



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0044577  
(43) 공개일자 2022년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/55 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)  
A61P 19/02 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)  
A61P 3/10 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C07K 14/55 (2013.01)  
A61K 38/2013 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2022-7007867  
(22) 출원일자(국제) 2020년08월13일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2022년03월08일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/046202  
(87) 국제공개번호 WO 2021/030602  
국제공개일자 2021년02월18일  
(30) 우선권주장  
62/886,283 2019년08월13일 미국(US)

(71) 출원인  
암젠 인크  
미국 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크, 원  
암젠 센터 드라이브  
(72) 발명자  
베이츠 다렌 엘.  
미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스,  
메일 스타 28-5-에이, 로 디파트먼트-페이턴트 오  
퍼레이션즈, 원 암젠 센터 드라이브, 씨/오 암젠  
인크  
손 수 제이.  
미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스,  
메일 스타 28-5-에이, 로 디파트먼트-페이턴트 오  
퍼레이션즈, 원 암젠 센터 드라이브, 씨/오 암젠  
인크  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인한얼

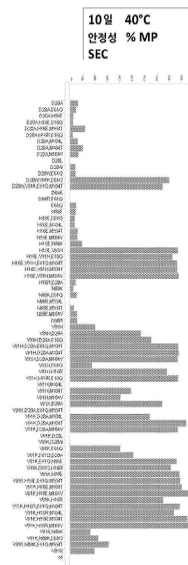
전체 청구항 수 : 총 80 항

(54) 발명의 명칭 T-조절 세포의 확장을 위한 인터류킨-2 돌연변이단백질

(57) 요약

세포를 우선적으로 확장 및 활성화하고, 대규모 생산하기 쉬운 IL-2 돌연변이단백질 및 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 분자가 본 명세서에서 제공된다. 또한, 본 발명의 조성물의 제조 및 이용 방법이 본 명세서에서 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A61P 19/02* (2018.01)

*A61P 29/00* (2018.01)

*A61P 3/10* (2018.01)

*C07K 2319/30* (2013.01)

(72) 발명자

**카테랄 한나**

미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스,  
메일 스탬프 28-5-에이, 로 디파트먼트-페이턴트 오  
퍼레이션즈, 원 암젠 센터 드라이브, 씨/오 암젠  
인크

---

**왕 줄분**

미국, 캘리포니아 91320-1799, 사우전드 오크스,  
메일 스탬프 28-5-에이, 로 디파트먼트-페이턴트 오  
퍼레이션즈, 원 암젠 센터 드라이브, 씨/오 암젠  
인크

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

서열번호 1에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 인간 인터류킨-2(IL-2) 돌연변이단백질로서, 여기서 상기 IL-2 돌연변이단백질은 V91K,D20L; D84R,E61Q; V91K,D20A,E61Q,M104T; N88K,M104L; V91H,M104L; V91K,H16E,M104V; V91K,H16R,M104V; V91K,H16R,M104T; V91K,D20A,M104T; V91K,H16E,M104T; V91K,H16E,E61Q,M104T; V91K,H16R,E61Q,M104T; V91K,H16E; V91H,D20A,M104T; H16E,V91H,M104V; V91H,D20A,E61Q,M104T; V91H,H16R,E16Q; V91K,D20A,M104V; H16E,V91H; V91H,D20A,M104V; H16E,V91H,M104T; H16E,V91H,E61Q,M104T; V91K,E61Q,H16E; V91K,H16R,M104L; H16E,V91H,E16Q; V91K,E61Q,H16R; D20W,V91K,E61Q; V91H,H16R; V91K,H16R; D20W,V91K,E61Q,M104T; V91K,D20A; V91H,D20A,E16Q; V91K,D20A,M104L; V91H,D20A; V91K,E61Q,D20A; V91H,M104T; V91H,M104V; V91K,E61Q; V91K,N88K,E61Q,M104T; V91K,N88K,E61Q; V91H,E61Q; V91K,N88K; D20A,H16E,M104T; D20A,M104T; H16E,N88K; D20A,M104V; D20A,M104L; H16E,M104T; H16E,M104V; N88K,M104V; N88K,E61Q; D20A,E61Q; H16R,D20A; D20W,E61Q; H16E,E61Q; H16E,M104L; N88K,M104T; D20A,H16E; D20A,H16E,E16Q; D20A,H16R,E16Q; V91K,D20W; V91A,H16A; V91A,H16D; V91A,H16E; V91A,H16S; V91E,H16A; V91E,H16D; V91E,H16E; V91E,H16S; V91K,H16A; V91K,H16D; V91K,H16S; 또는 V91S,H16E 중 하나 이상의 돌연변이를 갖고, 다른 T 세포에 비해 T 조절 세포를 우선적으로 자극하는, 인간 인터류킨-2(IL-2) 돌연변이단백질.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 NK 세포에 비해 T 조절 세포를 더 우선적으로 자극하는 것인, 인간 IL-2 돌연변이단백질.

#### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 돌연변이단백질은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 것인, 인간 IL-2 돌연변이단백질.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, 상기 돌연변이단백질은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열과 적어도 99% 동일한 것인, 인간 IL-2 돌연변이단백질.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이단백질의 아미노산 서열은 C125A에서 및 돌연변이 V91K,D20L; D84R,E61Q; V91K,D20A,E61Q,M104T; N88K,M104L; V91H,M104L; V91K,H16E,M104V; V91K,H16R,M104V; V91K,H16R,M104T; V91K,D20A,M104T; V91K,H16E,M104T; V91K,H16E,E61Q,M104T; V91K,H16R,E61Q,M104T; V91K,H16E; V91H,D20A,M104T; H16E,V91H,M104V; V91H,D20A,E61Q,M104T; V91H,H16R,E16Q; V91K,D20A,M104V; H16E,V91H; V91H,D20A,M104V; H16E,V91H,M104T; H16E,V91H,E61Q,M104T; V91K,E61Q,H16E; V91K,H16R,M104L; H16E,V91H,E16Q; V91K,E61Q,H16R; D20W,V91K,E61Q; V91H,H16R; V91K,H16R; D20W,V91K,E61Q,M104T; V91K,D20A; V91H,D20A,E16Q; V91K,D20A,M104L; V91H,D20A; V91K,E61Q,D20A; V91H,M104T; V91H,M104V; V91K,E61Q; V91K,N88K,E61Q,M104T; V91K,N88K,E61Q; V91H,E61Q; V91K,N88K; D20A,H16E,M104T; D20A,M104T; H16E,N88K; D20A,M104V; D20A,M104L; H16E,M104T; H16E,M104V; N88K,M104V; N88K,E61Q; D20A,E61Q; H16R,D20A; D20W,E61Q; H16E,E61Q; H16E,M104L; N88K,M104T; D20A,H16E; D20A,H16E,E16Q; D20A,H16R,E16Q; V91K,D20W; V91A,H16A; V91A,H16D; V91A,H16E; V91A,H16S; V91E,H16A; V91E,H16D; V91E,H16E; V91E,H16S; V91K,H16A; V91K,H16D; V91K,H16S; 또는 V91S,H16E에서 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열과 상이한 것인, 인간 IL-2 돌연변이단백질.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 1 nM IL-2 처리에서 T 이펙터 세포의 30% 미만의 pSTAT 활성화를 갖는 것인, 인간 IL-2 돌연변이단백질.

#### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 1 nM IL-2 처리에서 T 이펙터 세포의 30% 미만의 pSTAT 활성화 및 T 조절 세포의 40% 초과 pSTAT 활성화를 갖는 것인, 인간 IL-2 돌연변이단백질.

#### 청구항 8

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 1 nM IL-2 처리에서 T 조절 세포의 40% 초과 pSTAT 활성화를 갖는 것인, 인간 IL-2 돌연변이단백질.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 실시예 2의 프로토콜을 이용하여, 30% 초과 안정성을 갖는 것인, 인간 IL-2 돌연변이단백질.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 인간 IL-2 돌연변이단백질 및 Fc를 포함하는 Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 Fc는 인간 IgG1 Fc인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 인간 IgG1 Fc는 상기 Fc의 이펙터 기능을 변경하는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 것인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, 상기 인간 IgG1은 N297에서의 치환을 포함하는 것인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, N297에서의 치환은 N297G인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 15

제11항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 IgG Fc의 C-말단 리신의 치환 또는 결실을 포함하는, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 16

제15항에 있어서, 상기 인간 IgG Fc의 C-말단 리신은 결실된 것인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 17

제11항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 링커는 상기 단백질의 Fc와 인간 IL-2 돌연변이단백질 부분을 연결하는 것인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 링커는 GGGGS(서열번호 5), GGNGT, 또는 (서열번호 6), 및 YGNGT(서열번호 7)인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 링커는 GGGGS(서열번호 5)인 Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 20

제11항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물 세포에서 발현되는 경우, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 상기 Fc-융합체 단백질의 글리코실화를 변경하는, 아미노산 부가, 치환, 또는 결실을 추가로 포함하는 것인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 T3 치환을 포함하는 것인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 22

제21항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 T3N 또는 T3A 치환을 포함하는 것인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 23

제22항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 T3N 치환을 포함하는 것인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 24

제23항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 S5 돌연변이를 추가로 포함하는 것인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 25

제24항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 S5T 돌연변이를 추가로 포함하는 것인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 26

제11항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc-융합체 단백질은 Fc 이량체를 포함하는 것인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 27

제26항에 있어서, 상기 Fc-융합체 단백질은 2개의 IL-2 돌연변이단백질을 포함하는 것인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 28

제26항에 있어서, 상기 Fc-융합체 단백질은 단일 IL-2 돌연변이단백질을 포함하는 것인, Fc-융합체 단백질.

#### 청구항 29

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 인간 IL-2 돌연변이단백질을 인코딩하는 분리된 핵산.

#### 청구항 30

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 인간 IL-2 돌연변이단백질 및 항체의 Fc 부분을 인코딩하는 분리된 핵산.

#### 청구항 31

제30항에 있어서, 항체의 상기 Fc 부분 및 인간 IL-2 돌연변이단백질은 단일 오픈 리딩 프레임 내에서 인코딩되는 것인, 분리된 핵산.

#### 청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 상기 Fc는 인간 IgG1 Fc인, 분리된 핵산.

#### 청구항 33

제32항에 있어서, 상기 인간 IgG1 Fc는 상기 Fc의 이펙터 기능을 변경하는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 것인, 분리된 핵산.

#### 청구항 34

제33항에 있어서, 상기 인간 IgG1은 N297에서의 치환을 포함하는 것인, 분리된 핵산.

#### 청구항 35

제32항에 있어서, 상기 N297에서의 치환은 N297G인, 분리된 핵산.

#### 청구항 36

제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 IgG Fc의 C-말단 리신의 치환 또는 결실을 인코딩하는 분리된 핵산.

#### 청구항 37

제36항에 있어서, 상기 인간 IgG Fc의 C-말단 리신은 결실된 것인, 분리된 핵산.

#### 청구항 38

제30항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 항체의 Fc 부분과 인간 IL-2 돌연변이단백질을 연결하는 링커를 추가로 인코딩하는, 분리된 핵산.

#### 청구항 39

제38항에 있어서, 상기 링커는 GGGGS(서열번호 5), GGNGT, 또는 (서열번호 6), 및 YGNGT(서열번호 7)인, 분리된 핵산.

#### 청구항 40

제39항에 있어서, 상기 링커는 GGGGS(서열번호 5)인, 분리된 핵산.

#### 청구항 41

제30항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물 세포에서 발현되는 경우, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 상기 IL-2 돌연변이단백질을 포함하는 단백질의 글리코실화를 변경하는 아미노산 부가, 치환, 또는 결실을 추가로 포함하는 것인, 분리된 핵산.

#### 청구항 42

제41항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 T3 치환을 포함하는 것인, 분리된 핵산.

#### 청구항 43

제42항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 T3N 또는 T3A 치환을 포함하는 것인, 분리된 핵산.

#### 청구항 44

제43항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 T3N 치환을 포함하는 것인, 분리된 핵산.

#### 청구항 45

제44항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 S5 돌연변이를 추가로 포함하는 것인, 분리된 핵산.

#### 청구항 46

제45항에 있어서, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 S5T 돌연변이를 추가로 포함하는 것인, 분리된 핵산.

#### 청구항 47

프로모터에 작동적으로 연결된 분리된 제29항 내지 제46항 중 어느 한 항의 분리된 핵산을 포함하는 발현 벡터.

#### 청구항 48

제29항 내지 제46항 중 어느 한 항의 분리된 핵산을 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 49

제48항에 있어서, 상기 분리된 핵산은 프로모터에 작동적으로 연결된 것인, 숙주 세포.

#### 청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 상기 숙주 세포는 원핵 세포인, 숙주 세포.

#### 청구항 51

제50항에 있어서, 상기 숙주 세포는 대장균인, 숙주 세포.

#### 청구항 52

제48항 또는 제49항에 있어서, 상기 숙주 세포는 진핵 세포인, 숙주 세포.

#### 청구항 53

제52항에 있어서, 상기 숙주 세포는 포유동물 세포인, 숙주 세포.

#### 청구항 54

제53항에 있어서, 상기 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주인, 숙주 세포.

#### 청구항 55

제48항 내지 제54항 중 어느 한 항의 숙주 세포를 상기 프로모터가 발현되는 조건 하에서 배양하는 단계 및 상기 배양물로부터 인간 IL-2 돌연변이단백질을 수확하는 단계를 포함하는, 인간 IL-2 돌연변이단백질의 제조 방법.

#### 청구항 56

제49항 내지 제54항 중 어느 한 항의 숙주 세포를 상기 프로모터가 발현되는 조건 하에서 배양하는 단계 및 상기 배양물로부터 Fc-융합체 단백질을 수확하는 단계를 포함하는, Fc-융합체 단백질의 제조 방법.

#### 청구항 57

T 세포의 개체군을 유효량의 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 인간 IL-2 돌연변이단백질과 접촉시키는 단계를 포함하는, T 세포 개체군 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 비-조절 T 세포의 비를 증가시키는 방법.

#### 청구항 58

제57항에 있어서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비가 증가되는 것인, 방법.

#### 청구항 59

제58항에 있어서, 상기 CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비가 적어도 50% 증가되는 것인, 방법.

#### 청구항 60

T 세포의 개체군을, 유효량의 제10항 내지 제28항 중 어느 한 항의 Fc-융합체 단백질과 접촉시키는 단계를 포함하는, T 세포 개체군 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 비-조절 T 세포의 비를 증가시키는 방법.

#### 청구항 61

제60항에 있어서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비가 증가되는 것인, 방법.

#### 청구항 62

제61항에 있어서, 상기 CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비가 적어도 50% 증가되는 것인, 방법.

#### 청구항 63

유효량의 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 인간 IL-2 돌연변이단백질을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 말초 혈액 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 비-조절 T 세포의 비를 증가시키는 방법.

#### 청구항 64

제63항에 있어서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비가 증가되는 것인, 방법.

#### 청구항 65

제64항에 있어서, 상기 CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비가 적어도 50% 증가되는 것인, 방법.

#### 청구항 66

유효량의 제10항 내지 제28항 중 어느 한 항의 Fc-융합체 단백질을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 말초 혈액 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 비-조절 T 세포의 비를 증가시키는 방법.

#### 청구항 67

제66항에 있어서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비가 증가되는 것인, 방법.

#### 청구항 68

제67항에 있어서, 상기 CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비가 적어도 50% 증가되는 것인, 방법.

#### 청구항 69

유효량의 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 인간 IL-2 돌연변이단백질을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 말초 혈액 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 자연 살해(NK) 세포의 비를 증가시키는 방법.

#### 청구항 70

제69항에 있어서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD56 및/또는 CD16을 발현하는 CD3-CD19-림프구의 비가 증가되는 것인, 방법.

#### 청구항 71

제70항에 있어서, 상기 CD3+FoxP3+ 세포 대 CD56 및/또는 CD16을 발현하는 CD3-CD19-림프구의 비가 적어도 50% 증가되는 것인, 방법.

#### 청구항 72

유효량의 제10항 내지 제28항 중 어느 한 항의 Fc-융합체 단백질을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 말초 혈액 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 자연 살해(NK) 세포의 비를 증가시키는 방법.

#### 청구항 73

제72항에 있어서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD56 및/또는 CD16을 발현하는 CD3-CD19-림프구의 비가 증가되는 것인, 방법.

#### 청구항 74

제73항에 있어서, 상기 CD3+FoxP3+ 세포 대 CD56 및/또는 CD16을 발현하는 CD3-CD19-림프구의 비가 적어도 50% 증가되는 것인, 방법.

#### 청구항 75

치료 유효량의 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 IL-2 돌연변이단백질을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 또는 자가면역 질환을 갖는 대상체의 치료 방법.

#### 청구항 76

치료 유효량의 제10항 내지 제25항 중 어느 한 항의 Fc-융합체 단백질을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는,



염증성 또는 자가면역 질환을 갖는 대상체의 치료 방법.

#### 청구항 77

제75항 또는 제76항에 있어서, 투여가 질환의 적어도 하나의 증상을 감소시키는 것인, 염증성 또는 자가면역 질환을 갖는 대상체의 치료 방법.

#### 청구항 78

제77항에 있어서, 투여 후 대상체의 말초 혈액 내 조절 T 세포(Treg) 대 비-조절 T 세포의 비가 증가되는 것인, 방법.

#### 청구항 79

제77항에 있어서, 대상체의 말초 혈액 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 비-조절 T 세포의 비는 투여 후 본질적으로 동일하게 유지되는 것인, 방법.

#### 청구항 80

제75항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 염증성 또는 자가면역 질환은 루푸스(lupus), 이식편 대 숙주 질환, C형 간염-유도 혈관염, 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 원형 탈모증, 죽상동맥경화증, 건선, 장기 이식 거부반응, 쇼그렌 증후군, 베체트병, 자발성 임신 손실, 아토피 질환, 천식, 또는 염증성 장질환인, 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 8월 13일 출원된 미국 특허 출원 일련번호 62/886,283의 이익을 주장하며, 이는 본 명세서에서 그 전체로 참고로 포함된다.

#### 배경 기술

[0003] IL-2는 3개의 막관통 수용체 서브유닛, IL-2 결합시 세포내 신호전달 사건을 함께 활성화하는 IL-2R $\beta$  및 IL-2R $\gamma$ , 및 IL-2와 IL-2R $\beta$   $\gamma$  사이의 상호작용을 안정화하는 역할을 하는 CD25(IL-2R $\alpha$ )에 결합한다. IL-2R $\beta$   $\gamma$ 에 의해 전달된 신호는 PI3-키나제, Ras-MAP-키나제, 및 STAT5 경로의 신호들을 포함한다.

[0004] T 세포는 통상적으로 조직 내에 존재하는 낮은 농도의 IL-2에 반응하기 위해 CD25의 발현을 필요로 한다. CD25를 발현하는 T 세포는, 자가면역 염증을 억제하는 데 필수적인 FOXP3+ 조절 T 세포(Treg 세포) 및 활성화되어 CD25를 발현하는 FOXP3- T 세포를 모두 포함한다. FOXP3- CD25+ T 이펙터 세포(Teff)는 CD4+ 또는 CD8+ 세포 중 어느 하나일 수 있으며, 이들 모두는 염증, 자가면역, 장기 이식 거부반응, 또는 이식편 대 숙주 질환에 기여할 수 있다. IL-2-자극된 STAT5 신호전달은 정상적인 T-reg 세포 성장 및 생존, 및 높은 FOXP3 발현에 중요하다.

[0005] 공동 소유인 WO 2010/085495에서, 본 발명자들은 Treg 세포들을 우선적으로 확장 또는 자극하기 위한 IL-2 돌연변이단백질의 이용을 기재한다. 대상체에게 투여할 때, Treg 세포에 대한 효과는 염증성 및 자가면역 질환의 치료에 유용하다. 거기 기재된 IL-2 돌연변이단백질은 생체 내에서 Teff 세포보다 Treg를 확장시키는 데 유용하지만, 이는 인간 치료에 최적인 속성을 갖는 IL-2 돌연변이단백질을 제조하는데 바람직하였다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

#### 과제의 해결 수단

[0006] 높은 수율로 제조가능하고, 약리학적 활성을 갖는 IL-2 돌연변이단백질이 본 명세서에서 설명된다. 구체적으로,

본 발명의 IL-2 돌연변이단백질은 개선된Treg:Teff 선택성 범위를 갖는다. 인간 치료제로서의 이용을 위한 그러한 분자를 생산하기 위한 노력에서, 다수의 예상치 않고, 예기치 못한 관찰들이 발생되었다. 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 그러한 노력의 결과이다.

[0007] 본 명세서에 기재된 IL-2 돌연변이단백질은 IL-2 돌연변이단백질 및/또는 내생의 IL-2에 대해 면역 반응을 생성하는 가능성이 비교적 낮고, Treg 우선 확장 및 활성화를 제공한다. 나아가 특정 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은, 분자, 예를 들어 항체 Fc에 융합되며, 이는 대상체에게 투여되는 경우 혈청 반감기를 증가시킨다. IL-2 돌연변이단백질은 짧은 혈청 반감기(피하주사의 경우 3 내지 5시간)를 갖는다. 본 명세서에 기재된 예시적인 IL-2 돌연변이단백질 Fc 융합물은 인간에서 적어도 1일, 적어도 3일, 적어도 5일, 적어도 10일, 적어도 15일, 적어도 20일 또는 적어도 25일의 반감기를 갖는다. IL-2 돌연변이단백질의 약물동력학 상에서의 효과는 IL-2 돌연변이단백질 치료제의 감소된 또는 덜 빈번한 투약을 가능하게 한다.

[0008] 나아가, 거대 약학 분자를 만드는 경우, 분자의 응집은 최소화하고 안정성은 최대화하면서 거대 분자를 많은 양으로 생산하는 능력이 고려되어야만 한다. IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 분자는 그러한 속성들을 보인다.

[0009] 부가적으로, 특정 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질은 IgG1 Fc 영역을 함유한다. IgG1의 이펙터 기능(예를 들어, ADCC 활성)을 없애는 것이 바람직한 경우, 297번 위치에서 아스파라긴의 글리신으로의 돌연변이(N297G; EU 번호부여 방식)는 비글리코실화 IgG1 Fc를 야기하는 다른 돌연변이에 비해 크게 개선된 정제 효율 및 생물물리학적 특성을 제공하였음이 발견되었다. 바람직한 구현예에서, 시스템은 Fc 내로 조작되어 디설파이드 결합을 가능하게 하며, 이는 비글리코실화된(aglycosylated) Fc-함유 분자의 안정성을 증가시켰다. 비글리코실화된 Fc의 유용성은 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 맥락을 넘어선다. 이에 따라, N297G 치환 및 선택적으로 하나 이상의 추가의 잔기의 시스템으로의 치환을 포함하는, Fc-함유 분자, Fc-융합 및 항체가 본 명세서에서 제공된다.

