



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년12월11일

(11) 등록번호 10-2740971

(24) 등록일자 2024년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/55 (2006.01) A61K 38/20 (2006.01)

A61K 47/54 (2017.01) A61K 47/60 (2017.01)

A61K 47/61 (2017.01) A61P 37/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/55 (2013.01)

A61K 38/20 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7018206

(22) 출원일자(국제) 2018년12월27일

심사청구일자 2021년12월27일

(85) 번역문제출일자 2020년06월24일

(65) 공개번호 10-2020-0103681

(43) 공개일자 2020년09월02일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2018/048361

(87) 국제공개번호 WO 2019/131964

국제공개일자 2019년07월04일

(30) 우선권주장

JP-P-2017-252224 2017년12월27일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문헌

JP2014506116 A*

WO2005007121 A2*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

교와 기린 가부시킴가이샤

일본국 도쿄도 치요다쿠 오테마치 1초메 9방 2고

(72) 발명자

이케다, 마사히로

일본 1000004 도쿄도 치요다쿠 오테마치 1초메 9방 2고 교와 기린 가부시킴가이샤 혼샤 내

야마구치, 신페이

일본 1000004 도쿄도 치요다쿠 오테마치 1초메 9방 2고 교와 기린 가부시킴가이샤 혼샤 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

장수길, 이석재

전체 청구항 수 : 총 15 항

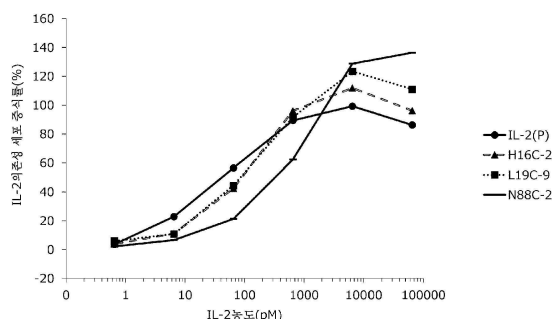
심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 IL-2 개변체

(57) 요약

본 발명은 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 선택성이 향상되고, 또한 Treg를 선택적으로 활성화하는 신규 IL-2 개변체를 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명은 IL-2 개변체, 해당 IL-2 개변체의 제조 방법, 해당 IL-2 개변체를 포함하는 조성물 및 면역 질환의 치료제, IL-2의 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 선택성을 증가시키는 방법, IL-2R α 서브유닛에 대한 IL-2의 친화성을 향상시키는 방법, IL-2R β 및 γ 서브유닛의 적어도 어느 하나에 대한 IL-2의 친화성을 저하시키는 방법, 그리고 제어성 T 세포를 선택적으로 활성화시키는 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 47/54 (2017.08)

A61K 47/60 (2017.08)

A61K 47/61 (2017.08)

A61P 37/04 (2018.01)

(72) 발명자

무라카미, 마스미

일본 1000004 도쿄토 치요다쿠 오테마치 1쵸메 9방
2고 료와 기린 가부시키키가이샤 혼샤 내

오노데라, 히데유키

일본 1000004 도쿄토 치요다쿠 오테마치 1쵸메 9방
2고 료와 기린 가부시키키가이샤 혼샤 내

명세서

청구범위

청구항 1

서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1의 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열을 포함하는 인터류킨(Interleukin)-2(이하, IL-2라고 약기한다) 개변체이며,

상기 아미노산 서열에 있어서의 적어도 129번째의 아미노산 잔기가, 티올기(-SH)를 갖는 비천연 아미노산 잔기 유래의 기에 PEG가 결합된 기, 또는 아지드기를 갖는 비천연 아미노산 잔기 유래의 기에 PEG가 결합된 기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.

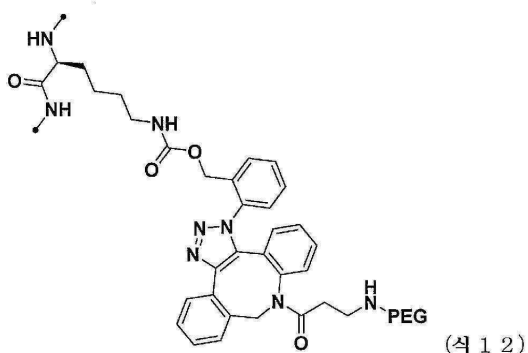
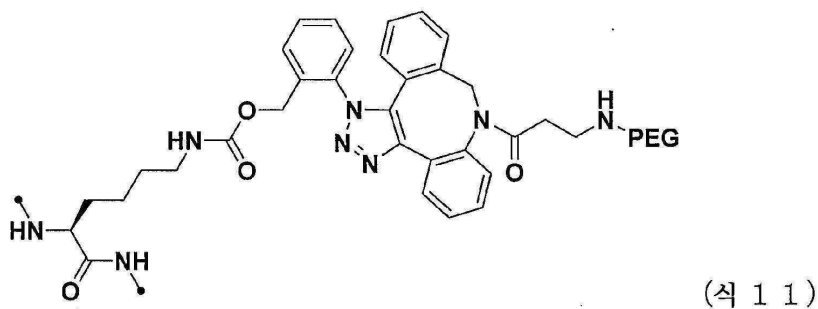
청구항 2

제1항에 있어서, 상기 티올기(-SH)를 갖는 비천연 아미노산 잔기 유래의 기에 PEG가 결합된 기는 시스테인 잔기 유래의 비천연 아미노산 잔기 유래의 기에 PEG가 결합된 기이며,

상기 아지드기를 갖는 비천연 아미노산 잔기 유래의 기에 PEG가 결합된 기는 N^6 -[{(o-아지도벤질)옥시}카르보닐]-L-리신(o-Az-Z-Lys) 잔기 유래의 기에 PEG가 결합된 기, 또는 N^6 -[{(m-아지도벤질)옥시}카르보닐]-L-리신(m-Az-Z-Lys) 잔기 유래의 기에 PEG가 결합된 기인, IL-2 개변체.

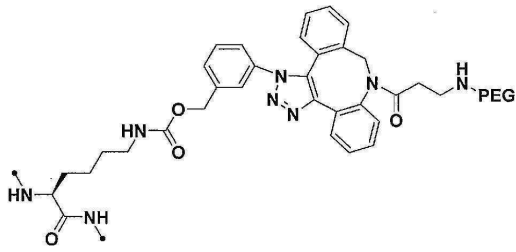
청구항 3

제2항에 있어서, 상기 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기에 PEG가 결합된 기가, 하기 (식 11) 및/또는 (식 12)로 표시되는 구조를 갖는, IL-2 개변체.

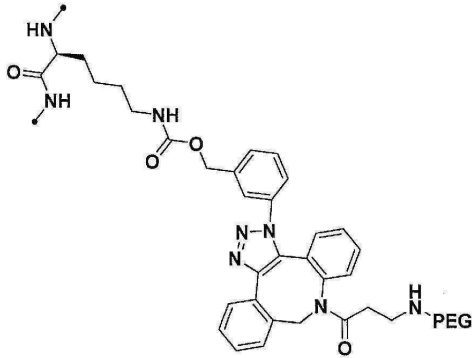


청구항 4

제2항에 있어서, 상기 m-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기에 PEG가 결합된 기가, 하기 (식 X4) 및/또는 (식 X5)로 표시되는 구조를 갖는, IL-2 개변체.



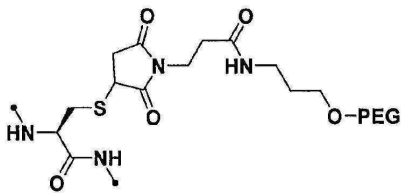
(식 X 4)



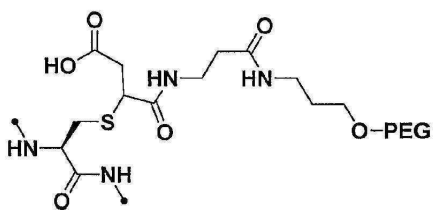
(식 X 5)

청구항 5

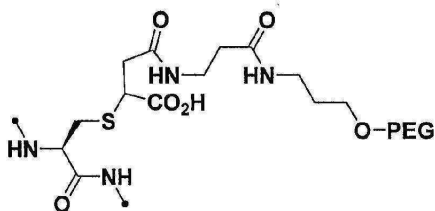
제2항에 있어서, 상기 시스테인 잔기 유래의 비천연 아미노산 잔기 유래의 기에 PEG가 결합된 기가, 하기 (식 X11) 및/또는 (식 X12) 및/또는 (식 X13)으로 표시되는 구조를 갖는, IL-2 개변체.



(식 X 1 1)



(식 X 1 2)



(식 X 1 3)

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, PEG가 직쇄상인, IL-2 개변체.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, PEG가 분지상인, IL-2 개변체.

청구항 8

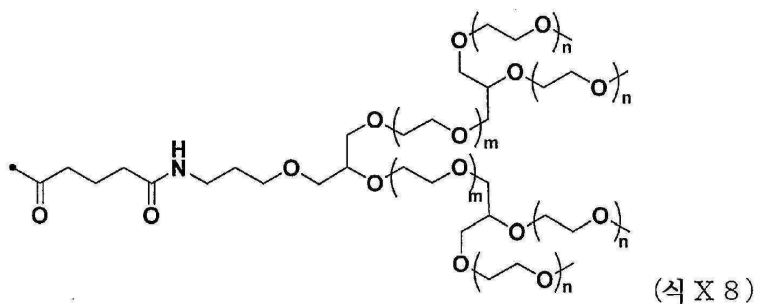
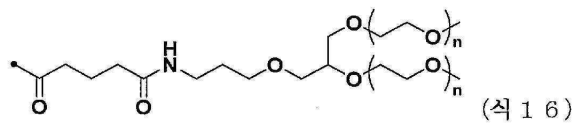
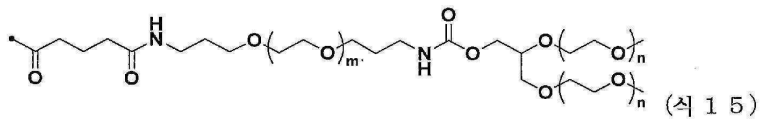
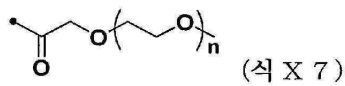
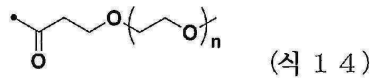
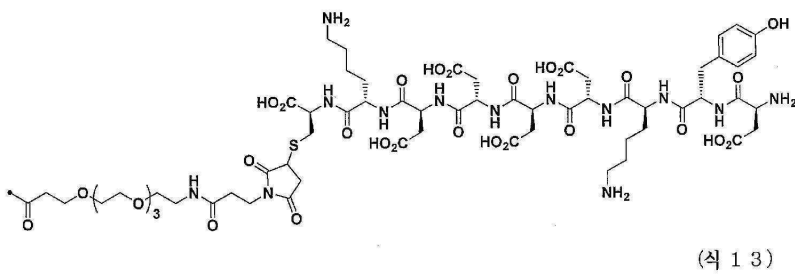
제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, PEG가, 평균 분자량 10kDa 이상의 PEG인, IL-2 개변체.

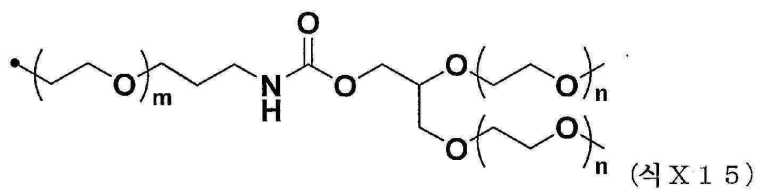
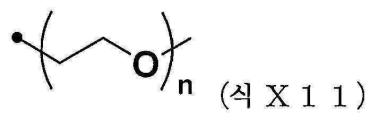
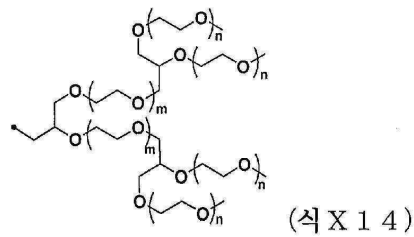
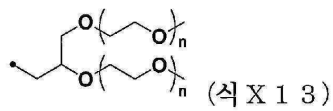
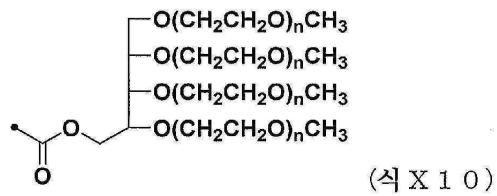
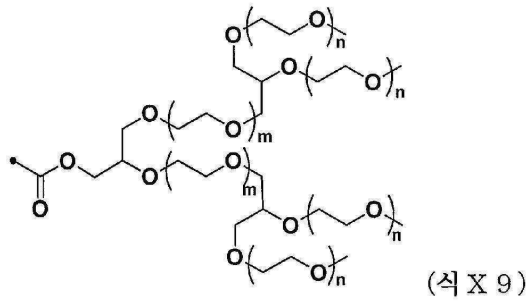
청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, PEG가, 평균 분자량 10kDa, 20kDa, 30kDa, 40kDa, 50kDa, 60kDa, 70kDa 또는 80kDa의 PEG인, IL-2 개변체.

청구항 10

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, PEG가, 하기 (식 13), (식 14), (식 15), (식 16), (식 X7), (식 X8), (식 X9), (식 X10), (식 X11), (식 X13), (식 X14) 또는 (식 X15) 중 적어도 하나의 식으로 표시되는 구조를 갖는, IL-2 개변체.





청구항 11

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, IL-2의 N 말단에 추가로 메티오닌 잔기가 결합하고 있는, IL-2 개변체.

청구항 12

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, IL-2의 N 말단의 알라닌이 결손되어 있는, IL-2 개변체.

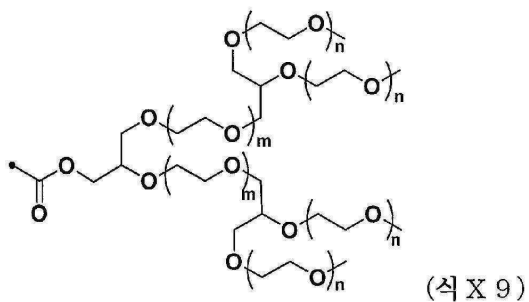
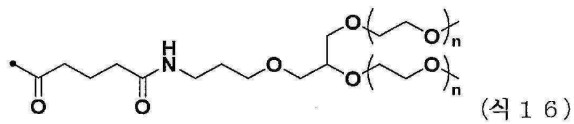
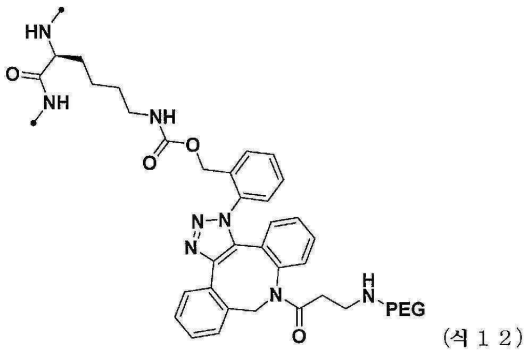
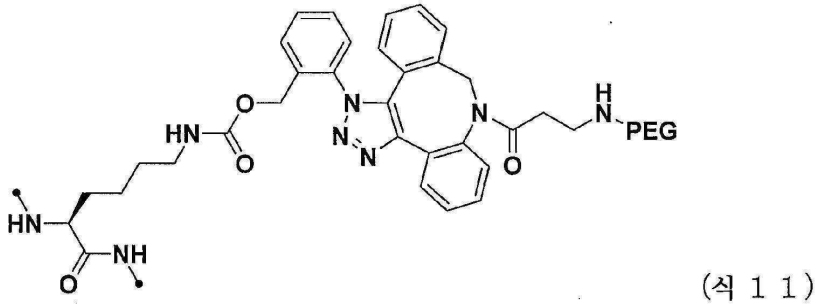
청구항 13

서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체이며,

상기 아미노산 서열에 있어서의 129번째의 아미노산 잔기가, 하기 (식 11) 또는 (식 12)로 표시되는 구조의 기로 치환되고,

상기 (식 11) 또는 (식 12)로 표시되는 구조에서 PEG는 80kDa의 평균 분자량을 갖고, 또한 하기 (식 16) 또는 (식 X9)로 표시되는 구조를 포함하며,

상기 IL-2의 N 말단의 알라닌은 결손되어 있는, IL-2 개변체.



청구항 14

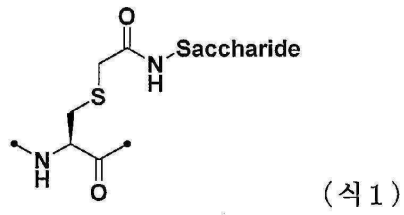
서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체이며,

상기 아미노산 서열에 있어서의 12 및 91번째의 아미노산 잔기는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되고, 또한 3번째의 아미노산 잔기는 PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있으며,

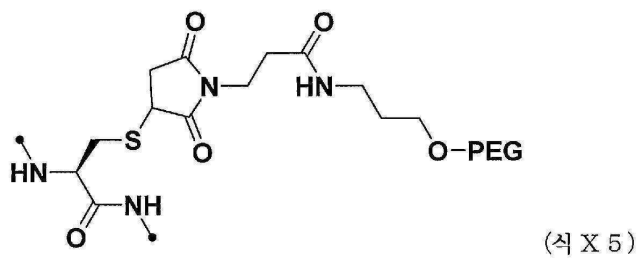
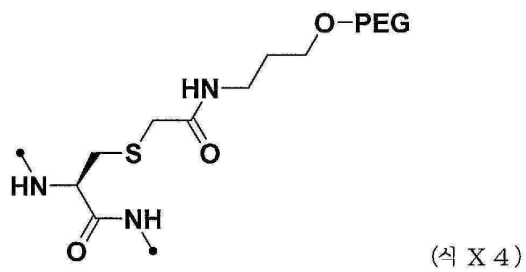
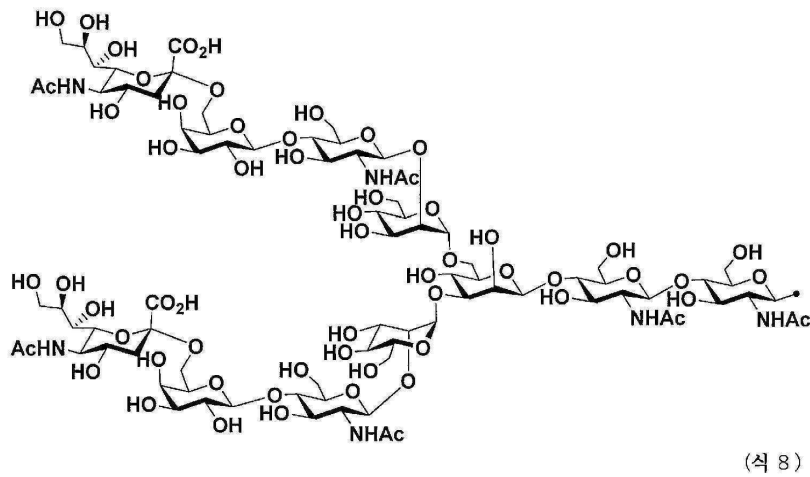
상기 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기는 하기 (식 1)로 표시되는 구조를 갖고,

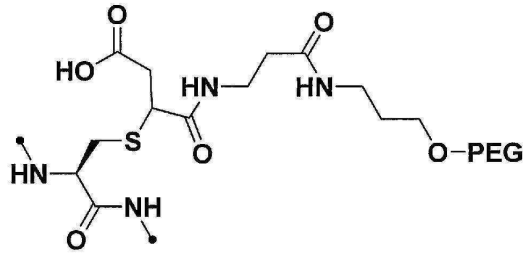
상기 당쇄는 하기 (식 8)로 표시되는 구조를 갖고,

상기 PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기는 하기 (식 X4), 또는 (식 X5), (식 X6) 혹은 (식 X7)이며, 상기 PEG는 평균 분자량이 50kDa이고, 또한 하기 (식 X15)로 표시되는, IL-2 개변체.

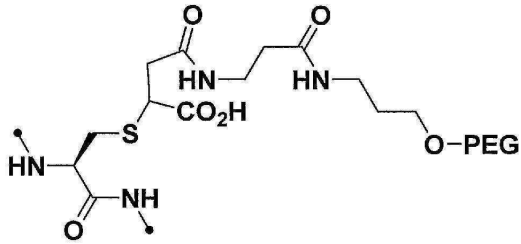


[(식 1) 중, Saccharide는 당쇄를 나타낸다.]

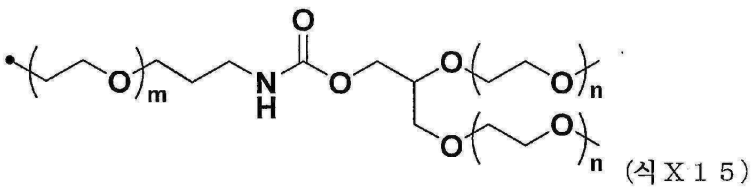




(식 X 6)



(식 X 7)



(식 X 15)

청구항 15

제1항 내지 제5항, 제13항 및 제14항 중 어느 한 항에 기재된 IL-2 개변체를 포함하는, 면역 질환 치료용 의약 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 IL-2 개변체, 해당 IL-2 개변체의 제조 방법, 해당 IL-2 개변체를 포함하는 조성물 및 치료제, IL-2R α 서브유닛에 대한 IL-2의 친화성을 향상시키는 방법, IL-2R β 및 γ 서브유닛의 적어도 어느 하나에 대한 IL-2의 친화성을 저하시키는 방법, 그리고 제어성 T 세포를 선택적으로 활성화시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 제어성 T 세포(Treg)는 전사 인자 Foxp3(forkhead box P3; 포크헤드 박스 P3)을 발현하는 것을 특징으로 하는 CD4 양성 T 세포 서브셋이다. Treg는 IL-10이나 TGF- β 등 억제성 사이토카인의 생성, 퍼포린이나 그랜자임 등 세포 상해성 단백질을 통한 세포 용해, CTLA-4 등을 통한 항원 제시 세포의 기능 조절, IL-2의 이용 경쟁에 의한 고갈 등 다양한 메커니즘에 의해 이펙터 T 세포(Teff)의 활성화를 저해하고, 과잉의 면역 반응을 오히려 억제하고 있다(비특허문헌 1).

[0003] Foxp3의 변이에 의한 Treg의 결손은 위독한 전신성의 자기 면역 반응을 나타내는 IPEX(immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked; 면역 조절이상, 다발성 내분비병증, 장병증, X-연관) 증후군을 발병한다. 또한, 복수의 자기 면역 질환에 있어서 Treg의 양이나 질이 저하되어 있는 점에서, Treg를 통한 면역 제어의 과잉이 병태 발병에 기여하고 있는 것으로 생각된다(비특허문헌 2, 비특허문헌 3).

[0004] IL-2(인터류킨(Interleukin)-2)는 주로 활성화 T 세포로부터 생성되는 사이토카인이며, 여러가지 면역 세포의 증식 및 활성화에 기여한다. 인간에게 있어서의 성숙체의 분자량은 약 15kDa(133 잔기)이며, 4개의 α -헬릭스로 구성되는 4-헬릭스 다발(4-four-helix bundle) 구조를 갖고 있다(비특허문헌 4).

[0005] IL-2 수용체(IL-2R)는 CD25(IL-2R α), CD122(IL-2R β), CD132(γ_c)의 3개의 분자로 구성되어 있고, IL-2에 대하여 증진화성($K_D \approx 10^{-9}$ M)을 나타내는 이종이량체형 수용체(IL-2R $\beta\gamma$)나, 고친화성($K_D \approx 10^{-11}$ M)을 나타내는 이종삼량체형 수용체(IL-2R $\alpha\beta\gamma$)가 형성된 경우에 시그널을 전달한다. CD25는 그 단체로도 IL-2와 저친화성($K_D \approx 10^{-8}$ M)으로 결합하지만, 시그널을 전달할 수는 없다(비특허문헌 5).

[0006] IL-2R의 발현 패턴은 면역 세포마다 다르다. CD56^{low} NK 세포나 나이브 T 세포에서는 CD25의 발현은 매우 낮고, IL-2R은 IL-2R $\beta\gamma$ 로서 기능하고 있다. 한편, Treg나 CD56^{high} NK 세포에서는 CD25가 발현하고 있고, IL-2R은 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 로서 기능한다(비특허문헌 6).

[0007] IL-2와 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 의 결합에서는, IL-2는 처음에 CD25에 결합한 후에, CD122, CD132와 순차 결합해 감으로써 IL-2R의 삼량체화를 일으킨다. IL-2에 의한 CD122와 CD132의 이량체화는 CD122 세포 내 영역으로의 JAK1의 리크루트 및 CD132 세포 내 영역으로의 JAK3의 리크루트를 촉진시키고, 이어서 STAT5의 인산화를 일으킨다. 인산화 STAT5(pSTAT5)는 이량체를 형성한 후에 핵 내로 이행하고, 표적 유전자의 전사를 재촉한다(비특허문헌 7, 비특허문헌 8).

[0008] IL-2 시그널은 Treg의 항상성 유지에 있어서 중요한 역할을 담당하고 있다. IL-2 자극에 의해 발생하는 pSTAT5는 직접적으로 Foxp3의 발현을 재촉함으로써 Treg의 증식 촉진, 안정화 및 Teff의 활성화 억제 기능을 향상시킨다. Treg는 고친화성 수용체인 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 를 발현하고 있는 데다가, IL-2 시그널을 양으로 제어하는 단백질 포스파타아제 1(Protein phosphatase 1(PP 1)) 및 PP 2A 활성이 높기 때문에, IL-2 자극에 의한 Treg의 STAT5의

인산화나 그의 하류의 유전자 발현은, 기억 T 세포의 그것보다도 10 내지 100배 정도 낮은 농도 영역에서 야기된다(비특허문헌 6, 비특허문헌 9).

- [0009] IL-2 유전자나 IL-2R 유전자를 결손한 마우스에서는, Treg의 감소와 위독한 자기 면역 반응을 나타낸다. 인간에게 있어서도 마찬가지로, CD25 유전자의 결손은 자기 반응성 T 세포의 증식이나 IPEX 증후군과 유사한 증상을 나타낸다. SLE(systemic lupus erythematosus; 전신 홍반성 루푸스) 환자나 I형 당뇨병 환자에서는, T 세포에 의한 IL-2 산생능의 저하와, 그에 수반한 Treg의 감소가 보인다(비특허문헌 10, 비특허문헌 11, 비특허문헌 12).
- [0010] IL-2 시그널의 활성화는 Treg 기능을 증강한다. SLE 유사 증상을 나타내는 MRL/lpr 마우스로의 IL-2의 투여는, 염증 반응을 억제하여 병태를 개선한다. 또한, GVHD(graft-versus-host disease; 이식편 대 숙주병) 환자나 SLE 환자로의 IL-2의 투여는 Treg의 증폭을 재촉하고, 병태를 개선한다(비특허문헌 13, 비특허문헌 14, 비특허문헌 15).
- [0011] 그러나, 야생형 IL-2의 투여는 종종 NK 세포나 호산구의 증가를 야기하고, 투여 부위 반응이나 발열 및 인플루엔자 유사 증상 등을 야기한다. 또한, IL-2의 혈중 반감기는 약 1시간으로 매우 짧은 점에서, 저용량 IL-2 요법에서는, IL-2를 연일 투여할 필요가 있다(비특허문헌 14, 비특허문헌 15, 비특허문헌 16).
- [0012] 상기 과제의 해결을 위해서, Treg를 선택적으로 활성화하고, 또한 혈중 반감기가 연장된 IL-2 개변체의 창제가 시도되고 있다.
- [0013] IL-2의 IL-2R $_{\alpha\beta\gamma}$ 선택성을 향상시키는 시도가 행하여지고 있다. 한 수법으로는, IL-2R $_{\beta\gamma}$ 와 상호 작용하는 아미노산 잔기에 변이를 도입하거나, 항IL-2 항체와 면역 복합체를 형성시키거나 하는 방법이 시도되고 있다(특허문헌 1, 특허문헌 2, 특허문헌 3, 특허문헌 4, 특허문헌 5, 특허문헌 6, 비특허문헌 17).
- [0014] 그러나, 아미노산 변이의 도입은 변이에 기인한 면역원성 증가가 발생한다. 아미노산 변이를 실시한 인간 IL-2 개변체의 게잡이 원숭이에게의 투여는, 항약물 항체가 산생되어 있다. 항IL-2 항체에 의한 IL-2로의 IL-2R $_{\alpha\beta\gamma}$ 선택성의 부여는, 벨 모양과 같은 활성이 된다(특허문헌 2, 특허문헌 6).
- [0015] IL-2의 혈중 반감기를 향상시키는 시도가 행하여지고 있다. 한 수법에서는, 항체 유래 Fc 서열을 부가하는 방법이 시도되고 있다(특허문헌 2, 특허문헌 4, 특허문헌 7, 비특허문헌 18). 다른 방법에서는, 폴리에틸렌글리콜(PEG) 등의 비독성 수용성 폴리머를 부가하는 방법이 알려져 있다(특허문헌 8, 특허문헌 9, 특허문헌 10, 특허문헌 11, 비특허문헌 19, 비특허문헌 20). 또한, 당쇄를 도입하는 방법도 시도되고 있다(특허문헌 12, 특허문헌 13, 특허문헌 14).
- [0016] 그러나, IL-2의 폴리에틸렌글리콜에 의한 수식은, 생물 활성의 저하가 발생한다(비특허문헌 19).

선행기술문헌

특허문헌

- [0017] (특허문헌 0001) 국제 공개 제2010/085495호
(특허문헌 0002) 국제 공개 제2014/153111호
(특허문헌 0003) 미국 특허 출원 공개 제2015/0374788호 명세서
(특허문헌 0004) 미국 특허 제7186804호 명세서
(특허문헌 0005) 국제 공개 제2014/028748호
(특허문헌 0006) 국제 공개 제2015/109212호
(특허문헌 0007) 미국 특허 출원 공개 제2017/0051029호 명세서
(특허문헌 0008) 국제 공개 제2016/025385호
(특허문헌 0009) 일본 특허 공개 제2016-202187호 공보
(특허문헌 0010) 미국 특허 제4902502호 명세서

(특허문헌 0011) 미국 특허 제5206344호 명세서
 (특허문헌 0012) 미국 특허 제5153310호 명세서
 (특허문헌 0013) 미국 특허 제5312903호 명세서
 (특허문헌 0014) 미국 특허 제5417970호 명세서

비특허문헌

[0018]

(비특허문헌 0001) Front Immunol, 2013. 4(378)
 (비특허문헌 0002) Nat Rev Immunol, 2014. 14(5): 343-349
 (비특허문헌 0003) Autoimmun Rev, 2015. 14(2): 105-116
 (비특허문헌 0004) Annu Rev Immunol, 2008. 26: 453-479
 (비특허문헌 0005) Immunity, 2013. 38(1): 13-25
 (비특허문헌 0006) Diabetes, 2015. 64(6): 2172-2183
 (비특허문헌 0007) J Biol Chem, 1997. 272(50): 31821-31828
 (비특허문헌 0008) Nat Rev Immunol. 2012 Feb 17; 12(3): 180-90
 (비특허문헌 0009) Nat Rev Immunol. 2015 May; 15(5): 283-94
 (비특허문헌 0010) Proc Natl Acad Sci USA, 1997. 94(7): 3168-3171
 (비특허문헌 0011) N Engl J Med, 2011. 365(22): 2110-2121
 (비특허문헌 0012) Curr Diab Rep, 2014. 14(12): 553
 (비특허문헌 0013) J Immunol, 2014. 193(5): 2168-2177
 (비특허문헌 0014) N Engl J Med, 2011. 365(22): 2055-2066
 (비특허문헌 0015) Ann Rheum Dis, 2015. 74(4): 791-792
 (비특허문헌 0016) Blood. 2014 Dec 4; 124(24): 3572-6.
 (비특허문헌 0017) Curr Pharm Des, 2002. 8(24): 2171-83
 (비특허문헌 0018) J Autoimmun, 2015. 56: 66-80
 (비특허문헌 0019) American College of Rheumatology Annual Meeting, San Diego, CA, 2017. Poster Abstract 2715: NKTR-358: A Selective, First-in-Class IL-2 Pathway Agonist Which Increases Number and Suppressive Function of Regulatory T Cells for the Treatment of Immune Inflammatory Disorders, Langowski, J., et al. http://www.nektar.com/application/files/6315/1001/4171/NKTR-358_2017ACR_ABS2715.pdf
 (비특허문헌 0020) Biotechnology(N Y), 1990. 8(4): 343-346

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019]

본 발명은 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 선택성이 향상되고, 또한 Treg를 선택적으로 활성화하는 신규 IL-2 개변체를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 과제를 예의 검토한 결과, 본 발명자들은, IL-2에 당쇄 또는 PEG를 결합시킴으로써 개변한 IL-2 개변체에 의해 상기 과제를 해결할 수 있음을 알아내고, 본 발명을 완성시켰다.

[0021] 즉, 본 발명은 이하와 같다.

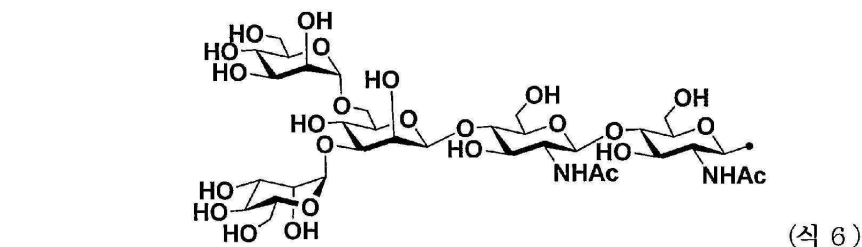
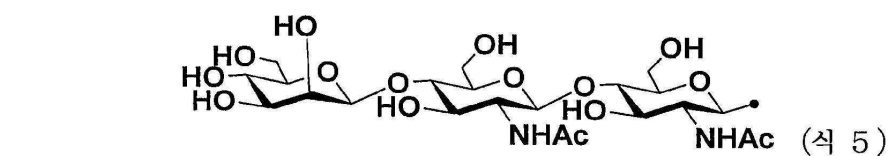
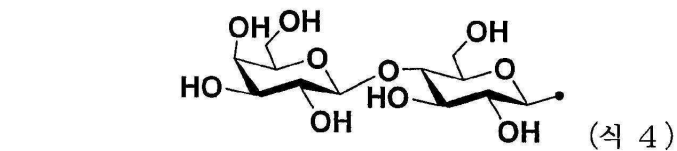
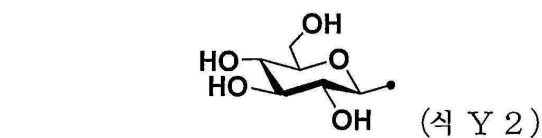
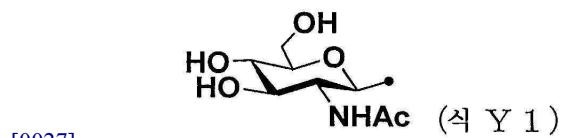
[0022] (1) 인터류킨-2(이하, IL-2라고 약기한다) 개변체.

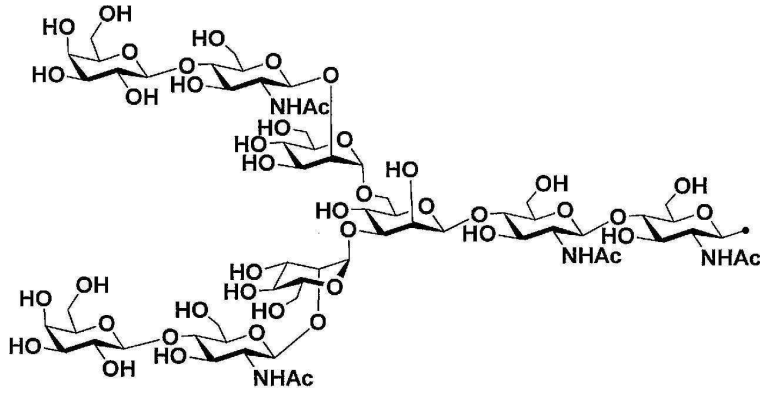
[0023] (2) 당쇄가 결합한 IL-2 개변체 및/또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)이 결합한 IL-2 개변체인, (1)에 기재된 IL-2 개변체.

[0024] (3) IL-2 수용체(이하 IL-2R)_{αβγ}에 대한 선택성이 향상되어 있는, (1) 또는 (2)에 기재된 IL-2 개변체.

[0025] (4) IL-2의 아미노산 서열에 있어서의, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 84, 87, 88, 91, 92, 108, 115, 119, 122, 123 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 당쇄가 결합하고 있는, (2) 또는 (3)에 기재된 IL-2 개변체.

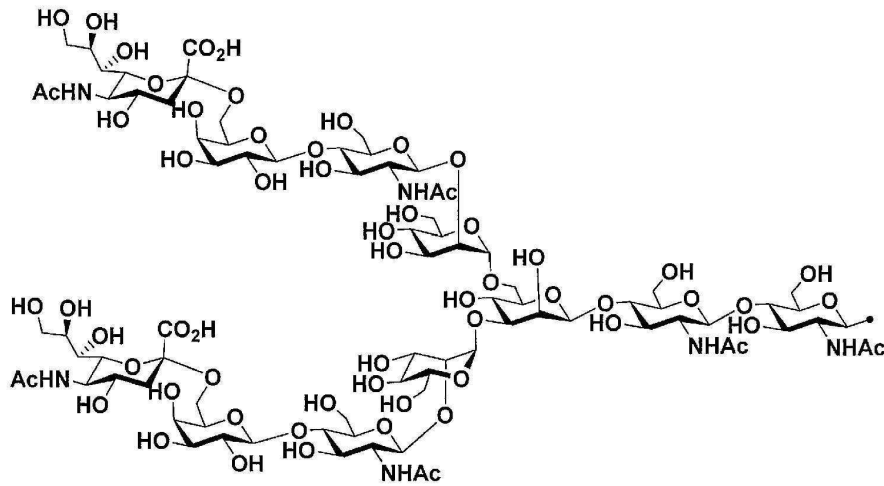
[0026] (5) 당쇄가 하기 (식 4) 내지 (식 8), (식 Y1), (식 Y2) 또는 (식 Y3)으로 표시되는 구조를 갖는 당쇄로부터 선택되는 적어도 하나인, (2) 내지 (4) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.





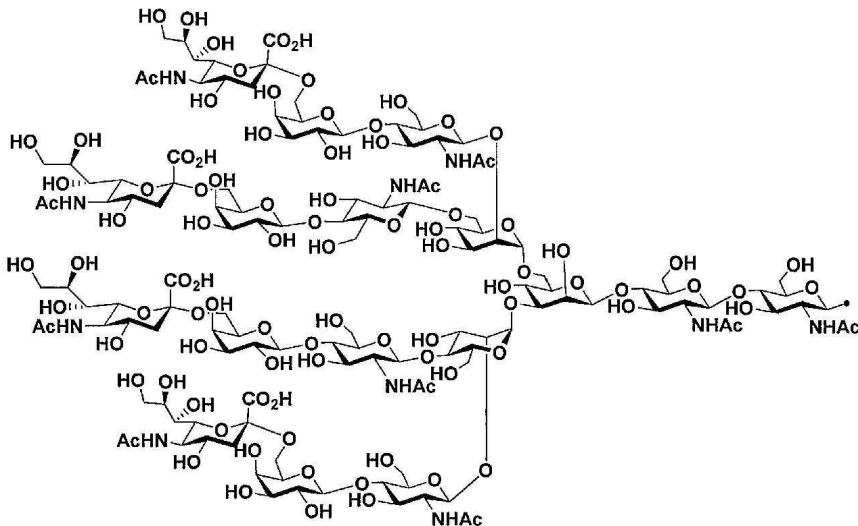
(식 7)

[0032]



(식 8)

[0033]



(식 Y 3)

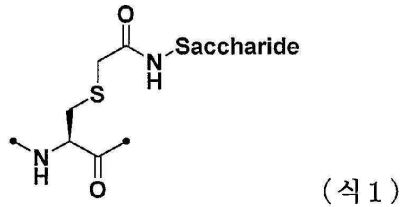
[0034]

[0035]

(6) 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열에 있어서의, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 84, 87, 88, 91, 92, 108, 115, 119, 122, 123 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는, (2) 내지 (5) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

[0036] (7) 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열에 있어서의, 12, 15, 16, 19, 88, 91 및 119번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는, (2) 내지 (6) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

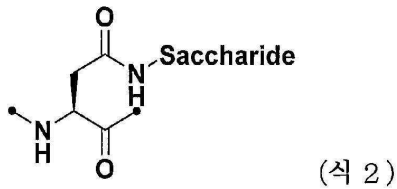
[0037] (8) 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기가, 하기 (식 1)로 표시되는 구조를 갖는, (6) 또는 (7)에 기재된 IL-2 개변체.



[0038]

[0039] [(식 1) 중, Saccharide는 당쇄를 나타낸다.]

[0040] (9) 당쇄가 결합한 아스파라긴 잔기 유래의 기가, 하기 (식 2)로 표시되는 구조를 갖는, (6) 또는 (7)에 기재된 IL-2 개변체.



[0041]

[0042] [(식 2) 중, Saccharide는 당쇄를 나타낸다.]

[0043] (10) 당쇄가 결합한 IL-2 개변체에 추가로 PEG가 결합한 IL-2 개변체인, (2) 내지 (9) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

[0044] (11) 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열에 있어서의, 1, 3, 51 및 78번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는, (2) 내지 (10) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

[0045] (12) IL-2의 아미노산 서열에 있어서의, 4, 5, 6, 7, 8, 60, 78, 79, 99, 100, 101 및 129번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 PEG가 결합하고 있는, (2) 또는 (3)에 기재된 IL-2 개변체.

[0046] (13) 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1의 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열에 있어서의, 4, 5, 6, 7, 8, 60, 78, 79, 99, 100, 101 및 129번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는, (2), (3) 및 (12) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

[0047] (14) 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열에 있어서의, 4, 5, 8, 78 및 129번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, PEG가 결합하고 있는 아미노산 잔기로 치환되어 있는, (2), (3), (12) 및 (13) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

[0048] (15) 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열에 있어서의, 4, 5, 8, 78 및 129번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 2개의 아미노산 잔기가, PEG가 결합하고 있는 아미노산 잔기로 치환되어 있는, (2), (3), (12) 내지 (14) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

[0049] (16) 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열에 있어서의, 4, 5 및 8번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서

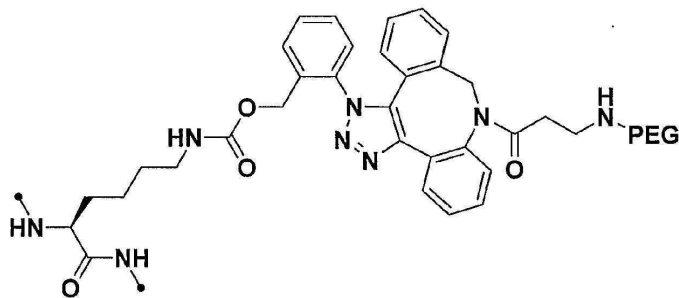
선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기, 그리고, 78번째 또는 129번째의 아미노산 잔기가, PEG가 결합하고 있는 아미노산 잔기로 치환되어 있는, (2), (3), (12) 내지 (15) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

[0050] (17) PEG가 결합한 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 비천연 아미노산 잔기인, (2), (3), (12) 내지 (16) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

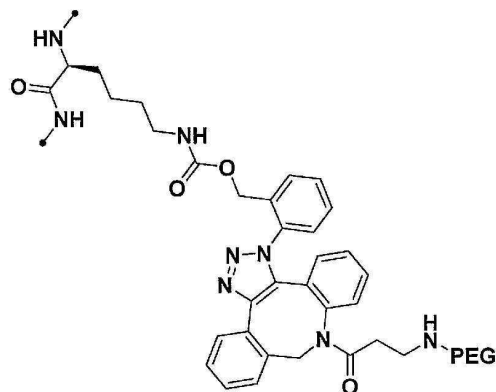
[0051] (18) PEG가 결합한 비천연 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 티올기(-SH)를 갖는 아미노산 잔기 유래의 기, 또는 PEG가 결합한 아지트기를 갖는 아미노산 잔기 유래의 기인, (17)에 기재된 IL-2 개변체.

[0052] (19) PEG가 결합한 비천연 아미노산 잔기가, N^6 -[{(o-아지도벤질)옥시}카르보닐]-L-리신(o-Az-Z-Lys) 잔기 유래의 기, N^6 -[{(m-아지도벤질)옥시}카르보닐]-L-리신(m-Az-Z-Lys) 잔기 유래의 기 또는 시스테인 잔기 유래의 기인, (17) 또는 (18)에 기재된 IL-2 개변체.

[0053] (20) PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기가, 하기 (식 11) 및/또는 (식 12)로 표시되는 구조를 갖는, (19)에 기재된 IL-2 개변체.

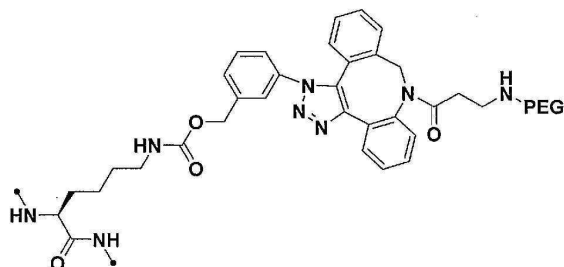


(식 11)

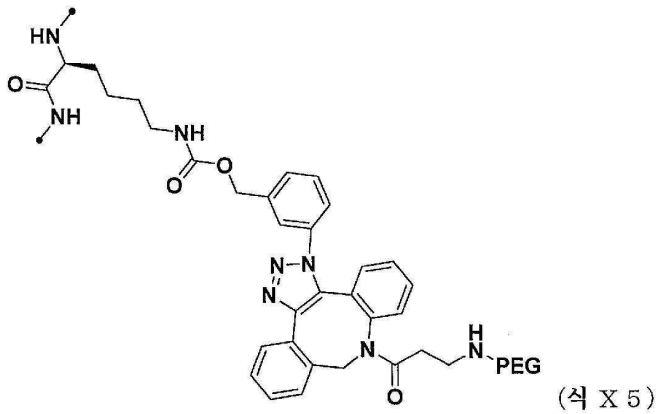


(식 12)

[0056] (21) PEG가 결합한 m-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기가, 하기 (식 X4) 및/또는 (식 X5)로 표시되는 구조를 갖는, (19)에 기재된 IL-2 개변체.



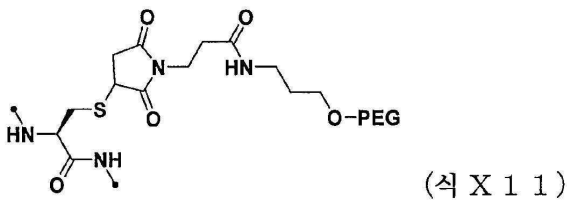
(식 X4)



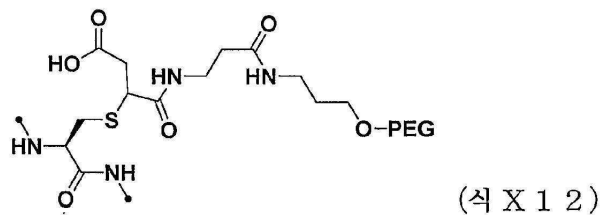
[0058]

[0059]

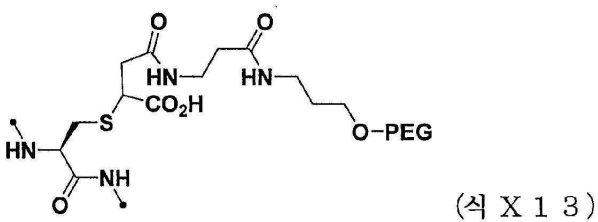
(22) PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기가, 하기 (식 X11) 및/또는 (식 X12) 및/또는 (식 X13)으로 표시되는 구조를 갖는, (19)에 기재된 IL-2 개변체.



[0060]



[0061]



[0062]

[0063]

(23) PEG가 직쇄상인, (2), (10) 내지 (22) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

[0064]

(24) PEG가 분지상인, (2), (10) 내지 (22) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

[0065]

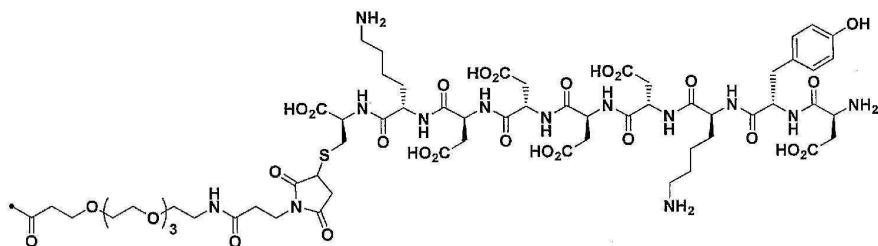
(25) PEG가, 평균 분자량 10kDa 이상의 PEG인, (2), (10) 내지 (24) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

[0066]

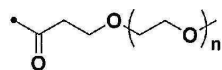
(26) 결합하고 있는 PEG가, 평균 분자량 10kDa, 20kDa, 30kDa, 40kDa, 50kDa, 60kDa, 70kDa 또는 80kDa의 PEG인, (2), (10) 내지 (25) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

[0067]

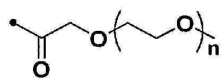
(27) 결합하고 있는 PEG가, 하기 (식 13), (식 14), (식 15), (식 16), (식 X7), (식 X8), (식 X9), (식 X10), (식 X11), (식 X13), (식 X14) 또는 (식 X15)의 적어도 하나의 식으로 표시되는 구조를 갖는, (2), (10) 내지 (26) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.



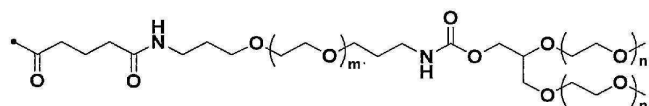
(식 13)



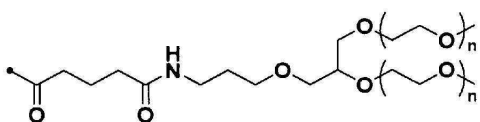
(식 14)



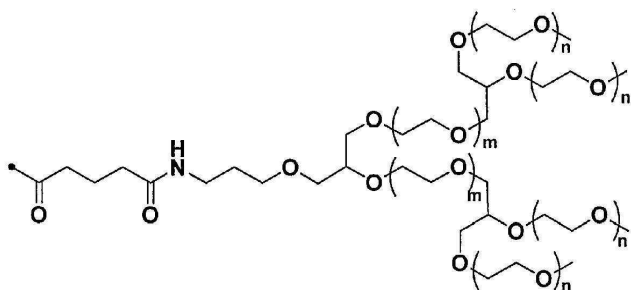
(식 X 7)



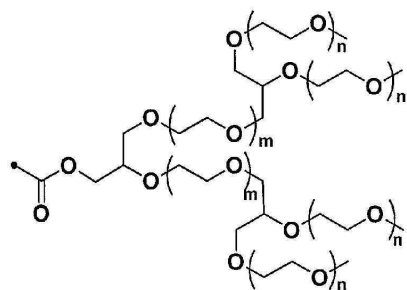
(식 15)



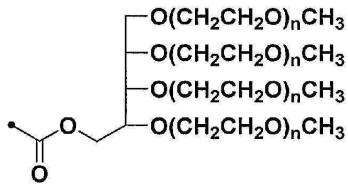
(식 16)



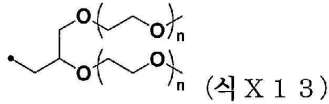
(식 X 8)



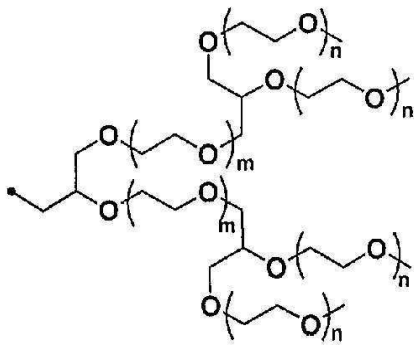
(식 X 9)



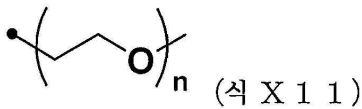
(식 X 1 0)



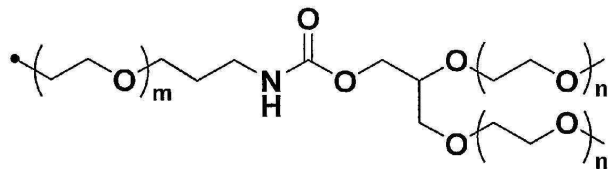
(식 X 1 3)



(식 X 1 4)



(식 X 1 1)



(식 X 1 5)

(28) IL-2의 N 말단에 추가로 메티오닌 잔기가 결합하고 있는, (1) 내지 (27) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

(29) IL-2의 N 말단의 알라닌이 결손되어 있는, (1) 내지 (28) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체.

(30) IL-2의 N 말단의 알라닌이 결손되고, 추가로 메티오닌이 결합하고 있는, (1) 내지 (29)에 기재된 IL-2 개변체.

(31) (1) 내지 (30) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체의 제조 방법.

(32) (1) 내지 (30) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체를 포함하는 조성물.

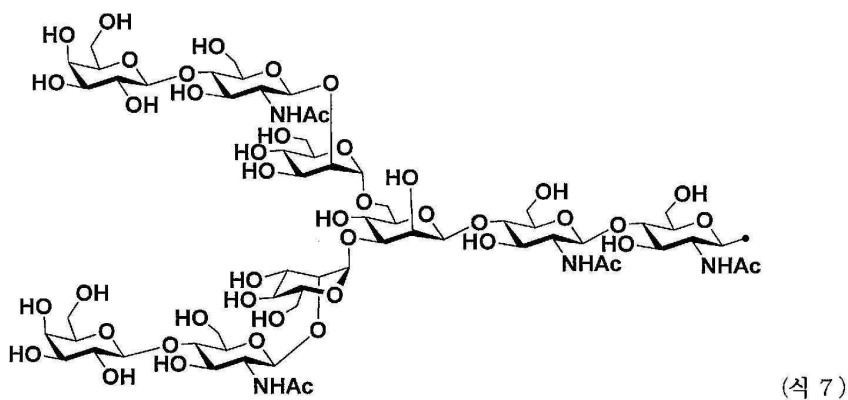
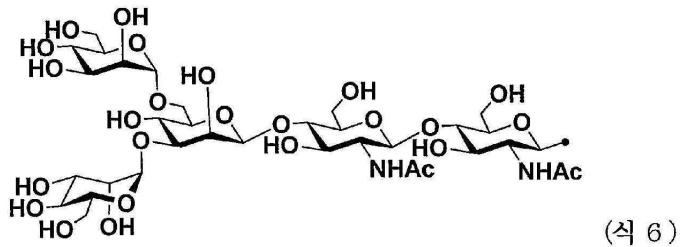
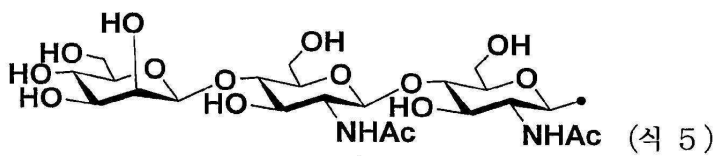
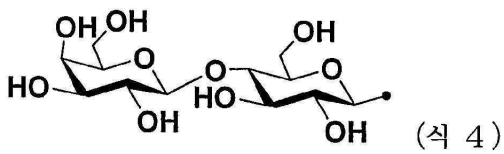
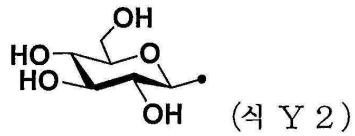
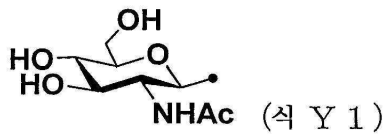
(33) (1) 내지 (30) 중 어느 하나에 기재된 IL-2 개변체를 포함하는, 면역 질환의 치료제.

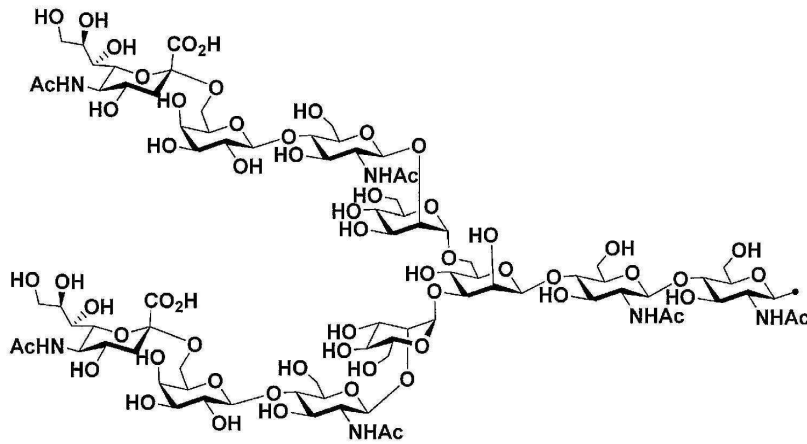
(34) IL-2의 IL-2R $_{\alpha\beta\gamma}$ 에 대한 선택성을 향상시키는 방법.

(35) IL-2에 당쇄 및/또는 PEG를 결합시키는 것을 포함하는, (34)에 기재된 방법.

(36) IL-2의 아미노산 서열에 있어서의, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 84, 87, 88, 91, 92, 108, 115, 119, 122, 123 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에, 당쇄를 결합시키는 것을 포함하는, (35)에 기재된 방법.

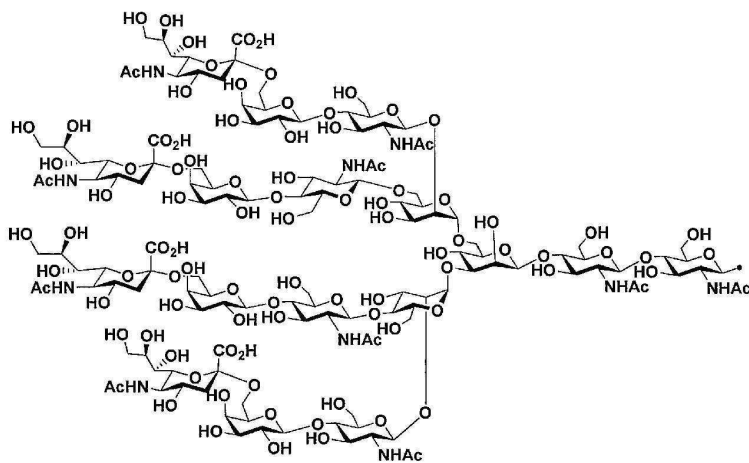
[0089] (37) 당쇄가, 하기 (식 4) 내지 (식 8), (식 Y1), (식 Y2) 또는 (식 Y3)으로 표시되는 구조를 갖는 당쇄로부터 선택되는 적어도 하나인, (35) 또는 (36)에 기재된 방법.





(식 8)

[0096]



(식 Y 3)

[0097]

[0098]

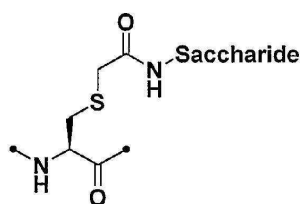
(38) 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열을 포함하는 IL-2에 있어서, 해당 아미노산 서열의 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 84, 87, 88, 91, 92, 108, 115, 119, 122, 123 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기를, 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기로 치환하는 것을 포함하는, (35) 내지 (37) 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0099]

(39) 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열에 있어서, 12, 15, 16, 19, 88, 91 및 119번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기로 치환하는 것을 포함하는, (35) 내지 (38) 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0100]

(40) 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기가, 하기 (식 1)로 표시되는 구조를 갖는, (38) 또는 (39)에 기재된 방법.



