはプロピオン酸）またはヒドロキシル基である場合に、保護基は、ベンジル基またはメチル、エチルもしくはtert-ブチルといったアルキル基であり得る。また、当該技術において公知の他の保護基は、本発明に使用され得る。

10

【0571】

文献における特定の末端官能基の例としては、N-スクシニミジルカルボネート（例えば、米国特許第5,281,698号、米国特許第5,468,478号を参照すればよい）、アミン（例えば、Buckmann et al. Makromol. Chem. 182:1379 (1981), Zaplisky et al. Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)を参照すればよい）、ヒドラジド（例えば、Andresz et al. Makromol. Chem. 179:301 (1978)を参照すればよい）、スクシニミジルプロピオネートおよびスクシニミジルブタノエート（例えば、Olson et al. in Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp 170-181, Harris & Zaplisky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997を参照すればよく；また、米国特許第5,672,662号を参照すればよい）、スクシニミジルスクシネート（例えば、Abuchowski et al. Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984)およびJoppich et al. Macromol. Chem. 180:1381 (1979)を参照すればよい）、スクシニミジルエステル（例えば、米国特許第4,670,417号を参照すればよい）、ベンゾトリアゾールカルボネート（例えば、米国特許第5,650,234号を参照すればよい）、グリシジルエステル（例えば、Pitha et al. Eur. J Biochem. 94:11 (1979)、Elling et al., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991)を参照すればよい）、オキシカルボニルイミダゾール（例えば、Beauchamp, et al., Anal. Biochem. 131:25 (1983), Tondelli et al. J. Controlled Release 1:251 (1985)を参照すればよい）、p-ニトロフェニルカルボネート（例えば、Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., 11: 141 (1985)；およびSartore et al., Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)を参照すればよい）、アルデヒド（例えば、Harris et al. J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984)、米国特許第5,824,784号、米国特許第5,252,714号を参照すればよい）、マレイミド（例えば、Goodson et al. Bio/Technology 8:343 (1990)、Romani et al. in Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)を参照すればよい）、オルトピリジル-ジスルフィド（例えば、Woghiren, et al. Bioconj. Chem. 4:314(1993)を参照すればよい）、アクリロール（例えば、Sawhney et al., Macromolecules, 26:581 (1993)を参照すればよい）、ビニルスルホン（例えば、米国特許第5,900,461号を参照すればよい）が挙げられるが、これらに限定されない。上述の参考文献および特許文献のすべては、参照によって本明細書に援用される。

20

30

40

【0572】

本発明のある実施形態において、本発明の重合体誘導体は、構造：  
 $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-N=N=N$   
 （ここで、

50

X は、上述のような官能基であり；  
n は、約 20 から約 4000 までである）  
を有している重合体骨格を含んでいる。

他の実施形態において、本発明の重合体誘導体は、構造：



(ここで、

W は、1 - 10 の炭素原子を備える脂肪族または芳香族の連結部分であり；

n は、約 20 から約 4000 までであり；

X は、上述のような官能基である)

を有している重合体骨格を含んでいる。m は 1 および 10 の間である。

10

#### 【0573】

本発明のアジド含有の PEG 誘導体は、当該技術において公知の種々の方法および / または本明細書に開示されている種々の方法によって調製され得る。以下に示されている 1 つの方法において、約 800 Da から約 100000 Da までの平均分子量を有している水溶性重合体骨格であり、第 1 の官能基に対して結合される第 1 の末端および好適な脱離基に対して結合される第 2 の末端を有する重合体骨格は、アジドアニオン (好適な対イオン (ナトリウム、カリウム、および tert ブチルアンモニウムなどが挙げられる) と対にされ得る) と反応させられる。脱離基は、求核置換を受け、アジド部分によって置換され、所望のアジド含有 PEG 重合体を生じる。

#### 【0574】

20



に示されているように、本発明における使用に好適な重合体骨格は、式 X - PEG - L (ここで、PEG はポリ (エチレングリコール) であり、X はアジド基と反応しない官能基であり、L は好適な脱離基である) を有している。好適な官能基の例としては、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、アセタール、アルケニル、アミン、アミノオキシ、保護されたアミン、保護されたヒドラジド、保護されたチオール、カルボキシル酸、保護されたカルボキシル酸、マレイミド、ジチオピリジン、ビニルピリジン、およびケトンが挙げられるが、これらに限定されない。好適な脱離基の例としては、塩化物、臭化物、ヨウ化物、メシレート、トレシレート、およびトシレートが挙げられるが、これらに限定されない。

30

#### 【0575】

本発明のアジド含有重合体の誘導体を調製する他の方法において、アジド官能基を有している結合剤は、約 800 Da から約 100000 Da までの平均分子量を有している水溶性の重合体骨格と接触させられ、ここで、上記結合剤は、PEG 重合体における化学的な官能基と選択的に反応してアジド含有重合体の誘導体生成物を形成する化学的な官能基を有しており、ここで、アジドは、結合剤によって重合体骨格から離されている。

#### 【0576】

例示的な反応手順が、以下に示される：



(ここで、

PEG は、ポリ (エチレングリコール) であり、X は、アルコキシまたは上述のような官能基といったキャップ形成基であり；

M は、アジド官能基と反応しないが、N の官能基と効率的かつ選択的に反応する官能基である)。

40

#### 【0577】

好適な官能基の例としては、N がアミンである場合にカルボキシル酸、カルボネートまたは活性エステルである M；N がヒドラジドまたはアミノオキシ部分である場合にケトンである M；N が求核基である場合に脱離基である M が挙げられるが、これらに限定されない。

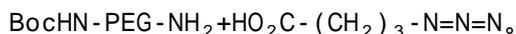
#### 【0578】

50

粗製生成物の精製は、公知の方法（必要に応じてクロマトグラフィーに続く生成物の沈殿が挙げられるが、これに限定されない）によって実現され得る。

【0579】

より詳細な例は、アミンの1つが *tert*-ブチル-Boc といった保護基部分によって保護され、結果として生じるモノ保護されたPEGジアミンが、アジド官能基を有している連結部分と反応させられるPEGジアミンの場合に関して、以下に示される：



【0580】

この場合に、アミン基は、種々の活性剤（例えば、チオニル塩化物もしくはカルボジイミド試薬、および *N*-ヒドロキシスクシニドもしくは *N*-ヒドロキシベンゾトリアゾール）を用いて、カルボキシル酸基と結合されて、モノアミンPEG誘導体とアジドを担持する連結部分との間にアミド結合を形成し得る。アミド結合の形成が成功した後に生じる、*N*-*tert*-ブチル-Boc-保護されたアジドを含んでいる誘導体は、生体活性分子を修飾するために直接的に使用され得るか、または他の有用な官能基を組み込むために、さらに合成され得る。例えば、*N*-*t*-Boc基は、強酸を用いた処理によって加水分解されて、*-*アミノ-PEG-アジドを生成する。生じるアミンは、合成の手がかりとして使用されて、有用な異種の二機能性試薬にとっての、マレイミド基、活性化ジスルフィド、および活性化エステルなどといった他の有用な官能基を組み込み得る。

10

【0581】

異種の二機能性誘導体は、重合体の末端のそれぞれと異なる分子を連結させることが所望される場合に特に有用である。例えば、*-N*-アミノ-*N*-アジドPEGは、活性化された求核基（例えば、アルデヒド、ケトンおよび活性化カルボネートなど）を有している分子の、PEGの1つの末端との連結、およびアセチレン基を有している分子の、PEGの他の末端との連結を可能にする。

20

【0582】

本発明の他の実施形態において、重合体誘導体は、構造：



（ここで、

*R* は、*H* もしくはアルキル、アルキレン、アルコキシ、またはアリールもしくは置換アリールであり得；

30

*B* は、存在し得るか、または存在しない場合があり得る連結部分であり；

*POLY* は、水溶性の非抗原性重合体であり；

*A* は、存在し得るか、または存在しない場合があり得、かつ *B* と同じであり得るか、または異なり得る連結部分であり；

*X* は、第2の官能基である）

を有している。

【0583】

*A* および *B* に関する連結部分の例は、18まで含有している多機能化アルキル基を含んでおり、より好ましくは1~10の炭素原子を含有しているが、これらに限定されない。異種原子（例えば、窒素、酸素または硫黄）は、アルキル鎖と共に含まれ得る。また、アルキル鎖は異種原子において分岐され得る。*A* および *B* に関する連結部分の例は、10まで含有している多機能化アルキル基を含んでおり、より好ましくは5~6の炭素原子を含有しているが、これらに限定されない。アリール基は、1つ以上の炭素原子、窒素原子、酸素原子または硫黄原子を用いて置換され得る。好適な連結基の他の例としては、参照によって本明細書にその全体が援用される、米国特許第5,932,462号、米国特許第5,643,575号および米国特許出願公開第2003/0143596号に記載されている連結基が挙げられる。当業者は、連結部分に関して以上に挙げたものが、決して網羅的なものではなく、かつ単に例示であること、および上述のような品質を有する連結部材料のすべてが、本発明における使用に好適であると考えられ得ることを認識する。

40

【0584】

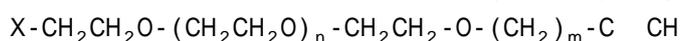
50

Xとしての利用に好適な官能基の例としては、ヒドロキシル、保護されたヒドロキシル、アルコキシル、活性化エステル（例えば、N-ヒドロキシスクシニミジルエステルおよび1-ベンゾトリアゾリルエステル）、活性なカルボネート（例えば、N-ヒドロキシスクシニミジルカルボネートおよび1-ベンゾトリアゾリルカルボネート）、アセタール、アルデヒド、アルデヒド水和物、アルケニル、アクリレート、メタクリレート、アクリルアミド、活性化スルホン、アミン、アミノオキシ、保護されたアミン、ヒドラジド、保護されたヒドラジド、保護されたチオール、カルボキシル酸、保護されたカルボキシル酸、イソシアネート、イソチオシアネート、マレイミド、ビニルスルホン、ジチオピリジン、ビニルピリジン、ヨードアセトアミド、エポキシド、グリオキサール、ジオン、メシレート、トシレート、およびトレシレート、アルケン、ケトン、およびアセチレンが挙げられる。理解されるように、選択されるX部分は、アセチレン基との反応が生じないように、アセチレン基と適合性であるべきである。また、アセチレン含有重合体の誘導体は、第2の官能基（すなわちX）は、アセチレン部分であることを意味する同種の二機能性であり得るか、または第2の官能基が異なる官能基であることを意味する異種の二機能性であり得る。

10

## 【0585】

本発明の他の実施形態において、重合体誘導体は、構造：



（ここで、

Xは、上述のような官能基であり；

nは、約20から約4000であり；

mは、1から10の間である）

を有している重合体骨格を含んでいる。異種の二機能性PEG重合体の詳細な例のそれぞれが以下に示される。

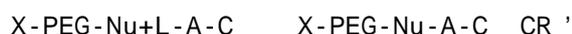
20

## 【0586】

本発明のアセチレン含有PEGの誘導体は、当業者に公知の方法および/または本明細書に開示されている方法を用いて調製され得る。1つの方法において、約800Daから約100000Daの平均分子量を有している水溶性重合体骨格であり、第1の官能基と結合される第1の末端、および好適な求核基と結合される第2の末端を有している当該重合体骨格は、PEGにおける求核基との反応に好適であるアセチレン基および脱離基の両方を有している化合物と反応させられる。求核部分を有しているPEG重合体および脱離基を有している分子が組み合せられると、脱離基は、求核置換を受け、求核部分によって置換され、所望のアセチレン含有重合体を生じる。

30

## 【0587】



に示されるように、反応における使用に好ましい重合体骨格は、式X-PEG-Nu（ここで、PEGはポリ（エチレングリコール）であり、Nuは求核部分であり、かつXはNu、Lまたはアセチレン官能基と反応しない官能基である）を有している。

## 【0588】

Nuの例としては、S<sub>N</sub>2-型の機序を介して主に反応するアミン、アルコキシ、アールオキシ、スルフィドリル、イミノ、カルボキシレート、ヒドラジド、アミノオキシ基が挙げられるが、これらに限定されない。Nuの付加的な例としては、求核付加反応を介して主に反応するこれらの官能基が挙げられる。L基の例としては、塩化物、臭化物、ヨウ化物、メシレート、トレシレート、トシレートおよび求核置換を受けると予想される他の基、ならびにケトン、アルデヒド、チオエステル、オレフィン、不飽和カルボニル基、カルボネートおよび求核基によって付加を受けると予想される他の求核性基が挙げられる。

40

## 【0589】

本発明の他の実施形態において、Aは、1~10の炭素原子の脂肪酸リンカー、または6~14の炭素原子の置換アリール環である。Xはアジド基と反応しない官能基であり、

50

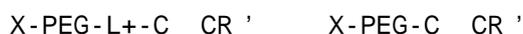
Lは好適な脱離基である。

【0590】

本発明のアセチレン含有重合体の誘導体を調製する他の方法において、約800Daから約10000Daの平均分子量を有しており、保護された官能基もしくはキャップ形成剤のいずれかを1つの末端に有しており、好適な脱離基を他方の末端に有しているPEG重合体は、アセチレンアニオンによって接触させられる。

【0591】

例示的な反応手順は、以下に示される：



(ここで、

PEGはポリ(エチレングリコール)であり、Xはキャップ形成基(例えば、アルコキシまたは上述のような官能基)であり；

R'は、H、アルキル、アルコキシ、アリールもしくはアリールオキシ基、または置換アルキル、置換アルコキシル、置換アリールもしくは置換アリールオキシ基のいずれかである)。

【0592】

上述の例において、脱離基Lは、十分な濃度のアセチレンアニオンと接触させられる場合に、SN2-型の置換を受けるために十分に反応性でなければならない。アセチレンアニオンによる脱離基のSN2置換の実現に求められる反応条件は、当業者に公知である。

【0593】

粗製生成物の精製は、当該分野に公知の方法(必要に応じて、クロマトグラフィーに続く沈殿が挙げられる)によって通常に実現され得るが、これに限定されない。

【0594】

水溶性重合体は本発明のpSTポリペプチドと連結され得る。水溶性重合体は、(1)天然にコードされていないアミノ酸もしくは天然にコードされるアミノ酸の任意の官能基もしくは置換基、またはpSTポリペプチドに組み込まれている天然にコードされていないアミノ酸、または(2)天然にコードされるアミノ酸に付加された任意の官能基もしくは置換基を介して連結され得る。代替的に、水溶性重合体は、天然に存在するアミノ酸(システイン、リジンまたはN末端残基のアミノ酸が挙げられるが、これらに限定されない)を介して、天然にコードされていないアミノ酸を組み込んでいるpSTポリペプチドと連結され得る。いくつかの場合に、本発明のpSTポリペプチドは、1、3、4、5、6、7、8、9、10の非天然アミノ酸を含んでおり、ここで、天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上は、(複数の)水溶性重合体(PEGおよび/またはオリゴ糖が挙げられるが、これらに限定されない)と連結される。いくつかの場合に、本発明のpSTポリペプチドは、水溶性重合体と連結された1、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上の天然にコードされていないアミノ酸をさらに含んでいる。いくつかの場合に、本発明のpSTポリペプチドは、水溶性重合体と連結された天然にコードされていないアミノ酸の1つ以上、および水溶性重合体と連結された天然に存在するアミノ酸の1つ以上を含んでいる。いくつかの場合に、本発明に使用される水溶性重合体は、その非抱合形態と比べて、pSTポリペプチドの半減期を延長させる。

【0595】

本発明のpSTポリペプチドと連結される水溶性重合体の数(すなわちPEG付加または糖鎖付加の程度)は、変更された(増強されたか、または低減されたが挙げられるが、これらに限定されない)薬理的特性、薬物動態的特性、または薬力学特性(例えばインピボにおける半減期)を与えるために調節され得る。いくつかの実施形態において、pSTの半減期は、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90パーセント、2倍、5倍、10倍、50倍、または少なくとも約100倍に、非修飾のポリペプチドを超えて延長される。

【0596】

(強い求核性基(すなわちヒドラジド、ヒドラジン、ヒドロキシアミンまたはセミカル

10

20

30

40

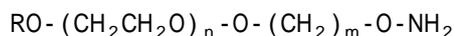
50

バジド)を含んでいるPEG誘導体)

本発明の一実施形態において、カルボニルを含有している天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドは、PEG骨格と直接的に連結されている末端のヒドラジン、ヒドロキシアミン、ヒドラジドまたはセミカルバジド部分を含んでいるPEG誘導体を用いて修飾されている。

【0597】

いくつかの実施形態において、ヒドロキシルアミン末端PEG誘導体は、構造：

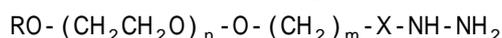


(ここで、Rは単純なアルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、mは2~10であり、nは、100~1000である(すなわち、平均分子量は5~40kDaの間である))

を有している。

【0598】

いくつかの実施形態において、ヒドラジン含有のPEG誘導体またはヒドラジド含有のPEG誘導体は、構造：

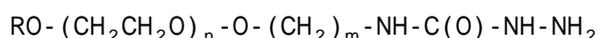


(ここで、Rは単純なアルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、mは2~10であり、nは100~1000であり、Xは任意に、存在し得るか、または存在しない場合があり得るカルボニル基(C=O)である)

を有している。

【0599】

いくつかの実施形態において、セミカルバジド含有のPEG誘導体は、構造：



(ここで、Rは、単純なアルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、mは2~10であり、nは100~1000である)

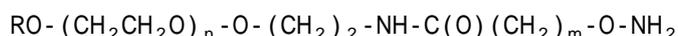
を有している。

【0600】

本発明の他の実施形態において、カルボニル含有アミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドは、アミド結合を用いてPEG骨格と連結されている末端のヒドロキシアミン、ヒドラジド、ヒドラジン、またはセミカルバジド部分を含んでいるPEG誘導体を用いて修飾されている。

【0601】

いくつかの実施形態において、ヒドロキシアミン末端PEG誘導体は、構造：

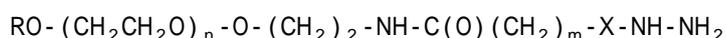


(ここで、Rは単純なアルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、mは2~10であり、nは100~1000である(すなわち、平均分子量は5~40kDaである))

を有している。

【0602】

いくつかの実施形態において、ヒドラジン含有のPEG誘導体またはヒドラジド含有のPEG誘導体は、構造：

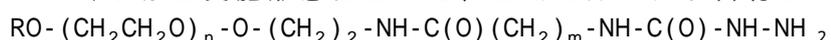


(ここで、Rは単純なアルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、mは2~10であり、nは100~1000であり、Xは、必要に応じて存在するか、または存在しない場合があり得るカルボニル基(C=O)である)

を有している。

【0603】

いくつかの実施形態において、セミカルバジド含有のPEG誘導体は、構造：



(ここで、Rは単純なアルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、mは2~10

10

20

30

40

50

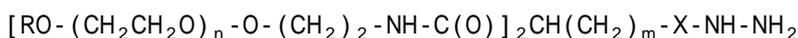
であり、 $n$ は100～1000である)  
を有している。

【0604】

本発明の他の実施形態において、カルボニル含有アミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドは、末端のヒドラジン、ヒドロキシアミン、ヒドラジドまたはセミカルバジド部分を含んでいる分枝鎖状のPEG(10～40kDa(より好ましくは、5～20kDaである)の範囲にある分子量を有している分枝鎖状のPEGのそれぞれの鎖を伴う)を用いて修飾されている。

【0605】

本発明の他の実施形態において、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドは、分枝鎖状の構造を有しているPEG誘導体を用いて修飾されている。例えば、いくつかの実施形態において、ヒドラジン末端PEG誘導体またはヒドラジド末端PEG誘導体は、以下の構造：

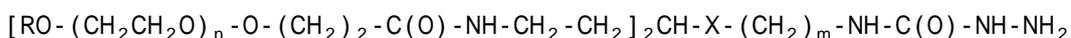


(ここで、Rは単純なアルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、 $m$ は2～10であり、 $n$ は100～1000であり、Xは任意に、存在し得るか、または存在しない場合があり得るカルボニル基(C=O)である)

を有している。

【0606】

いくつかの実施形態において、セミカルバジド基を含有するPEG誘導体は、構造：

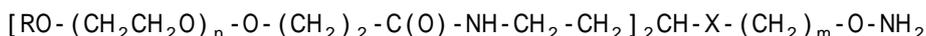


(ここで、Rは単純なアルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、Xは任意にNH、O、S、C(O)であるか、または存在せず、 $m$ は2～10であり、 $n$ は100～1000である)

を有している。

【0607】

いくつかの実施形態において、ヒドロキシアミン基を含有しているPEG誘導体は、構造：



(ここで、Rは単純なアルキル(メチル、エチル、プロピルなど)であり、Xは任意にNH、O、S、C(O)であるか、または存在せず、 $m$ は2～10であり、 $n$ は100～1000である)

を有している。

【0608】

水溶性重合体がpSTポリペプチドと連結される程度および部位は、pSTポリペプチド受容体のSite1とのpSTポリペプチドの結合を調節し得る。いくつかの実施形態において、連結は、平衡化結合アッセイ(例えば、hGHについてSpencer et al., J. Biol. Chem., 263:7862-7867 (1988)に記載の通りである)によって測定されるときに約400nM以下の $K_d$ 、150nM以下の $K_d$ 、いくつかの場合に100nM以下の $K_d$ を有して、pSTポリペプチドがpSTポリペプチド受容体に結合するように配置される。

【0609】

重合体の活性化およびペプチドの抱合に関する方法および化学反応は、文献に記載されており、当該技術において公知である。重合体の活性化のために通常に使用される方法としては、シアン、臭化物、過ヨウ素酸塩、グルタルアルデヒド、ピエポキシド、エピクロロヒドリン、ジビニルスルホン、カルボジイミド、ハロゲン化スルホニル、トリクロロトリアジンなどを有している官能基の活性化が挙げられるが、これらに限定されない(R. F. Taylor, (1991), PROTEIN IMMOBILISATION. FUNDAMENTAL AND APPLICATIONS, Marcel Dekker, N.Y.; S. S. Wong, (1992), CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSSLINKING, CRC Press, Boca Raton; G. T. Hermanson et al., (1993), IMMOBILIZED AFFINITY LIGAND TECHNIQUES, Academic Press, N.Y.; Dunn, R.L., et al., Eds. POLYMERIC DRUG

10

20

30

40

50

S AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991を参照すればよい)。

【0610】

PEGの官能性化および抱合に関する種々の総説および研究論文が利用可能である。例えば、Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325-373 (1985); Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987); Wong et al., *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866-874 (1992); Delgado et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249-304 (1992); Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150-165 (1995)を参照すればよい。

【0611】

また、重合体を活性化する方法は、国際公開第94/17039号、米国特許第5,324,844号、国際公開第94/18247号、国際公開第94/04193号、米国特許第5,219,564号、米国特許第5,122,614号、国際公開第90/13540号、米国特許第5,281,698号、およびさらに国際公開第93/15189号に見出され得、かつ活性化重合体と酵素(凝結因子VII(国際公開第94/15625号)、ヘモグロビン(国際公開第94/09027号)、酸素運搬タンパク質(米国特許第4,412,989号)、リボヌクレアーゼおよび超酸化物不均化酵素(Veronese et al., *App. Biochem. Biotech.* 11: 141-45 (1985))が挙げられるが、これらに限定されない)との間における抱合に関して見出され得る。

【0612】

天然にコードされていないアミノ酸(例えば、p-アジド-L-フェニルアラニン)を含んでいるpSTポリペプチドのPEG付加(すなわち任意の水溶性重合体の付加)は、任意の従来の方法によって実施される。例えば、pSTポリペプチドはアルキン末端mPEG誘導体を用いて修飾される。簡単に言うと、過剰のmPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CHが、室温において攪拌しながらp-アジド-L-Phe含有pSTの水性溶液に加えられる。典型的に、水性溶液は、反応が実施されるべきpH(一般的に約pH4~10)に近いpK<sub>a</sub>を有する緩衝液を用いて緩衝化される。pH7.5におけるPEG付加に好適な緩衝液の例としては、例えば、HEPES、リン酸塩、ホウ酸塩、TRIS-HCl、EPPSおよびTESが挙げられるが、これらに限定されない。pHは、継続的に観察され、必要に応じて調節される。反応は放置されて、典型的に1~48時間にわたって継続される。

【0613】

反応生成物は、続いて疎水性相互作用クロマトグラフィーにかけられて、遊離mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CH、およびにブロックされていないPEGが分子の両方の末端において活性化される場合に形成し、これによってpSTポリペプチドバリエーション分子を架橋し得るPEG化pSTポリペプチドの任意の高分子量複合体から、PEG付加pSTポリペプチドバリエーションを分離する。疎水性相互作用クロマトグラフィーの条件は、遊離mPEG(5000)-O-CH<sub>2</sub>-C≡CHがカラムを通過する一方で、PEG付加pSTポリペプチドバリエーション複合体が、1つ以上のPEG基に抱合された1つのpSTポリペプチドバリエーション分子を含んでいる所望の形態の後に溶出するような条件である。好適な条件は、所望の抱合物に対する架橋化複合体の相対的な大きさに依存して変わり、当業者によって容易に決定される。所望の抱合物を含んでいる溶出物は、限外ろ過によって濃縮され、ダイアフィルトレーションによって脱塩化される。

【0614】

必要に応じて、疎水性相互作用クロマトグラフィーから得られたPEG付加pSTポリペプチドは、当業者に公知の1つ以上の手法(アフィニティークロマトグラフィー;アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー(DEAE SEPHAROSEを用いる、が挙げられるが、これに限定されない);シリカ上におけるクロマトグラフィー;逆相HPLC;ゲルろ過(SEPHADEX G-75を用いる、が挙げられるが、これらに限定されない);疎水性相互作用クロマトグラフィー;サイズ排除クロマトグラフィー、金属キレートクロマトグラフィー;限外ろ過/ダイアフィルトレーション;エタノール沈殿;硫酸アンモニウム沈殿;等

10

20

30

40

50

電点電気泳動；置換クロマトグラフィー；電気泳動手法（分離用の等電点電気泳動が挙げられるが、これに限定されない）、差別的可溶性（硫酸アンモニウム沈殿が挙げられるが、これに限定されない）、または抽出が挙げられるが、これらに限定されない）によってさらに精製され得る。見かけの分子量は、球状タンパク質標準との比較によるGPCによって、見積もられ得る（Preneta, AZ in PROTEIN PURIFICATION METHODS, A PRACTICAL APPROACH (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306)。p S T - P E G 抱合物は、タンパク質分解（トリプシン切断が挙げられるが、これに限定されない）に続く質量分析によって評価され得る。Pepinsky B., et al., J. Pharmacol. & Exp. Ther. 297(3):1059-66 (2001)。

## 【0615】

10

本発明のp S Tポリペプチドのアミノ酸に連結された水溶性重合体は、制限されることなく、さらに誘導体化され得るか、または置換され得る。

## 【0616】

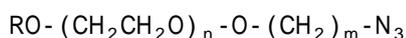
（アジド含有のPEG誘導体）

本発明の他の実施形態において、p S Tポリペプチドは、天然にコードされていないアミノ酸の側鎖に存在するアルキン部分と反応するアジド部分を含んでいるPEG誘導体を用いて、修飾されている。一般的に、PEG誘導体は、1～100kDaを有しており、いくつかの実施形態において10～40kDaの範囲にある平均分子量を有している。

