(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0052471
(43) 공개일자 2025년04월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/60 (2017.01) *A61K 38/20* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 9/10* (2006.01)
A61K 9/14 (2006.01) *A61P 31/12* (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/60 (2017.08)
A61K 38/2046 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7010980(분할)
(22) 출원일자(국제) 2016년03월11일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2017-7024937
원출원일자(국제) 2016년03월11일
심사청구일자 2021년03월03일
(85) 번역문제출일자 2025년04월03일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/022146
(87) 국제공개번호 WO 2016/145388
국제공개일자 2016년09월15일
(30) 우선권주장
62/131,634 2015년03월11일 미국(US)

(71) 출원인
넥타르 테라퓨틱스
미국 94158 캘리포니아주 샌프란시스코 사우스 미션 베이 불러바드 455 스위트 100
(72) 발명자
체리치 데보라 에이치
미국 94706 캘리포니아주 올버니 테일러 애비뉴 909
장 핑
미국 94030 캘리포니아주 밀브레 마드리드 코트 5
커크 피터 베네딕트
미국 94403 캘리포니아주 샌 마테오 포인세티아 애비뉴 413
(74) 대리인
특허법인코리아나

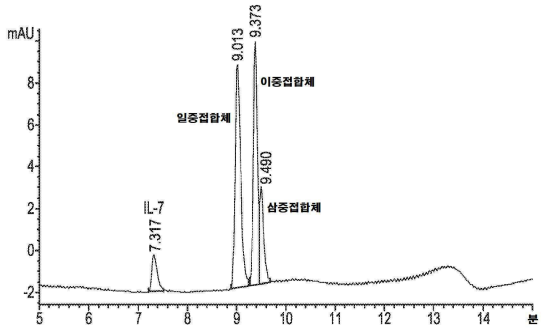
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **ＩＬ-7 부분 및 중합체의 접합체**

(57) 요 약

IL-7 부분과, 하나 이상의 비펩티드 수용성 중합체의 접합체가 제공된다. 통상적으로 비펩티드 수용성 중합체는 폴리(에틸렌글리콜) 또는 이의 유도체이다. 또한 특히 접합체를 포함하는 조성물, 접합체를 제조하는 방법, 및 조성물을 개체에 투여하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/10 (2013.01)
A61K 9/14 (2013.01)
A61P 31/12 (2018.01)
A61P 31/18 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)

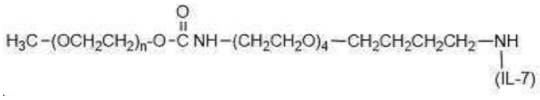
명 세 서

청구범위

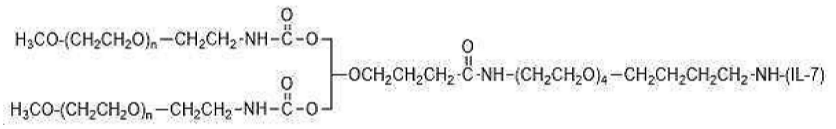
청구항 1

인터루킨-7(IL-7) 부분의 아미노기에서 아민 결합을 통해 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체에 공유 부착된 IL-7 부분을 포함하는 접합체:

여기서, 상기 접합체는 하기로부터 선택되는 구조를 포함하고:



및



,

상기 각 구조에서,

각각의 (n)은 독립적으로 20,000 달톤 내지 40,000 달톤의 폴리(에틸렌 글리콜)의 중량 평균 분자량에 해당하는 값을 가지는 정수이고,

여기서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체는 IL-7 부분의 N-말단에 공유 부착된다.

청구항 2

제1항에 있어서, 1 개, 2 개, 3 개 또는 4 개의 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체가 상기 IL-7 부분에 부착되어 있는 것인 접합체.

청구항 3

제1항에 있어서, 1 개, 2 개 또는 3 개의 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체가 상기 IL-7 부분에 부착되어 있는 것인 접합체.

청구항 4

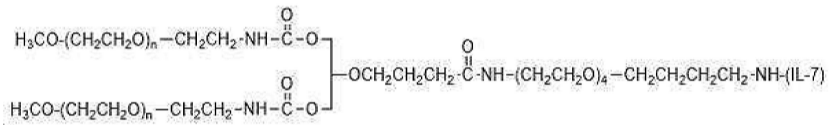
제1항에 있어서, 상기 IL-7 부분은 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 4, 서열 번호 5, 서열 번호 6, 서열 번호 7, 및 서열 번호 8로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 가지는 것인 접합체.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 IL-7 부분은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 가지는 것인 접합체.

청구항 6

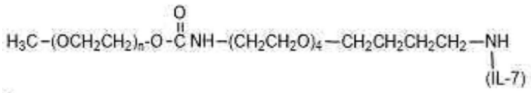
제1항에 있어서, 하기 구조를 포함하는 접합체:



여기서, 각각의 (n)은 독립적으로 20,000 달톤 내지 40,000 달톤의 폴리(에틸렌 글리콜)의 중량 평균 분자량에 해당하는 값을 가지는 정수이다.

청구항 7

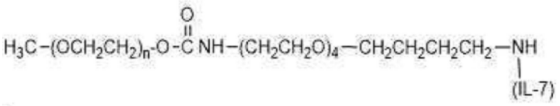
제1항에 있어서, 하기 구조를 포함하는 접합체:



여기서, (n)은 20,000 달톤 내지 40,000 달톤의 폴리(에틸렌 글리콜)의 중량 평균 분자량에 해당하는 값을 가지는 정수이다.

청구항 8

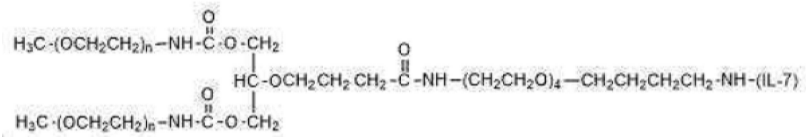
제1항에 있어서, 하기 구조를 포함하는 접합체:



여기서, 상기 접합체에 포함되는 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체의 중량 평균 분자량은 20,000 달톤 내지 40,000 달톤이다.

청구항 9

제1항에 있어서, 하기 구조를 포함하는 접합체:



여기서, 상기 접합체에 포함되는 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체의 중량 평균 분자량은 20,000 달톤 내지 40,000 달톤이다.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 접합체와 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는, 면역 결핍증, 바이러스 감염 또는 암 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 조성물은 주사에 적합한 유형인 약학 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 조성물은 재구성될 수 있는 분말 유형인 약학 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 조성물은 하이드로겔, 액체 용액 또는 액체 현탁액의 유형인 약학 조성물.

청구항 14

제10항에 있어서, 면역계의 천연 재구성을 가속화하는 방법에 사용하기 위한 약학 조성물.

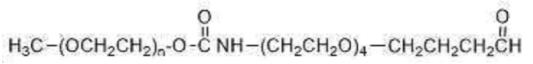
청구항 15

제10항에 있어서, 면역 결핍증, 바이러스 감염 또는 암을 앓고 있는 개체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 약학 조성물.

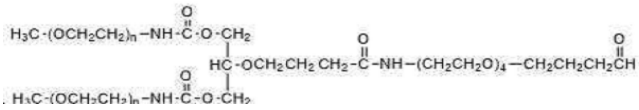
청구항 16

접합 조건 하에서 1차 아미노기를 포함하는 IL-7 부분과 폴리(에틸렌 글리콜) 시약을 접촉시켜 시프 염기(Schiff base)를 형성하는 단계; 및 환원제를 첨가하여 상기 시프 염기를 환원시키는 단계;를 포함하는, 제1항의 접합체를 제조하는 방법:

여기서, 상기 폴리(에틸렌 글리콜) 시약은 하기로부터 선택되고:



및



,

상기 각 구조에서 각각의 (n)은 독립적으로 20,000 달톤 내지 40,000 달톤의 폴리(에틸렌 글리콜)의 중량 평균 분자량에 해당하는 값을 가지는 정수이다.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 35 U.S.C.§119(e)에 따라서 2015년 3월 11일에 출원한 미국 가출원 62/131,634의 우선권의 이익을 주장하며, 이의 개시 내용은 본원에 전체가 참조로 포함되어 있다.

[0003] **기술분야**

[0004] 특히, 본 발명의 하나 이상의 구현예는 일반적으로 IL-7 부분(즉, 인간 IL-7의 활성과 유사한 활성을 적어도 일부 가지는 부분)과, 수용성 비펩티드 중합체를 포함하는 접합체에 관한 것이다. 덧붙여, 본 발명은 (특히) 접합체를 포함하는 조성물, 이 접합체를 합성하기 위한 방법, 그리고 이 조성물을 투여하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0005] 시토킨은 면역계의 자극 인자로, 약물로서 유용하다. 예를 들어 인터페론-알파(IFN-α), 인터페론-베타(IFN-β), 인터루킨-2(IL-2) 및 과립구/대식세포-콜로니 자극 인자(GM-CSF)는 모두 약물로서 승인받았다. 이 군에 속하는 약물들은 바이러스 감염, 암 및 면역계 조절장애, 예를 들어 자가면역성 질환을 앓는 개체를 치료하고, 암 화학요법 이후 면역계의 회복을 촉진하기 위해 사용된다. 불행하게도 이 단백질들은 환자로 하여금 치료용 단백질에 대해 항체를 생성시키도록 만들면서 이 단백질들 자체에 대한 면역 반응을 자극할 수 있다. 이 항체들은 또한 환자 자신이 내부적으로 생성하는, 상기 단백질들과 동일한 단백질들의 기능을 억제할 수도 있고, 이로 말미암아 환자 건강상 당면한 상태가 잠재적으로 오래가게 되는 결과가 초래된다.

[0006] 인터루킨-7("IL-7")은 T 세포, 장기 기억 T 세포, B 세포 및 기타 다른 면역 세포의 생존 및/또는 증식을 촉진하는 시토킨이다. 이 시토킨은, 세포 표면 단백질이자, 2 개의 상이한 소형 단백질 사슬들(즉, IL-7 수용체-알파 및 공통 감마)로 이루어진 IL-7 수용체에 결합한다. Kroemer et al. (1996) *Protein Eng.* 9(12):1135-1142. IL-7은 T 세포 레퍼토리를 확장시켜, 종양 항원의 더 다양한 표적화를 허용하는 것으로 보인다. IL-7의 이와 같은 활성 및 기타 다른 활성은 시토킨을, 면역계가 암 화학요법, HIV 감염 또는 기타 다른 질병, 질환 또는 화학물질에의 노출에 의해 손상된 환자를 치료하기 위한 치료용 단백질로서 유력한 후보로 만든다. 그러나, 이 IL-7의 면역 자극 특성이 기반이 되었을 때, 치료적으로 투여된 IL-7은 이 자체에 대한 항체 반응을 유도할 것으로 기대된다. 그러므로 당업계에는 면역원성은 더 약하지만, 면역계를 자극하는 특성은 보유하는 IL-7의 개선된 형태가 요망되고 있다.

[0007] 또한 IL-7 외부 투여가 행하여진 후 초래될 수 있는, IL-7의 비교적 높은 수준은 IL-7 수용체 발현의 상당하고 지속적인 감소를 유발할 수 있다. 예를 들어 문헌[Ghazawi et al. (2013) *Immunology and Cell Biology* 91:149-158]을 참조한다. 그러므로 비교적 높은 수준의 IL-7 작동제와 연계되어 IL-7 수용체 발현의 감소가 일어나지 않도록 하는 방식으로, 상기 IL-7 작동제 수준을 유지시키는 IL-7 기반 치료법도 또한 당업계에 요망되고 있다.

[0008] 그러므로 다른 무엇보다도 본 발명의 하나 이상의 구현예들은 IL-7과 비교되었을 때 다음과 같은 특징들, 즉 감소한 면역원성, 감소 또는 느려진 제거, 종양 환경에 더 편재화된 면역 반응의 활성화, 그리고 JAK/STAT 경로를 통한 지속적이고 오래 계속되는 신호전달 중 하나 이상을 가지는 IL-7의 형태들뿐만 아니라, 접합체를 포함하는 조성물, 그리고 본원에 기술된 바와 같은 관련 방법들에 관한 것이며, 이러한 구현예들은 당업계에서 신규하면서, 어느 누구에 의해서 제안된 적도 없던 것이라 믿어 의심치 않는다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0009] 그러므로, 본 발명의 하나 이상의 구현예들에서, 수용성 중합체에 공유 부착된 IL-7 부분의 잔기를 포함하는 접합체가 제공된다.

[0010] 본 발명의 하나 이상의 구현예들에서, 수용성 중합체에 공유 부착되어 있는 것으로서, 해리 가능한 결합을 통해 수용성 중합체에 공유 부착되어 있는 IL-7 부분의 잔기를 포함하는 접합체가 제공된다.

[0011] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, IL-7 부분의 잔기가 수용성 중합체에 공유적으로 부착되어 포함되어 있는 접합체로서, 상기 IL-7 부분의 잔기가 비유리성 결합을 통해 수용성 중합체(바람직하게 상기 수용성 중합체는 중량 평균 분자량이 5,000 달톤을 초과함)에 공유적으로 부착되어 있는 접합체가 제공된다.

[0012] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, IL-7 부분의 잔기가 수용성 중합체에 공유적으로 부착되어 포함되어 있는 접합체로서, 상기 IL-7 부분이 이황화물 결합에 관여하지 않는 시스테인 잔기가 존재하지 않는 접합체가 제공된다.

[0013] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, IL-7 부분의 잔기가 수용성 중합체에 공유적으로 부착되어 포함되어 있는 접합체로서, 상기 IL-7 부분이 인간 IL-7과 비교되었을 때 부가 시스테인 잔기를 가지고, 상기 수용성 중합체가 부가 시스테인 잔기에 공유적으로 부착되어 있는 접합체가 제공된다.

[0014] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, IL-7 부분의 잔기가 분지형 수용성 중합체에 공유적으로 부착되어 포함되어 있는 접합체가 제공된다.

[0015] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, IL-7 부분의 잔기가 수용성 중합체에 공유적으로 부착되어 포함되어 있는 접합체로서, 상기 IL-7 부분의 아민이 아미드 결합 이외의 결합을 통해 수용성 중합체에 공유적으로 부착되어 있는 접합체가 제공된다.

[0016] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, IL-7 부분의 잔기가 수용성 중합체에 공유적으로 부착되어 포함되어 있는 접합체로서, 상기 IL-7 부분의 아민이 아민 결합을 통해 수용성 중합체에 공유적으로 부착되어 있는 접합체가 제공된다.

[0017] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, IL-7 부분의 잔기가 수용성 중합체에 공유적으로 부착되어 포함되어 있는 접합체로서, 상기 접합체는 IL-7 부분의 잔기의 아민기에서 공유적으로 부착되는 것인 접합체가 제공된다.

[0018] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 약학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 본원에 기술된 바와 같은 접합체를 포함하는 조성물이 제공된다.

[0019] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, IL-7의 잔기와 수용성 중합체의 접합체로 구성된 조성물을 환자에 피하 투여하는 단계를 포함하는, 접합체를 전달하는 방법이 제공된다.

[0020] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 수용성 중합체에 공유적으로 부착되어 있는 IL-7 부분의 잔기를 포함하는 접합체로서, 상기 수용성 중합체는 공유적으로 부착되기 전 N-하이드록시숙신이미딜기를 보유하는 중합체 시약인 접합체가 제공된다.

[0021] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, 접합 조건 하에서 IL-7 부분과 중합체 시약을 접촉시키는 단계를 포함하는, 접합체를 제조하는 방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조된 mPEG2-NHS, 20 kDa-IL-7 접합체 용액의 RP-HPLC 분석 플롯이다.

도 2는 실시예 1에 기술된 바와 같은 mPEG2-NHS, 20 kDa의 양에 변화가 가하여졌을 때 IL-7의 접합체 반응 혼합

물의 SDS-PAGE 겔 영상이다.

도 3은 실시예 2에 기술된 바와 같이 제조된 mPEG2-NHS, 40 kDa-IL-7 접합체 용액의 RP-HPLC 분석 플롯이다.

도 4는 실시예 2에 기술된 바와 같은 mPEG2-NHS, 40 kDa의 양에 변화가 가하여졌을 때 IL-7의 접합체 반응 혼합물의 SDS-PAGE 겔 영상이다.

도 5는 실시예 3에 기술된 바와 같은 C2-PEG2-FMOC-NHS, 20 kDa의 양에 변화가 가하여졌을 때 IL-7의 접합체 반응 혼합물의 SDS-PAGE 겔 영상이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명의 하나 이상의 구현예를 상세히 기술하기 전에, 본 발명은 특정 중합체, 합성 기법, IL-7 부분 등으로 제한되지 않고, 이들은 다양화할 수 있음을 이해해야 한다.

[0024] 본 명세서 및 의도된 청구항에서 사용된 바와 같이, 단수형(“a”, “an” 및 “the”)은 문맥이 분명하게 다르게 지시하지 않는다면 복수의 지시대상물을 포함하는 것을 주의해야 한다. 따라서 예를 들어, “중합체”에 대한 언급은 단일의 중합체뿐만 아니라 둘 이상의 동일한 또는 상이한 중합체를 포함하고, “선택적인 부형제”에 대한 언급은 단일의 선택적인 부형제뿐만 아니라 둘 이상의 동일한 또는 상이한 선택적인 부형제 등을 지칭한다.

[0025] 본 발명의 하나 이상의 구현예를 기술하고 청구하는 것에서, 다음 용어는 하기에 기술된 정의에 따라서 사용될 것이다.

[0026] 본원에서 사용된 바와 같이 “PEG”, “폴리에틸렌 글리콜” 및 “폴리(에틸렌 글리콜)은 상호교환가능하며 임의의 비펩티드 수용성 폴리(에틸렌 옥사이드)를 포함한다. 통상적으로, 본 발명에 따른 용도에서 PEG는 다음의 구조 “$-(OCH_2CH_2)_n-$”((n)은 2 내지 4000임)를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, PEG는 또한 말단 산소가 예를 들어 합성 변환(synthetic transformation) 동안에 치환되는지 여부에 따라 “$-CH_2CH_2-O(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$” 및 “$-(OCH_2CH_2)_nO-$”를 포함한다. 명세서 및 청구항 전체에서, 용어 “PEG”는 다양한 말단 또는 “말단 캐핑(end capping)”기(group) 등을 가지는 구조를 포함하는 것을 기억해야 한다. 또한 용어 “PEG”는 대부분, 즉 50% 초과의 $-OCH_2CH_2-$ 반복 서브유닛을 포함하는 중합체를 의미한다. 특정 형태에 대하여, PEG는 임의의 수의 다양한 분자량뿐만 아니라, 하기에 보다 상세하게 기술되는 “분지형(branched)”, “선형(linear)”, “갈라진(forked)”, “다기능의(multifunctional)” 등과 같은 구조 또는 기하학적 구조를 취할 수 있다.

[0027] 용어 “말단 캐핑된(end-capped)” 및 “말단에 캐핑된(terminally capped)”은 본원에서 상호교환적으로 사용되어 말단 캐핑 부분(end-capping moiety)을 가지는 중합체의 말단 또는 종점을 지칭한다. 통상적으로, 필수적이지는 않지만 말단 캐핑 부분은 하이드록시 또는 C_{1-20} 알콕시기, 보다 바람직하게는 C_{1-10} 알콕시기, 보다 더 바람직하게는 C_{1-5} 알콕시기를 포함한다. 따라서, 말단 캐핑 부분의 예는 알콕시(예를 들어, 메톡시, 에톡시 및 벤질옥시)뿐만 아니라, 아릴, 헤테로아릴, 사이클로, 헤테로사이클로 등을 포함한다. 말단 캐핑 부분은 중합체에서 말단 단량체[예를 들어, $CH_3O(CH_2CH_2O)_n-$ 및 $CH_3(OCH_2CH_2)_n-$에서 말단 캐핑 부분 “메톡시”]의 하나 이상의 원자를 포함할 수 있음을 기억해야 한다. 덧붙여, 상기한 것의 각각의 포화, 불포화, 치환 및 비치환된 형태가 생각된다. 게다가, 말단 캐핑기(end-capping group)는 또한 실란일 수 있다. 또한 말단 캐핑기는 유리하게 검출가능한 표지를 포함할 수 있다. 중합체가 검출가능한 표지를 포함하는 말단 캐핑기를 가질 때, 중합체 및/또는 중합체가 결합한 부분(예를 들어, 활성제)의 양 또는 위치는 적합한 검출기를 사용하여 결정할 수 있다. 이와 같은 표지는 이에 한정되지 않지만, 형광물질, 화학발광물질, 효소 표지화에 사용되는 부분, 비색물질(예를 들어, 색소), 금속 이온, 방사성 부분 등을 포함한다. 적합한 검출기는 광도계, 필름, 분광계 등을 포함한다. 또한 말단 캐핑기는 유리하게 인지질을 포함할 수 있다. 중합체가 인지질을 포함하는 말단 캐핑기를 가질 때, 특유의 특성이 중합체 및 생성되는 접합체로 부여된다. 예시적인 인지질은 이에 한정되지 않지만, 포스파티딜콜린으로 불리는 인지질의 종류에서 선택되는 것들을 포함한다. 특이적인 인지질은 이에 한정되지 않지만, 디라우로일포스파티딜콜린(dilauroylphosphatidylcholine), 디올레일포스파티딜콜린(dioleylphosphatidylcholine), 디팔미토일포스파티딜콜린(dipalmitoylphosphatidylcholine), 디스테로일포스파티딜콜린(disteroylphosphatidylcholine), 베헤노일포스파티딜콜린(behenoylphosphatidylcholine), 아라키도일포스파티딜콜린(arachidoylphosphatidylcholine), 및 레시틴으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것들을 포함한다. 말단 캡핑기는 또한 표적화 부분을 포함할 수 있으므로, 중합체(및 이 중합체에 부착된 무엇, 예를 들어 IL-7 부분)

는 관심 부위에 우선적으로 국소화될 수 있다.

[0028] 본원에서 기술된 바와 같이 중합체에 대하여 "자연적으로 생성하지 않는"은 그 전체가 자연에서 발견되지 않는 중합체를 의미한다. 그러나 자연적으로 생성되지 않는 중합체는 전체 중합체 구조가 자연에서 발견되지 않는 한, 자연적으로 생성되는 하나 이상의 단량체 또는 자연적으로 생성되는 단량체의 분절을 포함할 수 있다.

[0029] "수용성 중합체" 중합체에서와 같이 용어 "수용성"은 실온에서 물에서 용해성인 임의의 중합체다. 통상적으로, 수용성 중합체는 여과 후에 동일한 용액에 의하여 전송된 (예를 들어, 600 nm 파장의) 빛의 적어도 약 75%, 보다 바람직하게는 적어도 약 95%를 전송할 것이다. 중량 기준으로, 수용성 중합체는 바람직하게 적어도 약 35%(중량으로) 물에서 용해하고, 보다 바람직하게는 적어도 약 50%(중량으로) 물에서 용해하며, 보다 더 바람직하게는 약 70%(중량으로) 물에서 용해하고, 보다 더 바람직하게는 약 85%(중량으로) 물에서 용해할 것이다. 그러나 수용성 중합체가 약 95%(중량으로) 물에서 용해하거나 또는 물에서 완전히 용해하는 것이 가장 바람직하다.

[0030] PEG와 같은 수용성 중합체의 맥락에서 분자량은 수 평균 분자량 또는 중량 평균 분자량으로서 표현될 수 있다. 다르게 지시되지 않는다면, 본원에서 분자량에 대한 모든 언급은 중량 평균 분자량을 말한다. 수 평균 및 중량 평균의 두 가지 분자량 결정 모두 겔 투과 크로마토그래피 또는 기타 다른 액체 크로마토그래피 기법을 사용하여 측정될 수 있다. 또한 말단기(end-group) 분석법의 사용 또는 수 평균 분자량 또는 광 산란 기법의 사용을 결정하는 총괄적 특성(예를 들어, 어는점 하락, 끓는점 상승, 또는 삼투압), 중량 평균 분자량을 결정하는 초원심분리, 또는 점도의 측정과 같은 분자량 값을 측정하는 기타 다른 방법을 사용할 수 있다. 본 발명의 중합체는 통상적으로 다분산이고(즉, 중합체의 수 평균 분자량 및 중량 평균 분자량은 동등하지 않음), 바람직하게는 약 1.2 미만, 보다 바람직하게는 약 1.15 미만, 보다 더 바람직하게는 약 1.10 미만, 훨씬 더 바람직하게는 약 1.05 미만, 및 가장 바람직하게는 약 1.03 미만의 낮은 다분산 값을 가진다.

[0031] 특정 작용기와 함께 사용될 때 용어 "활성", "반응성" 또는 "활성화"는 다른 분자 상에서 친전자체(electrophile) 또는 친핵체(nucleophile)와 용이하게 반응하는 반응성 작용기를 말한다. 이는 반응하기 위하여 강한 촉매 또는 매우 비현실적인 반응 조건을 필요로 하는 기들(즉, "비반응성" 또는 "불활성"기)과 반대이다.

[0032] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "작용기" 또는 이의 임의의 동의어는 이의 보호된 형태뿐만 아니라 비보호된 형태도 포함하는 것으로 의미한다.

[0033] 용어 "스페이서 부분", "결합" 및 "링커"는 본원에서 선택적으로 중합체 시약의 말단 및 IL-7 부분 또는 IL-7 부분의 친전자체 또는 친핵체와 같은 상호 결합하는(interconnecting) 부분을 결합하는 데 사용되는 결합 또는 원자 또는 원자의 집합을 지칭하는 것으로 사용된다. 스페이서 부분은 가수분해적으로 안정적일 수 있거나 또는 생리적으로 가수분해되거나 효소로 분해가능한 결합을 포함할 수 있다. 문맥이 다르게 분명하게 지시하지 않는다면, 스페이서 부분은 선택적으로 화합물의 임의의 두 가지 요소 사이에 존재한다(예를 들어, IL-7 부분의 잔기 및 수용성 중합체를 포함하는 제공된 접합체는 직접적으로 또는 스페이서 부분을 통해 간접적으로 부착될 수 있다).