(식 1)

[0101]

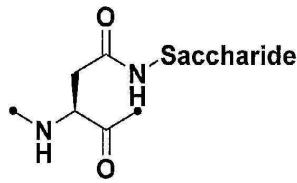
[0102]

[(식 1) 중, Saccharide는 당쇄를 나타낸다.]

[0103]

(41) 당쇄가 결합한 아스파라긴 잔기 유래의 기가, 하기 (식 2)로 표시되는 구조를 갖는, (38) 또는 (39)에 기

재된 방법.



(식 2)

[0104]

[0105]

[(식 2) 중, Saccharide는 당쇄를 나타낸다.]

[0106]

(42) 당쇄가 결합한 IL-2 개변체에 추가로 PEG를 결합시키는 것을 포함하는, (35) 내지 (41) 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0107]

(43) 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열에 있어서의, 1, 3, 51 및 78번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는, (42)에 기재된 방법.

[0108]

(44) IL-2의 아미노산 서열에 있어서의, 4, 5, 6, 7, 8, 60, 78, 79, 99, 100, 101 및 129번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 PEG가 결합하고 있는, (35)에 기재된 방법.

[0109]

(45) 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1의 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열에 있어서의, 4, 5, 6, 7, 8, 60, 78, 79, 99, 100, 101 및 129번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는, (35) 또는 (44)에 기재된 방법.

[0110]

(46) 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열에 있어서의 4, 5, 8, 78 및 129번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, PEG가 결합하고 있는 아미노산 잔기로 치환되어 있는, (35), (44) 및 (45) 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0111]

(47) 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기로 치환한 아미노산 서열에 있어서의 4, 5, 8, 78 및 129번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 2개의 아미노산 잔기가, PEG가 결합하고 있는 아미노산 잔기로 치환되어 있는, (35), (44) 내지 (46) 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0112]

(48) PEG가 결합한 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 비천연 아미노산 잔기인, (35), (42) 내지 (47) 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0113]

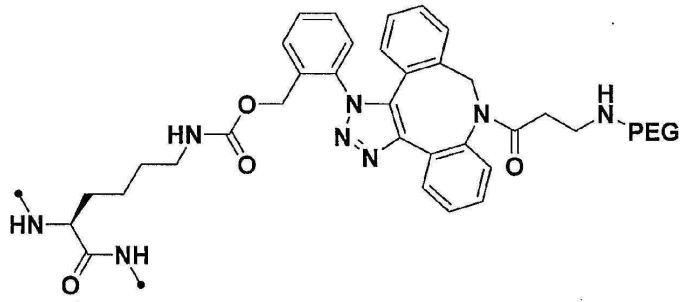
(49) PEG가 결합한 비천연 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 티올기(-SH)를 갖는 아미노산 잔기 유래의 기, 또는 PEG가 결합한 아지드기를 갖는 아미노산 잔기 유래의 기인, (48)에 기재된 방법.

[0114]

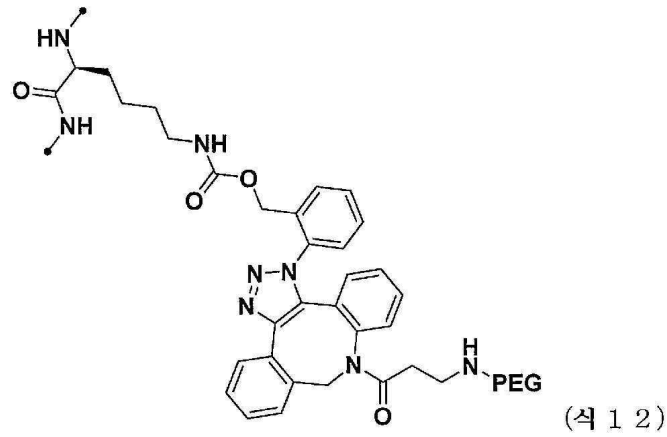
(50) PEG가 결합한 비천연 아미노산 잔기가, N^6 -[{(o-아지도벤질)옥시}카르보닐]-L-리신(o-Az-Z-Lys) 잔기 유래의 기, N^6 -[{(m-아지도벤질)옥시}카르보닐]-L-리신(m-Az-Z-Lys) 잔기 유래의 기 또는 시스테인 잔기 유래의 기인, (48) 또는 (49)에 기재된 방법.

[0115]

(51) PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기가, 하기 (식 11) 및/또는 (식 12)로 표시되는 구조를 갖는, (50)에 기재된 방법.



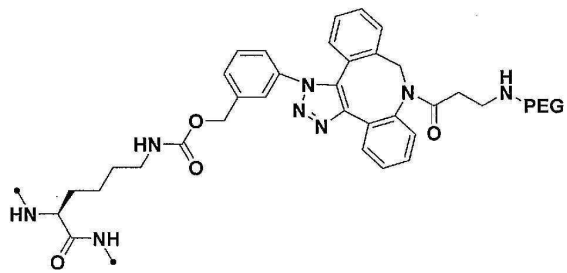
[0116]



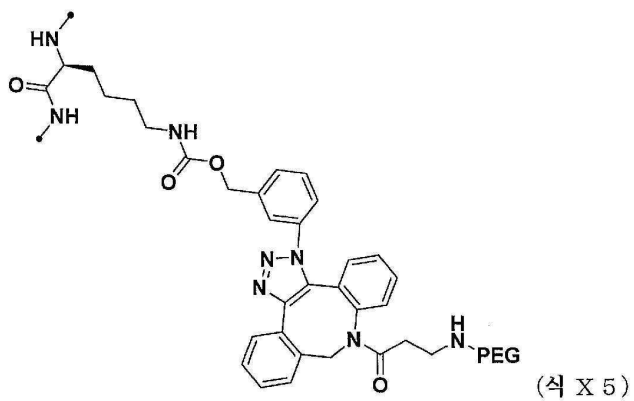
[0117]

[0118]

(52) PEG가 결합한 m-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기가, 하기 (식 X4) 및/또는 (식 X5)로 표시되는 구조를 갖는, (50)에 기재된 방법.



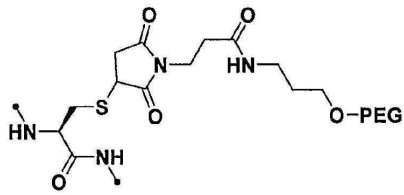
[0119]



[0120]

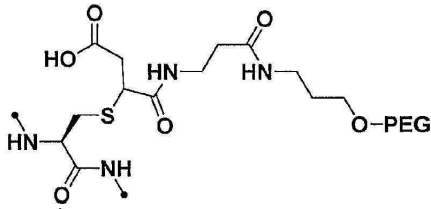
[0121]

(53) PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기가, 하기 (식 X11) 및/또는 (식 X12) 및/또는 (식 X13)으로 표시되는 구조를 갖는, (50)에 기재된 방법.



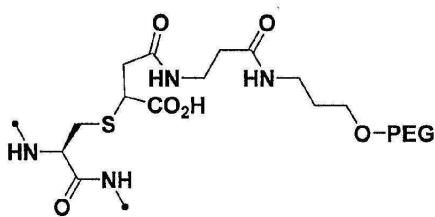
(식 X 1 1)

[0122]



(식 X 1 2)

[0123]



(식 X 1 3)

[0124]

[0125]

(54) PEG가 직쇄상인, (35), (42) 내지 (53) 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0126]

(55) PEG가 분지상인, (35), (42) 내지 (53) 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0127]

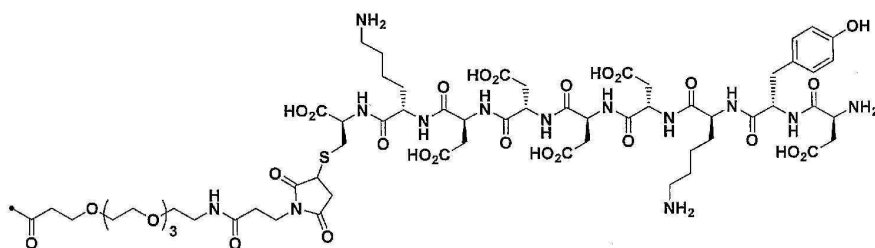
(56) PEG가, 평균 분자량 10kDa 이상의 PEG인, (35), (42) 내지 (55) 중 어느 하나에 기재된 방법.

[0128]

(57) PEG가, 평균 분자량 10kDa, 20kDa, 30kDa, 40kDa, 50kDa, 60kDa, 70kDa 또는 80kDa의 PEG인 (35), (42) 내지 (56) 중 어느 하나에 기재된 방법.

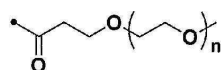
[0129]

(58) 결합하고 있는 PEG가, 하기 (식 13), (식 14), (식 15), (식 16), (식 X7), (식 X8), (식 X9), (식 X10), (식 X11), (식 X13), (식 X14) 또는 (식 X15)의 적어도 하나의 식으로 표시되는 구조를 갖는, (35), (42) 내지 (57) 중 어느 하나에 기재된 방법.



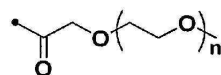
(식 1 3)

[0130]



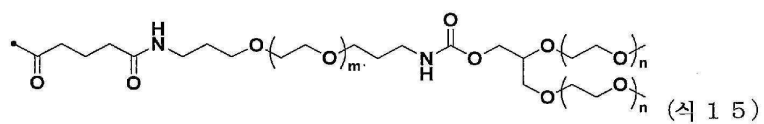
(식 1 4)

[0131]

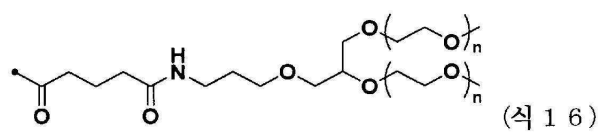


(식 X 7)

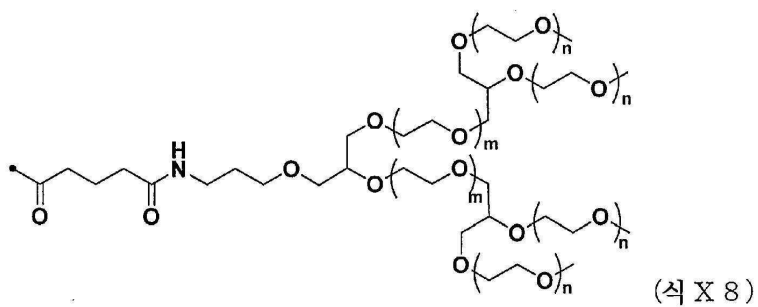
[0132]



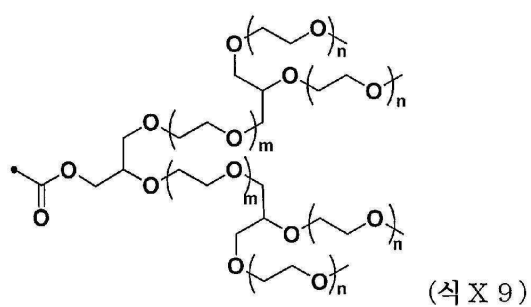
[0133]



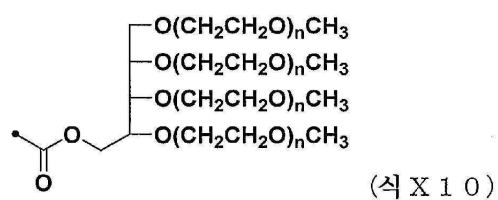
[0134]



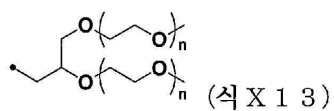
[0135]



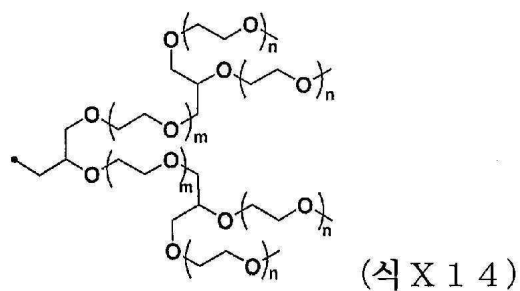
[0136]



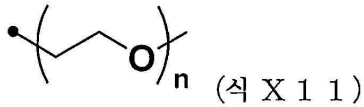
[0137]



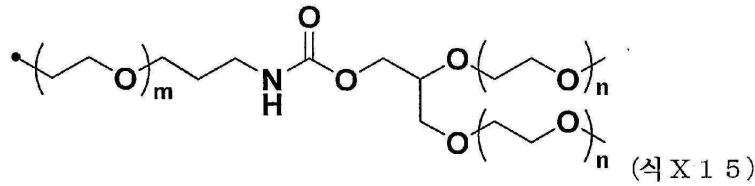
[0138]



[0139]



[0140]



[0141]

[0142]

[0143]

[0144]

[0145]

[0146]

[0147]

(59) IL-2의 N 말단에 추가로 메티오닌 잔기가 결합하고 있는, (34) 내지 (58) 중 어느 하나에 기재된 방법.

(60) IL-2의 N 말단의 알라닌이 결손되어 있는, (34) 내지 (59) 중 어느 하나에 기재된 방법.

(61) IL-2의 N 말단의 알라닌이 결손되고, 추가로 메티오닌이 결합하고 있는, (34) 내지 (60) 중 어느 하나에 기재된 방법.

(62) 제어성 T 세포를 선택적으로 활성화시키는 방법.

(63) IL-2R β 및 γ 서브유닛의 적어도 한쪽에 대한 IL-2의 친화성을 저하시키는 방법.

(64) IL-2R α 서브유닛에 대한 IL-2의 친화성을 향상시키는 방법.

발명의 효과

[0148]

본 발명의 IL-2 개변체는, Treg에 고발현하고 있는 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 선택적으로 결합하여 Treg를 선택적으로 활성화한다. 본 발명에 따르면, IL-2 개변체, 해당 IL-2 개변체의 제조 방법, 해당 IL-2 개변체를 포함하는 조성물 및 면역 질환의 치료제, IL-2의 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 로의 선택성을 증가시키는 방법, IL-2R α 서브유닛에 대한 IL-2의 친화성을 향상시키는 방법, IL-2R β 및 γ 서브유닛의 적어도 어느 하나에 대한 IL-2의 친화성을 저하시키는 방법, 그리고 제어성 T 세포를 선택적으로 활성화시키는 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0149]

도 1a는 각종 당쇄 결합 IL-2 개변체의 Treg 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 Peprotech 사제 IL-2[이하, IL-2(P)라고 기재], 흑색 삼각은 H16C-2, 흑색 사각은 L19C-9, 흑색 가로줄은 N88C-2의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 1b는 각종 당쇄 결합 IL-2 개변체의 Treg 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 E15C-11, 흑색 삼각은 L19C-11*, 흑색 사각은 L12C-11/V91C-11, 흑색 마름모꼴은 V91C-11/V115C-11, 흑색 가로줄은 V91C-11/N119C-11, 백색 동그라미는 A1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-11의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 1c는 각종 Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체의 Treg 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 A1C-Y50(IAC)/L12C-11/V91C-11, 흑색 삼각은 T3C-Li20(IAC)/L12C-11/V91C-11, 흑색 사각은 T3C-Y50(IAC)/L12C-11/V91C-11, 흑색 마름모꼴은 T3C-Y50(IAC)/E15C-11, 흑색 막대는 T3C-V40(IAC)/E15C-11, 백색 동그라미는 T3C-V80(Mal)/E15C-11, 백색 삼각은 F78C-V40(IAC)/L12C-11의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 1d는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 Treg 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 8His-IL-2, 흑색 삼각은 8His-F78(oAzZK)-Li20, 흑색 사각은 8His-I129(oAzZK)-Li20의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 1e는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 Treg 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 8His-S4(oAzZK)-Li20, 흑색 삼각은 8His-S5(oAzZK)-Li20, 흑색 사각은 8His-S6(oAzZK)-Li20, 흑색 마름모꼴은 8His-T7(oAzZK)-Li20, 흑색 가로줄은 8His-K8(oAzZK)-Li20의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 1f는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 Treg 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 8His-E60(oAzZK)-Li20, 흑색 삼각은 8His-H79(oAzZK)-Li20, 흑색 사각은 8His-R81(oAzZK)-Li20, 흑색 마름모꼴은 8His-L94(oAzZK)-Li20의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 1g는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 Treg 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 8His-S99(oAzZK)-Li20, 흑색 삼각은 8His-E100(oAzZK)-Li20, 흑색 사각은 8His-T101(oAzZK)-Li20, 흑색 마름모꼴은 8His-Q126(oAzZK)-Li20의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 1h는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 Treg 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 8His-F78(oAzZK)-V40, 흑색 삼각은 8His-F78(oAzZK)-W40, 흑색 사각은 8His-I129(oAzZK)-Li40, 흑색 마름모꼴은 8His-I129(oAzZK)-V40, 흑색 막대는 8His-I129(oAzZK)-W40, 백색 동그라미는 8His-I129(oAzZK)-Y50, 백색 삼각은 I129(oAzZK)-V40, 백색 사각은 I129(oAzZK)-W80, 백색 마름모꼴은 I129C-V40(Mal)의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 1i는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 Treg 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 8His-S4(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 흑색 삼각은 S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 흑색 사각은 8His-S5(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 흑색 마름모꼴은 S5(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 흑색 막대는 8His-K8(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 백색 동그라미는 K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 백색 삼각은 8His-F78(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 백색 사각은 8His-H79(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 백색 마름모꼴은 8His-S99(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 1j는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 Treg 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 8His-S4(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 흑색 삼각은 8His-S5(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 흑색 사각은 8His-K8(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 흑색 마름모꼴은 8His-F78(oAzZK)-Li30/H79(oAzZK)-Li30, 흑색 막대는 8His-F78(oAzZK)-Li30/S99(oAzZK)-Li30의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 2a는 각종 당쇄 결합 IL-2 개변체의 NK 세포 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 마름모꼴은 IL-2(P), 흑색 사각은 H16C-2, 흑색 삼각은 L19C-9, 흑색 동그라미는 N88C-2의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 2b는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 NK 세포 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 8His-IL-2, 흑색 삼각은 8His-F78(oAzZK)-Li20, 흑색 사각은 8His-I129(oAzZK)-Li20의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 2c는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 NK 세포 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 8His-S4(oAzZK)-Li20, 흑색 삼각은 8His-S5(oAzZK)-Li20, 흑색 사각은 8His-S6(oAzZK)-Li20, 흑색 마름모꼴은 8His-T7(oAzZK)-Li20, 흑색 가로줄은 8His-K8(oAzZK)-Li20의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 2d는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 NK 세포 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 8His-S99(oAzZK)-Li20, 흑색 삼각은 8His-E100(oAzZK)-Li20, 흑색 사각은 8His-T101(oAzZK)-Li20, 흑색 마름모꼴은 8His-Q126(oAzZK)-Li20의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 2e는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 NK 세포 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 8His-E60(oAzZK)-Li20, 흑색 삼각은 8His-H79(oAzZK)-Li20, 흑색 사각은 8His-R81(oAzZK)-Li20, 흑색 마름모꼴은 8His-L94(oAzZK)-Li20의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 2f는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 NK 세포 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 8His-F78(oAzZK)-V40, 흑색 삼각은 8His-F78(oAzZK)-W40, 흑색 사각은 8His-I129(oAzZK)-Li40, 흑색 마름모꼴은 8His-I129(oAzZK)-V40, 흑색 가로줄은 8His-I129(oAzZK)-W40, 백색 동그라미는 8His-I129(oAzZK)-Y50, 백색 삼

각은 I129(oAzZK)-W80, 백색 사각은 I129C-V40(Ma1)의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 2g는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 NK 세포 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 8His-S4(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 흑색 삼각은 S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 흑색 사각은 8His-S5(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 흑색 마름모꼴은 S5(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 흑색 가로줄은 8His-K8(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 백색 동그라미는 K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 2h는 각종 당쇄 결합 IL-2 개변체 및 각종 Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체의 NK 세포 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 L12C-11/V91C-11, 흑색 삼각은 A1C-Y50(IAC)/L12C-11/V91C-11, 흑색 사각은 T3C-Li20(IAC)/L12C-11/V91C-11, 흑색 마름모꼴은 T3C-Y50(IAC)/L12C-11/V91C-11, 흑색 막대는 T3C-Y50(IAC)/E15C-11, 백색 동그라미는 T3C-V40(IAC)/E15C-11, 백색 삼각은 T3C-V80(Ma1)/E15C-11, 백색 사각은 F78C-V40(IAC)/L12C-11의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 2i는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 NK 세포 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 IL-2(P), 흑색 삼각은 I129(oAzZK)-V40, 흑색 사각은 8His-F78(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 흑색 마름모꼴은 8His-H79(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 흑색 막대는 8His-S99(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 2j는 각종 PEG 결합 IL-2 개변체의 NK 세포 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 8His-S4(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 흑색 삼각은 8His-S5(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 흑색 사각은 8His-K8(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 흑색 마름모꼴은 8His-F78(oAzZK)-Li30/H79(oAzZK)-Li30, 흑색 막대는 8His-F78(oAzZK)-Li30/S99(oAzZK)-Li30의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 2k는 각종 당쇄 결합 IL-2 개변체의 NK 세포 증식 촉진 활성을 도시하는 도면이다. 흑색 동그라미는 E15C-11, 흑색 삼각은 L19C-11*, 흑색 사각은 V91C-11/V115C-11, 흑색 마름모꼴은 V91C-11/N119C-11, 흑색 막대는 A1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-11의 활성을 나타낸다. 횡축에 IL-2 농도(pM), 종축에 IL-2 의존성 세포 증식률(%)을 기재한다.

도 3은 미자극 Treg 또는 각종 IL-2 개변체 자극 Treg 공존 하에서의 반응자 T 세포(Tresp)의 증식률을 도시하는 도면이다. 도 3의 (A)는 CD4 양성 Tresp의 증식률, 도 3의 (B)는 CD8 양성 Tresp의 증식률이다. 어느 도면이든 횡축에 Tresp와 Treg의 존재비, 종축에 Tresp의 증식률(%)을 기재한다. 백색 마름모꼴은 미자극, 흑색 마름모꼴은 IL-2(P), 흑색 사각은 H16C-2, 흑색 삼각은 L19C-9, 흑색 동그라미는 N88C-2를 나타낸다.

도 4의 (A) 내지 도 4의 (E)는 자기 혈장으로 재구성한 인간 PBMC에 각종 IL-2 개변체를 첨가하여 배양했을 때의 배양 상정 중의 사이토카인 농도를 도시하는 도면이다. 도 4의 (A)는 IL-4 농도, 도 4의 (B)는 IL-6 농도, 도 4의 (C)는 IL-10 농도, 도 4의 (D)는 IFN γ 농도 및 도 4의 (E)는 TNF α 농도이다. 어느 도면이든 횡축에 첨가한 IL-2 농도(pM), 종축에 사이토카인 산생량(pg/mL)을 기재한다. 도 4의 (F)는 Treg 선택적 증식 활성을 평가한 결과를 도시하는 도면이다. 종축에, CD4 양성 분획 중, CD25⁺Foxp3^{high} 분획을 Treg, CD25⁺Foxp3^{low} 분획을 이펙터 T 세포(Teff)로 한 때의, 그 비[Treg(%)/Teff(%)]를 나타냈다. 횡축에, 첨가한 IL-2 농도를 나타낸다. 어느 도면이든, 백색 마름모꼴은 미자극, 흑색 마름모꼴은 IL-2(P), 흑색 사각은 H16C-2, 흑색 삼각은 L19C-9, 흑색 동그라미는 N88C-2를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0150]

이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0151]

「Treg」 또는 「Treg 세포」란, 제어성 T 세포를 나타낸다. 제어성 T 세포란, 다른 면역 세포의 활성을 억제하는 T 세포의 클래스이며, 플로우 사이토메트리를 사용하고, 세포 마커 표현형인 CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺에 의해 규정된다.

[0152]

FOXP3은, 세포 내 단백질이며, 염색을 위해서, 세포의 고정과 투과 처리를 필요로 하는 점에서, 생존하는 Treg

를 규정하기 위해서는, 세포 표면 표현형인, $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ 를 사용할 수 있다.

- [0153] Treg는 또한, tTreg(흉선 유래) 및 pTreg(말초 유래이며, 말초의 나이브 T 세포로부터 분화시켰다) 등, 다양한 Treg 서브클래스도 포함한다. 모든 Treg는, $IL-2R_{\alpha\beta\gamma}$ 을 발현하고, IL-2 의존적으로 증식하지만, 본 발명의 IL-2 개변체는, 적어도 하나의 Treg 서브클래스를 선택적으로 활성화할 수 있고, 바람직하게는 어느 서브클래스이든 선택적으로 활성화할 수 있다.
- [0154] 「IL-2」란, 야생형 IL-2, IL-2 개변체의 어느 경우든 있다.
- [0155] 「야생형 IL-2」란, 하기 1) 내지 3)의 IL-2의 어느 것이든 포함한다.
- [0156] 1) 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열을 포함하는 인간 유래 야생형 성숙 IL-2.
- [0157] 2) 상기 1)의 유전자 재조합체를 제작할 때에 첨가할 수 있는 아미노산 개변을 갖는 IL-2.
- [0158] 3) 상기 1) 및 상기 2)의 IL-2의 N 말단의 아미노산 잔기가 결실된 IL-2.
- [0159] 상기 2)의 아미노산 개변이란, 예를 들어 대장균에서 IL-2를 발현시키기 위하여 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단에 개시 코돈에 의해 코드되는 메티오닌 잔기를 결합시키는 개변이나, 대장균에서 IL-2를 발현시키고, 또한 간편하게 정제하기 위하여 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단에, MHHHHHHHHH로 표현되는 아미노산 서열(메티오닌이 결합한 폴리히스티딘)을 결합시키는 개변이나, IL-2의 물성을 높이기 위하여 인간 유래 야생형 성숙 IL-2에 125번째의 아미노산 잔기를 알라닌 잔기 또는 세린 잔기로 치환하는 개변 등을 들 수 있다.
- [0160] 상기 3)의 IL-2의 N 말단의 아미노산 잔기가 결실된 IL-2란, 예를 들어, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단의 알라닌 잔기, 또는 알라닌 잔기 및 프롤린 잔기가 결실된 아미노산 서열을 갖는 IL-2 등을 들 수 있다.
- [0161] 야생형 IL-2는, 구체적으로는, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단에 메티오닌 잔기가 결합한 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단에 MHHHHHHHHH로 표현되는 아미노산 서열이 결합한 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단의 알라닌 잔기가 결실된 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단의 알라닌 잔기가 결실되고, 또한 메티오닌이 결합한 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단의 알라닌 잔기 및 프롤린 잔기가 결실된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단에 메티오닌 잔기가 결합한 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단에 MHHHHHHHHH로 표현되는 아미노산 서열이 결합한 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단의 알라닌 잔기가 결실된 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단의 알라닌 잔기가 결실되고, 또한 메티오닌이 결합한 아미노산 서열, 혹은 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단의 알라닌 잔기 및 프롤린 잔기가 결실된 아미노산 서열에 있어서, 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기 혹은 알라닌 잔기로 치환한 아미노산 서열을 갖는 IL-2를 들 수 있다. 상술, N 말단측의 아미노산 서열 및 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 세린 잔기는, IL-2의 활성화에 영향을 줄 일 없이, 단백질 발현 또는 단백질 안정성의 관점에서 허용되는 아미노산 서열의 베리에이션이며, 본 발명의 IL-2 개변체에 있어서도 본 아미노산 서열의 베리에이션이 포함된다.
- [0162] 부언하면, 본 발명에 있어서 기재되는 IL-2의 아미노산 잔기의 번호는, 모두 서열 번호 1로 표현되는 IL-2의 아미노산 서열을 기준으로 했을 때의 아미노산 잔기 번호(위치)를 나타낸다. 따라서, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단의 알라닌 잔기가 1번째, 프롤린 잔기가 2번째, N 말단에 결합한 메티오닌 잔기는 -1번째로서 정의된다.
- [0163] 「IL-2 개변체」란, 야생형 IL-2에 어떠한 개변을 가하여 제작된, 야생형 IL-2의 기능을 갖는 모든 단백질을 포함한다. 개변체로서는, 예를 들어 아미노산 개변(예를 들어, 치환, 결실, 부가 등)에 의해 야생형 IL-2가 개변된 IL-2 개변체, 당쇄 수식에 의해 야생형 IL-2가 개변된 IL-2 개변체, 화학 수식에 의해 야생형 IL-2가 개변된 IL-2 개변체 등을 들 수 있다. 상기 개변은, 자연스럽게 발생하는 개변 및 인위적인 개변의 어느 개변이든 포함한다.
- [0164] 「야생형 IL-2의 기능」이란, $IL-2R_{\alpha\beta\gamma}$ 로의 결합, $IL-2R_{\beta\gamma}$ 로의 결합, CD122 및 CD132의 세포 내 영역을 통한 세포 내 시그널 전달 경로의 활성화, JAK1의 인산화, JAK3의 인산화, STAT5의 인산화, STAT3의 인산화, PI3K의

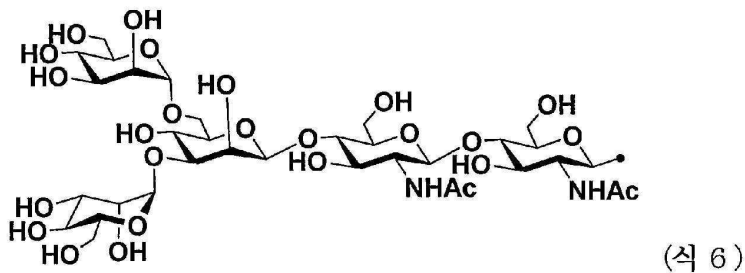
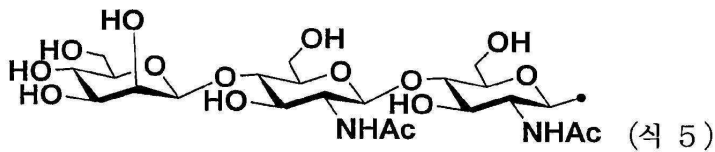
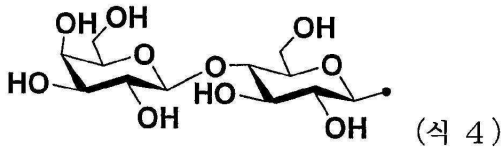
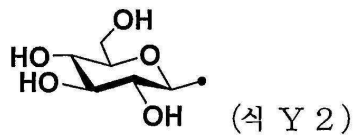
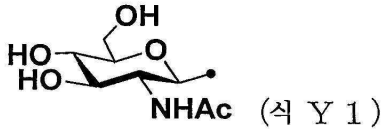
인산화, MEK의 인산화, Foxp3 발현 촉진, Foxp3에 의해 전사가 제어되어 있는 유전자군의 발현 촉진, Foxp3 유전자의 TSDR(Treg-specific demethylation region; Treg-특이적 탈메틸화 영역) 영역의 DNA 탈메틸화 촉진, IL-2R $\beta\gamma$ 를 발현하는 면역 세포의 증식 및 생존 촉진, IL-2R $\beta\gamma$ 를 발현하는 면역 세포의 사이토카인 산생 촉진, IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 를 발현하는 면역 세포의 증식 및 생존 촉진, IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 를 발현하는 면역 세포의 사이토카인 산생 촉진, Treg 증식 및 생존 촉진, 그리고 Treg의 Teff 활성화 억제능의 향상으로부터 선택되는 적어도 하나의 기능을 나타낸다.

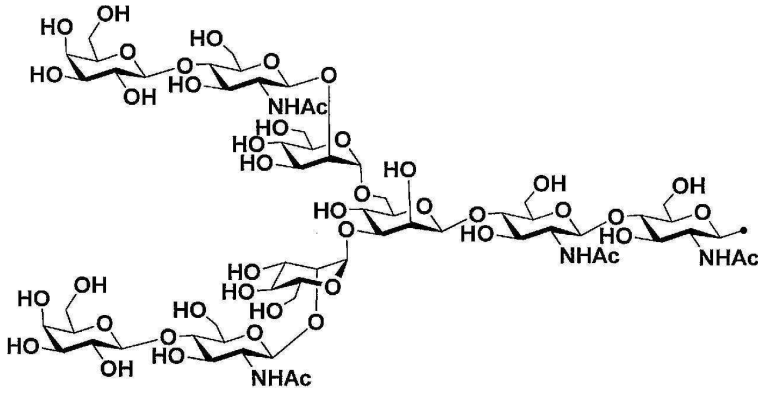
- [0165] 본 발명의 IL-2 개변체의 일 형태로서는, IL-2의 소정의 영역에 당쇄가 결합한 IL-2 개변체, 및 IL-2의 소정의 영역에 PEG가 결합한 IL-2 개변체, 및 IL-2의 소정의 영역에 당쇄 및 PEG가 결합한 IL-2 개변체를 들 수 있다. 결합으로서는, 예를 들어, 공유 결합, 비공유 결합 등을 들 수 있지만, 결합 양식은 가리지 않는다.
- [0166] 「아미노산 잔기」는 천연 아미노산 잔기와 비천연 아미노산 잔기의 어느 경우든 있다.
- [0167] 「천연 아미노산 잔기」란, 셀레노시스테인 잔기, 및 이하의 20종의 α -아미노산 잔기: 알라닌 잔기, 아스파라긴 잔기, 아스파르트산 잔기, 글루타민 잔기, 글루탐산 잔기, 글리신 잔기, 히스티딘 잔기, 이소류신 잔기, 류신 잔기, 리신 잔기, 메티오닌 잔기, 페닐알라닌 잔기, 프롤린 잔기, 세린 잔기, 트레오닌 잔기, 트립토판 잔기, 티로신 잔기, 발린 잔기, 또는 시스테인 잔기를 들 수 있다. 천연 아미노산 잔기는 L체와 D체의 양쪽을 포함하고, 인간에게 있어서는 L체 쪽이 바람직하다.
- [0168] 「비천연 아미노산 잔기」란, 천연 아미노산 잔기 이외의 모든 아미노산 잔기를 말한다. 비천연 아미노산 잔기로서는, 예를 들어, 천연 아미노산 잔기를 수식한 아미노산 잔기, 인공적으로 디자인된 아미노산 잔기를 들 수 있다.
- [0169] 「수식」이란, 화학 수식, 번역 후 수식 등, 모든 수식을 포함한다.
- [0170] 본 발명의 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 선택성이 향상되어 있는 IL-2 개변체를 들 수 있다. IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 선택성이 향상되어 있는 IL-2 개변체에 의해, IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 를 발현하고 있는 Treg를 선택적으로 활성화시킬 수 있다.
- [0171] 「IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 선택성」이란, IL-2가 IL-2R $\beta\gamma$ 보다도 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 선택적으로 결합하는 성질을 말한다. 또한, 「IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 선택성이 향상되어 있는」이란, 야생형 IL-2와 비교하여, IL-2 개변체의 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 선택성이 향상되어 있는 것을 말한다.
- [0172] IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 선택성, 또는 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 선택성이 향상되어 있는 것은, 예를 들어 이하에 기재하는 방법으로 판단할 수 있다.
- [0173] (1) 각종 IL-2에 대해서, IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 결합 활성의 EC₅₀값과, IL-2R $\beta\gamma$ 에 대한 결합 활성의 EC₅₀값을 측정한다. IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 의 EC₅₀이 IL-2R $\beta\gamma$ 의 EC₅₀보다도 작거나, 또는 EC₅₀ ratio값(IL-2R $\beta\gamma$ EC₅₀/IL-2R $\alpha\beta\gamma$ EC₅₀)이 1보다 크면, 당해 IL-2는 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 선택성이 있다고 판단할 수 있다.
- [0174] 또한, 야생형 IL-2의 EC₅₀ ratio값보다도 IL-2 개변체의 EC₅₀ ratio값이 크거나, 또는 표준화 EC₅₀ ratio값(IL-2 개변체의 EC₅₀ ratio값/야생형 IL-2의 EC₅₀ ratio값)이 1보다 큰 경우, 당해 IL-2 개변체는 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 선택성이 향상되어 있다고 판단할 수 있다. 표준화 EC₅₀ ratio값은, 1보다 큰, 5 이상, 10 이상, 11 이상, 12 이상, 13 이상, 14 이상, 15 이상, 16 이상, 17 이상, 18 이상, 19 이상, 20 이상, 21 이상, 22 이상, 23 이상, 24 이상, 25 이상, 26 이상, 27 이상, 28 이상, 29 이상, 30 이상의 순으로 바람직하다. 야생형 IL-2 대신에 야생형 IL-2와 동등한 EC₅₀ ratio값을 갖는 IL-2 개변체를 사용해도 된다.
- [0175] EC₅₀값의 측정 방법으로서, 구체적으로는 예를 들어, 하기 (A) 내지 (C)에 나타내는 수순에 의한 방법을 들 수 있다. 보다 구체적인 방법으로서, 실시예에 있어서 후술하는 방법을 들 수 있다.
- [0176] (A) 포유 동물 세포에 인간 IL-2R $\alpha\beta\gamma$, 또는 인간 IL-2R $\beta\gamma$ 를 발현시켜서, 인간 IL-2 의존성 생존 세포주를 제작하고, 각 세포주를 96웰 플레이트에 파종한다.
- [0177] (B) 컨트롤의 IL-2를 1000ng/ml로 첨가한 웰의 상대 형광 단위(relative fluorescence units; RLU)값을 100%,

IL-2를 포함하지 않는 배지를 첨가한 웰의 RLU값을 0%로 하여, 피검 물질인 IL-2 개변체의 IL-2 의존성 세포 증식률을 산출한다.

- [0178] (C) (B)에서 얻어진 데이터를 바탕으로 통계 해석 소프트웨어(예를 들어, IBDS사제 XLfit5 version 5.3.1.3)를 사용하여 EC_{50} 값을 산출한다.
- [0179] (2) 야생형 IL-2와 IL-2 개변체 각각에서, IL-2R 세포의 도메인(ECD)-Fc 융합 단백질인 CD25ECD-Fc, IL-2R $_{\beta\gamma}$ ECD-Fc에 대한 친화성을 Biacore로 측정한다. 야생형보다도 IL-2 개변체에서, CD25ECD-Fc의 K_D 값이 작고/작거나 IL-2R $_{\beta\gamma}$ ECD-Fc의 K_D 값이 클 때, 당해 IL-2 개변체는 IL-2R $_{\alpha\beta\gamma}$ 에 대한 선택성이 향상되어 있다고 판단할 수 있다. 또한, CD25ECD-Fc의 K_D 값에 대한 IL-2R $_{\beta\gamma}$ ECD-Fc의 K_D 값의 상대값이, 야생형보다도 IL-2 개변체에서 증가하고 있을 때, 당해 IL-2 개변체는 IL-2R $_{\alpha\beta\gamma}$ 에 대한 선택성이 향상되어 있다고 판단할 수도 있다.
- [0180] 「Treg를 선택적으로 활성화시키는」이란, 하기 (a) 내지 (c)의 적어도 어느 하나를 말한다.
- [0181] (a) 야생형 IL-2보다도 IL-2 개변체의 Treg 증식 활성이 높고/높거나 NK 세포 증식 활성이 낮다.
- [0182] (b) 야생형 IL-2보다도 IL-2 개변체에서, 세포 집단 중의 이펙터 T 세포(Teff)의 비율에 대한 Treg의 비율의 비 [Treg(%) / Teff(%)]가 높다.
- [0183] (c) 야생형 IL-2보다도 IL-2 개변체에서 염증성 사이토카인의 산생량이 저하되어 있고/있거나 항염증성 사이토카인의 산생량이 증가하고 있다.
- [0184] 상기 (a) 내지 (c)의 어느 경우든, 야생형 IL-2 대신 야생형 IL-2와 동등한 활성을 갖는 IL-2 개변체를 사용해도 된다.
- [0185] Treg 증식 활성, 및 NK 세포 증식 활성은, 예를 들어 이하에 기재하는 방법으로 측정할 수 있다. Treg 또는 NK 세포를 96웰 플레이트에 파종하고, 컨트롤의 IL-2를 첨가한 웰의 RLU값을 100%, IL-2를 포함하지 않는 배지를 첨가한 웰의 RLU값을 0%로 하여, 피검 물질인 IL-2 개변체의 Treg 또는 NK 세포 증식률을 산출한다. 보다 구체적인 방법으로서, 실시예에 있어서 후술하는 방법을 들 수 있다.
- [0186] Treg(%) / Teff(%)는 예를 들어, 이하에 기재하는 방법으로 측정할 수 있다. 인간 말초혈 단핵 세포(이하, PBMC라고도 약칭한다)를 자기 혈장에 현탁하고, 거기에 항CD3 항체 OKT3을 첨가하여 96웰 플레이트에 파종 후, 각종 IL-2를 첨가하여 배양한다. 얻어진 인간 PBMC와, 형광 표지 항인간 CD4 항체, 형광 표지 CD25 항체, 형광 표지 항Foxp3 항체와 반응시킨 후, 플로우 사이토미터(예를 들어, BD Biosciences사제 LSRFortessa)로 각종 형광 강도를 측정한다.
- [0187] 얻어진 데이터를, 데이터 해석 소프트웨어(예를 들어, TreeStar사제 FLOWJo, version 7.6.5)를 사용하여 해석하고, CD4 양성 분획의 중에서, CD25⁺Foxp3^{high} 분획을 Treg, CD25⁺Foxp3^{low} 분획을 이펙터 T 세포(Teff)로 하여, 그의 존재비[Treg(%) / Teff(%)]를 산출한다. 보다 구체적인 방법으로서, 실시예에 있어서 후술하는 방법을 들 수 있다.
- [0188] 각종 사이토카인의 산생량은, 예를 들어, 이하에 기재하는 방법으로 측정할 수 있다. 인간 PBMC를 자기 혈장에 현탁하고, 항CD3 항체 OKT3을 첨가하여 96웰 플레이트에 파종 후, 각종 IL-2를 첨가하여 배양하고, 상청 중의 사이토카인 산생량을 정량한다. 보다 구체적인 방법으로서, 실시예에 있어서 후술하는 방법을 들 수 있다.
- [0189] 본 발명의 IL-2 개변체의 일 형태로서는, IL-2에 당쇄가 결합함으로써 개변된 IL-2 개변체(이하, 당쇄 결합 IL-2 개변체라고도 약칭한다.), IL-2에 PEG가 결합함으로써 개변된 IL-2 개변체(이하, PEG 결합 IL-2 개변체라고도 약칭한다.)를 들 수 있다. 이하, 각 개변체에 대하여 설명한다.
- [0190] [당쇄 결합 IL-2 개변체]
- [0191] 본 발명의 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 84, 87, 88, 91, 92, 108, 115, 119, 122, 123 및 130번째의 아미노산 잔기로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 당쇄가 결합하고 있는 IL-2 개변체가 바람직하다.
- [0192] 본 명세서에 있어서, 「당쇄」란, 단당 또는 2 이상의 단당이 글리코시드 결합과 같은 결합을 통해서 결합한 것을 말하고, 어느 당쇄를 사용할 수도 있다.

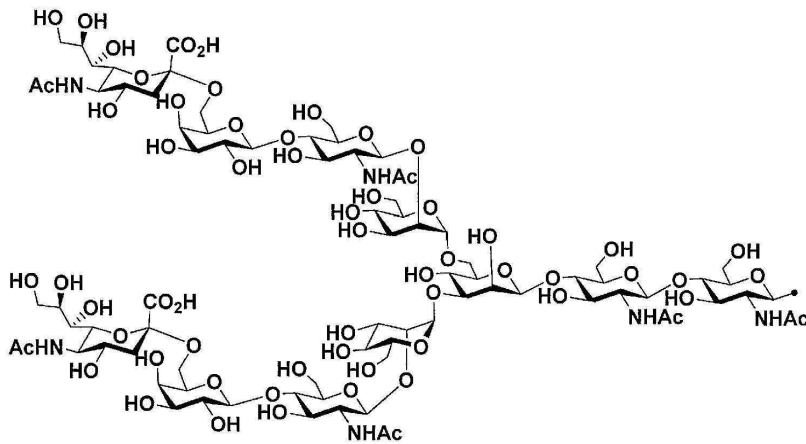
[0193] IL-2에 결합하는 당쇄로서는, 구체적으로는 예를 들어, 하기 (식 4) 내지 (식 8) 및 (식 Y1) 내지 (식 Y3)으로 표시되는 구조를 갖는 당쇄로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 1을 들 수 있다. IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 상기 아미노산 잔기에 해당 당쇄를 결합시킴으로써, IL-2 $R_{\alpha\beta\gamma}$ 에 대한 선택성을 향상시킬 수 있다. 또한, (식 6)의 α 1-6 암, α 1-3 암의 만노스(Man)의 각각에 N-아세틸글루코사민(GlcNAc)이 하나 결합한 당쇄, (식 7)의 α 1-6 암, α 1-3 암의 Man-GlcNAc 각각으로부터 갈락토오스(Gal)가 하나 제거된 당쇄(G1), (식 8)의 비환원 말단의 시알산(Sial)이 하나 제거된 당쇄, 및 (식 Y3)의 비환원 말단의 시알이 1 내지 4개 제거된 당쇄도 본 발명의 IL-2 개변체의 당쇄에 사용할 수 있다.





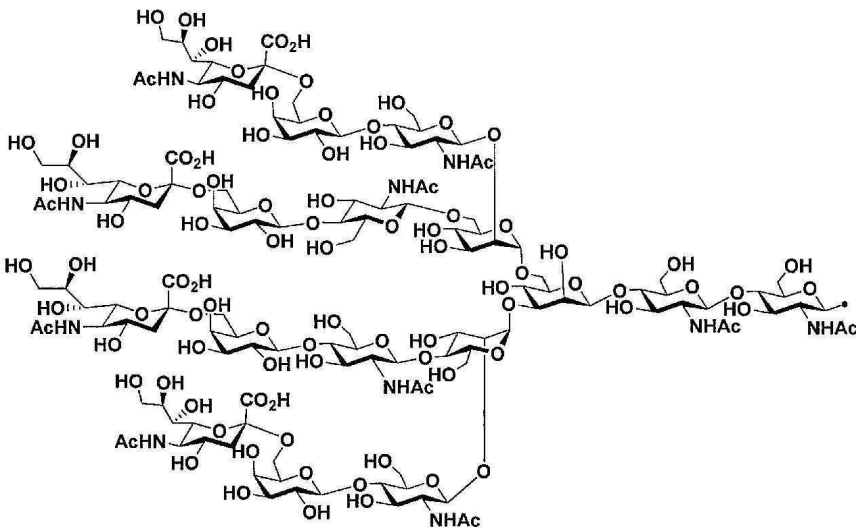
(식 7)

[0199]



(식 8)

[0200]



(식 Y 3)

[0201]

[0202]

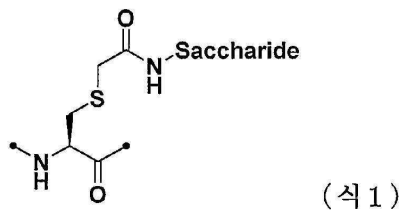
본 발명의 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 84, 87, 88, 91, 92, 108, 115, 119, 122, 123 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체가 바람직하고, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의, 12, 13, 15, 16, 19, 88, 91 및 119번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체가 보다 바람직하다.

[0203] 본 실시 형태에 있어서는, 야생형 IL-2의 아미노산 서열은, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기 또는 알라닌 잔기로 치환한 아미노산 서열이 보다 바람직하다.

[0204] 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기란, 각각 시스테인 잔기의 측쇄 티올 또는 아스파라긴 잔기의 측쇄 아미드가 수식되어 있는 기를 말한다.

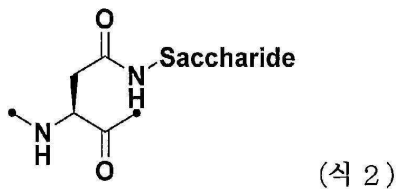
[0205] 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기란, 시스테인 잔기의 측쇄 티올 또는 아스파라긴 잔기의 측쇄 아미드에 화학 수식에 의해 당쇄가 결합한 기를 말한다. 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기는, 링커 등에 의해 수식되어 있어도 되고, 링커를 통하여 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기와 당쇄가 결합하고 있어도 된다.

[0206] 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로서는, 예를 들어, 하기 (식 1)에 나타내는 바와 같이, 시스테인 잔기의 측쇄 티올에 CH_2CONH 링커를 통하여 당쇄가 결합한 구조를 갖는 아미노산 잔기를 들 수 있다. 시스테인 잔기의 측쇄 티올과 당쇄는, 링커를 통하지 않고 결합하고 있어도 된다.



[0207] 상기 (식 1) 중, Saccharide는 당쇄를 나타낸다.

[0209] 당쇄가 결합한 아스파라긴 잔기 유래의 기로서는, 예를 들어, 하기 (식 2)에 나타내는 바와 같이, 아스파라긴 잔기의 측쇄 아미드에 화학 수식에 의해 당쇄가 결합한 구조를 들 수 있다. 아스파라긴 잔기의 측쇄 아미드와 당쇄는, 링커를 통하여 결합하고 있어도 된다.



[0210] 상기 (식 2) 중, Saccharide는 당쇄를 나타낸다.

[0212] 본 발명의 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, 예를 들어 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 84, 87, 88, 91, 92, 108, 115, 119, 122, 123 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환된 IL-2 개변체를 들 수 있다.

[0213] 야생형 IL-2에 당쇄가 하나 결합한 IL-2 개변체의 예로서는, 이하에 기재하는 물질을 들 수 있다.

[0214] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 11번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.

[0215] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.

[0216] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 13번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.

[0217] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 15번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.

[0218] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 16번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어

있는, IL-2 개변체.

- [0219] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 18번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.
- [0220] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 19번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.
- [0221] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 20번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.
- [0222] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 84번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.
- [0223] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 87번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.
- [0224] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 88번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.
- [0225] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 91번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.
- [0226] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 92번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.
- [0227] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 108번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.
- [0228] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 115번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.
- [0229] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 119번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.
- [0230] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 122번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.
- [0231] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 123번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.
- [0232] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 130번째의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는, IL-2 개변체.
- [0233] 상기 IL-2 개변체에 있어서, 결합하고 있는 당쇄는 어느 당쇄여도 되지만, 예를 들어 (식 4), (식 5), (식 6), (식 7), (식 8) 또는 (식 Y3)으로 표시되는 구조를 갖는 당쇄를 들 수 있다.
- [0234] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 11번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0235] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 7) 또는 (식 8)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0236] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 13번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4) 또는 (식 8)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0237] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 15번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4), (식 8) 또는 (식 Y3)으로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.

- [0238] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 16번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4), (식 5), (식 6) 또는 (식 7)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0239] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 18번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4) 또는 (식 8)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0240] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 19번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4), (식 7), (식 8), 또는 (식 Y3)으로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0241] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 20번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4) 또는 (식 8)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0242] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 84번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0243] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 87번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4) 또는 (식 8)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0244] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 88번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4), (식 7) 또는 (식 8)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0245] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 91번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4), (식 7) 또는 (식 8)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0246] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 92번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0247] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 108번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4) 또는 (식 7)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0248] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 115번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0249] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 119번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4) 또는 (식 7)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0250] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 122번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0251] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 123번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0252] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 130번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4) 또는 (식 7)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.

인, IL-2 개변체.

- [0253] 본 발명의 일 실시 형태로서는, 야생형 IL-2에 적어도 2개의 당쇄를 결합시킨 IL-2 개변체도 들 수 있다. 야생형 IL-2에 2개의 당쇄를 결합시킨 예로서는, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 1, 3, 4, 5, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 32, 38, 51, 76, 84, 87, 88, 91, 92, 100, 102, 104, 108, 115, 119, 122, 123, 127 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 2개의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기로 치환된 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체를 들 수 있다.
- [0254] 야생형 IL-2에 당쇄가 2개 결합한 IL-2 개변체의 예로서는, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 1, 3, 4, 5, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 32, 38, 51, 76, 84, 87, 88, 91, 92, 100, 102, 104, 108, 115, 119, 122, 123, 127 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 하나의 아미노산 잔기, 및 11, 12, 18, 20, 84, 87, 88, 91, 108, 115, 119, 122 및 123번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 하나의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체가 바람직하다.
- [0255] 본 발명의 구체적인 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, 이하에 나타내는 것을 들 수 있다.
- [0256] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 8번째 및 19번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0257] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 16번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0258] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 15번째 및 119번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0259] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 19번째 및 23번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0260] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 91번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0261] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 115번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0262] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 119번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0263] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 13번째 및 91번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0264] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 13번째 및 115번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0265] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 13번째 및 119번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0266] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 19번째 및 115번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0267] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 91번째 및 115번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0268] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 91번째 및 119번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0269] 상기 IL-2 개변체에 있어서, 결합하고 있는 당쇄는 어느 당쇄여도 되지만, 예를 들어 (식 4) 또는 (식 8)로 표시되는 구조를 갖는 당쇄를 들 수 있다.
- [0270] 또한, 본 발명의 구체적인 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, 이하에 나타내는 것도 들 수 있다.

- [0271] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 8번째 및 19번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0272] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 16번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 12번째로 결합하는 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)이며, 또한 16번째로 결합하는 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 4)인, IL-2 개변체.
- [0273] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 15번째 및 119번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0274] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 19번째 및 23번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0275] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 91번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0276] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 115번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0277] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 119번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0278] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 13번째 및 91번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0279] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 13번째 및 115번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0280] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 13번째 및 119번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0281] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 19번째 및 115번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0282] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 91번째 및 115번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0283] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 91번째 및 119번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0284] 본 발명의 일 실시 형태로서는, 야생형 IL-2에 적어도 3개 당쇄를 결합시킨 IL-2 개변체도 들 수 있다. 야생형 IL-2에 3개의 당쇄를 결합시킨 예로서는, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 1, 3, 4, 5, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 32, 38, 51, 76, 84, 87, 88, 91, 92, 100, 102, 104, 108, 115, 119, 122, 123, 127 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 3개의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기로 치환된 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체를 들 수 있다.
- [0285] 또한, 야생형 IL-2에 당쇄가 3개 결합한 예로서는, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 1, 3, 4, 5, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 32, 38, 51, 76, 84, 87, 88, 91, 92, 100, 102, 104, 108, 115, 119, 122, 123, 127 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기와, 11, 12, 18, 20, 84, 87, 88, 91, 108, 115, 119, 122 및 123번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체가 보다 바람직하다.
- [0286] 본 발명의 일 실시 형태로서는, 야생형 IL-2에 적어도 4개 당쇄를 결합시킨 IL-2 개변체도 들 수 있다. 야생형 IL-2에 4개의 당쇄를 결합시킨 예로서는, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 1, 3, 4, 5, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 32, 38, 51, 76, 84, 87, 88, 91, 92, 100, 102, 104, 108, 115, 119, 122, 123, 127 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 4개의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기로 치환된 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체를 들 수

있다.

- [0287] 또한, 야생형 IL-2에 당쇄가 4개 결합한 예로서는, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 1, 3, 4, 5, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 32, 38, 51, 76, 84, 87, 88, 91, 92, 100, 102, 104, 108, 115, 119, 122, 123, 127 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기와, 11, 12, 18, 20, 84, 87, 88, 91, 108, 115, 119, 122 및 123번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체가 보다 바람직하다.
- [0288] 본 발명의 일 실시 형태로서는, 야생형 IL-2에 적어도 5개 당쇄를 결합시킨 IL-2 개변체도 들 수 있다. 야생형 IL-2에 5개의 당쇄를 결합시킨 예로서는, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 1, 3, 4, 5, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 32, 38, 51, 76, 84, 87, 88, 91, 92, 100, 102, 104, 108, 115, 119, 122, 123, 127 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 5개의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기로 치환된 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체를 들 수 있다.
- [0289] 또한, 야생형 IL-2에 당쇄가 5개 결합한 예로서는, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 1, 3, 4, 5, 8, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 23, 32, 38, 51, 76, 84, 87, 88, 91, 92, 100, 102, 104, 108, 115, 119, 122, 123, 127 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기와, 1, 3, 5, 12, 32, 51, 76, 91, 100, 102 및 104번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 또는 아스파라긴 잔기 유래의 기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체가 보다 바람직하다.
- [0290] 본 발명의 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, 이하에 나타내는 것을 들 수 있다.
- [0291] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 3번째, 12번째, 32번째, 76번째 및 91번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0292] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 1번째, 3번째, 5번째, 12번째 및 91번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0293] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 3번째, 12번째, 51번째, 91번째 및 100번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0294] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 3번째, 12번째, 76번째, 91번째 및 100번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0295] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째, 91번째, 100번째, 102번째 및 104번째의 아미노산 잔기가, 각각 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0296] 상기 IL-2 개변체에 있어서, 결합하고 있는 당쇄는 어느 당쇄여도 되지만, 예를 들어 (식 8)로 표시되는 구조를 갖는 당쇄를 들 수 있다.
- [0297] 또한, 본 발명의 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, 이하에 나타내는 것도 들 수 있다.
- [0298] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 3번째, 12번째, 32번째, 76번째 및 91번째의 아미노산 잔기가, (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0299] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 1번째, 3번째, 5번째, 12번째 및 91번째의 아미노산 잔기가, (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0300] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 3번째, 12번째, 51번째, 91번째 및 100번째의 아미노산 잔기가, (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0301] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 3번째, 12번째, 76번째, 91번째 및 100번째의 아미노산 잔기가, (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.