## 【0617】

いくつかの実施形態において、アジド末端PEG誘導体は、構造：

20

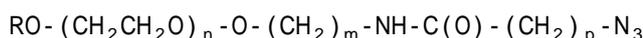


（ここで、Rは単純なアルキル（メチル、エチル、プロピルなど）であり、mは2～10であり、nは100～1000である（すなわち、平均分子量は5～40kDaの間である））

を有している。

## 【0618】

他の実施形態において、アジド末端PEG誘導体は、構造：



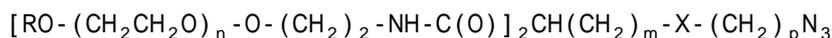
（ここで、Rは単純なアルキル（メチル、エチル、プロピルなど）であり、mは2～10であり、pは2～10であり、nは100～1000である（すなわち、平均分子量は5～40kDaの間である））

30

を有している。

## 【0619】

本発明の他の実施形態において、アルキン含有アミノ酸を含んでいるp S Tポリペプチドは、末端アジド部分を含んでいる分枝鎖状のPEG誘導体（10～40kDa、およびより好ましくは5～20kDaの範囲にある分子量を有する分枝鎖状のPEGのそれぞれの鎖を伴う）を用いて修飾されている。例えば、いくつかの実施形態において、アジド末端PEG誘導体は、以下の構造：



（ここで、Rは単純なアルキル（メチル、エチル、プロピルなど）であり、mは2～10であり、pは2～10であり、nは100～1000であり、かつXは任意に、いずれの場合においても存在し得るか、または存在し得ない、O、N、Sまたはカルボニル基（C=O）である）

40

を有している。

## 【0620】

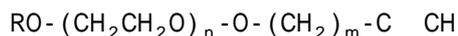
（アルキン含有のPEG誘導体）

本発明の他の実施形態において、p S Tポリペプチドは、天然にコードされていないアミノ酸の側鎖に存在するアジド部分と反応するアルキン部分を含んでいるPEG誘導体を用いて、修飾されている。

## 【0621】

50

いくつかの実施形態において、アルキン末端 PEG 誘導体は、以下の構造：



(ここで、R は単純なアルキル (メチル、エチル、プロピルなど) であり、m は 2 ~ 10 であり、n は 100 ~ 1000 である (すなわち、平均分子量は 5 ~ 40 kDa の間である))

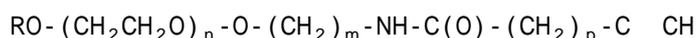
を有している。

【0622】

本発明の他の実施形態において、アルキンを含んでいる天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる pST ポリペプチドは、アミド結合を用いて PEG と連結される末端のアジドまたは末端のアルキン部分を含んでいる PEG 誘導体を用いて、修飾されている。

【0623】

いくつかの実施形態において、アルキン末端 PEG 誘導体は、以下の構造：

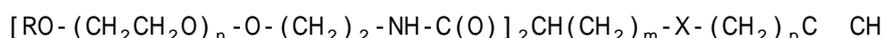


(ここで、R は単純なアルキル (メチル、エチル、プロピルなど) であり、m は 2 ~ 10 であり、p は 2 ~ 10 であり、n は 100 ~ 1000 である)

を有している。

【0624】

本発明の他の実施形態において、アジド含有アミノ酸を含んでいる pST ポリペプチドは、末端のアルキン部分を含んでいる分枝鎖状の PEG 誘導体 (10 ~ 40 kDa、およびより好ましくは 5 ~ 20 kDa の範囲にある分子量を有している分枝鎖状の PEG のそれぞれの鎖を伴う) を用いて修飾されている。例えば、いくつかの実施形態において、アルキン末端 PEG 誘導体は、以下の構造：



(ここで、R は単純なアルキル (メチル、エチル、プロピルなど) であり、m は 2 ~ 10 であり、p は 2 ~ 10 であり、n は 100 ~ 1000 であり、かつ X は O、N、S またはカルボニル基 (C=O) であるか、または存在しない)

を有している。

【0625】

(ホスフィン含有の PEG 誘導体)

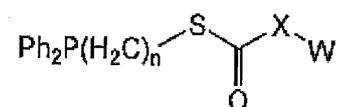
本発明の他の実施形態において、pST ポリペプチドは、活性化官能基 (エステル、カルボネートが挙げられるが、これらに限定されない) を含有しており、天然にコードされていないアミノ酸の側鎖に存在するアジド部分と反応するアリールホスフィン基をさらに含んでいる PEG 誘導体を用いて、修飾されている。一般的に、PEG 誘導体は、1 ~ 100 kDa、いくつかの実施形態において 10 ~ 40 kDa の範囲の平均分子量を有している。

【0626】

いくつかの実施形態において、PEG 誘導体は、構造：

【0627】

【化47】



【0628】

(ここで、n は 1 ~ 10 であり、X は O、N または S であり得るか、または存在しない場合があり得、Ph はフェニルであり、かつ W は水溶性重合体である)

を有している。

【0629】

いくつかの実施形態において、PEG 誘導体は、構造：

【0630】

10

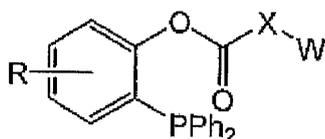
20

30

40

50

## 【化 4 8】



## 【0631】

(ここで、Xは、O、NまたはSであるか、または存在せず、Phはフェニルであり、Wは水溶性重合体であり、RはH、アルキル、アリール、置換アルキルおよび置換アリール基であり得る)を有している。例示的なR基としては、 $-\text{CH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{OR}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{SR}'$ 、ハロゲン、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{CN}$ および $-\text{NO}_2$ が挙げられるが、これらに限定されない。R'、R''、R'''およびR''''は互いに独立して、水素、置換もしくは非置換のヘテロアルキル、置換もしくは非置換のアリール(1-3のハロゲンを用いて置換されているアリールが挙げられるが、これらに限定されない)、置換もしくは非置換のアルキル、アルコキシもしくはチオアルコキシ、またはアルキルアリール基を指す。本発明の化合物が1つ以上のR基を含んでいる場合に、例えば、R基のそれぞれは独立して、2つ以上のこれらの基が存在する場合に、R'、R''、R'''およびR''''のそれぞれであるように選択される。R'およびR''が同じ窒素原子に連結される場合に、それらは、窒素原子と組み合わせさせて、5-、6-または7-員環を形成し得る。例えば、 $-\text{NR}'\text{R}''$ は、1-ピロリジニルおよび4-モルホリニルを包含することを意図されているが、これらに限定されない。置換基の上述の議論から、当業者は、“アルキル”という用語が、水素基以外の基(例えば、ハロアルキル( $-\text{CF}_3$ および $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ )が挙げられるが、これらに限定されない)およびアシル( $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$ 、および $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$ などが挙げられるが、これらに限定されない)と結合される炭素原子を含めた基を包含していることを理解する。

10

20

## 【0632】

(他のPEG誘導体および一般的なPEG付加技術)

pSTポリペプチドと連結され得る他の例示的なPEG分子だけでなく、PEG付加方法としては、例えば、参照によって本明細書に援用される、米国特許出願公開第2004/0001838号；米国特許出願公開第2002/0052009号；米国特許出願公開第2003/0162949号；米国特許出願公開第2004/0013637号；米国特許出願公開第2003/0228274号；米国特許出願公開第2003/0220447号；米国特許出願公開第2003/0158333号；米国特許出願公開第2003/0143596号；米国特許出願公開第2003/0114647号；米国特許出願公開第2003/0105275号；米国特許出願公開第2003/0105224号；米国特許出願公開第2003/0023023号；米国特許出願公開第2002/0156047号；米国特許出願公開第2002/0099133号；米国特許出願公開第2002/0086939号；米国特許出願公開第2002/0082345号；米国特許出願公開第2002/0072573号；米国特許出願公開第2002/0052430号；米国特許出願公開第2002/0040076号；米国特許出願公開第2002/0037949号；米国特許出願公開第2002/0002250号；米国特許出願公開第2001/0056171号；米国特許出願公開第2001/0044526号；米国特許出願公開第2001/0027217；米国特許出願公開第2001/0021763号；米国特許第6,646,110号；米国特許第5,824,778号；米国特許第5,476,653号；米国特許第5,219,564号；米国特許第5,629,384号；米国特許第5,736,625号；米国特許第4,902,502号；米国特許第5,281,698号；米国特許第5,122,614号；米国特許第5,473,034号；米国特許第5,516,673号；米国特許第5,382,657号；米国特許第6,

30

40

50

552, 167号; 米国特許第6, 610, 281号; 米国特許第6, 515, 100号; 米国特許第6, 461, 603号; 米国特許第6, 436, 386号; 米国特許第6, 214, 966号; 米国特許第5, 990, 237号; 米国特許第5, 900, 461号; 米国特許第5, 739, 208号; 米国特許第5, 672, 662号; 米国特許第5, 446, 090号; 米国特許第5, 808, 096号; 米国特許第5, 612, 460号; 米国特許第5, 324, 844号; 米国特許第5, 252, 714号; 米国特許第6, 420, 339号; 米国特許第6, 201, 072号; 米国特許第6, 451, 346号; 米国特許第6, 306, 821号; 米国特許第5, 559, 213号; 米国特許第5, 612, 460号; 米国特許第5, 747, 646号; 米国特許第5, 834, 594号; 米国特許第5, 849, 860号; 米国特許第5, 980, 948号; 米国特許第6, 004, 573号; 米国特許第6, 129, 912号; 国際公開第97/32607号、欧州特許出願公開第229, 108号、欧州特許出願公開第402, 378号、国際公開第92/16555号、国際公開第94/04193号、国際公開第94/14758号、国際公開第94/17039号、国際公開第94/18247号、国際公開第94/28024号、国際公開第95/00162号、国際公開第95/11924, WO95/13090号、国際公開第95/33490号、国際公開第96/00080号、国際公開第97/18832号、国際公開第98/41562号、国際公開第98/48837号、国際公開第99/32134号、国際公開第99/32139号、国際公開第99/32140号、国際公開第96/40791号、国際公開第98/32466号、国際公開第95/06058号、欧州特許出願公開第439, 508号、国際公開第97/03106号、国際公開第96/21469号、国際公開第95/13312号、欧州特許出願公開第921, 131号、国際公開第98/05363号、欧州特許出願公開第809, 996号、国際公開第96/41813号、国際公開第96/07670号、欧州特許出願公開第605, 963号、欧州特許出願公開第510, 356号、欧州特許出願公開第400, 472号、欧州特許出願公開第183, 503号および欧州特許出願公開第154, 316号に記載されているそれらが挙げられる。本明細書に記載のPEG分子のいずれもが、任意の形態(単鎖、分枝状鎖、マルチアーム鎖、単官能性、二機能性、多機能性、またはこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない)において使用され得る。

10

20

30

#### 【0633】

付加的な重合体およびPEG誘導体(ヒドロキシアミン(アミノオキシ)PEG誘導体が挙げられるが、これらに限定されない)について、参照によってその全体が本明細書に援用される以下の特許文献: 米国特許出願公開第2006/0194256号; 米国特許出願公開第2006/0217532号; 米国特許出願公開第2006/0217289号; 米国仮特許出願第60/755, 338号; 米国仮特許出願第60/755, 711号; 米国仮特許出願第60/755, 018号; 国際特許出願第PCT/US06/49397号; 国際公開第2006/069246号; 米国仮特許出願第60/743, 041号; 米国仮特許出願第60/743, 040号; 国際特許出願第PCT/US06/47822号; 米国仮特許出願第60/882, 819号; 米国仮特許出願第60/882, 500; および米国仮特許出願第60/870, 594号に記載されている。

40

#### 【0634】

##### 異種のFc融合タンパク質

上述のpST化合物は、免疫グロブリンのFc部分と、直接的にか、またはペプチドリンカーを介して融合され得る。免疫グロブリンは、ジスルフィド結合によって互いに保持されるポリペプチド鎖を含んでいる、一般に2つの軽鎖および2つの重鎖を有している分子である。鎖のそれぞれにおいて、1つのドメイン(V)は、分子の抗体特異性に依存する可変性のアミノ酸配列を有している。他のドメイン(C)は、同じ分類の分子に共通するかなり定常性のアミノ酸配列を有している。

#### 【0635】

本明細書に使用されるとき、免疫グロブリンのFc部分は、免疫学分野における用語

50

に共通して与えられている意味を有する。特にこの用語は、抗体から2つの抗原結合領域（F a b断片）を除去することによって得られる抗体断片を指す。F a b断片を除去する1つの方法は、パインプロテアーゼを用いて免疫グロブリンを消化することである。したがって、F c部分は、両方の重鎖に由来する定常領域のおよそ等しい大きさの断片から形成される。ここで、両方の重鎖は、非共有結合的な相互作用およびジスルフィド結合を介して会合している。F c部分は、ヒンジ領域、C H 2ドメインおよびC H 3ドメインを介した抗体に対する伸張を有している。ヒトおよびマウスにおける代表的なヒンジ領域は、その教示内容が参照によって本明細書に組み込まれる、Antibody Engineering, A Practical Guide, Borrebaeck, C. A. K., ed., W. H. Freeman and Co., 1992に見出され得る。F c部分は1つ以上の糖鎖付加部位をさらに含んでいる。ヒンジ領域、C H 2ドメインおよびC H 3ドメインを含んでいる多くの代表的なF c部分のアミノ酸配列は、当該分野に公知である。

10

**【0636】**

異なるエフェクター機能および薬物動態を有しているヒト免疫グロブリンのF c部分には5種類：I g G、I g A、I g M、I g DおよびI g Eが存在する。I g Gは血清中に豊富な免疫グロブリンである。また、I g Gは免疫グロブリンのいずれよりも血清中において最も長い半減期（23日）を有する。他の免疫グロブリンとは異なり、I g Gは、F c受容体との結合後に効率的に再循環される。4つのI g Gサブクラス：G 1、G 2、G 3およびG 4があり、それぞれが異なるエフェクター機能を有している。G 1、G 2およびG 3はC 1 qおよび結合補体と結合するが、G 4は結合できない。G 3はG 1よりもC 1 qと効率的に結合できるが、G 1は補体指向性の細胞溶解の媒介により有能である。G 2は補体との結合効率が非常に悪い。I g Gにおける結合部位はC H 2ドメインのカルボキシル末端に位置している。

20

**【0637】**

I g Gサブクラスのすべては、F c受容体（C D 1 6、C D 3 2、C D 6 4）と結合可能であり、G 1およびG 3がG 2およびG 4よりも効率的である。I g GのF c受容体結合領域は、C H 2ドメインのヒンジ領域およびカルボキシル末端領域の両方に位置する残基によって形成されている。

**【0638】**

I g Aは、J鎖によってともに保持されているモノマーおよびダイマーの形態の両方において存在する。I g Aは血清中に最も豊富に存在するが、その半減期はわずか6日間である。I g Aは3つエフェクター機能を有している。I g Aは、食作用および脱顆粒のそれぞれを促進する、マクロファージおよび好酸球上のI g A特異的受容体と結合する。また、I g Aは未知の代替経路を介して補体と結合する。

30

**【0639】**

I g Mは、ペントマーまたはヘキサマーのいずれか（いずれもJ鎖によって保持されている）として発現される。I g Mの半減期は5日間である。I g MはC H 3ドメインに位置する結合部位を介してC 1 qと弱く結合する。I g Dは血清中における半減期が3日間である。I g Dは、このI gが担っているエフェクター機能が何であるか明確になっていない。I g Eは2.5日間の半減期を有するモノマーI gである。I g Eは脱顆粒を促進し、炎症誘発性物質の放出を生じる2つのF c受容体と結合する。

40

**【0640】**

所望のインビボにおける効果に依存して、本発明の異種融合タンパク質は、上述のアイソタイプのいずれかを含み得るか、または変異F c領域を含み得る。ここで、補体および/またはF c受容体との結合機能が改変されている。したがって、本発明の異種融合タンパク質は、p S T化合物と融合された、免疫グロブリンのF c部分全体、免疫グロブリンのF c部分の断片、またはこれらの類似物を含み得る。

**【0641】**

本発明の融合タンパク質は、短鎖タンパク質または重鎖ポリペプチドからなり得る。2つ以上のF c融合タンパク質は、それらがF c領域の間に天然に形成されるジスルフィド

50

結合を介して相互作用するように、作製され得る。これらのマルチマーは、p S T化合物に対して異種であり得るか、またはそれらが融合タンパク質のF c部分のN末端と融合される異なるp S T化合物を含み得る。

#### 【0642】

融合タンパク質の最終的な構造と関係なく、F c領域またはF c様領域はN末端において融合されたp S T化合物のインビボ血漿半減期を延長するために機能する。また、本発明のp S T化合物は、p S Tの生物学的活性を少なくとも1つ維持しているべきである。治療半減期または循環半減期の向上は、本明細書に記載の方法または当該分野に公知の方法を用いて証明され得る。ここで、融合タンパク質の半減期は、p S T化合物単独の半減期と比較されている。生物学的活性は、当該分野に公知のインビトロ法およびインビボ法によって決定される。

10

#### 【0643】

タンパク質分解によって生成されるI g GのF c領域は、I g G分子およびF a b断片が急速に分解されるのと同様のインビボ半減期を有しているため、延長した半減期と関連する配列がC H 2ドメインおよび/またはC H 3ドメインに存在すると考えられる。さらに、親和性の高いF c受容体またはC 1 qと結合しないI g Gパリアントの分解速度は、親の野生型抗体の排除速度と識別できないことが、文献に示されている。これは、分解部位がF c受容体またはC 1 q結合と関連する部位とは異なることを示している(Wawrzynczak et al., (1992) *Molecular Immunology* 29:221)。マウスI g G領域を用いた部位特異的な変異生成の研究によって、分解速度を制御するI g G 1のF c領域の部位は、C H 2 - C H 3ドメインの接合域に位置していることが示唆された。F c領域は、癒合タンパク質の半減期を最適化するために分解部位において修飾され得る。本発明の融合タンパク質に使用されるF c領域は、I g G 1またはI g G 4のF c領域に由来し得、ヒンジ領域を含んでいるC H 2ドメインC H 3ドメインの両方を含み得る。

20

#### 【0644】

##### 異種のアルブミン融合タンパク質

本明細書に記載のp S Tは、アルブミンまたはこれらの類似物、断片、もしくは誘導体と、直接的に融合され得るか、またはペプチドリンカー、水溶性リンカー、もしくはプロドラッグリンカーを介して融合され得る。一般的に、本発明の融合タンパク質の一部であるアルブミンタンパク質は、任意の種(ヒトが挙げられる)からクローン化されたアルブミンに由来し得る。ヒト血清アルブミン(H S A)は、66500の分子量を有している、585アミノ酸の短鎖の非糖鎖付加ポリペプチド鎖からなる。ヒトH S Aのアミノ酸配列は公知である(参照によって本明細書に組み込まれる、See Meloun, et al. (1975) *FEBS Letters* 58:136; Behrens, et al. (1975) *Fed. Proc.* 34:591; Lawn, et al. (1981) *Nucleic Acids Research* 9:6102-6114; Minghetti, et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261:6747を参照すればよい)。アルブミンの種々の多形パリアントならびに類似物および断片について、Weitkamp, et al., (1973) *Ann. Hum. Genet.* 37:219に記載されている。例えば、欧州特許第322,094号におけるH S Aの短鎖形態。H S Aのこれらの断片のいくつか(H S A(1-338)、H S A(1-389)、ならびにH S A(1-419)および1-369と1-419との間の断片が挙げられる)が開示されている。欧州特許第399,666号には、H S A(1-177)、ならびにH S A(1-200)および1-177と1-200との間の断片を含むアルブミン断片が開示されている。

30

40

#### 【0645】

本発明の異種融合タンパク質が、任意のアルブミンタンパク質(断片、類似物および誘導体が挙げられる)と結合されているp S T化合物を含んでいることについて理解される。ここで、当該融合タンパク質が生物学的に活性であり、p S T化合物単独より長い血漿半減期を有している。したがって、融合タンパク質のアルブミン部分は、未処理のヒトアルブミンの半減期と等しい半減期を有している必要はない。所定の未処理のヒトアルブミンおよびp S T化合物の半減期に対して、より長い半減期または中間の半減期を有している断片、類似物および誘導体は、公知であるか、または生成され得る。

50

## 【0646】

本発明の異種融合タンパク質は、融合タンパク質の p S T 化合物および / または F c 部分もしくはアルブミン部分に保存的なアミノ酸置換を有している、タンパク質を包含している。“保存的な置換”は、同じ正味の電荷ならびにおよそ同じ大きさおよび形状を有している、他のアミノ酸を用いたアミノ酸の置換である。脂肪族または置換脂肪族のアミノ酸側鎖を有しているアミノ酸は、炭素原子および異種原子の総数が約 4 以下だけ異なる場合に、およそ同じ大きさを有する。それらは、それらの側鎖における分枝の数が 1 以下だけ異なる場合に、およそ同じ形状を有する。それらの側鎖にフェニル基または置換フェニル基を有するアミノ酸は、およそ同じ大きさおよび形状を有していると考えられる。本明細書において特に断りがなければ、保存的な置換は天然アミノ酸に対して好ましくなされる。

10

## 【0647】

野生型のアルブミンタンパク質および免疫グロブリンタンパク質は、種々の源から入手され得る。例えば、これらのタンパク質は、検出可能なレベルにおいて所定の m R N A を発現する組織または細胞から調製された c D N A ライブラリから入手され得る。ライブラリは、特に所望のタンパク質の公開された D N A 配列またはタンパク質を用いて設計されたプローブを用いてスクリーニングされ得る。例えば、免疫グロブリンの軽鎖または重鎖の定常領域について、Adams, et al. (1980) *Biochemistry* 19:2711-2719; Goughet, et al. (1980) *Biochemistry* 19:2702-2710; Dolby, et al. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:6027-6031 ; Rice et al. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:7862-7862; Falkner, et al. (1982) *Nature* 298:286-288; and Morrison, et al. (1984) *Ann. Rev. Immunol.* 2:239-256に記載されている。アルブミンのタンパク質配列および D N A 配列を開示しているいくつかの文献としては、Meloun, et al. (1975) *FEBS Letters* 58: 136 ; Behrens, et al. (1975) *Fed. Proc.* 34:591 ; Lawn, et al. (1981) *Nucleic Acids Research* 9:6102-6114; and Minghetti, et al. (1986) *J. Biol. Chem.* 261 :6747が挙げられる。

20

## 【0648】

本発明の異種融合タンパク質の性質決定

本発明の融合タンパク質を性質決定するための多くの方法が存在する。これらの方法のいくつかとしては、タンパク質染色法と組み合わせた S D S - P A G E または抗 I g G 抗体もしくは抗 H S A 抗体を用いた免疫プロットが挙げられるが、これらに限定されない。他の方法としては、例えば、マトリックス支援レーザーイオン化質量分析 ( M A L D I - M S )、液体クロマトグラフィー / 質量分析、等電点電気泳動、分析陰イオン交換クロマトグラフィー、円偏光二色性が挙げられる。

30

## 【0649】

血清アルブミンに対する親和性の増強

また、種々の生物学的に活性な分子は、本発明の p S T ポリペプチドと融合されて、生物学的に活性な分子の半減期を調節し得る。いくつかの実施形態において、分子が本発明の p S T ポリペプチドと連結されるか、または融合されて、動物における内因性の血清アルブミンに対する親和性を増強し得る。

40

## 【0650】

例えば、いくつかの場合に、p S T ポリペプチドおよびアルブミン結合配列の組換え融合物が作製される。例示的なアルブミン結合配列としては、ストレプトコッカスのタンパク質 G から得られるアルブミン結合ドメイン (例えば、Makrides et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277:534-542 (1996) および Sjolander et al., *J. Immunol. Methods* 201:115-123 (1997) を参照すればよい)、またはアルブミン結合ペプチド (例えば、Dennis, et al., *J. Biol. Chem.* 277:35035-35043 (2002) に記載のペプチドなど) が挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0651】

他の実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは脂肪酸を用いてアシル化される

50

。いくつかの場合に、脂肪酸は血清アルブミンに対する結合を促進する。例えば、Kurtzals, et al., Biochem. J. 312:725-731 (1995)を参照すればよい。

#### 【0652】

他の実施形態において、本発明のpSTポリペプチドは、血清アルブミン（ヒト血清アルブミンが挙げられるが、これに限定されない）と直接的に融合される。また、当業者であれば、広範な生物学的に活性な分子は、本発明におけるpSTと連結されて、血清アルブミンまたは他の血清成分との結合を調節し得ることを認識する。

#### 【0653】

##### X. pSTポリペプチドのグリコシル化

本発明は、糖付加残基を有している天然にコードされていない1つ以上のアミノ酸を組み込んでいる、pSTポリペプチドを包含している。糖付加残基は、天然（N-アセチルグルコサミンが挙げられるが、これに限定されない）、または非天然（3-フルオロガラクトースが挙げられるが、これに限定されない）であり得る。糖は、N型もしくはO型の糖鎖結合（N-アセチルガラクトース-L-セリンが挙げられるが、これに限定されない）、または非天然の結合（オキシムまたは対応するC型またはS型のグリコシドが挙げられるが、これらに限定されない）のいずれかによって、天然にコードされていないアミノ酸に連結され得る。

10

#### 【0654】

糖（グリコシルが挙げられるが、これに限定されない）部分は、インビボまたはインビトロにおいてpSTポリペプチドに付加され得る。本発明のいくつかの実施形態において、カルボニルを含んでいる天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドは、オキシム結合を介して対応する糖鎖付加ポリペプチドを生成するためのアミノオキシ基を有している糖誘導体を用いて修飾される。天然にコードされていないアミノ酸に連結されると、糖は、pSTポリペプチドに結合されるオリゴ糖を生成するための糖転移酵素および他の酵素を用いた処理によって、さらに合成され得る。例えば、H. Liu, et al. J. Am. Chem. Soc. 125: 1702-1703 (2003)を参照すればよい。

20

#### 【0655】

本発明のいくつかの実施形態において、カルボニルを含んでいる天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドは、アミノオキシ誘導体として調製される所定の構造を有しているグリカンを用いて、直接的に修飾される。当業者は、他の官能基（アジド、ヒドラジド、ヒドラジン、およびセミカルバジドが挙げられるが、これらに限定されない）が、天然にコードされていないアミノ酸との糖の連結に使用され得ることを認識する。

30

#### 【0656】

本発明のいくつかの実施形態において、アジドまたはアルキニルを含んでいる天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドは、それから、アルキニルまたはアジド誘導体のそれぞれ（限定されないが、これら挙げられる）を用いた、ヒュイゲン[3+2]環付加反応によって（限定されないが、これが挙げられる）、修飾される。この方法は、タンパク質が非常に高い選択性を有して修飾されることを可能にする。

40

#### 【0657】

##### XI. pSTポリペプチドの二量体および多量体

また、本発明は、pSTポリペプチドおよびpST類似物の組合せ（ホモ二量体、ヘテロ二量体、ホモ多量体またはヘテロ多量体（すなわち三量体、四量体など））を提供する。ここで、天然にコードされていない1つ以上のアミノ酸を含んでいるpSTは、pSTもしくはpSTのバリエーション、またはpSTもしくはpSTのバリエーションではない任意の他のポリペプチドと、ポリペプチド骨格に対して直接的にか、またはリンカーを介して結合されている。単量体と比べて増加しているその分子量に起因して、pSTの二量体または多量体の抱合物は、単量体のpSTに対して、新たな特性または所望の特性（異なる薬理作用、異なる薬物動態、異なる薬力学、調節されている治療半減期、または修飾されている血漿半減期が挙げられるが、これらに限定されない）を示し得る。いくつかの実施形