[0034] "알킬"은 통상적으로 길이가 약 1 개 내지 15 개 원자의 범위인 탄화수소 사슬을 말한다. 이와 같은 탄화수소 사슬은 필수적이지는 않지만 바람직하게는 포화되어 있고 분지형 또는 직선형 사슬일 수 있지만 통상적으로 직쇄가 바람직하다. 예시적인 알킬기로서는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸, 펜틸, 3-메틸펜틸 등을 포함한다.

[0035] "저급 알킬"은 1 개 내지 6 개의 탄소 원자를 포함하는 알킬기를 말하고, 메틸, 에틸, *n*-부틸, *i*-부틸, 및 *t*-부틸로 예시되는 바와 같이 직쇄 또는 분지형일 수 있다.

[0036] "사이클로알킬"은 가교(bridged), 융합 또는 스피로 사이클릭 화합물을 포함하여 포화 또는 불포화 사이클릭 탄화수소 사슬을 말하며, 바람직하게는 3 개 내지 약 12 개의 탄소 원자, 보다 바람직하게는 3 개 내지 약 8 개의 탄소 원자로 구성된다. "사이클로알킬렌"은 사이클릭 고리계 내 임의의 2 개의 탄소에서 사슬의 결합으로써 알킬 사슬 내로 삽입되는 사이클로알킬기를 말한다.

[0037] "알콕시"는 -OR기를 말하며, 여기서 R은 알킬 또는 치환된 알킬, 바람직하게는 C_{1-6} 알킬(예를 들어, 메톡시, 에톡시, 프로필옥시 등)이다.

[0038] 예를 들어 "치환된 알킬"에서와 같이, 용어 "치환된"은 하나 이상의 비간섭(noninterfering) 치환기, 예를 들어 이로 한정되지 않지만 알킬, 예를 들어 사이클로프로필, 사이클로부틸 등과 같은 C_{3-8} 사이클로알킬; 예를

들어 플루오로, 클로로, 브로모 및 요오드와 같은 할로; 시아노; 알콕시, 저급 페닐; 치환된 페닐; 등으로 치환되는 부분(예를 들어, 알킬기)을 말한다. "치환된 아릴"은 치환기로서 하나 이상의 비간섭기를 가지는 아릴이다. 페닐 고리상에서의 치환에 대하여, 치환기는 임의의 방향(즉, 오르토, 메타 또는 파라)으로 있을 수 있다.

[0039] "비간섭 치환기"는 분자 내에 존재할 때 통상적으로 분자 내에 포함되는 기타 다른 작용기와 반응하지 않는 기들이다.

[0040] "아릴"은 각각 5 개 또는 6 개의 코어 탄소 원자를 가지는 하나 이상의 방향족 고리를 의미한다. 아릴은 나프틸에서와 같이 융합될 수 있거나 또는 바이페닐에서와 같이 융합되지 않을 수 있는 다수의 아릴 고리를 포함한다. 또한 아릴 고리는 하나 이상의 사이클릭 탄화수소, 헤테로아릴, 또는 헤테로사이클릭 고리와 융합되거나 또는 융합되지 않을 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "아릴"은 헤테로아릴을 포함한다.

[0041] "헤테로아릴"은 바람직하게 황, 산소, 또는 질소, 또는 이들의 조합인, 1 개 내지 4 개의 헤테로원자를 포함하는 아릴기이다. 또한 헤테로아릴 고리는 하나 이상의 사이클릭 탄화수소, 헤테로사이클릭, 아릴, 또는 헤테로아릴 고리와 융합될 수 있다.

[0042] "헤테로사이클" 또는 "헤테로사이클릭"은 불포화 또는 방향족 특징을 가지거나 가지지 않으며, 탄소가 아닌 적어도 하나의 고리 원자를 가지는 5 개 내지 12 개 원자, 바람직하게는 5 개 내지 7 개 원자의 하나 이상의 고리를 의미한다. 바람직한 헤테로원자는 황, 산소, 및 질소를 포함한다.

[0043] "치환된 헤테로아릴"은 치환기로서 하나 이상의 비간섭기를 가지는 헤테로아릴이다.

[0044] "치환된 헤테로사이클"은 비간섭 치환기로 형성된 하나 이상의 측쇄를 가지는 헤테로사이클이다.

[0045] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "유기 라디칼"은 알킬, 치환된 알킬, 아릴, 및 치환된 아릴을 포함할 것이다.

[0046] "친전자체(electrophile)" 및 "친전자성기(electrophilic group)"는 친전자성 중심, 즉 전자를 구하고, 친핵체와 반응할 수 있는 중심을 가지는, 이온 또는 이온성일 수 있는 원자 또는 원자들의 집합을 말한다.

[0047] "친핵체(nucleophile)" 및 "친핵성기(nucleophilic group)"는 친핵성 중심, 즉 친전자성 중심을 구하거나 또는 친전자체와 반응할 수 있는 중심을 가지는, 이온 또는 이온성일 수 있는 원자 또는 원자들의 집합을 지칭한다.

[0048] "효소로 분해가능한 결합"은 하나 이상의 효소에 의한 분해의 대상이 되는 결합을 의미한다.

[0049] "가수분해가능한" 결합은 생리적 조건들 하에서 물과 반응하는(즉, 가수분해되는) 결합이다. 어느 결합이 물 속에서 가수분해되는 경향은 2 개의 중심 원자들을 연결하는 결합의 일반적인 유형뿐만 아니라, 이러한 중심 원자들에 부착된 치환기들에 따라서 달라질 것이다. 가수분해에 불안정적이거나 약한 결합으로서 적절한 것으로는 카르복실레이트 에스테르, 포스페이트 에스테르, 무수물, 아세탈, 케탈, 아실옥시알킬 에테르, 이민, 오르토에스테르, 펩티드 및 올리고뉴클레오티드를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. "유리가능한 결합"은 임상학적으로 유용한 속도로 생리적 조건 하에서 절단되는 공유 결합으로서, 예를 들어 가수분해가능한 결합과 효소에 의해 분해가능한 결합을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0050] "가수분해에 안정적인" 연결 또는 결합은 실질적으로 물에서 안정적인, 즉 생리적 조건 하에서 길어진 시간 동안 임의의 주목할 만한 정도로 가수분해되지 않는 화학적 결합, 통상적으로 공유 결합을 말한다. 가수분해에 안정적인 결합의 예로서는 이에 한정되지 않지만 탄소-탄소 결합(예를 들어, 지방족 사슬에서), 에테르, 아미드, 우레탄 등을 포함한다. 일반적으로, 가수분해에 안정적인 결합은 생리적 조건 하에서 하루에 약 1% 내지 2% 미만의 가수분해율을 나타내는 것이다. 대표적인 화학 결합의 가수분해율은 대부분의 표준 화학 교과서에서 찾을 수 있다.

[0051] "약학적으로 허용가능한 부형제 또는 담체"는 본 발명의 조성물 내에 선택적으로 포함될 수 있고 환자에게 어떤 상당한 부정적인 독성 효과를 야기하지 않는 부형제를 말한다.

[0052] "약리학적으로 유효한 양", "생리적으로 유효한 양" 및 "치료적으로 유효한 양"은 혈류에서 또는 표적 조직에서 중합체-(IL-7) 부분 접합체(또는 이에 상응하는 접합되지 않은 IL-7 부분)의 원하는 수준을 제공하는데 필요한 중합체-(IL-7) 부분 접합체의 양을 의미하는 것으로 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 정확한 양은 다수의 인자, 예를 들어 특정 IL-7 부분, 치료 조성물의 구성요소 및 물리적 특성, 의도된 환자 집단, 개별적인 환자 고려사항 등과 같은 인자에 따라 다를 것이고, 이는 본원에서 제공된 정보에 기초하여 당업자에 의해 용이

하게 결정될 수 있다.

[0053] “다작용성”은 중합체가 그 내부에 3 개 이상의 작용기를 가지는 경우를 의미하는데, 여기서 작용기들은 동일하거나 상이할 수 있다. 본 발명의 다작용성 중합체 시약은 통상적으로 약 3 개 내지 100 개의 작용기를 포함할 것이고, 이하의 범위들 중 하나 이상을 만족하는 수의 작용기를 포함할 수 있다: 3 개 내지 50 개의 작용기; 3 개 내지 25 개의 작용기; 3 개 내지 15 개의 작용기; 3 개 내지 10 개의 작용기. 예를 들어, 중합체 골격 내 작용기의 수는 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 7 개, 8 개, 9 개 및 10 개의 작용기로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0054] 본원에 사용된 바와 같이 용어 “IL-7 부분”은 인간 IL-7 활성을 가지는 펩티드 또는 단백질 부분을 말한다. IL-7 부분은 또한 중합체 시약과의 반응에 적합한 하나 이상의 친전자성기 또는 친핵성기를 가질 것이다. 덧붙여, 용어 “IL-7 부분”은 접합 이전의 IL-7 부분과 접합 후의 IL-7 부분 잔기 둘 다를 포함한다. 하기에서 보다 상세히 설명될 바와 같이, 당업자는 임의의 주어진 부분이 IL-7 활성을 가지는지 여부를 결정할 수 있다. 서열 번호 1 내지 8 중 어느 하나에 상응하는 아미노산 서열을 포함하는 단백질은 IL-7 부분일 뿐만 아니라, 상기 서열들에 실질적으로 상동성인 임의의 단백질 또는 폴리펩티드이다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 “IL-7 부분”은, 예를 들어 부위 지정 돌연 변이 유발법 또는 우발적 통과 돌연 변이(accidentally through mutation)에 의해 고의적으로 변형된 펩티드 및 단백질을 포함한다. 이러한 용어는 또한 1 개 내지 6 개의 부가 글리코실화 부위를 가지는 유사체, 펩티드 또는 단백질의 카복시 말단에 적어도 하나의 부가 아미노산(여기서, 부가 아미노산(들)은 적어도 하나의 글리코실화 부위를 포함함)을 가지는 유사체, 그리고 적어도 하나의 글리코실화 부위를 포함하는 아미노산 서열을 가지는 유사체를 포함한다. 상기 용어는 자연적으로 생성되는 부분, 재조합에 의해 생성되는 부분 및 합성으로 생성되는 부분을 포함한다.

[0055] 용어 “실질적으로 상동성인”은 특정 주제 서열, 예를 들어 돌연 변이 서열이 하나 이상의 치환, 결실 또는 부가에 의해 기준 서열과 차이가 나지만, 그 순 효과가 기준 서열과 주제 서열 간 비유사성의 기능적 불리함을 가져오지 않는 것을 의미한다. 본 발명을 위하여, 95% 초과의 상동성을 가지고, 생물학적 활성이 동등하며(반드시 생물학적 활성의 세기까지 동등할 필요는 없음), 발현 특징도 동등한 서열은 실질적으로 상동성인 것으로 간주된다. 상동성을 측정하기 위하여, 성숙한 서열의 절단은 무시되어야 한다. 본원에 사용되는 예시적인 IL-7 부분으로서는 서열 번호 1과 실질적으로 상동성인 서열들을 포함한다.

[0056] 용어 “단편”은 IL-7 부분의 일부 또는 단편의 아미노산 서열을 가지면서, IL-7의 생물학적 활성을 가지는 임의의 단백질 또는 폴리펩티드를 의미한다. 단편은 IL-7 부분의 단백 분해에 의하여 생산된 단백질 또는 폴리펩티드뿐만 아니라, 당업계의 통상적인 방법에 의한 화학 합성법에 의해 생산된 단백질 또는 폴리펩티드를 포함한다.

[0057] 용어 “환자”는 활성제(예를 들어, 접합체)의 투여로 예방되거나 치료될 수 있는 병태를 겪거나 겪기 쉬운 생물체를 말하고, 인간과 동물 모두 포함한다.

[0058] “선택적인” 또는 “선택적으로”는 이후에 기술되는 상황이 일어날 수도 있고 일어나지 않을 수도 있어서, 기술은 상황이 일어나는 경우 및 상황이 일어나지 않는 경우를 포함하는 것을 의미한다.

[0059] “실질적으로”는 거의 전부 또는 완전히, 예를 들어 조건의 50% 초과, 51% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 및 95% 이상 중 하나 이상을 만족하는 것을 의미한다.

[0060] 펩티드 내의 아미노산 잔기는 다음과 같이 축약된다: 페닐알라닌은 Phe 또는 F이고; 류신은 Leu 또는 L이며; 이소류신은 Ile 또는 I이고; 메티오닌은 Met 또는 M이며; 발린은 Val 또는 V이고; 세린은 Ser 또는 S이며; 프롤린은 Pro 또는 P이고; 트레오닌은 Thr 또는 T이며; 알라닌은 Ala 또는 A이고; 티로신은 Tyr 또는 Y이며; 히스티딘은 His 또는 H이고; 글루타민은 Gln 또는 Q이며; 아스파라긴은 Asn 또는 N이고; 리신은 Lys 또는 K이며; 아스파르트산은 Asp 또는 D이고; 글루탐산은 Glu 또는 E이며; 시스테인은 Cys 또는 C이고; 트립토판은 Trp 또는 W이며; 아르기닌은 Arg 또는 R이고; 글리신은 Gly 또는 G이다.

[0061] 본 발명의 하나 이상의 구현예에 따라서 접합체를 제공하며, 상기 접합체는 수용성 중합체에 (직접적으로 또는 스페이서 부분을 통해서) 공유적으로 부착된 IL-7 부분의 잔기를 포함한다. 본 발명의 접합체는 하나 이상의 하기 특성을 가질 것이다.

[0062] IL-7 부분

[0063] 앞서 진술한 바와 같이, 접합체는 수용성 중합체에 직접적으로 또는 스페이서 부분을 통해 공유적으로 부착된

IL-7 부분의 잔기를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "IL-7 부분"은 접합 전의 IL-7 부분뿐만 아니라 비펩티드 수용성 중합체에 부착한 후의 IL-7 부분도 말할 것이다. 그러나, 원래의 IL-7 부분은 비펩티드 수용성 중합체에 부착할 때, 중합체(들)에의 결합과 연관된 하나 이상의 공유 결합의 존재 때문에 IL-7 부분은 약간 변형된다는 것을 이해할 것이다. 종종 다른 분자에 부착된 IL-7 부분의 약간 변형된 형태는 IL-7 부분의 "잔기"로 지칭된다.

[0064] IL-7 부분은 비재조합 방법에서 및 재조합 방법에서 유래할 수 있고 본 발명은 이와 관련하여 한정되지 않는다. 덧붙여, IL-7 부분은 인간 출처, 동물 출처(곤충을 포함함), 진균 출처(효모를 포함함), 및 식물 출처로부터 유래할 수 있다.

[0065] IL-7 부분은 문헌[Namen et al. (1998) *J. Exp. Med.* 167:988-1002] 외 다수에 의해 기술된 절차에 따라서 수득될 수 있다.

[0066] IL-7 부분은 재조합 방법으로부터 유래할 수 있다. 예를 들어 문헌[Ouellette et al. (2003) *Protein Expression and Purification* 30:156-166]을 참조한다.

[0067] IL-7 부분은, 예를 들어 eBioscience, Inc.(San Diego, CA)로부터 상업적으로 구입될 수 있다.

[0068] IL-7 부분은 박테리아, 예를 들어 이.콜라이(*E. coli*)[예를 들어, 문헌[Fischer et al. (1995) *Biotechnol. Appl. Biotechnol.* 21(3):295-311] 참조], 포유류[예를 들어, 문헌[Kronman et al. (1992) *Gene* 121:295-304] 참조], 효모, 예를 들어 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)[예를 들어, 문헌[Morel et al. (1997) *Biochem. J.* 328(1):121-129] 참조], 그리고 식물[예를 들어, 문헌[Mor et al. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 75(3):259-266] 참조] 발현 시스템 내에서 발현될 수 있다. 발현은 외부 발현(숙주 세포가 자연적으로 원하는 유전 암호를 포함할 때)을 통하거나 내부 발현을 통하여 일어날 수 있다.

[0069] 단백질을 제조하기 위한 재조합에 기초한 방법이 상이할 수 있더라도, 재조합 방법은 통상적으로 원하는 폴리펩티드 또는 단편을 암호화하는 핵산을 구성하는 단계, 상기 핵산을 발현 벡터 내로 클로닝하는 단계, 숙주 세포(예를 들어, 식물, 박테리아, 효모, 유전자이식 동물 세포, 또는 차이니즈 햄스터 난소 세포 또는 아기 햄스터 신장 세포와 같은 포유류 세포)를 형질변환시키는 단계, 및 핵산을 발현시켜 원하는 폴리펩티드 또는 단편을 생성하는 단계를 포함한다. 시험관내에서 및 원핵 및 진핵 숙주 세포에서 재조합 폴리펩티드를 생성 및 발현하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다.

[0070] 재조합 폴리펩티드의 확인 및 정제를 용이하게 하기 위하여, 에피토프 태그(epitope tag) 또는 기타 다른 친화성 결합 서열에 대하여 암호화하는 핵산 서열은 암호화 서열과 함께 프레임 내에 삽입되거나 부가될 수 있고, 그렇게 함으로써 원하는 폴리펩티드 및 결합에 적합한 폴리펩티드로 구성된 융합 단백질을 생성한다. 융합 단백질은 융합 단백질 내에서 에피토프 태그 또는 기타 다른 결합 서열에 대해 지시된 결합 부분(예를 들어, 항체)을 가지는 친화성 컬럼을 통해 융합 단백질을 포함하는 혼합물을 먼저 러닝(running)하고 그렇게 하여 컬럼 내에 융합 단백질을 결합시킴으로써 확인 및 정제할 수 있다. 그 후에, 적절한 용액(예를 들어, 산)으로 컬럼을 세척하여 결합된 융합 단백질을 방출시킴으로써 융합 단백질을 회수할 수 있다. 재조합 폴리펩티드는 또한 숙주 세포를 용균시키고, 폴리펩티드를 예를 들어 이온 교환 크로마토그래피, 친화성 결합 접근법, 소수성 상호 작용 접근법에 의해 분리한 후, MALDI 또는 웨스턴 블럿에 의해 확인한 다음, 폴리펩티드를 수집함으로써 정제될 수 있다. 재조합 폴리펩티드를 확인 및 정제하는 상기와 같은 방법과 기타 다른 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 그러나, 본 발명의 하나 이상의 구현예에서, IL-7 부분은 융합 단백질의 형태가 아니다.

[0071] IL-7 활성을 가지는 단백질을 발현하는 데에 사용된 시스템에 따라서, IL-7 부분은 글리코실화되지 않을 수 있거나 글리코실화될 수 있으며, 이 두 형태 중 어느 하나가 사용될 수 있다. 다시 말해서, IL-7 부분은 글리코실화되지 않을 수 있거나, 또는 이 IL-7 부분은 글리코실화될 수 있다. 본 발명의 하나 이상의 구현예들에서, IL-7 부분은 글리코실화되지 않는다. IL-7 부분이 글리코실화되는 이러한 구현예들에서, 접합은 선택적으로 탄수화물 상에서 (예를 들어 미국 특허 7,956,032에 기술된 방식으로) 이루어질 수 있다.

[0072] 유리하게, IL-7 부분은 아미노산 측쇄 내부 원자에의 중합체의 용이한 부착을 제공하기 위하여, 하나 이상의 아미노산 잔기, 예를 들어 리신, 시스테인 및/또는 아르기닌을 포함하고/포함하거나 치환하도록 변형될 수 있다. IL-7 부분의 치환에 관한 일례가 미국 특허 번호 6,177,079에 기술되어 있다. 덧붙여, IL-7 부분은 자연적으로 생성되지 않는 아미노산 잔기를 포함하도록 변형될 수 있다. 아미노산 잔기 및 자연적으로 생성되지 않는 아미노산 잔기를 부가하는 기법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 문헌[J. March, Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure, 4th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992)]을 참조한다.

[0073] 덧붙여, 유리하게 IL-7 부분은 작용기의 부착을 포함하도록 변형될 수 있다(작용기 포함 아미노산 잔기를 부가함으로 인하여 변형되는 경우 제외). 예를 들어, IL-7 부분은 티올기를 포함하도록 변형될 수 있다. 덧붙여, IL-7 부분은 N-말단 알파 탄소를 포함하도록 변형될 수 있다. 덧붙여, IL-7 부분은 하나 이상의 탄수화물 부분을 포함하도록 변형될 수 있다. 덧붙여, IL-7 부분은 알데히드기를 포함하도록 변형될 수 있다. 덧붙여, IL-7 부분은 케톤기를 포함하도록 변형될 수 있다. 본 발명의 몇몇 구현예에서, IL-7 부분은 티올기, N-말단 알파 탄소, 탄수화물, 알데히드기 및 케톤기 중 하나 이상을 포함하도록 변형되지 않는 것이 바람직하다.

[0074] 예시적인 IL-7 부분들은 본원, 문헌, 그리고, 예를 들어 미국 특허 7,589,179, 및 문헌[Wong et al. (2013) *OncoImmunology* 2(11), e26442:1-3], [Romano et al. (1998) Protein Engineering 11(1):31-40], 및 [Vudattu et al. (2009) Genes and Immunity 10:132 140]에 기술되어 있다. 바람직한 IL-7 부분들은 서열 번호 1 내지 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열들, 그리고 이 서열들과 실질적으로 상동성인 서열들을 포함하는 아미노산 서열을 가지는 것들을 포함한다. 바람직한 IL-7 부분은 서열 번호 1에 상응하는 아미노산 서열을 가진다.

[0075] 몇몇 예에서, IL-7 부분은 “단량체” 형태를 가질 것인데, 여기서 상응하는 펩티드의 단일 발현은 불연속적 단위로 조직화된다. 다른 예에서, IL-7 부분은 단백질의 단량체 형태들 2 개가 서로 결합되어 있는 “이량체”(예를 들어, 재조합 IL-7의 이량체)의 형태를 가질 것이다.

[0076] 전술된 서열들 중 임의의 것의 절단된 형태, 하이브리드 변이체 및 펩티드 모의체는 또한 IL-7 부분으로서 사용될 수 있다. IL-7 활성을 적어도 어느 정도 유지하는 전술된 것들 중 임의의 것의 생물학적 활성 단편, 결실 변이체, 치환 변이체 또는 부가 변이체도 또한 IL-7 부분으로서 사용될 수 있다.

[0077] 임의의 소정 펩티드 또는 단백질 부분이 IL-7 활성을 가지는지 여부를 확인하는 것이 가능하다. 시험관 내 IL-7 활성을 확인하기 위한 다양한 방법들이 당업계에 기술되어 있다. 예를 들어 임의의 제안된 IL-7 부분 및 이로부터 제조된 접합체의 생물활성은 IL-7 의존적 쥣과동물 프로-B 세포주 2E8이 사용되어 평가될 수 있는데, 이때 상기 세포주로부터 유래하는 세포는 한정된 기간 동안 특정 범위의 농도만큼의 관심 시험 물질에 노출되고, 신호전달 단백질 STAT5의 인산화 정도는 생물활성의 정량적 척도로서 사용된다. 이와 같은 시험에서, 다음과 같은 성질들, 즉 (a) 인간 원산 IL-7의 포화 용량에 의해 유도되는 STAT5 인산화 수준의 적어도 10%에 해당하는 STAT5 인산화 수준; 및 (b) 인간 원산 IL-7의 EC50보다 1000 배 미만으로 더 높은 EC50 중 적어도 하나를 보이는 시험 물질들은 IL-7 활성을 가지는 것으로 이해된다. 시험 물질이 본 발명의 중합체 접합체일 때, 이 접합체는 인간 원산 IL-7의 포화 용량에 의해 유도되는 STAT5 인산화 수준의 적어도 50%인 STAT5 인산화 수준을 보일 것이고/보일 것이거나, 인간 원산 IL-7의 EC50보다 10 배 미만으로 더 높은 EC50을 보일 것이 바람직하다. 중합체 접합체는 최소량의 IL-7 생물활성을 나타낼 수 있음이 이해되지만, 하나 이상의 수용성 중합체의 방출로 말미암아 여전히 본 발명의 범위 내에 속하는 접합체인 것으로 이해된다(이 경우, 접합체의 “하류” 형태, 예를 들어 환자에게 투여된 형태에 비하여 수용성 중합체들 중 하나 이상이 결실된 형태는 다음과 같은 성질들, 즉 (a) 인간 원산 IL-7의 포화 용량에 의해 유도되는 STAT5 인산화 수준의 적어도 10%에 해당하는 STAT5 인산화 수준; 및 (b) 인간 원산 IL-7의 EC50보다 1000 배 미만으로 더 높은 EC50 중 적어도 하나를 나타냄).

[0078] 전기 분석법, 분광분석법, 크로마토그래피 및 방사 측정 방법을 비롯하여 당업계에 공지된 기타 다른 방법들은 또한 IL-7 기능을 평가하는 데 사용될 수 있다.

[0079] IL-7 부분의 활성을 측정하는 것과 연계하여 사용되는 분석법도 또한 본원에 기술된 접합체의 활성을 측정하는 데 사용될 수 있다. 그러나, 주어진 접합체의 특성들(예를 들어, 유리가능한 결합의 혼입, 대사를 견딜 수 있는 능력, 증가된 반감기 및 선택적 결합 특성 등)로 말미암아, 접합체는 반드시 본원에 정의된 IL-7 부분의 활성과 동일한 활성을 나타낼 필요는 없다.