- [0302] ·야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째, 91번째, 100번째, 102번째 및 104번째의 아미노산 잔기가, (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)인 IL-2 개변체.
- [0303] 본 실시 형태에 있어서는, 야생형 IL-2의 아미노산 서열은, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기 또는 알라닌 잔기로 치환한 아미노산 서열이 보다 바람직하다.
- [0304] [당쇄 결합 IL-2 개변체의 제조 방법]
- [0305] 당쇄 결합 IL-2 개변체의 제조 방법으로서, 당쇄 결합 펩티드를 화학 합성한 후에 폴딩시키는 방법(화학 합성법), 또는 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 당쇄 도입 위치의 아미노산 잔기를 당쇄가 결합할 수 있는 아미노산 잔기로 치환한 IL-2 개변체를 대장균 등의 숙주 세포에 의해 발현시킨 후에, 당쇄가 결합할 수 있는 아미노산 잔기에 당쇄를 결합시키는 방법(발현법)을 들 수 있다.
- [0306] 본 명세서에 있어서 「펩티드」란, 복수의 아미노산 잔기가 펩티드 결합을 통하여 쇄상에 연결된 것을 말한다. 특별히 기재가 없는 경우에는, 각 아미노산 잔기의 측쇄에는 보호기를 포함하고 있어도 되고, N 말단의 아미노기, C 말단의 카르복실기가 수식되어 있어도 된다.
- [0307] 당쇄 결합 IL-2 개변체는, 화학 합성법 및 발현법의 조합에 의해 제조되어도 된다. 이하, 각 방법에 대하여 설명한다.
- [0308] (화학 합성법에 의한 당쇄 결합 IL-2 개변체의 제조)
- [0309] 화학 합성법에 있어서는, 적어도 하나 이상의 당쇄 결합 펩티드 프래그먼트와 펩티드 프래그먼트를 순차 연결시킨 후에 폴딩시킴으로써 당쇄 결합 IL-2 개변체를 제조하는 것이 바람직하다.
- [0310] 연결시키는 펩티드 프래그먼트와 당쇄 결합 펩티드 프래그먼트의 총 수로서, 바람직하게는 2 내지 15개의 프래그먼트, 보다 바람직하게는 2 내지 5개의 프래그먼트를 사용하는 것이 바람직하다. 당쇄 결합 펩티드 프래그먼트 및 펩티드 프래그먼트는 티오에스테르화하고, 당쇄 결합 펩티드 티오에스테르 및 펩티드 티오에스테르로서 연결시켜도 된다.
- [0311] 펩티드 프래그먼트, 펩티드 티오에스테르를 합성하는 방법으로서, 예를 들어, 펩티드 합성에서 상용되는 방법 [예를 들어, 제5판 실험 화학 강좌 16 유기 화합물의 합성 IV: 카르복실산·아미노산·펩티드(일본 화학회 편, 마루젠 가부시키가이샤, 2005년), Chemical Ligation: Tools for Biomolecule Synthesis and Modification(Luca D. DiAndrea 등 저, Wiley, 2017년) 등에 기재된 방법]을 들 수 있다.
- [0312] 이때, 펩티드의 용해성을 향상시키는 등을 위해서, 2아미노산 대신 슈도프롤린(J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 9218-9227) 또는 이소펩티드(Angew. Chem. Int. Ed., 2015, 54, 8226-8230)를 사용할 수도 있다.
- [0313] 또한, 펩티드 프래그먼트, 펩티드 티오에스테르를 합성하는 방법으로서, 예를 들어, 펩티드 고상 합성법 대신 다카하시 등에 의해 개발된 Ajiphase 기술(Tetrahedron Lett., 2012, 53, 1936.), 및 오카다 등에 의해 개발된 Molecular Hiving 기술(J. Org. Chem., 2013, 78, 320-327) 등의 액상 합성법을 들 수 있다.
- [0314] 또한, 펩티드 프래그먼트를 합성하는 방법으로서, 예를 들어, 종래 공지된 방법에 따라서, 예를 들어, 폴리메라아제 연쇄 증폭 반응(PCR), 플라스미드 DNA의 조제, 제한 효소에 의한 DNA의 절단, 올리고뉴클레오타이드의 조제, DNA의 라이게이션, mRNA의 단리, 적절한 숙주 세포로의 DNA의 도입에 의한 형질 전환체의 취득, 형질 전환체의 배양을 포함하는 재조합 DNA법에 의해 제조하는 방법, 또는 무세포 단백질 발현법(Current Opinion in Biotechnology 2002, 13:297-303) 등에 기재된 방법을 들 수 있다. 펩티드 티오에스테르를 합성하는 방법으로서, 예를 들어, (Proc Natl Acad Sci USA 1998, 95:6705-6710) 등에 기재된 방법을 들 수 있다.
- [0315] 펩티드 프래그먼트, 펩티드 티오에스테르 등에 당쇄를 결합시키는 방법으로서, 예를 들어, 펩티드 프래그먼트의 시스테인 잔기의 측쇄 티올에 당쇄를 결합시키는 경우, 일본 특허 제4607017호 공보 등에 기재된 방법을 들 수 있다. 또한, 예를 들어, 펩티드 프래그먼트의 아스파라긴 잔기의 측쇄 아미드에 당쇄를 결합시키는 경우, 일본 특허 제4119428호 공보 등에 기재된 방법을 들 수 있다. 또한, 당쇄의 제조 방법으로서, 예를 들어, 국제 공개 제03/008431호에 기재된 방법 등을 들 수 있다.
- [0316] 펩티드 프래그먼트 및/또는 당쇄 결합 펩티드 프래그먼트를 연결하는 방법으로서, 펩티드 합성에서 상용되는 방법[예를 들어, 제5판 실험 화학 강좌 16 유기 화합물의 합성 IV: 카르복실산·아미노산·펩티드(일본 화학회

편, 마루젠 가부시키키가이샤, 2005년), Chemical Ligation: Tools for Biomolecule Synthesis and Modification(Luca D. DiAndrea 등 저, Wiley, 2017년), Chemoselective and Bioorthogonal Ligation Reactions Volume 1, 2(W.Russ Algar 등 저, Wiley, 2017년) 등에 기재된 방법]을 들 수 있고, C 말단을 티오에스테르로 한 펩티드 프래그먼트와, N 말단이 시스테인 잔기인 다른 펩티드 프래그먼트와의 네이티브 케미컬 라이게이션(NCL)법이 바람직하다.

- [0317] 펩티드 프래그먼트 및/또는 당쇄 결합 펩티드 프래그먼트의 연결은 임의의 개소에서 행할 수 있지만, NCL법을 사용하는 경우에는, C 말단측 펩티드 프래그먼트의 N 말단 아미노산 잔기로서는 시스테인 잔기 및 알라닌 잔기가 바람직하고, 보다 바람직하게는 시스테인 잔기이다.
- [0318] 펩티드 프래그먼트 및/또는 당쇄 결합 펩티드 프래그먼트를 연결하는 방법으로서, 구체적으로는 예를 들어, C 말단측 프래그먼트의 N 말단 아미노산 잔기로서 알라닌 잔기를 사용하는 경우에는, 통상적인 방법[Chemical Ligation: Tools for Biomolecule Synthesis and Modification(Luca D. DiAndrea 등 저, Wiley, 2017년) 등에 기재된 방법]에 따라서, 알라닌 잔기를 시스테인으로 잔기와 치환한 C 말단측 펩티드 프래그먼트와 N 말단측 펩티드 티오에스테르 프래그먼트를 NCL법에 의해 연결한 후에 탈황 반응에 의해 시스테인 잔기를 알라닌으로 잔기와 변환하는 방법을 들 수 있다.
- [0319] 당쇄 결합 펩티드를 폴딩하는 방법으로서, 예를 들어, 펩티드의 폴딩에서 상용되는 방법[예를 들어, 제5판 실험 화학 강좌 16 유기 화합물의 합성 IV: 카르복실산·아미노산·펩티드(일본 화학회 편, 마루젠 가부시키키가이샤, 2005년), Chemical Ligation: Tools for Biomolecule Synthesis and Modification(Luca D. DiAndrea 등 저, Wiley, 2017년) 등에 기재된 방법]을 들 수 있다.
- [0320] (발현법에 의한 당쇄 결합 IL-2 개변체의 제조)
- [0321] 발현법에 있어서는, 당쇄 결합 IL-2 개변체는, 종래 공지된 방법에 따라서, 예를 들어, 폴리메라아제 연쇄 증폭 반응(PCR), 플라스미드 DNA의 조제, 제한 효소에 의한 DNA의 절단, 올리고뉴클레오타이드의 조제, DNA의 라이게이션, mRNA의 단리, 적절한 숙주 세포로의 DNA의 도입에 의한 형질 전환체의 취득, 형질 전환체의 배양을 포함하는 재조합 DNA법, 및 화학 수식에 의한 당쇄 도입에 의해 제조할 수 있다.
- [0322] 당쇄 결합 IL-2 개변체는, 예를 들어, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 당쇄가 결합할 수 있는 아미노산 잔기를 포함하도록 변이가 도입된 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 발현 카세트를 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 숙주 세포에 해당 발현 벡터를 도입하고, 얻어진 단백질에 화학 수식으로 당쇄를 결합시킴으로써, 당쇄 결합 IL-2 개변체를 얻을 수 있다.
- [0323] 상기 발현 벡터의 제작에 사용하는 야생형 IL-2를 코딩하는 염기 서열로서는, NCBI 수탁 No. NM_000586으로 표현되는 염기 서열로부터 시그널 서열을 코딩하는 염기 서열을 제외한 염기 서열, 서열 번호 1에 기재되는 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열 등을 들 수 있다.
- [0324] IL-2를 코딩하는 염기 서열은, 인공 유전자 합성이나, 일본 DNA 데이터 뱅크(DDBJ) 등 유전자 뱅크에 등록된 서열로부터 적당한 프라이머를 설계하고, 당해 동물의 세포 또는 조직 등으로부터 추출한 mRNA로부터 RT-PCR을 행함으로써 취득할 수 있다.
- [0325] 또한, 당쇄 결합 IL-2 개변체는, 상기 발현 벡터를 목적으로 하는 당쇄를 생합성할 수 있는 숙주 세포에 도입함으로써 얻을 수도 있다.
- [0326] 상기 발현 벡터는, 구체적으로는 예를 들어, 상기 변이가 도입된 IL-2를 코딩하는 염기 서열을 원하는 위치(예를 들어, 5'말단)에 삽입한 발현에 적합한 벡터 중의 프로모터의 하류에 연결함으로써, 발현 벡터를 얻을 수 있다. 당해 발현 벡터는, 숙주에 맞춰서 분비 시그널을 갖고 있어도 된다.
- [0327] 당쇄가 결합할 수 있는 아미노산 잔기를 포함하도록 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 부위 특이적으로 변이를 도입하는 방법으로서, 공지된 방법을 사용할 수 있다(미국 특허 출원 공개 제2004/0171154호 명세서; Storici et al, 2001, Nature Biotechnology, 19, p.773-776; Kren et al, 1998, Nat. Med., vol.4, p.285-290; Calissano and Macino, 1996, Fungal Genet. News lett., Vol.43, p.15-16). 또한, 부위 특이적인 변이의 도입에는, 시판하고 있는 키트를 사용해도 된다.
- [0328] 구체적으로는, 예를 들어, 당쇄가 결합할 수 있는 아미노산 잔기로서 시스테인 잔기를 사용하는 경우, 야생형 IL-2의 아미노산 잔기를 시스테인 잔기로 치환한 IL-2 개변체는, 미국 특허 제5206344호 명세서, 국제 공개 제2016/025385호 등에 기재된 방법에 따라서 조제할 수 있고, 해당 IL-2 개변체로의 당쇄의 결합은, 일본 특허 제

4607017호 공보에 기재된 방법에 따라서 행할 수 있다.

- [0329] IL-2를 코딩하는 염기 서열을 포함하는 영역은, 5'말단에 번역 개시 코돈을 갖고, 또한 3'말단에는 번역 시종 코돈을 갖고 있어도 된다. 또한, IL-2를 코딩하는 염기 서열을 발현시키기 위해서는, 그의 상류에 프로모터를 접속하는 것이 바람직하다.
- [0330] 프로모터로서는, 유전자의 발현에 사용하는 숙주에 대응한 프로모터이면 특별히 제한되지 않는다. 형질 전환하는 숙주가 고초균일 경우에는, 예를 들어, SP01, SP02 및 PenP 프로모터를 들 수 있다. 숙주가 효모인 경우에는, 예를 들어, PH05, PGK, GAP 및 ADH 프로모터를 들 수 있다. 숙주가 대장균인 경우에는, trp 프로모터 (Ptrp), lac 프로모터 등을 들 수 있다. 숙주가 동물 세포인 경우에는, 예를 들어, SV40 유래의 프로모터 및 레트로바이러스의 프로모터를 들 수 있다.
- [0331] IL-2 단백질은 이. 콜라이 내에서 시그널 서열을 수반하지 않고 발현시킬 수도 있고, 해당 단백질은, 봉입체로부터 회수하고, 활성 형태로 리폴딩시킬 수 있다. 이러한 발현계는 미국 특허 제7105653호 명세서에 기재되어 있다.
- [0332] 시그널 서열을 사용하여, IL-2 단백질의 발현을 용이하게 할 수도 있다. 포유 동물 세포의 시그널 서열로서는, 예를 들어, 천연 인간 IL-2 시그널 서열, TCR 코딩 서열과 상동의 시그널 서열, 마우스 IL-2 코딩 서열과 상동의 시그널 서열을 들 수 있다. 또한, 다른 적절한 시그널 서열/숙주 세포쌍으로서, 예를 들어, 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 내에서 분비되게 하기 위한 비. 서브틸리스 sacB 시그널 서열, 및 피. 파스토리스(*P. pastoris*)에 의한 분비를 위한 사카로미세스 세레비시아에(*Saccharomyces cerevisiae*) α 접합 인자 시그널 서열, 또는 피. 파스토리스산 포스파타아제 phoI 시그널 서열을 포함한다. 시그널 서열은, 시그널 펩티다아제 절단 부위를 코딩하는 서열을 통하여, 단백질 코딩 서열에 직접 접속할 수도 있고, 짧은 뉴클레오티드 가교를 통하여 접속할 수도 있다.
- [0333] 진핵 생물 단백질 발현계의 전사 및 번역을 증강하기 위한 엘리먼트를 사용해도 되고, 예를 들어, 이중 프로모터의 양측 1000bp의 위치에, 콜리폴라워 모자이크 바이러스(CaMV) 프로모터를 두는 것에 의해, 식물 세포 내의 전사 레벨을, 10 내지 400배 높일 수 있다.
- [0334] 숙주 세포로서는, 특별히 한정되지 않고 원핵 세포 및 진핵 세포를 들 수 있다. 바람직한 숙주 세포로서는, 예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*), 바실루스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 등의 원핵 세포, 그리고 HEK, J558, NSO, SP2-O, CHO, COS, KB, NIH3T3, BALB/c3T3, 태줄 정맥 내피 세포 등의 동물 세포 및 에스. 세레비시아에(*S. cerevisiae*), 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 등의 효모주 및 Sf9 또는 Tn 등의 곤충 세포를 들 수 있다.
- [0335] 숙주 세포는, 목적으로 하는 당체의 생합성을 할 수 있도록 개변된 것이어도 된다.
- [0336] 숙주의 형질 전환은, 각각의 숙주에 대하여 일반적으로 행하여지고 있는 방법 또는 적용 가능한 방법이면 된다. 예를 들어, 숙주가 대장균이나 효모이면, 리튬법 등으로 제작한 적격 세포에 재조합 DNA를 포함하는 발현 벡터를 온도 쇼크법 또는 일렉트로포레이션법에 의해 도입한다. 숙주가 동물 세포이면, 증식기 등의 세포에 재조합 DNA를 포함하는 발현 벡터를 인산칼슘법, 리포펙션법 또는 일렉트로포레이션법에 의해 도입한다.
- [0337] 이와 같이 하여 얻어진 형질 전환체는, 각각의 숙주에 일반적으로 사용되고 있는 배지, 혹은 적용 가능한 배양액을 사용하여 배양하여 단백질을 발현시키고, 필요에 따라 추가로 화학 수식으로 당체를 결합시킴으로써, 당체 결합형 IL-2 단백질을 제조할 수 있다. 배양액으로서, 예를 들어, 숙주가 대장균일 경우에는 LB 배지 등의 배양액, 숙주가 효모일 경우에는 YPD 배지 등의 배양액, 숙주가 동물 세포일 경우에는 Dulbecco's MEM에 소태아 혈청을 첨가한 배양액을 들 수 있다.
- [0338] 배양은, 각각의 숙주에 대하여 일반적으로 사용되고 있는 조건 혹은 적용 가능한 조건이면 된다. 예를 들어, 숙주가 효모이면, 약 25 내지 37℃에서 약 12시간 내지 2주일 배양을 행하고, 필요에 따라, 통기나 교반을 가할 수 있다. 숙주가 동물 세포인 경우에는, 37℃에서, 5% 탄산 가스, 100% 습도의 조건에서 약 24시간 내지 2주일 배양을 행하고, 필요에 따라, 기상의 조건을 변화 또는 교반해도 된다.
- [0339] [PEG 결합 IL-2 개변체]
- [0340] 본 발명의 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, IL-2의 아미노산 서열에 있어서의, 4, 5, 6, 7, 8, 60, 78, 79, 99, 100, 101 및 129번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 PEG가 결합하고 있는 개변체가 바람직하고, 78 및 129번째의 적어도 한쪽의 아미노산 잔기에 PEG가 결합하고 있는 IL-

2 개변체가 보다 바람직하다.

[0341] 본 발명의 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의, 4, 5, 6, 7, 8, 60, 78, 79, 99, 100, 101 및 129번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체가 바람직하고, 78 및 129번째의 적어도 한쪽의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체가 보다 바람직하다.

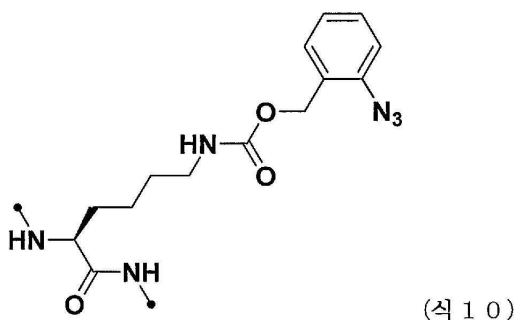
[0342] 본 실시 형태에 있어서, 야생형 IL-2의 아미노산 서열은, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단에 메티오닌 잔기가 결합한 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단 알라닌 잔기가 결손된 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단 알라닌 잔기가 결손되고 메티오닌 잔기가 결합한 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열 혹은 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단에 메티오닌 잔기가 결합한 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단 알라닌 잔기가 결손된 아미노산 서열, 및 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단 알라닌 잔기가 결손되고 메티오닌 잔기가 결합한 아미노산 서열에 있어서, 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기 또는 알라닌 잔기로 치환한 아미노산 서열이 보다 바람직하다.

[0343] 「PEG」란, 「 $-(CH_2CH_2O)_n-$ 」(n은 2 이상)으로 표시되는 에틸렌글리콜이 중합한 구조를 포함하는 수용성 폴리머인, 폴리(에틸렌글리콜) 분자이다. PEG로서는, PEG4, 평균 분자량 10kDa 이상의 것이 바람직하고, 예를 들어, 평균 분자량 10kDa, 20kDa, 30kDa, 40kDa, 50kDa, 60kDa, 70kDa, 80kDa, 90kDa, 100kDa, 200kDa 등을 들 수 있지만, 특별히 한정되지 않는다. 또한 PEG의 형상으로서는, 직쇄상이어도 되고, 분지쇄상이어도 되지만, 이들에 한정되지 않는다. IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 상기 아미노산 잔기에 PEG를 화학적으로 결합시킴으로써, IL-2R $_{\alpha\beta\gamma}$ 에 대한 선택성을 향상시킬 수 있다. IL-2R $_{\alpha\beta\gamma}$ 에 대한 선택성을 향상시킨 IL-2 개변체에 의해, Treg를 선택적으로 활성화시킬 수 있다.

[0344] PEG가 결합한 아미노산 잔기로서는, 예를 들어 PEG가 결합한 시스테인 잔기 및 비천연 아미노산 잔기를 들 수 있다.

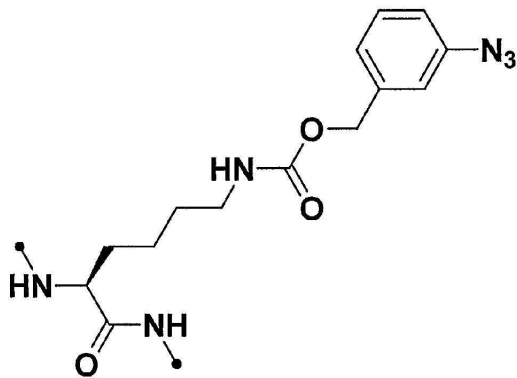
[0345] PEG가 결합한 비천연 아미노산 잔기로서는, 예를 들어, PEG가 결합한 티올기를 갖는 아미노산 잔기 유래의 기 그리고 PEG가 결합한 아지드기를 갖는 아미노산 잔기 유래의 기를 들 수 있다. 티올기를 갖는 아미노산 잔기로서는, 구체적으로는 예를 들어, 아세틸시스테인, 호모시스테인 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 아지드기를 갖는 아미노산 잔기로서는, 구체적으로는 예를 들어, o-Az-Z-Lys 잔기, m-Az-Z-Lys 잔기, N⁶-디아조리신, p-아지드페닐알라닌을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 비천연 아미노산 잔기로서는, 이외에, 국제 공개 제2017/030156호, [Nature. 2017 Nov 29; 551(7682): 644-647.], 국제 공개 제2013/068874호, 미국 출원 공개 제2014/0046030호 명세서, [Bioconj. Chem., 2014, 25(2), pp351-361], 국제 공개 제2014/044872호, [Bioconj. Chem. 2015 Nov 18; 26(11): 2249-60], 국제 공개 제2014/124258호, [Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 28; 108(26): 10437-42] 등에 기재되는 비천연 아미노산 잔기여도 된다. PEG와 상기 비천연 아미노산 잔기란, 링커를 통하여 결합하고 있어도 된다. 당해 링커는 PEG나 비천연 아미노산 잔기의 종류에 따라 적절히 변경할 수 있다.

[0346] 상기 o-Az-Z-Lys 잔기는, 하기 (식 10)으로 표시되는 구조를 갖는 아미노산 잔기이다.



[0347]

[0348] 상기 m-Az-Z-Lys 잔기는, 하기 (식 XX1)로 표시되는 구조를 갖는 아미노산 잔기이다.

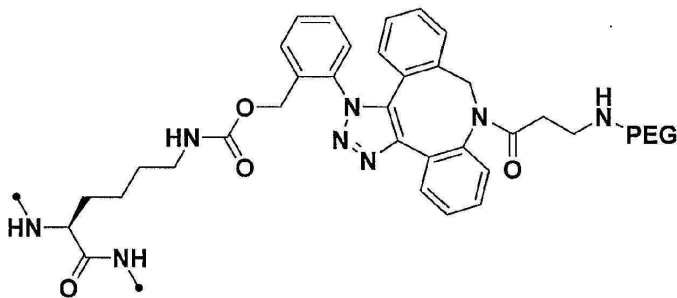


(식 XX1)

[0349]

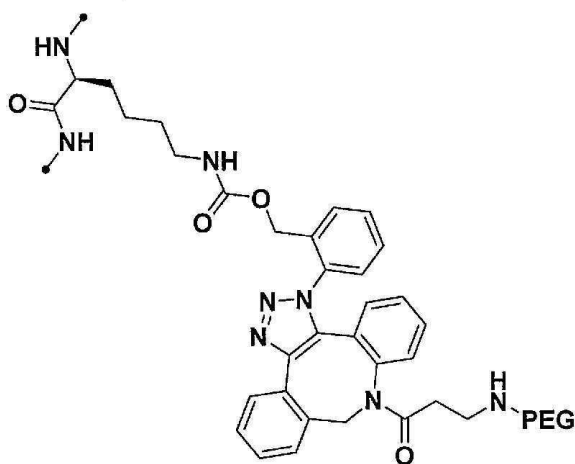
[0350] PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기 또는 PEG가 결합한 m-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기관, o-Az-Z-Lys 잔기 또는 m-Az-Z-Lys의 아지드기에 아세틸렌을 반응시켜서 생긴 링커를 통하여, PEG가 결합한 구조를 들 수 있다. 아세틸렌으로서는, 예를 들어, 디벤질시클로옥틴(DBCO), 비시클로[6.1.0]노닌(BCN) 등을 들 수 있다. 또한, 아세틸렌 대신에 [J. Am. Chem. Soc. 2006, 128, pp8820], [Org. Lett. 2000, 2, pp2141], [Org. Lett. 2000, 2, pp1939.] 등에 기재된 방법에 따라서, 아미드 결합을 통하여, PEG가 결합한 구조 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0351] PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기 또는 m-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기는, 구체적으로는 예를 들어, 하기 (식 11) 및/또는 (식 12), 또는 하기 (식 Y4) 및/또는 (식 Y5)로 표시되는 구조를 들 수 있다.



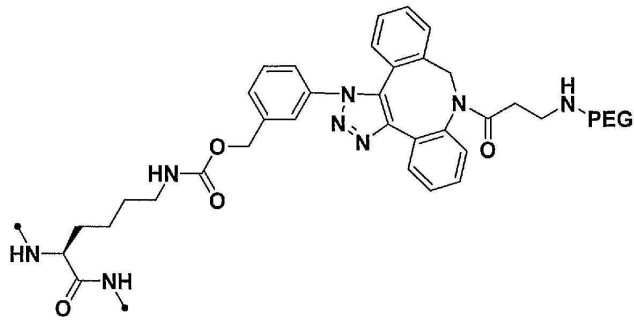
(식 11)

[0352]

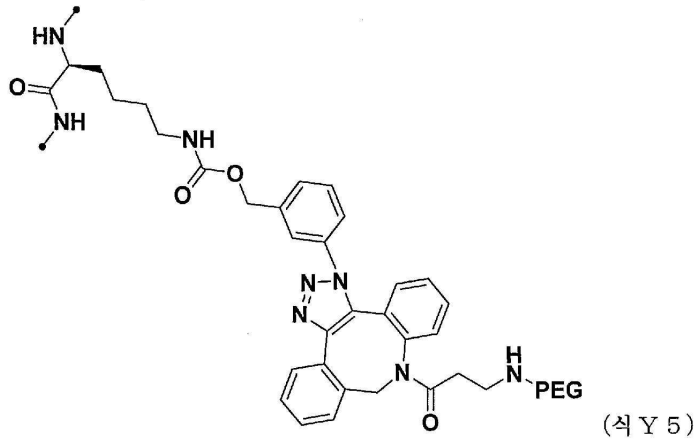


(식 12)

[0353]



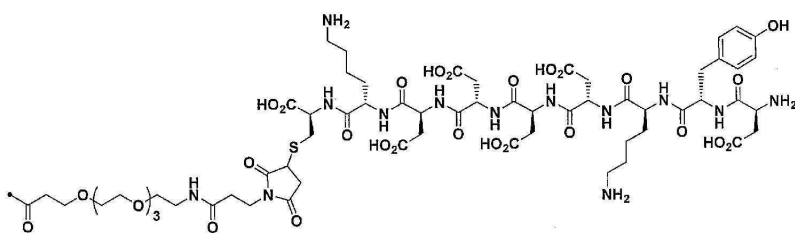
[0354]



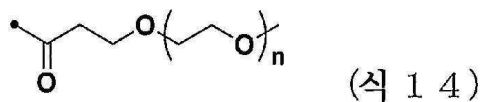
[0355]

[0356]

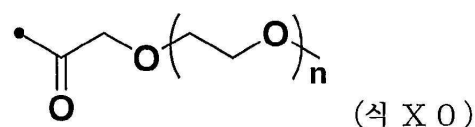
식 중 PEG로서는, PEG의 평균 분자량이나 구조에 따라 다양한 PEG를 사용할 수 있다. 구체적으로는 예를 들어, 하기 (식 13), 평균 분자량 20kDa인 경우의 하기 식 (14), 평균 분자량 30kDa인 경우의 하기 식 (14), 평균 분자량 40kDa인 경우의 하기 (식 X0), 평균 분자량 50kDa인 경우의 하기 (식 15), 평균 분자량 40kDa인 경우의 하기 (식 16), 평균 분자량 80kDa인 경우의 하기 (식 16), 평균 분자량 40kDa인 경우의 하기 (식 X1), 평균 분자량 80kDa인 경우의 하기 (식 X2) 또는 평균 분자량 40kDa인 경우의 하기 (식 X3)으로 표시되는 구조를 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 또한, 식 중 PEG가 하기 (식 X3)으로 표시되는 경우, $O(CH_2CH_2O)_nCH_3$ 의 4 분지쇄에 한하지 않고, 2 분지쇄 또는 3 분지쇄의 것도 마찬가지로 사용할 수 있다.



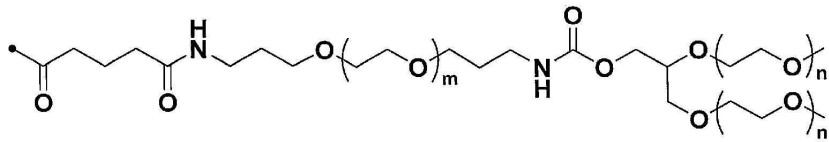
[0357]



[0358]

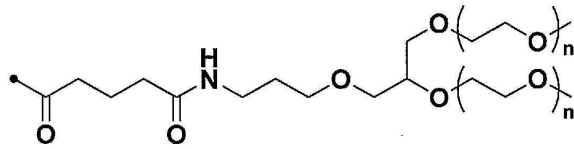


[0359]



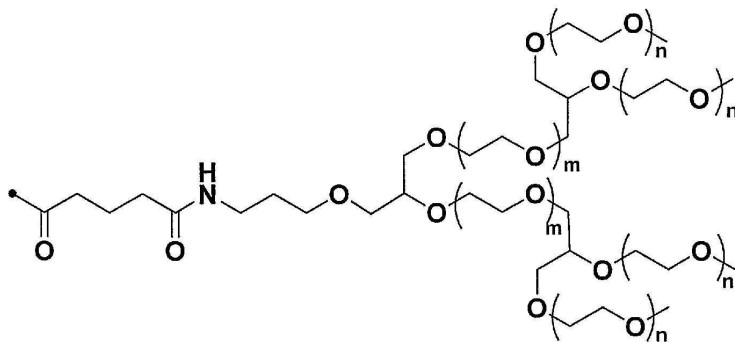
(식 15)

[0360]



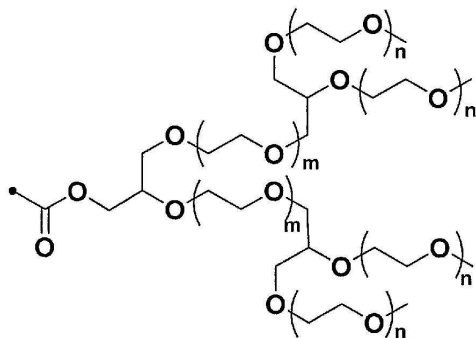
(식 16)

[0361]



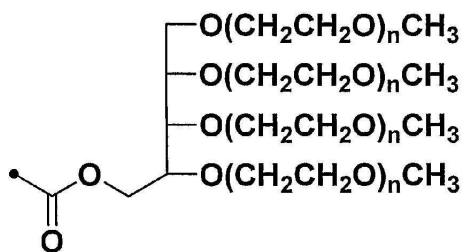
(식 X 1)

[0362]



(식 X 2)

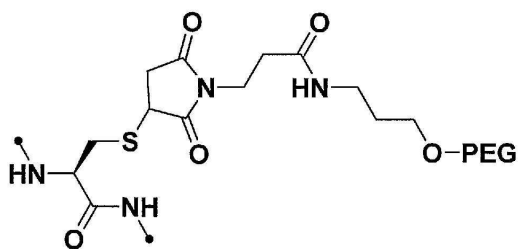
[0363]



(식 X 3)

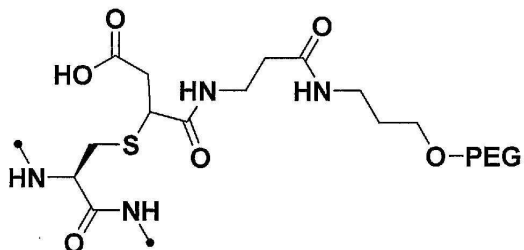
[0364]

[0365] PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기관, 구체적으로는 예를 들어, 시스테인 잔기의 티올기에 말레이미드를 반응시켜서 생긴 링커를 통하여 PEG가 결합한 하기 (식 Y6) 및/또는 (식 Y7) 및/또는 (식 Y8)로 표시되는 구조, 시스테인 잔기의 티올기에 할로아세틸기를 반응시켜서 생긴 링커를 통하여 PEG가 결합한 하기 (식 Y9)로 표시되는 구조 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.



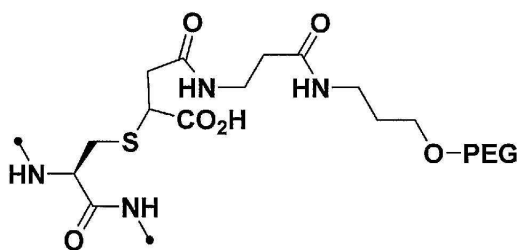
(식 Y 6)

[0366]



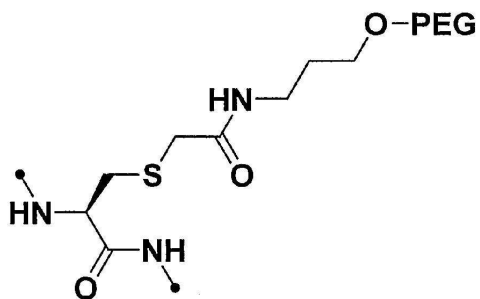
(식 Y 7)

[0367]



(식 Y 8)

[0368]

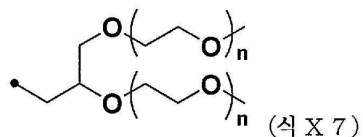


(식 Y 9)

[0369]

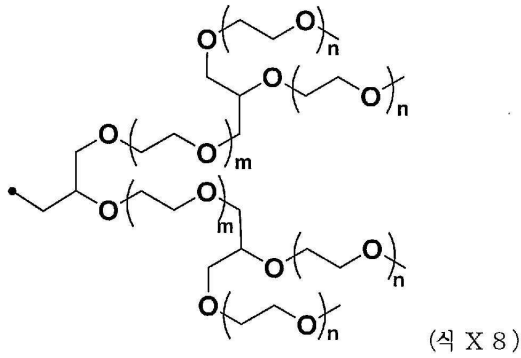
[0370]

식 중 PEG란, 구체적으로는 예를 들어, 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X7) 또는 평균 분자량 80kDa인 경우의 (식 X7) 또는 평균 분자량 80kDa인 경우의 (식 X8)로 표시되는 구조를 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.



(식 X 7)

[0371]



- [0372]
- [0373] 본 발명의 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, 이하에 기재하는 IL-2 개변체가 바람직하다.
- [0374] 본 발명의 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, 예를 들어 IL-2에 하나의 PEG가 결합한, 이하에 기재하는 IL-2 개변체를 들 수 있다.
- [0375] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 4번째의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0376] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 5번째의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0377] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 6번째의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0378] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 7번째의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0379] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 8번째의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0380] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 60번째의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0381] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 78번째의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0382] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 79번째의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0383] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 99번째의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0384] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 100번째의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0385] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 101번째의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0386] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 129번째의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0387] 상기 IL-2 개변체에 있어서, 결합하는 PEG의 크기로서는, 평균 분자량 20kDa 이상의 PEG가 바람직하고, 예를 들어 평균 분자량 20, 30, 40, 50, 60, 70, 또는 80kDa의 PEG를 들 수 있다.
- [0388] 본 발명의 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, 예를 들어 IL-2에 하나의 PEG가 결합한, 이하에 기재하는 IL-2 개변체도 들 수 있다.
- [0389] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 4번째의 아미노산 잔기가, 평균 분자량 20kDa 또는 평균 분자량

30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.

- [0390] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 5번째의 아미노산 잔기가, 평균 분자량 20kDa 또는 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0391] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 6번째의 아미노산 잔기가, 평균 분자량 20kDa 또는 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0392] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 7번째의 아미노산 잔기가, 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0393] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 8번째의 아미노산 잔기가, 평균 분자량 20kDa 또는 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0394] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 60번째의 아미노산 잔기가, 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0395] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 78번째의 아미노산 잔기에 평균 분자량 20kDa 또는 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14), 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X0), 평균 분자량 50kDa인 경우의 (식 15), 평균 분자량 40kDa 또는 80kDa인 경우의 (식 16), 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X1), 평균 분자량 80kDa인 경우의 (식 X2) 또는 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X3)으로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0396] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 79번째의 아미노산 잔기가, 평균 분자량 20kDa 또는 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0397] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 99번째의 아미노산 잔기가, 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0398] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 100번째의 아미노산 잔기가, 평균 분자량 20kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0399] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 101번째의 아미노산 잔기가, 평균 분자량 20kDa 또는 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0400] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 129번째의 아미노산 잔기에 (식 13), 혹은 평균 분자량 20kDa 또는 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14), 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X0), 평균 분자량 40kDa 또는 80kDa인 경우의 (식 16), 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X1), 평균 분자량 80kDa인 경우의 (식 X2), 평균 분자량 50kDa인 경우의 (식 15) 또는 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X3)으로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0401] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 129번째의 아미노산 잔기가, 40kDa인 경우의 (식 16)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0402] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 129번째의 아미노산 잔기가, 평균 분자량 40kDa 또는 80kDa인 경우의 (식 X7) 및/또는 (식 X8)로 표시되는 PEG가 결합하고 스테인 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0403] 본 발명의 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, IL-2에 적어도 2개의 PEG가 결합한 이하에 기재하는 IL-2 개변체가 바람직하다.
- [0404] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 4번째 및 78번째의 아미노산 잔기가, 각각 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0405] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 5번째 및 78번째의 아미노산 잔기가, 각각 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0406] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 8번째 및 78번째의 아미노산 잔기가, 각각 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0407] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 78번째 및 79번째의 아미노산 잔기가, 각각 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환된 IL-2 개변체.

- [0408] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 78번째 및 99번째의 아미노산 잔기가, 각각 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0409] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 78번째 및 129번째의 아미노산 잔기가, 각각 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0410] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 4번째 및 129번째의 아미노산 잔기가, 각각 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0411] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 5번째 및 129번째의 아미노산 잔기가, 각각 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0412] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 8번째 및 129번째의 아미노산 잔기가, 각각 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0413] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 79번째 및 129번째의 아미노산 잔기가, 각각 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0414] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 99번째 및 129번째의 아미노산 잔기가, 각각 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0415] 상기 IL-2 개변체에 있어서, 결합하는 PEG의 크기로서는, 평균 분자량 20kDa 이상의 PEG가 바람직하고, 예를 들어 평균 분자량 20, 30, 40, 50, 60, 70, 혹은 80kDa의 PEG를 들 수 있다.
- [0416] 본 발명의 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, IL-2에 적어도 2개의 PEG가 결합한, 이하에 기재하는 IL-2 개변체도 바람직하다.
- [0417] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 4번째 및 78번째의 아미노산 잔기가, 각각 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0418] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 4번째 및 78번째의 아미노산 잔기가, 각각 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X0)으로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0419] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 4번째 및 78번째의 아미노산 잔기가, 각각 평균 분자량 50kDa인 경우의 (식 15)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0420] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 5번째 및 78번째의 아미노산 잔기가, 각각 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0421] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 5번째 및 78번째의 아미노산 잔기가, 각각 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X0)으로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0422] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 8번째 및 78번째의 아미노산 잔기가, 각각 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14), 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X0)으로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0423] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 78번째 및 79번째의 아미노산 잔기가, 각각 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0424] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 78번째 및 99번째의 아미노산 잔기가, 각각 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0425] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 78번째 및 129번째의 아미노산 잔기가, 각각 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0426] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 4번째 및 129번째의 아미노산 잔기가, 각각 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14), 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X0) 또는 평균 분자량 50kDa인 경우의 (식 15)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0427] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 5번째 및 129번째의 아미노산 잔기가, 각각 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14), 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X0) 또는 평균 분자량 50kDa인 경우의 (식 15)로 표시되는 PEG

가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.

- [0428] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 8번째 및 129번째의 아미노산 잔기가, 각각 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14), 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X0) 또는 평균 분자량 50kDa인 경우의 (식 15)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0429] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 79번째 및 129번째의 아미노산 잔기가, 각각 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0430] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 99번째 및 129번째의 아미노산 잔기가, 각각 평균 분자량 30kDa인 경우의 (식 14)로 표시되는 PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기로 치환된 IL-2 개변체.
- [0431] 본 실시 형태에 있어서, 야생형 IL-2의 아미노산 서열은, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단에 메티오닌 잔기가 결합한 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단 알라닌 잔기가 결손된 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단 알라닌 잔기가 결손되고 또한 메티오닌 잔기가 결합한 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열 혹은 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단에 메티오닌 잔기가 결합한 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단 알라닌 잔기가 결손된 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단 알라닌 잔기가 결손되고 또한 메티오닌 잔기가 결합한 아미노산 서열에 있어서, 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기 또는 알라닌 잔기로 치환한 아미노산 서열이 바람직하다.
- [0432] [PEG 결합 IL-2 개변체의 제조법]
- [0433] PEG 결합 IL-2 개변체의 제조 방법으로서, 화학 합성법과 발현법을 들 수 있다. PEG 결합 IL-2 개변체는, 화학 합성법 및 발현법의 조합에 의해 제조되어도 된다. 이하, 각 방법에 대하여 설명한다.
- [0434] (화학 합성법에 의한 PEG 결합 IL-2 개변체의 제조)
- [0435] 화학 합성법에 의한 PEG 결합 IL-2 개변체의 제조 방법으로서, 예를 들어, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 PEG 도입 위치의 아미노산 잔기를 단백질의 부위 특이적인 PEG화를 가능하게 하는 화학적 반응성을 갖는 아미노산 잔기로 치환한 펩티드를 화학 합성한 후에, 폴딩시켜서 얻어지는 IL-2 개변체에 대하여 PEG를 결합시켜서 PEG 결합 IL-2 개변체를 제조하는 방법, 및 PEG 결합 펩티드 프래그먼트를 화학 합성한 후에 폴딩시킴으로써 PEG 결합 IL-2 개변체를 제조하는 방법을 들 수 있다.
- [0436] PEG 결합 펩티드 프래그먼트는, 펩티드 프래그먼트에 있어서의 단백질의 부위 특이적인 PEG화를 가능하게 하는 화학적 반응성을 갖는 아미노산 잔기에 PEG를 도입하는 방법에 의해 제조할 수 있다.
- [0437] PEG 결합 펩티드 프래그먼트를 화학 합성한 후에 폴딩시키는 방법으로서, 적어도 하나 이상의 PEG 결합 펩티드 프래그먼트와 펩티드 프래그먼트를 순차 연결시킨 후에 폴딩하는 방법, 또는 화학 합성한 IL-2 전체 길이 펩티드 프래그먼트에 대하여 PEG를 도입한 후에 폴딩시키는 방법 등을 들 수 있다.
- [0438] 펩티드 프래그먼트를 합성하는 방법, 및 펩티드 프래그먼트를 순차 연결시킨 후에 폴딩시키는 방법으로서, 예를 들어, (화학 합성법에 의한 당쇄 결합 IL-2 개변체의 제조)의 항에 있어서 상기한 방법과 마찬가지로의 방법을 들 수 있다.
- [0439] 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 PEG 도입 위치의 아미노산 잔기를 단백질의 부위 특이적인 PEG화를 가능하게 하는 화학적 반응성을 갖는 아미노산 잔기로 치환한 펩티드를 합성한 뒤, 폴딩에 의해 얻어지는 IL-2 개변체에 대하여 PEG를 도입하는 방법으로서, 예를 들어, 미국 특허 제5206344호 명세서, 국제 공개 제2012/065086호에 기재된 방법을 들 수 있다. 또한, 펩티드 프래그먼트에 있어서의 단백질의 부위 특이적인 PEG화를 가능하게 하는 화학적 반응성을 갖는 아미노산 잔기에 PEG를 도입하는 방법으로서 [Biomaterials 22(2001) 405-417], [Int. J. Mol. Sci. 2015, 16, 25831-25864], [J. Pharm. Sci., 105(2016) 460-475]에 기재된 방법을 들 수 있다.
- [0440] 단백질의 부위 특이적인 PEG화를 가능하게 하는 화학적 반응성을 갖는 아미노산 잔기로서는, 예를 들어, 티올기를 갖는 아미노산 잔기 그리고 아지드기를 갖는 아미노산 잔기를 들 수 있다. 티올기를 갖는 아미노산 잔기로서는, 예를 들어, 시스테인, 아세틸시스테인, 호모시스테인 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0441] 아지드기를 갖는 아미노산 잔기로서는, 예를 들어, o-Az-Z-Lys 잔기, m-Az-Z-Lys 잔기, N⁶-아지드리신, p-아지드페닐알라닌을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 다른 것은, 국제 공개 제2017/030156호, [Nature.

2017 Nov 29; 551(7682): 644-647.], 국제 공개 제2013/068874호, 미국 특허 출원 공개 제2014/0046030호 명세서, [Bioconj. Chem., 2014, 25(2), pp351-361], 국제 공개 제2014/044872호, [Bioconj. Chem. 2015 Nov 18; 26(11): 2249-60], 국제 공개 제2014/124258호, [Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 28; 108(26): 10437-42]에 기재되는 비천연 아미노산 잔기여도 된다. PEG와 상기 비천연 아미노산 잔기란, 링커를 통하여 결합하고 있어도 된다.

[0442] 상기 링커란, 탄소수 1 내지 20의 탄화수소기이며, 탄소가 산소, 질소, 황 등으로 수식되어 있어도 되고, 또한 탄소가 산소, 질소, 황으로 치환되어 있어도 된다. 당해 링커는 PEG나 비천연 아미노산 잔기의 종류에 따라 적절히 변경할 수 있다.

[0443] 화학 합성법으로서는, 구체적으로는 예를 들어, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 PEG 도입 위치의 아미노산 잔기를, 시스테인 등 티올기를 갖는 아미노산 잔기 및/또는 o-Az-Z-Lys 잔기 등 아지드기를 갖는 아미노산 잔기로 치환한 펩티드를 화학 합성한 뒤, 폴딩에 의해 얻어지는 IL-2 개변체에 대하여 PEG를 도입하여 PEG 결합 IL-2 개변체를 제조하는 방법을 들 수 있다. 시스테인 잔기를 도입한 IL-2 개변체에 PEG를 결합시키는 방법으로는, 미국 특허 제5206344호 명세서에 기재된 방법 등을 들 수 있다.

[0444] 또한, 구체적으로는 예를 들어, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 PEG 도입 위치의 아미노산 잔기를, 시스테인 또는 비천연 아미노산 잔기로 치환한 펩티드를 화학 합성한 뒤, 폴딩에 의해 얻어지는 IL-2 개변체에 대하여 PEG를 도입하여 PEG 결합 IL-2 개변체를 제조하는 방법을 들 수 있다.

[0445] PEG 결합 IL-2 개변체의 합성에는, 하기 (식 XX2)로 표시되는 PEG 시약을 사용할 수 있다.

X-(Linker)_n-PEG-Me (식 XX2)

[0446]

[0447] 식 중, X는, 티올기와 반응성을 갖는 관능기, 아지드기와 반응성을 갖는 관능기, N 말단 아미노기와 선택적으로 반응하는 관능기를 나타낸다.

[0448] 티올과 반응성을 갖는 관능기로서는, 구체적으로는 예를 들어, 티올기, 말레이미드기, 아크릴기, 요오도아세틸기, 브로모아세틸기, 클로로아세틸기 등을 들 수 있고, 바람직하게는 요오도아세틸기, 말레이미드기가 좋다.

[0449] 아지드와 반응성을 갖는 관능기로서는, 구체적으로는 예를 들어, 아세틸렌기, DBCO기, DBN기, 중원환 구조 상에 헥테로 원자를 포함하는 시클로알킨(Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54, 1190-1194), 티오에스테르기 등을 들 수 있고, 바람직하게는 DBCO를 들 수 있다.

[0450] N 말단 아미노기와 선택적으로 반응하는 관능기로서는, 구체적으로는 예를 들어 알데히드 등을 들 수 있다.

[0451] 식 중, Linker로서는, 탄소수 1 내지 20의 탄화수소기이며, 탄소가 산소, 질소, 황 등으로 수식되어 있어도 되고, 탄소가 산소, 질소, 황으로 치환되어 있어도 된다.

[0452] 식 중, n은 0 또는 1을 나타낸다.

[0453] 식 중, PEG란, 「-(CH₂CH₂O)_m-」(m은 2 이상)로 표현되는 에틸렌글리콜이 중합한 구조를 포함하는 수용성 폴리머인, 폴리(에틸렌글리콜) 분자이다. PEG의 분자량은, 예를 들어, PEG4, 평균 분자량 20kDa, 30kDa, 40kDa, 50kDa, 60kDa, 70kDa, 80kDa, 90kDa, 100kDa, 또는 200kDa 등을 들 수 있지만, 특별히 한정되지 않는다. 또한 PEG의 형상으로서, 직쇄상이어도 되고, 분지쇄상이어도 되지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0454] 사용하는 PEG 시약에 의해, 입체 이성체, 광학 이성체, 기하 이성체 등이 형성되는 경우가 있지만, 이들 이성체는 공지된 방법으로 분리하여 사용해도 되고, 혼합물로서 사용해도 된다. 얻어지는 IL-2 개변체는 거대 분자이기 때문에 이들 부분 구조의 이성체의 구조적 상이는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

[0455] 상기 PEG 시약은, 시판하고 있는 PEG 시약 이외에도, 시판하고 있는 PEG 시약으로부터 조제한 PEG 시약을 사용할 수도 있다. 예를 들어, 말단에 카르복실기나 N-히드록시숙신이미드에스테르 등의 카르복실산 등가체를 갖는 PEG 시약에 대하여 티올기 또는 아지드기와 반응성을 갖는 아민을 촉합시킴으로써, PEG 시약을 조제할 수 있다. 또한, 말단에 아미노기를 갖는 PEG 시약에 대하여 티올기 또는 아지드기와 반응성을 갖는 카르복실기나 N-히드록시숙신이미드에스테르 등의 카르복실산 등가체를 촉합하는 것 등에 의해서도 합성할 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0456] (발현법에 의한 PEG 결합 IL-2 개변체의 제조)

- [0457] 발현법에 의한 PEG 결합 IL-2 개변체의 제조 방법으로서, 예를 들어, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 PEG 도입 위치의 아미노산 잔기를 단백질의 부위 특이적인 PEG화를 가능하게 하는 화학적 반응성을 갖는 아미노산 잔기로 치환한 IL-2 개변체를 대장균 등의 숙주 세포에 의해 발현시킨 후에, 해당 IL-2 개변체에 있어서의 해당 아미노산 잔기에 화학 수식에 의해 PEG를 결합시킴으로써 PEG 결합 IL-2 개변체를 제조하는 방법을 들 수 있다.
- [0458] 구체적으로는, 예를 들어, (발현법에 의한 당쇄 결합 IL-2 개변체의 제조)의 항에 있어서 상기한 방법과 마찬가지로 하여, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 PEG 도입 위치에, 단백질의 부위 특이적인 PEG화를 가능하게 하는 화학적 반응성을 갖는 아미노산 잔기로의 치환이 도입된 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함하는 발현 카세트를 적절한 발현 벡터에 삽입하고, 해당 발현 벡터를 대장균 등의 숙주 세포에 도입하여 형질 전환체를 얻고, 해당 형질 전환체에 IL-2 개변체를 발현시키고, 해당 IL-2 개변체의 시스테인 잔기 또는 비천연 아미노산 잔기에 화학 수식에 의해 PEG를 결합시킴으로써, PEG 결합 IL-2 개변체를 얻는 방법을 들 수 있다.
- [0459] 대장균을 숙주 세포로 하는 경우, 발현 효율 또는 제작한 단백질의 정제 등을 위해서, 야생형 IL-2의 N 말단에 링커를 도입하여 발현 카세트를 구성해도 된다. 해당 링커로서는, 예를 들어, 메티오닌 잔기, 8개의 폴리히스티딘, 및 메티오닌 잔기를 포함하는 8개의 폴리히스티딘 등을 들 수 있다.
- [0460] IL-2의 아미노산 잔기를 시스테인 잔기로 치환한 IL-2 개변체의 조제 방법으로서, 예를 들어, 미국 특허 제 5206344호 명세서, 국제 공개 제2016/025385호 등에 기재된 방법을 들 수 있다.
- [0461] IL-2의 아미노산 잔기를 단백질의 부위 특이적인 PEG화를 가능하게 하는 화학적 반응성을 갖는 비천연 아미노산 잔기로 치환한 IL-2 개변체의 조제 방법으로서, 국제 공개 제2017/030156호, [Nature. 2017 Nov 29; 551(7682): 644-647.], 국제 공개 제2013/068874호, 미국 특허 출원 공개 제2014/0046030호 명세서, [Bioconj. Chem., 2014, 25(2), pp351-361], 국제 공개 제2014/044872호, [Bioconj. Chem. 2015 Nov 18; 26(11): 2249-60], 국제 공개 제2014/124258호, [Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 28; 108(26): 10437-42]에 기재되는 방법을 들 수 있다.
- [0462] 또한, IL-2의 아미노산 잔기를 o-Az-Z-Lys 잔기 또는 m-Az-Z-Lys 잔기 o-Az-Z-Lys 잔기로 치환한 IL-2 개변체의 제조 방법, 및 당해 IL-2 개변체에 PEG를 결합시키는 방법으로서, 예를 들어, 국제 공개 제2017/030156호에 기재된 방법을 들 수 있다.
- [0463] IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 PEG 도입 위치의 아미노산 잔기를 단백질의 부위 특이적인 PEG화를 가능하게 하는 화학적 반응성을 갖는 아미노산 잔기로 치환한 IL-2 개변체 대하여 PEG를 도입하는 방법으로서, 일본 특허 제 5206344호 공보, 국제 공개 제2012/065086호, 국제 공개 제2017/030156호, [Nature. 2017 Nov 29; 551(7682): 644-647.], 국제 공개 제2013/068874호, 미국 출원 공개 제2014/0046030호 명세서, [Bioconj. Chem., 2014, 25(2), pp351-361], 국제 공개 제2014/044872호, [Bioconj. Chem. 2015 Nov 18; 26(11): 2249-60], 국제 공개 제2014/124258호, [Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 28; 108(26): 10437-42]에 기재된 방법 등에 따라서 PEG를 도입할 수 있다.
- [0464] [당쇄 결합 IL-2 개변체 또는 PEG 결합 IL-2 개변체에, 추가로 PEG 또는 당쇄를 결합시킨 IL-2 개변체, 및 그의 제조 방법]
- [0465] 상술한 당쇄 결합 IL-2 개변체는, 추가로 PEG가 결합하고 있어도 된다. 또한, 상술한 PEG 결합 IL-2 개변체도, 추가로 당쇄가 결합하고 있어도 된다. 이들 IL-2 개변체는, 상술한 [당쇄 결합 IL-2 개변체의 제조 방법], 및 [PEG 결합 IL-2 개변체의 제조 방법]을 조합하여 제조할 수 있다. 또한, 국제 공개 제2012/065086호 등에 따라서, N 말단의 아미노기에 선택적으로 PEG를 도입할 수도 있다.
- [0466] PEG 결합 IL-2 개변체에 대하여 추가로 당쇄를 도입하는 경우, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 84, 87, 88, 91, 92, 108, 115, 119, 122, 123 및 130번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 당쇄가 결합하고 있는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체가 바람직하고, 12, 115 및 119번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기에 당쇄가 결합하고 있는 IL-2 개변체가 보다 바람직하다.
- [0467] 당쇄 결합 IL-2 개변체에 대하여 추가로 PEG를 도입하는 경우, 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의, 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 51, 60, 78, 79, 99, 100, 101 및 129번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개

변체가 바람직하고, 1, 3, 51 및 78번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기가, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 개변체가 보다 바람직하다.

[0468] PEG가 결합한 아미노산 잔기로서는, 예를 들어 PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기, N 말단 아미노산 잔기 유래의 기 및 비천연 아미노산 잔기를 들 수 있다.

[0469] 시스테인 잔기 유래의 기 또는 N 말단 아미노산 잔기 유래의 기란, 시스테인 잔기의 측쇄 티올기 또는 N 말단 아미노산 잔기의 주쇄 아미노기에 화학 수식 등에 의해 PEG가 결합한 기를 말한다. PEG와, 시스테인 잔기 유래의 기 또는 N 말단 아미노산 잔기 유래의 기란, 링커를 통하여 결합하고 있어도 된다. 당해 링커는 PEG나 비천연 아미노산 잔기의 종류에 따라 적절히 변경할 수 있다.

[0470] PEG가 결합한 비천연 아미노산 잔기로서는, 예를 들어 티올기를 갖는 아미노산 잔기 유래의 기 또는 아지드기를 갖는 아미노산 잔기 유래의 기에 화학 수식 등에 의해 PEG가 결합한 기 등을 들 수 있다. 티올기를 갖는 아미노산 잔기 유래의 기로서는, 예를 들어, PEG가 결합한 아세틸시스테인 잔기 유래의 기, PEG가 결합한 호모시스테인 잔기 유래의 기 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.

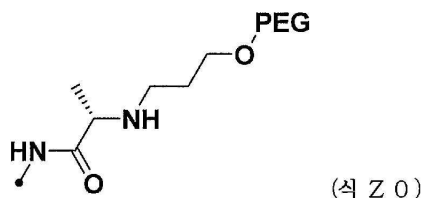
[0471] PEG가 결합한 아지드기를 갖는 아미노산 잔기 유래의 기로서는, 예를 들어, PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기, PEG가 결합한 m-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기, PEG가 결합한 N⁶-디아조리신 잔기 유래의 기, PEG가 결합한 p-아지드페닐알라닌 잔기 유래의 기 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0472] 비천연 아미노산 잔기로서는, 이외에, 국제 공개 제2017/030156호, [Nature. 2017 Nov 29; 551(7682): 644-647.], 국제 공개 제2013/068874호, 미국 출원 공개 제2014/0046030호 명세서, [Bioconj. Chem., 2014, 25(2), pp351-361], 국제 공개 제2014/044872호, [Bioconj. Chem. 2015 Nov 18; 26(11): 2249-60], 국제 공개 제2014/124258호, [Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jun 28; 108(26): 10437-42] 등에 기재되는 비천연 아미노산 잔기여도 된다. PEG와 상기 비천연 아미노산 잔기란, 링커를 통하여 결합하고 있어도 된다. 당해 링커는 PEG나 비천연 아미노산 잔기의 종류에 따라 적절히 변경할 수 있다.

[0473] 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 1번째의 아미노산 잔기를, PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환하는 경우, PEG가 결합한 N 말단 아미노산 잔기 유래의 기, PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기, PEG가 결합한 아세틸시스테인 잔기 유래의 기, PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기, PEG가 결합한 m-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기가 바람직하고, PEG가 결합한 N 말단 아미노산 잔기 유래의 기, PEG가 결합한 아세틸시스테인 잔기 유래의 기가 보다 바람직하다.

[0474] 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서의 3, 4, 5, 6, 7, 8, 51, 60, 78, 79, 99, 100, 101 및 129번째의 아미노산 잔기로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나의 아미노산 잔기를 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환하는 경우, PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기, PEG가 결합한 o-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기, PEG가 결합한 m-Az-Z-Lys 잔기 유래의 기가 바람직하고, PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기가 보다 바람직하다.

[0475] PEG가 결합한 N 말단 아미노산 잔기 유래의 기란, 구체적으로는 예를 들어, 알라닌 잔기의 주쇄 아미노기에 대하여 알데히드를 반응시켜서 생긴 링커를 통하여 PEG가 결합된 하기 (식 Z0)으로 표시되는 구조 등을 들 수 있다.



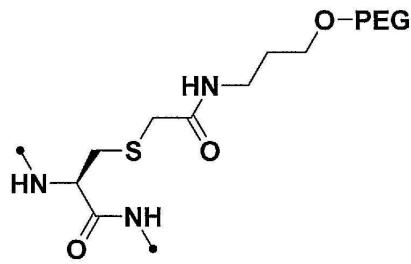
[0476]

[0477] 식 중 PEG란, 구체적으로는 예를 들어, 평균 분자량 20kDa인 경우의 하기 (식 X00)으로 표시되는 구조를 들 수 있지만 이들에 한정되지 않는다.



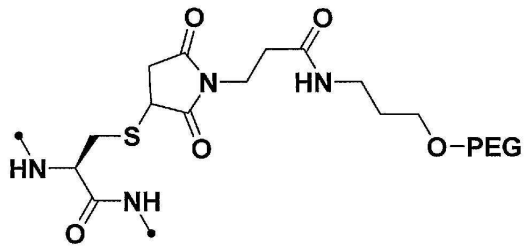
[0478]

[0479] PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기판, 구체적으로는 예를 들어, 시스테인 잔기의 측쇄 티올기에 대하여 할로아세틸기를 반응시켜서 생긴 링커를 통하여 PEG가 결합된 하기 (식 X4)로 표시되는 구조, 말레이미드를 반응시켜서 생긴 링커를 통하여 PEG가 결합된 하기 (식 X5) 및/또는 (식 X6) 및/또는 (식 X7) 등을 들 수 있다.