50

態において、本発明の p S T の二量体は、G H 受容体の二量体化を調節する。他の実施形態において、本発明の p S T の二量体または多量体は、受容体のアンタゴニスト、アゴニストまたは調節因子として作用する。

【0658】

いくつかの実施形態において、二量体または多量体を含んでいる p S T 分子に存在する 1 つ以上の p S T 分子は、水溶性重合体と連結されている天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる。

【0659】

いくつかの実施形態において、p S T ポリペプチドは、直接的に ( A s n - L y s のアミド結合または C y s - C y s のジスルフィド結合を介してが挙げられるが、これらに限定されない) 連結されている。いくつかの実施形態において、連結されている p S T ポリペプチドおよび / または連結されている p S T ではない分子は、二量体化を容易にする天然にコードされていない異なるアミノ酸を含んでいる。この例としては、第 1 の p S T ポリペプチドの天然にコードされていない 1 つのアミノ酸におけるアルキンおよび第 2 の p S T 分子の天然にコードされていない 1 つのアミノ酸におけるアジドがヒュイゲン [ 3 + 2 ] 環付加を介して抱合されていることが挙げられるが、これらに限定されない。代替的に、ケトンを含有している天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる第 1 の、p S T 分子および / または連結されている p S T ではない分子は、ヒドロキシアミンを含有している天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる第 2 のポリペプチドと抱合され得、これらのポリペプチドは対応するオキシムの形成を介して反応する。

【0660】

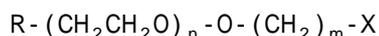
代替的に、2 つの p S T ポリペプチド、および / または連結されている p S T ではない分子は、リンカーを介して連結されている。任意のヘテロ - またはホモ - 二機能性リンカーを使用して、同じか、または異なる一次配列を有している、2 つの p S T ポリペプチドおよび / または連結されている p S T ではない分子を連結し得る。いくつかの実施形態において、p S T ポリペプチドおよび / または連結されている p S T ではない分子とともに使用されるリンカーは、二機能性の P E G 試薬であり得る。リンカーは広範な分子量または分子長を有し得る。より大きいまたはより小さい分子量のリンカーが使用されて、p S T および連結されている全体、p S T およびその受容体、またはもしあれば連結されている全体およびその結合パートナーの間における所望の空間関係または立体配置をもたらし得る。また、より長いまたはより短い分子長を有しているリンカーが使用されて、p S T および連結されている全体、またはもしあれば連結されている全体および結合パートナーの間における所望の空間または柔軟性をもたらし得る。

【0661】

いくつかの実施形態において、本発明は、ダンベル構造を有している二機能性の水溶性リンカーを提供する。当該ダンベル構造は、( a ) 重合体骨格の少なくとも第 1 の末端におけるアジド含有部分、アルキン含有部分、ヒドラジン含有部分、ヒドラジド含有部分、ヒドロキシアミン含有部分、またはカルボニル含有部分、ならびに ( b ) 重合体骨格の第 2 の末端における少なくとも第 2 の官能基を含んでいる。第 2 の官能基は、第 1 の官能基と同じであり得るか、または異なり得る。いくつかの実施形態において、第 2 の官能基は第 1 の官能基と反応性ではない。本発明は、いくつかの実施形態において、分枝鎖状の分子構造の少なくとも 1 つのアームを含んでいる水溶性化合物を提供する。例えば、分枝鎖状の分子構造は樹状であり得る。

【0662】

いくつかの実施形態において、本発明は、以下の構造：



(ここで、n は 5 ~ 3000 であり、m は 2 ~ 10 であり、X は、アジド含有部分、アルキン含有部分、ヒドラジン含有部分、ヒドラジド含有部分、アミノオキシ含有部分、ヒドロキシアミン含有部分、アセチル含有部分、またはカルボニル含有部分であり得、R は、X と同じであり得るか、または異なり得るキャップ基、官能基または脱離基である) を有

している活性化されている水溶性重合体との反応によって形成されている、1つ以上の p S T ポリペプチドを含んでいる多量体を提供する。R は、例えばヒドロキシル、保護されているヒドロキシル、アルコキシル、N - ヒドロキシスクシニミジルエステル、1 - ベンゾトリアゾールエステル、N - ヒドロキシスクシニミジルカルボネート、1 - ベンゾトリアゾイルカルボネート、アセタール、アルデヒド、アルデヒドヒドレート、アルケニル、アクリレート、メタクリレート、アクリルアミド、活性なスルホン、アミン、アミノオキシ、保護されているアミン、ヒドラジド、保護されているヒドラジド、保護されているチオール、カルボン酸、保護されているカルボン酸、イソシアネート、マレイミド、ビニルスルホン、ジチオピリジン、ビニルピリジン、ヨードアセトアミド、グリオキサール、ジオン、メシレート、トシレートおよびトレシレート、アルケン、およびケトンからなる群から選択される官能基であり得る。

10

## 【0663】

X I I . p S T ポリペプチドの活性および p S T 受容体に対する p S T の親和性の測定 p S T ポリペプチドの活性は、標準的な、または公知のインビトロまたはインビボのアッセイを用いて決定され得る。

## 【0664】

p S T ポリペプチドは、好中球における C D 1 1 a、C D 1 1 b、C D 1 1 c および / または C D 1 8 を上方制御するそれらの能力について分析され得る。この活性は、Hedari et al ( 上述されている ) によって説明されているような F A C S によって測定され得る。当業者にとって公知の好中球の活性を測定する付加的なアッセイとしては、L - セレクチンを測定するアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。他のアッセイが実施されて、本発明の p S T ポリペプチドによる細胞の増殖および / または分化を評価し得る。

20

## 【0665】

p S T ポリペプチドは受容体に対する結合能について分析され得る。例えば、成長ホルモンに応じて作動するか、または p S T と結合する細胞または細胞株 ( 活性な G H 受容体を含んでいる細胞 ( 例えば組換え G H 受容体産生細胞 ) が挙げられるが、これらに限定されない ) が使用されて、p S T 受容体結合を監視し得る。天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる非 P E G 付加または P E G 付加の p S T ポリペプチドについて、その受容体または他の p S T 受容体に対する p S T の親和性が、BIAcore biosensor ( 登録商標 ) ( Pharmacia ) を用いて測定され得る。好適な結合アッセイとしては、BIAcore biosensor ( Pearce et al., Biochemistry 38:81-89 (1999) ) および AlphaScreen ( 登録商標 ) アッセイ PerkinElmer ) が挙げられるが、これらに限定されない。AlphaScreen ( 登録商標 ) は、ビーズを用いた非放射線の発光近接アッセイであり、ドナーのビーズが 6 8 0 n m のレーザによって励起されて、一重項酸素を放出する。一重項酸素が拡散し、アクセプタのビーズ表面にあるチオキセン誘導体と反応して、~ 6 0 0 n m の蛍光放射を生じる。蛍光の放射は、ドナーおよびアクセプタのビーズが、互いがリガンドおよび受容体と結合される分子の相互作用によって非常に近接する場合にのみ生じる。このリガンド - 受容体の相互作用は受容体結合バリエーションを用いて競合され得、非結合バリエーションは競合しない。

30

## 【0666】

p S T ポリペプチドの活性は、標準的な、または公知のインビトロまたはインビボのアッセイを用いて決定され得る。

40

## 【0667】

本発明の p S T 類似物を生成するために使用される方法に関わらず、類似物は生物学的な活性についてのアッセイに供される。しかし、他の生物学的なアッセイが使用されて、所望の活性を確認し得る。Nicola, Ann.Rev. Biochem. 58: 45-77 (1989) を参照すればよい。生物学的活性に関する試験は、所望の結果に関する分析 ( 例えば、生物学的な活性の上昇または低下 ( 改変されていない p S T と比べて )、異なる生物学的活性 ( 改変されていない p S T と比べて )、受容体もしくは結合パートナーとの親和性分析、p S T 自身もしくはその受容体の立体配置もしくは構造の変化 ( 改変されていない p S T と比べて )、または血清半減期の分析 ) を準備すべきである。

50

## 【0668】

アッセイの方法論に関する参考文献の以上の記載は網羅的ではなく、当業者は所望の目的の結果を試験するために有用な他のアッセイを認識している。そのようなアッセイに対する変更は当業者にとって公知である。

## 【0669】

XIII. 有効性、機能的なインビボ半減期および薬物動態パラメータの測定

本発明の重要な局面は、水溶性重合体部分に対するポリペプチドの抱合を有しているか、または有していないb-GCSFポリペプチドの構築によって得られる、延長された生物学的半減期である。pSTポリペプチドの血中濃度の、投与後における急速な低下に起因して、抱合および非抱合のpSTポリペプチドおよびこれらのバリエーションを用いた処置に対する生物学的応答を評価することが重要である。本発明の抱合および非抱合のpSTポリペプチドおよびこれらのバリエーションは、投与の後においても血中半減期を延長し得ており、例えば、ELISA法および一次スクリーニングアッセイによる測定を可能にしている。市販のELISAキットまたはRIAキットを使用することが可能である。インビボにおける生物学的半減期の測定は、本明細書に記載の通りに実施される。

10

## 【0670】

天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドに関する薬物動態パラメータは、通常のおスのSprague Dawleyマウス（処理群ごとにN = 5の動物）において評価され得る。動物は、静脈内に25ug/ラットまたは皮下に50ug/ラットの単回用量のいずれかを受け、およそ5~7の血液試料が、予め決められた時間経過にしたがって（水溶性重合体と抱合されていない、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドに関して約6時間、および天然にコードされていないアミノ酸を含んでおり、水溶性重合体に抱合されているpSTポリペプチドに関して約4日の範囲に一般的に及ぶ）採取される。天然にコードされていないアミノ酸なしのpSTに関する薬物動態のデータは、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドについて得られたデータと直接的に比較され得る。

20

## 【0671】

pSTポリペプチドの薬物動態の試験は、マウス、ラットまたは霊長類（例えばカニクイザル）において実施され得る。典型的に皮下または血管内に単回注入され、血清中のpSTレベルが長期にわたって監視される。

30

## 【0672】

動物の健康、乳の生成、成長および他のパラメータを評価する方法は、当業者にとって公知である。本発明のpSTポリペプチドを評価するために使用され得る他のモデルは、当業者にとって公知である。

## 【0673】

XIV. 投与および薬学的組成物

本発明のポリペプチドまたはタンパク質（pST、合成酵素、1つ以上の非天然アミノ酸を含んでいるタンパク質などが挙げられるが、これらに限定されない）は、好適な薬学的担体と組み合わせて（限定されないが、これが挙げられる）、治療用途に任意に採用される。当該組成物は、例えば、治療有効量の化合物、および薬学的に受容可能な担体もしくは賦形剤を含んでいる。当該担体または賦形剤としては、生理食塩水、緩衝化生理食塩水、デキストロース、水、グリセロール、エタノール、および/またはこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。製剤は投与形態に合わせて作製される。一般的に、タンパク質を投与する方法は、当業者に公知であり、本発明のポリペプチドの投与に適用され得る。組成物は水溶性の形態（例えば薬学的に受容可能な塩（酸付加した塩および塩基付加した塩の両方が挙げられることを意味する）として存在している）であり得る。pSTの調合および投与は当業者に知られている方法によって行われる。硫酸イオン（例えば硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウム、硫酸マグネシウムおよびそれらの組合せ）、および緩衝薬（例えば酢酸塩、クエン酸塩、リン酸塩、HEPES、BES、TAPS、EPSPS、TESおよびそれらの混合物）を含んでいる塩が述べられている。

40

50

## 【0674】

本発明の1つ以上のポリペプチドを含んでいる治療組成物は、当業者に公知の方法にしたがって、有効性を確認し、用量を評価するために、疾患の1つ以上のインビトロおよび/またはインビボにおける動物モデルにおいて、任意に試験され得る。特に、用量は、天然アミノ酸の相同物に対する本明細書における非天然アミノ酸の活性、安定性または他の好適な測定（1つ以上の非天然アミノ酸を含めるために修飾されたpSTポリペプチドの、天然アミノ酸のpSTポリペプチドに対する比較、および修飾されて1つ以上の非天然アミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドの、現在、利用可能なpST処理との比較が挙げられるが、これらに限定されない）（すなわち比較アッセイ）によって最初に決定され得る。

10

## 【0675】

投与は、血液または組織細胞と最終的に接触する分子の導入において通常に使用される任意の経路による。本発明の非天然アミノ酸ポリペプチドは、1つ以上の薬学的に受容可能な担体を必要に応じてともなって、任意の好適な様式において投与される。本発明に関する当該ポリペプチドの患者に対する投与の好適な方法が利用可能であり、そして、2つ以上の経路が特定の組成物を投与するために使用されるが、特定の経路は、他の経路よりも即時のかつ効果的な作用または反応をしばしばもたらし得る。

## 【0676】

薬学的に受容可能な担体は、投与される特定の組成物によって、これと同様に組成物を投与するために使用される方法によって、部分的に決定される。したがって、本発明の薬学的組成物の広範な好適な製剤がある。

20

## 【0677】

本発明のpSTポリペプチドは、タンパク質またはペプチドにとって好適な任意の従来の経路（皮下もしくは静脈内、または注射もしくは注入の任意の他の形態が挙げられるが、これらに限定されない）によって投与され得る。ポリペプチド組成物は、多くの経路（経口、静脈内、腹腔内、筋肉内、経皮、皮下、局所、舌下、血管内、乳房内または直腸の手段が挙げられるが、これらに限定されない）によって投与され得る。また、修飾されているか、または非修飾の非天然アミノ酸ポリペプチドの組成物は、リポソームを介して投与され得る。当該投与経路および製剤は、当業者にとって公知である。pSTポリペプチドは、単独にか、または他の好適な成分（例えば薬学的担体）と組み合わせて使用され得る。pSTポリペプチドは他の薬剤または治療薬と合わせて使用され得る。

30

## 【0678】

また、単独の、または他の好適な組成物との組合せの、非天然アミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドは、吸入を介して投与されるためのエアロゾル製剤（すなわち、それらは“霧状化”され得る）に作製され得る。エアロゾル製剤は、圧縮可能な噴霧剤（例えば、ジクロロジフルオロメタン、プロパンおよび窒素など）に配合され得る。

## 【0679】

非経口投与（例えば、関節内（関節における）、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、および皮下の経路など）に好適な製剤としては、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤および意図される受容物の血液と等張な製剤にさせる溶液を含有できる水性および非水性の等張無菌注入溶液、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤、および防腐剤を含むことができる水性および非水性の無菌懸濁液が挙げられる。pSTの製剤は、容器（例えば、アンプルおよびバイアル）に密封された単回用量または多回用量において提供され得る。

40

## 【0680】

非経口投与および静脈内投与は好ましい投与方法である。特に、天然アミノ酸相同物治療に関してすでに使用中の投与の経路（EPO、GH、G-CSF、GM-CSF、IFN、インターロイキン、抗体、FGFおよび/または任意の他の薬学的送達タンパク質にとって使用される経路が挙げられるが、これらに限定されない）は、現在使用中の薬剤と共に、本発明のポリペプチドにとっての投与および製剤の好適な経路をもたらす。

## 【0681】

50

本発明に照らして、動物に投与される用量は、長期間にわたる動物に有益な治療応答、または他の好適な活性を示すために十分な用途に依存する量である。用量は、特定のベクターもしくは製剤の有効性、および採用される非天然アミノ酸ポリペプチドの安定性もしくは血中半減期、および患者の状態、これらと同様に処置される動物の体重または体表面積によって決定される。また、用量の大きさは、特定の動物における特定のベクターまたは製剤などの投与に付随する任意の副作用の存在、性質および程度によって決定される。

【0682】

疾患の処置または予防において投与されるベクターまたは製剤の有効量の決定において、獣医は、循環血漿濃度、製剤の毒性、疾患の進行、および/または(当該する場合に)抗非天然アミノ酸ポリペプチド抗体の産生を評価する。

10

【0683】

投与される用量は、典型的に、関連する組成物の変化されている活性または血中半減期に関して調節される、現在使用されている治療タンパク質の用量と等しい範囲にある。本発明のベクターまたは薬学的製剤は、任意の従来公知の療法(抗体投与、ワクチン投与、細胞毒性剤の投与、天然アミノ酸ポリペプチドの投与、核酸の投与、ヌクレオチド類似物の投与、および生体応答の調節剤の投与などが挙げられる)による障害の処置を補い得る。

【0684】

投与に関して、本発明の製剤は、関連製剤のLD-50もしくはED-50によって、および/または動物の集団および全体的な健康状態に対して適用されるような(これが挙げられるが、限定されない)、種々の条件における非天然アミノ酸ポリペプチドの任意の副作用の観察によって、決定される割合において投与される。投与は、単回用量または分けられた用量を介して達成され得る。

20

【0685】

製剤の注入を受ける動物が熱を出すか、寒気を覚えるか、または筋肉痛を覚える場合、動物は、適量のアスピリン、イブプロフェン、アセトアミノフェン、または他の痛覚/熱制御薬を受ける。注入に対する反作用(例えば、熱、筋肉痛、および悪寒)を経験する動物は、さらなる注入の30分前に、アスピリン、アセトアミノフェンまたは(これが挙げられるが、限定されない)ジフェンヒドラミン、または動物にとって適切な他の薬剤のいずれかを用いて前投与される。メペリジンは、解熱剤および抗ヒスタミン剤にすぐに反応しないひどい悪寒および筋肉痛に対して使用される。細胞注入は、反作用の重篤度に依存して速度を落とされるか、または中断される。

30

【0686】

本発明のpSTポリペプチドは、動物の対象に対して直接的に投与され得る。投与は、対象に対するpSTポリペプチドの導入において通常に使用される経路のうちのいずれかによる。本発明の実施形態に係るpSTポリペプチド組成物としては、経口、直腸、局所、吸入(エアロゾルを介した吸入が挙げられるが、これに限定されない)、頬側(舌下が挙げられるが、これに限定されない)、腔、非経口(皮下、筋肉内、皮内、関節内、胸膜内、腹腔内、大脳内、動脈内、胸膜内、または静脈内)が挙げられるが、これに限定されない)、局所(すなわち、皮膚および気道の表面を含む粘膜の表面の両方)、肺、眼内、鼻内および経皮の投与に好適なそれらが挙げられるが、所定の場合のいずれかにおける最も好適な経路は、処置される性質および重篤度に依存する。投与は、局所的であるか、または全身性であるかのいずれかであり得る。化合物の製剤は、容器(例えば、アンプルおよびバイアル)に密封された単回用量または多回用量に存在し得る。本発明のpSTポリペプチドは、薬学的に受容可能な担体を伴った、単回用量の形態(溶液、懸濁液、または乳液)が挙げられるが、これらに限定されない)における混合物に調製され得る。また、本発明のpSTポリペプチドは、連続的な注入(ミニポンプ(例えば浸透圧ポンプ))を用いた注入が挙げられるが、これに限定されない)、単回の大量瞬時投与、または緩徐に放出する徐放性製剤によって投与され得る。

40

【0687】

50

投与に好適な製剤としては、抗酸化剤、緩衝液、静菌剤、および製剤に等張性を与える溶液を含有できる水性および非水性の溶液、等張無菌溶液、ならびに懸濁剤、可溶化剤、増粘剤、安定化剤および防腐剤を含むことができる水性および非水性の無菌懸濁液が挙げられる。溶液および懸濁液は、これまでに記載したような、無菌の粉末、顆粒、および錠剤から調製され得る。

#### 【0688】

凍結乾燥は、所定のタンパク質調製物から水を除去する役割を果たす、タンパク質をもたらず技術において通常に採用される。凍結乾燥 (freeze-drying)、または凍結乾燥 (lyophilization) は、乾燥される物質がまず凍結され、それから氷または凍結した溶媒が真空条件における昇華によって除去される過程である。賦形剤は、凍結乾燥過程における安定性の上昇および/または保存状態における凍結乾燥生成物の安定性の向上を目的として、凍結乾燥前の製剤に含められ得る。Pikal, M. *Biopharm.* 3(9)26-30 (1990) および Arakawa et al. *Pharm. Res.* 8(3):285-291 (1991)。

10

#### 【0689】

また、製薬の噴霧乾燥は、当業者に公知である。例えば、Broadhead, J. et al., "The Spray Drying of Pharmaceuticals," in *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 18 (11 & 12), 1169-1206 (1992) を参照すればよい。小分子製薬に加えて、種々の生体物質は、噴霧乾燥されており、これらとしては、酵素、血清、血漿、微生物および酵母が挙げられる。噴霧乾燥は、1段階の過程において液体の製薬調製物を高純度の粉末、ほこりのない粉末、または凝集粉に転換できるので、有用な技術である。基本的な技術は、以下の4つの段階：(a) 供給溶液の水煙への霧状化；(b) 水煙 - 空気接触；(c) 水煙の乾燥；および (d) 乾燥空気からの乾燥生成物の分離を包含する。参照によって本明細書に援用される、米国特許第6,235,710号および米国特許第6,001,800号には、噴霧乾燥による組換えエリスロポエチンの調製物に関して記載されている。

20

#### 【0690】

本発明の薬学的組成物および製剤は、薬学的に受容可能な担体を含み得る。薬学的に受容可能な担体は、投与される特定の組成物によって、これと同様に、組成物の投与に使用される特定の方法によって、部分的に決定される。したがって、本発明の薬学的組成物の広範な好適な製剤 (薬学的に受容可能な担体、賦形剤、または安定化剤を任意に含む) がある (例えば、Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 17<sup>th</sup> ed. 1985) を参照すればよい)。

30

#### 【0691】

好適な担体としては、コハク酸塩、リン酸塩、ホウ酸塩、HEPES、クエン酸塩、ヒスチジン、イミダゾール、酢酸塩、重炭酸塩および他の有機酸を含有する緩衝液；抗酸化剤 (アスコルビン酸が挙げられるが、これに限定されない)；低分子量ポリペプチド (10残基未満のそれらが挙げられるが、これらに限定されない)；タンパク質 (血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリンが挙げられるが、これらに限定されない)；親水性ポリマー (ポリビニルピロリドンが挙げられるが、これに限定されない)；アミノ酸 (グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、ヒスチジンもしくはヒスチジン誘導体、メチオニン、グルタミン酸塩、またはリジンが挙げられるが、これらに限定されない)；単糖類、2糖類、他の糖 (トレハロース、スクロース、グルコース、マンノース、またはデキストリンが挙げられるが、これらに限定されない)；キレート剤 (EDTA およびエデントレート (edentate) 2ナトリウムが挙げられるが、これらに限定されない)；2価の金属イオン (亜鉛、コバルト、または銅が挙げられるが、これらに限定されない)；糖アルコール (マンニトールまたはソルビトールが挙げられるが、これらに限定されない)；塩形成対イオン (ナトリウムおよび塩化ナトリウムが挙げられるが、これらに限定されない)；微結晶性セルロース、ラクトース、コーンスターチおよび他のスターチといった充填剤；甘味剤および香料添加剤；着色剤；および/または非イオン性界面活性剤 (Tween (商標) (Tween 80 (ポリソルベート 80) および Tween 20 (ポリソルベート 20) が挙げられるが、これらに限定されない)、Pluronic (商標) ならびに他のブルコ

40

50

ン酸（プルロン酸 F 8 6（ポロオキサマー（poloxamer）1 8 8）が挙げられるが、これに限定されない）または P E G が挙げられるが、これらに限定されない）が挙げられるが、これらに限定されない。好適な界面活性剤としては、例えば、ポリ（エチレンオキシド）-ポリ（プロピレンオキシド）-ポリ（エチレンオキシド）（すなわち、（P E O - P P O - P E O））、またはポリ（プロピレンオキシド）-ポリ（エチレンオキシド）-ポリ（プロピレンオキシド）（すなわち、（P P O - P E O - P P O））、またはこれらの組合せに基づいたポリエーテルが挙げられるが、これらに限定されない。P E O - P P O - P E O および P P O - P E O - P P O は、Pluronic（商標）、R-Pluronic（商標）、Tetronic（商標）および R-Tetronic（商標）（B A S F Wyandotte Corp., Wyandotte, Mich.）という商品名において市販されており、言及によってその全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第 4, 8 2 0, 3 5 2 号にさらに記載されている。他のエチレン/プロピレンブロックポリマーは、好適な界面活性剤であり得る。界面活性剤または界面活性剤の組合せは、1 つ以上の負荷（攪拌から生じる負荷が挙げられるが、これに限定されない）に対して P E G 付加 p S T を安定化させるために、使用され得る。上述のうちのいくつかは“充填剤”と呼ばれ得る。また、いくつかは“強直性変更剤（tonicity modifier）”と呼ばれ得る。また、抗菌性防腐剤が、生成物の安定性および抗菌有効性を目的として適用され得；防腐剤としては、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、メタクレゾール、メチル/プロピルパラベン、クレゾール、およびフェノール、またはこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。参照によって本明細書に援用される米国特許第 7, 1 4 4, 5 7 4 号には、本発明の薬学的組成物および製剤ならびに他の送達調製物において好適であり得る付加的な材料について記載されている。

#### 【0692】

また、本発明の p S T ポリペプチド（P E G といった水溶性ポリマーと連結される p S T ポリペプチドが挙げられるが、これらに限定されない）は、徐放性の系の一部によってか、または一部として投与され得る。徐放性組成物としては、成形された品の形態（フィルム、またはマイクロカプセルが挙げられるが、これらに限定されない）における半透過性のポリマーマトリクスが挙げられるが、これに限定されない。徐放性のマトリクスとしては、生体適合性材料から得られるもの（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）（Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15: 267-277 (1981); Langer, Chem. Tech., 12: 98-105 (1982)）、エチレンビニルアセテート（上述の Langer et al.）またはポリ-D-( )-3-ヒドロキシブチル酸（欧州特許出願公開第 1 3 3, 9 8 8 号）、ポリラクチド（ポリ酪酸）（米国特許第 3, 7 7 3, 9 1 9 号；欧州特許出願公開第 5 8, 4 8 1 号）、ポリグリコリド（グリコール酸のポリマー）、ポリラクチド-コ-グリコリド（酪酸およびグリコリドのコポリマー）のポリ無水物、L-グルタミン酸およびガンマ-エチル-L-グルタミン酸塩のコポリマー（Sidman et al., Biopolymers, 22, 547-556 (1983)）、ポリ（オルト）エステル、ポリペプチド、ヒアルロン酸、コラーゲン、硫酸コンドロイチン、カルボキシル酸、脂肪酸、リン脂質、多糖、核酸、ポリアミノ酸、アミノ酸（例えば、フェニルアラニン、チロシン、イソロイシン）、ポリヌクレオチド、ポリビニルプロピレン、ポリビニルピロリドンならびにシリコン）が挙げられる。また、徐放性組成物としてはリポソームに取り込まれる化合物が挙げられる。化合物を含有しているリポソームは、それ自体が公知の方法によって調製される（独国特許出願公開第 3, 2 1 8, 1 2 1 号；Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 3688-3692 (1985)；Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77: 4030-4034 (1980)；欧州特許出願公開第 5 2, 3 2 2 号；欧州特許出願公開第 3 6, 6 7 6 号；米国特許第 4, 6 1 9, 7 9 4 号；欧州特許出願公開第 1 4 3, 9 4 9 号；米国特許第 5, 0 2 1, 2 3 4 号；日本国出願公開第 8 3 - 1 1 8 0 0 8 号；米国特許第 4, 4 8 5, 0 4 5 号および米国特許第 4, 5 4 4, 5 4 5 号；および欧州特許出願公開第 1 0 2, 3 2 4 号）。引用された参考文献および特許文献のすべては、参照によって本明細書に援用される。