[0010] 일 양태에서, 본 발명은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 인간 인터류킨-2(IL-2) 돌연변이단백질을 제공하고, 상기 IL-2 돌연변이단백질은 V91K,D20L; D84R,E61Q; V91K,D20A,E61Q,M104T; N88K,M104L; V91H,M104L; V91K,H16E,M104V; V91K,H16R,M104V; V91K,H16R,M104T; V91K,D20A,M104T; V91K,H16E,M104T; V91K,H16E,E61Q,M104T; V91K,H16R,E61Q,M104T; V91K,H16E; V91H,D20A,M104T; H16E,V91H,M104V; V91H,D20A,E61Q,M104T; V91H,H16R,E16Q; V91K,D20A,M104V; H16E,V91H; V91H,D20A,M104V; H16E,V91H,M104T; H16E,V91H,E61Q,M104T; V91K,E61Q,H16E; V91K,H16R,M104L; H16E,V91H,E16Q; V91K,E61Q,H16R; D20W,V91K,E61Q; V91H,H16R; V91K,H16R; D20W,V91K,E61Q,M104T; V91K,D20A; V91H,D20A,E16Q; V91K,D20A,M104L; V91H,D20A; V91K,E61Q,D20A; V91H,M104T; V91H,M104V; V91K,E61Q; V91K,N88K,E61Q,M104T; V91K,N88K,E61Q; V91H,E61Q; V91K,N88K; D20A,H16E,M104T; D20A,M104T; H16E,N88K; D20A,M104V; D20A,M104L; H16E,M104T; H16E,M104V; N88K,M104V; N88K,E61Q; D20A,E61Q; H16R,D20A; D20W,E61Q; H16E,E61Q; H16E,M104L; N88K,M104T; D20A,H16E; D20A,H16E,E16Q; D20A,H16R,E16Q; V91K,D20W; V91A,H16A; V91A,H16D; V91A,H16E; V91A,H16S; V91E,H16A; V91E,H16D; V91E,H16E; V91E,H16S; V91K,H16A; V91K,H16D; V91K,H16S; 및 V91S,H16E로부터 선택되는 적어도 하나의 돌연변이를 갖고; 시험관 내 분석 및 인간화 마우스들(CD34+ 조혈모세포로 재구성된 NSG 마우스들) 모두에서 다른 T 세포 또는 NK 세포에 비해 T 조절 세포를 우선적으로 자극한다. 일 구현예에서, 상기 돌연변이단백질은 서열번호 1에 제시된 아미노산과 적어도 95% 동일하다. 또 다른 구현예에서, 상기 돌연변이단백질은 서열번호 1에 제시된 아미노산과 적어도 97% 동일하다. 또 다른 구현예에서, 상기 돌연변이단백질의 아미노산 서열은 서열번호 1에 제시된 아미노산 서열과 C125A, 및 V91K,D20L; D84R,E61Q; V91K,D20A,E61Q,M104T; N88K,M104L; V91H,M104L; V91K,H16E,M104V; V91K,H16R,M104V; V91K,H16R,M104T; V91K,D20A,M104T; V91K,H16E,M104T; V91K,H16E,E61Q,M104T; V91K,H16R,E61Q,M104T; V91K,H16E; V91H,D20A,M104T; H16E,V91H,M104V; V91H,D20A,E61Q,M104T; V91H,H16R,E16Q; V91K,D20A,M104V; H16E,V91H; V91H,D20A,M104V; H16E,V91H,M104T; H16E,V91H,E61Q,M104T; V91K,E61Q,H16E; V91K,H16R,M104L; H16E,V91H,E16Q; V91K,E61Q,H16R; D20W,V91K,E61Q; V91H,H16R; V91K,H16R; D20W,V91K,E61Q,M104T; V91K,D20A; V91H,D20A,E16Q; V91K,D20A,M104L; V91H,D20A; V91K,E61Q,D20A; V91H,M104T; V91H,M104V; V91K,E61Q; V91K,N88K,E61Q,M104T; V91K,N88K,E61Q; V91H,E61Q; V91K,N88K; D20A,H16E,M104T; D20A,M104T; H16E,N88K; D20A,M104V; D20A,M104L; H16E,M104T; H16E,M104V; N88K,M104V; N88K,E61Q; D20A,E61Q; H16R,D20A; D20W,E61Q; H16E,E61Q; H16E,M104L; N88K,M104T; D20A,H16E; D20A,H16E,E16Q; D20A,H16R,E16Q; V91K,D20W; V91A,H16A; V91A,H16D; V91A,H16E; V91A,H16S; V91E,H16A; V91E,H16D; V91E,H16E; V91E,H16S; V91K,H16A; V91K,H16D; V91K,H16S; 및 V91S,H16E로부터 선택되는 적어도 하나의 위치에서만 상이하다.

[0011] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 Fc 및 인간 IL-2 돌연변이단백질을 포함하는 Fc-융합체 단

백질을 제공한다. 일 구현예에서, Fc는 인간 IgG1 Fc이다. 또 다른 구현예에서, 인간 IgG1 Fc는 상기 Fc의 이펙터 기능을 변경하는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 IgG1은 N297에서의 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, N297에서의 치환은 N297G이다. 또 다른 구현예에서, Fc-융합체 단백질은 상기 인간 IgG Fc의 C-말단 리신의 치환 또는 결실을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 인간 IgG Fc의 C-말단 리신은 결실된다. 또 다른 구현예에서, 링커는 상기 단백질의 Fc 및 인간 IL-2 돌연변이단백질 부분을 연결한다. 또 다른 구현예에서, 링커는 GGGGS(서열번호 5), GGNGT, 또는 (서열번호 6), 및 YGNGT(서열번호 7)이다. 또 다른 구현예에서, 링커는 GGGGS(서열번호 5)이다. 또 다른 구현예에서, 포유동물 세포에서 발현되는 경우, IL-2 돌연변이단백질은 상기 Fc-융합체 단백질의 글리코실화를 변경하는 아미노산 부가, 치환, 또는 결실을 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은 T3 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은 T3N 또는 T3A 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은 T3N 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은 S5 돌연변이를 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은 S5T 돌연변이를 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 Fc-융합체 단백질은 Fc 이량체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 Fc-융합체 단백질은 두 개의 IL-2 돌연변이단백질을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 Fc-융합체 단백질은 단일 IL-2 돌연변이단백질을 포함한다.

[0012] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 인간 IL-2 돌연변이단백질을 인코딩하는 분리된 핵산을 제공한다.

[0013] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 항체의 Fc 부분 및 인간 IL-2 돌연변이단백질을 인코딩하는 분리된 핵산을 제공한다. 일 구현예에서, 상기 항체의 Fc 부분 및 인간 IL-2 돌연변이단백질은 단일 오픈-리딩 프레임 내에서 인코딩된다. 또 다른 구현예에서, Fc는 인간 IgG1 Fc이다. 또 다른 구현예에서, 인간 IgG1 Fc는 상기 Fc의 이펙터 기능을 변경하는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인간 IgG1은 N297에서의 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, N297에서의 치환은 N297G이다. 또 다른 구현예에서, 핵산은 상기 인간 IgG Fc의 C-말단 리신의 치환 또는 결실을 인코딩한다. 또 다른 구현예에서, 상기 인간 IgG Fc의 C-말단 리신은 결실된다. 또 다른 구현예에서, 핵산은 항체의 Fc 부분과 인간 IL-2 돌연변이단백질을 연결하는 링커를 추가로 인코딩한다. 또 다른 구현예에서, 링커는 GGGGS(서열번호 5), GGNGT, 또는 (서열번호 6), 및 YGNGT(서열번호 7)이다. 또 다른 구현예에서, 링커는 GGGGS(서열번호 5)이다. 또 다른 구현예에서, 포유동물 세포에서 발현되는 경우, IL-2 돌연변이단백질은 상기 IL-2 돌연변이단백질을 포함하는 단백질의 글리코실화를 변경하는 아미노산 부가, 치환, 또는 결실을 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은 T3 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은 T3N 또는 T3A 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은 T3N 치환을 포함한다. 또 다른 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은 S5 돌연변이를 추가로 포함한다. 또 다른 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은 S5T 돌연변이를 추가로 포함한다.

[0014] 또 다른 양태에서, 본 발명은 프로모터에 작동적으로 연결된 상기 기재된 분리된 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다.

[0015] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 기재된 분리된 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일 구현예에서, 분리된 핵산은 프로모터에 작동적으로 연결된다. 또 다른 구현예에서, 상기 숙주 세포는 원핵 세포이다. 또 다른 구현예에서, 상기 숙주 세포는 대장균이다. 또 다른 구현예에서, 상기 숙주 세포는 진핵 세포이다. 또 다른 구현예에서, 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 또 다른 구현예에서, 숙주 세포는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주이다.

[0016] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 숙주 세포를 상기 프로모터가 발현되는 조건 하에서 배양하는 단계 및 상기 배양물로부터 인간 IL-2 돌연변이단백질을 수확하는 단계를 포함하는, 인간 IL-2 돌연변이단백질의 제조 방법을 제공한다.

[0017] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 숙주 세포를 상기 프로모터가 발현되는 조건 하에서 배양하는 단계 및 상기 배양물로부터 Fc-융합체 단백질을 수확하는 단계를 포함하는, Fc-융합체 단백질의 제조 방법을 제공한다.

[0018] 또 다른 양태에서, 본 발명은 T 세포의 개체군을 상기 기재된 바와 같은 인간 IL-2 돌연변이단백질의 유효량과 접촉시키는 단계를 포함하는, T 세포 개체군 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 비-조절 T 세포의 비를 증가시키는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비는 증가한다. 또 다른 구현예에서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비는 적어도 50% 증가한다.

[0019] 또 다른 양태에서, 본 발명은 T 세포의 개체군을 상기 기재된 바와 같은 Fc-융합체 단백질의 유효량과 접촉시키

는 단계를 포함하는, T 세포 개체군 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 비-조절 T 세포의 비를 증가시키는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비는 증가한다. 또 다른 구현예에서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비는 적어도 50% 증가한다.

[0020] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 인간 IL-2 돌연변이단백질의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 말초 혈액 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 비-조절 T 세포의 비를 증가시키는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비는 증가한다. 또 다른 구현예에서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비는 적어도 50% 증가한다.

[0021] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 Fc-융합체 단백질의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 말초 혈액 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 비-조절 T 세포의 비를 증가시키는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비는 증가한다. 또 다른 구현예에서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD3+FoxP3-의 비는 적어도 50% 증가한다.

[0022] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 기재된 바와 같은 인간 IL-2 돌연변이단백질의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 말초 혈액 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 자연 살해(NK) 세포의 비를 증가시키는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD56 및/또는 CD16을 발현하는 CD3-CD19-림프구의 비는 증가한다. 또 다른 구현예에서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD56 및/또는 CD16을 발현하는 CD3-CD19-림프구의 비는 적어도 50% 증가한다.

[0023] 또 다른 양태에서, 본 발명은, 상기 기재된 바와 같은 Fc-융합체 단백질의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 말초 혈액 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 자연 살해(NK) 세포의 비를 증가시키는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD56 및/또는 CD16을 발현하는 CD3-CD19-림프구의 비는 증가한다. 또 다른 구현예에서, CD3+FoxP3+ 세포 대 CD56 및/또는 CD16을 발현하는 CD3-CD19-림프구의 비는 적어도 50% 증가한다.

[0024] 또 다른 양태에서, 본 발명은 염증성 또는 자가면역 질환을 갖는 대상체의 치료 방법을 제공하며, 상기 방법은 상기 기재된 바와 같은 IL-2 돌연변이단백질의 치료 유효량 또는 상기 기재된 바와 같은 Fc-융합체 단백질의 치료 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 투여는 질환의 적어도 하나의 증상을 감소시킨다. 또 다른 구현예에서, 투여 후 대상체의 말초 혈액 내 조절 T 세포(Treg) 대 비-조절 T 세포의 비는 증가한다. 또 다른 구현예에서, 투여 후 대상체의 말초 혈액 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 비-조절 T 세포의 비는 본질적으로 동일하게 유지된다. 또 다른 구현예에서, 염증성 또는 자가면역 질환은 루푸스(lupus), 이식편 대 숙주 질환, C형 간염-유도 혈관염, 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 다발성 경화증, 류마티스 관절염, 원형 탈모증, 죽상동맥경화증, 건선, 장기 이식 거부반응, 쇼그렌 증후군, 베체트병, 자발성 임신 손실, 아토피 질환, 천식, 또는 염증성 장질환이다.

## 도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 SEC 크로마토그래피에 의해 측정된 40°C에서 10일의 안정성을 갖는 IL-2 돌연변이단백질의 DSC T<sub>m</sub> 측정 결과를 나타낸다.

도 2는 시험관 내 pSTAT5 분석에서 3개의 약화된 돌연변이단백질, H16R, V91K D20A M104V, D20W, 및 대조군, 야생형 인간 IL-2.Fc, 재조합 인간 IL-2, 및 재조합 마우스 IL-2에 대한 용량 적정 곡선을 나타낸다.

도 3은 마우스에서 생체 내 활성에 대해 인간 IL-2 돌연변이단백질 V91K D20A M104V, H16R, D20W, 및 대조군 야생형 IL-2.Fc의 평가를 나타낸다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 명세서에 사용된 섹션 제목은 단지 구조화 목적으로, 기재되는 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 본 명세서 내용 중 언급된 모든 참고문헌은 명시적으로 그 전체로서 참고로 포함된다.

[0027] 표준 기법이 재조합 DNA, 올리고뉴클레오타이드 합성, 조직 배양 및 형질전환, 단백질 정제, 등에 사용될 수 있다. 효소 반응 및 정제 기법은 제조자 설명에 따라, 또는 당업계에서 일반적으로 달성되는 바와 같이, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 다음 절차 및 기법은 당업계에서 알려진 통상의 방법에 따라, 그리고 본 명세서에 전반에 걸쳐 언급되고 논의된 각종 일반적이고 보다 구체적인 참고문헌에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 예를 들어, 임의의 목적을 위해 본 명세서에 참고로 포함된, 문헌 [Sambrook *et al.*, 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring



Harbor, N.Y.]을 참고한다. 특정 정의가 제공되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 분석 화학, 유기 화학, 및 의학 화학과 관련되어 사용된 명명법, 및 이의 실험실 절차 및 기법은 당업계에 잘 알려져 있고 일반적으로 사용되는 것들이다. 표준 기법은 화학 합성, 화학 분석, 약학 제제, 제형 및 환자의 전달 및 치료에 사용될 수 있다.

## [0028] IL-2

본 명세서에 기재된 IL-2 돌연변이단백질은 야생형 인간 IL-2의 변이체이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은, "야생형 인간 IL-2", "야생형 IL-2", 또는 "WT IL-2"는 다음 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 의미할 것이다:

APTSSTSKTKQLQLLEHLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELKHLCLEELKPLEEVNLQAQSKNF  
HLRPRDLISINIVLELKGSETTFMCEYADETATVEFLNRWITFXQSIISTLT

여기서, X는 C, S, V, 또는 A(서열번호 2)이다.

변이체는 야생형 IL-2 아미노산 서열 내 하나 이상의 치환, 결실 또는 삽입을 함유할 수 있다. 잔기는 본 명세서에서 1문자 아미노산 코드에 뒤이은 IL-2 아미노산 위치로 표시되며, 예를 들어, K35는 서열번호 2의 위치 35에서의 리신 잔기이다. 치환은 본 명세서에서 1문자 아미노산 코드에 뒤이은 IL-2 아미노산 위치에 이어 치환하는 1문자 아미노산 코드로 표시되며, 예를 들어, K35A는 서열번호 2의 35번 위치에서의 리신 잔기의 알라닌 잔기로의 치환이다.

## [0033] IL-2 돌연변이단백질

인간 IL-2 돌연변이단백질 및 조절(Treg) 세포를 우선적으로 자극하는 항-IL-2 항체가 본 명세서에서 제공된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "T 조절 세포를 우선적으로 자극한다"는, 상기 돌연변이단백질 또는 항체가 CD3+FoxP3- T 세포보다 CD3+FoxP3+ T의 증식, 생존, 활성화 및/또는 기능을 촉진시킴을 의미한다. Treg를 우선적으로 자극하는 능력의 측정 방법은 말초 혈액 백혈구의 유세포 분석에 의해 측정될 수 있으며, 여기서 총 CD4+ T 세포들 중 FOXP3+CD4+ T 세포의 백분율에서의 관찰된 증가, 총 CD8+ T 세포들 중 FOXP3+CD8+ T 세포들의 백분율에서의 증가, NK 세포들에 비해 FOXP3+ T 세포의 백분율에서의 증가, 및/또는 다른 T 세포 상에서의 CD25 발현의 증가에 비해 FOXP3+ T 세포의 표면 상에서 CD25의 발현 수준에서의 더 큰 증가가 있다. Treg 세포의 우선적인 성장은 또한, 전혈로부터 추출된 DNA에서 탈메틸화된 CD3 유전자에 비해 탈메틸화된 FOXP3 프로모터 DNA(즉, Treg-특이적 탈메틸화된 영역, 또는 TSDR)의 증가된 표시(representation)로서 탐지될 수 있으며, 이는 바이설파이트-처리된 유전체 DNA로부터의 중합효소 연쇄 반응(PCR) 산물의 서열결정에 의해 검출된다(문헌 [J. Sehouli, et al. 2011. Epigenetics 6:2, 236-246]). 구체적으로, 본 발명의 IL-2 돌연변이단백질은 증진된 Treg:Teff 범위를 가지며, 즉 이들은 Teff 세포에서 현저한 약화를 나타내면서 Treg 세포에서 높은 수준의 활성을 보유하였다. 활성화된 Teff 세포는 CD25를 증가된 수준으로 발현하고, 자가면역 및 염증성 질환을 갖는 환자들은 이들 세포들의 증가된 수를 갖기 때문에, 본 발명자들은 환자에서 CD25 발현에서의 더 현실적인 분화를 모방하기 위하여 Teff 세포들 상에서 CD25+-게이팅(gating)을 적용하였다.

Treg 세포를 우선적으로 자극하는 IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은 대상에서 또는 말초 혈액 샘플에서 CD3+FoxP3- T 세포에 대한 CD3+FoxP3+ T 세포의 비를 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 150%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 적어도 600%, 적어도 700%, 적어도 800%, 적어도 900%, 또는 적어도 1000% 증가시킨다.

일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 1 nM IL-2 처리에서 T 이펙터 세포의 50% 미만의 pSTAT 활성화를 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 1 nM IL-2 처리에서 T 이펙터 세포의 40% 미만의 pSTAT 활성화를 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 1 nM IL-2 처리에서 T 이펙터 세포의 30% 미만의 pSTAT 활성화를 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 1 nM IL-2 처리에서 T 이펙터 세포의 20% 미만의 pSTAT 활성화를 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 1 nM IL-2 처리에서 T 이펙터 세포의 10% 미만의 pSTAT 활성화를 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 2의 프로토콜을 이용하여, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 초과 10일 안정성을 또한 갖는다.

일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 200

nM IL-2 처리에서 T 이펙터 세포의 50% 미만의 pSTAT 활성화를 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 200 nM IL-2 처리에서 T 이펙터 세포의 40% 미만의 pSTAT 활성화를 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 200 nM IL-2 처리에서 T 이펙터 세포의 30% 미만의 pSTAT 활성화를 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 200 nM IL-2 처리에서 T 이펙터 세포의 20% 미만의 pSTAT 활성화를 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 200 nM IL-2 처리에서 T 이펙터 세포의 10% 미만의 pSTAT 활성화를 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 2의 프로토콜을 이용하여, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 초과 10일 안정성을 또한 갖는다.

[0038] 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 1 nM IL-2 처리에서 T 조절 세포의 30% 초과 10일 안정성을 또한 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 1 nM IL-2 처리에서 T 조절 세포의 40% 초과 10일 안정성을 또한 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 1 nM IL-2 처리에서 T 조절 세포의 50% 초과 10일 안정성을 또한 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 1 nM IL-2 처리에서 T 조절 세포의 60% 초과 10일 안정성을 또한 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 1 nM IL-2 처리에서 T 조절 세포의 70% 초과 10일 안정성을 또한 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 2의 프로토콜을 이용하여, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 초과 10일 안정성을 또한 갖는다.

[0039] 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 200 nM IL-2 처리에서 T 조절 세포의 30% 초과 10일 안정성을 또한 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 200 nM IL-2 처리에서 T 조절 세포의 40% 초과 10일 안정성을 또한 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 200 nM IL-2 처리에서 T 조절 세포의 50% 초과 10일 안정성을 또한 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 200 nM IL-2 처리에서 T 조절 세포의 60% 초과 10일 안정성을 또한 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 1의 프로토콜을 이용하여, 200 nM IL-2 처리에서 T 조절 세포의 70% 초과 10일 안정성을 또한 갖는다. 일부 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 이의 Fc-융합체 단백질은, 실시예 2의 프로토콜을 이용하여, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 90% 초과 10일 안정성을 또한 갖는다.