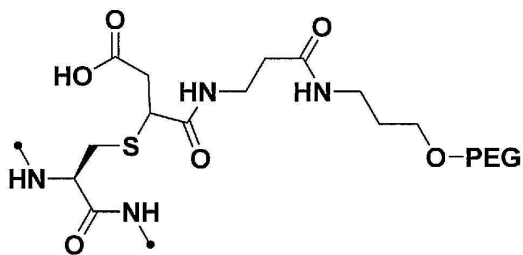
(식 X 4)

[0480]



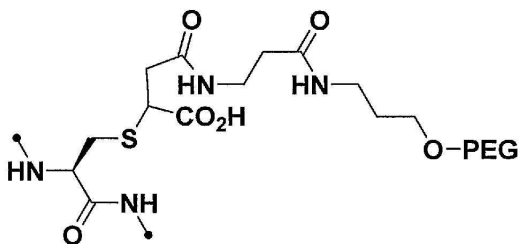
(식 X 5)

[0481]



(식 X 6)

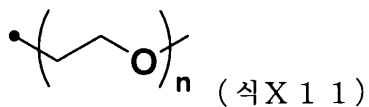
[0482]



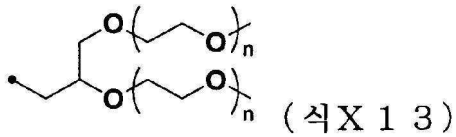
(식 X 7)

[0483]

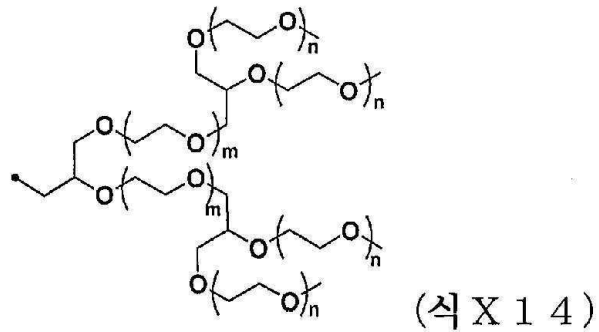
[0484] 식 중 PEG로서 구체적으로는, 평균 분자량 20kDa인 경우의 하기 (식 X11), 평균 분자량이 40kDa인 경우의 하기 (식 X11), 평균 분자량이 40kDa인 경우의 하기 (식 X13), 평균 분자량이 80kDa인 경우의 하기 (식 X13), 평균 분자량이 40kDa인 경우의 하기 (식 X14), 평균 분자량이 80kDa인 경우의 하기 (식 X14), 평균 분자량이 50kDa인 경우의 하기 (식 X15)로 표시되는 구조를 들 수 있지만 이들에 한정되지 않는다.



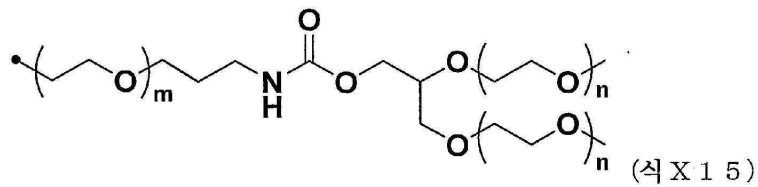
[0485]



[0486]

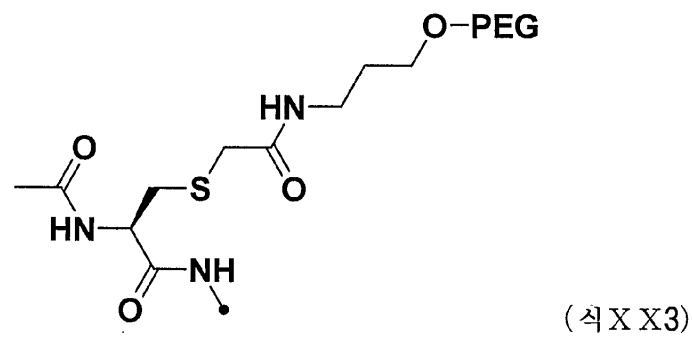


[0487]

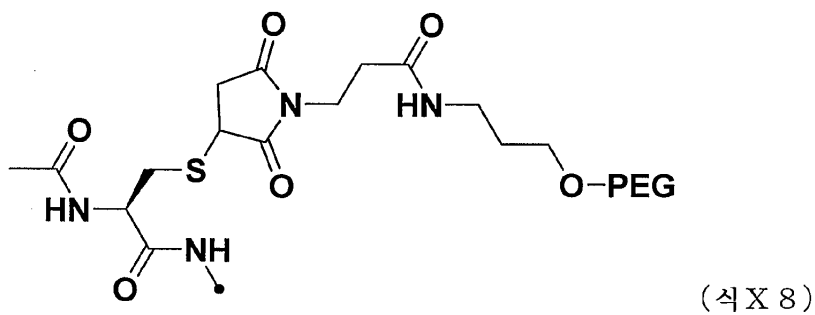


[0488]

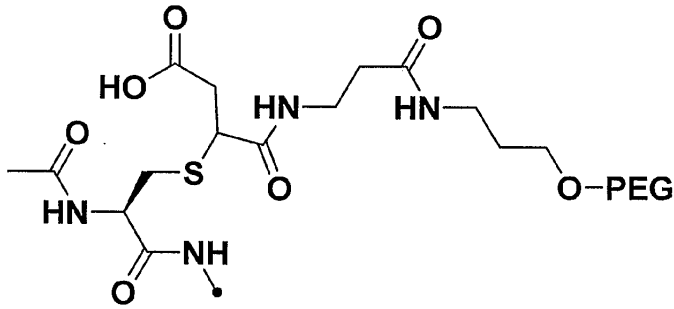
[0489] PEG가 결합한 아세틸시스테인 잔기 유래의 기판, 구체적으로는 예를 들어, 아세틸시스테인 잔기의 측쇄 티올기에 대하여 할로아세틸기를 반응시켜서 생긴 링커를 통하여 PEG가 결합된 하기 (식 XX3)으로 표시되는 구조, 말레이미드를 반응시켜서 생긴 링커를 통하여 PEG가 결합된 하기 (식 X8) 및/또는 (식 X9) 및/또는 (식 X10) 등을 들 수 있다.



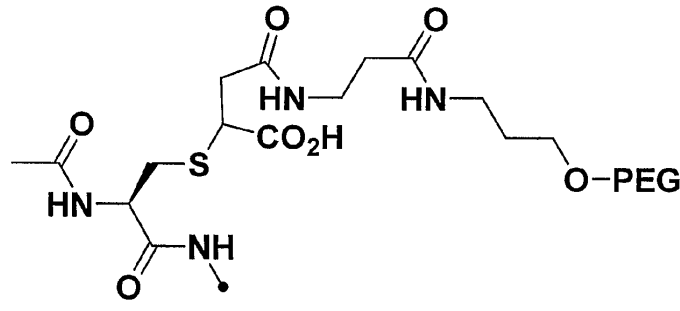
[0490]



[0491]



[0492]



[0493]

[0494]

식 중 PEG란, 구체적으로는 예를 들어, 평균 분자량이 40kDa인 경우의 상기 (식 X11), 평균 분자량이 40kDa인 경우의 상기 (식 X13), 평균 분자량이 80kDa인 경우의 상기 (식 X13), 평균 분자량이 80kDa인 경우의 상기 (식 X14), 평균 분자량이 50kDa인 경우의 상기 (식 X15)로 표시되는 구조를 들 수 있지만 이들에 한정되지 않는다.

[0495]

본 발명의 IL-2 개변체의 일 실시 형태로서는, 이하에 기재하는 IL-2 개변체가 바람직하다.

[0496]

· 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 11번째의 아미노산 잔기가 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되고, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.

[0497]

· 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째의 아미노산 잔기가 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되고, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.

[0498]

· 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 19번째의 아미노산 잔기가 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되고, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.

[0499]

· 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 38번째의 아미노산 잔기가 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되고, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.

[0500]

· 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 91번째의 아미노산 잔기가 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되고, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.

[0501]

· 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 91번째의 아미노산 잔기가 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되고, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.

[0502]

· 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 91번째 및 119번째의 아미노산 잔기가 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되고, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.

[0503]

· 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 91번째의 아미노산 잔기가 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되고, 또한 3번째의 아미노산 잔기가 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.

[0504]

· 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 15번째의 아미노산 잔기가 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되고, 또한 3번째의 아미노산 잔기가 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.

[0505]

· 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 119번째의 아미노산 잔기가 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되고, 또한 3번째의 아미노산 잔기가 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.

[0506]

· 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 91번째의 아미노산 잔기가 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로

치환되고, 또한 51번째의 아미노산 잔기가 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.

- [0507] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째의 아미노산 잔기가 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되고, 또한 78번째의 아미노산 잔기가 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0508] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 119번째의 아미노산 잔기가 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되고, 또한 78번째의 아미노산 잔기가 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0509] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 15번째의 아미노산 잔기가 당쇄가 결합한 아미노산 잔기로 치환되고, 또한 78번째의 아미노산 잔기가 PEG가 결합한 아미노산 잔기로 치환되어 있는 IL-2 개변체.
- [0510] 상술한 본 발명의 PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체에 결합시키는 당쇄, PEG는, 상술한 다양한 것을 조합하여 사용할 수 있다.
- [0511] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 11번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 7)로 표시되는 구조이며, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 (식 X0)에 나타내는 PEG가 결합한 N 말단 아미노산 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 X0)의 PEG의 구조가 평균 분자량 20kDa인 경우의 (식 X00)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0512] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 7)로 표시되는 구조이며, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 (식 X0)에 나타내는 PEG가 결합한 N 말단 아미노산 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 X0)의 PEG의 구조가 평균 분자량 20kDa인 경우의 (식 X00)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0513] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 38번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 7)로 표시되는 구조이며, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 (식 X0)에 나타내는 PEG가 결합한 N 말단 아미노산 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 X0)의 PEG의 구조가 평균 분자량 20kDa인 경우의 (식 X00)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0514] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 91번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 7)로 표시되는 구조이며, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 (식 X0)에 나타내는 PEG가 결합한 N 말단 아미노산 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 X0)의 PEG의 구조가 평균 분자량 20kDa인 경우의 (식 X00)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0515] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째의 아미노산 잔기 및 91번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)로 표시되는 구조이며, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 (식 XX3)으로 표시되는 PEG가 결합한 아세틸시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 XX3)의 PEG의 구조가 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X13) 또는 평균 분자량 50kDa인 경우의 (식 X15)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0516] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째의 아미노산 잔기 및 91번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)로 표시되는 구조이며, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 (식 X8) 및/또는 (식 X9) 및/또는 (식 X10)으로 표시되는 PEG가 결합한 아세틸시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 X8) 및/또는 (식 X9) 및/또는 (식 X10)의 PEG의 구조가 평균 분자량 80kDa인 경우의 (식 X13), 또는 평균 분자량 50kDa인 경우의 (식 X15), 또는 평균 분자량 80kDa인 경우의 (식 X14)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0517] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 19번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)로 표시되는 구조이며, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 (식 XX3)으로 표시되는 PEG가 결합한 아세틸시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 XX3)의 PEG의 구조가 평균 분자량 50kDa인 경우의 (식 X15), 또는 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X13)으로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.
- [0518] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 91번째 및 119번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스템인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)로 표시되는 구조이며, 또한 1번째의 아미노산 잔기가 (식 XX3)으로 표시되는 PEG가 결합한 아세틸시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 XX3)의 PEG의 구조가 평균 분자량 50kDa인 경우의 (식 X15)로 표시되는 구조인, IL-2 개변

체.

- [illegible]

내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)로 표시되는 구조이며, 또한 51번째의 아미노산 잔기가 (식 X4)로 표시되는 PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 X4)의 PEG의 구조가 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X11), 또는 평균 분자량 50kDa인 경우의 (식 X15)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.

[0528] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)로 표시되는 구조이며, 또한 78번째의 아미노산 잔기가 (식 X4)로 표시되는 PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 X4)의 PEG의 구조가 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X11), 또는 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X13)으로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.

[0529] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)로 표시되는 구조이며, 또한 78번째의 (식 X5) 및/또는 (식 X6) 및/또는 (식 X7)로 표시되는 PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 X5) 및/또는 (식 X6) 및/또는 (식 X7)의 PEG의 구조가 평균 분자량 40kDa 또는 80kDa인 경우의 (식 X13), 또는 평균 분자량 80kDa인 경우의 (식 X14)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.

[0530] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 119번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)로 표시되는 구조이며, 또한 78번째의 아미노산 잔기가 (식 X4)로 표시되는 PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 X4)의 PEG의 구조가 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X13)으로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.

[0531] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 12번째 및 119번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)로 표시되는 구조이며, 또한 78번째의 (식 X5) 및/또는 (식 X6) 및/또는 (식 X7)로 표시되는 PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 X5) 및/또는 (식 X6) 및/또는 (식 X7)의 PEG의 구조가 평균 분자량 80kDa인 경우의 (식 X13), 또는 평균 분자량 80kDa인 경우의 (식 X14)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.

[0532] · 야생형 IL-2의 아미노산 서열에 있어서, 15번째의 아미노산 잔기가 (식 1)에 나타내는 당쇄가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 1)의 Saccharide의 구조가 (식 8)로 표시되는 구조이며, 또한 78번째의 아미노산 잔기가 (식 X4)로 표시되는 PEG가 결합한 시스테인 잔기 유래의 기로 치환되어 있고, 또한 (식 X4)의 PEG의 구조가 평균 분자량 40kDa인 경우의 (식 X12)로 표시되는 구조인, IL-2 개변체.

[0533] 본 실시 형태에 있어서, 야생형 IL-2의 아미노산 서열은, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단에 메티오닌 잔기가 결합한 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단 알라닌 잔기가 결손된 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단 알라닌 잔기가 결손되고 메티오닌 잔기가 결합한 아미노산 서열, 또는 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열 혹은 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단에 메티오닌 잔기가 결합한 아미노산 서열, 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단 알라닌 잔기가 결손된 아미노산 서열, 및 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단 알라닌 잔기가 결손되고 메티오닌 잔기가 결합한 아미노산 서열에 있어서, 125번째의 아미노산 잔기를 세린 잔기 또는 알라닌 잔기로 치환한 아미노산 서열이 바람직하다.

[0534] 본 발명의 IL-2 개변체에는, 일반적으로 체내 동태를 개선하는 것이 알려져 있는 동태 개선 소자를 결합시킴으로써, 혈중 반감기를 제어할 수 있다. 동태 개선 소자로서는, 당쇄, 펩티드, 단백질, 지질 등을 들 수 있고, [Therapeutic Proteins(Roland Kontermann편, Wiley Blackwell, 2012년)]에 기재된 방법을 조합하여 사용할 수 있다. 구체적으로는, 본 발명의 IL-2 개변체의 Treg 세포 증식 활성의 선택성에 영향을 주지 않도록, 시알릴화, HESylation, O-그리코실화, PEG 미믹으로서의 펩티드, 단백질의 융합, 항체의 정상 영역 또는 Fc 영역의 융합, 알부민 등의 혈청 단백질과의 융합(지질 도입하여 알부민과 융합시키는 방법도 포함한다), 또는 인지질, 나노 입자와의 결합, 나노 입자로의 봉중 등의 방법에 의해 혈중 반감기를 제어할 수 있다.

[0535] [IL-2 개변체가 갖는 생물 활성의 평가]

[0536] IL-2 개변체의 생물 활성은, 당해 기술분야에 있어서의 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 평가할 수 있다. 평가 방법에는 후술하는 실시예에 있어서 기재된 것을 포함한다. IL-2 개변체의 생물 활성을 평가하는 방법으로서, 구체적으로는 예를 들어, 이하의 (a) 내지 (e)의 방법을 들 수 있다. 이들 방법은, IL-2 개변체의 치료 효과, 효능 및 약역학적 특성의 측정에도 사용할 수 있다.

- [0537] (a) IL-2 개변체에 의해 자극받는 Treg 세포의 증식 활성을 측정하는 방법
- [0538] IL-2 개변체 또는 야생형 IL-2를 첨가한 배지에서 Treg 세포를 배양하고, Treg 세포의 증식률을 측정한다. 이외에, Treg 세포의 증식 활성을 측정하는 방법으로서, 예를 들어, 플로우 사이토메트리에 의해, 혼합 세포 집단 내의 Treg 세포수의 증대를 측정하는 방법, 및 $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ 마커 표현형 또는 $CD4^+CD25^+CD127^{low}$ 마커 표현형의 존재 비율을 측정하는 방법; 분리한 Treg 세포로의 트리튬화 티미딘의 도입에 의해 측정하는 방법; Ki-67 등의 증식에 관련하는 세포 주기 단백질의 Treg 세포 내의 발현의 증대를 측정하는 방법; Treg 세포 내의 카르복시플루오레세인숙신이미딜에스테르(CFSE) 등의 생체 형광 색소의 세포 분열에 관련하는 희석을 플로우 사이토메트리에 의해 측정하는 방법을 들 수 있다.
- [0539] (b) IL-2 개변체에 의해 자극받는 NK 세포의 증식 활성을 측정하는 방법
- [0540] IL-2 개변체 또는 야생형 IL-2를 첨가한 배지에서 NK 세포를 배양하고, NK 세포의 증식률을 측정한다. 이외에, NK 세포의 증식 활성을 측정하는 방법으로서, 예를 들어, 플로우 사이토메트리에 의해, 혼합 세포 집단 내의 NK 세포수의 증대를 측정하는 방법, 및 $CD56^+$ 마커 표현형의 존재 비율을 측정하는 방법; 분리한 NK 세포로의 트리튬화 티미딘의 도입에 의해 측정하는 방법; Ki-67 등의 증식에 관련하는 세포 주기 단백질의 NK 세포 내의 발현의 증대를 측정하는 방법; NK 세포 내의 CFSE 등의 생체 형광 색소의 세포 분열에 관련하는 희석을 플로우 사이토메트리에 의해 측정하는 방법을 들 수 있다.
- [0541] 본 발명의 IL-2 개변체는, 야생형 IL-2와 비교하여, Treg 증식 활성이 높고/높거나 NK 세포 증식 활성이 낮은 것이 바람직하다. 야생형 IL-2 대신에 야생형 IL-2와 동등한 Treg 증식 활성 및/또는 NK 세포 증식 활성을 갖는 IL-2 개변체를 사용해도 된다.
- [0542] (c) IL-2 개변체에 의해 자극받은 Treg에 의한 반응자 T 세포(Tresp)의 증식 저해 활성을 측정하는 방법
- [0543] IL-2 개변체 또는 야생형 IL-2를 첨가한 배지에서 Treg를 배양하고, 이것과 적당한 TCR 자극 존재 하에서 Tresp($CD4^+Tresp$, $CD8^+Tresp$)와 공배양했을 때의 Tresp의 증식률을 측정하고, 야생형 IL-2와 비교하여 IL-2 개변체에 의한 Tresp의 증식 저해율을 평가한다. 본 발명의 IL-2 개변체는, 야생형 IL-2와 비교하여, 적어도 동등한 Tresp의 증식 저해 활성을 갖는 Treg를 증식시키는 것이 바람직하다. 야생형 IL-2 대신에 야생형 IL-2와 동등한 Tresp의 증식 저해 활성을 갖는 Treg를 증식시키는 IL-2 개변체를 사용해도 된다.
- [0544] (d) 생체외(Ex vivo) 어세이
- [0545] Teff나 NK 세포의 기능적 이펙터 분자인 IL-4, IL-6, $IFN\gamma$ 또는 $TNF\alpha$ 등의 염증성 사이토카인에 대해서, IL-2 개변체 또는 야생형 IL-2를 첨가한 배지에서 PBMC를 배양하고, 배양 상청 중의 사이토카인 산생량을 측정한다. 또한, 마찬가지로 방법으로 항염증성 사이토카인의 산생량을 측정해도 된다. 본 발명의 IL-2 개변체는, 야생형 IL-2와 비교하여, 염증성 사이토카인의 산생량을 감소시키고/시키거나 항염증성 사이토카인의 산생량이 증가시키는 것이 바람직하다. 야생형 IL-2 대신에 야생형 IL-2와 동등한 염증성 사이토카인 및/또는 항염증성 사이토카인을 산생시키는 IL-2 개변체를 사용해도 된다.
- [0546] (e) Treg/Teff비의 측정
- [0547] IL-2 개변체 또는 야생형 IL-2를 첨가한 배지에서 배양한 PMBC을 항인간 CD4 항체, 항인간 CD25 항체, 항인간 Foxp3 항체와 반응시켜, 플로우 사이토메트리에 의한 CD4 양성 분획 중에서 $CD25^+FOXP3^{high}$ 분획을 Treg, $CD25^+FOXP3^{low}$ 분획을 이펙터 T 세포(Teff)로 하고, 그의 존재비[Treg(%) / Teff(%)](Treg/Teff비)를 산출한다. 데이터의 해석은 시판하고 있는 데이터 해석 소프트웨어(예를 들어, TreeStar사제 Flowjo, version7.6.5)에 의해 행한다. 본 발명의 IL-2 개변체는, 야생형 IL-2와 비교하여, Treg/Teff비가 향상되어 있는 것이 바람직하다. 야생형 IL-2 대신에 야생형 IL-2와 동등한 Treg/Teff비를 갖는 IL-2 개변체를 사용해도 된다.
- [0548] [조성물]
- [0549] 본 발명의 일 실시 형태는, 유효량의 본 발명의 IL-2 개변체를 포함하는 조성물이다. 조성물의 형태로서는, 예를 들어, 의약 조성물 및 시약을 들 수 있다.
- [0550] 후술하는 실시예에 있어서 나타내는 바와 같이, 본 발명의 IL-2 개변체에 의해 Treg를 선택적으로 활성화시키는 점에서, 본 발명의 IL-2 개변체를 포함하는 조성물은, 면역 제어 작용을 갖는 조성물로서 적합하게 사용할 수

있다. 또한, 본 발명의 일 실시 형태로서, 본 발명의 IL-2 개변체를 포함하는 면역 질환의 치료제가 제공된다.

- [0551] 본 발명의 조성물이 사용되는 병태 또는 질환으로서, 예를 들어, 전신성 에리테마토데스, 건선, 만성 이식편 대 숙주병, 급성 이식편대숙주병, 크론병, 궤양성 대장염, 염증성 장질환, 다발성 경화증, 복강병, 특발성 혈전성 혈소판 감소성 자반병, 중증 근무력증, 시그렌 증후군, 강피증, 천식, 포도막염, 표피 과형성, 원형 탈모증, 베체트병, 다카야스 동맥염, 연골 염증, 뼈 분해, 관절염, 약년성 관절염, 약년성 관절 류머티즘, 소관절형 약년성 관절 류머티즘, 다관절형 약년성 관절 류머티즘, 전신성 발병 약년성 관절 류머티즘, 약년성 강직성 척추염, 약년성 장질환성 관절염, 약년성 반응성 관절염, 약년성 라이터 증후군, SEA 증후군(혈청 음성, 건부착부증, 관절증 증후군), 약년성 피부근염, 약년성 건선성 관절염, 약년성 강피증, 약년성 전신성 에리테마토데스, 약년성 맥관염, 소관절형 관절 류머티즘, 다관절형 관절 류머티즘, 전신성 발병 관절 류머티즘, 강직성 척추염, 장질환성 관절염, 반응성 관절염, 라이터 증후군, 피부근염, 건선성 관절염, 맥관염, 근염, 다발성 근염, 피부근염, 변형성 관절증, 결절성 다발동맥염, 베게너 육아종, 동맥염, 류마티스성 다발 근육통, 사르코이도시스, 경화증, 원발성 담즙성 간경변, 경화성 담관염, 피부염, 아토피성 피부염, 아테롬성 동맥경화증, 스틸병, 만성 폐색성 폐질환, 길랭-바레 증후군, 1형 당뇨병, 그레이브스병, 에디슨병, 레이노 현상, 자기 면역성 간염, 위스콧·알드리치 증후군 등 염증성 질환, 자기 면역 질환, 알레르기성 질환 등을 들 수 있다.
- [0552] 본 발명에 있어서의 조성물은, 공지된 제제학적 방법에 의해 제제화할 수 있다. 예를 들어, 캡슐제, 정제, 환제, 액제, 산제, 과립제, 세립제, 필름 코팅제, 펠릿제, 트로키제, 설하제, 저작제, 버컬제, 페이스트제, 시럽제, 현탁제, 엘릭시르제, 유제, 도포제, 연고제, 경고제, 찜질제, 경피 흡수형 제제, 로션제, 흡인제, 에어로졸제, 주사제 및 좌제 등으로서, 경구적 또는 비경구적으로 사용할 수 있다.
- [0553] 이들 제제화에 있어서는, 약리학상 허용되는 담체, 구체적으로는 예를 들어, 멸균수나 생리 식염수, 식물유, 용제, 기제, 유화제, 현탁제, 계면 활성제, 안정제, 향미제, 방향제, 부형제, 비히클, 방부제, 결합제, 희석제, 등장화제, 무통화제, 증량제, 붕괴제, 완충제, 코팅제, 활택제, 착색제, 감미제, 점조제, 교미 교취제, 용해 보조제 혹은 기타의 첨가제 등과 적절히 조합할 수 있다.
- [0554] 또한, 본 발명에 있어서의 조성물의 투여에는 시린지를 사용해도 되지만, 다른 디바이스를 사용해도 된다. 디바이스로서는, 예를 들어 인젝터 펜, 오토인젝터 디바이스, 무바늘 디바이스, 또는 피하 패치 디바이스 등을 들 수 있다.
- [0555] 본 발명의 조성물은, 인간을 포함하는 동물을 대상으로서 사용할 수 있지만, 인간 이외의 동물로서는 특별히 제한은 없고, 여러가지 가축, 가금, 애완동물, 실험용 동물 등을 대상으로 할 수 있다. 구체적으로는, 예를 들어, 돼지, 소, 말, 양, 염소, 닭, 오리, 타조, 집오리, 개, 고양이, 토끼, 햄스터, 마우스, 래트, 원숭이 등을 들 수 있지만, 이들에 제한되지 않는다. 또한, 건강 상태여도 되고, 이환 상태여도 된다. 단, 본 발명의 조성물이 의약 조성물일 경우에는, 이환 상태의 동물을 대상으로서 사용한다.
- [0556] 조성물에 있어서의 IL-2 개변체의 유효량은, 예를 들어, 치료의 상황 및 목적에 의존한다. 적절한 투여량은, IL-2 개변체가 사용되는 적응증, 투여의 루트, 그리고 투여하는 대상의 사이즈(체중, 체표면 또는 기관 사이즈) 및/또는 상태(연령 및 건강 상태)에 의존하여 조정할 수 있다.
- [0557] 예를 들어, 1회당 투여량 또는 섭취량은, 일반적으로 1ng/kg체중 내지 100mg/kg체중이며, 바람직하게는 0.01 μg/kg체중 내지 1mg/kg체중이다.
- [0558] 본 발명의 조성물의 제품(의약품, 시약) 또는 그의 설명서는, 면역을 억제하기 위하여 사용되는 등의 취지의 표시를 한 것일 수 있다. 여기서 「제품 또는 설명서에 표시를 한」이란, 제품의 본체, 용기, 포장 등에 표시를 한 것, 혹은 제품의 정보를 개시하는 설명서, 첨부 문서, 선전물, 기타의 인쇄물 등에 표시를 한 것을 의미한다.
- [0559] [IL-2R에 대한 선택성]
- [0560] 본 발명의 일 실시 형태는, IL-2R_{αβγ}에 대한 IL-2의 선택성을 향상시키는 방법이다. 본 실시 형태에 있어서는, 상기한 방법에 의해 IL-2에 당쇄 또는 PEG를 결합시켜서 개변함으로써, IL-2R_{αβγ}에 대한 IL-2의 선택성을 향상시킬 수 있다.
- [0561] IL-2R_{αβγ}에 대한 IL-2의 선택성이 향상되어 있을 때, IL-2R_α 서브유닛에 대한 IL-2 개변체의 친화성이, 야생형 IL-2의 친화성보다도 향상되어 있는 경우와, IL-2R_β 및 γ 서브유닛의 적어도 한쪽에 대한 IL-2 개변체의

친화성이, 야생형 IL-2의 친화성보다도 저하되어 있는 경우가 있을 수 있다.

- [0562] 본 발명의 일 실시 형태는, IL-2R α 서브유닛에 대한 IL-2의 친화성을 향상시키는 방법이다. 「IL-2R α 서브유닛에 대한 IL-2의 친화성이 향상되는」이란, 야생형 IL-2와 비교하여, IL-2 개변체의 IL-2R α 서브유닛에 대한 친화성이 향상되어 있는 것을 말한다. 본 실시 형태에 있어서는, 상기한 방법에 의해 IL-2에 당쇄 또는 PEG를 결합시켜서 개변함으로써, 야생형 IL-2보다도, 제작된 IL-2 개변체의 IL-2R α 서브유닛에 대한 친화성을 향상시켜, IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 IL-2의 선택성을 향상시킬 수 있다.
- [0563] IL-2R α 서브유닛에 대한 IL-2의 친화성은, IL-2R α (CD25)에 대한 IL-2의 결합성을 Biacore에 의해 측정하고, 정상 상태(steady state) 모델을 사용하여 해리상수 K_D 를 구함으로써 평가할 수 있다. Biacore에 의한 IL-2R α 에 대한 IL-2의 결합성은, 실시예에 있어서 후술하는 방법에 의해 측정할 수 있다. 본 실시 형태에 있어서는, IL-2R α 에 대한 IL-2 개변체의 K_D 는, 야생형 IL-2의 개변체보다도 낮은 것이 바람직하다. 야생형 IL-2 대신에 야생형 IL-2와 동등한 IL-2R α 로의 친화성을 갖는 IL-2 개변체를 사용해도 된다.
- [0564] 본 발명의 일 실시 형태는, IL-2R β 및 γ 서브유닛의 적어도 한쪽에 대한 IL-2의 친화성을 저하시키는 방법이다. 「IL-2R β 및 γ 서브유닛의 적어도 한쪽에 대한 IL-2의 친화성이 저하되는」이란, 야생형 IL-2와 비교하여, IL-2 개변체의 IL-2R β 및 γ 서브유닛의 적어도 한쪽에 대한 친화성이 저하되어 있는 것을 말한다. 본 실시 형태에 있어서는, 상기한 방법에 의해 IL-2에 당쇄 또는 PEG를 결합시켜서 개변함으로써, 야생형 IL-2와 비교하여, 제작된 IL-2 개변체의 IL-2R β 및 γ 서브유닛의 적어도 한쪽에 대한 친화성을 저하시켜서, IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 에 대한 IL-2의 선택성을 향상시킬 수 있다.
- [0565] 예를 들어, IL-2R $\beta\gamma$ 서브유닛에 대한 IL-2의 친화성은, IL-2의 IL-2R $\beta\gamma$ 에 대한 결합성을 Biacore에 의해 측정하고, 1:1 결합 모델(binding model)을 사용하여 해리상수 K_D 를 구함으로써 평가할 수 있다. Biacore에 의한 IL-2R $\beta\gamma$ 에 대한 IL-2의 결합성은, 실시예에 있어서 후술하는 방법에 의해 측정할 수 있다. 본 실시 형태에 있어서는, IL-2R $\beta\gamma$ 에 대한 IL-2의 K_D 는 야생형 IL-2와 비교하여 높은 것이 바람직하다. 야생형 IL-2 대신에 야생형 IL-2와 동등한 IL-2R $\beta\gamma$ 서브유닛에 대한 친화성을 갖는 IL-2 개변체를 사용할 수 있다.
- [0566] [제어성 T 세포를 선택적으로 활성화시키는 방법]
- [0567] 본 발명의 일 실시 형태는, 본 발명의 IL-2 개변체를 사용하여 제어성 T 세포를 선택적으로 활성화시키는 방법이다. 본 실시 형태에 있어서는, 본 발명의 IL-2 개변체를 피검 대상에게 투여하고, 제어성 T 세포를 선택적으로 활성화시킬 수 있다.
- [0568] 실시예
- [0569] 이하, 실시예에 기초하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이하의 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0570] [실시예 1] 당쇄 결합 IL-2 개변체의 합성
- [0571] 표 1 내지 5에 나타내는 각종 IL-2 개변체를 하기에 기재된 방법으로 제작하였다.

표 1

제작한 당쇄 결합 IL-2 개변체

개변체의 명칭	당쇄 결합 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	125 위치 변이
T3C-2	3	T	C-lactose	—
T3C-9	3	T	C-asialo	—
T3C-11	3	T	C-disialo	—
S4C-2	4	S	C-lactose	—
S4C-9	4	S	C-asialo	—
S4C-11	4	S	C-disialo	—
S5C-2	5	S	C-lactose	—
S5C-9	5	S	C-asialo	—
S5C-11	5	S	C-disialo	—
Q11C-2	11	Q	C-lactose	—
Q11C-9	11	Q	C-asialo	—
Q11C-11	11	Q	C-disialo	—
L12C-2	12	L	C-lactose	—
L12C-9	12	L	C-asialo	—
L12C-11	12	L	C-disialo	—
Q13C-2	13	Q	C-lactose	S
Q13C-11	13	Q	C-disialo	S
E15C-2	15	E	C-lactose	S
E15C-11	15	E	C-disialo	S
E15C-17	15	E	C-tetrasialo	S
H16C-2	16	H	C-lactose	—
H16C-3	16	H	C-trisaccharide	S
H16C-5	16	H	C-pentasaccharide	S
H16C-9	16	H	C-asialo	—
H16C-11	16	H	C-disialo	—
L18C-2	18	L	C-lactose	—
L18C-9	18	L	C-asialo	—
L18C-11	18	L	C-disialo	—
L19C-2	19	L	C-lactose	—
L19C-9	19	L	C-asialo	—
L19C-11	19	L	C-disialo	—
L19C-11*	19	L	C-disialo	S
L19N-11	19	L	N-disialo	S
L19C-17	19	L	C-tetrasialo	S

[0572]

표 2

제작한 당쇄 결합 IL-2 개변체

개변체의 명칭	당쇄 결합 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	125 위치 변이
D20C-2	20	D	C-lactose	S
D20C-11	20	D	C-disialo	S
R38C-2	38	R	C-lactose	—
R38C-9	38	R	C-asialo	—
R38C-11	38	R	C-disialo	—
D84C-2	84	D	C-lactose	S
D84C-11	84	D	C-disialo	S
S87C-2	87	S	C-lactose	S
S87C-11	87	S	C-disialo	S
N88C-2	88	N	C-lactose	—
N88C-9	88	N	C-asialo	—
N88C-11	88	N	C-disialo	—
N88C-1	88	N	C-GlcNAc	S
N88C-1*	88	N	C-glucose	S
N88-1	88	N	N-GlcNAc	S
V91C-2	91	V	C-lactose	—
V91C-9	91	V	C-asialo	—
V91C-11	91	V	C-disialo	—
I92C-2	92	I	C-lactose	S
I92C-11	92	I	C-disialo	S
E95C-2	95	E	C-lactose	S
A108C-2	108	A	C-lactose	S
A108C-9	108	A	C-asialo	S
V115C-2	115	V	C-lactose	S
V115C-9	115	V	C-asialo	S
N119C-2	119	N	C-lactose	S
N119C-9	119	N	C-asialo	S
N119C-11	119	N	C-disialo	S
I122C-2	122	I	C-lactose	S
I122C-9	122	I	C-asialo	S
T123C-11	123	T	C-disialo	S
S127C-11	127	S	C-disialo	S
S130C-2	130	S	C-lactose	S
S130C-9	130	S	C-asialo	S

[0573]

표 3

제작한 당쇄 결합 II-2 개원체									
개원체의 명칭	당쇄 결합 위치 1			당쇄 결합 위치 2			당쇄 결합 위치 3		
	당쇄 결합 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	당쇄 결합 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	당쇄 결합 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기
	125 위치								변이
R8C-11 / L19C-11	8	K	C-distalo	19	L	C-distalo	-	-	S
L12C-11 / H16C-2	12	L	C-distalo	16	H	C-lactose	-	-	S
L12C-11 / H16C-2 / L19C-11	12	L	C-distalo	16	H	C-lactose	19	L	C-distalo
L12C-11 / L19C-11	12	L	C-distalo	19	L	C-distalo	-	-	S
L12C-11 / N88C-2	12	L	C-distalo	88	N	C-lactose	-	-	S
L12C-11 / V91C-11	12	L	C-distalo	91	V	C-distalo	-	-	S
L12N-11 / V91N-11	12	L	N-distalo	91	V	N-distalo	-	-	S
L12C-11 / V115C-11	12	L	C-distalo	115	V	C-distalo	-	-	S
L12C-11 / N119C-11	12	L	C-distalo	119	N	C-distalo	-	-	S
Q13C-11 / V91C-11	13	Q	C-distalo	91	V	C-distalo	-	-	S
Q13C-11 / V115C-11	13	Q	C-distalo	115	V	C-distalo	-	-	S
Q13C-11 / N119C-11	13	Q	C-distalo	119	N	C-distalo	-	-	S
E15C-11 / V91C-11	15	E	C-distalo	91	V	C-distalo	-	-	S
E15C-11 / N119C-11	15	E	C-distalo	119	N	C-distalo	-	-	S
E15C-11 / T123C-11	15	E	C-distalo	123	T	C-distalo	-	-	S
H16C-2 / L19C-11	16	H	C-lactose	19	L	C-distalo	-	-	S
H16C-2 / V91C-11	16	H	C-lactose	91	V	C-distalo	-	-	S
L19C-11 / M23C-11	19	L	C-distalo	23	M	C-distalo	-	-	S
L19C-11 / V91C-11	19	L	C-distalo	91	V	C-distalo	-	-	S
L19C-11 / V115C-11	19	L	C-distalo	115	V	C-distalo	-	-	S
V91C-11 / V115C-11	91	V	C-distalo	115	V	C-distalo	-	-	S
V91C-11 / N119C-11	91	V	C-distalo	119	N	C-distalo	-	-	S

표 4

제작한 당쇄 결함 II-2 개변체										
개변체의 명칭	당쇄 결함 위치1		당쇄 결함 위치2		당쇄 결함 위치3		당쇄 결함 위치4		당쇄 결함 위치5	
	당쇄 결함 위치	치환전의 아미노산 잔기	당쇄 결함 위치	치환전의 아미노산 잔기	당쇄 결함 위치	치환전의 아미노산 잔기	당쇄 결함 위치	치환전의 아미노산 잔기	당쇄 결함 위치	치환전의 아미노산 잔기
A1C-11 / T3C-11 / S5C-11 / L12C-11 / V91C-11	1	A	3	T	5	S	12	L	91	V
T3C-11 / L12C-11 / T51C-11 / V91C-11 / E100C-11	3	T	12	L	51	T	91	V	100	E
T3C-11 / L12C-11 / K76C-11 / V91C-11 / E100C-11	3	T	12	L	76	K	91	V	100	E
T3C-11 / L12C-11 / K32C-11 / K76C-11 / V91C-11	3	T	12	L	32	K	76	K	91	V
L12C-11 / V91C-11 / E100C- 11 / T102C-11 / M104C-11	12	L	91	V	100	E	102	T	104	M

표 5

계좌란 당쇄 결함 IL-2 개변체									
개변체의 명칭	당쇄 결함 위치1			당쇄 결함 위치2			Cys 변이 위치		
	당쇄 결함 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	당쇄 결함 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	Cys 변이 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기
A1C / L12C-11 / V91C-11	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	1	A	AcC
A1C / E15C-11	15	E	C-disialo	—	—	—	1	A	AcC
A1C / L19C-11	19	L	C-disialo	—	—	—	1	A	AcC
A1C / V91C-11 / N119C-11	91	V	C-disialo	119	N	C-disialo	1	A	AcC
T3C / L12C-11 / V91C-11	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	3	T	C
T3C / L12C-11 / V91C-2	12	L	C-disialo	91	V	C-lactose	3	T	C
T3C / L12C-11 / N119C-11	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	3	T	C
T3C / L19C-11	19	L	C-disialo	—	—	—	3	T	C
T51C / L12C-11 / V91C-11	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	51	T	C
F78C / L12C-11	12	L	C-disialo	—	—	—	78	F	C
F78C / L12C-11 / V91C-11	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	78	F	C
F78C / E15C-11	15	E	C-disialo	—	—	—	78	F	C

[0576]

[0577] <표 1 내지 5의 설명>

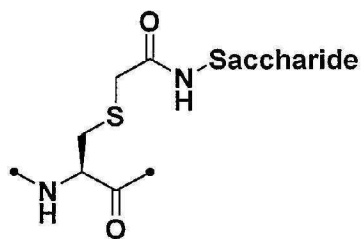
[0578] · 당쇄 결함 위치: 야생형 성숙 인간 IL-2의 아미노산 서열(서열 번호 1)(이하, 간단히 야생형 IL-2라고도 기재한다)의 N 말단으로부터의 위치

[0579] · Cys 변이 위치: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터의 위치

[0580] · 125 위치 변이: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 125번째의 아미노산 잔기의 변이의 유무를 나타낸다. 변이를 가하고 있지 않은 경우에는 -, 시스테인으로부터 세린으로 아미노산 잔기를 치환하는 변이를 가하고 있는 경우에는 S라고 기재한다.

[0581] 표 중, 당쇄 결함 위치의 치환 후의 아미노산 잔기의 열에 기재한 구조에 대하여 이하에 나타내었다.

[0582] C-당(GlcNAc, glucose, lactose, trisaccharide, pentasaccharide, asialo, disialo, tetrasialo)이란, 시스테인의 측쇄 티올에 CH_2CONH 링커를 통하여 당쇄가 도입된 하기 (식 1)로 표시되는 구조인 것을 나타낸다.

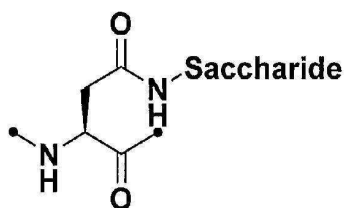


(식 1)

[0583]

[0584] 상기 (식 1) 중, Saccharide는 당쇄를 나타낸다.

[0585] N-당(GlcNAc, disialo)이란, 아스파라긴의 측쇄 아미드에 당쇄가 도입된 하기 (식 2)로 표시되는 구조인 것을 나타낸다.

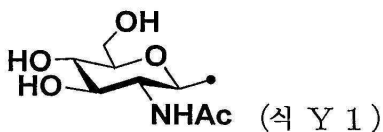


(식 2)

[0586]

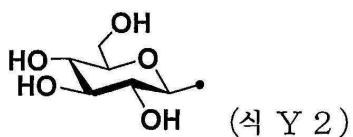
[0587] 상기 (식 2) 중, Saccharide는 당쇄를 나타낸다.

[0588] GlcNAc란 하기 (식 Y1)로 표시되는 구조를 나타낸다.



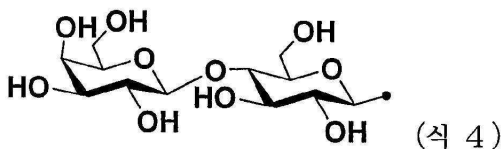
[0589]

[0590] Glucose란 하기 (식 Y2)로 표시되는 구조를 나타낸다.



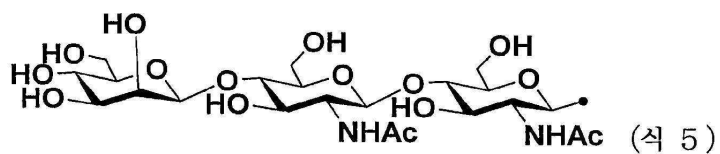
[0591]

[0592] lactose란 하기 (식 4)로 표시되는 구조를 나타낸다.



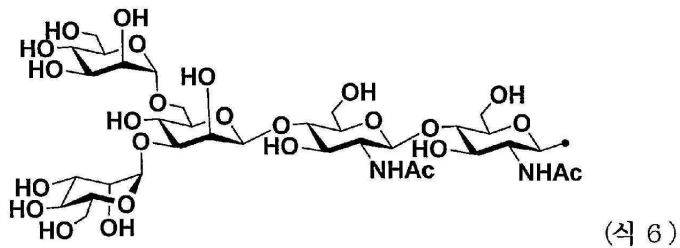
[0593]

[0594] trisaccharide란 하기 (식 5)로 표시되는 구조를 나타낸다.



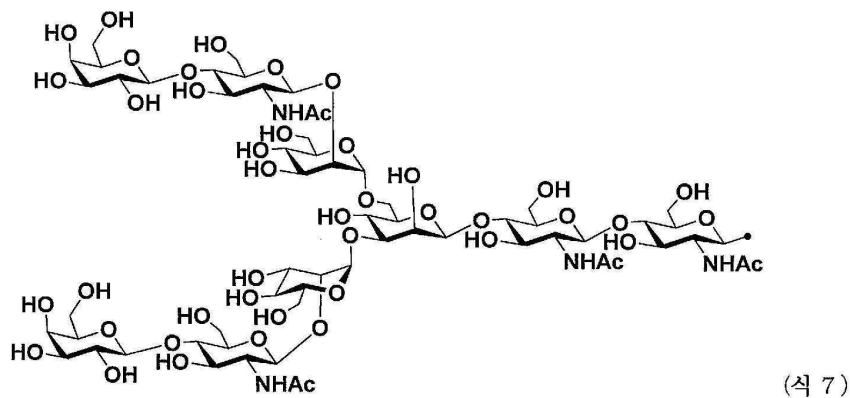
[0595]

[0596] pentasaccharide란 하기 (식 6)로 표시되는 구조를 나타낸다.



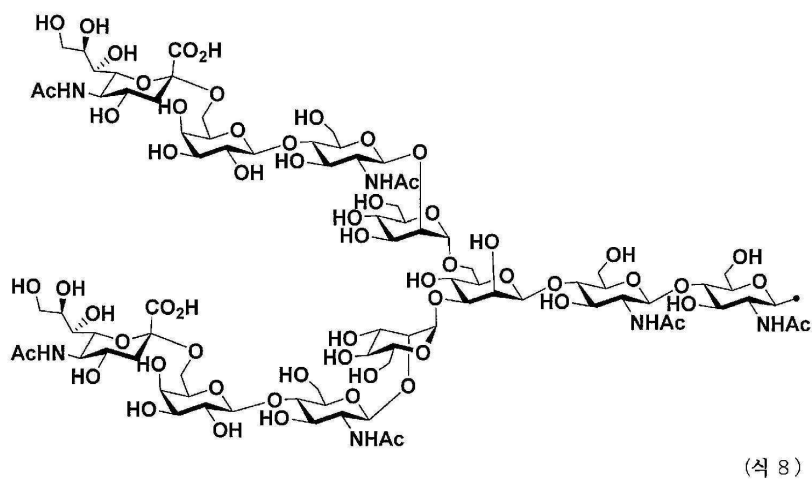
[0597]

[0598] asialo란 하기 (식 7)로 표시되는 구조를 나타낸다.



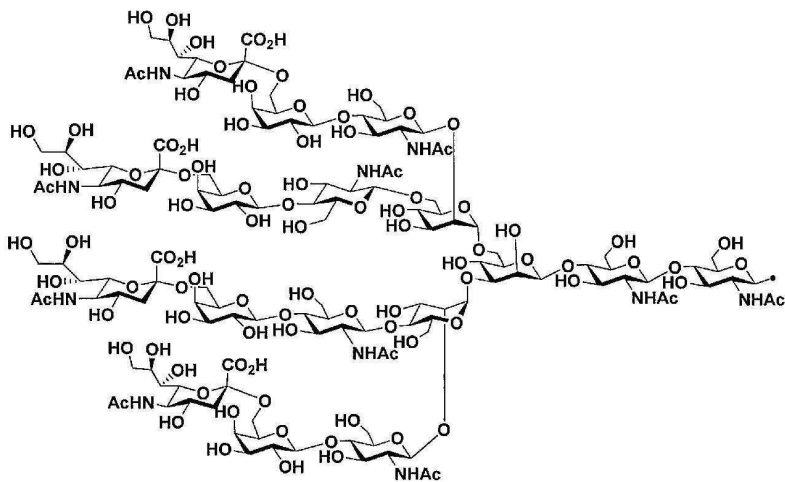
[0599]

[0600] disialo란 하기 (식 8)로 표시되는 구조를 나타낸다.



[0601]

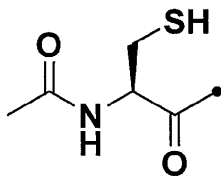
[0602] tetrasialo란 하기 (식 Y3)으로 표시되는 구조를 나타낸다.



(식 Y 3)

[0603]

[0604] · 표 중, Cys 변이 위치의 치환 후의 아미노산 잔기의 열에 기재한 AcC는 하기 (식 XXX)로 표시되는 구조를 나타낸다.



(식 X X X)

[0605]

표 6

제작한 IL-2 또는 IL-2 개변체				
IL-2 또는 IL-2 개변체명	변이 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	125 위치 변이
야생형 IL-2	—	—	—	—
L19C	19	L	C	S
L19C-acetamide	19	L	C-acetamide	S
L19N	19	L	N	S
N88C-acetamide	88	N	C-acetamide	S

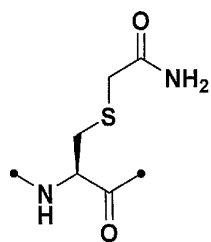
[0606]

[0607] <표 6의 설명>

[0608] · 변이 위치: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터의 위치

[0609] · 125 위치 변이: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 125번째의 아미노산 잔기의 변이의 유무를 나타낸다. 변이를 가하고 있지 않은 경우에는 -, 시스테인으로부터 세린으로 아미노산 잔기를 치환하는 변이를 가하고 있는 경우에는 S라고 기재한다.

[0610] 표 중, 치환 후의 아미노산 잔기의 열에 기재한 C-acetamide란, 하기 (식 9)로 표시되는 구조인 것을 나타낸다.



(식 9)

[0611]

[0612] (공정 1) 펩티드 세그먼트 1의 합성

[0613] IL-2 아미노산 서열 1 내지 57의 펩티드 티오에스테르 또는 당쇄 결합 펩티드 티오에스테르를 이하의 방법으로 조제하였다.

[0614] (공정 1-1a-1) 펩티드히드라이드의 합성

[0615] [Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 6978-6981]에 기재되는 방법에 따라서 얻어지는 트리틸히드라진 수지에, Fmoc-Gln(Trt)-OH(5 당량), 1-히드록시벤조트리아졸(5 당량), N,N'-디이소프로필카르보디이미드(5 당량)를 사용하여 DMF 중에서 1 잔기체의 아미노산 잔기를 수지에 담지하였다. 통상적인 방법에 따라서, DMF 중에서의, Fmoc 아미노산(5.3 당량), HCTU(5 당량), N-메틸모르폴린(5 당량) 또는 2,4,6-트리메틸피리딘(5 당량)을 사용한 아미노산의 신장과, 20% 피페리딘-DMF 용액에 의한 탈보호를 반복함으로써, 2 잔기체 이후의 아미노산을 신장하였다. 신장한 펩티드는, 트리플루오로아세트산(TFA), 트리이소프로필실란(TIPS), 물을 사용하여 수지로부터의 탈리와 측쇄 보호기를 제거한 후, 빙냉한 에테르 중에 적하하고, 발생한 침전을 원심 분리에 의해 회수하였다. 역상 HPLC 칼럼(프로테오나비(상품명), 시세이도사제)으로 정제하여, 펩티드히드라이드를 합성하였다.

[0616] 이때, 시스테인에 당쇄를 도입하는 경우에는 당쇄를 도입하는 위치를 시스테인으로 변이시킨 펩티드히드라이드를 조제하였다. 또한, 2종류의 당쇄를 도입하는 경우에는, 한쪽을 시스테인, 다른 한쪽을 S-아세트아미도메틸시스테인으로 변이시킨 펩티드히드라이드를 조제하였다.

[0617] 또한, 아미노산 서열 3 위치 또는 51 위치를 시스테인으로 변이시킨 IL-2 개변체를 제조할 때에는, 당쇄를 도입하는 위치를 시스테인, 아미노산 서열 3 위치 또는 51 위치를 S-아세트아미도메틸시스테인으로 변이시킨 펩티드히드라이드를 조제하였다.

[0618] 또한, 아미노산 서열 1 위치를 아세틸시스테인으로 변이시킨 아날로그를 제조할 때에는, 당쇄를 도입하는 위치를 시스테인, 아미노산 서열 1 위치를 S-아세트아미도메틸시스테인으로 변이시킨 펩티드를 수지 상에서 신장한 후, N 말단 아미노기를 무수 아세트산, 피리딘을 사용하여 아세틸화하고, 상기 방법에 따라서 수지로부터의 탈리와 측쇄 보호기의 제거, 정제를 행하고, 1 위치를 아세틸시스테인으로 변이시킨 펩티드히드라이드를 조제하였다.

[0619] (공정 1-1a-2) Cys-당쇄 결합 펩티드히드라이드 또는 Cys-아세트아미드 결합 펩티드히드라이드의 합성

[0620] (공정 1-1a-1)에서 얻어지는 펩티드히드라이드로의 브로모아세틸 당쇄(국제 공개 제2005/010053호에 기재되는 방법에 따라서 조제)를 사용한 당쇄 도입은, [Tetrahedron Lett., 2004, 45, 3287-3290, Carbohydr. Res. 2009, 344, 762-770]에 기재되는 방법으로 실시하여, 목적으로 하는 당쇄 결합 펩티드히드라이드를 합성하였다.

[0621] 브로모아세틸 당쇄 대신에 브로모아세트아미드를 사용하여, 상기과 마찬가지로의 방법으로 Cys-아세트아미드 결합 펩티드히드라이드를 합성하였다.

[0622] (공정 1-1b) Asn-당쇄 결합 펩티드히드라이드의 합성

[0623] [Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 6978-6981]에 기재되는 방법에 따라서 얻어지는 트리틸히드라진 수지에, Fmoc-Gln(Trt)-OH(5 당량), 1-히드록시벤조트리아졸(5 당량), N,N'-디이소프로필카르보디이미드(5 당량)를 사용하여 DMF 중에서 1 잔기체의 아미노산 잔기를 수지에 담지하였다. 통상적인 방법에 따라서, DMF 중에서의, Fmoc 아미노산(5.3 당량), HCTU(5 당량), N-메틸모르폴린(5 당량)을 사용한 아미노산의 신장과, 20% 피페리딘-DMF 용액에 의한 탈보호를 반복함으로써, 2 잔기체 이후의 당쇄 결합 Asn 이외의 아미노산을 신장하였다.

[0624] 당쇄 결합 Asn(국제 공개 제2004/005330호에 기재되는 방법에 따라서 조제)은 국제 공개 제2004/005330호에 기

재되는 방법으로 신장하였다. 신장한 펩티드는, 트리플루오로아세트산(TFA), 트리이소프로필실란(TIPS), 물을 사용하여 수지로부터의 탈리와 측쇄 보호기를 제거한 후, 빙냉한 에테르 중에 적하하고, 발생한 침전을 원심 분리에 의해 회수하였다. 역상 HPLC 칼럼[프로테오나비(상품명), 시세이도사제]으로 정제하여, Asn-당쇄 결합 펩티드히드라지드를 합성하였다.

[0625] (공정 1-2a) 펩티드 티오에스테르 또는 당쇄 결합 펩티드 티오에스테르의 합성

[0626] (공정 1-1a-1)에서 얻어지는 펩티드히드라지드 또는 (공정 1-1a-2)에서 얻어지는 Cys-당쇄 결합 펩티드히드라지드 또는 Cys-아세트아미드 결합 펩티드히드라지드 또는 (공정 1-1b)에서 얻어지는 Asn-당쇄 결합 펩티드히드라지드를 6mol/L 구아니딘염산염, 200mmol/L 인산 완충액(pH3)에 용해하고 -20℃로 냉각한 후, 200mmol/L 아질산나트륨, 6mol/L 구아니딘염산염, 200mmol/L 인산 완충액(pH7)을 첨가하고 5분간 교반하였다. 400mmol/L 2-머캅토에탄술폰산나트륨, 6mol/L 구아니딘염산염, 200mmol/L 인산 완충액(pH6)을 첨가하고 -15℃에서 1시간반 교반한 후, 역상 HPLC 칼럼[프로테오나비(상품명), 시세이도사제]으로 정제하여, 펩티드 티오에스테르 또는 당쇄 결합 펩티드 티오에스테르를 얻었다.

[0627] (공정 1-2b) 2종류의 당쇄 결합 펩티드 티오에스테르의 합성

[0628] 2종류의 당쇄를 도입하는 경우, (공정 1-1a-2)에서 얻어지는 당쇄 결합 펩티드히드라지드의 반응 용액에, 아세트산에 현탁시킨 아세트산은을 첨가하고 6시간 교반하여 S-아세트아미드메틸기를 제거하였다. 디티오프레이톨을 첨가한 후, 원심 분리하여 얻어지는 상청을 겔 여과(Superdex G-75)에 의해 4mol/L 구아니딘염산염, 5mmol/L 인산 완충액(pH5)으로 용매 교환하였다. 용출액에, 6mol/L 구아니딘염산염, 200mmol/L 인산 완충액(pH3)을 첨가하고, 2mol/L 염산을 사용하여 pH3으로 조정한 후, -15℃로 냉각하였다.

[0629] 6mol/L 구아니딘염산염, 200mmol/L 아질산나트륨, 50mmol/L 인산 완충액(pH7)을 첨가하고, -15℃에서 5분간 교반한 후, 6mol/L 구아니딘염산염, 400mmol/L 2-머캅토에탄술폰산나트륨, 200mmol/L 인산 완충액(pH6)을 첨가하고, -15℃에서 1시간반 교반하고, 역상 HPLC 칼럼[프로테오나비(상품명), 시세이도사제]으로 정제하여, 당쇄 결합 펩티드 티오에스테르를 얻었다.

[0630] 얻어진 당쇄 결합 펩티드 티오에스테르에 대하여, (공정 1-1a-2)에 기재된 방법에 따라서, 2종류째의 당쇄를 도입하고, 역상 HPLC 칼럼[프로테오나비(상품명), 시세이도사제]으로 정제하여, 2종류의 당쇄 결합 펩티드 티오에스테르를 얻었다.

[0631] (공정 2) 펩티드 세그먼트 2의 합성

[0632] IL-2 아미노산 서열 58-104의 펩티드히드라지드 또는 당쇄 결합 펩티드히드라지드를 이하의 방법으로 조제하였다.

[0633] (공정 2-1a-1) 펩티드히드라지드의 합성

[0634] [Angew. Chem. Int. Ed. 2014, 53, 6978-6981]에 기재되는 방법에 따라서 얻어지는 트리틸히드라진 수지에, Fmoc-Met-OH(5 당량), 1-히드록시벤조트리아졸(5 당량), N,N'-디이소프로필카르보디이미드(5 당량)를 사용하여 DMF 중에서 1 잔기째의 아미노산 잔기를 수지에 담지하였다.

[0635] 통상적인 방법에 따라서, DMF 중에서의, Fmoc 아미노산(5.3 당량), HCTU(5 당량), N-메틸모르폴린(5 당량) 또는 2,4,6-트리메틸피리딘(5 당량)을 사용한 아미노산의 신장과, 20% 피페리딘-DMF 용액에 의한 탈보호를 반복함으로써, 2 잔기째 이후의 아미노산을 신장하였다.

[0636] 신장한 펩티드는, 트리플루오로아세트산(TFA), 트리이소프로필실란(TIPS), 물을 사용하여 수지로부터의 탈리와 측쇄 보호기를 제거한 후, 빙냉한 에테르 중에 적하하고, 발생한 침전을 원심 분리에 의해 회수하였다. 역상 HPLC 칼럼[프로테오나비(상품명), 시세이도사제]으로 정제하여, 펩티드히드라지드를 합성하였다.

[0637] 이때, 당쇄를 도입하는 경우에는 당쇄를 도입하는 위치를 시스테인으로 변이하고, 추가로 아미노산 서열 58을 티오프롤린으로 변이시킨 펩티드히드라지드를 조제하였다. 아미노산 서열 78 위치를 시스테인으로 변이시킨 아날로그를 제조할 때에는, 아미노산 서열 78 위치를 시스테인으로 변이시킨 펩티드히드라지드를 조제하였다. 아미노산 서열 91 위치에 당쇄를 도입하고, 아미노산 서열 78 위치를 시스테인으로 변이한 아날로그를 제조할 때는, 아미노산 서열 91 위치를 시스테인, 아미노산 서열 78 위치를 S-아세트아미도메틸시스테인으로 변이시킨 펩티드히드라지드를 조제하였다.