#### 【0693】

リポソームに取り込まれた p S T ポリペプチドは、例えば、独国特許出願公開第 3, 2

18, 121号; Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82: 3688-3692 (1985); Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77: 4030-4034 (1980); 欧州特許出願公開第52, 322号; 欧州特許出願公開第36, 676号; 米国特許第4, 619, 794号; 欧州特許出願公開第143, 949号; 米国特許第5, 021, 234号; 日本国出願第83-118008号; 米国特許第4, 485, 045号および米国特許第4, 544, 545号; および欧州特許出願公開第102, 324号に記載されている方法によって調製され得る。組成物およびリポソームの大きさは、公知であるか、または経験的に当業者によって容易に決定され得る。リポソームのいくつかの例が、例えば、Park JW, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:1327-1331 (1995); Lasic D and Papahadjopoulos D (eds): MEDICAL APPLICATIONS OF LIPOSOMES (1998); Drummond DC, et al., Liposomal drug delivery systems for cancer therapy, in Teicher B (ed): CANCER DRUG DISCOVERY AND DEVELOPMENT (2002); Park JW, et al., Clin. Cancer Res. 8:1172-1181 (2002); Nielsen UB, et al., Biochim. Biophys. Acta 1591(1-3):109-118 (2002); Mamot C, et al., Cancer Res. 63: 3154-3161 (2003)に記載されている。引用された参考文献および特許文献のすべてが、参照によって本明細書に組み込まれる。

10

#### 【0694】

参照によって本明細書に援用される、米国特許第5, 134, 120号(“120特許”)および米国特許第5, 292, 721号(“721特許”)には、ブタにおいて、妊娠期の最後の2週から授乳期の3週の間における成長ホルモンの緩やかな増加によって、出生後の絶食時に、グルコースおよび遊離脂肪酸の血漿濃度を維持する能力の著しい増強を有している新生児の子ブタを生じることが教示されている。さらに、120特許および721特許は、授乳期におけるメスのブタの処理によって初乳における乳脂肪の増加、および乳の収量の増加を生じることが教示している。これらの作用は、新生児のブタの離乳前における生存可能性および体重増加の上昇のために重要である。本発明のある実施形態において、pST類似物の初回の用量は、当該動物の出産予定日の2週前に与えられる。本発明の実施形態において、さらなる用量は週ごとに与えられる。本発明の他の実施形態において、pST類似物の用量は2週間ごとに与えられる。本発明の他の実施形態において、単回用量のみが投与される。本発明の他の実施形態において、pSTは、輸送前に初回の用量に対するばくろ後において、誕生後の子ブタに投与される。本発明の他の実施形態において、pSTは2回にわたって投与される。本発明の他の実施形態において、pST類似物の用量は3週間ごとに与えられる。本発明の他の実施形態において、pST類似物の用量は1か月ごとに与えられる。

20

30

#### 【0695】

本発明に照らして、動物に対して投与される用量は、長期にわたって対象に有益な応答を引き起こすために十分な量であるべきである。一般的に、投与ごとに非経口的に投与される、本発明のpSTポリペプチドの治療有効量の総計は、動物の体重の約0.01ug/kg/日から約100ug/kg/日、または約0.05mg/kg/日から約1mg/kg/日の範囲であるが、これは治療の自由裁量に従う。また、投与の頻度は、治療の自由裁量に従い、動物における利用について承認されている、市販のpSTポリペプチド製品より、高い頻度であり得るか、または低い頻度であり得る。一般的に、本発明のPEG付加pSTポリペプチドは、上述の投与経路のうちのいずれかによって投与され得る。

40

#### 【0696】

##### XV. 本発明のpSTポリペプチドの治療的な使用

本発明のpSTポリペプチドは広範な疾患の処置に有効である。pST製品の投与は、特に、乳生成の増加、体重増加の上昇を生じさせる。したがって、本発明のpSTポリペプチドの投与は感染のおそれがある動物における感染の予防に有用であり得る。本発明のpSTポリペプチドは感染症にかかっている動物に投与され得る。本発明の一実施形態において、本発明のPEG付加のpSTポリペプチドは出産の2週間前～1日前に動物に対して投与される。本発明の一実施形態において、本発明のPEG付加のpSTポリペプチドは、出産の2週間前～1日前に動物に対して投与され、出産日にか、または出産から1

50

週間後までにさらに投与される。本発明の一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは出産の 2 週間前～1 日前に動物に対して投与される。本発明の一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは、出産の 2 週間前～1 日前に動物に対して投与され、出産日にか、または出産から 1 週間後までにさらに投与される。本発明の一実施形態において、本発明の P E G 付加の p S T ポリペプチドは出産の 1 週間前～1 日前に動物に対して投与される。本発明の一実施形態において、本発明の P E G 付加の p S T ポリペプチドは、出産の 1 週間前～1 日前に動物に対して投与され、出産日にか、または出産から 1 週間後までにさらに投与される。本発明の一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは出産の 1 週間前～1 日前に動物に対して投与される。本発明の一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは、出産の 1 週間前～1 日前に動物に対して投与され、出産日にか、または出産から 1 週間後までにさらに投与される。

10

## 【0697】

本発明の一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは輸送の 2 週間前～輸送日に動物に対して投与される。本発明の一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは輸送の 1 週間前～輸送日に動物に対して投与される。本発明の一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは、輸送の 1 週間前～輸送日に動物に対して投与され、輸送日にか、または輸送から 1 週間後までにさらに投与される。

## 【0698】

本発明の一実施形態において、本発明の P E G 付加の p S T ポリペプチドは出産の 7 日前に動物に対して投与される。本発明の一実施形態において、本発明の P E G 付加の p S T ポリペプチドは、出産の 7 日前に動物に対して投与され、出産日にか、または出産から 1 週間後までにさらに投与される。本発明の一実施形態において、本発明の P E G 付加の p S T ポリペプチドは、出産の 7 日前に動物に対して投与され、出産日にさらに投与される。本発明の一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは、出産の 1 週間前に動物に対して投与され、出産日にか、または出産から 1 週間後までにさらに投与される。本発明の一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは、出産の 1 週間前に投与され、出産日にさらに投与される。本発明の一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは子牛の疾患を予防するために出産の日またはその前に乳牛に投与される。本発明の一実施形態において、本発明の P E G 付加の p S T ポリペプチドは、子牛の疾患を予防するために出産の日またはその前に乳牛に投与される。本発明の一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチド子牛の疾患を予防するために出産の日の前に乳牛に投与される。本発明の一実施形態において、本発明の P E G 付加の p S T ポリペプチド子牛の疾患を予防するために出産の日の前に乳牛に投与される。一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは、0.01; 0.02; 0.03; 0.04; 0.05; 0.06; 0.07; 0.08; 0.09; 0.10; 0.11; 0.12; 0.13; 0.14; 0.15; 0.16; 0.17; 0.18; 0.19; 0.20; 0.21; 0.22; 0.23; 0.24; 0.25; 0.26; 0.27; 0.28; 0.29; 0.30; 0.31; 0.32; 0.33; 0.34; 0.35; 0.36; 0.37; 0.38; 0.39; 0.40; 0.41; 0.42; 0.43; 0.44; 0.45; 0.46; 0.47; 0.48; 0.49; または 0.50  $\mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の P E G 付加の p S T ポリペプチドは、0.01; 0.02; 0.03; 0.04; 0.05; 0.06; 0.07; 0.08; 0.09; 0.10; 0.11; 0.12; 0.13; 0.14; 0.15; 0.16; 0.17; 0.18; 0.19; 0.20; 0.21; 0.22; 0.23; 0.24; 0.25; 0.26; 0.27; 0.28; 0.29; 0.30; 0.31; 0.32; 0.33; 0.34; 0.35; 0.36; 0.37; 0.38; 0.39; 0.40; 0.41; 0.42; 0.43; 0.44; 0.45; 0.46; 0.47; 0.48; 0.49; または 0.50  $\mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは、P E G 付加され、0.01; 0.02; 0.03; 0.04; 0.05; 0.06; 0.07; 0.08; 0.09; 0.10; 0.11; 0.12; 0.13; 0.14; 0

20

30

40

50

. 15 ; 0 . 16 ; 0 . 17 ; 0 . 18 ; 0 . 19 ; 0 . 20 0 . 21 ; 0 . 22 ; 0 . 23 ; 0 . 24 ; 0 . 25 ; 0 . 26 ; 0 . 27 ; 0 . 28 ; 0 . 29 ; 0 . 30 ; 0 . 31 ; 0 . 32 ; 0 . 33 ; 0 . 34 ; 0 . 35 ; 0 . 36 ; 0 . 37 ; 0 . 38 ; 0 . 39 ; 0 . 40 ; 0 . 41 ; 0 . 42 ; 0 . 43 ; 0 . 44 ; 0 . 45 ; 0 . 46 ; 0 . 47 ; 0 . 48 ; 0 . 49 ; または  $0.50 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の PEG 付加の pST ポリペプチドは、PEG 付加され、0 . 01 ; 0 . 02 ; 0 . 03 ; 0 . 04 ; 0 . 05 ; 0 . 06 ; 0 . 07 ; 0 . 08 ; 0 . 09 ; 0 . 10 ; 0 . 11 ; 0 . 12 ; 0 . 13 ; 0 . 14 ; 0 . 15 ; 0 . 16 ; 0 . 17 ; 0 . 18 ; 0 . 19 ; 0 . 20 0 . 21 ; 0 . 22 ; 0 . 23 ; 0 . 24 ; 0 . 25 ; 0 . 26 ; 0 . 27 ; 0 . 28 ; 0 . 29 ; 0 . 30 ; 0 . 31 ; 0 . 32 ; 0 . 33 ; 0 . 34 ; 0 . 35 ; 0 . 36 ; 0 . 37 ; 0 . 38 ; 0 . 39 ; 0 . 40 ; 0 . 41 ; 0 . 42 ; 0 . 43 ; 0 . 44 ; 0 . 45 ; 0 . 46 ; 0 . 47 ; 0 . 48 ; 0 . 49 ; または  $0.50 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の PEG 付加の pST ポリペプチドは  $0.01 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。

10

## 【0699】

一実施形態において、本発明の pST ポリペプチドは、0 . 1 ; 0 . 2 ; 0 . 3 ; 0 . 4 ; 0 . 5 ; 0 . 6 ; 0 . 7 ; 0 . 8 ; または  $1.0 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の PEG 付加の pST ポリペプチドは、0 . 1 ; 0 . 2 ; 0 . 3 ; 0 . 4 ; 0 . 5 ; 0 . 6 ; 0 . 7 ; 0 . 8 ; または  $1.0 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の pST ポリペプチドは、PEG 付加され、0 . 1 ; 0 . 2 ; 0 . 3 ; 0 . 4 ; 0 . 5 ; 0 . 6 ; 0 . 7 ; 0 . 8 ; または  $1.0 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の PEG 付加の pST ポリペプチドは、PEG 付加され、0 . 1 ; 0 . 2 ; 0 . 3 ; 0 . 4 ; 0 . 5 ; 0 . 6 ; 0 . 7 ; 0 . 8 ; または  $1.0 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の pST ポリペプチドは  $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の PEG 付加の pST ポリペプチドは  $0.1 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の pST ポリペプチドは  $0.2 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の PEG 付加の pST ポリペプチドは  $0.2 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の pST ポリペプチドは  $0.3 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の PEG 付加の pST ポリペプチドは  $0.3 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の pST ポリペプチドは  $0.4 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の PEG 付加の pST ポリペプチドは  $0.4 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の pST ポリペプチドは  $0.5 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の PEG 付加の pST ポリペプチドは  $0.5 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。

20

30

## 【0700】

一実施形態において、本発明の pST ポリペプチドは、1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、 $60 \mu\text{g} / \text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の PEG 付加の pST ポリペプチドは、1、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26

40

50

、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の P E G 付加の p S T ポリペプチドは 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の P E G 付加の p S T ポリペプチドは 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の P E G 付加の p S T ポリペプチドは 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の P E G 付加の p S T ポリペプチドは 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の P E G 付加の p S T ポリペプチドは 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量において投与される。一実施形態において、本発明の p S T ポリペプチドは 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を超える用量において投与される。一実施形態において、本発明の P E G 付加の p S T ポリペプチドは 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  を超える用量において投与される。

10

#### 【0701】

p S T を含んでいる薬学的組成物は、単独にか、または障害または疾患の一部として低いか、または不完全な白血球生成によって特徴付けられている疾患にかかっている動物に対する種々の方法による投与にとって有効な力価に調合され得る。p S T の量の平均は、変化し得、特に熟練の獣医による推奨および処方に基づくべきである。p S T の正確な量は、処置される障害の正確な種類、処置される動物の状態、および組成物における他の成分といった要因に依存する優先度の問題である。また、本発明は、他の活性薬剤の治療有効量の投与を提供する。与えられる量は p S T を用いた療法に基づいて当業者によって容易に決定され得る。したがって本発明の p S T は、特に、乳の生成および成長を促進し得る。

20

#### 【0702】

本発明の薬学的組成物は従来手法において製造され得る。

30

#### 【実施例】

#### 【0703】

以下の実施例は、例証のために提示されており、請求されている発明を限定しない。

#### 【0704】

〔実施例1〕

(天然にコードされていないアミノ酸の、p S T への組込みについての部位の選択)

この実施例は、天然にコードされていないアミノ酸の、p S T への組込みの部位の選択についての基準の、見込みのある多くの組のいくつかについて説明している。

#### 【0705】

ブタのソマトトロピンの結晶構造は公知であり、置換のために選択される見込みのある残基としては、C x プログラムを用いた (Pintar et al. (2002) Bioinformatics, 18(7):980-4)、保存的な置換部位および溶媒との最も高い接触性を有している残基が挙げられるが、これらに限定されない。パラ - アセチルフェニルアラニンを用いた置換のために同定された保存的な置換部位としては、電荷ありまたはなしの疎水性の核を含んでいるチロシン残基、フェニルアラニン残基およびアルギニン残基が挙げられるが、これらに限定されない。構造的に関連し得る残基 (グリシン、プロリンおよびヘリックス末端のキャッピングに關与する残基が挙げられるが、これらに限定されない) は、置換のために選択されなかった。また、公知の受容体結合領域における残基は置換のために選択されない。

40

#### 【0706】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていない1つ以上のアミノ酸は、p S

50

Tにおける以下の位置：1位より前（すなわちN末端）、1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、23位、24位、25位、26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、37位、38位、39位、40位、41位、42位、43位、44位、45位、46位、47位、48位、49位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、56位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、67位、68位、69位、70位、71位、72位、73位、74位、75位、76位、77位、78位、79位、80位、81位、82位、83位、84位、85位、86位、87位、88位、89位、90位、91位、92位、93位、94位、95位、96位、97位、98位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位、130位、131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位、138位、139位、140位、141位、142位、143位、144位、145位、146位、147位、148位、149位、150位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、157位、158位、159位、160位、161位、162位、163位、164位、165位、166位、167位、168位、169位、170位、171位、172位、173位、174位、175位、176位、177位、178位、179位、180位、181位、182位、183位、184位、185位、186位、187位、188位、189位、190位、191位、192位（すなわちタンパク質カルボキシル末端）、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1）の1つ以上に組み込まれている。いくつかの実施形態において、天然にコードされていない1つ以上のアミノ酸は、pSTにおける以下の位置：1位より前（すなわちN末端）、1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、23位、24位、25位、26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、37位、38位、39位、40位、41位、42位、43位、44位、45位、46位、47位、48位、49位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、56位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、67位、68位、69位、70位、71位、72位、73位、74位、75位、76位、77位、78位、79位、80位、81位、82位、83位、84位、85位、86位、87位、88位、89位、90位、91位、92位、93位、94位、95位、96位、97位、98位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位、130位、131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位、138位、139位、140位、141位、142位、143位、144位、145位、146位、147位、148位、149位、150位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、157位、158位、159位、160位、161位、162位、163位、164位、165位、166位、167位、168位、169位、170位、171位、172位、173位、174位、175位、176位、177位、178位、179位、180位、181位、182位、183位、184位、185位、186位、187位、188位、189位、190位、191位、192位（すなわちタンパク質カルボキシル末端）、およびこれらの任意の組合せ（配列番号2）の1つ以上に組み込まれている。

10

20

30

40

## 【0707】

いくつかの実施形態において、天然にコードされていない1つ以上のアミノ酸は、pS

50

Tにおける以下の位置：1位より前（すなわちN末端）、35位、91位、92位、94位、95位、99位、101位、133位、134位、138位、139位、140位、142位、144位、149位、150位、154位、（すなわちタンパク質カルボキシル末端）、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1または2）の1つ以上に組み込まれている。

【0708】

いくつかの実施形態において、これらの位置（1位より前（すなわちN末端）、1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、23位、24位、25位、26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、37位、38位、39位、40位、41位、42位、43位、44位、45位、46位、47位、48位、49位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、56位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、67位、68位、69位、70位、71位、72位、73位、74位、75位、76位、77位、78位、79位、80位、81位、82位、83位、84位、85位、86位、87位、88位、89位、90位、91位、92位、93位、94位、95位、96位、97位、98位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位、130位、131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位、138位、139位、140位、141位、142位、143位、144位、145位、146位、147位、148位、149位、150位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、157位、158位、159位、160位、161位、162位、163位、164位、165位、166位、167位、168位、169位、170位、171位、172位、173位、174位、176位、177位、178位、179位、180位、181位、182位、183位、184位、185位、186位、187位、188位、189位、190位、191位、192位（すなわちタンパク質のカルボキシル末端）、およびこれらの任意の組合せ（配列番号1）が挙げられるが、これらに限定されない）の1つ以上における天然に存在しないアミノ酸は、水溶性重合体と連結されている。いくつかの実施形態において、これらの位置（1位より前（すなわちN末端）、1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、23位、24位、25位、26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、37位、38位、39位、40位、41位、42位、43位、44位、45位、46位、47位、48位、49位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、56位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、67位、68位、69位、70位、71位、72位、73位、74位、75位、76位、77位、78位、79位、80位、81位、82位、83位、84位、85位、86位、87位、88位、89位、90位、91位、92位、93位、94位、95位、96位、97位、98位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位、107位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位、130位、131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位、138位、139位、140位、141位、142位、143位、144位、145位、146位、147位、148位、149位、150位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、157位、158位、159位、160位、161位、162位、163位、164位、165位、166位、167位、168位、169位、170位、171位、172位、173位、

10

20

30

40

50

174位、176位、177位、178位、179位、180位、181位、182位、183位、184位、185位、186位、187位、188位、189位、190位、191位、192位（すなわちタンパク質のカルボキシル末端）、およびこれらの任意の組合せ（配列番号2）が挙げられるが、これらに限定されない）の1つ以上における天然に存在しないアミノ酸は、水溶性重合体と連結されている。

【0709】

また、図24に示されているように、pSTにおける選択される位置は以下の表に示されている。

【0710】

【表2】

表2

残基	位置	平均のCx値
TYR	35	0.95
GLN	91	1.27
PHE	92	0.6
SER	94	0.7
ARG	95	2.04
ASN	99	1.43
LEU	101	1.9
ARG	133	1.39
ALA	134	1.79
LEU	138	0.91
LYS	139	0.91
GLN	140	0.95
TYR	142	0.68
LYS	144	0.83
LEU	149	4.02
ARG	150	3.88
ALA	154	1.21

【0711】

〔実施例2：天然にコードされていないアミノ酸を含んでおり、E. coliにおいて生成されるpSTポリペプチドのクローニングおよび発現〕

この実施例は、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドの、E. coliにおけるクローニングおよび発現、ならびに修飾されているpSTポリペプチドの生物活性を評価する方法について詳述する。

【0712】

pSTをクローニングする方法は当業者にとって公知である。pSTについてのポリペプチド配列、ポリヌクレオチド配列、宿主細胞へのクローニング、および精製は、参照によってその全体が本明細書に援用される米国特許第5,849,883号、およびHeidari et al. *Veterinary Immunology and Immunopathology* (2001) 81:45-57において詳細に説明されている。

【0713】

直交性のtRNA（O-tRNA）および直交性のアミノアシルtRNA（O-RS）を含んでいる、導入された翻訳系は、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるpSTを発現させるために使用される。O-RSは、天然にコードされていないアミノ酸とともに、O-tRNAを優先的にアミノアシル化する。上記翻訳系は、コードされているセクターコドンに応じて天然にコードされていないアミノ酸をpSTへと次々に挿入する。好適なO-RSおよびO-tRNAの配列は、参照によって本明細書に援用される国

際公開第2006/068802号(名称：“Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof”) (例えば、これに限定されないが、E9 & E9のD286R変異体)、および国際公開第2007/021297号(名称：“Compositions of tRNA and Uses Thereof”) (F13)に記載されている。

【0714】

【表3】

表3：O-RSおよびO-tRNA配列

配列番号3	<i>M. jannaschii</i> mtRNA <sup>Tyr</sup> <sub>CUA</sub>	tRNA
配列番号4	HLAD03:最適化されているアンバ <sup>o</sup> -サブ <sup>o</sup> レツサtRNA	tRNA
配列番号5	HL325A:最適化されているAGGAフレームシフトサブ <sup>o</sup> レツサtRNA	tRNA
配列番号6	p-アゾト <sup>o</sup> -L-フェニルアラニンの組込み用のアミノアシルtRNA合成酵素 <i>p-Az-PheRS(6)</i>	RS
配列番号7	p-ベンゾ <sup>o</sup> イル-L-フェニルアラニンの組込み用のアミノアシルtRNA合成酵素 <i>p-BpaRS(1)</i>	RS
配列番号8	プロパ <sup>o</sup> ルギル-フェニルアラニンの組込み用のアミノアシルtRNA合成酵素 プロパ <sup>o</sup> ルギル-PheRS	RS
配列番号9	プロパ <sup>o</sup> ルギル-フェニルアラニンの組込み用のアミノアシルtRNA合成酵素 プロパ <sup>o</sup> ルギル-PheRS	RS
配列番号10	プロパ <sup>o</sup> ルギル-フェニルアラニンの組込み用のアミノアシルtRNA合成酵素 プロパ <sup>o</sup> ルギル-PheRS	RS
配列番号11	p-アゾト <sup>o</sup> -フェニルアラニンの組込み用のアミノアシルtRNA合成酵素 <i>p-Az-PheRS(1)</i>	RS
配列番号12	p-アゾト <sup>o</sup> -フェニルアラニンの組込み用のアミノアシルtRNA合成酵素 <i>p-Az-PheRS(3)</i>	RS
配列番号13	p-アゾト <sup>o</sup> -フェニルアラニンの組込み用のアミノアシルtRNA合成酵素 <i>p-Az-PheRS(4)</i>	RS
配列番号14	p-アゾト <sup>o</sup> -フェニルアラニンの組込み用のアミノアシルtRNA合成酵素 <i>p-Az-PheRS(2)</i>	RS
配列番号15	p-アセチル-フェニルアラニンの組込み用のアミノアシルtRNA合成酵素(LW1)	RS
配列番号16	p-アセチル-フェニルアラニンの組込み用のアミノアシルtRNA合成酵素(LW5)	RS
配列番号17	p-アセチル-フェニルアラニンの組込み用のアミノアシルtRNA合成酵素(LW6)	RS
配列番号18	p-アゾト <sup>o</sup> -フェニルアラニンの組込み用のアミノアシルtRNA合成酵素(AzPheRS-5)	RS
配列番号19	p-アゾト <sup>o</sup> -フェニルアラニンの組込み用のアミノアシルtRNA合成酵素(AzPheRS-6)	RS

10

20

30

【0715】

修飾されているpSTポリヌクレオチド配列および直交性のアミノアシルtRNA/tRNA対(天然にコードされていない所望のアミノ酸に特異的な)をプラスミドを用いたE. coliの形質転換は、天然にコードされていないアミノ酸の、pSTへの部位特異的な組込みを可能にする。例として示されている所定の遺伝子は、配列番号1または2におけるコドンの1つ以上を置換しているセクターコドン(アンバー)を有しているpSTである。生じたpSTポリペプチドは、以下の位置：1位、3位、4位、5位、6位、7位、8位、9位、10位、11位、12位、13位、14位、15位、16位、17位、18位、19位、20位、21位、23位、24位、25位、26位、27位、28位、29位、30位、31位、32位、33位、34位、35位、36位、37位、38位、39位、40位、41位、42位、43位、44位、45位、46位、47位、48位、49位、50位、51位、52位、53位、54位、55位、56位、57位、58位、59位、60位、61位、62位、63位、64位、65位、66位、67位、68位、69位、70位、71位、72位、73位、74位、75位、76位、77位、78位、79位、80位、81位、82位、83位、84位、85位、86位、87位、88位、89位、90位、91位、92位、93位、94位、95位、96位、97位、98位、99位、100位、101位、102位、103位、104位、105位、106位、10

40

50

7位、108位、109位、110位、111位、112位、113位、114位、115位、116位、117位、118位、119位、120位、121位、122位、123位、124位、125位、126位、127位、128位、129位、130位、131位、132位、133位、134位、135位、136位、137位、138位、139位、140位、141位、142位、143位、144位、145位、146位、147位、148位、149位、150位、151位、152位、153位、154位、155位、156位、157位、158位、159位、160位、161位、162位、163位、164位、165位、166位、167位、168位、169位、170位、171位、172位、173位、174位、175位、176位、177位、178位、179位、180位、181位、182位、183位、184位、185位、186位、187位、188位、189位、190位、191位（配列番号1または2）のうちの1つにおける天然にコードされているアミノ酸を置換している、天然にコードされていないアミノ酸パラ-アセチルフェニルアラニン（pAF、PAcF）を有していた。

10

## 【0716】

位置が選択され、変異体pSTポリペプチドが生成され、配列が確認され、プラスミドがW3110 B2細胞に導入され、コロニーがアンピシリンプレートにおいて成長させられた。これらのコロニーは、1:1000希釈のアンピシリン培養物を用いて5mLのLBに播種するために使用され、当該アンピシリン培養物をO.D.600=0.8まで増殖させた。それから、pAF（パラ-アセチルフェニルアラニン）を、15の異なる培養物に対して4mMの最終濃度まで加えた。約30分後に、0.2%の最終濃度のL-アラビノースを用いて培養物を誘導し、培養物をさらなる5時間にわたって37においてインキュベートした。このときに、各培養物の500μLのサンプルを取り、13000rpmにおいて4分にわたって遠心沈殿させた。上清を捨て、ペレットを、1μLのDNAseを有しているp150μLのB-PERに再懸濁し、室温において一晚にわたってインキュベートした。翌朝に、4X LDS Sample Buffer（Invitrogen, Carlsbad, CA）を加え、サンプルを95まで5分にわたって加熱し、10X Sample Reducing Agent（Invitrogen, Carlsbad, CA）を加えた。それから、サンプルを、4~12%の勾配ゲル（Invitrogen, Carlsbad, CA）に基づく、MES緩衝液におけるSDS-PAGEによって分離し、Simply Blue SafeStain（Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いて可視化した。図1は、4~12%の勾配ゲルおよびクーマシー染色による分析の後に、hGH培養物から生成されたサンプルの例を示している。