[0080] 수용성 중합체

[0081] 앞서 검토한 바와 같이, 각각의 접합체는 수용성 중합체에 부착된 IL-7 부분을 포함한다. 수용성 중합체에 대하여, 수용성 중합체는 비펩티드성이고, 비독성이며, 자연적으로 생성되지 않고 생체적합성이다. 생체적합성에 대하여, 물질 단독 또는 살아있는 조직과 관련된 다른 물질(예를 들어, IL-7 부분과 같은 활성제)과의 사용(예를 들어, 환자에게 투여)과 연관된 이로운 효과가 임상의, 예를 들어 내과의가 평가한 바와 같은 임의의 유해한 효과 보다 크다면 그 물질은 생체적합성인 것으로 고려된다. 비면역원성에 대하여, 생체내에서 물질의 의도된 사용이 원하지 않는 면역 반응(예를 들어, 항체 형성)을 생성하지 않는다면 그 물질은 비면역원성인 것으로 고려되고, 또는 면역 반응이 생성되면 그러한 반응은 임상의가 평가한 바와 같은 임상적으로 유의한 또는 중요한 것으로 여겨지지 않는다. 비펩티드성 수용성 중합체가 생체적합성이고 비면역원성인 것이 특히 바람직하다.

[0082] 추가적으로, 중합체는 통상적으로 2 개 내지 약 300 개의 종점을 가지는 것으로 특징지어진다. 상기 중합체의 예는 이에 한정되지 않지만 폴리(알킬렌 옥사이드), 예를 들어 폴리(알킬렌 글리콜), 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(“PEG”), 폴리(프로필렌 글리콜)(“PPG”), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜 등의 공중합체, 폴리(옥시에틸화된 폴리올), 폴리(올레핀 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(하이드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(하이드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α-하이드록시산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린(“POZ”)(WO 2008/106186호에 기술되어 있음), 폴리(N-아크릴로일모르폴린), 및 상기한 것 중의 임의의 것의 조합을 포함한다. 상기 폴리(에틸렌 글리콜)은 하이드록시, 알콕시, 치환된 알콕시, 알케녹시, 치환된 알케녹시, 알키녹시, 치환된 알키녹시, 아릴옥시 및 치환된 아릴옥시로 이루어진 군으로부터 선택되는 말단 캡핑 부분으로 말단이 캡핑된 것일 수 있다.

[0083] 수용성 중합체는 특정 구조로 제한되지 않고 선형(예를 들어, 말단 캐핑된, 예를 들어 알콕시 PEG 또는 이기능성 PEG), 분지형 또는 다수의 팔을 가진(multi-armed)(예를 들어, 갈라진 PEG 또는 폴리올 코어에 부착된 PEG), 수지상(또는 별) 구조(architecture)일 수 있으며, 각각은 하나 이상의 분해가능한 결합을 가지거나 가지지 않을 수 있다. 더욱이, 수용성 중합체의 내부 구조는 임의의 수의 상이한 반복 패턴으로 구조화될 수 있고 동종중합체, 교호 공중합체(alternating copolymer), 랜덤 공중합체(random copolymer), 블록 공중합체(block copolymer), 교호 삼중합체(alternating tripolymer), 랜덤 삼중합체(random tripolymer), 및 블록 삼중합체(block tripolymer)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0084] 통상적으로, 활성화된 PEG 및 기타 다른 활성화된 수용성 중합체(즉, 중합체 시약)는 IL-7 부분 상에서 원하는 부위와 결합하는데 적절한, 적합한 활성화기로 활성화된다. 따라서, 중합체 시약은 IL-7 부분과 반응하는 반응기를 가질 것이다. 이들 중합체를 활성 부분에 접합시키는 대표적인 중합체 시약 및 방법은 당업계에 공지되어 있고 문헌[Zalipsky, S., et al., "*Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides*", Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Plenus Press, New York (1992)], 및 [Zalipsky (1995) *Advanced Drug Reviews* 16:157-182]에 더 기술되어 있다. IL-7 부분에 결합하는데 적합한 예시적인 활성화기는 특히 하이드록실, 말레이미드, 에스테르, 아세탈, 케탈, 아민, 카복실, 알데히드, 알데히드 수화물, 케톤, 비닐 케톤, 티온, 티올, 비닐 술폰, 하이드라진을 포함한다.

[0085] 통상적으로, 접합체에서 수용성 중합체의 중량 평균 분자량은 약 100 달톤 내지 약 150,000 달톤이다. 그러나 예시적인 범위는 5,000 달톤 초과 내지 약 100,000 달톤의 범위로, 약 6,000 달톤 내지 약 90,000 달톤의 범위로, 약 10,000 달톤 내지 약 85,000 달톤의 범위로, 10,000 달톤 초과 내지 약 85,000 달톤의 범위로, 약 20,000 달톤 내지 약 85,000 달톤의 범위로, 약 53,000 달톤 내지 약 85,000 달톤의 범위로, 약 25,000 달톤 내지 약 120,000 달톤의 범위로, 약 29,000 달톤 내지 약 120,000 달톤의 범위로, 약 35,000 달톤 내지 약 120,000 달톤의 범위로, 및 약 40,000 달톤 내지 약 120,000 달톤의 범위로 중량 평균 분자량을 포함한다. 임의의 주어진 수용성 중합체에 대하여, 분자량이 이들 범위 중 하나 이상인 PEG가 바람직하다.

[0086] 수용성 중합체에 대하여 예시적인 중량 평균 분자량은 약 100 달톤, 약 200 달톤, 약 300 달톤, 약 400 달톤, 약 500 달톤, 약 600 달톤, 약 700 달톤, 약 750 달톤, 약 800 달톤, 약 900 달톤, 약 1,000 달톤, 약 1,500 달톤, 약 2,000 달톤, 약 2,200 달톤, 약 2,500 달톤, 약 3,000 달톤, 약 4,000 달톤, 약 4,400 달톤, 약 4,500 달톤, 약 5,000 달톤, 약 5,500 달톤, 약 6,000 달톤, 약 7,000 달톤, 약 7,500 달톤, 약 8,000 달톤, 약 9,000 달톤, 약 10,000 달톤, 약 11,000 달톤, 약 12,000 달톤, 약 13,000 달톤, 약 14,000 달톤, 약 15,000 달톤, 약 20,000 달톤, 약 22,500 달톤, 약 25,000 달톤, 약 30,000 달톤, 약 35,000 달톤, 약 40,000 달톤, 약 45,000 달톤, 약 50,000 달톤, 약 55,000 달톤, 약 60,000 달톤, 약 65,000 달톤, 약 70,000 달톤, 및 약 75,000 달톤을 포함한다. 또한 총 분자량이 상기한 것 중 임의의 것인 수용성 중합체의 분지형 형태(예를 들어, 두 개의 20,000 달톤 중합체로 구성되는 분지형 40,000 달톤의 수용성 중합체)를 사용할 수 있다. 하나 이상의 구현예에서, 접합체는 중량 평균 분자량이 약 6,000 달톤 미만인 PEG와 직접적으로 또는 간접적으로 부착된 임의의 PEG 부분을 가지지 않을 것이다.

[0087] 중합체로서 사용될 때, PEG는 통상적으로 많은 (OCH_2CH_2) 단량체[또는 PEG를 정의한 방법에 따라 (CH_2CH_2O) 단량체]를 포함할 것이다. 기술 전체에 사용된 바와 같이, 반복 유닛의 수는 “$(OCH_2CH_2)_n$”에서 아래첨자 “n”으로 확인된다. 따라서, (n)의 값은 통상적으로 2 내지 약 3400, 약 100 내지 약 2300, 약 100 내지 약 2270, 약 136 내지 약 2050, 약 225 내지 약 1930, 약 450 내지 약 1930, 약 1200 내지 약 1930, 약 568 내지 약 2727, 약 660 내지 약 2730, 약 795 내지 약 2730, 약 795 내지 약 2730, 약 909 내지 약 2730, 및 약 1,200 내지 약

1,900 범위의 하나 이상 내에 해당한다. 분자량이 공지된 임의의 주어진 중합체에 대하여, 중합체의 총 중량 평균 분자량을 반복 단량체의 분자량으로 나눔으로써 반복 유닛의 수(즉, "n")를 결정하는 것이 가능하다.

[0088] 또한 하이드록실기를 사용할 수 있지만, 본 발명에서의 사용을 위한 하나의 특히 바람직한 중합체는 말단 캐핑된 중합체, 즉 상대적으로 불활성기, 예를 들어 저급 C_{1-6} 알콕시기와 같은 기로 캐핑된 적어도 하나의 말단을 가지는 중합체이다. 중합체가 PEG일 때, 예를 들어 메톡시-PEG(보통 mPEG로 지칭됨)를 사용하는 것이 바람직하며, 메톡시-PEG는 중합체의 하나의 말단이 메톡시($-OCH_3$)기인 반면 다른 말단은 하이드록실 또는 선택적으로 화학적으로 변형될 수 있는 기타 다른 작용기인 PEG의 선형 형태이다.

[0089] 본 발명의 하나 이상의 구현예에 유용한 하나의 형태에서, 자유 또는 비결합 PEG는 각 말단에서 하이드록실기로 종결되는 선형 중합체이며,

[0090] $HO-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-OH$

[0091] 여기서 (n)은 통상적으로 0 내지 약 4,000의 범위이다.

[0092] 상기 중합체, 알파-, 오메가-디하이드록실폴리(에틸렌 글리콜)은 HO-PEG-OH로서 간단한 형태로 표현될 수 있고, -PEG- 부호는 다음 구조 단위로 표현될 수 있음이 이해되며,

[0093] $-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-$

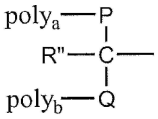
[0094] 여기서 (n)은 상기에서 정의된 바와 같다.

[0095] 본 발명의 하나 이상의 구현예에서 유용한 PEG의 다른 유형은 메톡시-PEG-OH, 또는 간략히 mPEG이고, 이의 하나의 말단은 상대적으로 불활성인 메톡시기인 반면, 다른 말단은 하이드록실기이다. mPEG의 구조는 하기에 주어져 있으며,

[0096] $CH_3O-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-OH$

[0097] 여기서 (n)은 상기에 기술된 바와 같다.

[0098] 또한 미국 특허 번호 5,932,462에 기술된 바와 같이, 다수의 팔을 가진 또는 분지형 PEG 분자는 PEG 중합체로서 사용할 수 있다. 예를 들어, PEG는 다음 구조를 가질 수 있으며,

[0099] 

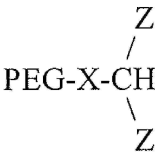
[0100] 여기서,

[0101] $poly_a$ 및 $poly_b$는 메톡시 폴리(에틸렌 글리콜)과 같은 (동일한 또는 상이한) PEG 골격이고;

[0102] R"은 H, 메틸 또는 PEG 골격과 같은 비반응성 부분이며;

[0103] P 및 Q는 비반응성 결합이다. 바람직한 구현예에서, 분지형 PEG 중합체는 메톡시 폴리(에틸렌 글리콜) 이치환된 리신이다. 사용된 특이적인 IL-7 부분에 따라서, 이치환된 리신의 반응성 에스테르 작용기는 추가적으로 변형되어 IL-7 부분 내에서 표적기와 반응하기에 적합한 작용기를 형성할 수 있다.

[0104] 덧붙여, PEG는 갈라진 PEG를 포함할 수 있다. 갈라진 PEG의 예는 다음의 구조로 표현되며,

[0105] 

[0106] 여기서, X는 하나 이상의 원자의 스페이서 부분이고 각각의 Z는 정의된 길이의 원자의 사슬로 CH에 결합된 활성화된 말단기다. 국제 특허 출원 공개 WO 99/45964는 본 발명의 하나 이상의 구현예에서 사용할 수 있는 다양한 갈라진 PEG 구조를 개시한다. 분지화 탄소 원자에 Z 작용기를 결합하는 원자의 사슬은 테더링기(tethering group)의 역할을 하고, 예를 들어 알킬 사슬, 에테르 사슬, 에스테르 사슬, 아미드 사슬 및 이의 조합을 포함할

수 있다.

[0107] PEG 중합체는 PEG 사슬의 말단에서보다 PEG의 길이를 따라 공유적으로 부착된, 카복실과 같은 반응성기를 가지는 펜던트(pendant) PEG 분자를 포함할 수 있다. 펜던트 반응성기는 PEG에 직접적으로 또는 알킬렌기와 같은 스페이서 부분을 통해 부착될 수 있다.

[0108] 상기 기술한 PEG 형태에 더하여, 또한 상기 중합체는 상기 기술한 임의의 중합체를 포함하여, 중합체에서 하나 이상의 약한 또는 분해가능한 결합으로 제조될 수 있다. 예를 들어, PEG는 가수분해되는 중합체에서 에스테르 결합으로 제조될 수 있다. 아래에 나타낸 바와 같이, 이러한 가수분해는 낮은 분자량의 단편으로 중합체의 절단을 일으킨다:

[0109] $$\text{-PEG-CO}_2\text{-PEG-} + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{-PEG-CO}_2\text{H} + \text{HO-PEG-}$$

[0110] 중합체 골격 내에서 분해가능한 결합으로서 및/또는 IL-7 부분으로의 분해가능한 결합으로서 유용한 기타 다른 가수분해로 분해가능한 결합은 카보네이트 결합; 예를 들어 아민 및 알데히드의 반응으로 생긴 이민 결합(예를 들어, 문헌 [Ouchi et al. (1997) *Polymer Preprints* 38(1):582-3] 참고); 예를 들어 알코올과 포스페이트기와의 반응으로 형성된 포스페이트 에스테르 결합; 통상적으로 하이드라지드 및 알데히드의 반응으로 형성되는 하이드라존 결합; 통상적으로 알데히드 및 알코올 사이의 반응으로 형성되는 아세탈 결합; 예를 들어, 포르메이트 및 알코올 사이의 반응으로 형성되는 오르토에스테르 결합; 예를 들어 PEG와 같은 중합체의 말단에서 아민기, 및 다른 PEG 사슬의 카복실기에 의해 형성된 아미드 결합; 예를 들어 말단 이소시아네이트기 및 PEG 알코올을 이용한 PEG의 반응으로 형성된 우레탄 결합; 예를 들어 PEG와 같은 중합체의 말단에서 아민기, 및 펩티드의 카복실기에 의해 형성된 펩티드 결합; 및 예를 들어 중합체의 말단에서 포스포라미디트기, 및 올리고뉴클레오티드의 5' 하이드록실기로 형성된 올리고뉴클레오티드 결합을 포함한다.

[0111] 접합체의 이와 같은 선택적인 특성, 즉 중합체 사슬 내로 또는 IL-7 부분으로 하나 이상의 분해가능한 결합의 도입은 투여시 접합체의 최종적인 원하는 약리학적 특성 이상으로 추가적인 제어를 제공할 수 있다. 예를 들어, 크고 상대적으로 불활성인 접합체(즉, 이에 부착된 하나 이상의 고분자량 PEG 사슬, 예를 들어 약 10,000 초과의 분자량을 가지는 하나 이상의 PEG 사슬을 가지며, 여기서 접합체는 근본적으로 어떠한 생물활성을 가지지 않음)가 투여될 수 있고, 가수분해되어 원래의 PEG 사슬의 일부를 가지는 생물활성 접합체를 생성한다. 이러한 방식으로, 접합체의 특성은 더 효과적으로 조정되어 시간이 지남에 따라 접합체의 생물활성의 균형을 이룰 수 있다.

[0112] 접합체와 결합되어 있는 수용성 중합체도 또한 "유리가능한 것"일 수 있다. 다시 말해서, 상기 수용성 중합체는 (가수 분해, 효소 공정 또는 촉매 공정 등을 통하여) 유리되고, 그 결과, 미접합 IL-7 부분이 생성된다. 몇몇 경우에 있어서, 유리가능한 중합체는 수용성 중합체의 어떠한 단편도 남기지 않고 IL-7 부분으로부터 생체 내 해리된다. 다른 경우에 있어서, 유리가능한 중합체는 수용성 중합체로부터 유래하는, 크기가 비교적 작은 단편(예를 들어, 숙시네이트 태그)을 남기면서 IL-7 부분으로부터 생체 내 해리된다. 예시적인 절단가능한 중합체로서는 카보네이트 결합을 통하여 IL-7 부분에 부착되는 중합체를 포함한다.

[0113] 비펩티드성 및 수용성 중합체에 관하여 상기한 검토는 결코 총망라한 것이 아니고 단지 예시적인 것이며, 상기 기술된 품질을 가지는 모든 중합체 물질이 고려됨을 당업자는 인지할 것이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "중합체 시약"은 일반적으로 전체 분자를 말하며, 이는 수용성 중합체 분절 및 작용기를 포함할 수 있다.

[0114] 상기 기술한 바와 같이, 본 발명의 접합체는 IL-7 부분에 공유적으로 부착된 수용성 중합체를 포함한다. 통상적으로, 임의의 주어진 접합체에 대하여, IL-7 활성을 가지는 하나 이상의 부분에 공유적으로 부착되는 1 개 내지 3 개의 수용성 중합체일 것이다. 그러나 몇몇 경우에서, 상기 접합체는 IL-7 부분에 개별적으로 부착된 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 7 개, 8 개 또는 그 이상의 수용성 중합체를 가질 수 있다. 임의의 주어진 수용성 중합체는 IL-7 부분의 아미노산에, 또는 IL-7 부분이 (예를 들어) 당단백질일 때, IL-7 부분의 탄수화물에 공유적으로 부착될 수 있다. 탄수화물에의 부착은 예를 들어 시알산-아지드 화학 반응[Luchansky et al. (2004) *Biochemistry* 43(38):12358-12366] 또는 알데히드기의 도입을 용이하게 하는 글리시돌의 사용과 같은 기타 다른 적합한 접근법[Heldt et al. (2007) *European Journal of Organic Chemistry* 32:5429-5433]을 이용하여 물질대사 작용화를 사용함으로써 수행할 수 있다.

[0115] IL-7 활성을 가지는 부분 및 중합체 내에서 특정한 결합은 다수의 인자에 따라 다르다. 상기 인자는, 예를 들어 이용된 특정한 결합 화학 성질, 특정한 IL-7 부분, IL-7 부분 내에서 (중합체로의 부착 또는 적합한 부착 부위

로의 전환을 위하여) 이용가능한 작용기, IL-7 부분 내에서 추가적인 반응성 작용기의 존재 등을 포함한다.

[0116] 본 발명의 접합체는, 반드시 그러하여야 하는 것은 아니지만, 전구 약물일 수 있는데, 이는 중합체와 IL-7 부분 사이의 결합이 가수분해로 유리가능하여, 부모 부분이 유리될 수 있음을 의미한다. 예시적인 유리가능한 결합으로서는 카복실레이트 에스테르, 포스페이트 에스테르, 티올 에스테르, 무수물, 아세탈, 케탈, 아실옥시알킬 에테르, 이민, 오르토에스테르, 퀩티드 및 올리고뉴클레오티드를 포함한다. 이와 같은 결합은 IL-7 부분(예를 들어, 단백질의 카복실기 C 말단 또는 단백질 중에 포함된 아미노산, 예를 들어 세린 또는 트레오닌의 측쇄 하이드록실기, 또는 탄수화물 중 유사한 작용기) 및/또는 중합체 시약을, 당업계에서 통상적으로 이용되는 커플링 방법을 사용하여 적절히 변형함으로써 용이하게 제조될 수 있다. 그러나, 적당히 활성화된 중합체와 IL-7 활성을 가지는 부분 중에 포함된 비변형 작용기의 반응에 의해 용이하게 형성되는 가수분해가능한 결합이 가장 바람직하다.

[0117] 대안적으로, 아미드, 우레탄(카바메이트로도 알려짐), 아민, 티오에테르(설파이드로도 알려짐), 또는 우레아(카바마이드로도 알려짐) 결합과 같은 가수분해에 안정적인 결합은 또한 IL-7 부분을 결합하기 위하여 결합으로서 이용될 수 있다. 또 한편, 바람직한 가수분해에 안정적인 결합은 아미드이다. 하나의 접근법에서, 활성화된 에스테르를 가지는 수용성 중합체는 IL-7 부분 상에서 아민기와 반응함으로써 아미드 결합을 생성할 수 있다.

[0118] 접합체(접합되지 않은 IL-7 부분에 반대인 것)는 측정가능한 정도의 IL-7 활성을 가질 수 있거나 가지지 않을 수 있다. 다시 말하면, 본 발명에 따라서 중합체-IL-7 부분 접합체는 변형되지 않은 부모 IL-7 부분의 생물활성의 약 0.1% 내지 약 100%를 어디에서도 가질 것이다. 몇몇 경우에서, 중합체-IL-7 부분 접합체는 변형되지 않은 부모 IL-7 부분의 100% 초과의 생물활성을 가질 것이다. 바람직하게, IL-7 활성을 약간 가지거나 또는 전혀 가지지 않는 접합체는 중합체를 상기 부분과 결합하는 가수분해가능한 결합을 포함하여, 접합체에서 활성의 결여(또는 상대적으로 결여)에 관계없이, 가수분해가능한 결합의 수성 유도 절단시 활성 부모 분자(또는 이의 유도체)가 유리된다. 이용되는 IL-7 활성을 가지는 특정 부분의 공지된 활성에 따라서, 상기 활성은 적합한 생체내 또는 시험관내 모델을 사용하여 결정할 수 있다.

[0119] 중합체에 대하여 IL-7 활성을 가지는 부분을 결합하는 가수분해에 안정적인 결합을 가지는 접합체에 대하여, 상기 접합체는 통상적으로 측정가능한 정도의 생물활성을 가질 것이다. 예를 들어, 상기 접합체는 통상적으로 접합되지 않은 IL-7 부분의 생물활성에 대한, 적어도 약 2%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97%, 적어도 약 100%, 및 105% 초과(당업계에 익히 공지된 모델과 같은 적합한 모델에서 측정될 때)의 백분율의 하나 이상을 만족하는 생물활성을 가지는 것으로 특징지어진다. 바람직하게, 가수분해에 안정적인 결합(예를 들어, 아미드 결합)을 가지는 접합체는 IL-7 활성을 가지는 변형되지 않은 부모 부분의 적어도 일부 정도의 생물활성을 가질 것이다.

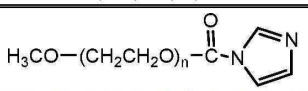
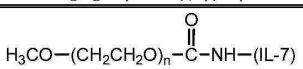
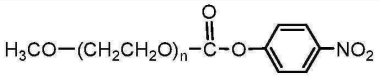
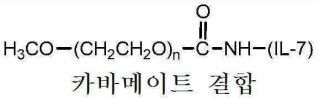
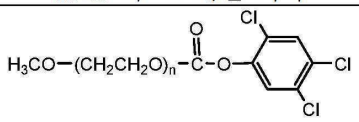
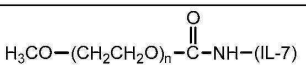
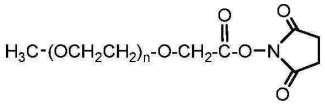
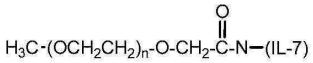
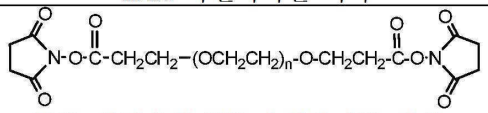
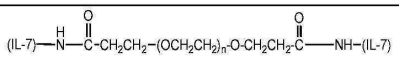
[0120] 이제, 본 발명에 따른 예시적인 접합체를 기술할 것이다. 통상적으로 상기 IL-7 부분은 서열 번호 1 내지 7 중 적어도 하나에 제공된 서열과 유사한 아미노산 서열을 (적어도 부분적으로) 공유하는 것으로 예측된다. 따라서, 서열 번호 1 내지 7 중 특정 위치 또는 원자를 참고로 하였을 때, 이와 같은 참고는 오로지 편의를 위한 것으로서 당업자는 IL-7 활성을 가지는 기타 다른 부분들 중 상응하는 위치 또는 원자를 용이하게 결정할 수 있을 것이다. 특히 본원에서 타고난 인간 IL-7에 관하여 제공된 설명은 종종 상기 서열들 중 임의의 것의 단편, 결실 변이체, 치환 변이체 또는 부가 변이체에도 적용될 수 있다.

[0121] IL-7 부분 상의 아미노기는 IL-7 부분과 수용성 중합체 사이의 부착점을 제공한다. 서열번호 1 내지 7에서 제공되는 아미노산 서열을 사용하여, 접합체에 대하여 이용가능할 수 있는 ε-아미노산을 가지는 각각에 수 개의 리신 잔기가 있음은 명백하다. 추가적으로 또한 임의의 단백질의 N-말단 아민은 부착점으로서의 역할을 할 수 있다.

[0122] IL-7 부분의 이용가능한 아민으로 공유 결합을 형성하는데 유용한 적합한 중합체 시약의 다수의 예가 있다. 상응하는 접합체에 따른 특이적인 예는 하기 표 1에 제공된다. 표에서 변수 (n)은 반복하는 단량체 단위의 수를 나타내고 "-NH-(IL-7)"는 중합체 시약에 접합한 후 IL-7 부분의 잔기를 나타낸다. 표 1에 제시된 각각의 중합체 부분[예를 들어, $(OCH_2CH_2)_n$ 또는 $(CH_2CH_2O)_n$]이 "CH_3" 기에서 종결할 때, (H 및 벤질과 같은) 기타 다른 기들로 이를 치환할 수 있다.

