



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2007-0108140  
 (43) 공개일자 2007년11월08일

- |   |   |
|---|---|
| <p>(51) Int. Cl.<br/> <i>C07K 14/505</i>(2006.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2007-7013156<br/>                 (22) 출원일자 2007년06월11일<br/>                 심사청구일자 없음<br/>                 번역문제출일자 2007년06월11일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2005/041113<br/>                 국제출원일자 2005년11월11일</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2006/060148<br/>                 국제공개일자 2006년06월08일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>                 60/627,433 2004년11월11일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>                 아피맥스, 인크.<br/>                 미합중국 캘리포니아, 팔로 알토, 미란다 애비뉴 4001 (우편번호 94304)</p> <p>(72) 발명자<br/>                 홈즈 크리스토퍼 피.<br/>                 미국 캘리포니아 95070 사라토가 웨스터오버 드라이브 13633<br/>                 웡 쿤<br/>                 미국 캘리포니아 94303 팔로알토 코스트랜드 드라이브 747<br/>                 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>                 박장원</p> |
|---|---|

전체 청구항 수 : 총 58 항

**(54) 에리트로포이에틴 수용체에 결합하는 신규한 펩타이드**

**(57) 요약**

본 발명은 에리트로포이에틴 수용체(EPO-R)의 작용제인 펩타이드 화합물에 대한 것이다. 본 발명은 또한 불충분하거나 결핍된 적혈구 세포 수치와 관련된 질병을 치료하기 위하여, 그런 펩타이드 화합물을 이용한 치료 방법에 대한 것이다. 본 발명의 펩타이드 화합물을 함유하는 약학 조성물 또한 제공된다.

(72) 발명자

**제미드 게넷**

미국 캘리포니아 94051 산타클라라 #106 킬리 블러  
바드 1000

**반다리 아속**

미국 캘리포니아 95035 밀피타스 카메론 서클 831

**동 야오후아 에스.**

미국 캘리포니아 94107 샌프란시스코 유닛 비 위스  
콘신 스트리스878

**투펠티 데이비드**

미국 캘리포니아 94085 서니베일 #106 산타페 터래  
이 250

**라론데 가이**

미국 캘리포니아 94062 우드사이드 스카이라인 드  
라이브 20007

**팔라니 바루**

미국 캘리포니아 95014 쿠퍼티노 돌로레스 애비뉴  
21856

**채즈 피터 제이.**

미국 캘리포니아 95014 쿠퍼티노 시카모어 드라이브  
10949

**라이톤 니콜라스 씨.**

미국 매사추세츠 01890 윈체스터 로이드 스트리트  
18

**도우어 윌리엄 제이.**

미국 캘리포니아 94025 멘로 파크 브래너 드라이브  
2307

**프레드릭 브라이언 티.**

미국 캘리포니아 95005 벤 로몬드 글랜 아버 로드  
8470

**차크라바르티 안잔**

인도 122002 걸게운-에이치알 메인 엠-취 로드 예  
셀 타워405-아이씨-1

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

도면 IA - IK에 따른 서열번호 1-668로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 펩타이드.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 여기에서 그 펩타이드의 N-말단은 아세틸화되어 있는 것인 펩타이드.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 여기에서 그 펩타이드는 모노머인 것인 펩타이드.

### 청구항 4

제1항에 있어서, 여기에서 그 펩타이드는 다이머인 것인 펩타이드.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 여기에서 그 펩타이드는 호모다이머인 것인 펩타이드.

### 청구항 6

제1항에 있어서, 그 펩타이드에 공유적으로 결합하는 하나 이상의 수용성 폴리머를 더 포함하는 것인 펩타이드.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 여기에서 그 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)인 것인 펩타이드.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 여기에서 상기 PEG는 약 500 내지 약 60,000 달톤의 분자량을 갖는 선형의 비가교 분자를 포함하는 것인 펩타이드.

### 청구항 9

제8항에 있어서, 여기에서 그 PEG는 약 20,000 달톤 미만의 분자량을 갖는 것인 펩타이드.

### 청구항 10

제8항에 있어서, 여기에서 그 PEG는 약 20,000 내지 약 60,000 달톤의 분자량을 갖는 것인 펩타이드.

### 청구항 11

제8항에 있어서, 여기에서 그 PEG는 약 20,000 내지 약 40,000 달톤의 분자량을 갖는 것인 펩타이드.

### 청구항 12

제8항에 있어서, 여기에서 두 개의 PEG 부분이 그 펩타이드에 공유적으로 결합하고, 상기 PEG의 각각은 선형의 비가교 분자를 포함하는 것인 펩타이드.

### 청구항 13

제12항에 있어서, 여기에서 상기 PEG의 각각은 약 20,000 내지 약 30,000 달톤의 분자량을 갖는 것인 펩타이드.

### 청구항 14

제1항에 있어서, 여기에서 상기 펩타이드는 에리트로포이에틴 수용체(EPO-R)에 결합하고 그것을 활성화시키는 것인 펩타이드.

### 청구항 15

(a) 첫 번째 펩타이드 체인;

(b) 두 번째 펩타이드 체인; 및

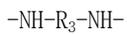
(c) 상기 첫 번째와 두 번째 펩타이드 체인을 연결시키는 연결 부분을 함유하는 펩타이드 다이머로서,

여기에서 상기 첫 번째 펩타이드 체인과 상기 두 번째 펩타이드 체인의 적어도 하나는 도면 IA-1K에 따른 서열 번호 1-668로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하고;

여기에서 상기 펩타이드는 에리트로포이에틴 수용체(EPO-R)에 결합하고 그것을 활성화시키는 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 여기에서 그 연결 부분은 다음 공식을 포함하는 것인 펩타이드 다이머:



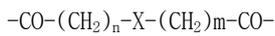
여기에서  $R_3$ 는 저급( $C_{1-6}$ ) 알킬렌이다.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 여기에서 그 연결 부분은 리신 잔기인 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 18**

제15항에 있어서, 여기에서 그 연결 부분은 다음 공식을 포함하는 것인 펩타이드 다이머:



여기에서  $n$ 은 0 내지 10사이의 정수이고,  $m$ 은 1 내지 10사이의 정수이고,  $X$ 는 O, S,  $N(CH_2)_pNR_1$ ,  $NCO(CH_2)_pNR_1$ , 및  $CHNR_1$ 에서 선택되고,  $R_1$ 은 H, Boc, 및 Cbz에서 선택되고, 그리고  $p$ 는 1 내지 10 사이의 정수이다.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 여기에서  $n$  및  $m$ 은 각각 1이고,  $X$ 는  $NCO(CH_2)_pNR_1$ 이고,  $p$ 는 2인 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 20**

제15항에 있어서, 수용성 폴리머를 더 포함하는 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 21**

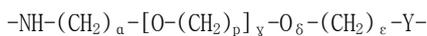
제20항에 있어서, 여기에서 수용성 폴리머는 링커 부분에 공유적으로 결합하는 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 22**

제15항에 있어서, 스페이서 부분을 더 포함하는 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 여기에서 상기 스페이서 부분은 다음 식을 포함하는 것인 펩타이드 다이머:



여기에서,  $\alpha$ ,  $\beta$ , 및  $\epsilon$  은 각각 1 내지 6에서 독립적으로 선택되어지는 정수이고,  $\delta$ 는 0 또는 1이고,  $\gamma$ 은 0 내지 10 사이의 정수이고, 그리고  $Y$ 는 NH 또는 CO에서 선택되고,

단,  $\gamma$ 가 1보다 큰 경우에  $\beta$ 는 2이다.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 여기에서  $\alpha$ ,  $\beta$ , 및  $\epsilon$ 의 각각은 2이고,  $\gamma$ 과  $\delta$  각각은 1이고, 그리고  $Y$ 는 NH이다.

**청구항 25**

제22항에 있어서, 하나 이상의 수용성 폴리머를 더 포함하는 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 여기에서 그 수용성 폴리머는 그 스페이서 부분에 공유적으로 결합되는 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 27**

제20항 또는 제25항에 있어서, 여기에서 그 수용성 폴리머는 폴리에틸렌글리콜(PEG)인 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 28**

제27항에 있어서, 여기에서 PEG는 약 500 내지 약 60,000 달톤의 분자량을 갖는 선형의 비가교 PEG인 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 여기에서 그 PEG는 약 500 내지 약 20,000 달톤 미만의 분자량을 갖는 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 30**

제28항에 있어서, 여기에서 그 PEG는 약 20,000 내지 60,000 달톤의 분자량을 갖는 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 31**

제30항에 있어서, 여기에서 그 PEG는 약 20,000 내지 약 40,000 달톤의 분자량을 갖는 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 32**

제27항에 있어서, 여기에서 두 개의 PEG 부분은 그 펩타이드에 공유적으로 결합되고, 상기 PEG의 각각은 선형 비가교된 분자를 포함하는 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 33**

제32항에 있어서, 여기에서 상기 PEG의 각각은 약 20,000 내지 약 30,000 달톤의 분자량을 갖는 것인 펩타이드 다이머.

**청구항 34**

에리트르포이에틴 결핍 또는 낮거나 결핍된 적혈구 세포 수치에 의해 특징지어지는 질병을 갖는 환자에게 도면 IA-1K에 따른 서열번호 1-668로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 치료적 유효량을 투여하는 것을 포함하는 환자의 치료방법.

**청구항 35**

제34항에 있어서, 여기에서 그 질병은 말기 신부전증 또는 투석; AIDS와 관련된 빈혈; 자가 면역 질환 또는 악성 종양; 베타-지중해빈혈(beta-thalassemia); 낭성 섬유증(cystic fibrosis); 미숙아의 조기 빈혈; 만성 염증 질환과 관련된 빈혈; 척수 상처; 급성 혈액 손실; 노화; 및 비정상적 적혈구 생성(erythropoiesis)에 의해 동반되는 다양한 종양 질병 상태로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 36**

제34항에 있어서, 여기에서 그 펩타이드는 모노머인 것인 방법.

**청구항 37**

제34항에 있어서, 여기에서 그 펩타이드는 다이머인 것인 방법.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 여기에서 그 펩타이드는 호모다이머인 것인 방법.

**청구항 39**

제34항에 있어서, 여기에서 하나 이상의 수용성 폴리머가 그 펩타이드에 공유적으로 결합하는 것인 방법.

**청구항 40**

제39항에 있어서, 여기에서 그 수용성 폴리머가 폴리에틸렌 글리콜(PEG)인 것인 방법.

**청구항 41**

제40항에 있어서, 여기에서 그 PEG가 약 500 내지 약 60,000 달톤의 분자량을 갖는 선형의 비가교 PEG인 것인 방법.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 여기에서 그 PEG는 약 500 내지 약 20,000 달톤 미만의 분자량을 갖는 것인 방법.

**청구항 43**

제41항에 있어서, 여기에서 그 PEG는 약 20,000 내지 60,000 달톤의 분자량을 갖는 것인 방법.

**청구항 44**

제43항에 있어서, 여기에서 그 PEG는 약 20,000 내지 약 40,000 달톤의 분자량을 갖는 것인 방법.

**청구항 45**

제40항에 있어서, 여기에서 두 개의 PEG 부분은 그 펩타이드에 공유적으로 결합하므로, 상기 PEG의 각각은 선형의 비가교 분자를 포함하는 것인 방법.

**청구항 46**

제45항에 있어서, 여기에서 상기 PEG의 각각은 약 20,000 내지 약 30,000 달톤의 분자량을 갖는 것인 방법.

**청구항 47**

(i) 도면 IA-1K에 따른 서열번호 1-668로부터 선택되는 아미노산을 포함하는 펩타이드; 및 (ii) 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

**청구항 48**

제47항에 있어서, 여기에서 그 펩타이드는 모노머인 것인 약학 조성물.

**청구항 49**

제47항에 있어서, 여기에서 그 펩타이드는 다이머인 것인 약학 조성물.

**청구항 50**

제49항에 있어서, 여기에서 그 펩타이드는 호모다이머인 것인 약학 조성물.

**청구항 51**

제50항에 있어서, 여기에서 하나 이상의 수용성 폴리머가 그 펩타이드에 공유적으로 결합하는 것인 약학 조성물.

**청구항 52**

제51항에 있어서, 여기에서 그 수용성 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)인 것인 약학 조성물.

**청구항 53**

제52항에 있어서, 여기에서 그 PEG는 약 500 내지 약 60,000 달톤의 분자량을 갖는 선형의 비가교 PEG인 것인 약학 조성물.

**청구항 54**

제53항에 있어서, 여기에서 그 PEG는 약 500 내지 약 20,000 달톤 미만의 분자량을 갖는 것인 약학 조성물.

**청구항 55**

제53항에 있어서, 여기에서 그 PEG는 약 20,000 내지 약 60,000 달톤의 분자량을 갖는 것인 약학 조성물.

**청구항 56**

제55항에 있어서, 여기에서 그 PEG는 약 20,000 내지 약 40,000 달톤의 분자량을 갖는 것인 약학 조성물.

**청구항 57**

제52항에 있어서, 여기에서 두 개의 PEG 부분은 그 펩타이드에 공유적으로 결합하고, 상기 PEG의 각각은 선형의 비가교 분자를 포함하는 것인 약학 조성물.

**청구항 58**

제57항에 있어서, 여기에서 상기 PEG의 각각은 약 20,000 내지 30,000 달톤의 분자량을 갖는 것인 약학 조성물.

**명세서**

**기술분야**

<1> 본 발명은 에리트로포이에틴 수용체(erythropoietin receptor, EPO-R)의 작용제인 펩타이드 화합물에 대한 것이다. 본 발명은 또한 불충분한 또는 불완전한 적혈구 생산과 관련된 질병을 치료하기 위한 그런 펩타이드 화합물을 사용한 치료 방법에 대한 것이다. 본 발명의 펩타이드 화합물을 포함하는 약학 조성물이 또한 제공된다.

**배경기술**

- <2> 에리트로포이에틴(적혈구 생성인자, Erythropoietin, EPO)은 약 34 kD(kilodalton)의 분자량을 갖는, 165개의 아미노산으로 된 당단백질 호르몬이며, 글리코실화는 아미노산 24, 38, 83 및 126의 위치가 바람직하다. 그것은 23개의 아미노산으로 된 단일 펩타이드를 갖는 전구체 단백질로서 최초로 생산된다. EPO는 세 가지 형태로 발생할 수 있다: α, β 및 아시알로(asialo). α 및 β 형태는 그들의 탄수화물 성분에 있어서 약간 차이가 있지만, 동일한 성능, 생물학적 활성 및 분자량을 갖는다. 상기 아시알로 형태는 말단 탄수화물(시알산)이 제거된 α 또는 β 형태이다. EPO를 암호화하는 DNA 서열은 보고되어 있다[미국 특허 번호 제4,703,008호 to Lin].
- <3> EPO는 유사분열(mitotic division)과 에리트로사이트(erythrocyte) 전구체 세포의 분화를 자극하여 에리트로사이트가 생산되게 한다. 그것은 저산소 상태가 나타날 때 신장에서 생산된다. 에리트로사이트 전구체 세포의 EPO-유도 분화 동안, 글로빈 합성이 유도된다; 헴(heme) 복합체 합성이 자극된다; 그리고 페리틴(ferritin) 수용체의 수가 증가한다. 이런 변화는 세포가 좀더 많은 철을 흡수하도록 하여 성숙된 에리트로사이트에 산소를 결합시키는 기능적인 헤모글로빈을 합성하도록 한다. 그러므로, 에리트로사이트 및 그들의 헤모글로빈은 신체에 산소를 공급하는 핵심 역할을 하고 있다. 이러한 변화들은 EPO와 에리트로사이트 전구체 세포의 표면에 존재하는 적절한 수용체 사이의 상호작용에 의해 개시된다[예를 들어, Graber and Krantz (1978) Ann. Rev. Med. 29:51-66를 보라].
- <4> EPO는 신체가 건강한 상태일 때에는 혈장(plasma)에 매우 저 농도로 존재하여 조직들이 많이 존재하고 있는 에리트로사이트로부터 충분한 산소를 받도록 한다. 이 정상적으로 낮은 EPO 농도는 노화로 인하여 정상적으로 상실되는 적혈구를 대체하는데 충분하다.
- <5> 혈액순환에 있어서 EPO의 양은 순환에서 혈액 세포들에 의해 산소 수송이 감소할 때 저산소증(Hypoxia) 상태에서 증가된다. 저산소증은 예를 들어 출혈을 통한 상당한 혈액 손실에 의해, 방사선에 과잉-노출되어 적혈구 세포의 파괴에 의해, high altitude or prolonged 무의식 또는 다양한 형태의 빈혈로 인한 산소 흡입의 감소에

의해 야기될 수 있다. 그러한 저산소 스트레스에 대한 반응으로, 증가된 EPO 수치는 에리트로이드 전구체 세포의 증식을 자극함으로써 적혈구 세포 생산을 증가시킨다. 혈액 순환에서 적혈구 세포의 수가 정상 조직의 산소 요구량보다 더 클 때, 혈액 순환에서 EPO 수치는 감소된다.

- <6> EPO가 적혈구 세포 형성 과정에서 필수적이기 때문에, 이 호르몬은 어쩌면 낮은 또는 불충분한 적혈구 세포 생산에 의해 특징지어지는 혈액 질환의 진단 및 치료 모두에 있어서 유용하게 적용된다. 최근 연구들이 다양한 질병 상태, 질환 및 혈액 불규칙 상태를 위한 EPO 치료 효과의 예측을 위한 근거를 제공해 주고 있고 있으며, 여기에는 베타-지중해빈혈(beta-thalassemia)[See Vedovato, et al. (1984) *Acta. Haematol.* 71:211-213]; 낭성 섬유증(cystic fibrosis) [See Vichinsky, et al. (1984) *J. Pediatric* 105:15-21]; 임신 및 월경 질환 [See Cotes, et al. (1993) *Brit. J. Obstet. Gynecol.* 90:304-311]; 조기 미숙아 빈혈 [See Haga, et al (1983) *Acta Pediatr. Scand.* 72; 827-831]; 척수 손상 [See Claus-Walker, et al. (1984) *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 65:370-374]; 우주비행 [See Dunn, et al. (1984) *Eur. J. Appl. Physiol.* 52:178-182]; 급성 혈액 손실 [see, Miller, et al. (1982) *Brit. J. Haematol.* 52:545-590]; 노화 [See Udupa, et al. (1984) *J. Lab. Clin. Med.* 103:574-580 및 581-588; 및 Lipschitz, et al. (1983) *Blood* 63:502-509]; 비정상적인 적혈구 생성에 의해 동반되는 다양한 중양 질병 상태들 [See Dainiak, et al. (1983) *Cancer* 5:1101-1106 and Schwartz, et al. (1983) *Otolaryngol.* 109:269-272]; 및 신기능 부전 [See Eschbach, et al. (1987) *N. Eng. J. Med.* 316:73-78]이 포함된다.
- <7> 정제된, 균질 EPO가 특징지어 졌다 [U.S. Pat. No. 4,677,195 to Hewick]. EPO를 암호화하는 DNA 서열이 정제, 클로닝되었으며, 천연 EPO처럼 동일한 생화학적, 면역학적 성질을 갖는 재조합 폴리펩타이드를 생산하도록 발현된다. 천연 EPO 상의 올리고사카라이드와 동일한 올리고사카라이드를 갖는 재조합 EPO 분자 또한 생산될 수 있다[See Sasaki, et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 12059-12076].
- <8> EPO의 생물학적 효과는 세포막 결합 수용체와의 상호작용에 의하여 부분적으로 매개되는 것으로 나타난다. 마우스의 비장에서 분리한 미성숙 에리트로이드 세포(적혈구 세포, erythroid cells)를 이용한 초기 연구들은 EPO 결합 세포 표면 단백질은 각각 대략 85,000달톤과 100,000달톤의 분자량을 갖는 두 개의 폴리펩타이드로 구성된다고 제시한다 [Sawyer, et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3690-3694]. EPO 결합 부위의 수는 세포 표면 당 평균 800 내지 1000으로 계산되었다. 이들 결합 부위들 중에서, 약 300개는 약 90pM(picomolar)의 Kd 수치로 EPO에 결합하고, 반면 잔여 부위는 약 570pM의 감소된 친화력으로 EPO에 결합한다[Sawyer, et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262:5554-5562]. 또 다른 연구에서는 프랜드 백혈병 바이러스(Friend leukemia virus)의 빈혈 균주(FVA)로 감염된 마우스로부터 준비된 EPO-반응성 지라 적혈구 모세포(erythroblasts)는 각각 약 100pM 및 800pM의 Kd 수치를 갖는 총 약 400개의 높고 낮은 친화력의 EPO 결합 부위를 갖는다고 제시하고 있다 [Landschulz, et al. (1989) *Blood* 73:1476-1486]. 그 이후의 연구들은 EPO 수용체(EPO-R)의 두 개의 형태가 하나의 유전자에 의해 암호화된다고 지적하였다. 이 유전자가 클로닝되었다 [See, e.g., Jones, et al. (1990) *Blood* 76, 31-35; Noguchi, et al. (1991) *Blood* 78:2548-2556; Maouche, et al. (1991) *Blood* 78:2557-2563].
- <9> 예를 들어, 마우스 및 인간의 EPO-R 단백질의 DNA 서열 및 암호화된 펩타이드 서열은 D'Andrea, et al.의 PCT 공개 번호 WO 90/08822에 기재되어 있다. 현재의 모델들은 EPO의 EPO-R에의 결합이 두 개의 EPO-R 분자들의 이량체화와 활성화를 초래하고 신호 변환의 후속 단계들을 초래함을 보여준다 [See, e.g., Watowich, et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2140- 2144]. EPO-R의 클로닝된 유전자들의 이용은 이 중요한 수용체의 작용제 및 길항제의 조사를 용이하게 해준다. 재조합 수용체 단백질의 이용은 다양한 랜덤 및 준-랜덤 펩타이드 다양성 생성 시스템에 있어서 수용체-리간드 상호작용의 연구를 가능하게 해준다. 이들 시스템은 다음을 포함한다: "혈장 상의 펩타이드" 시스템, [described in U.S. Pat. No. 6,270,170]; "과야지 상의 펩타이드" 시스템 [described in U.S. Pat. No. 5,432,018 and Cwirla, et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382]; "암호화된 합성 라이브러리"(ESL) 시스템 [described in U.S. patent application Ser. No. 946,239, filed Sep. 16, 1992]; 및 "대규모 고정 폴리머 합성" 시스템 [described in U.S. Pat. No. 5,143,854; PCT Pub. No. 90/15070; Fodor, et al. (1991) *Science* 251:767-773; Dower and Fodor (1991) *Ann. Rep. Med. Chem.* 26:271-180; and U.S. Pat. No. 5,424,186].
- <10> 적어도 어느 정도로 EPO-R과 상호작용하는 펩타이드가 동정되었고, 예를 들어 다음의 문헌에 기재되어 있다: Wrighton et al (1996) *Science* 273:458-463, Johnson et al, (1998) *Biochemistry* 37:3699-3710, 및 Wrighton et al (1997) *Nat. Biotechnol.* 15:1261-1265, 또한 미국 특허 번호 제5,773,569호, 제5,830,851호, 제5,986,047호, 및 제5,767,078호; 국제특허출원 공개번호 WO 96/40749; WO 96/40772; WO 01/38342; 및 WO

01/91780이다. 특히, 펩타이드 모티브를 포함하는 펩타이드 군이 동정되었고, 이들은 EPO-R에 결합하고 EPO-독립적인 세포 증식을 자극하는 멤버들이다. 그러나, 그 모티브를 포함하는 것처럼 데이터로 동정된 펩타이드는 약 20나노몰랄(nM) 내지 250nM 사이의 EC50 수치로 시험관 내에서 EPO-의존 세포 증식을 자극한다. 그러므로, 20nM 내지 25nM의 펩타이드 농도가 EPO에 의해 자극되는 최대의 세포 증식의 50%를 자극하는데 요구된다.

<11> EPO-R 작용제의 막대한 능력을 감안하면, 이 수용체에 의해 매개되는 중요한 생물학적 활성의 연구 및 질병의 치료 모두를 위하여, 강화된 기능 및 활성을 갖는 펩타이드 EPO-R 작용제의 동정이 요구된다. 본 발명은 그러한 화합물을 제공한다.

**발명의 상세한 설명**

<12> **발명의 요약**

<13> 본 발명은 현저하게 강화된 기능 및 활성을 갖는 EPO-R 작용제 모노머 펩타이드 및 두 개의 펩타이드 모노머로 구성된 이량체의 펩타이드 작용제를 제공한다.

<14> 이들 신규한 펩타이드 작용제의 기능은 다음을 포함하는 하나 이상의 변형에 의하여 더 강화될 수 있다: 아세틸화, 분자 상호간의 이황화 결합 형성, 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 부분의 공유적 결합, 및 도 IA-1K 및 이 출원을 통하여 나열된 다른 것들이다.

<15> 본 발명은 또한 보호기 및/또는 소수성기를 갖는 펩타이드를 제공한다. 펩타이드와 관련있는 보호기 및/또는 소수성기는 혈액순환에서 펩타이드의 반감기를 연장시키는데 이용될 수 있고, 또한 세포에 의한 흡수를 용이하게 하는데 이용될 수 있으며 세포막을 가로지르는 수송에 이용될 수 있다. 본 발명은 또한 그러한 펩타이드 작용제로 구성된 약학 조성물을 제공하고, 그러한 펩타이드 작용제를 이용한 다양한 의료 상태를 치료하는 방법을 제공한다.

<16> **발명의 상세한 설명**

<17> 정의:

<18> 펩타이드에서 비일반적인 아미노산은 다음과 같이 약식으로 기재한다: 1-나프틸알라닌은 1-nal 또는 Np; 2-나프틸알라닌은 2-nal; N-메틸글라이신 (또한 사르코신으로 알려진)은 MeG, Sc 또는 Sar; 호모세린 메틸에테르 (homoserine methylether)는 Hsm; 및 아세틸화된 글라이신(N-아세틸글라이신)은 AcG이다. 다른 약어들은 하기 표에서 제공된다. 여기에 사용된 것처럼, 용어 "폴리펩타이드" 또는 "단백질"은 아미드 결합을 통해 서로 연결된 알파 아미노산인 아미노산 모노머의 폴리머를 의미한다. 그러므로 폴리펩타이드는 길이로 적어도 두 개의 아미노산 잔기이며, 대개 더 길다. 일반적으로, 용어 "펩타이드"는 길이로 오직 몇 개의 아미노산 잔기를 갖는 폴리펩타이드를 의미한다. 본 발명의 신규한 EPO-R 작용제 펩타이드는 길이로 고작 약 50개의 아미노산 잔기인 것이 바람직하다. 길이로 약 14 내지 45 아미노산 잔기인 것이 더욱 바람직하다. 펩타이드와는 반대로, 폴리펩타이드는 어느 수의 아미노산 잔기들도 포함할 수 있다. 그러므로, 용어 폴리펩타이드는 더욱 긴 아미노산 서열뿐만 아니라 펩타이드도 포함한다.

<19> 여기에서 사용된 것처럼, 용어 "약학적으로 허용가능한"은 사람에게 투여되었을 때 "일반적으로 안전한 것으로 간주되는" 분자 자체 및 조성물을 의미하는 것으로서, 예를 들어 생리학적으로 허용되고 알려지거나 이와 유사한 나쁜 반응, 이를 테면 급성 위연동 이상 항진(gastric upset), 현기증(dizziness) 등을 통상적으로서 발생시키지 않는 그러한 분자 자체 및 조성물을 의미한다. 여기에서 사용된 것처럼, 용어 "약학적으로 허용가능한"은 연방 또는 주정부의 정규 기관에 의해 승인된 것 또는 미국 약전 또는 동물, 특히 인간에게 사용할 수 있는 다른 일반적으로 알려진 약전에 나열된 것을 의미한다.

<20> 용어 "담체"는 화합물과 함께 투여되는 희석제, 어췌번트, 부형제 또는 베히클을 의미한다. 그런 약학 담체는 멸균 수액, 이를 테면 물 또는 오일로서, 원유(petroleum), 동물, 채소 또는 합성 기원의 그것들, 이를 테면 땅콩 오일, 대두 오일, 미네랄 오일, 참깨 오일 등을 포함한다. 물 또는 수용액, 식염수액 및 수성 텍스트로즈 및 글리세롤 용액이 담체로서 이용되는 것이 바람직하고, 특히 주사 가능한 용액들로 바람직하다. 적절한 약학 담체들은 E.W. Martin의 "Remington's Pharmaceutical Sciences"에 기재되어 있다.

<21> 여기에서 사용된 것처럼, 용어 "작용제(agonist)"는 그것의 상보적인 생물학적으로 활성화된 수용체에 결합하고 그 수용체에서 생물학적 반응을 야기시키거나 수용체의 선재해 있는 생물학적 활성을 강화시키기 위해 수용체를 활성화시키는 생물학적으로 활성화된 리간드를 의미한다.

<22> 여기에 사용된 약어들은 하기 표 및 본 명세서를 통하여 정의된다.