20

30

## 【0717】

（封入体調製物の可溶化）

4の封入体（IB）緩衝液I（50mMのTris pH8.0；100mMのNaCl；1mMのEDTA；1%のTriton X-100；4）において、最終の固形分が10%になるまで混合することによって、細胞のペーストを再懸濁させた。合計して2回にわたって再懸濁させた材料をマイクロフリーダイザに通すことによって、細胞を溶解させた。10000g、4において15分にわたってサンプルを遠心分離し、上清をデカントした。余分な量のIB緩衝液I（50mMのTris pH8.0；100mMのNaCl；1mMのEDTA；1%のTriton-X100；4）において再懸濁させることによって、封入体（IB）ペレットを洗浄し、再懸濁させた材料を、合計して2回にわたってマイクロフリーダイザに通した。それから、10000g、4において15分にわたってサンプルを遠心分離し、上清をデカントした。IBペレットを1倍量の緩衝液II（50mMのTris pH8.0；100mMのNaCl；1mMのEDTA；4）において再懸濁させた。再懸濁の後に、10000g、4において15分にわたってサンプルを遠心分離し、上清をデカントした。それから、サンプルを、1/2倍量の緩衝液II（50mMのTris pH8.0；100mMのNaCl；1mMのEDTA；4）において再懸濁させた。それから、IBを適切な容器に分取した。10000g、4において15分にわたってサンプルを遠心分離し、上清をデカントした。それから、封入体を、可溶化させるか、またはさらなる使用まで-80に保存した。

40

50

## 【0718】

(封入体の可溶化)

封入体を、可溶化緩衝液(20 mMのTris pH 8.0; 8 Mのグアニジン; 10 mMの - ME)において10~15 mg/mLの最終濃度まで溶解させた。溶解させたIBを、1時間にわたってか、それらが完全に溶解されるまで、等速において混合しながら室温においてインキュベートした。タンパク質濃度が高い場合に、タンパク質濃度を、さらなる可溶化緩衝液を用いた希釈によって調整した。

## 【0719】

0.5 mg/mLのタンパク質の最終濃度まで0.5 Mのアルギニン(pH 8.0; 4 )において、サンプルを希釈することによって、リフォールディングを行った。サンプルを、48~72時間にわたって4 においてリフォールディングさせた。

10

## 【0720】

固体の(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を、穏やかに混合しながら20%の最終濃度までサンプルに加えた。サンプルを、30分にわたって4 において穏やかに混合した。沈殿したタンパク質(pSTを含んでいる)を、15分にわたる12000 gにおける遠心分離によってペレットにした。上清を除去し、ペレットを、1/2倍量の20 mMのNaAc、pH 4.5に再懸濁させた。ペレットのすべてが溶液に戻るわけではなかった。pSTのみが溶液に戻った。溶解しなかった材料を、15分にわたる12000 gにおける遠心分離によってペレットにし、上清を残しておいた。pST材料を0.45 μmのフィルタに通してろ過した。それから、材料を、緩衝液A(20 mMのNaAc、pH 4.5)において平衡化されているCM FFカラム(GE Healthcare)に載せた。材料はカラムにロードする前に10 m/Sである。カラムの10倍量の全体にわたる100%の緩衝液B(20 mMのNaAc、pH 4.5; 500 mMのNaCl)までの直線勾配を用いて、pSTをカラムから溶出させた。

20

## 【0721】

(PEG付加および精製)

50%の氷酢酸を用いてCMプールのpHを4.0に調整した。それから、プールを約4.0 mg/mLのタンパク質まで濃縮した。12:1~8:1 Mの過剰のヒドロキシルアミンPEG:pSTをプールに加えた。混合物を48~72時間にわたって28 においてインキュベートした。それから、水(8 m/S未満)を用いて8~10倍に希釈し、それから緩衝液A(20 mMのNaAc、pH 4.5)において平衡化されたSP HPカラム(GE Healthcareカラム)に載せた。100%の緩衝液B(20 mMのNaAc、pH 4.5; 500 mMのNaCl)までの40倍容積にわたる直線勾配を用いて、PEG付加されたpSTを溶出させた。

30

## 【0722】

PEG付加されたpST画分をプールし、pST生成緩衝液(4.26 mMのNaAc、pH 4.0; 0.565 mMのNaCl; 0.0033%のTween 20; 5%のソルビトール)に対して透析した。PEG材料を6~8 mg/mLのタンパク質まで濃縮し、0.22 μMのPESフィルタを用いてろ過滅菌された。タンパク質を、4 に保存するか、長期保存のために瞬間冷凍し、-80 に保存する。図6は、PEG付加の前後におけるb-GCSFのSDS-PAGE分析を示している。

40

## 【0723】

(pSTのペプチドマッピング(トリプシン/エンドプロテイナーゼGlu-C))

pSTポリペプチドへのパラ-アセチルフェニルアラニン(pAF)の組み込みを確認するために、ペプチドマッピングを実施した。PEG付加前の精製したpSTおよび野生型のpSTを、6 Mのグアニジン-HCl、50 mMのTris pH 8.0の最終濃度まで希釈し、10 mMのDTTを用いて1時間にわたって37 において還元させた。20 mMのIAAを用いて40分にわたって室温の暗所において、サンプルをアルキル化し、20 mMの最終濃度のDTTの添加によって反応を停止させた。材料を、100 mMの重炭酸アンモニウム、pH 7.7に透析し、4時間にわたって37 において1:50(タ

50

ンパク質：酵素)のトリプシンを用いて処理した。この反応を、1:20のGlu-Cの添加の後に、一晚にわたって25において続けた。0.1%の最終濃度のTFAの添加によって消化を停止させた。サンプルを、ThermoFinnigan LCQ Decaイオントラップ質量分析器を有しているタンデムのGrace Vydac C8逆相カラムにかけた。勾配は、定組成において8分にわたる98%の移動相A(0.05%のTFAの水溶液)から開始し、それから、214nmおよび250nmにおける検出をともなって、90分にわたって60%の移動相B(0.05%のTFAのアセトニトリル溶液)まで低下させた。0.2mL/分の流速および40のカラム温度を使用した。キャピラリーの電圧を、100~2000m/zのフルスキャン範囲を用いて15Vに設定した。MS/MSのための衝突電圧は規格化されている42%であった。

10

## 【0724】

(pSTのペプチドマッピング(トリプシン/エンドプロテイナーゼGlu-C))

PEG付加の前における精製したpSTを、6Mの最終濃度の Guanidinium-HCl、50mMのTris pH7.8まで希釈され、10mMのDTTを用いて1時間にわたって37において還元された。20mMのIAAを用いて40分にわたって室温の暗所において、サンプルをアルキル化し、20mMの最終濃度のDTTの添加によって反応を停止させた。材料を100mMの重炭酸アンモニウム pH7.7に透析し、1:20(タンパク質：酵素)のGlu-Cを用いて25において一晚にわたって処理した。0.1%の最終濃度のTFAの添加によって消化を停止させた。サンプルを、ThermoFinnigan LCQ Decaイオントラップ質量分析器を有しているタンデムのGrace Vydac C8逆相カラムにかけた。勾配は、定組成において8分にわたる98%の移動相A(0.05%のTFAの水溶液)から開始し、それから、214nmおよび250nmにおける検出をともなって、90分にわたって60%の移動相B(0.05%のTFAのアセトニトリル溶液)まで低下させた。0.2mL/分の流速および40のカラム温度を使用した。キャピラリーの電圧を、100~2000m/zのフルスキャン範囲を用いて15Vに設定した。MS/MSのための衝突電圧は規格化されている42%であった。

20

## 【0725】

(pSTポリペプチドのRP-HPLCおよびSEC-HPLC分析)

精製後におけるサンプルの純度を分析し、同一性を決定するために、RP-HPLCおよびSEC-HPLCを使用する。生成緩衝液(4.26mMの酢酸ナトリウム pH4.0、0.565mMの塩化ナトリウム、0.0033%のTween-20および5%のソルビトール)を用いて1mg/mLまで、PEG付加され、精製されたpSTを希釈し、10μLを、J.T. Baker wide pore Octyl (C8)逆相カラム(4.6×100mm、5μm)に注入する。勾配は、50%の移動相A(0.1%のTFAの水溶液)を用いて開始し、26分にわたる70%の移動相B(0.1%のTFAのアセトニトリル溶液)まで低下させた。カラムを再生し、流速を測定し、214nmにおける検出をともなって60のカラム温度を使用する。Agilent Chemstationソフトウェアを用いて分析を実施し得る。

30

## 【0726】

(M-NFS60増殖アッセイ)

pST分子の有効性を評価するために、増殖アッセイを実施し得る。細胞を2日ごとに分け、 $0.02 \times 10^6$ 細胞/mLに播く。

40

## 【0727】

アッセイの前日に、細胞を $0.1 \times 10^6$ 細胞/mLに分けた。16~24時間後に、10000細胞/ウェルの細胞をアッセイ培地に入れて、黒い平底の96ウェルプレートに播き、pST化合物の段階希釈物を2つ1組にして加えた。ウェルごとの総量は100μLであり、アッセイ培地は10%FBSおよびP/Sを加えたRPMI 1640であった。標準物(例えば、Neupogen(登録商標)および野生型のpST)を、同じようにプレートごとに2つ1組にして加える。それから、プレートを、5%CO<sub>2</sub>の37において42時間にわたってインキュベートする。42時間のインキュベート後に、10μLのAlamar B

50

lue (Biosource cat #: DAL1100) を加え、プレート を、5% CO<sub>2</sub> の 37 °C においてさらなる 6 時間にわたってインキュベートする。それから、プレート を 4000 rpm、室温において 2 分にわたって遠心沈殿して、あらゆる気泡を取り除く。535 nm における励起および 590 nm における発光の設定を用いて、Tecan の蛍光光度計によって、プレートを読みこむ。プレートをホイルに包んで、光感受性の Alamar Blue 色素に対する露光を回避する。

#### 【0728】

データ分析のために、各化合物についての 2 つ 1 組の段階希釈物の平均を取り、EC50 値を SigmaPlot において算出する。未加工の EC50 値をすべての化合物について列挙し、倍数の差異を算出する (PEG 付加したウシの GCSF 化合物を野生型の pST と比較した)。実験を複数回にわたって実施し、20% 未満の内部アッセイ CV および 30% 未満の内部アッセイ CV を決める。

10

#### 【0729】

##### 〔実施例 3〕

E9 RS は、アンバーコドンにおける pAF を pST の tRNA に担わせるために使用され得、E9 RS は、アンバーコドンにおける pAF3 を pST の tRNA に担わせるために使用され得る (pAF3 について例えば図面を参照すればよい)。pAF3 は、リフォールディングの前に本実施例において pAF2 に変換され、変換はアルキル化に基づく PEG 付加を可能にする。これは pST を用いて実施され、pAF2 への pAF3 の還元は 3 段階 (封入体の洗浄、前の PEG 付加および可溶化が挙げられる) において評価された。封入体の洗浄段階において、種々の濃度の DTT を IB 洗浄緩衝液に加えた。20 mM までの種々の DTT を最終の洗浄緩衝液において使用した。還元レベルは約 90% であった。前の PEG 付加段階において、4 °C においてインキュベーションされ、0.1 mM ~ 0.5 mM の DTT 濃度を使用した。高レベルの還元は、0.2 mM の DTT をともなった一晩にわたるインキュベーションの後に認められ、95% 以上であった。可溶化段階において、DTT 濃度を 10 mM まで上昇させ、さらなる 2 時間にわたってインキュベーションし (合計して 3 時間のインキュベーション)、高い収量をともなって、高レベルの還元は 95% 以上であった。これから得られた結果は図 29 に見られ得る。pAF への pAF3 の還元が続いて、PEG 付加された。10% の HOAc を用いてタンパク質の pH を 4.0 まで下げ、緩衝液を NaOAc に交換し、3.0 mg/mL 以下に濃縮した。NaCNBH<sub>3</sub> を 5 mM の最終濃度まで加え、PEG-アルデヒドを以下の割合 (PEG : タンパク質) = 0.9 : 1、1 : 1、1.5 : 1 において加えた。材料を、室温において混合 / インキュベートし、SDS-PAGE によって 1 時間、2 時間、3 時間、4 時間および 24 時間において分析し、これから得られた結果は図 30 に見られ得る。

20

30

#### 【0730】

##### 〔実施例 4〕

本実施例において、3 群のブタを、F92 pAF-30K の PEG を付加した pST を用いて処理した。処理されたブタは出生時体重の低い子豚である。群 1 は 0 mg/kg を受け、群 2 は 1 mg/kg を受け、群 3 は 5 mg/kg を受け、ブタは出生日に 1 回の投与を受け、21 日を通じて追跡され (離乳)、処理された群は、ネガティブコントロール群より良好な生存、ならびにより “正常” または “平均” の大きさの同腹子に対して処理されたブタにおいて良好な離乳体重を有していると予想される。

40

#### 【0731】

##### 〔実施例 5〕

本実施例は、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるヒト成長ホルモン (hGH) ポリペプチドの、E. coli におけるクローニングおよび発現について詳述している。また、本実施例は、修飾されている hGH ポリペプチドの生物活性を評価する 1 つの方法について説明する。

#### 【0732】

hGH およびそれらの断片をクローニングする方法は、参照によって本明細書に援用さ

50

れる米国特許第4,601,980号;米国特許第4,604,359号;米国特許第4,634,677号;米国特許第4,658,021号;米国特許第4,898,830号;米国特許第5,424,199号;および米国特許第5,795,745号に詳述されている。全長のhGHまたはN末端のシグナル配列を欠いているhGHの成熟形態をコードしているcDNAは、配列番号21および配列番号22のそれぞれに示されている。

【0733】

直交性のtRNA(O-tRNA)および直交性のアミノアシルtRNA合成酵素を含んでいる導入される翻訳系は、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいるhGHを発現させるために使用される。O-RSは、天然にコードされていないアミノ酸とともにO-tRNAを優先的にアミノアシル化する。翻訳系は、コードされているセクターコードンに応じて、天然にコードされていないアミノ酸をhGHに次々と挿入する。

10

【0734】

修飾されているhGH遺伝子および直交性のアミノアシルtRNA合成酵素/tRNA対(天然にコードされていない所望のアミノ酸に特異的)を含んでいるプラスミドを用いたE. coliの形質転換は、天然にコードされていないアミノ酸の、hGHポリペプチドへの部位特異的な組込みを可能にする。0.01~100mMの天然にコードされていない特定のアミノ酸を含んでいる培地において37°Cにおいて成長させた、形質転換されたE. coliは、高い中実度および効率を有して修飾されたhGHを発現する。天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる、Hisタグ付きのhGHは、封入体または凝集物としてE. coliの宿主細胞によって生成される。凝集物は、6MのグアニジンHClの変性条件のもとに可溶化され、親和性精製される。リフォールディングは、50mMのTRIS-HCl pH8.0、0.40μMのCuSO<sub>2</sub>および2%(w/v)のSarkosylにおける、一晚にわたる4°Cにおける透析によって実施される。それから、材料は20mMのTRIS-HCl pH8.0、100mMのNaCl、2mMのCaCl<sub>2</sub>に対して透析され、続いてHisタグが除去される(Boissel et al., (1993) J. Bio. Chem. 268:15983-93を参照すればよい)。hGHの精製のための方法は、当業者にとって公知であり、SDS-PAGE、ウェスタンブロット分析、およびエレクトロスプレーイオン化イオンとラップ質量分析などによって確認される。

20

【0735】

図1は精製したhGHポリペプチドのSDS-PAGEである。Hisタグ付きの変異体hGHタンパク質は、標準的なHisタグ付きのタンパク質精製手法を介したProBond Nickel-Chelating Resin(Invitrogen, Carlsbad, CA)を用いて精製され、続いて、ゲルにロードされる前にアニオン交換カラムにかけられる。列1は分子量マーカを示しており、列2は非天然アミノ酸なしのN-HisのhGHを表している。列3~10のそれぞれは、Y35、F92、Y111、G131、R134、K140、Y143およびK145のそれぞれに非天然アミノ酸p-アセチル-フェニルアラニンを含んでいるN-HisのhGH変異体を含んでいる。

30

【0736】

修飾されているhGHポリペプチドの生物活性をさらに評価するために、受容体とのhGHの相互作用の下流マーカを測定するアッセイを使用した。内因的に生成される受容体とのhGHの相互作用は、ヒトのIM-9リンパ球細胞株における転写ファミリーのメンバーであるSTAT5のシグナル伝達物質および活性化因子のチロシンリン酸化を導く。STAT5の2つの形態(STAT5AおよびSTAT5B)は、IM-9のcDNAライブラリから同定された(例えば、Silva et al., Mol. Endocrinol. (1996) 10(5):508-518を参照すればよい)。IM-9細胞上におけるヒト成長ホルモンの受容体は、ラット成長ホルモンまたはヒトプロラクチンがSTAT5の検出可能なリン酸化を生じないように、ヒト成長ホルモンに対して選択的である。重要なことにラットGHR(L43R)の細胞外ドメインおよびG120Rを有しているhGHpは、hGHに刺激されたpSTAT5のリン酸化に対して効率的に競合する。

40

【0737】

50

本発明の h G H ポリペプチドを用いて I M - 9 細胞を刺激した。ヒトの I M - 9 リンパ球を、ATCC (Manassas, VA) から購入し、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン、ストレプトマイシン (Invitrogen, Carlsbad, San Diego)、および熱非働化の 10% のウシ胎児血清 (Hyclone, Logan, UT) を補った RPMI 1640 において成長させた。I M - 9 細胞を、12 点の用量範囲の h G H ポリペプチドを用いた 10 分にわたる 37 °C における刺激の前に、アッセイ培地 (10 mM の H E P E S、チャコール/デキストラン処理した熱非働化の F B S、ピルビン酸ナトリウム、ペニシリンおよびストレプトマイシンを補った、フェノールレッドなしの RPMI) においてスターブさせた。氷冷した 90% のメタノールを用いた 1 時間にわたる氷上における透過化処理の前に、1% のホルムアルデヒドを用いて刺激した細胞を固定した。30 分にわたる室温におけるリン酸化 S T A T 5 の一次抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)、および続く P E を抱合させた 2 次抗体を用いた細胞内染色によって、S T A T 5 のリン酸化のレベルを検出した。サンプルの捕捉を、取得したデータの Flowjo ソフトウェア (Tree Star Inc., Ashland, OR) による解析とともに、FACS Array によって実施した。E C<sub>50</sub> 値は、タンパク質濃度に対する平均の蛍光強度 (M F I) を用いて SigmaPlot を利用してプロットされた用量反応曲線から得られた。

10

20

30

40

50

## 【0738】

以下の表 3 は、変異体 h G H ポリペプチドを用いて生成された I M - 9 データを要約している。非天然アミノ酸の置換を異なる位置に有している種々の h G H ポリペプチドは、記載されている通りにヒトの I M - 9 細胞を用いて試験された。特に、図 7 のパネル A は、His タグ付きの h G H ポリペプチドについての I M - 9 データを示しており、図 7 のパネル B は、非天然アミノ酸 p - アセチル - フェニルアラニンを含む Y 143 に含んでいる His タグ付きの h G H について I M - 9 データを示している。P E G 付加されている非天然アミノ酸を含んでいる h G H ポリペプチドの生物活性を評価するために、同じアッセイを使用した。

## 【0739】

## 【表 3】

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

## 【0740】

〔実施例 6 : カルボニル含有アミノ酸の導入およびアミノオキシ含有 P E G との続く反応〕

本実施例は、天然にコードされていないケトン含有アミノ酸を組み込んでいる p S T ポリペプチドを生成する方法を証明する。当該ケトン含有アミノ酸は、約 5000 MW のアミノオキシ含有 P E G と続いて反応させられる。1 位より前 (すなわち N 末端)、1 位、

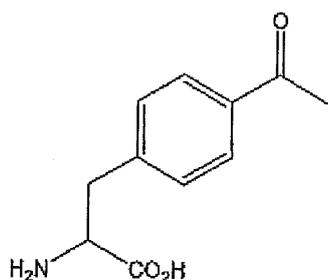
3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位、10 位、11 位、12 位、13 位、14 位、15 位、16 位、17 位、18 位、19 位、20 位、21 位、23 位、24 位、25 位、26 位、27 位、28 位、29 位、30 位、31 位、32 位、33 位、34 位、35 位、36 位、37 位、38 位、39 位、40 位、41 位、42 位、43 位、44 位、45 位、46 位、47 位、48 位、49 位、50 位、51 位、52 位、53 位、54 位、55 位、56 位、57 位、58 位、59 位、60 位、61 位、62 位、63 位、64 位、65 位、66 位、67 位、68 位、69 位、70 位、71 位、72 位、73 位、74 位、75 位、76 位、77 位、78 位、79 位、80 位、81 位、82 位、83 位、84 位、85 位、86 位、87 位、88 位、89 位、90 位、91 位、92 位、93 位、94 位、95 位、96 位、97 位、98 位、99 位、100 位、101 位、102 位、103 位、104 位、105 位、106 位、107 位、108 位、109 位、110 位、111 位、112 位、113 位、114 位、115 位、116 位、117 位、118 位、119 位、120 位、121 位、122 位、123 位、124 位、125 位、126 位、127 位、128 位、129 位、130 位、131 位、132 位、133 位、134 位、135 位、136 位、137 位、138 位、139 位、140 位、141 位、142 位、143 位、144 位、145 位、146 位、147 位、148 位、149 位、150 位、151 位、152 位、153 位、154 位、155 位、156 位、157 位、158 位、159 位、160 位、161 位、162 位、163 位、164 位、165 位、166 位、167 位、168 位、169 位、170 位、171 位、172 位、173 位、174 位、175 位、176 位、177 位、178 位、179 位、180 位、181 位、182 位、183 位、184 位、185 位、186 位、187 位、188 位、189 位、190 位、191 位、192 位 (すなわちタンパク質のカルボキシル末端)、およびそれらの任意の組合せ (配列番号 1 または 2) の残基のそれぞれは、以下の構造:

10

20

【0741】

【化49】



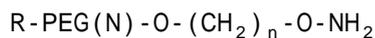
30

【0742】

を有している天然にコードされていないアミノ酸を用いて別々に置換される。

【0743】

いったん修飾されると、カルボニル含有アミノ酸を含んでいる p S T ポリペプチドのバリエーションは、以下の形態:



(ここで、R はメチルであり、n は 3 であり、N は約 5000 MW である)

40

のアミノオキシ含有の PEG 誘導体と反応させられる。25 mM の MES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6.0、25 mM の HEPES (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7.0、または 10 mM の酢酸ナトリウム (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5 に、10 mg/mL において溶解されている、p-アセチルフェニルアラニンを含んでいる精製した p S T は、10 ~ 100 倍過剰量のアミノオキシ含有 PEG と反応させられ、それから、10 ~ 16 時間にわたって室温において各がんされる (Jencks, W. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, pp 475)。PEG-p S T は、それから直後の精製および分析のための適切な緩衝液に希釈される。

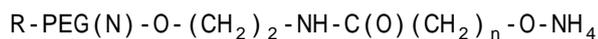
【0744】

【実施例 7 : アミド結合を介して PEG と連結されているヒドロキシアミン基からなる

50

P E G を用いた抱合]

以下の構造:



(ここで、R はメチルであり、n は 4 であり、N は約 2 0 0 0 0 MW である)

を有している P E G 試薬は、実施例 3 に記載の手法を用いて、天然にコードされていないケトン含有アミノ酸と連結される。反応、精製および分析の条件は実施例 3 に記載の通りである。

【0745】

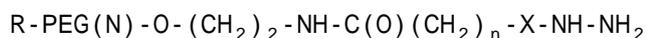
〔実施例 8 : 天然にコードされていない 2 つの異なるアミノ酸の、p S T ポリペプチドへの組み込み〕

本実施例は、ケトン官能基を含んでいる天然にコードされていないアミノ酸を組み込んでいる p S T ポリペプチドを生成する方法を証明している。当該アミノ酸は、以下の残基: 1 位より前 (すなわち N 末端)、1 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位、10 位、11 位、12 位、13 位、14 位、15 位、16 位、17 位、18 位、19 位、20 位、21 位、23 位、24 位、25 位、26 位、27 位、28 位、29 位、30 位、31 位、32 位、33 位、34 位、35 位、36 位、37 位、38 位、39 位、40 位、41 位、42 位、43 位、44 位、45 位、46 位、47 位、48 位、49 位、50 位、51 位、52 位、53 位、54 位、55 位、56 位、57 位、58 位、59 位、60 位、61 位、62 位、63 位、64 位、65 位、66 位、67 位、68 位、69 位、70 位、71 位、72 位、73 位、74 位、75 位、76 位、77 位、78 位、79 位、80 位、81 位、82 位、83 位、84 位、85 位、86 位、87 位、88 位、89 位、90 位、91 位、92 位、93 位、94 位、95 位、96 位、97 位、98 位、99 位、100 位、101 位、102 位、103 位、104 位、105 位、106 位、107 位、108 位、109 位、110 位、111 位、112 位、113 位、114 位、115 位、116 位、117 位、118 位、119 位、120 位、121 位、122 位、123 位、124 位、125 位、126 位、127 位、128 位、129 位、130 位、131 位、132 位、133 位、134 位、135 位、136 位、137 位、138 位、139 位、140 位、141 位、142 位、143 位、144 位、145 位、146 位、147 位、148 位、149 位、150 位、151 位、152 位、153 位、154 位、155 位、156 位、157 位、158 位、159 位、160 位、161 位、162 位、163 位、164 位、165 位、166 位、167 位、168 位、169 位、170 位、171 位、172 位、173 位、174 位、175 位、176 位、177 位、178 位、179 位、180 位、181 位、182 位、183 位、184 位、185 位、186 位、187 位、188 位、189 位、190 位、191 位、192 位 (すなわちタンパク質のカルボキシル末端)、およびこれらの任意の組合せ (配列番号 1 または 2) のうちの 2 つの位置において、上記 p S T ポリペプチドに組み込まれている。b S T ポリペプチドは、セクターコドンが核酸内の異なる 2 つの部位に導入されている点を除いて、実施例 1 に記載の通りに調製される。

【0746】

〔実施例 9 : ヒドラジド含有 P E G に対する p S T ポリペプチドの抱合および続くインシチュ還元〕

カルボニル含有アミノ酸を組み込んでいる p S T ポリペプチドは、実施例 2 および 3 に記載の手法にしたがって調製される。いったん修飾されると、以下の構造:



(ここで、R はメチルであり、n は 2 であり、N は 1 0 0 0 0 MW であり、X はカルボニル (C = O) 基である)

を有しているヒドラジド含有 P E G は上記 p S T ポリペプチドと抱合される。25 mM の M E S (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 6.0、25 mM の H e p e s (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 7.0、または 10 mM の酢酸ナトリウム (Sigma Chemical, St. Louis, MO) pH 4.5 に、10 mg / mL において溶解されている、p

10

20

30

40

50

- アセチルフェニルアラニンを含んでいる精製した p S T は、1 ~ 100 倍過剰量のヒドラジン含有 P E G と反応させられ、対応するヒドラゾンは、10 ~ 50 m M の最終濃度まで H<sub>2</sub>O に溶解されている 1 M の N a C N B H<sub>3</sub> ストック (Sigma Chemical, St. Louis, MO) の添加によってインシチュにおいて還元される。反応は、18 ~ 24 時間にわたって 4 ~ 室温の暗所において実施される。反応は、1 M の T r i s (Sigma Chemical, St. Louis, MO) p H 7 . 6 の 50 m M の最終濃度までの添加によって停止されるか、または直後の精製にとって適切な緩衝液に希釈される。