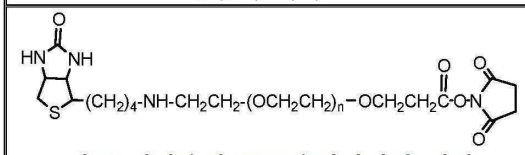
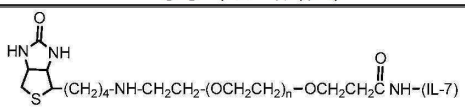
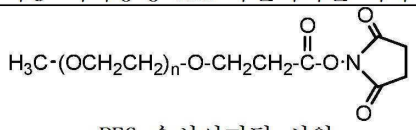
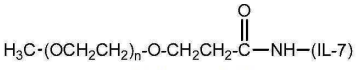
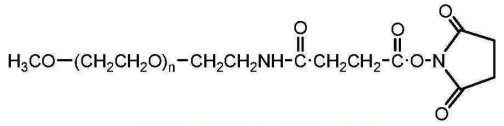
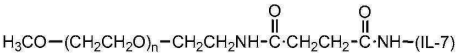
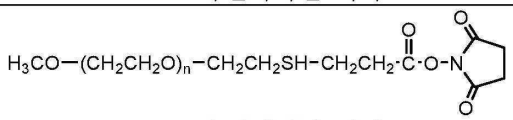
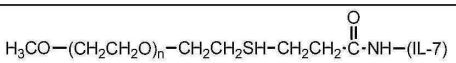
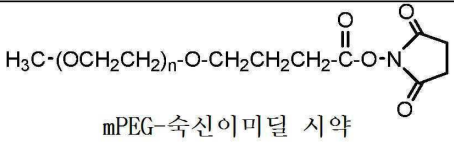
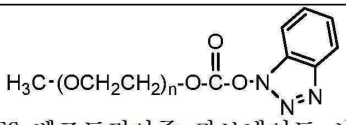
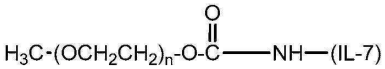
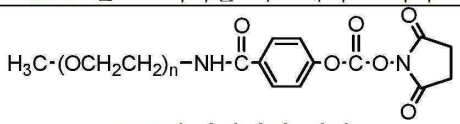
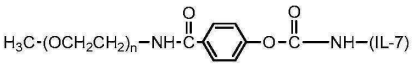
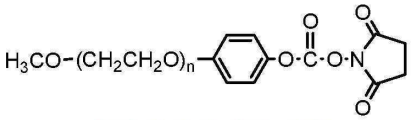
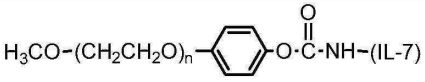
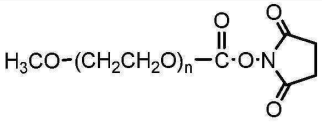
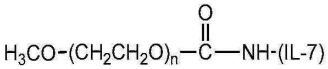
표 1

아민-선택적 중합체 시약들 및 이로부터 형성된 IL-7 부분 접합체

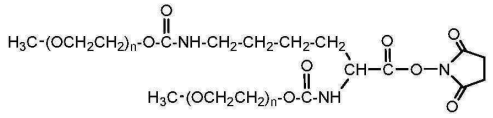
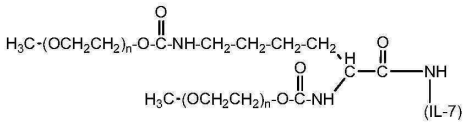
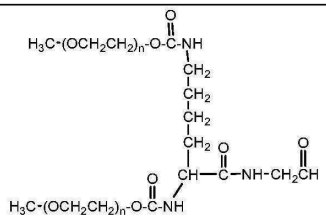
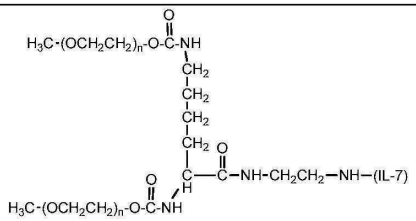
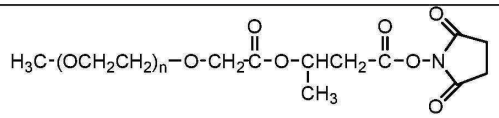
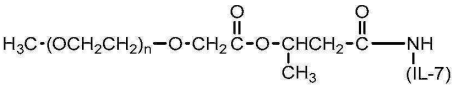
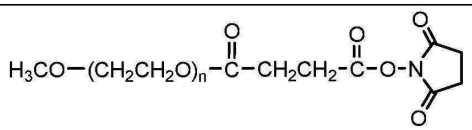
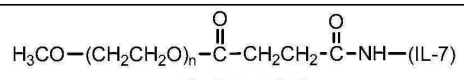
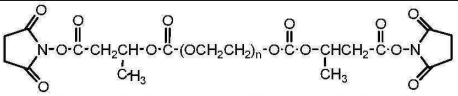
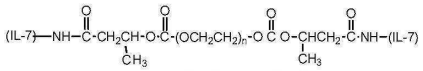
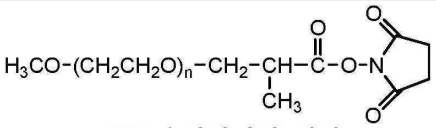
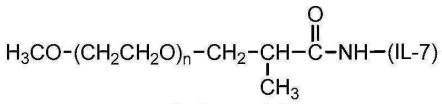
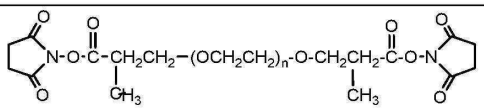
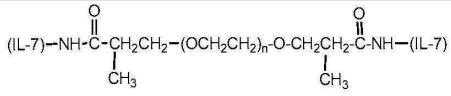
중합체 시약	상응하는 접합체
 mPEG-옥시카보닐이미다졸 시약	 카바메이트 결합
 mPEG 니트로페닐 시약	 카바메이트 결합
 mPEG-트리클로로페닐 카보네이트 시약	 카바메이트 결합
 mPEG-숙신이미딜 시약	 아미드 결합
 동종 이작용성 PEG-숙신이미딜 시약	 아미드 결합

[0123]

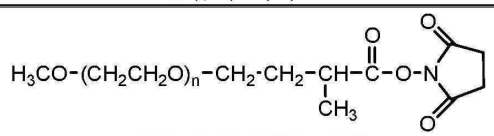
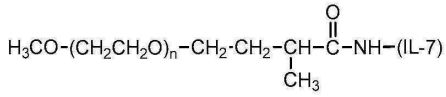
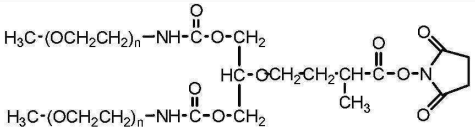
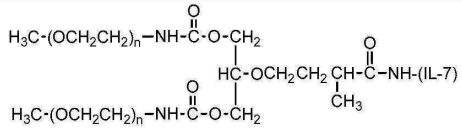
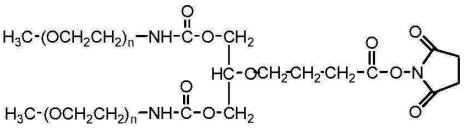
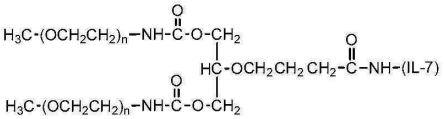
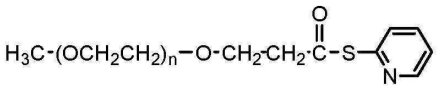
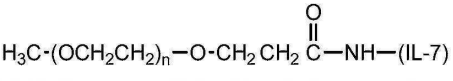
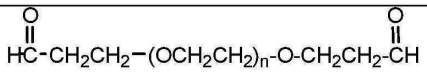
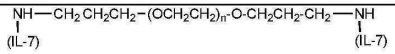
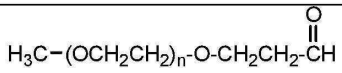
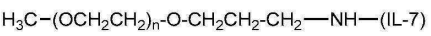
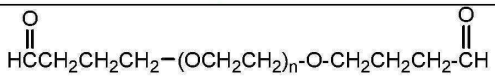
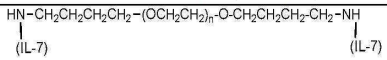
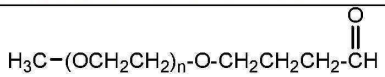
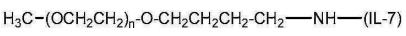
[0124]

중합체 시약	상응하는 접합체
 이종 이작용성 PEG-숙신이미딜 시약	 아미드 결합
 mPEG-숙신이미딜 시약	 아미드 결합
 mPEG-숙신이미딜 시약	 아미드 결합
 mPEG 숙신이미딜 시약	 아미드 결합
 mPEG-숙신이미딜 시약	 아미드 결합
 mPEG-벤조트리아졸 카보네이트 시약	 카바메이트 결합
 mPEG-숙신이미딜 시약	 카바메이트 결합
 mPEG-숙신이미딜 시약	 카바메이트 결합
 mPEG 숙신이미딜 시약	 카바메이트 결합

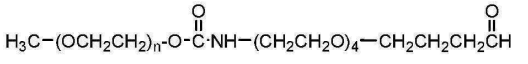
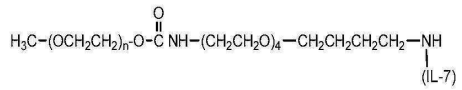
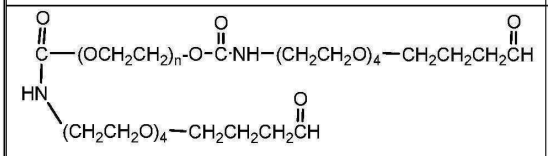
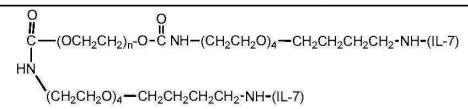
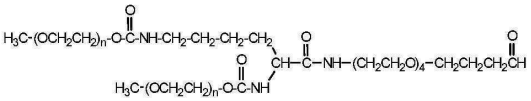
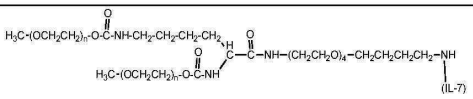
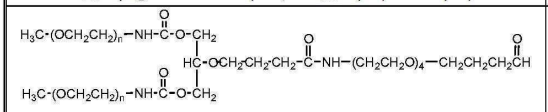
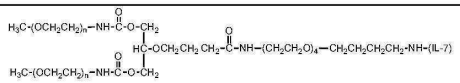
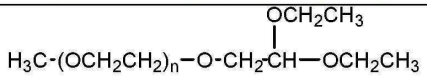
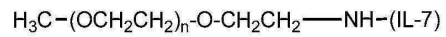
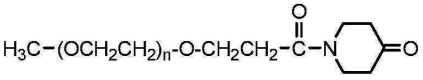
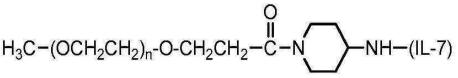
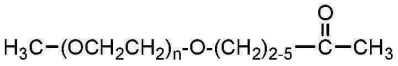
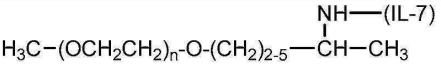
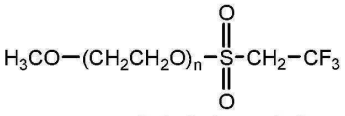
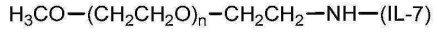
[0125]

중합체 시약	상응하는 접합체
 분지형 mPEG2-N-하이드록시숙신이미드 시약	 아미드 결합
 분지형 mPEG2-알데히드 시약	 2차 아민 결합
 mPEG-숙신이미딜 시약	 아미드 결합
 mPEG-숙신이미딜 시약	 아미드 결합
 동종 이작용성 PEG-숙신이미딜 시약	 아미드 결합
 mPEG-숙신이미딜 시약	 아미드 결합
 동종 이작용성 PEG-숙신이미딜 프로피오네이트 시약	 아미드 결합

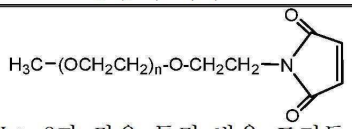
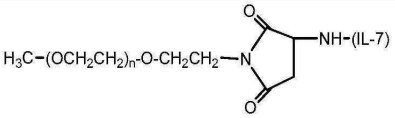
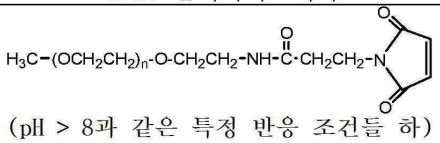
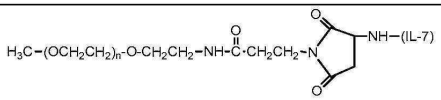
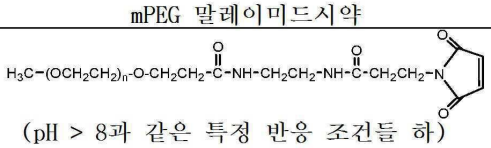
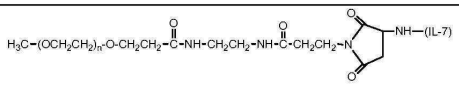
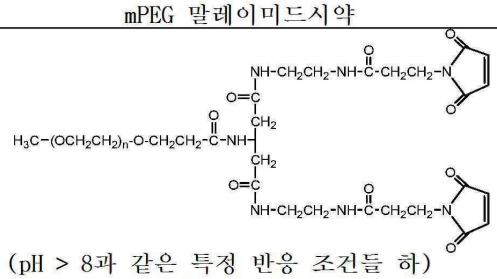
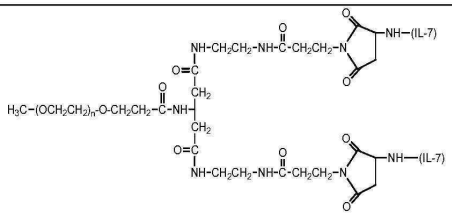
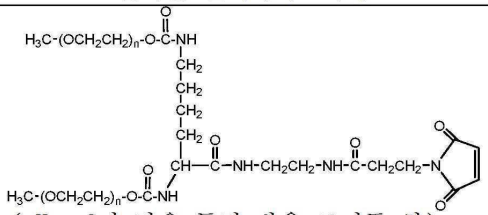
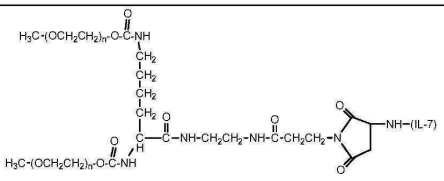
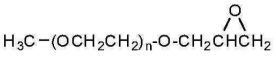
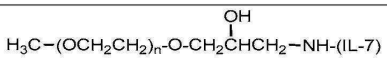
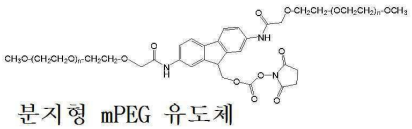
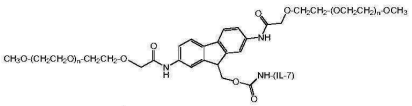
[0126]

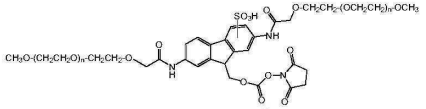
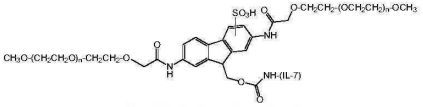
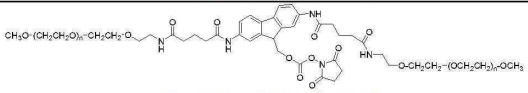
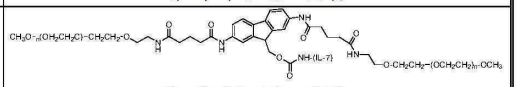
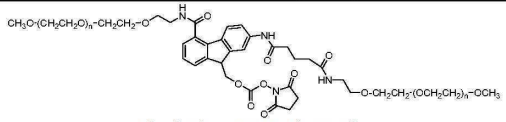
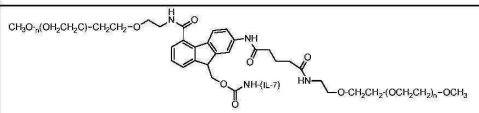
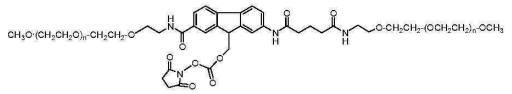
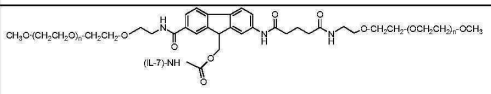
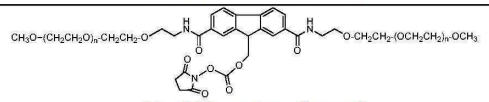
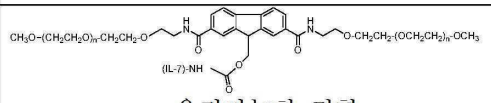
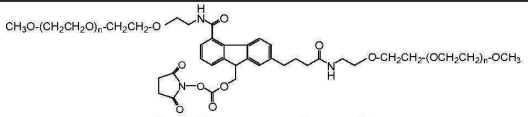
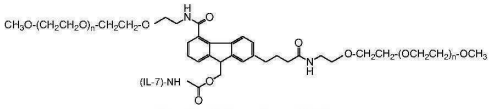
중합체 시약	상응하는 접합체
 mPEG-숙신이미딜 시약	 아미드 결합
 분지형 mPEG2-N-하이드록시숙신이미드 시약	 아미드 결합
 분지형 mPEG2-N-하이드록시숙신이미드 시약	 아미드 결합
 mPEG-티오에스테르 시약	 (통상적으로 N-말단 시스테인 또는 히스티딘을 가지는 IL-7 부분에 대한) 아미드 결합
 동종 이작용성 PEG 프로피온알데히드 시약	 2차 아민 결합
 mPEG 프로피온알데히드 시약	 2차 아민 결합
 동종 이작용성 PEG 부티르알데히드 시약	 2차 아민 결합
 mPEG 부티르알데히드 시약	 2차 아민 결합

[0127]

중합체 시약	상응하는 접합체
 mPEG 부티르알데히드 시약	 2차 아민 결합
 동종 이작용성 PEG 부티르알데히드 시약	 2차 아민 결합
 분지형 mPEG2 부티르알데히드 시약	 2차 아민 결합
 분지형 mPEG2 부티르알데히드 시약	 2차 아민 결합
 mPEG 아세탈 시약	 2차 아민 결합
 mPEG 피페리돈 시약	 (2차 탄소에 대한) 2차 아민 결합
 mPEG 메틸케톤 시약	 (2차 탄소에 대한) 2차 아민 결합
 mPEG 트레실레이트 시약	 2차 아민 결합

[0128]

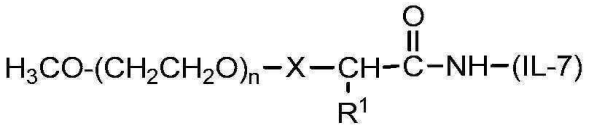
중합체 시약	상응하는 접합체
 (pH > 8과 같은 특정 반응 조건들 하) mPEG 말레이미드시약	 2차 아민 결합
 (pH > 8과 같은 특정 반응 조건들 하) mPEG 말레이미드시약	 2차 아민 결합
 (pH > 8과 같은 특정 반응 조건들 하) mPEG 말레이미드시약	 2차 아민 결합
 (pH > 8과 같은 특정 반응 조건들 하) mPEG 갈라진 말레이미드시약	 2차 아민 결합
 (pH > 8과 같은 특정 반응 조건들 하) 분지형 mPEG2 말레이미드시약	 2차 아민 결합
 (pH > 8과 같은 특정 반응 조건들 하) mPEG 에폭시드 시약	 2차 아민 결합
 분지형 mPEG 유도체	 유리가능한 결합

중합체 시약	상응하는 접합체
 분지형 mPEG 유도체	 유리가능한 결합
 분지형 mPEG 유도체	 유리가능한 결합
 분지형 mPEG 유도체	 유리가능한 결합
 분지형 mPEG 유도체	 유리가능한 결합
 분지형 mPEG 유도체	 유리가능한 결합
 분지형 mPEG 유도체	 유리가능한 결합

[0129]

[0130] IL-7 부분의 아미노기로 중합체 시약의 접합은 다양한 기법으로 이루어질 수 있다. 하나의 접근법에서, IL-7 부분은 숙신이미딜 유도체(또는 기타 다른 활성화된 에스테르기, 여기서 대안적인 활성화된 에스테르기-함유 중합체 시약에 대하여 기술된 것과 유사한 접근법을 사용할 수 있음)로 작용화된 중합체 시약으로 접합될 수 있다. 이러한 접근법에서, 상이한 반응 조건(예를 들어, 6 내지 7과 같은 낮은 pH, 또는 상이한 온도 및/또는 15℃ 미만 온도)을 사용하여 IL-7 부분 상의 상이한 위치로 중합체의 부착을 일으킬 수 있더라도, 숙신이미딜 유도체를 가지는 중합체는 pH 7 내지 9.0의 수성 매질에서 IL-7 부분에 부착될 수 있다. 덧붙여, 아미드 결합은 아민 종결 비펩티드 수용성 중합체를 활성화 카복실산기를 가지는 IL-7 부분과 반응시킴으로써 형성될 수 있다.

[0131] 예시적인 접합체는 다음과 같은 구조 내에 포함되며,



[0132]

[0133] 상기 식중,

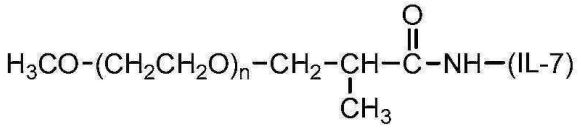
[0134] (n)은 2 내지 4000의 값을 가지는 정수이고;

[0135] X는 스페이서 부분이며;

[0136] R^1은 유기 라디칼이고;

[0137] IL-7은 IL-7 부분의 잔기이다.

[0138] 예시적인 접합체는 다음과 같은 구조에 의해 포함되며,

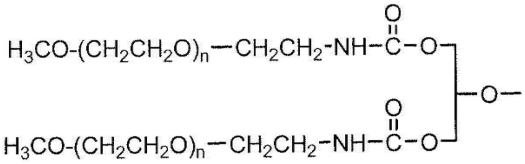


[0139]

[0140] 여기서, (n)은 2 내지 4000의 값을 가지는 정수이고, IL-7은 IL-7 부분의 잔기이다.

[0141] IL-7 부분을 중합체 시약으로 접합시키는 데 유용한 통상적인 다른 접근법은 IL-7 부분의 1차 아민을 케톤, 알데히드 또는 이의 수화물 형태(예를 들어, 케톤 수화물, 알데히드 수화물)로 작용화된 중합체 시약으로 접합하는 환원적 아미노화(reductive amination)의 사용이다. 이러한 접근법에서, IL-7 부분으로부터의 1차 아민은 알데히드 또는 케톤(또는 수화된 알데히드 또는 케톤의 상응하는 하이드록실-함유 기)의 카보닐기와 반응하며, 이렇게 함으로써 시프 염기(Schiff base)를 형성한다. 그 후 결과적으로 시프 염기는 소듐 보로하이드라이드와 같은 환원제의 사용을 통해 안정적인 접합체로 환원적으로 전환될 수 있다. 특히 케톤 또는 알파-메틸 분지형 알데히드로 및/또는 특이적인 반응 조건(예를 들어, 환원된 pH) 하에서 작용화된 중합체와의 선택적인 반응(예를 들어, N-말단에서)이 가능하다.

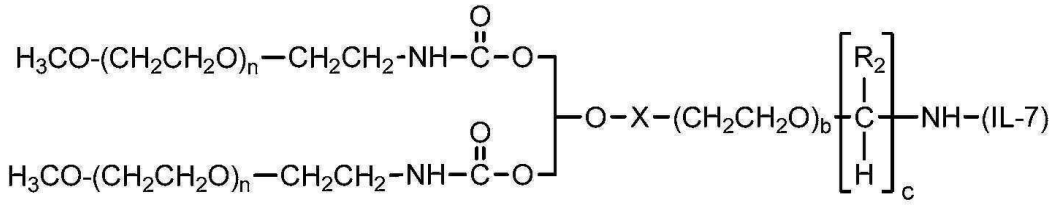
[0142] 수용성 중합체가 분지형인 본 발명의 예시적인 접합체는, 수용성 중합체가 다음과 같은 구조 내에 포함되는 것을 포함하며,



[0143]

[0144] 여기서, 각각의 (n)은 독립적으로 2 내지 4000의 값을 가지는 정수이다.

[0145] 본 발명의 예시적인 접합체는 다음과 같은 구조 내에 포함되며,



[0146]

[0147] 여기서,

[0148] 각각의 (n)은 독립적으로 2 내지 4000의 값을 가지는 정수이고;

[0149] X는 스페이서 부분이며;

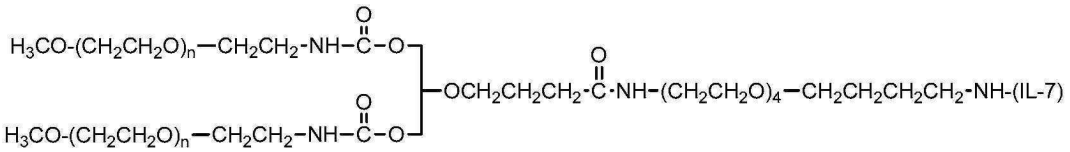
[0150] (b)는 2 내지 6의 값을 가지는 정수이고;

[0151] (c)는 2 내지 6의 값을 가지는 정수이며;

[0152] 각각의 경우, R^2는 독립적으로 H 또는 저급 알킬이고;

[0153] IL-7은 IL-7 부분의 잔기이다.

[0154] 본 발명의 예시적인 접합체는 다음과 같은 구조 내에 포함되며,



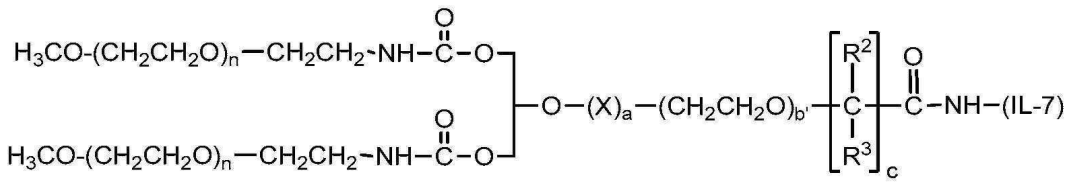
[0155]

[0156] 여기서,

[0157] 각각의 (n)은 독립적으로 2 내지 4000의 값을 가지는 정수이고;

[0158] IL-7는 IL-7 부분의 잔기이다.