<23>

약어	정의
[ ] <sub>2</sub> 또는 [ ] <sup>2</sup>	펩타이드가 다이머임을 표시
A 또는 Ala	알라닌
C 또는 Cys	시스테인
D 또는 Asp	아스파르트산
E 또는 Glu	글루타민산
F 또는 Phe	페닐알라닌
G 또는 Gly	글라이신
H 또는 His	히스티딘
I 또는 Ile	이소루이신
K 또는 Lys	라이신
L 또는 Leu	루이신
M 또는 Met	메티오닌
N 또는 Asn	아스파라긴
P 또는 Pro	프롤린
Q 또는 Gln	글루타민
R 또는 Arg	아르기닌
S 또는 Ser	세린
T 또는 Thr	트레오닌
V 또는 Val	발린
W 또는 Trp	트립토판
Y 또는 Tyr	티로신
1/2IDA	IDA 링커의 단편
2Py	2-피리딜알라닌
3Py	3-피리딜알라닌
Acm	아세트아미도메틸
Ahx	5-아미노헥사논산(5-아미노 카프로산)
All 또는 Alloc	아릴옥시카르보닐
Bal	b-알라닌(베타-알라닌)
LCBio 또는 LCBiotin	긴-사슬 바이오틴
BL-1	가지 링커 1
Boc	t-부틸옥시카르보닐
Bpa	비페닐알라닌
BTD	디펩타이드 모방체
C(Ace)	시스테인(아세트산)
C(Acm)	Acm 측쇄 보호를 갖는 시스테인
C(StBu)	StBu 측쇄 보호를 갖는 시스테인
C12 또는 C <sub>12</sub>	C <sub>12</sub> 지방산(아미드 연결된 라우르산)
C18 또는 C <sub>18</sub>	C <sub>18</sub> 지방산(아미드 연결된 스테아르산)
unsat C <sub>18</sub> , C <sub>18</sub> unsat 또는 C <sub>18u</sub>	C <sub>18</sub> 불포화 지방산(올레일 알코올)
Cit	시트룰린
CSH	유리 티올 측쇄를 갖는 시스테인
Cxx	Cys 측쇄 상의 독특한 기를 지시
D-Xxx	임의의 아미노산 Xxx의 D 형태
Dap	2,3-디아미노프로피오닌산
DBY	3,5-디브로모티로신

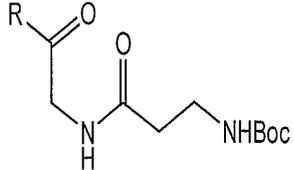
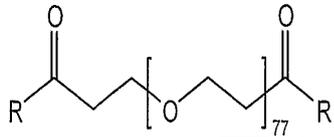
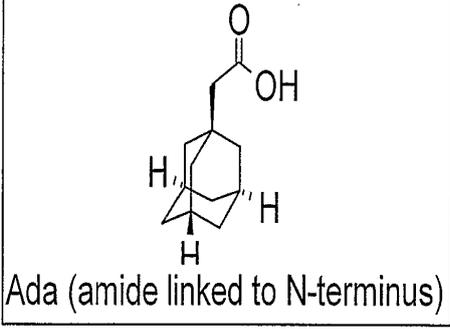
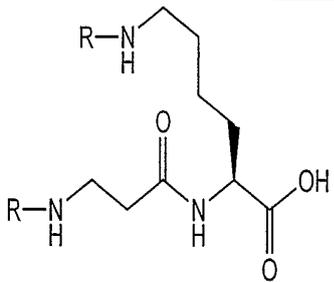
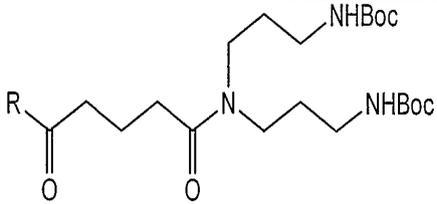
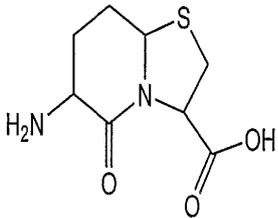
DCA	디카프로인산(Dicaproic acid) 링커
DCF	3,5-디클로로페닐알라닌
DL-1	아스파르트산 링커
Dpa	디페닐알라닌

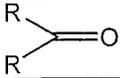
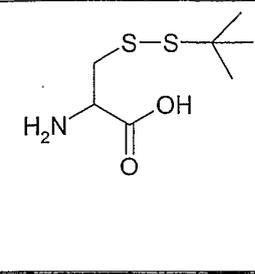
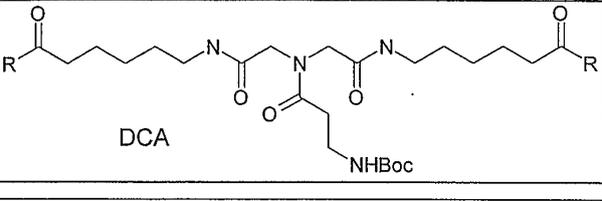
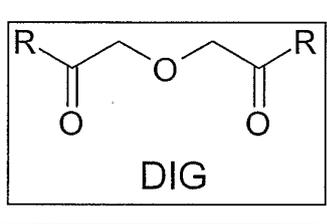
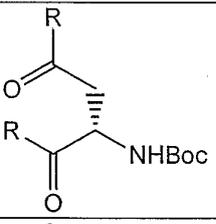
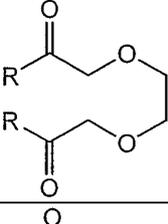
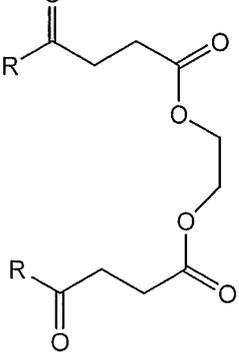
<24>

EL-1	글루탐산 링커
F1* 또는 F1	플루오레세인
Fmoc	9-플루오르에닐메틸옥시카르보닐
Fur	퍼푸릴알라닌
GBal	글라이신-B-알라닌(Lys의 측쇄에 부착될 때, Gly의 C-말단은 Lys의 측쇄 아민에 부착되고, Bal의 C-말단은 Gly의 아민에 부착됨)
GP-1	골포스트 링커 1
GP-2	골포스트 링커 2
GP-3	골포스트 링커 3
h(xx)	h로 시작하는 아미노산은 호모-아미노산을 의미
hCys	호모시스테인
Hsm	호모세린 메틸에틸
IDA	이미노디아세틱 링커
IDA-BL	IDA 링커에 결합된 가지 링커
Kxx 또는 K(x)	Lys 측쇄 상의 독특한 기를 의미
K(C <sub>12</sub> ) 또는 K(C12)	Lys 측쇄의 아민에서 카르복실기에 이르기 까지 부착된 C <sub>12</sub> 지방산
링커-R	링커의 C-말단 상의 기를 지시
M(O)	메티오닌 설피드사이드
M(O2) 또는 M(O <sub>2</sub> )	메티오닌 설피드
MP7 또는 MP7	미니PEG(7 에틸렌글라이콜 반복)
M(x)	변형된 Met 아미노산을 지시
1Nal	1-나프틸알라닌
2Nal	2-나프틸알라닌
Nap	나프록센
Nle	노르류신
paF	파라 아미노페닐알라닌
Pen	페니실린(b,b-디메틸시스테인)
Ph	페닐
PFf	플리알라닌 (4-메틸페닐알라닌)
pFF	파라 플루오로페닐알라닌
pIF	파라 이오도페닐알라닌
pNF	파라 니트로페닐알라닌
R(Pbf)	아르기닌, 2,2,4,6,7-펜타메틸디하이드로벤조퓨린-5-일설피드
Sar	사르코신
S(Bm)	세린 벤질에테르
S(Bz)	세린 벤질
SM-1	스틱만 링커 1
SS	이황화 결합된 다이머
TAP	텐-원자-PEG(2,2'-(에틸렌디옥시(비스(에틸아민)))
TBA	t-부틸알라닌(메틸-류이신)

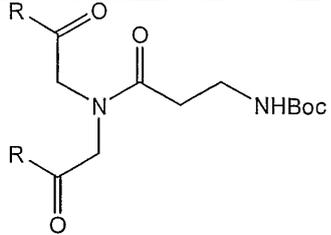
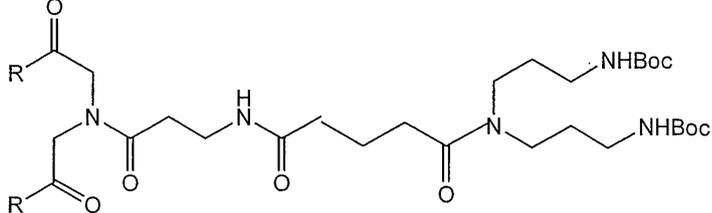
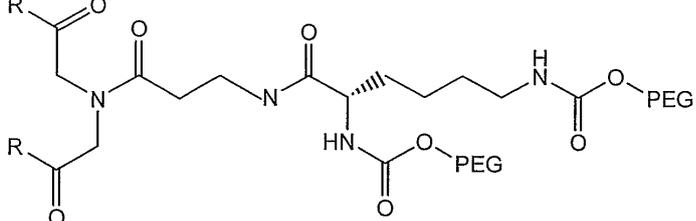
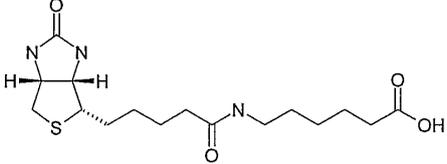
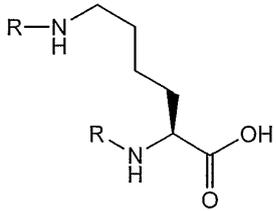
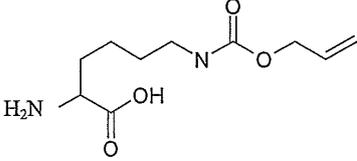
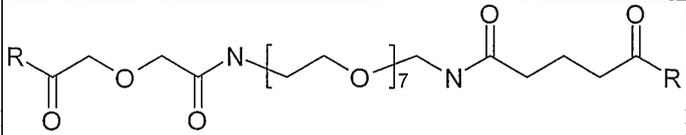
Trt	트리틸
Y(Me)	티로신 메틸에테르
Y(phos)	인산화된 티로신의 히드록실

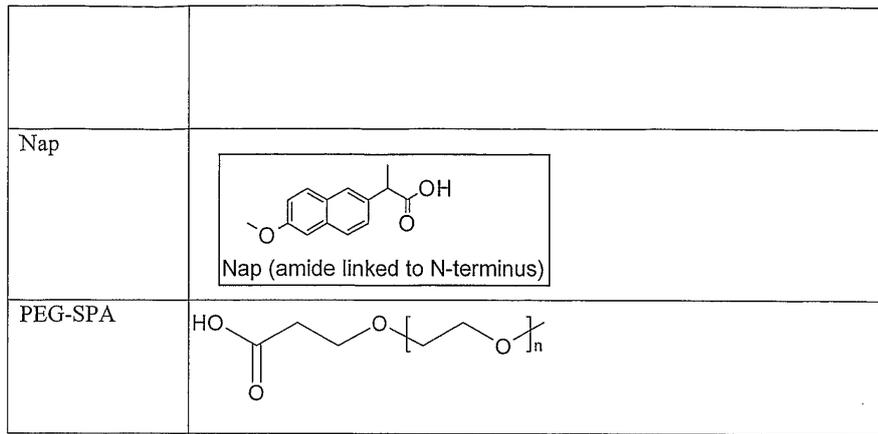
<25> 추가적으로, 다음은 약어들이고 그들의 연관된 화학 구조이다.

Abbreviation	Chemical Structure
1/2 IDA	
3.4 PEG	
Ada	 <p data-bbox="384 831 834 891">Ada (amide linked to N-terminus)</p>
Bal-Lys	
BL-1	
BTD	

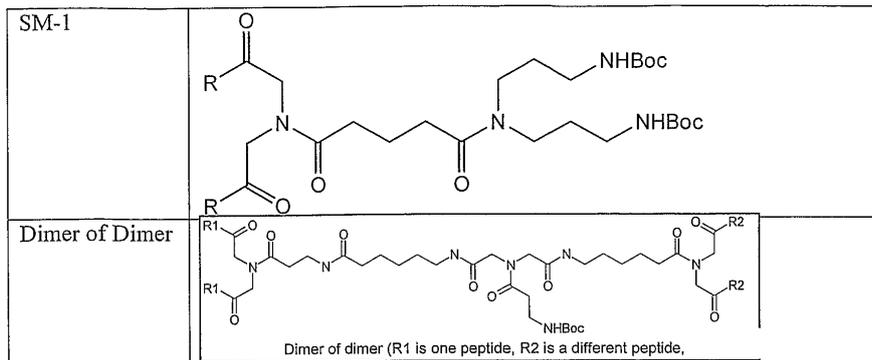
CO	
H-Cys(StBu)-OH	
DCA	
DIG	
DL-1	
DOD	
EDS	

<p>EL-1</p>	
<p>GP-1</p>	
<p>GP-2</p>	
<p>GP-3</p>	
<p>Hydantoin-PEG</p>	<p style="text-align: center;">Hydantoin-PEG</p>

IDA	
IDA-BL-1	
IDA-PEG <sub>2</sub> -Lys	
LCBio or LCBiotin	
Lys	
H-Lys(All)-OH or H-Lys(Alloc)-OH	
MP-7	 <p style="text-align: center;">MP-7 (mini-PEG, 7 repeats)</p>



<30>



<31>

<32>

EPR-R 작용제인 신규한 펩타이드

<33>

본 발명은 EPO-R의 작용제로서 현저하게 강화된 기능 및 활성을 보여주는 펩타이드에 관한 것이다. 이들 펩타이드 작용제들은 약 14 내지 약 45 아미노산 길이가 바람직하다.

<34>

본 발명의 펩타이드는 모너머, 호모 또는 헤테로-다이머, 또는 다른 호모- 또는 헤테로- 멀티머일 수 있다. 용어 "호모"는 동일한 모노머를 포함하는 것을 의미한다; 그러므로, 예를 들어, 본 발명의 호모다이머는 두 개의 동일한 모노머를 포함하는 펩타이드이다. 용어 "헤테로"는 다른 모노머를 포함하는 것을 의미한다; 그러므로, 예를 들어 본 발명의 헤테로다이머는 두 개의 동일하지 않는 모노머를 포함하는 펩타이드이다. 본 발명의 펩타이드 멀티머는 트리머, 테트라머, 펜타머, 또는 다른 고차 구조들일 수 있다. 게다가, 그런 다이머들 및 다른 멀티머들은 헤테로다이머 또는 헤테로멀티머일 수 있다. 본 발명의 펩타이드 모노머는 분해 산물들일 수 있다 (예를 들어, 메티오닌의 산화 산물 또는 탈아미드화된 글루타민, 아르기닌, 및 C-말단 아미드이다). 그런 분해 산물들이 사용될 수 있고, 그러므로 본 발명의 일 부분으로 고려될 수 있다. 바람직한 구체예에서, 본 발명의 헤테로멀티머들은 모두 EPO-R 작용제 펩타이드인 복합 펩타이드들을 포함한다. 더 바람직한 구체예들에 있어서, 본 발명의 멀티머들은 호모멀티머들이다: 예를 들어, 본 발명의 멀티머들은 호모멀티머이다: 예를 들어, 그들은 동일한 아미노산 서열의 복합 EPO-R 작용제 펩타이드를 포함한다. 따라서, 본 발명은 또한 EPO-R의 호모- 또는 헤테로- 다이머 펩타이드 작용제에 대한 것으로서, 이는 현저하게 강화된 기능 및 활성을 보여준다.

<35>

바람직한 구체예에 있어서, 본 발명의 다이머들은 두 개 모두 EPO-R 작용제 펩타이드인 두 개의 펩타이드를 포함한다. 이들 바람직한 다이머 펩타이드 작용제는 두 개의 펩타이드 모노머를 포함하고, 여기에서 각각의 펩타이드 모너머는 약 14 내지 약 45 아미노산 길이를 갖는다. 특히 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명의 다이머는 동일한 아미노산 서열의 두 개의 EPO-R 작용제 펩타이드를 포함한다.

<36>

20개의 기존 아미노산들의 입체 이성질체(예를 들어, D-아미노산), 비천연 아미노산, 이를 테면 α,α-이치환된 아미노산, N-알킬 아미노산, 젓산, 및 다른 비일반 아미노산들(unconventional amino acids)이 또한 본 발명의 화합물을 위한 적절한 성분이 될 수 있다. 비일반 아미노산들은 다음을 포함하지만 여기에 제한되지 않는다: β-알라닌, 3-피리딜알라닌, 4-하이드록시프롤린, 0-포스포세린, N-메틸글라이신, N-아세틸세린, N-포르밀메티오닌, 3-메틸히스티딘, 5-하이드록시라이신, 노르-루신, 및 다른 유사 아미노산 및 이미노산.

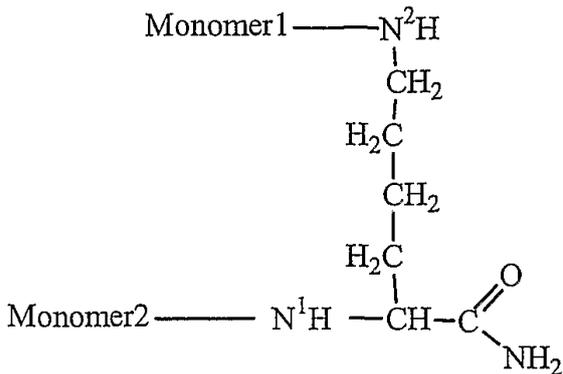
<37>

다른 변형들이 또한 가능하고, 아미노 말단의 변형, 카르복시 말단의 변형, 천연적으로 발생하는 유전적으로 암

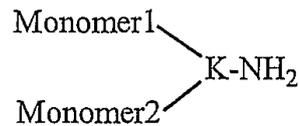
호화된 아미노산의 하나 이상을 비일반 아미노산으로의 치환, 하나 이상의 아미노산 잔기의 측쇄의 변형, 펩타이드의 인산화 등을 포함한다. 바람직한 아미노 말단의 변형은 (예를 들어, 아세트산 또는 할로겐으로 치환된 아세트산으로) 아세틸화이다. 바람직한 구체예에 있어서, N-말단 글리신은 N-아세틸글리신(AcG)으로 아세틸화된다. 바람직한 구체예에 있어서, C-말단 글리신은 N-메틸글리신(MeG, 또한 사르코신으로 알려져 있다)이다.

- <38> 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명의 펩타이드 모노머는 그 핵심 서열 중 두 개의 시스테인 잔기들 사이의 분자내의 이황화 결합을 포함한다.
- <39> 본 발명은 또한 이들 펩타이드 모노머의 결합체를 제공한다. 그러므로, 바람직한 구체예에 따르면, 본 발명의 모노머 펩타이드는 다이머 또는 올리고머가 되고, 그것에 의해 EPR-R 작용제 활성이 강화된다.
- <40> 하나의 구체예에 있어서, 본 발명의 펩타이드 모너머는 비오틴/스트렙타비딘 시스템을 이용하여 올리고머가 될 수 있다. 펩타이드 모너머의 비오틴이 결합된 유사체는 표준 기술에 의해 합성될 수 있다. 예를 들어, 펩타이드 모너머는 C-말단에서 비오틴이 결합될 수 있다. 이들 비오틴이 결합된 모노머는 스트렙타비딘과의 배양에 의해 올리고머가 된다[예를 들어, 4:1의 몰랄 비율로, 실온에서 PBS(phosphate buffered saline) 또는 HEPES-완충된 RPMI 배지(Invitrogen)에서 1 시간 동안]. 이 구체예의 변형으로, 비오틴이 결합된 펩타이드 모너머는 다수의 상업적으로 구입가능한 항-비오틴 항체들 중 임의의 하나와의 배양에 의해 올리고머가 될 수 있다[예를 들어, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Washington, DC)의 염소 항-비오틴 IgG].
- <41> 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명의 펩타이드 모너머는 적어도 하나의 링커 부분에 공유적 부착에 의해 다이머가 된다. 링커(L<sub>k</sub>) 부분은 비록 필수적이지 않지만, 하나 또는 두 개의 -NH- 결합으로 임의적으로 종결되고 하나 이상의 이용가능한 탄소 원자에 저급 알킬 치환체로 임의적으로 치환된 Cn2 링커 부분이 바람직하다. 바람직하게는, 링커 L<sub>k</sub>는 -NH-R-NH-를 포함하고, 여기에서 R은 다른 분자 부분(예를 들어, 고체 지지체의 표면에 존재할 수 있는 것과 같은 것)에 결합할 수 있는 카르복실기 또는 아미노기와 같은 기능기로 치환된 저급(C1-6) 알킬이다. 가장 바람직한 링커는 리신 잔기 또는 리신 아미드(카르복실기가 아미드 부분으로 전환된 리신 잔기 - CONH<sub>2</sub>)이다. 바람직한 구체예에 있어서, 링커는 두 개의 펩타이드 모너머의 C-말단을 각 모노머의 C-말단 아미노산에 동시에 부착하여 연결한다. 예를 들어, C-말단 링커 L<sub>k</sub>가 리신 아미드일때, 다이머는 일반식 I에서 보여지는 것과 같이 개략적으로 보여질 수 있고, 일반식 II에서 보여지는 것처럼 요약될 수 있다:

Formula I



Formula II



- <42>
- <43> 일반식 I 및 일반식 II에 있어서, N<sup>2</sup>는 리신의 ε-아미노기의 질소 원자를 나타내고 N<sup>1</sup>은 리신의 α-아미노기의 질소 원자를 나타낸다. 다이머 구조는 리신의 α 및 ε 아미노기 모두에 결합된 펩타이드를 나타내는 [펩타이드]<sub>2</sub>Lys-아미드로서 보여질 수 있거나, 또는 리신의 α 및 ε 아미노기 모두에 결합된 N-말단에 아세틸화된 펩타이드를 나타내는 [Ac-펩타이드]<sub>2</sub>Lys-아미드, 또는 분자내 이황화 루프를 포함하는 각 펩타이드로 리신의 α 및 ε 아미노기 모두에 결합된 N-말단이 아세틸화된 펩타이드를 나타내는 [Ac-펩타이드, 이황화]<sub>2</sub>Lys-아미드, 또는 분자내 이황화 루프 및 리신 및 PEG 부분의 C-말단 사이에 공유 결합을 형성하는 스페이서 분자를 포함하는 각 펩타이드로 리신의 α 및 ε 아미노기 모두에 결합된 N-말단의 아세틸화된 펩타이드를 나타내는 [Ac-펩타이드,

이황화]<sub>2</sub>Lys-스페이서-PEG 또는 C-말단의 리신아미드 잔기를 함유하는 N-말단이 아세틸화된 펩타이드의 호모다이머를 나타내는 [Ac-펩타이드-Lys-NH<sub>2</sub>]<sub>2</sub>-이미노디아세틱-N-(Boc-βAla)로서 여기에서 리신의 ε 아민은 이미노디아세트산의 두 개의 카르복실기의 각각에 결합하고, 여기에서 Boc-베타-알라닌은 아미드 결합을 통해 이미노디아세트산의 질소 원자에 공유적으로 결합되는 것이다.

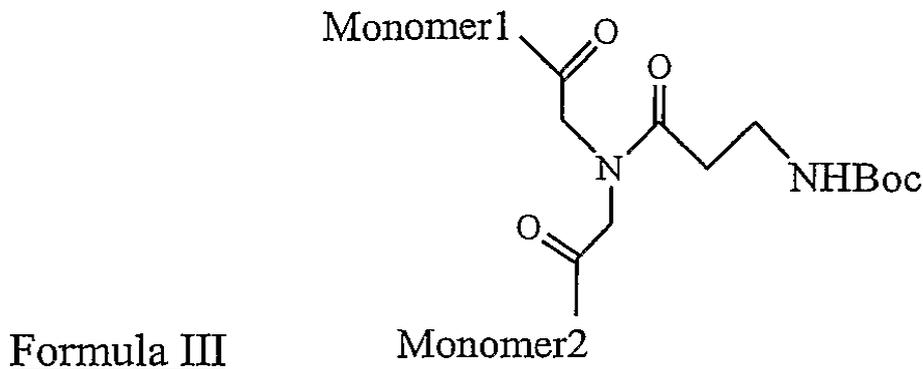
<44> 추가적인 구체예에 있어서, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)은 두 개의 펩타이드 모노머를 다이머화하는 링커 L<sub>k</sub>로서 이용된다: 예를 들어, 단일 PEG 부분은 펩타이드 다이머의 양 펩타이드 체인의 N-말단에 동시에 부착될 수 있다. 또 다른 추가적인 구체예에 있어서, 링커(L<sub>k</sub>) 부분은 두 개의 카르복실산을 포함하고 하나 이상의 이용가능한 원자가 추가적인 기능기, 이를 테면 하나 이상의 PEG 분자에 결합할 수 있는 아민으로 임의적으로 치환된 분자가 바람직하며, 그러나 이것이 필수적인 것은 아니다.

<45> 그런 분자는 다음과 같은 묘사될 수 있다:

<46> -CO-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-X-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-CO-

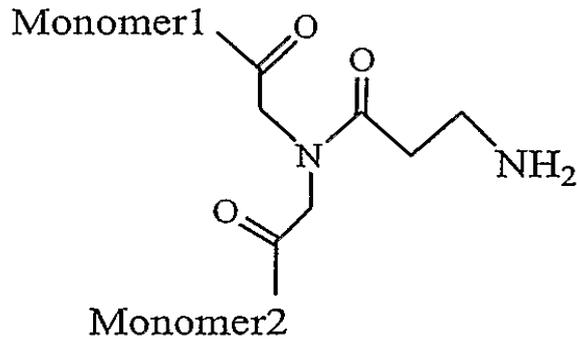
<47> 여기에서 n은 0 내지 10의 정수이고, m은 1 내지 10의 정수이고, X는 O, S, N(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>NR<sub>1</sub>, NCO(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>NR<sub>1</sub>, 및 CHNR<sub>1</sub>에서 선택되고, R<sub>1</sub>은 H, Boc, Cbz 등에서 선택되고, p는 1 내지 10의 정수이다.

<48> 바람직한 구체예에 있어서, 각 펩타이드의 하나의 아미노기는 링커 L<sub>k</sub>로 아미드 결합을 형성한다. 특히 바람직한 구체예에 있어서, 링커 L<sub>k</sub>에 결합된 펩타이드의 아미노기는 리신 잔기의 ε 아민 또는 N-말단 잔기의 α 아민, 또는 임의적인 스페이서 분자의 아미노기이다. 바람직한 구체예에 있어서, n 및 m 모두는 1이고, X는 NCO(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>NR<sub>1</sub>, p는 2, R<sub>1</sub>은 Boc이다. 그런 바람직한 링커를 함유하는 다이머 EPO 펩타이드는 일반식 III에서 보여지는 것과 같이 개략적으로 묘사될 수 있다.



<49> 임의적으로, Boc 기는 적절하게 활성화된 수용성 폴리머 스페이스와 공유결합을 형성할 수 있는 반응적인 아민기를 유리시키기 위해 제거될 수 있는데, 상기 수용성 폴리머 스페이스는 예를 들어 mPEG-파라-니트로페닐카르보네이트(mPEG-NPC), mPEG-숙시니미딜 프로피오네이트(mPEG-SPA), 및 N-하이드록시숙시니미드-PEG(NHS-PEG)이다(예를 들어, 미국 특허 제5,672,662호를 보라).

<51> 그러한 바람직한 링커를 포함하는 다이머 EPO 펩타이드는 일반식 IV에서 보는 바와 같이 개략적으로 묘사될 수 있다.



**Formula IV**

<52>

<53>

일반적으로, 비록 필수적인 것은 아니지만, 펩타이드 다이머는 또한 펩타이드 모노머의 시스테인 잔기들 사이에서 하나 이상의 분자내 이황화 결합을 포함할 수 있다. 바람직하게, 두 개의 모노머는 적어도 하나의 분자내 이황화 결합을 포함한다. 가장 바람직하게, 펩타이드 다이머의 양 모노머는 분자내 이황화 결합을 포함하고, 각 모노머는 시클릭 기를 포함한다. 펩타이드 모노머 또는 다이머는 또한 하나 이상의 스페이스 부분을 포함할 수 있다. 그런 스페이스 부분은 펩타이드 모노머 또는 펩타이드 다이머에 부착될 수 있다. 바람직하게, 그런 스페이스 부분은 펩타이드 다이머의 모노머를 연결하는 링커  $L_k$  부분에 부착된다. 예를 들어, 그러한 스페이스 부분은 리신 링커의 카르보닐 탄소를 통하거나 이미노디아세트산 링커의 질소 원자를 통하여 펩타이드 다이머에 부착된다.

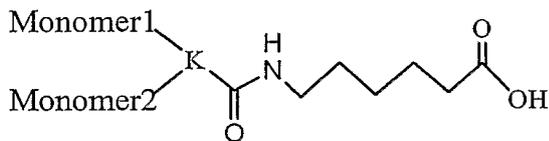
<54>

예를 들어, 그런 스페이스는 펩타이드 다이머의 링커를 부착된 수용성 폴리머 부분 또는 보호기에 연결할 수 있다. 다른 예에 있어서, 그런 스페이스는 펩타이드 모노머를 부착된 수용성 폴리머 부분에 연결할 수 있다.

