(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월24일
(11) 등록번호 10-2708105
(24) 등록일자 2024년09월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/55 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61K 47/54* (2017.01)
A61K 47/60 (2017.01) *A61K 47/61* (2017.01)
A61K 47/64 (2017.01) *A61K 47/68* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/55 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7005612
(22) 출원일자(국제) 2018년08월03일
심사청구일자 2021년08월02일
(85) 번역문제출일자 2020년02월26일
(65) 공개번호 10-2020-0035092
(43) 공개일자 2020년04월01일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/045265
(87) 국제공개번호 WO 2019/028425
국제공개일자 2019년02월07일
(30) 우선권주장
62/540,781 2017년08월03일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020170035910 A*
WO2016164937 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
신톡스, 인크.
미국 캘리포니아 (우편번호 92037) 라 졸라 엔. 토레이 파인스 로드 11099 스위트 190
(72) 발명자
프타신 제로드
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 노스 토레이 파인스 로드 11099 스위트 290
카파로 캐롤라이나 이.
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 노스 토레이 파인스 로드 11099 스위트 290
밀라 마르코스
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 노스 토레이 파인스 로드 11099 스위트 290
(74) 대리인
장훈

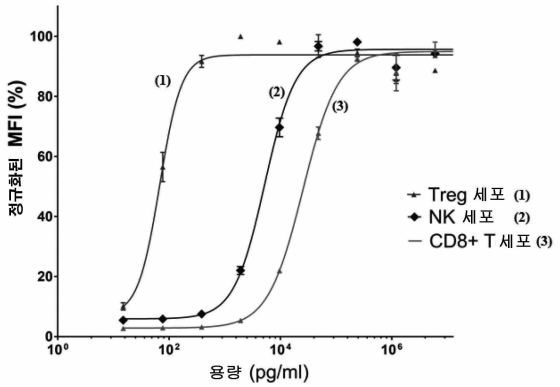
전체 청구항 수 : 총 34 항 심사관 : 강덕희

(54) 발명의 명칭 **자가면역 질환의 치료를 위한 사이토카인 접합체**

(57) 요 약

인터루킨(IL) 접합체(예를 들어, IL-2 접합체) 및 하나 이상의 적응증의 치료에서의 용도가 본원에서 개시된다. 또한, 하나 이상의 인터루킨 접합체(예를 들어, IL-2 접합체)를 포함하는 약학 조성물 및 키트가 본원에서 설명된다.

대 표 도 - 도4a



(52) CPC특허분류
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 47/542 (2017.08)
A61K 47/60 (2017.08)
A61K 47/61 (2017.08)
A61K 47/64 (2017.08)
A61K 47/6813 (2017.08)

명 세 서

청구범위

청구항 1

접합 모이어티에 공유 부착되는 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함하는 변형된 인터루킨 2 (IL-2) 폴리펩티드로서,

상기 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치가 K9, H16, L19, N26, E100 및 N119로부터 선택되고, 여기서, 상기 잔기 위치가 서열 번호 1에 제시된 위치 9, 16, 19, 26, 100 및 119에 상응하고;

상기 접합 모이어티가 수용성 중합체이고;

상기 변형된 IL-2 폴리펩티드가 서열 번호 1과 적어도 80%의 서열 동일성을 포함하는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치가 K9 및 H16으로부터 선택되고, 여기서, 상기 잔기 위치가 서열 번호 1에 제시된 위치 9 및 16에 상응하는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치가 K9이고, 여기서, 상기 잔기 위치가 서열 번호 1에 제시된 위치 9에 상응하는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치가 H16이고, 여기서, 상기 잔기 위치가 서열 번호 1에 제시된 위치 16에 상응하는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 비천연 아미노산이 N6-아지도에톡시-L-라이신 (AzK), N6-프로파르길에톡시-L-라이신 (PraK), BCN-L-라이신, 노르보르넨 라이신, TCO-라이신, 메틸테트라진 라이신, 알릴옥시카르보닐라이신, p-아세틸-L-페닐알라닌, p-아지도메틸-L-페닐알라닌 (pAMF), p-요오도-L-페닐알라닌, m-아세틸페닐알라닌, p-프로파르길옥시페닐알라닌, p-프로파르길-페닐알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, 플루오르화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, p-브로모페닐알라닌, p-아미노-L-페닐알라닌, O-알릴티로신, O-메틸-L-티로신, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 포스포노티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 2-아미노-3-((2-((3-(벤질옥시)-3-옥소프로필)아미노)에틸)셀라닐)프로판산 또는 2-아미노-3-(페닐셀라닐)프로판산을 포함하는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수용성 중합체가 폴리에틸렌 글리콜 (PEG), 폴리(프로필렌 글리콜) (PPG), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀계 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α-히드록시산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린 (POZ), 폴리(N-아크릴로일모르폴린) 또는 이들의 조합을 포함하는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 수용성 중합체가 PEG를 포함하는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 PEG가 5 kDa내지 100 kDa의 중량 평균 분자량을 갖는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 PEG가 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 45 kDa, 50 kDa, 55 kDa, 60 kDa, 65 kDa, 70 kDa 또는 75 kDa의 중량 평균 분자량을 갖는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 PEG가 50 kDa의 중량 평균 분자량을 갖는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합 모이어티가 링커를 통해 상기 변형된 IL-2 폴리펩티드의 적어도 하나의 비천연 아미노산에 결합되는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 링커가 동종 이작용성 링커, 이종 이작용성 링커, 절단가능한 또는 절단가능하지 않은 디펩티드 링커, 스페이서 또는 이들의 조합을 포함하는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 13

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 IL-2 폴리펩티드가 N-말단 결실을 포함하고,

상기 N-말단 결실이 N-말단으로부터 처음 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 또는 25개 잔기의 결실을 포함하고, 여기서, 상기 잔기 위치가 서열 번호 1에 제시된 위치에 상응하는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 14

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 IL-2 폴리펩티드가 서열 번호 1과 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 포함하는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 15

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 IL-2 폴리펩티드가 CD4+ T 조절 (Treg) 세포를 확장시킬 수 있는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 16

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 접합 모이어티가 IL-2Rβγ에 의한 IL-2의 수용체 신호전달 효능을 손상시키거나 차단하거나, IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rγ 서브유닛의 동원(recruitment)을 감소시키는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 17

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 IL-2/IL-2Rαβγ 복합체에 의해 유도된 CD4+ Treg 세포 증식이 야생형 IL-2 폴리펩티드에 의한 것과 동등하거나 이보다 더 큰, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 변형된 IL-2/IL-2Rαβγ 복합체가 CD4+ Treg 세포를 동물 모델에서 질환 경로를 조절하기에 충분한 집단으로 증식하는 것을 유도하는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 19

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 IL-2 폴리펩티드가 IL-2Rβγ에 대한 제1 수용체 신호전달 효능 및 IL-2Rαβγ에 대한 제2 수용체 신호전달 효능을 나타내며, 상기 제1 수용체 신호전달 효능이 제2 수용체 신호전달 효능보다 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 50배, 100배, 500배 또는 1000배 더 낮은, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 변형된 IL-2 폴리펩티드의 제1 수용체 신호전달 효능이 야생형 IL-2 폴리펩티드의 IL-2Rβγ에 대한 수용체 신호전달 효능보다 더 낮은, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 변형된 IL-2 폴리펩티드의 제2 수용체 신호전달 효능이 야생형 IL-2 폴리펩티드의 IL-2Rαβγ에 대한 수용체 신호전달 효능보다 더 낮은, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 22

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 IL-2 폴리펩티드가 IL-2 폴리펩티드에 대한 IL-2Rα 서브유닛의 동원의 증가를 제공하여 인터루킨 2 αβγ 수용체 (IL-2Rαβγ)의 활성화를 초래하고, 여기서, 상기 동원의 증가가 야생형 IL-2 폴리펩티드에 의한 IL-2Rα 서브유닛의 동원과 비교되는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 23

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 변형된 IL-2 폴리펩티드가 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rγ 서브유닛의 동원의 감소를 제공하고, 여기서, 상기 동원의 감소가 야생형 IL-2 폴리펩티드에 의한 IL-2Rβ 서브유닛 및/또는 IL-2Rγ 서브유닛의 동원과 비교되는, 변형된 IL-2 폴리펩티드.

청구항 24

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 피험체에서 자가면역 질환 또는 장애를 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 약학 조성물이 전신 전달용으로 제제화되는, 약학 조성물.

청구항 26

제24항에 있어서, 상기 약학 조성물이 비경구 투여용으로 제제화되는, 약학 조성물.

청구항 27

제24항에 있어서, 상기 자가면역 질환 또는 장애가 원형탈모증, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 피부근염, 1형 당뇨병, 소아 특발성 관절염, 사구체신염, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 중증 근무력증, 다발성 경화증, 수포창/유사천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발성 동맥염, 다발성 근염, 원발성 담즙성 경화증, 건선, 류마티스 관절염, 피부경화증, 쇼그렌 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 갑상선염, 포도막염, 백반증 또는 베거너 육아종증을 포함하는, 약학 조성물.

청구항 28

제24항에 있어서, 추가의 치료제가 상기 피험체에게 투여되는, 약학 조성물.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 약학 조성물 및 상기 추가의 치료제가 동시에 투여되는, 약학 조성물.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 약학 조성물 및 상기 추가의 치료제가 순차적으로 투여되는, 약학 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 약학 조성물이 상기 추가의 치료제 투여 전에 투여되는, 약학 조성물.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 약학 조성물이 상기 추가의 치료제 투여 후에 투여되는, 약학 조성물.

청구항 33

제24항에 있어서, 상기 피험체가 인간인, 약학 조성물.

청구항 34

IL-2Rαβɣ와의 복합체 형성을 유도하기에 충분한 시간 동안 Treg 세포를 포함하는 세포 집단을 제24항의 약학 조성물과 접촉시켜 상기 집단의 Treg 세포들의 확장을 자극함

을 포함하는, CD4+ 조절 T (Treg) 세포 집단을 확장시키는 생체외 또는 시험관내 방법.

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

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 상호 참조

[0002] 본 출원은 2017년 8월 3일 출원된 미국 특허 가출원 제62/540,781호의 이익을 주장하며, 이 출원은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이 목록은 그 전체가 참조로 포함된다. 2018년 8월 3일에 생성된 상기 ASCII 사본의 명칭은 46085-710_602_SL.txt이며, 크기는 3,703 바이트이다.

배 경 기 술

[0005] T 세포의 별개의 집단은 면역 항상성 및 내성을 유지하기 위해 면역계를 조절한다. 예를 들어, 조절 T(Treg) 세포는 세포 독성 T 세포가 감염된 세포 및/또는 암성 세포를 표적화하고 파괴하면서 병리학적 자기 반응성을 억제함으로써 면역계에 의한 부적절한 반응을 방지한다. 일부 경우에, T 세포의 상이한 집단의 조절은 질환 또는 적응증(indication)의 치료를 위한 옵션을 제공한다.

발명의 내용

[0006] 개시내용의 요약

[0007] 특정 실시양태에서, 사이토카인 접합체 및 하나 이상의 적응증의 치료에서의 용도가 본원에서 개시된다. 일부 실시양태에서, 인터루킨 2(IL-2) 접합체 및 하나 이상의 적응증의 치료에서의 용도가 또한 본원에서 설명된다. 일부 경우에, 하나 이상의 적응증은 자가면역 질환을 포함한다. 일부 경우에, 특이적으로 조절 T 세포(Treg 세포) 집단을 자극하거나 확장시키기 위해 IL-2와 IL-2 수용체 사이의 상호작용을 조절하는 IL-2 접합체가 본원에서 설명된다. 일부 경우에, 연장된 생체내 반감기, 감소된 독성, 및/또는 확장된 치료 윈도우를 갖는 IL-2 접합체가 본원에서 설명된다. 추가의 경우에, 본원에서 설명되는 하나 이상의 인터루킨 접합체(예를 들어, IL-2 접합체)를 포함하는 약학 조성물 및 키트가 본원에서 설명된다.

[0008] 특정 실시양태에서, 인터루킨 2(IL-2) 수용체 βγ(IL-2Rβγ)에 대한 수용체 신호전달 효능을 감소시키거나 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rγ 서브유닛의 동원을 감소시키지만 인터루킨 2 αβγ 수용체(IL-2Rαβγ)의 유의한 활성화를 보유하는 적어도 하나의 비천연 아미노산을 일정 위치에 포함하는 단리 및 변형된 IL-2 폴리펩티드가 본원에서 개시되고, 여기서 감소된 수용체 신호전달 효능은 야생형 IL-2 폴리펩티드와 IL-2Rβγ 사이의 수용체 신호전달 효능과 비교되고, 동원은 야생형 IL-2 폴리펩티드에 의한 IL-2Rγ 서브유닛의 동원과 비교된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산은 P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, 및 T113으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95, 및 Q126으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 K8, K9, 및 H16으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 Q22, N26, N88, 및 Q126으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 E15, D20, D84, 및 E95로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 L12, L19, 및 M23으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 Q22 및 N26으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산은 라이신 유사체이거나; 시스테인 유사체 또는 히스티딘 유사체이거나; 방향족 측쇄를 포함하거나;

아지도기를 포함하거나; 알킨기를 포함하거나; 알데히드 또는 케톤기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산은 방향족 측쇄를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산은 다음을 포함한다: N6-아지도에톡시-L-라이신(AzK), N6-프로파르길에톡시-L-라이신(PraK), BCN-L-라이신, 노르보르넨 라이신, TCO-라이신, 메틸테트라진 라이신, 알릴옥시카르보닐라이신, 2-아미노-8-옥소노난산, 2-아미노-8-옥소옥탄산, p-아세틸-L-페닐알라닌, p-아지도메틸-L-페닐알라닌(pAMF), p-요오도-L-페닐알라닌, m-아세틸페닐알라닌, 2-아미노-8-옥소노난산, p-프로파르길옥시페닐알라닌, p-프로파르길-페닐알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, L-도파, 플루오르화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, p-브로모페닐알라닌, p-아미노-L-페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, O-알릴티로신, O-메틸-L-티로신, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 포스포노티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcp-세린, L-포스포세린, 포스포노세린, L-3-(2-나프틸)알라닌, 2-아미노-3-((2-((3-(벤질옥시)-3-옥소프로필)아미노)에틸)셀라닐)프로판산, 2-아미노-3-(페닐셀라닐)프로판산 또는 셀레노시스테인. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산은 오르소고날 tRNA 합성 효소(orthogonal tRNA synthetase)/tRNA 쌍에 의해 변형된 IL-2 폴리펩티드 내에 통합된다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소/tRNA 쌍의 오르소고날 tRNA는 적어도 하나의 비천연 핵염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 적어도 하나의 비천연 아미노산을 통해 접합 모이어티에 공유 부착된다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 수용성 중합체, 지질, 단백질 또는 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(프로필렌 글리콜)(PPG), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀계 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α-히드록시산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린(POZ), 폴리(N-아크릴로일모르폴린) 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 PEG 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, PEG 분자는 선형 PEG이다. 일부 실시양태에서, PEG 분자는 분지형 PEG이다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리사카라이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리사카라이드는 덱스트란, 폴리시알산(PSA, polysialic acid), 히알루론산(HA), 아밀로스, 헤파린, 헤파란 술페이트(HS), 덱스트린 또는 히드록시에틸-전분(HES)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 지질은 지방산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 지방산은 약 6 내지 약 26개의 탄소 원자, 약 6 내지 약 24개의 탄소 원자, 약 6 내지 약 22개의 탄소 원자, 약 6 내지 약 20개의 탄소 원자, 약 6 내지 약 18개의 탄소 원자, 약 20 내지 약 26개의 탄소 원자, 약 12 내지 약 26개의 탄소 원자, 약 12 내지 약 24개의 탄소 원자, 약 12 내지 약 22개의 탄소 원자, 약 12 내지 약 20개의 탄소 원자, 또는 약 12 내지 약 18개의 탄소 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 지방산은 포화 지방산이다. 일부 실시양태에서, 단백질은 알부민, 트랜스페린 또는 트랜스티레틴을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단백질은 항체 또는 이의 결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 항체의 Fc 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 XTEN 펩티드, 글리신 풍부 호모아미노산 중합체(HAP), PAS 폴리펩티드, 엘라스틴 유사 폴리펩티드(ELP), CTP 펩티드 또는 젤라틴 유사 단백질(GLK) 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 링커를 통해 변형된 IL-2의 적어도 하나의 비천연 아미노산에 간접적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 링커는 동종이기능성 링커, 이종이기능성 링커, 제로 길이(zero-length) 링커, 절단가능한 또는 절단가능하지 않은 디펩티드 링커, 말레이미드 기, 스페이서 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리 및 변형된 IL-2 폴리펩티드는 IL-2Rβγ에 대한 수용체 신호전달 효능의 감소를 가지며, IL-2Rβγ에 대한 수용체 신호전달 효능의 감소는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 30배, 50배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 1000배, 또는 그 초과이다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 전장 IL-2 폴리펩티드의 기능적으로 활성인 단편; 재조합 IL-2 폴리펩티드; 또는 재조합 인간 IL-2 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 N-말단 결실, C-말단 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, N-말단 결실은 N-말단으로부터 처음 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 또는 30 개 잔기의 결실을 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 실시양태에서, C-말단 결실은 C-말단으로부터 마지막 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 개 또는 그 초과의 잔기의 결실을 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 실시양태에서, 기능적으로 활성인 단편은 IL-2 영역 10-133, 20-133, 30-133, 10-130, 20-130, 30-130, 10-125, 20-125, 30-125, 1-130 또는 1-125를 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열 번호 1에 대해 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2Rβγ에 대한 수용체 신호전달 효능이 감소된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 CD4+ T 조절(Treg) 세포를 확장시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 IL-2의 IL-2Rβγ에 대한 수용체 신호전달 효능을 손상시키거나 차단하거나, 또는 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rγ 서브유닛의 동원을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2/IL-2Rαβγ 복합체에 의한 CD4+ Treg 세포 증식

은 야생형 IL-2 폴리펩티드와 동등하거나 이보다 더 크다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2/IL-2Rαβɣ 복합체는 CD4+ Treg 세포를 동물 모델에서 질환 경로를 조절하기에 충분한 집단으로 증식하는 것을 유도한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 IL-2Rβɣ에 대한 제1 수용체 신호전달 효능 및 IL-2Rαβɣ에 대한 제2 수용체 신호전달 효능을 나타내며, 상기 제1 수용체 신호전달 효능은 제2 수용체 신호전달 효능보다 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 50배, 100배, 500배, 1000배 더 낮다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 제1 수용체 신호전달 효능은 야생형 IL-2 폴리펩티드의 IL-2Rβɣ에 대한 수용체 신호전달 효능보다 더 낮다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 제2 수용체 신호전달 효능은 야생형 IL-2 폴리펩티드의 IL-2Rαβɣ에 대한 수용체 신호전달 효능보다 더 낮다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 추가로 IL-2 폴리펩티드에 대한 IL-2Rα 서브유닛의 동원의 증가를 제공하여 인터루킨 2 αβɣ 수용체(IL-2Rαβɣ)의 활성화를 초래하고, 여기서 동원의 증가는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 의한 IL-2Rα 서브유닛의 동원과 비교된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 추가로 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rɣ 서브유닛의 동원의 감소를 제공하고, 여기서 동원의 감소는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 의한 IL-2Rβ 서브유닛 및/또는 IL-2Rɣ 서브유닛의 동원과 비교된다.

[0009] 특정 실시양태에서, 인터루킨 2(IL-2) 폴리펩티드에 대한 IL-2Rα 서브유닛의 동원을 증가시켜 인터루킨 2 αβɣ 수용체(IL-2Rαβɣ)의 활성화를 초래하는 적어도 하나의 비천연 아미노산을 일정 위치에 포함하는 단리 및 변형된 IL-2 폴리펩티드가 본원에서 개시되고, 여기서 동원의 증가는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 의한 IL-2Rα 서브유닛의 동원과 비교된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, 및 T113으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95, 및 Q126으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 K8, K9, 및 H16으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 Q22, N26, N88, 및 Q126으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 E15, D20, D84, 및 E95로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 L12, L19, 및 M23으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 Q22 및 N26으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산은 라이신 유사체이거나; 시스테인 유사체 또는 히스티딘 유사체이거나; 방향족 측쇄를 포함하거나; 아지도기를 포함하거나; 알킨기를 포함하거나; 알데히드 또는 케톤기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산은 방향족 측쇄를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산은 다음을 포함한다: N6-아지도에톡시-L-라이신(AzK), N6-프로파르길에톡시-L-라이신(PraK), BCN-L-라이신, 노르보르넨 라이신, TCO-라이신, 메틸테트라진 라이신, 알릴옥시카르보닐라이신, 2-아미노-8-옥소노난산, 2-아미노-8-옥소옥탄산, p-아세틸-L-페닐알라닌, p-아지도메틸-L-페닐알라닌(pAMF), p-요오도-L-페닐알라닌, m-아세틸페닐알라닌, 2-아미노-8-옥소노난산, p-프로파르길옥시페닐알라닌, p-프로파르길-페닐알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, L-도파, 플루오르화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, p-브로모페닐알라닌, p-아미노-L-페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, O-알릴티로신, O-메틸-L-티로신, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 포스포노티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcp-세린, L-포스포세린, 포스포노세린, L-3-(2-나프틸)알라닌, 2-아미노-3-((2-((3-(벤질옥시)-3-옥소프로필)아미노)에틸)셀라닐)프로판산, 2-아미노-3-(페닐셀라닐)프로판산 또는

셀레노시스테인. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산은 오르소고날 tRNA 합성 효소/tRNA 쌍에 의해 변형된 IL-2 폴리펩티드 내에 통합된다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소/tRNA 쌍의 오르소고날 tRNA는 적어도 하나의 비천연 핵염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 적어도 하나의 비천연 아미노산을 통해 접합 모이어티에 공유 부착된다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 수용성 중합체, 지질, 단백질 또는 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(프로필렌 글리콜)(PPG), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀계 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α-히드록시산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린(POZ), 폴리(N-아크릴로일모르폴린) 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 PEG 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, PEG 분자는 선형 PEG이다. 일부 실시양태에서, PEG 분자는 분지형 PEG이다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리사카라이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리사카라이드는 덱스트란, 폴리시알산(PSA), 히알루론산(HA), 아밀로스, 헤파린, 헤파란 술페이트(HS), 덱스트린 또는 히드록시에틸-전분(HES)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 지질은 지방산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 지방산은 약 6 내지 약 26개의 탄소 원자, 약 6 내지 약 24개의 탄소 원자, 약 6 내지 약 22개의 탄소 원자, 약 6 내지 약 20개의 탄소 원자, 약 6 내지 약 18개의 탄소 원자, 약 20 내지 약 26개의 탄소 원자, 약 12 내지 약 26개의 탄소 원자, 약 12 내지 약 24개의 탄소 원자, 약 12 내지 약 22개의 탄소 원자, 약 12 내지 약 20개의 탄소 원자, 또는 약 12 내지 약 18개의 탄소 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 지방산은 포화 지방산이다. 일부 실시양태에서, 단백질은 알부민, 트랜스페린 또는 트랜스티레틴을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단백질은 항체 또는 이의 결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 항체의 Fc 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 XTEN 펩티드, 글리신 풍부 호모아미노산 중합체(HAP), PAS 폴리펩티드, 엘라스틴 유사 폴리펩티드(ELP), CTP 펩티드 또는 젤라틴 유사 단백질(GLK) 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 링커를 통해 변형된 IL-2의 적어도 하나의 비천연 아미노산에 간접적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 링커는 동종이기능성 링커, 이종이기능성 링커, 제로 길이 링커, 절단가능한 또는 절단가능하지 않은 디펩티드 링커, 말레이미드 기, 스페이서 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리 및 변형된 IL-2 폴리펩티드는 IL-2Rβɣ에 대한 수용체 신호전달 효능의 감소를 가지며, IL-2Rβɣ에 대한 수용체 신호전달 효능의 감소는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 30배, 50배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 1000배, 또는 그 초과이다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 전장 IL-2 폴리펩티드의 기능적으로 활성인 단편; 재조합 IL-2 폴리펩티드; 또는 재조합 인간 IL-2 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 N-말단 결실, C-말단 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, N-말단 결실은 N-말단으로부터 처음 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 또는 30 개 잔기의 결실을 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 실시양태에서, C-말단 결실은 C-말단으로부터 마지막 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 개 또는 그 초과의 잔기의 결실을 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 실시양태에서, 기능적으로 활성인 단편은 IL-2 영역 10-133, 20-133, 30-133, 10-130, 20-130, 30-130, 10-125, 20-125, 30-125, 1-130 또는 1-125를 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열 번호 1에 대해 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2Rβɣ에 대한 수용체 신호전달 효능이 감소된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 CD4+ T 조절(Treg) 세포를 확장시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 IL-2의 IL-2Rβɣ에 대한 수용체 신호전달 효능을 손상시키거나 차단하거나, 또는 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rɣ 서브유닛의 동원을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2/IL-2Rαβɣ 복합체에 의한 CD4+ Treg 세포 증식은 야생형 IL-2 폴리펩티드와 동등하거나 이보다 더 크다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2/IL-2Rαβɣ 복합체는 CD4+ Treg 세포를 동물 모델에서 질환 경로를 조절하기에 충분한 집단으로 증식하는 것을 유도한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 IL-2Rβɣ에 대한 제1 수용체 신호전달 효능 및 IL-2Rαβɣ에 대한 제2 수용체 신호전달 효능을 나타내며, 상기 제1 수용체 신호전달 효능은 제2 수용체 신호전달 효능보다 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 50배, 100배, 500배, 1000배 더 낮다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 제1 수용체 신호전달 효능은 야생형 IL-2 폴리펩티드의 IL-2Rβɣ에 대한 수용체 신호전달 효능보다 더 낮다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 제2 수용체 신호전달 효능은 야생형 IL-2 폴리펩티드의 IL-2Rαβɣ에 대한 수용체 신호전달 효능보다 더 낮다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 추가로 IL-2 폴리펩티드에 대한 IL-2Rα 서브유닛의 동원을 증가시켜 인터루킨 2 αβɣ 수용체(IL-2Rαβɣ)의 활성화를 초래하고, 여기서 동원의 증가는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 의한 IL-2Rα 서브유닛의 동원과 비교된다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 추가로 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rɣ 서브유닛

의 동원을 감소시키고, 여기서 동원의 감소는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 의한 IL-2Rβ 서브유닛 및/또는 IL-2Rɣ 서브유닛의 동원과 비교된다.

[0010] 특정 실시양태에서, 변형된 인터루킨 2(IL-2) 폴리펩티드와 인터루킨 2 수용체 βɣ(IL-2Rβɣ) 사이의 결합을 감소시키거나 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rɣ 서브유닛의 동원을 감소시키지만 인터루킨 2 αβɣ 수용체(IL-2Rαβɣ)의 활성화를 손상시키지 않는 적어도 하나의 비천연 아미노산을 일정 위치에 포함하는 단리 및 변형된 IL-2 폴리펩티드가 본원에서 개시되고, 여기서 감소된 결합은 야생형 IL-2 폴리펩티드와 IL-2Rβɣ 사이의 결합과 비교되고, 감소된 동원은 야생형 IL-2 폴리펩티드에 의한 IL-2Rɣ 서브유닛의 동원과 비교된다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, 및 T113으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95, 및 Q126으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 K8, K9, 및 H16으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 Q22, N26, N88, 및 Q126으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 E15, D20, D84, 및 E95로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 L12, L19, 및 M23으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 Q22 및 N26으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 Q22이고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 N26이고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산은 라이신 유사체이거나; 시스테인 유사체 또는 히스티딘 유사체이거나; 방향족 측쇄를 포함하거나; 아지도기를 포함하거나; 알킨기를 포함하거나; 알데히드 또는 케톤기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산은 방향족 측쇄를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산은 다음을 포함한다: N6-아지도에톡시-L-라이신(AzK), N6-프로파르길에톡시-L-라이신(PraK), BCN-L-라이신, 노르보르넨 라이신, TCO-라이신, 메틸테트라진 라이신, 알릴옥시카르보닐라이신, 2-아미노-8-옥소노난산, 2-아미노-8-옥소옥탄산, p-아세틸-L-페닐알라닌, p-아지도메틸-L-페닐알라닌(pAMF), p-요오도-L-페닐알라닌, m-아세틸페닐알라닌, 2-아미노-8-옥소노난산, p-프로파르길옥시페닐알라닌, p-프로파르길-페닐알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, L-도파, 플루오르화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, p-브로모페닐알라닌, p-아미노-L-페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, O-알릴티로신, O-메틸-L-티로신, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 포스포노티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcp-세린, L-포스포세린, 포스포노세린, L-3-(2-나프틸)알라닌, 2-아미노-3-((2-((3-(벤질옥시)-3-옥소프로필)아미노)에틸)셀라닐)프로판산, 2-아미노-3-(페닐셀라닐)프로판산 또는 셀레노시스테인. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산은 오르소고날 tRNA 합성 효소/tRNA 쌍에 의해 변형된 IL-2 폴리펩티드 내에 통합된다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소/tRNA 쌍의 오르소고날 tRNA는 적어도 하나의 비천연 핵염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 적어도 하나의 비천연 아미노산을 통해 접합 모이어티에 공유 부착된다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 수용성 중합체, 지질, 단백질 또는 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(프로필렌 글리콜)(PPG), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀계 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드),

폴리(α-히드록시산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린(POZ), 폴리(N-아크릴로일모르폴린) 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 PEG 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, PEG 분자는 선형 PEG이다. 일부 실시양태에서, PEG 분자는 분지형 PEG이다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리사카라이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리사카라이드는 덱스트란, 폴리시알산(PSA), 히알루론산(HA), 아밀로스, 헤파린, 헤파란 술페이트(HS), 덱스트린 또는 히드록시에틸-전분(HES)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 지질은 지방산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 지방산은 약 6 내지 약 26개의 탄소 원자, 약 6 내지 약 24개의 탄소 원자, 약 6 내지 약 22개의 탄소 원자, 약 6 내지 약 20개의 탄소 원자, 약 6 내지 약 18개의 탄소 원자, 약 20 내지 약 26개의 탄소 원자, 약 12 내지 약 26개의 탄소 원자, 약 12 내지 약 24개의 탄소 원자, 약 12 내지 약 22개의 탄소 원자, 약 12 내지 약 20개의 탄소 원자, 또는 약 12 내지 약 18개의 탄소 원자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 지방산은 포화 지방산이다. 일부 실시양태에서, 단백질은 알부민, 트랜스페린 또는 트랜스티레틴을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단백질은 항체 또는 이의 결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 항체의 Fc 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 XTEN 펩티드, 글리신 풍부 호모아미노산 중합체(HAP), PAS 폴리펩티드, 엘라스틴 유사 폴리펩티드(ELP), CTP 펩티드 또는 젤라틴 유사 단백질(GLK) 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 링커를 통해 변형된 IL-2의 적어도 하나의 비천연 아미노산에 간접적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 링커는 동종이기능성 링커, 이종이기능성 링커, 제로 길이 링커, 절단가능한 또는 절단가능하지 않은 디펩티드 링커, 말레이미드 기, 스페이서 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2Rβγ에 대한 결합의 감소는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과의 감소이다. 일부 실시양태에서, IL-2Rβγ에 대한 결합의 감소는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 30배, 50배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 1000배, 또는 그 초과이다. 일부 실시양태에서, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과의 감소이다. 일부 실시양태에서, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 30배, 50배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 1000배, 또는 그 초과이다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 전장 IL-2 폴리펩티드의 기능적으로 활성인 단편; 재조합 IL-2 폴리펩티드; 또는 재조합 인간 IL-2 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 N-말단 결실, C-말단 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, N-말단 결실은 N-말단으로부터 처음 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25 또는 30 개 잔기의 결실을 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 실시양태에서, C-말단 결실은 C-말단으로부터 마지막 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 개 또는 그 초과의 잔기의 결실을 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 실시양태에서, 기능적으로 활성인 단편은 IL-2 영역 10-133, 20-133, 30-133, 10-130, 20-130, 30-130, 10-125, 20-125, 30-125, 1-130 또는 1-125를 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 서열 번호 1에 대해 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2Rβγ에 대한 결합 친화도가 감소된 변형된 IL-2 폴리펩티드는 CD4+ T 조절(Treg) 세포를 확장시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 IL-2의 IL-2Rβγ에 대한 결합을 손상시키거나 차단하거나, 또는 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rγ 서브유닛의 동원을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2/IL-2Rαβγ 복합체에 의한 CD4+ Treg 세포 증식은 야생형 IL-2 폴리펩티드와 동등하거나 이보다 더 크다.

[0011] 특정 실시양태에서, 단리 및 정제된 인터루킨 2(IL-2) 폴리펩티드; 및 P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택되는 아미노산 잔기에서 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드에 결합하는 접합 모이어티를 포함하는 IL-2 접합체가 본원에서 개시되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99,

E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, 및 T113으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산의 위치는 K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95, 및 Q126으로부터 선택되고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치는 K8, K9, 및 H16으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치는 Q22, N26, N88, 및 Q126으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치는 E15, D20, D84, 및 E95로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치는 L12, L19, M23, 및 F78로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치는 Q22 및 N26으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치는 Q22이다. 일부 실시양태에서, 아미노산 위치는 N26이다. 일부 실시양태에서, K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, F78, D84, N88, E95, 및 Q126으로부터 선택되는 아미노산 잔기는 라이신, 시스테인 또는 히스티딘으로 추가로 돌연변이된다. 일부 실시양태에서, 아미노산 잔기는 시스테인으로 돌연변이된다. 일부 실시양태에서, 아미노산 잔기는 라이신으로 돌연변이된다. 일부 실시양태에서, K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, F78, D84, N88, E95, 및 Q126으로부터 선택되는 아미노산 잔기는 비천연 아미노산으로 추가로 돌연변이된다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 다음을 포함한다: p-아세틸-L-페닐알라닌, p-아지도메틸-L-페닐알라닌(pAMF), p-요오도-L-페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, p-프로파르길옥시페닐알라닌, p-프로파르길-페닐알라닌, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcp-세린, L-도파, 플루오르화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, p-브로모페닐알라닌, p-아미노-L-페닐알라닌, 또는 이소프로필-L-페닐알라닌. 일부 실시양태에서, 추가의 돌연변이된 아미노산 잔기는 추가의 접합 모이어티에 결합한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 IL-2 수용체 β(IL-2Rβ) 서브유닛, IL-2 수용체 γ(IL-2Rγ) 서브유닛, 또는 이들의 조합에 대한 친화도가 감소된다. 일부 실시양태에서, 친화도 감소는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 IL-2Rβ, IL-2Rγ, 또는 이들의 조합에 대한 결합 친화도의 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50% 또는 60%의 감소이다. 일부 실시양태에서, 친화도 감소는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 또는 그 초과의 감소이다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 IL-2와 IL-2Rβ, IL-2Rγ 또는 이들의 조합의 결합을 손상시키거나 차단한다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 형성된 IL-2/IL-2Rβ 사슬 복합체에 대한 IL-Rγ 사슬의 동원을 하향 조절한다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 IL-2 수용체의 α, β 및 γ 사슬에 대한 그의 친화도에 영향을 주지 않으면서 폴리펩티드의 전신 반감기를 연장한다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 수용성 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가의 접합 모이어티는 수용성 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 수용성 중합체는 독립적으로 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(프로필렌 글리콜(PPG), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀계 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α-히드록시산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린(POZ), 폴리(N-아크릴로일모르폴린) 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 수용성 중합체는 독립적으로 PEG를 포함한다. 일부 실시양태에서, PEG는 선형 PEG 또는 분지형 PEG이다. 일부 실시양태에서, 각각의 수용성 중합체는 독립적으로 폴리사카라이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리사카라이드는 덱스트란, 폴리시알산(PSA), 히알루론산(HA), 아밀로스, 헤파린, 헤파란 술페이트(HS), 덱스트린 또는 히드록시에틸-전분(HES)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 수용성 중합체는 독립적으로 글리칸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 수용성 중합체는 독립적으로 폴리아민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가의 접합 모이어티는 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 단백질은 독립적으로 알부민, 트랜스페린 또는 트랜스티레틴을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 단백질은 독립적으로 Fc 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 단백질은 독립적으로 IgG의 Fc 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가의 접합 모이어티는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 폴리펩티드는 독립적으로 XTEN 펩티드, 글리신 풍부 호모아미노산 중합체(HAP), PAS 폴리펩티드, 엘라스틴 유사 폴리펩티드(ELP), CTP 펩티드 또는 젤라틴 유사 단백질(GLK)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드는 글루타밀화에 의해 변형된다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드에 직접 결합된다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 링커를 통해 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드에 간접적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 링커는 동종이기능성 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 동종이기능성 링커는 다음을 포함한다: 로만트(Lomant) 시약 디티오비스(숙신이미딜 프로피오네이트) DSP, 3'3'-디티오비스(술포숙신이미딜 프로피오네이트)(DTSSP), 디숙신이미딜 수베레이트(DSS), 비스(술포숙신이미딜)수베레이트(BS), 디숙신이미딜 타르트레이트(DST), 디술포숙신이미딜 타르트레이트(술포 DST), 에틸렌 글리코비스(숙신이미딜숙시네이트)(EGS), 디숙신이미딜 글루타레이트(DSG), N,N'-디숙신이미딜 카

르보네이트(DSC), 디메틸 아디피미데이트(DMA), 디메틸 피멜리미데이트(DMP), 디메틸 수베리미데이트(DMS), 디메틸-3,3'-디티오비스프로피온이미데이트(DTBP), 1,4-디-(3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미도)부탄(DPDPB), 비스말레이미도헥산(BMH), 아릴 할라이드 함유 화합물(DFDNB), 예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠 또는 1,3-디플루오로-4,6-디니트로벤젠, 4,4'-디플루오로-3,3'-디니트로페닐술폰(DFDNPS), 비스-[β-(4-아지도살리실아미도)에틸]디술파이드(BASED), 포름알데히드, 글루타르알데히드, 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르, 아디프산 디히드라지드, 카르보히드라지드, o-톨루이딘, 3,3'-디메틸벤지딘, 벤지딘, α,α'-p-디아미노디페닐, 디요오도-p-크실렌 술폰산, N,N'-에틸렌-비스(요오도아세트아미드) 또는 N,N'-헥사메틸렌-비스(요오도아세트아미드). 일부 실시양태에서, 링커는 이종이기능성 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이종이기능성 링커는 다음을 포함한다: N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(sPDP), 장쇄 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(LC-sPDP), 수용성 장쇄 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(술포-LC-sPDP), 숙신이미딜옥시카르보닐-α-메틸-α-(2-피리딜디티오)톨루엔(sMPT), 술포숙신이미딜-6-[α-메틸-α-(2-피리딜디티오)톨루아미도]헥사노에이트(술포-LC-sMPT), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(sMCC), 술포숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(술포-sMCC), m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르(MB), m-말레이미도벤조일-N-히드록시술포숙신이미드 에스테르(술포-MB), N-숙신이미딜(4-요오도아세틸)아미노벤조에이트(sIAB), 술포숙신이미딜(4-요오도아세틸)아미노벤조에이트(술포-sIAB), 숙신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트(sMPB), 술포숙신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트(술포-sMPB), N-(γ-말레이미도부티릴옥시)숙신이미드 에스테르(GMB), N-(γ-말레이미도부티릴옥시)술포숙신이미드 에스테르(술포-GMB), 숙신이미딜 6-((요오도아세틸)아미노)헥사노에이트(sIAX), 숙신이미딜 6-[6-(((요오도아세틸)아미노)헥사노일)아미노]헥사노에이트(sIAXX), 숙신이미딜 4-(((요오도아세틸)아미노)메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(sIAC), 숙신이미딜 6-((((((4-요오도아세틸)아미노)메틸)시클로헥산-1-카르보닐)아미노)헥사노에이트(sIACX), p-니트로페닐 요오도아세테이트(NPIA), 카르보닐 반응성 및 술프히드릴 반응성 가교결합제, 예컨대 4-(4-N-말레이미도페닐)부티르산 히드라지드(MPBH), 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실-히드라지드-8(M_2C_2H), 3-(2-피리딜디티오)프로피오닐 히드라지드(PDPH), N-히드록시숙신이미딜-4-아지도살리실산(NHs-AsA), N-히드록시술포숙신이미딜-4-아지도살리실산(술포-NHs-AsA), 술포숙신이미딜-(4-아지도살리실아미도)헥사노에이트(술포-NHs-LC-AsA), 술포숙신이미딜-2-(p-아지도살리실아미도)에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(sAsD), N-히드록시숙신이미딜-4-아지도벤조에이트(HsAB), N-히드록시술포숙신이미딜-4-아지도벤조에이트(술포-HsAB), N-숙신이미딜-6-(4'-아지도-2'-니트로페닐아미노)헥사노에이트(sANPAH), 술포숙신이미딜-6-(4'-아지도-2'-니트로페닐아미노)헥사노에이트(술포-sANPAH), N-5-아지도-2-니트로벤조일옥시숙신이미드(ANB-NOs), 술포숙신이미딜-2-(m-아지도-o-니트로벤즈아미도)-에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(sAND), N-숙신이미딜-4(4-아지도페닐)1,3'-디티오프로피오네이트(sADP), N-술포숙신이미딜(4-아지도페닐)-1,3'-디티오프로피오네이트(술포-sADP), 술포숙신이미딜 4-(p-아지도페닐)부티레이트(술포-sAPB), 술포숙신이미딜 2-(7-아지도-4-메틸쿠마린-3-아세트아미드)에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(sAED), 술포숙신이미딜 7-아지도-4-메틸쿠마인-3-아세테이트(술포-sAMCA), p-니트로페닐 디아조피루베이트(pNPDP), p-니트로페닐-2-디아조-3,3,3-트리플루오로프로피오네이트(PNP-DTP), 1-(p-아지도살리실아미도)-4-(요오도아세트아미도)부탄(AsIB), N-[4-(p-아지도살리실아미도)부틸]-3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미드(APDP), 벤조페논-4-요오도아세트아미드, p-아지도벤조일 히드라지드(ABH), 4-(p-아지도살리실아미도)부틸아민(AsBA), 또는 p-아지도페닐 글리옥살(APG). 일부 실시양태에서, 링커는 선택적으로 디펩티드 링커를 포함하는 절단가능한 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 디펩티드 링커는 Val-Cit, Phe-Lys, Val-Ala 또는 Val-Lys를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 절단가능하지 않은 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 선택적으로 말레이미도카프로일(mc), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(sMCC), 또는 술포숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(술포-sMCC)를 포함하는 말레이미드 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 스페이서를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 p-아미노벤질 알코올(PAB), p-아미노벤질옥시카르보닐(PABC), 이의 유도체 또는 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 IL-2 접합체의 혈청 반감기를 연장시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가의 접합 모이어티는 IL-2 접합체의 혈청 반감기를 연장시킬 수 있다.