[0159] 본 발명의 기타 다른 예시적인 접합체는 다음과 같은 구조 내에 포함되며,

[0160] 

[0161] 여기서,

[0162] 각각의 (n)은 독립적으로 2 내지 4000의 값을 가지는 정수이고;

[0163] (a)는 0 또는 1이며;

[0164] X가 존재할 때, 이 X는 하나 이상의 원자로 구성된 스페이서 부분이고;

[0165] (b')는 0이거나 1 내지 10의 값을 가지는 정수이며;

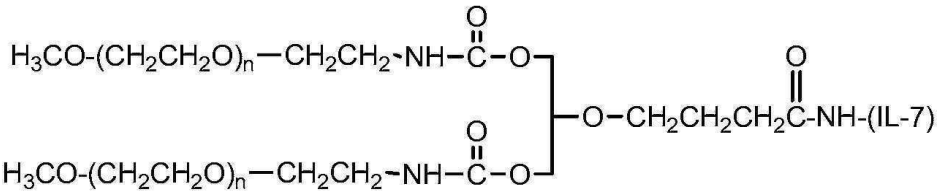
[0166] (c)는 1 내지 10의 값을 가지는 정수이고;

[0167] 각각의 경우, R^2는 독립적으로 H 또는 유기 라디칼이며;

[0168] 각각의 경우, R^3은 독립적으로 H 또는 유기 라디칼이고;

[0169] IL-7은 IL-7 부분의 잔기이다.

[0170] 본 발명의 또 다른 예시적 접합체는 다음과 같은 구조 내에 포함되며,

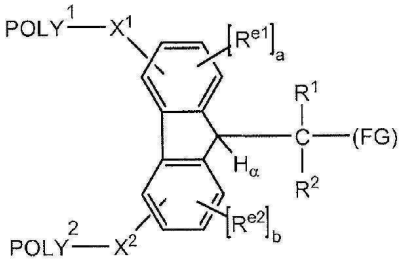
[0171] 

[0172] 여기서,

[0173] 각각의 (n)은 독립적으로 2 내지 4000의 값을 가지는 정수이고;

[0174] IL-7은 IL-7 부분의 잔기이다.

[0175] 유리가능한 결합을 포함하는 예시적인 접합체는, IL-7 부분이 다음과 같은 화학식 내에 포함되는 중합체 시약에 접합되어 있는 것을 포함하며,

[0176] 

[0177] 여기서,

[0178] $POLY^1$은 제1 수용성 중합체이고;

[0179] $POLY^2$는 제2 수용성 중합체이며;

[0180] X^1은 제1 스페이서 부분이고;

[0181] X^2는 제2 스페이서 부분이며;

[0182] H_α는 이온화가능한 수소 원자이고;

[0183] R^1은 H 또는 유기 라디칼이며;

[0184] R^2는 H 또는 유기 라디칼이고;

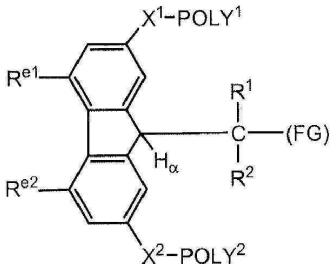
[0185] (a)는 0 또는 1이며;

[0186] (b)는 0 또는 1이고;

[0188] *R^{e1}이 존재할 때, 이 R^{e1}은 제1 전자 변경기(electron altering group)이며;

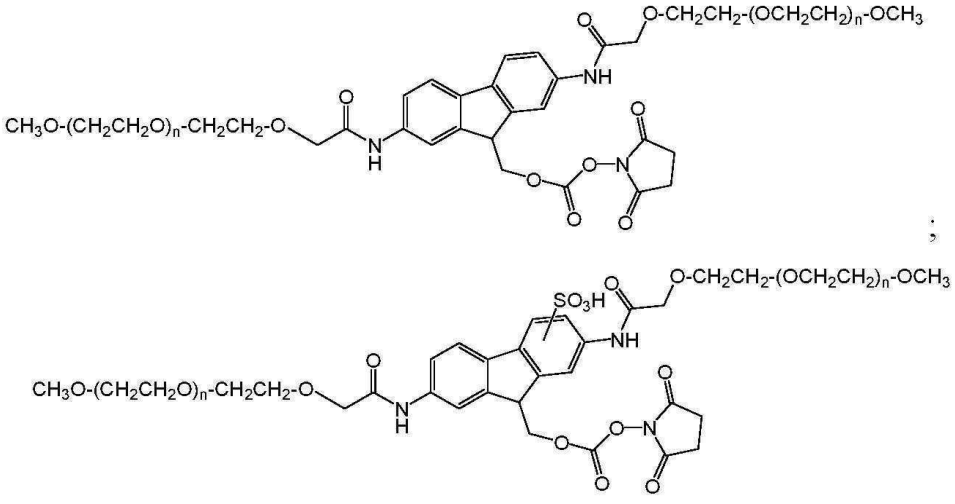
[0189] R^{e2}가 존재할 때, 이 R^{e2}는 제2 전자 변경기이고;

[0190] (FG)는 활성 제제의 아미노기와 반응하여 유리가능한 결합, 예를 들어 카바메이트 결합을 형성할 수 있는 작용기이다. 이러한 화학식들 중, 더 자세히 정의된 구조를 가지는 중합체 시약이 고려되며,

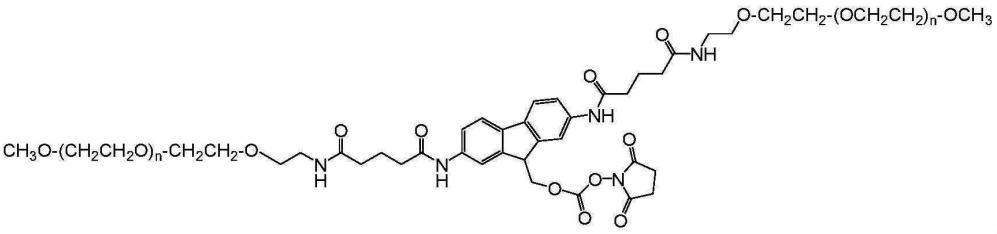
[0191] 

[0192] 여기서, $POLY^1$, $POLY^2$, X^1, X^2, R^1, R^2, H_α 및 (FG)는 각각 상기 정의된 바와 같고, R^{e1}은 제1 전자 변경기이며; R^{e2}는 제2 전자 변경기이다.

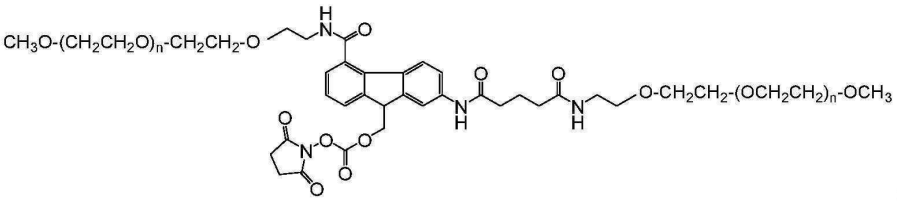
[0193] 또 다른 예시적 중합체 시약은 다음과 같은 화학식에 포함되며,

[0194] 

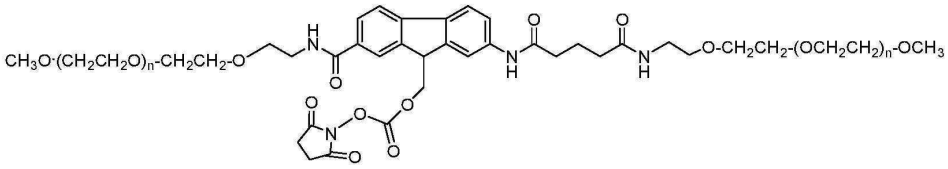
;



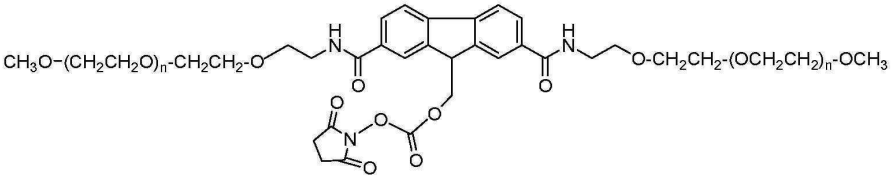
;



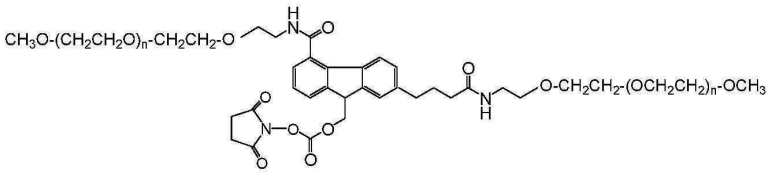
;



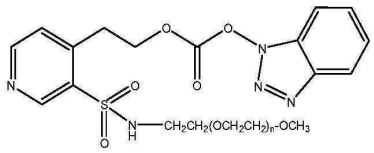
;



;



; 및

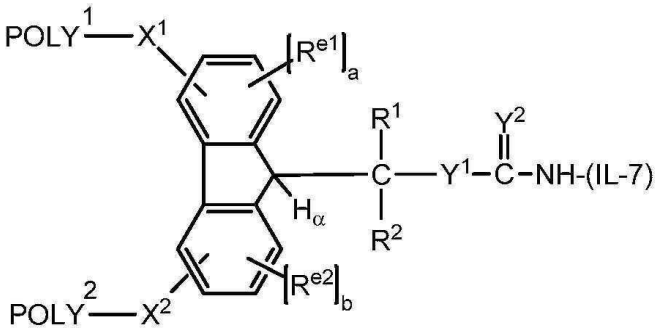


[0195]

[0196] 여기서, 각각의 구조와 각각의 경우에 있어서, (n)은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이다.

[0197] 이러한 유리가능한 결합을 제공하는 중합체 시약은 미국 특허 출원 공개 번호 2006/0293499에 제시된 방법에 따라서 제조될 수 있다.

[0198] 유리가능한 결합을 제공하는 중합체 시약을 사용하여 형성된 예시적인 접합체는 다음과 같은 화학식의 것들을 포함하며,

[0199] 

[0200] 여기서,

[0201] $POLY^1$은 제1 수용성 중합체이고;

[0202] $POLY^2$는 제2 수용성 중합체이며;

[0203] X^1은 제1 스페이서 부분이고;

[0204] X^2는 제2 스페이서 부분이며;

[0205] H_α는 이온화가능한 수소 원자이고;

[0206] R^1은 H 또는 유기 라디칼이며;

[0207] R^2는 H 또는 유기 라디칼이고;

[0208] (a)는 0 또는 1이며;

[0209] (b)는 0 또는 1이고;

[0210] R^{e1}이 존재할 때, 이 R^{e1}은 제1 전자 변경기이며;

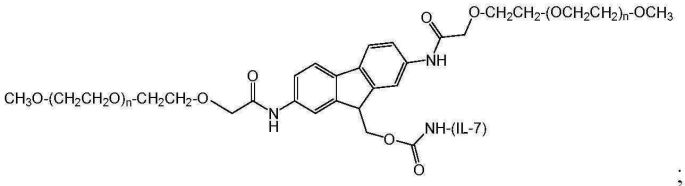
[0211] R^{e2}가 존재할 때, 이 R^{e2}는 제2 전자 변경기이고;

[0212] Y^1은 O 또는 S이며;

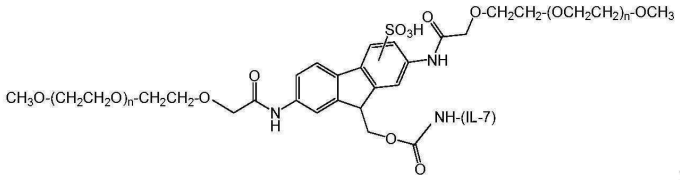
[0213] Y^2는 O 또는 S이고;

[0214] IL-7은 IL-7 부분의 잔기이다.

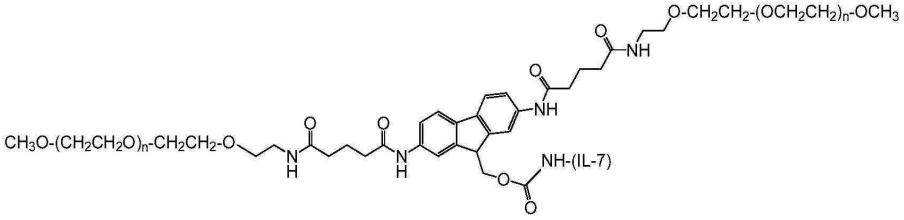
[0215] 예시적인 접합체는 다음과 같은 구조를 가지며,



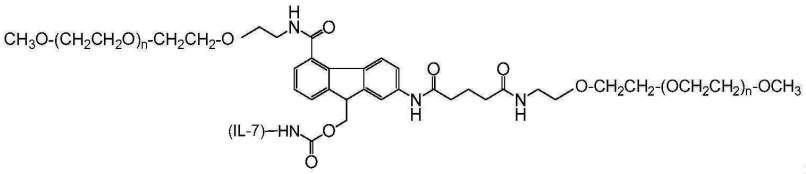
;



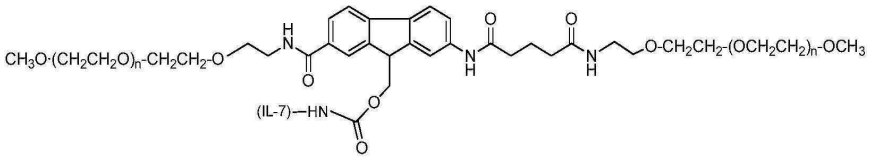
;



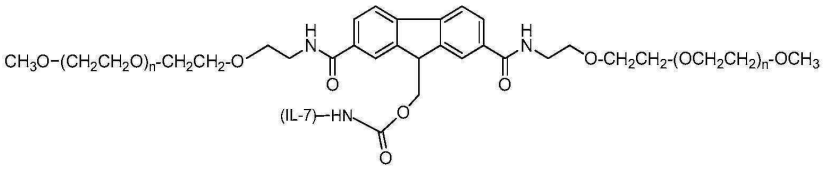
;



;

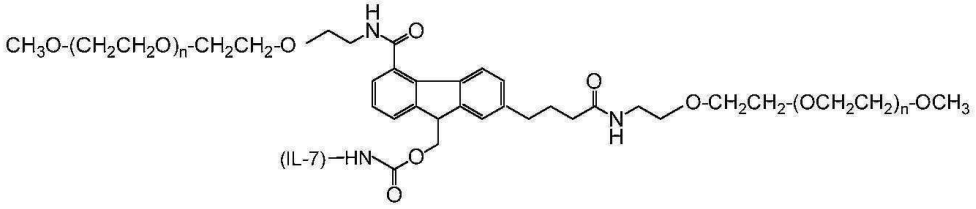


;

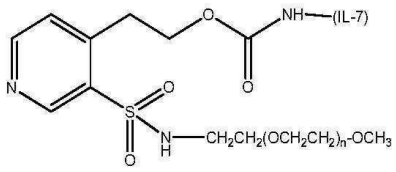


;

[0216]



; 및



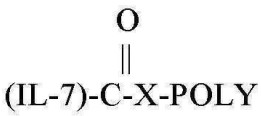
[0217]

[0218] 여기서,

[0219] 각각의 구조와 각각의 경우에 있어서, (n)은 독립적으로 4 내지 1500의 정수이고, IL-7은 IL-7 부분의 잔기이다.

[0220] 카복실기는 IL-7 부분 상의 부착점으로서의 역할을 할 수 있는 다른 작용기를 나타낸다. 구조적으로, 상기 접합체는 하기를 포함할 것이며,

[0221]



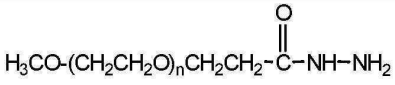
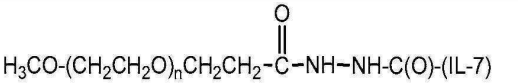
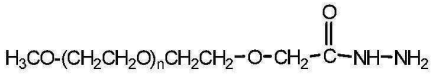
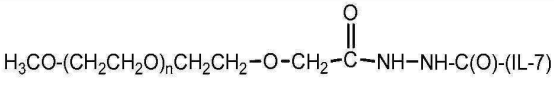
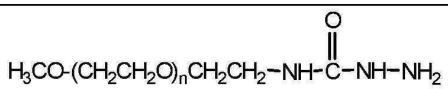
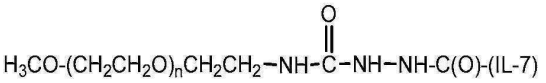
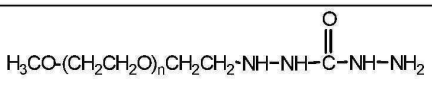
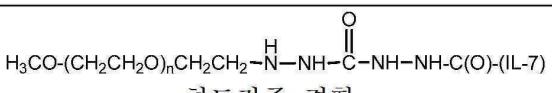
[0222] 여기서 IL-7 및 인접한 카보닐기는 카복실-포함 IL-7 부분에 해당하고, X는 결합, 바람직하게 O, N(H), 및 S로부터 선택되는 헤테로원자이며, POLY는 PEG와 같은 수용성 중합체이고, 선택적으로 말단 캐핑 부분에서 종결된다.

[0223] C(O)-X 결합은 말단 작용기를 가지는 중합체 유도체와 카복실-포함 IL-7 부분 사이의 반응으로 생긴다. 상기에서 검토된 바와 같이, 특이적인 결합은 이용되는 작용기의 유형에 따라 다를 것이다. 중합체가 하이드록실기로 말단 작용화되거나 또는 "활성화"되면, 생성되는 결합은 카복실산 에스테르일 것이고 X는 O일 것이다. 중합체 골격이 티올기로 작용화되면, 생성되는 결합은 티오에스테르일 것이고 X는 S일 것이다. 특정한 다수의 팔을 가진, 분지형 또는 갈라진 중합체를 이용할 때, C(O)X 부분, 및 특히 X 부분은 상대적으로 더 복잡할 수 있고 더 긴 결합 구조를 포함할 수 있다.

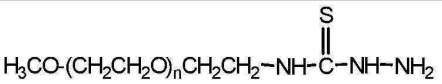
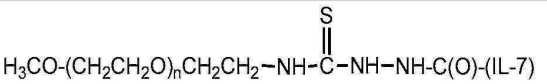
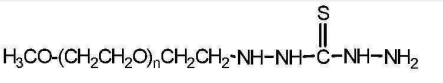
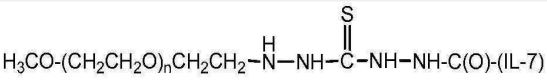
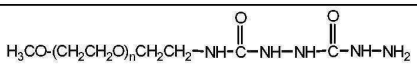
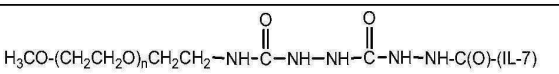
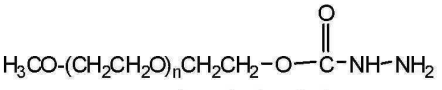
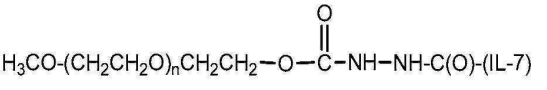
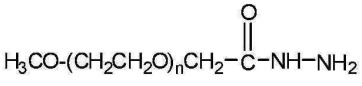
[0224] 또한 하이드라지드 부분을 포함하는 수용성 유도체는 카보닐 및 카복실산에서 접합에 유용하다. IL-7 부분이 카보닐 부분 또는 카복실산을 포함하지 않는 정도로, 당업자에게 공지된 기법을 사용하여 추가될 수 있다. 예를 들어, 카복실산(예를 들어, C-말단 카복실산)을 환원시킴으로써 및/또는 IL-7 부분의 글리코실화된 또는 글리케이트된(glycated)(여기서 첨가된 당은 카보닐 부분을 가짐) 형태를 제공함으로써 카보닐 부분을 도입할 수 있다. 카복실산을 포함하는 IL-7 부분에 대하여, PEG-하이드라진 시약은 커플링제(coupling agent)(예를 들어, DCC)의 존재 하에, IL-7 부분에 공유적으로 부착할 수 있다[예를 들어, $mPEG\text{-}OCH_2C(O)NHNH_2$ + HOC(O)-(IL-7)는 $mPEG\text{-}OCH_2C(O)NHNHC(O)$-IL-7를 생성함]. 상응하는 접합체에 따른 하이드라지드 부분을 포함하는 수용성 유도체의 특이적인 예는 하기 표 2에 제공된다. 덧붙여, 활성화된 에스테르(예를 들어, 숙신이미딜기)를 포함하는 임의의 수용성 유도체는, 활성화된 에스테르를 포함하는 수용성 중합체 유도체를 하이드라진($NH_2\text{-}NH_2$) 또는 tert-부틸 카바제이트[$NH_2NHCO_2C(CH_3)_3$]와 반응시킴으로써 전환되어 하이드라지드 부분을 포함할 수 있다. 표에서, 변수 (n)은 반복하는 단량체 단위의 수를 나타내고 "-C(O)-(IL-7)"는 중합체 시약으로의 접합 후의 IL-7 부분의 잔기를 나타낸다. 선택적으로, 하이드라존 결합은 적합한 환원제를 사용함으로써 환원될 수 있다. 표 2에 제시된 각각의 중합체 부분[예를 들어, $(OCH_2CH_2)_n$ 또는 $(CH_2CH_2O)_n$]은 "CH_3" 기에서 종결하는 한편, (H 및 벤질과 같은) 기타 다른 기들로 이를 치환할 수 있다.

표 2

카복실-특이적 중합체 시약들 및 이로부터 형성된 IL-7 부분 접합체

중합체 시약	상응하는 접합체
 mPEG-히드라진 시약	 히드라존 결합
 mPEG-히드라진 시약	 히드라존 결합
 mPEG-히드라진 시약	 히드라존 결합
 mPEG-히드라진 시약	 히드라존 결합

[0225]

중합체 시약	상응하는 접합체
 mPEG-히드라진 시약	 히드라존 결합
 mPEG-히드라진 시약	 히드라존 결합
 mPEG-히드라진 시약	 히드라존 결합
 mPEG-히드라진 시약	 히드라존 결합
 mPEG-히드라진 시약	 C(O)NHNHC(O) 결합

[0226]

[0227] IL-7 부분 내에 포함된 티올기는 수용성 중합체에 대한 효과적인 부착 부위로서의 역할을 할 수 있다. IL-7 부

분이 단백질일 때 특히 시스테인 잔기는 티올기를 제공한다. 그 다음 상기 시스테인 잔기에서 티올기는 티올기, 예를 들어 N-말레이미딜 중합체 또는 미국 특허 번호 5,739,208 및 WO 01/62827에 기술된 바와 같은 기타 다른 유도체와의 반응에 특이적인 활성화된 PEG와 반응할 수 있다. 덧붙여, 보호된 티올은 활성화된 당단백질의 올리고당 측쇄 내로 편입되고, 그 후 티올-반응성 수용성 중합체로 탈보호화된다.

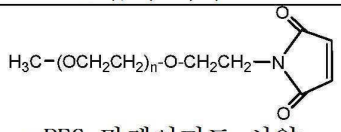
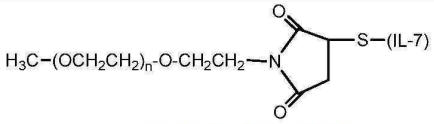
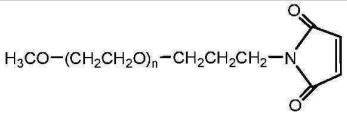
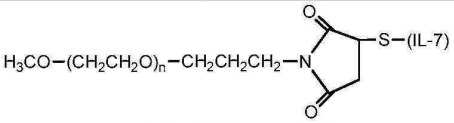
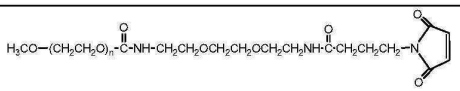
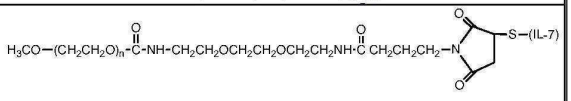
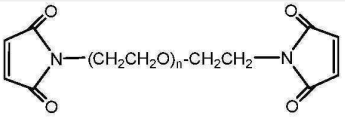
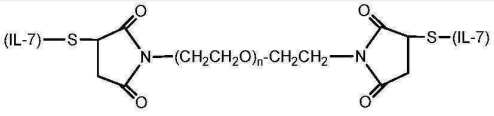
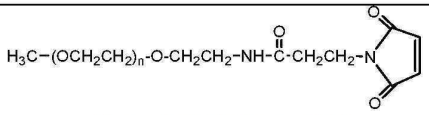
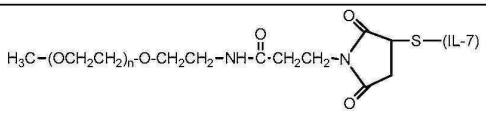
[0228] 상응하는 접합체에 따른 시약의 특이적인 예는 하기 표 3에 제공된다. 표에서, 변수 (n)은 반복하는 단량체 단위의 수를 나타내고 "-S-(IL-7)"는 수용성 중합체로의 접합 후의 IL-7 부분의 잔기를 나타낸다. 표 3에 제시된 각각의 중합체 부분[예를 들어, $(OCH_2CH_2)_n$ 또는 $(CH_2CH_2O)_n$]은 "CH_3" 기에서 종결하는 한편, (H 및 벤질과 같은) 기타 다른 기들로 이를 치환할 수 있다.