[0040] IL-2 돌연변이단백질의 예들은 이에 한정되지는 않지만, 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열에서, V91K,D20L; D84R,E61Q; V91K,D20A,E61Q,M104T; N88K,M104L; V91H,M104L; V91K,H16E,M104V; V91K,H16R,M104V; V91K,H16R,M104T; V91K,D20A,M104T; V91K,H16E,M104T; V91K,H16E,E61Q,M104T; V91K,H16R,E61Q,M104T; V91K,H16E; V91H,D20A,M104T; H16E,V91H,M104V; V91H,D20A,E61Q,M104T; V91H,H16R,E16Q; V91K,D20A,M104V; H16E,V91H; V91H,D20A,M104V; H16E,V91H,M104T; H16E,V91H,E61Q,M104T; V91K,E61Q,H16E; V91K,H16R,M104L; H16E,V91H,E16Q; V91K,E61Q,H16R; D20W,V91K,E61Q; V91H,H16R; V91K,H16R; D20W,V91K,E61Q,M104T; V91K,D20A; V91H,D20A,E16Q; V91K,D20A,M104L; V91H,D20A; V91K,E61Q,D20A; V91H,M104T; V91H,M104V; V91K,E61Q; V91K,N88K, E61Q,M104T; V91K,N88K,E61Q; V91H,E61Q; V91K,N88K; D20A,H16E,M104T; D20A,M104T; H16E,N88K; D20A,M104V; D20A,M104L; H16E,M104T; H16E,M104V; N88K,M104V; N88K,E61Q; D20A,E61Q; H16R,D20A; D20W,E61Q; H16E,E61Q; H16E,M104L; N88K,M104T; D20A,H16E; D20A,H16E,E16Q; D20A, H16R,E16Q; V91K,D20W; V91A,H16A; V91A,H16D; V91A,H16E; V91A,H16S; V91E,H16A; V91E,H16D; V91E,H16E; V91E,H16S; V91K,H16A; V91K,H16D; V91K,H16S; 및/또는 V91S,H16E 치환(들)을 포함하는 IL-2 돌연변이단백질을 포함한다. 본 발명의 IL-2 돌연변이단백질은 C125A 치환을 선택적으로 포함한다. 야생형 IL-2 서열에 대한 추가의 돌연변이의 수를 감소시키는 것이 유리할 수 있지만, 본 발명은 V91K,D20L; D84R,E61Q; V91K,D20A,E61Q,M104T; N88K,M104L; V91H,M104L; V91K,H16E,M104V; V91K,H16R,M104V; V91K,H16R,M104T; V91K,D20A,M104T; V91K,H16E,M104T; V91K,H16E,E61Q,M104T; V91K,H16R,E61Q,M104T; V91K,H16E; V91H,D20A,M104T; H16E,V91H,M104V; V91H,D20A,E61Q,M104T; V91H,H16R,E16Q; V91K,D20A,M104V; H16E,V91H; V91H,D20A,M104V; H16E,V91H,M104T; H16E,V91H,E61Q,M104T; V91K,E61Q,H16E; V91K,H16R,M104L; H16E,V91H,E16Q; V91K,E61Q,H16R; D20W,V91K,E61Q; V91H,H16R; V91K,H16R; D20W,V91K,E61Q,M104T; V91K,D20A; V91H,D20A,E16Q; V91K,D20A,M104L; V91H,D20A; V91K,E61Q,D20A; V91H,M104T; V91H,M104V; V91K,E61Q; V91K,N88K,E61Q,M104T; V91K,N88K,E61Q; V91H,E61Q; V91K,N88K; D20A,H16E,M104T; D20A,M104T; H16E,N88K; D20A,M104V; D20A,M104L; H16E,M104T; H16E,M104V;

N88K,M104V; N88K,E61Q; D20A,E61Q; H16R,D20A; D20W,E61Q; H16E,E61Q; H16E,M104L; N88K,M104T; D20A,H16E; D20A,H16E,E16Q; D20A,H16R,E16Q; V91K,D20W; V91A,H16A; V91A,H16D; V91A,H16E; V91A,H16S; V91E,H16A; V91E,H16D; V91E,H16E; V91E,H16S; V91K,H16A; V91K,H16D; V91K,H16S; 및/또는 V91S,H16E 치환에 추가하여 절단 및/또는 부가적인 삽입, 결실 및/또는 치환도 또한 포함하는 IL-2 돌연변이단백질을 포함하고, 단 상기 돌연변이단백질은 Treg를 우선적으로 자극하는 활성을 유지한다. 이에 따라, 구체에는 Treg 세포를 우선적으로 자극하고, V91K,D20L; D84R,E61Q; V91K,D20A,E61Q,M104T; N88K,M104L; V91H,M104L; V91K,H16E,M104V; V91K,H16R,M104V; V91K,H16R,M104T; V91K,D20A,M104T; V91K,H16E,M104T; V91K,H16E,E61Q,M104T; V91K,H16R,E61Q,M104T; V91K,H16E; V91H,D20A,M104T; H16E,V91H,M104V; V91H,D20A,E61Q,M104T; V91H,H16R,E16Q; V91K,D20A,M104V; H16E,V91H; V91H,D20A,M104V; H16E,V91H,M104T; H16E,V91H,E61Q,M104T; V91K,E61Q,H16E; V91K,H16R,M104L; H16E,V91H,E16Q; V91K,E61Q,H16R; D20W,V91K,E61Q; V91H,H16R; V91K,H16R; D20W,V91K,E61Q,M104T; V91K,D20A; V91H,D20A,E16Q; V91K,D20A,M104L; V91H,D20A; V91K,E61Q,D20A; V91H,M104T; V91H,M104V; V91K,E61Q; V91K,N88K,E61Q,M104T; V91K,N88K,E61Q; V91H,E61Q; V91K,N88K; D20A,H16E,M104T; D20A,M104T; H16E,N88K; D20A,M104V; D20A,M104L; H16E,M104T; H16E,M104V; N88K,M104V; N88K,E61Q; D20A,E61Q; H16R,D20A; D20W,E61Q; H16E,E61Q; H16E,M104L; N88K,M104T; D20A,H16E; D20A,H16E,E16Q; D20A,H16R,E16Q; V91K,D20W; V91A,H16A; V91A,H16D; V91A,H16E; V91A,H16S; V91E,H16A; V91E,H16D; V91E,H16E; V91E,H16S; V91K,H16A; V91K,H16D; V91K,H16S; 및/또는 V91S,H16E 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하고, 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 IL-2 돌연변이단백질을 포함한다. 특히 바람직한 구현예에서, 그러한 IL-2 돌연변이단백질은 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0041] 아미노산 서열의 경우, 서열 상동성 및/또는 유사성은 이에 한정되지는 않지만, 문헌 [Smith and Waterman, 1981, *Adv. Appl. Math.* 2:482]의 국소 서열 동일성 알고리즘, 문헌 [Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443]의 서열 동일성 배열 알고리즘, 문헌 [Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444]의 유사성 방법에 대한 탐구, 이들 알고리즘의 컴퓨터화된 도구(Genetics Computer Group(미국 위스콘신주 매디슨, 575 사이언스 드라이브 소재)의 Wisconsin Genetics Software Package에서의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA), 문헌 [Devereux *et al.*, 1984, *Nucl. Acid Res.* 12:387-395]에 기재된 Best Fit 서열 프로그램 등을 포함하는 당업계에서 알려진 표준 기법을 이용함으로써, 바람직하게는 디폴트 세팅을 이용하거나 또는 검사에 의해 결정된다. 바람직하게는, 동일성 백분율은 다음 파라미터들을 기본으로 하여 FastDB에 의해 계산된다: 미스매치 페널티(mismatch penalty) 1; 갭 페널티 1; 갭 크기 페널티 0.33; 및 접합 페널티 30(문헌 ["Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc.]).

[0042] 유용한 알고리즘의 예는 PILEUP이다. PILEUP는 점진적이고 쌍을 이룬 배열을 이용하여 관련 서열의 군으로부터 다중 서열 배열을 만든다. 이는 또한 이 배열을 만드는 데 사용된 클러스터링(clustering) 관계를 나타내는 계도(tree)를 플롯팅할 수 있다. PILEUP는 문헌 [Feng & Doolittle, 1987, *J. Mol. Evol.* 35:351-360]의 점진적 배열 방법의 단순화를 이용하며; 이 방법은 문헌 [Higgins and Sharp, 1989, *CABIOS* 5:151-153]에 기재된 것과 유사하다. 유용한 PILEUP 파라미터는 디폴트 갭 가중(weight) 3.00, 디폴트 갭 길이 가중 0.10, 및 가중된 말단 갭을 포함한다.

[0043] 유용한 알고리즘의 또 다른 예는 BLAST 알고리즘으로, 이는 문헌 [Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-410]; [Altschul *et al.*, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402]; 및 [Karin *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:5873-5878]에 기재되어 있다. 특히 유용한 BLAST 프로그램은 WU-BLAST-2 프로그램으로, 이는 문헌 [Altschul *et al.*, 1996, *Methods in Enzymology* 266:460-480]으로부터 취득되었다. WU-BLAST-2는 대부분이 디폴트 값으로 설정된 몇몇 검색 파라미터를 이용한다. 조정가능한 파라미터는 다음 값들을 이용하여 설정된다: 오버랩 스패ן(overlap span)=1, 오버랩 프랙션(overlap fraction)=0.125, 워드 역치(word threshold) (T)=11. HSP S 및 HSP S2 파라미터는 동적인 값으로, 관심 대상의 서열이 검색되는 특정 데이터베이스의 조성 및 특정 서열의 조성에 따라 프로그램 자체에 의해 수립되지만; 상기 값은 민감도를 증가시키기 위해 조정될 수 있다.

[0044] 추가의 유용한 알고리즘은 문헌 [Altschul *et al.*, 1993, *Nucl. Acids Res.* 25:3389-3402]에 의해 보고된 바와 같은 갭화(gapped) BLAST다. 갭화 BLAST는 BLOSUM-62 치환 점수; 9로 설정된 역치 T 파라미터; 갭화되지 않은

연장을 작동시키기 위한 투-히트(two-hit) 방법(갭 길이(gap length)  $k$ ,  $10+k$ 의 코스트(cost)를 부과함); 16으로 설정된  $X_u$ , 데이터베이스 검색 단계에 대해 40으로 설정되고, 알고리즘의 출력 단계에 대해 67로 설정된  $X_g$ 를 이용한다. 갭화 배열은 약 22 비트(bit)에 상응하는 점수에 의해 작동된다.

[0045] 아미노산 서열 변이를 도입하기 위한 위치 또는 영역은 예정될 수 있지만, 돌연변이 그 자체는 예정될 필요가 없다. 예를 들어, 소정의 위치에서 돌연변이의 성능을 최적화하기 위하여, 랜덤 돌연변이유발은 표적 코돈 또는 영역에서 수행될 수 있고, 발현된 IL-2 돌연변이단백질은 원하는 활성의 최적 조합에 대해 스크리닝될 수 있다. 알려진 서열을 갖는 DNA 내, 예정된 위치에서 치환 돌연변이를 만들기 위한 기법, 예를 들어, M13 프라이머 돌연변이유발 및 PCR 돌연변이유발은 잘 알려져 있다. 돌연변이체의 스크리닝은, 예를 들어 본 명세서에 기재된 분석을 이용하여 수행될 수 있다.

[0046] 아미노산 치환은 통상적으로 단일 잔기이고; 상당히 더 큰 삽입이 허용될(tolerated) 수 있지만, 삽입은 보통 약 한(1) 개 내지 약 이십(20) 개의 아미노산 잔기 정도일 것이다. 일부 경우들에서 결실은 훨씬 더 클 수 있지만, 결실은 약 한(1) 개 내지 약 이십(20) 개의 아미노산 잔기의 범위이다.

[0047] 치환, 결실, 삽입, 또는 이들의 임의의 조합이 최종 유도체 또는 변이체에 도달하는 데 이용될 수 있다. 일반적으로, 이들 변화는 분자의 변경, 특히 항원 결합 단백질의 면역원성 및 특이성의 변경을 최소화하기 위하여 몇 개의 아미노산에서 수행된다. 그러나, 더 큰 변화가 특정 환경에서 허용될 수 있다. 보존적 치환은 표 1로 나타낸 바와 같은 다음 차트에 따라 일반적으로 이루어진다.

표 1

원래의 잔기	예시적인 치환
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser, Ala
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr, Trp
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr, Phe
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[0048]

[0049] 기능 또는 면역학적 동일성에서의 실질적인 변화는 표 1에 나타낸 것들보다 덜 보존적인 치환을 선택함으로써 만들어질 수 있다. 예를 들어, 변경 영역에서 폴리펩티드 백본(backbone)의 구조, 예를 들어 알파-나선 또는 베타-시트 구조; 표적 위치에서 분자의 하전 또는 소수성; 또는 큰 부피의 측쇄에 더 현저히 영향을 미치는 치환이 만들어질 수 있다. 폴리펩티드의 특성에서 가장 큰 변화를 생성할 것으로 일반적으로 예측되는 치환은, (a) 친수성 잔기, 예를 들어, 세릴 또는 트레오닐이 소수성 잔기, 예를 들어 류실, 이소류실, 페닐알라닌, 발릴 또는 알라닌에 대해(또는 이에 의해) 치환; (b) 시스테인 또는 프롤린이 임의의 다른 잔기에 대해(또는 이에 의해) 치환; (c) 양전기성 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어 리실, 아르기닌, 또는 히스티딘을 갖는 잔기가 음전기성 잔기, 예를 들어 글루타미드 또는 아스파르틸에 대해(또는 이에 의해) 치환; 또는 (d) 부피가 큰 측쇄를 갖는 잔기, 예를 들어 페닐알라닌이 측쇄를 갖지 않는 것, 예를 들어 글리신에 대해(또는 이에 의해) 치환된 경우들



이다.

[0050] 변이체는 또한 필요에 따라 IL-2 돌연변이단백질의 특징을 변형하도록 선택되기도 하지만, 변이체는 통상적으로 동일한 정량적인 생물학적 활성을 나타내고, 자연 발생 유사체와 동일한 면역 반응을 유발할 것이다. 대안적으로, 변이체는 IL-2 돌연변이단백질의 생물학적 활성이 변경되도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 글리코실화 위치는 본 명세서에서 논의된 것과 같이 변경 또는 제거될 수 있다.

#### [0051] 연장된 혈청 반감기를 갖는 IL-2 돌연변이단백질

[0052] 본 명세서에서 제공되는 IL-2 돌연변이단백질은, 예를 들어 Teff 또는 NK 세포에 비해 Treg를 우선적으로 확장하기 때문에, 환자에게 투여하는 경우, 안전성 프로파일은 야생형 IL-2 또는 PROLEUKIN<sup>®</sup>(알데스류킨(aldesleukin); Novartis, 스위스 바젤 소재)과 상이할 것으로 예측된다. 야생형 IL-2 또는 PROLEUKIN<sup>®</sup>과 연관된 부작용은 독감-유사 증상들, 한기/오한, 관절통, 열, 발진, 소양증, 주사 부위 반응, 저혈압, 설사, 오심, 불안, 혼동 및 우울을 포함한다. 본 명세서에서 제공되는 IL-2 돌연변이단백질은, 그러한 반감기 연장이 환자에서 부작용 또는 역효과의 가능성 또는 강도를 증가시킬 수 있는 위험을 증가시키지 않으면서 돌연변이단백질의 혈청 반감기를 연장시키는 분자를 포함하도록 변경되거나 또는 이에 융합될 수 있다. 그러한 연장된 혈청 반감기 돌연변이단백질의 피하 투약은 더 낮은 전신 최대 노출( $C_{max}$ )을 갖는 연장된 표적 커버리지(coverage)를 가능하게 할 수 있다. 연장된 혈청 반감기는 돌연변이단백질의 더 낮거나 적은 빈도의 투약 요법을 허용할 수 있다.

[0053] 본 명세서에서 제공되는 IL-2 돌연변이단백질의 혈청 반감기는 당업계에 알려진 본질적으로 임의의 방법에 의해 연장될 수 있다. 그러한 방법은 신생아 Fc $\gamma$  수용체에 결합하는 펩티드를 포함하거나, 예를 들어 IgG 또는 인간 혈청 알부민의 연장된 혈청 반감기를 갖는 단백질에 결합하도록 IL-2 돌연변이단백질의 서열을 변경하는 단계를 포함한다. 다른 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은 융합 분자에 연장된 반감기를 부여하는 폴리펩티드에 융합된다. 그러한 폴리펩티드는 IgG Fc 또는 신생아 Fc $\gamma$  수용체에 결합하는 다른 폴리펩티드, 인간 혈청 알부민, 또는 연장된 혈청 반감기를 갖는 단백질에 결합하는 폴리펩티드를 포함한다. 바람직한 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은 IgG Fc 분자에 융합된다.

[0054] IL-2 돌연변이단백질은 IgG Fc 영역의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수 있다. 실시예에 나타난 바와 같이, IgG Fc 영역의 C-말단으로의 융합은 IgG Fc의 N-말단에 융합된 경우보다 더 큰 정도로 IL-2 돌연변이단백질 활성을 유지한다.

[0055] 본 발명의 일 구현예는 항체의 Fc 영역에 IL-2 돌연변이단백질을 융합시킴으로써 만들어진 두 개의 Fc-융합 폴리펩티드를 포함하는 이량체에 관한 것이다. 이량체는, 예를 들어 융합 단백질을 인코딩하는 유전자 융합물을 적절한 발현 벡터 내로 삽입하고, 재조합 발현 벡터로 형질전환된 숙주 세포에서 유전자 융합물을 발현시키고, 발현된 융합 단백질이 항체 분자처럼 조립하는 것을 허용함으로써 제조될 수 있고, 그로 인해 사슬간 결합을 Fc 모이어티들 사이에서 형성하여 이량체를 수득한다.

[0056] 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "Fc 폴리펩티드" 또는 "Fc 영역"은 항체의 Fc 영역으로부터 유도된 폴리펩티드의 천연 및 돌연변이단백질 형태를 포함하고, 이는 본 발명의 IL-2 돌연변이단백질 융합 단백질 또는 항-IL-2 항체 중 어느 하나의 일부일 수 있다. 이량체화를 촉진하는 힌지 영역을 함유하는 그러한 폴리펩티드의 절단된 형태가 또한 포함된다. 특정 구현예에서, Fc 영역은 항체 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다. 연장된 혈청 반감기와 함께, Fc 모이어티(및 그로부터 형성된 올리고머)를 포함하는 융합 단백질은 단백질 A 또는 단백질 G 컬럼 상에서의 친화도 크로마토그래피에 의해 손쉬운 정제의 이점을 제공한다. 바람직한 Fc 영역은 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4를 포함하는 인간 IgG로부터 유래된다. 본원에서, Fc 내 특정 잔기는 위치로 확인된다. 모든 Fc 위치는 EU 번호부여 방식을 기준으로 한다.

[0057] 항체의 Fc 부분의 기능들 중 하나는 항체가 그의 표적에 결합하는 경우 면역계와 소통하는 것이다. 이는 "이펙터 기능"으로 여겨진다. 소통은 항체-의존성 세포성 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포성 대식작용(ADCP), 및/또는 보체 의존성 세포독성(CDC)을 야기한다. ADCC 및 ADCP는 면역계의 세포 표면 상에서 Fc의 Fc 수용체에 대한 결합을 통해 매개된다. CDC는 Fc와 보체계의 단백질, 예를 들어 C1q와의 결합을 통해 매개된다.

[0058] IgG 하위군은 이펙터 기능을 매개하는 능력이 다양하다. 예를 들어, IgG1은 매개하는 ADCC 및 CDC에서 IgG2 및 IgG4보다 훨씬 더 뛰어나다. 이에 따라, 이펙터 기능이 바람직하지 않은 구현예에서는, IgG2 Fc가 바람직할 것이다. 그러나, IgG2 Fc-함유 분자는 IgG1 Fc-함유 분자에 비해, 제조가 더 어렵고, 더 짧은 반감기와 같이 생물물리학적 특성이 덜 매력적인 것으로 알려져 있다.

- [0059] 항체의 이펙터 기능은 Fc 내로 하나 이상의 돌연변이를 도입함으로써 증가 또는 감소될 수 있다. 본 발명의 구현예는 이펙터 기능이 증가되도록 조작된 Fc를 갖는 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질을 포함한다(미국 7,317,091 및 문헌 [Strohl, *Curr. Opin. Biotech.*, 20:685-691, 2009]; 이들 둘 모두는 그 전체로서 본 명세서에 참고로 포함됨). 증가된 이펙터 기능을 갖는 예시적인 IgG1 Fc 분자는 다음 치환들을 갖는 것들을 포함한다: S239D/I332E; S239D/A330S/I332E; S239D/A330L/I332E; S298A/D333A/K334A; P247I/A339D; P247I/A339Q; D280H/K290S; D280H/K290S/S298D; D280H/K290S/S298V; F243L/R292P/Y300L; F243L/R292P/Y300L/P396L; F243L/R292P/Y300L/V305I/P396L; G236A/S239D/I332E; K326A/E333A; K326W/E333S; K290E/S298G/T299A; K290N/S298G/T299A; K290E/S298G/T299A/K326E; 및/또는 K290N/S298G/T299A/K326E.
- [0060] IgG Fc-함유 단백질의 이펙터 기능을 증가시키는 또 다른 방법은 Fc의 푸코실화 감소에 의한다. Fc에 부착된 2 안테나성(biantennary) 복합체 유형 올리고당으로부터 코어 푸코스의 제거는, 항원 결합 또는 CDC 이펙터 기능을 변경하지 않으면서 ADCC 이펙터 기능을 크게 증가시켰다. Fc-함유 분자, 예를 들어 항체의 푸코실화를 감소 또는 제거하기 위한 몇몇 방법들이 알려져 있다. 이들은 FUT8 녹아웃 세포주, 변이체 CHO 주 Lec13, 래트 하이브리도마 세포주 YB2/0, FUT8 유전자에 대해 특이적인 소 간섭(small interfering) RNA를 포함하는 세포주, 및  $\beta$ -1,4-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III 및 골지  $\alpha$ -만노시다제 II를 공동발현하는 세포주를 포함하는 특정 포유동물 세포주에서의 제조함 발현을 포함한다. 대안적으로, Fc-함유 분자는 식물 세포, 효모, 또는 원핵 세포, 예를 들어 대장균과 같은 비-포유동물 세포에서 발현될 수 있다.
- [0061] 특정 구현예에서, 본 발명의 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질 또는 항-IL-2 항체는 이펙터 기능이 감소되도록 조작된 Fc를 포함한다. 감소된 이펙터 기능을 갖는 예시적인 Fc 분자는 다음 치환들을 갖는 것들을 포함한다: N297A 또는 N297Q(IgG1); L234A/L235A(IgG1); V234A/G237A(IgG2); L235A/G237A/E318A(IgG4); H268Q/V309L/A330S/A331S(IgG2); C220S/C226S/C229S/P238S(IgG1); C226S/C229S/E233P/L234V/L235A(IgG1); L234F/L235E/P331S(IgG1); 및/또는 S267E/L328F(IgG1).
- [0062] 인간 IgG1은 N297(EU 번호부여 체계)에서 글리코실화 위치를 갖고, 글리코실화는 IgG1 항체의 이펙터 기능에 기여하는 것으로 알려져 있다. 예시적인 IgG1 서열이 서열번호 3에 제공된다:

```

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
1           5           10           15
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
20           25           30
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
35           40           45
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
50           55           60
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65           70           75           80
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
85           90           95
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
100          105          110
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
115          120          125
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
130          135          140
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
145          150          155          160
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
165          170          175
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
180          185          190
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
195          200          205
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
210          215          220
Pro Gly Lys
225

```

[0063]

[0064]

비글리코실화된 항체를 제조하기 위한 노력으로 기들은 돌연변이된 N297을 갖는다. 돌연변이는 N297을 글루타민(N297Q)과 같은 생리화학적 성질에서 아스파라긴을 닮은 아미노산으로 또는 극성 기가 없는 아스파라긴을 모방하는 알라닌(N297A)으로 치환하는 것에 초점을 둔다.

[0065]

본 명세서에서 사용된 바와 같은, "비글리코실화된 항체" 또는 "비글리코실화된 fc"는 Fc의 297번 위치에서 잔기의 글리코실화 상태를 지칭한다. 항체 또는 기타 분자는 하나 이상의 기타 위치에서 글리코실화를 함유할 수 있지만, 비글리코실화된 항체 또는 비글리코실화된 Fc-융합체 단백질이 여전히 고려될 수 있다.

[0066]

이펙터 기능이 없는 IgG1 Fc를 제조하기 위한 노력으로, 인간 IgG1의 아미노산 N297의 글리신, 즉 N297G로의 돌연변이는 그 잔기에서의 다른 아미노산 치환보다 훨씬 더 뛰어난 정제 효능 및 생물물리학적 특성을 제공하는 것으로 발견되었다. 실시예 8을 참조한다. 이에 따라, 바람직한 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질은 N297G 치환을 갖는 인간 IgG1 Fc를 포함한다. N297G 치환을 포함하는 Fc는, 분자가 인간 IgG1 Fc를 포함하는 맥락에서 유용하며, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합의 맥락에서 사용하는데 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 항체는 N297G 치환을 갖는 Fc를 포함한다.