<55>

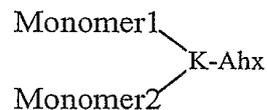
하나의 구체예에 있어서, 스페이스 부분은 -NH- 결합 또는 카르복실(-COOH)기로 임의적으로 종결되고, 하나 이상의 이용가능한 탄소 원자를 저급 알킬 치환기로 임의적으로 치환된  $C_{1-12}$  연결 부분이다. 하나의 구체예에 있어서, 스페이스는 R-COOH이고, 여기에서 R은 다른 분자 부분에 결합할 수 있는 카르복실 기 또는 아미노 기와 같은 기능기로 임의적으로 치환된 저급 ( $C_{1-6}$ ) 알킬렌이다. 예를 들어, 스페이스는 글리신(G) 잔기, 또는 아미노 헥사논산(hexanoic acid)일 수 있다. 바람직한 구체예에 있어서, 아미노 헥사논산은 6-아미노 헥사논산(Ahx)이다. 예를 들어, 스페이스 6-아미노 헥사논산(Ahx)이 펩타이드의 N-말단에 결합되는 경우, 펩타이드 말단 아민기는 표준 아미드 커플링을 통해 Ahx의 카르복실 기에 연결될 수 있다. 다른 예에 있어서, Ahx가 펩타이드의 C-말단에 결합되는 경우, Ahx의 아민은 표준 아미드 커플링을 통해 링커의 카르복실기에 연결될 수 있다. 그런 펩타이드의 구조는 일반식 V에서 보여지는 것처럼 나타낼 수 있고, 일반식 VI에서 보는 것과 같이 요약될 수 있다.

**Formula V**



<56>

**Formula VI**



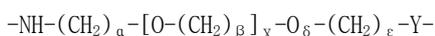
<57>

다른 구체예에 있어서, 스페이스는 -NH-R-NH-이고, 여기에서 R은 다른 분자 부분에 결합할 수 있는 카르복실 기 또는 아미노기와 같은 기능기로 치환된 저급 ( $C_{1-6}$ ) 알킬렌이다. 예를 들어, 스페이스는 리신 (K) 잔기 또는 리신 아미드( $K-NH_2$ , 카르복실기가 아미드 부분으로 전환된 리신 잔기-CONH)일 수 있다.

<58>

바람직한 구체예에 있어서, 스페이스 부분은 다음 구조를 갖는다:

<59>



<60>

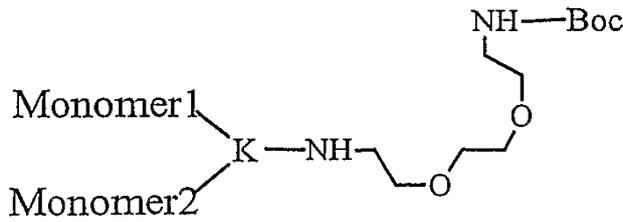
여기에서  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , 및  $\epsilon$ 은 각각 독립적으로 선택되는 정수이다. 바람직한 구체예에 있어서,  $\alpha$ ,  $\beta$ , 및  $\epsilon$ 은 1 내지 약 6에서 독립적으로 선택되는 정수이고,  $\delta$ 는 0 또는 1이고,  $\gamma$ 는 0에서 약 10에서 선택되는 정수이고,  $\gamma$ 가 1보다 큰 경우를 제외하고,  $\beta$ 는 2이고, Y는 NH또는 CO에서 선택된다.

<61>

특히 바람직한 구체예에 있어서,  $\alpha$ ,  $\beta$ , 및  $\epsilon$ 은 각각 2로 동일하고,  $\gamma$  및  $\delta$ 는 모두 1로 동일하고, Y는 NH이다. 예를 들어, 그러한 스페이스를 포함하는 펩타이드 다이머는 일반식 VII에서 개략적으로 묘사되고, 여기에서

링커는 리신이고, 스페이서는 링커를 Boc 보호기에 참여시킨다.

**Formula VII**

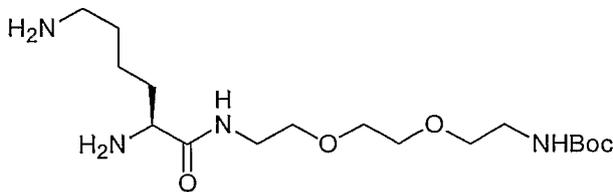


<62>

<63> 다른 특히 바람직한 구체예에 있어서,  $\gamma$  및  $\delta$  은 0이고,  $\alpha$  및  $\epsilon$  은 모두 5로 동일하고, Y는 CO이다.

<64> 특히 바람직한 구체예에 있어서, 링커를 더한 스페이서 부분은 일반식 VIII 또는 일반식 IX에서 보여주는 구조를 가진다.

**Formula VIII**



<65>

<66> 본 발명의 펩타이드 모노머, 다이머 또는 멀티머는 또한 하나 이상의 수용성 폴리머 부분을 포함할 수 있다. 바람직하게, 이러한 폴리머들은 본 발명의 펩타이드 화합물에 공유적으로 부착된다. 바람직하게, 최종-생산물 제조의 치료적 이용을 위하여, 폴리머는 약학적으로 허용가능한 것이다. 본 분야의 당업자는 폴리머-펩타이드 결합체가 치료적으로 이용될 것인가, 만약 그렇다면, 바람직한 1회 투여량, 투여 간격, 단백질 가수분해에 대한 저항 및 다른 고려사항들을 기초로 하여 바람직한 폴리머를 선택할 수 있다. 수용성 폴리머는 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-다이옥솔란, 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레익 안하이드라이드 공중합체, 폴리아미노산(호모폴리머 또는 랜덤 공중합체), 폴리(n-비닐 피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 호모폴리머, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 및 폴리옥시에틸레이티드 폴리올(polyoxyethylated polyols)이 될 수 있다.

<67> 바람직한 수용성 폴리머는 PEG이다. 폴리머는 임의 분자량을 가질 수 있고, 가교(branched) 또는 비가교(unbranched)일 수 있다. 본 발명의 이용을 위한 바람직한 PEG는 선형, 10 kD(kilodaltons)보다 더 큰 분자량을 갖는 비가교 PEG이고 더 바람직한 것은 분자량이 약 20 내지 60 kD 사이인 것이다. 더욱 바람직한 것은, 선형 비가교형 PEG 부분은 약 20 내지 40kD의 분자량을 가져야만 하고, 특히 바람직한 것은 20kD의 PEG이다. PEG의 제조를 고려하여, 분자량은 통상적으로 개별적인 분자들 사이에서 다양할 것으로 이해된다. 몇몇 분자들은 좀더 큰 분자량을 갖고, 몇몇은 정해진 분자량보다 더 작을 것이다. 그런 변화는 일반적으로 PEG 분자의 분자량을 묘사하는 단어 "약"의 이용에 의해 반영된다.

<68> 부착된 폴리머 분자의 수는 다양할 것이다; 예를 들어, 하나, 둘, 셋 또는 그 이상의 수용성 폴리머가 본 발명의 EPO-R 작용제 펩타이드에 부착될 것이다. 멀티플 부착된 폴리머는 동일하거나 다른 화학적 부분일 것이다(예를 들어, 다른 분자량의 PEGs). 그러므로, 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명은 거기에 부착된 두개 이상의 PEG 부분을 갖는 EPO-R 작용제 펩타이드를 고려한다. 바람직하게 PEG 부분 모두는 각각 약 10 내지 약 60 kD의 분자량을 각각 갖는 선형, 비가교된 PEG이다. 더욱 바람직하게, 각 선형의 비가교 PEG 부분은 약 20 내지 약 40kD의 분자량을 갖고, 더욱 바람직하게는 약 20 내지 30kD의 분자량을 갖는 것이고, 가장 바람직하기로는 각 선형의 PEG 부분이 약 20kD의 분자량을 갖는 것이다. 그러나, PEG의 다른 분자량이 또한 그러한 구체예로서 고려된다. 예를 들어, 본 발명은 적어도 하나 또는 두 개가 약 20 내지 약 40 kD의 분자량 또는 약 20 내지 30kD의 분자량을 갖고, 거기에 부착되는 두 개 이상의 선형의 비가교 PEG 부분을 갖는 EPO-R 작용제 펩타이드를 고려하고 포함한다. 다른 구체예에 있어서, 본 발명은 적어도 하나가 약 40 내지 60kD의 분자량을 갖고, 거기에 부착되는 두 개 이상의 선형의 비가교 PEG 부분을 갖는 EPO-R을 고려하고 포함한다.

- <69> 하나의 구체예에 있어서, PEG는 두 개의 펩타이드 모노머를 다이머가 되도록 하는 링커로서 사용될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, PEG는 펩타이드 모노머 또는 다이머의 적어도 하나의 말단(N-말단 또는 C-말단)에 부착된다. 하나의 구체예에 있어서, PEG는 펩타이드 모노머 또는 다이머의 스페이서 부분에 부착된다. 바람직한 구체예에 있어서, PEG는 펩타이드 다이머의 링커 부분에 부착된다. 가장 바람직한 구체예에 있어서, PEG는 스페이서 부분에 부착되고, 상기 스페이서 부분은 펩타이드 다이머의 모노머를 연결하는  $L_k$  링커 부분에 부착된다. 특히 바람직한 구체예에 있어서, PEG는 스페이서 부분에 부착되고, 상기 스페이서 부분은 리신 링커의 카르보닐 탄소 또는 리신 아미드 링커의 아미드 질소를 통해 펩타이드 다이머에 부착된다.
- <70> 펩타이드 모노머 및 다이머를 포함하는 본 발명에 의해 포함되는 펩타이드 및 펩타이드 서열은 도 IA-1K에서 보여준다. 편의를 위해, 상기 도면들에서 나타내는 개별 펩타이드 및 펩타이드 서열은 도 IA-1K의 좌측 컬럼에서 제공되는 서열번호로 여기에 참고로 기재된다.
- <71> 본 발명의 펩타이드 서열은 단독으로 또는 펩타이드 사슬의 N-말단 및/또는 C-말단 연장과 결합하여 존재할 수 있다. 그런 연장은 임의적으로 비-천연적으로 발생하는 서열로, 또는 실질적으로 비-천연적으로 발생하는 서열 없이 펩타이드 서열을 천연적으로 암호화될 수 있다; 그 연장은 임의의 부가, 결실, 점 돌연변이, 또는 다른 서열 변형 또는 당업자에 의해 의도되는 조합을 포함할 것이다. 예를 들어, 천연적으로 발생하는 서열은 전장 또는 부분 길이가 될 수 있고, 탄수화물, PEG, 다른 폴리머 등을 측쇄 결합을 통해 부착하기 위한 부위를 제공하는 아미노산 치환을 포함할 수 있으나 여기에 제한되지 않는다. 변형에 있어서, 아미노산 치환은 인간 면역계와 경쟁할 수 있도록 만들어진 서열의 인간화를 초래한다. 모든 종류의 용합 단백질이 제공되고, 여기에는 비-면역글로불린 스페이서 서열을 갖고 있거나 갖고 있지 않은 본 발명의 EPO-R 활성 서열에 접근하거나 아주 근접한 면역글로불린 서열을 포함한다. 한 종류의 구체예는 헤비 및/또는 라이트 체인의 가변 (V) 영역을 대신하여 EPO-R 활성 서열을 갖는 면역글로불린 체인이다.
- <72> 본 발명의 펩타이드 화합물의 제조:
- <73> 펩타이드 합성
- <74> 본 발명의 펩타이드는 당업계에 알려진 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 이들 표준 방법들은 배제 고체상 합성(exclusive solid phase synthesis), 부분 고체상 합성 방법, 단편 축합, 전통 용액 합성 및 재조합 DNA 기술을 포함한다[예를 들어, Merrifield J. Am. Chem. Soc. 1963 85:2149을 보라].
- <75> 하나의 구체예에 있어서, 펩타이드 다이머의 펩타이드 모노머는 개별적으로 합성되고 합성을 위해 연속적으로 다이머가 된다. 바람직한 구체예에 있어서, 다이머의 펩타이드 모노머는 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- <76> 특히 바람직한 구체예에 있어서, 다이머의 펩타이드 모노머는 펩타이드 합성을 위한 개시 부위로서 제공될 수 있는 두 개의 기능기 및 다른 분자 부분에 결합할 수 있는(예를 들어, 고체 지지체의 표면에 존재할 수 있는 것처럼) 세 번째 기능기(예를 들어 카르복실기 또는 아미노기)를 갖는 링커  $L_k$  부분에 의해 그들의 C-말단을 통해 연결된다.
- <77> 이런 경우에, 두 개의 펩타이드 모노머는 고체상 합성 기술의 변형으로 링커  $L_k$  부분의 두 개의 반응적인 질소 그룹 상에서 직접적으로 합성될 수 있다. 그런 합성은 연속적이거나 동시적일 수 있다.
- <78> 링커 상의 다이머의 펩타이드 사슬의 연속적인 사슬이 수행되는 경우, 링커 분자 상의 두 개의 아민 기능기는 두 개의 다른 직교적으로 제거될 수 있는 아민 보호기로 보호된다. 바람직한 구체예에 있어서, 보호된 디아민(diamine)은 보호된 리신이다. 보호된 링커는 링커의 세 번째 기능기를 통해 고체 지지체에 연결되어 있다. 첫 번째 아민 보호기는 제거되고, 다이머의 첫 번째 펩타이드가 첫 번째 그 첫 번째 보호되지 않은 아민 부분 상에서 합성된다. 이때 두 번째 아민 보호기가 제거되고, 다이머의 두 번째 펩타이드가 두 번째 보호되지 않은 아민 부분 상에서 합성된다. 예를 들어, 링커의 첫 번째 아민 부분은 Alloc으로 보호될 수 있고, 두 번째는 Fmoc로 보호될 수 있다. 이 경우에, Fmoc 기(그러나 Alloc 기는 아님)은 약염기(mild base)[예를 들어, 디메틸 포름아마이드(DMF)에서 20%의 피페리딘]의 처리에 의해 제거될 수 있고, 그 첫 번째 펩타이드 체인이 합성된다. 그 후에 Alloc 기가 적절한 시약[예를 들어, Pd(PPh<sub>3</sub>)/4-메틸 모르폴린 및 클로로포름]으로 제거될 수 있고, 그 두 번째 펩타이드 사슬이 합성된다.
- <79> 이 기술은 다이머를 생성하기 위해 사용될 수 있으며, 여기에서 두 개의 펩타이드 체인의 서열은 동일하거나 다르다. 시스템을 위한 다른 티올-보호기가 이황화 결합 형성을 제어하기 위해 사용되는 경우(하기에서 기술

됨), 이 기술은 다이머의 펩타이드 체인의 최종 아미노산 서열이 동일한 경우조차 사용되어야만 함을 유의해야 한다.

- <80> 링커 상에서 다이머의 펩타이드 체인의 동시 합성이 수행되는 경우, 링커 분자의 두 개의 아민 기능기는 동일한, 제거가능한 아민 보호기로 보호된다. 바람직한 구체예에 있어서, 보호된 디아민은 보호된 리신이다. 보호된 링커는 링커의 세 번째 기능기를 통해 고체 지지체에 연결된다. 이 경우, 링커 분자의 두 개의 보호된 기능기는 동시에 보호가 해제되고, 그 두 개의 펩타이드 체인이 보호 해제된 아민 상에서 동시에 α 합성된다. 이 기술을 사용하는 것은 다이머의 펩타이드 체인의 서열이 동일할 것이고, 시스테인 잔기를 위한 티올-보호기가 모두 동일한 것임을 유의해야 한다.
- <81> 펩타이드 합성을 위한 바람직한 방법은 고체상 합성(solid phase synthesis)이다. 고체상 펩타이드 합성 과정은 당업계에서 잘 알려져 있다[예를 들어, Stewart Solid Phase Peptide Syntheses (Freeman and Co.: San Francisco) 1969; 2002/2003 General Catalog from Novabiochem Corp, San Diego, USA; Goodman Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (Houben-Weyl, Stuttgart) 2002을 보라]. 고체상 합성에 있어서, 합성은 α-아민 보호된 수지를 이용하여 펩타이드의 C-말단 끝에서 통상적으로 개시된다.
- <82> 적절한 출발 물질은 예를 들어, 요구된 α-아미노산을 클로로메틸화 수지, 하이드록시메틸 수지, 폴리스티렌 수지, 벤즈하이드릴아민 수지(benzhydrylamine resine) 등에 부착함으로써 제조될 수 있다.
- <83> 그런 클로로메틸화 수지 중의 하나는 Bio Rad Laboratories (Richmond, CA)의 상표명 BIO-BEADS SX-I으로 판매되는 것이다. 하이드록시메틸 수지의 제조는 다음에 기재되어 있다[Bodonszky, et al. (1966) Chem. Ind. London 38:1597]. 벤즈하이드릴아민(BHA) 수지는 다음에 기재되어 있고[Pietta and Marshall (1970) Chem. Commun. 650], 또한 하이드로클로라이드 제형은 Beckman Instruments, Inc. (Palo Alto, CA)에서 상업적으로 입수가 가능하다. 예를 들어, α-아미노 보호된 아미노산이 지신(Gisin (1973) Helv. Chim. Acta 56:1467)에 의해 기재된 방법에 따라, 세슘 중탄산염 촉매(cesium bicarbonate catalyst)의 보조로 클로로메틸화 수지에 커플링 될 수 있다.
- <84> 초기 커플링 후에, α-아미노 보호기는 예를 들어, 실온에서 유기 용매에서 TFA(trifluoroacetic acid) 또는 HCl(hydrochloric acid) 용액을 이용하여 제거된다. 그 이후에, α-아미노 보호된 아미노산은 성장하는, 지지체-결합된 펩타이드 체인에 지속적으로 커플링된다. 그 α-아미노 보호기는 펩타이드의 단계적 합성 분야에서 유용한 것으로 알려진 것으로서, 다음을 포함한다: 아실-타입 보호기(예를 들어, 포르밀(formyl), 트리플루오로아세틸(trifluoroacetyl), 아세틸), 방향족 우레탄-타입 보호기(예를 들어, 벤질옥시카르보닐(Cbz) 및 치환된 Cbz), 지방성 우레탄 보호기(예를 들어, t-부틸옥시카르보닐(Boc), 이소프로필옥시카르보닐, 시클로헥실옥시카르보닐), 및 알킬 타입 보호기(예를 들어, 벤질, 트리페닐메틸, 플루오르에닐메틸 옥시카르보닐(fluorenylmethyl oxycarbonyl, Fmoc), 알릴옥시카르보닐(Alloc), 및 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소시클로헥스-1-일)에틸(Dde).
- <85> 측쇄 보호기(통상적으로 에테르, 에스테르, 트리틸, PMC(2,2,5,7,8- 펜타메틸-크로만-6-설폰닐)) 등은 커플링 동안 그대로 남아 있고 아미노-말단 보호기의 보호가 해제되는 동안 또는 커플링 동안 분열되지 않는다.
- <86> 측쇄 보호기는 최종 펩타이드의 합성이 완료될 때, 표적 펩타이드를 변경하지 않을 반응 조건 하에서 제거되어야만 한다. Tyr을 위한 측쇄 보호기는 테트라하이드로피라닐(tetrahydropyranyl), tert-부틸, 트리틸(trityl), 벤질, Cbz, Z-Br-Cbz 및 2,5-디클로로벤질을 포함한다. Asp를 위한 측쇄 보호기는 벤질, 2,6-디클로로벤질, 메틸, 에틸, 및 시클로헥실을 포함한다. Thr 및 Ser을 위한 측쇄 보호기는 아세틸, 벤조일, 트리틸, 테트라하이드로피라닐, 벤질, 2,6-디클로로벤질 및 Cbz를 포함한다. Arg를 위한 측쇄 보호기는 니트로, 토실(Tosyl, Tos), Cbz, 아다만틸옥시카르보닐 메시토일설폰닐(Mts), 2,2,4,6,7- 펜타메틸디하이드로벤조퓨란-5-설폰닐(Pbf), 4-메톡시-2,3,6-트리메틸-벤젠이설폰닐(4-mthoxy-2,3,6-trimethyl-benzenesulfonyl, Mtr), 또는 Boc를 포함한다. Lys를 위한 측쇄 보호기는 Cbz, 2-클로로벤질옥시카르보닐(2-Cl-Cbz), 2-브로모벤질옥시카르보닐(2-Br-Cbz), Tos, 또는 Boc를 포함한다.
- <87> α-아미노 보호기를 제거한 후에, 남아있는 보호된 아미노산은 목적하는 순서로 단계적으로 커플링된다. 각 보호된 아미노산은 일반적으로 적절한 카르복실기 활성화제, 이를 테면, 2-(1H-벤조트리아졸-1-일)-1,1,3,3-테트라메틸우라늄 헥사플루오로포스페이트(HBTU) 또는 디시클로헥실카르보디마이드(DCC)를 용액에서, 예를 들어, 메틸렌 클로라이드(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), N-메틸 피롤리딘, 디메틸 포름아미드(DMF), 또는 그들의 혼합물에서 약 3-배로 초과하여 일반적으로 반응한다.

<88> 목적 아미노산 서열이 완전해 진 후에, 목적 펩타이드는 시약, 이를 테면 TFA(trifluoroacetic acid) 또는 HF(hydrogen fluoride)로 처리하여 수지 지지체로부터 분리되고, 이는 레진으로부터 펩타이드가 분해되는 것일 뿐만 아니라 모든 잔여 측쇄 보호기도 분해되는 것이다. 클로로메틸화 수지가 사용될 때, 플루오르화 수소(hydrogen fluoride) 처리는 유리 펩타이드 산의 형성을 초래한다. 벤즈하이드릴아민 수지가 이용될 때, 플루오르화 수소의 처리는 유리 펩타이드 아마이드를 직접적으로 초래한다. 대안으로, 클로로메틸화 수지가 사용될 때, 측쇄가 보호된 펩타이드는 목적 측쇄가 보호된 아마이드를 제공하기 위하여 암모니아로, 또는 측쇄가 보호된 알킬 아마이드 또는 디알킬아미드를 제공하기 위하여 알킬아민으로 펩타이드 수지를 처리하여 분해될 수 있다. 측쇄 보호는 이때 유리 아마이드, 알킬아미드 또는 디알킬아미드를 제공하기 위해 플루오르화 수소로 처리하여 일반적인 방법으로 제거된다. 본 발명의 에스테르를 제조함에 있어서, 펩타이드 산(peptide acids)을 제조하는데 사용되는 수지가 이용되고, 측쇄가 보호된 펩타이드는 염기 및 적절한 알코올(예를 들어, 메탄올)로 분해된다. 측쇄가 보호기는 이때 목적 에스테르를 획득하기 위하여 플루오르화 수소로 처리하여 일반적인 방법으로 제거된다. 이들 공정들은 또한 20개는 천연적으로 발생하는, 유전적으로 암호화된 아미노산이 본 발명의 화합물의 하나, 둘 또는 그 이상의 임의의 위치로 치환된 아미노산인 펩타이드를 합성하는데 또한 사용될 수 있다. 본 발명의 펩타이드로 치환될 수 있는 합성 아미노산은 N-메틸, L-하이드록시프로필, L-3,4-디하이드록시페닐알라닌,  $\delta$  아미노산, 이를 테면, L- $\delta$  하이드록시일일 및 D- $\delta$ -메틸알라닌, L- $\delta$ -메틸알라닌,  $\beta$  아미노산 및 이소퀴놀인을 포함하지만 여기에 제한되지 않는다. D-아미노산과 비-천연적으로 발생하는 합성 아미노산은 본 발명의 펩타이드로 또한 통합될 수 있다.

<89> 펩타이드 변형

<90> 본 발명의 다른 화합물을 생산하기 위하여 본 발명의 펩타이드 화합물의 아미노 및/또는 카르복시 말단을 변형할 수도 있다. 아미노 말단 변형은 메틸화(예를 들어,  $-NHCH_3$  또는  $-N(CH_3)_2$ ), 아세틸화(예를 들어, 아세트산 또는 그들의 할로겐화된 유도체, 이를 테면  $\alpha$ -클로로아세트산,  $\alpha$ -브로모아세트산, 또는  $\alpha$ -이도아세트산), 벤질 옥시카르보닐(Cbz) 기의 부가, 또는  $RCOO-$ 로 정의된 카르복실레이트 기능성 또는  $R-SO_2$ 로 정의되는 설폰닐 기능성을 함유하는 임의의 차단기로 아미노 말단을 차단하는 것으로서, 여기에서 R은 알킬, 아릴, 헤테로아릴, 알킬 아릴 등에서 선택되는 것이다. 또한 프로테아제(proteases)에 대한 민감성을 감소시키기 위하여거나 펩타이드 화합물의 배열을 제한하기 위하여 N-말단에서 테스아미노산(desamino acid)을 통합시킬 수 있다(그리하여 N-말단 아미노기는 없다). 바람직한 구체예에 있어서, N-말단은 아세틸화된다. 특히 바람직한 구체예에 있어서 N-말단 글리신은 N-아세틸글리신(AcG)를 획득하기 위해 아세틸화된다.

<91> 카르복시 말단의 변형은 유리산을 카르복사마이드 기(carboxamide group)로의 치환 또는 구조적 제약을 도입하기 위하여 카르복시 말단에서 시클릭 락탐을 형성하는 것을 포함한다. 본 발명의 펩타이드를 프로테아제에 대한 민감성을 감소시키기 위하여 또는 펩타이드의 배열을 제한하기 위하여 시클릭화 또는 펩타이드의 말단에서 테스아미노 또는 테스카르복시 잔기를 도입할 수 있으며, 그로 인하여 말단 아미노 또는 카르복실기가 없다. 본 발명의 화합물의 C-말단 기능기는 아마이드, 아마이드 저급 알킬, 아마이드 디(저급 알킬), 저급 알콕시, 하이드록시 및 카르복시 및 그들의 저급 에스테르 유도체 및 그들의 약학적으로 허용가능한 염을 포함한다.

<92> 20개의 유전적으로 암호화된 아미노산(또는 입체 이성질체 D 아미노산)의 천연적으로 발생하는 측쇄를 다른 측쇄, 예를 들어, 알킬, 저급알킬, 시클릭 4-,5-,6- 내지 7-원환 알킬(membered alkyl), 아마이드, 아마이드 저급 알킬, 아마이드 디(저급 알킬), 저급 알콕시, 하이드록시, 카르복시 및 그들의 저급 에스테르 유도체, 및 4-,5-,6- 내지 7-원환 헤테로시클릭과 같은 기로 치환할 수 있다. 특히, 프롤린 잔기의 고리 크기가 5원에서 4, 6, 또는 7 원으로 변경된 프롤린 유사체가 이용될 수 있다. 시클릭 기는 포화 또는 불포화될 수 있고, 만약 불포화된 것이면, 방향족 또는 비-방향족일 수 있다. 헤테로시클릭 기는 바람직하게 하나 이상의 질소, 산소, 및/또는 황 헤테로원자를 포함한다. 이러한 기들의 예는 후라잔일(furazanyl), 후릴(furyl), 이미다졸이디닐(imidazolidinyl), 이미다졸일(imidazolyl), 이미다졸이닐(imidazoliny), 이소치아졸일(isothiazolyl), 이소사졸일(isoxazolyl), 모르폴리닐(morpholinyl) (예를 들어, 포르폴리노(morpholino)), 옥사졸일(oxazolyl), 피페라지닐(piperazinyl) (예를 들어, 1-피페라지닐(1-piperazinyl)), 피페리딜(piperidyl) (예를 들어, 1-피페리딜(1-piperidyl)), 피페리디노(piperidino)), 피라닐(pyranly), 피라지닐(pyrazinyl), 피라졸리디닐(pyrazolidinyl), 피라졸리닐(pyrazolinyl), 피라졸일(pyrazolyl), 피리다지닐(pyridazinyl), 피리딜(pyridyl), 피리미디닐(pyrimidinyl), 피롤리디닐(pyrrolidinyl) (예를 들어, 1-피롤리디닐(1-pyrrolidinyl)), 피롤리닐(pyrrolinyl), 피롤릴(pyrrolyl), 티아디아졸일(thiadiazolyl), 티아졸일(thiazolyl), 티에닐(thienyl), 티오모르폴리닐(thiomorpholinyl) (예를 들어, 티오모르폴리노(thiomorpholino)), 및 트리아졸일(triazolyl)을 포함한다. 이들 헤테로시클릭 기들은 치환되거나 비치환될 수 있다. 기가 치환된 경우, 치환기는

알킬, 알콕시, 할로젠, 산소 또는 치환되거나 비치환된 페닐이 될 수 있다.

<93> 또한 인산화 또는 다른 방법에 의해 점진적으로 펩타이드를 변형할 수 있다[예를 들어, Hruby, et al. (1990) Biochem J. 268:249-262에서 기재된 것 처럼 변형할 수 있다].

<94> 본 발명의 펩타이드 화합물은 또한 유사한 생물학적 성질을 갖는 비-펩타이드 화합물을 위한 구조적 모델로서 이용된다. 당업자들은 다양한 기술들이 리드 펩타이드 화합물로서 동일한 또는 유사한 목적되는 생물학적 활성을 갖는, 그러나 용해성, 안정성 및 가수분해 및 단백질 가수분해에 대한 민감성 측면에서 리드 펩타이드보다 더 나은 활성을 갖는 화합물을 구성하는데 이용될 수 있음을 인식한다[Morgan and Gainor (1989) Ann. Rep. Med. Chem. 24:243-252을 참조하라]. 이런 기술들은 펩타이드 골격을 포스포네이트(phosphonates), 아미데이트(amidates), 카르바메이트(carbamates), 설펜아미드(sulfonamides), 이차 아민, 및 N-메틸아미노산으로 구성된 골격으로의 치환을 포함한다.

