

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0151202

(43) 공개일자 2022년11월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/55 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)

A61K 47/60 (2017.01) A61P 35/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07K 14/55 (2013.01)

A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7035153

(22) 출원일자(국제) 2021년03월11일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년10월07일

(86) 국제출원번호 PCT/US2021/022011

(87) 국제공개번호 WO 2021/183832

국제공개일자 2021년09월16일

(30) 우선권주장

62/987,872 2020년03월11일 미국(US)

(71) 출원인

암브룩스, 인코포레이티드

미국 캘리포니아주 92037 라호야 노스 터레이 파
인스 로드 10975 스위트 100

(72) 발명자

첸 시겔

미국 92037 캘리포니아주 라호야 노스 터레이 파
인스 로드 10975 암브룩스, 인코포레이티드 내

루 잉춘

미국 92037 캘리포니아주 라호야 노스 터레이 파
인스 로드 10975 암브룩스, 인코포레이티드 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김진희, 김태홍

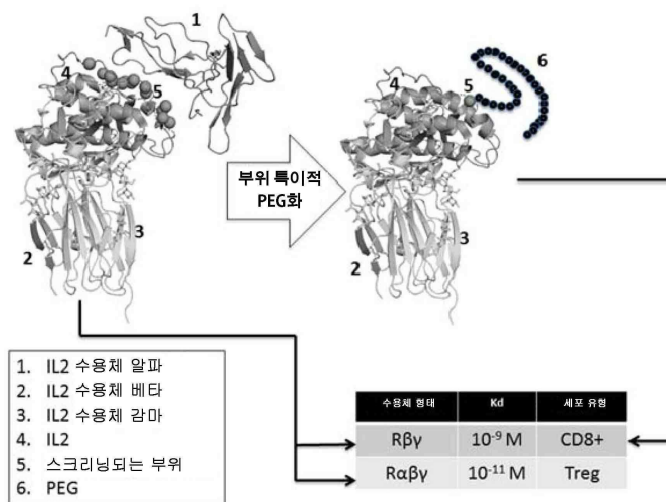
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 인터류킨-2 폴리펩타이드 접합체 및 그의 사용 방법

(57) 요약

본 발명은 인터류킨-2(IL-2) 폴리펩타이드 접합체를 포함하는 조성물 및 방법을 제공한다. 또한, 암을 비롯한 질환 또는 병태의 치료를 위한 IL-2 접합체가 기재된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 47/60 (2017.08)

A61P 35/00 (2018.01)

(72) 발명자

라쉬드 하루너

미국 92037 캘리포니아주 라호야 노스 터레이 파인
스 로드 10975 암브룩스, 인코포레이티드 내

크누드센 니콜라스

미국 92037 캘리포니아주 라호야 노스 터레이 파인
스 로드 10975 암브룩스, 인코포레이티드 내

티안 썩

미국 92037 캘리포니아주 라호야 노스 터레이 파인
스 로드 10975 암브룩스, 인코포레이티드 내

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드로서, 위치 42에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산; 서열번호 2 내의 선택된 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환; 및 하나 이상의 PEG 분자를 포함하고, 폴리펩타이드는 폴리펩타이드에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 통해 하나 이상의 PEG 분자에 접합되는 것인 변형된 IL-2 폴리펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 위치 45에 도입된 것인 변형된 IL-2 폴리펩타이드.

청구항 3

제2항에 있어서, 임의로, 서열번호 2 내의 선택된 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 파라-아세틸 페닐알라닌, *p*-니트로페닐알라닌, *p*-술포티로신, *p*-카르복시페닐알라닌, *o*-니트로페닐알라닌, *m*-니트로페닐알라닌, *p*-보로닐페닐알라닌, *o*-보로닐페닐알라닌, *m*-보로닐페닐알라닌, *p*-아미노페닐알라닌, *o*-아미노페닐알라닌, *m*-아미노페닐알라닌, *o*-아실페닐알라닌, *m*-아실페닐알라닌, *p*-OMe 페닐알라닌, *o*-OMe 페닐알라닌, *m*-OMe 페닐알라닌, *p*-술포페닐알라닌, *o*-술포페닐알라닌, *m*-술포페닐알라닌, 5-니트로 His, 3-니트로 Tyr, 2-니트로 Tyr, 니트로 치환된 Leu, 니트로 치환된 His, 니트로 치환된 De, 니트로 치환된 Trp, 2-니트로 Trp, 4-니트로 Trp, 5-니트로 Trp, 6-니트로 Trp, 7-니트로 Trp, 3-아미노티로신, 2-아미노티로신, 0-술포티로신, 2-술포옥시페닐알라닌, 3-술포옥시페닐알라닌, *o*-카르복시페닐알라닌, *m*-카르복시페닐알라닌, *p*-아세틸-L-페닐알라닌, *p*-프로파길-페닐알라닌, 0-메틸-L-티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, 0-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-0-아세틸-GlcNAc β -세린, L-도파, 불소화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, *p*-아지도-L-페닐알라닌, *p*-아실-L-페닐알라닌, *p*-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포티로신, *p*-요오도-페닐알라닌, *p*-브로모페닐알라닌, *p*-아미노-L-페닐알라닌, *p*-프로파길옥시-L-페닐알라닌, 4-아지도-L-페닐알라닌, 파라-아지도에톡시 페닐알라닌, 및 파라-아지도메틸-페닐알라닌인 변형된 IL-2 폴리펩타이드.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 파라-아세틸 페닐알라닌인 변형된 IL-2 폴리펩타이드.