[0067]

N297G 돌연변이를 갖는 인간 IgG1 Fc를 포함하는 Fc는 또한 삼입, 결실, 및 치환도 추가로 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 인간 IgG1 Fc는 N297G 치환을 포함하고, 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 동일, 적어도 91% 동일, 적어도 92% 동일, 적어도 93% 동일, 적어도 94% 동일, 적어도 95% 동일, 적어도 96% 동일, 적어도 97% 동일, 적어도 98% 동일, 또는 적어도 99% 동일하다. 특히 바람직한 구현예에서, C-말단 리신 잔기는 치환 또는 결실된다. N297G 치환 및 C-말단 리신의 결실을 포함하는 인간 IgG1의 아미노산 서열은 서열번호 4에 제시된다.

[0068]

글리코실화 IgG1 Fc-함유 분자는 글리코실화된 IgG1 Fc-함유 분자보다 덜 안정한 것으로 나타났다. Fc 영역은 비글리코실화 분자의 안정성을 증가시키기 위해 추가로 조작될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 아미노

산은 시스테인으로 치환되어 이량체 상태의 디설파이드 결합을 형성한다. 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열의 잔기 V259, A287, R292, V302, L306, V323, 또는 I332는 시스테인으로 치환될 수 있다. 바람직한 구현예에서, 잔기의 특정 쌍은, 이들이 서로 디설파이드 결합을 우선적으로 형성하도록 하는 치환으로, 이에 따라 디설파이드 결합의 뒤섞임(scrambling)을 제한 또는 방지한다. 바람직한 쌍은 이에 한정되지는 않지만, A287C와 L306C, V259C와 L306C, R292C와 V302C, 및 V323C와 I332C를 포함한다.

[0069] V259, A287, R292, V302, L306, V323, 또는 I332의 하나 이상의 잔기들이 시스테인으로 치환된 Fc-함유 분자가 본 명세서에서 제공되며, 이의 예는 A287C와 L306C, V259C와 L306C, R292C와 V302C, 또는 V323C와 I332C 치환을 포함하는 것들을 포함한다.

[0070] IgG1 Fc에 만들어질 수 있는 추가의 돌연변이는 Fc-함유 폴리펩티드들 중 이중이량체 형성을 촉진하는 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역은 세포에서 공동발현된 경우 두 개의 상이한 Fc-함유 폴리펩티드 사슬의 이중이량체 형성을 촉진하는 "손잡이(knob)"와 "구멍"을 만들도록 조작된다. 미국 U.S. 7,695,963. 다른 구현예에서, Fc 영역은, 세포에서 공동발현된 경우 두 개의 상이한 Fc-함유 폴리펩티드의 동종이량체 형성을 막는 한편, 이중이량체 형성을 촉진하기 위해 정전식 조종을 이용하도록 변경된다. WO 09/089,004, 이는 그 전체로서 본 발명에 참고로 포함된다. 바람직한 이중이량체 Fc는, Fc의 하나의 사슬이 D399K 및 E356K 치환을 포함하고, Fc의 다른 하나의 사슬이 K409D 및 K392D 치환을 포함하는 것들을 포함한다. 다른 구현예에서, Fc의 하나의 사슬은 D399K, E356K, 및 E357K 치환을 포함하고, Fc의 다른 하나의 사슬은 K409D, K392D, 및 K370D 치환을 포함한다.

[0071] 특정 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질은 단량체성, 즉 단일 IL-2 돌연변이단백질 분자만을 함유하는 것이 유리할 수 있다. 유사하게, 하나 이상의 추가적인 표적에 특이적으로 결합할 수 있는 바이-, 트리- 또는 테트라-특이적 항체가 바람직할 수 있다. 그러한 구현예에서, 융합 단백질 또는 항체의 Fc-영역은 이중이량체 형성을 촉진하는 하나 이상의 돌연변이를 함유할 수 있다. 융합 단백질 또는 항체는 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 중쇄 가변 도메인을 결여하지만, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합 폴리펩티드에서의 것에 대해 상호적인 돌연변이를 갖는 Fc-영역과 함께 공동발현된다. 두 개의 Fc-함유 폴리펩티드 이중이량체가 형성되는 경우, 생성되는 단백질은 단일 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 결합 도메인만을 포함한다.

[0072] 단량체성 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질을 제조하는 또 다른 방법은 IL-2 돌연변이단백질을 단량체성 Fc, 즉 이량체화하지 않은 Fc 영역에 융합하는 것이다. 안정한 단량체성 Fc는 이량체화를 막고, 단량체성 형태로 분자를 안정화하는 돌연변이를 포함한다. 바람직한 단량체성 Fc는 WO 2011/063348로 개시되어 있으며, 이는 그 전체로서 참고로 본 명세서에 포함된다. 특정 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질은 Y349, L351, L368, V397, L398, F405, 또는 Y407에서의 트레오닌 치환과 더불어 392 및 409번 위치에서 음으로 하전된 아미노산을 포함하는 Fc를 포함한다.

[0073] 특정 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질은 Fc와 IL-2 돌연변이단백질 간의 링커를 포함한다. 많은 상이한 링커 폴리펩티드는 당업계에서 알려져 있으며, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질의 맥락에서 이용될 수 있다. 바람직한 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질은 Fc와 IL-2 돌연변이단백질 사이에 GGGGS(서열번호 5), GGNGT(서열번호 6), 또는 YGNGT(서열번호 7)로 구성된 펩티드의 하나 이상의 복제물을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 영역과 IL-2 돌연변이단백질 영역 사이의 폴리펩티드 영역은 GGGGS(서열번호 5), GGNGT(서열번호 6), 또는 YGNGT(서열번호 7)의 단일 복제물을 포함한다. 본 명세서에 나타난 바와 같이, 적절한 세포에서 발현된 경우 링커 GGNGT(서열번호 6) 또는 YGNGT(서열번호 7)는 글리코실화되고, 그러한 글리코실화는 용액 중 및/또는 생체 내에 투여된 경우 단백질을 안정화하는 것을 도울 수 있다. 이에 따라, 특정 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 융합 단백질은 Fc 영역과 IL-2 돌연변이단백질 영역 사이에 글리코실화된 링커를 포함한다.

[0074] 폴리펩티드의 맥락에 위치된 경우, 글리코실화된 링커가 유용할 수 있는 것으로 고려된다. 폴리펩티드의 아미노산 서열 내로 삽입된 GGNGT(서열번호 6) 또는 YGNGT(서열번호 7)를 포함하거나 폴리펩티드의 아미노산 서열 내에서 하나 이상의 아미노산을 대체하는 폴리펩티드가 본 명세서에서 제공된다. 바람직한 구현예에서, GGNGT(서열번호 6) 또는 YGNGT(서열번호 7)는 폴리펩티드 3차 구조의 루프 내로 포함된다. 다른 구현예에서, 루프의 하나 이상의 아미노산은 GGNGT(서열번호 6) 또는 YGNGT(서열번호 7)로 대체된다.

[0075] Fc의 C-말단 부분 및/또는 IL-2 돌연변이단백질의 아미노 말단 부분은, 포유동물 세포에서 발현된 경우 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질의 글리코실화 프로파일을 변경하는 하나 이상의 돌연변이를 함유할 수 있다. 특정 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은 T3 치환, 예를 들어, T3N 또는 T3A를 추가로 포함한다. IL-2 돌연변이단



백질은 S5T와 같은 S5 치환을 추가로 포함할 수 있다.

- [0076] IL-2 돌연변이단백질과 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질 및 항-IL-2 항체의 공유결합 변형은 본 발명의 범주 내에 포함되며, 늘 그렇지는 않지만 일반적으로 번역 후에 수행된다. 예를 들어, 공유결합 변형의 일부 유형은 그의 아미노산 잔기 특정부를 선택된 측쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기와 반응시킬 수 있는 유기 유도체화제와 반응시킴으로써 분자 내로 도입된다.
- [0077] 시스테인 잔기는 가장 일반적으로 클로로아세트산 또는 클로로아세트아미드와 같은  $\alpha$ -할로아세테이트(및 상응하는 아민)와 반응하여 카르복시메틸 또는 카르복시아미도메틸 유도체를 제공한다. 시스테인 잔기는 또한 브로모트리플루오로아세톤,  $\alpha$ -브로모- $\beta$ -(5-이미도조일)프로피온산, 클로로아세틸 포스페이트, N-알킬말레이미드, 3-니트로-2-피리딜 디설파이드, 메틸 2-피리딜 디설파이드, p-클로로머큐리벤조에이트, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀, 또는 클로로-7-니트로벤조-2-옥사-1,3-디아졸과의 반응에 의해 유도체화된다.
- [0078] 이 작용제는 히스티딘 측쇄에 비교적 특이적이기 때문에 히스티딘 잔기는 pH 5.5 내지 7.0에서 디에틸피로카보네이트와의 반응에 의해 유도체화된다. 파라-브로모페나실 브로마이드 또한 유용하다; 반응은 바람직하게는 0.1 M 나트륨 카코딜레이트 중에서 pH 6.0에서 수행된다.
- [0079] 리시닐 및 아미노 말단 잔기는 석신산 또는 다른 카르복실산 무수물과 반응된다. 이들 작용제를 이용한 유도체화는 리시닐 잔기의 전하를 역전하는 효과를 갖는다. 알파-아미노-함유 잔기의 유도체화를 위한 기타 적합한 시약은 이미도에스테르, 예컨대 메틸 피콜린이미데이트; 피리독살 포스페이트; 피리독살; 클로로보로하이드라이드; 트리니트로벤젠설포산; 0-메틸이소우레아; 2,4-펜탄디온; 및 글리옥실레이트와의 아미노기전이효소-촉매화된 반응을 포함한다.
- [0080] 아르기닐 잔기는 하나 또는 몇몇 통상의 시약들, 그 중 페닐글리옥살, 2,3-부탄디온, 1,2-시클로헥산디온, 및 닌히드린과의 반응에 의해 변형된다. 아르기닌 잔기의 유도체화는, 구아닌 작용기의 높은  $pK_a$ 로 인하여 반응이 알칼리성 조건에서 수행되는 것을 필요로 한다. 나아가, 이들 시약은 리신 기 및 아르기닌 앵실론-아미노기와 반응할 수 있다.
- [0081] 티로실 잔기의 특이적 변형은, 특히 흥미롭게도 방향족 디아조늄 화합물 또는 테트라니트로메탄과의 반응에 의해 스펙트럼(spectral) 라벨을 티로실 잔기 내로 도입하여 만들어질 수 있다. 가장 흔하게는, N-아세틸이미디졸 및 테트라니트로메탄이 각각 0-아세틸 티로실 중 및 3-니트로 유도체를 형성하는 데 사용된다. 티로실 잔기는  $^{125}\text{I}$  또는  $^{131}\text{I}$ 를 이용하여 요오드화하여, 방사면역측정법인 상기 적합한 것으로 기재된 클로라민 T 방법에서의 이용을 위해 표지된 단백질을 제조한다.
- [0082] 카르복실 측쇄 기(side group)(아스파르트릴 또는 글루타밀)는 카르보디이미드( $\text{R}'-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R}'$ )와의 반응에 의해 선택적으로 변형되고, 식에서 R 및 R'는 선택적으로 상이한 알킬 기, 예컨대 1-시클로헥실-3-(2-모르폴리닐-4-에틸) 카르보디이미드 또는 1-에틸-3-(4-아조니아-4,4-디메틸펜틸)카르보디이미드이다. 나아가, 아스파르트릴 및 글루타밀 잔기는 암모늄 이온과의 반응에 의해 아스파라기닐 및 글루타미닐 잔기로 전환된다.
- [0083] 이작용성체를 이용한 유도체화는 각종 방법에서의 이용을 위해 항원 결합 단백질을 수불용성 지지체 매트릭스 또는 표면에 가교결합시키는 데 유용하다. 흔히 사용되는 가교결합제는, 예를 들어 1,1-비스(디아조아세틸)-2-페닐에탄, 글루타르알데히드, N-히드록시석신이미드 에스테르, 예를 들어 4-아지도살리실산을 갖는 에스테르, 3,3'-디티오비스(석신이미딜프로피오네이트)와 같은 디석신이미딜 에스테르를 포함하는, 동종이작용성 이미도에스테르, 및 비스-N-말레이미도-1,8-옥탄과 같은 이작용성 말레이미드를 포함한다. 메틸-3-[(p-아지도페닐)디티오]프로피오이미데이트와 같은 유도체화제는 광 존재 하에 가교결합을 형성할 수 있는 광활성화가능한 중간체를 수득한다. 대안적으로, 미국 특허 3,969,287; 3,691,016; 4,195,128; 4,247,642; 4,229,537; 및 4,330,440에 기재된 시아노겐 브로마이드-활성화된 탄수화물과 같은 반응성 수-불용성 매트릭스 및 반응성 기질이 단백질 고정화에 사용된다.
- [0084] 글루타미닐 및 아스파라기닐 잔기는 종종 상응하는 글루타밀 및 아스파르트릴 잔기로 각각 탈아미드화된다. 대안적으로, 이들 잔기는 온건한 산성 조건 하에서 탈아미드화된다. 이들 잔기의 어느 하나의 형태는 본 발명의 범주에 속한다.
- [0085] 기타 변형은 프롤린 및 리신의 히드록실화, 세릴 또는 트레오닐 잔기의 히드록실 기의 포스포릴화, 리신, 아르기닌 및 히스티딘 측쇄의  $\alpha$ -아미노기의 메틸화(문헌 [T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, 1983, pp. 79-86]), N-말단 아민의 아세틸화, 및 임의의 C-

말단 카르복실 기의 아미드화를 포함한다.

- [0086] 본 발명의 범주에 포함되는 IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 항-IL-2 항체의 공유결합 변형의 또 다른 유형은 단백질의 글리코실화 패턴의 변경을 포함한다. 당업계에서 알려진 바와 같이, 글리코실화 패턴은 단백질 서열(예를 들어, 아래 논의되는, 특정 글리코실화 아미노산 잔기의 존재 또는 부재), 또는 단백질이 그 안에서 생산되어지는 숙주 세포 또는 유기체 모두에 따라 달라질 수 있다. 구체적인 발현계가 아래 논의된다.
- [0087] 폴리펩티드의 글리코실화는 통상적으로 N-연결 또는 O-연결이다. N-연결은 탄수화물 모이어티의 아스파라긴 잔기의 측쇄에의 부착을 지칭한다. 트리-펩티드 서열인 아스파라긴-X-세린 및 아스파라긴-X-트레오닌(여기서, X는 프롤린 외의 임의의 아미노산임)은 탄수화물 모이어티의 아스파라긴 측쇄로의 효소적 부착에 대한 인식 서열이다. 이에 따라, 폴리펩티드 내 이들 트리-펩티드 서열 중 어느 하나의 존재는 잠재적인 글리코실화 위치를 만든다. O-연결된 글리코실화는 당류인 N-아세틸갈락토사민, 갈락토스, 또는 자일로스 중 하나의, 히드록시아미노산, 가장 흔하게는 세린 또는 트레오닌으로의 부착을 지칭하지만, 5-히드록시프롤린 또는 5-히드록시리신도 또한 사용될 수 있다.
- [0088] 글리코실화 위치의 IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 또는 항-IL-2 항체로의 첨가는, 상기 기재된 트리-펩티드 서열들 중 하나 이상을 함유하도록 아미노산 서열을 변경함으로써 편리하게 달성될 수 있다(N-연결된 글리코실화 위치의 경우). 변경은 또한 하나 이상의 세린 또는 트레오닌 잔기의 출발 서열에 대한 부가 또는 이에 의한 치환에 의해서도 이루어질 수 있다(O-연결된 글리코실화 위치의 경우). 용이하게, IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 항-IL-2 항체 아미노산 서열은 바람직하게는 DNA 수준에서의 변화를 통하여, 특히 원하는 아미노산으로 번역될 코돈이 생성되도록 예비선택된 염기에서 표적 폴리펩티드를 인코딩하는 DNA를 돌연변이시킴으로써 변경된다.
- [0089] IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 항-IL-2 항체 상의 탄수화물 모이어티의 수를 증가시키는 또 다른 수단은 글리코시드의 단백질에 대한 화학적 또는 효소적 커플링에 의한 것이다. 이들 절차는, 이들이 N- 및 O-연결된 글리코실화에 대한 글리코실화 능을 갖는 숙주 세포에서 단백질의 생산을 필요로 하지 않는다는 점에서 유리하다. 이용된 커플링 방법에 따라, 당(류)은 (a) 아르기닌 및 히스티딘, (b) 자유 카르복실기, (c) 시스테인의 것과 같은 자유 설프히드릴 기, (d) 세린, 트레오닌, 또는 히드록시프롤린의 것들과 같은 자유 히드록실기, (e) 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판의 것과 같은 방향족 잔기, 또는 (f) 글루타민의 아미드기에 부착될 수 있다. 이들 방법은 1987년 9월 11일 공개된 WO 87/05330, 및 문헌 [Aplin and Wriston, 1981, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306]에 기재되어 있다.
- [0090] 출발 IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 항-IL-2 항체 상에 존재하는 탄화수소 모이어티의 제거는 화학적으로 또는 효소적으로 달성될 수 있다. 화학적 탈글리코실화는 화합물 트리플루오로메탄설폰산, 또는 균등 화합물에 단백질의 노출을 필요로 한다. 이러한 처리는, 폴리펩티드를 온전하게 남기는 한편, 연결 당(N-아세틸글루코사민 또는 N-아세틸갈락토사민) 외에 대부분 또는 모든 당의 절단을 초래한다. 화학적 탈글리코실화는 문헌 [Hakimuddin *et al.*, 1987, *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52] 및 [Edge *et al.*, 1981, *Anal. Biochem.* 118:131]에 기재되어 있다. 폴리펩티드 상에서 탄화수소 모이어티의 효소적 절단은 문헌 [Thotakura *et al.*, 1987, *Meth. Enzymol.* 138:350]에 기재된 바와 같은 각종 엔도- 및 엑소-글리코시다제의 이용에 의해 달성될 수 있다. 잠재적인 글리코실화 위치에서 글리코실화는 문헌 [Duskin *et al.*, 1982, *J. Biol. Chem.* 257:3105]에 기재된 바와 같은 화합물 투니카마이신의 이용에 의해 방지될 수 있다. 투니카마이신은 단백질-N-글리코시드 연결의 형성을 차단한다.
- [0091] IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 항-IL-2 항체의 공유결합 변형의 또 다른 유형은 단백질을, 이에 한정되지는 않지만 폴리에틸렌 글리콜, 폴리프로필렌 글리콜 또는 폴리옥시알킬렌과 같은 각종 폴리올을 포함한 각종 비단백질성 중합체에, 미국 특허 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 또는 4,179,337에 제시된 방식으로 연결하는 것을 포함한다. 추가적으로, 아미노산 치환은 IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 항-IL-2 항체 내 각종 위치에서 이루어져서 PEG와 같은 중합체의 부가를 용이하게 할 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 구현에는 폐길화(PEGylated) IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 항-IL-2 항체를 포함한다. 그러한 폐길화 단백질은 그들의 비-폐길화 형태에 비해 증가된 반감기 및/또는 감소된 면역원성을 가질 수 있다.
- [0092] **IL-2 돌연변이단백질 및 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드**

- [0093] IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 항-IL-2 항체를 인코딩하는 핵산이 본 발명에 포함된다. 본 발명의 양태는 본 명세서에 기재된 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 변이체(예를 들어, 축퇴(degeneracy)로 인함)를 포함한다.
- [0094] 핵산의 분리를 위한 프로브 또는 프라이머로서 또는 데이터베이스 검색을 위한 질의(query) 서열로서 이용될 본 명세서에 기재된 아미노산 서열에 상응하는 뉴클레오티드 서열은 아미노산 서열로부터 "역-번역"에 의해 수득될 수 있다. 잘 알려진 연쇄 반응(PCR) 절차는 IL-2 돌연변이단백질 및 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질을 인코딩하는 DNA 서열을 분리 및 증폭하기 위하여 사용될 수 있다. DNA 단편들의 조합의 원하는 말단을 한정하는 올리고뉴클레오티드가 5' 및 3' 프라이머로서 사용된다. 올리고뉴클레오티드는 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 위치를 추가적으로 함유하여 DNA 단편들의 증폭된 조합의 발현 벡터 내로의 삽입을 용이하게 할 수 있다. PCR 기법은 문헌 [Saiki et al., *Science* 239:487 (1988)]; [*Recombinant DNA Methodology*, Wu et al., eds., Academic Press, Inc., San Diego (1989), pp. 189-196]; 및 [*PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Innis et. al., eds., Academic Press, Inc. (1990)]에 기재되어 있다.
- [0095] 본 발명의 핵산 분자는 단일 가닥 및 이중 가닥 형태 모두 및 상응하는 상보적 서열의 DNA 및 RNA를 포함한다. "분리된 핵산"은, 자연 발생 공급원으로부터 분리된 핵산의 경우, 핵산이 분리되어 나온 유기체의 유전체에 존재하는 인접 유전자 서열로부터 분리된 핵산이다. 예를 들어, 주형으로부터 효소적으로 또는 PCR 생성물, cDNA 분자, 또는 올리고뉴클레오티드와 같이 화학적으로 합성된 핵산의 경우, 그러한 공정들로부터 생성된 핵산은 분리된 핵산으로 이해된다. 분리된 핵산 분자는 별개의 단편 형태 또는 더욱 큰 핵산 구성체(construct)의 성분으로서 핵산 분자를 지칭한다. 한 바람직한 구현예에서, 핵산은 내인성 물질의 오염이 실질적으로 없다. 핵산 분자는 바람직하게는 실질적으로 순수한 형태로, 표준 생화학적 방법에 의해 그의 성분 뉴클레오티드 서열의 동정, 조작, 및 회수를 가능하게 하는 양 또는 농도로, 적어도 1회 분리된 DNA 또는 RNA로부터 유래되어 왔다 (예컨대, 문헌 [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989)]에 개괄된 것). 그러한 서열은 바람직하게는, 진핵생물 유전자에 통상적으로 존재하는, 내부 비번역된 서열 또는 인트론에 의해 연속된 오픈 리딩 프레임의 형태로 제공 및/또는 구축된다. 비번역된 DNA의 서열은 오픈 리딩 프레임으로부터 5' 또는 3'으로 존재할 수 있고, 여기서 이는 코딩 영역의 조작 또는 발현을 방해하지 않는다.
- [0096] 본 발명에 따른 IL-2 돌연변이단백질은 보통, 당업계에 잘 알려진 카세트 또는 PCR 돌연변이유발 또는 기타 기법을 이용하여, IL-2 돌연변이단백질 또는 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질을 인코딩하는 DNA에서 뉴클레오티드의 위치 특이적 돌연변이유발에 의해 제조되어, 변이체를 인코딩하는 DNA를 생산하고, 그 후 본 명세서에 개괄된 바와 같은 세포 배양에서 재조합 DNA를 발현한다. 그러나, IL-2 돌연변이단백질 및 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체는 확립된 기법을 이용하여 시험관 내 합성에 의해 제조될 수 있다. 아래에서 더 완전히 개괄된 바와 같이 변형된 특징을 갖는 변이체들이 또한 선택될 수 있지만, 변이체들은 통상적으로 자연 발생 유사체와 동일한 성질의 생물학적 활성, 예를 들어 Treg 확장을 나타낸다.
- [0097] 당업자들에 의해 이해되는 바와 같이, 유전암호의 축퇴로 인해, 본 발명의 각각의 IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 및 항-IL-2 항체는 극히 많은 수의 핵산에 의해 인코딩되고, 이들 중 각각은 본 발명의 범주 내이며 표준 기법을 이용하여 제조될 수 있다. 이에 따라, 특정 아미노산 서열이 확인되어, 당업자는, 인코딩된 단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 방식으로 하나 이상의 코돈의 서열을 간단히 변형시킴으로써, 임의의 수의 상이한 핵산을 만들 수 있다.
- [0098] 본 발명은 또한 플라스미드, 발현 벡터, 전사 또는 발현 카세트의 형태의 발현 시스템 및 구성체를 제공하며, 이는 상기와 같은 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 추가적으로, 본 발명은 그러한 발현계 또는 구성체를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0099] 통상적으로, 임의의 숙주 세포에서 이용된 발현 벡터는 플라스미드 유지 및 외인성 뉴클레오티드 서열의 클로닝과 발현을 위한 서열을 함유할 것이다. 특정 구현예에서, "축적 서열"로서 집합적으로 지칭되는 그러한 서열은, 프로모터, 하나 이상의 인핸서 서열, 복제 기원, 전사 종결 서열, 공여체 및 수용체 스플라이스 위치(splice site)를 함유하는 완전한 인트론 서열, 폴리펩티드 분비를 위한 리더 서열을 인코딩하는 서열, 리보솜 결합 위치, 폴리아데닐화 서열, 발현될 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 삽입하기 위한 폴리링크 영역, 및 선택가능한 마커 성분의 뉴클레오티드 중 하나 이상을 통상적으로 포함할 것이다. 이들 서열 각각은 아래에서 논의된다.
- [0100] 선택적으로, 벡터는 "태그-인코딩 서열, 즉 IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 항-IL-2 항체-인코딩 서열의 5' 또는 3' 말단에 위치한 올리고뉴클레오티드 분자를 함유할 수 있고; 올리고뉴클레오티

드 서열은 폴리His(예컨대, 핵사His(서열번호 8))를 인코딩하거나, FLAG, HA(헤마글루티닌 인플루엔자 바이러스), 또는 *myc*와 같은 또 다른 "태그"를 인코딩하며, 이에 대한 상업적으로 입수가 가능한 항체가 존재한다. 이 태그는 폴리펩티드의 발현시 폴리펩티드에 통상적으로 융합되고 숙주 세포로부터 이의 친화도 정제 또는 탐지 수단으로서의 역할을 할 수 있다. 친화도 정제는, 예를 들어 친화도 매트릭스로서 태그에 대하여 항체를 이용하여 컬럼 크로마토그래피에 의해 달성될 수 있다. 선택적으로, 태그는 절단용 특정 펩티다제를 이용하는 것과 같은 각종 수단에 의해 제거될 수 있다.