<95> 이황화 결합의 형성

<96> 본 발명의 화합물은 하나 이상의 분자 내 이황화 결합을 포함할 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 펩타이드 모노머 또는 다이머는 적어도 하나의 분자 내 이황화 결합을 포함한다. 바람직한 구체예에 있어서, 펩타이드 다이머는 두 개의 분자내 이황화 결합을 포함한다.

<97> 각 이황화 결합은 펩타이드 핵심 서열의 시스테인 잔기의 산화에 의해 형성될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 시스테인 결합 형성의 제어는 목적 이소머의 형성을 최적화하는데 효과적인 종류 및 농도의 산화제를 선택함으로써 수행된다. 예를 들어, 펩타이드 다이머의 두 개의 분자내 이황화 결합(각 펩타이드 체인에 하나씩)을 형성하기 위한 산화는 산화제가 DMSO일 경우에 (분자내 이황화 결합의 형성에 앞서) 우선적으로 성취된다.

<98> 바람직한 구체예에 있어서, 시스테인 결합의 형성은 펩타이드 합성 동안 티올-보호기의 선택적인 이용에 의해 제어된다. 예를 들어, 두 개의 분자내 이황화 결합을 갖는 다이머가 요구되는 경우, 첫 번째 모노머 펩타이드 체인은 첫 번째 티올 보호기[예를 들어, 트릴틸(Trt), Alloc(allyloxycarbonyl), 및 1-(4,4-디메틸-2,6-디옥소시클로헥스-1-일리덴)에틸(Dde) 등]로 보호된 핵심 서열의 두 개의 시스테인 잔기로 합성되고, 그 때 두 번째 펩타이드 모노머는 첫 번째 티올 보호기와는 다른 두 번째 티올 보호기[예를 들어, Acm(acetamidomethyl), t-부틸(tBu) 등]로 보호된 핵심 서열의 두 개의 시스테인 잔기로 합성된다. 그 이후에 첫 번째 티올 보호기는 첫 번째 모노머의 유효한 비설파이드 고리화를 위해 제거되고, 두 번째 티올 보호기는 두 번째 모노머의 유효한 비설파이드 고리화를 위해 제거된다.

<99> 본 발명의 다른 구체예는 황들 중 하나가 CH<sub>2</sub>기 또는 황을 위한 다른 이소테르(isotere)로 치환된 이들 이황화 유도체의 유사체를 제공한다. 이들 유사체들은 본 발명의 화합물로부터 제조될 수 있고, 여기에서 각 핵심 서열은 당업계에 잘 알려진 방법[예를 들어, Barker, et al. (1992) J. Med. Chem. 35:2040-2048; Or, et al. (1991) J. Org. Chem. 56:3146-3149을 보라]을 이용하여 분자내 또는 분자사이의 치환을 통해 적어도 하나의 C 또는 호모시스테인 잔기 및 두 번째 C 잔기 대신에 α-아미노-γ-부티르산을 함유한다. 당업자들은 이러한 치환이 α-아미노-γ-부티르산 및 호모시스테인의 다른 동족체들을 이용하여 발생할 수 있음을 손쉽게 이해할 것이다. 전의 고리화 전략에 추가하여, 다른 비-이황화 펩타이드 고리화 전략이 사용될 수 있다. 그런 대안의 고리화 전략은 예를 들어, 티오-에테르 결합의 형성에 관련된 것뿐만 아니라 아미드-고리화 전략을 포함한다.

<100> 그러므로, 본 발명의 화합물은 분자내 아미드 결합 또는 분자 사이의 티오-에테르 결합을 갖는 고리화 형태로 존재할 수 있다. 예를 들어, 핵심 서열 중 하나의 시스테인이 리신으로 치환되고 두 번째 시스테인은 글루탐산으로 치환된 펩타이드가 합성될 수 있다. 그 후에 시클릭 모노머가 이들 두 잔기의 측쇄 사이에서 아미드 결합을 통해 형성될 수 있다. 대안으로, 핵심 서열 중 하나의 시스테인이 리신으로 치환된 펩타이드가 합성될 수 있다. 이때, 시클릭 모노머는 리신 잔기의 측쇄와 핵심 서열의 두 번째 시스테인 잔기 사이에서 티오-에테르 결합으로 통해 형성될 수 있다. 이처럼, 이황화 고리화 전략에 추가하여, 아미드-고리화 전략 및 티오-에테르 고리화 전략이 본 발명의 화합물의 고리화하는데 손쉽게 사용될 수 있다. 추가적으로, 펩타이드의 아미노-말단은 α-치환된 아세트산으로 마무리될 수 있고, 여기에서 α-치환기는 리빙그룹(leaving group), 이를 테면 α-할로아세트산, 예를 들어, α-클로로아세트산, α-브로모아세트산 또는 α-이오도아세트산이다.

<101> 링커의 추가

<102> 구체예에 있어서, 펩타이드 다이머가 링커 L<sub>k</sub> 부분에 의해 다이머가 되는 경우, 상기 링커는 펩타이드가 합성되

는 동안 펩타이드 내로 통합될 수 있다. 예를 들어, 링커  $L_K$  부분이 펩타이드 합성 동안 개시 부위가 될 가능성이 있는 두 개의 기능기와 다른 분자 부분에 결합할 수 있는 세 번째 기능기(예를 들어, 카르복실기 또는 아미노기)를 포함하는 경우, 그 링커는 고체 지지체에 결합될 수 있다. 그 이후에, 두 개의 펩타이드 모노머가 다양한 고체상 합성 기술로 링커  $L_K$  부분의 두 개의 반응적 질소기 상에서 직접적으로 합성될 수 있다.

<103> 다른 구체예에 있어서, 펩타이드 다이머가 링커  $L_K$  부분에 의해 다이머가 되는 경우, 상기 링커는 펩타이드 합성 이후에 펩타이드 다이머의 두 개의 펩타이드 모노머에 결합될 수 있다. 그러한 결합은 당업계에서 잘 알려진 방법에 의해 성취될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 링커는 합성된 펩타이드 모노머의 표적 기능기에 부착하기에 적절한 적어도 두 개의 기능기를 포함한다. 예를 들어, 두 개의 유리 아민기를 갖는 링커는 두 개의 펩타이드 모노머 각각의 C-말단의 카르복실기와 반응할 수 있다. 다른 구체예에 있어서, 미리 활성화되거나 적절한 커플링 시약에 존재하에서 두 개의 카르복실기를 포함하는 링커는 두 개의 펩타이드 모노머 각각의 N-말단 또는 측쇄 아민기, 또는 C-말단의 리신 아미드와 반응할 수 있다.

<104> *스페이스의 추가*

<105> 펩타이드 화합물이 스페이스 부분을 포함하는 구체예에 있어서, 상기 스페이스는 펩타이드가 합성되는 동안 펩타이드 내로 통합될 수 있다. 예를 들어, 스페이스가 유리 아민기와 다른 분자 부분에 결합할 수 있는 두 번째 기능기(예를 들어, 카르복실기 또는 아미노기)를 포함하는 경우, 그 스페이스는 고체 지지체에 결합될 수 있다. 그 이후에, 펩타이드는 표준 고체상 기술에 의해 스페이스의 유리 아미노기 상에서 직접적으로 합성될 수 있다.

<106> 바람직한 구체예에 있어서, 두 개의 기능기를 함유하는 스페이스는 첫 번째 기능기를 통해 첫 번째로 고체 지지체에 결합된다. 그 다음, 펩타이드 합성 동안 개시 부위로 사용될 수 있는 두 개의 기능기와 다른 분자 부분에 결합할 수 있는 세 번째 기능기(예를 들어, 카르복실기 또는 아미노기)를 갖고 있는 링커  $L_K$  부분은 스페이스의 두 번째 기능기와 링커의 세 번째 긴오기를 통해 스페이스에 결합된다. 그 이후에, 두 개의 펩타이드 모노머가 다양한 고체상 합성 기술에 의해 링커  $L_K$  부분의 두 개의 반응적인 질소기 상에서 직접적으로 합성될 수 있다. 예를 들어, 스페이스가 유리 아민기와 결합된 고체 지지체는 링커의 유리 카르복실기를 통해 리신 링커와 반응할 수 있다.

<107> 펩타이드 화합물이 스페이스 부분을 포함하는 다른 구체예에 있어서, 상기 스페이스는 펩타이드가 합성된 후에 그 펩타이드에 결합될 수 있다. 그러한 결합은 당분야에서 잘 알려진 방법에 의해 성취될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, 링커는 그 합성된 펩타이드의 표적 기능기에 부착되기에 적절한 적어도 하나의 기능기를 포함한다. 예를 들어, 유리 아민기를 가진 스페이스는 펩타이드의 C-말단 카르복실기와 반응할 수 있다. 다른 구체예에 있어서, 유리 카르복실기를 갖는 링커는 펩타이드의 N-말단 또는 리신 잔기의 유리 아민기와 반응할 수 있다. 또 다른 예에서, 유리 설퍼하이드드릴기를 함유하는 스페이스는 이황화 결합을 형성하는 산화에 의해 펩타이드의 시스테인 잔기에 결합할 수 있다.

<108> *수용성 고분자의 부착*

<109> 하기의 기재에 더불어, 미국 특허출원번호 제10/844,933호 및 2004년 5월 12일자에 출원된 국제특허출원번호 제 PCT/U804/14887호가 여기에 참고자료로서 전체로 통합된다.

<110> 최근, 수용성 폴리머, 이를 테면 폴리에틸렌 글리콜(PEG)가 치료 및 진단에 중요한 펩타이드의 공유적 변형을 위해 사용되어 왔다. 그런 폴리머의 부착은 생물학적 활성을 강화시키고, 혈액순환시간을 연장시키고, 면역원성을 감소시키고, 수액 용해성을 증가시키며, 또한 프로테아제 분해에 대한 저항성을 증가시킨다고 생각되어 왔다. 예를 들어, PEG의 치료적 펩타이드, 이를 테면, 인터루킨[Knauf, et al. (1988) J. Biol. Chem. 263:15064; Tsutsumi, et al. (1995) J. Controlled Release 33:447], 인터페론(Kita, et al. (1990) Drug Des. Delivery 6:157), 카탈라아제(Abuchowski, et al. (1977) J. Biol. Chem. 252:582), 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(superoxide dismutase)(Beauchamp, et al. (1983) Anal. Biochem. 131:25), 및 아데노신 데아미나아제(adenosine deaminase)(Chen, et al. (1981) Biochim. Biophys. Acta 660:293)에 대한 부착이 생체 내(in vivo)에서 그들의 반감기를 확장시키고/거나 그들의 면역원성 및 항원성을 감소시키는 것으로 보고되어 왔다.

<111> 본 발명의 펩타이드 화합물은 또한 하나 이상의 수용성 폴리머 부분을 포함할 수 있다. 바람직하게, 이들 폴리머는 공유적으로 그 펩타이드 화합물에 부착된다. 그 수용성 폴리머는 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 에틸렌 글리콜/프로필렌 글리콜의 공중합체, 카르복시메틸셀룰로오스, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리-1,3-디옥솔란(dioxolane), 폴리-1,3,6-트리옥산, 에틸렌/말레익 안하이드라이드 공중합체

(ethylene/maleic anhydride copolymer), 폴리아미노산(호모폴리머 또는 랜덤 공중합체), 폴리(n-비닐피롤리돈)폴리에틸렌 글리콜, 프로프로필렌 글리콜 호모폴리머, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 및 폴리옥시에틸레이트 폴리올이 될 수 있다. 바람직한 수용성 폴리머는 PEG이다.

<112> 본 발명의 펩타이드, 펩타이드 다이머 및 다른 펩타이드-기초한 분자는 그 수용성 폴리머(들)을 그 분자의 수용체-결합 부분(예를 들어, 펩타이드+스페이서)에 연결시키는 임의의 다양한 화학을 이용하여 수용성 폴리머(예를 들어, PEG)에 부착될 수 있다. 통상적인 구체에는 수용성 폴리머의 수용체-결합 부분의 공유적 결합을 위해 단일 부착 접합(single attachment junction)을 사용하지만, 대안의 구체에는 있어서 복수의 부착 접합(multiple attachment junctions)이 사용될 수 있고, 다양한 종류의 수용성 폴리머들이 별개의 부착 연결로 수용체-결합 부분에 부착되는 변화가 포함될 수 있고, 스페이서 및/또는 하나 또는 두 개의 펩타이드 체인에 공유적 부착 접합(covalent attachment junction(s))이 포함될 수 있다. 몇몇 구체에는 있어서, 다이머 또는 고차 멀티머는 펩타이드 체인의 구별되는 종들(예를 들어, 헤테로다이머 또는 다른 헤테로멀티머)를 포함할 것이다. 예를 들어서, 그러나 여기에 제한되지 않게, 다이머는 PEG 부착 접합을 갖는 첫 번째 펩타이드를 포함할 수 있고, 두 번째 펩타이드 체인은 PEG 부착 접합이 결실되어 있거나 첫 번째 펩타이드 체인과 다른 연결 화학을 이용할 수 있고, 몇몇 변형에 있어서 스페이서는 PEG 부착 접합을 포함하거나 결실되어 있을 수 있고, 그런 스페이서가 만약 페그화(PEGylation) 되었다면 첫 번째 및/또는 두 번째 펩타이드 체인의 그것과는 다른 연결 화학을 이용할 것이다. 다른 구체에는 수용체-결합 부분의 스페이서 부분에 부착된 PEG와 분자의 펩타이드 부분의 아미노산 중 하나의 측쇄에 연결된 다른 수용성 폴리머(예를 들어 탄수화물)을 이용한다.

<113> 매우 다양한 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 종류들이 수용체-결합 부분(펩타이드+스페이서)의 페그화(PEGylation)를 위해 사용될 수 있다. 실질적으로, 임의의 적절한 반응적인 PEG 시약이 사용될 수 있다. 바람직한 구체에는 있어서, 반응적인 PEG 시약은 수용체-결합 부분에 결합할 때 카르바메이트(carbamate) 또는 아미드 결합의 형성을 초래한다. 적절한 반응적인 PEG 종류는 NOF 사(Yebisu Garden Place Tower, 20-3 Ebisu 4-chome, Shibuya-ku, Tokyo 150- 6019)의 약물 전달 시스템 카탈로그(2003) 및 Nektar Therapeutics(490 Discovery Drive, Huntsville, Alabama 35806)의 분자 엔지니어링 카탈로그(2003)에서 상업적으로 구입할 수 있는 것들을 포함하나 여기에 제한되지 않는다. 예를 들어, 여기에 제한되지는 않지만, 다음의 PEG 시약들이 종종 다양한 구체에서 바람직하다: mPEG2-NHS, mPEG2-ALD, 멀티-암 PEG(multi-Arm PEG), mPEG(MAL)2, mPEG2(MAL), mPEG-NH2, mPEG-SPA, mPEG-SBA, mPEG-티오에스테르, mPEG-더블 에스테르, mPEG-BTC, mPEG-ButyrALD, mPEG-ACET, 헤테로기능적인 PEGs (NH2-PEG-COOH, Boc- PEG-NHS, Fmoc-PEG-NHS, NHS-PEG-VS, NHS-PEG-MAL), PEG 아크릴레이트(ACRL-PEG-NHS), PEG-인지질(예를 들어, mPEG-DSPE), 당업자에 의해 선택고디는 화학에 의해 활성화되는 글리세린-기초 PEGs의 GL 시리즈를 포함하는 SUNBRITE 시리즈의 다중가지의 PEGs, 임의의 SUNBRITE의 활성화된 PEGs (카르복실-PEGs, p-NP-PEGs, 트레실-PEGs, 알데히드 PEGs, 아세탈-PEGs, 아미노-PEGs, 티올-PEGs, 말레이미도-PEGs, 하이드록실-PEG-아민, 아미노-PEG-COOH, 하이드록실-PEG-알데히드, 카르복실릭 안하이드라이드 타입-PEG, 기능화된 PEG-인지질, 및 그들의 특정 적용 및 이용을 위해 당업자에 의해 선택되는 다른 유사하고/하거나 적절한 반응적 PEG를 포함하지만 여기에 제한되지 않는다).

<114> 폴리머는 임의의 분자량이고, 가지가 있거나 없을 것이다. 본 발명에서 이용되기 위한 바람직한 PEG는 약 20 킬로달톤(kD 또는 kDa) 내지 약 40kD(용어 "약"은 PEG의 제조에 있어서 몇 가지 분자는 정해진 분자량보다 좀 더 크거나 덜 큰 분자량을 가지는 것을 의미한다)의 분자량을 가지는 선형의 비가지 PEG를 구성한다. 가장 바람직하게, PEG는 약 30kD 내지 약 40kD의 분자량을 갖는다. 희망하는 치료적 프로파일(예를 들어, 희망하는 일관된 방출의 지속; 만약 있다면 생물학적 활성에 대한 효과; 취급에의 용이성; 항원성의 정도 또는 결실; 및 다른 치료적 펩타이드에 대한 PEG의 알려진 효과)에 따라 다른 크기가 사용될 수도 있다.

<115> 부착된 폴리머 분자의 수는 다양할 수 있다; 예를 들어, 하나, 둘, 셋 또는 그 이상의 수용성 폴리머가 본 발명의 EPO-R 작용제 펩타이드에 부착될 수 있다. 다수 부착된 폴리머들은 동일하거나 다른 화학적 부분(예를 들어 다른 분자량의 PEGs)가 될 수 있다. 어떤 경우에 있어, 폴리머 부착의 정도(펩타이드에 부착된 폴리머 부분의 수 및/또는 폴리머가 부착되는 펩타이드의 전체 수)는 부착 반응에 있어서 펩타이드 분자에 대한 폴리머 분자의 비율, 뿐만 아니라 반응 혼합물에서 각각의 전체 농도에 의해 영향받을 수 있다. 일반적으로, 최적 폴리머에 대한 펩타이드 비율(초과하지 않는 비반응된 펩타이드 및/또는 폴리머 부분을 제공하기 위한 반응 효율의 점에서)은 폴리머 부착의 희망 정도(예를 들어, 모노, 디-, 트리- 등), 선택된 폴리머의 분자량, 폴리머가 가지가 있는지 또는 없는 것인지 여부 및 특정 부착 방법을 위한 반응 조건과 같은 요소에 의해 결정될 것이다.

<116> 바람직한 구체에서, 공유적으로 부착된 수용성 폴리머는 PEG이다. 실험을 들기 위하여, PEG의 공유적 부착(페그화)을 위한 방법들 중의 예는 하기에 기재되어 있다. 이들 실험을 드는 기재들은 제한할 의도는 아니다. 당업

자들은 수용성 폴리머의 넓은 범위의 공유적 부착을 위한 다양한 방법들이 당분야에서 잘 알려져 있음을 인식할 것이다. 이처럼, 당분야에 알려진 수많은 임의의 수용성 폴리머들이 당분야에 잘 알려진 수 많은 임의의 부착 방법에 의해 부착된 펩타이드 화합물은 본 발명에 포함된다.

<117> 하나의 구체예에 있어서, PEG는 두 개의 펩타이드 모노머를 다이머로 만드는 링커로서 이요될 수 있다. 하나의 구체예에 있어서, PEG는 펩타이드 모노머 또는 다이머의 적어도 하나의 말단(N-말단 또는 C-말단)에 부착된다. 또 다른 구체예에 있어서, PEG는 펩타이드 모노머 또는 다이머의 스페이서 부분에 부착된다. 바람직한 구체예에 있어서, PEG는 펩타이드 다이머의 링커 부분에 부착된다.

<118> 매우 바람직한 구체예에 있어서, PEG는 스페이스 부분에 부착되고, 상기 스페이서 부분은 펩타이드 다이머의 모너머를 연결시키는 링커  $L_k$  부분에 부착된다. 가장 바람직하게, PEG는 스페이서 부분에 부착되고, 상기 스페이서 부분은 리신 링커의 카르보닐 탄소 또는 리신 아미드 링커의 아미드 질소를 통해 펩타이드 다이머에 부착된다. 당업자가 이용할 수 있는 수 많은 PEG 부착 방법이 있다[예를 들어, Goodson, et al. (1990) *Bio/Technology* 8:343 (PEGylation of interleukin-2 at its glycosylation site after site-directed mutagenesis); EP 0 401 384 (coupling PEG to G-CSF); Malik, et al, (1992) *Exp. Hematol.* 20:1028-1035 (PEGylation of GM-CSF using tresyl chloride); PCT Pub. No. WO 90/12874 (PEGylation of erythropoietin containing a recombinantly introduced cysteine residue using a cysteine-specific mPEG derivative); U.S. Pat. No. 5,757,078 (PEGylation of EPO peptides); and U.S. Pat. No. 6,077,939 (PEGylation of an N-terminal  $\alpha$ -carbon of a peptide)를 보라].

<119> 예를 들어, PEG는 반응기를 통해 아미노산 잔기에 공유적으로 결합될 수 있다. 반응기는 활성화된 PEG 분자에 결합될 수 있는 것이다(예를 들어, 유리 아미노 또는 카르복실기). 예를 들어, N-말단의 아미노산 잔기 및 리신(K) 잔기는 유리 아미노기를 갖는다; 그리고 C-말단의 아미노산 잔기는 유리 카르복실기를 갖는다. 실퍼하이드릴기(예를 들어, 시스테인 잔기에서 발견되는 것처럼)은 또한 PEG 부착을 위해 반응기로서 사용될 수 있다. 추가로, 폴리펩타이드의 C-말단에서 특이적으로 활성화된 기들(예를 들어, 히드라지드, 알데히드 및 방향족-아미노기)을 도입하기 위한 효소-어시스트 방법이 기재되어 있다[Schwarz, et al. (1990) *Methods Enzymol.* 184:160; Rose, et al. (1991) *Bioconjugate Chem.* 2:154; Gaertner, et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:7224].

<120> 예를 들어, PEG 분자는 다른 반응적인 부분을 갖는 메톡시 PEG("mPEG")을 이용한 펩타이드 아미노기에 부착될 수 있다. 그런 폴리머들은 mPEG-숙시니미딜 숙시네이트(mPEG-succinimidyl succinate), mPEG-숙시니미딜 카르보네이트(mPEG-succinimidyl carbonate), mPEG-이미데이트(mPEG-imidate), mPEG-4-니트로페닐 카르보네이트(mPEG-4-nitrophenyl carbonate), 및 mPEG-시아누르 클로라이드(mPEG-cyanuric chloride)를 포함한다. 유사하게, PEG 분자는 유리 아민기를 갖는 메톡시 PEG(mPEG-NBt)을 이용하여 펩타이드 카르복실기에 부착될 수 있다.

<121> PEG의 부착은 비-특이적이고 특이적 PEG 부착을 함유하는 펩타이드가 목적인 경우, 희망하는 페그화 화합물은 페그화 화합물의 혼합물로부터 정제될 수 있다. 예를 들어, 만약 N-말단에 페그화된 펩타이드가 목적이라면, N-말단의 페그화된 형태가 랜덤하게 페그화된 펩타이드 집단으로부터 정제될 수 있다(예를 들어, 다른 모노페그화된 부분에서 이 부분을 분리하는 것).

<122> 바람직한 구체예에 있어서, PEG는 펩타이드에 자리-특이적으로 부착된다. 성장 호르몬-방출 인자의 강력한 유사체의 N-말단, 측쇄 및 C-말단에서의 자리-특이적 페그화가 고체-상 합성을 통해 수행된다[Felix, et al. (1995) *Int. J. Peptide Protein Res.* 46:253]. 다른 자리-특이적 방법은 N-말단의 트레오닌의 소듐 페리오테이트 산화에 의해 생성된 N-말단에서의 반응적인 알데히드기를 통해 자리-특이적 방법에서 리포솜의 표면-이식된 PEG의 말단에 펩타이드를 부착시키는 것과 관련이 있다[Zalipsky, et al. (1995) *Bioconj. Chem.* 6:705]. 그러나, 이 방법은 N-말단의 세린 또는 트레오닌 잔기를 갖는 폴리펩타이드로 제한된다. 히드라존(hydrazone), 환원 히드라존, 옥심 또는 환원 옥심 결합을 통한 펩타이드의 N-말단 페그화를 위한 다른 자리-특이적 방법이 Wei 등의 미국특허번호 제6,077,939호에 기재되어 있다.

<123> 하나의 방법에서, 선택적인 N-말단 페그화는 특정 단백질에서 유도체화(derivatization)를 위해 이용가능한 첫 번째의 아미노기(리신 대 N-말단)의 다른 타입의 다른 반응성을 이용한 환원 알킬화에 의해 성취될 수 있다. 적절한 반응 조건 하에서, PEG를 함유한 카르보닐기는 펩타이드의 N-말단에 선택적으로 부착된다. 예를 들어, 리신 잔기의  $\epsilon$ -아미노기 및 펩타이드의 N-말단의  $\alpha$ -아미노기 사이의 pKa 차이를 이용하는 pH에서 반응을 수행함으로써 선택적으로 N-말단에 페그화된 단백질이 가능하다. 그런 선택적 부착에 의해, 페그화는 다른 반응기(예를 들어, 리신 측쇄 아미노기)에는 현저한 변형이 없이, 단백질의 N-말단에서 우세하게 일어난다. 환원 알킬화

를 이용하여, PEG는 단백질에의 커플링을 위하여 단일 반응적 알데히드를 가져야만 한다(예를 들어, PEG 프로프린알데히드가 사용될 수 있다).

<124> 자리-특이적 돌연변이생성은 자리-특이적 폴리머 부착을 위한 펩타이드를 준비하기위해 사용될 수 있는 또 다른 접근이다. 이 방법에 의해, 펩타이드의 아미노산 서열은 펩타이드 내의 희망하는 위치에 적절한 반응기를 통합 시키도록 설계된다. 예를 들어, 국제공개특허 제WO 90/12874호는 시스템인 잔기의 삽입 또는 다른 잔기의 시스템인 잔기로의 치환에 의해 변형된 단백질의 자리-특이적 페그화를 기재하고 있다. 이 공개는 또한 시스템인-특이적 mPEG 유도체를 EPO 상에서 재조합적으로 도입된 시스템인 잔기로 반응시킴으로써 mPEG-에리트로포이에틴 (mPEG-EPO<sup>TM</sup>)의 제조를 기재하고 있다.

<125> PEG가 스페이서 또는 링커 부분에 부착되는 경우, 유사한 부착 방법이 사용될 수 있다. 이 경우에, 링커 또는 스페이서가 반응기를 포함하고, 적절하게 상보적인 반응기를 포함하고 있는 활성화된 PEG 분자가 공유 부착을 초래하는데 이용된다. 바람직한 구체예에 있어서, 링커 또는 스페이서 반응기는 아미드 또는 카르바메이트와 같은 안정적인 공유결합을 형성하기 위해 적절하게 활성화된 PEG 분자와 반응하는 말단의 아미노기(예를 들어, 링커 또는 스페이서의 말단에서 위치된 것)를 함유한다. 적절하게 활성화된 PEG 종류는 mPEG-과라-니트로페닐카르보네이트 (mPEG-NPC), mPEG-숙시니미딜 카르보네이트 (mPEG-SC), 및 mPEG-숙시니미딜 프로피온네이트(mPEG-SPA)를 포함하나 여기에 제한되지 않는다. 다른 바람직한 구체예에 있어서, 링커 또는 스페이서 반응기는 적절한 반응 조건하에서 아민-함유 PEG 분자와 공유 결합을 형성하기 위해 활성화될 수 있는 카르복실기를 함유한다. 적절한 PEG 분자는 mPEG-NH<sub>2</sub>를 포함하고 적절한 반응 조건은 카르보디이미드-매개 아미드 형성 (carbodiimide-mediated amide formation) 등을 포함한다.

<126> EPO-R 작용제 활성화 분석

<127> 본 발명의 다양한 펩타이드 화합물(예를 들어, EPO-R 작용제)의 생물학적 활성은 당업계에 잘 알려진 임의의 다양한 방법에 의해 분석될 수 있다. 예를 들어, 2004년 5월 12일자에 출원된 국제특허출원번호 PCT/US04/14886를 보라. 확실한, 바람직한 분석에 대한 비-제한적 예시들이 또한 여기에 기재되어 있다.

<128> 시험관내(In vitro) 기능적 분석

<129> 시험관내 경쟁적 결합 분석은 EPO-R에의 결합에 대해 EPO와 경쟁하는 테스트 펩타이드의 능력을 정량화한다. 예를 들어(예를 들어, 미국 특허 제5,773,569호에 기재된 것을 보라), 인간 EPO-R(EPO 결합 단백질, EBP)의 세포 외부 도메인은 E.coli에서 재조합적으로 생산될 수 있고 재조합 단백질은 고체 지지체, 이를 테면 마이크로티트레 디쉬(microtitre dish) 또는 합성 비즈[예를 들어, Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)의 설포링크 비즈]에 결합될 수 있다. 고정화된 EBP는 이때 표지된 재조합 EPO 또는 표지된 재조합 EPO 및 테스트 펩타이드와 함께 배양된다. 그런 실험을 위해 테스트 펩타이드를 연속적으로 희석한다. 테스트 펩타이드가 부가되지 않은 분석 포인트는 EBP에 결합하는 전체 EPO를 정의한다. 테스트 펩타이드를 함유하는 반응을 위해, 결합된 EPO의 양을 정량화하고, 대조군 결합에 대한 퍼센트(전체=100%)로 표현하였다. 이들 수치는 펩타이드 농도에 대하여 기입되었다. IC<sub>50</sub> 수치는 EBP에 대한 EPO의 결합을 감소시키는 테스트 펩타이드의 농도를 50%로 정의한 것이다(EPO 결합의 50% 저해).