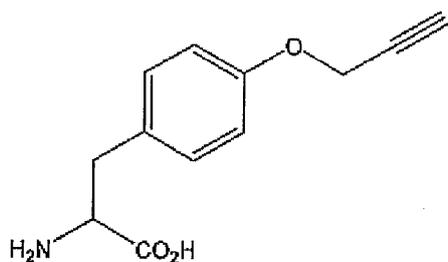
【0747】

〔実施例 10 : アルキン含有アミノ酸の、p S T ポリペプチドへの導入および m P E G アジドを用いた誘導体化〕

以下の残基：1 位より前 (すなわち N 末端)、1 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位、10 位、11 位、12 位、13 位、14 位、15 位、16 位、17 位、18 位、19 位、20 位、21 位、23 位、24 位、25 位、26 位、27 位、28 位、29 位、30 位、31 位、32 位、33 位、34 位、35 位、36 位、37 位、38 位、39 位、40 位、41 位、42 位、43 位、44 位、45 位、46 位、47 位、48 位、49 位、50 位、51 位、52 位、53 位、54 位、55 位、56 位、57 位、58 位、59 位、60 位、61 位、62 位、63 位、64 位、65 位、66 位、67 位、68 位、69 位、70 位、71 位、72 位、73 位、74 位、75 位、76 位、77 位、78 位、79 位、80 位、81 位、82 位、83 位、84 位、85 位、86 位、87 位、88 位、89 位、90 位、91 位、92 位、93 位、94 位、95 位、96 位、97 位、98 位、99 位、100 位、101 位、102 位、103 位、104 位、105 位、106 位、107 位、108 位、109 位、110 位、111 位、112 位、113 位、114 位、115 位、116 位、117 位、118 位、119 位、120 位、121 位、122 位、123 位、124 位、125 位、126 位、127 位、128 位、129 位、130 位、131 位、132 位、133 位、134 位、135 位、136 位、137 位、138 位、139 位、140 位、141 位、142 位、143 位、144 位、145 位、146 位、147 位、148 位、149 位、150 位、151 位、152 位、153 位、154 位、155 位、156 位、157 位、158 位、159 位、160 位、161 位、162 位、163 位、164 位、165 位、166 位、167 位、168 位、169 位、170 位、171 位、172 位、173 位、174 位、175 位、176 位、177 位、178 位、179 位、180 位、181 位、182 位、183 位、184 位、185 位、186 位、187 位、188 位、189 位、190 位、191 位、192 位 (すなわちタンパク質のカルボキシル末端)、およびそれらの任意の組合せ (配列番号 1、配列番号 2) は、天然にコードされていない以下のアミノ酸：

【0748】

【化50】



【0749】

を用いてそれぞれ置換される。

【0750】

p - プロパルギル - チロシンの、p S T への部位特異的な組込みに利用される配列は、配列番号 1 もしくは 2、配列番号 3 (muttRNA, M. jannaschii mtRNA<sup>Tyr</sup><sub>CUA</sub>) および実施例 2 に記載の配列番号 10、11、12 であり得る。プロパルギルチロシンを含んでいる

10

20

30

40

50

p S Tポリペプチドは、実施例 3 に記載の条件を用いて、E. coliにおいて発現され、精製される。

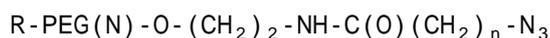
【 0 7 5 1 】

プロパルギル - チロシンを含んでいる精製された P E G は、P B 緩衝液 ( 1 0 0 m M のリン酸ナトリウム、0 . 1 5 M の N a C l 、 p H = 8 ) において 0 . 1 ~ 1 0 m L に溶解され、1 0 ~ 1 0 0 倍過剰量のアジド含有 P E G が反応混合物に加えられる。それから、触媒量の C u S O <sub>4</sub> および C u ワイヤが反応混合物に加えられる。混合物がインキュベーター ( 約 4 時間にわたる室温もしくは 3 7 ° C 、または一晩にわたる 4 ° C が挙げられるが、これらに限定されない ) された後に、H <sub>2</sub> O が加えられ、混合物は透析膜に通して過される。サンプルを、実施例 3 に記載の類似の手法によって ( が挙げられるが、これに限定されない ) 、付加について分析し得る。

10

【 0 7 5 2 】

本実施例において、P E G は、以下の構造 :



( ここで、R はメチルであり、n は 4 であり、N は 1 0 0 0 0 M W である )

を有している。

【 0 7 5 3 】

[ 実施例 1 1 : p S T ポリペプチドにおける巨大な疎水性アミノ酸の、プロパルギルチロシンを用いた置換 ]

p S T の以下の領域内 : 1 位より前 ( すなわち N 末端 ) 、 1 位、 3 位、 4 位、 5 位、 6 位、 7 位、 8 位、 9 位、 1 0 位、 1 1 位、 1 2 位、 1 3 位、 1 4 位、 1 5 位、 1 6 位、 1 7 位、 1 8 位、 1 9 位、 2 0 位、 2 1 位、 2 3 位、 2 4 位、 2 5 位、 2 6 位、 2 7 位、 2 8 位、 2 9 位、 3 0 位、 3 1 位、 3 2 位、 3 3 位、 3 4 位、 3 5 位、 3 6 位、 3 7 位、 3 8 位、 3 9 位、 4 0 位、 4 1 位、 4 2 位、 4 3 位、 4 4 位、 4 5 位、 4 6 位、 4 7 位、 4 8 位、 4 9 位、 5 0 位、 5 1 位、 5 2 位、 5 3 位、 5 4 位、 5 5 位、 5 6 位、 5 7 位、 5 8 位、 5 9 位、 6 0 位、 6 1 位、 6 2 位、 6 3 位、 6 4 位、 6 5 位、 6 6 位、 6 7 位、 6 8 位、 6 9 位、 7 0 位、 7 1 位、 7 2 位、 7 3 位、 7 4 位、 7 5 位、 7 6 位、 7 7 位、 7 8 位、 7 9 位、 8 0 位、 8 1 位、 8 2 位、 8 3 位、 8 4 位、 8 5 位、 8 6 位、 8 7 位、 8 8 位、 8 9 位、 9 0 位、 9 1 位、 9 2 位、 9 3 位、 9 4 位、 9 5 位、 9 6 位、 9 7 位、 9 8 位、 9 9 位、 1 0 0 位、 1 0 1 位、 1 0 2 位、 1 0 3 位、 1 0 4 位、 1 0 5 位、 1 0 6 位、 1 0 7 位、 1 0 8 位、 1 0 9 位、 1 1 0 位、 1 1 1 位、 1 1 2 位、 1 1 3 位、 1 1 4 位、 1 1 5 位、 1 1 6 位、 1 1 7 位、 1 1 8 位、 1 1 9 位、 1 2 0 位、 1 2 1 位、 1 2 2 位、 1 2 3 位、 1 2 4 位、 1 2 5 位、 1 2 6 位、 1 2 7 位、 1 2 8 位、 1 2 9 位、 1 3 0 位、 1 3 1 位、 1 3 2 位、 1 3 3 位、 1 3 4 位、 1 3 5 位、 1 3 6 位、 1 3 7 位、 1 3 8 位、 1 3 9 位、 1 4 0 位、 1 4 1 位、 1 4 2 位、 1 4 3 位、 1 4 4 位、 1 4 5 位、 1 4 6 位、 1 4 7 位、 1 4 8 位、 1 4 9 位、 1 5 0 位、 1 5 1 位、 1 5 2 位、 1 5 3 位、 1 5 4 位、 1 5 5 位、 1 5 6 位、 1 5 7 位、 1 5 8 位、 1 5 9 位、 1 6 0 位、 1 6 1 位、 1 6 2 位、 1 6 3 位、 1 6 4 位、 1 6 5 位、 1 6 6 位、 1 6 7 位、 1 6 8 位、 1 6 9 位、 1 7 0 位、 1 7 1 位、 1 7 2 位、 1 7 3 位、 1 7 4 位、 1 7 5 位、 1 7 6 位、 1 7 7 位、 1 7 8 位、 1 7 9 位、 1 8 0 位、 1 8 1 位、 1 8 2 位、 1 8 3 位、 1 8 4 位、 1 8 5 位、 1 8 6 位、 1 8 7 位、 1 8 8 位、 1 8 9 位、 1 9 0 位、 1 9 1 位、 1 9 2 位 ( すなわちタンパク質のカルボキシル末端 ) 、 およびこれらの任意の組合せ ( 配列番号 1 、 配列番号 2 における対応するアミノ酸、または他の p S T ポリペプチドにおける対応するアミノ酸 ) に存在する P h e 残基、 T r p 残基または T y r 残基の 1 つは、天然にコードされていない以下のアミノ酸 :

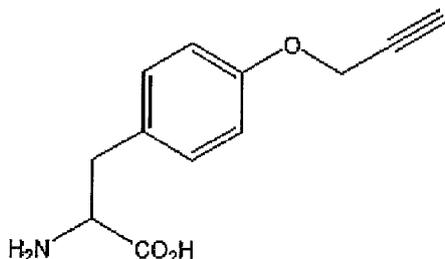
20

30

40

【 0 7 5 4 】

## 【化 5 1】



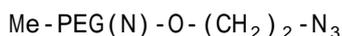
## 【 0 7 5 5】

10

を用いて、実施例 7 に記載の通りに置換される。

## 【 0 7 5 6】

いったん修飾されると、PEG は、アルキン含有アミノ酸を含んでいる p S T ポリペプチドのバリエーションに対して結合される。PEG は、以下の構造：



を有しており、結合させる手法は実施例 7 における手法にしたがう。これは、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる p S T ポリペプチドのバリエーションを生成する。当該アミノ酸は、天然に存在する巨大な疎水性アミノ酸の 1 つと等配電子性であり、上記ポリペプチドないの異なる部位において PEG 誘導体を用いて修飾されている。

## 【 0 7 5 7】

20

〔実施例 1 2：1 つ以上の PEG リンカーによって隔てられている、p S T ポリペプチドのホモ二量体、ヘテロ二量体、ホモ多量体またはヘテロ多量体の生成〕

実施例 7 において生成されたアルキン含有 p S T ポリペプチドは、以下の形態：



(ここで、n は 4 であり、PEG は約 5 0 0 0 の平均分子量を有している)

の二機能性の PEG 誘導体と反応させられて、対応する p S T ポリペプチドのホモ二量体を生成する。2 つの p S T 分子は PEG によって物理的に隔てられている。類似の様式において、p S T ポリペプチドは、1 つ以上の他のポリペプチドと結合されて、ヘテロ二量体、ホモ多量体またはヘテロ多量体を形成し得る。結合、精製および分析は、実施例 3 および 7 の通りに実施される。

30

## 【 0 7 5 8】

〔実施例 1 3：p S T ポリペプチドに対する糖部分の結合〕

以下の残基：1 位より前 (すなわち N 末端)、1 位、3 位、4 位、5 位、6 位、7 位、8 位、9 位、10 位、11 位、12 位、13 位、14 位、15 位、16 位、17 位、18 位、19 位、20 位、21 位、23 位、24 位、25 位、26 位、27 位、28 位、29 位、30 位、31 位、32 位、33 位、34 位、35 位、36 位、37 位、38 位、39 位、40 位、41 位、42 位、43 位、44 位、45 位、46 位、47 位、48 位、49 位、50 位、51 位、52 位、53 位、54 位、55 位、56 位、57 位、58 位、59 位、60 位、61 位、62 位、63 位、64 位、65 位、66 位、67 位、68 位、69 位、70 位、71 位、72 位、73 位、74 位、75 位、76 位、77 位、78 位、79 位、80 位、81 位、82 位、83 位、84 位、85 位、86 位、87 位、88 位、89 位、90 位、91 位、92 位、93 位、94 位、95 位、96 位、97 位、98 位、99 位、100 位、101 位、102 位、103 位、104 位、105 位、106 位、107 位、108 位、109 位、110 位、111 位、112 位、113 位、114 位、115 位、116 位、117 位、118 位、119 位、120 位、121 位、122 位、123 位、124 位、125 位、126 位、127 位、128 位、129 位、130 位、131 位、132 位、133 位、134 位、135 位、136 位、137 位、138 位、139 位、140 位、141 位、142 位、143 位、144 位、145 位、146 位、147 位、148 位、149 位、150 位、151 位、152 位、153 位、154 位、155 位、156 位、157 位、158 位、159 位、160 位、161 位、162 位、163

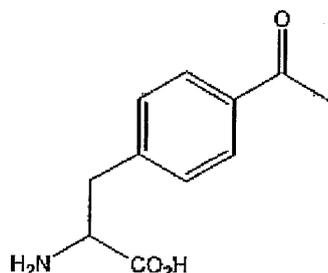
40

50

位、164位、165位、166位、167位、168位、169位、170位、171位、172位、173位、174位、175位（すなわちタンパク質のカルボキシル末端）、およびそれらの任意の組合せ（配列番号1、配列番号2における対応するアミノ酸、または他のpSTポリペプチドにおける対応するアミノ酸）のうちの1つは、天然にコードされていない以下のアミノ酸：

【0759】

【化52】



10

【0760】

を用いて置換される。

【0761】

いったん修飾されると、カルボニル含有アミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドのバリエーションは、N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）の結合されているアミノキシ類似物と反応させられる。pSTポリペプチドのバリエーション（10mg/mL）およびアミノキシ糖（21mM）を、100mMの水性の酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.5）において混合し、7～26時間にわたって37℃においてインキュベートする。糖を結合させたpSTポリペプチド（5mg/mL）を、UDP-ガラクトース（16mM）および-1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ（0.4ユニット/mL）と、48時間にわたって周囲温度において、HEPES緩衝液（pH7.4）においてインキュベートすることによって、第2の糖を、第1の糖と酵素的に結合させる（Schanbacher et al. J. Biol. Chem. 1970, 245, 5057-5061）。

20

【0762】

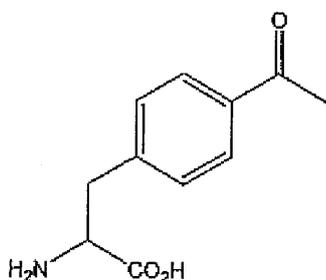
〔実施例14：PEG付加されたpSTポリペプチドアンタゴニスト〕

30

残基（pST受容体結合に関与する残基が挙げられるが、これらに限定されない）を、天然にコードされていない以下のアミノ酸：

【0763】

【化53】



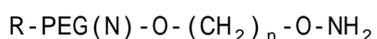
40

【0764】

を用いて、実施例3に記載の通りに置換する。

【0765】

いったん修飾されると、カルボニル含有アミノ酸を含んでいるpSTポリペプチドのバリエーションは、以下の形態：



（ここで、Rはメチルであり、Nは20000MWである）

のアミノキシ含有のPEG誘導体と反応させられて、天然にコードされていないアミノ

50

酸を含んでいる b - G C S F ポリペプチドを生成する。当該アミノ酸は、上記ポリペプチドないの単一の部位において P E G 誘導体を用いて修飾されている。結合、精製および分析は実施例 3 のように実施される。

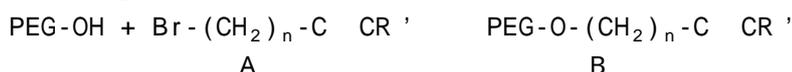
【 0 7 6 6 】

〔実施例 1 5 : p S T 分子が直接的に連結されている、p S T ポリペプチドのホモ二量体、ヘテロ二量体、ホモ多量体またはヘテロ多量体の生成〕

アルキン含有アミノ酸を含んでいる p S T ポリペプチドのバリエーションは、アジド含有アミノ酸を含んでいる他の p S T ポリペプチドのバリエーションと直接的に結合され得る。類似の様式において、p S T ポリペプチドは、1 つ以上の他のポリペプチドと結合されて、ヘテロ二量体、ホモ多量体またはヘテロ多量体を形成し得る。結合、精製および分析は実施例 3、6 および 7 のように実施される。

【 0 7 6 7 】

〔実施例 1 6 〕



ポリアルキレングリコール ( P - O H ) は、ハロゲン化アルキル ( A ) と反応させられて、エーテルを形成する。これらの化合物において、n は 1 ~ 9 までの整数であり、R ' は、直鎖状または分枝鎖状の、飽和または不飽和の C 1 ~ C 2 0 アルキル基または C 1 ~ C 2 0 ヘテロアルキル基であり得る。また、R ' は、飽和もしくは不飽和の C 3 ~ C 7 シクロアルキル基もしくは C 3 ~ C 7 ヘテロシクロアルキル基、置換されているか、もしくは非置換のアリール基もしくはヘテロアリール基、または置換されているか、もしくは非置換のアルカリル基 ( アルキルは飽和または不飽和の C 1 ~ C 2 0 アルキルである ) もしくはヘテロアルカリル基であり得る。典型的に、P E G - O H は、8 0 0 ~ 4 0 0 0 0 ダルトン ( D a ) の分子量を有しているポリエチレングリコール ( P E G ) またはモノエトキシポリエチレングリコール ( m P E G ) である。

【 0 7 6 8 】

〔実施例 1 7 〕



T H F ( 3 5 m L ) における N a H ( 1 2 m g 、 0 . 5 m m o l ) を用いて、2 0 0 0 0 D a の分子量を有している m P E G - O H ( m P E G - O H 2 0 k D a ; 2 . 0 g 、 0 . 1 m m o l 、 Sunbio ) を処理した。それから、キシレンに 8 0 重量 % の溶液として溶解されているプロパルギルプロミド ( 0 . 5 6 m L 、 5 m m o l 、 5 0 等量、Aldrich ) 、および触媒量の K I を溶液に加え、生じた混合物を 2 時間にわたって加熱して、還流させた。それから、水 ( 1 m L ) を加え、溶媒を真空下において除去した。残余物に対して C H 2 C l 2 ( 2 5 m L ) を加え、有機相を分離し、無水 N a 2 S O 4 に通して乾燥させ、容積を約 2 m L まで減少させた。この C H 2 C l 2 溶液をジエチルエーテル ( 1 5 0 m L ) に滴下して加えた。生じた沈殿物を、回収し、冷却したジエチルエーテルを用いて数回にわたって洗浄し、乾燥させてプロパルギル - O - P E G を生じさせた。

【 0 7 6 9 】

〔実施例 1 8 : mPEG-OH + Br-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-C CH mPEG-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-C CH〕

T H F ( 3 5 m L ) における N a H ( 1 2 m g 、 0 . 5 m m o l ) を用いて、2 0 0 0 0 D a の分子量を有している m P E G - O H ( m P E G - O H 2 0 k D a ; 2 . 0 g 、 0 . 1 m m o l 、 Sunbio ) を処理した。それから、5 0 等量の 5 - ブロモ - 1 - ペンチン ( 0 . 5 3 m L 、 5 m m o l 、 Aldrich ) 、および触媒量の K I を混合物に加えた。生じた混合物を 1 6 時間にわたって加熱して、還流させた。それから、水 ( 1 m L ) を加え、溶媒を真空下において除去した。残余物に対して C H 2 C l 2 ( 2 5 m L ) を加え、有機相を分離し、無水 N a 2 S O 4 に通して乾燥させ、容積を約 2 m L まで減少させた。この C H 2 C l 2 溶液をジエチルエーテル ( 1 5 0 m L ) に滴下して加えた。生じた沈殿物を、回収し、冷却したジエチルエーテルを用いて数回にわたって洗浄し、乾燥させて対応するアルキンを生じさせた。5 - クロロ - 1 - ペンチンは類似の反応に使用される。

10

20

30

40

50

## 【0770】

〔実施例19：mPEG-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>の生成〕

- (1) m-HOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>OH + NaOH + Br-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CH<sub>3</sub> → m-HOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>  
 (2) m-HOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CH<sub>3</sub> + MsCl + N(Et)<sub>3</sub> → m-MsOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>  
 (3) m-MsOCH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CH<sub>3</sub> + LiBr → m-Br-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>  
 (4) mPEG-OH + m-Br-CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CH<sub>3</sub> → mPEG-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>O-CH<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>

THF (50 mL) および水 (2.5 mL) における3-ヒドロキシベンジルアルコール (2.4 g、20 mmol) の溶液に対して、粉末状の水酸化ナトリウム (1.5 g、37.5 mmol) をまず加え、それからキシレン (3.36 mL、30 mmol) における80重量%の溶液として溶解させたプロパルギルプロミドの溶液を加えた。反応混合物を6時間にわたって還流しながら加熱した。混合物に対して10%のクエン酸 (2.5 mL) を加え、溶媒を真空下において除去した。酢酸エチル (3 × 15 mL) を用いて残余物を抽出し、混合性の有機層を、NaClの飽和溶液 (10 mL) を用いて洗浄し、MgSO<sub>4</sub>に通して乾燥させ、濃縮して3-プロパルギロキシベンジルアルコールを生じさせた。

10

## 【0771】

塩化メタンスルホニル (2.5 g、15.7 mmol) およびトリエチルアミン (2.8 mL、20 mmol) を、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>における化合物3 (2.0 g、11.0 mmol) の溶液に対して0°Cにおいて加え、反応物を16時間にわたって冷却装置に入れておいた。通常の手続きによって淡黄色の油状物としてメシレートが生じた。この油状物 (2.4 g、9.2 mmol) をTHF (20 mL) に溶解させ、LiBr (2.0 g、23.0 mmol) を加えた。反応混合物を1時間にわたって加熱して還流し、それから室温まで冷却させた。混合物に水 (2.5 mL) を加え、真空下において溶媒を除去した。酢酸エチル (3 × 15 mL) を用いて残余物を抽出し、混合性の有機層を、飽和NaCl溶液 (10 mL) を用いて洗浄し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>に通して乾燥させ、濃縮して所望の臭化物を生じさせた。

20

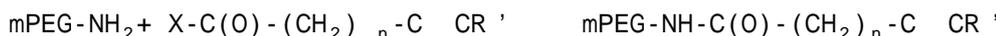
## 【0772】

mPEG-OH 20 kDa (1.0 g、0.05 mmol, Sunbio) をTHF (20 mL) に溶解させ、溶液を冷却槽において冷却した。数分間にわたって激しく攪拌しながらNaH (6 mg、0.25 mmol) を加え、それから上述のように得られた臭化物 (2.55 g、11.4 mmol) および触媒量のKIを加えた。冷却槽を外し、生じた混合物を12時間にわたって加熱して還流した。混合物に水 (1.0 mL) を加え、真空下において溶媒を除去した。残余物にCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) を加え、有機層を分離し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>に通して乾燥させ、容積を約2 mLまで減少させた。エーテル溶液 (150 mL) に滴下して加えて、白色の沈殿物を生じさせた。当該沈殿物を回収してPEG誘導体を得た。

30

## 【0773】

〔実施例20〕



また、末端アルキン含有ポリ(エチレングリコール)重合体は、末端官能基を含んでいるポリ(エチレングリコール)を、上述のアルキン官能基を含んでいる反応性の分子と結合させることによって取得され得る。

40

## 【0774】

〔実施例21：mPEG-NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>の生成〕

- (1) HO<sub>2</sub>C-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CH<sub>3</sub> + NHS + DCC → NHSO-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>  
 (2) mPEG-NH<sub>2</sub> + NHSO-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CH<sub>3</sub> → mPEG-NH-C(O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> CH<sub>3</sub>

4-ペンチン酸 (2.943 g、3.0 mmol) をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (25 mL) に溶解させた。N-ヒドロキシコハク酸塩 (3.80 g、3.3 mmol) およびDCC (4.66 g、3.0 mmol) を加え、溶液を室温において一晩にわたって攪拌した。生じた粗製のNHSエステル7をさらに精製することなく以下の反応に使用した。

50

## 【0775】

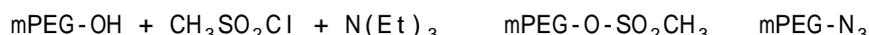
5000 Daの分子量を有しているmPEG-NH<sub>2</sub> (mPEG-NH<sub>2</sub>、Sunbio)をTHF (50 mL)に溶解させ、混合物を4℃まで冷却した。激しく攪拌しながらNHSEステル 7 (400 mg、0.4 mmol)を数回に分けて加えた。混合物を室温まで温めながら3時間にわたって攪拌して放置した。それから、水 (2 mL)を加え、真空下において溶媒を除去した。残余物にCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL)を加え、有機層を分離し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>に通して乾燥させ、容積を約2 mLまで減少させた。このCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>溶液をエーテル (150 mL)に滴下して加えた。生じた沈殿物を回収し、真空下において乾燥させた。

## 【0776】

〔実施例22：ポリ(エチレングリコール)のメタンスルホネートまたはメシレートの調製〕

本実施例において、ポリ(エチレングリコール)のメタンスルホニルエステル(ポリ(エチレングリコール)のメタンスルホネートまたはメシレートとも呼ばれる)の調製について説明する。対応するトシレートおよびハロゲン化物は、類似の手法によって調製され得る。

## 【0777】



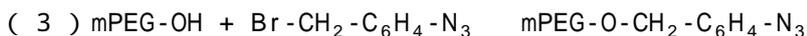
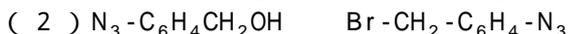
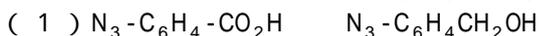
150 mLのトルエンにおけるmPEG-OH (MW = 3400、25 g、10 mmol)を窒素存在下において2時間にわたって共沸蒸留し、溶液を室温まで冷却した。40 mLの無水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>および2.1 mLの無水トリエチルアミン(15 mmol)を、溶液に加えた。溶液を冷却槽において冷却し、1.2 mLの蒸留した塩化メタンスルホン酸(15 mmol)を滴下して加えた。窒素存在下の室温において一晩にわたって溶液を攪拌し、2 mLの無水エタノールを加えることによって反応を停止させた。真空下において混合物を、蒸発させて主にトルエン以外の溶媒を除去し、ろ過し、真空下においてふたたび濃縮し、それから100 mLのジエチルエーテルにおいて沈殿させた。ろ過物を、冷却したエーテルを用いて数回にわたって洗浄し、真空下において乾燥させてメシレートを得た。

## 【0778】

メシレート(20 g、8 mmol)を75 mLのTHFに溶解させ、溶液を4℃まで冷却した。冷却した溶液にアジ化ナトリウム(1.56 g、24 mmol)を加えた。反応物を加熱して2時間にわたって窒素存在下において還流した。それから、溶媒を蒸発させ、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>を用いて残余物を希釈した。有機画分を、NaClを用いて洗浄し、無水MgSO<sub>4</sub>に通して乾燥させた。容積を20 mLまで減少させ、150 mLの冷却した無水エーテルを加えることによって生成物を沈殿させた。

## 【0779】

〔実施例23：mPEG-O-CH<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-N<sub>3</sub>の生成〕



4-アジドベンジルアルコールは、参照によって本明細書に援用される米国特許第5,998,595号に記載の方法を用いて生成され得る。塩化メタンスルホン酸(2.5 g、15.7 mmol)およびトリエチルアミン(2.8 mL、20 mmol)を、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>における4-アジドベンジルアルコール(1.75 g、11.0 mmol)の溶液に対して0℃において加え、16時間にわたって冷却装置に入れておいた。通常の手続きによって淡黄色の油状物としてメシレートを得た。この油状物(9.2 mmol)をTHF(20 mL)に溶解させ、LiBr(2.0 g、23.0 mmol)を加えた。反応混合物を加熱して1時間にわたって還流し、それから、室温まで冷却した。混合物に水(2.5 mL)を加え、真空下において溶媒を除去した。酢酸エチル(3 × 15 mL)を用いて残余物を抽出し、混合性の有機層を、飽和NaCl溶液(10 mL)を用いて洗浄し、無