[0101] 측접 서열은 동종성(즉, 숙주 세포와 동일한 종 및/또는 균주), 이종성(즉, 숙주 세포 종 또는 균주 외의 종), 하이브리드(즉, 하나 초과와 공급원으로부터의 측접 서열의 조합), 합성 또는 천연일 수 있다. 이와 같이, 측접 서열의 공급원은 임의의 원핵성 또는 진핵성 유기체일 수 있으며, 임의의 척추 또는 무척추 유기체, 또는 임의의 식물일 수 있으며, 단 측접 서열은 숙주 세포 기구 내에서 작용성이고 그에 의해 활성화될 수 있다.

[0102] 본 발명의 벡터에서 유용한 측접 서열은 당업계에서 잘 알려진 임의의 몇 가지 방법에 의해 수득될 수 있다. 통상적으로, 본 명세서에 유용한 측접 서열은 맵핑 및/또는 제한 엔도뉴클레아제 분해에 의해 이전에 확인되어 왔으며 이에 따라 적절한 제한 엔도뉴클레아제를 이용하여 적절한 조직 공급원으로부터 분리될 수 있다. 일부 경우들에서, 측접 서열의 전체 뉴클레오타이드 서열은 알려진 것일 수 있다. 여기서, 측접 서열은 핵산 합성 또는 클로닝에 대해 본 명세서에 기재된 방법을 이용하여 합성될 수 있다.

[0103] 측접 서열의 전체 또는 단지 일부만이 알려져 있는지의 여부에 관계없이, 이는 중합효소 연쇄 반응(PCR)을 이용 및/또는 동일 또는 다른 종으로부터의 올리고뉴클레오타이드 및/또는 측접 서열 단편과 같은 적합한 프로브를 이용하여 유전체 라이브러리를 스크리닝함으로써 수득될 수 있다. 측접 서열을 알지 못하는 경우, 예를 들어 코딩 서열 또는 심지어는 다른 유전자 또는 유전자들을 함유할 수 있는 더 큰 DNA 조각으로부터 측접 서열을 함유하는 DNA의 단편을 분리할 수 있다. 분리는 제한 엔도뉴클레아제 분해에 의해 적절한 DNA 단편을 생산하고, 이어서 아가로스 겔 정제, Qiagen<sup>®</sup> 컬럼 크로마토그래피(미국 캘리포니아주 채츠워스 소재), 또는 당업자에게 알려진 기타 방법을 이용한 분리에 의해 달성될 수 있다. 이러한 목적을 달성하는데 적합한 효소의 선택은 당업자에게는 매우 명백할 것이다.

[0104] 복제의 기원은 통상적으로 상업적으로 구매된 그러한 원핵성 발현 벡터의 일부이고, 기원은 숙주 세포에서 벡터의 증폭을 돕는다. 선택된 벡터가 복제 위치의 기원을 함유하지 않는 경우, 알려진 서열에 기초하여 화학적으로 합성되어 벡터 내로 결합될 수 있다. 예를 들어, 플라스미드 pBR322(New England Biolabs, 미국 매사추세츠주 베벌리 소재)의 복제 기원은 대부분의 그람-음성 박테리아에 적합하고, 각종 바이러스 기원(예를 들어, SV40, 폴리오마, 아데노바이러스, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 또는 유두종바이러스, 예컨대 HPV 또는 BPV)은 포유동물 세포 내 클로닝 벡터에 유용하다. 일반적으로, 복제 성분의 기원은 포유동물 발현 벡터(예를 들어, SV40 기원은 단지 이것이 바이러스 초기 프로모터를 함유하기 때문에 종종 이용됨)에 불필요하다.

[0105] 전사 종결 서열은 폴리펩티드 코딩 영역의 말단에 대해 통상적으로 3'에 위치되며, 전사를 종결하는 역할을 한다. 일반적으로, 원핵 세포에서 전사 종결 서열은 G-C 풍부 단편에 뒤이은 폴리-T 서열이다. 서열은 라이브러리로부터 쉽게 클로닝되거나 심지어는 벡터의 일부로서 상업적으로 구매되지만, 이는 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 핵산 합성을 위한 방법을 이용하여 쉽게 합성될 수 있다.

[0106] 선택가능한 마커 유전자는 선택적 배양 매질에서 성장한 숙주 세포의 생존 및 성장에 필요한 단백질을 인코딩한다. 통상적인 선발 마커 유전자는 (a) 원핵성 숙주 세포에 대해 항생물질 또는 기타 독소, 예를 들어 암피실린, 테트라사이클린, 또는 카나마이신에 대한 내성을 부여; (b) 세포의 영양요구성 결핍을 보충; 또는 (c) 복합 또는 제한 배지로부터 입수가 가능한 필수 영양소를 공급하는 단백질을 인코딩한다. 특이적인 선택가능한 마커는 카나마이신 내성 유전자, 암피실린 내성 유전자, 및 테트라사이클린 내성 유전자이다. 유리하게는, 네오마이신 내성 유전자도 또한 원핵성 및 진핵성 숙주 세포 모두에서 선택을 위해 사용될 수도 있다.

[0107] 기타 선택가능한 유전자가 발현될 유전자를 증폭시키기 위해 사용될 수 있다. 증폭은 성장 또는 세포 생존에 중요한 단백질의 생산에 필요한 유전자가 재조합 세포의 염색체의 연속적인 세대에서 한줄로(in tandem) 반복되는 과정이다. 포유동물 세포에 적합한 선택가능한 마커의 예는 디하이드로폴레이트 환원효소(DHFR) 및 프로모터가 없는 티리니딘(thyrnidine) 키나제 유전자를 포함한다. 포유동물 세포 형질전환체는, 벡터 내에 존재하는 선택가능한 유전자로 인해 그 형질전환체만이 독특하게 적응하여 생존하는 선택압 하에 놓여진다. 매질 내 선택제의 농도가 계속적으로 증가되는 조건 하에서 형질전환된 세포를 배양함으로써 선택압이 부가되고, 이에 의해 선택가능한 유전자 및 결과적으로 원하는 폴리펩티드, 예컨대 IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 항-IL-2의 중쇄 및/또는 경쇄를 인코딩하는 유전자 모두의 증폭을 야기한다. 그 결과, 폴리펩



티드의 증가된 양이 증폭된 DNA로부터 합성된다.

- [0108] 리보솜-결합 위치는 보통 mRNA의 번역 개시에 필수적이며 샤인-달가노(Shine-Dalgarno) 서열(원핵생물) 또는 코작(Kozak) 서열(진핵생물)에 의해 특징지어진다. 요소는 프로모터에 대해 3' 및 발현될 폴리펩티드의 코딩 서열에 대해 5'에 통상적으로 위치된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 코딩 영역은 내부 리보솜 결합 위치(IRES)에 작동적으로 연결될 수 있고, 단일 RNA 전사체로부터 2개의 오픈 리딩 프레임의 번역을 가능하게 한다.
- [0109] 일부 경우들, 예컨대 글리코실화가 진핵성 숙주 세포 발현계에서 바람직한 경우에, 각종 프리서열 또는 프로서열(prosequences)을 조작하여 글리코실화 또는 수율을 개선할 수 있다. 예를 들어, 특정 신호 펩티드의 펩티다제 절단 위치를 변경하거나 프로서열을 첨가할 수 있으며, 이 또한 글리코실화에 영향을 미칠 수 있다. 최종 단백질 생성물은 -1 위치(성숙한 단백질의 제1 아미노산에 대해)에서 발현이 일어나기 쉬운 하나 이상의 추가 아미노산을 가질 수 있고, 이는 완전히 제거되지 않을 수 있다. 예를 들어, 최종 단백질 생성물은 아미노-말단에 부착된 펩티다제 절단 위치에서 발견되는 하나 또는 두 개의 아미노산 잔기를 가질 수 있다. 대안적으로, 효소가 성숙한 폴리펩티드 내에서 그러한 영역을 절단하는 경우, 일부 효소 절단 위치의 이용은 바람직한 폴리펩티드의 약간 절단된 형태를 초래할 수 있다.
- [0110] 본 발명의 발현 및 클로닝 벡터는 숙주 생물에 의해 인식되는 프로모터를 통상적으로 함유할 것이며, IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 또는 항-IL-2 항체의 중쇄 및/또는 경쇄를 인코딩하는 분자에 작동적으로 연결될 것이다. 프로모터는 구조 유전자의 전사를 제어하는 구조 유전자의 출발 코돈에 대해 업스트림(일반적으로 약 100 내지 1000 bp 이내)에 위치된(즉, 5') 전사되지 않은 서열이다. 프로모터는 통상적으로 두 개의 부류, 즉 유도성 프로모터 및 구성적 프로모터 중 하나로 그룹화될 수 있다. 유도성 프로모터는, 영양소의 존재 또는 부재 또는 온도에서의 변화와 같은 배양 조건에서 일부 변화에 반응하여 이들의 제어 하에 DNA로부터 증가된 수준을 개시한다. 한편 구성적 프로모터는 이들이 작동적으로 연결된 유전자를 균일하게, 즉 유전자 발현에 대한 제어가 적거나 없이 전사한다. 다양한 잠재적인 숙주 세포에 의해 인식되는 다수의 프로모터는 잘 알려져 있다.
- [0111] 효모 숙주와의 이용에 적합한 프로모터는 당업계에서도 잘 알려져 있다. 효모 인핸서는 효모 프로모터와 함께 유리하게 이용된다. 포유동물 숙주 세포와의 이용에 적합한 프로모터는 잘 알려져 있으며, 이에 한정되지는 않지만 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스(예컨대, 아데노바이러스 2), 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 거대세포바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 가장 바람직하게는 유인원(Simian) 바이러스 40(SV40)을 포함한다. 기타 적합한 포유동물 프로모터는 이중성 포유동물 프로모터, 예를 들어 열-충격 프로모터 및 액틴 프로모터를 포함한다.
- [0112] 관심 대상이 될 수 있는 추가 프로모터는 이에 한정되지는 않지만, SV40 초기 프로모터(문헌 [Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310]); CMV 프로모터(문헌 [Thornsen *et al.*, 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663]); 라우스 육종 바이러스의 3' 긴 말단 반복부에 함유된 프로모터(문헌 [Yamamoto *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-797]); 헤르페스 티미딘 키나제 프로모터(문헌 [Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-1445]); 메탈로티오닌 유전자로부터의 프로모터 및 조절 서열([문헌 [Prinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42]); 및 원핵성 프로모터, 예컨대 베타-락타마제 프로모터(문헌 [Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731]); 또는 tac 프로모터(문헌 [DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25])를 포함한다. 조직 특이성을 나타내고 유전자이식 동물에서 사용되는 다음 동물 전사 제어 영역도 관심 대상이다: 췌장 샘파리세포(pancreatic acinar cell)에서 활성인 엘라스타제 I 유전자 제어 영역(문헌 [Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-646]; [Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409]; [MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515]); 췌장 베타 세포에서 활성인 인슐린 유전자 제어 영역(문헌 [Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-122]); 림프구 세포에서 활성인 면역글로불린 유전자 제어 영역(문헌 [Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-658]; [Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-538]; [Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444]); 고환, 유방, 림프구 및 비만 세포에서 활성인 마우스 유방 종양 바이러스 제어 영역(문헌 [Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-495]); 간에서 활성인 알부민 유전자 제어 영역(문헌 [Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-276]); 간에서 활성인 알파-페토-단백질 유전자 제어 영역(문헌 [Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648]; [Hammer *et al.*, 1987, *Science* 253:53-58]); 간에서 활성인 알파 1-안티트립신 유전자 제어 영역(문헌 [Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-171]); 골수 세포에서 활성인 베타-글로빈 유전자 제어 영역(문헌 [(Mogam *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-340]; [Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94]); 뇌의 회소돌기아교 세포에서 활성인 미엘린 염기성 단백질 유전자 제어 영역(문헌 [Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-712]);

골격근에서 활성인 미오신 경쇄-2 유전자 제어 영역(문헌 [Sani, 1985, *Nature* 314:283-286]); 및 시상하부에 서 활성인 생식선자극 방출 호르몬 유전자 제어 영역(문헌 [Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-1378]).

[0113] 인헨서 서열은 고등 진핵생물에 의한 전사를 증가시키기 위하여 벡터 내로 삽입될 수 있다. 인헨서는 보통 길이 약 10 내지 300 bp의 DNA의 시스-작용 요소로, 전사를 증가시키기 위해 프로모터 상에서 작용한다. 인헨서는 상대적으로 배향 및 위치 독립적이며, 전사 유닛에 대해 5' 및 3' 모두의 위치에서 발견되었다. 포유동물 유전자로부터 입수가능한 몇몇 인헨서 서열이 알려져 있다(예를 들어, 글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파-페토-단백질 및 인슐린). 그러나 통상적으로, 바이러스로부터의 인헨서가 이용된다. 당업계에서 알려진 SV40 인헨서, 거대세포 바이러스 초기 프로모터 인헨서, 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서는 진핵성 프로모터의 활성화를 위한 예시적인 증진 성분이다. 인헨서는 코딩 서열에 대하여 벡터 내에서 5' 또는 3'에서 위치될 수 있지만, 프로모터로부터의 5' 위치에 통상적으로 위치된다. 적절한 천연 또는 이중성 신호 서열을 인코딩하는 서열(리더 서열 또는 신호 펩티드)은 발현 벡터 내로 포함되어 IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 항-IL-2 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 세포외 분비를 촉진할 수 있다. 신호 펩티드 또는 리더의 선택은 단백질이 생산되는 숙주 세포의 유형에 따라 달라지며, 이중성 신호 서열은 천연 신호 서열을 대체할 수 있다. 포유동물 숙주 세포에서 작용성인 신호 펩티드의 예는, 미국 특허 4,965,195에 기재된 인터류킨-7(IL-7)에 대한 신호 서열; 문헌 [Cosman *et al.*, 1984, *Nature* 312:768]에 기재된 인터류킨-2 수용체에 대한 신호 서열; 유럽 특허 0367 566에 기재된 인터류킨-4 수용체 신호 펩티드; 미국 특허 4,968,607에 기재된 I형의 인터류킨-1 수용체 신호 펩티드; 유럽 특허 0 460 846에 기재된 II형 인터류킨-1 수용체 신호 펩티드를 포함한다. 일 구현예에서, 본 발명의 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체는 도 24에 예시된 것과 같은 리더 서열을 포함한다.

[0114] 벡터가 숙주 세포 유전체 내로 통합된 경우, 벡터는 발현을 촉진하는 하나 이상의 요소를 함유할 수 있다. 예들은 EASE 요소(문헌 [Aldrich *et al.*, 2003 *Biotechnol Prog.* 19:1433-38]) 및 매트릭스 부착 영역(MAR)을 포함한다. MAR은 염색질의 구조적 조직화를 매개하며, "위치" 효과로부터 통합된 벡터를 격리할 수 있다. 이에 따라, MAR은 벡터가 안정한 형질감염체를 만드는 데 사용된 경우에 특히 유용하다. 다수의 자연 및 합성 MAR-함유 핵산이 당업계에서 알려져 있으며, 예를 들어, 미국 특허 6,239,328; 7,326,567; 6,177,612; 6,388,066; 6,245,974; 7,259,010; 6,037,525; 7,422,874; 7,129,062가 있다.

[0115] 본 발명의 발현 벡터는 상업적으로 구매가능한 벡터와 같은 출발 벡터로부터 구성될 수 있다. 그러한 벡터는 바람직한 측점 서열 모두를 함유하거나 함유하지 않을 수 있다. 본 명세서에 기재된 하나 이상의 측점 서열이 벡터 내에 이미 존재하지 않는 경우, 이들은 개별적으로 수득되어 벡터 내로 결합될 수 있다. 측점 서열 각각의 수득에 이용된 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0116] 벡터가 구성되고, IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 항-IL-2 항체의 중쇄 및/또는 경쇄를 인코딩하는 핵산 분자가 벡터의 적절한 위치 내로 삽입된 후, 완성된 벡터는 증폭 및/또는 폴리펩티드 발현에 적합한 숙주 세포 내로 삽입될 수 있다. 선택된 숙주 세포 내로의 발현 벡터의 형질전환은 형질감염, 감염, 인산칼슘 공침전, 전기천공법, 미량주사, 리포펙션(lipofection), DEAE-덱스트란 매개 형질감염, 또는 기타 알려진 기법을 포함하는 잘 알려진 방법에 의해 달성될 수 있다. 선택된 방법은 부분적으로는 이용되는 숙주 세포의 유형에 따른 것일 것이다. 이들 방법 및 기타 적합한 방법은 숙련자에게 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌 [Sambrook *et al.*, 2001, 상동]에 기재되어 있다.

[0117] 적절한 조건 하에서 배양된 경우, 숙주 세포는 IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 항-IL-2 항체의 중쇄 및/또는 경쇄를 합성하고, 이는 이어서 배양 매질로부터(숙주 세포가 매질 내로 이를 분비하는 경우) 또는 그를 생산하는 숙주 세포로부터 직접(분비되지 않는 경우) 수집될 수 있다. 적절한 숙주 세포의 선택은 바람직한 발현 수준, 활성에 바람직하거나 필요한 폴리펩티드 변형(예컨대, 글리코실화 또는 포스포릴화) 및 생물학적으로 활성인 분자로의 폴딩(folding)의 용이성과 같은 각종 인자에 따라 달라질 것이다. 숙주 세포는 진핵성 또는 원핵성일 수 있다.

[0118] 발현에 대한 숙주로서 이용가능한 포유동물 세포주는 이에 한정되지는 않지만, 미국 군주 보관소(ATCC)로부터 입수가능한 불멸화 세포주를 포함하고, 당업계에서 잘 알려진 발현계에서 사용된 임의의 세포주는 본 발명의 재조합 폴리펩티드를 제조하는 데 이용될 수 있다. 일반적으로, 숙주 세포는 바람직한 IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 항-IL-2 항체를 인코딩하는 DNA를 포함하는 재조합 발현 벡터로 형질전환된다. 사용될 수 있는 숙주 세포들 중에는 원핵생물, 효모 또는 고등 진핵 세포가 있다. 원핵생물은 그람 음성 또는 그람 양성 유기체를 포함하고, 예를 들어 대장균 또는 바실러스가 있다. 고등 진핵 세포는 곤충 세포 및 포유동물 기원의 수립된 세포주를 포함한다. 적합한 포유동물 숙주 세포주의 예는 원숭이 신장 세포의 COS-7 주(ATCC

CRL 1651)(문헌 [Gluzman *et al.*, 1981, Cell 23:175]), L 세포, 293 세포, C127 세포, 3T3 세포(ATCC CCL 163), 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 또는 이들의 유도체, 예컨대 Veggie CHO 및 무혈청 배지에서 성장하는 관련 세포주(문헌 [Rasmussen *et al.*, 1998, Cytotechnology 28: 31]), HeLa 세포, BHK(ATCC CRL 10) 세포주, 및 문헌 [McMahan *et al.*, 1991, EMBO J. 10: 2821]에 기재된 것과 같은 아프리카 초록 원숭이 신장 세포주 CVI(ATCC CCL 70)으로부터 유도된 CVI/EBNA 세포주, 293, 293 EBNA 또는 MSR 293와 같은 인간 배아 신장 세포, 인간 표피 A431 세포, 인간 Colo205 세포, 기타 형질전환된 영장류 세포주, 정상외배체 세포, 일차 조직의 시험관 내 배양으로부터 유도된 세포 군주, 일차 외식편, HL-60, U937, HaK 또는 Jurkat 세포를 포함한다. 선택적으로, HepG2/3B, KB, NIH 3T3 또는 S49와 같은 포유동물 세포주는, 예를 들어 각종 신호 형질도입 또는 리포터 분석에 폴리펩티드를 사용하는 것이 바람직한 경우, 이 폴리펩티드의 발현에 사용될 수 있다.