[0638] (공정 2-1a-2) Cys-당쇄 결합 펩티드히드라지드 또는 Cys-아세트아미드 결합 펩티드히드라지드의 합성의 합성

- [0639] (공정 2-1a-1)에서 얻어지는 펩티드히드라지드의 브로모아세틸 당쇄(국제 공개 제2005/010053호에 기재되는 방법으로 조제)를 사용한 당쇄 도입을, [Tetrahedron Lett., 2004, 45, 3287-3290, Carbohydr. Res. 2009, 344, 762-770]에 기재되는 방법에 따라서 실시한 반응 용액에 대하여, 브로모아세틸 당쇄에 대하여 10 당량의 2-머캅토에탄술폰산나트륨을 첨가한 후, 8mol/L 구아니딘염산염 수용액, 2mol/L 염산, 메톡시아민염산염을 첨가하여 pH4로 조정하고, 실온에서 20분 반응시켰다. 역상 HPLC 칼럼[프로테오나비(상품명), 시세이도사제]으로 정제하여, Cys-당쇄 결합 펩티드히드라지드를 합성하였다.
- [0640] 브로모아세틸 당쇄 대신에 브로모아세트아미드를 사용하여, 상기와 마찬가지로의 방법으로 Cys-브로모아세트아미드 결합 펩티드히드라지드를 합성하였다.
- [0641] (공정 2-1b) Asn-당쇄 결합 펩티드히드라지드의 합성
- [0642] (공정 1-1b)와 마찬가지로의 방법으로 Asn-당쇄 결합 펩티드히드라지드를 조제하였다.
- [0643] (공정 3) 펩티드 세그먼트 3의 합성
- [0644] IL-2 아미노산 서열 105-133의 펩티드 또는 당쇄 결합 펩티드를 이하의 방법으로 조제하였다.
- [0645] (공정 3-1) 가용화 태그(H-C(Npys)RRRRR-NH₂)의 조정
- [0646] Rink-아미드 수지에, DMF 중에서의 Fmoc 아미노산(5.3 당량), HCTU(5 당량), N-메틸모르폴린(5 당량)을 사용한 아미노산의 신장과, 20% 피페리딘-DMF 용액에 의한 탈보호를 반복함으로써 아미노산을 신장하였다. 신장한 펩티드는, 트리플루오로아세트산(TFA), 트리이소프로필실란(TIPS), 물을 사용하여 수지로부터의 탈리와 측쇄 보호기를 제거한 후, 빙냉한 에테르 중에 적하하고, 발생한 침전을 원심 분리에 의해 회수하여, 가용화 태그(H-C(Npys)RRRRR-NH₂)를 조제하였다.
- [0647] (공정 3-2) 가용화 태그 도입 펩티드의 합성
- [0648] IL-2 아미노산 서열 105-133의 펩티드를 이하의 방법으로 조제하였다.
- [0649] HMPB-ChemMatrix 수지에, Fmoc-Thr(tBu)-OH(5 당량), 1-(메틸렌-2-술폰닐)-3-니트로-1,2,4-트리아졸(5 당량), 1-메틸이미다졸(3.5 당량)을 사용하여 1 잔기째의 아미노산 잔기를 수지에 담지하였다. 통상적인 방법에 따라서, DMF 중에서의, Fmoc 아미노산(5.3 당량), HCTU(5 당량), N-메틸모르폴린(5 당량) 또는 2,4,6-트리메틸 피리딘(5 당량)을 사용한 아미노산의 신장과, 20% 피페리딘-DMF 용액에 의한 탈보호를 반복함으로써, 2 잔기째 이후의 아미노산을 신장하였다.
- [0650] 신장한 펩티드는, 트리플루오로아세트산(TFA), 트리이소프로필실란(TIPS), 물을 사용하여 수지로부터의 탈리와 측쇄 보호기를 제거한 후, 빙냉한 에테르 중에 적하하고, 발생한 침전을 원심 분리에 의해 회수하여 펩티드의 조 정제물을 얻었다. 이때, 시스테인에 당쇄를 도입하는 경우에는 당쇄를 도입하는 위치를 시스테인으로 변이하고, 추가로 아미노산 서열 105를 티오프롤린으로 변이시킨 펩티드를 조제하였다.
- [0651] (공정 3-1)에서 얻어지는 가용화 태그(펩티드 조 생성물에 대하여 3 당량)를 6.8mol/L 구아니딘염산염, 310mmol/L 인산 완충액(pH7)에 용해하고, 5 당량의 무수 아세트산을 첨가하고 실온 하 1시간 교반하였다. 10 당량의 아르기닌염산염을 첨가한 후, 8mol/L 구아니딘염산염, 250mmol/L 트리스히드록시메틸아미노메탄염산염 수용액(pH8)에 용해한 상기 펩티드 조 생성물을 첨가하고 실온 하 1시간 교반하였다. 역상 HPLC 칼럼[프로테오나비(상품명), 시세이도사제]으로 정제하여, 가용화 태그 도입 펩티드를 합성하였다.
- [0652] (공정 3-3) 가용화 태그 도입 펩티드로의 당쇄 도입
- [0653] (공정 3-2)에서 얻어지는 가용화 태그 도입 펩티드를 8mol/L 구아니딘염산염, 5mmol/L 트리스(2-카르복시에틸) 포스핀, 200mmol/L 인산 완충액(pH6)에 용해하고, 브로모아세틸 당쇄(5 당량, 국제 공개 제2005/010053호에 기재되는 방법으로 조제)의 6mol/L 구아니딘염산염, 200mmol/L 인산 완충액(pH7) 용액을 첨가하고 5시간 반응시켰다.
- [0654] 브로모아세틸 당쇄에 대하여 4 당량의 2-머캅토에탄술폰산나트륨을 첨가하고 1시간 교반한 후, 6mol/L 구아니딘염산염, 200mmol/L 인산 완충액(pH7)에 용해한 메톡시아민염산염(300 당량)을 첨가하고, 2mol/L 염산을 사용하여 pH4로 조정하고 1시간 반응시켰다. 역상 HPLC 칼럼[프로테오나비(상품명), 시세이도사제]으로 정제하여, 당쇄 결합 펩티드를 합성하였다.

- [0655] (공정 4) IL-2 개변체, 당쇄 결합 IL-2 개변체의 합성
- [0656] (공정 4-1) 펩티드 세그먼트 1과 2의 연결 반응
- [0657] 상기 (공정 1)에서 얻어지는 펩티드 세그먼트 1과 상기 (공정 2)에서 얻어지는 펩티드 세그먼트 2(1.1 당량)를 8mol/L 구아니딘염산염, 100mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀, 100mM 아스코르브산, 50mmol/L 4-머캅토펜아세트산, 200mmol/L 인산 완충액(pH7)에 용해하고, 반응시킨 후, 역상 HPLC 칼럼[프로테오나비(상품명), 시세이도사제]으로 정제하여, 펩티드 세그먼트 1과 2의 연결체를 합성하였다.
- [0658] (공정 4-2) 펩티드 세그먼트 1과 2의 연결체의 티오에스테르화
- [0659] 상기 (공정 4-1)에서 얻어지는 펩티드 세그먼트 1과 2의 연결체를, (공정 1-2a)와 마찬가지로의 방법으로 티오에스테르화하였다.
- [0660] (공정 4-3) 펩티드 세그먼트 3과의 연결
- [0661] 상기 (공정 4-2)에서 얻어지는 펩티드 티오에스테르와 상기 (공정 3)에서 얻어지는 펩티드 세그먼트 3(1 당량)을 8mol/L 구아니딘염산염, 100mM 트리스(2-카르복시에틸)포스핀, 100mM 아스코르브산, 50mmol/L 4-머캅토펜아세트산, 200mmol/L 인산 완충액(pH7)에 용해하고, 반응시킨 후, 역상 HPLC 칼럼[프로테오나비(상품명), 시세이도사제]으로 정제하여, 펩티드 세그먼트 1, 2 및 3의 연결체를 합성하였다.
- [0662] (공정 4-4) 아세트아미드메틸기의 탈보호
- [0663] 상기 (공정 4-3)에서 얻어지는 펩티드 세그먼트 1, 2 및 3의 연결체의 시스테인이 아세트아미드메틸기로 보호되어 있는 경우, 이하에 나타내는 방법으로 아세트아미드메틸기를 제거하였다.
- [0664] 펩티드 세그먼트 1, 2 및 3의 연결체를, 6mol/L 요소, 5mmol/L 인산 완충액(pH5)에 용해하고, 아세트산에 현탁시킨 아세트산은(420 당량)을 첨가하고 5시간 교반하였다. 과잉량의 디티오프레이톨을 첨가한 후, 원심 분리하여 얻어지는 상층을 역상 HPLC 칼럼[프로테오나비(상품명), 시세이도사제]으로 정제하여, 탈아세트아미드메틸체를 취득하였다.
- [0665] (공정 4-5) 시알산벤질에스테르의 탈보호
- [0666] 상기 (공정 4-3)에서 얻어지는 펩티드 세그먼트 1, 2 및 3의 연결체의 당쇄 상의 시알산 측쇄 카르복실산이 벤질기로 보호되어 있는 경우, 국제 공개 제2004/005330호에 기재되는 방법에 따라서, 벤질기를 제거한 후, 역상 HPLC 칼럼[프로테오나비(상품명), 시세이도사제]으로 정제하여, 탈 벤질체를 취득하였다.
- [0667] (공정 4-6) IL-2 개변체, 당쇄 결합 IL-2 개변체의 합성
- [0668] (공정 4-3) 또는 (공정 4-4) 또는 (공정 4-5)에서 합성한 펩티드 세그먼트 1, 2 및 3의 연결체를, 6mol/L 구아니딘염산염, 100mmol/L 트리스히드록시메틸아미노메탄염산염(pH8)에 용해한 후, 100mmol/L 트리스히드록시메틸아미노메탄염산염, 10mmol/L 환원형 글루타티온, 1mmol/L 산화형 글루타티온(pH8)을 첨가하고, 실온 하 18시간 교반하였다. 역상 HPLC 칼럼[프로테오나비(상품명), 시세이도사제]으로 정제하여, IL-2 개변체, 당쇄 결합 IL-2 개변체를 취득하였다.
- [0669] 얻어진 IL-2 개변체, 당쇄 결합 IL-2 개변체는, 질량 분석에서 계산값과 실측값이 일치하고 있는 점, 및/또는 CD 스펙트럼이 야생형 IL-2와 일치하는 점, 및/또는 SDS-PAGE에서 검출되는 밴드가 상정 분자량의 밴드 위치인 것을 확인할 수 있었던 점에서, 품질 및 순도가 문제 없는 것을 확인하였다.
- [0670] [실시에 2] N말 PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체의 합성
- [0671] 표 7에 나타내는 N말 PEG화, 당쇄 결합 IL-2를 하기에 기재된 방법으로 제작하였다.

표 7

제작한 N말 PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체

개변체의 명칭	PEG 결합 위치			당쇄 결합 위치			125 위치 변이
	PEG 결합 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	당쇄 결합 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	
A1-Li20 (CHO) / Q11C-9	1	A	A-Li20 (CHO)	11	Q	C-asialo	—
A1-Li20 (CHO) / L12C-9	1	A	A-Li20 (CHO)	12	L	C-asialo	—
A1-Li20 (CHO) / R38C-9	1	A	A-Li20 (CHO)	38	R	C-asialo	—
A1-Li20 (CHO) / V91C-9	1	A	A-Li20 (CHO)	91	V	C-asialo	—

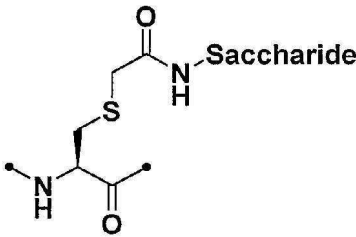
<표 7의 설명>

· 당쇄 결합 위치, PEG 결합 위치: 야생형 성숙 인간 IL-2의 아미노산 서열(서열 번호 1)(이하, 간단히 야생형 IL-2라고도 기재한다)의 N 말단으로부터의 위치

· 125 위치 변이: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 125번째의 아미노산 잔기의 변이의 유무를 나타낸다. 변이를 가하고 있지 않은 경우에는 -, 시스테인으로부터 세린으로 아미노산 잔기를 치환하는 변이를 가하고 있는 경우에는 S라고 기재한다.

· 표 중, 당쇄 결합 위치의 치환 후의 아미노산 잔기의 열에 기재한 구조에 대하여 이하에 나타내었다.

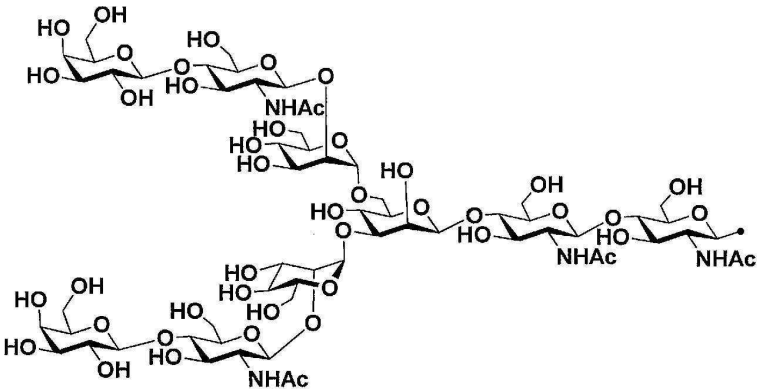
C-당(asialo)이란, 시스테인의 측쇄 티올에 CH₂CONH 링커를 통하여 당쇄가 도입된 하기 (식 1)로 표시되는 구조인 것을 나타낸다.



(식 1)

상기 (식 X1)에 있어서, Saccharide는 당쇄를 나타낸다.

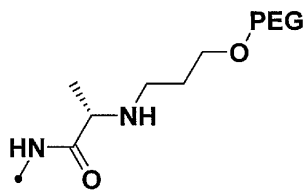
asialo란 하기 (식 7)로 표시되는 구조를 나타낸다.



(식 7)

표 중, PEG 결합 위치의 치환 후의 아미노산 잔기의 열에 기재한 구조에 대하여 이하에 나타내었다.

A1-PEG(CHO)[Li20(CHO)]란, 알라닌 주쇄 아미노기에 (CH₂)₃ 링커를 통하여 PEG가 도입된 하기 (식 Z0)으로 표시되는 구조인 것을 나타낸다.

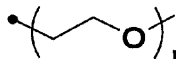


(식Z 0)

[0684]

[0685]

Li2O이란, 상기 (식 Z0) 중, PEG가 평균 분자량 약 20kDa의 하기 (식 X00)으로 표시되는 구조인 것을 나타낸다.



(식X 0 0)

[0686]

[0687]

당쇄 결합 IL-2 개변체의 1mM EDTA, 20mmol/L 인산 완충액(pH5.5)에, 실온 하에서 PEG-알데히드(10 당량, PJK-241; Creative PEG Works)의 20mmol/L 인산 완충액(pH5.5)을 첨가하고 실온 하 30분 교반한 후, $\text{NaBH}_3(\text{CN})$ (1000 당량)을 첨가하고 3시간 교반하였다.

[0688]

Amicon Ultra-0.5(10kDa)를 사용한 한외 여과에 의해 0.05% 트리플루오로아세트산, 2% 아세토니트릴 수용액으로 용매 치환한 후, 크기 배제 크로마토그래피(칼럼; Waters제, XBridge BEH450A, 3.5 μm , 7.8 $\times$ 150mm과 XBridge BEH200A, 3.5 μm , 7.8 $\times$ 150mm을 연결)로 정제하고, N말 PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체를 합성하였다.

[0689]

정제한 N말 PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체의 순도를 SDS-PAGE로 확인하였다. 그 결과 모든 개변체에 있어서, PEG의 분자량이 증가한 단일의 밴드가 보여서, 고순도의 N말 PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체가 얻어진 것을 확인할 수 있었다.

[0690]

[실시에 3] Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체의 합성

[0691]

표 8에 나타내는 Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2를 하기에 기재된 방법으로 제작하였다.

표 8

제작한 Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체

개변체의 명칭	PEG결합 위치			당쇄 결합 위치 1			당쇄 결합 위치 2			125 위치 변이
	PEG결합 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	당쇄 결합 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	당쇄 결합 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	
A1C-Li40(IAc) / L12C-11 / Y91C-11	1	A	AcC-Li40(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
A1C-Y80(Mal) / L12C-11 / Y91C-11	1	A	AcC-Y80(Mal)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
A1C-Y50(IAc) / L12C-11 / Y91C-11	1	A	AcC-Y50(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
A1C-Y50(Mal) / L12C-11 / Y91C-11	1	A	AcC-Y50(Mal)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
A1C-W80(Mal) / L12C-11 / Y91C-11	1	A	AcC-W80(Mal)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
A1C-Y50(IAc) / L19C-11	1	A	AcC-Y50(IAc)	19	L	C-disialo	—	—	—	S
A1C-V40(IAc) / L19C-11	1	A	AcC-V40(IAc)	19	L	C-disialo	—	—	—	S
A1C-Y50(IAc) / V91C-11 / N119C-11	1	A	AcC-Y50(IAc)	91	V	C-disialo	119	N	C-disialo	S
T3C-W80(Mal) / L12C-11 / Y91C-2	3	T	C-W80(Mal)	12	L	C-disialo	91	V	C-lactose	S
T3C-Li20(IAc) / L12C-11 / Y91C-11	3	T	C-Li20(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T3C-Li40(IAc) / L12C-11 / Y91C-11	3	T	C-Li40(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T3C-V40(IAc) / L12C-11 / Y91C-11	3	T	C-V40(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T3C-W40(IAc) / L12C-11 / Y91C-11	3	T	C-W40(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T3C-Y50(IAc) / L12C-11 / Y91C-2	3	T	C-Y50(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-lactose	S
T3C-Y50(IAc) / L12C-11 / Y91C-11	3	T	C-Y50(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T3C-Y50(Mal) / L12C-11 / Y91C-11	3	T	C-Y50(Mal)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T3C-V40(IAc) / E15C-11	3	T	C-V40(IAc)	15	E	C-disialo	—	—	—	S
T3C-Y80(Mal) / E15C-11	3	T	C-Y80(Mal)	15	E	C-disialo	—	—	—	S
T3C-Y50(IAc) / E15C-11	3	T	C-Y50(IAc)	15	E	C-disialo	—	—	—	S
T3C-Y80(Mal) / L12C-11 / N119C-11	3	T	C-Y80(Mal)	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	S
T3C-W80(Mal) / L12C-11 / N119C-11	3	T	C-W80(Mal)	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	S
T3C-Y50(IAc) / L12C-11 / N119C-11	3	T	C-Y50(IAc)	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	S
T51C-Li40(IAc) / L12C-11 / Y91C-11	51	T	C-Li40(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T51C-V40(IAc) / L12C-11 / Y91C-11	51	T	C-V40(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T51C-W40(IAc) / L12C-11 / Y91C-11	51	T	C-W40(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
T51C-Y50(IAc) / L12C-11 / Y91C-11	51	T	C-Y50(IAc)	12	L	C-disialo	91	V	C-disialo	S
F78C-Li40(IAc) / L12C-11	78	F	C-Li40(IAc)	12	L	C-disialo	—	—	—	S
F78C-V40(IAc) / L12C-11	78	F	C-V40(IAc)	12	L	C-disialo	—	—	—	S
F78C-V40(Mal) / L12C-11	78	F	C-V40(Mal)	12	L	C-disialo	—	—	—	S
F78C-Y80(Mal) / L12C-11	78	F	C-Y80(Mal)	12	L	C-disialo	—	—	—	S
F78C-W80(Mal) / L12C-11	78	F	C-W80(Mal)	12	L	C-disialo	—	—	—	S
F78C-V40(IAc) / L12C-11 / N119C-11	78	F	C-V40(IAc)	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	S
F78C-Y80(Mal) / L12C-11 / N119C-11	78	F	C-Y80(Mal)	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	S
F78C-W80(Mal) / L12C-11 / N119C-11	78	F	C-W80(Mal)	12	L	C-disialo	119	N	C-disialo	S
F78C-Li40(IAc) / E15C-11	78	F	C-Li40(IAc)	15	E	C-disialo	—	—	—	S

[0692]

[0693]

<표 8의 설명>

[0694]

· PEG 결합 위치, 당쇄 결합 위치 1 및 2: 야생형 성숙 인간 IL-2의 아미노산 서열(서열 번호 1)(이하, 간단히 야생형 IL-2라고도 기재한다)의 N 말단으로부터의 위치

[0695]

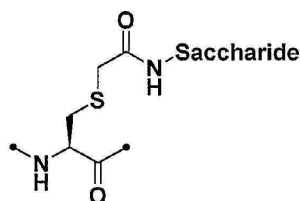
· 125 위치 변이: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 125번째의 아미노산 잔기의 변이의 유무를 나타낸다. 변이를 가하고 있지 않은 경우에는 -, 시스테인으로부터 세린으로 아미노산 잔기를 치환하는 변이를 가하고 있는 경우에는 S라고 기재한다.

[0696]

· 표 중, 당쇄 결합 위치의 치환 후의 아미노산 잔기의 열에 기재한 구조에 대하여 이하에 나타내었다.

[0697]

C-당(lactose, disialo)이란, 시스테인의 측쇄 티올에 CH₂CONH 링커를 통하여 당쇄가 도입된 하기 (식 1)로 표시되는 구조인 것을 나타낸다.



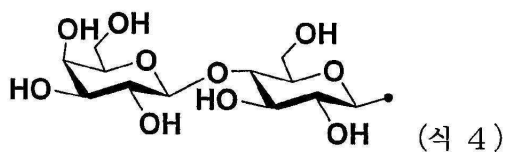
(식 1)

[0698]

[0699]

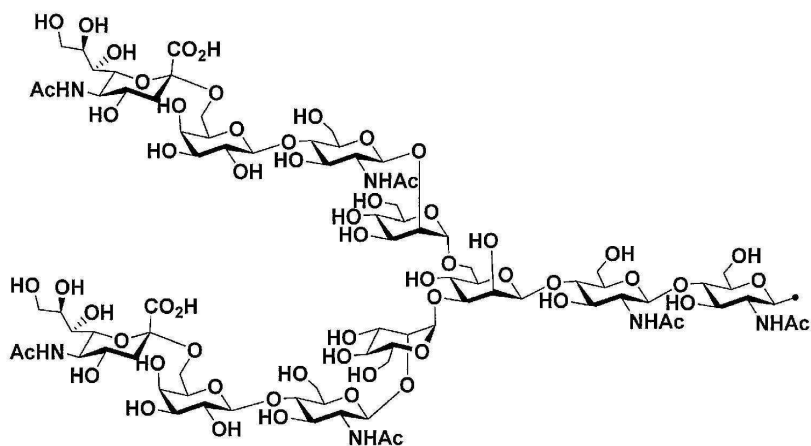
상기 (식 1)에 있어서, Saccharide는 당쇄를 나타낸다.

[0700] lactose란 하기 (식 4)로 표시되는 구조를 나타낸다.



[0701]

[0702] disialo란 하기 (식 8)로 표시되는 구조를 나타낸다.

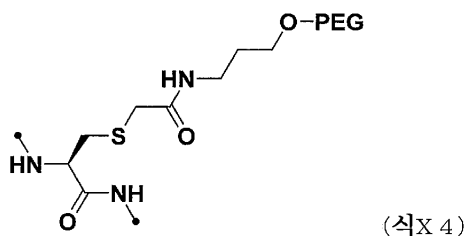


(식 8)

[0703]

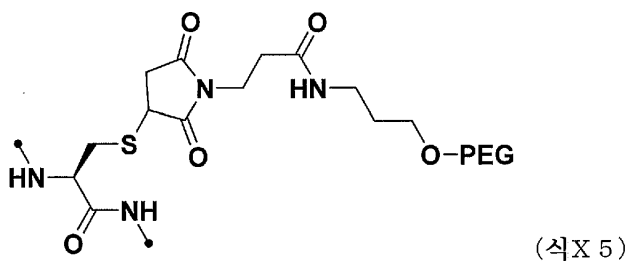
[0704] 표 중, PEG 결합 위치의 치환 후의 아미노산 잔기의 열에 기재한 구조에 대하여 이하에 나타내었다.

[0705] C-PEG(IAc)[Li20(IAc), Li40(IAc), V40(IAc), W40(IAc), Y50(IAc)]란, 시스테인 측쇄에 $\text{CH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{O}$ 링커를 통하여 PEG가 도입된 하기 (식 X4)로 표시되는 구조인 것을 나타낸다.

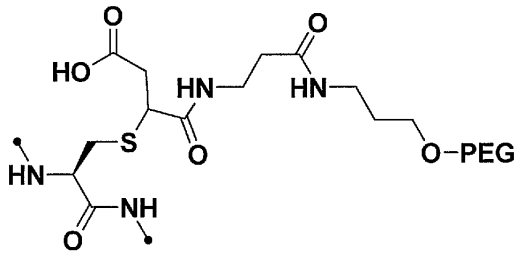


[0706]

[0707] C-PEG(Mal)[V40(Mal), V80(Mal), W80(Mal), Y50(Mal)]이란, 시스테인 측쇄에 3-(3-티오-2,5-디옥소피롤리딘-1-일)-프로필옥시 링커를 통하여 PEG가 도입된 하기 (식 X5)로 표시되는 구조인 것을 나타낸다. 이때, C-PEG(Mal)는 디옥소피롤리딘환이 개환한 (식 X6) 또는 (식 X7)로 표시되는 구조여도 된다.

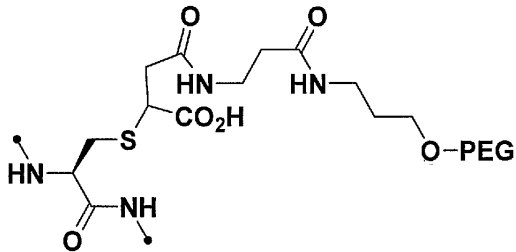


[0708]



(식X 6)

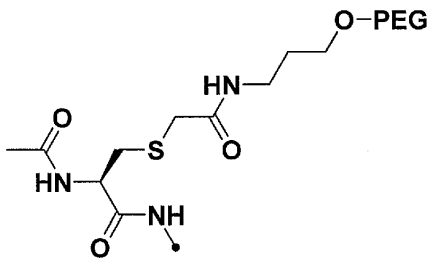
[0709]



(식X 7)

[0710]

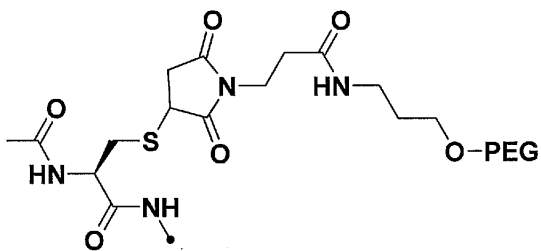
[0711] AcC-PEG(IAc)[Li40(IAc), Y50(IAc)]란, 아세틸시스테인 측쇄에 $\text{CH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{O}$ 링커를 통하여 PEG가 도입된 하기 (식 XX3)으로 표시되는 구조인 것을 나타낸다.



(식X X3)

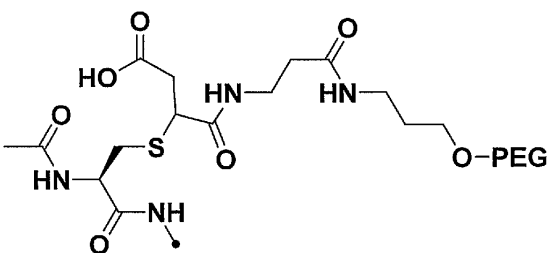
[0712]

[0713] AcC-PEG(Mal)[V80(Mal), W80(Mal), Y50(Mal)]이란, N-아세틸시스테인 측쇄에 3-(3-티오-2,5-디옥소피롤리딘-1-일)-프로필옥시 링커를 통하여 PEG가 도입된 하기 (식 X8)로 표시되는 구조인 것을 나타낸다. 이때, AcC-PEG(Mal)는 디옥소피롤리딘환이 개환한 (식 X9) 또는 (식 X10)으로 표시되는 구조여도 된다.



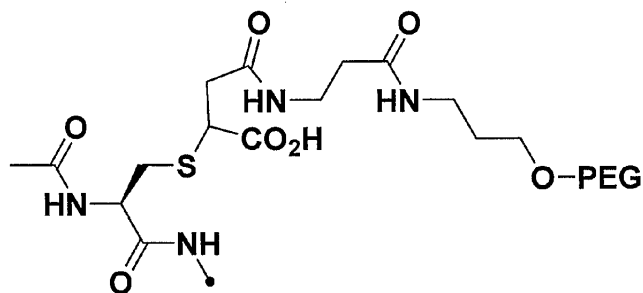
(식X 8)

[0714]



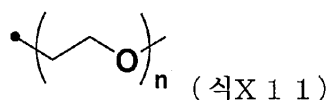
(식X 9)

[0715]



(식X 1 0)

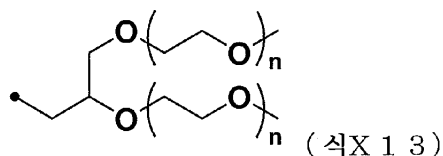
Li20이란, 상기 (식 X4) 내지 (식 X10) 중, PEG가 평균 분자량 약 20kDa의 하기 (식 X11)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,



(식X 1 1)

Li40이란, 상기 (식 X4) 내지 (식 X10) 중, PEG가 평균 분자량 약 40kDa의 상기 (식 X11)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,

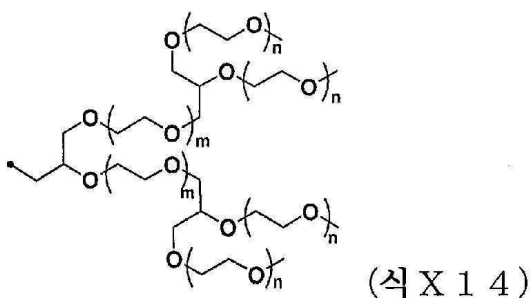
V40이란, 상기 (식 X4) 내지 (식 X10) 중, PEG가 평균 분자량 약 40kDa의 하기 (식 X13)으로 표시되는 구조인 것을 나타내고,



(식X 1 3)

V80이란, 상기 (식 X4) 내지 (식 X10) 중, PEG가 평균 분자량 약 80kDa인 상기 (식 X13)으로 표시되는 구조인 것을 나타내고,

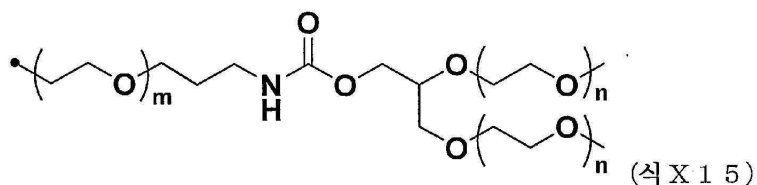
W40이란, 상기 (식 X4) 내지 (식 X10) 중, PEG가 $(CH_2CH_2O)_m$ 의 평균 분자량이 5kDa이며, $(CH_2CH_2O)_n$ 의 평균 분자량이 7.5kDa인 하기 (식 X14)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,



(식 X 1 4)

W80이란, 상기 (식 X4) 내지 (식 X10) 중, PEG가 $(CH_2CH_2O)_m$ 의 평균 분자량이 5kDa이며, $(CH_2CH_2O)_n$ 의 평균 분자량이 17.5kDa인 상기 (식 X14)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,

Y50이란, 상기 (식 X4) 내지 (식 X10) 중, PEG가 $(CH_2CH_2O)_m$ 의 평균 분자량이 10kDa이며, $(CH_2CH_2O)_n$ 의 평균 분자량이 20kDa인 하기 (식 X15)로 표시되는 구조인 것을 나타낸다.



[0727]

[0728]

(공정 1) PEG-할로아세틸의 조제

[0729]

PEG-아민(SUNBRIGHT GL2-400PA; 니퍼유 가부시끼가이샤 또는 SUNBRIGHT GL3-400PA100U; 니퍼유 가부시끼가이샤 또는 SUNBRIGHT GL4-400PA; 니퍼유 가부시끼가이샤)을 클로로포름에 용해하고, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 히드로클로라이드(5 당량), 4-디메틸아미노피리딘(5 당량), 요오도아세트산(5 당량)을 첨가하고 실온 하 90시간 교반하였다. 에테르/이소프로판올=1/1을 첨가하고, 석출한 고체를 여과취출하였다. 잔사를 물에 용해하고, Amicon Ultra-0.5(10kDa)를 사용한 한외 여과에 의해 요오도아세트산을 제거하고, 동결 건조함으로써 PEG-IAC를 합성하였다.

[0730]

(공정 2) Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체의 합성

[0731]

표 5에 나타내는 당쇄 결합 IL-2 개변체의 1mmol/L EDTA, 20mmol/L 인산 완충액(pH5.5)에, 실온 하에서 PEG-할로아세틸(5 당량, 상기 공정 1에서 합성한 화합물 또는 SUNBRIGHT ME-200IA; 니퍼유 가부시끼가이샤 또는 SUNBRIGHT ME-400IA; 니퍼유 가부시끼가이샤) 또는 PEG-말레이미드(5.0nmol, SUNBRIGHT GL2-800MA; 니퍼유 가부시끼가이샤 또는 SUNBRIGHT GL4-400MA100U; 니퍼유 가부시끼가이샤 또는 SUNBRIGHT GL4-800MA; 니퍼유 가부시끼가이샤)의 1mmol/L EDTA, 20mmol/L 인산 완충액(pH5.5)을 첨가한 후, 0.1mol/L 수산화나트륨 수용액을 사용하여 pH7.2 내지 7.4로 조정하고, 2시간 교반하였다. 크기 배제 크로마토그래피(칼럼; Waters제, XBridge BEH450A, 3.5 μ m, 7.8 $\times$ 150mm과 XBridge BEH200A, 3.5 μ m, 7.8 $\times$ 150mm을 연결)로 정제하여, Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체를 합성하였다.

[0732]

정제한 Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체의 순도를 SDS-PAGE로 확인하였다. 그 결과 모든 개변체에 있어서, PEG의 분자량이 증가한 단일의 밴드가 보여서, 고순도의 Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체가 얻어진 것을 확인할 수 있었다.

[0733]

[실시예 4] 대장균용 8His-IL-2 및 o-Az-Z-Lys 도입 인간 IL-2 및 m-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 발현 벡터의 조제

[0734]

표 9에 나타내는 대장균용 8His-IL-2 발현 벡터 및 o-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 발현 벡터 및 m-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 발현 벡터를 이하의 방법에 의해 제작하였다.

표 9

제작한 대장균용 8His-IL-2 발현 벡터 및 o-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 발현 벡터 및 m-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 발현 벡터

개변제명	Az-Z-Lys 도입 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	1 위치 수식	125 위치 변이	염기 서열
8His-IL-2	—	—	—	MHHHHHHHHA	S	서열 번호3
8His-S4 (oAzZK)	4	S	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호4
8His-S5 (oAzZK)	5	S	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호5
8His-S6 (oAzZK)	6	S	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호6
8His-T7 (oAzZK)	7	T	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호7
8His-K8 (oAzZK)	8	K	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호8
8His-E60 (oAzZK)	60	E	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호9
8His-F78 (oAzZK)	78	F	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호10
8His-H79 (oAzZK)	79	F	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호11
8His-R81 (oAzZK)	81	R	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호12
8His-L94 (oAzZK)	94	L	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호13
8His-S99 (oAzZK)	99	S	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호14
8His-E100 (oAzZK)	100	E	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호15
8His-T101 (oAzZK)	101	T	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호16
8His-Q126 (oAzZK)	126	Q	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호17
8His-I129 (oAzZK)	129	I	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호18
8His-I129 (mAzZK)	129	I	m-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호18
8His-S4 (oAzZK) / F78 (oAzZK)	4, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호27
8His-S5 (oAzZK) / F78 (oAzZK)	5, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호28
8His-K8 (oAzZK) / F78 (oAzZK)	8, 78	K, F	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호29
8His-F78 (oAzZK) / H79 (oAzZK)	78, 79	F, H	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호30
8His-F78 (oAzZK) / S99 (oAzZK)	78, 99	F, S	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호31
8His-F78 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	78, 129	F, I	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호32
8His-S4 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	4, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호33
8His-S5 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	5, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호34
8His-K8 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	8, 129	K, I	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호35
8His-H79 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	79, 129	H, I	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호36
8His-S99 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	99, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MHHHHHHHHA	S	서열 번호37

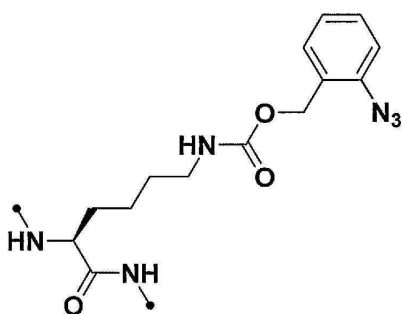
<표 9의 설명>

· Az-Z-Lys 도입 위치: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터의 위치

· 1 위치 수식: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 1번째의 알라닌 잔기의 수식을 나타낸다. MHHHHHHHHA란, N 말단 알라닌 잔기에 메티오닌 및 폴리히스티딘 서열(HHHHHHHH) 태그가 결합하고 있는 것을 나타낸다.

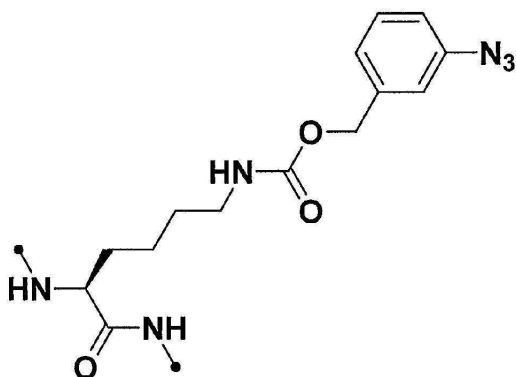
· 125 위치 변이: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 125번째의 아미노산 잔기의 변이의 유무를 나타낸다. 변이를 가하고 있지 않은 경우에는 -, 시스테인으로부터 세린으로 아미노산 잔기를 치환하는 변이를 가하고 있는 경우에는 S라고 기재한다.

표 중, 치환 후의 아미노산 잔기의 열에 기재한 o-Az-Z-Lys란 하기 (식 10)으로 표시되는 구조를 나타내고,



(식 10)

[0742] m-Az-Z-Lys란 하기 (식 XX1)로 표시되는 구조를 나타낸다.



(식 XX1)

[0743]

[0744] IL-2로서는, 서열 번호 1로 표현되는 야생형 성숙 인간 IL-2 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 시스테인으로부터 세린으로 치환하고, 또한 N 말단에 메티오닌 및 폴리히스티딘 서열(HHHHHHHH) 태그가 결합한 아미노산 서열을 포함하는 8His-IL-2(아미노산 서열: 서열 번호 2, 당해 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열: 서열 번호 3)를 바탕으로 하여, 상기 발현 벡터를 제작하였다.

[0745] pFLAG-CTS(SIGMA사제)의 lac 리프레서 유전자 lacI의 직하류에, 피롤리딘 tRNA의 염기 서열 및 피롤리딘 tRNA 합성 효소(이하 Pyl tRNA, tRNA^{Pyl}이라고도 기재한다)를 코딩하는 염기 서열이 삽입된 pFLAG-CTS-Pyl TS(국제 공개 제2017/030156호)의 NdeI 제한 효소 사이트와 SalI 제한 효소 사이트의 사이에, 8His-IL-2를 코딩하는 염기 서열(서열 번호 3)을 삽입함으로써, 대장균용의 8His-IL-2 발현 벡터(이하 pFLAG-CTS-Pyl TS_8His-hIL-2라고 기재한다)를 제작하였다.

[0746] 8His-IL-2의 염기 서열을 기로 하여, o-Az-Z-Lys 또는 m-Az-Z-Lys를 도입하는 부위에 상당하는 코돈을 앰버(TAG) 코돈으로 치환한 염기 서열(서열 번호 4 내지 18, 27 내지 37)을 PCR법 또는 인공 유전자 합성(니혼 진위즈 가부시키키가이샤)으로 제작하였다. 얻어진 염기 서열을, pFLAG-CTS-Pyl TS-8His-hIL-2의 8His-IL-2의 염기 서열과 치환하였다.

[0747] [실시예 5] 8His-IL-2 및 o-Az-Z-Lys 도입 IL-2 및 m-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2의 조제

[0748] 표 10에 나타내는 8His-IL-2 및 o-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 및 m-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2를 이하의 방법에 의해 제작하였다.

표 10

조제한 8His-IL-2 및 o-Az-Z-Lys 도입IL-2 및 m-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2

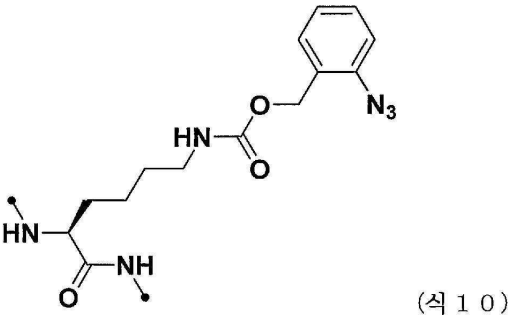
개변제명	Az-Z-Lys 도입 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	1 위치 수식	125 위치 변이
8His-IL-2	—	—	—	MMMMMMMMHA	S
8His-S4(oAzZK)	4	S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S5(oAzZK)	5	S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S6(oAzZK)	6	S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-T7(oAzZK)	7	T	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-K8(oAzZK)	8	K	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-E60(oAzZK)	60	E	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK)	78	F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-H79(oAzZK)	79	F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-R81(oAzZK)	81	R	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-L94(oAzZK)	94	L	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S99(oAzZK)	99	S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-E100(oAzZK)	100	E	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-T101(oAzZK)	101	T	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-Q126(oAzZK)	126	Q	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-I129(oAzZK)	129	I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-I129(mAzZK)	129	I	m-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S4(oAzZK) / F78(oAzZK)	4, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S5(oAzZK) / F78(oAzZK)	5, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-K8(oAzZK) / F78(oAzZK)	8, 78	K, F	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK) / H79(oAzZK)	78, 79	F, H	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK) / S99(oAzZK)	78, 99	F, S	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK) / I129(oAzZK)	78, 129	F, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S4(oAzZK) / I129(oAzZK)	4, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S5(oAzZK) / I129(oAzZK)	5, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-K8(oAzZK) / I129(oAzZK)	8, 129	K, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-H79(oAzZK) / I129(oAzZK)	79, 129	H, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S
8His-S99(oAzZK) / I129(oAzZK)	99, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MMMMMMMMHA	S

- <표 10의 설명>
- Az-Z-Lys 도입 위치: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터의 위치

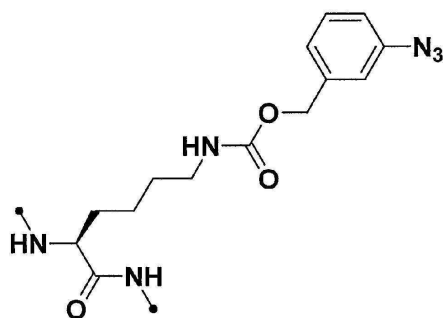
· 1 위치 수식: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 1번째의 알라닌 잔기의 수식을 나타낸다. MHHHHHHHHA란, N 말단 알라닌 잔기에 메티오닌 및 폴리히스티딘 서열(HHHHHHHH) 태그가 결합하고 있는 것을 나타낸다.

· 125 위치 변이: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 125번째의 아미노산 잔기의 변이의 유무를 나타낸다. 변이를 가하고 있지 않은 경우에는 -, 시스테인으로부터 세린으로 아미노산 잔기를 치환하는 변이를 가하고 있는 경우에는 S라고 기재한다.

표 중, 치환 후의 아미노산 잔기의 열에 기재한 o-Az-Z-Lys란 하기 (식 10)으로 표시되는 구조를 나타내고,



[0756] m-Az-Z-Lys란 하기 (식 XX1)로 표시되는 구조를 나타낸다.



(식 XX1)

[0757]

[0758] 실시예 4에서 제작한 대장균용 8His-IL-2 발현 벡터 및 o-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 발현 벡터 또는 m-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 발현 벡터를 대장균 B-95, delA [Sci Rep, 2015. 5(9699)]에 도입하였다. 8His-IL-2 발현 벡터 및 각종 o-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 발현 벡터 또는 m-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 발현 벡터 100ng을 100 μ L의 적격 세포에 첨가하여 천천히 혼화하고, 빙상에서 30분간 정치하였다.

[0759] 계속해서, 42 $^{\circ}$ C의 온욕에 30초간 가온한 후, 다시 빙상에 2분간 정치하였다. LB 배지 500 μ L를 첨가하여 37 $^{\circ}$ C로 설정한 인큐베이터에서 60분간 진탕 배양을 행한 후, 최종 농도 100 μ g/mL의 암피실린(와코준야쿠사제)을 포함하는 LB 플레이트(1.5w/v% 아가로오스)에 전량을 플레이트하였다. 37 $^{\circ}$ C로 설정한 인큐베이터에서 밤새 배양을 행한 후, 플레이트에서 생육해 온 대장균을 유전자 도입주로서 선발하였다.

[0760] 얻어진 유전자 도입주를 전량 회수하고, 최종 농도 1mM의 o-Az-Z-Lys 또는 m-Az-Z-Lys(국제 공개 제 2017/030156호에 기재된 방법에 따라서 GVK Biosciences사에서 합성), 최종 농도 100 μ g/mL의 암피실린을 첨가한 800mL의 Super Broth [MOPS(나카라이테스크사제) 1w/v%, 트립톤(DIFCO사제) 3w/v%, 효모 추출물(Yeast Extract)(DIFCO사제) 2w/v%]에 파종하고, 37 $^{\circ}$ C로 설정한 바이오 셰이커에서, 165rpm으로 진탕 배양하였다.

[0761] 균체 용액의 600nm의 흡광도의 값이 1.5 내지 2.0이 된 단계에서 최종 농도 1.0mmol/L의 이소프로필- β -티오갈락토피라노시드(IPTG)(나카라이테스크사제)를 첨가하고, 42 $^{\circ}$ C로 설정한 바이오 셰이커에서, 165rpm으로 3시간 진탕 배양하여 각 인간 IL-2를 발현시켰다.

[0762] 배양 후의 균체 용액을 원심 분리[CR21E(히다치 세이사꾸쇼사제), 7000rpm, 4 $^{\circ}$ C, 5분간]함으로써 대장균 균체를 회수 후, 40mL의 B-PER 박테리아 단백질 추출 시약(Bacterial Protein Extraction Reagent)(Thermo Scientific사제)을 첨가하고 용균시키고, 원심 분리(12000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 5분간)함으로써 용입체를 얻었다.

[0763] 얻어진 용입체를 32mL의 용입체 가용화 시약(Inclusion Body Solubilization Reagent)(Thermo Scientific사제)으로 용해 후, 다시 원심 분리(12000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 30분간)하고, 상청을 회수하였다.

[0764] 용입체 가용화액을 6mol/L 구아니딘염산염(와코준야쿠사제)을 포함하는 100mmol/L Tris-HCl 완충액(와코준야쿠사제)(pH8.0)으로 3배 용량으로 희석 후, TALON 금속 친화성 수지(Metal Affinity Resin)(Clontech사제)에 첨가하였다. 6mol/L 구아니딘염산염을 포함하는 100mmol/L Tris-HCl 완충액(pH8.0)으로 세정 후, 250mmol/L 이미다졸 및 6mol/L 구아니딘염산염을 포함하는 100mmol/L Tris-HCl 완충액(pH8.0)으로 용출하였다. 280nm의 흡광도를 측정함으로써, 용출액의 단백질 농도를 측정하였다.

[0765] 리폴딩 버퍼[1mmol/L 산화형 글루타티온(Sigma-Aldrich사제)을 포함하는 100mmol/L Tris-HCl 완충액(pH8.0)]로 상기 용출액을 3배 희석하고, 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 정치하였다. 그 후, Amicon Ultra-4(3kDa)(머크 밀리포아사제)로 농축하였다.

[0766] AKTA FPLC(GE 헬스케어사제)에 Superdex75 10/300GL(GE 헬스케어사제)을 접속하고, 이동상으로서 2mol/L 구아니딘염산염을 포함하는 100mmol/L Tris-HCl 완충액(pH8.0)을 송액하였다. 상기 농축액을 SEC 칼럼에 첨가하고, 단량체 분획을 회수하였다.

[0767] 얻어진 분획은 D-PBS(나카라이테스크사제)로 2배 희석하고 실온에서 6시간 정치 후, Amicon Ultra-4(3kDa)를 사용한 한계 여과에 의해 D-PBS에 버퍼 치환하였다.

[0768] 제작한 모든 o-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 또는 m-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2는, SDS-PAGE에서 8His-IL-2와 동일한 분자량의 밴드인 것을 확인하였다.

[0769] [실시예 6] 대장균용 o-Az-Z-Lys 도입 IL-2 발현 벡터의 조제

[0770] 표 11에 나타내는 대장균용 o-Az-Z-Lys 도입 IL-2 발현 벡터를 이하의 방법에 의해 제작하였다.

표 11

제작한 대장균용 o-Az-Z-Lys 도입 IL-2 발현 벡터

개변제명	Az-Z-Lys 도입 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	1 위치 수식	125 위치 변이	염기 서열
F78 (oAzZK)	78	F	o-Az-Z-Lys	MA	S	서열 번호42
I129 (oAzZK)	129	I	o-Az-Z-Lys	MA	S	서열 번호43
desAla-I129 (oAzZK)	129	I	o-Az-Z-Lys	M	S	서열 번호44
S4 (oAzZK) / F78 (oAzZK)	4, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MA	S	서열 번호45
S5 (oAzZK) / F78 (oAzZK)	5, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MA	S	서열 번호46
K8 (oAzZK) / F78 (oAzZK)	8, 78	K, F	o-Az-Z-Lys	MA	S	서열 번호47
S4 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	4, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MA	S	서열 번호48
S5 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	5, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MA	S	서열 번호49
K8 (oAzZK) / I129 (oAzZK)	8, 129	K, I	o-Az-Z-Lys	MA	S	서열 번호50

[0771]

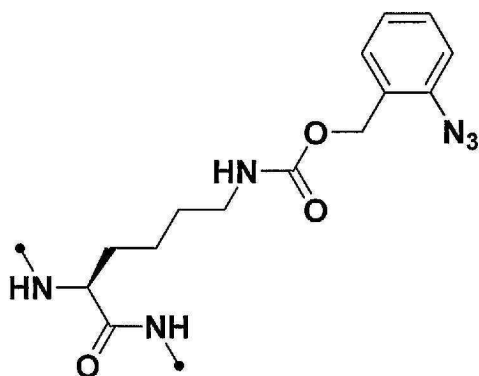
[0772] <표 11의 설명>

[0773] · Az-Z-Lys 도입 위치: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터의 위치

[0774] · 1 위치 수식: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 1번째의 알라닌 잔기의 수식을 나타낸다. MA란, N 말단 알라닌 잔기에 메티오닌이 결합하고 있는 것을 나타낸다. M이란, 알라닌으로부터 메티오닌으로 아미노산 잔기를 치환하는 변이를 가하고 있는 것을 나타낸다.

[0775] · 125 위치 변이: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 125번째의 아미노산 잔기의 변이의 유무를 나타낸다. 변이를 가하고 있지 않은 경우에는 -, 시스테인으로부터 세린으로 아미노산 잔기를 치환하는 변이를 가하고 있는 경우에는 S라고 기재한다.

[0776] 표 중, 치환 후의 아미노산 잔기의 열에 기재한 o-Az-Z-Lys란 하기 (식 10)으로 표시되는 구조를 말한다.



(식 10)

[0777]

[0778] IL-2로서는, 서열 번호 1로 표현되는 야생형 성숙 인간 IL-2 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 시스테인으로부터 세린으로 치환하고, 또한 N 말단에 메티오닌 결합한 아미노산 서열을 포함하는 IL-2(아미노산 서열: 서열 번호 38, 당해 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열: 서열 번호 39), 또는 서열 번호 1로 표현되는 야생형 성숙 인간 IL-2 아미노산 서열의 125번째의 아미노산 잔기를 시스테인으로부터 세린으로 치환하고, 1번째의 알라닌 잔기를 결손하고, 또한 N 말단에 메티오닌 결합한 아미노산 서열(아미노산 서열: 서열 번호 40, 당해 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열: 서열 번호 41)을 포함하는 IL-2를 바탕으로 하여, 상기 발현 벡터를 제작하였다.

[0779] pFLAG-CTS-Py1 TS의 NdeI 제한 효소 사이트와 SalI 제한 효소 사이트의 사이에, o-Az-Z-Lys를 도입하는 부위에 상당하는 코돈을 앰버(TAG) 코돈으로 치환한 염기 서열(서열 번호 42 내지 50)을 삽입함으로써, 대장균용의 각종 o-Az-Z-Lys 도입 IL-2 발현 벡터(이하 pFLAG-CTS-Py1 TS_hIL-2라고 기재한다)를 제작하였다.

[0780] [실시예 7] o-Az-Z-Lys 도입 IL-2의 조제

[0781] 표 12에 나타내는 IL-2의 임의의 아미노산 잔기를 o-Az-Z-Lys 잔기로 치환한 o-Az-Z-Lys 도입 IL-2는 이하의 방법으로 제작하였다.

표 12

조제한 o-Az-Z-Lys 도입IL-2					
개변제명	oAzZK 도입 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	1 위치 수식	125 위치 변이
F78(oAzZK)	78	F	o-Az-Z-Lys	MA	S
I129(oAzZK)	129	I	o-Az-Z-Lys	MA	S
desAla-I129(oAzZK)	129	I	o-Az-Z-Lys	M	S
S4(oAzZK) / F78(oAzZK)	4, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MA	S
S5(oAzZK) / F78(oAzZK)	5, 78	S, F	o-Az-Z-Lys	MA	S
K8(oAzZK) / F78(oAzZK)	8, 78	K, F	o-Az-Z-Lys	MA	S
S4(oAzZK) / I129(oAzZK)	4, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MA	S
S5(oAzZK) / I129(oAzZK)	5, 129	S, I	o-Az-Z-Lys	MA	S
K8(oAzZK) / I129(oAzZK)	8, 129	K, I	o-Az-Z-Lys	MA	S

[0782]

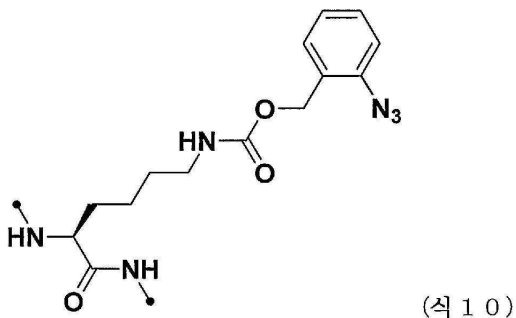
[0783] <표 12의 설명>

[0784] · o-Az-Z-LysK 도입 위치: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터의 위치

[0785] · 1 위치 수식: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 1번째의 알라닌 잔기의 수식을 나타낸다. MA란, N 말단 알라닌 잔기에 메티오닌이 결합하고 있는 것을 나타낸다. M이란, 알라닌으로부터 메티오닌으로 아미노산 잔기를 치환하는 변이를 가하고 있는 것을 나타낸다.

[0786] · 125 위치 변이: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 125번째의 아미노산 잔기의 변이의 유무를 나타낸다. 변이를 가하고 있지 않은 경우에는 -, 시스테인으로부터 세린으로 아미노산 잔기를 치환하는 변이를 가하고 있는 경우에는 S라고 기재한다.

[0787] 표 중, 치환 후의 아미노산 잔기의 열에 기재한 o-Az-Z-Lys란 하기 (식 10)으로 표시되는 구조를 말한다.



[0788]

[0789] 실시예 6에서 제작한 대장균용 o-Az-Z-Lys 도입 IL-2 발현 벡터를 대장균 B-95. delA[Sci Rep, 2015. 5(9699)]에 도입하고, 실시예 5에 기재된 방법으로 봉입체 가용화액을 조제하였다.

[0790] AKTA FPLC에 HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR(GE 헬스케어사제)을 접속하고, 이동상으로서 2mol/L 구아니딘염 산염을 포함하는 100mmol/L Tris-HCl 완충액(pH8.0)을 송액하였다. 상기 봉입체 가용화액을 SEC 칼럼에 첨가하고, 단량체 분획을 회수하였다.

[0791] 산화형 글루타티온을 2mmol/L이 되도록 첨가하고, 4℃에서 밤새 정치하였다. 그 후, Amicon Ultra-4(3kDa)(머크 밀리포아사제)로 농축하고 NAP 칼럼(GE 헬스케어사제)을 사용하여 0.4mol/L 아르기닌염산염, 5w/v% 트레올로오스를 포함하는 10mmol/L 아세트산 완충액(pH4.5)에 버퍼 치환하였다.

[0792] 제작한 o-Az-Z-Lys 도입 IL-2는, SDS-PAGE에서 아미노산 서열로부터 예상되는 분자량을 갖는 것을 확인하였다.

[0793] [실시예 8] o-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 또는 m-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 또는 o-Az-Z-Lys 도입 IL-2의 PEG화

[0794] 표 13 내지 15에 나타내는 o-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 또는 m-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 또는 o-Az-Z-Lys 도입

IL-2의 PEG화체(이하 PEG 결합 IL-2 개변체라고 기재한다)를 이하의 방법으로 조제하였다.