[0012] 본원의 특정 실시양태에서, 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드; 및 접합 모이어티를 포함하는 인터루킨 2(IL-2) 접합체가 개시되고; 여기서 IL-2 접합체는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 IL-2 수용체 β(IL-2Rβ) 서브유닛, IL-2 수용체 γ(IL-2Rγ) 서브유닛 또는 이들의 조합에 대한 친화도가 감소된다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 IL-2Rβ 또는 IL-2Rγ와 상호작용하는 아미노산 잔기에 결합된다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택되는 아미노산 잔기에 결

합되며, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 수용성 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가의 접합 모이어티는 수용성 중합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 수용성 중합체는 독립적으로 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리(프로필렌 글리콜(PPG), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜의 공중합체, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀계 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α-히드록시산), 폴리(비닐 알코올), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린(POZ), 폴리(N-아크릴로일모르폴린) 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 수용성 중합체는 독립적으로 PEG를 포함한다. 일부 실시양태에서, PEG는 선형 PEG 또는 분지형 PEG이다. 일부 실시양태에서, 각각의 수용성 중합체는 독립적으로 폴리사카라이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리사카라이드는 덱스트란, 폴리시알산(PSA), 히알루론산(HA), 아밀로스, 헤파린, 헤파란 술페이트(HS), 덱스트린 또는 히드록시에틸-전분(HES)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 수용성 중합체는 독립적으로 글리칸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 수용성 중합체는 독립적으로 폴리아민을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가의 접합 모이어티는 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 단백질은 독립적으로 알부민, 트랜스페린 또는 트랜스티레틴을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 단백질은 독립적으로 Fc 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 단백질은 독립적으로 IgG의 Fc 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 추가의 접합 모이어티는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 각각의 폴리펩티드는 독립적으로 XTEN 펩티드, 글리신 풍부 호모아미노산 중합체(HAP), PAS 폴리펩티드, 엘라스틴 유사 폴리펩티드(ELP), CTP 펩티드 또는 젤라틴 유사 단백질(GLK)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드는 글루타밀화에 의해 변형된다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드에 직접 결합된다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 링커를 통해 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드에 간접적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 링커는 동종이기능성 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 동종이기능성 링커는 다음을 포함한다: 로만트 시약 디티오비스(숙신이미딜 프로피오네이트) DSP, 3'3'-디티오비스(술포숙신이미딜 프로피오네이트)(DTSSP), 디숙신이미딜 수베레이트(DSS), 비스(술포숙신이미딜)수베레이트(BS), 디숙신이미딜 타르트레이트(DST), 디술포숙신이미딜 타르트레이트(술포 DST), 에틸렌 글리코비스(숙신이미딜숙시네이트)(EGS), 디숙신이미딜 글루타레이트(DSG), N,N'-디숙신이미딜 카르보네이트(DSC), 디메틸 아디피미데이트(DMA), 디메틸 피멜리미데이트(DMP), 디메틸 수베리미데이트(DMS), 디메틸-3,3'-디티오비스프로피온이미데이트(DTBP), 1,4-디-(3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미도)부탄(DPDPB), 비스말레이미도헥산(BMH), 아릴 할라이드 함유 화합물(DFDNB), 예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠 또는 1,3-디플루오로-4,6-디니트로벤젠, 4,4'-디플루오로-3,3'-디니트로페닐술폰(DFDNPS), 비스-[β-(4-아지도살리실아미도)에틸]디술파이드(BASED), 포름알데히드, 글루타르알데히드, 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르, 아디프산 디히드라지드, 카르보히드라지드, o-톨루이딘, 3,3'-디메틸벤지딘, 벤지딘, α,α'-p-디아미노디페닐, 디요오도-p-크실렌 술폰산, N,N'-에틸렌-비스(요오도아세트아미드) 또는 N,N'-헥사메틸렌-비스(요오도아세트아미드). 일부 실시양태에서, 링커는 이종이기능성 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이종이기능성 링커는 다음을 포함한다: N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(sPDP), 장쇄 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(LC-sPDP), 수용성 장쇄 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(술포-LC-sPDP), 숙신이미딜옥시카르보닐-α-메틸-α-(2-피리딜디티오)톨루엔(sMPT), 술포숙신이미딜-6-[α-메틸-α-(2-피리딜디티오)톨루아미도]헥사노에이트(술포-LC-sMPT), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(sMCC), 술포숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(술포-sMCC), m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르(MB), m-말레이미도벤조일-N-히드록시술포숙신이미드 에스테르(술포-MB), N-숙신이미딜(4-요오도아세틸)아미노벤조에이트(sIAB), 술포숙신이미딜(4-요오도아세틸)아미노벤조에이트(술포-sIAB), 숙신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트(sMPB), 술포숙신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트(술포-sMPB), N-(γ-말레이미도부티릴옥시)숙신이미드 에스테르(GMB), N-(γ-말레이미도부티릴옥시)술포숙신이미드 에스테르(술포-GMB), 숙신이미딜 6-((요오도아세틸)아미노)헥사노에이트(sIAX), 숙신이미딜 6-[6-(((요오도아세틸)아미노)헥사노일)아미노]헥사노에이트(sIAXX), 숙신이미딜 4-(((요오도아세틸)아미노)메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(sIAC), 숙신이미딜 6-((((((4-요오도아세틸)아미노)메틸)시클로헥산-1-카르보닐)아미노)헥사노에이트(sIACX), p-니트로페닐 요오도아세테이트(NPIA), 카르보닐 반응성 및 술프히드릴 반응성 가교결합제, 예컨대 4-(4-N-말레이미도페닐)부티르산 히드라지드(MPBH), 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실-히드라지드-8(M_2C_2H), 3-(2-피리딜디티오)프로피오닐 히드라지드(PDPH), N-히드록시숙신이미딜-4-아지도살리실산(NHs-AsA), N-히드록시술포숙신이미딜-4-아지도살리실산(술포-NHs-AsA), 술포숙신이미딜-(4-아지도살리실아미도)헥사노에이트(술포-NHs-LC-AsA), 술포숙신이미딜-2-(p-아지도살리실아미도)에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(sAsD), N-히드록시숙신이미딜-4-아지도벤조에이트(HsAB), N-히드록시술포숙신이미딜-4-아지도벤조에이트(술포-HsAB), N-숙신이미딜-6-(4'-아지도-2'-니트로페닐아미노)헥사노에이트(sANPAH), 술포

숙신이미딜-6-(4'-아지도-2'-니트로페닐아미노)헥사노에이트(술포-sANPAH), N-5-아지도-2-니트로벤조일옥시숙신이미드(ANB-NOs), 술포숙신이미딜-2-(m-아지도-o-니트로벤즈아미도)-에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(sAND), N-숙신이미딜-4(4-아지도페닐)1,3'-디티오프로피오네이트(sADP), N-술포숙신이미딜(4-아지도페닐)-1,3'-디티오프로피오네이트(술포-sADP), 술포숙신이미딜 4-(p-아지도페닐)부티레이트(술포-sAPB), 술포숙신이미딜 2-(7-아지도-4-메틸쿠마린-3-아세트아미드)에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(sAED), 술포숙신이미딜 7-아지도-4-메틸쿠마인-3-아세테이트(술포-sAMCA), p-니트로페닐 디아조피루베이트(pNPDP), p-니트로페닐-2-디아조-3,3,3-트리플루오로프로피오네이트(PNP-DTP), 1-(p-아지도살리실아미도)-4-(요오도아세트아미도)부탄(AsIB), N-[4-(p-아지도살리실아미도)부틸]-3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미드(APDP), 벤조페논-4-요오도아세트아미드, p-아지도벤조일히드라지드(ABH), 4-(p-아지도살리실아미도)부틸아민(AsBA), 또는 p-아지도페닐 글리옥살(APG). 일부 실시양태에서, 링커는 선택적으로 디펩티드 링커를 포함하는 절단가능한 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 디펩티드 링커는 Val-Cit, Phe-Lys, Val-Ala 또는 Val-Lys를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 절단가능하지 않은 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 선택적으로 말레이미도카프로일(mc), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(sMCC), 또는 술포숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(술포-sMCC)를 포함하는 말레이미드 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 스페이서를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 p-아미노벤질 알코올(PAB), p-아미노벤질옥시카르보닐(PABC), 이의 유도체 또는 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 IL-2 접합체의 혈청 반감기를 연장시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 추가의 접합 모이어티는 IL-2 접합체의 혈청 반감기를 연장시킬 수 있다.

[0013] 특정 실시양태에서, 상기 설명된 IL-2 접합체; 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학 조성물이 본원에서 개시된다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 비경구 투여용으로 제제화된다.

[0014] 특정 실시양태에서, 그 치료를 필요로 하는 피험체에서 자가면역 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 본원에서 개시되고, 이 방법은 피험체에게 상기 설명된 IL-2 접합체의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 자가면역 질환 또는 장애는 원형탈모증, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 피부근염, 1형 당뇨병, 소아 특발성 관절염, 사구체신염, 그레이브스(Graves) 병, 길랑-바레(Guillain-Barre) 증후군, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 중증 근무력증, 다발성 경화증, 수포창/유사천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발성 동맥염, 다발성 근염, 원발성 담즙성 경화증, 건선, 류마티스 관절염, 피부경화증, 쇼그렌(Sjoegren) 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 갑상선염, 포도막염, 백반증 또는 베거너(Wegener) 육아종증을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 추가의 치료제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체 및 추가의 치료제는 동시에 투여된다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체 및 추가의 치료제는 순차적으로 투여된다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 추가의 치료제 투여 전에 투여된다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 추가의 치료제 투여 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, 피험체는 인간이다.

[0015] 특정 실시양태에서, 조절 T(Treg) 세포 집단을 확장시키는 방법이 본원에서 개시되고, 상기 방법은 (a) 세포를 상기 설명된 IL-2 접합체와 접촉시키는 단계; 및 (b) IL-2 접합체를 IL-2Rα, IL-2Rβ 및 IL-2Rγ 서브유닛과 상호작용시켜 IL-2/IL-2Rαβγ 복합체를 형성하는 단계를 포함하고; 여기서 IL-2 접합체는 IL-2Rβ 및/또는 IL-2Rγ 서브유닛에 대한 감소된 친화도를 갖거나 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rγ 서브유닛의 동원을 하향 조절하거나 α, β 및 γ 수용체 서브유닛에 대해 IL-2와 유사한 효능을 보유하지만, 그의 반감기를 연장하고, IL-2/IL-2Rαβγ 복합체는 천연 IL-2와 유사하게 또는 이보다 더 강력하게 Treg 세포의 확장을 자극한다.

[0016] 특정 실시양태에서, 상기 설명된 IL-2 접합체를 포함하는 키트; 또는 상기 설명된 IL-2 접합체를 포함하는 약학 조성물이 본원에서 개시된다. 일부 실시양태에서, 또한 상기 설명된 IL-2 폴리펩티드를 코딩하는 다중 핵산 분자를 포함하는 키트가 본원에서 설명된다.

도면의 간단한 설명

[0017] 본 발명의 신규한 특징은 특히 첨부된 청구 범위에 제시되어 있다. 본 발명의 특징 및 이점에 대한 더 나은 이해는 본 발명의 원리가 이용되는 예시적인 실시양태를 제시하는 하기의 상세한 설명 및 첨부 도면을 참조하여 얻을 수 있다:

도 1은 예시적인 비천연 아미노산을 도시한 것이다. 이 도면은 문헌 [Young *et al.*, "Beyond the canonical 20 amino acids: expanding the genetic lexicon," *J. of Biological Chemistry* 285(15): 11039-11044 (2010)]의 도 2로부터 도입된 것이다.

도 2a-도 2b는 예시적인 비천연 아미노산을 제시한 것이다. 도 2a는 예시적인 라이신 유도체를 제시한 것이다.

도 2b는 예시적인 페닐알라닌 유도체를 제시한 것이다.

도 3a-도 3d는 예시적인 비천연 아미노산을 제시한 것이다. 이러한 비천연 아미노산(UAA)은 단백질에서 유전자로 코딩되었다(도 3a - UAA # 1-42; 도 3b - UAA # 43-89; 도 3c - UAA # 90-128; 도 3d - UAA # 129-167). 도 3a-3d는 문헌 [Dumas *et al.*, *Chemical Science* 2015, **6**, 50-69]의 표 1로부터 도입된 것이다.

도 4a-도 4b는 인간 LRS 1차 세포 집단에서 pSTAT5 신호전달에 대한 예시적인 IL-2 변이체 용량 반응 곡선(도 4a) 및 마우스 CTLL-2 집단에서의 증식 반응(도 4b)을 보여준다.

도 5는 2개의 상이한 농도에서의 예시적인 IL-2 분자 K35_30kD의 향상된 PK 프로파일을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 사이토카인은 케모카인, 인터페론, 인터루킨, 림포카인, 종양 괴사 인자, 및 선천 및 적응 면역 세포 항상성에서 역할을 하는 다른 성장 인자와 같은 세포 신호전달 단백질 패밀리를 포함한다. 사이토카인은 대식세포, B 림프구, T 림프구 및 비만 세포, 내피 세포, 섬유모세포 및 상이한 기질 세포와 같은 면역 세포에 의해 생성된다. 일부 경우에, 사이토카인은 체액성 및 세포 기반 면역 반응 사이의 균형을 조절한다.

[0019] 인터루킨은 T 및 B 림프구, 단핵구 계통의 세포, 호중구, 호염기구, 호산구, 거핵구 및 조혈 세포의 발생 및 분화를 조절하는 신호전달 단백질이다. 인터루킨은 헬퍼 CD4 T 및 B 림프구, 단핵구, 대식세포, 내피 세포 및 다른 조직 내 세포에 의해 생성된다. 일부 경우에, 약 15개의 인터루킨, 즉 인터루킨 1-13, 인터루킨 15 및 인터루킨 17이 존재한다.

[0020] 인터루킨 2(IL-2)는 이의 구조가 15.5 kDa의 4개의 α-나선 다발을 포함하는 다면발현성(pleiotropic) 타입-1 사이토카인이다. IL-2의 전구체 형태는 길이가 153개의 아미노산 잔기이며, 처음 20개의 아미노산은 신호 펩티드를 형성하고 잔기 21-153은 성숙한 형태를 형성한다. IL-2는 주로 항원 자극 후 CD4+ T 세포에 의해 생성되고, CD8+ 세포, 자연 살해(NK) 세포 및 NK T(NKT) 세포, 활성화된 수지상 세포(DC) 및 비만 세포에 의해 보다 약한 정도로 생성된다. IL-2 신호전달은 IL-2 수용체(IL-2R) 서브유닛, 즉 IL-2Rα(CD25로도 알려짐), IL-2Rβ(CD122로도 알려짐) 및 IL-2Rγ(CD132로도 알려짐)의 특정 조합과의 상호작용을 통해 발생한다. IL-2와 IL-2Rα와의 상호작용은 "저친화도" IL-2 수용체 복합체를 약 10^{-8} M의 K_d로 형성한다. IL-2와 IL-2Rβ 및 IL-2Rγ와의 상호작용은 "중간 친화도" IL-2 수용체 복합체를 약 10^{-9} M의 K_d로 형성한다. IL-2와 3개의 모든 서브유닛, 즉 IL-2Rα, IL-2Rβ 및 IL-2Rγ와의 상호작용은 "고친화도" IL-2 수용체 복합체를 약 $>10^{-11}$ M의 K_d로 형성한다.

[0021] 일부 경우에, "고친화도" IL-2Rαβγ 복합체를 통한 IL-2 신호전달은 조절 T 세포의 활성화 및 증식을 조절한다. 조절 T 세포 또는 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 조절 T(Treg) 세포는 이펙터 세포, 예컨대 $CD8^+$ T 세포, 헬퍼 세포, 예컨대 $CD4^+$ Th1, Th2 및 Th17 세포, B 세포, NK 세포 및 NK T 세포의 억제에 의한 면역 항상성의 유지를 매개한다. 일부 경우에, Treg 세포는 흉선(tTreg 세포)으로부터 생성되거나, 말초의 나이브 T 세포(pTreg 세포)로부터 유도된다. 일부 경우에, Treg 세포는 말초 내성의 매개체로 간주된다. 실제로, 한 연구에서, CD25- 고갈된 말초 $CD4^+$ T 세포의 이동은 누드 마우스에서 다양한 자가면역 질환을 생성하는 반면, $CD4^+CD25^+$ T 세포의 공동 전달은 자가면역의 발생을 억제하였다(Sakaguchi, *et al.*, "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25)," *J. Immunol.* 155(3): 1151-1164 (1995)). Treg 세포 집단의 증가는 이펙터 T 세포 증식을 하향 조절하고, 자가면역 및 T 세포 항종양 반응을 억제한다.

[0022] 특정 실시양태에서, 사이토카인/사이토카인 수용체 신호전달을 통해 림프구(예를 들어, 조절 T 세포)의 별개의 집단(들)을 선택적으로 상향 조절하는 방법이 본원에서 개시된다. 일부 경우에, 사이토카인은 인터루킨을 포함한다. 일부 경우에, 사이토카인은 사이토카인 접합체, 예를 들어 인터루킨 접합체, 인터페론 접합체 또는 종양 괴사 인자 접합체이다. 추가의 경우에, 본원에서 설명되는 하나 이상의 사이토카인 접합체를 포함하는 약학 조성물 및 키트가 본원에서 설명된다.

[0023] 일부 실시양태에서, IL-2/IL-2R 신호전달을 통해 Treg 집단을 선택적으로 상향 조절하는 방법이 본원에서 설명된다. 일부 경우에, IL-2는 야생형 IL-2에 비해 IL-2Rαβγ 복합체 내에서 약화된 IL-2Rβ 및 IL-2Rγ 상호작용을 갖거나 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rγ 서브유닛의 동원을 하향 조절하거나, α, β 및 γ 수용체 서

브유닛에 대해 IL-2와 유사한 효능을 보유하지만, 그의 반감기를 연장하는 IL-2 접합체이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 IL-2 접합체를 사용하여 자가면역 질환을 치료하는 방법이 본원에서 추가로 설명된다. 추가의 실시양태에서, 본원에서 설명되는 하나 이상의 IL-2 접합체를 포함하는 약학 조성물 및 키트가 본원에서 설명된다.

[0024] **사이토카인 접합체**

[0025] 일부 실시양태에서, 사이토카인 접합체가 본원에서 설명된다. 일부 경우에, 사이토카인은 인터루킨, 종양 괴사 인자, 인터페론, 케모카인, 또는 림포카인을 포함한다. 일부 경우에, 사이토카인은 인터루킨이다. 일부 경우에, 사이토카인은 인터페론이다. 추가의 경우에, 사이토카인은 종양 괴사 인자이다.

[0026] 일부 실시양태에서, 인터루킨 접합체가 본원에서 설명된다. 예시적인 인터루킨은 인터루킨 1β(IL-1β), 인터루킨 2(IL-2), 인터루킨 7(IL-7), 인터루킨 10(IL-10), 인터루킨 12(IL-12), 인터루킨 15(IL-15), 인터루킨 18(IL-18) 및 인터루킨 21(IL-21)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 일부 경우에, 인터루킨이 IL-1β, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18 및 IL-21로부터 선택되는 인터루킨 접합체가 본원에서 설명된다.

[0027] *IL-2 접합체*

[0028] 일부 실시양태에서, 일정 아미노산 위치에서 변형된 IL-2 접합체가 본원에서 설명된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드이다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 포유동물 IL-2, 예를 들어 설치류 IL-2 단백질 또는 인간 IL-2 단백질이다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 인간 IL-2 단백질이다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 서열 번호 1에 대해 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 서열 번호 1의 서열을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 서열 번호 1의 서열로 이루어진다. 추가의 경우에, IL-2 폴리펩티드는 서열 번호 2에 대해 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 서열 번호 2의 서열을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 서열 번호 2의 서열로 이루어진다.

[0029] 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 말단 절단된 변이체이다. 일부 경우에, 말단 절단은 N-말단 결실이다. 다른 경우에, 말단 절단은 C-말단 결실이다. 추가의 예에서, 말단 절단은 N-말단 및 C-말단 결실 둘 모두를 포함한다. 예를 들어, 말단 절단은 N-말단 또는 C-말단 또는 둘 모두로부터 적어도 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 개 또는 그 초과의 잔기의 결실일 수 있다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 적어도 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20 개 또는 그 초과의 잔기의 N-말단 결실을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 적어도 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 잔기의 N-말단 결실을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 적어도 또는 약 2개의 잔기의 N-말단 결실을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 적어도 또는 약 3개의 잔기의 N-말단 결실을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 적어도 또는 약 4개의 잔기의 N-말단 결실을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 적어도 또는 약 5개의 잔기의 N-말단 결실을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 적어도 또는 약 6개의 잔기의 N-말단 결실을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 적어도 또는 약 7개의 잔기의 N-말단 결실을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 적어도 또는 약 8개의 잔기의 N-말단 결실을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 적어도 또는 약 9개 잔기의 N-말단 결실을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 적어도 또는 약 10개의 잔기의 N-말단 결실을 포함한다.

[0030] 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩티드는 기능적으로 활성인 단편이다. 일부 경우에, 기능적으로 활성인 단편은 IL-2 영역 10-133, 20-133, 30-133, 10-130, 20-130, 30-130, 10-125, 20-125, 30-125, 1-130, 또는 1-125를 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 경우에, 기능적으로 활성인 단편은 IL-2 영역 10-133을 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 경우에, 기능적으로 활성인 단편은 IL-2 영역 20-133을 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 경우에, 기능적으로 활성인 단편은 IL-2 영역 30-133을 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 경우에, 기능적으로 활성인 단편은 IL-2 영역 10-125을 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 경우에, 기능적으로 활성인 단편은 IL-2 영역 20-125을 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 경우에, 기능적으로 활성인 단편은 IL-2 영역 1-130을 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다. 일부 경우에, 기능적으로 활성인 단편은 IL-2 영역 1-125을 포함하고, 여기서 잔기 위치는 서열 번호 1에서의 위치를 참조한다.

[0031] 일부 실시양태에서, 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드 및 접합 모이어티를 포함하는 본원에서 설명되는 IL-2 접

합체는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 IL-2 수용체 β(IL-2Rβ) 서브유닛, IL-2 수용체 γ(IL-2Rγ) 서브유닛 또는 이들의 조합에 대한 친화도가 감소된다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 감소된 IL-2Rγ 서브유닛 동원을 갖는다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 IL-2Rβ와(예를 들어, IL-2/IL-2Rβ 계면에서), IL-2Rγ와(예를 들어, IL-2/IL-2Rβ 계면에서), 또는 이들의 조합과 상호작용하는 아미노산 잔기에 결합된다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 IL-2/IL-2Rβ 계면, IL-2/IL-2Rβ 계면, 또는 IL-2Rβγ 계면에 근접한 아미노산 잔기에 결합된다. 일부 경우에, 아미노산 잔기는 IL-2/IL-2Rβ 계면, IL-2/IL-2Rβ 계면, 또는 IL-2Rβγ 계면으로부터 약 5Å, 약 10Å, 약 15Å 또는 약 20Å 떨어져 존재한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, IL-2/IL-2Rβ 계면, IL-2/IL-2Rβ 계면, 또는 IL-2Rβγ 계면에 관여하는 IL-2의 잔기는 IL-2Rβ 서브유닛, IL-2Rγ 서브유닛으로부터의 잔기, 또는 IL-2Rβγ 계면의 잔기와 소수성 상호작용, 수소 결합 또는 이온성 상호작용을 형성하는 IL-2 잔기를 포함한다.

[0032] 일부 경우에, 접합 모이어티는 아미노산 위치 P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택되는 아미노산 잔기에 결합하고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, 및 T113으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95, 및 Q126으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 K8, K9, 및 H16으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 Q22, N26, N88, 및 Q126으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 E15, D20, D84, 및 E95로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 L12, L19, 및 M23으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 Q22 및 N26으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 K8이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 K9이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 Q11이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 L12이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 E15이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 H16이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 L18이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 L19이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 D20이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 Q22이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 M23이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 N26이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 R81이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 D84이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 S87이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 N88이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 V91이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 I92이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 L94이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 E95이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 E116이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 N119이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 R120이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 T123이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 A125이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 Q126이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 S127이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 S130이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 T131이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 L132이다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 T133이다.

[0033] 일부 경우에, IL-2 접합체는 추가의 돌연변이를 추가로 포함한다. 이러한 경우, 아미노산은 혈청 반감기, 안정성 또는 이들의 조합의 증가를 위해 추가의 접합 모이어티에 접합된다. 대안적으로, 아미노산은 먼저 천연 아미노산, 예컨대 라이신, 시스테인, 히스티딘, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌 또는 티로신으로 돌연변이되거나; 또는 추가의 접합 모이어티에 결합하기 전에 비천연 아미노산으로 돌연변이된다.

[0034] 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 IL-2Rαβγ 복합체의 IL-2 수용체 β(IL-2Rβ) 서브유닛, IL-2 수용체 γ(IL-2Rγ) 서브유닛 또는 이들의 조합에 대해 감소된 결합 친화도를 갖는다. 일부 경우에, 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 IL-2 수용체 β(IL-2Rβ) 서브유닛, IL-2 수용체 γ(IL-2Rγ) 서브유닛 또는 이들의 조합에 대한 IL-2 접합체의 감소된 친화도는 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 또는 99% 초과이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 10%이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 20%이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 40%이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 50%이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 60%이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 80%이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 90%이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 99%이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 99%보다 크다. 일부 경우에,

감소된 친화도는 약 80%이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 100%이다.

[0035] 일부 실시양태에서, 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 IL-2 수용체 β(IL-2Rβ) 서브유닛, IL-2 수용체 γ(IL-2Rγ) 서브유닛 또는 이들의 조합에 대한 IL-2 접합체의 감소된 결합 친화도는 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 30배, 50배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 1,000배 또는 그 초과이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 1배이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 2배이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 4배이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 5배이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 6배이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 8배이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 10배이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 30배이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 50배이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 100배이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 300배이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 500배이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 약 1000배이다. 일부 경우에, 감소된 친화도는 1,000배 초과이다.

[0036] 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 감소된 IL-2Rγ 서브유닛 동원을 갖는다. 일부 경우에, 감소된 동원은 비천연 아미노산이 없는 동등한 IL-2 폴리펩티드(예를 들어, 야생형 IL-2 폴리펩티드)에 의한 IL-2Rγ 서브유닛 동원과 비교된다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 비천연 아미노산 변형이 없는 동등한 IL-2 폴리펩티드에 비해 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 99% 초과이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 10%이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 20%이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 40%이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 50%이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 60%이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 70%이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 80%이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 90%이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 99%이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 99% 초과이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 100%이다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 추가로 IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가를 갖는다.

[0037] 일부 실시양태에서, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 비천연 아미노산 변형이 없는 동등한 IL-2 폴리펩티드(예를 들어, 야생형 IL-2 폴리펩티드)에 비해 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 30배, 50배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 1,000배 또는 그 초과이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 1배이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 2배이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 4배이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 5배이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 6배이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 8배이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 10배이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 30배이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 50배이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 100배이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 300배이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 500배이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 1000배이다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소는 약 1000배 초과이다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 추가로 IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가를 갖는다.

[0038] 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 IL-2 폴리펩티드에 대한 IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가를 갖는다. 일부 경우에, 감소된 동원은 비천연 아미노산이 없는 동등한 IL-2 폴리펩티드(예를 들어, 야생형 IL-2 폴리펩티드)에 의한 IL-2Rα 서브유닛 동원과 비교된다. 일부 경우에, IL-2Rγ 서브유닛 동원의 증가는 비천연 아미노산 변형이 없는 동등한 IL-2 폴리펩티드에 비해 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 99% 초과이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 10%이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 20%이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 40%이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 50%이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 60%이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 70%이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 80%이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 90%이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 99%이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 99% 초과이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 100%이다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 추가로 IL-2Rβ 서브유닛 및/또는 IL-2Rγ 서브유닛 동원의 감소를 갖는다.

[0039] 일부 실시양태에서, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 비천연 아미노산 변형이 없는 동등한 IL-2 폴리펩티드(예를 들어, 야생형 IL-2 폴리펩티드)에 비해 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 30배, 50배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 1,000배 또는 그 초과이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 1배이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 2배이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛

동원의 증가는 약 4배이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 5배이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 6배이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 8배이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 10배이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 30배이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 50배이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 100배이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 300배이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 500배이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 1000배이다. 일부 경우에, IL-2Rα 서브유닛 동원의 증가는 약 1000배 초과이다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 추가로 IL-2Rβ 서브유닛 및/또는 IL-2Rɣ 서브유닛 동원의 감소를 갖는다.

[0040] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 IL-2 폴리펩티드는 IL-2Rβɣ에 대한 수용체 신호전달 효능의 감소를 갖는다. 일부 경우에, IL-2Rβɣ에 대한 수용체 신호전달 효능의 감소는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 30배, 50배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 1,000배 또는 그 초과이다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 약 2배이다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 약 5배이다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 약 10배이다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 약 20배이다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 약 30배이다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 약 40배이다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 약 50배이다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 약 100배이다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 약 200배이다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 약 300배이다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 약 400배이다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 약 500배이다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 약 1000배이다.

[0041] 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능은 EC50 값에 의해 측정된다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 EC50의 증가이다. 일부 경우에, EC50의 증가는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 30배, 50배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 1,000배 또는 그 초과이다.

[0042] 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능은 ED50 값에 의해 측정된다. 일부 경우에, 수용체 신호전달 효능의 감소는 ED50의 증가이다. 일부 경우에, ED50의 증가는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 30배, 50배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 1,000배 또는 그 초과이다.

[0043] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 IL-2 폴리펩티드는 야생형 IL-2 폴리펩티드의 치료 윈도우에 비해 확장된 치료 윈도우를 갖는다. 일부 경우에, 확장된 치료 윈도우는 IL-2 폴리펩티드와 인터루킨 2 수용체 βɣ(IL-2Rβɣ) 사이의 결합의 감소, IL-2Rβɣ에 대한 수용체 신호전달 효능의 감소, IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rɣ 서브유닛의 동원 감소, 또는 IL-2 폴리펩티드에 대한 IL-2Rα 서브유닛의 동원 증가 때문이다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 인터루킨 2αβɣ 수용체(IL-2Rαβɣ)의 손상된 활성화를 갖지 않는다.

[0044] 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 IL-2βɣ 신호전달 복합체에 대한 제1 수용체 신호전달 효능 및 IL-2αβɣ 신호전달 복합체에 대한 제2 수용체 신호전달 효능을 나타내고, 제1 수용체 신호전달 효능과 제2 수용체 신호전달 효능 사이의 차이는 적어도 1배이다. 일부 경우에, 차이는 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 1,000배 또는 그 초과이다. 일부 경우에, 제1 수용체 신호전달 효능은 제2 수용체 신호전달 효능보다 작다. 일부 경우에, 제1 수용체 신호전달 효능은 제2 수용체 신호전달 효능보다 적어도 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 50배, 100배, 500배, 1,000배 더 낮다. 일부 경우에, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 IL-2αβɣ 신호전달 복합체에 대한 제2 수용체 신호전달 효능보다 더 낮은 IL-2βɣ 신호전달 복합체에 대한 수용체 신호전달 효능을 갖는다. 일부 경우에, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 제1 수용체 신호전달 효능은 야생형 IL-2 폴리펩티드의 수용체 신호전달 효능보다 적어도 약 1배 더 낮다. 일부 경우에, 변형된 IL-2 폴리펩티드의 제1 수용체 신호전달 효능은 야생형 IL-2 폴리펩티드의 수용체 신호전달 효능보다 적어도 약 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배, 200배, 또는 500배 더 낮다. 일부 경우에, 제1 수용체 신호전달 효능 및 제2 수용체 신호전달 효능은 둘 모두 야생형 IL-2 폴리펩티드의 각각의 효능보다 더 낮지만, 제1 수용체 신호전달 효능은 제2 수용체 신호전달 효능보다 더 낮다. 일부 경우에, 제1 수용체 신호전달 효능과 제2 수용체 신호전달 효능의 차이는 변형된 IL-2 폴리펩티드에 대한 치료 윈도우를 증가시킨다.

[0045] 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 직접 또는 링커 펩티드를 통해 간접적으로 IL-2 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 연결된다. 일부 경우에, 접합 모이어티(예를 들어, 중합체, 단백질 또는 펩티드)는 IL-2의 N-말단 또는 C-말단에서 IL-2에 유전적으로 융합되고, 직접 또는 링커 펩티드를 통해 간접적으로 연결된다. 일부 경우에,

접합 모이어티는 N-말단 또는 C-말단 아미노산 잔기에 연결된다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 N-말단 또는 C-말단 아미노산 잔기에 결합된 반응성 기에 연결된다.

[0046] 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 18시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 초과 또는 이보다 긴 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간 초과 또는 이보다 긴 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 1시간 초과의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 2시간 초과의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 3시간 초과의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 4시간 초과의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 5시간 초과의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 6시간 초과의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 7시간 초과의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 8시간 초과의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 9시간 초과의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 10시간 초과의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 12시간 초과의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 18시간 초과의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 24시간 초과의 혈장 반감기를 포함한다.

[0047] 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 15시간, 18시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 또는 그 초과의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 15시간, 18시간, 24시간 또는 그 초과의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 1시간의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 2시간의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 3시간의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 4시간의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 5시간의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 6시간의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 7시간의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 8시간의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 9시간의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 10시간의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 12시간의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 18시간의 혈장 반감기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 적어도 24시간의 혈장 반감기를 포함한다.

[0048] 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 약 1시간 내지 약 7일, 약 12시간 내지 약 7일, 약 18시간 내지 약 7일, 약 24시간 내지 약 7일, 약 1시간 내지 약 5일, 약 12시간 내지 약 5일, 약 24시간 내지 약 5일, 약 2일 내지 약 5일, 또는 약 2일 내지 약 3일의 혈장 반감기를 포함한다.

[0049] 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 약 1시간 내지 약 18시간, 약 1시간 내지 약 12시간, 약 2시간 내지 약 10시간, 약 2시간 내지 약 8시간, 약 4시간 내지 약 18시간, 약 4시간 내지 약 12시간, 약 4시간 내지 약 10시간, 약 4시간 내지 약 8시간, 약 6시간 내지 약 18시간, 약 6시간 내지 약 12시간, 약 6시간 내지 약 10시간, 약 6시간 내지 약 8시간, 약 8시간 내지 약 18시간, 약 8시간 내지 약 12시간, 또는 약 8 시간 내지 약 10시간의 혈장 반감기를 포함한다.

[0050] 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 Treg 세포를 증식 및/또는 확장시킬 수 있는 혈장 반감기를 포함하지만, 아폽토시스(apoptosis)와 같은 유해한 영향을 미치지는 않는다.

[0051] 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 야생형 IL-2에 비해, 예를 들어 적어도 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 15시간, 18시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 또는 그 초과만큼 연장된 혈장 반감기를 포함한다.