[0119] 대안적으로, 효모와 같은 저급 진핵생물 또는 박테리아와 같은 원핵생물에서 폴리펩티드를 생산하는 것이 가능하다. 적합한 효모는 사카로마이세스 세레비시에(*Saccharomyces cerevisiae*), 스킴조사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*), 클루이베로마이세스(*Kluyveromyces*) 군주, 칸디다 또는 이중성 폴리펩티드를 발현할 수 있는 임의의 효모 군주를 포함한다. 적합한 박테리아 군주는 대장균, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 살모넬라 티푸스균(*Salmonella typhimurium*), 또는 이중성 폴리펩티드를 발현할 수 있는 임의의 박테리아 군주를 포함한다. 폴리펩티드가 효모 또는 박테리아에서 제조되는 경우, 작용성 폴리펩티드를 수득하기 위하여, 예를 들어 적절한 위치의 포스포릴화 또는 글리코실화에 의해 그 안에서 생산된 폴리펩티드를 변형하는 것이 바람직할 수 있다. 그러한 공유결합 부착은 알려진 화학적 또는 효소적 방법을 이용하여 달성될 수 있다.

[0120] 폴리펩티드는 또한 본 발명의 분리된 핵산을 하나 이상의 곤충 발현 벡터에서 적합한 제어 서열에 작동적으로 연결시키고, 곤충 발현계를 이용함으로써 생산될 수도 있다. 배칼로바이러스(baculovirus)/곤충 세포 발현계에 대한 재료 및 방법은 예를 들어, 미국 캘리포니아주 샌디에이고 소재의 Invitrogn(MaxBac<sup>®</sup> 키트)으로부터 키트 형태로 상업적으로 구매가능하고, 그러한 방법은 문헌 [Summers and Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555 (1987)], 및 [Luckow and Summers, *Bio/Technology* 6:47 (1988)]에 기재된 바와 같이, 당업계에 잘 알려져 있다. 무세포 번역계는 또한 본 명세서에 개시된 핵산 구성체로부터 유도된 RNA를 이용하여 폴리펩티드를 생산하기 위해 사용될 수 있다. 세균, 진균, 효모, 및 포유동물 세포 숙주와의 이용에 적절한 클로닝 및 발현 벡터는 문헌 [Pouwels *et al.* (*Cloning Vectors: A Laboratory Manual*, Elsevier, New York, 1985)]에 기재되어 있다. 바람직하게는, 적어도 하나의 발현 제어 서열에 작동적으로 연결된, 본 발명의 분리된 핵산을 포함하는 숙주 세포는 "재조합 숙주 세포"이다.

[0121] 특정 양태에서, 본 발명은 T 조절 세포를 우선적으로 자극하는 인간 IL-2 돌연변이단백질을 인코딩하는 분리된 핵산을 포함하며, V91K,D20L; D84R,E61Q; V91K,D20A,E61Q,M104T; N88K,M104L; V91H,M104L; V91K,H16E,M104V; V91K,H16R,M104V; V91K,H16R,M104T; V91K,D20A,M104T; V91K,H16E,M104T; V91K,H16E,E61Q,M104T; V91K,H16R,E61Q,M104T; V91K,H16E; V91H,D20A,M104T; H16E,V91H,M104V; V91H,D20A,E61Q,M104T; V91H,H16R,E16Q; V91K,D20A,M104V; H16E,V91H; V91H,D20A,M104V; H16E,V91H,M104T; H16E,V91H,E61Q,M104T; V91K,E61Q,H16E; V91K,H16R,M104L; H16E,V91H,E16Q; V91K,E61Q,H16R; D20W,V91K,E61Q; V91H,H16R; V91K,H16R; D20W,V91K,E61Q,M104T; V91K,D20A; V91H,D20A,E16Q; V91K,D20A,M104L; V91H,D20A; V91K,E61Q,D20A; V91H,M104T; V91H,M104V; V91K,E61Q; V91K,N88K,E61Q,M104T; V91K,N88K,E61Q; V91H,E61Q; V91K,N88K; D20A,H16E,M104T; D20A,M104T; H16E,N88K; D20A,M104V; D20A,M104L; H16E,M104T; H16E,M104V; N88K,M104V; N88K,E61Q; D20A,E61Q; H16R,D20A; D20W,E61Q; H16E,E61Q; H16E,M104L; N88K,M104T; D20A,H16E; D20A,H16E,E16Q; D20A,H16R,E16Q; V91K,D20W; V91A,H16A; V91A,H16D; V91A,H16E; V91A,H16S; V91E,H16A; V91E,H16D; V91E,H16E; V91E,H16S; V91K,H16A; V91K,H16D; V91K,H16S; 및/또는 V91S,H16E 치환 및 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열과 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0122] 또한 본 명세서에 기재된 임의의 예시적인 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질을 인코딩하는 분리된 핵산이 포함된다. 바람직한 구현예에서, 항체 및 인간 IL-2 돌연변이단백질의 Fc 부분은 단일 오픈-리딩 프레임 내에서, Fc 영역과 IL-2 돌연변이단백질 사이에서 인코딩되는 링커를 선택적으로 이용하여 인코딩된다.

[0123] 또 다른 양태에서, 프로모터에 작동적으로 연결된 상기 IL-2 돌연변이단백질- 또는 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질-인코딩 핵산을 포함하는 발현 벡터가 본 명세서에서 제공된다.

[0124] 또 다른 양태에서, 상기 IL-2 돌연변이단백질, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질, 또는 항-IL-2 항체를 인코딩하는 분리된 핵산을 포함하는 숙주 세포가 본 명세서에서 제공된다. 숙주 세포는 대장균과 같은 원핵 세포



일 수 있거나, 포유동물 세포와 같은 진핵 세포일 수 있다. 특정 구현예에서, 숙주 세포는 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포주이다.

[0125] 또 다른 양태에서, 인간 IL-2 돌연변이단백질의 제조 방법이 본 명세서에서 제공된다. 인간 IL-2 돌연변이단백질에 작동적으로 연결된 프로모터가 발현되는 조건 하에서 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법. 이어서, 인간 IL-2 돌연변이단백질은 상기 배양으로부터 수확된다. IL-2 돌연변이단백질은 배양 매질 및/또는 숙주 세포 용해물로부터 수확될 수 있다.

[0126] 또 다른 양태에서, 인간 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질의 제조 방법이 본 명세서에서 제공된다. 인간 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질에 작동적으로 연결된 프로모터가 발현되는 조건 하에서 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법. 이어서, 인간 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질은 상기 배양으로부터 수확된다. 인간 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질은 배양 매질 및/또는 숙주 세포 용해물로부터 수확될 수 있다.

[0127] 또 다른 양태에서, 항-IL-2 항체의 제조 방법이 본 명세서에서 제공된다. 항-IL-2 항체의 중쇄 및 경쇄에 작동적으로 연결된 프로모터가 발현되는 조건 하에서 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함하는 방법. 이어서, 항-IL-2 항체는 상기 배양으로부터 수확된다. 항-IL-2 항체는 배양 매질 및/또는 숙주 세포 용해물로부터 수확될 수 있다.

## [0128] 약학 조성물

[0129] 일부 구현예에서, 본 발명은 치료 유효량의 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체를 약학적으로 효과적인 희석제, 담체, 용해제, 유화제, 보존제 및/또는 보조제와 함께 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질은 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질의 맥락에 있다. 본 발명의 약학 조성물은 이에 한정되지는 않지만, 액체, 동결 및 동결건조된 조성물을 포함한다.

[0130] 바람직하게는, 제형 재료는 투여량 및 사용된 농도에서 수령자에게 비독성이다. 특정 구현예에서, 치료 분자, 예를 들어 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체를 함유하는 IL-2 돌연변이단백질의 치료 유효량을 포함하는 약학 조성물이 제공된다.

[0131] 특정 구현예에서, 약학 조성물은 조성물의 pH, 삼투압, 점도, 투명도, 색상, 등장성, 향, 멸균성, 안정성, 용해 속도 또는 방출, 흡착 또는 침투를 변형, 유지 또는 보존하기 위한 제형 재료를 함유할 수 있다. 그러한 구현예에서, 적합한 제형 재료는 이에 한정되지는 않지만, 아미노산(예컨대, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌, 프롤린 또는 리신); 항미생물제; 항산화제(예컨대, 아스코르브산, 아황산나트륨 또는 아황산수소나트륨); 버퍼(예컨대, 보레이트, 중탄산염, Tris-HCl, 시트레이트, 포스페이트 또는 기타 유기산); 증량제(예컨대, 만니톨 또는 글리신); 킬레이트화제(예컨대, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA)); 착화제(예컨대, 카페인, 폴리비닐피롤리돈, 베타-사이클로덱스트린 또는 히드록시프로필-베타-사이클로덱스트린); 충전제; 단당류; 이당류; 및 기타 탄수화물(예컨대, 글루코스, 만노스 또는 텍스트린); 단백질(예컨대, 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린); 착색제, 풍미제 및 희석제; 유화제; 친수성 중합체(예컨대, 폴리비닐피롤리돈); 저분자량 폴리펩티드; 염-형성 상대이온(예컨대, 나트륨); 보존제(예컨대, 염화 벤즈알코늄, 벤조산, 살리실산, 티메로살, 페네틸 알코올, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 클로르헥시딘, 소르빈산 또는 과산화수소); 용매(예컨대, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜); 당 알코올(예컨대, 만니톨 또는 소르비톨); 현탁제; 계면활성제 또는 습윤제(예컨대, 플루로닉스(pluronic), PEG, 소르비탄 에스테르, 폴리소르베이트 20과 같은 폴리소르베이트류, 폴리소르베이트, 트라이톤, 트로메타민, 레시틴, 콜레스테롤, 티록사팔(tyloxapal)); 안정성 증진제(예컨대, 수크로스 또는 소르비톨); 긴장성(tonicity) 증진제(예컨대, 알칼리 금속 할라이드, 바람직하게는 염화나트륨 또는 염화칼륨, 만니톨 소르비톨); 전달 비히클; 희석제; 부형제 및/또는 약학 보조제를 포함한다. 문헌 [REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18" Edition, (A. R. Genrmo, ed.), 1990, Mack Publishing Company]을 참조한다.

[0132] 특정 구현예에서, 최적 약학 조성물은, 예를 들어 의도된 투여 경로, 전달 포맷 및 원하는 투여량에 따라, 당업자에 의해 결정될 것이다. 예를 들어, 문헌 [REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 상동]을 참조한다. 특정 구현예에서, 그러한 조성물은 물리적 상태, 안정성, 생체 내 방출 속도 및 본 발명의 항원 결합 단백질의 생체 내 청소(clearance) 속도에 영향을 줄 수 있다. 특정 구현예에서, 약학 조성물 내 일차 비히클 또는 담체는 자연에서 수성 또는 비수성 중 어느 하나일 수 있다. 예를 들어, 적합한 비히클 또는 담체는, 주사용 물, 생리학 적 식염수 또는 가능하게는 비경구 투여용 조성물에서 공통적인 기타 재료들로 보충된 인공 뇌척수액일 수

있다. 중성의 버퍼화된 식염수 또는 혈청 알부민과 혼합된 식염수는 추가의 예시적인 비히클이다. 특정 구현예에서, 약학 조성물은 약 pH 7.0 내지 8.5의 Tris 버퍼, 또는 약 pH 4.0 내지 5.5의 아세테이트 버퍼를 포함하고, 소르비톨 또는 이에 대해 적합한 치환물을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체 조성물은, 저장을 위해 바람직한 정도의 순도를 갖는 선택된 조성물을 선택적 제형화제와 혼합함으로써(REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 상동), 동결건조 케이크 또는 수용액 형태로 제조될 수 있다. 나아가, 특정 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체 생성물은 수크로스과 같은 적절한 부형제를 이용하여 동결건조물로서 제형화될 수 있다.

[0133] 본 발명의 약학 조성물은 비경구 전달을 위해 선택될 수 있다. 대안적으로, 조성물은 흡입을 위해 또는 경구와 같이, 소화관을 통한 전달을 위해 선택될 수 있다. 그러한 약학적으로 허용가능한 조성물의 제조는 당업계의 기술 내에 속한다. 제형 성분들은 바람직하게는 투여 위치에서 허용가능한 농도로 존재한다. 특정 구현예에서, 버퍼는 조성물을 생리학적 pH 또는 통상적으로 약 5 내지 약 8의 pH 범위 내에서 약간 낮은 pH로 유지하는 데 사용된다.

[0134] 비경구 투여가 고려되는 경우, 본 발명에서의 이용을 위한 치료 조성물은 약학적으로 허용가능한 비히클 내 원하는 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체 조성물을 포함하는 무-발열원의 비경구적으로 허용가능한 수용액 형태로 제공될 수 있다. 비경구 주사에 특히 적합한 비히클은 멸균 증류수로, 여기서 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체 조성물은 적절히 보존된 멸균, 등장성 용액으로서 제형화된다. 특정 구현예에서, 제제는, 데포(depot) 주사를 통해 전달될 수 있는 생성물의 제어된 또는 서방형 방출을 제공할 수 있는, 주사가능한 미소구체, 바이오-부식성 입자, 중합체성 화합물(예컨대, 폴리락트산 또는 폴리글리콜산), 비즈 또는 리포솜과 같은 작용제와 함께 원하는 분자의 제형을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 또한 순환에서 지연된 기간을 촉진하는 효과를 갖는 히알루론산이 사용될 수도 있다. 특정 구현예에서, 주입가능한 약물 전달 장치가 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체 조성물을 도입하는 데 사용될 수 있다.

[0135] 추가의 약학 조성물은 당업자에게 명백할 것이며, 지연된- 또는 제어된-전달 제형에서 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체 조성물을 포함하는 제형을 포함한다. 리포솜 담체, 생체-침식성 미세입자 또는 다공성 비즈 및 데포 주사제와 같은 기타 각종 지연된- 또는 제어된- 전달 수단을 제형화하기 위한 기법도 또한 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어, 국제 특허 출원 PCT/US93/00829를 참조하며, 이는 참고로 포함되고, 약학 조성물의 전달을 위한 다공성 중합체성 미세입자의 제어된 방출을 기재한다. 서방성 제제는 성형품 형태, 예를 들어 필름, 또는 마이크로캡슐의 반투과성 중합체 매트릭스를 포함할 수 있다. 서방성 방출 매트릭스는 폴리에스테르, 하이드로겔, 폴리락티드(미국특허 3,773,919 및 유럽 특허 출원 공보 EP 058481에 개시된 바와 같음, 이들 각각은 참고로 포함됨), L-글루탐산 및 감마 에틸-L-글루타메이트의 공중합체(문헌 [Sidman et al., 1983, Biopolymers 2:547-556]), 폴리(2-히드록시에틸-메타크릴레이트)(문헌 [Langer et al., 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277] 및 [Langer, 1982, Chem. Tech. 12:98-105]), 에틸렌 비닐 아세테이트(문헌 [Langer et al., 1981, 상동]) 또는 폴리-D(-)-3-히드록시부티르산(유럽 특허 출원 공보 EP 133,988)을 포함할 수 있다. 서방성 방출 조성물은 또한 당업계에 알려진 몇몇 방법들 중 일부에 의해 제조될 수 있는 리포솜을 포함할 수 있다. 예를 들어, 참고로 포함됨, 문헌 [Eppstein et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82:3688-3692]; 유럽 특허 출원 공보 EP 036,676; EP 088,046 및 EP 143,949를 참조한다.

[0136] 생체 내 투여에 사용된 약학 조성물은 멸균 제제로서 통상적으로 제공된다. 멸균은 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 달성될 수 있다. 조성물이 동결건조된 경우, 이 방법을 이용하는 멸균은 동결건조 및 재구성 전 또는 후 중 어느 하나에 의해 수행될 수 있다. 비경구 투여용 조성물은 동결건조 형태 또는 용액 형태로 저장될 수 있다. 비경구 조성물은 일반적으로 멸균 접근 포트를 갖는 용기, 예를 들어 정맥주사액 백 또는 피하주사 바늘에 의해 뚫릴 수 있는 스톱퍼(stopper)를 갖는 바이알 내에 위치된다.

[0137] 본 발명의 양태는 자가-버퍼링 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체 제형을 포함하며, 이는 그 전체로서 참고로 본 명세서에서 포함된 국제 특허 출원 WO 06138181A2(PCT/US2006/022599)에 기재된 바와 같은 약학 조성물로서 사용될 수 있다.

[0138] 상기 논의된 바와 같이, 특정 구현예는 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체 조성물, 특히 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체 조성물에 추가하여, 본 섹션 및 본 명세서 어딘가에 예시적으로 기재된 것과 같은 하나 이상의 부형제를 포함하는 약학 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질을 제공한다. 부형제는 이와 관련하여, 효과를 개선하기 위해 및/또는 예를 들어 제조, 선적, 저장, 예비-이용 제제, 투여 동안 및 그 이후에 발생하는 스트레스들로 인한 저하 및 손상에 대해 그러한 제형 및 공정을 안정화시키기 위하여, 점도 조절과 같은 제형의

물리적, 화학적 또는 생물학적 특성 및/또는 본 발명의 공정을 조절하는 것과 같은 광범위한 목적에 이용될 수 있다.

- [0139] 이와 관련된, 단백질 안정화 및 유용한 제형 재료 및 방법에 대한 여러 자세한 설명이 이용가능하며, 예컨대 문헌 [Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991)]; [Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," in: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter and Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002)], 및 [Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002)]이 있고, 이들 각각은 그 전체로서 참고로 본 명세서에서 포함되며, 특히 부분적으로는, 특히 가축 및/또는 인간의 의학 용도를 위한 단백질 약학 제품 및 공정에 관하여, 본 발명에 따른 자가-버퍼링 단백질 제형에 대해 동일한 부형제 및 공정에 관한 것이다.
- [0140] 본 발명의 특정 구현예에 따라, 예를 들어 제형의 이온 강도 및/또는 등장성을 조정하기 위하여 및/또는 본 발명에 따른 조성물의 단백질 또는 기타 성분의 용해도 및/또는 물리적 안정성을 개선시키기 위하여 염이 이용될 수 있다.
- [0141] 잘 알려진 바와 같이, 단백질의 표면 상에서 하전된 잔기에 결합함으로써 그리고 단백질에서 하전된 기 및 극성기를 차폐 및 이들의 정전기적 상호작용, 인력 및 척력 상호작용의 강도를 감소시킴으로써 단백질의 음성 상태를 안정화시킬 수 있다. 이온은 또한 구조적으로 단백질의 변성된 펩티드 연결(--CONH)에 결합함으로써 단백질의 변성 상태를 안정화시킬 수 있다. 나아가, 단백질에서 하전된 기 및 극성 기와의 이온 상호작용은 분자 내 정전기적 상호작용을 감소시킬 수 있고, 이에 의해 단백질 응집 및 불용성을 방지 또는 감소시킬 수 있다.
- [0142] 이온성 중은 단백질에 대한 이들의 효과 면에서 현저히 상이하다. 본 발명에 따른 약학 조성물의 제형화에 이용될 수 있는, 단백질에 대한 이온 및 이들의 효과의 다수의 카테고리 순위가 개발되어 왔다. 일 예는 호프마이스터(Hofmeister) 시리즈로, 이는 용액 중 단백질의 입체배치 안정성에 대한 이들의 효과에 의해 이온성 및 극성 비이온성 용질의 순위를 매긴다. 안정화 용질은 "코스모트로픽(kosmotropic)"으로서 지칭된다. 탈안정화 용질은 "카오트로픽(chaotropic)"으로서 지칭된다. 코스모트로프(kosmotrope)는 고농도(예를 들어, 1몰 초과)의 황산암모늄)로 이용되어 용액으로부터 단백질을 침전시킨다("염석(salt-out)"). 카오트로프(chaotrope)는 일반적으로 단백질을 변성 및/또는 용해시키는 데 이용된다("염용(salt-in)"). "염용" 및 "염석"에 대한 이온의 상대적인 효능은 호프마이스터 시리즈에서 이들의 위치를 한정한다.
- [0143] 자유 아미노산은 본 발명의 각종 구현예에 따라 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체 제형에서 증량제, 안정화제, 및 항산화제로서, 그리고 기타 표준 용도로 이용될 수 있다. 리신, 프롤린, 세린 및 알라닌은 제형에서 단백질을 안정화하는 데 이용될 수 있다. 글리신은 케이크 구조 및 특성의 수정을 보장하기 위하여 동결건조에서 유용하다. 아르기닌은 액체 및 동결건조된 제형 모두에서 단백질 응집을 억제하는 데 유용할 수 있다. 메티오닌은 항산화제로서 유용하다.
- [0144] 폴리올은 당, 예를 들어, 만니톨, 수크로스, 및 소르비톨, 및 예를 들어 글리세롤 및 프로필렌 글리콜과 같은 다가 알코올, 및 본 명세서에 논의된 목적을 위한, 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 및 관련 성분을 포함한다. 폴리올은 코스모트로픽이다. 이들은 물리적 및 화학적 분해 과정으로부터 단백질을 보호하기 위한 액체 및 동결건조된 제형 모두에서 유용한 안정화제이다. 폴리올은 또한 제형의 긴장성을 조정하는데 유용하다.
- [0145] 폴리올들 중, 동결건조된 제형에서 케이크의 구조적 안정성을 보장하기 위하여 일반적으로 사용되는 만니톨이 본 발명의 선택 구현예에서 유용하다. 이는 케이크에 대한 구조적 안정성을 보장한다. 이는 일반적으로 동결건조보호제, 예를 들어 수크로스와 함께 이용된다. 그 중, 긴장성 조정을 위해 그리고 제조 공정 동안 큰 부피의 수송 또는 제조 동안 동결-해동 스트레스로부터의 보호를 위해 안정화제로서, 소르비톨 및 수크로스가 바람직하다. 글루코스 및 락토스와 같이, (자유 알데히드 또는 케톤 기를 함유하는) 환원당은 표면 리신 및 아르기닌 잔기를 당화할 수 있다. 따라서, 이들은 일반적으로 본 발명에 따른 이용에 바람직한 폴리올들 중에 있지 않다. 추가적으로, 수크로스와 같이, 그러한 반응성 종을 형성하는 당류는 산성 조건 하에서 프룩토스 및 글루코스로 가수분해되고, 결과적으로 당화를 일으키며, 또한 이와 관련하여 본 발명의 바람직한 폴리올들 중에 있지 않다. PEG는 단백질의 안정화 및 동결보호제로서 유용하고, 이와 관련하여 본 발명에서 사용될 수 있다.
- [0146] IL-2 돌연변이단백질 및/또는 항-IL-2 항체 제형의 구현예는 계면활성제를 추가로 포함한다. 단백질 분자는 표면 상에서의 흡착, 및 공기-액체, 고체-액체, 및 액체-액체 계면에서 변성 및 결과적으로 응집에 민감할 수 있다. 이들 효과는 일반적으로 단백질 농도와 역으로 증가한다. 이들 유해한 상호작용은 일반적으로 단백질 농도

와 역으로 증가하며, 통상적으로 제품의 선적 및 취급 동안 생성되는 것과 같은 물리적 교반에 의해 악화된다.