표 13

제작한 PEG 결합 IL-2 개변체

개변체명	PEG 도입 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	1 위치 수식	125 위치 변이
8His-S4(oAzZK)-PEG4	4	S	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-S4(oAzZK)-Li20	4	S	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-S4(oAzZK)-Li30	4	S	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S
8His-S5(oAzZK)-PEG4	5	S	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-S5(oAzZK)-Li20	5	S	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-S5(oAzZK)-Li30	5	S	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S
8His-S6(oAzZK)-PEG4	6	S	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-S6(oAzZK)-Li20	6	S	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-S6(oAzZK)-Li30	6	S	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S
8His-T7(oAzZK)-PEG4	7	T	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-T7(oAzZK)-Li20	7	T	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-T7(oAzZK)-Li30	7	T	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S
8His-K8(oAzZK)-PEG4	8	K	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-K8(oAzZK)-Li20	8	K	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-K8(oAzZK)-Li30	8	K	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S
8His-E60(oAzZK)-PEG4	60	E	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-E60(oAzZK)-Li20	60	E	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-E60(oAzZK)-Li30	60	E	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK)-PEG4	78	F	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK)-Li20	78	F	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK)-Li30	78	F	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK)-Li40	78	F	(oAzZK)-Li40	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK)-Y50	78	F	(oAzZK)-Y50	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK)-V40	78	F	(oAzZK)-V40	MMMMMMMMHA	S
8His-F78(oAzZK)-W40	78	F	(oAzZK)-W40	MMMMMMMMHA	S
F78(oAzZK)-IIII40	78	F	(oAzZK)-IIII40	MA	S
F78(oAzZK)-Li40	78	F	(oAzZK)-Li40	MA	S
F78(oAzZK)-V40	78	F	(oAzZK)-V40	MA	S
F78(oAzZK)-V80	78	F	(oAzZK)-V80	MA	S
F78(oAzZK)-W40	78	F	(oAzZK)-W40	MA	S
F78(oAzZK)-W80	78	F	(oAzZK)-W80	MA	S
8His-H79(oAzZK)-PEG4	79	F	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-H79(oAzZK)-Li20	79	F	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-H79(oAzZK)-Li30	79	F	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S

[0795]

표 14

제작한 PEG 결합 IL-2 개변체

개변체명	PEG 도입 위치	치환 전의 아미노산	치환 후의 아미노산	1 위치 수식	125 위치 변이
8His-R81(oAzZK)-PEG4	81	R	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-R81(oAzZK)-Li20	81	R	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-R81(oAzZK)-Li30	81	R	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S
8His-L94(oAzZK)-PEG4	94	L	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-L94(oAzZK)-Li20	94	L	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-L94(oAzZK)-Li30	94	L	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S
8His-S99(oAzZK)-PEG4	99	S	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-S99(oAzZK)-Li20	99	S	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-S99(oAzZK)-Li30	99	S	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S
8His-E100(oAzZK)-PEG4	100	E	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-E100(oAzZK)-Li20	100	E	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-E100(oAzZK)-Li30	100	E	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S
8His-T101(oAzZK)-PEG4	101	T	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-T101(oAzZK)-Li20	101	T	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-T101(oAzZK)-Li30	101	T	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S
8His-Q126(oAzZK)-PEG4	126	Q	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-Q126(oAzZK)-Li20	126	Q	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-Q126(oAzZK)-Li30	126	Q	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S
8His-I129(oAzZK)-PEG4	129	I	(oAzZK)-PEG4	MMMMMMMMHA	S
8His-I129(oAzZK)-Li20	129	I	(oAzZK)-Li20	MMMMMMMMHA	S
8His-I129(oAzZK)-Li30	129	I	(oAzZK)-Li30	MMMMMMMMHA	S
8His-I129(oAzZK)-Li40	129	I	(oAzZK)-Li40	MMMMMMMMHA	S
8His-I129(oAzZK)-V40	129	I	(oAzZK)-V40	MMMMMMMMHA	S
8His-I129(mAzZK)-V40	129	I	(mAzZK)-V40	MMMMMMMMHA	S
8His-I129(oAzZK)-W40	129	I	(oAzZK)-W40	MMMMMMMMHA	S
8His-I129(oAzZK)-Y50	129	I	(oAzZK)-Y50	MMMMMMMMHA	S
I129(oAzZK)-IIII40	129	I	(oAzZK)-IIII40	MA	S
I129(oAzZK)-Li30	129	I	(oAzZK)-Li30	MA	S
I129(oAzZK)-Li40	129	I	(oAzZK)-Li40	MA	S
I129(oAzZK)-V40	129	I	(oAzZK)-V40	MA	S
I129(oAzZK)-V80	129	I	(oAzZK)-V80	MA	S
I129(oAzZK)-W40	129	I	(oAzZK)-W40	MA	S
I129(oAzZK)-W80	129	I	(oAzZK)-W80	MA	S
desAla-I129(oAzZK)-V40	129	I	(oAzZK)-V40	M	S
desAla-I129(oAzZK)-W80	129	I	(oAzZK)-W80	M	S
desAla-I129(oAzZK)-V80	129	I	(oAzZK)-V80	M	S

[0796]

표 15

계좌한 PEG 결합 II-2 개변체									
개변체명	PEG 도입 위치 1			PEG 도입 위치 2			치환 후의 아미노산 잔기	1 위치 수식	125 위치 변이
	PEG 도입 위치	치환 전의 아미노산 잔기	위치	PEG 도입 위치	치환 전의 아미노산 잔기	위치			
8His-S4 (oAzZK)-Li30 / F78 (oAzZK)-Li30	4	S	78	F	(oAzZK)-Li30	MA	MA	S	S
S4 (oAzZK)-Li40 / F78 (oAzZK)-Li40	4	S	78	F	(oAzZK)-Li40	MA	MA	S	S
S4 (oAzZK)-Y50 / F78 (oAzZK)-Y50	4	S	78	F	(oAzZK)-Y50	MA	MA	S	S
8His-S5 (oAzZK)-Li30 / F78 (oAzZK)-Li30	5	S	78	F	(oAzZK)-Li30	MA	MA	S	S
S5 (oAzZK)-Li40 / F78 (oAzZK)-Li40	5	S	78	F	(oAzZK)-Li40	MA	MA	S	S
8His-K8 (oAzZK)-Li30 / F78 (oAzZK)-Li30	8	K	78	F	(oAzZK)-Li30	MA	MA	S	S
K8 (oAzZK)-Li40 / F78 (oAzZK)-Li40	8	K	78	F	(oAzZK)-Li40	MA	MA	S	S
8His-F78 (oAzZK)-Li30 / H79 (oAzZK)-Li30	78	F	79	H	(oAzZK)-Li30	MA	MA	S	S
8His-F78 (oAzZK)-Li30 / S99 (oAzZK)-Li30	78	F	99	S	(oAzZK)-Li30	MA	MA	S	S
8His-F78 (oAzZK)-Li30 / I129 (oAzZK)-Li30	78	F	129	I	(oAzZK)-Li30	MA	MA	S	S
8His-S4 (oAzZK)-Li30 / I129 (oAzZK)-Li30	4	S	129	I	(oAzZK)-Li30	MA	MA	S	S
8His-S4 (oAzZK)-Y50 / I129 (oAzZK)-Y50	4	S	129	I	(oAzZK)-Y50	MA	MA	S	S
S4 (oAzZK)-Li40 / I129 (oAzZK)-Li40	4	S	129	I	(oAzZK)-Li40	MA	MA	S	S
S4 (oAzZK)-Y50 / I129 (oAzZK)-Y50	4	S	129	I	(oAzZK)-Y50	MA	MA	S	S
8His-S5 (oAzZK)-Li30 / I129 (oAzZK)-Li30	5	S	129	I	(oAzZK)-Li30	MA	MA	S	S
S5 (oAzZK)-Li40 / I129 (oAzZK)-Li40	5	S	129	I	(oAzZK)-Li40	MA	MA	S	S
S5 (oAzZK)-Y50 / I129 (oAzZK)-Y50	5	S	129	I	(oAzZK)-Y50	MA	MA	S	S
8His-K8 (oAzZK)-Li30 / I129 (oAzZK)-Li30	8	K	129	I	(oAzZK)-Li30	MA	MA	S	S
8His-K8 (oAzZK)-Y50 / I129 (oAzZK)-Y50	8	K	129	I	(oAzZK)-Y50	MA	MA	S	S
K8 (oAzZK)-Li40 / I129 (oAzZK)-Li40	8	K	129	I	(oAzZK)-Li40	MA	MA	S	S
K8 (oAzZK)-Y50 / I129 (oAzZK)-Y50	8	K	129	I	(oAzZK)-Y50	MA	MA	S	S
8His-H79 (oAzZK)-Li30 / I129 (oAzZK)-Li30	79	H	129	I	(oAzZK)-Li30	MA	MA	S	S
8His-S99 (oAzZK)-Li30 / I129 (oAzZK)-Li30	99	S	129	I	(oAzZK)-Li30	MA	MA	S	S

<표 13, 14 및 15의 설명>

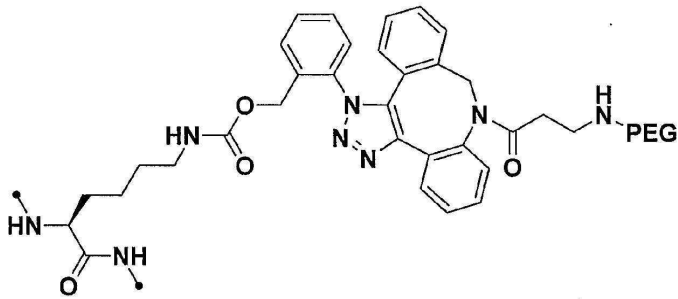
· PEG 도입 위치: 서열 번호 1의 N 말단으로부터의 위치

· 1 위치 수식: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 1번째의 알라닌 잔기의 수식을 나타낸다. MA란, N 말단 알라닌 잔기에 메티오닌이 결합하고 있는 것을 나타내고, MHHHHHHHHA란, N 말단 알라닌 잔기에 메티오닌 및 폴리히스티딘 서열(MHHHHHHH) 태그가 결합하고 있는 것을 나타낸다.

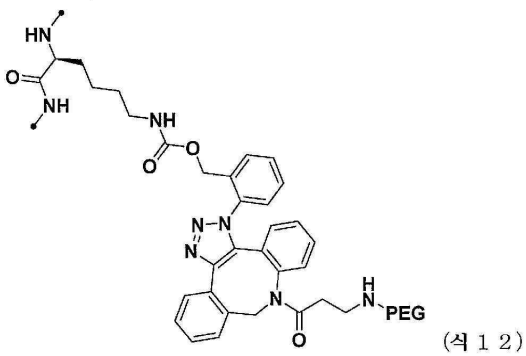
· 125 위치 변이: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 125번째의 아미노산 잔기의 변이의 유무를 나타낸다. 아미노산 잔기의 변이를 가지고 있지 않은 경우에는 -, 시스테인으로부터 세린으로 아미노산 잔기를 치환하는 변이를 가지고 있는 경우에는 S라고 기재한다.

표 중, 치환 후의 아미노산 잔기의 열에 기재한 구조에 대하여 이하에 나타내었다.

[0803] (oAzZK)-PEG(PEG4, Li20, Li30, Li40, V40, V80, W40, W80, Y50, IIII40)란, 리신의 측쇄 아미노기에, 링커를 통하여 PEG가 도입된 하기 (식 11) 또는 (식 12)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,

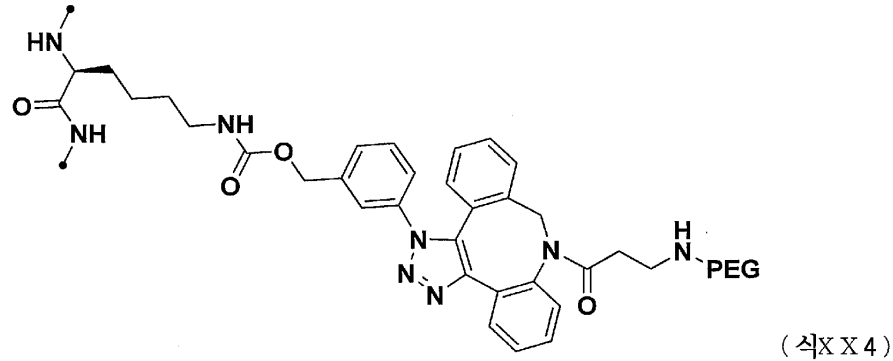


[0804]

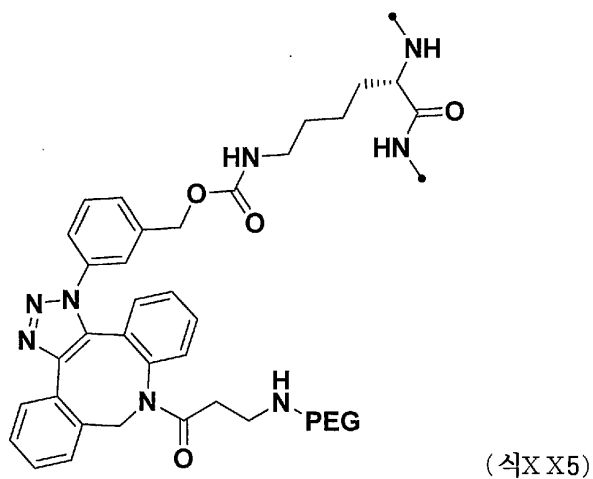


[0805]

[0806] (mAzZK)-PEG(V40)란, 리신의 측쇄 아미노기에, 링커를 통하여 PEG가 도입된 하기 (식 XX4) 또는 (식 XX5)로 표시되는 구조인 것을 나타낸다.

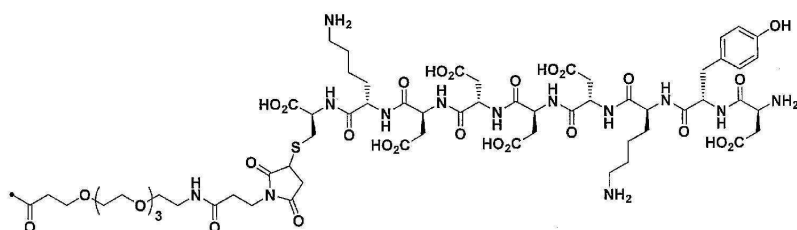


[0807]



[0808]

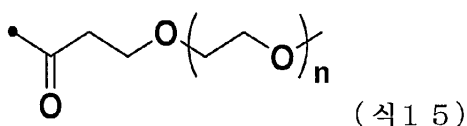
[0809] PEG4란 하기 (식 13)으로 표시되는 구조인 것을 나타내고,



(식 13)

[0810]

[0811] Li20이란, 평균 분자량 약 20kDa인 경우의 하기 (식 15)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,

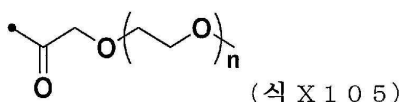


(식 15)

[0812]

[0813] Li30이란, 평균 분자량 약 30kDa인 경우의 상기 (식 15)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,

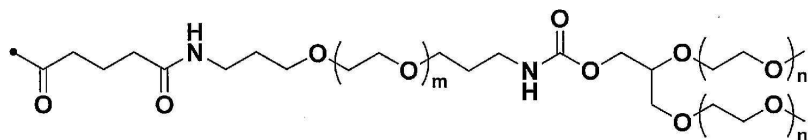
[0814] Li40이란, 평균 분자량 약 40kDa의 하기 (식 X105)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,



(식 X105)

[0815]

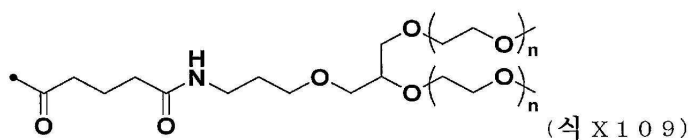
[0816] Y50이란, $(CH_2CH_2O)_m$ 의 평균 분자량이 10kDa이며, $(CH_2CH_2O)_n$ 의 평균 분자량이 20kDa인 하기 (식 X107)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,



(식 X107)

[0817]

[0818] V40이란, 평균 분자량이 40kDa인 하기 (식 X109)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,

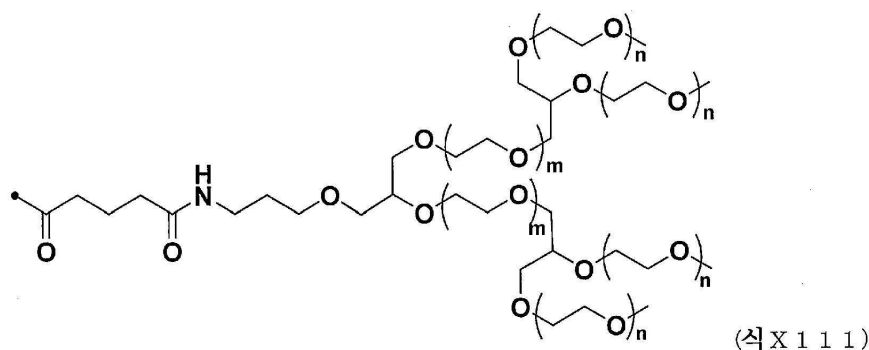


(식 X109)

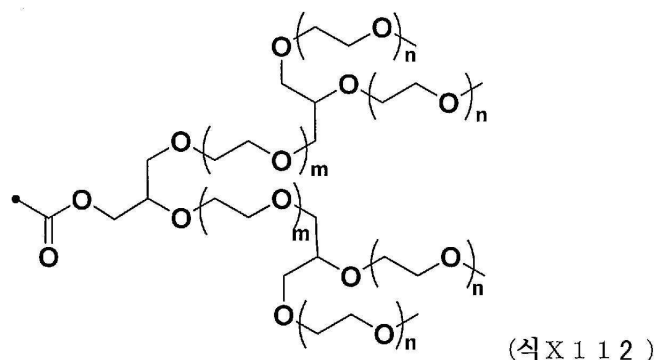
[0819]

[0820] V80이란, 평균 분자량이 80kDa인 상기 (식 X109)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,

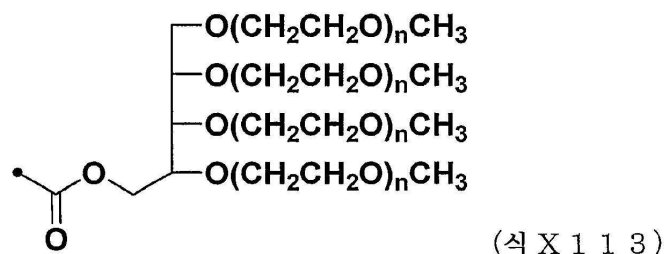
[0821] W40이란, $(CH_2CH_2O)_m$ 의 평균 분자량이 5kDa이며, $(CH_2CH_2O)_n$ 의 평균 분자량이 7.5kDa인 하기 (식 X111)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,



W80이란, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m$ 의 평균 분자량이 5kDa이며, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 의 평균 분자량이 17.5kDa인 하기 (식 X112)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,



IIII40이란, 평균 분자량이 40kDa인 하기 (식 X113)으로 표시되는 구조인 것을 나타낸다.



(공정 1a) PEG-DBCO의 조제 1

PEG-카르복실산(mPEG-AA 40K; Creative PEG Works사제)을 클로로포름에 용해하고, 1-에틸-3-(3-디메틸아미노프로필)카르보디이미드 히드록로라이드(5 당량), 4-디메틸아미노피리딘(5 당량), 디벤조시클로옥틴-아민(5 당량, A2763; 도표 가세이 고교)을 첨가하고 실온 하 3시간 교반하였다. 에테르/이소프로판올=1/1을 첨가하고, 석출한 고체를 여과취출함으로써 PEG-DBCO를 합성하였다.

(공정 1b) PEG-DBCO의 합성 2

PEG-NHS(SUNBRIGHT GL2-400GS2; 니찌유 가부시끼가이샤 또는 SUNBRIGHT GL2-800GS2; 니찌유 가부시끼가이샤 또는 SUNBRIGHT GL4-400GS2; 니찌유 가부시끼가이샤 또는 SUNBRIGHT GL4-800TS; 니찌유 가부시끼가이샤 또는 SUNBRIGHT GL2-400GS100U; 니찌유 가부시끼가이샤 또는 SUNBRIGHT XY4-400TS; 니찌유 가부시끼가이샤)를 클로로포름에 용해하고, 디벤조시클로옥틴-아민(5 당량, A2763; 도표 가세이 고교)을 첨가하고 실온 하 3시간 교반하였다. 에테르/이소프로판올=1/1을 첨가하고, 석출한 고체를 여과취출함으로써 PEG-DBCO를 합성하였다.

(공정 2) PEG 결합 IL-2 개변체의 조제

PEG-DBCO(DBCO-PEG4-FLAG(DYKDDDDK)(Jena Bioscience사제), DBCO-PEG 20kDa(Click Chemistry Tools사제), DBCO-PEG 30kDa(Click Chemistry Tools사제) 또는 공정 1a 혹은 공정 1b에서 조제한 PEG-DBCO를 D-PBS로 용해

하고, 이것을 o-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 또는 m-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 또는 o-Az-Z-Lys 도입 IL-2에 20mol 당량 첨가하고, 실온에서 밤새 정치하였다.

[0833] DBCO-PEG4-FLAG을 결합시킨 PEG 결합 IL-2 개변체는 ANTI-FLAG M2 친화성 아가로스 겔(Affinity Agarose Gel)(Sigma-Aldrich사제)을 사용하여, 메이커 매뉴얼에 기재된 수순으로 목적 단백질을 정제하였다.

[0834] DBCO-PEG4-FLAG 이외의 PEG를 결합시킨 PEG 결합 IL-2 개변체는, 처음에 MonoS 5/50GL(GE 헬스케어사제)을 사용한 양이온 교환 크로마토그래피에 의해 미반응된 PEG를 제거하였다. 이동상에는 50mmol/L 인산 완충액(pH3.0)을 사용하였다. 계속하여 Superrose 6 increase 10/300GL(GE 헬스케어사제)을 사용한 크기 배제 크로마토그래피에 의해 PEG 결합 IL-2 개변체를 분취하였다. 이동상에는, 2mol/L 구아니딘염산염을 포함하는 100mmol/L Tris-HCl 완충액(pH8.0)을 사용하였다.

[0835] 얻어진 PEG 결합 IL-2 개변체는, Amicon Ultra-4(3kDa)를 사용한 한계 여과, 또는 NAP 칼럼에 의해 D-PBS 또는 5w/v% 트레할로오스를 포함하는 10mM 아세트산 버퍼(pH4.5) 또는 0.4mol/L 아르기닌염산염, 5w/v% 트레할로오스를 포함하는 10mM 아세트산 완충액(pH4.5)에 버퍼 치환하였다.

[0836] 정제한 PEG 결합 IL-2 개변체의 순도를 SDS-PAGE로 확인하였다. 그 결과 모든 PEG 결합 IL-2 개변체에 있어서, o-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 또는 m-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 또는 o-Az-Z-Lys 도입 IL-2에 대하여 PEG의 분자량이 증가한 단일의 밴드가 보여서, 고순도의 PEG 결합 IL-2 개변체가 얻어진 것을 확인할 수 있었다.

[0837] [실시예 9] I129C 변이 IL-2 발현 벡터의 조제

[0838] 서열 번호 1로 표현되는 야생형 성숙 인간 IL-2 아미노산 서열의 1번째의 알라닌을 결손하고, 125번째의 아미노산 잔기를 시스테인으로부터 세린으로, 129번째의 아미노산 잔기를 이소류신으로부터 시스테인으로 치환하고, 또한 N 말단에 메티오닌이 결합한 아미노산 서열을 포함하는 IL-2(아미노산 서열: 서열 번호 51, 당해 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열: 서열 번호 52, 이하 IL-2_I129C라고 기재한다)를 바탕으로 하여, 상기 발현 벡터를 제작하였다.

[0839] IL-2_I129C의 염기 서열(서열 번호 52)을 인공 유전자 합성(가부시키가이샤라구아스 재팬)으로 조제하고, pET-22b(+)(Novagen사제)의 NdeI 제한 효소 사이트와 BamHI 제한 효소 사이트의 사이에 삽입함으로써, 대장균용의 IL-2_I129C 발현 벡터(이하 pET-22b(+)-hIL-2_I129C라고 기재한다)를 제작하였다.

표 16

제작한 Cys 치환IL-2 발현 벡터

개변체명	Cys 치환 위치	치환 전의 아미노산 잔기	1 위치 수식	125 위치 변이	염기 서열
I129C	129	I	M	S	서열 번호52

[0840]

[0841] <표 16의 설명>

[0842] · Cys 변이 위치: 서열 번호 1의 N 말단으로부터의 위치

[0843] · 1 위치 수식: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 1번째의 알라닌 잔기의 수식을 나타낸다. M이란, 알라닌으로부터 메티오닌으로 아미노산 잔기를 치환하고 있는 것을 나타낸다.

[0844] · 125 위치 변이: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 125번째의 아미노산 잔기의 변이의 유무를 나타낸다. 아미노산 잔기의 변이를 가하고 있지 않은 경우에는 -, 시스테인으로부터 세린으로 아미노산 잔기를 치환하는 변이를 가하고 있는 경우에는 S라고 기재한다.

[0845] [실시예 10] IL-2_I129C의 조제

[0846] IL-2_I129C를 하기에 기재된 방법으로 제작하였다. 실시예 9에서 제작한 대장균용 pET-22b(+)-hIL-2_I129C를 대장균 BL21(DE3)(Novagen사제)에 도입하고, 실시예 5에 기재된 방법으로 봉입체를 얻었다.

[0847] 얻어진 봉입체를 15mL의 6mol/L 구아니딘염산염, 5mmol/L DTT, 5mmol/L EDTA를 포함하는 100mmol/L Tris-HCl 완충액(pH8.0)으로 용해 후, 60℃에서 30분간 가온하고, 원심 분리(19000×g, 4℃, 30분간)함으로써 상청을 회

수했다(봉입체 가용화액).

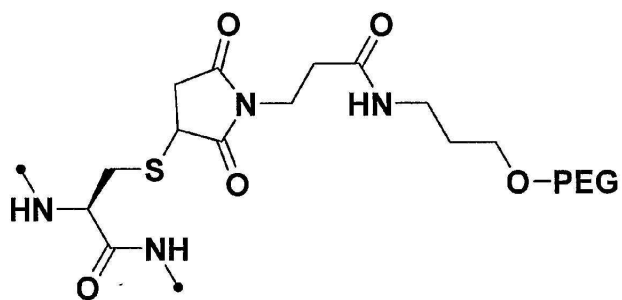
- [0848] 봉입체 가용화액에 15mL의 100mmol/L Tris-HCl 완충액(pH8.0)을 첨가하고 실온에서 10분간 정치 후, 원심 분리 (19000×g, 4℃, 30분간)함으로써 침전을 회수하였다.
- [0849] 얻어진 침전을 다시 6mol/L 구아니딘염산염, 5mmol/L DTT, 5mmol/L EDAT를 포함하는 100mmol/L Tris-HCl 완충액(pH8.0)으로 용해했다(침전 가용화액).
- [0850] AKTA FPLC에 HiPrep 26/60 Sephacryl S-100HR(GE 헬스케어사제)을 접속하고, 이동상으로서 6mol/L 구아니딘염산염, 5mmol/L DTT, 5mmol/L EDTA를 포함하는 100mmol/L Tris-HCl 완충액(pH8.0)을 송액하였다. 상기 침전 가용화액을 SEC 칼럼에 첨가하고, 단량체 분획을 회수하였다.
- [0851] 리폴딩은 이하의 방법으로 실시하였다. 상기에서 조제한 단량체 IL-2_I129C를 NAP 칼럼을 사용하여 6mol/L 구아니딘염산염을 포함하는 100mmol/L Tris-HCl 완충액(pH8.0)에 버퍼 교환 후, 2mol/L 구아니딘염산염, 10vol% 글리세롤, 6.9mmol/L 환원형 글루타티온, 0.7mmol/L 산화형 글루타티온을 포함하는 100mmol/L Tris-HCl 완충액(pH8.0)으로 하여, 실온에서 밤새 정치하였다. 그 후, Proteovavi(시세이도사제)를 사용한 역상 HPLC로 리폴딩 분획을 분취하고, 동결 건조하였다.
- [0852] 제작한 IL-2_I129C의 순도를 SDS-PAGE로 확인하였다. 그 결과, 아미노산 서열로부터 예상되는 분자량을 갖는 단일의 밴드를 확인하였다.
- [0853] [실시예 11] IL-2_I129C의 PEG화
- [0854] 표 17에 나타내는 IL-2_I129C의 PEG화체(이하 PEG 결합 IL-2 개변체라고 기재한다)를 이하의 방법으로 조제한다.

표 17

제작한 PEG 결합 IL-2 개변체

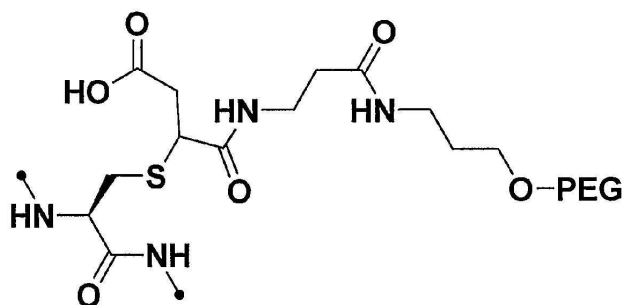
개변체명	PEG도입 위치	치환 전의 아미노산 잔기	치환 후의 아미노산 잔기	1 위치 수식	125 위치 변이
I129C-V40 (Mal)	129	I	C-V40 (Mal)	M	S
I129C-V80 (Mal)	129	I	C-V80 (Mal)	M	S
I129C-W80 (Mal)	129	I	C-W80 (Mal)	M	S

- [0855]
- [0856] <표 17의 설명>
- [0857] · PEG 도입 위치: 서열 번호 1의 N 말단으로부터의 위치.
- [0858] · 1 위치 수식: 서열 번호 1로 표현되는 아미노산 서열의 N 말단으로부터 1번째의 알라닌 잔기의 수식을 나타낸다. M이란, 알라닌으로부터 메티오닌으로 아미노산 잔기를 치환하고 있는 것을 나타낸다.
- [0859] · 125 위치 변이: 서열 번호 1의 N 말단으로부터 125번째의 아미노산 잔기의 변이의 유무를 나타낸다. 아미노산 잔기의 변이를 가하고 있지 않은 경우에는 -, 시스테인으로부터 세린으로 아미노산 잔기를 치환하는 변이를 가하고 있는 경우에는 S라고 기재한다.
- [0860] 표 중, 치환 후의 아미노산 잔기의 열에 기재한 구조에 대하여 이하에 나타내었다.
- [0861] C-PEG(Mal)(V40, V80, W80)란, 시스테인 측쇄에 3-(3-티오-2,5-디옥소피롤리딘-1-일)-프로필옥시 링커를 통하여 PEG가 도입된 하기 (식 X119)로 표시되는 구조인 것을 나타낸다. 이때, C-PEG(Mal)는 디옥소피롤리딘환이 개환한 (식 X120) 또는 (식 X121)로 표시되는 구조여도 된다.



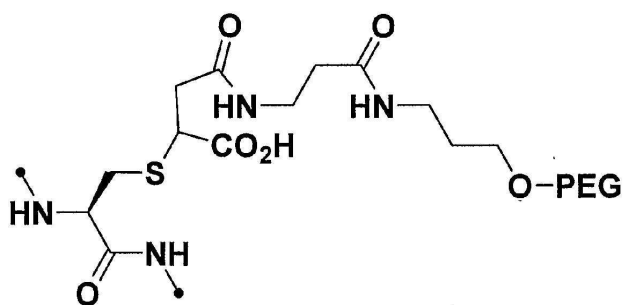
(식 X 1 1 9)

[0862]



(식 X 1 2 0)

[0863]

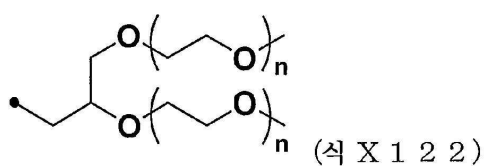


(식 X 1 2 1)

[0864]

[0865]

V40이란, 상기 (식 X119) 내지 (식 X121) 중, PEG가 평균 분자량 약 40kDa의 하기 (식 X122)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,



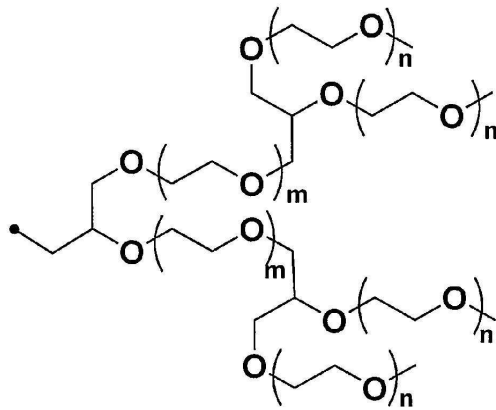
[0866]

[0867]

V80이란, 상기 (식 X119) 내지 (식 X121) 중, PEG가 평균 분자량 약 80kDa인 상기 (식 X122)로 표시되는 구조인 것을 나타내고,

[0868]

W80이란, 상기 (식 X119) 내지 (식 X121) 중, PEG가 $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 의 평균 분자량이 5kDa이며, $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n$ 의 평균 분자량이 17.5kDa인 하기 (식 X128)로 표시되는 구조인 것을 나타낸다.



(식 X 1 2 8)

[0869]

[0870] 실시예 10에서 조제한 IL-2_I129C의 동결 건조품을 2mol/L 구아니딘염산염, 1mmol/L EDTA를 포함하는 20mmol/L Tris-HCl 완충액(pH7.0)으로 용해하였다. PEG-말레이미드(SUNBRIGHT GL2-400MA; 니퍼유 가부시끼가이샤 또는 SUNBRIGHT GL2-800MA; 니퍼유 가부시끼가이샤 또는 SUNBRIGHT GL4-800MA; 니퍼유 가부시끼가이샤)를 D-PBS로 용해하고, 이것을 IL-2_I129C에 대하여 20mol 당량 첨가하고, 실온에서 밤새 정치하였다. PEG 결합 IL-2_I129C는, 실시예 8에 기재된 방법으로 정제하였다. 얻어진 PEG 결합 IL-2_I129C는, NAP 칼럼을 사용하여 0.4mol/L 아르기닌염산염, 5w/v% 트레할로오스를 포함하는 10mM 아세트산 완충액(pH4.5)에 버퍼 치환하였다.

[0871] 정제한 PEG 결합 IL-2 개변체의 순도를 SDS-PAGE로 확인하였다. 그 결과 모든 PEG 결합 IL-2 개변체에 있어서, IL-2_I129C에 대하여 PEG의 분자량이 증가한 단일의 밴드가 보여서, 고순도의 PEG 결합 IL-2 개변체가 얻어진 것을 확인할 수 있었다.

[0872] [실시예 12] IL-2R_{αβγ} 선택성의 평가

[0873] 제작한 IL-2 개변체의 인간 IL-2R_{αβγ}에 대한 선택성을 이하의 방법으로 평가하였다.

[0874] 마우스 pro B 세포주 Ba/F3(RCB0805)에 인간 IL-2R_{αβγ}, 또는 인간 IL-2R_{βγ}을 발현시킴으로써, 인간 IL-2 의존성 생존 세포주를 제작하였다. 각 세포는, 인간 CD25, 인간 CD122, 인간 CD132 및 모노머 Azami-Green을 푸린 절단 서열(RAKR)과 구제역(foot-and-mouth-disease) 바이러스 유래 2A 펩티드 서열(APVKQTLNFDLLKLAGDVESNPG P)을 통하여 연결한 인간 IL-2R_{αβγ}-Azamigreen 융합체의 아미노산 서열(서열 번호 19)을 코딩하는 유전자 서열(서열 번호 20) 또는 인간 CD122, 인간 CD132 및 모노머 Azami-Green을 푸린 절단 서열과 구제역 바이러스 유래 2A 펩티드 서열을 통하여 연결한 인간 IL-2R_{βγ}-Azamigreen 융합체의 아미노산 서열(서열 번호 21)을 코딩하는 유전자 서열(서열 번호 22)을 갖는 pDELTA 벡터를 Nucleofector 2b(Lonza사제)를 사용하여 Ba/F3에 유전자 도입하고, 인간 IL-2에 의존성을 나타내는 클론을 선별함으로써 얻었다. 얻어진 세포는 각각 Ba/F3-hIL-2R_{αβγ} 및 Ba/F3-hIL-2R_{βγ}로 하였다.

[0875] Ba/F3-hIL-2R_{αβγ} 및 Ba/F3-hIL-2R_{βγ}을 원심관에 회수하고, 1200rpm으로 3분간 원심 분리 후, 상청을 흡인 제거하였다. D-PBS로 4회 세정 후, 어세이용 배지[RPMI 1640 배지(나카라이테스크사제) 500mL에 비동화 FBS 50mL(GIBCO사제) 및 페니실린-스트렙토마이신 혼합 용액(나카라이테스크사제) 5mL를 첨가한 배지]에서 세포를 5.0×10^4 cells/mL에 현탁하고, 96웰 백색 평평한 밑바닥 플레이트(스미토모 베이크라이트사제)에 100 μL/well씩 파종하였다.

[0876] 어세이용 배지(0% 컨트롤), 어세이용 배지에서 390nmol/L로 희석한 시판 IL-2 용액(최종 농도 65nmol/L, 100% 컨트롤) 및 어세이용 배지에서 최종 농도의 6배 농도로 희석한 시판 IL-2인 Peptrotech사제 IL-2[이하, IL-2(P)라고 기재한다] 및 Thermo Fisher Scientific사제 IL-2[이하, IL-2(T)라고 기재한다] 또는 각종 당쇄 결합 IL-2 용액(최고 최종 농도 65nM, 10배의 희석 계열에서 9 조건)을 20 μL/well씩 첨가하고, 37℃, 5% CO₂ 하에서 24 내지 48시간 배양하였다.

[0877] Celltiter-Glo 용액(Promega사제)을 80 μL/well씩 첨가하고, 실온에서 10분간 정치 후, 멀티플레이트 리더 ARVO(Perkin Elmer사제)에서 발광값을 측정하였다.

[0878] IL-2(P) 또는 IL-2(T)를 최종 농도 65nmol/mL로 첨가한 웰의 상대 형광 단위(RLU)값을 100%, IL-2를 포함하지 않는 배지를 첨가한 웰의 RLU값을 0%로 하고, 각종 개변체의 IL-2 의존성 세포 증식률(% of IL-2-dependent proliferation)을 산출하였다. 얻어진 데이터를 기초로, 통계 해석 소프트웨어 XLfit5 version 5.3.1.3(IBDS 사제)을 사용하여 EC₅₀값의 산출을 행하였다.

[0879] IL-2(P) 또는 IL-2(T) 및 각종 당쇄 결합 IL-2 개변체에 관하여, Ba/F3-hIL-2R_{αβγ}에 대한 EC₅₀값(EC_{50αβγ})과 Ba/F3-hIL-2R_{βγ}의 EC₅₀값(EC_{50βγ})의 비(EC_{50βγ}/EC_{50αβγ})를 EC₅₀ ratio값으로 정의하고, IL-2R_{αβγ} 선택성의 지표로서 사용하였다.

[0880] IL-2(P) 또는 IL-2(T)의 EC₅₀ ratio값을 1로 한 때의, 각종 당쇄 결합 IL-2 개변체의 EC₅₀ ratio값을 표준화 EC₅₀ ratio 값으로 하고, 표 18 내지 20에 나타내었다.

표 18

당쇄 결합 IL-2 개변체의 표준화 EC50 ratio값

표준화 EC50ratio 값	개변체
< 5	T3C-2, T3C-9, T3C-11, S4C-2, S4C-9, S4C-11, S5C-2, S5C-9, S5C-11, Q11C-2, Q11C-9, L12C-2, H16C-11, L18C-9, L19N-11, R38C-2, R38C-9, R38C-11, N88-1, N88C-1, I92C-11, V115C-9, N119C-11, I122C-9, S127C-11
5 ~ 30	Q11C-11, L12C-9, L12C-11, L18C-2, L18C-11, D20C-2, D20C-11, D84C-2, S87C-2, S87C-11, N88C-9, N88C-11, V91C-2, V91C-9, V91C-11, A108C-2, A108C-9, V115C-2, N119C-2, N119C-9, I122C-2, T123C-11
> 30	Q13C-2, Q13C-11, E15C-2, E15C-11, H16C-2, H16C-3, H16C-5, H16C-9, L19C-2, L19C-9, L19C-11, L19C-11*, N88C-2, I92C-2, S130C-2, S130C-9

[0881]

표 19

당쇄 결합 IL-2 개변체의 표준화 EC50 ratio값

표준화 EC50ratio 값	개변체
< 5	D84C-11, E95C-2, L12C-11 / H16C-2 / L19C-11, L12C-11 / L19C-11, L12C-11 / N88C-2, L12N-11 / V91N-11, E15C-11 / V91C-11, E15C-11 / T123C-11, H16C-2 / L19C-11, H16C-2 / V91C-11, L19C-11 / V91C-11
5 ~ 30	K8C-11 / L19C-11, L12C-11 / H16C-2, E15C-11 / N119C-11, L19C-11 / M23C-11, T3C-11 / L12C-11 / K32C-11 / K76C-11 / V91C-11
> 30	E15C-17, L19C-17, L12C-11 / V91C-11, L12C-11 / V115C-11, L12C-11 / N119C-11, Q13C-11 / V91C-11, Q13C-11 / V115C-11, Q13C-11 / N119C-11, L19C-11 / V115C-11, V91C-11 / V115C-11, V91C-11 / N119C-11, A1C-11 / T3C-11 / S5C-11 / L12C-11 / V91C-11, T3C-11 / L12C-11 / T51C-11 / V91C-11 / E100C-11, T3C-11 / L12C-11 / K76C-11 / V91C-11 / E100C-11, L12C-11 / V91C-11 / E100C-11 / T102C-11 / M104C-11

[0882]

표 20

N말 PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체 및 Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체의 표준화 EC50 ratio값

표준화 EC50ratio값	개변체
< 5	T51C-V40 (IAc) / L12C-11 / V91C-11, T51C-W40 (IAc) / L12C-11 / V91C-11
5 ~ 30	T3C-V40 (IAc) / L12C-11 / V91C-11, T3C-W40 (IAc) / L12C-11 / V91C-11, T3C-W80 (Mal) / L12C-11 / V91C-2, T3C-V80 (Mal) / L12C-11 / N119C-11, T3C-W80 (Mal) / L12C-11 / N119C-11, T3C-Y50 (IAc) / L12C-11 / N119C-11, T51C-Li40 (IAc) / L12C-11 / V91C-11, T51C-Y50 (IAc) / L12C-11 / V91C-11, F78C-V40 (IAc) / L12C-11 / N119C-11, F78C-V80 (Mal) / L12C-11 / N119C-11, F78C-W80 (Mal) / L12C-11 / N119C-11
> 30	A1-Li20 (CHO) / Q11C-9, A1-Li20 (CHO) / L12C-9, A1-Li20 (CHO) / R38C-9, A1-Li20 (CHO) / V91C-9, A1C-Li40 (IAc) / L12C-11 / V91C-11, A1C-V80 (Mal) / L12C-11 / V91C-11, A1C-Y50 (IAc) / L12C-11 / V91C-11, A1C-Y50 (Mal) / L12C-11 / V91C-11, A1C-W80 (Mal) / L12C-11 / V91C-11, A1C-Y50 (IAc) / L19C-11, A1C-V40 (IAc) / L19C-11, A1C-Y50 (IAc) / V91C-11 / N119C-11, T3C-Li20 (IAc) / L12C-11 / V91C-11, T3C-Li40 (IAc) / L12C-11 / V91C-11, T3C-Y50 (IAc) / L12C-11 / V91C-2, T3C-Y50 (IAc) / L12C-11 / V91C-11, T3C-Y50 (Mal) / L12C-11 / V91C-11, T3C-V40 (IAc) / E15C-11, T3C-V80 (Mal) / E15C-11, T3C-Y50 (IAc) / E15C-11, F78C-Li40 (IAc) / L12C-11, F78C-V40 (IAc) / L12C-11, F78C-V40 (Mal) / L12C-11, F78C-V80 (Mal) / L12C-11, F78C-W80 (Mal) / L12C-11, F78C-Li40 (IAc) / E15C-11

[0883]

[0884]

표 18 내지 20에 있어서, 표준화 EC₅₀ ratio값이 5 이상인 당쇄 결합 IL-2 개변체 및 N말 PEG화, 당쇄 결합 IL-2 및 Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2를, 컨트롤인 IL-2(P) 또는 IL-2(T)보다도 IL-2R_{αβγ} 선택성이 높은 개변체라고 판단하였다.

[0885]

표 18 내지 20에 나타내는 바와 같이, 다수의 당쇄 결합 IL-2 개변체 및 N말 PEG화, 당쇄 결합 IL-2 및 Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2가 IL-2(P) 또는 IL-2(T)보다도 IL-2R_{αβγ} 선택성이 높은 개변체인 것을 확인할 수 있었다. 또한, Q13C-2, Q13C-11, E15C-2, E15C-11, H16C-2, H16C-3, H16C-5, H16C-9, L19C-2, L19C-9, L19C-11, L19C-11*, N88C-2, I92C-2, S130C-2, S130C-9, E15C-17, L19C-17, L12C-11/V91C-11, L12C-11/V115C-11, L12C-11/N119C-11, Q13C-11/V91C-11, Q13C-11/V115C-11, Q13C-11/N119C-11, L19C-11/V115C-11, V91C-11/V115C-11, A1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-11, T3C-11/L12C-11/T51C-11/V91C-11/E100C-11, T3C-11/L12C-11/K76C-11/V91C-11/E100C-11, L12C-11/V91C-11/E100C-11/T102C-11/M104C-11, A1-Li20 (CHO)/Q11C-9, A1-Li20 (CHO)/L12C-9, A1-Li20 (CHO)/R38C-9, A1-Li20 (CHO)/V91C-9, A1C-Li40 (IAc)/L12C-11/V91C-11, A1C-V80 (Mal)/L12C-11/V91C-11, A1C-Y50 (IAc)/L12C-11/V91C-11, A1C-Y50 (Mal)/L12C-11/V91C-11, A1C-W80 (Mal)/L12C-11/V91C-11, A1C-Y50 (IAc)/L19C-11, A1C-V40 (IAc)/L19C-11, A1C-Y50 (IAc)/V91C-11/N119C-11, T3C-Li20 (IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-Li40 (IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-Y50 (IAc)/L12C-11/V91C-2, T3C-Y50 (IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-Y50 (Mal)/L12C-11/V91C-11, T3C-V40 (IAc)/E15C-11, T3C-V80 (Mal)/E15C-11, T3C-Y50 (IAc)/E15C-11, F78C-Li40 (IAc)/L12C-11, F78C-V40 (IAc)/L12C-11, F78C-V40 (Mal)/L12C-11, F78C-V80 (Mal)/L12C-11, F78C-W80 (Mal)/L12C-11, F78C-Li40 (IAc)/E15C-11은 표준화 EC₅₀ ratio값이 30보다 크고, 컨트롤인 IL-2(P) 또는 IL-2(T)보다도 IL-2R_{αβγ}에 대한 선택성이 매우 높은 당쇄 결합 IL-2 개변체 및 N말

PEG화, 당쇄 결합 IL-2 및 Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2인 것을 확인할 수 있었다.

[0886] 각종 PEG 결합 IL-2 개변체에 대해서도, 마찬가지로의 방법으로 IL-2 의존성 세포 증식물을 측정하여 표준화 EC₅₀ ratio값을 산출한 결과를, 표 21 및 표 22에 나타내었다. 단, 당쇄 결합 IL-2 개변체의 컨트롤은 IL-2(P) 또는 IL-2(T)였던 것에 반해, PEG 결합 IL-2 개변체의 컨트롤은 IL-2(P) 또는 8His-IL-2를 사용하였다.

표 21

PEG 결합 IL-2 개변체의 표준화 EC₅₀ ratio값

표준화 EC ₅₀ ratio 값	개변체
< 5	8His-S4(oAzZK)-PEG4, 8His-S5(oAzZK)-PEG4, 8His-S6(oAzZK)-PEG4, 8His-T7(oAzZK)-PEG4, 8His-T7(oAzZK)-Li20, 8His-K8(oAzZK)-PEG4, 8His-E60(oAzZK)-PEG4, 8His-E60(oAzZK)-Li20, 8His-F78(oAzZK)-PEG4, 8His-H79(oAzZK)-PEG4, 8His-R81(oAzZK)-PEG4, 8His-R81(oAzZK)-Li20, 8His-R81(oAzZK)-Li30, 8His-L94(oAzZK)-PEG4, 8His-L94(oAzZK)-Li20, 8His-L94(oAzZK)-Li30, 8His-S99(oAzZK)-PEG4, 8His-S99(oAzZK)-Li20, 8His-E100(oAzZK)-PEG4, 8His-E100(oAzZK)-Li30, 8His-T101(oAzZK)-PEG4, 8His-Q126(oAzZK)-PEG4, 8His-Q126(oAzZK)-Li20
5 ~ 30	8His-S4(oAzZK)-Li20, 8His-S4(oAzZK)-Li30, 8His-S5(oAzZK)-Li20, 8His-S5(oAzZK)-Li30, 8His-S6(oAzZK)-Li20, 8His-S6(oAzZK)-Li30, 8His-T7(oAzZK)-Li30, 8His-K8(oAzZK)-Li20, 8His-K8(oAzZK)-Li30, 8His-E60(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li20, 8His-H79(oAzZK)-Li20, 8His-H79(oAzZK)-Li30, 8His-S99(oAzZK)-Li30, 8His-E100(oAzZK)-Li20, 8His-T101(oAzZK)-Li20, 8His-T101(oAzZK)-Li30, 8His-Q126(oAzZK)-Li30, 8His-I129(oAzZK)-PEG4, 8His-I129(oAzZK)-Li20
> 30	8His-F78(oAzZK)-Li30, 8His-I129(oAzZK)-Li30

[0887]

표 22

PEG 결합 IL-2 개변체의 표준화 EC₅₀ ratio값

표준화 ^{EC₅₀} ratio값	개변체
< 5	-
5 ~ 30	-
> 30	8His-F78(oAzZK)-Li40, 8His-F78(oAzZK)-V40, 8His-F78(oAzZK)-W40, 8His-F78(oAzZK)-Y50, F78(oAzZK)-Li40, F78(oAzZK)-V40, F78(oAzZK)-W40, F78(oAzZK)-IIII40, F78(oAzZK)-V80, F78(oAzZK)-W80, 8His-I129(oAzZK)-Li40, 8His-I129(oAzZK)-V40 8His-I129(mAzZK)-V40, 8His-I129(oAzZK)-Y50, I129(oAzZK)-Li30, I129(oAzZK)-Li40, I129(oAzZK)-V40, I129(oAzZK)-W40, I129(oAzZK)-IIII40, I129(oAzZK)-V80, I129(oAzZK)-W80, desAla-I129(oAzZK)-V40, desAla-I129(oAzZK)-W80, desAla-I129(oAzZK)-V80, I129C-V40(Mal), I129C-V80(Mal), I129C-W80(Mal), 8His-S4(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, S4(oAzZK)-Li40/F78(oAzZK)-Li40, S4(oAzZK)-Y50/F78(oAzZK)-Y50, 8His-S5(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, S5(oAzZK)-Li40/F78(oAzZK)-Li40, 8His-K8(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, K8(oAzZK)-Li40/F78(oAzZK)-Li40, 8His-F78(oAzZK)-Li30/H79(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/S99(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-S4(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, S4(oAzZK)-Li40/I129(oAzZK)-Li40, S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-S5(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, S5(oAzZK)-Li40/I129(oAzZK)-Li40, S5(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-K8(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, K8(oAzZK)-Li40/I129(oAzZK)-Li40, K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-H79(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-S99(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30

[0888]

[0889]

표 21 및 표 22에 있어서, 표준화 EC₅₀ ratio값이 5 이상인 PEG 결합 IL-2 개변체를, 컨트롤인 8His-IL-2보다도 IL-2R_{αβγ} 선택성이 높은 개변체라고 판단하였다.

[0890]

표 21 및 표 22에 나타내는 바와 같이, 다수의 PEG 결합 IL-2 개변체가 8His-IL-2보다도 IL-2R_{αβγ} 선택성이 높은 개변체인 것을 확인할 수 있었다. 또한 8His-F78(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li40, 8His-F78(oAzZK)-V40, 8His-F78(oAzZK)-W40, 8His-F78(oAzZK)-Y50, F78(oAzZK)-Li40, F78(oAzZK)-V40, F78(oAzZK)-W40, F78(oAzZK)-IIII40, F78(oAzZK)-V80, F78(oAzZK)-W80, 8His-I129(oAzZK)-Li30, 8His-I129(oAzZK)-Li40, 8His-I129(oAzZK)-V40, 8His-I129(mAzZK)-V40, 8His-I129(oAzZK)-W40, 8His-I129(oAzZK)-Y50, I129(oAzZK)-Li30, I129(oAzZK)-Li40, I129(oAzZK)-V40, I129(oAzZK)-W40, I129(oAzZK)-IIII40, I129(oAzZK)-V80, I129(oAzZK)-W80, desAla-I129(oAzZK)-V40, desAla-I129(oAzZK)-W80, desAla-I129(oAzZK)-V80, I129C-V40(Mal), I129C-V80(Mal), I129C-W80(Mal), 8His-S4(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, S4(oAzZK)-Li40/F78(oAzZK)-Li40, S4(oAzZK)-Y50/F78(oAzZK)-Y50, 8His-S5(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, S5(oAzZK)-Li40/F78(oAzZK)-Li40, 8His-K8(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, K8(oAzZK)-Li40/F78(oAzZK)-Li40, 8His-F78(oAzZK)-Li30/H79(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/S99(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-S4(oAzZK)-

Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, S4(oAzZK)-Li40/I129(oAzZK)-Li40, S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-S5(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, S5(oAzZK)-Li40/I129(oAzZK)-Li40, S5(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-K8(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, K8(oAzZK)-Li40/I129(oAzZK)-Li40, K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-H79(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30 및 8His-S99(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30은 표준화 EC₅₀ ratio값이 30보다 크고, 컨트롤인 IL-2(P) 또는 8His-IL-2보다도 IL-2R_{αβγ}에 대한 선택성이 매우 높은 PEG 결합 IL-2 개변체인 것을 확인할 수 있었다.

[0891] 상기 실험에 있어서, IL-2(P), IL-2(T), 야생형 IL-2 및 8His-IL-2의 EC₅₀ ratio값이 동 정도인 것을 확인하고 있다. 따라서, 표 18 내지 20에 있어서 표준화 EC₅₀ ratio값이 5 이상인 당쇄 결합 IL-2 개변체, 및 PEG화 당쇄 결합 IL-2 개변체, 그리고 표 21 및 표 22에 있어서 표준화 EC₅₀ ratio값이 5 이상인 PEG 결합 IL-2 개변체는, 야생형 IL-2보다도 IL-2R_{αβγ} 선택성이 높은 개변체이다.

[0892] [실시예 13] Treg 증식 활성

[0893] 각종 IL-2의 인간 Treg에 대한 세포 증식 활성을 이하의 방법으로 측정하였다. 각종 IL-2로서, 당쇄 결합 IL-2 개변체로서 H16C-2, E15C-11, L19C-9, L19C-11, N88C-2, L12C-11/V91C-11, V91C-11/V115C-11, V91C-11/N119C-11 및 A1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-11, Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체로서, A1C-Y50(Iac)/L12C-11/V91C-11, T3C-Li20(Iac)/L12C-11/V91C-11, T3C-Y50(Iac)/L12C-11/V91C-11, T3C-Y50(Iac)/E15C-11, T3C-V40(Iac)/E15C-11, T3C-V80(Mal)/E15C-11 및 F78C-V40(Iac)/L12C-11, PEG 결합 IL-2 개변체로서, 8His-S4(oAzZK)-Li20, 8His-S5(oAzZK)-Li20, 8His-S6(oAzZK)-Li20, 8His-T7(oAzZK)-Li20, 8His-K8(oAzZK)-Li20, 8His-E60(oAzZK)-Li20, 8His-F78(oAzZK)-Li20, 8His-F78(oAzZK)-V40, 8His-F78(oAzZK)-W40, 8His-H79(oAzZK)-Li20, 8His-R81(oAzZK)-Li20, 8His-L94(oAzZK)-Li20, 8His-S99(oAzZK)-Li20, 8His-E100(oAzZK)-Li20, 8His-T101(oAzZK)-Li20, 8His-Q126(oAzZK)-Li20, 8His-I129(oAzZK)-Li20, 8His-I129(oAzZK)-Li40, 8His-I129(oAzZK)-V40, 8His-I129(oAzZK)-W40, 8His-I129(oAzZK)-Y50, I129(oAzZK)-V40, I129(oAzZK)-W80, I129C-V40(Mal), 8His-S4(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-S5(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-K8(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/H79(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/S99(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-S4(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-S5(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, S5(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-K8(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-H79(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30 및 8His-S99(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30 그리고 컨트롤로서 IL-2(P) 및 8His-IL-2를 사용하였다.

[0894] 동결 인간 말초혈단핵구 세포(PBMC)(AllCells사제)를 37℃의 온욕에서 용해 후, 배양용 배지[X-vivo15 SFM(Lonza사제) 1000mL, 비동화 인간 AB 혈청(SIGMA사제) 150mL] 10mL에 현탁하고, 접착용 T-75 플라스크(greiner bio-one사제)에 파종하여 24시간 정치 배양했다(37℃, 95vol% air/5vol% CO₂ 하). 세포를 전량 회수하고, EasySep 인간 CD4⁺ T 세포 풍부화 키트(Enrichment kit)(STEMCELL Technologies사제)를 사용하여 CD4⁺ T 세포를 농축하였다.

[0895] 항-인간 CD4-Alexa 488(Biolegend사제), 항-인간 CD25-PE(BD Pharmingen사제), 항-인간 CD127-BV421(Biolegend 사제)로 염색 후(빙상, 30분간), 셀 소터 SH800(SONY사제)으로 CD4⁺CD25⁺CD127^{low} 분획(Treg)을 분리하였다.

[0896] 분리한 Treg 및 배양용 배지에서 3회 세정한 CD3/CD28 Dynabeads(Thermo Fischer SCIENTIFIC사제)를 혼합하고, 각각 3.4×10^4 개/mL로 되도록 배양용 배지에서 현탁하고, 96웰 U 바닥 플레이트(corning사제)에 150 μL/well씩 파종하였다. 배양용 배지에서 최종 농도의 4배 농도로 희석한 각종 IL-2 용액을 50 μL/well씩 첨가하고, 37℃, 5% CO₂ 하에서 배양을 개시하였다.

[0897] 5 내지 7일간 배양한 후, 각 웰의 전액량 중 50 μL를, 96웰 백색 플레이트에 옮겼다. Celltiter-Glo 용액을 50 μL/well씩 첨가하고, 실온에서 10분간 정치한 후, 루미노미터(TURNER BIOSYSTEMS사제)로 발광값을 측정하였다.

[0898] 컨트롤의 IL-2(P) 또는 8His-IL-2를 최종 농도 65nmol/L로 첨가한 웰의 RLU값을 100%, IL-2를 포함하지 않는 배지를 첨가한 웰의 RLU값을 0%로 하여, 각종 IL-2의 Treg 증식률을 산출하였다.

[0899] 얻어진 결과를 도 1a 내지 1j에 나타내었다. 도 1a 내지 1c에 도시하는 바와 같이, IL-2(P)는 IL-2 농도 650pmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 80% 이상을 나타낸 것에 비해, 당쇄 결합 IL-2 개변체인 H16C-

2, E15C-11, L19C-9, L19C-11*, N88C-2, L12C-11/V91C-11, V91C-11/V115C-11 및 V91C-11/N119C-11, Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체인 T3C-Y50(IAc)/E15C-11은, IL-2 농도 650 내지 6500pmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 80% 이상을 나타냈다.

[0900] 또한, Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체인, L12C-11/F78C-V40(IAc)은 IL-2 농도 65nmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 80% 이상을 나타냈다. 당쇄 결합 IL-2 개변체인, A1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-11, Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체인, A1C-Y50(IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-Li20(IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-Y50(IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-V40(IAc)/E15C-11 및 T3C-V80(Mal)/E15C-11은, IL-2 농도 65nmol/L에 있어서도 IL-2 의존성 세포 증식률은 80% 이하였다.

[0901] 또한, 도 1d 내지 1j에 도시하는 바와 같이, 컨트롤인 8His-IL-2는 IL-2 농도 6500pmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 80% 이상을 나타낸 것에 비해, PEG 결합 IL-2 개변체인 8His-S4(oAzZK)-Li20, 8His-S5(oAzZK)-Li20, 8His-S6(oAzZK)-Li20, 8His-T7(oAzZK)-Li20, 8His-K8(oAzZK)-Li20, 8His-E60(oAzZK)-Li20, 8His-F78(oAzZK)-Li20, 8His-F78(oAzZK)-V40, 8His-F78(oAzZK)-W40, 8His-H79(oAzZK)-Li20, 8His-R81(oAzZK)-Li20, 8His-L94(oAzZK)-Li20, 8His-S99(oAzZK)-Li20, 8His-E100(oAzZK)-Li20, 8His-T101(oAzZK)-Li20, 8His-Q126(oAzZK)-Li20, 8His-I129(oAzZK)-Li20, 8His-I129(oAzZK)-Li40, 8His-I129(oAzZK)-V40, 8His-I129(oAzZK)-W40, 8His-I129(oAzZK)-Y50, I129(oAzZK)-V40, I129C-V40(Mal), 8His-S4(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-S5(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-K8(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/S99(oAzZK)-Li30, 8His-S4(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-S5(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-K8(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 및 8His-S99(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30은, IL-2 농도 650 내지 6500pmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 80% 이상을 나타냈다.