<130> 다른 시험관내 경쟁적 결합 분석은 두 개의 비즈, EPO-결합된 비즈 및 EPO-R결합된 비즈의 접근 기능으로서 형성된 빛 시그널을 측정한다. 비즈 접근은 EPO의 EPO-R에대한 결합에 의해 생성된다. EPO-R에 결합하기 위해 EPO와 경쟁하는 테스트 펩타이드는 빛 방출에 있어서의 감소로 인하여 이 결합을 방해할 것이다. 빛 방출에 있어서 50% 감소를 초래하는 테스트 펩타이드의 농도는 I<sub>50</sub> 수치로서 정의된다.

<131> EPO-수용체에 특이적으로 결합하는 본 발명의 모노머 및 다이머 펩타이드 EPO-R 작용제의 생물학적 활성 및 기능이 시험관내 세포-기초 기능적 분석(in vitro cell-based functional assays)을 이용하여 분석될 수 있다. 한 분석은 인간 EPO-R을 발현하는 쥐의 pre-B-세포주에 기초하고 fos 프로모터-작동되는 루시페라아제 수용체 유전자 구조물로 더 트랜스펙트된다. EPO 또는 다른 EPO-R 작용제에의 노출시키면 그런 세포는 루시페라아제를 합성함으로써 반응한다. 루시페라아제는 그것의 기질 루시페린이 부가될 때 빛의 방출을 야기시킨다. 그러므로, 그런 세포에서의 EPO-R 활성화 수준은 루시페라아제 활성화를 측정함으로써 정량화될 수 있다. 테스트 펩타이드의 활성화는 연속적으로 희석된 테스트 펩타이드를 그 세포에 첨가함으로써 측정되고, 이때 4시간 동안 배양된다. 배양한 후에, 루시페린 기질은 그 세포에 첨가되고, 빛 방출이 측정된다. 빛의 최대 방출의 반을 초래하는 테스트 펩타이드의 농도는 EC50으로 기록된다.

- <132> 다른 분석은 EPO-R이 안정하게 트랜스펙트된 비형질전환된 쥐의 골수 유래 세포주인 FDC-P1/ER 세포를 이용하여 수행될 수 있다[Dexter, et al. (1980) J. Exp. Med. 152:1036-1047].
- <133> 하나의 그런 분석에 있어서, 세포들은 필수 성장 인자의 존재하에서 고정된밀도의 절반으로 성장된다(예를 들어, 미국특허 제5,773,569호를 보라). 그 세포들은 그 후 PBS로 세척되고 성장인자 없이 전체 배지에서 16-24 시간 동안 결핍된다. 그 세포들의 생존능을 결정한 후에(예를 들어 트립판 블루 염색에 의해), 스톱 용액(성장 인자 없는 전체 배지에서)은 50  $\mu$ L 당 약 10<sup>5</sup> 세포가 주어지도록 만든다. 펩타이드 EPO-R 작용제 화합물(통상적으로 상-결합된 또는 다른 결합된 또는 비고정 펩타이드에 반대하여 유리, 용액 상 펩타이드)의 연속적인 희석은 테스트하기 위하여 웰 당 50  $\mu$ L의 최종 부피로 96-웰 조직 배양 플레이트에서 만들어진다. 세포들 (50  $\mu$ L)이 각 웰에 첨가되고 음성 대조군이 죽거나 정지되는 지점에서 그 세포들은 24-48시간 동안 배양된다. 세포 증식이 당업계에 잘 알려진 기술, 일르 테면 세포 증식의 지시로서 H<sup>3</sup>-티미딘 결합을 측정하는 MTT 분석[Mosmann (1983) J. Immunol. Methods 65:55-63을 보라]에 의해 측정된다. 펩타이드는 EPO-R-발현 세포주 및 부모의 비-발현 세포주 모두에서 평가된다. 최고 세포 증식의 반을 획득하는데 필수적인 테스트 펩타이드의 농도는 EC50으로 기록된다.
- <134> 다른 분석에서, 세포는 EPO-보충된 배지에서 고정 상으로 성장시키고, EPO 없는 배지에서 추가로 18시간 동안 배양된다. 세포들은 동일한 세포 밀도의 세 가지 그룹으로 분류된다: 어떤 인자도 첨가되지 않은 한 그룹(음성 대조군), EPO를 갖는 그룹(양성 대조군), 및 테스트 펩타이드를 갖는 실험 그룹. 배양된 세포들은 다양한 시간에서 수집되고 DNA-결합 형광 염료(예를 들어, 요오드화 프로피디움 또는 Hoechst 염료, 시그마로부터 입수할 수 있는 양자 모두)로 염색하였다. 그후 형광을 측정하고, 예를 들어 FACS 스캔 플루오 사이토미터를 이용하여 측정한다. 세포주기의 각 주기에서 세포의 퍼센트를 측정하고, 예를 들어 CeIIFIT 소프트웨어의 SOBR 모델(Becton Dickinson)을 이용하여 측정한다. EPO 또는 활성 펩타이드로 처리된 세포들은 음성 대조군에 비하여 S 주기에서 세포의 더 큰 부분을 보여줄 것이다(증가된 DNA 함량을 나타내는 것처럼 증가된 형광에 의해 측정된 것과 같음).
- <135> 유사한 분석이 FDCP-I[예를 들어, Dexter et al. (1980) J. Exp. Med. 152:1036-1047을 보라] 또는 TF-I [Kitamura, et al. (1989) Blood 73:375-380] 세포주를 이용하여 수행될 수 있다. FDCP-I는 WEHI-3-조건의 배지(IL-3, ATCC 번호 TIB-68을 함유하는 배지)로 보충될 때, 증식할 수 있지만 분화될 수는 없는 성장인자 의존의, 쥐의 다-기능 원시 조혈 전구체 세포주이다. 그런 실험을 위해, FDCP-I 세포주가 인간 또는 쥐의 EPO-R로 트랜스펙트되는데, EPO의 존재하에서 증식할 수는 있으나 분화될 수는 없는 CP-1-hEPO-R 또는 FDCP-1-mEPO-R 세포주를 각각 생산하기 위한 것이다. TF-I, EPO-의존 세포주는 세포 증식에서 펩타이드 EPO-R 작용제의 효괄르 측정하기 위해 사용될 수 있다.
- <136> 다른 분석에 있어서, 비장 세포로의 H<sup>3</sup>-티미딘 통합에 근거한 마이크로분석을 위해 Krystal (1983) Exp. Hematol 11:649-660에 기재된 과정을 EPO 작용제로서 사용하기 위한 본 발명의 화합물의 능력을 확인하기 위해 사용할 수 있다. 요약하면, B6C3F<sub>1</sub> 마우스는 페닐하이드라진(60 mg/kg)으로 이틀 동안 매일 주사되었다. 세 번째 날에, 비장 세포를 제거하고 24 시간 동안 증식하는 그들의 능력을 MTT 분석을 이용하여 확인하였다.
- <137> 에트로포이에틴-반응 세포주에서 EPO의 EPO-R에 대한 결합은 수용체와 다양한 She, vav 및 JAK2 키나아제와 같은 세포내 단백질 모두의 티로신 인산화를 유도한다. 그러므로, 다른 시험관내 분석은 EPO-R와 하류의 세포내 시그널 전환 단백질의 티로신 인산화를 유도하는 본 발명의 펩타이드의 능력을 측정한다. 상기 기재된 결합 및 증식 분석에 의해 정의된 것처럼 활성 펩타이드는 에리트로포이에틴-반응 세포에서 EPO의 그것과 거의 동일한 인산화 패턴을 유도한다. 이 분석을 위해, FDC-P 1/ER 세포[Dexter, et al. (1980) J Exp Med 152:1036-47]가 EPO-보충된 배지에서 유지되고 정지상에서 성장된다. 이들 세포들은 24시간 동안 EPO 없는 배지에서 배양된다. 그 세포들의 정의된 수가 37°C에서 대략 10분 동안 테스트 펩타이드와 배양된다. EPO를 갖는 세포의 대조군 샘플이 또는 각 분석을 수행한다. 테스트된 세포들을 원심분리로 수집하고 SDS 라이시스 버퍼에서 재현탁시키고 SDS 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 수행하였다. 겔에서 전기영동된 단백질을 니트로셀룰로오스로 옮기고, 블랏상의 포스포티로신 함유 단백질을 표준 면역학적 기술로 가시화하였다. 예를 들어, 그 블랏은 항-포스포티로신 항체[예를 들어, Upstate Biotechnology, Inc.의 쥐의 항-포스포티로신 IgG]로 탐침시킬 수 있고, 세척하고 두 번째 항체[예를 들어, Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. (Washington, DC)의 페록시다아제 표지된 염소의 항-마우스 IgG]로 탐침시킨다. 그 이후에, 포스포티로신-함유 단백질을 비색분석, 화학발광분석 또는 형광분석을 포함하는 표준 기술로 가시화될 수 있다. 예를 들어, 화학발광분석은 Amersham의 ECL 웨스턴 블랏 시

트템을 이용하여 수행할 수 있다.

- <138> 본 발명의 펩타이드의 활성을 평가하기 위하여 사용될 수 있는 또 다른 세포-기초한 시험관내 분석은 쥐의 골수 또는 인간 말초 혈액 세포를 이용하는 콜로니 분석을 포함한다. 쥐의 골수는 쥐의 긴 넓적다리(femurs)로부터 얻을 수 있는 반면, 인간 말초 혈액의 샘플은 건강한 도너로부터 얻을 수 있다. 말초 혈액의 경우, 단핵 세포가 처음에 혈액으로부터 분리되고, 예를 들어 Ficoll-Hypaque gradient [Stem Cell Technologies, Inc. (Vancouver, Canada)]을 통한 원심분리에 의해 분리된다. 이 분석을 위해, 핵이 있는 세포의 카운팅은 원래 샘플에 있는 핵을 가진 세포의 수와 농도를 확립함으로써 수행된다. 정해진 수의 세포가 제조사의 지시[Stem Cell Technologies, Inc. (Vancouver, Canada)]에 따라 메틸 셀룰로오즈 상에서 평판배양된다. 실험 그룹은 테스트 펩타이드로 처리되고, 양성 대조군은 EPO로 처리되고, 음성 대조군은 아무런 처리를 받지 않는다. 각 그룹의 성장 콜로니의 수는 정해진 배양 기간이 지난 후에, 일반적으로 10일과 18일이 지난 후에 그 수를 센다. 활성 펩타이드는 콜로니 형성을 촉진시킬 것이다.
- <139> 본 발명의 화합물의 활성을 증명하는데 사용될 수 있는 다른 시험관내 생물학적 분석이 다음에 기재되어 있다 [Greenberger, et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2931-2935 (EPO-dependent hematopoietic progenitor cell line); Quelle and Wojchowski (1991) J. Biol. Chem. 266:609-614 (protein tyrosine phosphorylation in B6Sut.EP cells); Dusanter-Fourt, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:10670-10678 (tyrosine phosphorylation of EPO-receptor in human EPO-responsive cells); Quelle, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267: 17055-17060 (tyrosine phosphorylation of a cytosolic protein, pp 100, in FDC-ER cells); Worthington, et al. (1987) Exp. Hematol. 15:85-92 (colorimetric assay for hemoglobin); Kaiho and Miuno (1985) Anal. Biochem. 149:117-120 (detection of hemoglobin with 2,7-diaminofluorene); Patel, et al. (1992) J. Biol. Chem. 267:21300- 21302 (expression of c-myb); Witthuhn, et al. (1993) Cell 74:227-236 (association and tyrosine phosphorylation of JAK2); Leonard, et al. (1993) Blood 82:1071-1079 (expression of GATA transcription factors); 및 Ando, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:9571-9575 (regulation of Gi transition by cycling D2 and D3)].
- <140> Molecular Devices Corp.에 의해 설계된, 마이크로피지오미터(microphysiometer)로 알려진 기구가 다양한 수용체에 대한 작용제 및 길항제의 효과 측정에 성공적으로 이용되었음이 보고되었다. 이 기구는 수용체 활성에 대응하여 세포 외부의 배지의 산성화 비율에 있어서의 변경을 측정하는 것이다.
- <141> 생체 내(in vivo) 기능 분석
- <142> 테스트 펩타이드의 기능을 평가하기 위해 사용될 수 있는 하나의 생체내 기능 분석은 적혈구증가적 엑스하이포믹 마우스의 바이오분석(polycythemic exhypoxic mouse bioassay)이다. 이 분석을 위하여, 마우스는 몇일 동안 교대 조건 사이클을 겪게 하였다. 이 사이클에서, 마우스들은 저비중(hypobaric) 조건과 대기압 조건 사이에서 교대하였다. 그 이후에, 마우스들은 테스트 샘플을 투여하기 전에 2-3일 동안 대기압 조건에서 유지시켰다. 테스트 펩타이드 샘플, 또는 양성 대조군 마우스의 경우에서의 EPO 표준이 그 조건 하의 마우스들에게 피하조직으로 주입시켰다. 방사능표지된 철(예를 들어, Fe59)가 그 이틀 후에 투여되고, 방사능 표지된 철의 투여 후 2일째에 혈액 샘플을 채취하였다. 헤마토크릿(Hematocrits)과 방사능 측정은 표준 기술에 의해 각 혈액 샘플에서 측정되었다. 활성 테스트 펩타이드가 주사된 마우스로부터의 혈액 샘플이 테스트 펩타이드 또는 EPO를 주사받지 못한 마우스들보다 (에리트로사이트 헤모글로빈에 의한 Fe59의 결합에 의하여) 더 큰 방사능을 보여줄 것이다.
- <143> 테스트 펩타이드의 기능을 평가하는데 사용될 수 있는 다른 생체내 기능 분석은 망상적혈구 분석(reticulocyte assay)이다. 이 분석을 위하여, 정상적으로 비처리된 마우스는 EPO 또는 테스트 펩타이드로 3일 동안 연속적으로 피하 조직으로 주사되었다. 셋째날에, 그 마우스는 또한 철 텍스트란으로 복막내로 주사되었다. 다섯째날에, 혈액 샘플을 마우스로부터 채취하였다. 혈액 속의 망상적혈구의 퍼센트(%)는 티아졸 오렌지 염색과 플로우 사이토미터 분석(retic-count program)으로 측정하였다. 추가로, 헤마토크릿은 손으로 결정된다. 수집된 망상적혈구의 퍼센트는 다음의 공식으로 결정된다:
- <144> 
$$\% \text{RETIC}_{\text{CORRECTED}} = \% \text{RETIC}_{\text{OBSERVED}} \times (\text{Hematocrit}_{\text{INDIVIDUAL}} / \text{Hematocrit}_{\text{NORMAL}})$$
- <145> 활성 테스트 화합물은 테스트 펩타이드 또는 EPO를 받지 못한 마우스에 비하여 증가된 % RETIC<sub>CORRECTED</sub> 수치를 보여줄 것이다.
- <146> 본 발명의 EPO-R 작용제 펩타이드의 용도

- <147> 본 발명의 펩타이드 화합물은 EPO의 생산 및 EPO의 EPO-R에 대한 결합(예를 들어, EPO의 메카니즘/ EPO-R 시크널 전환/수용체 활성화)에 영향을 끼치는, 그리고 영향을 받는 것으로 여겨지는 많은 인자의 평가를 포함하여 EPO의 생물학적 역할을 이해하기 위한 도구로서 시험관 내에서 유용하다. 본 발명의 펩타이드는 또한 EPO-R에 결합하는 다른 화합물의 개발에서도 유용하다. 왜냐하면 본 발명의 화합물은 그 발전에 유용한 중요한 구조-활성화-관계 정보를 제공하기 때문이다.
- <148> 게다가, EPO-R에 결합하는 그들의 능력에 기초하여, 본 발명의 펩타이드는 살아있는 세포; 고정된 세포; 생물학적 체액; 조직의 균질 현탁액; 정제된, 천연의 생물학적 물질; 등에서 EPO-R의 측정을 위한 시약으로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 그런 펩타이드를 표지함으로써, 그들의 표면 상에 EPO-R을 갖고 있는 세포를 동정할 수 있다. 추가로, EPO-R에 결합하는 그들의 능력에 기초하여, 본 발명의 펩타이드는 인 시추 염색(in situ staining), FACS (fluorescence-activated cell sorting) 분석, 웨스턴 블롯팅, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 등에서 사용될 수 있다. 추가로, EPO-R에 결합하는 그들의 능력에 기초하여, 본 발명의 펩타이드는 수용체 정제, 또는 세포 표면상에서(또는 투고된 세포의 내부에서) EPO-R을 발현하는 세포를 정제에 이용될 수 있다.
- <149> 본 발명의 펩타이드는 또한 다양한 의약 리서치 및 진단 목적의 상업적 시약으로 이용될 수 있다. 그런 용도는 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: (1) 다양한 기능 분석에서 후보 EPO-R 작용제의 활성을 정량하기 위한 측정 기준으로서의 용도; (2) 랜덤 펩타이드 스크리닝, 예를 들어 EPO-R 펩타이드 리간드의 새로운 페밀리를 찾는 경우에서의 차단 시약으로서의 용도로서, 그 펩타이드는 본 발명의 EPO 펩타이드의 복귀를 차단하는데 이용될 수 있다; (3) EPO-R과의 공동-결정화에 있어서의 용도, 예를 들어 EPO-R에 결합된 본 발명의 펩타이드의 결정체가 형성될 수 있고, 이 결정체는 X-레이 결정학에 의해 수용체/펩타이드 구조를 결정할 수 있다; (4) 글로빈 합성 및 헴 복합체 합성을 유도하고, 분화를 개시함으로써 페리틴(ferritin) 수용체의 수를 증가시키는 에리트로사이트 전구체 세포의 능력을 측정하는 용도; (5) FDCEP-I -mEPO-R 및 TF-I 세포주와 같은 EPO-의존 세포주의 증식 및 성장을 유지하기 위한 용도; 및 (6) 리서치 및 진단 적용의 용도로서, 여기에서 EPO-R은 바람직하게 활성화되거나 그런 활성화가 EPO-R 작용제 등의 알려진 정량에 대하여 편리하게 기준화된다. 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 치료 방법 및 의약의 제조가 제공된다. 본 발명의 펩타이드 화합물은 인간을 포함한 온혈 동물에 생체 내에서 EPO의 EPO-R에 대한 결합을 자극시키기 위하여 투여된다. 그러므로, 본 발명은 EPO의 결핍과 관련된 질병의 치료적 치료를 위한 방법을 포함하고, 그 방법은 본 발명의 펩타이드를 EPO-R을 자극시켜 생체 내에서 EPO의 결핍과 관련된 증상을 완화시키는데 충분한 양으로 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 펩타이드는 신 기능 부전(renal insufficiency) 및/또는 말기 신부전증/투석; AIDS와 관련된 빈혈; 만성 염증 질병(예를 들어, 류마티성 관절염 및 만성 염증성 창자병)과 관련된 빈혈 및 자가면역질환의 치료에 있어서; 그리고 수술 전에 환자의 적혈구 수치를 증가시키기 위한 용도로 사용될 것이다. 본 발명의 펩타이드의 투여에 의해 치료될 수 있는 다른 질병 상태, 질환 및 혈액 비규칙성 상태는 다음을 포함한다: 베타-지중해빈혈(beta-thalassemia); 낭성 섬유증(cystic fibrosis); 임신 및 월경 장애; 미숙아의 조기 빈혈; 척수 상처; 우주 비행; 급성 혈액 손실; 노화; 및 비정상적 적혈구 생성(erythropoiesis)에 의해 동반되는 다양한 종양 질병 상태.
- <150> 다른 구체예에 있어서, 본 발명의 펩타이드는 낮거나 또는 결핍된 적혈구 세포에 의해 특징지어 질 수 없는 질병의 치료를 위해 사용될 수 있는데, 예를 들어 수혈 전에 사전치료로서 가능하다. 추가로, 본 발명의 화합물의 투여는 출혈 시간의 감소를 초래하고, 그러므로 수술 전에 환자에게 투여하거나 출혈이 예상되는 경우에 사용될 것이다. 추가로 본 발명의 화합물은 메가카리오사이트(megakaryocytes)의 활성화에 이용될 것이다.
- <151> EPO가 중추 콜린성 신경 세포(central cholinergic neurons)에 대한 효과뿐만 아니라 혈관 내피 세포에 대한 분열 촉진 및 화학주성 효과를 갖기는 것을 보여주었기 때문에[예를 들어, Amagnostou, et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5978-5982 and Konishi, et al. (1993) Brain Res. 609:29-35을 보라], 본 발명의 화합물은 또한 다음과 같은 다양한 혈관 질환의 치료를 위해 사용될 것이다: 상처 치유 촉진; 결 심장 혈관의 성장 촉진(심근 경색증 후에 일어날 수 있는 것과 같은 것); 외상 치료; 및 혈관 이식 후 치료. 본 발명의 화합물은 아세틸콜린의 절대적으로 낮은 수치 또는 다른 신경 자극 물질, 예를 들어 뉴로트랜스미터와 비교하여 아세틸 콜린의 상대적으로 낮은 수치에 의해 일반적으로 특징지어지는 다양한 신경계 질환의 치료를 위해 사용될 것이다.
- <152> 약학 조성물
- <153> 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 상기 EPO-R 작용제 펩타이드 화합물의 약학 조성물이 제공된다. 그런 조성물

의 투여에 의해 완화되거나 조절되는 상태들은 상기에서 기재된 것을 포함한다. 그런 약학 조성물은 경구, 비경구(근육내, 복막내, 정맥내(IV) 또는 피하내 주사), 경피(간접적으로 또는, 이온삼투요법 또는 전기 천공을 사용), 점막 관통(코, 질, 직장 또는 혀)의 투여 경로 또는 바이오침식가능한(bioerodible) 삽입물을 사용하여 투여될 수 있고, 각 투여 경로를 위한 적절한 1회 투여 형태로 제형화될 수 있다. 일반적으로, 본 발명은 약학적으로 허용가능한 희석제, 방부제, 가용화제, 유화제, 어쥘런트 및/또는 담체와 함께 EPO-R 작용제 펩타이드, 또는 본 발명의 유도체 산물의 효과적인 양을 포함하는 약학조성물을 제공한다. 그런 조성물은 다양한 완충액 성분(예를 들어, 트리스-HCl, 아세테이트, 포스페이트), pH 및 이온 강도의 희석제; 계면활성제 및 가용화제(예를 들어, 트윈 20, 트윈 80, 항-산화제(예를 들어, 아스코르브산, 소듐 메타비설파이트), 방부제(예를 들어, 트리머졸, 벤질 알코올) 및 벌킹 물질(예를 들어, 락토오즈, 만니톨)과 같은 첨가제; 폴리락틱산, 폴리글리콜산 등과 같은 폴리머 화합물의 미립자 제조물 내로 또는 리포솜 내로 그 물질의 통합하는 것을 포함한다. 히알루론산이 또한 사용될 수 있다. 그런 조성물은 물리적 상태, 안정성, 생체 내 방출 비율 및 본 발명의 단백질 및 유도체의 생체내 배제(clearance)에 영향을 끼칠 것이다. 예를 들어 참고자료로 여기에 통합된, 레밍턴의 약학 과학(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) pages 1435-1712)을 보라. 조성물은 액체 형태로 제조될 수 있고 건조된 분말(예를 들어 동결건조된) 형태로 제조될 수 있다.

- <154> 경구 전달
- <155> 경구적 고체 투여 형태가 여기의 용도로서 이해되고, 이는 일반적으로 레밍턴의 약학 과학(Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. 1990 (Mack Publishing Co. Easton PA 18042))의 챕터 89에 기재되어 있고, 이는 여기에 참고자료로 통합되어 있다. 고체 투여 형태는 정제, 캡슐, 필, 트로키 또는 로젠쥬, 캐체이(cachets), 펠릿, 분말 또는 과립을 포함한다. 또한, 리포솜의 또는 프로티노이드 캡슐화가 본 조성물을 제형화하는데 이용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,925,673호에서 보고된 프로티노이드 마이크로스피어와 같은 것이다).
- <156> 리포솜 캡슐화(Liposomal encapsulation)가 사용될 수 있고 그 리포솜은 다양한 폴리머로 유도체화된다(예를 들어, 미국 특허 번호 제5,013,556호). 치료제를 위한 가능한 고체 투여 형태에 대한 기재는 여기에 참고자료로써 통합된 다음에서 주어진다 (Marshall, K. In: Modern Pharmaceutics Edited by G.S. Banker and CT. Rhodes Chapter 10, 1979). 일반적으로, 제형은 EPO-R 작용제 펩타이드(또는 그것의 화학적으로 변형된 형태)를 포함할 것이고 위 환경에 대해 보호되도록 하는 성분을 삽입하고 창자에서 생물학적으로 활성 물질을 방출할 것이다.
- <157> 또한 여기에 용도로서 고려되는 것은 약학적으로 허용가능한 에멀전, 용액, 현탁액 및 시럽을 포함하는 경구 투여를 위한 액체 투여 형태로서 활성이 없는 희석제; 습윤제와 같은 어쥘런트, 에멀전화 및 현탁액제; 및 감미제, 향미제 및 향신제를 포함하는 다른 성분을 포함할 수 있다. 그 펩타이드는 화학적으로 변형하여 유도체의 경구 전달에 효과적일 수 있다.
- <158> 일반적으로, 고려되는 화학적 변형은 성분 분자 그 자체에 적어도 하나의 부분에 부착되는 것으로, 상기 부분은 (a) 단백질 가수분해의 저해; 및 (b) 위 또는 창자로부터 혈류로의 흡수가 가능하도록 한다. 또한 희망되는 것은 그 성분 또는 성분들의 경구적인 안정성의 증가 및 신체에서 순환시간의 증가이는 상기에서 논의된 것처럼, 페그화(PEGylation)는 약학적 용법을 위한 바람직한 화학적 변형이다. 사용될 수 있는 다른 부분은 다음을 포함한다: 프로필렌 글리콜, 에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜과의 공중합체, 카르복시메틸 셀룰로오즈, 텍스트란, 폴리비닐 알코올, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리프롤린, 폴리-1,3-디옥솔란 및 폴리-1,3,6-티오옥소칸(poly-1,3,6-tioxocane)[예를 들어, Abuchowsld and Davis (1981) "Soluble Polymer-Enzyme Adducts," in Enzymes as Drugs. Hocenberg and Roberts, eds. (Wiley-Interscience: New York, NY) pp. 367-383; and Newmark, et al. (1982) J. Appl. Biochem. 4:185-189을 보라].
- <159> 경구 제형을 위하여, 방출 위치는 위, 소장(십이지장, 공장(jejunem) 또는 회장(ileum)), 또는 대장일 수 있다. 당업자는 위에서 용해되지 않고 십이지장 또는 소장의 다른 곳에서 그 물질을 방출시키는 제형을 이용할 수 있다. 바람직하게, 방출은 펩타이드(또는 유도체)의 보호에 의해 또는 위 환경을 지나, 이를 테면 창자에서 펩타이드 (또는 유도체)를 방출함으로써 위 환경의 유독한 효과를 회피할 것이다.
- <160> 장 코팅으로서 이용되는 다른 일반적인 활성이 없는 성분들의 예들은 셀룰로오즈 아세테이트 트리멜리테이트(cellulose acetate trimellitate, CAT), 하이드록시프로필메틸셀룰로오즈 프탈레이트(hydroxypropylmethylcellulose phthalate, HPMCP), HPMCP 50, HPMCP 55, 폴리비닐 아세테이트 프탈레이트(polyvinyl acetate phthalate, PVAP), 유드라짓(Eudragit) L30D, 아쿠아테릭(Aquateric), 셀룰로오즈 아세테

이트 프탈레이트(cellulose acetate phthalate, CAP), 유드라짓 L, 유드라짓 S 및 셸락(Shella). 이들 코팅들은 혼합 필름으로서 이용될 수 있다. 코팅 또는 코팅 혼합은 위에 대한 보호가 의도되지 않는 정제로 또한 사용될 수 있다. 이것은 설탕 코팅 또는 정제를 더 삼키기 쉽게 만드는 코팅을 포함할 수 있다. 캡슐은 건조한 치료제(예를 들어, 분말)의 전달을 위해 딱딱한 껍질(이를 테면 겔라틴)로 구성될 수 있고, 액체 형태를 위해 부드러운 겔라틴 껍질이 사용될 수 있다. 카셰(cachets)의 껍질 물질은 두꺼운 녹말 또는 다른 식용가능한페이퍼가 될 수 있다. 필, 로젠지, 몰드 정제 또는 정제 가루(tablet triturates)를 위하여, 모이스트 매싱 기술(moist massing techniques)이 사용될 수 있다.

<161> 펠타이드(또는 유도체)는 과립 또는 약 1mm의 특정 크기의 펠릿 형태로 미세한 다미립자(multiparticulates)로서 제형에 포함될 수 있다. 캡슐 투여를 위한 물질의 제형은 또한 분말, 약하게 압출된 플러그(plugs) 또는 정제가 될 수 있다. 이들 치료제들은 압축에 의해 제주될 수 있다. 착색제 및/또는 향미제가 또한 포함될 수 있다. 예를 들어, 펠타이드(또는 유도체)가 (리포솜 또는 마이크로스피어 캡슐화에 의한 것처럼) 제형될 수 있고 식용에 알맞은 물체, 이를 테면 착색제 및 향미제가 함유된 냉장 음료내에 함유될 수 있다.