[0052] 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 야생형 IL-2에 비해, 예를 들어 약 1시간 내지 약 18시간, 약 1시간 내지 약 12시간, 약 2시간 내지 약 10시간, 약 2시간 내지 약 8시간, 약 4시간 내지 약 18시간, 약 4시간 내지 약 12시간, 약 4시간 내지 약 10시간, 약 4시간 내지 약 8시간, 약 6시간 내지 18시간, 약 6시간 내지 약 12시간, 약 6시간 내지 약 10시간, 약 6시간 내지 약 8시간, 약 8시간 내지 약 18시간, 약 8시간 내지 약 12시간, 또는 약 8시간 내지 약 10시간 연장된 혈장 반감기를 포함한다.

[0053] 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 독성이 감소된 연장된 혈장 반감기를 포함한다. 일부 경우에, IL-2 접합체는

독성이 감소된, 적어도 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 15시간, 18시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 또는 그 초과의 연장된 혈장 반감기를 포함한다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 독성이 감소된, 적어도 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 15시간, 18시간, 24시간 또는 그 초과의 연장된 혈장 반감기를 포함한다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 독성이 감소된, 약 1시간 내지 약 18시간, 약 1시간 내지 약 12시간, 약 2시간 내지 약 10시간, 약 2시간 내지 약 8시간, 약 4시간 내지 약 18시간, 약 4시간 내지 약 12시간, 약 4시간 내지 약 10시간, 약 4시간 내지 약 8시간, 약 6시간 내지 약 18시간, 약 6시간 내지 약 12시간, 약 6시간 내지 약 10시간, 약 6시간 내지 약 8시간, 약 8시간 내지 약 18시간, 약 8시간 내지 약 12시간, 또는 약 8시간 내지 약 10시간의 연장된 혈장 반감기를 포함한다. 일부 경우에, 감소된 독성은 야생형 IL-2에 비해 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 20배, 30배, 50배, 100배 또는 이보다 크게 감소된 것이다. 일부 경우에, 감소된 독성은 야생형 IL-2에 비해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500% 또는 이보다 크게 감소된 것이다.

[0054] 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 접합 모이어티의 크기(예를 들어, 부피 또는 길이)가 혈장 안정성을 향상시키지만 효능을 감소시키지 않는 접합 모이어티를 포함한다. 일부 경우에, 접합 모이어티의 크기는 혈장 반감기를 적어도 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 15시간, 18시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 또는 이보다 더 길게 연장시킨다. 일부 경우에, 접합 모이어티의 크기는 혈장 반감기를 적어도 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 15시간, 18시간, 24시간 또는 이보다 더 길게 연장시킨다. 일부 경우에, 접합 모이어티의 크기는 혈장 반감기를 약 1시간 내지 약 18시간, 약 1시간 내지 약 12시간, 약 2시간 내지 약 10시간, 약 2시간 내지 약 8시간, 약 4시간 내지 약 18시간, 약 4시간 내지 약 12시간, 약 4시간 내지 약 10시간, 약 4시간 내지 약 8시간, 약 6시간 내지 약 18시간, 약 6시간 내지 약 12시간, 약 6시간 내지 약 10시간, 약 6시간 내지 약 8시간, 약 8시간 내지 약 18시간, 약 8시간 내지 약 12시간, 또는 약 8시간 내지 약 10시간 연장시킨다. 일부 경우에, 접합 모이어티의 크기는 효능을 야생형 IL-2에 비해 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 미만 또는 이보다 더 낮은 비율만큼 감소시킨다.

[0055] 일부 실시양태에서, IL-2 접합체는 접합 모이어티의 크기(예를 들어, 부피 또는 길이)가 혈장 안정성 및 효능을 향상시키는 접합 모이어티를 포함한다. 일부 경우에, 접합 모이어티의 크기는 혈장 반감기를 적어도 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 15시간, 18시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일 또는 이보다 더 길게 연장시킨다. 일부 경우에, 접합 모이어티의 크기는 혈장 반감기를 적어도 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 12시간, 15시간, 18시간, 24시간 또는 이보다 더 길게 연장시킨다. 일부 경우에, 접합 모이어티의 크기는 혈장 반감기를 약 1시간 내지 약 18시간, 약 1시간 내지 약 12시간, 약 2시간 내지 약 10시간, 약 2시간 내지 약 8시간, 약 4시간 내지 약 18시간, 약 4시간 내지 약 12시간, 약 4시간 내지 약 10시간, 약 4시간 내지 약 8시간, 약 6시간 내지 약 18시간, 약 6시간 내지 약 12시간, 약 6시간 내지 약 10시간, 약 6시간 내지 약 8시간, 약 8시간 내지 약 18시간, 약 8시간 내지 약 12시간, 또는 약 8시간 내지 약 10시간 연장시킨다. 일부 경우에, 접합 모이어티의 크기는 효능을 야생형 IL-2에 비해 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% 또는 이보다 높은 비율만큼 추가로 향상시킨다.

[0056] 일부 경우에, 접합 모이어티는 IL-2의 IL-2Rβɣ에 대한 수용체 신호전달 효능을 손상시키거나 차단하거나, 또는 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rɣ 서브유닛의 동원을 감소시킨다.

[0057] 일부 경우에, IL-2Rβɣ에 대한 수용체 신호전달 효능을 갖는 변형된 IL-2 폴리펩티드는 CD4+ T 조절(Treg) 세포를 확장시킬 수 있다.

[0058] 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2/IL-2Rαβɣ 복합체에 의한 CD4+ Treg 세포 증식은 야생형 IL-2 폴리펩티드와 동등하거나 이보다 더 크다.

[0059] 일부 실시양태에서, IL-2/IL-2Rαβɣ 복합체는 CD4+ Treg 세포를 동물 모델에서 질환 경로를 조절하기에 충분한 집단으로 증식하는 것을 유도한다.

[0060] 일부 실시양태에서, 인터루킨 2 αβɣ 수용체(IL-2Rαβɣ) 결합 단백질이 본원에서 설명되고, 여기서 상기 결합 단백질의 인터루킨 2βɣ 수용체(IL-2Rβɣ)에 대한 수용체 신호전달 효능은 야생형 인간 IL-2(hIL-2)의 효능보다 낮고, 상기 결합 단백질은 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함한다. 일부 경우에, 상기 결합 단백질은 변형된 IL-2 폴리펩티드 또는 이의 기능적으로 활성인 단편이고, 여기서 변형된 IL-2 폴리펩티드는 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함한다.

[0061] 일부 실시양태에서, 인터루킨 2 αβγ 수용체(IL-2Rαβγ) 결합 단백질이 본원에서 설명되고, 여기서 상기 결합 단백질에 의한 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rγ 서브유닛의 동원은 야생형 인간 IL-2(hIL-2)에 의한 동원보다 작고, 상기 결합 단백질은 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함한다. 일부 경우에, 상기 결합 단백질은 변형된 IL-2 폴리펩티드 또는 이의 기능적으로 활성인 단편이고, 여기서 변형된 IL-2 폴리펩티드는 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함한다.

[0062] 일부 실시양태에서, 인터루킨 2 αβγ 수용체(IL-2Rαβγ) 결합 단백질이 본원에서 설명되고, 여기서 상기 결합 단백질의 인터루킨 2 βγ 수용체(IL-2Rβγ)에 대한 결합 친화도는 야생형 인간 IL-2(hIL-2)의 결합 친화도보다 낮고, 상기 결합 단백질은 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함한다. 일부 경우에, 상기 결합 단백질은 변형된 IL-2 폴리펩티드 또는 이의 기능적으로 활성인 단편이고, 여기서 변형된 IL-2 폴리펩티드는 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함한다.

[0063] 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 IL-2Rαβγ를 포함하는 IL-2/IL-2Rαβγ 복합체가 본원에서 설명되고, 여기서 변형된 IL-2 폴리펩티드는 IL-2Rβγ에 대한 감소된 수용체 신호전달 효능을 가지며, 감소된 수용체 신호전달 효능은 야생형 IL-2 폴리펩티드와 IL-2Rβγ 사이의 결합 친화도와 비교된다. 일부 경우에, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 비천연 아미노산에 공유 부착된 접합 모이어티를 추가로 포함한다.

[0064] 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 IL-2Rαβγ를 포함하는 IL-2/IL-2Rαβγ 복합체가 본원에서 설명되고, 여기서 상기 변형된 IL-2 폴리펩티드에 의한 IL-2/IL-2Rβγ 복합체에 대한 IL-2Rγ 서브유닛의 동원은 야생형 IL-2 폴리펩티드의 동원보다 작다. 일부 경우에, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 비천연 아미노산에 공유 부착된 접합 모이어티를 추가로 포함한다.

[0065] 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 IL-2Rαβγ를 포함하는 IL-2/IL-2Rαβγ 복합체가 본원에서 설명되고, 여기서 변형된 IL-2 폴리펩티드는 IL-2Rβγ에 대한 감소된 결합 친화도를 가지며, 감소된 결합 친화도는 야생형 IL-2 폴리펩티드와 IL-2Rβγ 사이의 결합 친화도와 비교된다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩티드 및 IL-2Rαβγ를 포함하는 IL-2/IL-2Rαβγ 복합체가 본원에서 설명되고, 여기서 상기 변형된 IL-2 폴리펩티드에 의한 IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rγ 서브유닛의 동원은 야생형 IL-2 폴리펩티드의 동원보다 작다. 일부 경우에, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 비천연 아미노산에 공유 부착된 접합 모이어티를 추가로 포함한다.

[0066] 일부 실시양태에서, 세포 집단 내의 CD4+ Treg 세포를 선택적으로 확장시키는 CD4+ Treg 세포 활성화제가 본원에서 설명되고, 여기서 상기 활성화제는 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩티드를 포함한다. 일부 경우에, 상기 활성화제는 야생형 IL-2 폴리펩티드와 접촉된 CD3+ 세포 집단에서의 CD8+ 이펙터 T 세포 및/또는 자연 살해 세포의 확장에 비해, 상기 활성화제가 상기 CD3+ 세포 집단과 접촉할 때 CD3+ 세포 집단에서 CD8+ 이펙터 T 세포 및/또는 자연 살해 세포를 20%, 15%, 10%, 5%, 1% 또는 0.1% 미만으로 확장시킨다. 일부 경우에, 상기 세포 집단은 생체내 세포 집단이다. 일부 경우에, 상기 세포 집단은 시험관내 세포 집단이다. 일부 경우에, 상기 세포 집단은 생체외 세포 집단이다.

[0067] *IL-10 접합체*

[0068] 일부 실시양태에서, 일정 아미노산 위치에서 변형된 IL-10 접합체가 본원에서 설명된다. 인간 사이토카인 합성 억제 인자 또는 CSIF로도 알려진 IL-10은 병원체에 대한 염증 반응을 제한하는 면역 조절 사이토카인이지만, CD8 T 세포에 대한 그의 면역 자극 활성으로 인해 항종양 사이토카인으로도 확인되었다. IL-10은 대식세포에서 Th1 사이토카인, MHC 클래스 II 항원 및 공동 자극 분자의 발현을 하향 조절하고, B 세포 생존, 증식 및 항체 생산을 추가로 향상시킨다. 추가로, IL-10은 흉선 세포의 증식 및 CD8 T 세포의 세포 독성을 자극할 수 있다. 일부 경우에, IL-10 접합체는 단리 및 정제된 IL-10 폴리펩티드 및 접합 모이어티를 포함한다. 일부 경우에, IL-10 접합체는 야생형 IL-10 폴리펩티드에 비해 IL-10 수용체에 대한 감소된 친화도를 갖는다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 IL-10 수용체(예를 들어, IL-10/IL-10R 계면에서)와 상호작용하는 아미노산 잔기에 결합된다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 IL-10/IL-10R 계면에 근접한(예를 들어, IL-10/IL-10R 계면으로부터 약 5Å, 약 10Å, 약 15Å 또는 약 20Å 떨어진) 아미노산 잔기에 결합된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, IL-10/IL-10R 계면에 관여하는 잔기는 IL-10R로부터의 잔기와 소수성 상호작용, 수소 결합 또는 이온성 상호작용을 형성하는 IL-10 잔기를 포함한다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 IL-10 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 직접 또는 링커 펩티드를 통해 간접적으로 연결된다. 추가의 경우에, 접합 모이어티는 그의 면역 억제 활성을 증가시키고 그의 면역 자극 활성을 감소시키기 위해 IL-10과 IL-10R 사이의 상호작용을 조절한다. 일부 경우에, IL-10 접합체

는 IL-10/IL-10R 신호전달을 통해 림프구의 별개의 집단(들)을 상향 조절한다. 일부 경우에, IL-10 접합체는 면역 활성을 조절한다.

[0069] *추가의 사이토카인 접합체*

[0070] 일부 실시양태에서, 일정 아미노산 위치에서 변형된 하나 이상의 추가의 사이토카인 접합체가 본원에서 설명된다. 예시적인 사이토카인은 IL-1β, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 및 IL-21을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 일부 경우에, 사이토카인 접합체는 단리 및 정제된 사이토카인 폴리펩티드 및 접합 모이어티를 포함한다. 일부 경우에, 사이토카인 접합체는 야생형 사이토카인에 비해 이의 각각의 수용체에 대한 감소된 친화도를 갖는다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 수용체 계면에 근접한(예를 들어, 수용체 계면으로부터 약 5Å, 약 10Å, 약 15Å 또는 약 20Å 떨어진) 아미노산 잔기에 결합된다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 직접 또는 링커 펩티드를 통해 간접적으로 사이토카인 폴리펩티드의 N-말단 또는 C-말단에 연결된다. 추가의 경우에, 접합 모이어티는 그의 면역 억제 활성을 증가시키고 그의 면역 자극 활성을 감소시키기 위해 사이토카인과 이의 수용체 사이의 상호작용을 조절한다. 일부 경우에, 사이토카인 접합체는 그의 수용체 신호전달을 통해 림프구의 별개의 집단(들)을 상향 조절한다. 일부 경우에, 사이토카인 접합체는 면역 활성을 조절한다.

[0071] *사이토카인 접합체 전구체*

[0072] 돌연변이체 사이토카인(예컨대, IL-2)을 포함하는 사이토카인 접합체 전구체가 본원에서 설명되고, 여기서 하나 이상의 아미노산은 야생형 아미노산으로부터 돌연변이된 것이다. 이러한 전구체는 종종 질환 또는 병태의 치료를 위해 본원에서 설명되는 방법과 함께 사용된다. 일부 실시양태에서, 사이토카인 전구체는 접합되지 않는다. 이러한 돌연변이는 부가, 결실 또는 치환을 다양하게 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 상이한 천연 아미노산으로의 치환을 포함한다. 일부 경우에, 돌연변이체 사이토카인은 아미노산 위치 P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133에서의 돌연변이를 포함하고, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, 및 T113으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95, 및 Q126으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 K8, K9, 및 H16으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 Q22, N26, N88, 및 Q126으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 E15, D20, D84, 및 E95로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 L12, L19, 및 M23으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 Q22 및 N26으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 사이토카인 돌연변이체는 접합 모이어티를 포함하고, 여기서 접합 모이어티는 돌연변이체 사이토카인의 돌연변이된 부위에 부착된다.

[0073] *단백질 또는 펩티드 융합체*

[0074] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 사이토카인 접합체는 펩티드 또는 단백질에 융합된 사이토카인(예를 들어, IL-2 또는 다른 사이토카인)(융합체)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 또는 단백질은 항체 또는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 사이토카인 접합체는 항체 또는 이의 결합 단편에 융합된 사이토카인(예를 들어, IL-2 또는 다른 사이토카인)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 사이토카인은 다수의 단백질 또는 펩티드에 융합된다. 일부 실시양태에서, 사이토카인 접합체는 단백질 또는 펩티드에 대한 사이토카인 융합체, 및 적어도 하나의 접합 모이어티를 포함한다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 결합 단편, 뮤린 항체 또는 이의 결합 단편, 키메라 항체 또는 이의 결합 단편, 모노클로날 항체 또는 이의 결합 단편, 1가 Fab', 2가 Fab_2, $F(ab)'_3$ 단편, 단일쇄 가변 단편(scFv), 비스-scFv, $(scFv)_2$, 디아바디, 미니바디, 나노바디, 트리아바디, 테트라바디, 휴마바디(humabody), 디술파이드 안정화된 Fv 단백질(dsFv), 단일 도메인 항체(sdAb), Ig NAR, 카멜리드(camelid) 항체 또는 이의 결합 단편, 이중 특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 또는 화학적으로 변형된 이의 유도체를 포함한다. 일부 경우에, 이러한 융합 단백질은 번역을 통해 직접 생성된다. 일부 실시양태에서, 융합체는 화학적 또는 다른 효소적 라이게이션 방법을

사용하여 생성된다. 일부 실시양태에서, 사이토카인 접합체는 링커에 의해 부착된 융합된 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 펩티드이다. 일부 실시양태에서, 사이토카인 접합체는 N-말단 펩티드 또는 단백질 융합체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 사이토카인 접합체는 C-말단 펩티드 또는 단백질 융합체를 포함한다. 일부 경우에, 펩티드 또는 단백질에 융합된 사이토카인은 아래에서 설명되는 하나 이상의 접합 모이어티에 추가로 접합된다.

[0075] 일부 경우에, 사이토카인 접합체는 scFv, 비스-scFv, $(scFv)_2$, dsFv 또는 sdAb 융합체에 대한 융합을 포함한다. 일부 경우에, 융합체는 scFv를 포함한다. 일부 경우에, 사이토카인 접합체는 비스-scFv에 대한 융합체를 포함한다. 일부 경우에, 사이토카인 접합체는 $(scFv)_2$에 대한 융합체를 포함한다. 일부 경우에, 사이토카인 접합체는 dsFv에 대한 융합체를 포함한다. 일부 경우에, 사이토카인 접합체는 sdAb에 대한 융합체를 포함한다. 일부 경우에, scFv, 비스-scFv, $(scFv)_2$, dsFv 또는 sdAb에 융합된 사이토카인은 아래에서 설명되는 하나 이상의 접합 모이어티에 추가로 접합된다.

[0076] 일부 경우에, 사이토카인 접합체는 항체, 예를 들어 IgG, IgA, IgM, IgE 또는 IgD의 Fc 부분에 대한 융합체를 포함한다. 일부 경우에, 사이토카인 접합체는 IgG(예를 들어, IgG_1, IgG_3 또는 IgG_4)의 Fc 부분에 대한 융합체를 포함한다. 일부 경우에, Fc 부분에 융합된 사이토카인은 아래에서 설명되는 하나 이상의 접합 모이어티에 추가로 접합된다.

[0077] 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 항체 또는 이의 결합 단편에 융합된다. 일부 경우에, 사이토카인 폴리펩티드는 인간화 항체 또는 이의 결합 단편, 뮤린 항체 또는 이의 결합 단편, 키메라 항체 또는 이의 결합 단편, 모노클로날 항체 또는 이의 결합 단편, 1가 Fab', 2가 Fab_2, $F(ab)'_3$ 단편, 단일쇄 가변 단편(scFv), 비스-scFv, $(scFv)_2$, 디아바디, 미니바디, 나노바디, 트리아바디, 테트라바디, 휴마바디, 디술파이드 안정화된 Fv 단백질(dsFv), 단일 도메인 항체(sdAb), Ig NAR, 카멜리드 항체 또는 이의 결합 단편, 이중 특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 또는 화학적으로 변형된 이의 유도체에 융합된다. 추가의 경우에, 사이토카인 폴리펩티드는 항체의 Fc 부분에 융합된다. 추가의 경우에, 사이토카인 접합체는 IgG(예를 들어, IgG_1, IgG_3 또는 IgG_4)의 Fc 부분에 융합된다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 결합 단편에 융합된 사이토카인은 아래에서 설명되는 하나 이상의 접합 모이어티에 추가로 접합된다.

[0078] 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 항체 또는 이의 결합 단편에 융합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 인간화 항체 또는 이의 결합 단편, 뮤린 항체 또는 이의 결합 단편, 키메라 항체 또는 이의 결합 단편, 모노클로날 항체 또는 이의 결합 단편, 1가 Fab', 2가 Fab_2, $F(ab)'_3$ 단편, 단일쇄 가변 단편(scFv), 비스-scFv, $(scFv)_2$, 디아바디, 미니바디, 나노바디, 트리아바디, 테트라바디, 휴마바디, 디술파이드 안정화된 Fv 단백질(dsFv), 단일 도메인 항체(sdAb), Ig NAR, 카멜리드 항체 또는 이의 결합 단편, 이중 특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 또는 화학적으로 변형된 이의 유도체에 융합된다. 추가의 경우에, IL-2 폴리펩티드는 항체의 Fc 부분에 융합된다. 추가의 경우에, IL-2 폴리펩티드는 IgG(예를 들어, IgG_1, IgG_3 또는 IgG_4)의 Fc 부분에 융합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드에 융합된 항체 또는 이의 결합 단편은 IL-2 폴리펩티드와 IL-2Rβγ의 결합을 방해하지 않을 것이다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드에 융합된 항체 또는 이의 결합 단편은 IL-2 폴리펩티드와 IL-2Rβγ의 결합을 부분적으로 차단한다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 결합 단편에 융합된 IL-2 폴리펩티드는 아래에서 설명되는 하나 이상의 접합 모이어티에 추가로 접합된다.

[0079] *천연 및 비천연 아미노산*

[0080] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 아미노산 잔기(예를 들어, IL-2와 같은 사이토카인 내의)는 접합 모이어티에 대한 결합(또는 접합 모이어티와의 반응) 전에 라이신, 시스테인, 히스티딘, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌 또는 티로신으로 돌연변이된다. 예를 들어, 라이신, 시스테인, 히스티딘, 아르기닌, 아스파르트산, 글루탐산, 세린, 트레오닌 또는 티로신의 측쇄는 본원에서 설명되는 접합 모이어티에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 아미노산 잔기는 시스테인, 라이신 또는 히스티딘으로 돌연변이된다. 일부 경우에, 아미노산 잔기는 시스테인으로 돌연변이된다. 일부 경우에, 아미노산 잔기는 라이신으로 돌연변이된다. 일부 경우에, 아미노산 잔기는 히스티딘으로 돌연변이된다. 일부 경우에, 아미노산 잔기는 티로신으로 돌연변이된다. 일부 경우에, 아미노산 잔기는 트립토판으로 돌연변이된다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 접합 모이어티와 접합되지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 사이토카인은 비천연 아미노산을 포함하고, 여기서 사이토카인은 단백질에 접합되고, 여기서 부착 지점은 비천연 아미노산이 아니다.

[0081] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 아미노산 잔기(예를 들어, IL-2와 같은 사이토카인 내의)는 접합 모이어티에 결합하기 전에 비천연 아미노산으로 돌연변이된다. 일부 경우에, 비천연 아미노산으로의 돌연변이는 면역계의 자가 항원 반응을 방지하거나 최소화한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "비천연 아미노산"은 단백질에서 자연적으로 발생하는 20개 아미노산 이외의 다른 아미노산을 지칭한다. 비천연 아미노산의 비제한적 예는 다음을 포함한다: p-아세틸-L-페닐알라닌, p-요오도-L-페닐알라닌, p-메톡시페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, p-프로파르길옥시페닐알라닌, p-프로파르길-페닐알라닌, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcp-세린, L-도파, 플루오르화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, p-보로노페닐알라닌, O-프로파르길티로신, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, p-브로모페닐알라닌, 셀레노시스테인, p-아미노-L-페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, 아지도-라이신(AzK), 티로신 아미노산의 비천연 유사체; 글루타민 아미노산의 비천연 유사체; 페닐알라닌 아미노산의 비천연 유사체; 세린 아미노산의 비천연 유사체; 트레오닌 아미노산의 비천연 유사체; 알킬, 아릴, 아실, 아지도, 시아노, 할로, 히드라진, 히드라지드, 히드록실, 알케닐, 알키닐, 에테르, 티올, 술포닐, 셀레노, 에스테르, 티오산, 보레이트, 보로네이트, 포스포, 포스포노, 포스핀, 헤테로시클릭, 에논, 이민, 알데히드, 히드록실아민, 케토 또는 아미노 치환 아미노산 또는 이들의 조합; 광 활성화 가능 가교결합제를 갖는 아미노산; 스핀 표지된 아미노산; 형광 아미노산; 금속 결합 아미노산; 금속 함유 아미노산; 방사성 아미노산; 광 케이지된(photocaged) 및/또는 광 이성질체화 아미노산; 비오틴 또는 비오틴 유사체 함유 아미노산; 케토 함유 아미노산; 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에테르를 포함하는 아미노산; 중원자 치환 아미노산; 화학적으로 절단가능한 또는 광 절단가능한 아미노산; 연장된 측쇄를 갖는 아미노산; 독성기를 함유하는 아미노산; 당 치환된 아미노산; 탄소 연결 당 함유 아미노산; 산화 환원 활성 아미노산; α-히드록시 함유 산; 아미노티오산; α α-이치환된 아미노산; β-아미노산; 프롤린 또는 히스티딘 이외의 다른 시클릭 아미노산, 및 페닐알라닌, 티로신 또는 트립토판 이외의 다른 방향족 아미노산.

[0082] 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 선택적 반응성 기, 또는 표적 폴리펩티드의 부위 선택적 표지를 위한 반응성 기를 포함한다. 일부 경우에, 화학 반응은 바이오르소고날(biorthogonal) 반응(예를 들어, 생체 적합성 및 선택적 반응)이다. 일부 경우에, 화학 반응은 Cu(I) 촉매된 또는 "구리가 없는" 알킨-아지드 트리아졸 형성 반응, 슈타우딩거(Staudinger) 라이게이션, 역전자 요구형 딜스-알더(IEDDA: inverse-electron-demand Diels-Alder) 반응, "포토-클릭(photo-click)" 화학 반응, 또는 금속 매개 공정, 예컨대 올레핀 복분해 및 스즈키-미야우라(Suzuki-Miyaura) 또는 소노가시라(Sonogashira) 교차 커플링이다.

[0083] 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 예를 들어 UV 조사시 가교되는 광 반응성 기를 포함한다.

[0084] 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 광 케이지된 아미노산을 포함한다.

[0085] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 파라 치환, 메타 치환 또는 오르토 치환된 아미노산 유도체이다.

[0086] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 다음을 포함한다: p-아세틸-L-페닐알라닌, p-요오도-L-페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, p-메톡시페닐알라닌, p-프로파르길옥시페닐알라닌, p-프로파르길-페닐알라닌, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAcp-세린, L-도파, 플루오르화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신 p-브로모페닐알라닌, p-아미노-L-페닐알라닌 또는 이소프로필-L-페닐알라닌.

[0087] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 3-아미노티로신, 3-니트로티로신, 3,4-디히드록시-페닐알라닌 또는 3-요오도티로신이다.

[0088] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 페닐셀레노시스테인이다.

[0089] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 벤조페논, 케톤, 요오다이드, 메톡시, 아세틸, 벤조일 또는 아지드 함유 페닐알라닌 유도체이다.

[0090] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 벤조페논, 케톤, 요오다이드, 메톡시, 아세틸, 벤조일 또는 아지드 함유 라이신 유도체이다.

[0091] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 방향족 측쇄를 포함한다.

[0092] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 방향족 측쇄를 포함하지 않는다.

[0093] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 아지도 기를 포함한다.

[0094] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 마이클-수용체(Michael-acceptor) 기를 포함한다. 일부 경우에, 마이클-수용체 기는 1,2-부가 반응을 통해 공유 결합을 형성할 수 있는 불포화 모이어티를 포함한다. 일부 경우에, 마이클-수용체 기는 전자 결핍 알켄 또는 알킨을 포함한다. 일부 경우에, 마이클-수용체 기는 알파,베타 불포화된 케톤, 알데히드, 술폭사이드, 술폰, 니트릴, 이민 또는 방향족을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0095] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 데히드로알라닌이다.

[0096] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 알데히드 또는 케톤기를 포함한다.

[0097] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 알데히드 또는 케톤기를 포함하는 라이신 유도체이다.

[0098] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 베타, 감마 또는 델타 위치에 하나 이상의 O, N, Se 또는 S 원자를 포함하는 라이신 유도체이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 감마 위치에 O, N, Se 또는 S 원자를 포함하는 라이신 유도체이다.

[0099] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 엡실론 N 원자가 산소 원자로 대체된 라이신 유도체이다.

[0100] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 자연적으로 발생하는 번역 후 변형된 라이신이 아닌 라이신 유도체이다.

[0101] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 측쇄를 포함하는 아미노산이고, 여기서 알파 위치로부터의 제6 원자는 카르보닐기를 포함한다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 측쇄를 포함하는 아미노산이고, 여기서 알파 위치로부터의 제6 원자는 카르보닐기를 포함하고, 알파 위치로부터의 제5 원자는 질소이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 측쇄를 포함하는 아미노산이고, 여기서 알파 위치로부터의 제7 원자는 산소 원자이다.

[0102] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 셀레늄을 포함하는 세린 유도체이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 셀레노세린(2-아미노-3-히드로셀레노프로판산)이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-3-((2-((3-(벤질옥시)-3-옥소프로필)아미노)에틸)셀라닐)프로판산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-3-(페닐셀라닐)프로판산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 셀레늄을 포함하고, 여기서 셀레늄의 산화는 알켄을 포함하는 비천연 아미노산의 형성을 유발한다.

[0103] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 시클로옥티닐기를 포함한다.

[0104] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 트랜스시클로옥테닐기를 포함한다.

[0105] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 노르보르네닐기를 포함한다.

[0106] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 시클로프로페닐기를 포함한다.

[0107] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 디아지린기를 포함한다.

[0108] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 테트라진기를 포함한다.

[0109] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 라이신 유도체이고, 여기서 측쇄 질소는 카르바밀화된다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 라이신 유도체이고, 여기서 측쇄 질소는 아실화된다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-6-{[(tert-부톡시)카르보닐]아미노}헥산산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-6-{[(tert-부톡시)카르보닐]아미노}헥산산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-Boc-N6-메틸라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-아세틸라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 피롤라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-트리플루오로아세틸라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-6-{[(벤질옥시)카르보닐]아미노}헥산산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-6-{[(p-요오도벤질옥시)카르보닐]아미노}헥산산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-6-{[(p-니트로벤질옥시)카르보닐]아미노}헥산산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-프롤릴라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-6-{[(시클로펜틸옥시)카르보닐]아미노}헥산산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-(시클로펜탄카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-(테트라히드로푸란-2-카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-(3-에티닐테트라히드로푸란-2-카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-((프로프-2-인-1-일옥시)카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-6-{[(2-아지도시클로펜틸옥시)카르보닐]아미노}헥산산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-((2-아지도에톡시)카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-6-{[(2-니트로벤질옥시)카르보닐]아미노}헥산산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-6-{[(2-시클로옥티닐옥시)카르보닐]아미노}헥산산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-(2-아

미노부트-3-이노일)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-6-((2-아미노부트-3-이노일)옥시)헥산산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-(알릴옥시카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-(부테닐-4-옥시카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-(펜테닐-5-옥시카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-((부트-3-인-1-일옥시)카르보닐)-라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-((펜트-4-인-1-일옥시)카르보닐)-라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-(티아졸리딘-4-카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-8-옥소노난산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-8-옥소옥탄산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-(2-옥소아세틸)라이신이다.

[0110] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-프로피오닐라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-부티릴라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-(부트-2- 에노일)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-((비시클로 [2.2.1] 헵트-5- 엔-2-일옥시)카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-((스피로 [2.3]헥스-1-엔-5-일메톡시)카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-(((4-(1-(트리플루오로메틸)시클로프로프-2-엔-1-일)벤질)옥시)카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-((비시클로[2.2.1]헵트-5-엔-2-일메톡시)카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 시스테이닐라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-((1-(6-니트로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)에톡시)카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-((2-(3-메틸-3H-디아지린-3-일)에톡시)카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-((3-(3-메틸-3H-디아지린-3-일)프로폭시)카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-((메타니트로베닐옥시)N6-메틸카르보닐)라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-((비시클로[6.1.0]비-4-인-9-일메톡시)카르보닐)-라이신이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 N6-((시클로헵트-3-엔-1-일옥시)카르보닐)-L-라이신이다.

[0111] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 2-아미노-3-(((((벤질옥시)카르보닐)아미노)메틸)셀라닐)프로판산이다.

[0112] 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 다른 용도에 맞게 만들어진(repurposed) 앰버(amber), 오팔(opal) 또는 오커(ochre) 정지 코돈에 의해 사이토카인(예를 들어, IL 폴리펩티드)에 통합된다.

[0113] 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 4-염기 코돈에 의해 사이토카인(예를 들어, IL 폴리펩티드)에 통합된다.

[0114] 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 다른 용도에 맞게 만들어진 희귀 센스 코돈에 의해 사이토카인(예를 들어, IL 폴리펩티드)에 통합된다.

[0115] 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 비천연 핵산을 포함하는 합성 코돈에 의해 사이토카인(예를 들어, IL 폴리펩티드)에 통합된다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 변형된 오르소고날 합성 효소/tRNA 쌍에 의해 사이토카인에 통합된다. 이러한 오르소고날 쌍은 a) 다른 내인성 아미노산을 비천연 tRNA에 충전하고 b) 비천연 아미노산을 다른 내인성 tRNA에 충전하는 것을 최소화하면서, 비천연 tRNA를 비천연 아미노산으로 충전할 수 있는 비천연 합성 효소를 포함한다. 이러한 오르소고날 쌍은 a) 내인성 합성 효소에 의해 다른 내인성 아미노산으로 충전되는 것을 방지하면서, 비천연 합성 효소에 의해 충전될 수 있는 tRNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 쌍은 박테리아, 효모, 고세균 또는 인간 공급원과 같은 다양한 유기체로부터 확인된다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소/tRNA 쌍은 단일 유기체로부터의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소/tRNA 쌍은 2개의 상이한 유기체로부터의 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소/tRNA 쌍은 변형 전에 2개의 상이한 아미노산의 번역을 촉진하는 성분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 알라닌 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 아르기닌 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 아스파라긴 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 아스파르트산 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 시스테인 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 글루타민 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 글루탐산 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 알라닌 글리신이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 히스티딘 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 류신 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 이소류신 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 라이신 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 메티오닌 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 페닐알라닌 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 프롤린 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 세린 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 트레오닌 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 트립토판 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 티로신 합성 효소

이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 발린 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 합성 효소는 변형된 포스포세린 합성 효소이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 알라닌 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 아르기닌 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 아스파라긴 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 아스파르트산 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 시스테인 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 글루타민 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 글루탐산 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 알라닌 글리신이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 히스티딘 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 류신 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 이소류신 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 라이신 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 메티오닌 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 페닐알라닌 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 프롤린 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 세린 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 트레오닌 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 트립토판 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 티로신 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 발린 tRNA이다. 일부 실시양태에서, 오르소고날 tRNA는 변형된 포스포세린 tRNA이다.

[0116] 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 아미노아실(aaRS 또는 RS)-tRNA 합성 효소-tRNA 쌍에 의해 사이토카인(예를 들어, IL 폴리펩티드)에 통합된다. 예시적인 aaRS-tRNA 쌍은 메타노코쿠스 얀나쉬이(*Methanococcus jannaschii*)(*Mj-Tyr*) aaRS/tRNA 쌍, 이. 콜라이(*E. coli*) TyrRS(*Ec-Tyr*)/비. 스테아로테르모필루스(*B. stearothermophilus*) $tRNA_{CUA}$ 쌍, 이. 콜라이 LeuRS(*Ec-Leu*)/비. 스테아로테르모필루스 $tRNA_{CUA}$ 쌍, 및 피롤라이실-tRNA 쌍을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 *Mj-Tyr*RS/tRNA 쌍에 의해 사이토카인(예를 들어, IL 폴리펩티드)에 통합된다. *Mj-Tyr*RS/tRNA 쌍에 의해 통합될 수 있는 예시적인 UAA는 파라-치환된 페닐알라닌 유도체, 예컨대 p-아미노페닐알라닌 및 p-메톡시페닐알라닌; 메타-치환 티로신 유도체, 예컨대 3-아미노티로신, 3-니트로티로신, 3,4-디히드록시페닐알라닌 및 3-요오도티로신; 페닐셀레노시스테인; p-보로노페닐알라닌; 및 o-니트로벤질티로신을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0117] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 *Ec-Tyr*/$tRNA_{CUA}$ 또는 *Ec-Leu*/$tRNA_{CUA}$ 쌍에 의해 사이토카인(예를 들어, IL 폴리펩티드)에 통합된다. *Ec-Tyr*/$tRNA_{CUA}$ 또는 *Ec-Leu*/$tRNA_{CUA}$ 쌍에 의해 통합될 수 있는 예시적인 UAA는 벤조페논, 케톤, 요오다이드 또는 아지드 치환기를 함유하는 페닐알라닌 유도체; O-프로파르길티로신; α-아미노카프릴산, O-메틸티로신, O-니트로벤질 시스테인; 및 3-(나프탈렌-2-일아미노)-2-아미노-프로판산을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0118] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 피롤라이실-tRNA 쌍에 의해 사이토카인(예를 들어, IL 폴리펩티드)에 통합된다. 일부 경우에, PylRS는 고세균, 예를 들어 메탄 생성 고세균으로부터 수득된다. 일부 경우에, PylRS는 메타노사르시나 바르케리 (*Methanosarcina barkeri*), 메타노사르시나 마제이(*Methanosarcina mazei*), 또는 메타노사르시나 아세티보란스(*Methanosarcina acetivorans*)로부터 수득된다. 피롤라이실-tRNA 쌍에 의해 통합될 수 있는 예시적인 UAA는 아미드 및 카르바메이트 치환된 라이신, 예컨대 2-아미노-6-((R)-테트라히드로푸란-2-카르복사미도)헥산산, N-ε-D-프롤릴-L-라이신 및 N-ε-시클로펜틸옥시카르보닐-L-라이신; N-ε-아크릴로일-L-라이신; N-ε-[(1-(6-니트로벤조[d][1,3]디옥솔-5-일)에톡시)카르보닐]-L-라이신; 및 N-ε-(1-메틸시클로프로-2-엔카르복사미도)라이신을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0119] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 US 9,988,619 및 US 9,938,516에 개시된 합성 효소에 의해 본원에서 설명되는 사이토카인(예를 들어, IL 폴리펩티드)에 통합된다. 상기 합성 효소에 통합될 수 있는 예시적인 UAA는 파라-메틸아지도-L-페닐알라닌, 아르알킬, 헤테로시클릴, 헤테로아랄킬 비천연 아미노산 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 UAA는 피리딜, 피라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 옥사졸릴, 티아졸릴, 티오페닐 또는 다른 헤테로사이클을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산은 아지드, 테트라진, 또는 수용성 모이어티와 같은 커플링 파트너에 접합될 수 있는 다른 화학기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 합성 효소는 생체 내에서 발현되고 UAA를 시토카인에 통합하기 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 상기 합성 효소는 무세포 번역 시스템을 사용하여 UAA를 사이토카인에 통합시키기 위해 사용된다.