[0902] 또한, PEG 결합 IL-2 개변체인 I129(oAzZK)-W80, 8His-F78(oAzZK)-Li30/H79(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, S5(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50 및 8His-H79(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30은, IL-2 농도 65nmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 80% 이상을 나타냈다.

[0903] 이상의 결과로부터, 평가한 모든 IL-2 개변체가 Treg의 세포 증식 활성을 갖는 것이 확인되었다. 또한, 컨트롤인 IL-2(P) 또는 8His-IL-2(P)에 대하여 각종 IL-2 개변체, 당쇄 결합 IL-2 개변체인 H16C-2, E15C-11, L19C-9, L19C-11*, N88C-2, L12C-11/V91C-11, V91C-11/V115C-11 및 V91C-11/N119C-11, Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체인 T3C-Y50(IAc)/E15C-11, 그리고 PEG 결합 IL-2 개변체인 8His-S4(oAzZK)-Li20, 8His-S5(oAzZK)-Li20, 8His-S6(oAzZK)-Li20, 8His-T7(oAzZK)-Li20, 8His-K8(oAzZK)-Li20, 8His-E60(oAzZK)-Li20, 8His-F78(oAzZK)-Li20, 8His-F78(oAzZK)-V40, 8His-F78(oAzZK)-W40, 8His-H79(oAzZK)-Li20, 8His-R81(oAzZK)-Li20, 8His-L94(oAzZK)-Li20, 8His-S99(oAzZK)-Li20, 8His-E100(oAzZK)-Li20, 8His-T101(oAzZK)-Li20, 8His-Q126(oAzZK)-Li20, 8His-I129(oAzZK)-Li20, 8His-I129(oAzZK)-Li40, 8His-I129(oAzZK)-V40, 8His-I129(oAzZK)-W40, 8His-I129(oAzZK)-Y50, I129(oAzZK)-V40, I129C-V40(Mal), 8His-S4(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-S5(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-K8(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/S99(oAzZK)-Li30, 8His-S4(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-S5(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-K8(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 및 8His-S99(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30의 Treg 증식 활성은 유지되어 있었다.

[0904] 또한, 컨트롤인 IL-2(P) 또는 8His-IL-2(P)에 대하여 각종 IL-2 개변체, 당쇄 결합 IL-2 개변체인 A1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-11, Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체인 A1C-Y50(IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-Li20(IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-Y50(IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-V40(IAc)/E15C-11, T3C-V80(Mal)/E15C-11 및 F78C-V40(IAc)/L12C-11, PEG 결합 IL-2 개변체인, I129(oAzZK)-W80, 8His-F78(oAzZK)-Li30/H79(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, S5(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50 및 8His-H79(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30의 Treg 증식 활성은 저하되었다.

[0905] [실시예 14] NK 세포 증식 활성

[0906] 각종 IL-2의 인간 NK 세포의 세포 증식 활성을 이하의 방법으로 측정하였다. 각종 IL-2 개변체로서, 당쇄 결합 IL-2 개변체로서, H16C-2, E15C-11, L19C-9, L19C-11*, N88C-2, L12C-11/V91C-11, V91C-11/V115C-11, V91C-11/N119C-11 및 A1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-11, Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체로서, A1C-Y50(IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-Li20(IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-Y50(IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-Y50(IAc)/E15C-11, T3C-V40(IAc)/E15C-11, T3C-V80(Mal)/E15C-11 및 F78C-V40(IAc)/L12C-11, PEG 결합 IL-2 개변체로서, 8His-S4(oAzZK)-Li20, 8His-S5(oAzZK)-Li20, 8His-S6(oAzZK)-Li20, 8His-T7(oAzZK)-Li20, 8His-

K8(oAzZK)-Li20, 8His-E60(oAzZK)-Li20, 8His-F78(oAzZK)-Li20, 8His-F78(oAzZK)-V40, 8His-F78(oAzZK)-W40, 8His-H79(oAzZK)-Li20, 8His-R81(oAzZK)-Li20, 8His-L94(oAzZK)-Li20, 8His-S99(oAzZK)-Li20, 8His-E100(oAzZK)-Li20, 8His-T101(oAzZK)-Li20, 8His-Q126(oAzZK)-Li20, 8His-I129(oAzZK)-Li20, 8His-I129(oAzZK)-Li40, 8His-I129(oAzZK)-V40, 8His-I129(oAzZK)-W40, 8His-I129(oAzZK)-Y50, I129(oAzZK)-V40, I129(oAzZK)-W80, I129C-V40(Mal), 8His-S4(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-S5(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-K8(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/H79(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/S99(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-S4(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-S5(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, S5(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-K8(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-H79(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30 및 8His-S99(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30 그리고 컨트롤로서 IL-2(P) 및 8His-IL-2를 사용하였다.

[0907] 인간 PBMC로부터의 NK 세포의 분리는 하기 방법으로 실시하였다. 실시예 13에 기재된 방법으로 동결 인간 PBMC를 해동(압축 해제)하고, NK 세포 분리 키트(Isolation Kit) 인간(Miltenyi Biotech사제)을 사용하여 CD56⁺ NK 세포를 분리하였다. 분리한 세포를 배양용 배지에서 3회 세정 후(1500rpm, 실온, 5분간), 하기의 증식 어세이에 제공하였다.

[0908] 분리한 NK 세포를 1.3×10^5 cells/mL로 되도록 배양용 배지 또는 X-vivo 10 SFM(Lonza사제)에서 현탁하고, 96웰 U 바닥 플레이트에 150 μ L/well(2×10^4 cells/well)씩 파종하였다. 배양용 배지 또는 X-vivo 10 SFM에서 최종 농도의 4배 농도로 희석한 IL-2 용액을 50 μ L/well씩 첨가하고, 37℃, 5% CO₂ 하에서 4 내지 6일간 배양하였다. 그 후, 각종 IL-2의 NK 세포 증식률을 실시예 13에 기재된 방법으로 산출하였다.

[0909] 증식용 배지를 사용하여 얻어진 결과를 도 2a 내지 2h에, X-vivo 10 SFM을 사용하여 얻어진 결과를 도 2i 내지 2k에 나타내었다.

[0910] 도 2a, 2h 및 2k에 도시하는 바와 같이, IL-2(P)는 증식용 배지에서는 IL-2 농도 6500pmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 80% 이상을 나타낸 것에 비해, 당쇄 결합 IL-2 개변체인, H16C-2 및 L19C-9는, IL-2 농도 65nmol/L에 있어서도 IL-2 의존성 세포 증식률은 20% 이상 80% 미만이고, 당쇄 결합 IL-2 개변체인, N88C-2 및 L12C-11/V91C-11, Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체인, A1C-Y50(IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-Li20(IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-Y50(IAc)/L12C-11/V91C-11, T3C-Y50(IAc)/E15C-11, T3C-V40(IAc)/E15C-11, T3C-V80(Mal)/E15C-11 및 L12C-11/F78C-V40(IAc)은 IL-2 농도 65nmol/L에 있어서도 IL-2 의존성 세포 증식률은 20% 미만을 나타냈다.

[0911] 또한, IL-2(P)는 X-vivo 10 SFM에서는 IL-2 농도 65pmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 80% 이상을 나타낸 것에 비해, 당쇄 결합 IL-2 개변체인, E15C-11은 IL-2 농도 6500pmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 80% 이상을 나타내고, 당쇄 결합 IL-2 개변체인, L19C-11*, V91C-11/V115C-11 및 V91C-11/N119C-11은, IL-2 농도 65nmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 80% 이상을 나타내고, 당쇄 결합 IL-2 개변체인, A1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-11은 IL-2 농도 65nmol/L에 있어서도 IL-2 의존성 세포 증식률은 20% 이하였다.

[0912] 이어서 도 2b 내지 2g 및 2i 내지 2j에 도시하는 바와 같이, 8His-IL-2는 증식용 배지에서는 IL-2(P)와 마찬가지로 IL-2 농도 6500pmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 80% 이상을 나타낸 것에 비해, PEG 결합 IL-2 개변체인, 8His-S4(oAzZK)-Li20, 8His-S5(oAzZK)-Li20, 8His-S6(oAzZK)-Li20, 8His-T7(oAzZK)-Li20, 8His-K8(oAzZK)-Li20, 8His-E60(oAzZK)-Li20, 8His-F78(oAzZK)-Li20, 8His-H79(oAzZK)-Li20, 8His-R81(oAzZK)-Li20, 8His-L94(oAzZK)-Li20, 8His-S99(oAzZK)-Li20, 8His-E100(oAzZK)-Li20, 8His-T101(oAzZK)-Li20 및 8His-Q126(oAzZK)-Li20 은 IL-2 농도 65nmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 80% 이상을 나타내고, PEG 결합 IL-2 개변체인, 8His-I129(oAzZK)-Li20, 8His-F78(oAzZK)-V40, 8His-F78(oAzZK)-W40, 8His-I129(oAzZK)-Li40, 8His-I129(oAzZK)-V40, 8His-I129(oAzZK)-W40 및 8His-I129(oAzZK)-Y50은 IL-2 농도 65nmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 20% 이상 80% 미만이고, PEG 결합 IL-2 개변체인, I129(oAzZK)-W80, I129C-V40(Mal), 8His-S4(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-S5(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, S5(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-K8(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30 및 K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50은 IL-2 농도 65nmol/L에 있어서도 IL-2 의존성 세포 증식률은 20% 미만이었다. 또한, IL-2(P)는 X-vivo 10 SFM에서는 IL-2 농도 65pmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 80% 이상을 나타낸 것에 비해, PEG 결합 IL-2 개변체인, I129(oAzZK)-V40, 8His-S5(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30

및 8His-F78(oAzZK)-Li30/S99(oAzZK)-Li30은 IL-2 농도 65nmol/L에 있어서 IL-2 의존성 세포 증식률이 80% 이상을 나타내고, PEG 결합 IL-2 개변체인, 8His-S4(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-K8(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/H79(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30 및 8His-H79(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30은 IL-2 농도 65nmol/L에 있어서도 IL-2 의존성 세포 증식률은 20% 이상 80% 미만이었다. 8His-S99(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30은 최대 첨가 농도 6500pmol/L에 있어서 IL-2 의 존성 세포 증식률은 30%였다.

[0913] 이상의 결과로부터, 평가한 모든 IL-2 개변체에 있어서 NK 세포에 대한 세포 증식 활성이 저하되어 있는 것이 확인되었다. 특히, 당쇄 결합 IL-2 개변체인 H16C-2, E15C-11, L19C-9, L19C-11*, N88C-2, L12C-11/V91C-11, V91C-11/V115C-11, V91C-11/N119C-11 및 A1C-11/T3C-11/S5C-11/L12C-11/V91C-11, Cys-PEG화, 당쇄 결합 IL-2 개변체인 A1C-Y50(IAC)/L12C-11/V91C-11, T3C-Li20(IAC)/L12C-11/V91C-11, T3C-Y50(IAC)/L12C-11/V91C-11, T3C-Y50(IAC)/E15C-11, T3C-V40(IAC)/E15C-11, T3C-V80(Mal)/E15C-11 및 L12C-11/F78C-V40(IAC), PEG 결합 IL-2 개변체인 8His-F78(oAzZK)-V40, 8His-F78(oAzZK)-W40, 8His-I129(oAzZK)-Li20, 8His-I129(oAzZK)-Li40, 8His-I129(oAzZK)-V40, 8His-I129(oAzZK)-W40, 8His-I129(oAzZK)-Y50, I129(oAzZK)-V40, I129(oAzZK)-W80, I129C-V40(Mal), 8His-S4(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-S5(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-K8(oAzZK)-Li30/F78(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/H79(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/S99(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, 8His-S4(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, S4(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-S5(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, S5(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-K8(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30, K8(oAzZK)-Y50/I129(oAzZK)-Y50, 8His-H79(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30 및 8His-S99(oAzZK)-Li30/I129(oAzZK)-Li30은, 컨트롤인 IL-2(P) 및 8His-IL-2보다도 크게 세포 증식 활성이 저하되어 있는 것이 확인되었다.

[0914] Treg는 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 을 발현하고 있고, NK 세포는 IL-2R $\beta\gamma$ 을 발현하고 있다. 실시예 13 및 14의 결과로부터, 평가한 모든 IL-2 개변체는, IL-2R $\beta\gamma$ 을 발현하는 NK 세포가 아니라, IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 을 발현하는 Treg를 선택적으로 증식시키는 것이 명확해졌다.

[0915] [실시예 15] IL-2 자극 Treg에 의한, Tresp의 증식 저해 활성

[0916] 이하에 기재하는 방법으로, 각종 IL-2로 자극하여 증식시킨 인간 Treg에 의한, 인간 Tresp의 증식 저해 활성을 측정하였다. 모든 세포는 동일 로트의 동결 인간 PBMC로부터 분리하였다. 각종 IL-2로서는, 당쇄 결합 IL-2 개변체 H16C-2, L19C-9, 및 N88C-2 그리고 컨트롤로서 IL-2(P)를 사용하였다.

[0917] 어레이 7일 전에, 실시예 13에 기재된 방법으로, 동결 인간 PBMC로부터 Treg를 분리하였다. 얻어진 Treg를 CD3/CD28 Dynabeads(Treg:beads=1:1) 및 각종 IL-2(최종 농도 65nM) 존재 하에서 7일간 배양하였다. 얻어진 세포를 IL-2 자극 Treg로 하였다.

[0918] 시험 당일의 세포 조제는 다음과 같이 실시하였다. 실시예 13에 기재된 방법으로 동결 인간 PBMC로부터 Treg를 분리하고, 이것을 미자극 Treg으로 하였다. 동결 인간 PBMC로부터 EasySep 인간 T 세포 풍부화 키트(STEMCELL Technologies사제) 및 EasySep 인간 Pan-CD25 양성 선택 및 고갈 키트(Positive Selection and Depletion Kit)(STEMCELL Technologies사제)를 사용하여 CD3⁺CD25⁻ T 세포를 분리 후, 10% FBS 함유 RPMI1640 배지에서 40 μ mol/L로 희석한 Celltrace violet(Thermo Fischer SCIENTIFIC사제)을 실온에서 5분간 반응시킴으로써 세포를 라벨링하였다.

[0919] 얻어진 세포는 반응자 T 세포(Tresp)로 하였다. 동결 인간 PBMC로부터 항-HLA-DR 마이크로비드(MicroBeads), 인간(Miltenyi Biotec사제)을 사용하여 HLA-DR⁺ 세포를 분리하였다. 얻어진 세포는 APC(Antigen presenting cell; 항원 제시 세포)로 하였다.

[0920] 얻어진 세포는 항CD3 항체 OKT3(Biolegend사제)을 최종 농도 0.5 μ g/mL로 되도록 첨가한 X-vivo 15 SFM으로 현탁 후, Tresp은 2×10^4 cells/well(50 μ L), APC는 1×10^5 cells/well(50 μ L), Treg는 1.6×10^2 내지 5×10^3 cells/well(50 μ L)(Tresp: Treg=4:1 내지 128:1)로 96웰 V 바닥 플레이트(스미토모 베이크라이트사제)에 파종하고, 37°C, 5% CO₂ 하에서 4일간 배양하였다.

[0921] 그 후, 세포를 항-인간 CD4-APC(BD Pharmingen사제) 및 항-인간 CD8-PE(BD Pharmingen사제)로 염색(실온에서 15분간)한 후에, 플로우 사이토미터 FACS Canto II(BD Biosciences사제)로 각종 형광 강도를 측정하였다.

- [0922] 얻어진 데이터는, FCS 파일로서 출력한 후에, 데이터 해석 소프트웨어FlowJo(TreeStar, version7.6.5)를 사용하여 CD4⁺Tresp 또는 CD8⁺Tresp에 있어서의 세포의 평균 분열 횟수인 분열 지수(division index)값에 대하여 해석을 행하였다.
- [0923] APC와 Tresp을 첨가하고, Treg 무첨가의 웰의 분열 지수값을 100% 컨트롤, Tresp만 첨가한 웰의 분열 지수값을 0% 컨트롤로 하고, 미자극 Treg, 또는 IL-2 자극 Treg 첨가 시의 Tresp의 세포 증식률을 산출하였다. 얻어진 결과를 도 3의 (A) 및 도 3의 (B)에 도시하였다.
- [0924] 도 3의 (A) 및 도 3의 (B)에 도시하는 바와 같이, CD4⁺Tresp 및 CD8⁺Tresp의 세포 증식은, 미자극 Treg를 사용한 경우, Treg를 최대량의 5×10^3 cells/well(Tresp:Treg=4:1)로 첨가한 경우에도 저해되지 않았다.
- [0925] 한편, IL-2(P), 당쇄 결합 IL-2 개변체 H16C-2, L19C-9, 및 N88C-2를 사용하여 자극하고, 증식시킨 IL-2 자극 Treg를 첨가한 경우에는, 모두 미자극 Treg를 첨가했을 때보다도 Tresp의 증식이 저해되었다.
- [0926] IL-2 자극 Treg에 의해, CD4⁺Tresp의 증식은 최대 40 내지 60% 정도, CD8⁺Tresp의 증식은 최대 30 내지 40% 정도 저해되었다. 시판 IL-2로 자극한 Treg과, 당쇄 결합 IL-2 개변체로 자극한 Treg는, Tresp의 증식 저해율은 동등하였다.
- [0927] 이상의 결과로부터, 제작한 당쇄 결합 IL-2 개변체는, Treg의 억제 활성을 IL-2(P)와 동일 정도로 증강하는 것이 명확해졌다.
- [0928] [실시예 16] 생체의 어세이
- [0929] 각종 IL-2로 자극한 인간 PBMC의 각종 사이토카인의 산생량을 이하에 기재하는 방법으로 측정하였다. 각종 IL-2로서는, 당쇄 결합 IL-2 개변체 H16C-2, L19C-9, 및 N88C-2 그리고 포지티브 컨트롤로서 IL-2(P)를 사용하였다.
- [0930] 인간 말초혈을 15mL 원심관에 분주 후, 2000rpm으로 10분간 원심 분리하고, 상청을 회수함으로써 인간 혈장을 얻었다. 얻어진 혈장은 0.22 μ m 필터를 사용하여 여과 멸균하였다. 회수한 혈장과 등량의 PBS를 말초혈에 첨가하여 회석 후, Ficoll Paque plus(GE 헬스케어사제)를 사용한 밀도 구배 원심법에 의해 인간 PBMC를 얻었다.
- [0931] 얻어진 인간 PBMC를 자기 혈장에서 5×10^6 cells/mL로 현탁하고, 거기에 항CD3 항체 OKT3을 최종 농도 0.5 μ g/mL로 되도록 첨가하였다. 96웰 U 바닥 플레이트에 180 μ l/well로 파종 후, 0.1% BSA-PBS에서 최종 농도의 10배 농도로 희석한 각종 IL-2를 20 μ l/well씩 첨가하였다. 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 5일간 배양 후, 배양 상청을 회수하고, 상청 중의 사이토카인 산생량을 Human Th1/2/17 CBA 키트(BD Biosciences사제)를 사용하여 정량하였다.
- [0932] 또한 얻어진 인간 PBMC를 사용하여, 이하에 기재하는 방법으로 각종 IL-2의 Treg 선택적 증식 활성을 측정하였다. 인간 PBMC와, 항-인간 CD4-Alexa 488을 반응 후, PerFix-EXPOSE 포스포 에피토프 노출 키트(Phospho Epitope Exposure Kit)(Beckman Coulter사제)의 PerFix EXPOSE 버퍼 1 및 PerFix EXPOSE 버퍼 2를 사용하여 세포의 고정 및 투과 처리를 행한 후에, 항-인간 CD25-PE(BD Biosciences사제)와 항-인간 Foxp3 Alexa 647(Biolegend사제, Cat#320214)을 포함하는 PerFix EXPOSE 버퍼 3을 첨가하고, 세포를 염색했다(차광, 실온, 60분간).
- [0933] 또한, PerFix EXPOSE 버퍼 4를 첨가하여 세포를 2회 세정 후(2500rpm, 3분간 원심 분리), 플로우 사이토미터 LSRFortessa(BD Biosciences사제)에서 각종 형광 강도를 측정하였다.
- [0934] 얻어진 데이터는, FCS 파일로서 출력한 후에, 데이터 해석 소프트웨어FlowJo(TreeStar사제, version7.6.5)를 사용하여 해석을 행하였다. CD4 양성 분획의 중에서, CD25⁺Foxp3^{high} 분획을 Treg, CD25⁺Foxp3^{low} 분획을 이펙터 T 세포(Teff)로서, 그의 존재비[Treg(%) / Teff(%)]를 산출하고, Treg 선택적 증식 활성의 지표로 하였다.
- [0935] 측정된 사이토카인 산생량의 결과를 도 4의 (A) 내지 도 4의 (E)에 도시하였다. 도 4의 (A) 내지 도 4의 (E)에 도시하는 바와 같이, IL-2(P)는 측정된 사이토카인 중, IL-4, IL-6, IL-10, IFN γ 및 TNF α 의 모든 사이토카인의 산생을 촉진하고 있었다.
- [0936] 한편, 당쇄 결합 IL-2 개변체에서는 IL-6 및 IL-10 산생량은 시판 IL-2와 동일 정도였지만, IL-4, IFN γ 및 TNF α 의 산생량이 저하되어 있었다. IL-17A의 산생은 어느 배양 조건에서도 검출 한계 이하였다.

- [0937] IL-10은 항염증성 사이토카인이며, IL-6, IL-4, IFN γ , 및 TNF α 은 염증성 사이토카인이다.
- [0938] 이상의 결과로부터, 제작한 당쇄 결합 IL-2 개변체의 염증성 사이토카인의 산생 촉진 활성은, IL-2(P)보다도 대폭으로 저하되어 있음을 확인할 수 있었다.
- [0939] 또한, 얻어진 Treg/Teff비를 도 4의 (F)에 도시하였다. 도 4의 (F)에 도시하는 바와 같이, IL-2(P)에서 자극한 경우의 Treg/Teff비는 0.2 내지 0.3 정도였다. 한편, 당쇄 결합 IL-2 개변체 H16C-2, L19C-9, 및 N88C-2로 자극한 경우의 Treg/Teff비는, 모두 0.3 내지 0.5 정도였다.
- [0940] 이상의 결과로부터, 생체 내의 환경에 가까운 다양한 면역 세포가 존재하는 배양 조건 하에 있어서, 제작한 당쇄 결합 IL-2 개변체는 IL-2(P)와 비교하여, Teff보다도 Treg를 선택적으로 증식시키는 것이 명확해졌다. Treg 및 Teff는 모두 IL-2R $\alpha\beta\gamma$ 을 발현하고 있지만, 당쇄 IL-2 개변체는, Teff보다도 Treg를 선택적으로 증식시키는 성질을 갖고, 염증을 진정화시키기에 바람직한 IL-2 개변체이다.
- [0941] [실시에 17] 친화성 해석
- [0942] 하기의 방법으로, 각종 IL-2의 인간 CD25ECD-Fc 및 인간 IL-2R $\beta\gamma$ ECD-Fc에 대한 친화성을 측정하였다. 각종 IL-2로서, 당쇄 결합 IL-2 개변체 L12C-2, L12C-9, L12C-11, H16C-2, L19C-9, L12C-11, N88C-2 및 V91C-11, 그리고 컨트롤로서 야생형 IL-2, 8His-IL-2 및 IL-2(P)를 사용하였다.
- [0943] 인간 CD25ECD-Fc 및 인간 IL-2R $\beta\gamma$ ECD-Fc 인간 CD25의 세포외 영역과 C 말단에 Avitag 서열(GLNDIFEAQKIEWHE)을 갖는 인간 IgG1 유래 Fc를 포함하는 CD25ECD-Fc-Avitag의 아미노산 서열(서열 번호 23)을 기초로 설계한 염기 서열(서열 번호 24)을 INPEP4 벡터의 BglIII 제한 효소 사이트와 BamHI 제한 효소 사이트에 삽입함으로써, 포유류 세포용의 인간 CD25ECD-Fc-Avitag 발현 벡터를 제작하였다.
- [0944] 또한, 인간 CD122의 세포외 영역과 Y354C/T366W 변이 및 C 말단에 Avitag 서열 및 폴리히스티딘 태그 서열(HHHHHHHH)을 갖는 인간 IgG1 유래 Fc 영역을 포함하는 CD122ECD-Fc(knob)-Avitag-8His와, 인간 CD132의 세포외 영역과 Y349C/T366S/L368A/Y407V 변이 및 C 말단에 FLAG 태그 서열을 갖는 인간 IgG1 유래 Fc 영역을 포함하는 CD132ECD-Fc(hole)-FLAG을 푸린 절단 서열과 구제역 바이러스 유래 2A 펩티드 서열을 통하여 연결한 인간 CD122ECD-Fc-Avitag-8His_인간 CD132ECD-Fc-FLAG의 아미노산 서열(서열 번호 25)을 기초로 설계한 염기 서열(서열 번호 26)을 INPEP4 벡터의 BglIII 제한 효소 사이트와 BamHI 제한 효소 사이트에 삽입함으로써, 포유류 세포용의 인간 IL-2R $\beta\gamma$ ECD-Fc 발현 벡터를 제작하였다.
- [0945] 얻어진 플라스미드와 Expi293 발현 시스템(Expression System)(ThermoFisher SCIENTIFIC사제)을 사용하여, 각종 Fc 융합 단백질을 배양 상정 중에 발현시켰다. CD25ECD-Fc는 Mabselect sure(GE 헬스케어사제)를 사용하여 조 정제 후, Superdex200 10/300GL(GE 헬스케어사제)을 사용한 크기 배제 크로마토그래피에 의해 모노머 분획을 분취했다(이동상: D-PBS).
- [0946] 한편, IL-2R $\beta\gamma$ ECD-Fc는 Mabselect sure를 사용하여 조 정제 후, Superdex200 10/300GL을 사용한 크기 배제 크로마토그래피(이동상: D-PBS) 및 ANTI-FLAG M2 친화성 아가로스 겔을 사용한 정제에 의해 모노머 분획을 분취하였다.
- [0947] Series S Sensor chip CM5(GE 헬스케어사제)를 Biacore T-100(GE 헬스케어사제)에 세트하고, 인간 항체 포획 키트(Human Antibody Capture Kit)(GE 헬스케어사제)를 사용하여, 친화성 측정용 플로우 셀 및 레퍼런스용 플로우 셀에 항-인간 Fc를 고정화하였다.
- [0948] 이어서, HBS-EP(+) 버퍼(GE 헬스케어사제)로 유로를 치환한 후, 리간드로서, HBS-EP(+)로 희석한 CD25ECD-Fc 또는 IL-2R $\beta\gamma$ ECD-Fc를, 친화성 측정용 플로우 셀에만 첨가했다(고정화량: 200 내지 900RU).
- [0949] 그 후, 애널라이트로서, HBS-EP(+) 버퍼로 지적(至適) 농도로 희석한 IL-2(P)를 친화성 측정용 플로우 셀 및 레퍼런스용 플로우 셀에 첨가하여, 센서 그래프를 얻었다. 플로우 셀의 재생 반응에는 3mol/L MgCl₂를 사용하였다.
- [0950] 얻어진 센서 그래프로부터의 속도론 상수의 산출에는 Biacore T-100 평가 소프트웨어를 사용하였다. CD25ECD-Fc에 대한 결합의 해석에는 정상 상태 모델을 사용하고, 해리상수 K_D를 구하였다. IL-2R $\beta\gamma$ ECD-Fc에 대한 결합의 해석에는 1:1 결합 모델을 사용하고, 결합 속도 상수 k_a, 해리 속도 상수 k_d 및 K_D를 각각 구하였다. 얻어진

K_D 를 표 23에 나타내었다.

표 23

개변체명	K_D (M)	
	hCD25ECD-Fc	hIL-2R $_{\beta\gamma}$ ECD-Fc
IL-2 (P)	1.30×10^{-8}	2.09×10^{-10}
8His-IL-2	1.50×10^{-8}	2.09×10^{-10}
야생형 IL-2	3.32×10^{-8}	2.15×10^{-10}
L12C-2	1.33×10^{-8}	3.67×10^{-10}
L12C-9	1.46×10^{-8}	8.31×10^{-10}
L12C-11	1.51×10^{-8}	7.40×10^{-10}
H16C-2	1.25×10^{-8}	1.11×10^{-8}
L19C-9	2.09×10^{-8}	2.10×10^{-9}
L19C-11	1.98×10^{-8}	3.34×10^{-9}
N88C-2	1.12×10^{-8}	4.39×10^{-8}
V91C-11	1.35×10^{-8}	5.84×10^{-10}

[0951]

[0952] 표 23에 나타내는 바와 같이, CD25에 대한 K_D 값은, 당쇄 결합 IL-2 개변체와 IL-2(P)로 동일 정도였다. 한편, IL-2R $_{\beta\gamma}$ 에 대한 K_D 값은, 당쇄 결합 IL-2 개변체가 IL-2(P)보다도 높았다.

[0953] 표 18 내지 20의 결과와 합하면, IL-2R $_{\beta\gamma}$ 에 대한 K_D 값이 높은 것일수록, IL-2R $_{\alpha\beta\gamma}$ 선택성이 높아지는 경향을 확인할 수 있었다.

[0954] 이상의 결과로부터, 당쇄 결합 IL-2 개변체는, CD25에 대한 친화성을 유지하고 있는 한편, IL-2R $_{\beta\gamma}$ 에 대한 친화성이 저하됨으로써 IL-2R $_{\alpha\beta\gamma}$ 선택성이 향상되었다고 생각되었다.

[0955] [실시예 18] 당쇄·PEG 구조의 영향

[0956] IL-2에 아미노산 개변을 행하는 것이나, 당쇄 또는 PEG를 결합시키는 것이 IL-2R $_{\alpha\beta\gamma}$ 선택성에 끼치는 영향을 평가하기 위해서, 실시예 1에서 제작한 L19C, L19C-acetamide, L19N, 및 실시예 5에서 제작한 각종 o-Az-z-Lys 도입 8His-IL-2를 실시예 12에 기재된 방법과 마찬가지로 표준화 EC₅₀ ratio값을 측정하였다. 얻어진 결과를 표 24에 나타내었다.

표 24

표준화EC50ratio값	개변체
< 5	8His-S4(oAzZK), 8His-S5(oAzZK), 8His-S6(oAzZK), 8His-T7(oAzZK), 8His-K8(oAzZK), 8His-E60(oAzZK), 8His-F78(oAzZK), 8His-H79(oAzZK), 8His-R81(oAzZK), 8His-L94(oAzZK), 8His-S99(oAzZK), 8His-E100(oAzZK), 8His-T101(oAzZK), 8His-I129(oAzZK)
5 ~ 30	L19C, L19C-acetamide, L19N, 8His-Q126(oAzZK)
> 30	—

[0957]

[0958]

표 24에 나타내는 바와 같이, L19C, L19C-acetamide, L19N의 표준화 EC₅₀ ratio값이 5 내지 30이었다. 표 18에 나타내는 바와 같이, L19C-2, L19C-9, L19C-11 및 L19C-11*의 표준화 EC₅₀ ratio값은 30 이상이었던 점에서, L19C-2, L19C-9, L19C-11 및 L19C-11*은 당채 결합에 의해 IL-2R_{αβγ}에 대한 선택성이 향상되어 있는 것이 밝혀졌다.

[0959]

또한, 표 24에 나타내는 바와 같이, 8His-Q126(oAzZK) 이외의 o-Az-Z-Lys 도입 8His-IL-2 개변체의 표준화 EC₅₀ ratio값이 5 이하였다. 표 21 및 표 22에 나타내는 바와 같이, 8His-S4(oAzZK)-Li20, 8His-S4(oAzZK)-Li30, 8His-S5(oAzZK)-Li20, 8His-S5(oAzZK)-Li30, S6(oAzZK)-Li20, 8His-S6(oAzZK)-Li30, 8His-T7(oAzZK)-Li30, 8His-K8(oAzZK)-Li20, 8His-K8(oAzZK)-Li30, 8His-E60(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li20, 8His-F78(oAzZK)-Li30, 8His-F78(oAzZK)-Li40, 8His-F78(oAzZK)-V40, 8His-F78(oAzZK)-W40, 8His-F78(oAzZK)-Y50, 8His-H79(oAzZK)-Li20, 8His-H79(oAzZK)-Li30, 8His-S99(oAzZK)-Li30, 8His-E100(oAzZK)-Li20, 8His-T101(oAzZK)-Li20, 8His-T101(oAzZK)-Li30, 8His-I129(oAzZK)-PEG4, 8His-I129(oAzZK)-Li20, 8His-I129(oAzZK)-Li30, 8His-I129(oAzZK)-Li40, 8His-I129(oAzZK)-V40, 8His-I129(oAzZK)-W40 및 8His-I129(oAzZK)-Y50의 표준화 EC₅₀ ratio값은 5 이상이었던 점에서, 이들 PEG 결합 IL-2 개변체는 PEG가 결합됨으로써 IL-2R_{αβγ}에 대한 선택성이 향상되어 있는 것이 밝혀졌다.

[0960]

본 발명을 특정한 양태를 사용하여 상세하게 설명했지만, 본 발명의 의도와 범위를 벗어나는 일 없이 여러가지 변경 및 변형이 가능한 것은, 당업자에게 있어서 명확하다. 부언하면, 본 출원은, 2017년 12월 27일자로 출원된 일본 특허 출원(특원 2017-252224)에 기초하고 있어, 그 전체가 인용에 의해 원용된다.

서열목록 자유텍스트

[0962]

서열 번호 1: 야생형 성숙 인간 IL-2의 아미노산 서열

서열 번호 2: 8His-IL-2의 아미노산 서열

서열 번호 3: 8His-IL-2의 염기 서열

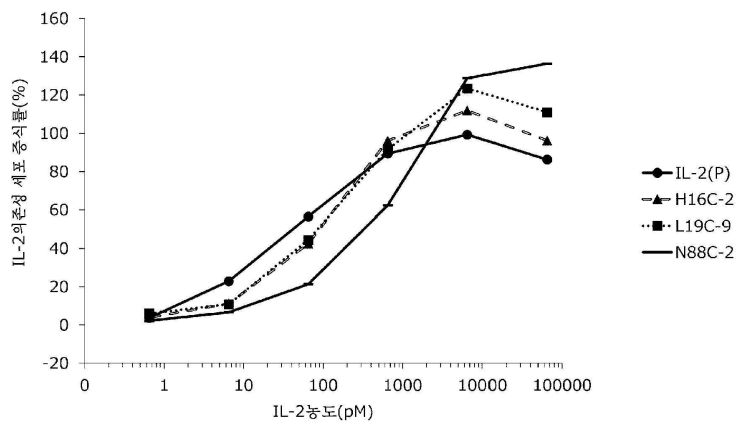
서열 번호 4: 8His-S4(oAzZK)의 염기 서열

- 서열 번호 5: 8His-S5(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 6: 8His-S6(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 7: 8His-T7(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 8: 8His-K8(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 9: 8His-E60(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 10: 8His-F78(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 11: 8His-H79(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 12: 8His-R81(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 13: 8His-L94(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 14: 8His-S99(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 15: 8His-E100(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 16: 8His-T101(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 17: 8His-Q126(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 18: 8His-I129(oAzZK), 8His-I129(mAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 19: 인간 IL-2R $_{\alpha\beta\gamma}$ -Azamigreen 융합체의 아미노산 서열
- 서열 번호 20: 인간 IL-2R $_{\alpha\beta\gamma}$ -Azamigreen 융합체의 염기 서열
- 서열 번호 21: 인간 IL-2R $_{\beta\gamma}$ -Azamigreen 융합체의 아미노산 서열
- 서열 번호 22: 인간 IL-2R $_{\beta\gamma}$ -Azamigreen 융합체의 염기 서열
- 서열 번호 23: 인간 CD25ECD-Fc-Avitag의 아미노산 서열
- 서열 번호 24: 인간 CD25ECD-Fc-Avitag의 염기 서열
- 서열 번호 25: 인간 CD122ECD-Fc-Avitag-8His_인간 CD132ECD-Fc-FLAG의 아미노산 서열
- 서열 번호 26: 인간 CD122ECD-Fc-Avitag-8His_인간 CD132ECD-Fc-FLAG의 염기 서열
- 서열 번호 27: 8His-S4(oAzZK)/F78(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 28: 8His-S5(oAzZK)/F78(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 29: 8His-K8(oAzZK)/F78(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 30: 8His-F78(oAzZK)/H79(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 31: 8His-F78(oAzZK)/S99(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 32: 8His-F78(oAzZK)/I129(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 33: 8His-S4(oAzZK)/I129(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 34: 8His-S5(oAzZK)/I129(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 35: 8His-K8(oAzZK)/I129(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 36: 8His-H79(oAzZK)/I129(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 37: 8His-S99(oAzZK)/I129(oAzZK)의 염기 서열
- 서열 번호 38: N 말단 메티오닌 부가 IL-2 C125S의 아미노산 서열
- 서열 번호 39: N 말단 메티오닌 부가 IL-2 C125S의 염기 서열

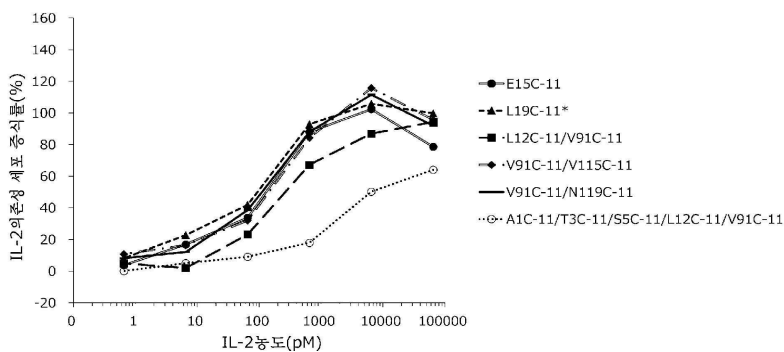
서열 번호 40: desAla_IL-2 C125S의 아미노산 서열
 서열 번호 41: desAla_IL-2 C125S의 염기 서열
 서열 번호 42: F78(oAzZK)의 염기 서열
 서열 번호 43: I129(oAzZK)의 염기 서열
 서열 번호 44: desAla_I129(oAzZK)의 염기 서열
 서열 번호 45: S4(oAzZK)/F78(oAzZK)의 염기 서열
 서열 번호 46: S5(oAzZK)/F78(oAzZK)의 염기 서열
 서열 번호 47: K8(oAzZK)/F78(oAzZK)의 염기 서열
 서열 번호 48: S4(oAzZK)/I129(oAzZK)의 염기 서열
 서열 번호 49: S5(oAzZK)/I129(oAzZK)의 염기 서열
 서열 번호 50: K8(oAzZK)/I129(oAzZK)의 염기 서열
 서열 번호 51: I129C의 아미노산 서열
 서열 번호 52: I129C의 염기 서열

도면

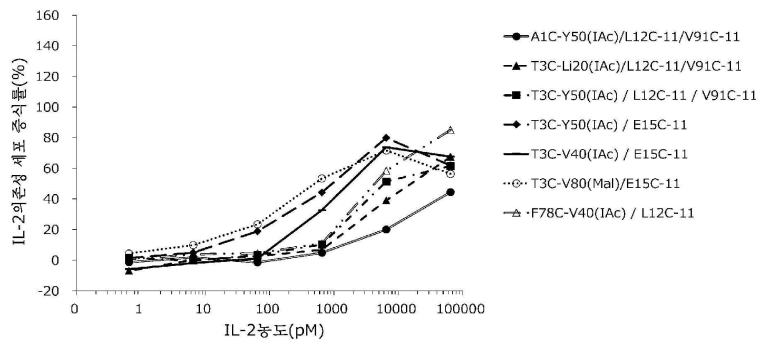
도면1a



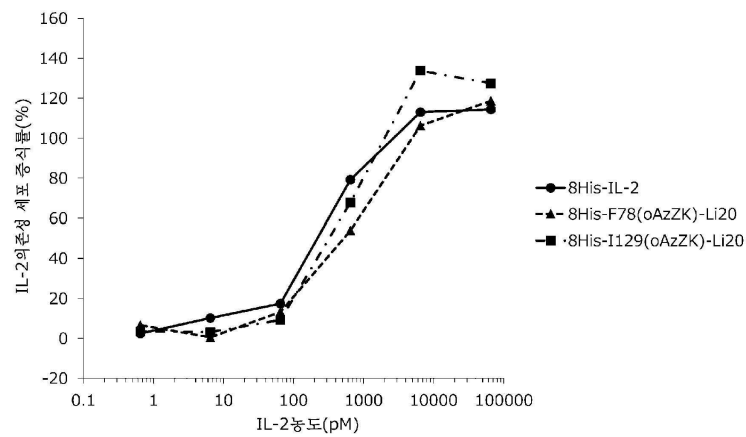
도면1b



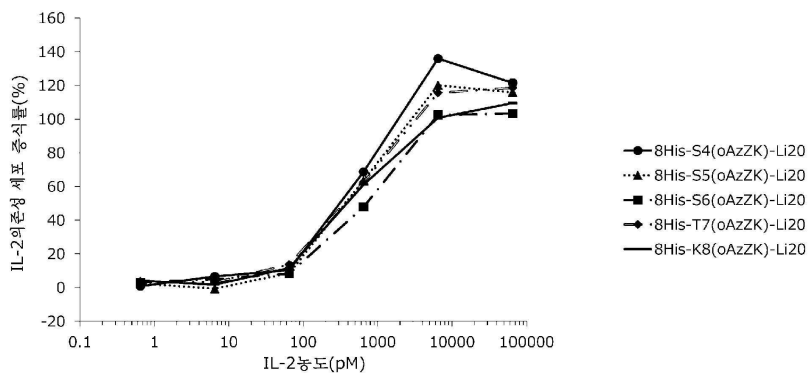
도면1c



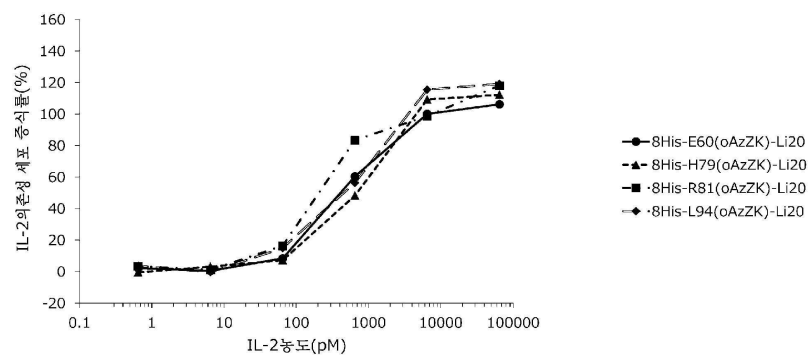
도면1d



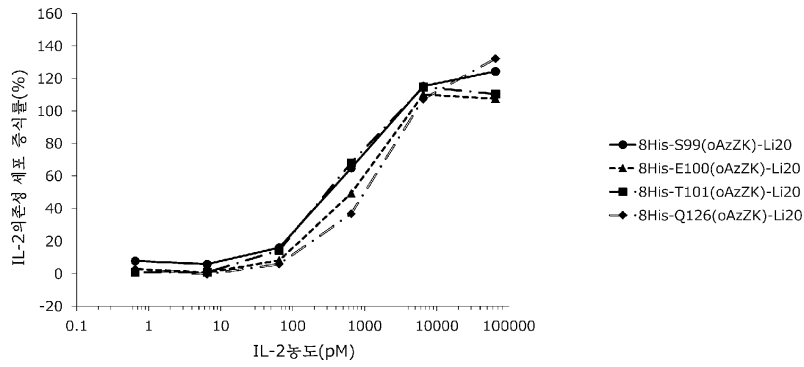
도면1e



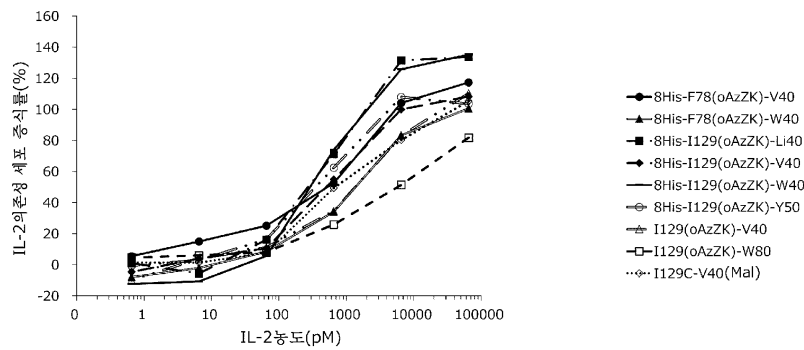
도면1f



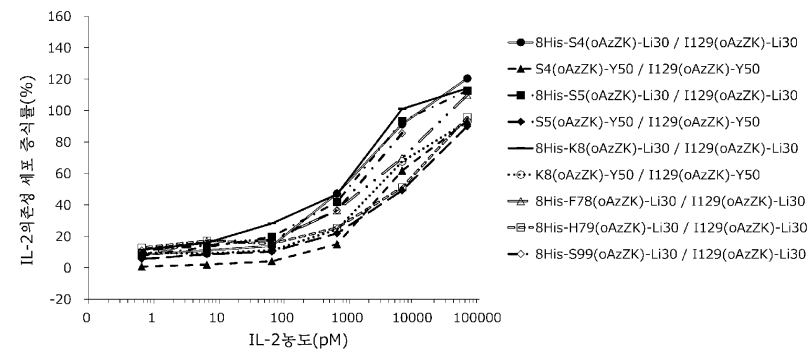
도면1g



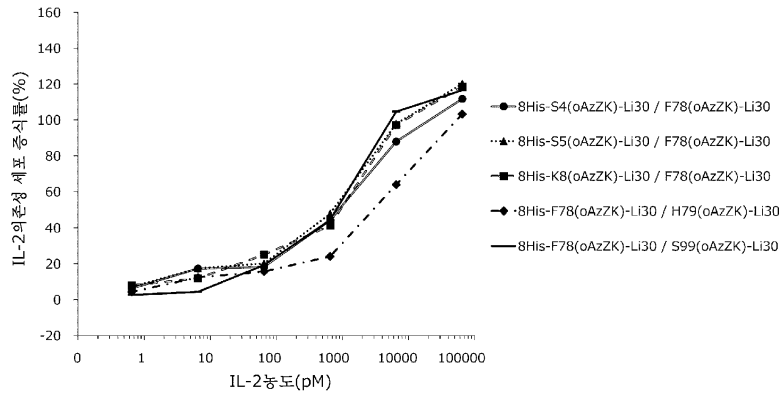
도면1h



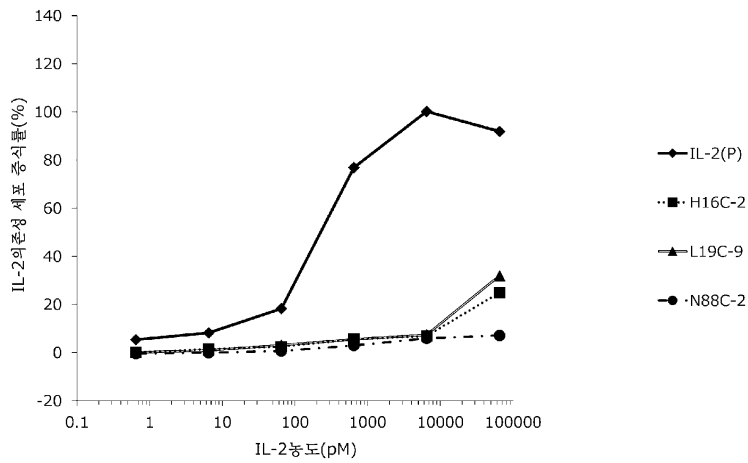
도면1i



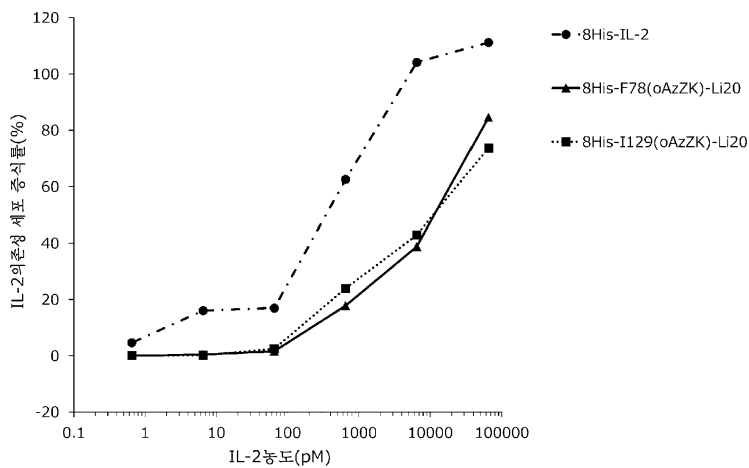
도면1j



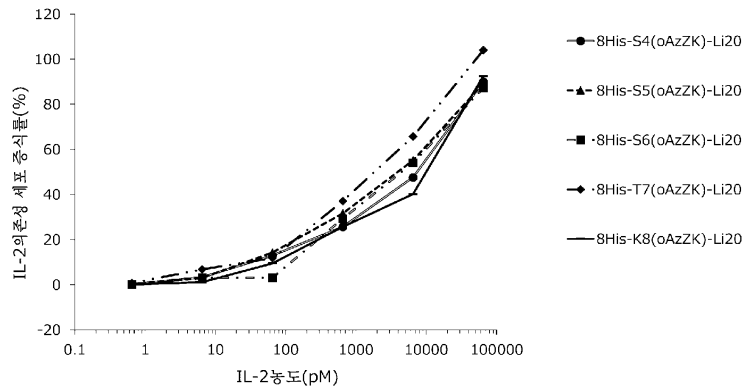
도면2a



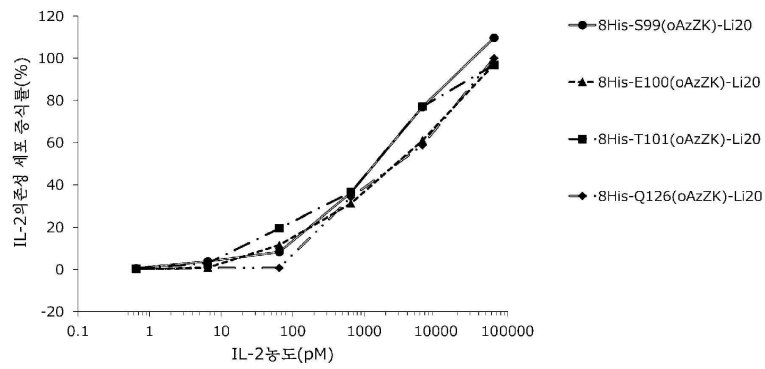
도면2b



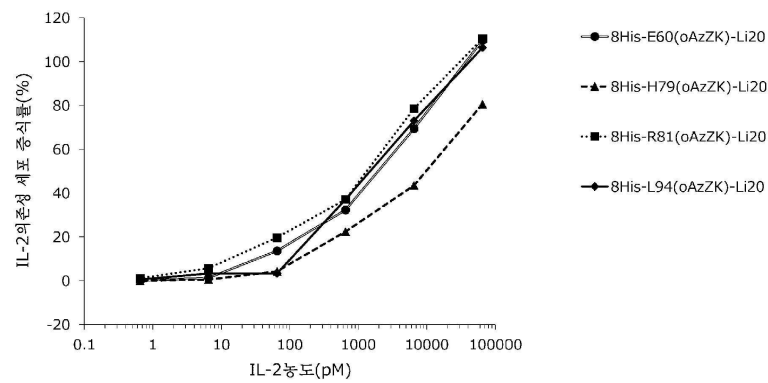
도면2c



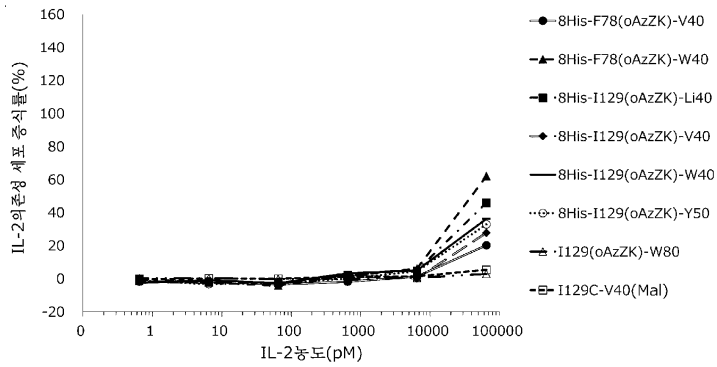
도면2d



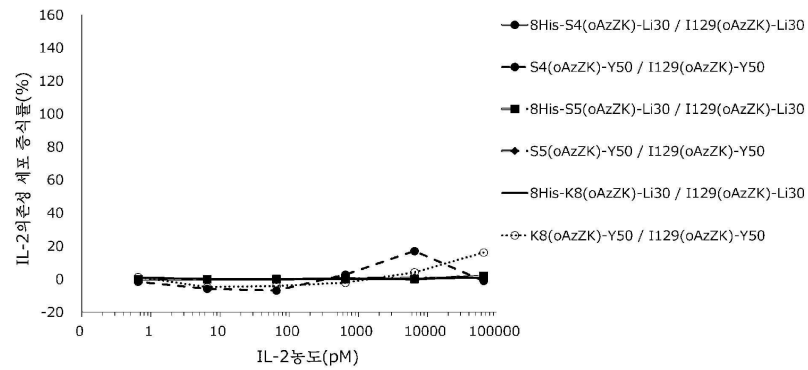
도면2e



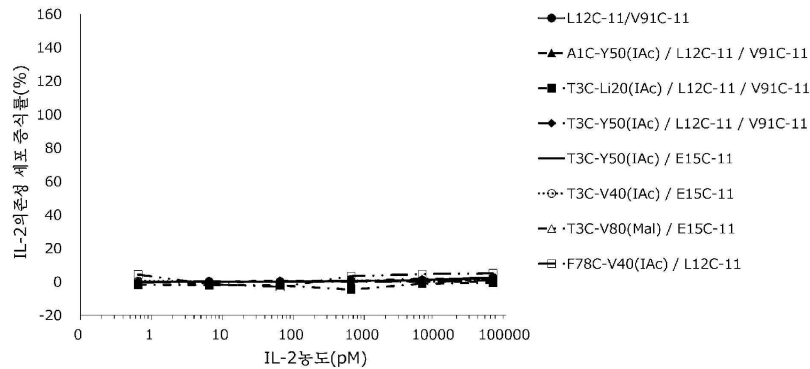
도면2f



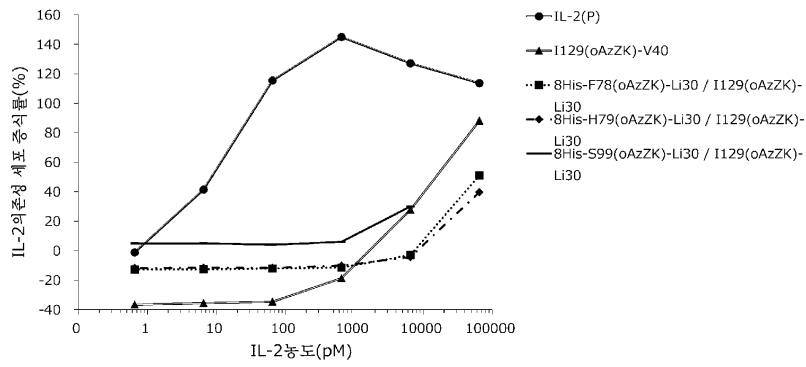
도면2g



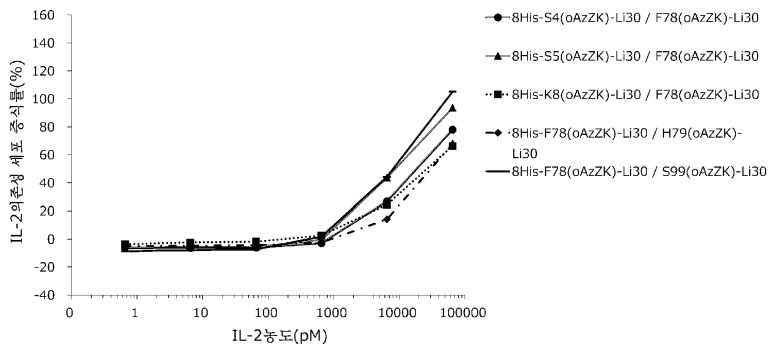
도면2h



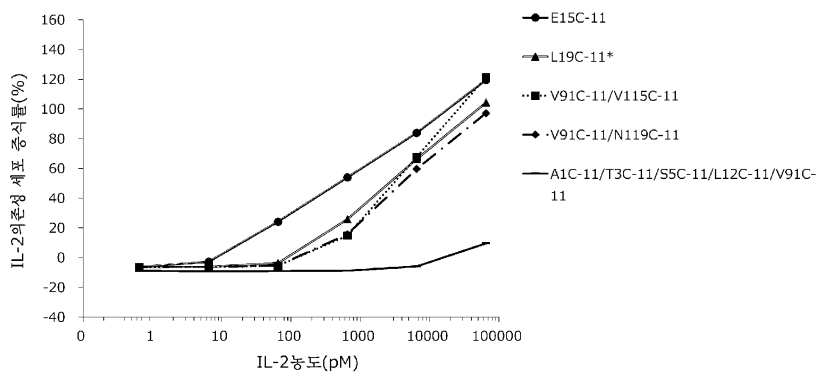
도면2i



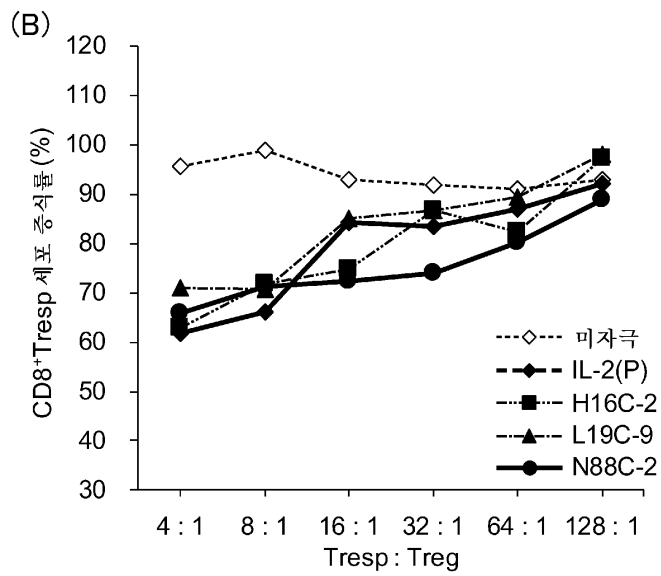
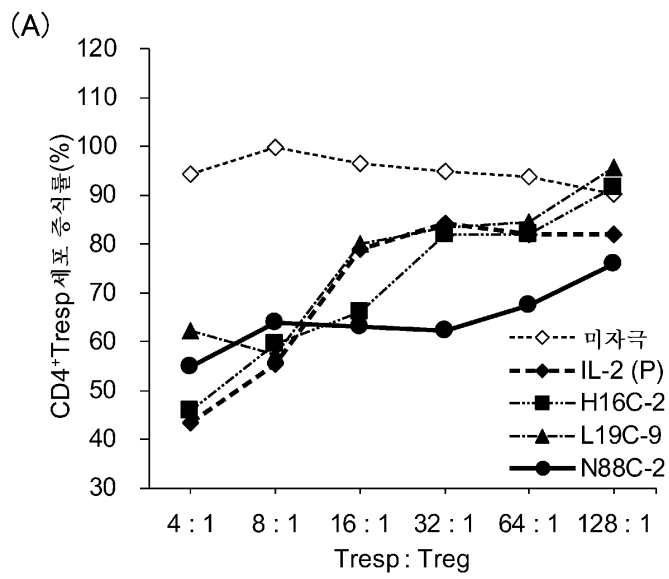
도면2j



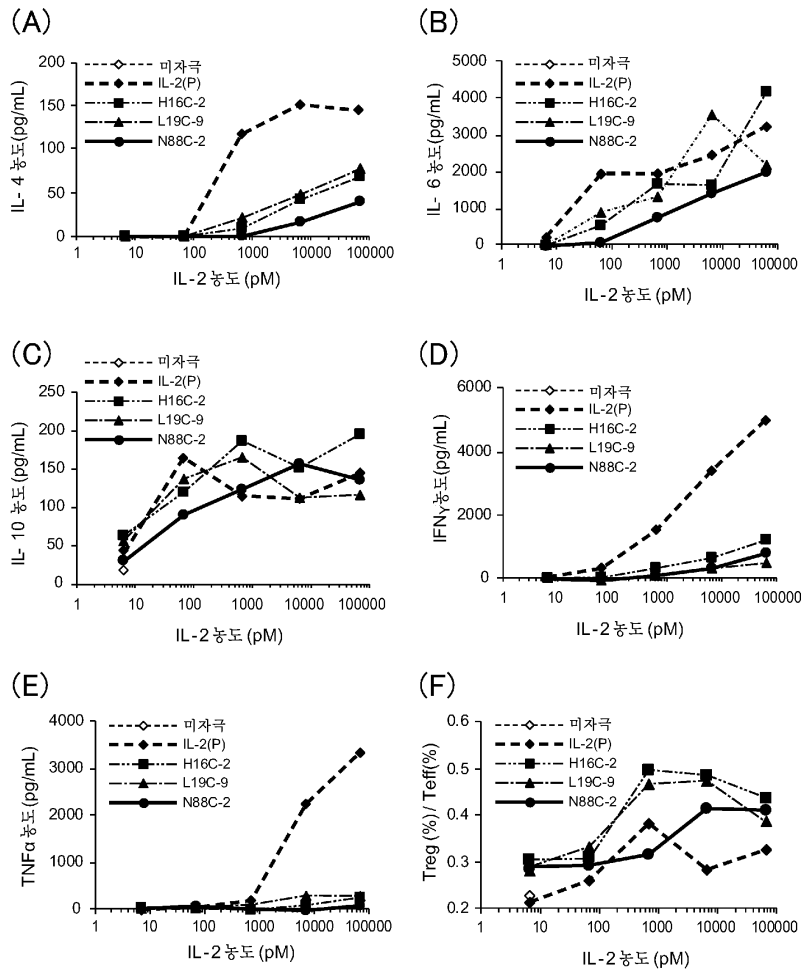
도면2k



도면3



도면4



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA KIRIN CO., LTD.