[0229] 예시적인 IL-7 부분과 상응하는 서열 번호 1에 있어서, 3, 35, 48, 93, 130 및 142번 위치에 시스테인 잔기가 존재하는 것이 확인될 수 있다. 따라서, 예시적인 티올 부착 부위는 3, 35, 48, 93, 130 및 142번 위치를 포함한다. 덧붙여, 통상의 합성 기법을 사용하여 IL-7 부분에 시스테인 잔기를 부가할 수도 있다. 예를 들어, WO 90/12874에 기술된, 시스테인 잔기를 부가하는 절차(이 절차는 IL-7 부분에 맞춰 수정될 수 있음)을 참고한다. 덧붙여, 통상의 유전자 조작 방법도 시스테인 잔기를 IL-7 부분에 도입하는 데 사용될 수 있다. 그러나, 몇몇 구현예에서, 부가의 시스테인 잔기 및/또는 티올기를 도입하지 않는 것이 바람직하다.

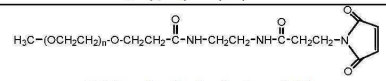
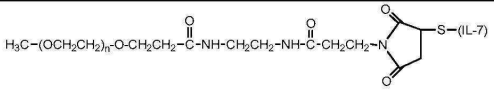
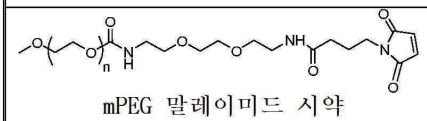
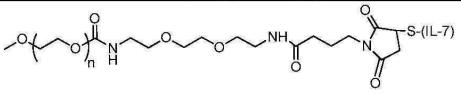
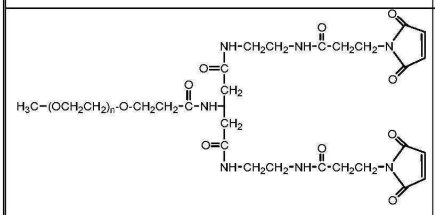
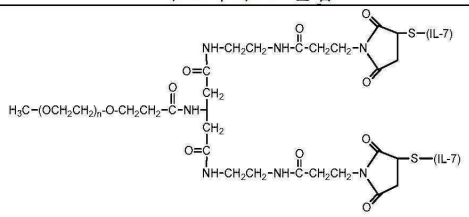
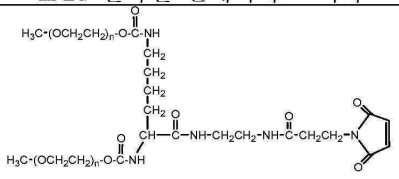
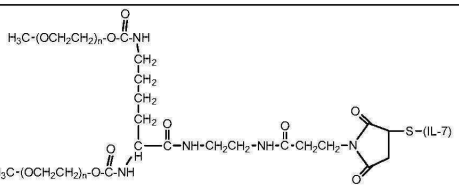
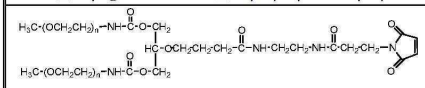
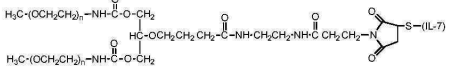
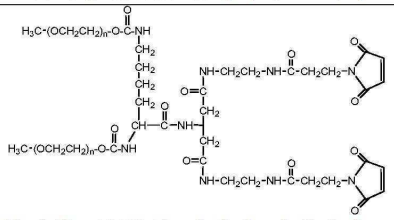
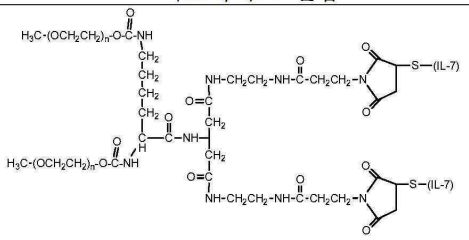
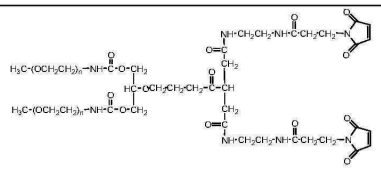
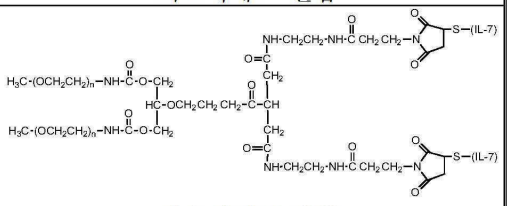
표 3

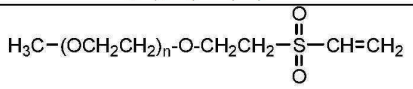
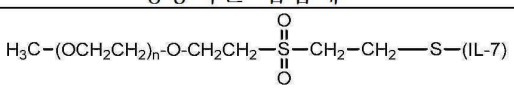
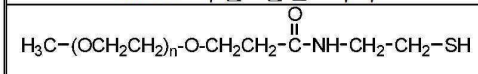
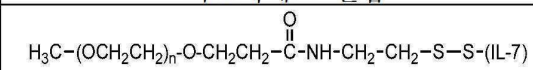
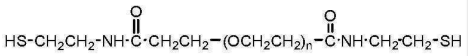
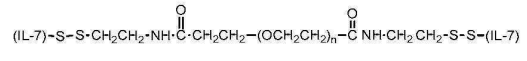
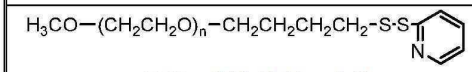
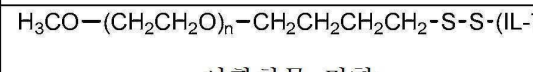
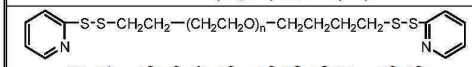
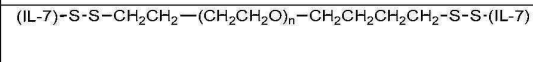
티올-선택적 중합체 시약들 및 이로부터 형성된 IL-7 부분 접합체

[0230]

중합체 시약	상응하는 접합체
 mPEG 말레이미드 시약	 티오에테르 결합
 mPEG 말레이미드 시약	 티오에테르 결합
 mPEG 말레이미드 시약	 티오에테르 결합
 동종 이작용성 mPEG 말레이미드 시약	 티오에테르 결합
 mPEG 말레이미드 시약	 티오에테르 결합

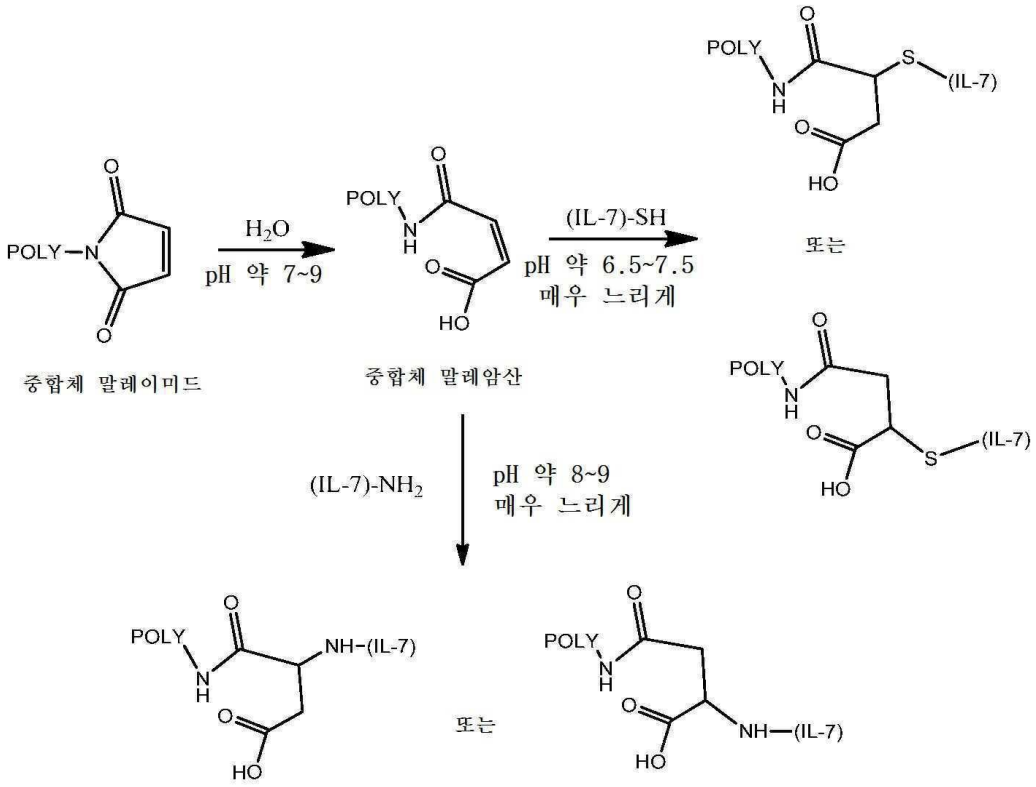
[0231]

중합체 시약	상응하는 접합체
 mPEG 말레이미드 시약	 티오에테르 결합
 mPEG 말레이미드 시약	 티오에테르 결합
 mPEG 갈라진 말레이미드 시약	 티오에테르 결합
 분지형 mPEG2 말레이미드 시약	 티오에테르 결합
 분지형 mPEG2 말레이미드 시약	 티오에테르 결합
 분지형 mPEG2의 갈라진 말레이미드 시약	 티오에테르 결합
 분지형 mPEG2의 갈라진 말레이미드 시약	 티오에테르 결합

중합체 시약	상응하는 접합체
 mPEG 비닐 설폰 시약	 티오에테르 결합
 mPEG 티올 시약	 이황화물 결합
 동종 이작용성 PEG 티올 시약	 이황화물 결합
 mPEG 이황화물 시약	 이황화물 결합
 동종 이작용성 이황화물 시약	 이황화물 결합

[0232]

[0233] (말레이미드가 IL-7 부분 상의 아민 또는 티올기와 반응하는지 여부와 관계없이) 하나 이상의 말레이미드 작용기를 가지는 수용성 중합체로부터 형성된 접합체에 대하여, 수용성 중합체의 상응하는 말레암산(maleamic acid) 형태(들)는 또한 IL-7 부분과 반응할 수 있다. 특정 조건(예를 들어, 약 pH 7 내지 9 및 물의 존재) 하에서, 말레이미드 고리는 "열려서(open)" 상응하는 말레암산을 형성할 것이다. 결과적으로 말레암산은 IL-7 부분의 아민 또는 티올기와 반응할 수 있다. 예시적인 말레암산에 기초한 반응은 하기에 도식적으로 나타내어져 있다. POLY는 수용성 중합체를 나타내고, IL-7은 IL-7 부분을 나타낸다.



[0234]

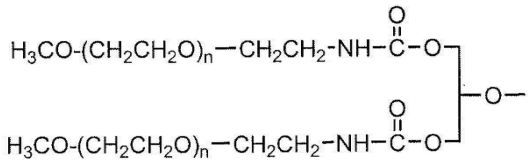
[0235] 본 발명에 따라서 대표적인 접합체는 다음과 같은 구조를 가질 수 있으며,

[0236] POLY-$L_{0,1}$-C(O)Z-Y-S-S-(IL-7)

[0237] 여기서 POLY는 수용성 중합체고, L은 선택적인 링커이며, Z는 O, NH, 및 S로 이루어진 군으로부터 선택되는 헤테로원자이고, Y는 C_{2-10} 알킬, C_{2-10} 치환된 알킬, 아릴, 및 치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되며, IL-7는

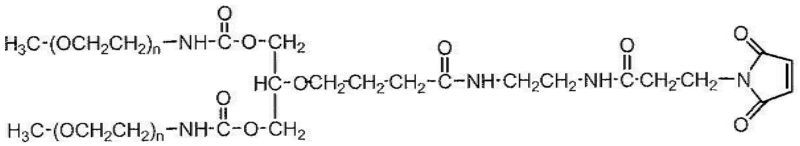
IL-7 부분이다. IL-7 부분과 반응할 수 있고 접합체의 이러한 유형을 생성할 수 있는 중합체 시약은 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0014903에 기술되어 있다.

[0238] 앞서 나타낸 바와 같이, 수용성 중합체가 분지형의 형태인 본 발명의 예시적인 접합체는 수용성 중합체의 분지형의 형태가 다음의 구조를 포함하게 할 것이며,

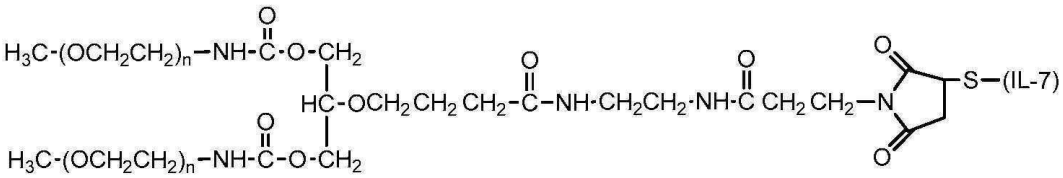
[0239] 

[0240] 여기서, 각각의 (n)은 독립적으로 2 내지 4000의 값을 가지는 정수이다.

[0241] 분지형의 형태로 수용성 중합체를 가지는 예시적인 접합체는 다음의 시약을 사용하여 제조되며,

[0242] 

[0243] 그렇게 함으로써 다음의 구조를 가지는 접합체를 형성하고,

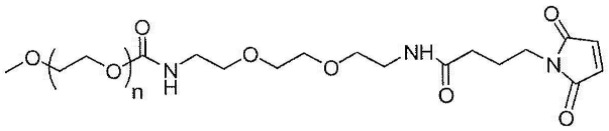
[0244] 

[0245] 여기서,

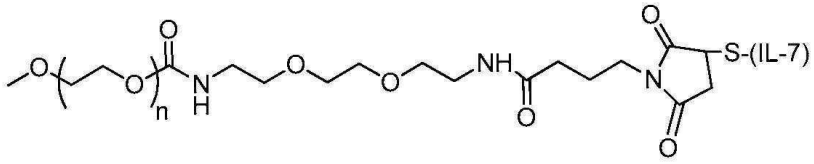
[0246] (각각의 구조에 있어서) 각각의 (n)은 독립적으로 2 내지 4000의 값을 가지는 정수이며,

[0247] IL-7은 IL-7 부분의 잔기이다.

[0248] 추가적인 예시적 접합체는 다음의 시약을 사용하여 형성될 수 있으며,

[0249] 

[0250] 그렇게 함으로써 다음의 구조를 가지는 접합체를 형성하고,

[0251] 

[0252] 여기서,

[0253] (각각의 구조에 있어서) (n)은 독립적으로 2 내지 4000의 값을 가지는 정수이며;

[0254] IL-7은 IL-7 부분의 잔기이다.

[0255] 접합체는 다수의 방법으로 티올-선택적인 중합체 시약을 사용하여 형성될 수 있고 본 발명은 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 선택적으로 적합한 완충액(원한다면, 아민-함유 완충액을 포함함)에서, IL-7 부분은 약 pH 7 내지 8의 수성 매질에 배치하고, 티올-선택적인 중합체 시약은 과량 몰로 첨가한다. PEG화 수율을 상대적으로 낮게 결정한다면 2 시간 초과의 반응 시간(예를 들어, 5 시간, 10 시간, 12 시간, 및 24 시간)은 유용할 수 있지만, 반응은 약 0.5 시간 내지 2 시간 동안 진행되게 한다. 이러한 접근법에서 사용할 수 있는 예시적인 중합체 시약은 말레이미드, 술폰(예를 들어, 비닐 술폰), 및 티올(예를 들어, 오르토 피리디닐 또는 "OPSS"와 같

은 작용화된 티올)로 이루어진 군으로부터 선택되는 반응성기를 가지는 중합체 시약이다.

[0256] 중합체 시약에 대하여, 여기 및 다른 부분에서 기술된 것들은 상업적 출처에서 구입하거나 또는 상업적으로 이용가능한 출발 물질로부터 제조할 수 있다. 덧붙여, 중합체 시약을 제조하는 방법은 문헌에 기술되어 있다.

[0257] IL-7 부분과 비펩티드 수용성 중합체 사이의 부착은, 어떠한 개재 원자(intervening atom)가 IL-7 부분과 중합체 사이에 위치하지 않아 직접적일 수 있거나, 또는 IL-7 부분과 중합체 사이에 하나 이상의 원자가 위치하여 간접적일 수 있다. 간접적인 부착에 대하여 "스페이서 부분"은 IL-7 부분의 잔기와 수용성 중합체 사이에서 링커로서의 역할을 한다. 스페이서 부분을 구성하는 하나 이상의 원자는 하나 이상의 탄소 원자, 질소 원자, 황 원자, 산소 원자, 및 이의 조합을 포함할 수 있다. 스페이서 부분은 아미드, 2차 아민, 카바메이트, 티오에테르, 및/또는 이황화기를 포함할 수 있다. 특이적인 스페이서 부분의 비제한적인 예로서는 -O-, -S-, -S-S-, -C(O)-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, -C(S)-, $-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-O-CH_2-$, $-CH_2-O-$, $-O-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-O-$, $-O-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-O-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-O-$, $-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-$, -C(O)-NH-CH_2-, -C(O)-NH-CH_2-CH_2-, $-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-, -C(O)-NH-$CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-, $-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-, -C(O)-NH-$CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-$C(O)-NH-$CH_2-CH_2-CH_2-$, $-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-CH_2-, $-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-, $-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-CH_2-, $-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-, -C(O)-O-CH_2-, $-CH_2-$C(O)-O-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$C(O)-O-CH_2-, -C(O)-O-CH_2-CH_2-, -NH-C(O)-CH_2-, $-CH_2-$NH-C(O)-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$NH-C(O)-CH_2-, -NH-C(O)-CH_2-CH_2-, $-CH_2-$NH-C(O)-CH_2-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$NH-C(O)-CH_2-CH_2-, -C(O)-NH-CH_2-, -C(O)-NH-CH_2-CH_2-, -O-C(O)-NH-CH_2-, -O-C(O)-NH-CH_2-CH_2-, -NH-CH_2-, -NH-CH_2-CH_2-, $-CH_2-$NH-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$NH-CH_2-, -C(O)-CH_2-, -C(O)-CH_2-CH_2-, $-CH_2-$C(O)-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$C(O)-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$C(O)-CH_2-CH_2-, $-CH_2-CH_2-$C(O)-, $-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-, $-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-, $-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-, $-CH_2-CH_2-CH_2-$C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_2-, -O-C(O)-NH-$[CH_2]_h-(OCH_2CH_2)_j-$, 2가 사이클로알킬기, -O-, -S-, 아미노산, $-N(R^6)-$, 및 상기한 것 중 임의의 2 개 이상의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 포함하고, 여기서 R^6은 H 또는 알킬, 치환된 알킬, 알케닐, 치환된 알케닐, 알키닐, 치환된 알키닐, 아릴 및 치환된 아릴로 이루어진 군으로부터 선택되는 유기 라디칼이고, (h)는 0 내지 6이며, (j)는 0 내지 20이다. 기타 다른 특이적인 스페이서 부분은 $-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$, $-NH-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$, 및 $-O-C(O)-NH-(CH_2)_{1-6}-NH-C(O)-$의 구조를 가지며, 여기서 각각의 메틸렌 뒤의 아래첨자는 상기 구조 내에 포함된 메틸렌의 수를 나타내는데, 예를 들어 $(CH_2)_{1-6}$은 구조가 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개 또는 6 개의 메틸렌을 포함할 수 있음을 의미한다. 추가적으로, 임의의 상기 스페이서 부분은 1 개 내지 20 개의 에틸렌 옥사이드 단량체 단위[즉, $-(CH_2CH_2O)_{1-20}$]를 포함하는 에틸렌 옥사이드 올리고머 사슬을 더 포함할 수 있다. 즉, 에틸렌 옥사이드 올리고머 사슬은 스페이서 부분의 앞에 또는 뒤에, 그리고 선택적으로 두 개 이상의 원자로 구성되는 스페이서 부분의 임의의 두 개의 원자 사이에서 생길 수 있다. 또한, 상기 올리고머가 중합체 분절에 인접하거나 단지 중합체 분절의 연장을 나타내는 것이라면, 상기 올리고머 사슬은 스페이서 부분의 일부인 것으로 고려되지 않는다.

[0258] 조성물

[0259] 상기 접합체는 통상적으로 조성물의 부분이다. 일반적으로, 바람직하게 필수적이지는 않지만, 상기 조성물은 복수의 접합체를 포함하고 각각의 접합체는 동일한 IL-7 부분으로 구성된다(즉, 전체 조성물 내에서, IL-7 부분의 오직 한 가지 유형만이 발견된다). 덧붙여, 상기 조성물은 다수의 접합체를 포함할 수 있고, 여기서 임의의 주어진 접합체는 둘 이상의 상이한 IL-7 부분으로 이루어진 군으로부터 선택되는 부분으로 구성된다(즉, 전체 조성물 내에서, 둘 이상의 상이한 IL-7 부분이 발견된다). 그러나 선택적으로 조성물 내에서 실질적으로 모든 접합체(예를 들어, 조성물 내에서 85% 이상의 다수의 접합체)는 각각 동일한 IL-7 부분으로 구성된다.

[0260] 조성물은 단일의 접합체 종(species)(예를 들어, 단일 중합체가 조성물 내에서 실질적으로 모든 접합체에 대하여 동일한 위치에서 부착된 모노PEG화된 접합체) 또는 접합체 종의 혼합물(예를 들어, 중합체의 부착이 상이한 부위에서 일어난 모노PEG화된 접합체의 혼합물 및/또는 모노PEG화된 접합체, 디PEG화된 접합체 및 트리PEG화된

접합체의 혼합물)을 포함할 수 있다. 또한 상기 조성물은 IL-7 활성을 가지는 임의의 주어진 부분에 부착된 4 개, 5 개, 6 개, 7 개, 8 개 또는 그 이상의 중합체를 가지는 기타 다른 접합체를 포함할 수 있다. 덧붙여, 본 발명은 조성물이 다수의 접합체를 포함하는 경우를 포함하며, 각각의 접합체는 하나의 IL-7 부분에 공유적으로 부착된 하나의 수용성 중합체뿐만 아니라 하나의 IL-7 부분에 공유적으로 부착된 2 개, 3 개, 4 개, 5 개, 6 개, 7 개, 8 개, 또는 그 이상의 수용성 중합체를 포함하는 조성물을 포함한다.

[0261] 본 조성물 중 접합체에 대하여, 조성물은 다음과 같은 특징들 중 하나 이상을 만족시킬 것인데, 즉 조성물 중 접합체의 적어도 약 85%가 IL-7 부분에 부착된 중합체 1 개 내지 8 개를 가질 것이고; 조성물 중 접합체의 적어도 약 85%가 IL-7 부분에 부착된 중합체 1 개 내지 7 개를 가질 것이며; 조성물 중 접합체의 적어도 약 85%가 IL-7 부분에 부착된 중합체 1 개 내지 5 개를 가질 것이고; 조성물 중 접합체의 적어도 약 85%가 IL-7 부분에 부착된 중합체 1 개 내지 3 개를 가질 것이며; 조성물 중 접합체의 적어도 약 95%가 IL-7 부분에 부착된 중합체 1 개 내지 2 개를 가질 것이고; 조성물 중 접합체의 적어도 약 95%가 IL-7 부분에 부착된 중합체 3 개 내지 8 개를 가질 것이며; 조성물 중 접합체의 적어도 약 95%가 IL-7 부분에 부착된 중합체 2 개 내지 5 개, 7 개를 가질 것이고; 조성물 중 접합체의 적어도 약 95%가 IL-7 부분에 부착된 중합체 3 개 내지 6 개를 가질 것이며; 조성물 중 접합체의 적어도 약 95%가 IL-7 부분에 부착된 중합체 1 개를 가질 것이고; 조성물 중 접합체의 적어도 약 99%가 IL-7 부분에 부착된 중합체 1 개 내지 6 개를 가질 것이며; 조성물 중 접합체의 적어도 약 99%가 IL-7 부분에 부착된 중합체 1 개 내지 4 개를 가질 것이고; 조성물 중 접합체의 적어도 약 99%가 IL-7 부분에 부착된 중합체 1 개 내지 3 개를 가질 것이며; 조성물 중 접합체의 적어도 약 99%가 IL-7 부분에 부착된 중합체 1 개 내지 2 개를 가질 것이고; 조성물 중 접합체의 적어도 약 99%가 IL-7 부분에 부착된 중합체 1 개를 가질 것이다. 중합체의 범위를 지칭하는 표현, 예를 들어 “중합체 x 개 내지 y 개”는 x 개 내지 y 개의 수만큼의 중합체(경계값 포함)로 고려됨이 이해된다(다시 말해서, 예를 들어 “중합체 1 개 내지 3 개”는 중합체 1 개, 중합체 2 개 및 중합체 3 개인 것으로 고려되고, “중합체 1 개 내지 2 개”는 중합체 1 개 및 중합체 2 개인 것으로 고려되는 식임). 또한 2 개 이상의 중합체가 IL-7 부분에 부착되어 있는 소정의 접합체는 안정적이면서 해리 가능하게 부착된 중합체들의 혼합물을 가질 수 있음도 고려된다(이 경우, 적어도 하나의 중합체는 IL-7 부분에 안정적으로 부착되고, 적어도 하나의 중합체는 IL-7 부분에 해리 가능하게 부착되어 있음).

[0262] 하나 이상의 구현예에서, 접합체-함유 조성물에는 알부민이 없거나 또는 실질적으로 없는 것이 바람직하다. 또한 상기 조성물에는 IL-7 활성을 가지지 않는 단백질이 없거나 또는 실질적으로 없는 것이 바람직하다. 따라서, 상기 조성물에는 알부민이 85%, 보다 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 99% 없는 것이 바람직하다. 추가적으로, 상기 조성물에는 IL-7 활성을 가지지 않는 임의의 단백질이 85%, 보다 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 99% 없는 것이 바람직하다. 상기 조성물 내에 알부민이 존재하는 정도까지, 본 발명의 예시적인 조성물에는 IL-7 부분의 잔기를 알부민에 결합하는 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체를 포함하는 접합체가 실질적으로 없다.