[0120] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 자연 발생 합성 효소에 의해 본원에서 설명되는 사이토카인(예를 들어, IL 폴리펩티드)에 통합된다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 하나 이상의 아미노산에 대해 영양 요구성인 유기체에 의해 사이토카인에 통합된다. 일부 실시양태에서, 영양 요구성 아미노산에 상응하는 합성 효소는 상응하

는 tRNA를 비천연 아미노산으로 충전할 수 있다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 셀레노시스테인 또는 이의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 셀레노메티오닌 또는 이의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 방향족 아미노산이고, 여기서 방향족 아미노산은 요오다이드와 같은 아릴 할라이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 영양 요구성 아미노산과 구조적으로 유사하다.

[0121] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 도 1에 예시된 비천연 아미노산을 포함한다.

[0122] 일부 경우에, 비천연 아미노산은 라이신 또는 페닐알라닌 유도체 또는 유사체를 포함한다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 라이신 유도체 또는 라이신 유사체를 포함한다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 피롤라이신(Pyl)을 포함한다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 페닐알라닌 유도체 또는 페닐알라닌 유사체를 포함한다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 문헌 [Wan, et al., "Pyrrolysyl-tRNA synthetase: an ordinary enzyme but an outstanding genetic code expansion tool," Biocheim Biophys Aceta 1844(6): 1059-4070 (2014)]에 기재되어 있는 비천연 아미노산이다. 일부 경우에, 비천연 아미노산은 도 2(예를 들어, 도 2a 및 도 2b)에 예시된 비천연 아미노산을 포함한다.

[0123] 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 도 3a 내지 도 3d(문헌 [Dumas *et al.*, *Chemical Science* 2015, **6**, 50-69]의 표 1로부터 도입됨)에 예시된 비천연 아미노산을 포함한다.

[0124] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 사이토카인(예를 들어, IL 폴리펩티드)에 통합되는 비천연 아미노산은 US 9,840,493; US 9,682,934; US 2017/0260137; US 9,938,516; 또는 US 2018/0086734에 개시되어 있다. 상기 합성 효소에 의해 통합될 수 있는 예시적인 UAA는 파라-메틸아지도-L-페닐알라닌, 아르알킬, 헤테로시클릴 및 헤테로아랄킬 및 라이신 유도체 비천연 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 UAA는 피리딜, 피라지닐, 피라졸릴, 트리아졸릴, 옥사졸릴, 티아졸릴, 티오페닐 또는 다른 헤테로사이클을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산은 아지드, 테트라진, 또는 수용성 모이어티와 같은 커플링 파트너에 접합될 수 있는 다른 화학기를 포함한다. 일부 실시양태에서, UAA는 알킬 링커를 통해 방향족 모이어티에 부착된 아지드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 알킬 링커는 C_1-C_{10} 링커이다. 일부 실시양태에서, UAA는 알킬 링커를 통해 방향족 모이어티에 부착된 테트라진을 포함한다. 일부 실시양태에서, UAA는 아미노기를 통해 방향족 모이어티에 부착된 테트라진을 포함한다. 일부 실시양태에서, UAA는 알킬아미노 기를 통해 방향족 모이어티에 부착된 테트라진을 포함한다. 일부 실시양태에서, UAA는 알킬 사슬을 통해 아미노산 측쇄의 말단 질소(예를 들어, 라이신 유도체의 N6 또는 더 짧은 알킬 측쇄를 포함하는 유도체의 N5, N4 또는 N3)에 부착된 아지드를 포함한다. 일부 실시양태에서, UAA는 알킬 사슬을 통해 아미노산 측쇄의 말단 질소에 부착된 테트라진을 포함한다. 일부 실시양태에서, UAA는 알킬 링커를 통해 아미드에 부착된 아지드 또는 테트라진을 포함한다. 일부 실시양태에서, UAA는 3-아미노알라닌, 세린, 라이신 또는 이의 유도체의 아지드 또는 테트라진 함유 카르바메이트 또는 아미드이다. 일부 실시양태에서, 상기 UAA는 생체 내에서 사이토카인에 통합된다. 일부 실시양태에서, 상기 UAA는 무세포 시스템에서 사이토카인에 통합된다.

[0125] **접합 모이어티**

[0126] 특정 실시양태에서, 상기 설명된 하나 이상의 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TF)에 결합된 접합 모이어티가 본원에서 개시된다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 사이토카인과 이의 수용체의 상호작용을 교란시키는 분자이다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 사이토카인에 결합할 때 사이토카인 접합체가 면역 반응을 조절할 수 있게 하는 임의의 분자이다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 수용성 중합체를 포함한다. 다른 경우에, 접합 모이어티는 단백질 또는 이의 결합 단편을 포함한다. 추가의 경우에, 접합 모이어티는 펩티드를 포함한다. 추가의 경우에, 접합 모이어티는 핵산을 포함한다. 추가의 경우에, 접합 모이어티는 소분자를 포함한다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 혈청 반감기를 증가시키고/시키거나, 안정성을 개선한다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 하나 이상의 사이토카인 수용체 도메인 또는 서브유닛과의 사이토카인 상호작용을 감소시킨다. 추가의 경우에, 접합 모이어티는 그의 동족 수용체(들)에 대한 하나 이상의 사이토카인 도메인 또는 서브유닛의 사이토카인 상호작용을 차단한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 사이토카인 접합체는 다중 접합 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 사이토카인 펩티드 내의 비천연 또는 천연 아미노산에 부착된다. 일부 실시양태에서, 사이토카인 접합체는 천연 아미노산에 부착된 접합 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 사이토카인 접합체는 사이토카인 펩티드 내의 비천연 아미노산에 부착된다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 사이토카인 펩티드의 N 또는 C 말단 아미노산에 부착된다. 다양한 조합 부위가 본원에 개시되어 있으며, 예를 들어, 제1 접합 모이어티는 사이토카인 펩티드의 비천연 또는 천연 아미노산에 부착되고, 제2 접합 모이어티는 사이토카인 펩티드의 N 또는 C 말단 아미노산에 부착된다. 일부 실시양태에서, 단일 접합 모이어티가 사이토카

인 펩티드의 다수의 잔기(예를 들어, 스테이플)에 부착된다. 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 사이토카인 펩티드의 N 및 C 말단 아미노산 둘 모두에 부착된다.

[0127] *수용성 중합체*

[0128] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 모이어티는 수용성 중합체이다. 일부 경우에, 수용성 중합체는 비펩티드성, 비독성 및 생체 적합성이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 물질을 단독으로 사용하거나 살아있는 조직과 관련하여(예를 들어, 환자에 대한 투여) 또 다른 물질(예를 들어, 사이토카인 모이어티와 같은 활성 물질)과 함께 사용할 때 관련되는 유익한 효과가 임상의, 예를 들어, 내과의사, 독성학자 또는 임상 개발 전문가에 의해 평가시에 임의의 유해한 영향보다 더 크면, 그 물질은 생체 적합성인 것으로 간주된다. 일부 경우에, 수용성 중합체는 추가로 비면역원성이다. 일부 경우에, 생체 내에서 물질의 의도된 사용이 바람직하지 않은 면역 반응(예를 들어, 항체의 형성)을 생성하지 않거나, 또는 임상의, 예를 들어, 내과의사, 독성학자 또는 임상 개발 전문가에 의해 평가시에 임상적으로 유의하거나 중요한 것으로 고려되지 않는 면역 반응이 생성될 경우, 물질은 비면역원성으로 간주된다.

[0129] 일부 경우에, 수용성 중합체는 약 2 내지 약 300개의 말단을 갖는 것을 특징으로 한다. 예시적인 수용성 중합체는 폴리(알킬렌 글리콜), 예컨대 폴리에틸렌 글리콜("PEG"), 폴리(프로필렌 글리콜)("PPG"), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜 등의 공중합체, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀계 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α-히드록시산), 폴리(비닐 알코올)(PVA), 폴리아크릴아미드(PAAm), 폴리(N-(2-히드록시프로필) 메타크릴아미드)(PHPMA), 폴리디메틸아크릴아미드(PDAAm), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린("POZ")(WO 2008/106186에 기재됨), 폴리(N-아크릴로일모르폴린), 및 이들 중 임의의 것의 조합을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0130] 일부 경우에, 수용성 중합체는 특정 구조로 제한되지 않는다. 일부 경우에, 수용성 중합체는 선형(예를 들어, 말단 캐핑된(capped), 예를 들어 알콕시 PEG 또는 이기능성 PEG), 분지형 또는 다중 아암형(multi-armed)(예를 들어, 포크형 PEG 또는 폴리올 코어에 부착된 PEG), 각각 하나 이상의 분해 가능한 연결이 있거나 없는 수지상(또는 별) 아키텍처이다. 또한, 수용성 중합체의 내부 구조는 임의의 수의 상이한 반복 패턴으로 구성될 수 있으며, 단독 중합체, 교호 공중합체, 랜덤 공중합체, 블록 공중합체, 교호 삼중합체, 랜덤 삼중중합체 및 블록 삼중합체로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0131] 일부 실시양태에서, IL-2 접합체에서 수용성 중합체의 중량 평균 분자량은 약 100 달톤 내지 약 150,000 달톤이다. 예시적인 범위는 예를 들어 5,000 달톤 초과 내지 약 100,000 달톤 범위, 약 6,000 달톤 내지 약 90,000 달톤 범위, 약 10,000 달톤 내지 약 85,000 달톤 범위, 10,000 달톤 초과 내지 약 85,000 달톤 범위, 약 20,000 달톤 내지 약 85,000 달톤 범위, 약 53,000 달톤 내지 약 85,000 달톤 범위, 약 25,000 달톤 내지 약 120,000 달톤 범위, 약 29,000 달톤 내지 약 120,000 달톤 범위, 약 35,000 달톤 내지 약 120,000 달톤 범위, 약 40,000 달톤 내지 약 120,000 달톤 범위의 중량 평균 분자량을 포함한다.

[0132] 수용성 중합체의 예시적인 중량 평균 분자량은 약 100 달톤, 약 200 달톤, 약 300 달톤, 약 400 달톤, 약 500 달톤, 약 600 달톤, 약 700 달톤, 약 750 달톤, 약 800 달톤, 약 900 달톤, 약 1,000 달톤, 약 1,500 달톤, 약 2,000 달톤, 약 2,200 달톤, 약 2,500 달톤, 약 3,000 달톤, 약 4,000 달톤, 약 4,400 달톤, 약 4,500 달톤, 약 5,000 달톤, 약 5,500 달톤, 약 6,000 달톤, 약 7,000 달톤, 약 7,500 달톤, 약 8,000 달톤, 약 9,000 달톤, 약 10,000 달톤, 약 11,000 달톤, 약 12,000 달톤, 약 13,000 달톤, 약 14,000 달톤, 약 15,000 달톤, 약 20,000 달톤, 약 22,500 달튼, 약 25,000 달톤, 약 30,000 달톤, 약 35,000 달톤, 약 40,000 달톤, 약 45,000 달톤, 약 50,000 달톤, 약 55,000 달톤, 약 60,000 달톤, 약 65,000 달톤, 약 70,000 달톤 및 약 75,000 달톤을 포함한다. 상기 중 임의의 것의 총 분자량을 갖는 수용성 중합체의 분지형 버전(예를 들어, 2개의 20,000 달톤 중합체로 이루어진 분지형 40,000 달톤 수용성 중합체)도 사용될 수 있다. 하나 이상의 실시양태에서, 접합체는 직접 또는 간접적으로 부착된, 약 6,000 달톤 미만의 중량 평균 분자량을 갖는 임의의 PEG 모이어티를 갖지 않을 것이다.

[0133] PEG는 통상적으로 많은 (OCH_2CH_2) 단량체[또는 PEG가 정의되는 방법에 따라 (CH_2CH_2O) 단량체]를 포함할 것이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 반복 단위의 수는 "$(OCH_2CH_2)_n$에서 아래첨자 "n"에 의해 확인된다. 따라서, (n)의 값은 통상적으로 다음 범위 중 하나 이상에 속한다: 2 내지 약 3400, 약 100 내지 약 2300, 약 100 내지 약 2270, 약 136 내지 약 2050, 약 225 내지 약 1930, 약 450 내지 약 1930, 약 1200 내지 약 1930, 약 568 내지 약 2727, 약 660 내지 약 2730, 약 795 내지 약 2730, 약 795 내지 약 2730, 약 909 내지 약 2730, 및 약

1,200 내지 약 1,900. 분자량이 알려진 임의의 주어진 중합체에 대해, 중합체의 총 중량 평균 분자량을 반복 단량체의 분자량으로 나눔으로써 반복 단위의 수(즉, "n")를 결정할 수 있다.

[0134] 일부 경우에, 수용성 중합체는 말단 캐핑된 중합체, 즉 상대적으로 불활성인 기, 예를 들어 저급 C_{1-6} 알콕시 기 또는 히드록실 기로 캐핑된 적어도 하나의 말단을 갖는 중합체이다. 중합체가 PEG일 때, 예를 들어 메톡시-PEG(보통 mPEG로 지칭됨)를 사용할 수 있고, 메톡시-PEG는 중합체의 하나의 말단이 메톡시($-OCH_3$) 기인 반면 다른 말단은 히드록실 또는 선택적으로 화학적으로 변형될 수 있는 다른 작용기인 PEG의 선형 형태이다.

[0135] 일부 실시양태에서, 예시적인 수용성 중합체는 콴타 바이오디자인, 엘티디(Quanta Biodesign, Ltd)의 선형 또는 분지형 이산 PEG(dPEG); 넥타르 테라퓨틱스 (Nektar Therapeutics)로부터의 선형, 분지형 또는 포크형 PEG; 및 젠켐 테크놀로지(JenKem Technology)로부터의 Y형 PEG 유도체를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0136] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 폴리(알킬렌 글리콜), 예컨대 폴리에틸렌 글리콜("PEG"), 폴리(프로필렌 글리콜)("PPG"), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜 등의 공중합체, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀계 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α-히드록시산), 폴리(비닐 알코올)(PVA), 폴리아크릴아미드(PAAm), 폴리디메틸아크릴아미드(PDAAm), 폴리(N-(2-히드록시프로필) 메타크릴아미드)(PHPMA), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린("POZ"), 폴리(N-아크릴로일모르폴린), 및 이들의 조합로부터 선택되는 수용성 중합체에 접합된다. 일부 경우에, 사이토카인 폴리펩티드는 PEG에 접합된다(예를 들어, PEG화된다). 일부 경우에, 사이토카인 폴리펩티드는 PPG에 접합된다. 일부 경우에, 사이토카인 폴리펩티드는 POZ에 접합된다. 일부 경우에, 사이토카인 폴리펩티드는 PVP에 접합된다.

[0137] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 IL-2 폴리펩티드는 폴리(알킬렌 글리콜), 예컨대 폴리에틸렌 글리콜("PEG"), 폴리(프로필렌 글리콜)("PPG"), 에틸렌 글리콜과 프로필렌 글리콜 등의 공중합체, 폴리(옥시에틸화 폴리올), 폴리(올레핀계 알코올), 폴리(비닐피롤리돈), 폴리(히드록시알킬메타크릴아미드), 폴리(히드록시알킬메타크릴레이트), 폴리(사카라이드), 폴리(α-히드록시산), 폴리(비닐 알코올)(PVA), 폴리아크릴아미드(PAAm), 폴리디메틸아크릴아미드(PDAAm), 폴리(N-(2-히드록시프로필) 메타크릴아미드)(PHPMA), 폴리포스파젠, 폴리옥사졸린("POZ"), 폴리(N-아크릴로일모르폴린), 및 이들의 조합로부터 선택되는 수용성 중합체에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 PEG에 접합된다(예를 들어, PEG화된다). 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 PPG에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 POZ에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 PVP에 접합된다.

[0138] 일부 경우에, 수용성 중합체는 폴리글리세롤(PG)을 포함한다. 일부 경우에, 폴리글리세롤은 과분지형 PG(HPG)(예를 들어, 문헌 [Imran, et al. "Influence of architecture of high molecular weight linear and branched polyglycerols on their biocompatibility and biodistribution," *Biomaterials* **33**:9135-9147 (2012)]에 기재된 바와 같음)이다. 다른 경우에, 폴리글리세롤은 선형 PG(LPG)이다. 추가의 경우에, 폴리글리세롤은 중간 기능성 PG, 선형-블록-과분지형 PG(예를 들어, 문헌 [Wurm et al., "Squaric acid mediated synthesis and biological activity of a library of linear and hyperbranched poly(glycerol)-protein conjugates," *Biomacromolecules* **13**:1161-1171 (2012)]에 기재된 바와 같음), 또는 측쇄 기능성 PG(예를 들어, 문헌 [Li, et al., "Synthesis of linear polyether polyol derivatives as new materials for bioconjugation," *Bioconjugate Chem.* **20**:780-789 (2009)]에 기재된 바와 같음)이다.

[0139] 일부 경우에, 본원에서 설명되는 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TF) 폴리펩티드는 PG, 예를 들어 HPG, LPG, 중간 기능성 PG, 선형-블록-과분지형 PG, 또는 측쇄 기능성 PG에 접합된다. 일부 경우에, 사이토카인은 IL-2 폴리펩티드이다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 PG, 중간 기능성 PG, 선형-블록-과분지형 PG에 접합된다.

[0140] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 분해 가능한 합성 PEG 대체 물질이다. 예시적인 분해 가능한 합성 PEG 대체 물질은 다음을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다: 폴리[올리고(에틸렌 글리콜)메틸 메타크릴레이트](POEGMA); 텔레켈릭(telechelic) 또는 양말단 작용화된 PEG 기반의 거대 단량체의 중합에 의해 생성된 골격 변형된 PEG 유도체; 분해 가능한 결합을 포함하는 공단량체를 포함하는 PEG 유도체, 예컨대 폴리[(에틸렌 옥시)-코-(메틸렌 에틸렌 옥사이드)][P(EO-co-MEO)], 시클릭 케텐 아세탈, 예컨대 5,6-벤조-2-메틸렌-1,3-디옥세판(BMDO), 2-메틸렌-1,3-디옥세판(MDO), 및 OEGMA와 공중합된 2-메틸렌-4-페닐-1,3-디옥솔란(MPDL); 또는 폴리-(ε-카프로락톤)-그라프트-폴리(에틸렌 옥사이드)(PCL-g-PEO).

[0141] 일부 경우에, 본원에서 설명되는 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 분해 가능한 합

성 PEG 대체 물질, 예를 들어 POEGM; 텔레켈릭, 또는 양말단 작용화된 PEG 기반의 거대 단량체의 중합에 의해 생성된 골격 변형된 PEG 유도체; P(EO-co-MEO), 시클릭 케텐 아세탈, BMDO, MDO, 및 OEGMA와 공중합된 MPDL; 또는 PCL-g-PEO에 접합된다. 일부 경우에, 사이토카인은 IL-2 폴리펩티드이다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 분해 가능한 합성 PEG 대체 물질, 예를 들어 POEGM; 텔레켈릭, 또는 양말단 작용화된 PEG 기반의 거대 단량체의 중합에 의해 생성된 골격 변형된 PEG 유도체; P(EO-co-MEO), 시클릭 케텐 아세탈, BMDO, MDO, 및 OEGMA와 공중합된 MPDL; 또는 PCL-g-PEO에 접합된다.

[0142] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(양성 이온)을 포함한다. 예시적인 폴리(양성 이온)은 폴리(술포베타인 메타크릴레이트)(PSBMA), 폴리(카르복시베타인 메타크릴레이트)(PCBMA), 및 폴리(2-메타크릴로일옥시에틸 포스포릴콜린)(PMPC)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 일부 경우에, 본원에서 설명되는 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 폴리(양성 이온), 예컨대 PSBMA, PCBMA 또는 PMPC에 접합된다. 일부 경우에, 사이토카인은 IL-2 폴리펩티드이다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 폴리(양성 이온), 예컨대 PSBMA, PCBMA 또는 PMPC에 접합된다.

[0143] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리카르보네이트를 포함한다. 예시적인 폴리카르보네이트는 펜타플루오로페닐 5-메틸-2-옥소-1,3-디옥산-5-카르복실레이트(MTC-OC_6F_5)를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 본원에서 설명되는 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 폴리카르보네이트, 예컨대 MTC-OC_6F_5에 접합된다. 일부 경우에, 사이토카인은 IL-2 폴리펩티드이다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 폴리카르보네이트, 예컨대 MTC-OC_6F_5에 접합된다.

[0144] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 중합체 하이브리드, 예를 들어 폴리카르보네이트/PEG 중합체 하이브리드, 펩티드/단백질-중합체 접합체, 또는 히드록실 함유 및/또는 양성 이온성 유도체화된 중합체(예를 들어, 히드록실 함유 및/또는 양성 이온성 유도체화된 PEG 중합체)를 포함한다. 일부 경우에, 본원에서 설명되는 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 중합체 하이브리드, 예컨대 폴리카르보네이트/PEG 중합체 하이브리드, 펩티드/단백질-중합체 접합체 또는 히드록실 함유 및/또는 양성 이온성 유도체화된 중합체(예를 들어, 히드록실 함유 및/또는 양성 이온성 유도체화된 PEG 중합체)에 접합된다. 일부 경우에, 사이토카인은 IL-2 폴리펩티드이다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 중합체 하이브리드, 예컨대 폴리카르보네이트/PEG 중합체 하이브리드, 펩티드/단백질-중합체 접합체 또는 히드록실 함유 및/또는 양성 이온성 유도체화된 중합체(예를 들어, 히드록실 함유 및/또는 양성 이온성 유도체화된 PEG 중합체)에 접합된다.

[0145] 일부 경우에, 수용성 중합체는 폴리사카라이드를 포함한다. 예시적인 폴리사카라이드는 덱스트란, 폴리시알산(PSA), 히알루론산(HA), 아밀로스, 헤파린, 헤파란 술페이트(HS), 덱스트린 또는 히드록시에틸-전분(HES)을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 폴리사카라이드에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 덱스트란에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 PSA에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 HA에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 아밀로스에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 헤파린에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 HS에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 덱스트린에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 HES에 접합된다.

[0146] 일부 경우에, 수용성 중합체는 글리칸을 포함한다. 글리칸의 예시적인 클래스는 N-연결된 글리칸, O-연결된 글리칸, 당지질, O-GlcNAc 및 글리코사미노글리칸을 포함한다. 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 글리칸에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 N-연결된 글리칸에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 O-연결된 글리칸에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 당지질에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 O-GlcNAc에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 글리코사미노글리칸에 접합된다.

[0147] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리옥사졸린 중합체를 포함한다. 폴리옥사졸린 중합체는 선형 합성 중합체이며, PEG와 유사하게 낮은 다분산도를 포함한다. 일부 경우에, 폴리옥사졸린 중합체는 평균 분자량을 특징으로 하는 다분산된 폴리옥사졸린 중합체이다. 일부 경우에, 폴리옥사졸린 중합체의 평균 분자량은 예를 들어 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500, 7000, 7500, 8000, 10,000, 12,000, 20,000, 35,000, 40,000, 50,000, 60,000, 100,000, 200,000, 300,000, 400,000 또는 500,000 Da을 포함한다. 일부 경우에, 폴리옥사졸린 중합체는 폴리(2-메틸 2-옥사졸린)(PMOZ), 폴리(2-에틸 2-옥사졸린)(PEOZ) 또는 폴리(2-프로필 2-옥사졸린)(PPOZ)을 포함한다. 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨,

IFN, 또는 TNF) 폴리펩티드는 폴리옥사졸린 중합체에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 폴리옥사졸린 중합체에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 PMOZ에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 PEOZ에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 PPOZ에 접합된다.

[0148] 일부 경우에, 수용성 중합체는 폴리아크릴산 중합체를 포함한다. 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 폴리아크릴산 중합체에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 폴리아크릴산 중합체에 접합된다.

[0149] 일부 경우에, 수용성 중합체는 폴리아민을 포함한다. 폴리아민은 2개 이상의 1차 아미노기를 포함하는 유기 중합체이다. 일부 실시양태에서, 폴리아민은 분지형 폴리아민, 선형 폴리아민 또는 시클릭 폴리아민을 포함한다. 일부 경우에, 폴리아민은 저분자량 선형 폴리아민이다. 예시적인 폴리아민은 푸트레신, 카다베린, 스페르미딘, 스페르민, 에틸렌 디아민, 1,3-디아미노프로판, 헥사메틸렌디아민, 테트라에틸메틸렌디아민 및 피페라진을 포함한다. 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 폴리아민에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 폴리아민에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 푸트레신, 카다베린, 스페르미딘, 스페르민, 에틸렌 디아민, 1,3-디아미노프로판, 헥사메틸렌디아민, 테트라에틸메틸렌디아민, 또는 피페라진에 접합된다.

[0150] 일부 경우에, 수용성 중합체는 미국 특허 제7,744,861호, 제8,273,833호 및 제7,803,777호에 기재되어 있다. 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 미국 특허 제7,744,861호, 제8,273,833호 또는 제7,803,777호에 기재된 링커에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 미국 특허 제7,744,861호, 제8,273,833호 또는 제7,803,777호에 기재된 링커에 접합된다.

[0151] *단백질*

[0152] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 모이어티는 단백질 또는 이의 결합 단편이다. 예시적인 단백질은 알부민, 트랜스페린 또는 트랜스티레틴을 포함한다. 일부 경우에, 단백질 또는 이의 결합 단편은 항체 또는 이의 결합 단편을 포함한다. 일부 경우에, 사이토카인 접합체는 단백질 또는 이의 결합 단편을 포함한다. 일부 경우에, 단백질 또는 이의 결합 단편을 포함하는 IL-2 접합체는 증가된 혈청 반감기 및/또는 안정성을 갖는다. 일부 경우에, 단백질 또는 이의 결합 단편을 포함하는 IL-2 접합체는 하나 이상의 IL-2R 서브유닛과의 감소된 IL-2 상호작용을 갖는다. 추가의 경우에, 단백질 또는 이의 결합 단편은 하나 이상의 IL-2R 서브유닛과의 IL-2 상호작용을 차단하거나, 또는 IL-2Rβγ 신호전달 복합체의 조립에 영향을 끼친다.

[0153] 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 알부민이다. 알부민은 수용성 구형 단백질의 패밀리이다. 이것은 모든 혈장 단백질의 약 55-60%를 차지하고, 혈장에서 흔히 발견된다. 인간 혈청 알부민(HSA)은 3차 구조가 도메인 I(아미노산 잔기 1-195), 도메인 II(아미노산 잔기 196-383) 및 도메인 III(아미노산 잔기 384-585))의 3개의 도메인으로 나뉘어진 585개 아미노산의 폴리펩티드이다. 각각의 도메인은 결합 부위를 추가로 포함하며, 이것은 장쇄 및 중간쇄 지방산, 빌리루빈 또는 헤민과 같은 내인성 리간드, 또는 헤테로시클릭 또는 방향족 화합물과 같은 외인성 화합물과 가역적으로 또는 비가역적으로 상호작용할 수 있다.

[0154] 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 알부민에 접합된다. 일부 경우에, 사이토카인 폴리펩티드는 인간 혈청 알부민(HSA)에 접합된다. 추가의 경우에, 사이토카인 폴리펩티드는 알부민의 기능적 단편에 접합된다.

[0155] 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 알부민에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 인간 혈청 알부민(HSA)에 접합된다. 추가의 경우에, IL-2 폴리펩티드는 알부민의 기능적 단편에 접합된다.

[0156] 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 트랜스페린이다. 트랜스페린은 크기가 약 80 kDa인 679개 아미노산의 폴리펩티드이며, 하나는 N-말단 도메인에 있고 다른 하나는 C-말단 도메인에 있는 2개의 Fe^{3+} 결합 부위를 포함한다. 일부 경우에, 인간 트랜스페린의 반감기는 약 7-12일이다.

[0157] 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 트랜스페린에 접합된다. 일부 경우에, 사이토카인 폴리펩티드는 인간 트랜스페린에 접합된다. 추가의 경우에, 사이토카인 폴리펩티드는 트랜스페린의 기능적 단편에 접합된다.

[0158] 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 트랜스페린에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 인간 트랜스페린에 접합된다. 추가의 경우에, IL-2 폴리펩티드는 트랜스페린의 기능적 단편에 접합된다.

[0159] 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 트랜스티레틴(TTR)이다. 트랜스티레틴은 혈청 및 뇌척수액에 위치하는 수송 단백질로서, 갑상선 호르몬 티록신(T_4) 및 레티놀에 결합된 레티놀 결합 단백질을 수송한다.

[0160] 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 트랜스티레틴에 접합된다(그의 말단 중의 하나를 통해 또는 내부 힌지 영역을 통해). 일부 경우에, 사이토카인 폴리펩티드는 트랜스티레틴의 기능적 단편에 접합된다.

[0161] 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 트랜스티레틴에 접합된다(그의 말단 중의 하나를 통해 또는 내부 힌지 영역을 통해). 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 트랜스티레틴의 기능적 단편에 접합된다.

[0162] 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 항체 또는 이의 결합 단편이다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 결합 단편, 뮤린 항체 또는 이의 결합 단편, 키메라 항체 또는 이의 결합 단편, 모노클로날 항체 또는 이의 결합 단편, 1가 Fab', 2가 Fab_2, $F(ab)'_3$ 단편, 단일쇄 가변 단편(scFv), 비스-scFv, $(scFv)_2$, 디아바디, 미니바디, 나노바디, 트리아바디, 테트라바디, 휴마바디, 디술파이드 안정화된 Fv 단백질(dsFv), 단일 도메인 항체(sdAb), Ig NAR, 카멜리드 항체 또는 이의 결합 단편, 이중 특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 또는 화학적으로 변형된 이의 유도체를 포함한다.

[0163] 일부 경우에, 접합 모이어티는 scFv, 비스-scFv, $(scFv)_2$, dsFv 또는 sdAb를 포함한다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 scFv를 포함한다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 비스-scFv를 포함한다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 $(scFv)_2$를 포함한다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 dsFv에 대한 융합체를 포함한다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 sdAb를 포함한다.

[0164] 일부 경우에, 접합 모이어티는 항체, 예를 들어 IgG, IgA, IgM, IgE 또는 IgD의 Fc 부분을 포함한다. 일부 경우에, 모이어티는 IgG(예를 들어, IgG_1, IgG_3 또는 IgG_4)의 Fc 부분을 포함한다.

[0165] 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 항체 또는 이의 결합 단편에 접합된다. 일부 경우에, 사이토카인 폴리펩티드는 인간화 항체 또는 이의 결합 단편, 뮤린 항체 또는 이의 결합 단편, 키메라 항체 또는 이의 결합 단편, 모노클로날 항체 또는 이의 결합 단편, 1가 Fab', 2가 Fab_2, $F(ab)'_3$ 단편, 단일쇄 가변 단편(scFv), 비스-scFv, $(scFv)_2$, 디아바디, 미니바디, 나노바디, 트리아바디, 테트라바디, 휴마바디, 디술파이드 안정화된 Fv 단백질(dsFv), 단일 도메인 항체(sdAb), Ig NAR, 카멜리드 항체 또는 이의 결합 단편, 이중 특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 또는 화학적으로 변형된 이의 유도체에 접합된다. 추가의 경우에, 사이토카인 폴리펩티드는 항체의 Fc 부분에 접합된다. 추가의 경우에, 사이토카인 폴리펩티드는 IgG(예를 들어, IgG_1, IgG_3 또는 IgG_4)의 Fc 부분에 접합된다.

[0166] 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 항체 또는 이의 결합 단편에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 인간화 항체 또는 이의 결합 단편, 뮤린 항체 또는 이의 결합 단편, 키메라 항체 또는 이의 결합 단편, 모노클로날 항체 또는 이의 결합 단편, 1가 Fab', 2가 Fab_2, $F(ab)'_3$ 단편, 단일쇄 가변 단편(scFv), 비스-scFv, $(scFv)_2$, 디아바디, 미니바디, 나노바디, 트리아바디, 테트라바디, 휴마바디, 디술파이드 안정화된 Fv 단백질(dsFv), 단일 도메인 항체(sdAb), Ig NAR, 카멜리드 항체 또는 이의 결합 단편, 이중 특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 또는 화학적으로 변형된 이의 유도체에 접합된다. 추가의 경우에, IL-2 폴리펩티드는 항체의 Fc 부분에 접합된다. 추가의 경우에, IL-2 폴리펩티드는 IgG(예를 들어, IgG_1, IgG_3 또는 IgG_4)의 Fc 부분에 접합된다.

[0167] 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩티드는 수용성 중합체(예를 들어, PEG) 및 항체 또는 이의 결합 단편에 접합된다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 결합 단편은 인간화 항체 또는 이의 결합 단편, 뮤린 항체 또는 이의 결합 단편, 키메라 항체 또는 이의 결합 단편, 모노클로날 항체 또는 이의 결합 단편, 1가 Fab', 2가 Fab_2, $F(ab)'_3$ 단편, 단일쇄 가변 단편(scFv), 비스-scFv, $(scFv)_2$, 디아바디, 미니바디, 나노바디, 트리아바디, 테트라바디, 휴마바디, 디술파이드 안정화된 Fv 단백질(dsFv), 단일 도메인 항체(sdAb), Ig NAR, 카멜리드 항체 또는 이의 결합 단편, 이중 특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 또는 화학적으로 변형된 이의 유도체를 포함한다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 결합 단편은 scFv, 비스-scFv, $(scFv)_2$, dsFv 또는 sdAb를 포함한다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 결합 단편은 scFv를 포함한다. 일부 경우에, 항체 또는 이의 결합 단편은 IL-2 접합체를 관심 있는 표적 세포로 안내하고, 수용성 중합체는 안정성 및/또는 혈청 반감기를 향상시킨다.

[0168] 일부 경우에, 하나 이상의 IL-2 폴리펩티드-수용성 중합체(예를 들어, PEG) 접합체는 추가로 항체 또는 이의 결합 단편에 결합된다. 일부 경우에, IL-2 접합체 대 항체의 비는 약 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1 또는 12:1이다. 일부 경우에, IL-2 접합체 대 항체의 비는 약 1:1이다. 다른 경우에, IL-2 접합체 대 항체의 비는 약 2:1, 3:1 또는 4:1이다. 추가의 경우에, IL-2 접합체 대 항체의 비는 약 6:1 이상이다.

[0169] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 IL-2 폴리펩티드-수용성 중합체(예를 들어, PEG) 접합체는 항체 또는 이의 결합 단편에 직접 결합된다. 다른 경우에, IL-2 접합체는 링커를 사용하여 항체 또는 이의 결합 단편에 간접적으로 결합된다. 예시적인 링커는 동종이기능성 링커, 이종이기능성 링커, 말레이미드 기반 링커, 제로-트레이스(zero-trace) 링커, 자가 희생성(self-immolative) 링커, 스페이서 등을 포함한다.

[0170] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 IL-2 폴리펩티드-수용성 중합체(예를 들어, PEG) 접합체의 IL-2 폴리펩티드 부분에 직접 또는 간접적으로 결합된다. 이러한 경우, 항체의 IL-2 폴리펩티드에 대한 접합 부위는 IL-2 폴리펩티드와 IL-2Rβγ의 결합을 방해하지 않는 부위에 있다. 추가의 경우에, IL-2 폴리펩티드에 대한 항체의 접합 부위는 IL-2 폴리펩티드와 IL-2Rβγ의 결합을 부분적으로 차단하는 부위에 있다. 다른 실시양태에서, 항체 또는 이의 결합 단편은 IL-2 폴리펩티드-수용성 중합체(예를 들어, PEG) 접합체의 수용성 중합체 부분에 직접 또는 간접적으로 결합된다.

[0171] *펩티드*

[0172] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 모이어티는 펩티드이다. 일부 경우에, 펩티드는 비구조화된 펩티드이다. 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 펩티드에 접합된다. 일부 경우에, 펩티드를 포함하는 IL-2 접합체는 증가된 혈청 반감기 및/또는 안정성을 갖는다. 일부 경우에, 펩티드를 포함하는 IL-2 접합체는 하나 이상의 IL-2R 서브유닛과의 감소된 IL-2 상호작용을 갖는다. 추가의 경우에, 펩티드는 하나 이상의 IL-2R 서브유닛과의 IL-2 상호작용을 차단한다.

[0173] 일부 경우에, 접합 모이어티는 XTEN™ 펩티드(Amunix Operating Inc.)이고, 변형은 XTEN화(XTENylation)로 지칭된다. XTEN화는 관심 있는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산과, 6개의 아미노산, 즉 Ala, Glu, Gly, Ser 및 Thr의 상이한 비율을 포함하는 긴 구조화되지 않은 친수성 펩티드인 XTEN™ 펩티드(Amunix Operating Inc.)를 코딩하는 핵산의 유전자 융합이다. 일부 경우에, XTEN™ 펩티드는 관심 있는 폴리펩티드와 조합하여 발현, 유전자 안정성, 용해도, 응집 내성, 반감기 증가, 효능 증가 및/또는 시험관내 활성 증가와 같은 특성에 기초하여 선택된다. 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 XTEN 펩티드에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 XTEN 펩티드에 접합된다.

[0174] 일부 경우에, 접합 모이어티는 글리신 풍부 호모아미노산 중합체(HAP)이고, 변형은 HAP화(HAPylation)으로 지칭된다. HAP화는 관심 있는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산과 글리신이 풍부한 호모아미노산 중합체(HAP)를 코딩하는 핵산의 유전자 융합이다. 일부 경우에, HAP 중합체는 $(Gly_4Ser)_n$ 반복 모티프(서열 번호 3)를 포함하고, 때로는 약 50, 100, 150, 200, 250, 300개 또는 그 초과의 잔기 길이를 갖는다. 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 HAP에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 HAP에 접합된다.

[0175] 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 PAS 폴리펩티드이고, 변형은 PAS화(PASylation)로 지칭된다. PAS화는 관심 있는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산과 PAS 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 유전자 융합이다. PAS 폴리펩티드는 Pro, Ala 및 Ser 잔기로 이루어진 친수성의 하전되지 않은 폴리펩티드이다. 일부 경우에, PAS 폴리펩티드의 길이는 적어도 약 100, 200, 300, 400, 500 또는 600개 아미노산이다. 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 PAS 폴리펩티드에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 PAS 폴리펩티드에 접합된다.

[0176] 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 엘라스틴 유사 폴리펩티드(ELP)이고, 변형은 ELP화(ELPylation)로 지칭된다. ELP화는 관심 있는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산과 엘라스틴 유사 폴리펩티드(ELP)를 코딩하는 핵산의 유전자 융합이다. ELP는 VPGxG 반복 모티프(서열 번호 4)를 포함하고, 여기서 x는 프롤린을 제외한 임의의 아미노산이다. 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 ELP에 접합된다. 일부 경우에, IL-2 폴리펩티드는 ELP에 접합된다.