<120> IL-2 variant

<130> W526126

<150> JP2017-252224

<151> 2017-12-27

<160> 52

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1 5 10 15
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
 20 25 30

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

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
 115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 2

<211> 142

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: amino acid sequence of
 8His-IL-2

<400> 2

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

50	55	60	
Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn			
65	70	75	80
Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser			
85	90	95	
Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe			
100	105	110	
Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn			
115	120	125	
Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr			
130	135	140	
<210>	3		
<211>	426		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Description of the artificial sequence: base sequence of 8His-IL-2		
<400>	3		
atgcatcatc atcaccatca tcatcagcc cgcaccagca gcagcaccaa aaagaccag			60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat			120
aaaaaccga agctgaccgc catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc			180
gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac			240
ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaactg			300
atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcatgt gcgaatatgc cgacgagacc			360
gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc			420
ctgacc			426
<210>	4		
<211>	426		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	Description of the artificial sequence: base sequence of S4 (o-Az-Z-Lys)		

<400> 4

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgacctaga gcagcaccaa aaagaccag	60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat	120
aaaaaccga agctgacccg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc	180
gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac	240
ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgctgacc tgatcagcaa catcaacgtg	300
atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcattgt gcgaatatgc cgacgagacc	360
gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc	420
ctgacc	426

<210> 5

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of S5
(o-Az-Z-Lys)

<400> 5

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagct agagcaccaa aaagaccag	60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat	120
aaaaaccga agctgacccg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc	180
gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac	240
ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgctgacc tgatcagcaa catcaacgtg	300
atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcattgt gcgaatatgc cgacgagacc	360
gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc	420
ctgacc	426

<210> 6

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of S6
(o-Az-Z-Lys)

<400> 6

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagca gctagaccaa aaagaccag	60
--	----

ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120

aaaaacccga agctgacccg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180

gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240

ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgctc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300

atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcattg gcgaatatgc cgacgagacc 360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420

ctgacc 426

<210> 7

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of T7
(o-Az-Z-Lys)

<400> 7

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagca gcagctagaa aaagaccag 60

ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120

aaaaacccga agctgacccg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180

gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240

ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgctc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300

atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcattg gcgaatatgc cgacgagacc 360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420

ctgacc 426

<210> 8

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of K8
(o-Az-Z-Lys)

<400> 8

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagca gcagcaccta gaagaccag 60

ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120

aaaaacccga agctgaccgc catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180

gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240

ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300

atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcatgt gcgaatatgc cgacgagacc 360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420

ctgacc 426

<210> 9

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of E60

(o-Az-Z-Lys)

<400> 9

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagca gcagcaccaa aaagaccag 60

ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120

aaaaacccga agctgaccgc catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180

gagctgaagc atctgcagtg cctgtaggaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240

ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300

atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcatgt gcgaatatgc cgacgagacc 360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420

ctgacc 426

<210> 10

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of F78

(o-Az-Z-Lys)

<400> 10

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagca gcagcaccaa aaagaccag 60

ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120

aaaaacccga agctgaccgc catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180

gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240

ctggcccaga gcaaaaacta gcacctgcgc ccgctgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300

atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcatgt gcgaatatgc cgacgagacc 360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420

ctgacc 426

<210> 11

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of H79

(o-Az-Z-Lys)

<400> 11

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagca gcagcaccaa aaagaccag 60

ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120

aaaaaccgga agctgaccgc catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180

gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240

ctggcccaga gcaaaaactt ttagctgcgc ccgctgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300

atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcatgt gcgaatatgc cgacgagacc 360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420

ctgacc 426

<210> 12

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of R81

(o-Az-Z-Lys)

<400> 12

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagca gcagcaccaa aaagaccag 60

ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120

aaaaaccgga agctgaccgc catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180

gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240

ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgtag ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300

atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcattgt gcgaatatgc cgacgagacc 360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420

ctgacc 426

<210> 13

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of L94
(o-Az-Z-Lys)

<400> 13

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagca gcagcaccaa aaagaccag 60

ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120

aaaaaccga agctgaccgg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180

gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240

ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300

atcgtgtagg aactgaaggg tagcgagacc accttcattgt gcgaatatgc cgacgagacc 360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420

ctgacc 426

<210> 14

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of S99
(o-Az-Z-Lys)

<400> 14

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagca gcagcaccaa aaagaccag 60

ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120

aaaaaccga agctgaccgg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180

gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240

ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300

atcgtgctgg aactgaaggg ttaggagacc accttcatgt gcgaatatgc cgacgagacc 360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420
ctgacc 426

<210> 15
<211> 426
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of E100
(o-Az-Z-Lys)
<400> 15

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagca gcagcaccaa aaagaccag 60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120
aaaaaccga agctgaccg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180

gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240
ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300
atcgtgctgg aactgaaggg tagctagacc accttcatgt gcgaatatgc cgacgagacc 360
gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420
ctgacc 426

<210> 16
<211> 426
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of T101
(o-Az-Z-Lys)
<400> 16

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagca gcagcaccaa aaagaccag 60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120
aaaaaccga agctgaccg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180
gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240
ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300
atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagtag accttcatgt gcgaatatgc cgacgagacc 360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420

ctgacc 426

<210> 17

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of Q126
(o-Az-Z-Lys)

<400> 17

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc cggaccagca gcagcaccaa aaagaccag 60

ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120

aaaaaccga agctgaccgg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180

gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240

ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgctgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300

atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcattg gcgaatatgc cgacgagacc 360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cctagagcat catcagtacc 420

ctgacc 426

<210> 18

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of I129
(o-Az-Z-Lys)

<400> 18

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc cggaccagca gcagcaccaa aaagaccag 60

ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120

aaaaaccga agctgaccgg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180

gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240

ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgctgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300

atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcattg gcgaatatgc cgacgagacc 360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat ctagagtacc 420

ctgacc

426

<210> 19

<211> 1502

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: amino acid sequence of
human IL-2R????Azamigreen fusion

<400> 19

Met Asp Ser Tyr Leu Leu Met Trp Gly Leu Leu Thr Phe Ile Met Val

1 5 10 15

Pro Gly Cys Gln Ala Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro

20 25 30

His Ala Thr Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn

35 40 45

Cys Glu Cys Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr

50 55 60

Met Leu Cys Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys

65 70 75 80

Gln Cys Thr Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro

85 90 95

Gln Pro Glu Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro

100 105 110

Met Gln Pro Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro

115 120 125

Pro Pro Trp Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val

130 135 140

Gly Gln Met Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His

145 150 155 160

Arg Gly Pro Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg

165 170 175

Trp Thr Gln Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln

180 185 190
 Phe Pro Gly Glu Glu Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu
 195 200 205
 Ser Glu Thr Ser Cys Leu Val Thr Thr Thr Asp Phe Gln Ile Gln Thr
 210 215 220
 Glu Met Ala Ala Thr Met Glu Thr Ser Ile Phe Thr Thr Glu Tyr Gln

 225 230 235 240
 Val Ala Val Ala Gly Cys Val Phe Leu Leu Ile Ser Val Leu Leu Leu
 245 250 255
 Ser Gly Leu Thr Trp Gln Arg Arg Gln Arg Lys Ser Arg Arg Thr Ile
 260 265 270
 Arg Ala Lys Arg Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu
 275 280 285
 Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met Ala Ala Pro

 290 295 300
 Ala Leu Ser Trp Arg Leu Pro Leu Leu Ile Leu Leu Leu Pro Leu Ala
 305 310 315 320
 Thr Ser Trp Ala Ser Ala Ala Val Asn Gly Thr Ser Gln Phe Thr Cys
 325 330 335
 Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly
 340 345 350
 Ala Leu Gln Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg

 355 360 365
 Arg Trp Asn Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp
 370 375 380
 Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ala Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Thr
 385 390 395 400
 Val Asp Ile Val Thr Leu Arg Val Leu Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp
 405 410 415
 Arg Val Met Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu

 420 425 430

Met Ala Pro Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys
435 440 445

Asn Ile Ser Trp Glu Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His
450 455 460

Leu Glu Phe Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu
465 470 475 480

Ala Pro Leu Leu Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu
485 490 495

Thr Leu Thr Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro
500 505 510

Leu Gln Gly Glu Phe Thr Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala
515 520 525

Phe Arg Thr Lys Pro Ala Ala Leu Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu
530 535 540

Gly His Leu Leu Val Gly Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu
545 550 555 560

Val Tyr Leu Leu Ile Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys
565 570 575

Val Leu Lys Cys Asn Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu
580 585 590

Ser Ser Glu His Gly Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe
595 600 605

Pro Ser Ser Ser Phe Ser Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro
610 615 620

Leu Glu Val Leu Glu Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln
625 630 635 640

Asp Lys Val Pro Glu Pro Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr
645 650 655

Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala
660 665 670

Leu Glu Ile Glu Ala Cys Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser

675 680 685
 Glu Glu Asp Pro Asp Glu Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser
 690 695 700
 Pro Gln Pro Leu Gln Pro Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr
 705 710 715 720
 Phe Pro Ser Arg Asp Asp Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly
 725 730 735
 Gly Pro Ser Pro Pro Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu

 740 745 750
 Glu Arg Met Pro Pro Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp
 755 760 765
 Pro Gln Pro Leu Gly Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp
 770 775 780
 Phe Gln Pro Pro Pro Glu Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val
 785 790 795 800
 Pro Asp Ala Gly Pro Arg Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro

 805 810 815
 Pro Gly Gln Gly Glu Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn
 820 825 830
 Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr
 835 840 845
 His Leu Val Arg Ala Lys Arg Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe
 850 855 860
 Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met

 865 870 875 880
 Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu Pro
 885 890 895
 Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly Asn
 900 905 910
 Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp Ser
 915 920 925

Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val Phe

930

935

940

Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro Gln

945

950

955

960

Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn Asp

965

970

975

Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr Ser

980

985

990

Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe Val

995

1000

1005

Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln

1010

1015

1020

Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn

1025

1030

1035

Leu Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp

1040

1045

1050

Asn Asn Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr

1055

1060

1065

Arg Thr Asp Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr

1070

1075

1080

Arg His Lys Phe Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr

1085

1090

1095

Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala

1100

1105

1110

Gln His Trp Ser Glu Trp Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn

1115

1120

1125

Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala Val Val

1130

1135

1140

Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys Val

1145

1150

1155

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

1160 1165 1170
Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala

1175 1180 1185
Trp Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp

1190 1195 1200
Tyr Ser Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly

1205 1210 1215
Gly Ala Leu Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His

1220 1225 1230
Ser Pro Tyr Trp Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr

1235 1240 1245
Arg Ala Lys Arg Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu

1250 1255 1260
Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met Val

1265 1270 1275
Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Ile Lys Leu Cys Met Arg Gly

1280 1285 1290
Thr Val Asn Gly His Asn Phe Val Ile Glu Gly Glu Gly Lys Gly

1295 1300 1305
Asn Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Ile Leu Asp Leu Asn Val Thr Glu

1310 1315 1320
Gly Ala Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Val Phe

1325 1330 1335
Gln Tyr Gly Asn Arg Ala Phe Thr Lys Tyr Pro Ala Asp Ile Gln

1340 1345 1350
Asp Tyr Phe Lys Gln Thr Phe Pro Glu Gly Tyr His Trp Glu Arg

1355 1360 1365
Ser Met Thr Tyr Glu Asp Gln Gly Ile Cys Thr Ala Thr Ser Asn

1370 1375 1380
Ile Ser Met Arg Gly Asp Cys Phe Phe Tyr Asp Ile Arg Phe Asp

1385 1390 1395

Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr

1400 1405 1410

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

1415 1420 1425

Val Leu Lys Gly Asp Val Asn Met Arg Leu Leu Leu Glu Gly Gly

1430 1435 1440

Gly His Tyr Arg Cys Asp Phe Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Lys

1445 1450 1455

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

1460 1465 1470

Ile Leu Lys His Asp Lys Asp Tyr Asn Lys Val Lys Leu Tyr Glu

1475 1480 1485

Asn Ala Val Ala Arg Tyr Ser Met Leu Pro Ser Gln Ala Lys

1490 1495 1500

<210> 20

<211> 4506

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of human

IL-2R???Azamigreen fusion

<400> 20

atggattcat acctgcttat gtgggtctc ctcaccttca ttatggtccc cggatgtcaa 60

gccgagctct gtgacgatga tccacctgaa atcccccatg caacttttaa ggccatggcc 120

tataaggaag gtacatgct gaactgtgaa tgcaagcgtg gcttcgcag gattaagagc 180

ggctccctgt acatgctgtg caccgggaac tcttccatt caagtggga caaccagtgt 240

cagtgtacct cctccgaac aagaaatacc accaaacagg tgactccca gccagaggag 300

cagaaggagc ggaagacaac agaaatgcaa agtccaatgc agcccggtga tcaggccagc 360

ctcccaggcc actgtcggga accaccccct tgggaaaacg aggccacaga acggatatac 420

catttcgttg tcggtcaaat ggtgtattat cagtgtgtgc agggctacag ggccctgcat 480

cgaggccccg cagaatcagt ctgcaaatg actcacggca agactcgtg gaccagcct 540

cagctgatat gtaccggaga gatggaaact tctcaattcc ccggggagga gaaaccccag 600

gcattctcctg aaggaggaggcc tgagtcgcaa acctcttgtc tggttaccac aaccgacttc 660
cagatccaga ccgagatggc cgcaacatg gaaacaagta ttttactac agagtatcag 720
gtggccgtag caggctgtgt ctctctgttg atttccgtgc tgctgttgtc tgggctgacc 780
tggcaaagaa gacagagaaa gtctaggcgc actatccgag caaagcgggc tccagtgaag 840
cagacattga attttgaict gttgaaactt gccggcgacg ttgagtctaa ccttggccct 900
atggctgcac cagccctgtc ctggcgtttg cctctcctta tattgtctgt tctcttctgt 960

acctcttggg ctctcgctgc agtgaatggg acctcccaat ttacatgctt ctacaacagt 1020
agagccaaca tttcatgtgt gtggagccag gatggcgctc tgcaagatac atcttgccag 1080
gtccacgcct ggccagatag acggcggttg aatcagacct gtgagcttct gcccgtgtcc 1140
caggcaagtt gggcttgc aa ctttatactg ggcgctcccg atagtcagaa gctgaccact 1200
gtggacatcg tgacctgcg ggtgtttgt agggaggggcg tccggtggag agtcatggct 1260
atacaggatt ttaaaccctt cgagaacctt cgcctcatgg ccccatctc tctgcaagtc 1320
gtgcatgtag agacacatag gtgtaacatc tcttgggaaa tctctcaggc ttcacactac 1380

tttgagaggc acctggagtt tgaggcccgct actctgagcc caggacatac ttgggaggag 1440
gcacccctgc tcacccctaa gcagaagcag gattggatat gtctggagac tttgactccc 1500
gacactcagt atgatttcca ggtgagagtg aaacccctgc agggggagtt tacaacctgg 1560
tcacatgga gtcagccctt tgcttttga actaaacctg ccgcctcgg caaggacaca 1620
atcccttggc tgggtacct gcttgcggc ctttccggcg cttttggttt tatcatcctg 1680
gtctaccttc tcatcaactg ccgcaatact ggcccttggc tgaagaaagt ccttaagtgt 1740
aacacccag atccaagtaa gttcttctct cagctgtcca gtgagcacgg tggcgatgtc 1800

cagaagtggg tgagcagtc ctctccctcc tccagtttca gcccggggg cctggctcca 1860
gagattagtc ccttgagggt gctggagcga gacaaggtaa ctacagctgtt gctgcagcaa 1920
gataaggctg cagagcctgc atctctcagc agtaatcatt cctgaccag ctgttttact 1980
aaccagggtt acttcttttt ccacctgcca gatgctctgg agattgagc atgtcaagtc 2040
tattttacat acgaccctta cagtaggaa gaccagatg agggggtcgc aggagctccc 2100
acaggttcat cccacagcc actccagcct ttgtcaggcg aggatgacgc atactgcaca 2160
tttcaagcc gcgatgatct ctttctgttc tcaccaagcc tgctgggggg acctagtctt 2220

cctagcaccg ctccaggagg gtctggcgca ggagaggaac gaatgcctcc aagtcttcag 2280
gagcgggtcc cccgggattg ggacctcag ccctggggc ccccccaccc tggagtccct 2340
gacctctgg acttccaacc cccacccgag ttggtgttta gagaagccgg agaggaggtg 2400
cctgacgcgg gccttagaga gggagtcagt tttccatgga gtcggccacc aggacagggc 2460

gaatttcgag ctctcaacgc tcgtctgcct ttgaacaccg atgcctatct gtctctccag	2520
gaactgcagg ggcaagatcc taccacctc gtcagagcca aaagagctcc tgtgaagcag	2580
actctgaact ttgatttgct caaactggct ggcgacgtgg aatctaattcc aggcccaatg	2640
ctgaaacca gtctgccatt cacccttttg ctcttcctgc agctccctct gttgggtgtc	2700
gggctgaaca caactattct gactccaaat gggaacgagg acaccaccgc cgattttctc	2760
cttactacca tgcccaccga ctccctcagc gtgagtactt tgcccctccc agaagtgcag	2820
tgcttcgtct tcaacgtcga gtacatgaac tgtacttga acagctcttc agagcctcag	2880
cctaccaacc tcacattgca ctattggtac aagaacagcg ataacgataa agtgcagaag	2940
tgctccact atctgtttag tgaagagatc accagtgggt gccagctgca gaagaaggaa	3000
attcacctct atcagacttt tgtggtgcag ttgcaagatc cccgggagcc taggaggcag	3060
gccacccaaa tgettaagct gcaaaatctc gttattcctt gggtcccgga gaatctcaca	3120
ttgcacaagc tctccgagtc acagctcgaa ctgaattgga ataataaggtt cctgaaccac	3180
tgccctgagc acctggtgca gtaccggaca gactgggacc acagttggac tgagcaatct	3240
gtggactata gacataaatt ctccctgcct agcgtcgacg ggcagaaaacg ttacaccttt	3300
agggtgcggt ctcgttttaa tccactgtgt gggctctgcc agcactggtc agagtgtca	3360
cacctattc attggggtag taatacatct aaggagaatc cattcctctt cgccctcgag	3420
gctgtggtga tcagcgtggg aagtatgggc ctcatcatct ctctctgtg cgtgtacttt	3480
tggttggaac ggactatgcc tcgtatccct aactcaaaa atctcgagga tctggtgact	3540
gagtatcacg gcaacttttc agcctggtca ggagtgtcaa agggattggc cgaatctctc	3600
cagcccgact atagtgcag gctttgtctg gtttccgaaa tcccccaaa aggcggagca	3660
ttgggtgagg gccccggagc ttaccctgt aaccaacact ccccttactg ggcacccct	3720
tgttacactc tgaagccaga aactagagca aagagggtc cagtgaaca gactttgaat	3780
ttcgacctgc tgaagctggc aggtgacgta gagtcaaacc ccggcccat ggtgtctgtc	3840
attaagcctg aaatgaaaa taagctctgc atgaggggta ctgtgaacgg ccacaatttt	3900
gtgatcgagg gcgaaggaaa aggaaatccc tacgaaggga ctgagattct tgacctgaac	3960
gttactgaag gggctcctct cccctttgct tacgacatcc tgaccaccgt gtttcagtat	4020
ggtaaccgag cttttacaaa gtatctgct gatatacagg actattttaa gcaaacattc	4080
ccagagggt accactggga gcggtctatg acctatgaag accaaggat ttgcaccgt	4140
accagcaaca tctcaatgcg aggcgactgt ttcttttacg atatcagatt cgatggaaca	4200
aacttcccc ccaacggacc cgttatgcaa aagaaaacac tgaaatggga acccagcaca	4260

gagaagatgt atgttgagga cggggttctg aagggggacg tgaatatgcg gctcttgctg 4320

gaaggcggag gccactatag atgtgatttc aagacaactt acaaggctaa gaaggaagtg 4380

aggttgctg acgccataa gatcgatcat cgaatcgaga ttttgaagca tgacaaggat 4440

tataataagg tgaaactgta cgagaacgcc gtggcccggt actccatgct cccagtcaa 4500

gctaaa 4506

<210> 21

<211> 1202

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: amino acid sequence of
human IL-2R???Azamigreen fusion

<400> 21

Met Ala Ala Pro Ala Leu Ser Trp Arg Leu Pro Leu Leu Ile Leu Leu

1 5 10 15
Leu Pro Leu Ala Thr Ser Trp Ala Ser Ala Ala Val Asn Gly Thr Ser

20 25 30
Gln Phe Thr Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp

35 40 45
Ser Gln Asp Gly Ala Leu Gln Asp Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp

50 55 60
Pro Asp Arg Arg Arg Trp Asn Gln Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser

65 70 75 80
Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ala Pro Asp Ser Gln

85 90 95
Lys Leu Thr Thr Val Asp Ile Val Thr Leu Arg Val Leu Cys Arg Glu

100 105 110
Gly Val Arg Trp Arg Val Met Ala Ile Gln Asp Phe Lys Pro Phe Glu

115 120 125
Asn Leu Arg Leu Met Ala Pro Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu

130 135 140
Thr His Arg Cys Asn Ile Ser Trp Glu Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr

145 150 155 160
 Phe Glu Arg His Leu Glu Phe Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His
 165 170 175
 Thr Trp Glu Glu Ala Pro Leu Leu Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp
 180 185 190
 Ile Cys Leu Glu Thr Leu Thr Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val

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

 260 265 270
 Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe
 275 280 285
 Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu
 290 295 300
 Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser Pro Gly Gly Leu Ala Pro
 305 310 315 320
 Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu

 325 330 335
 Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro Ala Ser Leu Ser Ser Asn
 340 345 350
 His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr Phe Phe Phe His
 355 360 365
 Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys Gln Val Tyr Phe Thr Tyr
 370 375 380
 Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu Gly Val Ala Gly Ala Pro

 385 390 395 400

Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro Leu Ser Gly Glu Asp Asp
 405 410 415
 Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp Leu Leu Leu Phe Ser Pro
 420 425 430
 Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser
 435 440 445
 Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro
 450 455 460
 Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro
 465 470 475 480
 Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu Leu Val Leu Arg Glu Ala
 485 490 495
 Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg Glu Gly Val Ser Phe Pro
 500 505 510
 Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg
 515 520 525
 Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly
 530 535 540
 Gln Asp Pro Thr His Leu Val Arg Ala Lys Arg Ala Pro Val Lys Gln
 545 550 555 560
 Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn
 565 570 575
 Pro Gly Pro Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe
 580 585 590
 Leu Gln Leu Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr
 595 600 605
 Pro Asn Gly Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met
 610 615 620
 Pro Thr Asp Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln
 625 630 635 640
 Cys Phe Val Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser

645	650	655	
Ser Glu Pro Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn			
660	665	670	
Ser Asp Asn Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu			
675	680	685	
Glu Ile Thr Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr			
690	695	700	
Gln Thr Phe Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln			
705	710	715	720
Ala Thr Gln Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro			
725	730	735	
Glu Asn Leu Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn			
740	745	750	
Trp Asn Asn Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr			
755	760	765	
Arg Thr Asp Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg			
770	775	780	
His Lys Phe Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe			
785	790	795	800
Arg Val Arg Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp			
805	810	815	
Ser Glu Trp Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu			
820	825	830	
Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala Val Val Ile Ser Val Gly Ser			
835	840	845	
Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg			
850	855	860	
Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr			
865	870	875	880
Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu			
885	890	895	

Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser

900 905 910
Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser

915 920 925
Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu

930 935 940
Lys Pro Glu Thr Arg Ala Lys Arg Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn

945 950 955 960
Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

965 970 975
Met Val Ser Val Ile Lys Pro Glu Met Lys Ile Lys Leu Cys Met Arg

980 985 990
Gly Thr Val Asn Gly His Asn Phe Val Ile Glu Gly Glu Gly Lys Gly

995 1000 1005
Asn Pro Tyr Glu Gly Thr Gln Ile Leu Asp Leu Asn Val Thr Glu

1010 1015 1020
Gly Ala Pro Leu Pro Phe Ala Tyr Asp Ile Leu Thr Thr Val Phe

1025 1030 1035
Gln Tyr Gly Asn Arg Ala Phe Thr Lys Tyr Pro Ala Asp Ile Gln

1040 1045 1050
Asp Tyr Phe Lys Gln Thr Phe Pro Glu Gly Tyr His Trp Glu Arg

1055 1060 1065
Ser Met Thr Tyr Glu Asp Gln Gly Ile Cys Thr Ala Thr Ser Asn

1070 1075 1080
Ile Ser Met Arg Gly Asp Cys Phe Phe Tyr Asp Ile Arg Phe Asp

1085 1090 1095
Gly Thr Asn Phe Pro Pro Asn Gly Pro Val Met Gln Lys Lys Thr

1100 1105 1110
Leu Lys Trp Glu Pro Ser Thr Glu Lys Met Tyr Val Glu Asp Gly

1115 1120 1125
Val Leu Lys Gly Asp Val Asn Met Arg Leu Leu Leu Glu Gly Gly

1130 1135 1140
Gly His Tyr Arg Cys Asp Phe Lys Thr Thr Tyr Lys Ala Lys Lys

1145 1150 1155
Glu Val Arg Leu Pro Asp Ala His Lys Ile Asp His Arg Ile Glu

1160 1165 1170
Ile Leu Lys His Asp Lys Asp Tyr Asn Lys Val Lys Leu Tyr Glu

1175 1180 1185
Asn Ala Val Ala Arg Tyr Ser Met Leu Pro Ser Gln Ala Lys

1190 1195 1200

<210> 22

<211> 3606

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of human

IL-2R??Azamigreen fusion

<400> 22

atggctgcac cagccctgtc ctggcgtttg cctctcctta tattgctgct tcctcttgc 60
acctcttggg ctcccgctgc agtgaatggg acctcccaat ttacatgctt ctacaacagt 120
agagccaaca tttcatgtgt gtggagccag gatggcgctc tgcaagatac atcttgccag 180
gtccacgcct ggccagatag acggcgggtgg aatcagacct gtgagcttct gcccgtgtcc 240
caggcaagtt gggcttgcaa ctttatactg ggcgctcccg atagtcagaa gctgaccact 300
gtggacatcg tgaccctgcg ggtgctttgt agggagggcg tccggtggag agtcatggct 360

atacaggatt ttaaaccctt cgagaacctt cgctcatgg ccccatctc tctgcaagtc 420
gtgcatgtag agacacatag gtgtaacatc tcttgggaaa tctctcagge ttcacactac 480
tttgagagge acctggagtt tgaggcccggt actctgagcc caggacatac ttgggaggag 540
gcaccctgc tcaccctcaa gcagaagcag gaggatgat gtctggagac ttgactccc 600
gacactcagt atgagttcca ggtgagagtg aaaccctgc agggggagtt tacaacctgg 660
tcaccatgga gtcagccctt tgcctttcga actaaacctg ccgcctcgg caaggacaca 720
atccctggc tcggtcacct gcttgcggc ctttccggcg cttttggttt tatcatcctg 780

gtctaccttc tcatcaactg ccgcaatact gggccttggc tgaagaaagt ccttaagtgt 840
aacaccccag atccaagtaa gttcttctct cagctgtcca gtgagcacgg tggcgatgtc 900

cagaagtggg tgagcagtc cttccctcc tccagtttca gccccggggg cctggctcca	960
gagattagtc cccttgagg gctggagcga gacaaggtaa ctacagctgtt gctgcagcaa	1020
gataaggcgc cagagcctgc atctctcagc agtaatcatt ccctgaccag ctgttttact	1080
aaccagggat acttcttttt ccacctgcca gatgctctgg agattgaggc atgtcaagtc	1140
tattttacat acgacccta cagtaggaa gaccagatg agggggtcgc aggagctccc	1200
acaggttcat cccacagcc actccagcct ttgtcaggcg aggatgacgc atactgcaca	1260
tttccaagcc gcgatgatct ctttctgttc tcaccaagcc tgctgggggg acctagtcct	1320
cctagcaccg ctccaggagg gtctggcgca ggagaggaac gaatgcctcc aagtcttcag	1380
gagcgggtcc cccgggattg ggacctcag cccctgggcc cccccaccc tggagtcct	1440
gacctcgtgg acttccaacc cccaccgag ttggtgctta gagaagccgg agaggaggtg	1500
cctgacccg gccctagaga gggagtcagt ttccatgga gtcggccacc aggacagggc	1560
gaatttcgag ctctcaacgc tcgtctgcct ttgaacaccg atgcctatct gtctctccag	1620
gaactgcagg ggcaagatcc taccacctc gtcagagcca aaagagctcc tgtgaagcag	1680
actctgaact ttgatttgct caaactggct ggcgacgtgg aatctaacc aggcccaatg	1740
ctgaaaccca gtctgccatt cactctttg ctcttctgc agctccctct gttgggtgtc	1800
gggctgaaca caactattct gactccaaat gggaacgagg acaccaccgc cgatttcttc	1860
cttactacca tgccaccga ctccctcagc gtgagtactt tgccctccc agaagtgcag	1920
tgcttcgtct tcaacgtcga gtacatgaac tgtacttga acagctcttc agagcctcag	1980
cctaccaacc tcacattgca ctattggtac aagaacagcg ataacgataa agtgcagaag	2040
tgctccact atctgtttag tgaagagatc accagtgggt gccagctgca gaagaaggaa	2100
attcacctct atcagacttt tgtggtgcag ttgcaagatc cccgggagcc taggaggcag	2160
gccacccaaa tgcttaagct gcaaaatctc gttattcctt gggtcccgga gaatctcaca	2220
ttgcacaagc tctccgagtc acagctcga ctgaattgga ataataggtt cctgaaccac	2280
tgctcgagc acctggtgca gtaccggaca gactgggacc acagtggac tgagcaatct	2340
gtggactata gacataaatt ctccctgcct agcgtcgacg ggcagaaacg ttacaccttt	2400
agggtgcggt ctctttttaa tccactgtgt gggtctgccc agcactggtc agagtggta	2460
cacctattc attggggtag taatacatct aaggagaatc cattcctctt cgccctcgag	2520
gctgtggtga tcagcgtggg aagtatgggc ctcatcattt ctctcctgtg cgtgtacttt	2580
tggttggaac ggactatgcc tcgtatccct aactcaaaa atctcgagga tctggtgact	2640
gagtatcacg gcaacttttc agcctggtca ggagtgtcaa agggattggc cgaatctctc	2700
cagcccgact atagtgagag gctttgtctg gtttccgaaa tcccccaaa aggcggagca	2760

ttgggtgagg gccccggagc ttcaccctgt aaccaacact ccccttactg ggcaccccct 2820
 tgttacactc tgaagccaga aactagagca aagagggtc cagtgaaca gactttgaat 2880

ttcgacctgc tgaagctggc aggtgacgta gagtcaaacc ccggcccat ggtgtctgtc 2940
 attaagcctg aaatgaaaat taagctctgc atgaggggta ctgtgaacgg ccacaatttt 3000
 gtgatcgagg gcgaaggaaa aggaaatccc tacgaaggga ctgagattct tgacctgaac 3060
 gttactgaag gggtctctct cccctttgct tacgacatcc tgaccaccgt gtttcagtat 3120
 ggtaaccgag cttttacaaa gtatcctgct gatatacagg actattttaa gcaaaccattc 3180
 ccagagggt accactggga gcggtctatg acctatgaag accaaggtat ttgcaccgt 3240
 accagcaaca tcicaatgcg aggcgactgt ttcctttacg atatcagatt cgatggaaca 3300

aacttcccc ccaacggacc cgttatgcaa aagaaaacac tgaaatggga acccagcaca 3360
 gagaagatgt atgttgagga cggggttctg aagggggacg tgaatatgcg gctcttgctg 3420
 gaaggcgag gccactatag atgtgatttc aagacaactt acaaggctaa gaaggaagtg 3480
 aggttgctg acgccataa gatcgatcat cgaatcgaga ttttgaagca tgacaaggat 3540
 tataataagg tgaaactgta cgagaacgcc gtggcccggt actccatgct cccagtcaa 3600
 gctaaa 3606

<210> 23

<211> 454

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: amino acid sequence of
 human CD25ECD-Fc-Avitag

<400> 23

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile

1 5 10 15

Leu Ser Glu Leu Cys Asp Asp Asp Pro Pro Glu Ile Pro His Ala Thr

20 25 30

Phe Lys Ala Met Ala Tyr Lys Glu Gly Thr Met Leu Asn Cys Glu Cys

35 40 45

Lys Arg Gly Phe Arg Arg Ile Lys Ser Gly Ser Leu Tyr Met Leu Cys

50 55 60

Thr Gly Asn Ser Ser His Ser Ser Trp Asp Asn Gln Cys Gln Cys Thr

65	70	75	80
Ser Ser Ala Thr Arg Asn Thr Thr Lys Gln Val Thr Pro Gln Pro Glu			
	85	90	95
Glu Gln Lys Glu Arg Lys Thr Thr Glu Met Gln Ser Pro Met Gln Pro			
	100	105	110
Val Asp Gln Ala Ser Leu Pro Gly His Cys Arg Glu Pro Pro Pro Trp			
	115	120	125
Glu Asn Glu Ala Thr Glu Arg Ile Tyr His Phe Val Val Gly Gln Met			
	130	135	140
Val Tyr Tyr Gln Cys Val Gln Gly Tyr Arg Ala Leu His Arg Gly Pro			
145	150	155	160
Ala Glu Ser Val Cys Lys Met Thr His Gly Lys Thr Arg Trp Thr Gln			
	165	170	175
Pro Gln Leu Ile Cys Thr Gly Glu Met Glu Thr Ser Gln Phe Pro Gly			
	180	185	190
Glu Glu Lys Pro Gln Ala Ser Pro Glu Gly Arg Pro Glu Ser Glu Thr			
	195	200	205
Ser Cys Leu Val Thr Thr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
	210	215	220
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
225	230	235	240
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val			
	245	250	255
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
	260	265	270
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
	275	280	285
Gln Tyr Gly Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
	290	295	300
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
305	310	315	320

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 325 330 335
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 340 345 350
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 355 360 365

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 370 375 380
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 385 390 395 400
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 405 410 415
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 420 425 430

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln
 435 440 445
 Lys Ile Glu Trp His Glu
 450

<210> 24

<211> 1362

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of human
 CD25ECD-Fc-Avitag

<400> 24

atgagagtgc ttatatttatt gtggctgttc acagcctttc ctggtattct tagtgagctc	60
tgtgacgatg acccgccaga gatccacac gccacattca aagccatggc ctacaaggaa	120
ggaaccatgt tgaactgtga atgcaagaga ggtttccgca gaataaaaag cgggtcactc	180
tatatgctct gtacaggaaa ctctagccac tcgtcctggg acaaccaatg tcaatgcaca	240
agctctgcc a ctcggaacac aacgaacaa gtgacacctc aacctgaaga acagaaagaa	300
aggaaaacca cagaaatgca aagtccaatg cagccagtgg accaagcgag ccttcaggt	360
cactgcaggg aacctccacc atgggaaaat gaagccacag agagaattta tcatttcgtg	420

gtggggcaga tggtttatta tcagtgcgtc cagggatata gggctctaca cagaggtcct 480
gctgagagcg tctgcaaaat gaccacggg aagacaaggt ggaccagcc ccagtcata 540

tgcacaggtg aaatggagac cagtcagttt ccaggtgaag agaagcctca ggcaagcccc 600
gaaggccgtc ctgagagtga gacttcctgc ctggtcaca cagacaaaac tcacacatgc 660
ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttcctctt cccccaaaa 720
cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg 780
agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtagtgg acggcgtgga ggtgcataat 840
gccaagacaa agccgcggga ggagcagtag gggagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 900
accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa 960

gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca 1020
caggtgtaca cctgcctccc atcccgggaa gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc 1080
tgcttggtca aaggcttcta tccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag 1140
ccggagaaca actacaagac cagcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttctc 1200
tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcagctcc 1260
gtgatcatg aggtcttga caaccactac acgcagaaga gcctctcct gtctccggga 1320
cttaacgaca tcttgaagc aaaaagatc gaatggcacg ag 1362

<210> 25

<211> 1010

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: amino acid sequence of
human CD122ECD-Fc-Avitag-8His_human CD132ECD-Fc-FLAG

<400> 25

Met Arg Val Leu Ile Leu Leu Trp Leu Phe Thr Ala Phe Pro Gly Ile

1 5 10 15

Leu Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Gln Phe Thr Cys Phe Tyr Asn Ser

20 25 30

Arg Ala Asn Ile Ser Cys Val Trp Ser Gln Asp Gly Ala Leu Gln Asp

35 40 45

Thr Ser Cys Gln Val His Ala Trp Pro Asp Arg Arg Arg Trp Asn Gln

50 55 60

Thr Cys Glu Leu Leu Pro Val Ser Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu
 65 70 75 80
 Ile Leu Gly Ala Pro Asp Ser Gln Lys Leu Thr Thr Val Asp Ile Val
 85 90 95
 Thr Leu Arg Val Leu Cys Arg Glu Gly Val Arg Trp Arg Val Met Ala

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

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

 225 230 235 240
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 245 250 255
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 260 265 270
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 275 280 285
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr

 290 295 300
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val

305 310 315 320
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 325 330 335
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 340 345 350
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro

 355 360 365
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
 370 375 380
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 385 390 395 400
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 405 410 415
 Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp

 420 425 430
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 435 440 445
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Leu
 450 455 460
 Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu His His His
 465 470 475 480
 His His His His His Arg Ala Lys Arg Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu

 485 490 495
 Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
 500 505 510
 Pro Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys
 515 520 525
 Gly Val Gln Cys Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly Asn Glu
 530 535 540
 Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp Ser Leu

 545 550 555 560

Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val Phe Asn
 565 570 575
 Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro Gln Pro
 580 585 590
 Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn Asp Lys
 595 600 605
 Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr Ser Gly
 610 615 620
 Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe Val Val
 625 630 635 640
 Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln Met Leu
 645 650 655
 Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu Thr Leu
 660 665 670
 His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn Arg Phe
 675 680 685
 Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp Trp Asp
 690 695 700
 His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe Ser Leu
 705 710 715 720
 Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg
 725 730 735
 Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp Ser His
 740 745 750
 Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe
 755 760 765
 Ala Leu Glu Ala Gly Ala Gln Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 770 775 780
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 785 790 795 800
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

805 810 815
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 820 825 830
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 835 840 845
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 850 855 860
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

 865 870 875 880
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 885 890 895
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu
 900 905 910
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 915 920 925
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

 930 935 940
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 945 950 955 960
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 965 970 975
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 980 985 990
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Asp Tyr Lys Asp Asp Asp

995 1000 1005
 Asp Lys
 1010
 <210> 26
 <211> 3030
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of human

CD122ECD-Fc-Avitag-8His_human CD132ECD-Fc-FLAG

<400> 26

atgcgtgtgt tgataactcct ctggcttttc actgcttttc caggaattct ttcagccgta	60
aacggcacca gtcaatttac ctgcttctat aatagtcgcg ccaatatctc atgtgtttgg	120
agtcaagatg gcgctctgca ggacacaagt tgccaagtac acgcctggcc agatcgccgt	180
cgggtggaacc agacttgtga gttgcttccc gtttctcagg catcctgggc ttgtaacctt	240
attctggggg ctcccattc acagaagctg acaacagtgg atatcgttac cctcagagtc	300
ctttgtaggg agggcgtgag gtggcgtgtt atggccatcc aagacttcaa gccatttgaa	360
aacttgcgcc ttatggcccc aatttcattg caagtggttc atgtggagac acacaggtgc	420
aacatcagtt gggaaatttc tcaagcttct cactacttcg agaggcacct tgaatttgaa	480
gcccggagcc tctctccgg acatacatgg gaagaggctc cattgctgac tctgaagcag	540
aaacaggaat ggatttgctt tgagacattg accccagata cacaatacga attccaggtc	600
cgtgttaagc ctctccaggg ggagtttacc acatggagcc cttggagtca gccccttgct	660
ttccggacca aaccagctgc tctgggtaag gacacagggg ctccaggacaa gacacacaca	720
tgtcctcctt gccccgtcc tgagctcctg ggccggcctt cagtgtttct cttccctcca	780
aaacctaagg acacccttat gatatctcga acaccagaag tcaattgcgt tgtggtagac	840
gtgtcccatg aagaccctga ggtaaaattc aattggatg ttgatggagt agaggtagac	900
aatgctaaga caaaacctcg agaggagcag tacaactcca cctatagggt tgtttctgta	960
cttaccgtct tgcatcagga ttggcttaac ggcaaggagt ataaatgtaa ggtgtctaat	1020
aaagcacttc ctgcccctat agaaaaaacc atatccaagg caaagggaca gcctcgtgaa	1080
cctcaggtct gtactctgcc cccatcccgg gacgaattga caaagaatca ggtaagcctc	1140
tcttgcgctg ttaaagggtt ctaccctcc gacatagccg tcgagtggga atccaatggc	1200
cagcccgaga ataattacaa aactactcct ccgctccttg atagcgatgg tagtttcttt	1260
cttgatcca agttgacagt ggacaagtca agatggcagc agggtaatgt atttagctgc	1320
tccgttatgc atgaggccct tcataacat tacactcaga aatccctctc actctccct	1380
ggcaaaggac ttaacgacat cttcgaagca caaaagatcg aatggcacga gcaccaccac	1440
catcaccacc atcacagggc aaagcgggct ccagtttaagc agaccttgaa ctttgatctt	1500
ctgaaactgg ccggtgacgt tgagictaac cccggacca tgaatttggg gctttccttg	1560
atttttctgg cccttatcct taaaggggtg cagtgtttga acaccacat tttagctccc	1620
aatgggaacg aagacacaac cgccgatttt tttctcaca ccatgcctac cgatagcttg	1680
tccgtttcaa ctctgcctct tccagaagtt cagtgtttcg tgtttaatgt cgagtatatg	1740

aattgtacat ggaactcatc ttccgaacca caacctacca accttacttt gcactattgg 1800
tacaagaact ctgacaatga caaggtccag aagtgtctctc actatttgtt ctctgaagag 1860

attacatctg gctgtcaatt gcaaaagaaa gagatccacc ttaccacaaac cttcgtcgtc 1920
caattgcagg acccacgaga gccccgccgg caagtactc aaatgcttaa gctccagaat 1980
ctcgtcatcc cctgggcccc agagaacctg acatttcata agttgagtga aagtcagctt 2040
gagttgaact ggaacaatag atttctcaac cactgtctgg aacacctcgt ccaataccga 2100
accgactggg atcattcatg gaccgagcaa tctgttgact atcgccataa attctctttg 2160
ccatccgttg atgggcaaaa acgttacacc ttccgtgtcc gctcacgatt taatcctctc 2220
tgtggctccg cacagcattg gagcgagtgg agccacccta tacactgggg ttctaatact 2280

tctaaggaaa accctttcct ctttgcactt gaggccgggg cacaagataa gactcatact 2340
tgtctccat gtccagcccc cgaattgctg ggtggaccca gcgtcttctt gttcccccca 2400
aagcccaaag acacactcat gataagtagg actcccgagg taacctgtgt cgtagtcgac 2460
gtaagtcatg aagatcctga ggtgaagttt aattggtatg tggatggggg tgaggttcac 2520
aacgctaaaa ccaagccaag agaggagcaa tacaacagta cttatcgcgt cgtgagcgta 2580
ctcacagttc tgcatcaaga ttggctgaat ggcaaagagt acaaatgtaa agtaagcaat 2640
aaggcacttc ctgctcctat cgaaaagact atcagcaaag caaaaggcca accaaggagg 2700

cctcaagtat atacactccc acctttaga gatgagttga ctaagaatca ggtaagtctc 2760
tgggtgtctt tcaagggatt ttatccttca gatatagctg tggagtggga gtctaacggc 2820
caacctgaaa acaactataa gaccaccccc cctgtactgg atagcgatgg tagttttttc 2880
ctctactcca agctcacctg ggacaagtct cgtgggaac aaggtaacgt gttttcctgc 2940
agcgttatgc acgaggcact tcataatcat tacacacaaa aatcactgtc tttagatccc 3000
ggtaagact acaaagacga cgatgacaag 3030

<210> 27

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of
8His-S4(oAzK)/ F78(oAzK)

<400> 27

atgcacatc atcacatca tcatcagcc ccgacctaga gcagcaccaa aaagaccag 60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120

aaaaacccga agctgacccg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180
gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240
ctggcccaga gcaaaaacta gcacctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300
atcgtgctgg aactgaagg tagcgagacc accttcatgt gcgaatatgc cgacgagacc 360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420
ctgacc 426

<210> 28

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of

8His-S5(oAzZK) / F78(oAzZK)

<400> 28

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagct agagcaccaa aaagaccag 60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120
aaaaacccga agctgacccg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180

gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240
ctggcccaga gcaaaaacta gcacctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300
atcgtgctgg aactgaagg tagcgagacc accttcatgt gcgaatatgc cgacgagacc 360
gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420
ctgacc 426

<210> 29

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of

8His-K8(oAzZK) / F78(oAzZK)

<400> 29

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagca gcagcaccta gaagaccag 60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120
aaaaacccga agctgacccg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180
gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240

ctggcccaga gcaaaaacta gcacctgctc cgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300
atcgtgctgg aactgaagg tagcgagacc accttcattg gcgaatatgc cgacgagacc 360
gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420

ctgacc 426

<210> 30

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of
8His-F78(oAzZK) / H79(oAzZK)

<400> 30

atgcatcatc atcaccatca tcatcagcc cgcaccagca gcagcaccaa aaagaccag 60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120
aaaaaccga agctgaccgg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180
gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240

ctggcccaga gcaaaaacta gtagctgctc cgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300
atcgtgctgg aactgaagg tagcgagacc accttcattg gcgaatatgc cgacgagacc 360
gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420
ctgacc 426

<210> 31

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of
8His-F78(oAzZK) / S99(oAzZK)

<400> 31

atgcatcatc atcaccatca tcatcagcc cgcaccagca gcagcaccaa aaagaccag 60

ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120
aaaaaccga agctgaccgg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180
gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240
ctggcccaga gcaaaaacta gcacctgctc cgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300
atcgtgctgg aactgaagg ttaggagacc accttcattg gcgaatatgc cgacgagacc 360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat catcagtacc 420
ctgacc 426

<210> 32

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of
8His-F78(oAzZK) / I129(oAzZK)

<400> 32

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagca gcagcaccaa aaagaccag 60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120
aaaaaccga agctgaccgg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180
gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240
ctggcccaga gcaaaaacta gcacctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300

atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcatgt gcgaatatgc cgacgagacc 360
gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat ctagagtacc 420
ctgacc 426

<210> 33

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of
8His-S4(oAzZK) / I129(oAzZK)

<400> 33

atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgacctaga gcagcaccaa aaagaccag 60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat 120

aaaaaccga agctgaccgg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc 180
gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac 240
ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg 300
atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcatgt gcgaatatgc cgacgagacc 360
gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat ctagagtacc 420
ctgacc 426

<210> 34

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of
8His-S5(oAzZK) / I129(oAzZK)

<400> 34

```
atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagct agagcaccaa aaagaccag      60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat    120
aaaaaccgga agctgaccgg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc    180
gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac    240
ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg    300
atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcattg gcgaatatgc cgacgagacc    360
```

```
gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat ctagagtacc    420
ctgacc                                           426
```

<210> 35

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of
8His-K8(oAzZK) / I129(oAzZK)

<400> 35

```
atgcatcatc atcaccatca tcatcacgcc ccgaccagca gcagcaccta gaagaccag      60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat    120
aaaaaccgga agctgaccgg catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc    180

gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac    240
ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg    300
atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcattg gcgaatatgc cgacgagacc    360
gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat ctagagtacc    420
ctgacc                                           426
```

<210> 36

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of

8His-H79(oAzZK) / I129(oAzZK)

<400> 36

atgcatcatc atccatcatc tcatcacgcc ccgaccagca gcagcaccaa aaagaccag	60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat	120
aaaaaccga agctgaccgc catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc	180
gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac	240
ctggcccaga gcaaaaactt ttagctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg	300
atcgtgctgg aactgaaggg tagcgagacc accttcattg gcgaatatgc cgacgagacc	360

gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat ctagagtacc	420
ctgacc	426

<210> 37

<211> 426

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of

8His-S99(oAzZK) / I129(oAzZK)

<400> 37

atgcatcatc atccatcatc tcatcacgcc ccgaccagca gcagcaccaa aaagaccag	60
ctgcagctgg aacatctgct gctggatctg cagatgatcc tgaatggcat taacaactat	120
aaaaaccga agctgaccgc catgctgacc tttaaatttt atatgccgaa aaaagccacc	180

gagctgaagc atctgcagtg cctggaagaa gaactgaaac cgctggaaga ggtgctgaac	240
ctggcccaga gcaaaaactt tcacctgcgc ccgcgtgacc tgatcagcaa catcaacgtg	300
atcgtgctgg aactgaaggg ttaggagacc accttcattg gcgaatatgc cgacgagacc	360
gccaccatcg tggaattcct gaaccgctgg atcacctttt cccagagcat ctagagtacc	420
ctgacc	426

<210> 38

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: amino acid sequence of

IL-2 C125S Nter-Met

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ile Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 39

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of IL-2

C125S Nter-Met

<400> 39

atggcaccta cttaagttc tacaagaaa acacagctac aactggagca ttactgctg 60

gatttacaga tgattttgaa tggaattaat aattacaaga atcccaaact caccaggatg 120

ctcacattta agttttacat gcccaagaag gccacagaac tgaacatct tcagtgtcta 180

gaagaagaac tcaaacctct ggaggaagtg ctaaatttag ctcaaagcaa aaactttcac 240

ttaagaccca gggacttaat cagcaatatac aacgtaatag ttctggaact aaagggatct 300

gaaacaacat tcatgtgtga atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac 360

agatggatta ccttttcaca aagcatcatc tcaacactga ct 402

<210> 40

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: amino acid sequence of
desAla_IL-2 C125S

<400> 40

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 41

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220

><223> Description of the artificial sequence: base sequence of
desAla_IL-2 C125S

<400> 41

atgcctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat	60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc	120
acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa	180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta	240
agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa	300
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga	360

tggattacct tttcacaag catcatctca aactgact	399
--	-----

<210> 42

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of
F78(oAzZK)

<400> 42

atggcaccta cttcaagttc tacaagaaa acacagctac aactggagca ttactgctg	60
gatttacaga tgattttgaa tggaattaat aattacaaga atcccaaact caccaggatg	120
ctcacattta agttttacat gcccaagaag gccacagaac tgaacatct tcagtgtcta	180
gaagaagaac tcaaacctct ggaggaagtg ctaaatttag ctcaaagcaa aaactagcac	240

ttaagacca gggacttaat cagcaatc aacgtaatag ttctggaact aaagggatct	300
gaaacaacat tcatgtgtga atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac	360
agatggatta cttttcaca aagcatcatc tcaacactga ct	402

<210> 43

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of
I129(oAzZK)

<400> 43

atggcaccta cttaagttc tacaagaaa acacagctac aactggagca ttactgctg 60
gatttacaga tgattttgaa tggaattaat aattacaaga atcccaaact caccaggatg 120

ctcacattta agttttacat gccaagaag gccacagaac tgaaacatct tcagtgtcta 180
gaagaagaac tcaaacctct ggaggaagtg cttaatttag ctcaaagcaa aaactttcac 240
ttaagaccca gggacttaac cagcaatatac aacgtaatag ttctggaact aaagggatct 300
gaaacaacat tcatgtgtga atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac 360
agatggatta ccttttcaca aagcatctag tcaaacactga ct 402

<210> 44

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of

desAla_I129(oAzZK)

<400> 44

atgcctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60
ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120
acatttaagt tttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180
gaagaactca aacctctgga ggaagtgtca aatttagctc aaagcaaaaa ctttactta 240
agaccaggga acttaatcag caatatcaac gtaatagtgc tggaactaaa gggatctgaa 300
acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360
tggattacct tttcacaag catctagtca aactgact 399

<210> 45

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of

S4(oAzZK)/ F78(oAzZK)

<400> 45

atggcaccta cttagagttc tacaagaaa acacagctac aactggagca ttactgctg 60
gatttacaga tgattttgaa tggaattaat aattacaaga atcccaaact caccaggatg 120
ctcacattta agttttacat gccaagaag gccacagaac tgaaacatct tcagtgtcta 180
gaagaagaac tcaaacctct ggaggaagtg cttaatttag ctcaaagcaa aaactagcac 240

ttaagaccca gggacttaat cagcaataatc aacgtaatag ttctggaact aaagggatct 300

gaaacaacat tcatgtgtga atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac 360

agatggatta ccttttcaca aagcatcatc tcaaacactga ct 402

<210> 46

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of
S5(oAzZK) / F78(oAzZK)

<400> 46

atggcaccta cttcatagtc tacaaagaaa acacagctac aactggagca ttactgtctg 60

gatttacaga tgattttgaa tggaattaat aattacaaga atcccaaact caccaggatg 120

ctcacattta agttttacat gcccaagaag gccacagaac tgaacatct tcagtgtcta 180

gaagaagaac tcaaacctct ggaggaagtg ctaaatttag ctcaaagcaa aaactagcac 240

ttaagaccca gggacttaat cagcaataatc aacgtaatag ttctggaact aaagggatct 300

gaaacaacat tcatgtgtga atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac 360

agatggatta ccttttcaca aagcatcatc tcaaacactga ct 402

<210> 47

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of
K8(oAzZK) / F78(oAzZK)

<400> 47

atggcaccta cttaagttc tacatagaaa acacagctac aactggagca ttactgtctg 60

gatttacaga tgattttgaa tggaattaat aattacaaga atcccaaact caccaggatg 120

ctcacattta agttttacat gcccaagaag gccacagaac tgaacatct tcagtgtcta 180

gaagaagaac tcaaacctct ggaggaagtg ctaaatttag ctcaaagcaa aaactagcac 240

ttaagaccca gggacttaat cagcaataatc aacgtaatag ttctggaact aaagggatct 300

gaaacaacat tcatgtgtga atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac 360

agatggatta ccttttcaca aagcatcatc tcaaacactga ct 402

<210> 48

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of
S4(oAzZK) / I129(oAzZK)

<400> 48

atggcaccta cttagagttc tacaagaaa acacagctac aactggagca tttactgctg	60
gatttacaga tgattttgaa tggaattaat aattacaaga atcccaaact caccaggatg	120
ctcacattta agttttacat gcccaagaag gccacagaac tgaacatct tcagtgtcta	180
gaagaagaac tcaaacctct ggaggaagtg ctaaatttag ctcaaagcaa aaactttcac	240
ttaagaccca gggacttaat cagcaatata aacgtaatag ttctggaact aaagggatct	300
gaaacaacat tcatgtgtga atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac	360

agatggatta cttttcaca aagcatctag tcaaacctga ct	402
---	-----

<210> 49

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of
S5(oAzZK) / I129(oAzZK)

<400> 49

atggcaccta cttcatagtc tacaagaaa acacagctac aactggagca tttactgctg	60
gatttacaga tgattttgaa tggaattaat aattacaaga atcccaaact caccaggatg	120
ctcacattta agttttacat gcccaagaag gccacagaac tgaacatct tcagtgtcta	180
gaagaagaac tcaaacctct ggaggaagtg ctaaatttag ctcaaagcaa aaactttcac	240

ttaagaccca gggacttaat cagcaatata aacgtaatag ttctggaact aaagggatct	300
gaaacaacat tcatgtgtga atatgctgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac	360
agatggatta cttttcaca aagcatctag tcaaacctga ct	402

<210> 50

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of

K8(oAzZK) / I129(oAzZK)

<400> 50

atggcaccta cttcaagttc tacatagaaa acacagctac aactggagca ttactgtctg 60
gatttacaga tgattttgaa tggaattaat aattacaaga atcccaaact caccaggatg 120

ctcacattta agttttacat gccaagaag gccacagaac tgaacatct tcagtgtcta 180
gaagaagaac tcaaacctct ggaggaagtg ctaaatttag ctcaaagcaa aaactttcac 240
ttaagacca gggacttaat cagcaatatt aacgtaatag ttctggaact aaagggatct 300
gaaacaacat tcatgtgtga atatgtgat gagacagcaa ccattgtaga atttctgaac 360
agatggatta ccttttcaca aagcatctag tcaaacactga ct 402

<210> 51

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: amino acid sequence of

?h129?b

<400> 51

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115

120

125

Cys Ser Thr Leu Thr

130

<210> 52

<211> 399

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of the artificial sequence: base sequence of ?h129?b

<400> 52

atgcctactt caagttctac aaagaaaaca cagctacaac tggagcattt actgctggat 60

ttacagatga ttttgaatgg aattaataat tacaagaatc ccaaactcac caggatgctc 120

acatttaagt ttacatgcc caagaaggcc acagaactga aacatcttca gtgtctagaa 180

gaagaactca aacctctgga ggaagtgcta aatttagctc aaagcaaaaa ctttcactta 240

agaccaggg acttaatcag caatatcaac gtaatagttc tggaactaaa gggatctgaa 300

acaacattca tgtgtgaata tgctgatgag acagcaacca ttgtagaatt tctgaacaga 360

tggattacct tttcacaag catctgttca aactgact 399