10

20

30

40

50

水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  に通して乾燥させ、濃縮して所望の臭化物を得た。

【0780】

mPEG-OH 20kDa (2.0g、0.1mmol、Sunbio) を、THF (35 mL) における NaH (12mg、0.5mmol) を用いて処理し、触媒量の KI とともに上記臭化物 (3.32g、15mmol) を混合物に加えた。生じた混合物を加熱して12時間にわたって還流した。水 (1.0mL) を混合物に加え、真空下において溶媒を除去した。残余物に  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  を加え、有機層を、分離し、無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  に通して乾燥させ、容積を約 2 mL まで減少させた。エーテル溶液 (150 mL) に滴下して加えて沈殿物を生じさせ、沈殿物を回収して mPEG-O- $\text{CH}_2$ - $\text{C}_6\text{H}_4$ - $\text{N}_3$  を得た。

10

【0781】

〔実施例 24〕

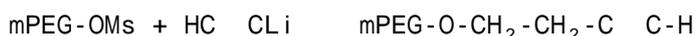


$\text{NH}_2\text{-PEG-O-CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$  (MW 3400 Da、2.0g) を  $\text{NaHCO}_3$  の飽和水溶液 (10 mL) に溶解させ、溶液を 0 まで冷却した。激しく攪拌しながら 3-アジド-1-N-ヒドロキシコハク酸イミドプロピオネート (5 等量) を加えた。3 時間後に、20 mL の  $\text{H}_2\text{O}$  を加え、室温においてさらなる 45 分間にわたって混合物を攪拌した。0.5 規定の  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を用いて pH を 3 に調整し、 $\text{NaCl}$  を約 15 重量% の濃度まで加えた。反応混合物を、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL  $\times$  3) を用いて抽出し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  に通して乾燥させ、濃縮した。冷却したエーテルを用いた沈殿の後に、生成物をろ過によって回収し、真空下において乾燥させて -カルボキシ-アジドPEG 誘導体を得た。

20

【0782】

〔実施例 25〕



当該分野に公知のように調製され、THF において -78 まで冷却されたリチウムアセチリド (4 等量) の溶液に、THF に溶解させた mPEG-MO の溶液を、激しく攪拌しながら滴下して加えた。3 時間後に、反応物を室温まで温め、1 mL のブタノールの添加によって反応を停止させた。それから、20 mL の  $\text{H}_2\text{O}$  を加え、混合物を室温においてさらなる 45 分間にわたって攪拌した。0.5 規定の  $\text{H}_2\text{SO}_4$  を用いて pH を 3 に調整し、 $\text{NaCl}$  を約 15 重量% の濃度まで加えた。反応混合物を、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100 mL  $\times$  3) を用いて抽出し、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  に通して乾燥させ、濃縮した。冷却したジエチルエーテルを用いた沈殿の後に、生成物をろ過によって回収し、真空下において乾燥させて 1-(ブト-3-イニロキシ)-メトキシポリエチレングリコール (mPEG) を得た。

30

【0783】

〔実施例 26 : アジド含有アミノ酸およびアセチレン含有アミノ酸の組み込み〕

アジド含有アミノ酸およびアセチレン含有アミノ酸は、L. Wang, et al., (2001), Science 292:498-500 ; J.W. Chin et al., Science 301:964-7 (2003) ; J. W. Chin et al., (2002), Journal of the American Chemical Society 124:9026-9027 ; J. W. Chin, & P. G. Schultz, (2002), Chem Bio Chem 3(11):1135-1137 ; J. W. Chin, et al., (2002), PNAS United States of America 99:11020-11024 ; および L. Wang, & P. G. Schultz, (2002), Chem. Comm., 1:1-11 に記載の方法を用いて、タンパク質へ部位特異的に組み込まれ得る。アミノ酸がいったん組み込まれると、2 mM の PEG 誘導体、1 mM の  $\text{CuSO}_4$  および ~ 1 mg の Cu ワイヤの存在下において、リン酸緩衝液 (PB) (pH 8) における 0.01 mM のタンパク質を用いて、4 時間にわたって 37 において環付加反応を実施した。

40

【0784】

〔実施例 27 : p-アセチル-D, L-フェニルアラニン (pAF) および m-PEG-ヒドロキシアミン誘導体の合成〕

50

ラセミ体の p S T は、Zhang, Z., Smith, B. A. C., Wang, L., Brock, A., Cho, C. & Schultz, P. G., *Biochemistry*, (2003) 42, 6735-6746においてこれまでに説明されている手法を用いて合成される。

【0785】

m - P E G - ヒドロキシアミン誘導体を合成するために、以下の手法が実施される。ジクロロメタン ( D C M、70 m L ) における ( N - t - B o c - アミノオキシ ) 酢酸 ( 0 . 382 g、2 . 0 m m o l ) および 1 , 3 - ジイソプロピルカルボジイミド ( 0 . 16 m L、1 . 0 m m o l ) の溶液 ( 1 時間にわたって室温 ( R T ) において攪拌される ) に対して、メトキシ - ポリエチレングリコールアミン ( m - P E G - N H <sub>2</sub>、7 . 5 g、0 . 25 m m o l、M t . 30 K、BioVectra ) を加えた。反応物を、48 時間にわたって R T において攪拌し、それから約 100 m L まで濃縮した。混合物を、冷却したエーテル ( 800 m L ) に滴下して加えた。t - B o c 保護した生成物を、沈殿させ、ろ過によって回収し、3 × 10 m L のエーテルによって洗浄した。それを、D C M ( 100 m L ) に再溶解させ、エーテル ( 100 m L ) において 2 回にわたって沈殿させることによって精製した。生成物を、真空下において乾燥させて、7 . 2 g を生じ、N M R およびニンヒドリン試験によって確認した。

10

【0786】

以上において得られた保護された生成物 ( 7 . 0 g ) の脱 B o c を、1 時間にわたって 0 の 50 % において、それから 1 . 5 時間にわたって R T において T F A / D C M において実施する。真空下において T F A のほとんどを除去した後に、ヒドロキシルアミン誘導体の T F A 塩を、ジオキサン ( 1 m L ) における 4 規定の H C l を残余物に加えることによって H C l 塩に変換させる。沈殿物を、D C M ( 50 m L ) に再溶解させ、エーテル ( 800 m L ) において再沈殿させる。最終生成物 ( 6 . 8 g、97 % ) を、ろ過によって回収し、3 × 100 m L のエーテルを用いて洗浄し、真空下において乾燥させ、窒素存在下において保存した。他の P E G ( 5 K、20 K ) のヒドロキシルアミン誘導体を、同じ手法を用いて合成する。

20

【0787】

〔実施例 28 : P E G 付加された p S T のインビトロ活性およびインビボ活性〕

P E G - p S T、未修飾の P E G および緩衝溶液を、マウスまたはラットに投与する。結果は、未修飾の p S T と比べて、本発明の P E G 付加された p S T の優れた活性および延長された半減期を示し、マウスごとに同じ用量を用いて有意に多い量の好中球および白血球数の最大値のシフトによって示唆されている。

30

【0788】

本発明の p S T ポリペプチドは、静脈内または皮下の経路によってマウスに投与される。動物は、投与前および投与後の複数の時点において採血される。血漿は、各サンプルから回収され、放射線免疫アッセイによって分析される。排泄半減期は、算出され、天然にコードされていないアミノ酸を含んでいる p S T ポリペプチドと、野生型の p S T または本発明の p S T ポリペプチドの種々の形態と比較される。同様に、本発明の p S T ポリペプチドはカニクイザルに投与され得る。動物は、投与前および投与後の複数の時点において採血される。血漿は、各サンプルから回収され、放射線免疫アッセイによって分析される。

40

【0789】

本発明のポリペプチドは、疾患モデルの動物に投与され得る。実施され得る動物実験は、パストレラヘモリチカを用いて攻撃した畜牛、乳腺の細菌攻撃 / 乳腺炎誘発 ( *Klebsiella pneumonia* ) を受けた畜牛をともなう。実施され得る他の実験は、ウシの呼吸器疾患の制御、発生率および持続期間、または大腸菌による乳腺炎の予防を評価する。動物の健康状態、乳の生成量、好中球数および他のパラメータを評価する方法は、当業者にとって公知である。本発明の p S T ポリペプチドを評価するために使用され得る他のモデルとしては、感染症または感染ばくろの動物モデル ( 例えば、*Pseudomonas aeruginosa* による肺炎のハムスターモデル、*Candida albicans* による腎盂腎炎のラットモデル、新生児の子馬に

50

関するモデル、および成長期のブタに関するモデル)が挙げられるが、これらに限定されない。これらのモデルのいくつかは、米国特許第5,849,883号および国際公開第89/10932号に記載されている。これらのモデルは当業者にとって公知である。

【0790】

(<sup>3</sup>H - チミジンアッセイ)

<sup>3</sup>H - チミジンアッセイを標準的な方法を用いて実施する。骨髄を、屠殺したメスの B a 1 b C マウスまたは他の動物から得る。骨髄細胞を、簡単に懸濁させ、遠心分離し、成長培地に再懸濁させる。約10000細胞を含んでいる160 μlの分取物を、96ウェルのマイクロタイタープレートの各ウェルに入れる。精製したpST類似物のサンプル(上述のように調製した)を各ウェルに加え、68時間にわたってインキュベートする。トリチウム化したチミジンウェルに加え、さらなる5時間にわたってインキュベートする。5時間のインキュベート後に、細胞を、回収し、ろ過し、十分にリンスした。ろ過物を、シンチレーション液の入っているバイアルに加える。放射をカウントする(LKB Beta plateシンチレーションカウンター)。標準物および類似物を3つ1組にして分析し、標準曲線を大きく上回っているか、または大きく下回っているサンプルを、適切な希釈をともなって再アッセイする。結果を、未変更のpST標準物の結果に対する3つ1組の類似物の平均を取ったデータとして記録する。

10

【0791】

ヒトの骨髄細胞の増殖誘導を、<sup>3</sup>H - チミジンの増加した取り込みに基づいて評価する。健全な提供者から得られたヒトの骨髄細胞を、Ficoll-Hypaque (1.077 g/ml、Pharmacia)を用いて密度カット(density cut)に供し、低密度の細胞を、10%のウシ胎児血清およびglutamine pen-strepを含んでいるIscove's培地(GIBCO)に懸濁させる。続いて、2 × 10<sup>4</sup>のヒトの骨髄細胞を、96の平底ウェルプレートにおけるコントロール培地または組換えE. coli由来のpST材料とともに、5%CO<sub>2</sub>の37 °Cにおいて2日にわたってインキュベートする。サンプルを、2つ1組みにして、10000倍の範囲にわたって変化する濃度においてアッセイする。それから、培養物0.5 μCi / ウェルの<sup>3</sup>H - チミジン(New England Nuclear, Boston, Mass)を用いて4時間にわたってパルスする。<sup>3</sup>H - チミジンの取り込みを、Venuta, et al., Blood, 61, 781 (1983)に記載の通りに測定する。

20

【0792】

(WEHI - 3 B D<sup>+</sup>分化誘導)

マウスの骨髄端急性白血病脂肪株WEHI - 3 B D<sup>+</sup>の分化を誘導する、本発明のpSTポリペプチドの能力を、Metcalf, Int. J. Cancer, 25, 225 (1980)に記載されているように、半固体の寒天培地において評価する。組換えpST生成物および培地コントロールを、5%CO<sub>2</sub>の37 °Cにおいて7日にわたって、約60 WEHI - 3 B D<sup>+</sup>細胞 / ウェルとともにインキュベートする。サンプルを、24ウェルの平底プレートにおいてインキュベートし、濃度を2000倍の範囲にわたって変更する。コロニーを。未分化、部分的に分化または完全に分化と分類し、コロニー細胞数を顕微鏡的にカウントする。

30

【0793】

(CFU - GMアッセイ、BFU - EアッセイおよびCFU - GEMMアッセイ)

ヒトのG - CSFおよびhG - CSFの天然の単離物は、ヒトの骨髄細胞を増殖させ、分化させると考えられる。これらの活性を、健全なヒトの提供者から得られた非接着性の低密度の骨髄細胞を用いた、CFU - GMアッセイ(Broxmeyer, et al., Exp. Hematol., 5, 87, (1971))、BFU - EアッセイおよびCFU - GEMM(Lu, et al., Blood, 6150 (1983))アッセイにおいて測定する。他の源から得られた細胞を使用し得る。50ユニットのG - CSFまたは本発明のpSTのいずれかを用いたCFU - GM、BFU - EおよびCFU - GEMMの生物活性の比較を実施する。

40

【0794】

コロニーアッセイを、非接着性の低密度の骨髄細胞を用いて実施する。ヒトの骨髄細胞を、Ficoll-Hypaque (1.077 g/cm<sup>3</sup>の密度、Pharmacia)を用いた密度カットに

50

供する。それから、低密度の細胞を、ウシ胎児血清を含んでいる Iscove's 改変 Dulbecco's 培地に再懸濁させ、Falcon 組織培養ディッシュ (No. 3003, Becton Dickinson, Cockeysville, Md.) に接着させるために、1.5 時間にわたって 37 °C においておく。

#### 【0795】

培地コントロールは、10%の FCS、0.2 mM のヘミンおよび組換えエリスロポエチンを含んでいる Iscove's 改変 Dulbecco's 培地からなる。CFU-GM アッセイのために、 $1 \times 10^5$  の標的の細胞を、補完した McCoy's 5A 培地および 10% の非働化したウシ胎児血清を含んでいる 0.3% の寒天培養培地の 1 mL において培養する。培養物をコロニー (凝集物につき 40 を超える細胞) について評価し、形態を培養の 7 日目に判断する。コロニー数は、4 つ 1 組のプレートから決定された平均値  $\pm$  標準誤差として示されている。

10

#### 【0796】

BFU-E アッセイおよび CFU-GEMM アッセイのために、細胞 ( $1 \times 10^5$ ) を、Iscove's 改変 Dulbecco 培地 (Gibco)、0.8% のメチルセルロース、30% のウシ胎児血清、0.05 nM の 2-メルカプトエタノール、0.2 mM のヘミンおよび 1 ユニットの組換えエリスロポエチンの混合物の 1 mL に加える。ディッシュを、5% CO<sub>2</sub> および 5% O<sub>2</sub> の加湿した雰囲気においてインキュベートする。低い酸素圧は、Reming Bioinstruments (Syracuse, N.Y.) から提供されている oxyreducer を用いて得られる。コロニーをインキュベーションの 14 日後に評価する。コロニーの数は、2 つ 1 組のプレートから決定されるような平均値  $\pm$  標準誤差として決定される。

20

#### 【0797】

(抱合した pST および非抱合の pST ならびにそれらのバリエーションのインビボ半減期の測定)

オスの Sprague Dawley ラット (約 7 週齢) を使用する。投与日に各動物の体重を測定する。用量は当業者にとって公知の方法を用いて決定され得、例えば非抱合の pST サンプルおよび抱合した pST サンプルの、体重 1 kg につき 100  $\mu$ g を、3 匹のラットの尾静脈の血管内に注入する。注入後の 1 分、30 分、1 時間、4 時間、6 時間および 24 時間に、500  $\mu$ l の血液を CO<sub>2</sub> 麻酔のもとに各ラットから回収する。血液サンプルを 1.5 時間にわたって室温において保存し、それから、遠心分離 (4 °C、18000  $\times$  g、5 分間) によって血清を単離する。血清サンプルを分析の日まで -80 °C に保存する。血清サンプルにおける活性な pST の量を、氷上においてサンプルを融解させた後における pST のインビボ活性アッセイによって定量化する。

30

#### 【0798】

(抱合した pST および非抱合の pST ならびにそれらのバリエーションの、健常ラットにおけるインビボ生物活性の測定)

SPF Sprague Dawley ラットにおける pST のインビボにおける生物学的な作用の測定を、抱合した pST および非抱合の pST ならびにこれらのバリエーションの有効性を評価するために使用する。到着日にラットを 6 つの群にランダムに割り当てる。動物を 7 日にわたって休息させ、不良な健康状態または極端な体重の個体を不採用にする。休息期間の開示におけるラットの体重の範囲は 250 ~ 270 g である。

40

#### 【0799】

投与日にラットを 6 時間にわたって絶食させ、それから pST またはこれらのバリエーションの体重 1 kg につき 100  $\mu$ g を皮下に注入する。各 pST サンプルは、ランダム化した 6 匹の群に注入する。EDTA によって安定化された 300  $\mu$ g の血液のサンプルを、投与前ならびに投与後の 6 時間、12 時間、24 時間、36 時間、48 時間、72 時間、96 時間、120 時間および 144 時間にラットの尾静脈から回収する。血液サンプルを、以下の血液学的要因：ヘモグロビン、赤血球カウント、ヘマトクリット、細胞容積の平均、細胞のヘモグロビン濃度の平均、白血球カウント、白血球百分率 (好中球、リンパ球、好酸球、好塩基球、単球) について分析する。これらの測定に基づいて、抱合した pST および非抱合の pST ならびにこれらのバリエーションの有効性を評価する。

#### 【0800】

50

(化学療法的に誘導された好中球減少症にかかっているラットにおける、抱合した p S T および非抱合の p S T ならびにそれらのバリエーションのインビオ生物活性の測定)

SPF Sprague Dawleyラットをこの分析に利用する。到着日に到着日にラットを6つの群にランダムに割り当てる。動物を7日にわたって休息させ、不良な健康状態または極端な体重の個体を不採用にする。休息期間の開示におけるラットの体重の範囲は250~270gである。

【0801】

p S T サンプルの投与の24時間前に、化学療法の抗がん剤によって生じる好中球減少症と類似する好中球減少症を誘導するシクロホスホアミド(CPA)の、体重1kgにつき50mgを、ラットの腹腔内に注入した。0日に、p S T およびこれらのバリエーションの体重1kgにつき100μgを皮下に注入した。各p S T サンプルを、6匹のランダム化した群に注入する。EDTAによって安定化された300μlの血液のサンプルを、投与前ならびに投与後の6時間、12時間、24時間、36時間、48時間、72時間、96時間、120時間および144時間にラットの尾静脈から回収する。血液サンプルを、以下の血液学的要因：ヘモグロビン、赤血球カウント、ヘマトクリット、細胞容積の平均、細胞のヘモグロビン濃度の平均、白血球カウント、白血球百分率(好中球、リンパ球、好酸球、好塩基球、単球)について分析する。これらの測定に基づいて、抱合したp S T および非抱合のp S T ならびにこれらのバリエーションの有効性を評価する。

10

【0802】

本明細書に記載の実施例および実施形態は単に例証を目的としていること、ならびにこれらに鑑みた種々の変形もしくは変更は当業者に示唆されており、かつ本願および添付の特許請求の範囲の精神および範囲に含まれることが、理解される。本明細書に引用されているすべての公開、特許、特許出願および/または他の文献は、個々の公開、特許、特許出願および/または他の文献がすべての目的のために参照によって本明細書に援用されると個々に示されていたと同じ程度に、すべての目的のために参照によってその全体が本明細書に援用される。

20

【0803】

【表5】

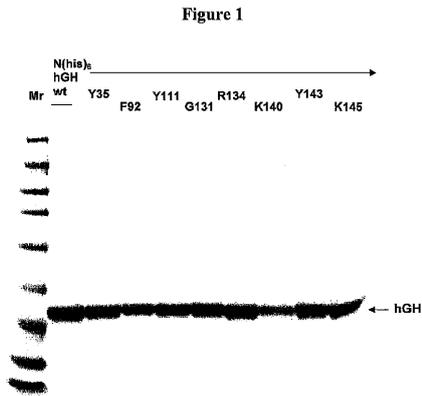
表5：上述の配列

30

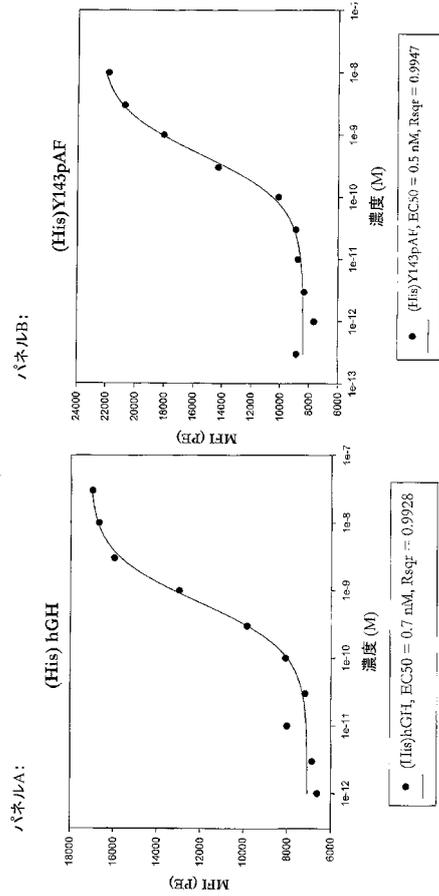
配列番号	配列の種類および名称	配列
1	ブタのソマトトロピンのアミノ酸配列	AFPAMPLSSLFANAVLRAQHLHQLAADTYKEFERAYIPEG QRYSIQNAQA AFCFSETIPAPT GKDEAQQRSDVELLRFSLL LIQSWLGPVQFLSRVFTNSLVFGTSDRVYEKLDLEEGIQ LMRELEDGSPRAGQILKQTYDKFDTNLRSDALLKKNYGL LSCFKKDLHKAETYL RVMKCRRFVESSCAF
2	安定化しているL118Eを有しているブタのソマトトロピンのアミノ酸配列	AFPAMPLSSLFANAVLRAQHLHQLAADTYKEFERAYIPEG QRYSIQNAQA AFCFSETIPAPT GKDEAQQRSDVELLRFSLL LIQSWLGPVQFLSRVFTNSLVFGTSDRVYEKLDLELGIQA LMRELEDGSPRAGQILKQTYDKFDTNLRSDALLKKNYGL LSCFKKDLHKAETYL RVMKCRRFVESSCAF

40

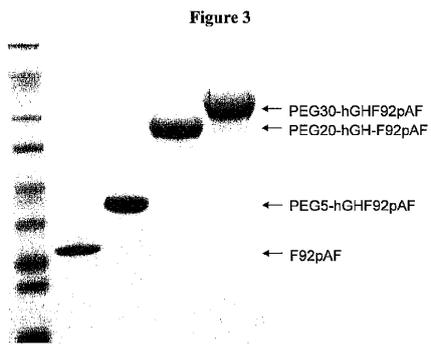
【 図 1 】



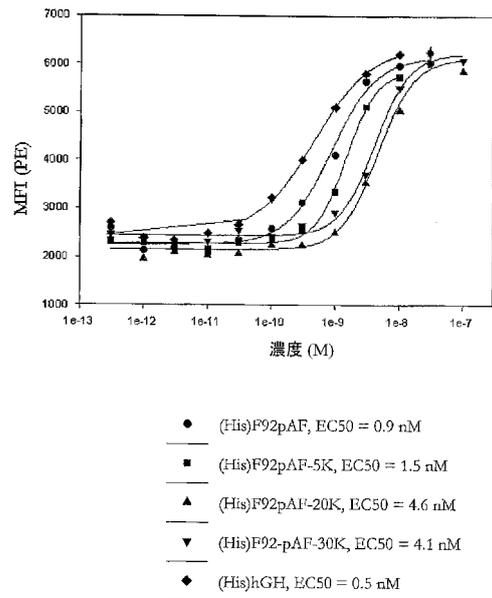
【 図 2 】



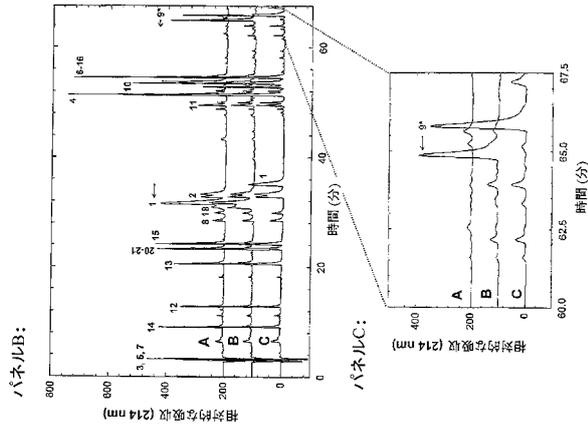
【 図 3 】



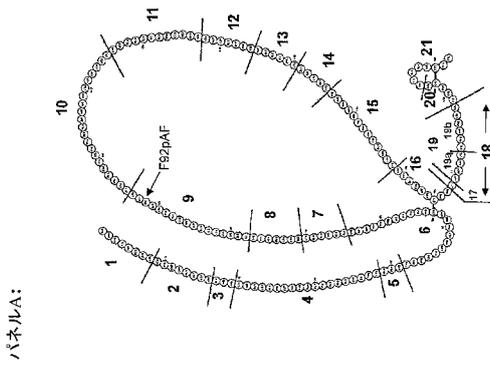
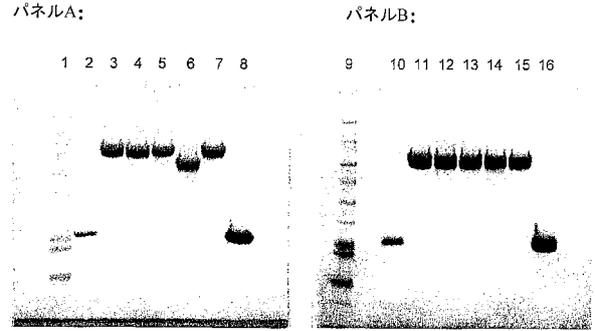
【 図 4 】