[0263] 임의의 주어진 부분에 대한 중합체의 원하는 수의 제어는 적절한 중합체 시약, IL-7 부분에 대한 중합체 시약의 비율, 온도, pH 조건, 및 접합 반응의 기타 다른 양태를 선택함으로써 성취될 수 있다. 덧붙여, 원하지 않는 접합체(예를 들어, 4 개 이상의 부착된 중합체를 가지는 접합체)의 감소 또는 제거는 정제 수단을 통해 성취될 수 있다.

[0264] 예를 들어, 중합체-IL-7 부분 접합체는 정제되어 상이한 접합된 종을 획득/분리할 수 있다. 구체적으로, 생성물 혼합물은 정제되어 IL-7 부분당 1 개, 2 개, 3 개, 4 개, 5 개 또는 그 이상의 PEG, 통상적으로 IL-7 부분당 1 개, 2 개, 또는 3 개의 PEG로부터 임의의 부분의 평균을 획득할 수 있다. 최종 접합체 반응 혼합물의 정제를 위한 전략은 예를 들어 이용된 중합체 시약의 분자량, 특정 IL-7 부분, 원하는 투여 요법, 및 잔여 활성 및 개별적인 접합체(들)의 생체내 특성을 포함한 다수의 인자에 따라 다를 것이다.

[0265] 원한다면, 상이한 분자량을 가지는 접합체는 겔 여과 크로마토그래피 및/또는 이온 교환 크로마토그래피를 사용하여 분리할 수 있다. 다시 말하면, 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 상이한 분자량에 기초하여(차이는 본질적으로 수용성 중합체 부분의 평균 분자량에 해당함) 상이하게 번호가 매겨진 중합체 대 IL-7 부분의 비율(예를 들어, 1-머, 2-머, 3-머 등, 여기서 “1-머”는 IL-7 부분에 대한 1 개의 중합체를 나타내고, “2-머”는 IL-7 부분에 대한 2 개의 중합체를 나타낸다, 등등)을 분별한다. 예를 들어, 35,000 달톤 단백질이 약 20,000 달톤의 분자량을 가지는 중합체 시약에 무작위로 접합되는 예시적인 반응에서, 생성되는 반응 혼합물은 변형되지 않은 단백질(약 35,000 달톤의 분자량을 가짐), 모노PEG화된 단백질(약 55,000 달톤의 분자량을 가짐), 디PEG화된 단백질(약 75,000 달톤의 분자량을 가짐), 등을 포함할 수 있다.

[0266] 이러한 접근법을 사용하여 PEG와 상이한 분자량을 가지는 기타 다른 중합체-IL-7 부분 접합체를 분리하는 반면,

이러한 접근법은 일반적으로 IL-7 부분 내에서 상이한 중합체 부착 부위를 가지는 위치상 이소형(positional isoform)을 분리하는데 효과적이지 않다. 예를 들어, 회수된 접합체 조성물의 각각은 IL-7 부분 내에서 상이한 반응성기(예를 들어, 리신 잔기)에 부착된 PEG(들)를 포함할 수 있지만, 겔 여과 크로마토그래피를 사용하여 PEG 1-머, 2-머, 3-머 등의 각각의 다른 혼합물을 분리할 수 있다.

[0267] 이러한 유형의 분리를 수행하는데 적합한 겔 여과 컬럼은 GE Healthcare(영국 버킹엄셔 소재)로부터 이용가능한 Superdex™ 및 Sephadex™ 컬럼을 포함한다. 특정 컬럼의 선별은 원하는 분별 범위에 따라 다를 것이다. 용출은 일반적으로 포스페이트, 아세테이트 등과 같은 적합한 완충액을 사용하여 수행할 수 있다. 수집된 분획물은, 예를 들어 (i) 단백질 함량에 대하여 280 nm에서의 흡광도, (ii) 표준으로서 소 혈청 알부민(BSA)을 사용하여 염색에 기초한 단백질 분석, (iii) PEG 함량에 대하여 요오드 시험(Sims et al. (1980) *Anal. Biochem*, 107:60-63), (iv) 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(SDS PAGE) 후 바륨 요오다이드로 염색, 및 (v) 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)와 같은 다수의 상이한 방법으로 분석할 수 있다.

[0268] 위치상 이소형의 분리는 적합한 컬럼(예를 들어, C18 컬럼 또는 C3 컬럼, Amersham Biosciences Vydac과 같은 회사에서 시판 중임)을 사용하는 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)를 사용하여 역상 크로마토그래피로, 또는 이온 교환 컬럼(예를 들어, GE Healthcare에서 시판 중인 Sepharose™ 이온 교환 컬럼)을 사용하는 이온 교환 크로마토그래피로 수행한다. 이러한 접근법 중 하나를 사용하여 동일한 분자량을 가지는 중합체-활성제 이성질체(isomer)(즉, 위치상 이소형)를 분리할 수 있다.

[0269] 상기 조성물에는 바람직하게 IL-7 활성을 가지지 않는 단백질이 실질적으로 없다. 덧붙여, 상기 조성물에는 바람직하게 기타 다른 비공유적으로 부착된 수용성 중합체 모두 실질적으로 없다. 그러나 몇몇 환경에서, 상기 조성물은 중합체-IL-7 부분 접합체 및 접합되지 않은 IL-7 부분의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0270] 선택적으로, 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제를 더 포함한다. 원한다면, 약학적으로 허용가능한 부형제는 접합체에 첨가되어 조성물을 형성할 수 있다.

[0271] 예시적인 부형제는 이에 한정되지 않지만, 탄수화물, 무기염, 항균제, 항산화제, 계면활성제, 완충액, 산, 염기, 아미노산, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것들을 포함한다.

[0272] 당과 같은 탄수화물, 알디톨, 알돈산, 에스테르화된 당 및/또는 당 중합체와 같은 유도체화 당은 부형제로서 존재할 수 있다. 구체적인 탄수화물 부형제로서는 예를 들어 프럭토스, 말토스, 갈락토스, 글루코스, D-만노스, 소르보스 등과 같은 단당류; 락토스, 수크로스, 트레할로스, 셀로비오스 등과 같은 이당류; 라피노스, 멜레지토스, 말토덱스트린, 덱스트란, 전분 등과 같은 다당류; 만니톨, 자일리톨, 말티톨, 락티톨, 자일리톨, 소르비톨(글루시톨), 피라노실 소르비톨, 미오이노시톨, 사이클로덱스트린 등과 같은 알디톨을 포함한다.

[0273] 또한 부형제로서는 시트르산, 아세트산, 염화나트륨, 염화칼륨, 황산나트륨, 질산칼륨, 제1인산나트륨, 제2인산나트륨, 및 이의 조합과 같은 무기염 또는 완충액을 포함할 수 있다.

[0274] 또한 조성물은 미생물 성장을 방지 또는 막기 위한 항균제를 포함할 수 있다. 본 발명의 하나 이상의 구현예에 적합한 항균제의 제한적이지 않는 예는 염화벤잘코늄, 염화벤제토늄, 벤질 알코올, 염화세틸피리디늄, 클로로부탄올, 페놀, 페닐에틸 알코올, 질산 페닐수은, 타이메로솔(thimersol), 및 이의 조합을 포함한다.

[0275] 항산화제도 또한 상기 조성물 내에 존재할 수 있다. 항산화제는 산화를 방지하는 데 사용되어, 접합체 또는 제조물의 기타 다른 성분의 악화를 방지한다. 본 발명의 하나 이상의 구현예에서의 사용에 적합한 항산화제로서는 예를 들어 팔미트산아스코빌, 부틸 하이드록시아니솔, 부틸 하이드록시톨루엔, 차아인산(hypophosphorous acid), 모노티오글리세롤, 갈산프로필(propyl gallate), 아황산수소나트륨(sodium bisulfite), 소듐 포름알데히드 설폭실레이트(sodium formaldehyde sulfoxylate), 메타중아황산나트륨(sodium metabisulfite), 및 이의 조합을 포함한다.

[0276] 계면활성제는 부형제로서 존재할 수 있다. 예시적인 계면활성제는 “트윈 20” 및 “트윈 80”과 같은 폴리소르베이트, F68 및 F88(둘 다 BASF(미국 뉴저지주 플로햄 파크 소재)에서 시판 중임)과 같은 플루로닉(pluronic); 소르비탄 에스테르; 레시틴 및 기타 다른 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민(바람직하게는 리포좀 형태로 있지 않음)과 같은 인지질, 지방산 및 지방 에스테르와 같은 지질; 콜레스테롤과 같은 스테로이드; 및 EDTA, 아연 및 기타 다른 적합한 양이온과 같은 IL-7화제를 포함한다.

[0277] 산 또는 염기는 상기 조성물 내에 부형제로서 존재할 수 있다. 사용할 수 있는 산의 제한적이지 않는 예로서는

염산, 아세트산, 인산, 시트르산, 말산, 락트산, 포름산, 트리클로로아세트산, 질산, 과염소산(perchloric acid), 인산, 황산, 푸마르산, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 산들을 포함한다. 적합한 염기의 예로서는 이에 한정되지 않지만, 수산화나트륨, 아세트산나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼륨, 아세트산암모늄, 아세트산칼륨, 인산나트륨, 인산칼륨, 시트르산나트륨, 포름산나트륨, 황산나트륨, 황산칼륨, 푸마르산칼륨(potassium fumerate), 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 염기들을 포함한다.

[0278] 하나 이상의 아미노산은 본원에 기술된 조성물 중 부형제로서 존재할 수 있다. 이와 관련하여, 예시적인 아미노산으로서는 아르기닌, 리신 및 글리신을 포함한다.

[0279] 상기 조성물 내에서 접합체(즉, 활성제와 중합체 시약 사이에 형성된 접합체)의 양은 다수의 인자에 따라 다양할 것이지만, 최적으로는 조성물이 단위 투약 용기(unit dose container)(예를 들어, 바이알) 내에 저장될 때 치료상으로 효과적인 용량일 것이다. 덧붙여, 약학적 제조물은 주사기 내에 수용될 수 있다. 치료상으로 효과적인 용량은 임상적으로 원하는 종점을 제공하는 양을 결정하기 위하여 접합체의 양을 증가시키면서 반복된 투여에 의해 실험적으로 결정할 수 있다.

[0280] 상기 조성물 내에서 임의의 개별적인 부형제의 양은 부형제의 활성 및 조성물의 특정 수요에 따라 다를 것이다. 통상적으로, 임의의 개별적인 부형제의 최적양은 통상적인 실험을 통해, 즉 (낮은 양에서 높은 양의 범위로) 부형제의 양을 달리하면서 포함하는 조성물을 제조, 안정성 및 기타 다른 파라미터를 시험, 및 그 다음 유의한 부작용이 없는 최적의 성능을 이루는 범위를 결정함으로써 결정된다.

[0281] 그러나 일반적으로 부형제는 조성물 내에 부형제의 중량으로 약 1% 내지 약 99%, 바람직하게는 중량으로 약 5% 내지 약 98%, 보다 바람직하게는 중량으로 약 15% 내지 약 95%의 양으로, 가장 바람직하게는 중량으로 30% 미만의 농도로 존재할 것이다.

[0282] 기타 다른 부형제와 마찬가지로 이들 상기한 약학적 부형제는 문헌 ["Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995)], ["Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998)], 및 [Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000]에 기술되어 있다.

[0283] 상기 조성물은 모든 유형의 제형, 특히 주사에 적합한 유형, 예를 들어 재구성될 수 있는 분말 또는 동결건조물(lyophilate)뿐만 아니라 액체를 포함한다. 주사하기 전에 고체 조성물을 재구성하기에 적합한 희석제의 예로서는 정균성 주사용수(bacteriostatic water for injection), 물 내의 5% 덱스트로스, 인산완충식염수, 링거용액, 식염수, 멸균수, 탈이온수, 및 이의 조합을 포함한다. 액체 약학 조성물에 대하여, 용액 및 현탁액이 고려된다.

[0284] 하나 이상의 구현예들에서, 본 조성물은 또한 하이드로겔일 수도 있다. 예시적 하이드로겔은 폴리(에틸렌글리콜)을 (접합되지 않은 형태로) 포함하는 것들, 예를 들어 문헌[Zustiak et al. (2010) *Biomacromolecules* 11(5):1348-1357]에 기술된 것들을 포함한다.

[0285] 하나 이상의 구현예의 조성물은 통상적으로 필수적이지는 않지만 주사를 통해 투여되고, 따라서 일반적으로 투여 직전에 하이드로겔, 액체 용액 또는 현탁액이다. 또한 약학적 제조물은 시럽, 크림, 연고, 정제(tablet), 파우더 등과 같은 기타 다른 형태를 취할 수 있다. 기타 다른 투여 방식, 예를 들어 폐내, 직장, 경피, 경점막, 경구, 척추 강내, 종양 내, 종양 주위, 복막 내, 피하 및 동맥 내 등을 또한 포함한다.

[0286] 또한 본 발명은 본원에서 제공되는 바와 같은 접합체를 이용한 치료에 반응하는 병태를 겪는 환자에게 상기 접합체를 투여하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 환자에게 일반적으로 주사를 통해 치료적으로 유효한 양의 접합체(바람직하게는 약학 조성물의 부분으로서 제공됨)를 투여하는 단계를 포함한다. 앞서 기술한 바와 같이, 상기 접합체는 (예를 들어, 근육내로, 피하로 및 비경구로) 주사될 수 있다. 비경구 투여에 적합한 제형 유형으로서는 특히 주사용 용액으로 준비된 것, 사용 전에 용매와 같이 사용하는 건조 분말, 주사용으로 준비된 현탁액, 사용 전에 비히클과 같이 사용하는 건조 불용성 조성물, 및 투여 전에 희석하는 에멀젼 및 액체 농축물을 포함한다.

[0287] 접합체(바람직하게는 약학 조성물의 부분으로서 제공됨)를 투여하는 방법은 상기 접합체가 특정 부위에 국소화되도록 선택적으로 수행될 수 있다. 예를 들어, 접합체를 포함하는 액체, 겔 및 고체 제형은 발병 부위(예를 들어, 종양 내부, 종양 근처, 염증이 생긴 내부 및 염증이 생긴 부위 근처)에 수술에 의해 이식될 수 있다. 편리하게, 장기와 조직은 또한 원하는 위치가 접합체에 더 잘 노출되도록 보장하기 위해 조영될 수도 있다.

[0288] 투여 방법은 본 접합체의 투여에 의해 치유 또는 예방될 수 있는 임의의 병태를 치료하는 데에 사용될 수 있다. 당업계의 통상의 기술을 가진 자들은 어느 접합체가 어느 병태를 효과적으로 치료할 수 있는지를 이해한다. 예를 들어 본 접합체는, 면역 결핍증을 앓고있는 환자를 치료하고, 예를 들어 자연에서 면역 억제를 초래하는 치료가 행하여지거나 이러한 질병이 발생한 후에 일어나는 면역계의 천연 재구성을 가속화시킴에 있어서 단독으로 사용될 수 있거나, 아니면 기타 다른 약물요법과 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어 본 접합체는 바이러스 감염, 면역 질환을 치료하고, 특정 세포류의 생장(증식 포함)을 향상시키는 데에 사용될 수 있다. 더욱이 접합체는 암, 예를 들어 방광암, 폐암, 뇌암, 유방암, 피부암 및 전립선암을 앓고 있는 환자를 치료하는 데에 사용될 수 있다. 유리하게, 본 접합체는 다른 활성 제제의 투여 전, 이의 투여와 동시, 또는 이의 투여 후에 환자에게 투여될 수 있다. 예를 들어 본 접합체는 암을 앓고있는 환자를 치료하기 위한 면역요법 수반 접근법의 일환으로서 사용될 수 있는데, 이때 이 접합체는 암을 앓고있는 개체들의 치료에 사용된 또 다른 면역요법 약물의 투여 전, 이의 투여와 동시, 또는 이의 투여 후에 환자에게 투여된다.

[0289] 투여될 실제 용량은 피험체의 연령, 체중 및 전체적인 상태뿐만 아니라, 치료중인 병태의 심각성, 건강 관리 전문가의 판단, 그리고 투여되는 접합체에 따라서 달라질 것이다. 치료적으로 유효한 양은 당업자들에게 공지되어 있으며/있거나 관련된 참조 문서 및 문헌에 기술되어 있다. 일반적으로 치료적으로 유효한 양은 약 0.001 mg 내지 100 mg, 바람직하게는 0.01 mg/일 내지 75 mg/일의 용량으로, 보다 바람직하게는 0.10 mg/일 내지 50 mg/일의 용량의 범위일 것이다. 주어진 용량은, 예를 들어 임상의가 적절한 종점에 이르렀다고(예를 들어 치료, 퇴행, 부분 퇴행 등이 이루어졌다고) 결정할 때까지 주기적으로 투여될 수 있다.

[0290] 임의의 주어진 접합체(또한, 바람직하게는 약학적 제조물의 부분으로서 제공됨)의 단위 복용량은 임상의의 판단, 환자의 수요 등에 따라 다양한 투여 스케줄로 투여될 수 있다. 구체적인 투여 스케줄은 당업자에게 공지되어 있거나 또는 통상적인 방법을 사용하여 실험적으로 결정될 수 있다. 예시적인 투여 스케줄은 이에 한정되지 않지만, 하루에 1 번, 일주일에 3 번, 일주일에 2 번, 일주일에 1 번, 한달에 2 번, 한달에 1 번 투여 및 이의 임의의 조합을 포함한다. 일단 임상 종점을 성취하면, 조성물의 투여는 중단시킨다.

[0291] 본 발명은 이의 바람직한 특이적 구현예와 함께 기술되어 있고, 상기한 기술뿐만 아니라 후술하는 실시예는 본 발명을 예시하는 것이고 본 발명의 범주를 제한하는 것이 아닌 것으로 의도됨을 이해해야 한다. 본 발명의 범주 내에서의 다른 양태, 이점 및 변형은 본 발명이 속하는 기술분야의 숙련된 자들에게 명백할 것이다.

[0292] 본원에서 참조한 모든 논문, 서적, 특허 및 기타 다른 간행물은 참조로서 전체가 포함된다.

[0294] **실험예**

[0295] 본 발명의 실시는 다르게 지시되지 않는다면, 유기합성, 생화학, 단백질 정제 등의 통상적인 기법을 이용할 것이고, 이는 당업계의 기술 범위 내이다. 이와 같은 기법은 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예를 들어, 상기한 문헌 [J. March, Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure, 4th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992)]을 참조한다.

[0296] 다음의 실시예에서, 사용된 숫자(예를 들어, 양, 온도 등)에 대하여 정확성을 확보하기 위하여 노력하였으나, 몇몇 실험적 오차 및 편차를 고려하여야 한다. 다르게 지시되지 않는다면, 온도는 섭씨이고 압력은 해수면에서의 대기압 또는 대기압 근처이다. 하기 실시예의 각각은 본원에 기술된 하나 이상의 구현예를 수행하는 데 당업자에게 도움이 될 것으로 고려된다.

[0297] 서열 번호 1의 아미노산 서열에 상응하는 재조합체 IL-7(“rhIL-7”)을 포함하는 수용액(“스톡 용액”)이 실시예들에서의 사용을 위해 제조된다.

[0298] <u>SDS-PAGE 분석</u>

[0299] Invitrogen 겔 전기 영동 시스템(XCell SureLock Mini-Cell)을 사용하는 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기 영동(SDS-PAGE)에 의해 시료를 분석하였다. 시료를 시료 완충액과 혼합하였다. 그 다음, 제조된 시료들을 NuPAGE Novex 4% 내지 12% 폴리아크릴아미드 예비 주조 겔 상에 로딩한 후, 약 30 분 동안 전개시켰다.

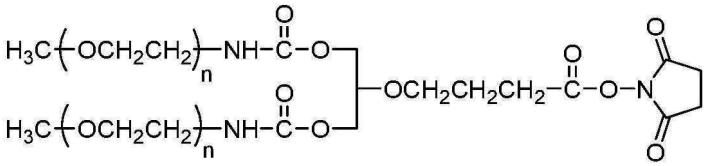
[0300] <u>RP-HPLC 분석</u>

[0301] 역상 크로마토그래피(RP-HPLC) 분석은 Agilent 1200 HPLC 시스템(Agilent사) 상에서 수행되었다. 시료들은 60 ℃에서 Poroshell 300SB-C3 컬럼(2.1 x 75 mm, Agilent)이 사용되어 분석되었다. 이동상은 0.1%TFA/H_2O(A) 및

0.1%TFA/CH_3CN(B)이었다. 컬럼에 대한 유속은 0.5 ml/분이었다. 용리된 단백질 및 PEG-단백질 접합체는 280 nm에서 UV가 사용되어 검출되었다.

[0302] **실시예 1**

[0303] **분지형 mPEG-N-하이드록시숙신이미드 유도체(20 kDa)가 사용된 IL-7의 PEG화**



분지형 mPEG-N-하이드록시숙신이미드 유도체(20 kDa)
("mPEG2-NHS")

[0304]

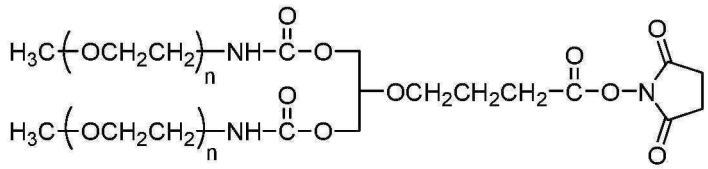
[0305] 아르곤 하에 -20℃에 보관하여 두었던 mPEG2-NHS(20 kDa)를 상온까지 승온시켰다. (스톡 IL-7 용액의 측량된 분취액 중 IL-7의 양에 비하여) 10 배 내지 50 배 과량인, 승온된 mPEG2-NHS를 2 mM HCl 중에 용해하여 10% 시약 용액을 제조하였다. 상기 10% 시약 용액을 신속히 스톡 IL-7 용액(20 mM Tris 중 0.5 mg/ml, 50 mM NaCl, pH7.8)의 분취액에 첨가하고 나서 잘 혼합하였다. 아미드 결합을 통한 mPEG2-NHS와 IL-7의 커플링이 허용되도록 반응 용액을 실온에서 2 시간 동안 Slow Speed Lab Rotator 상에 놓아둔 후, 4℃에 밤새 놓아두었다. 25 mM 글리신 용액을 첨가하여 반응을 억제하였다. 접합체를 대상으로 SDS-PAGE 및 RP-HPLC 둘 다에 의해 특성규명을 실시하였다.

[0306] 도 1은, 10 배 과량의 PEG가 사용되었을 때 접합체 용액의 RP-HPLC 분석 후의 크로마토그램을 나타낸다. PEG화 반응은 44%의 일중 접합체(mono-conjugate)(하나의 PEG가 IL-7에 부착되어 있는 것) 종, 35%의 이중 접합체(2 개의 PEG가 IL-7에 부착되어 있는 것) 종, 그리고 14%의 삼중 접합체(3 개의 PEG가 IL-7에 부착되어 있는 것) 종을 생성하였다. 용액 중에 남아있는 미반응 IL-7은 단지 7%에 불과하였다.

[0307] 도 2는, 상이한 mPEG2-NHS(20 kDa) 농도(즉 10 배, 20 배 및 50 배 과량)에서의 PEG화에 대한 SDS 겔 결과들을 나타낸다.

[0308] **실시예 2**

[0309] **분지형 mPEG-N-하이드록시숙신이미드 유도체(40 kDa)가 사용된 IL-7의 PEG화**



분지형 mPEG-N-하이드록시숙신이미드 유도체(40 kDa)
("mPEG2-NHS")

[0310]

[0311] 아르곤 하에 -20℃에 보관하여 두었던 mPEG2-NHS(40 kDa)를 상온까지 승온시켰다. (스톡 IL-7 용액의 측량된 분취액 중 IL-7의 양에 비하여) 10 배 내지 50 배 과량인, 승온된 mPEG2-NHS를 2 mM HCl 중에 용해하여 10% 시약 용액을 제조하였다. 상기 10% 시약 용액을 신속히 스톡 IL-7 용액(20mM Tris 중 0.5 mg/ml, 50 mM NaCl, pH7.8)의 분취액에 첨가하고 나서 잘 혼합하였다. 아미드 결합을 통한 mPEG2-NHS와 IL-7의 커플링이 허용되도록 반응 용액을 실온에서 2 시간 동안 Slow Speed Lab Rotator 상에 놓아둔 후, 4℃에 밤새 놓아두었다. 25 mM 글리신 용액을 첨가하여 반응을 억제하였다. 접합체를 대상으로 SDS-PAGE 및 RP-HPLC 둘 다에 의해 특성규명을 실시하였다.

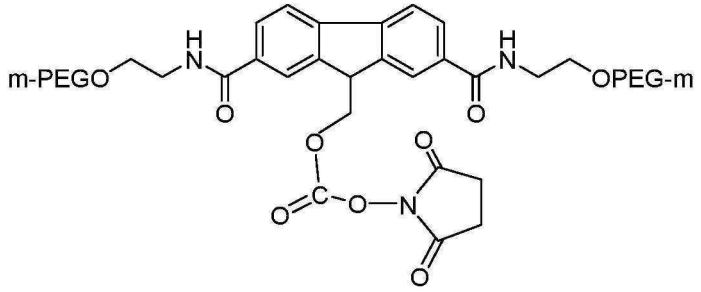
[0312] 도 3은, 10 배 과량의 PEG가 사용되었을 때 접합체 용액의 RP-HPLC 분석 후의 크로마토그램을 나타낸다. PEG화 반응은 36%의 일중 접합체 종과, 44%의 이중 접합체 종, 그리고 17%의 삼중 접합체 종을 생성하였다. 용액 중에 남아있는 미반응 IL-7은 단지 3%에 불과하였다.