[0177] 일부 실시양태에서, 접합 모이어티는 CTP 펩티드이다. CTP 펩티드는 31개의 아미노산 잔기 펩티드인 FQSSSS*KAPPPS*LPSPS*RLPGPS*DTPILPQ(서열 번호 5)를 포함하고, 여기서 S*는 O-글리코실화 부위(OPKO)를 나타낸다. 일부 경우에, CTP 펩티드는 사이토카인 폴리펩티드(예를 들어, IL-2 폴리펩티드)에 유전적으로 융합된다.

일부 경우에, 사이토카인 폴리펩티드(예를 들어, IL-2 폴리펩티드)는 CTP 펩티드에 접합된다.

[0178] 일부 실시양태에서, 사이토카인(예를 들어, IL-2 폴리펩티드)은 글루타밀화에 의해 변형된다. 글루타밀화(또는 폴리글루타밀화)는 글루타메이트의 가역적인 번역 후 변형이고, 여기서 글루타메이트의 γ-카르복시기는 α-카르복시기가 폴리글루타메이트 사슬로 연장되는 유리 글루타메이트의 아미노기와 펩티드 유사 결합을 형성한다.

[0179] 일부 실시양태에서, 사이토카인(예를 들어, IL-2 폴리펩티드)은 젤라틴 유사 단백질(GLK) 중합체에 의해 변형된다. 일부 경우에, GLK 중합체는 Gly-Xaa-Yaa의 다수의 반복체를 포함하며, 여기서 Xaa 및 Yaa는 각각 프롤린 및 4-히드록시 프롤린을 각각 포함한다. 일부 경우에, GLK 중합체는 아미노산 잔기 Pro, Gly, Glu, Qln, Asn, Ser 및 Lys를 추가로 포함한다. 일부 경우에, GLK 중합체의 길이는 약 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 150개 잔기 또는 그 초과이다.

[0180] *추가의 접합 모이어티*

[0181] 일부 경우에, 접합 모이어티는 세포외 바이오마커를 포함한다. 일부 경우에, 세포외 바이오마커는 종양 항원이다. 일부 경우에, 예시적인 세포외 바이오마커는 CD19, PSMA, B7-H3, B7-H6, CD70, CEA, CSPG4, EGFRvIII, EphA3, EpCAM, EGFR, ErbB2 (HER2), FAP, FRα, GD2, GD3, 루이스(Lewis)-Y, 메조텔린, Muc1, Muc 16, ROR1, TAG72, VEGFR2, CD11, Gr-1, CD204, CD16, CD49b, CD3, CD4, CD8, 및 B220을 포함한다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 사이토카인(예를 들어, IL-2)에 결합 또는 접합된다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 예를 들어 사이토카인(예를 들어, IL-2)의 N-말단 또는 C-말단에서 유전적으로 융합된다.

[0182] 일부 경우에, 접합 모이어티는 번역 후 변형에 의해 생성된 분자를 포함한다. 일부 경우에, 번역 후 변형의 예는 미리스토일화, 팔미토일화, 이소프레닐화(또는 프레닐화)(예를 들어, 파르네실화 또는 게라닐게라닐화), 글리피화(glypiation), 아실화(예를 들어, O-아실화, N-아실화, S-아실화), 알킬화(예를 들어. 메틸 또는 에틸 기와 같은 알킬기의 추가), 아미드화, 글리코실화, 히드록실화, 요오드화, 뉴클레오티드 부가, 산화, 인산화, 숙시닐화, 황화, 당화, 카르바밀화, 글루타밀화 또는 탈아미드화를 포함한다. 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, IL-2)은 번역 후 변형, 예를 들어 미리스토일화, 팔미토일화, 이소프레닐화(또는 프레닐화)(예를 들어, 파르네실화 또는 게라닐게라닐화), 글리피화, 아실화(예를 들어, O-아실화, N-아실화, S-아실화), 알킬화(예를 들어. 메틸 또는 에틸 기와 같은 알킬기의 추가), 아미드화, 글리코실화, 히드록실화, 요오드화, 뉴클레오티드 부가, 산화, 인산화, 숙시닐화, 황화, 당화, 카르바밀화, 글루타밀화 또는 탈아미드화를 포함한다.

[0183] **접합**

[0184] *링커*

[0185] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 사이토카인 폴리펩티드(예를 들어, IL-2 폴리펩티드)에 대해 접합 모이어티를 접합 또는 결합시키기 위한 유용한 기능성 반응성 기는 예를 들어 0차(zero order) 이상의 링커를 포함한다. 일부 경우에, 본원에서 설명되는 인터루킨에 통합되는 비천연 아미노산은 기능성 반응성 기를 포함한다. 일부 경우에, 링커는 본원에서 설명되는 인터루킨에 통합되는 비천연 아미노산과 반응하는 기능성 반응성 기를 포함한다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 본원에서 설명되는 인터루킨에 통합되는 비천연 아미노산과 반응하는 기능성 반응성 기를 포함한다. 일부 경우에, 접합 모이어티는 본원에서 설명되는 링커(선택적으로 사이토카인 펩티드에 미리 부착된)와 반응하는 기능성 반응성 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 본원에서 설명되는 사이토카인 펩티드 내의 천연 아미노산과 반응하는 반응성 기를 포함한다. 일부 경우에, 고차 링커는 다음을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다: 로만트 시약 디티오비스(숙신이미딜 프로피오네이트) DSP, 3'3'-디티오비스(술포숙신이미딜 프로피오네이트)(DTSSP), 디숙신이미딜 수베레이트(DSS), 비스(술포숙신이미딜)수베레이트(BS), 디숙신이미딜 타르트레이트(DST), 디술포숙신이미딜 타르트레이트(술포 DST), 에틸렌 글리코비스(숙신이미딜숙시네이트)(EGS), 디숙신이미딜 글루타레이트(DSG), N,N'-디숙신이미딜 카르보네이트(DSC), 디메틸 아디피미데이트(DMA), 디메틸 피멜리미데이트(DMP), 디메틸 수베리미데이트(DMS), 디메틸-3,3'-디티오비스프로피온이미데이트(DTBP), 1,4-디-(3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미도)부탄(DPDPB), 비스말레이미도헥산(BMH), 아릴 할라이드 함유 화합물(DFDNB), 예를 들어 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠 또는 1,3-디플루오로-4,6-디니트로벤젠, 4,4'-디플루오로-3,3'-디니트로페닐술폰(DFDNPS), 비스-[β-(4-아지도살리실아미도)에틸]디술파이드(BASED), 포름알데히드, 글루타르알데히드, 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르, 아디프산 디히드라지드, 카르보히드라지드, o-톨루이딘, 3,3'-디메틸벤지딘, 벤지딘, α,α'-p-디아미노디페닐, 디요오도-p-크실렌 술폰산, N,N'-에틸렌-비스(요오도아세트아미드) 또는 N,N'-헥사메틸렌-비스(요오도아세트아미드).

[0186] 일부 실시양태에서, 이기능성 링커는 이종이기능성 링커를 포함한다. 예시적인 이종이기능성 링커는 다음을 포

함하지만, 이로 제한되지 않는다: 아민 반응성 및 술프히드릴 가교결합제, 예컨대 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(sPDP), 장쇄 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(LC-sPDP), 수용성 장쇄 N-숙신이미딜 3-(2-피리딜디티오)프로피오네이트(술포-LC-sPDP), 숙신이미딜옥시카르보닐-α-메틸-α-(2-피리딜디티오)톨루엔(sMPT), 술포숙신이미딜-6-[α-메틸-α-(2-피리딜디티오)톨루아미도]헥사노에이트(술포-LC-sMPT), 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(sMCC), 술포숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(술포-sMCC), m-말레이미도벤조일-N-히드록시숙신이미드 에스테르(MB), m-말레이미도벤조일-N-히드록시술포숙신이미드 에스테르(술포-MB), N-숙신이미딜(4-요오도아세틸)아미노벤조에이트(sIAB), 술포숙신이미딜(4-요오도아세틸)아미노벤조에이트(술포-sIAB), 숙신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트(sMPB), 술포숙신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트(술포-sMPB), N-(γ-말레이미도부티릴옥시)숙신이미드 에스테르(GMB), N-(γ-말레이미도부티릴옥시)술포숙신이미드 에스테르(술포-GMB), 숙신이미딜 6-((요오도아세틸)아미노)헥사노에이트(sIAX), 숙신이미딜 6-[6-(((요오도아세틸)아미노)헥사노일)아미노]헥사노에이트(sIAXX), 숙신이미딜 4-(((요오도아세틸)아미노)메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(sIAC), 숙신이미딜 6-((((((4-요오도아세틸)아미노)메틸)시클로헥산-1-카르보닐)아미노)헥사노에이트(sIACX), p-니트로페닐 요오도아세테이트(NPIA), 카르보닐 반응성 및 술프히드릴 반응성 가교결합제, 예컨대 4-(4-N-말레이미도페닐)부티르산 히드라지드(MPBH), 4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실-히드라지드-8(M_2C_2H), 3-(2-피리딜디티오)프로피오닐 히드라지드(PDPH), N-히드록시숙신이미딜-4-아지도살리실산(NHs-AsA), N-히드록시술포숙신이미딜-4-아지도살리실산(술포-NHs-AsA), 술포숙신이미딜-(4-아지도살리실아미도)헥사노에이트(술포-NHs-LC-AsA), 술포숙신이미딜-2-(p-아지도살리실아미도)에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(sAsD), N-히드록시숙신이미딜-4-아지도벤조에이트(HsAB), N-히드록시술포숙신이미딜-4-아지도벤조에이트(술포-HsAB), N-숙신이미딜-6-(4'-아지도-2'-니트로페닐아미노)헥사노에이트(sANPAH), 술포숙신이미딜-6-(4'-아지도-2'-니트로페닐아미노)헥사노에이트(술포-sANPAH), N-5-아지도-2-니트로벤조일옥시숙신이미드(ANB-NOs), 술포숙신이미딜-2-(m-아지도-o-니트로벤즈아미도)-에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(sAND), N-숙신이미딜-4(4-아지도페닐)1,3'-디티오프로피오네이트(sADP), N-술포숙신이미딜(4-아지도페닐)-1,3'-디티오프로피오네이트(술포-sADP), 술포숙신이미딜 4-(p-아지도페닐)부티레이트(술포-sAPB), 술포숙신이미딜 2-(7-아지도-4-메틸쿠마린-3-아세트아미드)에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(sAED), 술포숙신이미딜 7-아지도-4-메틸쿠마인-3-아세테이트(술포-sAMCA), p-니트로페닐 디아조피루베이트(pNPDP), p-니트로페닐-2-디아조-3,3,3-트리플루오로프로피오네이트(PNP-DTP), 1-(p-아지도살리실아미도)-4-(요오도아세트아미도)부탄(AsIB), N-[4-(p-아지도살리실아미도)부틸]-3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미드(APDP), 벤조페논-4-요오도아세트아미드, p-아지도벤조일 히드라지드(ABH), 4-(p-아지도살리실아미도)부틸아민(AsBA), 또는 p-아지도페닐 글리옥살(APG).

[0187] 일부 경우에, 반응성 기능성 기는 결합 모이어티 상에(예를 들어, 접합 모이어티 상에 또는 IL-2 상에) 존재하는 친전자성 기에 반응성인 친핵성 기를 포함한다. 예시적인 친전자성 기는 카르보닐 기, 예컨대 알데히드, 케톤, 카르복실산, 에스테르, 아미드, 에논, 아실 할라이드 또는 산 무수물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응성 기능성 기는 알데히드이다. 예시적인 친핵성 기는 히드라지드, 옥심, 아미노, 히드라진, 티오세미카르바존, 히드라진 카르복실레이트 및 아릴히드라지드를 포함한다.

[0188] 일부 실시양태에서, 링커는 절단가능한 링커이다. 일부 실시양태에서, 절단가능한 링커는 디펩티드 링커이다. 일부 실시양태에서, 디펩티드 링커는 발린-시트룰린(Val-Cit), 페닐알라닌-라이신(Phe-Lys), 발린-알라닌(Val-Ala) 및 발린-라이신(Val-Lys)이다. 일부 실시양태에서, 디펩티드 링커는 발린-시트룰린이다.

[0189] 일부 실시양태에서, 링커는 예를 들어 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 초과의 아미노산을 포함하는 펩티드 링커이다. 일부 경우에, 펩티드 링커는 최대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 또는 그 미만의 아미노산을 포함한다. 추가의 경우에, 펩티드 링커는 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개의 아미노산을 포함한다.

[0190] 일부 실시양태에서, 링커는 자가 희생성 링커 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자기 희생성 링커 모이어티는 p-아미노벤질 알코올(PAB), p-아미노벤질옥시카르보닐(PABC), 또는 이의 유도체 또는 유사체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 디펩티드 링커 모이어티 및 자기 희생성 링커 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자가 희생성 링커 모이어티는 미국 특허 제9089614호 및 WIPO 출원 공개 WO2015038426에 기재된 것이다.

[0191] 일부 실시양태에서, 절단가능한 링커는 글루쿠로나이드이다. 일부 실시양태에서, 절단가능한 링커는 산 절단가

능한 링커이다. 일부 실시양태에서, 산 절단가능한 링커는 히드라진이다. 일부 실시양태에서, 절단가능한 링커는 환원성 링커이다.

[0192] 일부 실시양태에서, 링커는 말레이미드 기를 포함한다. 일부 경우에, 말레이미드 기는 또한 말레이미드 스페이서로도 지칭된다. 일부 경우에, 말레이미드 기는 말레이미도카프로일(mc)을 형성하는 카프로산을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 링커는 말레이미도카프로일(mc)을 포함한다. 일부 경우에, 링커는 말레이미도카프로일(mc)이다. 다른 경우에, 말레이미드 기는 상기 설명된 말레이미도메틸 기, 예컨대 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(sMCC) 또는 술포숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(술포-sMCC)를 포함한다.

[0193] 일부 실시양태에서, 말레이미드 기는 자가 안정화 말레이미드이다. 일부 경우에, 자가 안정화 말레이미드는 디아미노프로피온산(DPR)을 이용하여 말레이미드에 인접한 염기성 아미노기를 통합시켜 티오숙신이미드 고리 가수분해의 분자 내 촉매 작용을 제공함으로써, 말레이미드가 역-마이클(retro-Michael) 반응을 통해 제거 반응을 겪는 것을 제거한다. 일부 경우에, 자가 안정화 말레이미드는 문헌 [Lyon, *et al.,* "Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates," *Nat. Biotechnol.* **32**(10):1059-1062 (2014)]에 기재된 말레이미드 기이다. 일부 경우에, 링커는 자가 안정화 말레이미드이다. 일부 경우에, 링커는 자가 안정화 말레이미드이다.

[0194] *접합 화학*

[0195] 다양한 접합 반응이 링커, 접합 모이어티, 및 본원에서 설명되는 사이토카인 펩티드에 통합되는 비천연 아미노산을 접합하기 위해 사용된다. 이러한 접합 반응은 종종 "바이오르소고날" 반응과 같은 수성 조건과 상용성이다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 촉매, 빛, 또는 링커, 접합 모이어티 또는 비천연 아미노산에서 발견되는 반응성 화학기와 같은 화학 시약에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 효소에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 사용되는 접합 반응은 문헌 [Gong, Y., Pan, L. Tett. Lett. 2015, 56, 2123]에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 사용되는 접합 반응은 문헌 [Chen, X.; Wu. Y-W. Org. Biomol. Chem. 2016, 14, 5417]에 기재되어 있다.

[0196] 본원에서 설명되는 일부 실시양태에서, 접합 반응은 케톤 또는 알데히드와 친핵체의 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 케톤과 아미노옥시기와의 반응으로 옥심을 형성하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 케톤과 아릴 또는 헤테로아릴 아민기와의 반응으로 이민을 형성하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 알데히드와 아릴 또는 헤테로아릴 아민기와의 반응으로 이민을 형성하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 옥심을 통해 부착된 링커 또는 접합 모이어티를 포함하는 사이토카인 펩티드를 생성한다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 알데히드 또는 케톤과 트립타민 친핵체의 픽텟-스펭글러(Pictet-Spengler) 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 히드라지노-픽텟-스펭글러 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 픽텟-스펭글러 라이게이션을 포함한다.

[0197] 본원에서 설명되는 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 아지드와 포스핀의 반응(슈타우딩거 라이게이션)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스핀은 아릴 포스핀이다. 일부 실시양태에서, 아릴 포스핀은 오르토 에스테르기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 포스핀은 구조 메틸 2-(디페닐포스파닐)벤조에이트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 아릴아미드를 통해 부착된 링커 또는 접합 모이어티를 포함하는 사이토카인 펩티드를 생성한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 아미드를 통해 부착된 링커 또는 접합 모이어티를 포함하는 사이토카인 펩티드를 생성한다.

[0198] 본원에서 설명되는 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 1,3-이극성 고리 부가 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1,3-이극성 고리 부가 반응은 아지드와 포스핀의 반응("클릭" 반응)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 구리에 의해 촉매된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 트리아졸을 통해 부착된 링커 또는 접합 모이어티를 포함하는 사이토카인 펩티드를 생성한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 아지드와 변형된 올레핀의 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 아지드와 변형된 알킨의 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 아지드와 시클로알킨, 예를 들어 OCT, DIFO, DIFBO, DIBO, BARAC, TMTH 또는 다른 변형된 시클로알킨과의 반응을 포함하고, 이들의 구조는 문헌 [Gong, Y., Pan, L. Tett. Lett. 2015, 56, 2123]에 제시되어 있다. 일부 실시양태에서, 1,3-이극성 고리 부가 반응은 광에 의해 촉매된다("포토클릭"). 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 말단 알릴기와 테트라졸 및 광의 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 말단 알키닐기와 테트라졸 및 광의 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 O-

알릴 아미노산과 테트라진 및 광의 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 O-알릴 티로신과 테트라진 및 광의 반응을 포함한다.

[0199] 본원에서 설명되는 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 디엔 및 친디엔체(dienophile)를 포함하는 역전자 요구형 고리 부가 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 디엔은 테트라진을 포함한다. 일부 실시양태에서, 친디엔체는 알켄을 포함한다. 일부 실시양태에서, 친디엔체는 알킨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 알킨은 변형된 알킨이다. 일부 실시양태에서, 알켄은 변형된 디엔이다. 일부 실시양태에서, 알킨은 트랜스-시클로옥틴이다. 일부 실시양태에서, 알킨은 시클로옥텐이다. 일부 실시양태에서, 알켄은 시클로프로펜이다. 일부 실시양태에서, 알켄은 플루오로시클로프로펜이다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 고리에 2개의 질소 원자를 포함하는 6원 고리 헤테로사이클을 통해 링커 또는 접합 모이어티에 부착된 사이토카인 펩티드의 형성을 유도한다.

[0200] 본원에서 설명되는 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 올레핀 복분해 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 알켄 및 알킨과 루테늄 촉매의 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 2개의 알켄과 루테늄 촉매의 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 2개의 알킨과 루테늄 촉매의 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 알켄 또는 알킨과 루테늄 촉매 및 알릴기를 포함하는 아미노산의 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 알켄 또는 알킨과 루테늄 촉매 및 알릴 술파이드 또는 셀레나이드를 포함하는 아미노산의 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 루테늄 촉매는 호베다-그루브스(Hoveda-Grubbs) 2세대 촉매이다. 일부 실시양태에서, 올레핀 복분해 반응은 하나 이상의 변형된 알켄 또는 알킨의 반응을 포함한다.

[0201] 본원에서 설명되는 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 교차 커플링 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 교차 커플링 반응은 이리듐, 금, 루테늄, 로듐, 팔라듐, 니켈, 백금 또는 다른 전이 금속 촉매와 같은 전이 금속 촉매 및 하나 이상의 리간드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 전이 금속 촉매는 수용성이다. 본원에서 설명되는 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 스즈키-미야우라 교차 커플링 반응을 포함한다. 본원에서 설명되는 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 아릴 할라이드(또는 트리플레이트 또는 토실레이트), 아릴 또는 알케닐 보론산 및 팔라듐 촉매의 반응을 포함한다. 본원에서 설명되는 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 소노가시라 교차 커플링 반응을 포함한다. 본원에서 설명되는 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 아릴 할라이드(또는 트리플레이트 또는 토실레이트), 알킨 및 팔라듐 촉매의 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 교차 커플링 반응은 탄소-탄소 결합을 통해 사이토카인 펩티드에 대한 링커 또는 접합 모이어티의 부착을 유발한다.

[0202] 본원에서 설명되는 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 접합 전에 반응성 기의 탈보호 또는 "언케이징(uncaging)" 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 빛을 사용한 반응성 기의 언케이징, 이어서 실시되는 접합 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 하나 이상의 니트로기를 포함하는 아랄킬 모이어티로 보호된다. 일부 실시양태에서, 반응성 기의 언케이징은 유리 아민, 술파이드 또는 다른 반응성 기를 생성한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 전이 금속 촉매를 사용한 반응성 기의 언케이징, 이어서 실시되는 접합 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 전이 금속 촉매는 팔라듐 및 하나 이상의 리간드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 알릴 모이어티로 보호된다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 알릴 카르바메이트로 보호된다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 프로파길 모이어티로 보호된다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 프로파르길 카르바메이트로 보호된다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 친디엔체로 보호되고, 여기서 디엔(예를 들어, 테트라진)에 대한 노출은 반응성 기의 탈보호를 유도한다.

[0203] 본원에서 설명되는 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 리간드 유도 반응을 포함하고, 여기서 (선택적으로 반응성 기에 부착된) 리간드는 반응성 기와 사이토카인 펩티드 사이의 접합을 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, 리간드는 사이토카인 펩티드와 반응성 기의 반응 동안 또는 반응 후에 절단된다. 일부 실시양태에서, 사이토카인 펩티드의 접합 부위는 천연 아미노산이다. 일부 실시양태에서, 사이토카인 펩티드의 접합 부위는 라이신, 시스테인 또는 세린이다. 일부 실시양태에서, 사이토카인 펩티드의 접합 부위는 본원에서 설명되는 비천연 아미노산이다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 이탈기, 예컨대 전자 부족(electron-poor) 아릴 또는 헤테로아릴기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응성 기는 이탈기, 예컨대 사이토카인 펩티드에 의해 대체되는 전자 부족 알킬기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 라디칼 포획제와 라디칼 종의 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 산화 라디칼 부가 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 라디칼 포획제는 아릴아민이다. 일부 실시양태에서, 라디칼 종은 티로실 라디칼이다. 일부

실시양태에서, 라디칼 종은 루테늄 촉매(예를 들어, [Ru(bpy)$_3$]) 및 빛에 의해 생성된다.

[0204] 효소 반응은 본원에서 설명되는 접합 반응에 선택적으로 사용된다. 예시적인 효소에 의한 접합은 SortA 매개 접합, TG 매개 접합 또는 FGE 매개 접합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 접합 반응은 아미드 결합을 형성하기 위해 티오에스테르를 사용하여 말단 1-아미노-2-티오기의 천연 단백질 라이게이션(PL: native protein ligation)을 포함한다.

[0205] 링커 또는 접합 모이어티를 사이토카인 펩티드와 반응시키기 위한 다양한 접합 반응이 본원에 설명되어 있으며, 여기서 반응은 사이토카인 펩티드 내의 천연("표준") 아미노산에서 발생한다. 일부 실시양태에서, 접합 위치에서 발견되는 천연 아미노산은 야생형 서열에서 발견되거나, 대안적으로 위치는 돌연변이되었다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 시스테인 잔기에서 디술파이드 결합의 형성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 시스테인 또는 라이신의 1,4 마이클 부가 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 시스테인의 시아노벤조티아졸 라이게이션을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 1,3-디클로로-2-프로피온과 같은 아세톤 모이어티아의 가교결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 시스테인과 O-메시틸렌술포닐히드록실아민의 반응에 의해 형성된 데히드로알라닌에 대한 1,4 마이클 부가를 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 티로신과 트리아졸린디온(TAD) 또는 TAD 유도체와의 반응을 포함한다. 일부 실시양태에서, 접합 반응은 트립토판과 로듐 카르베노이드의 반응을 포함한다.

[0206] **사용 방법**

[0207] *자가면역 질환 또는 장애*

[0208] 일부 실시양태에서, 그 치료를 필요로 하는 피험체에서 자가면역 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 또한 본원에서 개시되고, 이 방법은 본원에서 설명되는 사이토카인 접합체(예를 들어, IL-2 접합체)의 치료 유효량을 피험체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드 및 접합 모이어티를 포함하고, 여기서 IL-2 접합체는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 IL-2 수용체 β(IL-2Rβ) 서브유닛, IL-2 수용체 γ(IL-2Rγ) 서브유닛, 또는 이들의 조합에 대한 감소된 친화도를 갖는다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드; 및 P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택되는 아미노산 잔기에서 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드에 결합하는 접합 모이어티를 포함하고; 여기서, 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 잔기는 K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95, 및 Q126으로부터 선택된다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 IL-2αβγ 복합체와 상호작용하지만 IL-2Rβ 및 IL-2Rγ에 대해서는 감소된 친화도를 갖거나, IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rγ 서브유닛의 동원을 감소시킬 것이다. 일부 경우에, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 야생형 IL-2 폴리펩티드에 비해 IL-2Rα에 대한 결합 친화도를 유지한다. 이 경우에, IL-2/IL-2Rαβγ 복합체는 CD4+ Treg 세포의 확장을 자극하거나 향상시킨다. 추가의 경우에, 변형된 IL-2 폴리펩티드는 IL-2Rβγ 복합체를 통한 Teff 및/또는 NK 세포의 활성화제에 필요한 용량을 증가시키고, 이에 의해 IL-2Rαβγ 복합체를 통한 Treg 세포의 활성화제를 위한 용량 범위를 확장시킨다(또는 IL-2Rαβγ 복합체를 통한 Treg 세포의 활성화제를 위한 IL-2의 치료 윈도우를 확장시킨다).

[0209] 일부 경우에, 자가면역 질환 또는 장애는 원형탈모증, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 피부근염, 1형 당뇨병, 소아 특발성 관절염, 사구체신염, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 중증 근무력증, 다발성 경화증, 수포창/유사천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발성 동맥염, 다발성 근염, 원발성 담즙성 경화증, 건선, 류마티스 관절염, 피부경화증, 쇼그렌 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 갑상선염, 포도막염, 백반증 또는 베거너 육아종증을 포함한다.

[0210] 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 접합체는 원형탈모증, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 피부근염, 1형 당뇨병, 소아 특발성 관절염, 사구체신염, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 중증 근무력증, 다발성 경화증, 수포창/유사천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발성 동맥염, 다발성 근염, 원발성 담즙성 경화증, 건선, 류마티스 관절염, 피부경화증, 쇼그렌 증후군, 전신성 홍반성

루푸스, 갑상선염, 포도막염, 백반증 또는 베거너 육아종증을 갖는 피험체에게 투여된다.

[0211] 일부 경우에, IL-2 접합체는 원형탈모증, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 피부근염, 1형 당뇨병, 소아 특발성 관절염, 사구체신염, 그레이브스병, 길랑-바레 증후군, 특발성 혈소판 감소성 자반증, 중증 근무력증, 다발성 경화증, 수포창/유사천포창, 악성 빈혈, 결절성 다발성 동맥염, 다발성 근염, 원발성 담즙성 경화증, 건선, 류마티스 관절염, 피부경화증, 쇼그렌 증후군, 전신성 홍반성 루푸스, 갑상선염, 포도막염, 백반증 또는 베거너 육아종증을 갖는 피험체에게 투여된다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 1형 당뇨병을 갖는 피험체에게 투여된다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 그레이브스병을 갖는 피험체에게 투여된다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 다발성 경화증을 갖는 피험체에게 투여된다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 건선을 갖는 피험체에게 투여된다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 류마티스 관절염을 갖는 피험체에게 투여된다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 쇼그렌 증후군을 갖는 피험체에게 투여된다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 전신성 홍반성 루푸스를 갖는 피험체에게 투여된다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 포도막염을 갖는 피험체에게 투여된다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 베거너 육아종증을 갖는 피험체에게 투여된다.

[0212] 일부 경우에, 사이토카인 접합체(예를 들어, IL-2 접합체)는 이식편 대 숙주 질환(GVHD)의 치료를 위해 피험체에게 투여된다.

[0213] 일부 실시양태에서, 추가의 치료제가 피험체에게 추가로 투여된다. 일부 경우에, 추가의 치료제는 사이토카인 접합체(예를 들어, IL-2 접합체)와 동시에 투여된다. 다른 경우에, 추가의 치료제 및 사이토카인 접합체(예를 들어, IL-2 접합체)는 순차적으로 투여되며, 예를 들어, 사이토킨 접합체(예를 들어, IL-2 접합체)는 추가의 치료제의 투여 전에 투여되거나 또는 사이토카인 접합체(예를 들어, IL-2)는 추가의 치료제의 투여 후에 투여된다.

[0214] 자가면역 질환 또는 장애의 치료를 위한 예시적인 추가의 치료제는 다음을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다: 코르티코스테로이드, 예컨대 프레드니손, 부데소나이드 또는 프레드니솔론; 칼시뉴린 억제제, 예컨대 시클로스포린 또는 타크롤리무스; mTOR 억제제, 예컨대 시롤리무스 또는 에베롤리무스; IMDH 억제제, 예컨대 아자티오프린, 레플루노마이드 또는 미코페놀레이트; 생물학적 제제, 예컨대 아바타셉트, 아달리무맙, 아나킨라, 세르톨리주맙, 에타네르셉트, 골리무맙, 인플릭시맙, 익세키주맙, 나탈리주맙, 리툭시맙, 세큐키누맙, 토실리주맙, 우스테키누맙 또는 베돌리주맙; 및 모노클로날 항체, 예컨대 바실릭시맙, 다클리주맙 또는 무로모납.

[0215] 일부 경우에, 사이토카인 접합체(예를 들어, IL-2 접합체)는 다음으로부터 선택되는 추가의 치료제와 함께 투여된다: 코르티코스테로이드, 예컨대 프레드니손, 부데소나이드 또는 프레드니솔론; 칼시뉴린 억제제, 예컨대 시클로스포린 또는 타크롤리무스; mTOR 억제제, 예컨대 시롤리무스 또는 에베롤리무스; IMDH 억제제, 예컨대 아자티오프린, 레플루노마이드 또는 미코페놀레이트; 생물학적 제제, 예컨대 아바타셉트, 아달리무맙, 아나킨라, 세르톨리주맙, 에타네르셉트, 골리무맙, 인플릭시맙, 익세키주맙, 나탈리주맙, 리툭시맙, 세큐키누맙, 토실리주맙, 우스테키누맙 또는 베돌리주맙; 및 모노클로날 항체, 예컨대 바실릭시맙, 다클리주맙 또는 무로모납.

[0216] *세포 집단의 확장 방법*

[0217] 일부 실시양태에서, Treg 세포 집단을 확장시키는 방법이 본원에서 추가로 설명된다. 일부 경우에, 방법은 세포를 본원에서 설명되는 사이토카인 접합체와 접촉시키는 단계 및 사이토카인을 사이토카인 수용체와 상호작용시켜 복합체를 형성하는 단계를 포함하고, 여기서 복합체는 별개의 림프구 집단의 확장을 자극한다.

[0218] 일부 실시양태에서, CD4+ 조절 T(Treg) 세포 집단을 확장시키는 방법은 IL-2Rαβγ와의 복합체 형성을 유도하여 Treg 세포 집단의 확장을 자극하기에 충분한 시간 동안 세포를 상기 설명된 단리 및 변형된 IL-2 폴리펩티드와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD4+ Treg 세포 집단을 확장시키는 방법은 (a) 세포를 본원에서 설명되는 IL-2 접합체와 접촉시키는 단계; 및 (b) IL-2 접합체를 IL-2Rα, IL-2Rβ 및 IL-2Rγ 서브유닛과 상호작용시켜 IL-2/IL-2Rαβγ 복합체를 형성하는 단계를 포함하고; 여기서, IL-2 접합체는 IL-2Rβ 및 IL-2Rγ 서브유닛에 대한 감소된 친화도를 갖거나, IL-2/IL-2Rβ 복합체에 대한 IL-2Rγ 서브유닛의 동원을 감소시키고, IL-2/IL-2Rαβγ 복합체는 Treg 세포의 확장을 자극한다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드; 및 P2, T3, S4, S5, S6, T7, K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, R81, P82, R83, D84, S87, N88, N89, V91, I92, L94, E95, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, T113, E116, N119, R120, T123,

A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택되는 아미노산 잔기에서 단리 및 정제된 IL-2 폴리펩티드에 결합하는 접합 모이어티를 포함하고; 여기서, 아미노산 잔기의 넘버링은 서열 번호 1에 상응한다. 일부 경우에, 아미노산 잔기는 K8, K9, Q11, L12, E15, H16, L18, L19, D20, Q22, M23, N26, R81, D84, S87, N88, V91, I92, L94, E95, E116, N119, R120, T123, A125, Q126, S127, S130, T131, L132, 및 T133으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 잔기는 P2, T3, S4, S5, S6, T7, G27, N29, N30, Y31, K32, K35, T37, M46, K47, K48, A50, T51, E52, K53, H55, Q57, E60, E67, N71, Q74, S75, K76, N77, F78, H79, P82, R83, N89, K97, G98, S99, E100, T101, T102, F103, M104, C105, E106, Y107, A108, D109, E110, T111, A112, 및 T113으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 K8, K9, L12, E15, H16, L19, D20, Q22, M23, N26, D84, N88, E95, 및 Q126으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 K8, K9, 및 H16으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 Q22, N26, N88, 및 Q126으로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 E15, D20, D84, 및 E95로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 L12, L19, M23, 및 F78로부터 선택된다. 일부 경우에, 아미노산 위치는 Q22 및 N26으로부터 선택된다.

[0219] 일부 경우에, IL-2 접합체는 CD4+ T 조절(Treg) 세포를 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과로 확장시킨다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 CD4+ T 조절(Treg) 세포를 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 초과로 확장시킨다.

[0220] 일부 경우에, IL-2 접합체는 CD4+ T 조절(Treg) 세포를 적어도 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 1000배, 또는 그 초과로 확장시킨다. 일부 경우에, IL-2 접합체는 CD4+ T 조절(Treg) 세포를 약 약 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 1000배, 또는 그 초과로 확장시킨다.

[0221] 일부 경우에, IL-2Rαβγ와의 복합체 형성을 유도하기에 충분한 시간은 적어도 5분, 10분, 15분, 20분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 8시간, 10시간, 12시간, 18시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일이다. 일부 경우에, IL-2Rαβγ와의 복합체 형성을 유도하기에 충분한 시간은 약 5분, 10분, 15분, 20분, 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 8시간, 10시간, 12시간, 18시간, 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일이다.

[0222] 일부 실시양태에서, 방법은 생체내 방법이다.

[0223] 일부 실시양태에서, 방법은 시험관내 방법이다.

[0224] 일부 실시양태에서, 방법은 생체외 방법이다.

[0225] **사이토카인 폴리펩티드 생산**

[0226] 일부 경우에, 천연 아미노산 돌연변이 또는 비천연 아미노산 돌연변이를 함유하는, 본원에서 설명되는 사이토카인(예를 들어, 인터루킨, IFN 또는 TNF) 폴리펩티드는 재조합 방식으로 생성되거나 화학적으로 합성된다. 일부 경우에, 본원에서 설명되는 사이토카인(예를 들어, IL-2) 폴리펩티드는 예를 들어 숙주 세포 시스템 또는 무세포 시스템에 의해 재조합 방식으로 생성된다.

[0227] 일부 경우에, 사이토카인(예를 들어, IL-2) 폴리펩티드는 숙주 세포 시스템을 통해 재조합 방식으로 생성된다. 일부 경우에, 숙주 세포는 진핵 세포(예를 들어, 포유동물 세포, 곤충 세포, 효모 세포 또는 식물 세포) 또는 원핵 세포(예를 들어, 그람 양성 박테리아 또는 그람 음성 박테리아)이다. 일부 경우에, 진핵 숙주 세포는 포유동물 숙주 세포이다. 일부 경우에, 포유동물 숙주 세포는 안정한 세포주, 또는 관심 있는 유전 물질이 그 자신의 게놈 내에 통합되고 많은 세대의 세포 분열 후에 유전 물질의 생성물을 발현하는 능력을 갖는 세포주이다. 다른 경우에, 포유동물 숙주 세포는 일시적인 세포주 또는 관심 있는 유전 물질이 그 자신의 게놈 내에 통합되지 않고 많은 세대의 세포 분열 후에 유전 물질의 생성물을 발현하는 능력을 갖지 않는 세포주이다.

[0228] 예시적인 포유동물 숙주 세포는 293T 세포주, 293A 세포주, 293FT 세포주, 293F 세포, 293 H 세포, A549 세포, MDCK 세포, CHO DG44 세포, CHO-S 세포, CHO-K1 세포, Expi293F™ 세포, Flp-In™ T-REx™ 293 세포주, Flp-In™-293 세포주, Flp-In™-3T3 세포주, Flp-In™-BHK 세포주, Flp-In™-CHO 세포주, Flp-In™-CV-1 세포주, Flp-In™-Jurkat 세포주, FreeStyle™ 293-F 세포, FreeStyle™ CHO-S 세포, GripTite™ 293 MSR 세포주, GS-CHO 세포주, HepaRG™ 세포, T-REx™ Jurkat 세포주, Per.C6 세포, T-REx™-293 세포주, T-REx™-CHO 세포주, 및 T-REx™-HeLa 세포주를 포함한다.

[0229] 일부 실시양태에서, 진핵 숙주 세포는 곤충 숙주 세포이다. 예시적인 곤충 숙주 세포는 드로소필라 S2 세포, Sf9 세포, Sf21 세포, 하이 파이브(High Five)™ 세포 및 expresSF+® 세포를 포함한다.

[0230] 일부 실시양태에서, 진핵 숙주 세포는 효모 숙주 세포이다. 예시적인 효모 숙주 세포는 피키아 파스토리스(*Pichia pastoris*) 효모 균주, 예컨대 GS115, KM71H, SMD1168, SMD1168H 및 X-33, 및 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 효모 균주, 예컨대 INVSc1을 포함한다.

[0231] 일부 실시양태에서, 진핵 숙주 세포는 식물 숙주 세포이다. 일부 경우에, 식물 세포는 조류로부터의 세포를 포함한다. 예시적인 식물 세포주는 클라미도모나스 레인하르티이(*Chlamydomonas reinhardtii*) 137c, 또는 시네코코쿠스 에롱가투스(*Synechococcus elongatus*) PPC 7942로부터의 균주를 포함한다.

[0232] 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 원핵 숙주 세포이다. 예시적인 원핵 숙주 세포는 BL21, Mach1™, DH10B™, TOP10, DH5α, DH10Bac™, OmniMax™, MegaX™, DH12S™, INV110, TOP10F', INVαF, TOP10/P3, ccdB 서바이벌(Survival), PIR1, PIR2, Stbl2™, Stbl3™ 또는 Stbl4™를 포함한다.