- [0147] 계면활성제는 일상적으로 표면 흡착을 방지, 최소화 또는 감소시키는 데 이용된다. 이와 관련하여 본 발명에서 유용한 계면활성제는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 소르비탄 폴리옥실레이트의 기타 지방산 에스테르, 및 폴록사머 188을 포함한다.
- [0148] 계면활성제는 또한 단백질 입체배치 안정성을 제어하는 데 흔히 이용된다. 이와 관련하여, 임의의 소정의 계면활성제는 통상적으로 일부 단백질은 안정화하고, 다른 것들은 탈안정화하기 때문에, 계면활성제의 이용은 단백질 특이적이다.
- [0149] 폴리소르베이트는 산화성 분해에 민감하며, 종종 공급되는 바에 따라, 단백질 잔기 측쇄, 특히 메티오닌의 산화를 유발하기에 충분한 양의 과산화물을 함유한다. 결과적으로 폴리소르베이트는 조심스럽게 사용되어야 하며, 사용되는 경우 이들의 최저 유효 농도로 사용되어야 한다. 이와 관련하여, 폴리소르베이트는 부형제가 이들의 최저 유효 농도에서 사용되어야 하는 일반적인 규칙을 예시한다.
- [0150] IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체 제형의 구현에는 하나 이상의 항산화제를 추가로 포함한다. 단백질의 유해한 산화는 주변 산소 및 온도의 적절한 수준을 유지함으로써, 그리고 빛에 대한 노출을 피함으로써 약학 제형에서 어느 정도까지는 방지될 수 있다. 항산화제 부형제도 사용되어 단백질의 산화적 분해를 방지할 수 있다. 이와 관련하여 유용한 항산화제들 중에는 환원제, 산소/자유-라디칼 소거제, 및 킬레이트화제가 있다. 본 발명에 따른 치료 단백질 제형에서의 이용을 위한 항산화제는 바람직하게는 수용성이며, 생성물의 유통 기한에 걸쳐 이들의 활성을 유지한다. 이와 관련하여, EDTA는 본 발명에 따른 바람직한 항산화제이다.
- [0151] 항산화제는 단백질을 손상시킬 수 있다. 예를 들어, 글루타치온과 같은 환원제는 구체적으로 분자내 이황화물 결합을 방해할 수 있다. 이에 따라, 본 발명에서의 이용을 위한 항산화제는, 특히 이들 스스로가 제형 내 단백질을 손상시키는 가능성을 제거하거나 충분히 감소시키도록 선택된다.
- [0152] 본 발명에 따른 제형은 단백질 공동-인자이며, 특정 인슐린 현탁액을 형성하는 데 필요한 아연과 같이 단백질 배위 착화합물을 형성하는 데 필요한 금속 이온을 포함할 수 있다. 금속 이온은 또한 단백질을 분해하는 일부 공정들을 저해할 수 있다. 그러나, 금속 이온은 단백질을 분해하는 물리 및 화학 공정을 또한 촉매한다.
- [0153] 마그네슘 이온(10 내지 120 mM)은 아스파르트산의 이소아스파르트산으로의 이성질화를 저해하는 데 사용될 수 있다.  $\text{Ca}^{+2}$  이온(100 mM 이하)은 인간 테옥시리보뉴클레아제의 안정성을 증가시킬 수 있다. 그러나,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ , 및  $\text{Zn}^{+2}$ 는 rhDN아제를 탈안정화시킬 수 있다. 유사하게,  $\text{Ca}^{+2}$  및  $\text{Sr}^{+2}$ 는 인자 VIII을 안정화시킬 수 있고, 이는  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  및  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  및  $\text{Fe}^{+2}$ 에 의해 탈안정화될 수 있고, 이의 응집은  $\text{Al}^{+3}$  이온에 의해 증가될 수 있다.
- [0154] IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체 제형의 구현에는 하나 이상의 보존제를 추가로 포함한다. 동일한 용기로부터의 1회 초과를 추출을 포함하는 다중-용량 비경구 제형을 개발하는 경우 보존제는 필수적이다. 이들의 일차적 기능은 약물 제품의 유통기한 또는 이용 기간에 걸쳐 미생물 성장을 저해하고, 제품 멸균성을 보장하는 것이다. 흔히 사용되는 보존제는 벤질 알코올, 페놀 및 m-크레졸을 포함한다. 보존제는 소분자 비경구제와 함께 이용되는 긴 역사를 가졌지만, 보존제를 포함하는 단백질 제형의 개발은 도전이 될 수 있다. 보존제는 단백질에 대해 거의 언제나 탈안정화 효과(응집)를 갖고, 이는 다중-용량 단백질 제형에서 이들의 이용을 제한하는 주요 인자가 된다. 오늘날까지, 대부분의 단백질 약물은 일회용으로만 제형화된다. 그러나, 다중-용량 제형이 가능한 경우, 이는 환자 편의성, 및 상승된 시장성을 가능하게 하는 부가된 장점을 갖는다. 좋은 예로 인간 성장 호르몬(hGH)이 있으며, 여기서 보존 제형의 개발은 더욱 편리하고 다중-이용 주사 펜 방식의 상용화를 이끌었다. 적어도 4 개의 그러한 hGH 보존 제형을 함유한 펜 장치는 현재 시장에서 유통되고 있다. 노르디트로핀(Norditropin)(액체, Novo Nordisk), 누트로핀(Nutropin) AQ(액체, Genetech) & 제노트로핀(Genotropin)(동결 건조된-이중 챔버 카트리지, Pharmacia & Upjohn)은 페놀을 함유하는 한편, 소마트로프(Somatropo)(Eli Lilly)는 m-크레졸을 이용하여 제형화된다.
- [0155] 일 구현예에서, 예를 들어 본 명세서에서 기재된 IL-2 돌연변이단백질 또는 IL-2 돌연변이단백질의 Fc-융합체 중 어느 하나와 같은, IL-2 돌연변이단백질 또는 IL-2 돌연변이단백질의 Fc-융합체는 pH 7.6에서 10 mM KPi, 161 mM L-아르기닌으로 제형화된다.
- [0156] 보존된 제형의 제형화 및 개발 동안 일부 양태들이 고려되어야 한다. 약물 제품에서 효과적인 보존 농도가 최적화되어야만 한다. 이는 단백질 안정성을 양보하지 않으면서 항균 효과를 부여하는 농도 범위를 갖는 제형에서



소정의 보존제를 시험하는 것을 필요로 한다.

[0157] 또 다른 양태에서, 본 발명은 IL-2 돌연변이단백질 또는 IL-2 돌연변이단백질의 Fc-융합체를 동결건조된 제형으로 제공한다. 동결-건조된 제품은 보존제 없이 동결건조될 수 있고, 이용시 희석제를 함유하는 보존제를 이용하여 재구성될 수 있다. 이는 보존제가 단백질과 접촉되는 기간을 단축시켜, 연관된 안정성 위험을 현저하게 최소화한다. 액체 제형을 이용하여, 보존제 효과 및 안정성은 전체 제품 유통기한(약 18 내지 24개월)에 걸쳐 유지되어야 한다. 유의해야 할 중요한 점은 보존제 효과가 유효 약물 및 모든 부형제 성분을 함유하는 최종 제형에서 입증되어야 한다는 것이다.

[0158] IL-2 돌연변이단백질 제형은, 특정 질환의 특정 치료를 위해, 특히 생물이용성 및 지속성의 범위에서, 일반적으로 특이적 투여 경로 및 방법, 특이적 투약량 및 투여 빈도에 대해 설계될 것이다. 이에 따라 제형은, 이에 한정되지는 않지만 경구, 귀, 눈, 직장 및 질을 포함하는 임의의 적합한 경로, 및 정맥 및 동맥 내 주사, 근육내 주사, 및 피하 주사를 포함하는 비경구 경로에 의한 전달을 위해 본 발명에 따라 설계될 수 있다.

[0159] 약학 조성물이 일단 제형화되면, 이는 멸균 바이알 내에 용액, 현탁액, 겔, 유화제, 고체, 결정, 또는 탈수되거나 동결건조된 분말로서 저장될 수 있다. 그러한 제형은 즉시 사용가능한 형태 또는 투여 전 재구성되는(예를 들어, 동결건조된) 형태 중 어느 하나로 보관될 수 있다. 본 발명은 또한 일회-용량 투여 유닛을 생산하기 위한 키트를 제공한다. 본 발명의 키트는 건조된 단백질을 갖는 제1 용기 및 수성 제형을 갖는 제2 용기 모두를 각각 함유할 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에서, 단일 및 다중-챔버의 예비 충전된 주사기들(예를 들어, 액체 주사기 및 리오시린지(lyosyringe))를 함유하는 키트가 제공된다.

[0160] 사용될 IL-2 돌연변이단백질 약학 조성물의 치료 유효량은 예를 들어 치료적 맥락 및 목적에 따라 달라질 것이다. 당업자는, 치료를 위한 적절한 투약량 수준이 부분적으로는 전달되는 분자, IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체가 이용되는 적응증, 투여 경로, 및 환자의 크기(체중, 체표면 또는 장기 크기) 및/또는 상태(연령 및 일반 건강상태)에 따라 달라질 것임을 이해할 것이다. 특정 구현예에서, 임상적은 최적 치료 효과를 수득하기 위하여 투약량을 적정하고 투여 경로를 변형할 수 있다. 통상적인 투약량은, 상기 언급된 인자에 따라 달라지며, 약 0.1  $\mu\text{g/kg}$  내지 약 1 mg/kg 이상의 범위일 수 있다. 특정 구현예에서, 투약량은 0.5  $\mu\text{g/kg}$  내지 약 100  $\mu\text{g/kg}$ , 선택적으로 2.5  $\mu\text{g/kg}$  내지 약 50  $\mu\text{g/kg}$ 의 범위일 수 있다.

[0161] 치료 유효량의 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체는 바람직하게는 질환 증상의 심각도에서의 감소, 질환 무증상 기간의 빈도 또는 기간에서의 증가, 또는 질환의 고통으로 인한 손상 또는 장애의 방지를 초래한다.

[0162] 약학 조성물은 의약 장치를 이용하여 투여될 수 있다. 약학 조성물의 투여를 위한 의약 장치의 예는 미국 특허 4,475,196; 4,439,196; 4,447,224; 4,447, 233; 4,486,194; 4,487,603; 4,596,556; 4,790,824; 4,941,880; 5,064,413; 5,312,335; 5,312,335; 5,383,851; 및 5,399,163에 기재되어 있으며, 이는 모두는 참고로 본 명세서에서 포함된다.

[0163] 일 구현예에서, 약학 조성물이 제공된다.

#### [0164] 자가면역 또는 염증성 장애의 치료 방법

[0165] 특정 구현예에서, 본 발명의 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체는 자가면역 또는 염증성 장애의 치료에 사용된다. 바람직한 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질이 사용된다.

[0166] 본 명세서에 개시된 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체를 이용한 치료에 특히 순응가능한 장애는 이에 한정되지는 않지만, 염증, 자가면역 질환, 아토피 질환, 신생물발암(paraneoplastic) 자가면역 질환, 연골 염증, 관절염, 류마티스 관절염, 소아 관절염, 소아 류마티스 관절염, 소수관절형 소아 류마티스 관절염, 다수관절형 소아 류마티스 관절염, 전신 발생 소아 류마티스 관절염, 소아 강직성 척추염, 소아 장질환성 관절염, 소아 반응성 관절염, 소아 라이터(Reiter) 증후군, SEA 증후군(혈청반응 음성, 부착부병증(Enthesopathy), 관절염 증후군), 소아 피부근염, 소아 건선성 관절염, 소아 경피증, 소아 전신 홍반성 루푸스, 소아 혈관염, 소수관절형 류마티스 관절염, 다수관절형 류마티스 관절염, 전신 발생 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 장질환성 관절염, 반응성 관절염, 라이터 증후군, SEA 증후군(혈청반응 음성, 부착부병증, 관절염 증후군), 피부근염, 건선성 관절염, 경피증, 혈관염, 근염(myolitis), 다발성근염(polymyolitis), 피부근염(dermatomyolitis), 결절성 다발동맥염(polyarteritis nodosa), 베게너 육아종증, 혈관염, 류마티스성 다발근통(ploymyalgia rheumatica), 사르코이드증, 경화증, 원발성 담도 경화증, 경화성 담관염, 쇼그렌 증후군, 건선, 판상형 건선, 물방울형 건선, 역위 건선, 농포성 건선, 홍피성 건선, 피부염, 아토피 피부염, 죽상동맥경화증, 루푸스, 스틸병, 전신 홍반 루푸스(SLE), 중증 근무력증, 염증성 장질환 (IBD), 크론병, 궤양성 대장염, 셀리악병, 다발성 경화증(MS), 천식,



COPD, 비부비동염, 폴립이 있는 비부비동염, 호산구성 식도염, 호산구성 기관지염, 길랭-바레(Guillain-Barre) 질환, 제1형 진성 당뇨병, 갑상선염(예를 들어, 그레이브스(Graves)병), 애디슨(Addison) 병, 레이노(Raynaud) 현상, 자가면역 간염, GVHD, 이식 거부반응, 신장 손상, C형 간염-유도 혈관염, 자발성 임신 손실 등을 포함한다.

[0167] 바람직한 구현예에서, 자가면역 또는 염증성 장애는 루푸스, 이식편 대 숙주 질환, C형 간염-유도 혈관염, 제1형 당뇨병, 다발성 경화증, 자발성 임신 손실, 아토피 질환, 및 염증성 장질환이다.

[0168] 또 다른 구현예에서, 자가면역 또는 염증성 장애를 갖거나 이의 발생 위험이 있는 환자는 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체(예를 들어, 본 명세서에 개시된 IL-2 돌연변이단백질, 예컨대 본 명세서에 개시된 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체, 또는 당업계에서 알려진 또 다른 IL-2 돌연변이단백질 또는 야생형 IL-2, 선택적으로 본 명세서에 기재된 유형의 Fc-융합체 분자의 일부로서)로 치료되며, 치료에 대한 환자의 반응이 모니터링된다. 모니터링되는 환자의 반응은 치료에 대한 환자의 임의의 검출가능한 또는 측정가능한 반응, 또는 그러한 반응들의 임의의 조합일 수 있다. 예를 들어, 반응은 환자의 생리학적 상태, 예컨대 체온 또는 열, 욕구, 발한, 두통, 오심, 피곤, 배고픔, 목마름, 정신적 명민함 등에서의 변화일 수 있다. 대안적으로, 반응은, 예를 들어 환자로부터 취한 말초혈액 샘플 중 세포 유형 또는 유전 산물(예를 들어, 단백질, 펩티드 또는 핵산)의 양에서의 변화일 수 있다. 일 구현예에서, 환자의 치료 요법은, 환자가 치료에 대해 검출가능한 또는 측정가능한 반응을 갖는 경우 또는 그러한 반응이 특정 역치를 넘는 경우 변경된다. 변경은 투약 빈도에서의 감소 또는 증가, 또는 용량당 투여되는 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체의 양에서의 감소 또는 증가, 또는 투약의 "휴식"(즉, 특정 기간 동안 또는 치료 의사가 치료가 지속되어야 한다고 결정할 때까지, 또는 환자의 모니터링된 반응이 치료가 재개되어야하거나 재개될 수 있음을 나타낼 때까지, 어느 하나에 의한, 치료의 일시적 중단), 또는 치료의 종결일 수 있다. 일 구현예에서, 반응은 환자의 체온 또는 CRP 수준에서의 변화이다. 예를 들어, 반응은 환자의 체온에서의 증가, 또는 말초 혈액 샘플에서의 CRP 수준의 증가, 또는 이들 모두에서의 증가일 수 있다. 특정 일 구현예에서, 환자의 체온이 치료 과정 동안 적어도 0.1°C, 0.2°C, 0.3°C, 0.4°C, 0.5°C, 0.7°C, 1°C, 1.5°C, 2°C, 또는 2.5°C 증가하는 경우, 환자의 치료는 감소, 지연 또는 종결된다. 또 다른 특정 구현예에서, 환자의 말초 혈액 샘플에서 CRP의 농도가 치료 과정 동안 적어도 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1, 1.5, 또는 2 mg/mL 증가하는 경우, 환자의 치료는 감소, 지연, 또는 종결된다. 치료를 변형, 감소, 지연 또는 종결할지의 여부의 결정에 모니터링되고, 이용될 수 있는 환자의 기타 반응은 모세혈관 누출 증후군(저혈압 및 심혈관 불안정성), 손상된 호중구 기능(예를 들어, 감염의 발전 또는 악화를 초래 또는 검출함), 혈소판감소증, 혈전 혈관병증, 주사 부위 반응, 혈관염(예컨대, C형 간염 바이러스 혈관염), 또는 염증성 증상 또는 질환의 발생 또는 악화를 포함한다. 치료를 변형, 감소, 증가, 지연 또는 종결할지의 여부를 결정하는 데 모니터링되고 이용될 수 있는 환자의 추가 반응은 NK 세포, Treg 세포, FOXP3<sup>-</sup> CD4 T 세포, FOXP3<sup>+</sup> CD4 T 세포, FOXP3<sup>-</sup> CD8 T 세포, 또는 호산구의 수에서의 증가를 포함한다. 이들 세포 유형의 증가는 예를 들어 모세혈관 유닛 당 그러한 세포의 수에서의 증가로서(예를 들어, 혈액 1 밀리리터 당 세포 내 증가로서 발현됨) 또는 혈액 샘플 내 세포 또는 세포들의 또 다른 유형에 비해 그러한 세포 유형의 백분율에서의 증가로서 검출될 수 있다. 모니터링될 수 있는 또 다른 환자 반응은, 환자의 말초 혈액 샘플에서 CD25<sup>+</sup> 세포 상에서의 세포 표면-결합된 IL-2 돌연변이단백질 또는 항-IL-2 항체의 양에서의 증가이다.

[0169] **Treg 세포의 확장 방법**

[0170] IL-2 돌연변이단백질, 항-IL-2 항체, 또는 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질은 대상 또는 샘플 내에서 Treg 세포를 확장하는 데 이용될 수 있다. Treg 대 비-조절 T 세포의 비를 증가시키는 방법이 본 명세서에서 제공된다. 본 방법은 T 세포의 개체군을, 인간 IL-2 돌연변이단백질, 항-IL-2 항체 또는 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체의 유효 양과 접촉시키는 단계를 포함한다. 이 비는 T 세포의 개체군 내에서 CD3+FOXP3<sup>+</sup> 세포 내 CD3+FOXP3<sup>-</sup> 세포의 비를 결정함으로써 측정될 수 있다. 인간 혈액에서 통상적인 Treg 빈도는 총 CD4+CD3<sup>+</sup> T 세포의 5 내지 10%이지만, 상기 열거된 질환들에서 이러한 백분율은 더 낮거나 더 높을 수 있다. 바람직한 구현예에서, Treg의 백분율은 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 100%, 적어도 200%, 적어도 300%, 적어도 400%, 적어도 500%, 적어도 600%, 적어도 700%, 적어도 800%, 적어도 900%, 또는 적어도 1000% 증가한다. Treg에서 최대 배수 증가는 특정 질환에 대해 변화될 수 있으나; IL-2 돌연변이단백질 처리를 통해 수득될 수 있는 최대 Treg 빈도는 총 CD4+CD3<sup>+</sup> T 세포의 50% 또는 60%이다. 특정 구현예에서, IL-2 돌연변이단백질, 항-IL-2 항체, 또는 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질이 대상체에게 투여되고, 대상체의 말초 혈액 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 비-조

절 T 세포의 비는 증가한다.

[0171] IL-2 돌연변이단백질, 항-IL-2 항체, 및 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질은 다른 세포 유형에 비해 Treg를 우선적으로 확장하기 때문에, 이들은 대상의 말초 혈액 내에서 조절 T 세포(Treg) 대 자연 살해(NK) 세포의 비를 증가시키는데도 유용하다. 이 비는 CD3+FoxP3+ 세포 대 CD19- 및 CD3-인 CD16+ 및/또는 CD56+ 림프구의 비를 결정함으로써 측정될 수 있다.

[0172] IL-2 돌연변이단백질, 항-IL-2 항체, 또는 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질은, 환자의 말초 혈액 내에서 Treg 대 비-조절 T 세포 또는 NK 세포의 비를 현저히 확장하지 않으면서 환자에서 질환 또는 장애에 대해 치료 효과를 가질 수 있음이 고려된다. 치료 효과는 염증 또는 자가면역의 위치에서 IL-2 돌연변이단백질, 항-IL-2 항체, 또는 IL-2 돌연변이단백질 Fc-융합체 단백질의 국소화된 활성으로 인한 것일 수 있다.

[0173] **실시예**

[0174] 실질적이며 예측적인 아래 실시예들은, 본 발명의 특정 구현에 또는 특징을 예시하는 목적을 위해 제공되며 본 발명의 범주를 제한하고자 하지 않는다.

[0175] **실시예 1 - IL-2 돌연변이단백질의 pSTAT5 신호전달**

[0176] IL-2 돌연변이단백질을 상대적 pSTAT5 활성화에 대해 조사하였다. 증진된 Treg:Teff 범위를 갖는 돌연변이단백질, 즉, Teff 세포에서의 현저한 약화를 나타내면서 Treg 세포에서는 높은 수준의 활성을 보유하는 것들을 확인하기 위하여 활성 스크린을 설계하였다. 활성화된 Teff 세포는 CD25의 증가된 수준을 발현하고, 자가면역 및 염증성 질환을 갖는 환자들은 이들 세포의 상승된 수를 갖기 때문에, 본 발명자들은 환자에서 CD25 발현에서의 더 현실적인 분화를 모방하기 위하여 Teff 세포에 대하여 CD25+-게이팅을 적용하였다. IL-2 돌연변이단백질의 활성을 FACS 기반 분석에 의해 측정된 세포 내 포스포어-STAT5 반응에 의해 평가하였다. 간단하게는, 미리 냉동된 인간 PBMC를 해동시키고 0.5 내지 2시간 동안 완전 매질 내에서 휴지시켰다. 세포를 5백만 내지 천만 세포/ml로 현탁시키고, 96-웰의 깊은(deep) 웰 플레이트에서 웰 당 100  $\mu$ l로 분취하였다(5십만 내지 백만 세포/웰). 세포를 1 nM 내지 200 nM 범위의  $10\times$  용량 적정에서, 10  $\mu$ l 의 최종 부피에서 30분 동안 IL-2 돌연변이단백질을 이용하여 자극하였다. STAT5 포스포릴화 수준을 BD 포스플로우(phosflow) 버퍼 키트를 이용하여 측정하였다. 간단하게는, 1 ml의 BD 용해/고정 포스플로우 버퍼를 첨가하여 자극을 중단하였다. 세포를 37°C에서 10 내지 15분 동안 고정시켰고, CD3, CD4, CD25, FOXP3, CD8 및 pSTAT5에 대해 염색하기 전에, 얼음 상에서  $1\times$ BD 포스플로우 펄 버퍼를 이용하여 투과시켰다. PBMC의 두 개의 공여자에 대한 결과를 아래 표 2에 나타낸다.