[0313] 도 4는, 상이한 mPEG2-NHS(40 kDa) 농도(즉 10 배, 20 배 및 50 배 과량)에서의 PEG화에 대한 SDS 겔 결과들을

나타낸다.

[0314] 실시예 3

[0315] 9-하이드록시메틸-2,7-디[mPEG(10,000)-카르복사미도]플루오렌-N-하이드록시숙신이미드 유도체(20 kDa)가 사용된 IL-7의 PEG화



분지형 mPEG-FMOC-N-하이드록시숙신이미드 유도체(20 kDa)
("C2-PEG2-FMOC-NHS")

[0316]

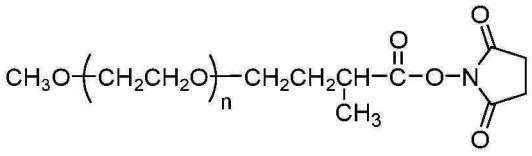
[0317] 아르곤 하에 -20℃에 보관하여 두었던 C2-PEG2-FMOC-NHS(20 kDa)를 상온까지 승온시켰다. (스톡 IL-7 용액의 측량된 분취액 중 IL-7의 양에 비하여) 10 배 내지 50 배 과량인, 승온된 C2-PEG2-FMOC-NHS를 2 mM HCl 중에 용해하여 10% 시약 용액을 제조하였다. 상기 10% 시약 용액을 신속히 스톡 IL-7 용액(20mM Tris 중 0.5 mg/ml, 50 mM NaCl, pH7.8)의 분취액에 첨가하고 나서 잘 혼합하였다. 카바메이트 결합을 통한 C2-PEG2-FMOC-NHS와 IL-7의 커플링이 허용되도록 반응 용액을 실온에서 2 시간 동안 Slow Speed Lab Rotator 상에 놓아둔 후, 4℃에 밤새 놓아두었다. 25 mM 글리신 용액을 첨가하여 반응을 억제하였다. 접합체를 대상으로 SDS-PAGE 및 RP-HPLC 둘 다에 의해 특성규명을 실시하였다.

[0318] 도 5는, PEG화 정찰에 대한 SDS 겔 결과를 나타낸다. 이하 겔에 표시된 바와 같이, 10 배 과량의 시약이 사용되었을 때의 우세 종은 일중 접합체(43%)였고, 20 배 과량의 시약이 사용되었을 때의 우세 종은 이중 접합체(40%)였으며, 50 배 과량의 시약이 사용되었을 때의 우세 종은 삼중 접합체(47%)였다.

[0319] 이와 동일한 접근법이 적용되었을 때, 다른 중량 평균 분자량을 가지는 C2-PEG2-FMOC-NHS가 사용되어 다른 접합체들이 제조될 수 있었다.

[0320] 실시예 4

[0321] 선형 mPEG-숙신이미딜 α-메틸부타노에이트 유도체(30 kDa)가 사용된 IL-7의 PEG화



선형 mPEG-숙신이미딜 α-메틸부타노에이트 유도체(30 kDa)
("mPEG-SMB")

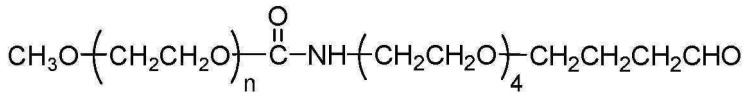
[0322]

[0323] 아르곤 하에 -20℃에 보관하여 두었던 mPEG-SMB(30 kDa)를 상온까지 승온시켰다. (스톡 IL-7 용액의 측량된 분취액 중 IL-7의 양에 비하여) 20 배 과량인, 승온된 mPEG-SMB를 2 mM HCl 중에 용해하여 10% 시약 용액을 제조하였다. 상기 10% 시약 용액을 신속히 스톡 IL-7 용액(인산나트륨 완충액 중 0.5 mg/ml, pH7.5)의 분취액에 첨가하고 나서 잘 혼합하였다. mPEG-SMB를 첨가한 후, 반응 혼합물의 pH를 측정한 다음, 종래의 기술을 사용하여 이 pH를 7.5로 조정하였다. 아미드 결합을 통한 mPEG-SMB와 IL-7의 커플링이 허용되도록 반응 용액을 밤새 Slow Speed Lab Rotator 상에 놓아두어, 실온에서의 접합을 촉진하였다. 글리신 용액을 첨가하여 반응을 억제하였다. 접합체 용액을 대상으로 SDS-PAGE 및 HPLC 둘 다에 의해 특성규명을 실시하였다.

[0324] 이와 동일한 접근법이 적용되었을 때, 다른 중량 평균 분자량을 가지는 mPEG-SMB가 사용되어 다른 접합체들이 제조될 수 있었다.

[0325] 실시예 5

[0326] **선형 mPEG-부티랄데히드 유도체(20 kDa)가 사용된 IL-7의 PEG화**



선형 mPEG-부티랄데히드 유도체(20kDa)
("mPEG-부티르ALD")

[0327]

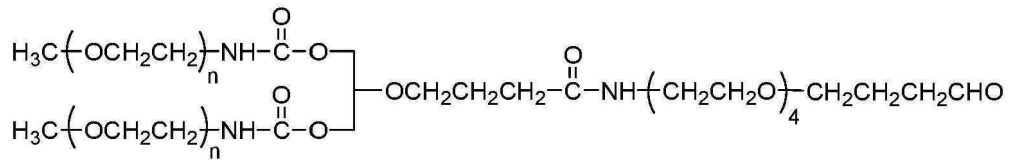
[0328] 아르곤 하에 -20℃에 보관하여 두었던 mPEG-부티르ALD(20 kDa)를 상온까지 승온시켰다. (스톡 IL-7 용액의 측량된 분취액 중 IL-7의 양에 비하여) 30 배 과량인, 승온된 mPEG-부티르ALD를 Milli-Q H_2O 중에 용해하여 10% 시약 용액을 제조하였다. 상기 10% 시약 용액을 신속히 스톡 IL-7 용액(아세트산나트륨 완충액 중 0.5 mg/ml, pH5.5)의 분취액에 첨가하고 나서 잘 혼합하였다. mPEG-부티르ALD를 30 분 동안 첨가한 후, 환원제인 시아노수소화붕소나트륨을 첨가하여 10 mM $NaCNBH_3$를 제조하였다. 반응 용액을 밤새 Slow Speed Lab Rotator 상에 놓아두어, 실온에서의 접합을 촉진하였다. 아세트산으로 pH를 4로 만들어 반응을 억제하였다. 접합체 용액을 대상으로 SDS-PAGE 및 HPLC 둘 다에 의해 특성규명을 실시하였다.

[0329] mPEG-부티르ALD의 알데히드기는 IL-7과 결합한 1차 아민과 반응한 후, 시아노수소화붕소나트륨과 같은 환원제에 의한 환원 시 2차 아민을 통하여 이 1차 아민에 공유 결합할 수 있었다. PEG화 반응은 pH5.5에서 수행되었기 때문에, PEG 유도체의 IL-7에 대한 부착은 N-말단에 대한 부착보다 더 선택적이었다.

[0330] 이와 동일한 접근법이 적용되었을 때, 다른 중량 평균 분자량을 가지는 선형 mPEG-부티르ALD가 사용되어 다른 접합체들이 제조될 수 있었다.

[0331] **실시예 6**

[0332] **분지형 mPEG-부티랄데히드 유도체(40 kDa)가 사용된 IL-7의 PEG화**



분지형 mPEG-부티랄데히드 유도체(40 kDa)
("mPEG2-부티르ALD")

[0333]

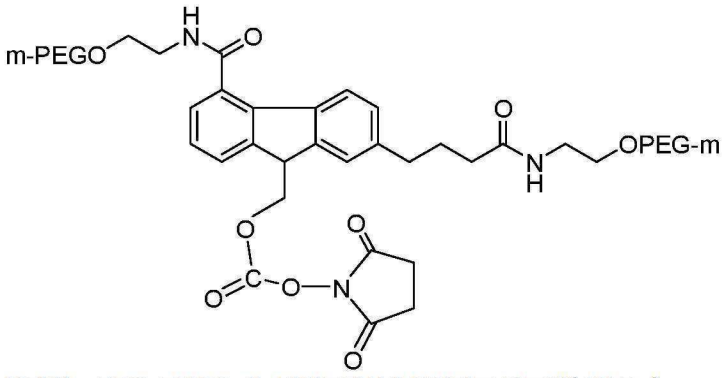
[0334] 아르곤 하에 -20℃에 보관하여 두었던 mPEG2-부티르ALD(40 kDa)을 상온까지 승온시켰다. (스톡 IL-7의 측량된 분취액 중 IL-7의 양에 비하여) 30 배 과량인, 승온된 mPEG-부티르ALD를 Milli-Q H_2O 중에 용해하여 10% 시약 용액을 제조하였다. 상기 10% 시약 용액을 신속히 스톡 IL-7 용액(인산나트륨 완충액 중 0.5 mg/ml, pH6.0)의 분취액에 첨가하고 나서 잘 혼합하였다. mPEG2-부티르ALD를 30 분 동안 첨가한 후, 환원제인 시아노수소화붕소나트륨을 첨가하여 10 mM $NaCNBH_3$를 제조하였다. 반응 용액을 밤새 Slow Speed Lab Rotator 상에 놓아두어, 실온에서의 접합을 촉진하였다. 아세트산으로 pH를 4로 만들어 반응을 억제하였다. 접합체 용액을 대상으로 SDS-PAGE 및 HPLC 분석 둘 다에 의해 특성규명을 실시하였다.

[0335] mPEG2-부티르ALD의 알데히드기는 IL-7과 결합한 1차 아민과 반응한후, 시아노수소화붕소나트륨과 같은 환원제에 의한 환원 시 2차 아민을 통하여 이 1차 아민에 공유 결합할 수 있었다. PEG화 반응은 pH6.0에서 수행되었기 때문에, PEG 유도체의 IL-7에 대한 부착은 N-말단에 대한 부착보다 더 선택적이었다.

[0336] 이와 동일한 접근법이 적용되었을 때, 다른 중량 평균 분자량을 가지는 mPEG2-부티르ALD가 사용되어 다른 접합체들이 제조될 수 있었다.

[0337] **실시예 7**

[0338] **9-하이드록시메틸-4-(mPEG(20,000)-키복시아미드)-7-(3-(mPEG(20,000))카바모일-프로필)-플루오렌-N-하이드록시숙신이미딜 탄산염(40 kDa)이 사용된 IL-7의 PEG화**



분지형 mPEG-FMOC-N-하이드록시숙신이미드 유도체(40kDa)
("CAC-PEG2-FMOC-NHS")

[0339]

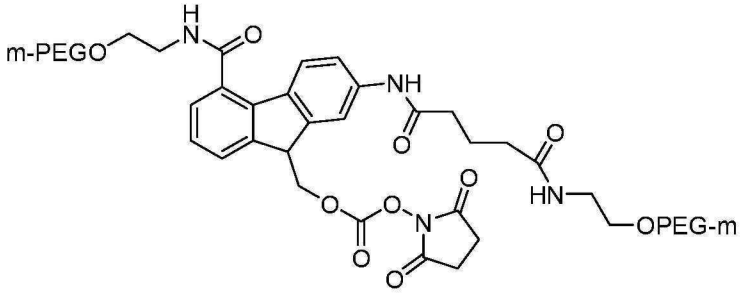
[0340] 아르곤 하에 -20℃에 보관하여 두었던 CAC-PEG2-FMOC-NHS(40 kDa)를 상온까지 승온시켰다. (스톡 IL-7 용액의 측량된 분취액 중 IL-7의 양에 비하여) 10 배 내지 50 배 과량인, 승온된 CAC-PEG2-FMOC-NHS를 2mM HCl 중에 용해하여 10% 시약 용액을 제조하였다. 상기 10% 시약 용액을 신속히 스톡 IL-7 용액(인산나트륨 완충액 중 0.5 mg/ml, pH7.5)의 분취액에 첨가하고 나서 잘 혼합하였다. 반응 용액을 처음에는 실온에서 2 시간 동안 Slow Speed Lab Rotator(RotoMix) 상에 놓아두었고, 이후에는 4℃에서 밤새 놓아두었다. 여기에 1 M 아세트산을 첨가하여 pH를 5로 낮추어 반응을 억제하였다. 접합체 용액을 대상으로 SDS-PAGE 및 HPLC 둘 다에 의해 특성규명을 실시하였다.

[0341] PEG 구조 중 해리 가능한 결합으로 말미암아 PEG는 생리학적 조건 하에 PEG-IL-7 접합체로부터 해리될 수 있었다.

[0342] 이와 동일한 접근법이 적용되었을 때, 다른 중량 평균 분자량을 가지는 CAC-PEG2-FMOC-NHS가 사용되어 다른 접합체들이 제조될 수 있었다.

[0343] <u>실시예 8</u>

[0344] **9-하이드록시메틸-[4-카복사미도 mPEG(20,000)-7-아미도글루타르 아미드 mPEG(20,000)]플루오렌-N-하이드록시숙신이미드 유도체(40 kDa)가 사용된 IL-7의 PEG화**



분지형 mPEG-FMOC-N-하이드록시숙신이미드 유도체(40kDa)
("CG-PEG2-FMOC-NHS")

[0345]

[0346] 아르곤 하에 -20℃에 보관하여 두었던 CC-PEG2-FMOC-NHS(40 kDa)를 상온까지 승온시켰다. (스톡 IL-7 용액의 측량된 분취액 중 IL-7의 양에 비하여) 10 배 내지 50 배 과량인, 승온된 CG-PEG2-FMOC-NHS를 2 mM HCl 중에 용해하여 10% 시약 용액을 제조하였다. 상기 10% 시약 용액을 신속히 스톡 IL-7 용액(인산나트륨 완충액 중 0.5 mg/ml, pH7.5)의 분취액에 첨가하고 나서 잘 혼합하였다. 반응 용액을 처음에는 실온에서 2 시간 동안 Slow Speed Lab Rotator(RotoMix) 상에 놓아두었고, 이후에는 4℃에서 밤새 놓아두었다. 여기에 1 M 아세트산을 첨가하여 pH를 5로 낮추어 반응을 억제하였다. 접합체 용액을 대상으로 SDS-PAGE 및 HPLC 둘 다에 의해 특성규명을 실시하였다.

[0347] PEG 구조 중 분해 가능한 결합으로 말미암아 PEG는 생리학적 조건 하에서 PEG-IL-7 접합체로부터 해리될 수 있었다.

[0348] 이와 동일한 접근법이 적용되었을 때, 다른 중량 평균 분자량을 가지는 CG-PEG2-FMOC-NHS가 사용되어 다른 접합체들이 제조될 수 있었다.

서열 번호 1

```
        10          20          30          40          50          60
MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA

        70          80          90         100         110         120
ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL

       130         140         150
KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH
```

[0349]

서열 번호 2

```
        10          20          30          40          50          60
DCDIEGKDGK QYESVLMVSI DQLLDSMKEI GSNCLNNEFN FFKRHICDAN KEGMFLFRAA

        70          80          90         100         110         120
RKLRQFLKMN STGDFDLHLL KVSEGTTILL NCTGQVKGRK PAALGEAQPT KSLEENKSLK

       130         140         150
EQKKLNDLCF LKRLLQEIKT CWNKILMGTK EH
```

[0350]

서열 번호 3

```
        10          20          30          40          50          60
DCDIEGKDGK QYESVLMVSI DQLLDSMKEI GSNCLNNEFN FFKRHICDAN KEGMFLFRAA

        70          80          90         100         110         120
RKLRQFLKMN STGDFDLHLL KVSEGTTILL NCTGQEENKS LKEQKKLNDL CFLKRLLQEI

       130
KTCWNKILMG TKEH
```

[0351]

서열 번호 4

```
        10          20          30          40          50          60
DCDIEGKDGK QYESVLMVSI DQLLDSMKEI GSNCLNNEFN FFKRHICDAN KEGMFLFRAA

        70          80          90         100         110         120
RKLRQFLKMN STGDFDLHLL KVSEGTTILL KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT


KEH
```

[0352]

서열 번호 5

```
        10          20          30          40          50          60
DCDIEGKDGK QYESVLMVSI DQLLDSMKEI GSNCLNNEFN FFKRHICDAN KVKGRKPAAL

        70          80          90         100
GEAQPTKSLE ENESLKEQKK LNDLCFLKRL LQEIKTCWNK ILMGTKEH
```

[0353]

서열 번호 6

```
        10          20          30          40          50          60
DCDIEGKDGK QYESVLMVSI DQLLDSMKEI GSNCLNNEFN FFKRHICDAN KEENESLKEQ

        70          80          90
KKLNDLCFLK RLLQEIKTCW NKILMGTKEH
```

[0354]

서열 번호 7

```
         10          20          30          40          50          60
DCDIEGKDGK QYESVLMVSI DQLLVKGRKP AALGEAQPTK SLEENESLKE QKKLNDLCFL

         70          80          90         100         110         120
KRLLQEIKTC WNKILMGTKE H
```

[0355]

서열 번호 8

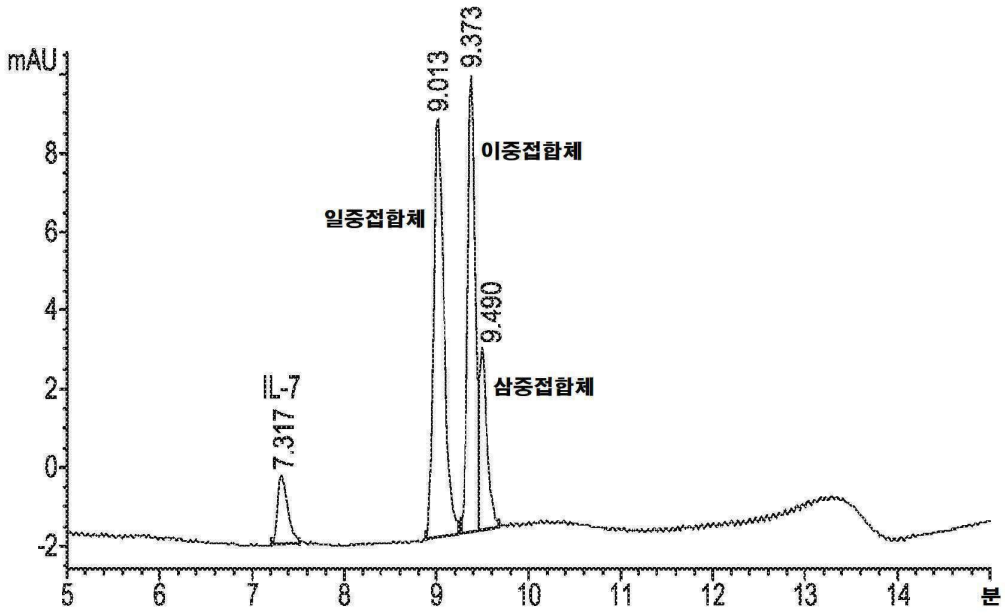
```
         10          20          30          40          50          60
DCDIEGKDGK QYESVLMVSI DQLLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT

KEH
```

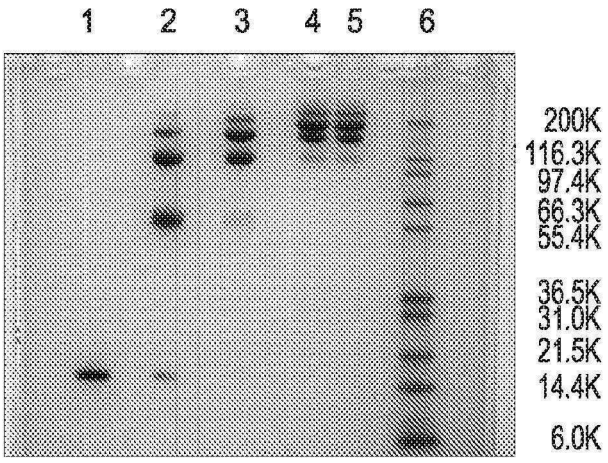
[0356]

도면

도면1

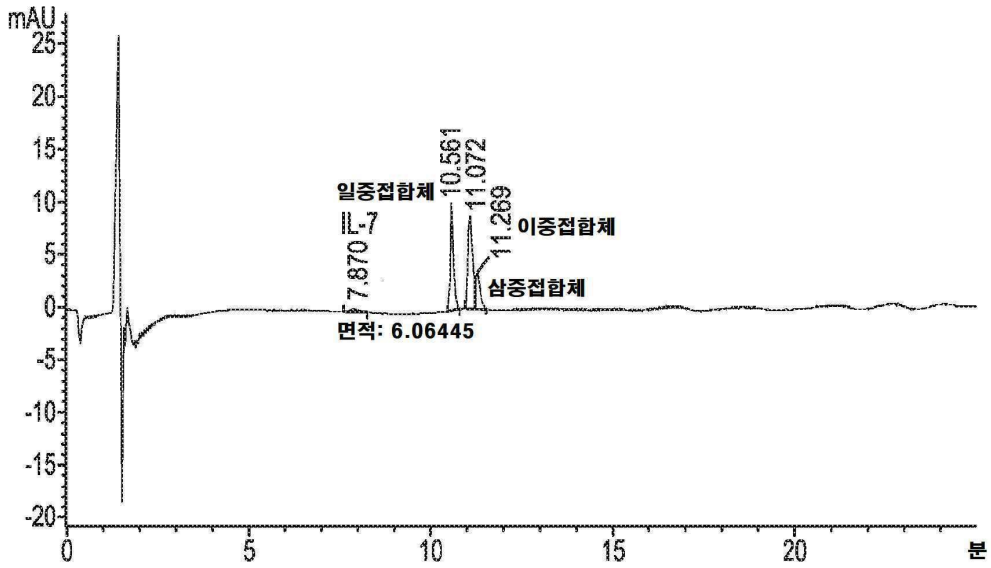


도면2

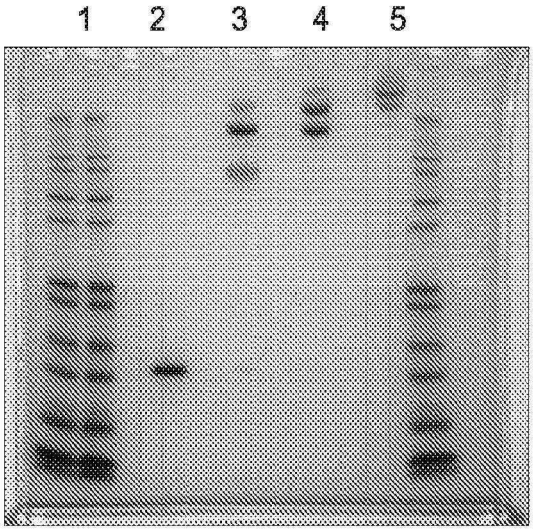


1: **원산** IL-7; 2: mPEG2-20K-IL-7,10X
3: mPEG2-20K-IL-7,20X
4 & 5: mPEG2-20K-IL-7,50X
6: **마크 12 분자량 표준**

도면3

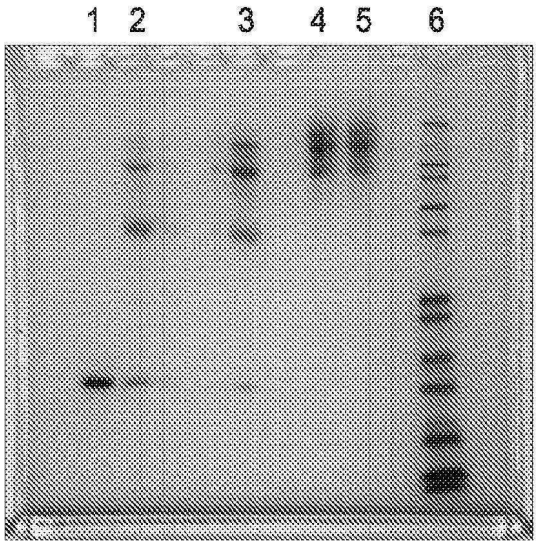


도면4



1: **마크 12 분자량 표준**
2: **원산** IL-7; 3: mPEG2-40K-IL-7,10X
4: mPEG2-40K-IL-7,20X
5: mPEG2-40K-IL-7,50X

도면5



1: **원산** IL-7; 2: C2-20K-IL-7,10X
3: C2-20K-IL-7,20X
4 &5: C2-20K-IL-7,50X
6: **마크 12 분자량 표준**

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> NEKTAR THERAPEUTICS

<120> CONJUGATES OF AN IL-7 MOIETY AND A POLYMER

<130> SHE0517.PCT

<140> PCT/US2016/022146

<141> 2016-03-11

<150> 62/131,634

<151> 2015-03-11

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 1

Met Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val
1 5 10 15

Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly
20 25 30

Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
35 40 45

Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
50 55 60

Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
65 70 75 80

Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
85 90 95

Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
100 105 110

Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp
115 120 125

Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn

130 135 140

Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 2

<211> 152

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 2

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15
Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30
Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp

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

100 105 110
Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu
115 120 125
Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys
130 135 140
Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 3

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 3

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp
35 40 45

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg
50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu
65 70 75 80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln Glu
85 90 95

Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe
100 105 110

Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu
115 120 125

Met Gly Thr Lys Glu His
130

<210> 4

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<400> 4

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser

20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp

35 40 45

Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg

50 55 60

Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu

65 70 75 80

Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu

85 90 95

Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys

100 105 110

Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His

115 120

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu

1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser

20 25 30

Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp

35 40 45

Ala Asn Lys Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln

50 55 60

Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Glu Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys

65 70 75 80

Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr

85 90 95

Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
100 105

<210> 6

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 6

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15
Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser
20 25 30

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

<210> 7

<211> 81

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 7

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu
1 5 10 15
Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala

20 25 30

Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys Ser Leu Glu Glu Asn Glu Ser Leu

35 40 45

Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu

50 55 60

Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu

65 70 75 80

His

<210> 8

<211> 63

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 8

Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu

1 5 10 15

Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu

20 25 30

Gln Lys Lys Leu Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu

35 40 45

Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His

50 55 60