[0233] 일부 경우에, 본원에서 설명되는 IL-2 폴리펩티드의 생성을 위한 적합한 다중 핵산 분자 또는 벡터는 진핵 생물 또는 원핵 생물 공급원으로부터 유래된 임의의 적합한 벡터를 포함한다. 예시적인 다중 핵산 분자 또는 벡터는 박테리아(예를 들어,이. 콜라이), 곤충, 효모(예를 들어, 피키아 파스토리스), 조류 또는 포유동물 공급원으로부터의 벡터를 포함한다. 박테리아 벡터는 예를 들어 pACYC177, pASK75, pBAD 벡터 시리즈, pBADM 벡터 시리즈, pET 벡터 시리즈, pETM 벡터 시리즈, pGEX 벡터 시리즈, pHAT, pHAT2, pMal-c2, pMal-p2, pQE 벡터 시리즈, pRSET A, pRSET B, pRSET C, pTrcHis2 시리즈, pZA31-Luc, pZE21-MCS-1, pFLAG ATS, pFLAG CTS, pFLAG MAC, pFLAG Shift-12c, pTAC-MAT-1, pFLAG CTC, 또는 pTAC-MAT-2를 포함한다.

[0234] 곤충 벡터는 예를 들어 pFastBac1, pFastBac DUAL, pFastBac ET, pFastBac HTa, pFastBac HTb, pFastBac HTc, pFastBac M30a, pFastBact M30b, pFastBac, M30c, pVL1392, pVL1393, pVL1393 M10, pVL1393 M11, pVL1393 M12, FLAG 벡터, 예컨대 pPolh-FLAG1 또는 pPolh-MAT 2, 또는 MAT 벡터, 예컨대 pPolh-MAT1, 또는 pPolh-MAT2를 포함한다.

[0235] 효모 벡터는 예를 들어 게이트웨이(Gateway)® pDEST™ 14 벡터, 게이트웨이® pDEST™ 15 벡터, 게이트웨이® pDEST™ 17 벡터, 게이트웨이® pDEST™ 24 벡터, 게이트웨이® pYES-DEST52 벡터, pBAD-DEST49 게이트웨이® 목표 벡터, pAO815 피키아 벡터, pFLD1 피키아 파스토리스 벡터, pGAPZA,B, & C 피키아 파스토리스 벡터, pPIC3.5K 피키아 벡터, pPIC6 A, B, & C 피키아 벡터, pPIC9K 피키아 벡터, pTEF1/Zeo, pYES2 효모 벡터, pYES2/CT 효모 벡터, pYES2/NT A, B, & C 효모 벡터, 또는 pYES3/CT 효모 벡터를 포함한다.

[0236] 조류 벡터는 예를 들어 pChlamy-4 벡터 또는 MCS 벡터를 포함한다.

[0237] 포유동물 벡터는 예를 들어 일시적 발현 벡터 또는 안정한 발현 벡터를 포함한다. 예시적인 일시적 포유동물 발현 벡터는 p3xFLAG-CMV 8, pFLAG-Myc-CMV 19, pFLAG-Myc-CMV 23, pFLAG-CMV 2, pFLAG-CMV 6a,b,c, pFLAG-CMV 5.1, pFLAG-CMV 5a,b,c, p3xFLAG-CMV 7.1, pFLAG-CMV 20, p3xFLAG-Myc-CMV 24, pCMV-FLAG-MAT1, pCMV-FLAG-MAT2, pBICEP-CMV 3, 또는 pBICEP-CMV 4를 포함한다. 예시적인 안정한 포유동물 발현 벡터는 pFLAG-CMV 3, p3xFLAG-CMV 9, p3xFLAG-CMV 13, pFLAG-Myc-CMV 21, p3xFLAG-Myc-CMV 25, pFLAG-CMV 4, p3xFLAG-CMV 10, p3xFLAG-CMV 14, pFLAG-Myc-CMV 22, p3xFLAG-Myc-CMV 26, pBICEP-CMV 1, 또는 pBICEP-CMV 2를 포함한다.

[0238] 일부 경우에, 무세포 시스템은 본원에서 설명되는 사이토카인(예를 들어, IL-2) 폴리펩티드의 생산에 사용된다. 일부 경우에, 무세포 시스템은 세포로부터의 세포질 및/또는 핵 성분의 혼합물을 포함하고, 시험관내 핵산 합성에 적합하다. 일부 경우에, 무세포 시스템은 원핵 세포 성분을 이용한다. 다른 경우에, 무세포 시스템은 진핵 세포 성분을 이용한다. 핵산 합성은 예를 들어 드로소필라 세포, 제노푸스 알(Xenopus egg), 고세균 또는 HeLa 세포에 기초한 무세포 시스템에서 얻어진다. 예시적인 무세포 시스템은 이. 콜라이 S30 추출 시스템, 이. 콜라이 T7 S30 시스템 또는 PURExpress®, XpressCF 및 XpressCF+를 포함한다.

[0239] 무세포 번역 시스템은 플라스미드, mRNA, DNA, tRNA, 합성 효소, 방출 인자, 리보솜, 샤페론 단백질, 번역 개시 및 신장 인자, 천연 및/또는 비천연 아미노산 및/또는 단백질 발현에 사용되는 다른 성분과 같은 성분을 다양하게 포함한다. 이러한 성분은 수율을 개선하거나, 합성 속도를 증가시키거나, 단백질 생성물 신뢰도를 증가시키거나, 또는 비천연 아미노산을 포함하도록 선택적으로 변형된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 사이토카인은 US 8,778,631; US 2017/0283469; US 2018/0051065; US 2014/0315245; 또는 US 8,778,631에 기재된 무세포 번역 시스템을 사용하여 합성된다. 일부 실시양태에서, 무세포 번역 시스템은 변형된 방출 인자, 또는 심지

어 시스템으로부터 하나 이상의 방출 인자의 제거를 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 번역 시스템은 감소된 프로테아제 농도를 포함한다. 일부 실시양태에서, 무세포 번역 시스템은 비천연 아미노산을 코딩하기 위해 사용되는 재할당된 코돈을 갖는 변형된 tRNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산의 통합을 위해 본원에서 설명되는 합성 효소가 무세포 번역 시스템에 사용된다. 일부 실시양태에서, tRNA에는 무세포 번역 시스템에 첨가되기 전에 효소에 의한 또는 화학적 방법을 사용하여 비천연 아미노산이 미리 로딩된다. 일부 실시양태에서, 무세포 번역 시스템을 위한 성분은 변형된 유기체, 예컨대 변형된 박테리아, 효모 또는 다른 유기체로부터 얻어진다.

[0240] 일부 실시양태에서, 사이토카인(예를 들어, IL-2) 폴리펩티드는 발현 숙주 시스템을 통해 또는 무세포 시스템을 통해 순환 치환된(circularly permuted) 형태로 생성된다.

[0241] *비천연 아미노산을 포함하는 사이토카인 폴리펩티드의 생산*

[0242] 오르소고날 tRNA 합성 효소/tRNA 쌍을 사용하여 사이토카인(예를 들어, IL-2)에 유전적으로 통합될 수 있도록, 사이토카인(예를 들어, IL-2) 폴리펩티드의 핵산 서열에 존재하는 하나 이상의 특이적 코돈이 비천연 아미노산을 코딩하도록 할당되는 오르소고날 또는 확장된 유전자 코드가 본 개시내용에서 사용될 수 있다. 오르소고날 tRNA 합성 효소/tRNA 쌍은 tRNA를 비천연 아미노산으로 충전할 수 있고, 코돈에 반응하여 비천연 아미노산을 폴리펩티드 사슬에 통합시킬 수 있다.

[0243] 일부 경우에, 코돈은 코돈 앰버, 오커, 오팔 또는 4자리(quadruplet) 코돈이다. 일부 경우에, 코돈은 비천연 아미노산을 운반하는 데 사용될 오르소고날 tRNA에 상응한다. 일부 경우에, 코돈이 앰버이다. 다른 경우에, 코돈은 오르소고날 코돈이다.

[0244] 일부 경우에, 코돈은 4자리 코돈이며, 이는 오르소고날 리보솜 리보-Q1에 의해 디코딩될 수 있다. 일부 경우에, 4자리 코돈은 문헌 [Neumann, *et al.*, "Encoding multiple unnatural amino acids via evolution of a quadruplet-decoding ribosome," *Nature*, **464**(7287): 441-444 (2010)]에 제시된 바와 같다.

[0245] 일부 경우에, 본 개시내용에서 사용되는 코돈은 재코딩된(recoded) 코돈, 예를 들어, 동의어 코돈 또는 대체 코돈으로 대체되는 희귀 코돈이다. 일부 경우에, 재코딩된 코돈은 문헌 [Napolitano, *et al.*, "Emergent rules for codon choice elucidated by editing rare argine codons in *Escherichia coli*," *PNAS*, **113**(38): E5588-5597 (2016)]에 제시된 바와 같다. 일부 경우에, 재코딩된 코돈은 문헌 [Ostrov *et al.*, "Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome," *Science* **353**(6301): 819-822 (2016)]에 기재된 바와 같다.

[0246] 일부 경우에, 비천연 핵산이 사용되어 하나 이상의 비천연 아미노산이 사이토카인(예를 들어, IL-2) 내로 통합된다. 예시적인 비천연 핵산은 다음을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다: 우라실-5-일, 하이포잔틴-9-일(I), 2-아미노아데닌-9-일, 5-메틸시토신(5-me-C), 5-히드록시메틸 시토신, 잔틴, 하이포잔틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 우라실 및 시토신, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실(슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-히드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌, 특정 비천연 핵산, 예컨대 5-치환 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2 치환 퓨린, N-6 치환 퓨린, O-6 치환 퓨린, 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실, 5-프로피닐시토신, 5-메틸 시토신, 이중체 형성의 안정성을 증가시키는 것, 범용 핵산, 소수성 핵산, 무차별(promiscuous) 핵산, 크기 확장 핵산, 플루오르화 핵산, 5-치환 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린, 예를 들어 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신, 5-메틸시토신(5-me-C), 5-히드록시메틸 시토신, 잔틴, 하이포잔틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸, 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실, 5-할로시토신, 5-프로피닐($-C\equiv C-CH_3$) 우라실, 5-프로피닐 시토신, 피리미딘 핵산의 다른 알키닐 유도체, 6-아조 우라실, 6-아조 시토신, 6-아조 티민, 5-우라실(슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-히드록실 및 다른 8-치환 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸, 다른 5-치환 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌, 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌, 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌, 7-데아자아데닌, 3-데아자구아닌, 3-데아자아데닌, 트리시클릭 피리미딘, 페녹사진 시티딘([5,4-b][1,4]벤족사진-2(3H)-온), 페노티아진 시티딘(1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조티아진-2(3H)-온), G-클램프, 페녹사진 시티딘(예를 들어, 9-(2-아미노에톡시)-H-피리미도 [5,4-b][1,4]벤족사진-2(3H)-온), 카르바졸

시티딘(2H-피리미도[4,5-b]인돌-2-온), 피리도인돌 시티딘(H-피리도[3',2':4,5]피롤로[2,3-d]피리미딘-2-온), 퓨린 또는 피리미딘 염기가 다른 헤테로사이클로 대체된 것, 7-데아자-아데닌, 7-데아자구아노신, 2-아미노피리딘, 2-피리딘, 아자시티토신, 5-브로모시토신, 브로모우라실, 5-클로로시토신, 염소화 시토신, 시클로시토신, 시토신 아라비노사이드, 5-플루오로시토신, 플루오로피리미딘, 플루오로우라실, 5,6-디히드로시토신, 5-요오도시토신, 히드록시우레아, 요오도우라실, 5-니트로시토신, 5-브로모우라실, 5-클로로우라실, 5-플루오로우라실, 및 5-요오도 우라실, 2-아미노-아데닌, 6-티오-구아닌, 2-티오-티민, 4-티오-티민, 5-프로피닐-우라실, 4-티오-우라실, N4-에틸시토신, 7-데아자구아닌, 7-데아자-8-아자구아닌, 5-히드록시시토신, 2'-데옥시우리딘, 2-아미노-2'-데옥시아데노신, 및 미국 특허 3,687,808; 4,845,205; 4,910,300; 4,948,882; 5,093,232; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121; 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,681,941; 5,750,692; 5,763,588; 5,830,653 및 6,005,096; WO 99/62923; 문헌 [Kandimalla et al., (2001) Bioorg. Med. Chem. 9:807-813; The Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, Kroschwitz, J.I., Ed., John Wiley & Sons, 1990, 858-859; Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613; 및 Sanghvi, Chapter 15, Antisense Research and Applications, Crookeand Lebleu Eds., CRC Press, 1993, 273-288]에 기재된 것들. 추가의 염기 변형은 예를 들어 미국 특허 3,687,808; 문헌 [Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613; 및 Sanghvi, Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke and Lebleu ed., CRC Press, 1993]에서 볼 수 있다.

[0247] 다양한 헤테로시클릭 염기 및 다양한 당 모이어티(및 당 유사체)를 포함하는 비천연 핵산은 관련 기술 분야에서 이용 가능하고, 일부 경우에 핵산은 자연 발생 핵산의 주요 5가지의 기본 성분 이외의 다른 하나 또는 다수의 헤테로시클릭 염기를 포함한다. 예를 들어, 헤테로시클릭 염기는 일부 경우에 우라실-5-일, 시토신-5-일, 아데닌-7-일, 아데닌-8-일, 구아닌-7-일, 구아닌-8-일, 4-아미노피롤로 [2.3-d] 피리미딘-5-일, 2-아미노-4-옥소피롤로 [2,3-d] 피리미딘-5-일, 2-아미노-4-옥소피롤로 [2.3-d] 피리미딘-3-일 기를 포함하고, 여기서 퓨린은 9-위치를 통해 핵산의 당 모이어티에, 1-위치를 통해 피리미딘, 7-위치를 통해 피롤로피리미딘 및 1-위치를 통해 피라졸로피리미딘에 부착된다.

[0248] 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드 유사체는 또한 포스페이트 모이어티에서 변형된다. 변형된 포스페이트 모이어티는 2개의 뉴클레오티드 사이의 연결에서 변형을 갖는 것을 포함하지만, 이로 제한되지는 않으며, 예를 들어 다음을 포함한다: 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 예를 들어 3'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트, 포스피네이트, 포스포르아미데이트, 예를 들어 3'-아미노 포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르 및 보라노포스페이트. 2개의 뉴클레오티드 사이의 이들 포스페이트 또는 변형된 포스페이트 연결은 3'-5' 연결 또는 2'-5' 연결을 통해 이루어지고, 연결은 3'-5'에서 5'-3'으로 또는 2'-5'에서 5'-2'으로와 같은 반전된 극성을 포함하는 것으로 이해된다. 또한, 다양한 염, 혼합 염 및 유리 산 형태도 포함된다. 다수의 미국 특허는 변형된 포스페이트를 함유하는 뉴클레오티드를 제조하고 사용하는 방법을 교시하고 있고, 이들 특허는 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 및 5,625,050을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0249] 일부 실시양태에서, 비천연 핵산은 2',3'-디데옥시-2',3'-디데히드로-뉴클레오시드(PCT/US2002/006460), 5'-치환된 DNA 및 RNA 유도체(PCT/US2011/033961; Saha et al., J. Org Chem., 1995, 60, 788-789; Wang et al., Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 1999, 9, 885-890; 및 Mikhailov et al., Nucleosides & Nucleotides, 1991, 10(1-3), 339-343; Leonid et al., 1995, 14(3-5), 901-905; 및 Eppacher et al., Helvetica Chimica Acta, 2004, 87, 3004-3020; PCT/JP2000/004720; PCT/JP2003/002342; PCT/JP2004/013216; PCT/JP2005/020435; PCT/JP2006/315479; PCT/JP2006/324484; PCT/JP2009/056718; PCT/JP2010/067560) 또는 변형된 염기를 갖는 모노포스페이트로 제조된 5'-치환된 단량체(Wang et al., Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids, 2004, 23 (1 & 2), 317-337)를 포함한다.

[0250] 일부 실시양태에서, 비천연 핵산은 5'-CH_2-치환된 2'-O-보호된 뉴클레오시드에서와 같이 당 고리의 5'-위치 및 2'-위치에서의 변형(PCT은/US94/02993)을 포함한다(Wu et al., Helvetica Chimica Acta, 2000, 83, 1127-1143 및 Wu et al., Bioconjugate Chem. 1999, 10, 921-924). 일부 경우에, 비천연 핵산은 올리고뉴클레오티드 내로 도입하기 위해 제조된 아미드 연결된 뉴클레오시드 이량체를 포함하고, 여기서 이량체(5'→3')에서의 3' 연결된

뉴클레오시드는 2'-OCH_3 및 5'-CH_3를 포함한다(Mesmaeker et al., Synlett, 1997, 1287-1290). 비천연 핵산은 2'-치환된 5'-CH_2(또는 O) 변형된 뉴클레오시드를 포함할 수 있다(PCT/US92/01020). 비천연 핵산은 5'-메틸렌포스포네이트 DNA 및 RNA 단량체, 및 이량체를 포함할 수 있다(Bohringer et al., Tet. Lett., 1993, 34, 2723-2726; Collingwood et al., Synlett, 1995, 7, 703-705; 및 Hutter et al., Helvetica Chimica Acta, 2002, 85, 2777-2806). 비천연 핵산은 2'-치환을 갖는 5'-포스포네이트 단량체(US2006/0074035) 및 다른 변형된 5'-포스포네이트 단량체(WO1997/35869)를 포함할 수 있다. 비천연 핵산은 5'-변형된 메틸렌포스포네이트 단량체(EP614907 및 EP629633)를 포함할 수 있다. 비천연 핵산은 5' 및/또는 6'-위치에 히드록실기를 포함하는 5' 또는 6'-포스포네이트 리보뉴클레오시드의 유사체를 포함할 수 있다(Chen et al., Phosphorus, Sulfur and Silicon, 2002, 777, 1783-1786; Jung et al., Bioorg. Med. Chem., 2000, 8, 2501-2509; Gallier et al., Eur. J. Org. Chem., 2007, 925-933; 및 Hampton et al., J. Med. Chem., 1976, 19(8), 1029-1033). 비천연 핵산은 5'-포스포네이트 데옥시리보뉴클레오시드 단량체 및 5'-포스페이트기를 갖는 이량체를 포함할 수 있다(Nawrot et al., Oligonucleotides, 2006, 16(1), 68-82). 비천연 핵산은 6'-포스포네이트기를 갖는 뉴클레오시드를 포함할 수 있으며, 여기서 5' 및/또는 6' 위치는 비치환되거나 또는 티오-tert-부틸기($SC(CH_3)_3$)(및 이의 유사체); 메틸렌아미노기(CH_2NH_2(및 이의 유사체) 또는 시아노기(CN)(이의 유사체)를 포함할 수 있다(Fairhurst et al., Synlett, 2001, 4, 467-472; Kappler et al., J. Med. Chem., 1986, 29, 1030-1038; Kappler et al., J. Med. Chem., 1982, 25, 1179-1184; Vrudhula et al., J. Med. Chem., 1987, 30, 888-894; Hampton et al., J. Med. Chem., 1976, 19, 1371-1377; Geze et al., J. Am. Chem. Soc, 1983, 105(26), 7638-7640; 및 Hampton et al., J. Am. Chem. Soc, 1973, 95(13), 4404-4414).

[0251] 일부 실시양태에서, 비천연 핵산은 또한 당 모이어티의 변형을 포함한다. 일부 경우에, 핵산은 당기가 변형된 하나 이상의 뉴클레오시드를 함유한다. 이러한 당 변형된 뉴클레오시드는 향상된 뉴클레아제 안정성, 증가된 결합 친화도 또는 일부 다른 유리한 생물학적 특성을 부여할 수 있다. 특정 실시양태에서, 핵산은 화학적으로 변형된 리보푸라노스 고리 모이어티를 포함한다. 화학적으로 변형된 리보푸라노스 고리의 예는 비제한적으로 치환기 기의 부가(5' 및/또는 2' 치환기 기 포함; 비시클릭 핵산(BNA)을 형성하는 2개의 고리 원자의 가교); 리보실 고리 산소 원자의 S, N(R) 또는 $C(R_1)(R_2)$(R = H, C_1-C_{12} 알킬 또는 보호기)로의 대체; 및 이들의 조합을 포함한다. 화학적으로 변형된 당의 예는 WO2008/101157, US2005/0130923 및 WO2007/134181에서 찾을 수 있다.

[0252] 일부 경우에, 변형된 핵산은 변형된 당 또는 당 유사체를 포함한다. 따라서, 리보스 및 데옥시리보스 이외에, 당 모이어티는 펜토스, 데옥시펜토스, 헥소스, 데옥시헥소스, 글루코스, 아라비노스, 크실로스, 릭소스, 또는 당 "유사체" 시클로펜틸기일 수 있다. 당은 피라노실 또는 푸라노실 형태일 수 있다. 당 모이어티는 리보스, 데옥시리보스, 아라비노스 또는 2'-O-알킬리보스의 푸라노사이드일 수 있고, 당은 [알파] 또는 [베타] 아노머 배열로 각각의 헤테로시클릭 염기에 부착될 수 있다. 당 변형은 2'-알콕시-RNA 유사체, 2'-아미노-RNA 유사체, 2'-플루오로-DNA 및 2'-알콕시- 또는 아미노-RNA/DNA 키메라를 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 예를 들어, 당 변형은 2'-O-메틸-우리딘 또는 2'-O-메틸-시티딘을 포함할 수 있다. 당 변형은 2'-O-알킬-치환된 데옥시리보뉴클레오시드 및 2'-O-에틸렌글리콜 유사 리보뉴클레오시드를 포함한다. 이들 당 또는 당 유사체, 및 이들 당 또는 유사체가 헤테로시클릭 염기(핵산 염기)에 부착된 각각의 "뉴클레오시드"는 공지되어 있다. 또한, 당 변형은 또한 다른 변형과 함께 제조되어 조합될 수 있다.

[0253] 당 모이어티에 대한 변형은 리보스 및 데옥시리보스의 천연 변형뿐만 아니라 비천연 변형도 포함한다. 당 변형은 2' 위치에서의 다음 변형을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다: OH; F; O-, S- 또는 N-알킬; O-, S- 또는 N-알케닐; O-, S- 또는 N-알키닐; 또는 O-알킬-O-알킬(여기서, 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환 또는 비치환된 C_1 내지 C_{10} 알킬 또는 C_2 내지 C_{10} 알케닐 및 알키닐임). 2' 당 변형은 또한 -O[$(CH_2)_nO$]mCH_3, -O$(CH_2)_nOCH_3$, -O$(CH_2)_nNH_2$, -O$(CH_2)_nCH_3$, -O$(CH_2)_nONH_2$ 및 -O$(CH_2)_nON[(CH_2)_nCH_3)]_2$를 포함하지만 이로 제한되지 않고, 여기서 n 및 m은 1 내지 약 10이다.

[0254] 2' 위치에서의 다른 변형은 다음을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다: C_1 내지 C_{10} 저급 알킬, 치환된 저급 알킬, 알크아릴, 아르알킬, O-알크아릴, O-아르알킬, SH, SCH_3, OCN, Cl, Br, CN, CF_3, OCF_3, $SOCH_3$, SO_2CH_3, ONO_2, NO_2, N_3, H_2, 헤테로시클로알킬, 헤테로시클로알크아릴, 아미노알킬아미노, 폴리알킬아미노, 치환된 실릴, RNA 절단기, 리포터 기, 인터컬레이터, 올리고뉴클레오티드의 약동학적 특성을 개선하기 위한 기, 또는 올리고뉴클레오티드의 약력학적 특성을 개선하기 위한 기, 및 유사한 특성을 갖는 다른 치환기. 또한, 당의 다른

위치, 특히 3' 말단 뉴클레오티드 상의 또는 2'-5' 연결된 올리고뉴클레오티드 내의 3' 위치 및 5' 말단 뉴클레오티드의 5' 위치에서 유사한 변형이 이루어질 수 있다. 변형된 당은 또한 가교 고리 산소, 예컨대 CH_2 및 S에 변형을 함유하는 것을 포함한다. 뉴클레오티드 당 유사체는 또한 펜토푸라노실 당 대신에 시클로부틸 모이어티와 같은 당 모방체를 가질 수 있다. 이러한 변형된 당 구조의 제조를 교시하고 다양한 염기 변형을 설명하고 있는 많은 미국 특허가 존재하고, 그 예는 다음과 같고, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다: 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; 및 5,700,920.

[0255] 변형된 당 모이어티를 갖는 핵산의 예는 비제한적으로, 5'-비닐, 5'-메틸(R 또는 S), 4'-S, 2'-F, 2'-OCH_3, 및 2'-$O(CH_2)_2OCH_3$ 치환기를 포함하는 핵산을 포함한다. 2' 위치에서의 치환기는 또한 알릴, 아미노, 아지도, 티오, O-알릴, O-(C_1-C_{10} 알킬), OCF_3, $O(CH_2)_2SCH_3$, $O(CH_2)_2$-O-N(R_m)(R_n) 및 O-CH_2-C(=O)-N(R_m)(R_n)으로부터 선택될 수 있고, 여기서 각각의 R_m 및 R_n은 독립적으로 H 또는 치환 또는 비치환된 C_1-C_{10} 알킬이다.

[0256] 특정 실시양태에서, 본원에서 설명되는 핵산은 하나 이상의 비시클릭 핵산을 포함한다. 이러한 특정 실시양태에서, 비시클릭 핵산은 4' 및 2' 리보실 고리 원자 사이의 가교를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 핵산은 하나 이상의 비시클릭 핵산을 포함하고, 여기서 가교는 4'→2' 비시클릭 핵산을 포함한다. 이러한 4'→2' 비시클릭 핵산의 예는 하기 화학식 중 하나를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다: 4'-(CH_2)-O-2'(LNA); 4'-(CH_2)-S-2'; 4'-(CH_2)$_2$-O-2'(ENA); 4'-CH(CH_3)-O-2'및 4'-CH(CH_2OCH_3)-O-2' 및 이들의 유사체(미국 특허 제7,399,845호); 4'-C(CH_3)(CH_3)-O-2' 및 이의 유사체(WO2009/006478, WO2008/150729, US2004/0171570, 미국 특허 제7,427,672호, 문헌 [Chattopadhyaya et al., J. Org. Chem., 209, 74, 118-134], 및 WO2008/154401 참조). 또한, 예를 들어 다음 문헌을 참조한다: Singh et al., Chem. Commun., 1998, 4, 455-456; Koshkin et al., Tetrahedron, 1998, 54, 3607-3630; Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2000, 97, 5633-5638; Kumar et al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 1998, 8, 2219-2222; Singh et al., J. Org. Chem., 1998, 63, 10035-10039; Srivastava et al., J. Am. Chem. Soc., 2007, 129(26) 8362-8379; Elayadi et al., Curr. Opinion Invens. Drugs, 2001, 2, 558-561; Braasch et al., Chem. Biol, 2001, 8, 1-7; Oram et al., Curr. Opinion Mol. Ther., 2001, 3, 239-243; 미국 특허 4,849,513; 5,015,733; 5,118,800; 5,118,802; 7,053,207; 6,268,490; 6,770,748; 6,794,499; 7,034,133; 6,525,191; 6,670,461; 및 7,399,845; 국제 출원 공개 WO2004/106356, WO1994/14226, WO2005/021570, WO2007/090071, 및 WO2007/134181; 미국 특허 출원 공개 US2004/0171570, US2007/0287831, 및 US2008/0039618; U.S. 특허 가출원 60/989,574, 61/026,995, 61/026,998, 61/056,564, 61/086,231, 61/097,787, 및 61/099,844; 및 국제 특허 출원 PCT/US2008/064591, PCT US2008/066154, PCT US2008/068922, 및 PCT/DK98/00393.

[0257] 특정 실시양태에서, 핵산은 연결된 핵산을 포함한다. 핵산은 임의의 핵산 사이의 연결을 사용하여 함께 연결될 수 있다. 핵산 사이의 연결 기의 2가지 주요 클래스는 인 원자의 존재 또는 부재에 의해 정의된다. 대표적인 인 함유 핵산 사이 연결은 비제한적으로 포스포디에스테르, 포스포트리에스테르, 메틸포스포네이트, 포스포르아미데이트 및 포스포로티오에이트(P=S)를 포함한다. 대표적인 인 비함유 핵산 사이 연결은 메틸렌메틸이미노(-CH_2-N(CH_3)-O-CH_2-), 티오디에스테르(-OC(O)-S-), 티오노카르바메이트(-O-C(O)(NH)-S-); 실록산(-O-Si(H)$_2$-O-); 및 N,N* -디메틸히드라진(-CH_2-N(CH_3)-N(CH_3))를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 키랄 원자를 갖는 핵산 사이의 연결은 라세미체 혼합물로서, 별개의 거울상 이성질체, 예를 들어 알킬포스포네이트 및 포스포로티오에이트로서 제조될 수 있다. 비천연 핵산은 단일 변형을 함유할 수 있다. 비천연 핵산은 모이어티 중 하나 내에 또는 상이한 모이어티 사이에 다중 변형을 함유할 수 있다.

[0258] 핵산에 대한 골격 포스페이트 변형은 메틸 포스포네이트, 포스포로티오에이트, 포스포르아미데이트(가교 또는 비가교), 포스포트리에스테르, 포스포로디티오에이트, 포스포디티오에이트 및 보라노포스페이트를 포함하지만, 이로 제한되지 않고, 임의의 조합으로 사용될 수 있다. 다른 비포스페이트 연결도 사용될 수 있다.

[0259] 일부 실시양태에서, 골격 변형(예를 들어, 메틸포스포네이트, 포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트 및 포스

포로디티오에이트 뉴클레오티드 사이 연결)은 변형된 핵산에 면역 자극 활성을 부여하고/하거나, 생체 내에서 이의 안정성을 향상시킬 수 있다.

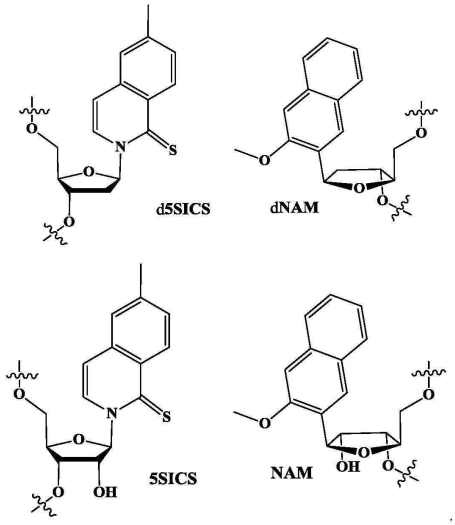
[0260] 일부 경우에, 인 유도체(또는 변형된 포스페이트 기)는 당 또는 당 유사체 모이어티에 부착되고, 모노포스페이트, 디포스페이트, 트리포스페이트, 알킬포스포네이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포르아미데이트 등일 수 있다. 변형된 포스페이트 연결 또는 비포스페이트 연결을 함유하는 예시적인 폴리뉴클레오티드는 다음 문헌에서 볼 수 있다: Peyrottes et al., 1996, Nucleic Acids Res. 24: 1841-1848; Chaturvedi et al., 1996, Nucleic Acids Res. 24:2318-2323; 및 Schultz et al., (1996) Nucleic Acids Res. 24:2966-2973; Matteucci, 1997, "Oligonucleotide Analogs: an Overview" in Oligonucleotides as Therapeutic Agents, (Chadwick and Cardew, ed.) John Wiley and Sons, New York, NY; Zon, 1993, "Oligonucleoside Phosphorothioates" in Protocols for Oligonucleotides and Analogs, Synthesis and Properties, Humana Press, pp. 165-190; Miller et al., 1971, JACS 93:6657-6665; Jager et al., 1988, Biochem. 27:7247-7246; Nelson et al., 1997, JOC 62:7278-7287; 미국 특허 제5,453,496호; 및 Micklefield, 2001, Curr. Med. Chem. 8: 1157-1179.

[0261] 일부 경우에, 골격 변형은 포스포디에스테르 연결을 음이온성, 중성 또는 양이온성 기와 같은 다른 모이어티로 대체하는 것을 포함한다. 이러한 변형의 예는 다음을 포함한다: 음이온성 뉴클레오시드 사이의 연결; N3'→P5' 포스포르아미데이트 변형; 보라노포스페이트 DNA; 프로올리고뉴클레오티드; 메틸포스포네이트와 같은 중성 뉴클레오시드 사이의 연결; 아미드 연결된 DNA; 메틸렌(메틸이미노) 연결; 포름아세탈 및 티오포름아세탈 연결; 술포닐기를 함유하는 골격; 모르폴리노 올리고; 펩티드 핵산(PNA); 및 양으로 하전된 데옥시리보핵산 구아니딘(DNG) 올리고(Micklefield, 2001, Current Medicinal Chemistry 8: 1157-1179). 변형된 핵산은 하나 이상의 변형, 예를 들어 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 연결의 조합과 같은 포스페이트 연결의 조합을 포함하는 키메라 또는 혼합 골격을 포함할 수 있다.

[0262] 포스페이트의 치환기는 예를 들어 단쇄 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오시드 사이의 연결, 혼합 헤테로원자 및 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오시드 사이의 연결, 또는 하나 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로시클릭 뉴클레오시드 사이의 연결을 포함한다. 이들은 모르폴리노 연결(뉴클레오시드의 당 부분으로부터 부분적으로 형성됨)을 갖는 것; 실록산 골격; 술파이드, 술폭사이드 및 술폰 골격; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 골격; 알켄 함유 골격; 술파메이트 골격; 메틸렌이미노 및 메틸렌히드라지노 골격; 술포네이트 및 술폰아미드 골격; 아미드 골격; 혼합된 N, O, S 및 CH_2 성분 부분을 갖는 것을 포함한다. 다수의 미국 특허는 이러한 유형의 인산 대체물을 제조하고 사용하는 방법을 개시하고 있고, 미국 특허 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 및 5,677,439를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 뉴클레오티드 대체물에서, 뉴클레오티드의 당 및 포스페이트 모이어티 둘 모두가 예를 들어 아미드 유형 연결(아미노에틸글리신)(PNA)로 대체될 수 있는 것으로 이해된다. 미국 특허 제5,539,082호; 제5,714,331호; 및 제5,719,262호는 PNA 분자의 제조 및 사용 방법을 교시하고 있으며, 이들 각각은 본원에 참고로 포함된다. 또한, 문헌 [Nielsen et al., Science, 1991, 254, 1497-1500]을 참조한다. 또한, 예를 들어, 세포 흡수를 향상시키기 위해 다른 유형의 분자(접합체)를 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체에 연결하는 것도 가능하다. 접합체는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체에 화학적으로 연결될 수 있다. 이러한 접합체는 다음과 같은 지질 모이어티를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다: 콜레스테롤 모이어티(Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86, 6553-6556), 콜산(Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1994, 4, 1053-1060), 티오에테르, 예를 들어 헥실-S-트리틸티올(Manoharan et al., Ann. KY. Acad. Sci., 1992, 660, 306-309; Manoharan et al., Bioorg. Med. Chem. Let., 1993, 3, 2765-2770), 티오콜레스테롤(Oberhauser et al., Nucl. Acids Res., 1992, 20, 533-538), 지방족 사슬, 예를 들어 도데칸디올 또는 운데실 잔기(Saison-Behmoaras et al., EM5OJ, 1991, 10, 1111-1118; Kabanov et al., FEBS Lett., 1990, 259, 327-330; Svinarchuk et al., Biochimie, 1993, 75, 49-54), 인지질, 예를 들어 디-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1-디-O-헥사데실-rac-글리세로-S-H-포스포네이트(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654; Shea et al., Nucl. Acids Res., 1990, 18, 3777-3783), 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 사슬(Manoharan et al., Nucleosides & Nucleotides, 1995, 14, 969-973), 또는 아다만탄 아세트산(Manoharan et al., Tetrahedron Lett., 1995, 36, 3651-3654), 팔미틸 모이어티(Mishra et al., Biochem. Biophys. Acta, 1995, 1264, 229-237), 또는 옥타데실아민 또는 헥실아미노-카르보닐-옥시콜레스테롤

모이어티(Crooke et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 1996, 277, 923-937). 다수의 미국 특허는 이러한 접합체의 제조를 교시하고 있고, 미국 특허 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717, 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241, 5,391,723; 5,416,203, 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 및 5,688,941을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0263] 일부 경우에, 비천연 핵산은 비천연 염기쌍을 추가로 형성한다. 생체내 조건 하에서 비천연 DNA 또는 RNA 염기쌍(UBP)을 형성할 수 있는 예시적인 비천연 뉴클레오티드는 5SICS, d5SICS, NAM, dNaM 및 이들의 조합을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 비천연 뉴클레오티드는 다음을 포함한다:



[0264]

[0265] 일부 실시양태에서, 비천연 염기쌍은 문헌 [Dumas *et al.*, "Designing logical codon reassignment - Expanding the chemistry in biology," *Chemical Science*, 6: 50-69 (2015)]에 기재된 비천연 아미노산을 생성한다.

[0266] 본원에서 개시되는 구축물 또는 벡터가 도입되는 숙주 세포는 tRNA, tRNA 합성 효소 및 관심 있는 단백질이 생성되도록 적합한 배지에서 배양 또는 유지된다. 배지는 또한 관심 있는 단백질이 비천연 아미노산(들)을 포함하도록 비천연 아미노산(들)을 포함한다.

[0267] 오르소고날 tRNA 합성 효소/tRNA 쌍은 tRNA를 비천연 아미노산으로 충전할 수 있고, 코돈에 반응하여 비천연 아미노산을 폴리펩티드 사슬에 통합시킬 수 있다. 예시적인 aaRS-tRNA 쌍은 메타노코쿠스 얀나쉬이(*Mj-Tyr*) aaRS/tRNA 쌍, 이. 콜라이 TyrRS(*Ec-Tyr*)/비. 스테아로테르모필루스 $tRNA_{CUA}$ 쌍, 이. 콜라이 LeuRS(*Ec-Leu*)/비. 스테아로테르모필루스 $tRNA_{CUA}$ 쌍, 및 피롤라이실-tRNA 쌍을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0268] 비천연 아미노산(들)을 포함하는 사이토카인(예를 들어, IL-2) 폴리펩티드는 tRNA 및 tRNA 합성 효소를 포함하고 하나 이상의 인 프레임 오르소고날(정지) 코돈을 갖는 관심 있는 핵산 서열을 포함하는 본원에서 설명되는 핵산 구축물을 숙주 세포 내로 도입함으로써 제조된다. 숙주 세포는 비천연 아미노산(들)을 포함하는 생리학적 용액에 노출되고, 이어서 숙주 세포는 관심 있는 단백질의 코딩 서열의 발현을 허용하는 조건 하에서 유지된다. 비천연 아미노산(들)은 코돈에 반응하여 폴리펩티드 사슬에 통합된다. 예를 들어, 하나 이상의 비천연 아미노산이 사이토카인(예를 들어, IL-2) 폴리펩티드에 통합된다. 대안적으로, 2개 이상의 비천연 아미노산이 단백질의 2개 이상의 부위에서 사이토카인(예를 들어, IL-2) 폴리펩티드에 통합될 수 있다.