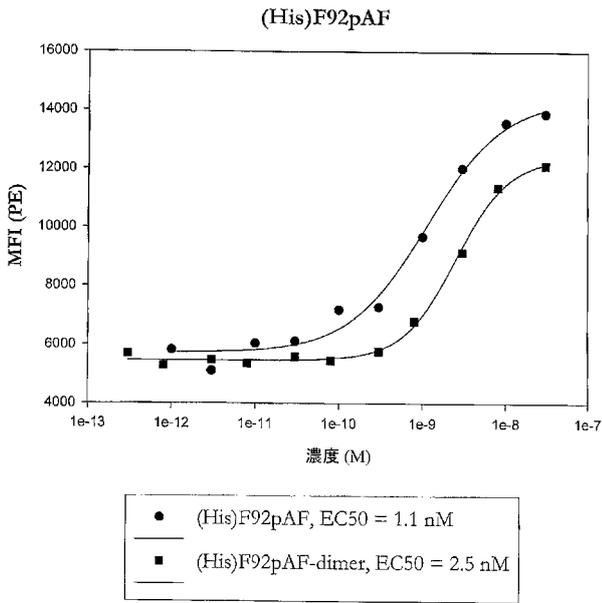
【 図 5 】



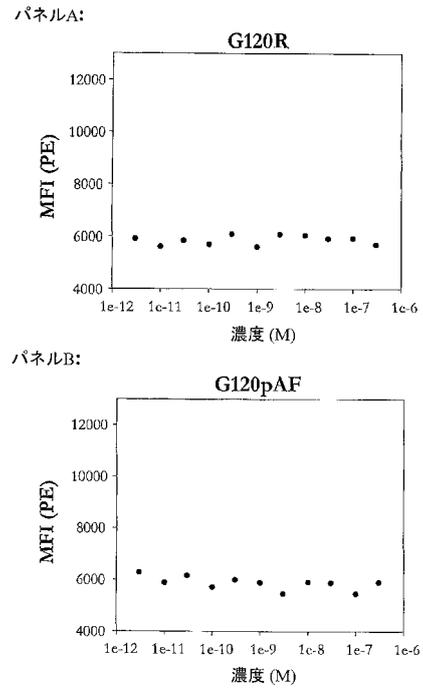
【 図 6 】



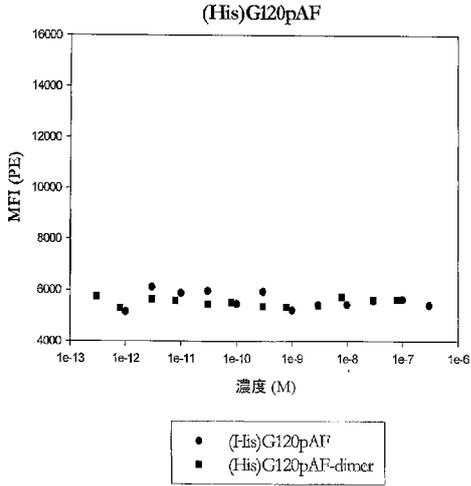
【 図 7 】



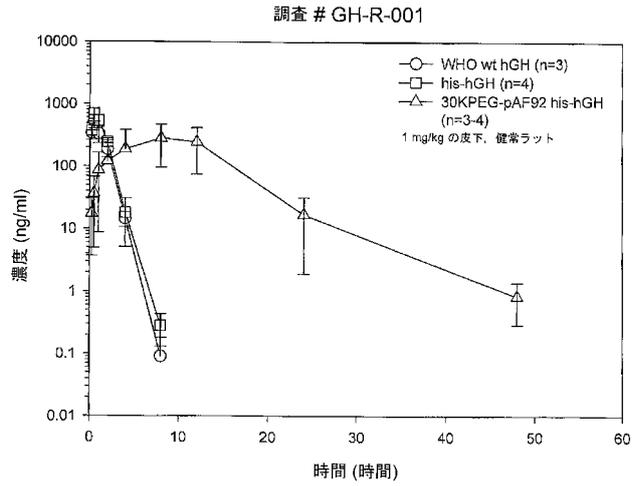
【 図 8 】



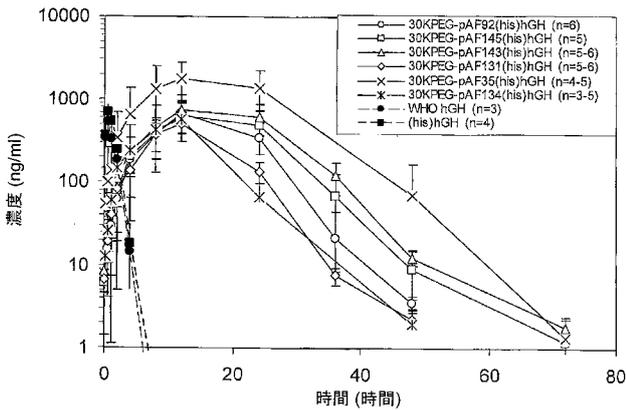
【 図 9 】



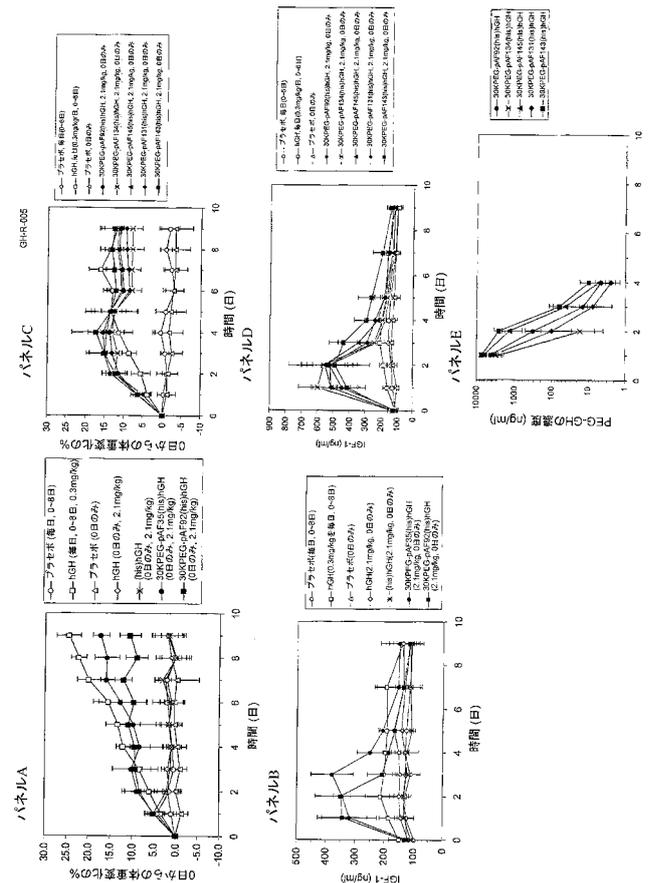
【 図 10 】



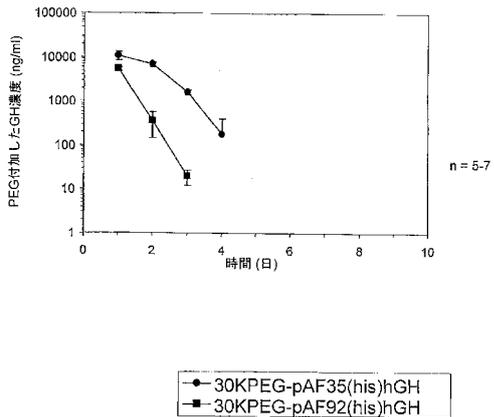
【 図 11 】



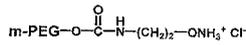
【 図 13 】



【 図 12 】



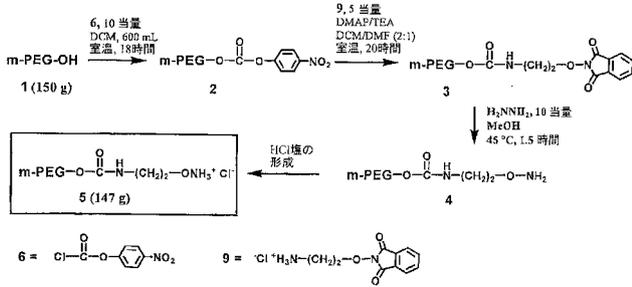
【 図 1 4 】



直鎖状の30kDaのモノエトキシーポリ(エチレングリコール)-2-アミノオキシエチルアミンカルバメートの塩酸塩

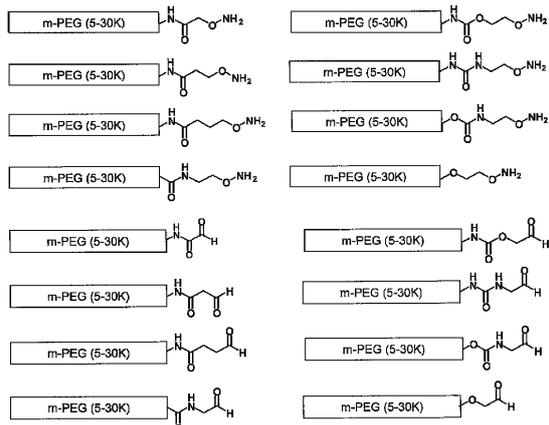
【 図 1 5 】

カルバメートを結合させたオキシアミノ誘導体化されているPEGの合成

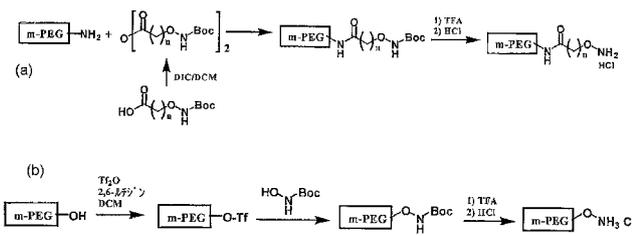


【 図 1 6 】

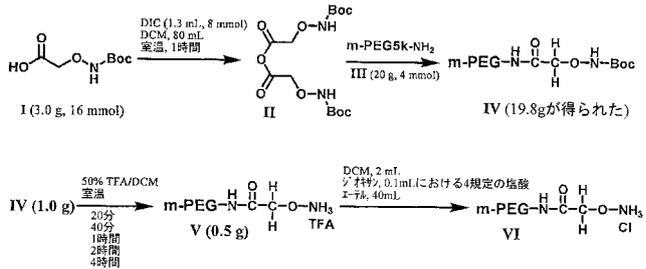
Figure 16



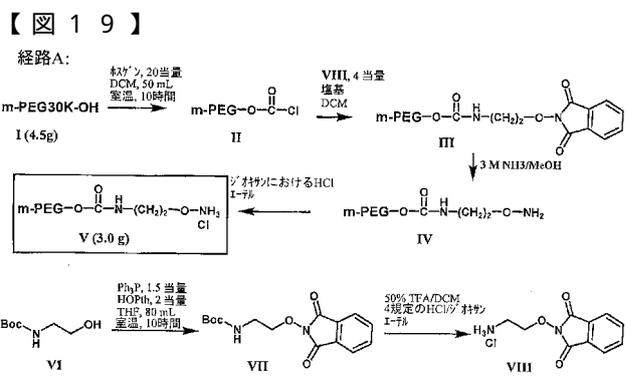
【 図 1 7 】



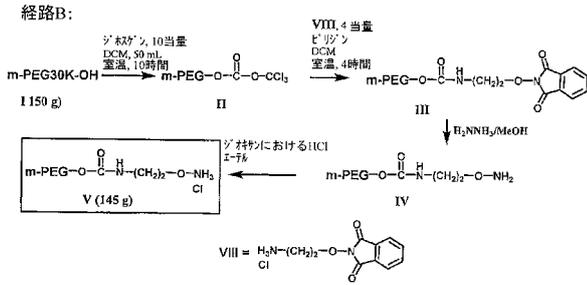
【 図 1 8 】



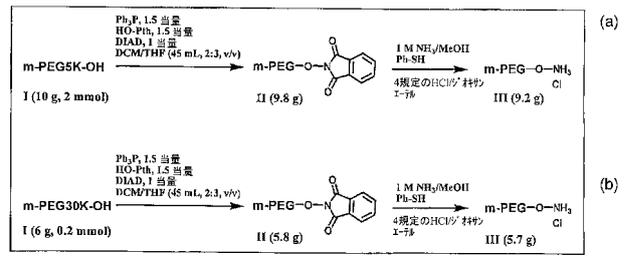
【 図 1 9 】



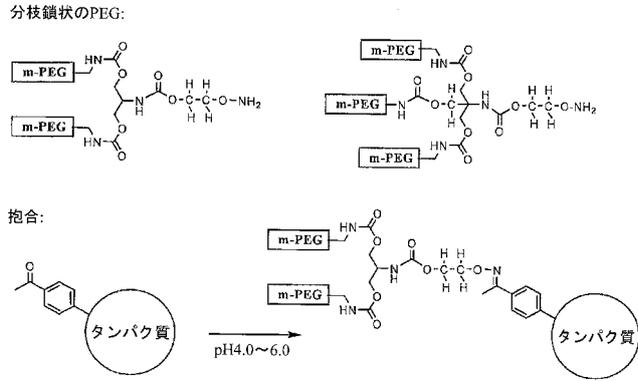
【 図 2 0 】



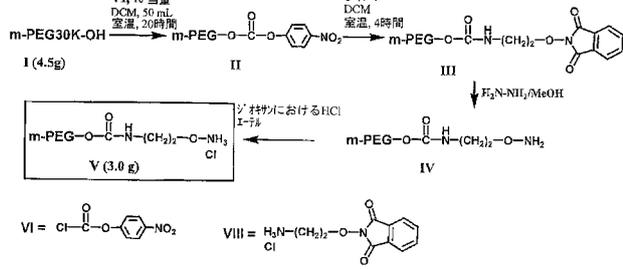
【 図 2 1 】



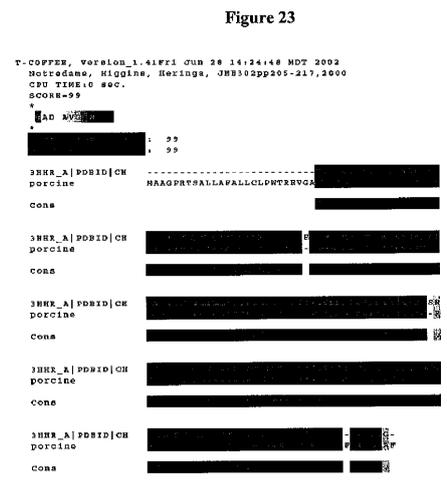
【 図 2 2 】



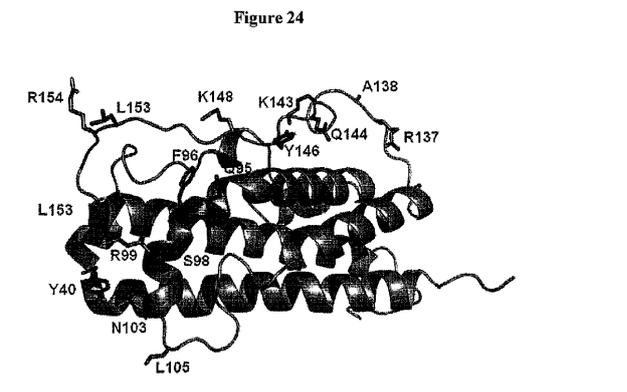
経路C:



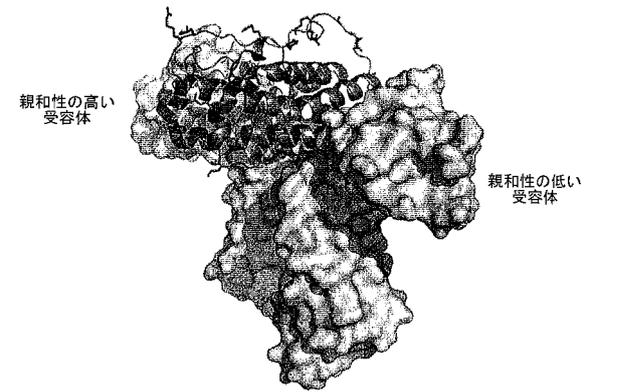
【 図 2 3 】



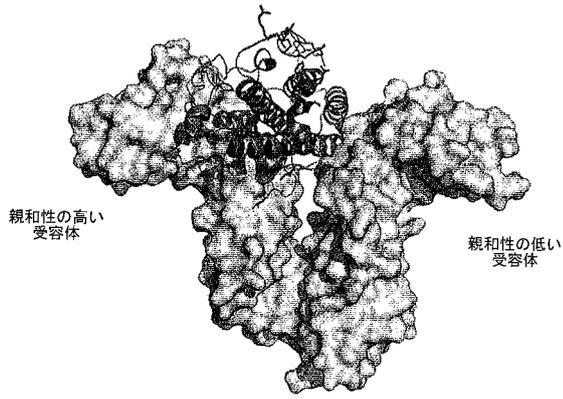
【 図 2 4 】



【 図 2 5 】

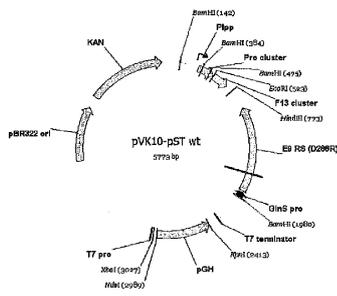


【 図 2 6 】

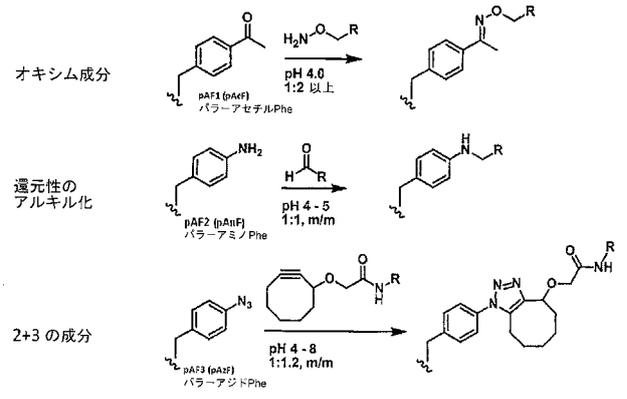


【 図 2 7 】

Figure 27

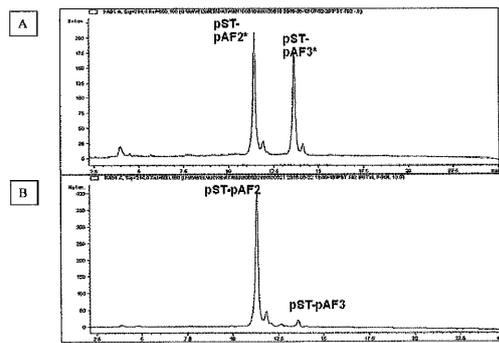


【 図 2 8 】

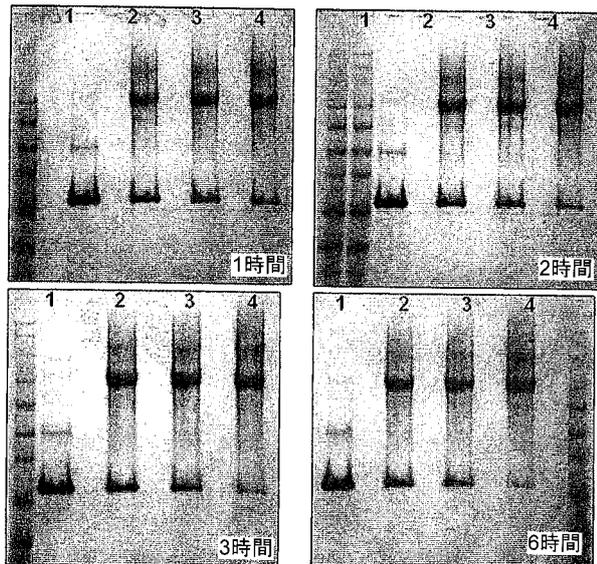


【 図 2 9 】

Figure 29



【 図 3 0 】



## 【配列表】

2013515081000001.app

## 【手続補正書】

【提出日】平成24年8月21日(2012.8.21)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1の35位、91位、92位、94位、95位、99位、101位、133位、134位、138位、139位、140位、142位、144位、149位、150位、154位、およびこれらの任意の組合せの位置からなる群から選択される配列番号1の位置において置換されている、天然にコードされていないアミノ酸を含んでおり、

配列番号1のN末端に連結されているメチオニンを必要に応じて含んでいる、ブタのソマトトロピン(pST)ポリペプチド。

【請求項2】

天然にコードされていない上記アミノ酸は、パラ-アセチルフェニルアラニン(pAF)、パラ-アミノフェニルアラニン(pAnF)、パラ-アジドフェニルアラニン(pAzF)、N-アセチルグルコサミニル-L-セリン、N-アセチルグルコサミニル-L-スレオニンおよびO-ホスホチロシンからなる群から選択される、請求項1に記載のpSTポリペプチド。

【請求項3】

リンカー、重合体または生物学的に活性な分子と連結されている、請求項1または2に記載のpSTポリペプチド。

【請求項4】

天然にコードされていない上記アミノ酸において連結されている、請求項3に記載のpSTポリペプチド。

【請求項5】

水溶性重合体と連結されている、請求項1～4のいずれか1項に記載のpSTポリペプチド。

【請求項6】

上記水溶性重合体はポリ(エチレングリコール)部分を含んでいる、請求項5に記載のpSTポリペプチド。

【請求項7】

上記水溶性重合体は約0.1kDaから約100kDaの分子量を有している、請求項6に記載のpSTポリペプチド。

【請求項8】

上記水溶性重合体は約30kDaの分子量を有している、請求項6または7に記載のpSTポリペプチド。

【請求項9】

配列番号1の35位において置換されている、天然にコードされていないアミノ酸を含んでおり、配列番号1のN末端に連結されているメチオニンを必要に応じて含んでおり、

天然にコードされていない上記アミノ酸は、パラ-アセチルフェニルアラニンであり、ポリ(エチレン)グリコール部分を含んでいる水溶性重合体と結合されている、pSTポリペプチド。

【請求項10】

上記水溶性重合体は約0.1kDaから約50kDaの分子量を有している、請求項9に記載のpSTポリペプチド。

**【請求項 1 1】**

上記水溶性重合体は約 30 kDa の分子量を有している、請求項 9 または 10 に記載の pST ポリペプチド。

**【請求項 1 2】**

配列番号 1 の 92 位において置換されている、天然にコードされていないアミノ酸を含んでおり、

配列番号 1 の N 末端に連結されているメチオニンを必要に応じて含んでおり、

天然にコードされていない上記アミノ酸は、パラ - アセチルフェニルアラニンであり、ポリ(エチレン)グリコール部分を含んでいる水溶性重合体と結合されている、pST ポリペプチド。

**【請求項 1 3】**

上記水溶性重合体は約 0.1 kDa から約 50 kDa の分子量を有している、請求項 12 に記載の pST ポリペプチド。

**【請求項 1 4】**

上記水溶性重合体は約 30 kDa の分子量を有している、請求項 12 または 13 に記載の pST ポリペプチド。

**【請求項 1 5】**

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の pST ポリペプチド、薬学的に受容可能な担体、および必要に応じて 1 つ以上の他の薬剤もしくは治療薬を含んでいる、薬学的製剤。

**【請求項 16】**

pST によって調節される疾患を有している動物の処置に使用する、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の pST ポリペプチドおよび必要に応じて 1 つ以上の他の薬剤もしくは治療薬。

**【請求項 1 7】**

pST によって調節される感染症を有している動物の処置に使用する、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の pST ポリペプチドおよび必要に応じて 1 つ以上の他の薬剤もしくは治療薬。

**【請求項 1 8】**

動物における感染症の予防に使用する、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の pST ポリペプチドおよび必要に応じて 1 つ以上の他の薬剤もしくは治療薬。

**【請求項 1 9】**

請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の pST ポリペプチドおよび必要に応じて 1 つ以上の他の薬剤もしくは治療薬の、治療用途のための、使用。

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 10/61671

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - C07K 14/475 (2011.01) USPC - 530/399 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) USPC: 530/399 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Databases Searched: PubWEST DB=PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB; PLUR=NO; OP=ADJ; Google Patents, Google Scholar. Search Terms Used: porcine, growth hormone, porcine somatotropin, pST, non-natural\$, protease, PEG, polyethylene glycol, haematopoiesis, gcsf, modulate, saccharide, linker, neutrophil, proliferation, substituted, amino acid		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	US 2008/0107680 A1 (Cho et al.) 8 May 2008 (08.05.2008) esp: paras [0020]-[0023], [0025], [0032]-[0036], [0038], [0039], [0041]-[0046], [0052], [0053], [0056]-[0058], [0114], [0240].	1-9, 22-47, 52, 53, 71, 72, 87-90, 92-95, 97, 99, 103 10-21, 73-85, 91, 96, 98
Y	US 5,849,694 A (Synenki et al.) 15 December 1998 (15.12.1998) esp: col 5, ln 48-52; col 7 ln 43-44; col 10 ln 3-6; Fig. 1.	10-21, 73-85, 91
Y	US 2006/0029581 A1 (Gianni) 9 February 2006 (09.02.2006) esp: para [0098], [0099], [0243], [0244].	96, 98
X — Y	US 2006/0094655 A1 (Guyon et al.) 4 May 2006 (04.05.2006) esp: para [0007]-[0010], [0022], [0024], [0097], [0164], [0168], [0171], [0207], [0282], [0284], [0332].	1-6, 8, 22-26 10-21, 73-81, 91
Y	US 5,210,180 A (Wang et al.) 11 May 1993 (11.05.1993) SEQ ID NO: 1.	10-21, 73-81, 91
A	VIOLAND et al. "Isolation and characterization of porcine somatotropin containing a succinimide residue in place of aspartate129" Protein Science (1992), Vol. 1, No. 12, pp. 1634-1641.	1-47, 52, 53, 71-85, 87-99, 103
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 12 May 2011 (12.05.2011)		Date of mailing of the international search report <b>24 MAY 2011</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/61671

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: claims 1-47, 52, 53, 71-85, 87-99, and 103, directed to a porcine somatotropin polypeptide comprising one or more non-naturally encoded amino acids.

Group II: claims 48-51, 66-68, 73, 86, 100-102 and 104, directed to a composition comprising a pST polypeptide and a pharmaceutically acceptable carrier, and a method comprising administration of said polypeptide to a subject, or a polypeptide administered to a subject.

- Please see extra sheet for continuation -

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-47, 52, 53, 71-85, 87-99, and 103

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 10/61671

## Continuation of Box III: Lack of Unity of Invention

Group III: claims 54, 55, 69 and 70, directed to a nucleic acid encoding a modified porcine somatotropin polypeptide, wherein the polynucleotide comprises at least one selector codon.

Group IV: claims 56-65, directed to a method of making a pST polypeptide, comprising contacting an isolated pST polypeptide comprising a non-naturally encoded amino acid with a linker, polymer or biologically active molecule comprising a moiety that reacts with the non-naturally encoded amino acid.

The inventions listed as Groups I - IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical feature of the Group IV claims is a method of making a bST polypeptide, comprising contacting an isolated bST polypeptide comprising a non-naturally encoded amino acid with a linker, polymer or biologically active molecule comprising a moiety that reacts with the non-naturally encoded amino acid - not required by the claims of Groups I-III. The special technical feature of the Group III claims is a nucleic acid encoding a modified porcine somatotropin polypeptide, wherein the nucleic acid comprises at least one selector codon. Although this technical element is also common to Group I, as will be shown below, this common technical element was known in the prior art at the time of the invention. The special technical feature of the Group II claims is a composition comprising a pST polypeptide and a pharmaceutically acceptable carrier, and methods comprising administration of said polypeptide to a subject, or a polypeptide administered to a subject. - not required by the claims of Groups I, III or IV.

The common technical element shared by the above groups is that they are related to modified forms of porcine somatotropin comprising non-natural amino acids. This common technical element does not represent an improvement over the prior art of US 2006/0094655 A1 to Guyon et al., which discloses modified growth hormone peptides (abstract), including porcine growth hormone (para [0060]), that may comprise non-natural amino acids (para [0020], [0093], [0122]) wherein the polypeptide may be modified post-translationally, including (in specific reference to claims 3 and 4) modification by attachment of a water-soluble polymer (pegylated; para [0022]). The hormone may be modified at a number of specific positions (para [0014]). Guyon also discloses nucleic acids encoding said growth hormone molecules (para [0003]), methods of forming said modified growth hormone polypeptides, and methods of treatment using said modified growth hormones (abstract), using pharmaceutical compositions comprising said growth hormones (para [0300]). Further, porcine somatotropin comprising SEQ ID NO: 1 was known in the prior art (US 5,210,180 A to Wang et al. see SEQ ID NO: 1, which is 100% identical to Applicants' SEQ ID NO: 1). Therefore, the inventions of Groups I-IV lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 K 38/22</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 37/24	
<b>A 6 1 K 38/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ナドセン, ニック  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 0 2 5, エスコンディド, ローン ロード 1 9 1 6

(72) 発明者 クレイノヴ, ヴァディム  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 1 3 0, サンディエゴ, ホワイト オーク レーン 5  
 4 5 7

F ターム(参考) 4C084 AA02 BA01 BA08 BA31 BA37 CA53 DA41 DB22 NA12 NA14  
 ZB32 ZB35 ZC04 ZC41 ZC42 ZC61  
 4H045 AA10 AA30 BA10 CA40 DA31 EA20 FA74 GA21 HA07