<162> 회석하거나 펠타이드(또는 유도체)의 부피를 화학적으로 활성이 없는 물질로 증가시킬 수 있다. 이들 회석제는 탄수화물, 특히 만니톨, α-락토오스, 무수 락토오스, 셀룰로오스, 수크로스, 변형된 덱스트란 및 전분을 포함할 수 있다. 특정 무기 염들이 충전제로서 사용될 수 있으며, 여기에는 칼슘 트리포스페이트, 마그네슘 카르보네이트 및 소듐 클로라이드가 포함될 수 있다. 몇몇 상업적으로 입수가 가능한 회석제들은 Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress 및 Avicell이다.

<163> 붕해제(Disintegrants)가 고체 투여 형태로서 치료적 제형에 포함될 수 있다. 붕해제로서 사용되는 물질은 전부 에 기초한 상업적인 붕해제를 포함하여 전분, 익스플로랩(Explotab)을 포함을 포함하나 여기에 제한되지 않는다. 소듐 전분 글리코레이트(Sodium starch glycolate), 엠벌라이트(Amberlite), 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 울트라밀로펙틴(ultramylpectin), 소듐 알지네이트(sodium alginate), 겔라틴, 오렌지 필, 산 카르복시메틸 셀룰로오스, 천연 해면(natural sponge) 및 벤토나이트(bentonite)이 모두 사용될 수 있다. 그 붕해제는 불용성 양이온 교환 수지일 수 있다. 분말화된 검이 붕해제로서 결합제(binders)로서 사용될 수 있고 아가, 카라야(Karaya) 또는 트래거칸스(tragacanth)와 같은 분말화된 검을 포함할 수 있고, 그것의 나트륨염이 또한 붕해제로서 유용하다.

<164> 결합제는 딱딱한 정제를 형성하기 위하여 펠타이드(또는 유도체) 제제를 서로 묶기 위하여 사용될 수 있고 아카시아, 트래거칸스, 전분 및 겔라틴과 같은 천연 물질로부터의 물질을 포함할 수 있다. 다른 것으로는 메틸 셀룰로오스(MC), 에틸 셀룰로오스(EC) 및 카르복실메틸 셀룰로오스(CMC)를 포함한다. 폴리비닐 피롤리돈(PVP) 및 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스(HPMC)는 그 펠타이드(또는 유도체)를 과립화하기 위하여 알콜 용액에서 사용될 수 있다.

<165> 윤활제(antifrictional agent)가 제형 공정 동안 끈적임을 방지하기 위하여 펠타이드(또는 유도체)의 제형에 포함될 수 있다. 윤활제(Lubricant)는 또한 펠타이드(또는 유도체)와 다이 벽면(die wall) 사이의 층으로 이용될 수 있고, 이들은 다음을 포함하지만 여기에 제한되지 않는다: 그것의 마그네슘 및 칼슘 염을 포함하는 스테아르산, 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE), 액체 파라핀, 채소 오일 및 왁스. 용해성 윤활제는 소듐 라우릴 설페이트(sodium lauryl sulfate), 마그네슘 라우릴 설페이트(magnesium lauryl sulfate), 다양한 분자량의 폴리에틸렌 글리콜, 카르보왁스(Carbowax) 4000 및 6000이 될 수 있다.

<166> 제형 동안 약물의 플로우 성질을 개선시키고 압축동안 재배열을 돕기위한 글라이던트(Glidants)가 첨가될 수 있다. 글라이던트는 전분, 탈크, 열분해 실리카 및 수소함유 실리코알루미네이트를 포함할 수 있다. 펠타이드(또는 유도체)의 승개 환경으로의 용해를 돕기위하여, 계면활성제가 습윤제로서 첨가될 수 있다. 계면활성제는 음이온 계면활성제, 이를 테면 소듐 라우릴 설페이트(sodium lauryl sulfate), 디옥틸 소듐 설퍼숙시네이트(dioctyl sodium sulfosuccinate) 및 디옥틸 소듐 설풀포네이트(dioctyl sodium sulfonate)를 포함할 수 있다. 양이온 계면활성제가 사용될 수 있으며, 여기에는 벤즈알코늄 클로라이드(benzalkonium chloride) 또는 벤즈에토포늄 클로라이드(benzethonium chloride)가 포함될 수 있다. 계면활성제로서 제형에 포함될 수 있는 가능한 비이온성 계면활성제의 목록은 라우로마크로골(lauromacrogol) 400, 폴리옥실 40, 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수산화된 피마자유 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 폴리소르베이트 20, 40, 60, 65 및 80, 수크로스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로오스 및 카르복실메틸 셀룰로오스이다. 이들 계면활성제들은 단독으로 또는 다른 비율로 혼합물로서 제형내에서 존재할 수 있다.

<167> 펠타이드(또는 유도체)의 흡수를 강화시키는 첨가제는 예를 들어 지방산, 올레산, 리놀레산 및 리놀렌산이다.

- <168> 제어 방출 경구 제형이 바람직하다. 펩타이드(또는 유도체)가 확산 또는 다공질 메카니즘(leaching mechanisms)에 의해 방출시키는 활성이 없는 매트릭스, 이를 테면 겔내로 도입될 수 있다. 천천히 축퇴하는 매트릭스가 제형내로 도입될 수 있다. 몇몇 장 코팅이 또한 지연된 방출 효과를 갖는다. 제어 방출의 다른 형태는 오로스 치료 시스템(Oros therapeutic system, Alza Corp.)에 기초한 방법에 의한 것으로서, 예를 들어 약물이 물이 들어오게 하여 삼투효과로 인하여 단일의 작은 열림을 통해 약물을 밖으로 밀어내는 반투성막 내에 포함된다.
- <169> 다른 코팅들이 제형을 위해 사용될 수 있다. 이들은 코팅 펜에 적용가능한 다양한 슈거들을 포함한다. 펩타이드(또는 유도체)는 필름 코팅된 정제에 주어질 수 있고, 이 예에서 사용된 물질은 2 그룹으로 나뉘어진다. 첫 번째 글부는 비장 물질(nonenteric materials)이고 메틸 셀룰로오스, 에틸 셀룰로오스, 하이드록시에틸 셀룰로오스, 메틸하이드록시-에틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필 셀룰로오스, 하이드로시프로필-메틸 셀룰로오스, 소듐 카르복시-메틸 셀룰로오스, 프로비돈(providone) 및 폴리에틸렌 글리콜을 포함한다. 두 번째 그룹은 프탈산의 일반적인 에스테르인 장 물질(enteric materials)로 구성된다.
- <170> 물질의 혼합은 최적 필름 코팅을 제공하기 위해 사용될 수 있다. 필름 코팅은 펜 코터(pan coater)에서 또는 유동체화된 베드에서 또는 압축 코팅에 의해 수행될 수 있다.
- <171> *비경구 전달*
- <172> 비경구 투여를 위해 본 발명에 따른 제조는 멸균 수성 또는 비수성 용액, 현탁액 또는 에멀전을 포함한다. 비수성 용액 또는 배히클의 예로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 채소 오일, 이를 테면 올리브유, 옥수수유, 젤라틴, 주사가능한 유기 에스테르, 이를 테면 에틸 올리에이트(ethyl oleate)이다. 그런 투여 형태는 또한 방부제, 유효제, 및 분산제와 같은 어쥬번트를 포함할 수 있다. 그들은 예를 들어 세균 보유 필터를 통한 여과에 의해, 조성물 내로 멸균제로의 통합시킴으로써, 그 조성물을 방사선을 조사함으로써, 또는 그 조성물을 가열함으로써 멸균할 수 있다. 그들은 또한 사용 직전에 멸균수 또는 몇몇 다른 멸균된 주사가능한 매개체를 이용하여 제조될 수 있다.
- <173> *직장 또는 질 전달*
- <174> 직장 또는 질 투여를 위한 조성물은 활성 물질에 추가로 코코아 버터 또는 좌약 왁스와 같은 부형제를 함유하는 좌약이 바람직하다.
- <175> 코 또는 허밀 투여를 위한 조성물은 또한 당업계에서 잘 알려진 표준 부형제로 제조된다.
- <176> *폐 전달(Pulmonary Delivery)*
- <177> 또한 여기에서 고려되는 것은 EPO-R 작용제 펩타이드(또는 그것의 유도체)의 폐 전달이다. 펩타이드(또는 유도체)는 흡입하는 동안 포유동물의 폐로 전달되어 혈류로 연결되는 폐의 상피를 가로지른다[예를 들어, Adjei, et al. (1990) *Pharmaceutical Research* 7:565-569; Adjei, et al. (1990) *Int. J. Pharmaceutics* 63:135-144 (leuprolide acetate); Braquet, et al. (1989) *J. Cardiovascular Pharmacology* 13(sup5):143-146 (endothelin-1); Hubbard, et al. (1989) *Annals of Internal Medicine*, Vol. 111, pp. 206-212 ( $\alpha$ 1-antitrypsin); Smith, et al. (1989) *J. Clin. Invest.* 84:1145-1146 ( $\alpha$ 1-proteinase); Oswein, et al. (1990) "Aerosolization of Proteins," *Proceedings of Symposium on Respiratory Drug Delivery II* Keystone, Colorado (recombinant human growth hormone); Debs, et al. (1988) *J. Immunol.* 140:3482-3488 (interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor  $\alpha$ ); 및 U.S. Pat. No. 5,284,656 to Platz, et al. (granulocyte colony stimulating factor)을 보라]. 전신 효과를 위한 약물의 폐 전달을 위한 방법 및 조성물은 Wong 등의 미국 특허 제5,451,569호에 기재되어 있다. 본 발명의 실시에서 사용되기 위해 고려되는 것은 치료물질의 폐 전달을 위해 설계된 다양한 범위의 기계적 장치이고, 흡입기, 계량된 도스 흡입기(metered dose inhalers) 및 분말 흡입기, 당업자에게 익숙한 모든것을 포함하지만 여기에 제한되지 않는다.
- <178> 본 발명의 실시에 적절한 몇몇 특이적인 상업적으로 입수가능한 장치의 예로는 울트라벳트 흡입기(the Ultravent nebulizer, Mallinckrodt Inc., St. Louis, MO); 아콘 II 흡입기(the Acorn II nebulizer, Marquest Medical Products, Englewood, CO); 벤톨린 계량 도스 흡입기(the Ventolin metered dose inhaler, Glaxo Inc., Research Triangle Park, NC); 및 스피너 분말 흡입기(the Spinhaler powder inhaler, Fisons Corp., Bedford, MA)이 있다.
- <179> 모든 그러한 장치들은 펩타이드(또는 유도체)의 조제에 적절한 제형의 이용이 요구된다. 통상적으로, 각 제형은 사용되는 장치의 타입에 특이적이고 보통 희석제, 어쥬번트 및/또는 치료에 유용한 담체에 추가로 적절한 추

진 물질의 이용에 관계될 수 있다. 또한, 리포솜, 마이크로캡슐 또는 마이크로스피어의 사용, 함유 복합체 또는 다른 타입의 담체들이 고려된다. 상업적으로 변형된 펩타이드가 또한 화학적 변형의 타입 또는 사용된 장치의 타입에 의존하여 다른 제형에서 제조될 수 있다.

- <180> 제트 또는 초음파 흡입기와 함께 사용하기에 적절한 제형들은 통상적으로 용액 mL 당 생물학적 활성 단백질의 약 0.1 내지 25mg의 농도로 용해되는 펩타이드(또는 유도체)를 포함할 것이다. 그 제형은 또한 완충액 및 단당(예를 들어 단백질 안정화 및 삼투압의 조절을 위해)을 포함할 수 있다. 흡입기 제형은 또한 에어로졸을 형성하는 용액의 원자화(atomization)에 의해 야기된 펩타이드(또는 유도체)의 표면 유도 응집을 감소하거나 방지하기 위하여 계면활성제를 포함할 수 있다.
- <181> 계량된-도스 흡입기 장치로 사용하기 위한 제형은 일반적으로 계면활성제의 원조로 추진체 내에 현탁된 펩타이드(또는 유도체)를 함유하는 미세하게 나뉜 분말을 포함한다. 이 추진체는 이 목적을 위해 사용되는 임의의 통상적인 물질이며, 이를 테면, 클로로플루오로카본, 히드로클로로플루오로카본 히드로플루오로카본 또는 히드로카본과 트리클로로플루오로메탄, 디클로로디플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄을 및 1,1,1,2-테트라플루오로에탄 또는 그들의 조합을 포함한다. 올레산이 또한 계면활성제로서 유용할 수 있다.
- <182> 분말 흡입기 장치로 분산시키기 위한 제형은 펩타이드(또는 유도체)를 함유하는 미세하게 분리된 건조 분말을 포함할 것이고, 그 장치로부터 분말의 분산을 유용하게 하는 양, 예를 들어, 제형의 무게에 대해 50 내지 90%의 양으로 락토오스, 솔비톨, 수크로스 또는 만니톨과 같은 차단제를 포함할 수 있다. 펩타이드(또는 유도체)는 먼 쪽 폐에 가장 효과적으로 전달하기 위하여 10mm(또는 마이크론) 미만의, 바람직하게 0.5 내지 5mm의 평균 입자 크기를 갖는 미립자 형태로 제조되는 것이 가장 유리하다.
- <183> 코 전달(Nasal Delivery)
- <184> EPO-R 작용제 펩타이드(또는 유도체)의 코 전달이 또한 고려된다. 코 전달은 폐에 물질을 침전시킬 필요 없이, 코로 치료 물질을 투여한 후에 펩타이드를 혈류까지 직접적으로 운반하도록 한다.
- <185> 코 전달을 위한 제형은 텍스트란 또는 시클로텍스트란을 갖는 것을 포함한다.
- <186> 코 전달을 유용하게 하는 다른 투과-강화제가 또한 본 발명의 펩타이드와 함께 사용되기 위해 고려된다(이를 테면 여기에 참고자료로서 전체로서 통합된, 2003년 12월 17일자에 출원된 국제 특허 공개 번호 제W0 2004056314 호에 기재되어 있다).
- <187> 단위 투여량
- <188> 모든 펩타이드 화합물을 위해, 다른 연구가 수행되는 것처럼, 다양한 환자들의 다양한 조건들의 치료를 위한 적절한 투여량 수준에 관한 정보들이 알려지고, 당업자는 치료 항목, 나이, 수용자의 일반적인 건강을 고려하여 적절한 투여량을 확인할 수 있다. 선택된 투여량은 바람직한 치료 효과, 투여 경로, 및 바람직한 치료 경과에 의존한다. 일반적으로 매일, 체중의 0.001 내지 10mg/kg의 투여량 수준으로 포유동물에게 투여된다. 일반적으로 정맥 주사 또는 주입을 위한 투여량이 더 적을 것이다. 투여 스케줄은 순환 반감기 및 사용된 제형에 따라 다양할 것이다.
- <189> 본 발명의 펩타이드(또는 그들의 유도체)는 하나 이상의 추가적 활성 성분 또는 약학적 조성물과 함께 투여될 것이다.

**실시예**

- <193> 본 발명은 하기의 실시예들에 의해 기재된다. 그러나, 본 명세서에 있는 이들의 용도 및 다른 실시예들은 오직 설명하기 위한 것이고, 본 발명의 또는 임의의 예시적 형태의 범위 및 의미를 제한하는 것은 아니다. 게다가, 본 발명은 여기에 기재된 임의의 특정 바람직한 구체예에 제한되는 것은 아니다.
- <194> 진정, 본 발명의 많은 변형들 및 변화들이 본 명세서를 읽었을 때 당업자에게 명백해질 것이고, 그것의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 만들어질 수 있다. 그러므로 본 발명은 청구항에서 권리가 주어진 전체 범위의 등가물과 함께 청구항에 의해 오직 제한된다.
- <195> 열거된 실시예들은 당업자에 의한 본 발명의 펩타이드의 생물학적 활성을 확인한 실험들을 기재하고 있다.
- <196> **실시예 1: EPO-R 작용제 펩타이드의 합성**
- <197> 이 실시예는 본 발명에 의해 포함되는 펩타이드를 합성할 수 있는 방법의 바람직한, 비-제한적 구체예를 기재하

고 있다. 그러나, EPO 펩타이드 부분의 합성을 위해 이미 기재된 다른 방법들(예를 들어 2004년 5월 12일자에 출원된 PCT/US04/14886을 보라)이 또한 본 발명의 화합물을 제조하는데 이용될 수 있다.

<198> 고체상 기술이 본 발명의 펩타이드 모노머 및 다이머를 합성하는데 제공된다. 본 발명의 펩타이드 화합물에 링커 및 PEG 부분의 부착을 위한 예시적인 기술들이 또한 기재되어 있고, 뿐만 아니라 펩타이드 화합물의 산화 방법, 예를 들어 분자내의 이황화 결합을 형성하는 방법들이 기재되어 있다. 마지막으로, 이 실시예는 또한 이들 방법에 따라 합성된 펩타이드 화합물을 정제하는 기술을 제공한다.

<199> 1. 펩타이드 모노머 합성

<200> 본 발명의 다양한 펩타이드 모노머가 여기에 기재된 것처럼 어플라이드 바이오시스템 433A 자동화된 기구 (Applied Biosystems 433 A automated instrument) 상에서 메리필드 고체상 합성 기술(Merrifield solid phase synthesis technique) [Stewart and Young. Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd edition (Pierce Chemical, Rockford, IL) 1984을 보라]을 이용하여 합성될 수 있다. 수지 PAL(Milligen/Biosearch)이 사용되고, 이는 5-(4'-Fmoc-아미노메틸-3,5'-디메톡시페녹시)말레르산으로 가교된 폴리스티렌이다. PAL 수지의 이용은 수지로부터 펩타이드를 분해할 때 카르복시 말단의 아미드 기능을 초래한다. 아미노산에서의 첫 번째 아민 보호는 Fmoc로 성취되고, 측쇄 보호기는 세린, 트레오닌 및 티로신 하이드록실을 위한 t-부틸; 글루타민과 아스파라긴 아미드를 위한 트리틸; 시스테인을 위한 Trt 또는 Acn; 및 아르기닌 구아니디노기를 위한 PMC(2,2,5,7,8-펜타메틸크로만 설포네이트)이다. 각 커플링은 BOP(benzotriazolyl N-oxtrisdimethylaminophosphonium hexafluorophosphate)와 HOBT (1-hydroxybenzotriazole)로 1시간 또는 2시간동안 수행된다. 아미드화 카르복시 말단을 갖는 펩타이드의 합성을 위해, 완전히 조립된 펩타이드는 90% 트리플루오로아세트산, 5% 에탄디티올 및 5% 물의 혼합물로 1.5시간 동안 초기에 40°C 및 점진적으로 실온으로 증가시켜 분해하였다. 이 보호되지 않은 산물은 수지로 채워지고 디에틸 에테르로 침전된다. 완전한 건조 후에, 산물은 0.1% 트리플루오로아세트산에서 아세트ونی트릴/물의 구배로 C18 역상 고성능 액체 크로마토그래피로 정제된다.

<201> 2. 펩타이드 다이머 합성

<202> 본 발명의 다양한 펩타이드 다이머가 다양한 고체상 기술에서 리신 링커상에서 직접적으로 합성된다.

<203> 두 개의 펩타이드 체인의 동시 합성을 위해, Fmoc-Lys(Fmoc)-OH이 PAL 수지(Milligen/Biosearch)에 결합되고, 그것에 의해 합성되는 두 개의 체인 사이의 링커로서 이용되는 초기 리신 잔기를 제공한다. Fmoc 보호기는 약염기(DMF에서 20% 피페리딘)로 제거되고, 펩타이드 체인은 출발점으로서 생성된 유리 아미노기를 이용하여 합성된다. 펩타이드 체인 합성은 상기 기재된 고체상 합성 기술을 이용하여 수행된다. Trt는 모든 시스테인 잔기를 보호하기 위해 사용된다. 다이머 탈보호(deprotection), 수지로부터 분해 및 정제를 수행하고, 시스테인 잔기의 산화는 50 내지 250°C에서 2-3일 동안 100% DMSO에서 탈보호된 다이머를 배양함으로써 수행된다. 이 산화 반응은 두 개의 분자 내 이황화 결합을 갖는 다이머를 우세하게(>75%) 획득할 수 있다. 두 개의 펩타이드 체인의 연속적 합성을 위해, Fmoc-Lys(Alloc)-OH을 PAL 수지(Milligen/Biosearch)에 결합시키고, 그것에 의해 합성되는 두 개의 체인 사이에 링커로서 작용하는 초기 리신 잔기가 제공된다. Fmoc 보호기는 약염기(DMF에서 20% 피페리딘)로 제거된다. 첫 번째 펩타이드 체인은 출발점으로서 초래된 유리 아미노기를 이용하여 합성된다. 펩타이드 합성은 상기 기재된 고체상 기술을 이용하여 수행된다. 첫 번째 체인의 두 개의 시스테인 잔기는 Trt로 보호된다. 첫 번째 펩타이드 체인의 합성 후에, Alloc 기는 Pd[P(C6H5)3]4, 4-메틸 모르폴린 및 클로로포름을 갖는 지지체-결합된 리신 링커로부터 제거된다. 두 번째 펩타이드 체인은 이 때 이 두 번째 유리 아미노기 상에서 합성된다. 두 번째 체인의 두 개의 시스테인 잔기는 Acn으로 보호된다. 분자 내의 이황화 결합이 첫 번째 펩타이드 체인에서 트리플루오로아세트산을 이용한 Trt 보호기를 제거하고 20% DMSO에서 하룻밤 동안 교반에 의한 산화를 통해 형성된다. 분자 내의 이황화 결합은 Acn 보호기의 제거와 이오딘, 메탄올, 및 탈륨 트리플루오로아세테이트를 이용한 탈보호된 시스테인 잔기를 산화를 동시에 함으로써 두 번째 펩타이드 체인에서 형성된다.

<204> 3. 스페이서의 부착

<205> 스페이서가 아미노산(예를 들어, 글리신 또는 리신)인 경우, 스페이서는 고체상 펩타이드 합성 동안 펩타이드 내로 통합된다. 이 경우에, 스페이서 아미노산은 PAL 수지와 결합되고, 그것의 유리 아미노기는 다른 스페이서 아미노산 또는 리신 링커의 부착을 위한 기초로서 이용될 수 있다. 리신 링커의 부착 후에 다이머 펩타이드가 상기 기재된 것처럼 합성된다.

<206> 4. 분자 내 이황화 결합을 형성하기 위한 펩타이드의 산화

<207> 펩타이드 다이머는 20% DMSO/물(1mg 건조 중량 펩타이드/mL)에서 용해시키고 36시간 동안 실온에 두었다. 펩타

이드는 C18 HPLC 컬럼 (Waters Delta-Pak C18, 15 마이크론 입자 크기, 300 옹스트롬 기공 크기, 40 mm x 200 mm 길이) 상에 반응 혼합물을 로딩시켜 정제하고, 선형 ACN/물/0.01% TFA 구배에서 5 내지 95% ACN으로 40분 동안 수행하였다. 희망 펩타이드를 함유한 분획의 라이오폴리제이션(Lyophilization)이 복슬한 흰 고체로서 산물을 제공한다.

<208> 5. 펩타이드의 페그화(PEGylation)

<209> 본 발명 펩타이드의 페그화는 몇가지 다른 기술을 이용하여 수행할 수 있다.

<210> **말단의 -NH<sub>2</sub> 기의 페그화:** 펩타이드 다이머는 청명한 용액을 제공하기 위하여 건조 DMF에서 활성화된 PEG 중 (NOF Corp. Japan의 mPEG-NPC)의 1.5 eq (몰 기준)으로 혼합된다. 5분 후에, DIEA의 4eq를 상기 용액에 첨가한다. 그 혼합물은 대기 온도에서 14시간 동안 교반하고, C18 역상 HPLC로 정제한다. 페그화된 펩타이드의 구조는 MALDI 매스에 의해 확인된다. 정제된 펩타이드는 또한 하기 기재한 것처럼 양이온 교환 크로마토그래피를 통해 정제를 수행한다.

<211> **펩타이드 다이머의 N-말단의 디페그화:** 펩타이드 다이머는 청명한 용액을 제공하기 위하여 건조 DMF에서 활성화된 PEG 중(NOF Corp. Japan의 mPEG-NPC)의 2.5 eq (몰 기준)으로 혼합된다. 5분 후에, DIEA의 4eq를 상기 용액에 첨가한다. 그 혼합물은 대기 온도에서 14시간 동안 교반하고, C18 역상 HPLC로 정제한다. 정제된 펩타이드는 또한 하기 기재한 것처럼 양이온 교환 크로마토그래피를 통해 정제를 수행한다.

<212> **N-말단의 페그화를 통한 펩타이드 다이머화:** 펩타이드(2.5 eq.) 및 PEG-(SP A-NHS)<sub>2</sub> (1 eq., Shearwater Corp, USA.)를 청명한 용액을 주기위하여 0.25M에서 건조 DMF에서 용해시킨다. 5분 후에, DIEA의 10eq.를 상기 용액에 첨가한다. 혼합물은 2시간 동안 대기 온도에서 교반하고 C18 역상 HPLC로 정제한다. 정제된 펩타이드는 또한 하기 기재한 것처럼 양이온 교환 크로마토그래피를 통해 정제를 수행한다.

<213> **C-말단의 페그화를 통한 펩타이드 다이머화:** 펩타이드(2.5 eq.) 및 PEG-(SP A-NHS)<sub>2</sub> (1 eq., Shearwater Corp, USA.)를 청명한 용액을 주기위하여 0.25M에서 건조 DMF에서 용해시킨다. 5분 후에, DIEA의 10eq.를 상기 용액에 첨가한다. 혼합물은 2시간 동안 대기 온도에서 교반하고 C18 역상 HPLC로 정제한다. 정제된 펩타이드는 또한 하기 기재한 것처럼 양이온 교환 크로마토그래피를 통해 정제를 수행한다.

<214> 6. 펩타이드의 이온 교환 정제

<215> 몇가지 교환 지지체가 반응하지 않은(또는 가수분해된 PEG)로부터 상기 펩타이드-PEG 접합체를 분리하기 위하여 그들의 능력이 검사될 수 있고, 추가로 출발 다이머 펩타이드를 보유하는 능력 역시 검사될 수 있다. 이온 교환 수지(2-3 g)는 1cm 컬럼에 로드시키고, 염 형태(용출제가 pH 14, ca. 5 컬럼 부피가 될때까지 컬럼 상에서 0.2N NaOH를 로드시켰다)로 전환시키고, 그리고 수소 형태(조정된 용출제가 pH, ca. 5 컬럼 부피로 로드될 때까지 0.1 N HCl 또는 0.1 M HOAc로 용출시켰다), pH 6이 될때까지 25% ACN/물로 세척하였다. 접합되기 전의 펩타이드 또는 펩타이드-PEG 접합체는 25% ACN/물(10 mg/mL)로 세척하고 pH는 TFA로 <3이 되도록 조정하고 컬럼에 로드시켰다. 25% ACN/물의 2-3 컬럼 부피로 세척하고 5mL 분획을 수집한 후에, 펩타이드는 25% ACN/물에서 0.1 M NH<sub>4</sub>OAc로 용출시켜 컬럼으로부터 유리시키고, 다시 5mL 분획을 수집하였다. HPLC를 통한 분석은 어느 분획이 목적 펩타이드를 함유하고 있는지를 알 수 있다. ELSD(Evaporative Light- Scattering Detector)로의 분석은 펩타이드가 컬럼에 보유되어 있고 NH<sub>4</sub>OAc 용액으로 용출될 때(일반적으로 분획 4와 10 사이), 비-접합된 PEG가 오염물질로서 관찰되지 않음을 보여준다. 펩타이드가 초기 세척 버퍼에서 용출될 때(일반적으로 첫 번째 2 분획), 목적 PEG-접합체 및 초과 PEG의 분리가 관측될 수 없다.

<216> 다음 컬럼들은 가능한한 성공적으로 펩타이드와 펩타이드-PEG 접합체를 보유할 수 있고 비접합된 펩타이드로부터 펩타이드-PEG 접합체를 성공적으로 정제할 수 있다:

<217> 이온 교환 수지

지지체	소스
모노 S HR 5/5 강 양이온 교환 프리-로드된 컬럼	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England)
SE53 셀룰로오스, 마이크로과립 강 양이온 교환 지지체	Whatman (Middlesex, UK)
SP 세파로스 패스트 플로우 강 양이온 교환 지지체	Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England)

<219> **실시예 2: 시험관 내 활성 분석**

<220> 이 실시예는 본 발명에 의해 포함되는 펩타이드, 예를 들어 EPO-R 작용제의 활성 및 효능을 평가하기에 유용한 시험관내 분석을 기재한다. 특히, 여기에 기재된 것처럼 이 분석으로부터 획득한 결과는 펩타이드 화합물이 EPO-R에 결합하는지, EPO-R 시그널을 활성화시키지는 여부를 증명한다. 그 분석은 또한 화합물의 결합 효율 및 생물학적 활성을 예를 들어 다른 알려진 EPO 모방 화합물과 비교하기 위해 사용될 수 있다.

<221> 이 분석에서 테스트된 EPO-R 작용제 펩타이드 모노머 및 다이머는 통상적으로 실시예 1에서 기재된 방법에 따라 준비된다. 이들 펩타이드 모노머 및 다이머의 효능을 다음의 시험관내 활성 분석의 시리즈를 이용하여 평가하였다: 레포터 분석, 증식 분석, 경쟁적 결합 분석 및 C/BFU-e 분석. 이들 네 가지 분석은 하기에서 자세하게 기재한다.