[0269] 다수의 비천연 아미노산이 사이토카인(예를 들어, IL-2) 폴리펩티드에 통합될 때, tRNA 합성 효소/tRNA 쌍이 코돈(들)에 반응하여 비천연 아미노산의 통합을 유도할 수 있도록 다중 코돈이 원하는 위치에서 코딩 핵산 서열 내에 통합될 필요가 있음을 이해할 것이다. 적어도 1, 2, 3, 4개 또는 그 초과의 코돈 코딩 핵산은 관심 있는 핵산 서열에 통합될 수 있다.

[0270] 관심 있는 단백질에 하나 초과의 유형의 비천연 아미노산을 단일 단백질에 통합시키는 것이 바람직한 경우, 제2의 또는 추가의 오르소고날 tRNA-tRNA 합성 효소 쌍을 사용하여 제2의 또는 추가의 비천연 아미노산을 통합시킬 수 있으며; 적합하게는 상기 제2의 또는 추가의 오르소고날 tRNA-tRNA 합성 효소 쌍은 관심 있는 단백질을 코딩하는 핵산에서 상이한 코돈을 인식하여, 2개 이상의 비천연 아미노산이 단일 제조 단계에서 단백질의 상이한 정의된 부위에 특이적으로 도입될 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, 2개 이상의 오르소고날 tRNA-tRNA 합성 효소 쌍이 사용될 수 있다.

[0271] 비천연 아미노산(들)을 포함하는 사이토카인(예를 들어, IL-2) 폴리펩티드가 숙주 세포에서 생성되면, 이것은 효소, 화학적 및/또는 삼투 용해 및 물리적 파괴를 포함하는 관련 기술 분야에 공지된 다양한 기술에 의해 숙주 세포로부터 추출될 수 있다. 사이토카인(예를 들어, IL-2) 폴리펩티드는 관련 기술 분야에 공지된 표준 기술, 예컨대 분취 크로마토그래피, 친화도 정제 또는 임의의 다른 적합한 기술에 의해 정제될 수 있다.

[0272] 적합한 숙주 세포는 박테리아 세포(예를 들어, 이. 콜라이)를 포함할 수 있지만, 가장 적합하게는 숙주 세포는 진핵 세포, 예를 들어 곤충 세포(예를 들어, 드로소필라, 예컨대 드로소필라 멜라노가스터(*Drosophila melanogaster*)), 효모 세포, 선충(예를 들어, 셀레간스(*Celegans*)), 마우스(예를 들어, 무스 무스쿨루스(*Mus musculus*)) 또는 포유동물 세포(예를 들어, 중국 햄스터 난소 세포(CHO) 또는 COS 세포, 인간 293T 세포, HeLa 세포, NIH 3T3 세포 및 마우스 적백혈병(MEL) 세포) 또는 인간 세포 또는 다른 진핵 세포이다. 다른 적합한 숙주 세포는 관련 기술 분야의 통상의기술자에게 알려져 있다. 적합하게는, 숙주 세포는 포유동물 세포, 예를 들어 인간 세포 또는 곤충 세포이다.

[0273] 본 발명의 실시양태에서 일반적으로 사용될 수 있는 다른 적합한 숙주 세포는 실시예 섹션에 언급되는 것들이다. 벡터 DNA는 통상적인 형질전환 또는 형질감염 기술을 통해 숙주 세포로 도입될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "형질전환" 및 "형질감염"은 인산칼슘 또는 염화칼슘 공동 침전, DEAE-덱스트란 매개 형질감염, 리포펙션 또는 전기천공을 비롯하여, 숙주 세포 내로 외래 핵산 분자(예를 들어, DNA)를 도입하기 위한 다양한 잘 알려진 기술을 지칭하는 것으로 의도된다. 숙주 세포를 형질전환 또는 형질감염시키는 적합한 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있다.

[0274] 세포주를 생성할 때, 일반적으로 안정한 세포주를 제조하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 포유동물 세포의 안정적인 형질감염을 위해, 사용된 발현 벡터 및 형질감염 기술에 따라, 소량의 세포만이 외래 DNA를 그들의 게놈에 통합시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 이들 통합체를 확인하고 선택하기 위해, 선택 가능한 마커(예를 들어, 항생제에 대한 내성)를 코딩하는 유전자가 일반적으로 관심 있는 유전자와 함께 숙주 세포에 도입된다. 바람직한 선택 마커는 G418, 히그로마이신 또는 메토트렉세이트와 같은 약물에 대한 내성을 부여하는 마커를 포함한다. 선택 가능한 마커를 코딩하는 핵산 분자는 동일한 벡터 상에서 숙주 세포로 도입될 수 있거나 또는 별개의 벡터 상에서 도입될 수 있다. 도입된 핵산 분자로 안정적으로 형질감염된 세포는 약물 선택에 의해 확인될 수 있다(예를 들어, 선택 가능한 마커 유전자가 통합된 세포는 생존하는 반면, 다른 세포는 죽을 것이다).

[0275] 한 실시양태에서, 본원에서 설명되는 구축물은 숙주 세포의 게놈에 통합된다. 안정적인 통합의 이점은 개별 세포 또는 클론 사이의 균일성이 달성된다는 것이다. 또 다른 이점은 최고의 생산자를 선택할 수 있다는 것이다. 따라서, 안정적인 세포주를 생성하는 것이 바람직하다. 또 다른 실시양태에서, 본원에서 설명되는 구축물은 숙주 세포 내로 형질감염된다. 구축물을 숙주 세포 내로 형질감염시키는 이점은 단백질 수율이 최대화될 수 있다는 것이다. 한 측면에서, 본원에서 설명되는 핵산 구축물 또는 벡터를 포함하는 세포가 설명된다.

[0276] **약학 조성물 및 제제**

[0277] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 제약 조성물 및 제제는 비경구(예를 들어 정맥내, 피하, 근육내), 뇌내, 경구, 비강내, 협측, 직장, 설하 또는 경피 투여 경로를 포함하지만 이로 제한되지 않는 다수의 투여 경로에 의해 피험체에게 투여된다.

[0278] 일부 실시양태에서, 약학적 제제는 수성 액체 분산액, 자가 유화 분산액, 고체 용액, 리포솜 분산액, 에어로졸, 고체 투여 형태, 분말, 즉시 방출 제제, 제어 방출 제제, 고속 용융 제제, 정제, 캡슐, 환제, 지연 방출 제제, 연장 방출 제제, 맥동형 방출 제제, 다중 미립자 제제(예를 들어, 나노 입자 제제), 및 혼합된 즉시 및 제어 방출 제제를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0279] 일부 실시양태에서, 약학적 제제는 본원에 개시된 조성물과의 상용성, 및 목적하는 투여 형태의 방출 프로파일 특성에 기초하여 선택된 담체 또는 담체 물질을 포함한다. 예시적인 담체 물질은 예를 들어 결합제, 현탁제, 붕해제, 충전제, 계면활성제, 가용화제, 안정화제, 윤활제, 습윤제, 희석제 등을 포함한다. 약학적으로 상용성인

담체 물질은 아카시아, 젤라틴, 콜로이드 이산화규소, 글리세로인산칼슘, 락트산칼슘, 말토덱스트린, 글리세린, 규산마그네슘, 폴리비닐피롤리돈(PVP), 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르, 카제인나트륨, 대두 레시틴, 타우로콜산, 포스포티딜콜린, 염화나트륨, 인산삼칼슘, 인산이칼륨, 셀룰로스 및 셀룰로스 접합체, 당 스테아로일 락틸나트륨, 카라기난, 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 사전 호화(pregelatinized) 전분 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌 [*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995), Hoover, John E., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975, Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., *Pharmaceutical Dosage Forms*, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980, 및 *Pharmaceutical Dosage Forms and* Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins1999)]을 참조한다.

[0280] 일부 경우에, 약학 조성물은 리포솜의 지질 이중층에 직접 또는 간접적으로 결합된 복수의 IL-2 접합체를 포함하는 면역리포솜으로서 제제화된다. 예시적인 지질은 지방산; 인지질; 스테롤, 예컨대 콜레스테롤; 스핑고지질, 예컨대 스핑고미엘린; 글리코스핑고지질, 예컨대 강글리오사이드, 글로보시드 및 세레브로사이드; 계면활성제 아민, 예컨대 스테아릴, 올레일 및 리놀레일 아민을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 일부 경우에, 지질은 양이온성 지질을 포함한다. 일부 경우에, 지질은 인지질을 포함한다. 예시적인 인지질은 다음을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다: 포스파티드산("PA"), 포스파티딜콜린("PC"), 포스파티딜글리세롤("PG"), 포스파티딜에탄올아민("PE"), 포스파티딜이노시톨("PI") 및 포스파티딜세린("PS"), 스 핑고미엘린(뇌 스핑고미엘린 포함), 레시틴, 리소레시틴, 리소포스파티딜에탄올아민, 세레브로사이드, 디아라키도일포스파티딜콜린("DAPC"), 디데카노일-L-알파-포스파티딜콜린("DDPC"), 디엘라이도일포스파티딜콜린("DEPC"), 디라우로일포스파티딜콜린("DLPC"), 디리놀레오일포스파티딜콜린, 디미리스토일포스파티딜콜린("DMPC"), 디올레오일포스파티딜콜린("DOPC"), 디팔미토일포스파티딜콜린("DPPC"), 디스테아로일포스파티딜콜린("DSPC"), 1-팔미토일-2-올레오일-포스파티딜콜린("POPC"), 디아라키도일포스파티딜글리세롤("DAPG"), 디데카노일-L-알파-포스파티딜글리세롤("DDPG"), 디엘라이도일포스파티딜글리세롤("DEPG"), 디라우로일포스파티딜글리세롤("DLPG"), 디리놀레오일포스파티딜글리세롤, 디미리스토일포스파티딜글리세롤("DMPG"), 디올레오일포스파티딜글리세롤("DOPG"), 디팔미토일포스파티딜글리세롤("DPPG"), 디스테아로일포스파티딜글리세롤("DSPG"), 1-팔미토일-2-올레오일-포스파티딜글리세롤("POPG"), 디아라키도일포스파티딜에탄올아민("DAPE"), 디데카노일-L-알파-포스파티딜에탄올아민("DDPE"), 디엘라이도일포스파티딜에탄올아민("DEPE"), 디라우로일포스파티딜에탄올아민("DLPE"), 디리놀레오일포스파티딜에탄올아민, 디미리스토일포스파티딜에탄올아민("DMPE"), 디올레오일포스파티딜에탄올아민("DOPE"), 디팔미토일포스파티딜에탄올아민("DPPE"), 디스테아로일포스파티딜에탄올아민("DSPE"), 1-팔미토일-2-올레오일-포스파티딜에탄올아민("POPE"), 디아라키도일포스파티딜이노시톨("DAPI"), 디데카노일-L-알파-포스파티딜이노시톨("DDPI"), 디엘라이도일포스파티딜이노시톨("DEPI"), 디라우로일포스파티딜이노시톨("DLPI"), 디리놀레오일포스파티딜이노시톨, 디미리스토일포스파티딜이노시톨("DMPI"), 디올레오일포스파티딜이노시톨("DOPI"), 디팔미토일포스파티딜이노시톨("DPPI"), 디스테아로일포스파티딜이노시톨("DSPI"), 1-팔미토일-2-올레오일-포스파티딜이노시톨("POPI"), 디아라키도일포스파티딜세린("DAPS"), 디데카노일-L-알파-포스파티딜세린("DDPS"), 디엘라이도일포스파티딜세린("DEPS"), 디라우로일포스파티딜세린("DLPS"), 디리놀레오일포스파티딜세린, 디미리스토일포스파티딜세린("DMPS"), 디올레오일포스파티딜세린("DOPS"), 디팔미토일포스파티딜세린("DPPS"), 디스테아로일포스파티딜세린("DSPS"), 1-팔미토일-2-올레오일-포스파티딜세린("POPS"), 디아라키도일 스핑고미엘린, 디데카노일 스핑고미엘린, 디엘라이도일 스핑고미엘린, 디라우로일 스핑고미엘린, 디리놀레오일 스핑고미엘린, 디미리스토일 스핑고미엘린, 스핑고미엘린, 디올레오일 스핑고미엘린, 디팔미토일 스핑고미엘린, 디스테아로일 스핑고미엘린 및 1-팔미토일-2-올레오일-스핑고미엘린.

[0281] 일부 경우에, 약학적 제제는 아세트산, 붕산, 시트르산, 락트산, 인산 및 염산과 같은 산, 수산화나트륨, 인산나트륨, 붕산나트륨, 시트르산나트륨, 아세트산나트륨, 락트산나트륨 및 트리스-히드록시메틸아미노메탄과 같은 염기, 및 시트레이트/덱스트로스, 중탄산나트륨 및 염화암모늄과 같은 버퍼를 포함하는 pH 조절제 또는 완충제를 추가로 포함한다. 이러한 산, 염기 및 버퍼는 조성물의 pH를 허용 가능한 범위로 유지하는데 필요한 양으로 포함된다.

[0282] 일부 경우에, 약학적 제제는 조성물의 삼투압을 허용 가능한 범위로 유지하기 위해 필요한 양의 하나 이상의 염을 포함한다. 이러한 염은 나트륨, 칼륨 또는 암모늄 양이온 및 클로라이드, 시트레이트, 아스코르베이트, 보레이트, 포스페이트, 비카르보네이트, 술페이트, 티오술페이트 또는 비술파이트 음이온을 갖는 것을 포함하고, 적합한 염은 염화나트륨, 염화칼륨, 티오황산나트륨, 아황산수소나트륨 및 황산암모늄을 포함한다.

[0283] 일부 실시양태에서, 약학적 제제는 트레할로스, 수크로스, 만니톨, 말토스, 글루코스와 같은 당, 또는

인산칼륨, 시트르산나트륨, 황산암모늄 및/또는 폴리펩티드의 용해도 및 생체내 안정성을 증가시키기 위한 헤파린과 같은 다른 작용제를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0284] 일부 경우에, 약학적 제제는 화합물이 보다 안정한 환경을 제공할 수 있기 때문에 화합물을 안정화하기 위해 사용되는 희석제를 추가로 포함한다. 포스페이트 완충 염수를 포함하고 이로 제한되지 않는 완충 용액에 용해된 염(또한 pH 제어 또는 유지를 제공할 수 있음)이 관련 기술 분야에서 희석제로 사용된다. 특정 예에서, 희석제는 조성물의 부피를 증가시켜 압축을 촉진하거나 캡슐 충전을 위한 균일한 블렌드를 위한 충분한 부피를 생성한다. 이러한 화합물은 예를 들어 락토스, 전분, 만니톨, 소르비톨, 덱스트로스, 미세결정질 셀룰로스, 예컨대 아비셀(Avicel)®, 이염기성 인산칼슘, 인산이칼슘 이수화물, 인산삼칼슘, 인산칼슘, 무수 락토스, 분무 건조된 락토스, 사전 호화 전분, 압축성 당, 예를 들어 Di-Pac®(Amstar), 만니톨, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스 아세테이트 스테아레이트, 수크로스 기재 희석제, 제과용(confectioner) 당, 일염기성 황산칼슘 일수화물, 황산칼슘 이수화물, 락트산칼슘 삼수화물, 덱스트레이트, 가수분해된 시리얼 고형물, 아밀로스, 분말 셀룰로스, 탄산칼슘, 글리신, 카올린, 만니톨, 염화나트륨, 이노시톨, 벤토나이트 등을 포함할 수 있다.

[0285] 일부 경우에, 약학적 제제는 물질의 분해 또는 붕해를 촉진하기 위한 붕해 작용제 또는 붕해제를 포함한다. 용어 "붕해"는 위장관액과 접촉될 때 투여 형태의 용해와 분산 둘 모두를 포함한다. 붕해제의 예에는 다음을 포함한다: 전분, 예를 들어 천연 전분, 예컨대 옥수수 전분 또는 감자 전분, 사전 호화 전분, 예컨대 내셔널(National) 1,551 또는 아미젤(Amijel)®, 또는 전분 글리콜산나트륨, 예컨대 프로모겔(Promogel)® 또는 엑스플로탑(Explotab)®, 셀룰로스, 예컨대 목재 생성물, 메틸결정질 셀룰로스, 예를 들어, 아비셀®, 아비셀® PH101, 아비셀® PH102, 아비셀® PH105, 엘세마(Elcema)® P100, 엠코셀(Emcocel)®, 비바셀(Vivacel)®, 밍 티아(Ming Tia)® 및 솔카-플록(Solka-Floc)®, 메틸셀룰로스, 크로스카르멜로스 또는 가교결합된 셀룰로스, 예컨대 가교결합된 나트륨 카르복시메틸셀룰로스(Ac-Di-Sol®), 가교결합된 카르복시메틸셀룰로스, 또는 가교결합된 크로스카르멜로스, 가교결합된 전분, 예컨대 전분 글리콜산나트륨, 가교결합된 중합체, 예컨대 크로스포비돈, 가교결합된 폴리비닐피롤리돈, 알기네이트, 예컨대 알긴산 또는 알긴산의 염, 예컨대 알긴산나트륨, 점토, 예컨대 비검(Veegum)® HV(규산알루미늄마그네슘), 검, 예컨대 한천, 구아, 로커스트 빈, 카라야(Karaya), 펙틴 또는 트라가칸트, 전분 글리콜산나트륨, 벤토나이트, 천연 스펀지, 계면활성제, 수지, 예컨대 양이온 교환 수지, 시트러스 펄프, 라우릴 황산나트륨, 라우릴 황산나트륨(전분과 조합됨) 등.

[0286] 일부 경우에, 약학적 제제는 충전제, 예컨대 락토스, 탄산칼슘, 인산칼슘, 이염기성 인산칼슘, 황산칼슘, 미세결정질 셀룰로스, 셀룰로스 분말, 덱스트로스, 덱스트레이트, 덱스트란, 전분, 사전 호화 전분, 수크로스, 자일리톨, 락티톨, 만니톨, 소르비톨, 염화나트륨, 폴리에틸렌 글리콜 등을 포함한다.

[0287] 윤활제 및 활택제는 또한 물질의 부착 또는 마찰을 방지, 감소 또는 억제하기 위해 본원에서 설명되는 약학적 제제에 선택적으로 포함된다. 예시적인 윤활제는 예를 들어 다음을 포함한다: 스테아르산, 수산화칼슘, 탈크, 스테아릴푸마르산나트륨, 탄화수소, 예컨대 미네랄 오일, 또는 수소화 식물성 오일, 예컨대 수소화 대두유(Sterotex®), 고급 지방산 및 이의 알칼리 금속 및 알칼리 토금속 염, 예컨대 알루미늄, 칼슘, 마그네슘, 아연, 스테아르산, 스테아르산나트륨, 글리세롤, 탈크, 왁스, 스테아로웨트(Stearowet)®, 붕산, 벤조산나트륨, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 류신, 폴리에틸렌 글리콜(예를 들어, PEG-4000) 또는 메톡시폴리에틸렌 글리콜, 예컨대 카르보왁스(Carbowax)™, 올레산나트륨, 벤조산나트륨, 글리세릴 베헤네이트, 폴리에틸렌 글리콜, 라우릴 황산마그네슘 또는 나트륨, 콜로이드 실리카, 예컨대 실로이드(Syloid)™, Cab-O-Sil®, 전분, 예컨대 옥수수 전분, 실리콘 오일, 계면활성제 등.

[0288] 가소제는 미세캡슐화 물질 또는 필름 코팅을 연화시켜 취성을 감소시키기 위해 사용되는 화합물을 포함한다. 적합한 가소제는 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜, 예컨대 PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 1450, PEG 3350 및 PEG 800, 스테아르산, 프로필렌 글리콜, 올레산, 트리에틸 셀룰로스 및 트리아세틴을 포함한다. 가소제는 또한 분산제 또는 습윤제로서 기능할 수 있다.

[0289] 가용화제는 트리아세틴, 트리에틸시트레이트, 에틸 올레에이트, 에틸 카프릴레이트, 라우릴 황산나트륨, 도큐세이트 나트륨, 비타민 E TPGS, 디메틸아세트아미드, N-메틸피롤리돈, N-히드록시에틸피롤리돈, 폴리비닐피롤리돈, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 히드록시프로필 시클로덱스트린, 에탄올, n-부탄올, 이소프로

필 알코올, 콜레스테롤, 담즙산 염, 폴리에틸렌 글리콜 200-600, 글리코푸롤, 트랜스큐톨, 프로필렌 글리콜 및 디메틸 이소소르바이드 등과 같은 화합물을 포함한다.

[0290] 안정화제는 임의의 산화방지제, 버퍼, 산, 보존제 등과 같은 화합물을 포함한다. 예시적인 안정화제는 L-아르기닌 히드로클로라이드, 트로메타민, 알부민(인간), 시트르산, 벤질 알코올, 페놀, 이인산이나트륨 탈수물, 프로필렌 글리콜, 메타크레졸 또는 m-크레졸, 아세트산아연, 폴리소르베이트-20 또는 트윈® 20 또는 트로메타몰을 포함한다.

[0291] 현탁제는 다음과 같은 화합물을 포함한다: 폴리비닐피롤리돈, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈 K12, 폴리비닐피롤리돈 K17, 폴리비닐피롤리돈 K25, 또는 폴리비닐피롤리돈 K30, 비닐피롤리돈/비닐 아세테이트 공중합체(S630), 폴리에틸렌 글리콜(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜의 분자량은 약 300 내지 약 6000, 또는 약 3350 내지 약 4000, 또는 약 7000 내지 약 5400일 수 있다), 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 히드록시메틸셀룰로스 아세테이트 스테아레이트, 폴리소르베이트-80, 히드록시에틸셀룰로스, 알긴산나트륨, 검, 예를 들어 검 트라가칸트 및 검 아카시아, 구아 검, 크산탄, 예를 들어 크산탄 검, 당, 셀룰로식, 예를 들어 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 메틸셀룰로스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필메틸셀룰로스, 히드록시에틸셀룰로스, 폴리소르베이트-80, 알긴산나트륨, 폴리에톡실화 소르비탄 모노라우레이트, 폴리에톡실화 소르비탄 모노라우레이트, 포비돈 등.

[0292] 계면활성제는 라우릴 황산나트륨, 도큐세이트 나트륨, 트윈 60 또는 80, 트리아세틴, 비타민 E TPGS, 소르비탄 모노올레에이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트, 폴리소르베이트, 폴록사머, 담즙산 염, 글리세릴 모노스테아레이트, 에틸렌 옥사이드와 프로필렌 옥사이드의 공중합체, 예를 들어, 플루로닉(Pluronic)®(BASF) 등을 포함한다. 추가의 계면활성제는 폴리옥시에틸렌 지방산 글리세라이드 및 식물성 오일, 예를 들어 폴리옥시에틸렌(60) 수소화 피마자유, 및 폴리옥시에틸렌 알킬에테르 및 알킬페닐 에테르, 예를 들어 옥톡시놀 10, 옥톡시놀 40을 포함한다. 때때로, 계면활성제는 물리적 안정성을 향상시키기 위해 또는 다른 목적으로 포함된다.

[0293] 점도 향상제는 예를 들어 메틸셀룰로스, 크산탄 검, 카르복시메틸셀룰로스, 히드록시프로필 셀룰로스, 히드록시프로필메틸 셀룰로스, 히드록시프로필메틸 셀룰로스 아세테이트 스테아레이트, 히드록시프로필메틸 셀룰로스 프탈레이트, 카르보머, 폴리비닐 알코올, 알기네이트, 아카시아, 키토산 및 이들의 조합을 포함한다.

[0294] 습윤제는 올레산, 글리세릴 모노스테아레이트, 소르비탄 모노올레에이트, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레에이트, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노라우레이트, 도큐세이트 나트륨, 올레산나트륨, 라우릴 황산나트륨, 도큐세이트 나트륨, 트리아세틴, 트윈 80, 비타민 E TPGS, 암모늄 염 등과 같은 화합물을 포함한다.

[0295] **치료 요법**

[0296] 일부 실시양태에서, 본원에서 설명되는 약학 조성물은 치료 용도로 투여된다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회 또는 그 초과의 빈도로 투여된다. 약학 조성물은 1일, 매일, 격일, 1주일에 5일, 1주일에 1회, 격주로, 1개월에 2주, 1개월에 3주, 1개월에 1회, 1개월에 2회, 1개월에 3회 또는 그 초과의 빈도로 투여된다. 약학 조성물은 적어도 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 18개월, 2년, 3년 또는 그 초과의 기간 동안 투여된다.

[0297] 환자의 상태가 개선되는 경우, 의사의 판단에 따라 조성물의 투여는 연속적으로 실시되거나, 대안적으로, 투여되는 조성물의 용량은 특정 시간 동안 일시적으로 감소되거나 일시적으로 정지된다(즉, "휴약"). 일부 경우에, 휴약 기간은 2일 내지 1년 사이에서 상이하며, 단지 예로서 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 10일, 12일, 15일, 20일, 28일, 35일, 50일, 70일, 100일, 120일, 150일, 180일, 200일, 250일, 280일, 300일, 320일, 350일 또는 365일을 포함한다. 휴약 동안의 용량 감소는 10%-100%이며, 단지 예로서 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%를 포함한다.

[0298] 환자 상태가 개선되면, 필요한 경우 유지 용량이 투여된다. 후속적으로, 투여량 또는 투여 빈도, 또는 둘 모두는 증상의 함수로서 개선된 질환, 장애 또는 병태가 유지되는 수준으로 감소될 수 있다.

[0299] 일부 실시양태에서, 이러한 양에 상응하는 주어진 약제의 양은 특정 화합물, 질환의 중증도, 치료를 필요로 하는 피험체 또는 숙주의 특성(예를 들어, 체중)과 같은 인자에 따라 달라지지만, 그럼에도 불구하고, 예를 들어, 투여되는 특정 약제, 투여 경로, 및 치료되는 피험체 또는 숙주를 비롯한 환자를 둘러싼 특정 상황에 따라 관련 기술 분야에 공지된 방식으로 통상적으로 결정된다. 일부 경우에, 원하는 용량은 단일 용량으로 또는 동시에(또

는 짧은 시간에 걸쳐) 또는 적절한 간격으로, 예를 들어 하루에 2, 3, 4개 또는 그 초과의 하위 용량으로 투여되는 분할 용량으로 편리하게 제공된다.

[0300] 상기한 범위는 개별 치료법에 관한 변수의 수가 많고, 이러한 권장 값으로부터의 상당히 벗어나는 경우도 드물지 않기 때문에 단지 제안하는 범위이다. 이러한 투여량은 사용되는 화합물의 활성, 치료될 질환 또는 병태, 투여 방식, 개별 피험체의 요건, 치료되는 질환 또는 병태의 중증도 및 의사의 판단에 제한되지 않는 다수의 변수에 따라 변경된다.

[0301] 일부 실시양태에서, 이러한 치료법의 독성 및 치료 효능은 LD50(집단의 50%에 대해 치사적인 양) 및 ED50(집단의 50%에서 치료적으로 효과적인 용량)의 결정을 포함하지만 이로 제한되지 않는, 세포 배양 또는 실험 동물에서의 표준 제약 절차에 의해 결정된다. 독성 효과와 치료 효과 사이의 용량 비율은 치료 지수이고, LD50과 ED50 사이의 비율로 표현된다. 높은 치료 지수를 나타내는 화합물이 바람직하다. 세포 배양 검정 및 동물 연구로부터 얻은 데이터는 인간에 사용하기 위한 다양한 투여량의 제제화에 사용된다. 이러한 화합물의 투여량은 바람직하게는 독성이 최소인 ED50을 포함하는 다양한 순환 농도 범위 내에 있다. 투여량은 사용된 투여 형태 및 이용되는 투여 경로에 따라 상기 범위 내에서 변한다.

[0302] **키트/제조품**

[0303] 특정 실시양태에서, 본원에서 설명되는 하나 이상의 방법 및 조성물과 함께 사용하기 위한 키트 및 제조품이 본원에 개시된다. 이러한 키트는 바이알, 튜브 등과 같은 하나 이상의 용기를 수용하기 위해 구획화되는 캐리어, 패키지 또는 용기를 포함하고, 각각의 용기(들)는 본원에서 설명되는 방법에서 사용되는 별도의 요소 중 하나를 포함한다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주사기 및 시험관을 포함한다. 한 실시양태에서, 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로 형성된다.

[0304] 본원에서 제공되는 제조품은 포장 물질을 함유한다. 약학적 포장 물질의 예는 블리스터 팩, 병, 튜브, 백, 용기, 병, 및 선택된 제제 및 의도된 투여 및 치료 방식에 적합한 임의의 포장 물질을 포함하지만, 이로 제한되지는 않는다.

[0305] 예를 들어, 용기(들)는 본원에서 개시되는 하나 이상의 사이토카인(예를 들어, IL-2) 폴리펩티드 또는 사이토카인(예를 들어, IL-2) 접합체, 및 선택적으로 사이토카인(예를 들어, IL-2) 폴리펩티드 또는 사이토카인(예를 들어, IL-2) 접합체의 전달을 용이하게 하기 위한, 본원에서 설명되는 하나 이상의 약학적 부형제를 포함한다. 상기 키트는 선택적으로 본원에서 설명되는 방법에서의 용도와 관련된 식별 설명서 또는 라벨 또는 지침을 포함한다.

[0306] 키트는 전형적으로 내용물을 열거한 라벨 및/또는 사용 설명서, 및 사용 설명서가 있는 포장 삽입물을 포함한다. 또한, 일반적으로 일련의 지침이 포함된다.

[0307] 한 실시양태에서, 라벨은 용기 상에 있거나 용기와 관련되어 있다. 한 실시양태에서, 라벨을 형성하는 문자, 숫자 또는 다른 캐릭터가 용기 자체에 부착, 성형 또는 에칭될 때 라벨은 용기 상에 있고, 라벨이 또한 예를 들어 포장 삽입물로서 용기를 보유하는 저장기 또는 캐리어 내에 존재할 때 라벨은 용기와 관련되어 있는 것이다. 한 실시양태에서, 라벨은 내용물이 특정 치료 용도에 사용될 것임을 나타내기 위해 사용된다. 라벨은 또한 본원에서 설명되는 방법에서와 같이 내용물의 용도에 대한 지침을 표시한다.

[0308] 특정 실시양태에서, 약학 조성물은 본원에서 제공되는 화합물을 함유하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 포함하는 팩 또는 분배기 장치에 제공된다. 예를 들어, 팩은 블리스터 팩과 같은 금속 또는 플라스틱 포일을 포함한다. 한 실시양태에서, 팩 또는 분배기 장치에는 투여를 위한 지침이 수반된다. 한 실시양태에서, 팩 또는 분배기는 또한 의약품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 당국에 의해 규정된 형태로 용기와 관련된 통지서를 수반하며, 이 통지서는 인간 또는 수의용 투여를 위한 약물의 형태에 대한 당국의 승인을 반영한다. 예를 들어, 이러한 통지서는 의약품에 대해 미국 식품의약국(Food and Drug Administration)이 승인한 라벨 또는 승인된 제품 삽입물이다. 한 실시양태에서, 상용성 약학적 담체 내에 제제화된 본원에서 제공되는 화합물을 함유하는 조성물이 또한 제조되고, 적절한 용기에 배치되며, 지시된 병태의 치료를 위해 라벨링된다.

[0309] **특정 용어**

[0310] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 특허 청구된 주제가 속하는 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 상세한 설명은 단지 예시적이고 설명을 위한 것이며 특허 청구된 임의의 주제를 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 본 출원에서, 단수형의 사용은

구체적으로 다르게 언급되지 않는 한, 복수형을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 명백하게 다르게 지시되지 않는 한, 복수의 지시 대상을 포함한다는 점에 유의해야 한다. 본 출원에서, "또는"의 사용은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다. 또한, 용어 "포함하는", 및 다른 형태, 예컨대 "포함하다" 및 "포함되는"은 제한적인 의미로 사용되는 것이 아니다.

[0311] 본 발명의 다양한 특징이 하나의 실시양태와 관련하여 설명될 수 있지만, 특징은 또한 개별적으로 또는 임의의 적절한 조합으로 제공될 수 있다. 반대로, 본 발명은 명확성을 위해 별도의 실시양태와 관련하여 본원에서 설명될 수 있지만, 본 발명은 단일 실시양태로도 구현될 수 있다.

[0312] 본 명세서에서 "일부 실시양태", "실시양태", "한 실시양태" 또는 "다른 실시양태"의 언급은 그 실시양태와 관련하여 설명된 특정 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 일부 실시양태에 포함되지만, 반드시 본 발명의 모든 실시양태에 포함되는 것은 아님을 의미한다.

[0313] 본원에서 사용되는 바와 같이, 범위 및 양은 "약" 특정 값 또는 범위로 표현될 수 있다. 또한, 약은 정확한 양도 포함한다. 따라서, "약 5 μL"는 "약 5 μL" 및 또한 "5 μL"를 의미한다. 일반적으로, "약"이라는 용어는 예를 들어 15%, 10% 또는 5% 이내와 같은 실험 오차 내에 있을 것으로 예상되는 양을 포함한다.

[0314] 본원에서 사용되는 섹션 제목은 단지 조직적 목적을 위한 것이며, 설명된 주제를 제한하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0315] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "개체(들)", "피험체(들)"및 "환자(들)"는 임의의 포유동물을 의미한다. 일부 실시양태에서, 포유동물은 인간이다. 일부 실시양태에서, 포유동물은 비인간이다. 이들 용어는 의료계 종사자(예를 들어, 의사, 등록 간호사, 전문 간호사, 의사 보조, 간호 조무사 또는 호스피스 근무자)의 감독(예를 들어, 지속적 또는 간헐적)을 특징으로 하는 상황을 요구하거나 이들 상황으로 제한되지 않는다.

[0316] 본원에서 사용되는 바와 같이, 결합 친화도와 관련하여 용어 "유의한" 또는 "유의하게"는 표적 수용체에 대한 사이토카인(예를 들어, IL-2 폴리펩티드)의 결합에 영향을 주기에 충분한 사이토카인(예를 들어, IL-2 폴리펩티드)의 결합 친화도의 변화를 의미한다. 일부 경우에, 이 용어는 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 그 초과의 변화를 의미한다. 일부 경우에, 이 용어는 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 50배, 100배, 500배, 1000배 또는 그 초과의 변화를 의미한다.

[0317] 일부 경우에, 사이토카인 신호전달 복합체를 통한 하나 이상의 세포 집단의 활성화와 관련하여 용어 "유의한" 또는 "유의하게"는 세포 집단을 활성화하기에 충분한 변화를 의미한다. 일부 경우에, 세포 집단을 활성화하기 위한 변화는 수용체 신호전달 효능으로서 측정된다. 그러한 경우, EC50 값이 제공될 수 있다. 다른 경우에, ED50 값이 제공될 수 있다. 추가의 경우에, 사이토카인의 농도 또는 투여량이 제공될 수 있다.

[0318] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "효능"은 표적 효과를 생성하는데 필요한 사이토카인(예를 들어, IL-2 폴리펩티드)의 양을 지칭한다. 일부 경우에, 용어 "효능"은 표적 사이토카인 수용체(예를 들어, IL-2 수용체)를 활성화하기 위해 필요한 사이토카인(예를 들어, IL-2 폴리펩티드)의 양을 지칭한다. 다른 경우에, 용어 "효능"은 표적 세포 집단을 활성화하기 위해 필요한 사이토카인(예를 들어, IL-2 폴리펩티드)의 양을 지칭한다. 일부 경우에, 효능은 ED50(유효 용량 50) 또는 최대 효과의 50%를 생성하기 위해 필요한 용량으로 측정된다. 다른 경우에, 효능은 EC50(유효 농도 50), 또는 집단의 50%에서 목표 효과를 생성하기 위해 필요한 용량으로 측정된다.

[0319] **실시예**

[0320] 이들 실시예는 단지 예시적인 목적으로 제공되며, 본원에서 제공되는 특허 청구항의 범주를 제한하지 않는다.

[0321] **실시예 1**

[0322] **키나제 및 사이토카인 수용체 이량체화 검정**

[0323] *세포 취급*

[0324] 패쓰헌터(PathHunter) 세포주는 표준 절차에 따라 냉동기 스톡으로부터 확장되었다. 세포를 20 μL의 총 부피로 백색 벽의 384웰 마이크로플레이트에 씨딩하고, 시험 전에 적절한 시간 동안 인큐베이팅하였다.

[0325] *아고니스트 포맷*

[0326] 아고니스트 결정을 위해, 세포를 샘플과 함께 인큐베이팅하여 반응을 유도하였다. 검정 버퍼에서 5X 샘플을 생성하기 위해 샘플 스톡의 중간 희석을 수행하였다. 약 5 μL의 5X 샘플을 세포에 첨가하고, 검정에 따라 6 내지

16시간 동안 37℃에서 인큐베이팅하였다. 비히클 농도는 1%이었다.

[0327] *신호 검출*

[0328] 검정 신호는 각각 아고니스트 및 길항제 분석을 위한 12.5 또는 15 μL(50% v/v)의 패쓰헌터 검출 시약 칵테일의 단일 첨가, 이어서 실온에서 1시간 동안의 인큐베이팅을 통해 생성되었다. 일부 검정의 경우, 검정 성능을 향상시키기 위해 고감도 검출 시약(패쓰헌터 플래시 키트(Flash Kit))을 사용하여 활성을 검출하였다. 이들 검정에서, 동일한 부피의 검출 시약(25 또는 30 μL)을 웰에 첨가한 후, 실온에서 1시간 인큐베이팅하였다. 화학발광 신호 검출을 위해 퍼킨엘머 엔비젼(PerkinElmer Envision)™ 기기로 신호 생성 후 마이크로플레이트를 판독하였다.

[0329] *데이터 분석*

[0330] 화합물 활성을 CBIS 데이터 분석 스위트(ChemInnovation, 미국 캘리포니아주 소재)를 사용하여 분석하였다. 아고니스트 모드 검정의 경우, 활성 백분율은 다음 식을 사용하여 계산하였다:

[0331] % 활성 = 100% x (시험 샘플의 평균 RLU - 비히클 대조군의 평균 RLU)/(평균 MAX RLU 대조군 리간드 - 비히클 대조군의 평균 RLU).

[0332] 길항제 모드 분석의 경우, 억제 백분율은 다음 식을 사용하여 계산하였다:

[0333] % 억제 = 100% x (1-(시험 샘플의 평균 RLU - 비히클 대조군의 평균 RLU)/(EC80 대조군의 평균 RLU - 비히클 대조군의 평균 RLU)).