표 2

IL-2 돌연변이단백질의 pSTAT5 활성화

IL2	공여체 1				공여체 2			
	1 nM IL2		200 nM IL2		1 nM IL2		200 nM IL2	
	처리		처리		처리		처리	
	%pSTA T5+ Tregs	%pSTA T5+ Teffs	%pSTA T5+ Tregs	%pSTA T5+ Teffs	%pSTA T5+ Tregs	%pSTA T5+ Teffs	%pSTA T5+ Tregs	%pSTA T5+ Teffs
배지 단독	1.86	0.655	2.57	0.68	0.29	1.24	0.59	0.4
WTIL2	89.95	48.3	94.4	41	96.6	80.4	95.4	78.1
N88D			92.2	27	89.3	39.9	95.2	56
V91R	87.45	40.3	97.25	39.25				
H16R	47.5	5.135	66.5	11.85	56.4	14.6	73.7	19.3
N88R	70.2	20.1	87.6	38.8	84.3	32.6	91.7	44.5
V91H	90.4	61.35	95.8	54.35	95.7	81.7	96.3	76.6
N88K	31.2	3.195	67.1	17.35	42	6.61	77.3	15.5
D20W	5.445	1.15	31.1	5.5	8.48	2.55	27.9	2.66
D20A	38.85	5.435	63.65	19.45	49	5.94	64	15
H16E	88.2	52.3	95.5	52.25	95.7	70.8	95.4	72
E61Q	88.65	68.05	95.4	67.3	96.3	84	96.5	83.2
V91K,H16E	41.45	5.425	60.25	15.55	53	10.1	67.9	15.3
V91R,C125A	88.95	50.45	95.7	51.7	95.7	76.6	96.2	75.7
V91H,E61Q	87.05	43.8	96.75	68.85	93	59.7	97.5	83.1
V91K,H16R	1.61	0.63	6.96	1.845	2.31	2.22	2.96	1.65
V91K,D20W	1.215	0.85	3.265	1.465	2.14	2.68	1.74	1.99
V91K,D20A	9.19	1.185	30.15	4.385	15.9	2.43	30.8	5.79
V91K,N88K	1.69	0.64	6.87	1.075	2.01	1.65	2.68	0.91
H16E,V91H	78.45	24.75	88.1	36.55	89.6	42.2	92.1	48.7
V91H,D20A	7.15	0.805	24.55	3.11	11.1	1.83	22.5	4.32
H16R,D20A	1.205	1.13	4.27	0.93	2.19	1.45	0.86	1.89
D20A,H16E	19.85	1.66	39.3	5.945	28.6	3.67	39	5.3
V91H,H16R	14.35	1.35	35.1	4.55	24.5	3.3	36.1	4.8
H16E,N88K	1.475	0.495	3.14	0.625	1.09	1.09	0.8	0
D20A,E61Q	10.13	1.005	65.95	20.1	9.72	1.82	68.9	16.3
H16E,E61Q	64.95	12.05	95.45	61.35	70.6	10.2	96	75.5
V91K,E61Q	69.5	14.3	95.4	57.05	73.7	12.1	96.6	74.1
V91K,E61Q,H16E	6.02	1.135	52.5	11.7	6.21	1.15	58.6	10.5
V91K,E61Q,H16R	3.075	1.435	8.52	1.155	1.87	0.65	3.74	1.68
V91K,E61Q,D20A	2.215	0.88	26.6	2.71	1.84	0.98	22.5	2.51
D20A,H16E,E61Q	2.715	0.775	32.25	3.325	1.49	0.81	27.6	3.73
D20A,H16R,E61Q	15.35	1.465	80.9	27.65	13.3	1.88	86	29.9
V91H,H16R,E61Q	76.85	24.6	95.1	44.3	82.5	24.7	95.4	68.3
H16E,V91H,E61Q	24.4	1.235	83.4	33.55	26.7	2.04	90.9	44.1

[0177]

V91H,D20A,E61Q	16.8	1.3	94.1	51.6	19	2.54	95.3	64.2
N88K,M104T	2.2	0.71	11.035	0.98	3.6	1.06	9.22	1.47
V91H,M104T	89.35	47.65	97.65	44.6	96.9	77.5	97.1	69.5
D20A,M104T	52.7	7.195	70.3	17.1	67	12.3	78.3	19.8
H16E,M104T	88.15	47.7	96.25	44	95.9	71.7	95.9	63.3
N88K,M104V	4.89	1.025	21	1.655	4.26	0.91	17.7	2.72
V91H,M104V	89.35	50.8	97	50.9	95.2	73.1	96.7	71.7
D20A,M104V	52.55	6.245	70.05	16.2	66.7	12	76.2	18.9
H16E,M104V	88.95	47.4	96.25	44.2	91.1	59.8	96.5	67.5
V91K,H16E,M104T	44.45	4.105	62.7	11.175	54.7	7.07	70.7	17.2
V91K,H16R,M104T	1.92	1.16	10.9	2.3	3.22	1.64	5.64	1.65
V91K,D20A,M104T	9.34	0.9	31.05	4.78	18.5	2.52	28.9	1.59
D20A,H16E,M104T	22.25	1.94	42	8.835	34.2	2.33	46	9.92
H16E,V91H,M104T	78.6	24.6	89.05	37.75	91	35.2	93.2	46.7
V91H,D20A,M104T	8.825	1.105	27.1	4.355	15.3	1.9	21.7	3.48
V91K,H16E,M104V	39.15	4.94	57.5	13.1	56.6	9.66	66.7	11.7
V91K,H16R,M104V	2.175	1.06	8.995	1.74	4.09	1.5	3.98	0.7
V91K,D20A,M104V	9.07	1.275	30.2	4.165	21.3	2.74	34.8	4.81
H16E,V91H,M104V	79.3	22.7	86.3	33.4	90.3	36.8	92.3	50.4
V91H,D20A,M104V	7.985	1.365	25.6	3.78	11.2	2.96	21.1	2.6
V91K,H16E,E61Q, M104T	35.25	3.21	88.1	35.95	37.6	4.74	93.4	45.4
V91K,H16R,E61Q, M104T	1.57	0.81	13.8	1.4	1.68	0.74	6.93	1.27
H16E,V91H,E61Q, M104T	25.8	1.925	84.1	39.8	38.9	2.63	91.9	47.7
V91H,D20A,E61Q, M104T	49.5	6.74	71.2	18.2	67.4	11.3	79.5	22.9
D20W,E61Q	2.29	0.77	6.655	1.34	2.45	1.2	2.97	1
D20W, V91K,E61Q	3.855	1.1	36.3	4.41	2.89	1.15	32.5	4.57
N88K,E61Q	18.2	1.64	92.95	45.7	26.7	4.22	97.1	64.1
V91K,N88K,E61Q	5.42	0.485	83.25	30.15	6.34	1.45	91.5	41.5
V91K,N88K,E61Q, M104T	2.9	0.765	76.2	21.4	4.02	1.35	87.7	29.6
D20W,V91K,E61Q, M104T	80.6	27.05	95.2	41.25	89.2	35.7	97	61.5
V91H,M104L	90.55	47.85	96.85	39.65	98.1	63.9	96.9	66.3
D20A,M104L	47.7	5.28	69.2	15.35	66	12.6	76.7	24.4
H16E,M104L	89.25	43.45	95.6	38.75	97.2	61	96.6	62.1
V91K,H16R,M104L	3.4	1.04	10.265	0.785	5.19	2.74	5.93	1.64
V91K,D20A,M104L	11.95	1.47	30.55	3.665	21	2.89	30.5	4.89

[0178]

[0179]

#### 실시예 2 - IL-2 돌연변이단백질의 안정성

[0180]

양호한 제조성능을 갖는 안정한 분자의 선택을 위해, SEC 크로마토그래피에 의해 측정된 40℃ 10일의 안정성을 따라 DSC Tm 측정의 분자 평가 분석을 시험하였다. 10일 후 %MP의 결과를 도 1에 나타낸다.

[0181]

#### 실시예 3 - 인간 IL-2 돌연변이단백질의 약화

[0182]

약화된 인간 IL-2 돌연변이단백질을 시험관 내 pSTAT5 분석에서 마우스 비장세포에서의 활성화에 대해 평가하였다. 본 발명자들은 마우스 비장세포 pSTAT5 분석에서 마우스 면역 세포 상에서 선택된 돌연변이단백질의 활성을 확인하였다(도 2). 3개의 약화된 돌연변이단백질인 H16R, V91K D20A M104V, D20W, 및 대조군, 야생형 인간 IL-2.Fc, 재조합 인간 IL-2, 및 재조합 마우스 IL-2에 대해 용량 적정 곡선을 나타낸다. 마우스 비장세포는 돌연변이단백질의 적정 농도를 함유하는 매질 내에서 30분 동안 자극되었으며, FACS에 의해 분석되었다. 돌연변이단백질은 인간 Treg 세포에서와 같이, 마우스 Treg 세포에서의 활성의 유사한 순위 순서를 보였다(즉, WT>H16R>V91K D20A M104V>D20W). 순위 순서는 T 이펙터 세포에 대해서도 역시 유사하였다.

[0183]

#### 실시예 4 - 마우스에서 인간 IL-2 돌연변이단백질의 생체 내 활성

[0184]

C57B16 마우스들은, 0일에 PBS(비히클 대조군), 야생형 IL-2-Fc, V91K D20A M104V, H16R, 또는 D20W의 단일 용량을 제공받았으며, 4일에 비장세포를 수확하고, Treg 세포, CD8 T 및 NK 세포에 대한 효과를 분석하였다. 25 ug만이 제공된 D20W를 제외하고, 3개의 용량(마우스 당 1 ug, 5 ug, 또는 25 ug)을 평가하였다. CD4+ CD25+ FoxP3+ 세포에 의해 정의된 바와 같은, 살아있는 게이트화된 세포로 총 Treg 세포의 백분율을 (A)로 나타내고, 계산된 Treg 세포의 총 수(B), CD8 T 세포(C), 및 NK 세포(D)를 나타낸다. 도 3에 예시된 바와 같이, 야생형



IL-2, H16R, 및 V91K D20A M104V는 생체 내에서 용량 의존성 방식으로, Treg 세포의 현저한 확장을 유도하였다. 2개의 돌연변이단백질, H16R 및 V91K D20A M104V는, 야생형 IL-2.Fc와 유사하거나 심지어는 더 큰 정도로 Treg 세포 상에서 놀랍게도 강한 활성을 나타내었다. 대조적으로, H16R 또는 V91K D20A M104V 중 어느 것도 야생형 IL-2.Fc에 비해 CD8 T 또는 NK 세포에 대한 현저한 활성을 보이지 않았다. 이들 결과는, 시험관 내에서 pSTAT5 관독에 의해 측정된 바와 같은 활성의 현저한 약화에도 불구하고, 최소 CD8 T 및 NK 세포 반응을 유도하는 한편, 약화된 돌연변이단백질이 생체 내에서 강건한 Treg 반응을 유도하는 능력을 보유한다는 것을 입증한다. 이에 따라, 약화는 생체 내 Treg:비-Treg 선택성에 비례적이지 않은 영향을 미친다.

[0185] 실시예 5 - IL-2 돌연변이단백질의 pSTAT5 신호전달

[0186] IL-2 돌연변이단백질을 상대적 pSTAT5 활성화에 대해 조사하였다. 증진된 Treg:Teff 범위를 갖는 돌연변이단백질, 즉, Teff 세포에서의 현저한 약화를 나타내면서 Treg 세포에서는 높은 수준의 활성을 보유하는 것들을 확인하기 위하여 활성 스크린을 설계하였다. 활성화된 Teff 세포는 CD25의 증가된 수준을 발현하고, 자가면역 및 염증성 질환을 갖는 환자들은 이들 세포의 상승된 수를 갖기 때문에, 본 발명자들은 환자에서 CD25 발현에서의 더 현실적인 분화를 모방하기 위하여 Teff 세포에 대하여 CD25+ 게이팅을 적용하였다. IL-2 돌연변이단백질의 활성을 FACS 기반 분석에 의해 측정된 세포 내 포스포어-STAT5 반응에 의해 평가하였다. 간단하게는, 미리 냉동된 인간 PBMC를 해동시키고 0.5 내지 2시간 동안 완전 매질 내에서 휴지시켰다. 세포를 5백만 내지 천만 세포/ml로 현탁시키고, 96-웰의 깊은 웰 플레이트에서 웰 당 100  $\mu$ l로 분취하였다(5십만 내지 백만 세포/웰). 세포를 0.4 nM 내지 25 nM 범위의  $10\times$  용량 적정에서, 10  $\mu$ l의 최종 부피에서 30분 동안 IL-2 돌연변이단백질을 이용하여 자극하였다. STAT5 포스포틸화 수준을 BD 포스포플로우 버퍼 키트를 이용하여 측정하였다. 간단하게는, 1 ml의 BD 용해/고정 포스포플로우 버퍼를 첨가하여 자극을 중단하였다. 세포를 37°C에서 10 내지 15분 동안 고정시켰고, CD3, CD4, CD25, FOXP3, CD8 및 pSTAT5에 대해 염색하기 전에, 얼음 상에서  $1\times$ BD 포스포플로우 펄 버퍼를 이용하여 투과시켰다. PBMC의 두 개의 공여자에 대한 결과를 아래 표 2에 나타낸다.

표 3

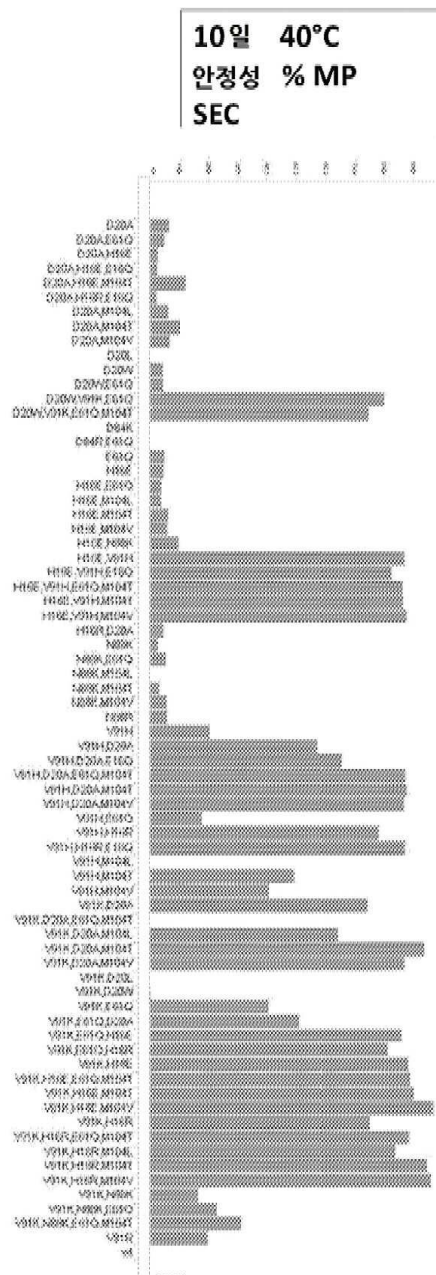
IL-2 돌연변이단백질의 pSTAT5 활성화

IL2	공여체 1				공여체 2			
	25 nM IL2 처리		0.4 nM IL2 처리		25 nM IL2 처리		0.4 nM IL2 처리	
	%pSTAT 5+ Tregs	%pSTAT 5+ Teffs	%pSTAT 5+ Tregs	%pSTAT 5+ Teffs	%pSTAT 5+ Tregs	%pSTAT 5+ Teffs	%pSTAT 5+ Tregs	%pSTAT 5+ Teffs
배지 단독	3.85	.045						
WTIL2	100	87.7	99.7	85.3	99.8	91.9	99.5	90.3
V91A, H16A	99.7	89	99.8	85.8	99.8	91.4	99.2	43.4
V91A, H16D	99.4	82.9	99.7	76.4	100	84.5	95.1	22
V91A, H16E	99.6	76.7	100	63.6	99.6	69.4	84.4	11
V91A, H16S	99.9	84.1	99.8	80.9	99.7	88.6	99.1	38.1
V91E, H16A	99.6	85	99.8	78.1	99.8	87.5	96.4	28.3
V91E, H16D	99.5	72.6	99.2	56.9	99.8	64.7	81.2	11.2
V91E, H16E	99.3	63.3	99.3	48.1	99	62.3	74.3	7.16
V91E, H16S	100	84.2	99.3	76.1	99.8	87.3	96.6	28.3
V91K, H16A	99.3	73.4	98.9	55.9	100	65.6	82.4	12.6
V91K, H16D	96.1	37.5	93.8	22.8	95.4	30	45.1	2.1
V91K, H16S	99.4	71	99	53.3	99.8	68.5	70.7	3.36
V91S, H16E	98.6	60.1	98.9	45	98.9	53.6	70.5	7.58

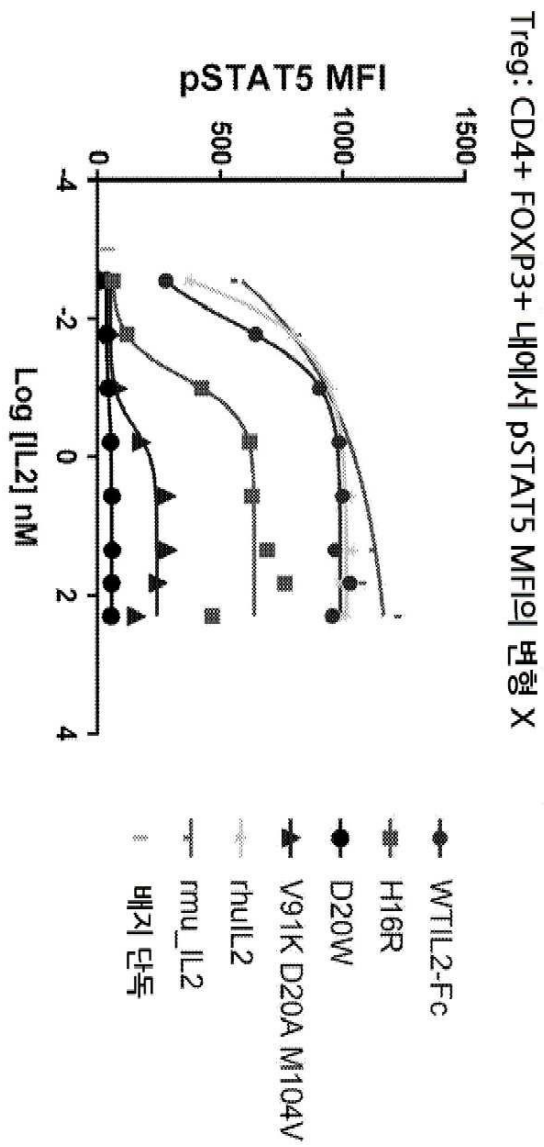
[0187]

도면

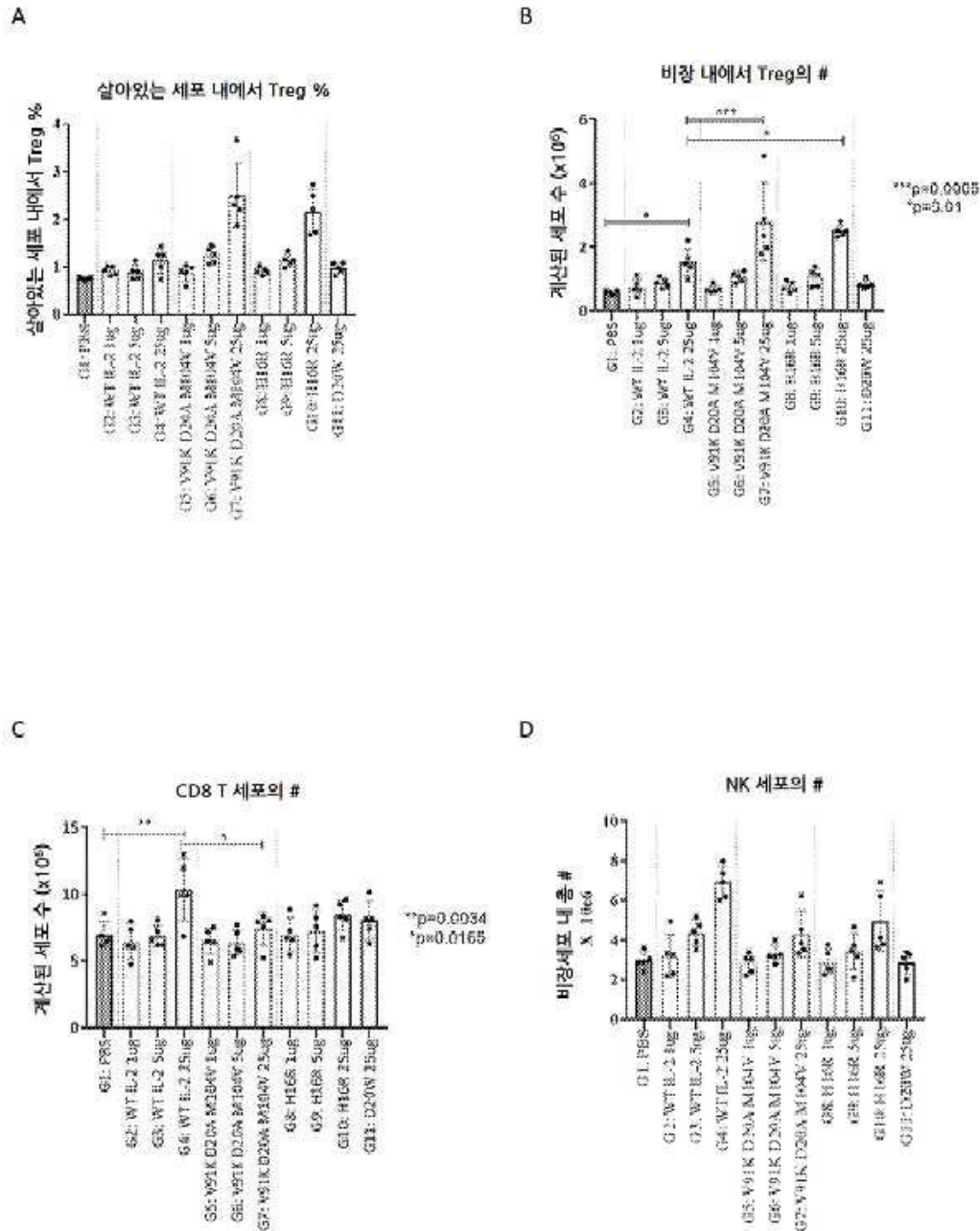
도면1



도면2



### 도면3





<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><221> MOD\_RES

<222> (125)..(125)

<223> Cys, Ser, Val or Ala

<400> 1

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Lys Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Xaa Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 2

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220><221>

MOD\_RES

<222> (125)..(125)

<223> Cys, Ser, Val or Ala

<400> 2

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys

20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys

35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Xaa Gln Ser Ile

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 3

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

35 40 45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

100 105 110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

165 170 175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Pro Gly Lys

225

<210> 4

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

1                    5                    10                    15  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
                   20                    25                    30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
                   35                    40                    45  
  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
                   50                    55                    60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr  
 65                    70                    75                    80  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
                   85                    90                    95  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
                   100                    105                    110  
  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
                   115                    120                    125  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser  
                   130                    135                    140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145                    150                    155                    160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
                   165                    170                    175  
  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
                   180                    185                    190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
                   195                    200                    205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
                   210                    215                    220  
 Pro Gly  
 225  
 <210> 5  
 <211> 5  
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

Gly Gly Asn Gly Thr

1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 7

Tyr Gly Asn Gly Thr

1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 8

His His His His His His

1 5