<222> 1. 리포터 분석(Reporter assay)

<223> 이 분석은 리포터 세포에서 유래된 쥐의 프리-B-세포주, Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux에 기초한다. 이 리포터 세포주는 인간 GCSF 리포터의 세포 내 부분에 인간 EPO 리포너의 세포 외부의 부분을 포함하는 키메라 리포터를 발현한다. 이 세포주는 또한 fos 프로모터-작동 루시페라아제 리포터 유전자 구조물로 트랜스펙트된다. 이 키메라 리포터의 에리트로포이에틴제의 첨가를 통한 활성화는 루시페라아제 리포터 유전자의 발현을 초래하고, 그러므로 루시페라아제 기질인 루시페린을 첨가할 때 빛이 생산된다. 그러므로, 그런 세포에서 EPO-R 활성의 수준은 루시페라아제 활성을 측정함으로써 정량화될 수 있다.

<224> Baf3/EpoR/GCSFR fos/lux 세포는 10% FBS(fetal bovine serum; Hyclone), 10% WEHI-3 상청액(WEHI-3 세포의 배양으로부터의 상청액, ATCC # TIB-68), 및 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 DMEM/F12 배지 (Gibco)에서 배양하였다. 그 분석의 약 18시간 전에, 세포들은 10% FBS 및 0.1% WEHI-3 상청액으로 보충된 DMEM/F12 배지로 계대함으로써 결핍시켰다. 분석 당일에, 세포들은 10% FBS(WEHI-3 상청액이 불포함)으로 보충된 DMEM/F12 배지로 한 번 세척되고,  $1 \times 10^6$  cells/mL이 알려진 농도의 테스트 펩타이드의 존재 하에서, 또는 양성 대조군으로서 EPO (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN)과 함께, 10% FBS(WEHI-3 상청액이 불포함)으로 보충된 DMEM/F12 배지에서 배양되었다. 테스트 펩타이드의 연속적 희석액이 이 분석에서 동시에 시험되었다. 분석 플레이트는 5% CO<sub>2</sub> 대기에서 37°C에서 4시간 동안 배양되고, 루시페린(Steady-Glo; Promega, Madison, WI)이 각 웰에 첨가되었다. 5 분의 배양 후에, 빛 방출을 Packard Topcount Luminometer (Packard Instrument Co., Downers Grove, 111.) 상에서 측정하였다. 빛 카운트는 테스트 펩타이드 농도에 상대적으로 기록되었고 Graph Pad software를 이용하여 분석되었다. 빛의 최고 방출의 반을 초래하는 테스트 펩타이드의 농도는 EC50으로 기록된다.

<225> 2. 증식 분석

<226> 이 분석은 쥐의 프리-B-세포주, Baf3에 기초한 것으로서, 이것은 인간 EPO-R을 발현하도록 트랜스펙트된 것이다. 초래된 세포주, BaF3/Ga14/E1k/EPOR,의 증식은 EPO-R 활성화에 의존한다. 세포 증식의 정도는 MTT를 이용하여 정량화하였고, MTT 분석에서의 시그널은 생존 세포의 수에 비례한다. BaF3/Ga14/E1k/EPOR 세포는 10% FBS(Hyclone)와 2% WEHI-3 상청액(ATCC # TIB-68)로 보충된 DMEM/F12 배지 (Gibco)에서 스피너 플라스크에서 배양되었다. 배양된 세포는  $1 \times 10^6$  cells/ml의 세포 농도에서 스피너 플라스크에서, 10% FBS와 0.1% WEHI-3 상청액으로 보충된 DMEM/F12 배지에서, 하룻밤 동안 결핍시켰다. 결핍된 세포들은 그 때 돌베코의 PBS(Dulbecco's PBS, Gibco)로 두 번 세척하고, 10% FBS(WEHI-3 상청액은 불포함)으로 보충된 DMEM/F12 에서  $1 \times 10^6$  cells/ml의 밀도로 재현탁되었다. 그 세포 현탁액의 50 µL aliquots (-50,000 세포)를 96 웰 분석 플레이트에서 3배로 평균 배양하였다. 10% FBS (WEHI-3 상청액은 불포함)으로 보충된 DMEM/F12 에서 테스트 EPO 유사 펩타이드의 희석액 시리즈의 50 µL aliquots, 또는 50 µL EPO (R & D Systems Inc., Minneapolis, MN) 또는 Aranesp™ (다르베포이에틴 알파(darbepoetin alpha), Amsen에서 상업적으로 입수가 가능한 ERO-R 작용제)이 그 96 웰 분석 플레이트에 첨가된다(최종 웰 부피 100 µL). 예를 들어, 12개의 다른 희석액은 테스트 펩타이드(또는 대조군 EPO 펩타이드)의 최종 농도가 810pM 내지 0.0045pM의 범위인 경우에 테스트될 수 있다. 그 평균배양된 세포는 37°C에서 48 시간 동안 배양되었다. 그 다음, MTT (Roche Diagnostics)의 10 µL를 각 배양 디쉬 웰에 첨가하고, 4시간 동안 배양하였다. 이 반응은 10% SDS + 0.01N HCl을 첨가함으로써 종료된다. 그 플레이트는 그때 37°C 에서 하룻밤 동안 배양되었다. 각 웰의 595nm 파장에서의 흡수를 분광광도계(spectrophotometry)로 측정하였다. 임혀진 흡수

도 대 테스트 펩타이드 농도의 점을 그리고 Graph Pad software를 이용하여 EC50을 계산하였다. 최고 흡수의 반을 초래하는 테스트 펩타이드의 농도는 EC50으로 기록된다.

<227> 3. 경쟁적 결합 분석

<228> 경쟁적 결합 계산은 빛 시그널이 두 개 비즈의 접근성에 대한 기능으로서 생성되는 분석을 통해 수행되었다: 비오틴 결합된 EPO-R- 결합 펩타이드 트래이서를 함유하는 스트랩타비딘 도너 비즈 및 EPO-R이 결합된 수용체 비즈. 일중항 산소(singlet oxygen)가 조명시에 첫 번째 비즈로부터 유리되고 두 번째 비즈가 빛을 방출하도록 야기시키는 유리된 일중항 산소와 접촉하는 동안 빛은 비-방사능 에너지 트랜스퍼에 의해 생성된다. 이들 비즈 세트는 상업적으로 입수할 수 있다(Packard). 비즈 접근성(Bead proximity)은 EPO-R에 EPO-R 결합 펩타이드 트래이서의 결합에 의해 생성된다. EPO-R 결합을 위해 EPO-R-결합 펩타이드 트래이서와 경쟁하는 테스트 펩타이드는 이 결합을 방해하여 빛 방출의 감소를 야기시킬 것이다.

<229> 좀더 상세한 방법은 다음과 같다: 테스트 EPO-R 작용제 펩타이드, 또는 양성 또는 음성 대조군의 연속적 희석액의 4 μL을 384 웰 플레이트에 첨가한다. 그 이후에 수용체/비즈 각테일의 2 μL /웰을 첨가한다. 수용체 비즈 각테일은 다음으로 구성된다: 5mg/ml 스트랩타비딘 도너 비즈(Packard)의 15 μL, 5mg/ml 모노클로날 항체 ab179의 15 μL(이 항체는 재조합 EPO-R에 함유된 인간 태반 알칼라인 포스포타아제 단백질의 부분을 인식한다), 단백질-A 코팅된 수용체 비즈(단백질 A가 ab179 항체(Packard)에 결합할 것이다), 재조합 EPO-R의 1:6.6 희석액의 112.5 μL(ab179 표적 에피토프를 함유하는 인간 태반 알칼라인 포스포타아제 단백질의 부분으로의 융합 단백질로서 중국 햄스터 난소 세포에서 생산된 것임) 및 Alphaquest 버퍼(40mM HEPES, pH 7.4; 1mM MgCl2; 0.1% BSA, 0.05% Tween 20)의 607.5 μL. 혼합물을 툭툭 친다. 비오틴 결합된 EPO-R-결합 펩타이드 트래이서의 2 μL/웰을 첨가한다.

<230> 그 혼합물을 1분 원심분리한다. Packard Top Seal로 플레이트를 봉하고 호일로 감싼다. 실온에서 하룻밤 동안 배양한다. 18시간 후에 AlphaQuest 리더(Packard)를 이용하여 빛 방출을 읽는다. 빛 방출 대 펩타이드의 농도를 기입하고 Graph Pad 또는 엑셀로 분석한다. 빛 방출에서 테스트 펩타이드 없이 관측된 것에 대하여 50% 감소된 테스트 펩타이드의 농도는 IC50으로 기록된다.

<231> 4. C/BFU-e 분석

<232> EPO-R 시그널은 골수 줄기세포의 증식하는 적혈구 세포 전구체로의 분화를 자극한다. 이 분석은 최초의 인간 골수 다전능 줄기 세포(primary human bone marrow pluripotent stem cells)로부터 적혈구 세포 전구체의 증식 및 분화를 자극하는 테스트 펩타이드의 능력을 측정한다.

<233> 이 분석을 위하여, 테스트 펩타이드의 연속적 희석액을 10% FBS(Hyclone)로 보충된 IMDM 배지(Gibco)에서 만들었다. 이들 연속적 희석액, 또는 양성 대조군 EPO 펩타이드는 1.5mL의 최종 부피로 만들기 위하여 메틸셀룰로오스에 첨가되었다. 메틸셀룰로오스 및 펩타이드 혼합물은 완전히 볼텍스하였다.

<234> 인간의 Aliquots (100,000 cells/mL), CD34+ 세포(Poietics/Cambrex)로부터 유래된 골수를 녹였다. 녹여진 세포는 50ml 튜브에서 1mg/ml DNase (줄기세포)의 0.1mL에 첨가되었다. 다음, 40-50 mL MDM 배지가 세포에 첨가된다: 그 배지는 최초 10mL 동안 50mL 튜브의 측면을 따라 방울로 첨가하고, 배지의 잔존 부피는 천천히 튜브의 측면을 따라 흘러넣었다. 그 세포들은 20분동안 900rpm에서 원심분리되고, 그 배지는 흡인에 의해 조심스럽게 제거되었다. 세포들은 IMDM 배지 1mL에서 재현탁되고 mL 당 세포 밀도는 헤마사이토미터 슬라이드(슬라이드 상에서 세포 현탁액의 10 μL aliquot, 및 세포 밀도는 평균 계수 X 10,000 cells/ml이다) 상에서 계수되었다. 그 세포들은 15,000 cells/mL의 세포밀도가 되도록 IMDM 배지에서 희석되었다. 희석된 세포의 100 μL가 각 1.5mL 메틸셀룰로오스 첨가된 펩타이드 샘플에 첨가되고(분석 배지에서 최종 세포 농도는 1000 cells/ mL이다), 그 혼합물은 볼텍스되었다. 혼합물에서 거품을 사라지게 하고, 무딘-끝 바늘을 이용하여 1mL를 흡인하였다. 각 샘플로부터 흡인된 혼합물 0.25mL를 24-웰 플레이트(Falcon brand)의 4 웰 각각에 첨가한다. 그 플레이트된 혼합물은 14일 동안 습한 배양기에서 5% CO<sub>2</sub>하, 37°C에서 배양한다. 상 현미경(5X-10X 대물렌즈, 최종 100X 확대)를 이용하여 에리트로이드(erythroid) 콜로니의 존재를 계수한다. 형성된 콜로니의 숫자가 최고 90%인 테스트 펩타이드의 농도는 EPO 양성 대조군에서 관측된 것에 비하여 EC90으로 기록된다.

<235> 5. 방사능리간드 경쟁적 결합 분석(Radioligand Competitive Binding Assay)

<236> 추가적인 방사능리간드(radioligand) 경쟁 결합 분석이 본 발명의 펩타이드를 위한 IC50 수치를 측정하는데 이 용될 수 있다. 이 분석은 <sup>125</sup>I-EPO의 EPOr에 대한 결합을 측정한다. 이 분석은 다음 실험 프로토콜에 따라 수행

된다.

A. 물질

<237>

<238>

재조합 인간 EPO R/Fc 키메라	· 동정: 재조합 인간 EPO R/Fc 키메라 · 공급자: R&D Systems(Mineapolis, US) · 카탈로그 번호: 963-ER · Lot 번호: EOK033071 · 저장: 4℃
요오드화 재조합 인간 에리트로포이에틴	· 동정: (3[ <sup>125</sup> I]이도티로실)에리트로포이에틴, 인간 재조합체, 고티적 활성, 370kBq, 10 μCi · 공급자: Amersham Biosciences (Piscataway, Nj, US) · 카탈로그 번호: IM219-10 μCi · Lot 번호: · 저장: 4℃
단백질-G 세파로스	· 동정: 단백질 G-세파로스 4 페스트 플로우 · 공급자: Amersham Biosciences (Piscataway, Nj, US) · 카탈로그 번호: 7-0618-01 · Lot 번호: · 저장: 4℃
분석 버퍼	· PBS(phosphate buffered saline), pH 7.4, 0.1% 소혈청 알부민 및 0.1% 소듐 아자이드 포함 · 저장: 4℃

<239>

B. 적절한 수용체 농도의 결정

<240>

인간 IgG1의 Fc 부분에 융합된 동결건조된 재조합체 EPOR 세포의 도메인의 하나의 50 μg 유리병을 1mL의 분석 버퍼로 재구성된다. 분석에 사용하기 위한 수용체의 정확한 양을 측정하기 위하여 이 수용체 제조물의 100 μL 연속적 희석액을 12 x 75 mm 폴리프로필렌 테스트 튜브에서 요오드화된 재조합 인간 에리트로포이에틴(<sup>125</sup>I-EPO)의 200 μL에서 대략 20,000 cpm과 결합시킨다. 튜브들은 캡을 씌우고 LabQuake 회전 교반기 상에서 하룻밤 동안 4℃에서 부드럽게 혼합된다.

<241>

그 다음 날, 단백질 G-세파로스의 50% 슬러리의 50 μL를 각 튜브에 첨가한다. 튜브는 부드럽게 혼합시켜 4℃에서 2 시간동안 배양하였다. 이 튜브는 단백질-G 세파로스를 펠릿시키기 위하여 4000 RPM (3297 x G)에서 15분 동안 원심분리시켰다. 그 상청액은 조심스럽게 제거하여 버렸다. 4℃ 분석 버퍼의 1mL로 3회 세척한 후에, 펠릿들은 Wallac Wizard gamma 계수기로 계수하였다. 그 결과를 분석하고 최고 결합 수치의 50%에 도달하는데 요구되는 희석도를 계산하였다.

<242>

C. 펩타이드를 위한 IC<sub>50</sub> 결정

<243>

본 발명의 펩타이드의 IC<sub>50</sub>을 결정하기 위하여, 펩타이드의 연속적 희석액의 100 μL를 12 x 75 mm 폴리프로필렌 테스트 튜브에서 재조합체 에리트로포이에틴 수용체(100 pg/tube)의 100 μL와 결합시킨다. 이때 요오드화된 인간 에리트로포이에틴(<sup>125</sup>I-EPO)의 100 μL는 각 튜브에 첨가하고, 그 튜브는 캡을 씌운 뒤 하룻밤동안 4℃에서 혼합시켰다. 그 다음날, 결합된 <sup>125</sup>I-EPO를 상기 기재한 것처럼 정량화한다. 그 결과를 분석하고 GraphPad Software, Inc. (San Diego, CA)의 Graphpad Prism version 4.0을 이용하여 IC50 수치를 계산하였다. 그 분석은 각 펩타이드에 대하여 2번 이상 반복하는 것이 바람직하고, 그것의 IC50 수치는 이 과정에 의해 측정되고, 총 3회 반복하여 IC50을 결정한다.

<244>

실시예 3. 생체 내(In vivo) 활성 분석

<245>

이 실시예는 본 발명에 의해 포함되는 펩타이드, 예를 들어 EPO-R 작용제의 활성 및 효능을 평가하는데 유용한 생체 내 분석을 기재한다. 특히, 여기에 기재된 것처럼 이 분석으로부터 획득한 결과는 펩타이드 화합물이 EPO-

R에 결합하는지, EPO-R 시그널을 활성화시키지는 여부를 증명한다. 이 분석은 또한 화합물의 결합 효능 및 생물학적 활성을 다른 것, 예를 들어 알려진 EPO 모방 화합물과 비교하는데 이용될 수 있다.

<246> 이 실시예는 본 발명의 EPO-R 작용제 펩타이드의 활성 및 효능을 평가하는데 유용한 다양한 생체내 분석을 기재한다. 이 분석에서 테스트된 EPO-R 작용제 펩타이드 모노머 및 다이머는 통상적으로 실시예 1에서 기재된 방법에 따라 제조된다. 이들 펩타이드 모노머 및 다이머의 생체내 활성은 다음의 시리즈 분석을 통해 평가된다: 폴리사이테믹 엑스하이포식 쥐 바이오어세이(polycythemic exhyoxic mouse bioassay) 및 세망 적혈구 (reticulocyte) 분석이다. 이들 두가지 분석은 하기에서 상세하게 기재된다.

<247> 1. 적혈구증가적 엑스하이포식 마우스의 바이오분석(polycythemic exhyoxic mouse bioassay)

<248> 테스트 펩타이드는 Cotes and Bangham(Nature 191: 1065-1067, 1961)에 기재된 방법에 채택된 적혈구증가적 exhyoxic 마우스 바이오분석에서 생체내 활성을 분석하였다. 이 분석은 EPO 모방체로서의 기능에 대한 테스트 펩타이드의 능력을 시험한다: 예를 들어 EPO-R 활성화 및 새로운 적혈구 세포 합성의 유도. 적혈구 세포합성은 합성된 적혈구 세포의 헤모글로빈 내로 방사능표지된 철의 통합에 기초하여 정량화된다.

<249> BDF1 마우스는 대기압 조건에서 7-10일 동안 순응시킨다. 모든 동물에 대하여 체중을 측정하고, 저체중 동물 (<15g)은 사용하지 않았다. 마우스는 총 14일 동안 저압 챔버에서 연속 조건 사이클하에 두었다. 각 14시간 사이클은 0.40±0.02% 대기압에서 18시간, 대기압에서 6시간으로 구성된다. 그 조건 이후에, 마우스는 사용하기 전에 추가로 72시간 동안 대기압 상태로 유지시켰다.

<250> 테스트 펩타이드 또는 제조합 인간 EPO 표준을 PBS + 0.1% BSA 베킵클(PBS/BSA)에서 희석시켰다. 펩타이드 모노머 스톡 용액은 DMSO(dimethyl sulfoxide)에서 처음으로 용해시켰다.

<251> 음성 대조군은 오직 PBS/BSA으로 주사된 마우스의 한 그룹과 1% DMSO로 주사된 다른 한 그룹을 포함한다. 각 투여 그룹은 10마리의 마우스를 포함한다. 마우스들은 적절한 샘플 0.5mL로 피하조직(목의 목덜미)으로 주사되었다

<252> 샘플 주사 후 48시간 후에, 마우스들은 약 0.75  $\mu$ Curies/mouse의 투여량을 위해, 0.2 ml 의 Fe<sup>59</sup> (Dupont, NEN)로 복막내 주사로 투여한다. 마우스 체중은 Fe<sup>59</sup> 투여 24시간 후에 측정하였고, 마우스들은 Fe<sup>59</sup> 투여 후 48시간 동안 희생시켰다. 혈액을 심장 뚫기(cardiac puncture)에 의해 각 동물로부터 수집하고 헤마토크릿을 측정하였다(헤파인은 항응고제로 사용하였다). 각 혈액 샘플(0.2mL)는 Packard gamma 계수기를 이용하여 Fe<sup>59</sup> 결합을 위해 분석하였다. 비-반응자 마우스(예를 들어 음성 대조군 미만으로 방사능 결합을 갖는 마우스)은 적절한 데이터 구성에서 제외시켰다. 음성 대조군의 53% 미만의 헤마토크릿 수치를 갖는 마우스를 또한 제외시켰다. 결과는 각 실험 투여량에 대한 10 마리의 세트로부터 유래된 것이다. 각 그룹으로부터 혈액 샘플에서 결합된 방사능의 평균 양(CPM, counts per minute)을 계산하였다

<253> 2. 세망적혈구 분석(Reticulocyte Assay)

<254> 정상 BDF1 마우스는 EPO 대조군 또는 테스트 펩타이드로 삼일 연속적으로 투여시켰다(0.5mL, 피하조직으로 주사됨). 3일째날, 마우스는 철 텍스트란(100 mg/ml)으로 또한 투여시켰다(0.1mL, 복막내로 주사됨). 5일째날, 마우스는 CO<sub>2</sub>로 마비시키고, 심장 뚫기로 혈액을 채취하였다. 각 혈액 샘플의 세망적혈구의 퍼센트(%)는 티아졸 오렌지 염색과 플로우 사이토미터 분석(retic-count program)으로 측정하였다. 헤마토크릿은 메뉴얼에 따라 측정하였다. 세망적혈구의 정확한 퍼센트는 다음 공식을 이용하여 결정하였다:

<255> 
$$\% \text{RETIC}_{\text{CORRECTED}} = \% \text{RETIC}_{\text{OBSERVED}} \times (\text{Hematocrit}_{\text{INDIVIDUAL}} / \text{Hematocrit}_{\text{NORMAL}})$$

<256> 3. 혈액학적 분석(Hematological Assay)

<257> 정상 CD1 마우스는 EPO 양성 대조군, 테스트 펩타이드 또는 베킵클의 정맥내 주사를 일주일간 4회 투여하였다. 양성 대조군 및 테스트 펩타이드 투여량의 범위는 mg/kg로서 나타내고, 제형에서 활성 화합물 농도를 다양화하여 시험하였다. 주사된 부피는 5mL/kg이다. 베킵클 대조군은 12 마리의 동물인 반면, 잔여 투여량 그룹은 각각 8마리 씩이다. 매일 생존 및 격주로 체중을 기록하였다.

<258> 투여된 마우스는 금식시킨 마우스이고 이소플루란(isoflurane) 흡입으로 마취시켜 말단 혈액 샘플을 1일째(베킵클 대조군 마우스의 경우) 및 15일 및 29일째(4마우스/그룹/day)에 심장 또는 개복 대동맥 뚫기를 통하여 수집하였다. 혈액은 Vacutainer® 튜브로 옮겼다. 바람직한 항응고제는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)이다.

혈액 샘플은 당업계에서 잘 알려진 자동화된 임상 분석기(예를 들어 Coulter, Inc.에서 제조된 것)를 이용하여 적혈구 합성 및 헤마토크릿(Hct), 헤모글로빈(Hgb) 및 총 에리트로사이트 수(RBC)와 같은 생리기능을 측정하는 종점에서 평가되었다.

<259> 본 발명은 여기에 기재된 특정 구체예에 의해 그 범위가 제한되지 않는다. 진정으로, 여기에 기재된 것에 추가하여 본 발명의 다양한 변형이 상기 기재 및 동반되는 도면들로부터 당업자에게 인식될 것이다. 그런 변형은 청구범위의 범위내에 포함되는 것이다. 또한 모든 수치들은 개략적인 것으로 이해되고 기재를 위해 제공된다.

<260> 특히, 특허출원 및 다양한 공개를 포함하는 수많은 참고자료들이 인용되었고 명세서 전체로서 논의되었다. 그런 참고자료의 인용 및/또는 논의는 거의 본 발명의 기재를 명확화하기 위하여 제공되는 것이고 임의의 그런 참고자료가 본 발명의 선행 기술로 인정되는 것은 아니다. 본 명세서에서 인용되고 논의된 모든 참고자료는 그들 전체로서 여기에 참고자료로 통합되고 만약 각 참고자료가 개별적으로 참고자료로써 통합된다면 그와 동일한 범위에서 통합된다.

**도면의 간단한 설명**

<190> 도 IA-1K는 본 발명의 펩타이드 서열을 포함하는 펩타이드 표를 보여주고 있다. 펩타이드 서열은 단문자 아미노산 코드를 이용하여 표시되었다. 변형 및 비-천연적으로 발생하는 아미노산은 본 명세서의 아래에서 정의된 약어를 이용하여 표시하였다.

<191> 편의를 위하여, 각 개별 펩타이드는 참고로 좌측 컬럼에서 주어진 그것의 독특한 서열 동정 번호(서열번호)로 언급되었다. 설피하이드릴 결합("SS bonds")에 의한 개별 펩타이드의 다이머화는 개발 시스템인 잔기 상에 분홍으로 표시되었고, 펩타이드의 카르복실기 또는 (아미드 결합을 형성하는) 아민기를 통한 다이머화는 그 관련된 잔기 상에 파란색 및 노란색으로 각각 표시하였다.

<192> 개별 펩타이드의 링커 부분이 존재하면 "링커"로 표지된 컬럼에서 특이화하였다. "링커-R"로 표지된 컬럼은 만약 존재한다면 링커 상에서 R기로서 나타내는 화학적 부분을 지시한다.























<150> 60/627,433

<151> 2004-11-11

<160> 299

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 1

Gly Gly Thr Tyr Ser Ser His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 2

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Ser Lys  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 3

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 3

Gly Gly Thr Tyr Ser Ser His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Ser Lys  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 4

Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys Pro Gln  
1 5 10 15

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 5  
 Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys Pro Gln  
 1 5 10

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 6  
 Gly Gly Cys Arg Ile Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Trp Gly Gly Lys  
 1 5 10 15

<210> 7

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 7  
 Gly Gly Thr Tyr Ser Ala His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
 20

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 8

Gly Gly Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Gly Gly  
 1 5 10

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 9

Gly Gly Cys Arg Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Gly Gly  
 1 5 10

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 10

Thr Tyr Ser Lys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Glu Lys Pro Gln  
 1 5 10 15

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 11

Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys Pro Gln  
 1 5 10 15

<210> 12

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 12

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly Ser Ser Lys  
 20

<210> 13

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 13

Leu Gly Arg Lys Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Lys Lys Asp  
 20

<210> 14

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 14

Met Lys Thr Lys Tyr Lys Cys Tyr Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys  
 1 5 10 15

Glu Gly Ser Arg Leu Lys  
 20

<210> 15

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 15

Arg Ala Gln Leu Thr Ala Cys His Phe Gly Pro Val Thr Trp Val Cys  
 1 5 10 15

Leu Arg Arg Leu Arg Val  
20

<210> 16

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 16

Thr Ile Ala Gln Tyr Ile Cys Tyr Met Gly Pro Glu Thr Trp Glu Cys  
1 5 10 15

Arg Pro Ser Pro Arg Lys Ala  
20

<210> 17

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 17

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 18

Arg Gly Gln Leu Tyr Ala Cys His Phe Gly Pro Val Thr Trp Val Cys  
1 5 10 15

Lys Arg Arg Lys Arg Val  
20

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 19

Ser Lys Ala Arg Tyr Met Cys His Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys  
1 5 10 15

Arg Pro Glu Val  
20

<210> 20

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 20  
 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly Ser Pro Ser Pro Gly  
 20 25

<210> 21

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Bal

<400> 21

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly Xaa Lys  
 20

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 22  
 Gly Gly Thr Ser Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
 20

<210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (9)

<223> Sar

<400> 23  
 Gly Gly Thr Ser Ser Cys His Phe Xaa Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
 20

<210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (9)  
<223> Sar

<400> 24  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Xaa Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 25  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 25  
Gly Gly Leu Tyr Cys Met Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Gln Pro Leu  
1 5 10 15

Arg Gly

<210> 26  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 26  
 Gly Gly Tyr Ala Cys Gly Pro Thr Trp Val Cys Gln Pro Arg Gly  
 1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 27  
 Gly Gly Leu Tyr Cys Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Pro Arg Gly  
 1 5 10 15

<210> 28

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 28  
 Gly Gly Thr Tyr Ser Ala His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Ala Lys  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
 20

<210> 29

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 29

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Ala Lys  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 30

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 30

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Ala  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 31

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 31  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Gly Gly  
20

<210> 32

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 32  
Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys Pro Ser Pro  
1 5 10 15

Ser Pro Gly

<210> 33

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<400> 33

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Lys  
 1                      5                                      10                                      15

Pro Gln Gly Gly  
                     20

<210>    34

<211>    16

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220>

<223>    Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400>    34

Leu Tyr Thr Cys Arg Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Leu Pro Ala  
 1                      5                                      10                                      15

<210>    35

<211>    20

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220>

<223>    Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400>    35

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Ser  
 1                      5                                      10                                      15

Pro Gln Gly Gly  
                     20

<210>    36

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 36

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Pro  
1 5 10 15

Gln Gly Gly

<210> 37

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 37

Leu Tyr Leu Cys Arg Phe Gly Pro Val Thr Trp Asp Cys Gly Tyr Lys  
1 5 10 15

<210> 38

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 38  
Ser Trp Asp Cys Arg Ile Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Lys Trp Ser  
1 5 10 15

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 39  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 40

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)

<223> Nle

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (11)

<223> Nle

<400> 40

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Xaa Gly Pro Xaa Thr Trp Val Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly  
 20

<210> 41

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<400> 41

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
 20

<210> 42

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)  
<223> 1Nal

<400> 42  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Trp  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 43  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)  
<223> 1Nal

<400> 43  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Ala Lys  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 44

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (16)

<223> 3Py

<400> 44

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Xaa  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<400> 45

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Phe Arg  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 46

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 2Nal

<400> 46

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 47

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (11)

<223> 1Nal

<400> 47

Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Ala Arg Pro Gln  
 1 5 10 15

<210> 48

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<400> 48

Gly Gly Thr Tyr Ser Ala His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
 20