[0334] **실시예 2**

[0335] **1차 인간 백혈구 감소 시스템(LRS) 유래 PBMC 샘플에서 예시적인 IL-2 화합물의 생체외 면역 반응 프로파일링**

[0336] 예시적인 IL-2 화합물의 차별적인 수용체 특이성이 1차 면역 세포 하위 집단의 활성화를 어떻게 영향을 끼치는지 결정하기 위해, 인간 LRS 유래 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 샘플에서 림프구 활성화의 농도-반응 프로파일링을 다색 유세포 분석을 사용하여 수행하였다. 이러한 연구는 PrimityBio LLC(미국 캘리포니아주 프레몬트 소재)에서 수행되었다. 인간 LRS 샘플로부터 유래한 1차 림프구를 예시적인 IL-2 화합물의 희석 계열로 처리하고, 표 1에 제시된 패널을 사용하여 각각의 림프구 세포 유형에서의 pSTAT5 신호전달을 기초로 하여 정량하였다.

표 1

[0337]

마커	세포 집단
CD3	T 세포
CD4	Th 세포
CD8	T 이펙터 세포
CD45RA	나이브 T 세포
CD56	NK 세포
CD14/19	단핵구/B 세포
CD25	Treg 또는 노출된(experienced) T 세포
CD127	비 Treg
CD62L	기억 T vs 이펙터 기억 T 세포
pSTAT5 (Y694)	활성화 마커

[0338] 예시적인 IL-2 변이체 K9_30kD로 처리한 후 pSTAT5 축적을 판독하여, 농도-반응 모드에서 상이한 T 및 NK 세포 하위세트의 활성화에 대한 유세포 분석 데이터를 분석하였다.

[0339] 도 4a-도 4b는 인간 LRS 1차 세포에서 pSTAT5 신호전달에 대한 용량 반응 곡선(도 4a) 및 마우스 CTLL-2 집단에

서의 증식 반응(도 4b)을 보여준다.

[0340] 표 2는 지시된 IL-2 변이체로 처리된 인간 LRS 샘플 또는 CTLL-2 증식에서 pSTAT5 신호전달(EC50)에 대한 용량 반응 EC50을 보여준다.

표 2

[0341]

화합물	NK 세포	CD8+ T 세포	Treg 세포	CD8+/Treg 비	천연 IL-2 대비 Treg EC50 의 증가 배수	CTLL-2 증식
천연 IL-2	4586	31024	75	414	1	455.8
K9_30kD	169578	1100679	2217	496	30	504
H16_30kD	2545257	12070108	34976	345	466	80755
L19_30kD	6756768	22436430	93205	241	1243	3510
D20_30kD	2643930	9505217	1129455	8	15059	689939
M23_30kD	143620	539824	1030	524	14	1102
N26_30kD	258531	1188859	2459	483	33	2594
N88_30kD	3298113	11111537	323201	34	4309	66606
E100_30kD	35088	195823	483	405	6	1676
N119_30kD	34010	143380	535	268	11	1215
T123_30kD	33396	152928	269	569	6	255
Q126_30kD	3676807	19722480	29454	670	393	3584
S127_30kD	20210	92190	150	615	3	123
T131_30kD	24207	132922	258	515	3	641
N88R/D109_30kD	2780819	12503386	175805	71	3663	59577
V91K	20537	102255	142	720	3	99.5
N88R	2312847	15025734	11082	1356	148	363

[0342] EC50 값(pg/mL)은 MFI 플롯으로부터 생성된 용량 반응 곡선으로부터 계산하였다.

[0343] *각각의 개별 실험에서 천연 IL-2(야생형 IL-2) 실행과 비교한 Treg 효능 변화.

[0344] **실시예 3**

[0345] **종양 보유 C57BL/6 마우스에서의 PK 연구**

[0346] 실험 세부 사항은 하기 표 3에 요약되어 있다.

표 3

[0347]

군	동물의 수	시험/대조군 물질 (용량)	경로, 투여 요법	종점(들)
1	9	천연 IL-2 (야생형) (3.0 mg/kg) 농도: 0.6 mg/mL	IV, 5 mL/kg 으로 T=0 에서 제 0 일에 단일 투여	투여 후 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8,12, 및 24 시간에 혈액 채취
2	9	K35_30kD (3.0 mg/kg) 농도: 0.6 mg/mL	IV, 5 mL/kg 으로 T=0 에서 제 0 일에 단일 투여	
3	9	K35_30kD (0.3 mg/kg) 농도: 0.6 mg/mL	IV, 5 mL/kg 으로 T=0 에서 제 0 일에 단일 투여	
추가	6	N/A	N/A	블랭크 매트릭스 수거 (시간 제약이 없음)
총	33			

[0348] 2개의 용량 수준의 예시적인 PEG화된 IL-2 화합물 K35_30kD의 약동학적 특성을 평가하였다. 동결건조된 시험 물질을 PBS에서 재구성하고, 9마리의 수컷 C57BL/6 마우스에게 각각의 투여군에 대한 꼬리 정맥 내 주사를 통해 0.3 및 3 mg/kg을 투여하였다(아래의 수집 세부 사항 참조). 투여 후 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 및 24 시간에 혈액 샘플을 채취하였다. 천연 마우스 IL-2와 교차 반응하지 않는 Abcam의 hIL-2 ELISA 키트(ab100566)를 시험 물질의 검출 및 정량에 사용하였다. 천연 및 PEG화된 화합물의 키트 검출 감도의 ELISA 특이적 차이를

조정하기 위해, 천연 IL-2 및 K35_30kD 시험 물질 표준 곡선을 시험 물질 희석 버퍼를 사용하여 생성하고, 데이터를 각각의 표준 곡선에 대해 분석하였다. 플로팅된 데이터는 상기 설명된 바와 같이 3개의 개별 샘플(생물학적 반복 시험체)의 평균 및 SEM을 나타내고, K35_30kD 시험 물질에 대한 PK 파라미터를 추출하고, 표 4에 요약하였다.

표 4

[0349]

분석물	파라미터	단위	용량	
			0.3 mg/kg	3 mg/kg
			평가치	
IL-2 K35-mPEG30kD	T_{max}	hr	0.250	0.250
	C_{max}	ng/mL	6080	57700
	AUC_{0-t}	hr*/ng/mL	38500	425000
	R^2		0.994	0.947
	$AUC_{\%extrap}$	%	35.3	37.4
	$AUC_{0-\infty}$	h*ng/mL	59600	679000
	$t_{1/2}$	hr	18.2	19.5
	C_{max}/D	kg*ng/mL/mg	20300	19200
	AUC_{0-t}/D	hr*ng/mL	128000	142000

[0350] 도 5는 2개의 상이한 농도에서의 K35_30kD의 향상된 PK 프로파일을 보여준다. 이들의 PK 프로파일은 야생형 IL-2와 비교된다.

[0351] **실시예 4**

[0352] 표 5는 본원에서 설명되는 IL-2 서열을 예시한 것이다.

표 5

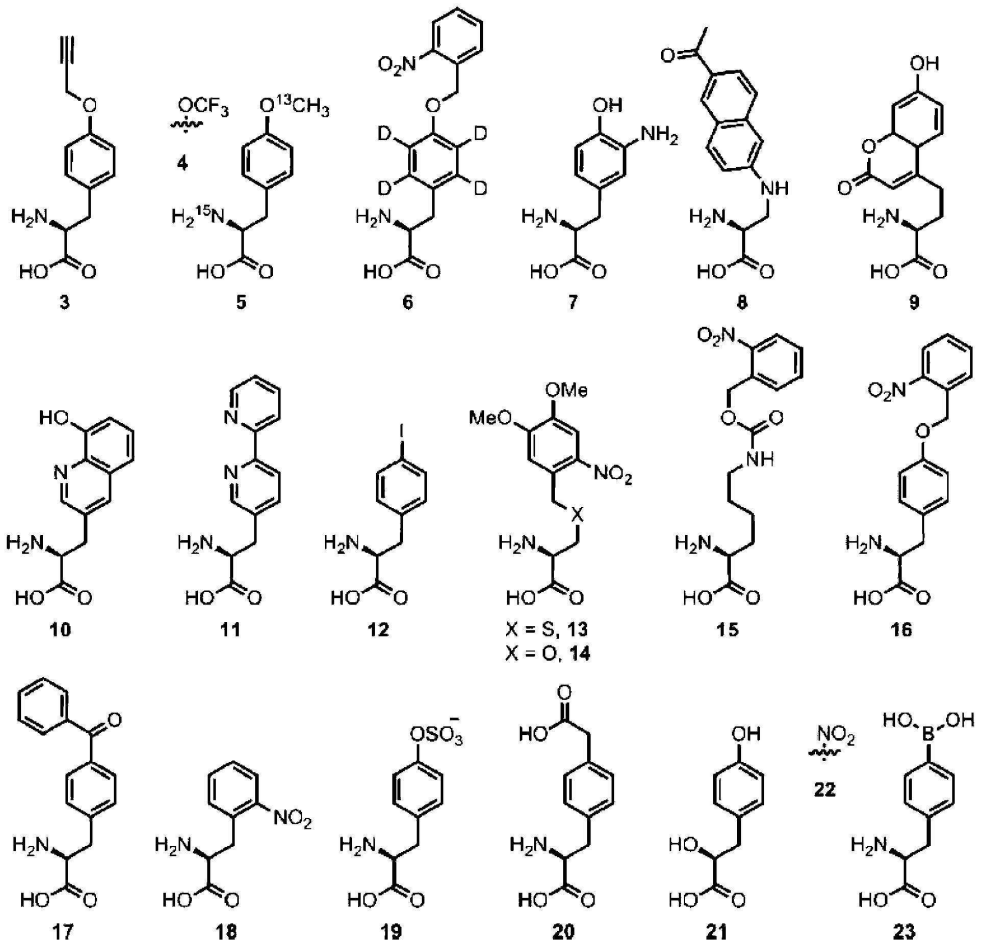
[0353]

명칭	서열	서열 번호
IL-2 (호모 사피엔스) (성숙 형태)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKL TRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLN LAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYA DETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT	1
IL-2 (호모 사피엔스) (전구체) NCBI 수탁 번호: AAB46883.1	MYRMQLLSCIALSLALVTNSAPTSSSTKKTQLQLE HLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRD LISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFCQSIISTLT	2

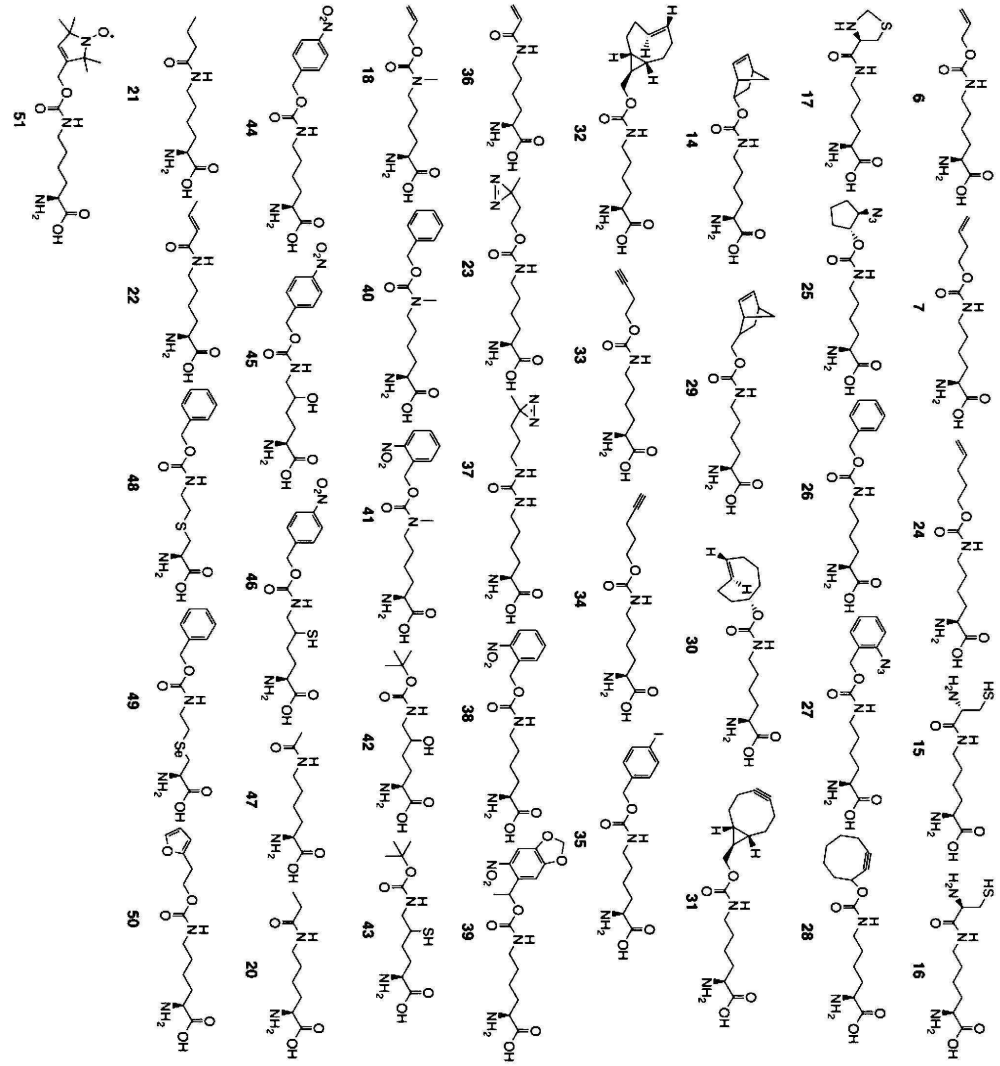
[0354] 본 발명의 바람직한 실시양태가 본 명세서에서 제시되고 설명되었지만, 이러한 실시양태는 단지 예로서 제공된다는 것이 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 다수의 변형, 변경 및 치환이 본 발명을 벗어나지 않으면서 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 수행될 것이다. 본 명세서에서 설명되는 본 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있음을 이해하여야 한다. 다음 청구항은 본 발명의 범위를 정의하고 이들 청구항의 범위 내의 방법 및 구조 및 이의 균등물이 본 발명에 포함되는 것이 의도된다.

도면

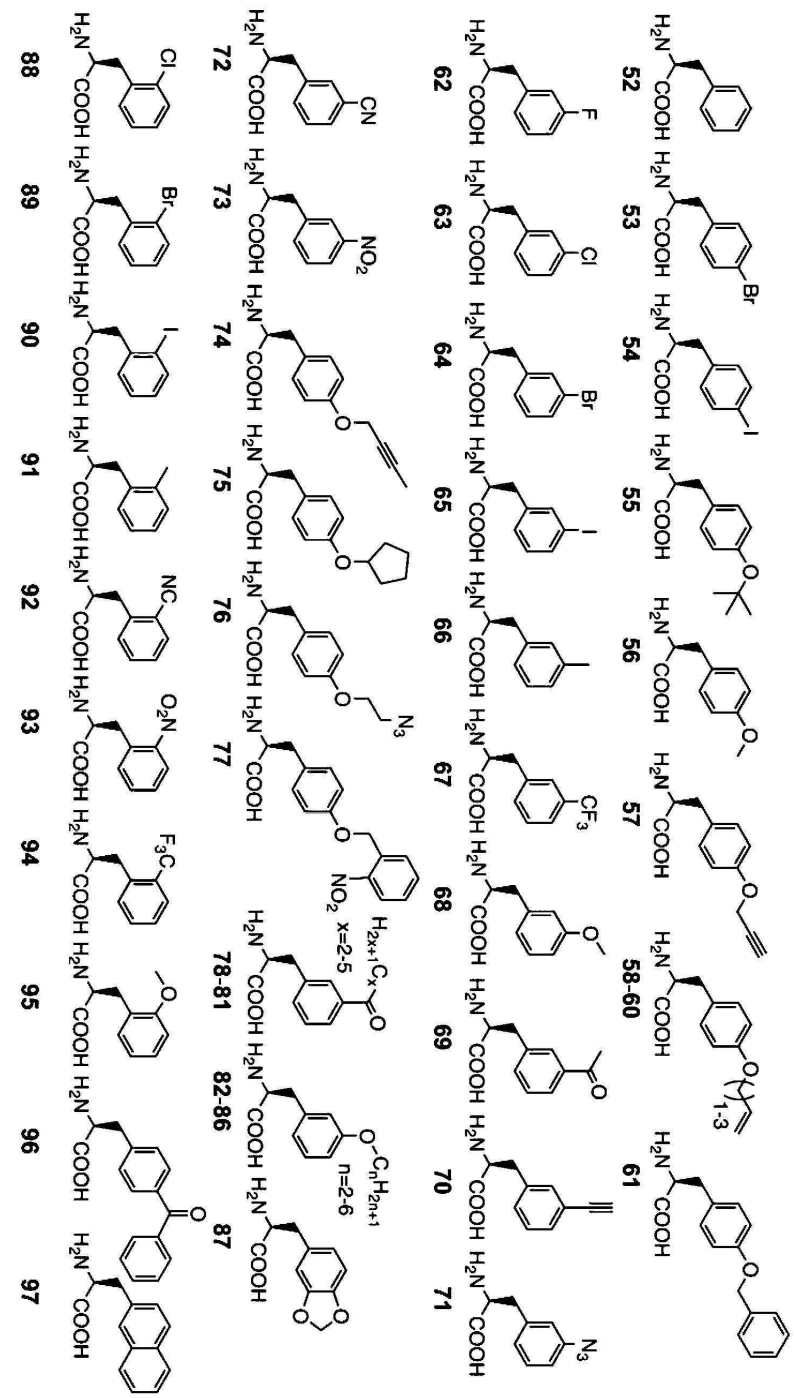
도면1



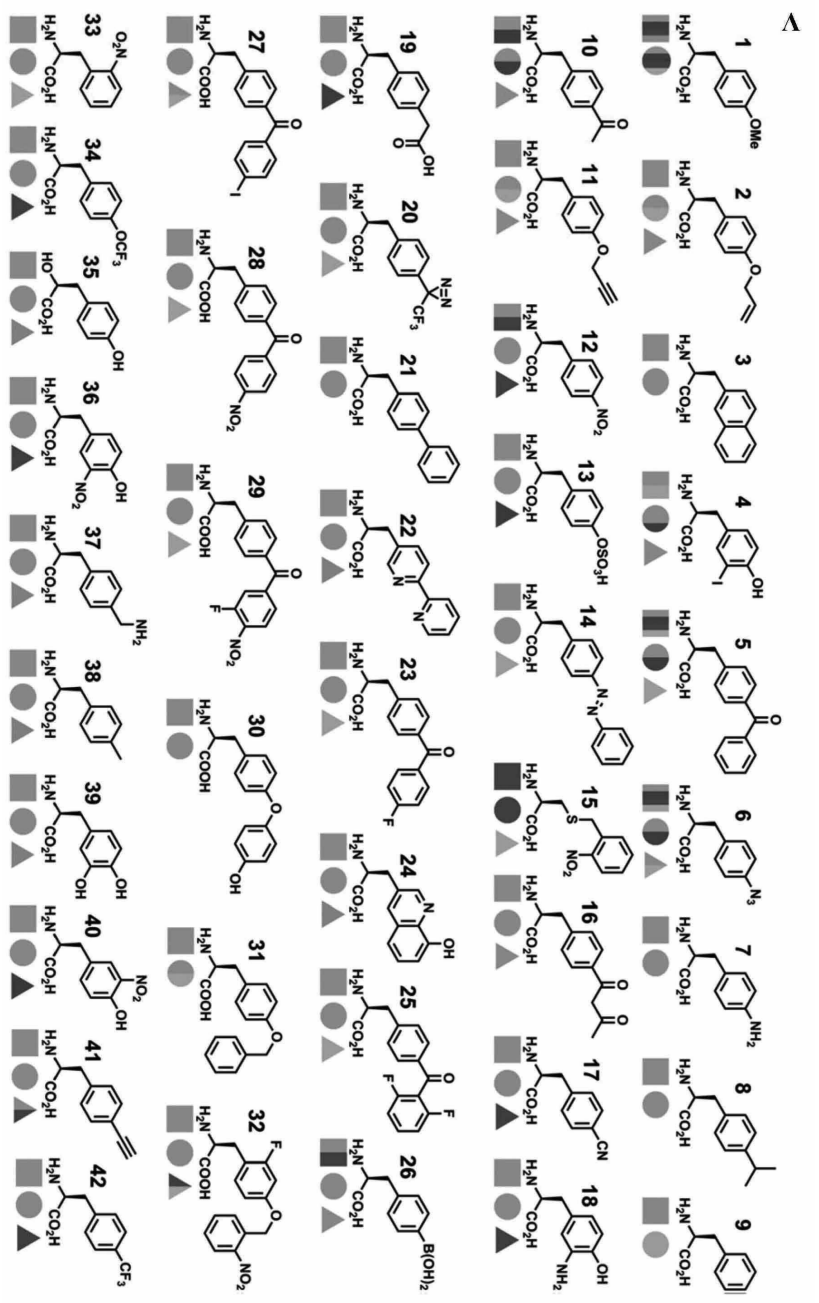
도면2a



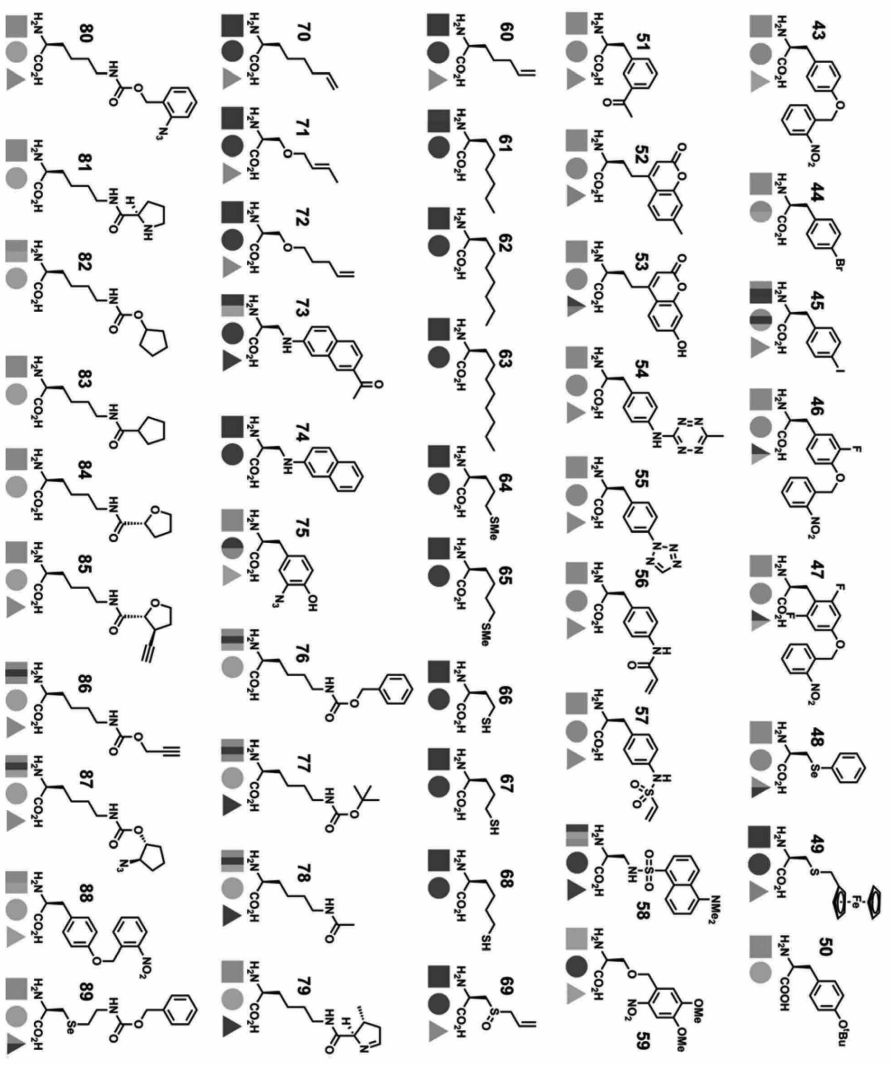
도면2b


52
53
54
55
56
57
58-60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78-81
82-86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
F
Cl
Br
I
CF3
O
1-3
CN
NO2
N3
x=2-5
n=2-6
NC
O2N
F3C

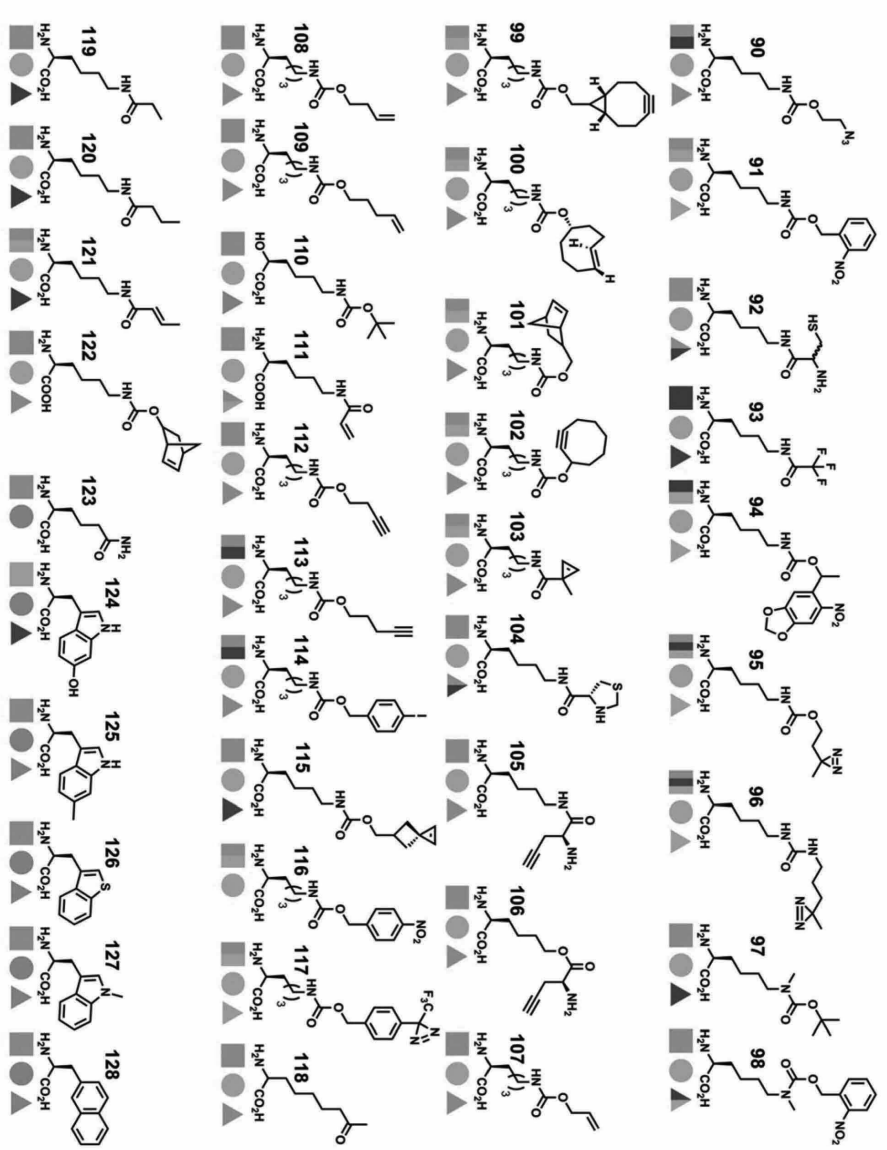
도면3a



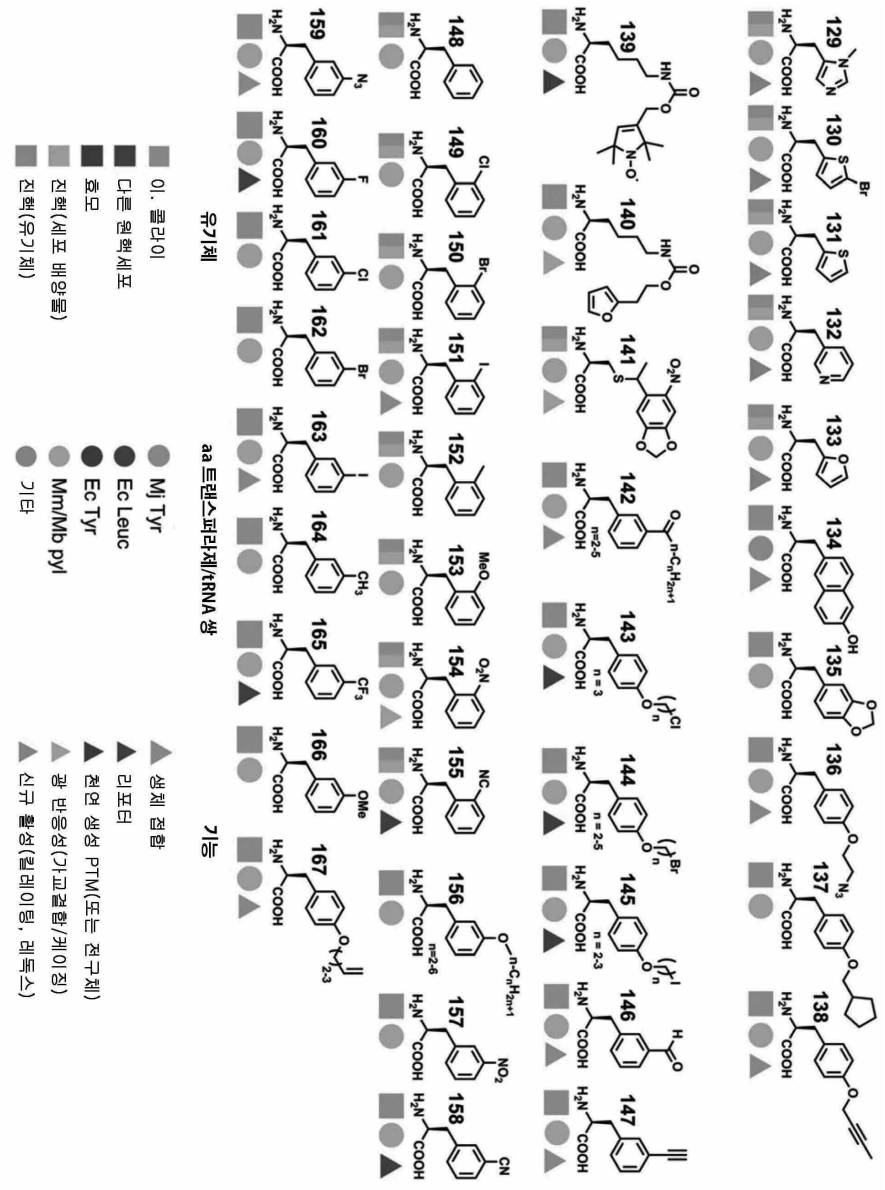
도면3b



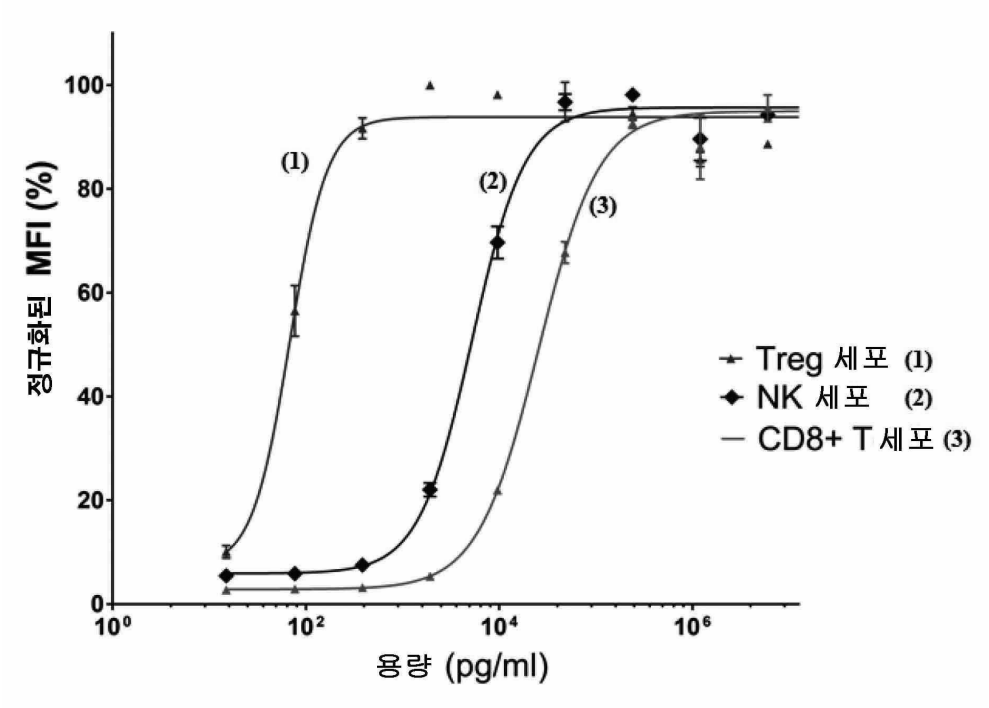
도면3c



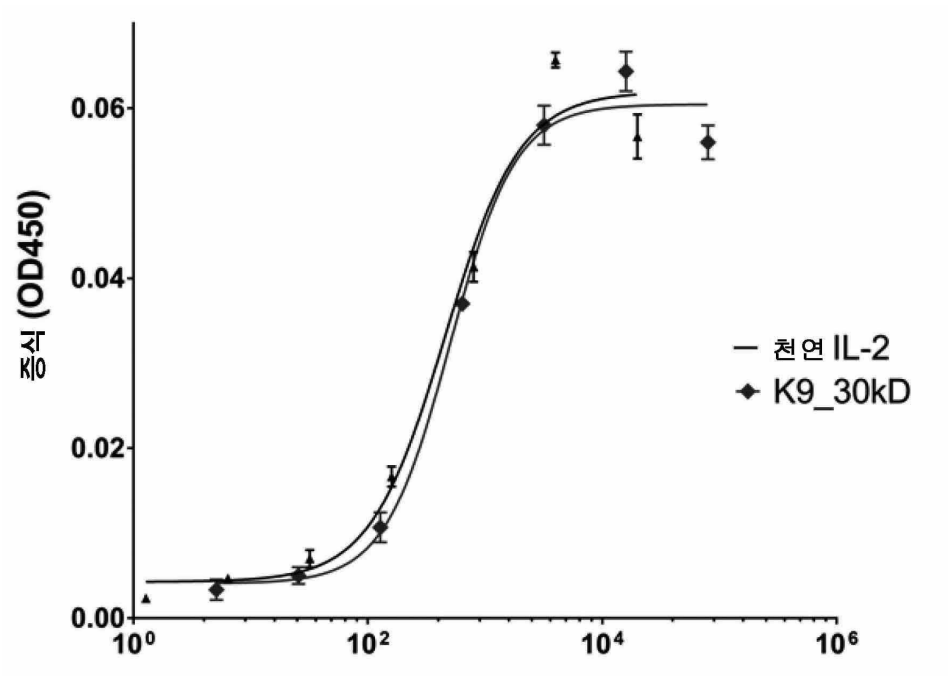
도면3d


129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
유기체
이. 콜라이
다른 원핵세포
효모
진핵(세포 배양물)
진핵(유기체)
aa 트랜스퍼라제/tRNA 쌍
Mj Tyr
Ec Leuc
Ec Tyr
Mm/Mb pyl
기타
기능
생체 접합
리포터
천연 생성 PTM(또는 전구체)
광 반응성(가교결합/케이징)
신규 활성(킬레이팅, 레독스)

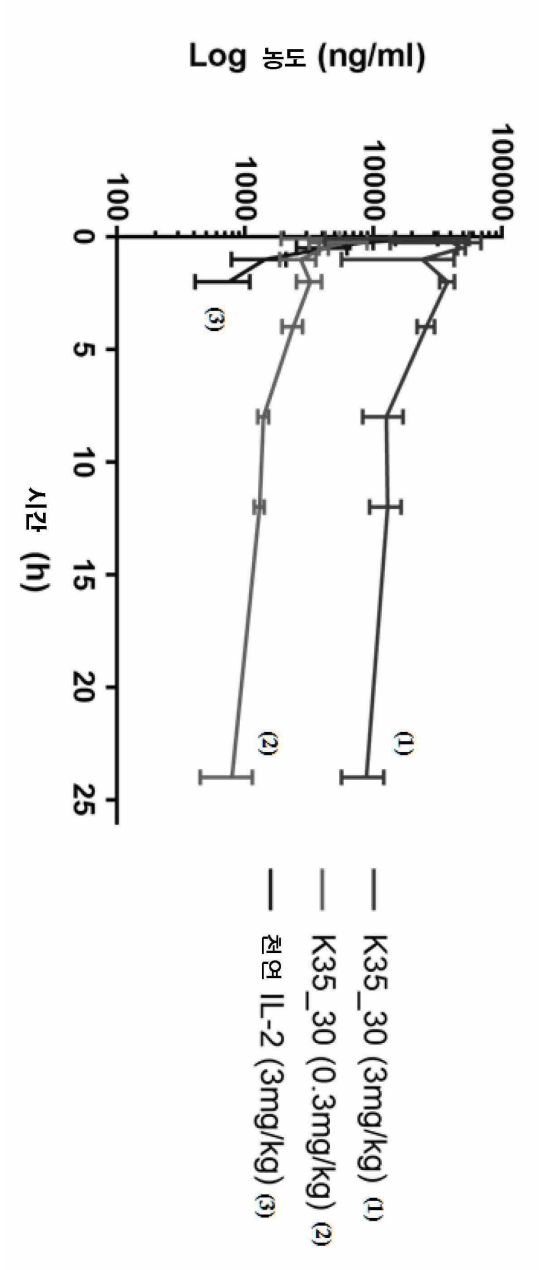
도면4a


정규화된 MFI (%)
100
80
60
40
20
0
(1)
(2)
(3)
Treg 세포 (1)
NK 세포 (2)
CD8+ T 세포 (3)
10^0
10^2
10^4
10^6
용량 (pg/ml)

도면4b


증식 (OD450)
0.06
0.04
0.02
0.00
천연 IL-2
K9_30kD
10^0
10^2
10^4
10^6

도면5



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> SYNTHORX INC.

<120> CYTOKINE CONJUGATES FOR THE TREATMENT OF AUTOIMMUNE DISEASES

<130> 46085-710.602

<140><141><150> 62/540,781

<151> 2017-08-03

<160> 5

<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> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15

Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu
20 25 30

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

85 90 95
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile
100 105 110
Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala
115 120 125
Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe
130 135 140
Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
145 150

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<400> 3
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5
<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
peptide
<220><221> MOD_RES
<222> (4)..(4)

<223> Any amino acid except proline

<400> 4

Val Pro Gly Xaa Gly

1 5

<210> 5

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<400> 5

Phe Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro

1 5 10 15

Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

20 25 30