<210> 49  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (12)  
<223> 1Na1

<400> 49  
Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Ala Arg Pro  
1 5 10 15

Gln

<210> 50  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)  
<223> 1Na1

<400> 50  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Ala Arg

1                    5                    10                    15

Pro Gln

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<400> 51

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Ala Arg  
 1                    5                    10                    15

Pro Gln Gly Gly  
                   20

<210> 52

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 52

Gly Gly Thr Tyr Ser

1 5

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 53

His Phe Gly Pro Leu Thr Trp

1 5

<210> 54

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 54

Lys Pro Gln Gly Gly

1 5

<210> 55

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> lNaI

<220>  
<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> BaI

<400> 55  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly Xaa Lys  
20

<210> 56

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> Dpa

<400> 56  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly

20

<210> 57

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> Bpa

<400> 57

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
 20

<210> 58

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 58

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Phe Val Cys Arg  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly

20

<210> 59

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)

<223> 1Nal

<400> 59

Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Ala Arg Pro  
 1 5 10 15

Gln Gly

<210> 60

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<400> 60  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Ala Arg  
1 5 10 15

Pro Gln Gly

<210> 61

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Bal

<400> 61  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Phe  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly Xaa Lys  
20

<210> 62

<211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)  
 <223> Bal

<400> 62  
 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Phe Val Cys Arg  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly Xaa Lys  
 20

<210> 63  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)  
 <223> 1Na1

<400> 63  
 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly Lys  
20

<210> 64

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (6)

<223> homo-Cys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (15)

<223> homo-Cys

<400> 64

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly Ala Lys  
20

<210> 65  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)  
<223> 1Na1

<400> 65  
Gly Gly Thr Tyr Ser Pro His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Pro Arg  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 66  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)  
<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Bal

<400> 66

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys Phe Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly Xaa Lys  
20

<210> 67

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (16)

<223> 2Py

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Bal

<400> 67  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Xaa  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly Xaa Lys  
20

<210> 68

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> 1Nal

<400> 68  
Cys Gly Gly Thr Tyr Ser Pro His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Pro  
1 5 10 15

Arg Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 69

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)  
 <223> 1Na1

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)  
 <223> Ba1

<400> 69  
 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly Xaa  
 20

<210> 70  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)  
 <223> 1Na1

<400> 70  
 Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg Pro  
 1 5 10 15

Gln

<210> 71

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<400> 71

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
 1                    5                    10                    15

Pro Gln

<210> 72

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<400> 72

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro

<210> 73

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)

<223> 1Nal

<400> 73

Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg Pro  
1 5 10 15

<210> 74

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)  
<223> 1NaI

<400> 74  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
1 5 10 15

<210> 75  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)  
<223> 1NaI

<400> 75  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Xaa Gly Pro Leu Thr Phe Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly Lys  
20

<210> 76  
<211> 21  
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> 1NaI

<400> 76

Lys Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys  
1 5 10 15

Arg Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 77

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Ahx

<400> 77  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Xaa Gly Pro Leu Thr Phe Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro Gln Xaa Lys  
20

<210> 78

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Ahx

<400> 78  
Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro Gln Xaa Lys  
20

<210> 79

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Ahx

<400> 79

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro Gln Xaa

<210> 80

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Ahx

<400> 80

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro Gln Xaa Lys  
20

<210> 81

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 81

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys Ser Met Gly Pro Ser Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly  
20

<210> 82

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<400> 82

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Met Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly  
20

<210> 83

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)

<223> Pen

<400> 83

Tyr Ser Xaa His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
1 5 10

<210> 84

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)

<223> Pen

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)

<223> Pen

<400> 84

Tyr Ser Xaa His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Xaa Lys  
1 5 10

<210> 85

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)..(20)

<223> Ahx

<400> 85

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Ile Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln

1                    5                    10                    15

Pro Leu Xaa Xaa  
                  20

<210>    86

<211>    20

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220>

<223>    Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221>    MOD\_RES

<222>    (13)

<223>    1Nal

<220>

<221>    MOD\_RES

<222>    (19)

<223>    Ahx

<400>    86

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
  1                    5                    10                    15

Pro Gln Xaa Cys  
                  20

<210>    87

<211>    14

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 87  
 Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
 1 5 10

<210> 88  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (4)  
 <223> Pen

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)  
 <223> Pen

<400> 88  
 Thr Tyr Ser Xaa His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Xaa Lys  
 1 5 10

<210> 89  
 <211> 20  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 89

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Gly Gly Pro Gly Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly  
20

<210> 90

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 90

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
1 5 10 15

Pro Gln

<210> 91

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)

<223> DBY

<400> 91

Thr Xaa Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
1 5 10

<210> 92

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 92

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Ile Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly  
20

<210> 93

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4)

<223> DBY

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Na1

<400> 93

Gly Gly Thr Xaa Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Lys  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 94

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Ahx

<400> 94

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Met Thr Xaa Val Cys Gln

1                    5                    10                    15

Pro Leu Arg Gly Xaa Cys  
                  20

<210> 95

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (11)

<223> Nle

<400> 95

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Xaa Thr Trp Val Cys Gln  
1                    5                    10                    15

Pro Leu Arg Gly  
                  20

<210> 96

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4)

<223> DBY

<400> 96

Gly Gly Thr Xaa Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Lys  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 97

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 97

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly  
20

<210> 98

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Ahx

<400> 98

Gly Gly Leu Tyr Glu Cys Arg Met Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro Gly Xaa

<210> 99

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 99

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly  
20

<210> 100

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)

<223> Nle

<400> 100

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Xaa Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly  
 20

<210> 101

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 2NaI

<400> 101

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Lys  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
 20

<210> 102

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)  
 <223> Ahx

<400> 102  
 Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly Xaa Cys  
 20

<210> 103  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)  
 <223> Dpa

<400> 103  
 Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Lys  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
 20

<210> 104

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 104

Gly Gly Leu Tyr Tyr Cys Arg Phe Gly Pro Ile Thr Phe Glu Cys His  
1 5 10 15

Pro Thr Arg Gly  
20

<210> 105

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> DCF

<400> 105

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Lys  
1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 106

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Ahx

<400> 106

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly Xaa Cys  
20

<210> 107

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 107

Gly Gly Gln Leu Leu Cys Gly Ile Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Arg  
1 5 10 15

Trp Val Gly Gly  
20

<210> 108

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 108

Gly Gly Asn Tyr Thr Cys Arg Phe Gly Pro Leu Thr Trp Glu Cys Thr  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly  
 20

<210> 109

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)

<223> Nle

<400> 109

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Xaa Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly  
 20

<210> 110

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)

<223> Hsm

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (11)

<223> Hsm

<400> 110

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Xaa Gly Pro Xaa Thr Trp Val Cys Gln  
 1                      5                      10                      15

Pro Leu Arg Gly  
                     20

<210> 111

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 111

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Glu Thr Trp Val Cys Gln

1                    5                    10                    15

Pro Leu Arg Gly  
                  20

<210>    112

<211>    20

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220>

<223>    Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400>    112

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Phe Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
  1                    5                    10                    15

Pro Leu Arg Gly  
                  20

<210>    113

<211>    20

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220>

<223>    Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221>    MOD\_RES

<222>    (8)

<223>    Hsm

<400>    113

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Xaa Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln

1                    5                    10                    15

Pro Leu Arg Gly  
                  20

<210>    114

<211>    20

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220>

<223>    Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221>    MOD\_RES

<222>    (8)

<223>    Hsm

<220>

<221>    MOD\_RES

<222>    (13)

<223>    1NaI

<400>    114

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Xaa Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
  1                    5                    10                    15

Pro Leu Arg Gly  
                  20

<210>    115

<211>    20

<212>    PRT

<213>    Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 115

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Leu Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly  
20

<210> 116

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 116

Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln Pro Leu  
1 5 10 15

Arg Gly

<210> 117

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 117

Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln Pro Leu Arg

1                    5                    10                    15

Gly

<210> 118

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 118

Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln Pro Leu Arg Gly  
 1                    5                    10                    15

<210> 119

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 119

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
 1                    5                    10                    15

Pro Leu

<210> 120

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 120

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro

<210> 121

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 121

Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln Pro  
1 5 10

<210> 122

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 122

Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln

1                    5                    10

<210> 123

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)..(21)

<223> Ahx

<400> 123

Gly Gly Asn Tyr Thr Cys Arg Phe Gly Pro Leu Thr Trp Glu Cys Thr  
 1                    5                    10                    15

Pro Gln Gly Xaa Xaa Lys  
 20

<210> 124

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)..(22)

<223> Ahx

<400> 124  
Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly Xaa Xaa Lys  
20

<210> 125

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<400> 125  
Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly  
20

<210> 126

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 126  
Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

<210> 127

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 127  
Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln Pro Leu  
1 5 10 15

<210> 128

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 128  
Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly Gly Gly Lys  
20

<210> 129

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 129

Ala Arg Gly Lys Tyr Gln Cys Gln Phe Gly Pro Leu Thr Trp Glu Cys  
1 5 10 15

Leu Pro Ile Arg Pro Arg  
20

<210> 130

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 130

Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln Pro  
1 5 10 15

Leu Arg Gly

<210> 131

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)..(24)

<223> Ahx

<400> 131

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Lys  
20 25

<210> 132

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 132

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg

<210> 133

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 133

Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln Pro  
1 5 10 15

Leu Arg

<210> 134

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)

<223> Ahx

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (15)

<223> 1Nal

<400> 134

Xaa Lys Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Xaa Val  
1 5 10 15

Cys Arg Pro Gln Gly Gly  
20

<210> 135

<211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)  
 <223> 1NaI

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)  
 <223> Sar

<400> 135  
 Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa  
 20

<210> 136  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 136  
 Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Leu Lys Gly  
20

<210> 137

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)

<223> Hsm

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 137

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Xaa Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa  
20

<210> 138

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 138

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly Gly Lys Gly  
20

<210> 139

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 139

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Ser Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly  
20

<210> 140

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)

<223> Hsm

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Na1

<400> 140

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Xaa Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
 1                    5                    10                    15

Pro Leu Lys Gly  
 20

<210> 141

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 141

Ala His Ala Thr Gly Ala Gly Tyr Glu Thr Pro Arg Gly Trp Cys Gln  
 1                    5                    10                    15

Leu Thr Gly Gly Gly  
 20

<210> 142

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Na1

<400> 142

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
 1                      5                                      10                                      15

Pro Leu

<210> 143

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)..(22)

<223> Ahx

<400> 143

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Gly Xaa Xaa Lys  
20

<210> 144

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<400> 144

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Lys  
20

<210> 145

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)  
<223> 1Na1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)  
<223> Sar

<400> 145  
Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 146  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)  
<223> Ahx

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 146

Xaa Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys  
 1 5 10 15

Gln Pro Leu Arg Xaa  
 20

<210> 147

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 147

Ser Arg Thr Arg Tyr Arg Cys Glu Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys  
 1 5 10 15

Arg Arg Trp Lys  
 20

<210> 148

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 148

Leu Thr Arg Leu Tyr Ser Cys His Met Gly Pro Ser Thr Trp Val Cys  
 1 5 10 15

Ser Thr Ala Leu Arg Lys  
 20

<210> 149

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 149

Arg Gly Gln Leu Tyr Ala Cys His Phe Gly Pro Val Thr Trp Val Cys  
 1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Val Lys  
 20

<210> 150

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 150

Ser Gly Ile Leu Tyr Glu Cys His Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys



<210> 153

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 153

Ala Arg Gly Arg Tyr Gln Cys Gln Phe Gly Pro Leu Thr Trp Glu Cys  
1 5 10 15

Leu Pro Ile Arg Pro Arg Lys  
20

<210> 154

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 154

Val Thr Arg Met Tyr Arg Cys Arg Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys  
1 5 10 15

Glu Arg Lys

<210> 155

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 155  
 Arg Pro Ser Leu Tyr Glu Cys His Leu Gly Pro Leu Thr Trp Glu Cys  
 1 5 10 15

Arg Pro Arg Arg Arg Glu Lys  
 20

<210> 156

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 156  
 Arg Gly His Met Tyr Ser Cys Gln Leu Gly Pro Val Thr Trp Val Cys  
 1 5 10 15

Arg Pro Leu Ser Gly Arg Lys  
 20

<210> 157

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 157  
 Ile Thr Pro Thr Tyr His Cys Arg Phe Gly Pro Gln Thr Trp Val Cys  
 1 5 10 15



<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 160

Pro Asp Leu Ala Tyr Ser Cys Arg Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys  
1 5 10 15

Ala Pro Asn Arg Lys  
20

<210> 161

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 161

Leu Gly Arg Arg Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Arg Arg Asp Lys  
20

<210> 162

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 162  
Leu Leu Arg Gly Tyr Glu Cys Tyr Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys  
1 5 10 15

Arg Ser Ser Arg Pro Arg Lys  
20

<210> 163

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 163  
Met Arg Thr Arg Tyr Arg Cys Tyr Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys  
1 5 10 15

Glu Gly Ser Arg Leu Lys  
20

<210> 164

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 164  
His Leu Arg Arg Tyr Asp Cys Ser Phe Gly Pro Gln Thr Trp Val Cys  
1 5 10 15

Arg Pro Arg Arg Ser Leu Lys  
20

<210> 165

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 165

Ile Arg Gly Arg Asn Arg Cys Arg Phe Gly Pro Gln Thr Trp Val Cys  
 1 5 10 15

Pro Asp Ser Tyr Glu Phe Lys  
 20

<210> 166

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 166

Gln Arg Arg His Val Phe Leu Ser Asp Gly Ala Ala Tyr Val Gly Leu  
 1 5 10 15

Trp Val Glu Cys Asp Asp Ile Ser Lys  
 20 25

<210> 167

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 167

Val Leu Pro Leu Tyr Arg Cys Arg Met Gly Arg Glu Thr Trp Glu Cys  
1 5 10 15

Met Arg Ala Ala Gly Val Thr Lys  
20

<210> 168

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 168

Pro Gly Asn Ser Tyr Arg Cys His Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys  
1 5 10 15

Gly Arg Asp Arg His Leu Lys  
20

<210> 169

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 169

His Leu Gly Arg Tyr Asp Cys Ser Phe Gly Pro Gln Thr Trp Val Cys

1                    5                    10                    15

Arg Pro Arg Arg Ser Leu Lys  
20

<210> 170

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 170

Arg Pro Arg Pro Tyr Ser Cys Thr Met Gly Pro Arg Thr Trp Val Cys  
1                    5                    10                    15

Gly Gly Val Arg Ala Gly Lys  
20

<210> 171

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 171

Pro Gly Asn Ser Tyr Arg Cys Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Gly  
1                    5                    10                    15

Arg Asp Arg His Leu Lys  
20

<210> 172

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (3)

<223> D-Leu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> lNa1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 172

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln

1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys

20

<210> 173

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)

<223> D-Met

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 173

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 174

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (6)  
<223> D-Cys

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)  
<223> 1NaI

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (15)  
<223> D-Cys

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)  
<223> Sar

<400> 174  
Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 175  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (6)

<223> D-Cys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 175

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
 1                      5                      10                      15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 176

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (15)

<223> D-Cys

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 176

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 177

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (17)

<223> D-Pro

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 177

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 178

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 178

Glu Tyr Leu Cys Arg Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Glu Arg Tyr  
 1 5 10 15

Lys

<210> 179

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 179

Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg Pro Gln  
1 5 10 15

Lys

<210> 180

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 180

Asp Tyr His Cys Arg Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg Pro Leu  
1 5 10 15

Lys

<210> 181

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 181

Leu Tyr Glu Cys Arg Met Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Arg Pro Gly

1                    5                    10                    15

Lys

<210> 182

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 182

Leu Tyr Leu Cys Arg Met Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln Pro Arg  
 1                    5                    10                    15

Lys

<210> 183

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 183

Asp Tyr Asn Cys Arg Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg Pro Ser  
 1                    5                    10                    15

Lys

<210> 184

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 184

Ser Tyr Leu Cys Arg Met Gly Pro Thr Thr Trp Leu Cys Thr Ala Gln  
1 5 10 15

Lys

<210> 185

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 185

Glu Tyr Ser Cys Arg Met Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Ser Pro Thr  
1 5 10 15

Lys

<210> 186

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 186  
Ile Tyr Arg Cys Leu Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Thr Pro Asp  
1 5 10 15

Lys

<210> 187

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (18)

<223> D-Leu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 187

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln

1                    5                    10                    15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 188

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)..(22)

<223> Ahx

<400> 188

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1                    5                    10                    15

Pro Leu Arg Xaa Xaa Xaa Lys  
20

<210> 189

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (10)

<223> D-Pro

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 189

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 190

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (7)

<223> D-His

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> lNal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 190

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 191

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (5)

<223> D-Ala

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 191

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
 1                      5                      10                      15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 192

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 192

Arg Thr Arg Glu Tyr Ser Cys Gln Met Gly Pro Leu Thr Trp Thr Cys



<210> 195

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 195

Asn Gly Arg Thr Tyr Ser Cys Gln Leu Gly Pro Val Thr Trp Val Cys  
1 5 10 15

Ser Arg Gly Val Arg Arg Lys  
20

<210> 196

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 196

Ser Arg Thr Arg Tyr Arg Cys Glu Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys  
1 5 10 15

Glu Arg Trp Lys  
20

<210> 197

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 197

Gly Ser Arg Thr Tyr Ser Cys Gln Leu Gly Pro Val Thr Trp Val Cys  
 1 5 10 15

Gly Arg Arg Arg Lys  
 20

<210> 198

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 198

Gly Gly Thr Tyr Ser Cys His Phe Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg  
 1 5 10 15

Pro Gln Gly Gly Lys  
 20

<210> 199

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 199

Gly Gly Asp Tyr His Cys Arg Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg  
 1 5 10 15

Pro Leu Gly Gly Lys  
20

<210> 200

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 200

Gly Gly Val Tyr Ala Cys Arg Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Ser  
1 5 10 15

Pro Leu Gly Gly Lys  
20

<210> 201

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 201

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Tyr Xaa Val Cys Glu  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 202

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 202

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Glu  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 203

<211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)  
 <223> 1NaI

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)  
 <223> Sar

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (21)  
 <223> D-Lys

<400> 203  
 Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 204  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)  
 <223> D-Thr

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (13)  
 <223> 1NaI

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)  
 <223> Sar

<400> 204  
 Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 205  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (16)

<223> D-Gln

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 205

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 206

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (4)

<223> D-Tyr

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)  
<223> 1NaI

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)  
<223> Sar

<400> 206  
Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 207  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (11)  
<223> D-Ile

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 207

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln

1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys

20

<210> 208

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> D-Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 208

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 209

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> D-1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 209

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 210

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 210

Gly Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys  
1 5 10 15

Gln Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 211

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 211

Gly Gly Leu Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys  
1 5 10 15

Gln Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 212

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 212  
 Gly Gly Leu Tyr Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys  
 1 5 10 15

Gln Pro Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 213

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 213  
 Gly Gly Leu Tyr Ala Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys  
 1 5 10 15

Gln Pro Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 214

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 214

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys  
 1                    5                    10                    15

Gln Pro Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 215

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 215

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys

1 5 10 15

Gln Pro Leu Arg Xaa Lys

20

<210> 216

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)

<223> Ahx

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 216

Xaa Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys  
 1 5 10 15

Gln Pro Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 217

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 217

Asn Tyr Thr Cys Arg Phe Gly Pro Leu Thr Trp Glu Cys Thr Pro Gln  
 1 5 10 15

Lys

<210> 218

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 218

Ser Trp Asp Cys Arg Ile Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Arg Trp Ser

1                    5                    10                    15

Lys

<210> 219

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 219

Asn Tyr Met Cys His Phe Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Arg Pro Gly  
 1                    5                    10                    15

Lys

<210> 220

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 220

Leu Tyr Leu Cys Arg Met Gly Pro Gln Thr Trp Met Cys Gln Pro Gly  
 1                    5                    10                    15

Lys

<210> 221

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 221

Trp Tyr Ser Cys Leu Met Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Arg Ala His  
1 5 10 15

Lys

<210> 222

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 222

Glu Tyr Phe Cys Arg Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln Arg Ser  
1 5 10 15

Lys

<210> 223

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 223

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys  
1 5 10 15

Gln Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 224

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 224

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Ile Thr Xaa Val Cys  
1 5 10 15

Gln Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 225

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 225

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Thr Xaa Val Cys  
1 5 10 15

Gln Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 226

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 226

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Val Cys  
 1                    5                    10                    15

Gln Pro Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 227

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 227

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Gln Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 228

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 228  
Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 229

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 229  
Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 230

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 230

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Arg Xaa Lys  
20

<210> 231

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)..(21)

<223> Sar

<400> 231

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln

1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Xaa Lys

20

<210> 232

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Sar

<400> 232

Gly Gly Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln Pro

1                    5                    10                    15

Leu Arg Xaa Lys  
                  20

<210> 233

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Sar

<400> 233

Gly Gly Leu Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln Pro

1                    5                    10                    15

Leu Arg Xaa Lys  
                  20

<210> 234

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)  
 <223> 1NaI

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)  
 <223> Sar

<400> 234  
 Gly Gly Leu Tyr Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln Pro  
 1 5 10 15

Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 235  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)  
 <223> 1NaI

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)  
 <223> Sar

<400> 235  
 Gly Gly Leu Tyr Ala Cys Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln Pro  
 1 5 10 15

Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 236  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)  
 <223> 1Nal

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)  
 <223> Sar

<400> 236  
 Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln Pro  
 1 5 10 15

Leu Arg Xaa Lys

20

<210> 237

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Sar

<400> 237

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Val Cys Gln Pro  
 1 5 10 15

Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 238

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (19)  
<223> Sar

<400> 238  
Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Cys Gln Pro  
1 5 10 15

Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 239  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)  
<223> 1NaI

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (19)  
<223> Sar

<400> 239  
Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Pro  
1 5 10 15

Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 240

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> D-Arg

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 240

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 241

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(2)

<223> Ahx

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (15)

<223> lNa1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (22)

<223> Sar

<400> 241

Xaa Xaa Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val  
 1 5 10 15

Cys Gln Pro Leu Arg Xaa  
 20

<210> 242

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Dap

<400> 242

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Xaa  
 20

<210> 243

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)  
<223> 1Na1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)  
<223> Sar

<400> 243  
Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys Lys  
20

<210> 244  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (13)  
<223> 1Na1

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (19)

<223> Sar

<400> 244

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 245

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Sar

<400> 245

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Ile Thr Xaa Val Cys Gln Pro  
1 5 10 15

Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 246

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Sar

<400> 246

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Xaa Val Cys Gln Pro  
 1                      5                      10                      15

Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 247

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Sar

<400> 247

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Thr Xaa Val Cys Gln Pro  
 1 5 10 15

Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 248

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 248

Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Met Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln Pro  
 1 5 10 15

Arg Lys

<210> 249

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 249  
 Gly Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Met Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Arg Lys

<210> 250  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 250  
 Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Met Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln Pro  
 1 5 10 15

Arg Arg Lys

<210> 251  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)

<223> Sar

<400> 251

Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Met Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln Pro  
1 5 10 15

Arg Arg Xaa Lys  
20

<210> 252

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 252

Gly Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Met Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Arg Arg Lys  
20

<210> 253

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 253

Gly Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Met Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Arg Arg Xaa Lys  
20

<210> 254

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 254

Leu Tyr Leu Cys Arg Met Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln Pro Arg  
1 5 10 15

Arg Lys

<210> 255

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (18)

<223> Sar

<400> 255

Leu Tyr Leu Cys Arg Met Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln Pro Arg  
1 5 10 15

Arg Xaa Lys

<210> 256

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 256

Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Gln Pro Leu  
1 5 10 15

Lys

<210> 257

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (11)

<223> 1Nal

<400> 257

Leu Tyr Leu Cys Arg Met Gly Pro Val Thr Xaa Glu Cys Gln Pro Arg  
 1 5 10 15

Lys

<210> 258

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (11)

<223> 1Nal

<400> 258

Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln Pro Leu  
 1 5 10 15

Lys

<210> 259

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (14)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 259

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Pro Ile Thr Xaa Val Cys  
 1                      5                      10                      15

Gln Pro Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 260

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Sar

<400> 260

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln Pro  
1 5 10 15

Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 261

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Sar

<400> 261

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Arg Xaa Lys  
20

<210> 262

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)..(14)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (21)

<223> Sar

<400> 262

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Xaa Val Cys  
 1                      5                      10                      15

Gln Pro Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 263

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Sar

<400> 263

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Xaa Lys  
20

<210> 264

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (19)

<223> Sar

<400> 264  
 Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln Pro  
 1 5 10 15

Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 265

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 265  
 Gly Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Met Gly Pro Val Thr Xaa Glu Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Arg Arg Xaa Lys  
 20

<210> 266

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 266

Gly Gly Asp Tyr His Cys Arg Met Gly Pro Leu Thr Trp Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 267

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 267

Gly Gly Asp Tyr His Cys Arg Met Gly Pro Leu Thr Xaa Val Cys Arg  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa Lys  
20

<210> 268

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1Nal

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 268

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Lys Pro Ile Thr Xaa Val Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Leu Arg Xaa  
20

<210> 269

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (13)

<223> 1NaI

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 269

Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Lys Xaa Val Cys Gln  
 1                      5                      10                      15

Pro Leu Arg Xaa  
 20

<210> 270

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(2)

<223> Ahx

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (15)

<223> 1Na1

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (22)

<223> Sar

<400> 270

Xaa Xaa Gly Gly Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Ile Thr Xaa Val  
 1 5 10 15

Cys Gln Pro Leu Arg Xaa Lys  
 20

<210> 271

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (9)

<223> 1Na1

<400> 271



<223> PFF

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 273

Gly Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Xaa Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln

1 5 10 15

Pro Arg Arg Xaa Lys

20

<210> 274

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 274

Gly Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Tyr Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln

1 5 10 15

Pro Arg Arg Xaa Lys

20

<210> 275

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 275

Gly Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Ser Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln  
 1                      5                                      10                                      15

Pro Arg Arg Xaa Lys  
 20

<210> 276

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (8)

<223> Nle

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 276

Gly Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Xaa Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Arg Arg Xaa Lys  
20

<210> 277

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (20)

<223> Sar

<400> 277

Gly Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Leu Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Arg Arg Xaa Lys  
20

<210> 278

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)  
<223> Sar

<400> 278  
Gly Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Gln Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln  
1 5 10 15

Pro Arg Arg Xaa Lys  
20

<210> 279  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (8)  
<223> Cit

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)  
<223> Sar

<400> 279  
Gly Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Xaa Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln



<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (8)  
 <223> TBA

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)  
 <223> Sar

<400> 281  
 Gly Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Xaa Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln  
 1 5 10 15

Pro Arg Arg Xaa Lys  
 20

<210> 282  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (19)  
 <223> Sar

<400> 282  
Gly Gly Leu Tyr Leu Cys Arg Gly Pro Val Thr Trp Glu Cys Gln Pro  
1 5 10 15

Arg Arg Xaa Lys  
20

<210> 283

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 283  
Glu Tyr Glu Cys Tyr Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Arg Pro Glu  
1 5 10 15

Lys

<210> 284

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 284  
Asp Tyr Thr Cys Arg Met Gly Pro Met Thr Trp Ile Cys Thr Ala Thr  
1 5 10 15

Lys

<210> 285

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 285

Asn Tyr Leu Cys Arg Phe Gly Pro Met Thr Trp Asp Cys Thr Gly Phe  
1 5 10 15

Lys

<210> 286

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 286

Asn Tyr Val Cys Arg Met Gly Pro Ile Thr Trp Ile Cys Thr Pro Ala  
1 5 10 15

Lys

<210> 287

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 287

Gln Leu Leu Cys Gly Ile Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Arg Trp Val  
1 5 10 15

Lys

<210> 288

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 288

Arg Tyr Ser Cys Phe Met Gly Pro Thr Thr Trp Val Cys Ser Pro Val  
1 5 10 15

Lys

<210> 289

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 289

Asp Tyr Val Cys Arg Met Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Ala Pro Tyr

1                    5                    10                    15

Lys

<210> 290

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 290

Tyr Tyr Tyr Cys Trp Met Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Ser Pro Ala  
 1                    5                    10                    15

Lys

<210> 291

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 291

Leu Val Met Cys Arg Ile Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Asp Ile Pro  
 1                    5                    10                    15

Lys

<210> 292

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 292

Asn Leu Gln Cys Arg Ile Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Arg His Ala  
1 5 10 15

Lys

<210> 293

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 293

Leu Tyr Ile Cys Arg Met Gly Pro Leu Thr Trp Glu Cys Arg Arg Thr  
1 5 10 15

Lys

<210> 294

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 294

Gln Tyr Ala Cys Arg Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Arg Tyr Met  
 1 5 10 15

Lys

<210> 295

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 295

Val Tyr Leu Cys Thr Phe Gly Pro Ile Thr Trp Leu Cys Arg Gly Ala  
 1 5 10 15

Lys

<210> 296

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 296

Asn Tyr Ala Cys Arg Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Ser Pro Leu  
 1 5 10 15

Lys

<210> 297

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 297

Leu Tyr Tyr Cys Arg Phe Gly Pro Ile Thr Phe Glu Cys His Pro Thr  
 1 5 10 15

Lys

<210> 298

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 298

Leu Tyr Ala Cys His Met Gly Pro Met Thr Trp Val Cys Gln Pro Leu  
 1 5 10 15

Lys

<210> 299

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 299

Leu Tyr Thr Cys Arg Met Gly Pro Ile Thr Trp Val Cys Leu Pro Ala  
1 5 10 15

Lys