청구항 6

제1항 또는 제3항에 있어서, 하나 이상의 아미노산 치환은 서열번호 2의 위치 38 및/또는 65에 있는 것인 변형된 IL-2 폴리펩타이드.

청구항 7

제1항 또는 제3항에 있어서, 위치 38에서의 아미노산 치환은 알라닌인 변형된 IL-2 폴리펩타이드.

청구항 8

제1항 또는 제3항에 있어서, 위치 65에서의 아미노산 치환은 아르기닌인 변형된 IL-2 폴리펩타이드.

청구항 9

제1항에 있어서, 하나 이상의 PEG 분자는 선형 또는 분지형인 변형된 IL-2 폴리펩타이드.

청구항 10

제1항에 있어서, 하나 이상의 PEG 분자는 5 kDa, 10 kDa, 15 kDa, 20 kDa, 25 kDa, 30 kDa, 35 kDa, 40 kDa, 45 kDa 및 50 kDa의 평균 분자량을 갖는 것인 변형된 IL-2 폴리펩타이드.

청구항 11

제1항에 있어서, 하나 이상의 PEG 분자는 30 kDa인 변형된 IL-2 폴리펩타이드.

청구항 12

제1항에 있어서, 하나 이상의 PEG 분자는 40 kDa인 변형된 IL-2 폴리펩타이드.

청구항 13

대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 암의 치료를 필요로 하는 대상체에게 유효량의 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 변형된 IL-2 폴리펩타이드를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 암은 유방암, 소세포 폐암, 난소암, 전립선암, 위 암종, 위장췌장 종양 (gastroenteropancreatic tumor), 자궁경부암, 식도 암종, 결장암, 결장직장암, 상피 유래 암 또는 종양, 신장 암, 뇌암, 교모세포종, 췌장암, 갑상선 암종, 자궁내막암, 췌장암, 두경부암 또는 피부암인 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 치료제를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 치료제는 화학요법제, 호르몬제, 항종양제, 면역자극제, 면역조절제, 면역치료제 또는 이들의 조합인 방법.

청구항 17

의약 제조에서의, 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 변형된 IL-2 폴리펩타이드의 용도.

청구항 18

치료 유효량의 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 IL-2 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 19

서열번호 9 또는 11의 IL-2 폴리펩타이드.

청구항 20

글리코실화된, 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 IL-2 폴리펩타이드.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 상호 참조

[0002] 본 출원은 2020년 3월 11일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/987,872호를 우선권으로 주장하며, 상기 가출원은 그 전체가 본원에 참조로 인용된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은, EFS-Web을 통해 ASCII 형식으로 제출되고 그 전체가 본원에 참조로 인용된 서열목록을 포함한다. 2021년 3월 3일에 생성된 ASCII 사본은, 명칭이 AMBX_0232_00PCT_ST25.txt이고 크기가 27,704 바이트이다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 개시내용의 실시양태는 적어도 면역요법, 면역종양학 및 암 요법의 분야에 관한 것이다. 더 구체적으로는, 본 개시내용은 인터류킨-2(IL-2) 접합체 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] 암은 가장 유의적인 건강 상태 중 하나이다. 미국에서, 암은 사망률이 심장병 다음으로 높고, 4건의 사망 중 1건을 차지한다. 암 발병률은 미국 인구가 나이가 들어감에 따라 증가할 것으로 예상되며, 이는 이 질환의 영향을 더욱 증대시킨다. 1970년대 및 1980년대에 확립된 현재의 암 치료법은 크게 변하지 않았다. 화학 요법, 방사선 및 새로운 표적 요법을 포함한 다른 치료 양식을 포함하는 이러한 치료법은 무엇보다도 이러한 요법이 주로 종양 덩어리를 표적으로 하기 때문에 대부분의 진행된 병기의 일반적인 암에서 이용될 때 전체 생존 이점이 제한적으로 나타났다.

[0008] 보다 구체적으로, 지금까지의 통상적인 암 진단 및 치료법은 매우 빠르게 성장하는 신생물 세포(즉, 종양 덩어리를 형성하는 세포)를 선택적으로 검출하고 박멸하려고 시도해왔다. 표준 종양 요법은 종종 과도한 독성이 없는, 즉 종종 "최대 허용 용량"(MTD) 또는 "관찰된 유해한 수준 없음"(NOAEL)으로도 언급되는 최고 용량의 방사선 또는 화학 요법제를 투여하도록 1차적으로 설계되었다. 많은 기존의 암 화학 요법(예를 들어, 사이클로포스파미드와 같은 알킬화제, 5-플루오로우라실과 같은 항대사물질, 및 빈크리스틴과 같은 식물 알칼로이드) 및 기존의 방사선 요법은 주로 세포 성장 및 DNA 복제와 관련된 세포 메커니즘을 방해함으로써 암세포에 독성 효과를 나타낸다. 또한, 화학 요법 프로토콜은 종종 치료 효능을 높이기 위해 화학 요법제의 조합물을 투여하는 것을 포함한다. 매우 다양한 화학 요법제를 이용할 수 있음에도 불구하고, 이들 치료법에는 많은 단점이 있다. 예를 들어, 화학 요법제는 정상이든 악성이든, 빠르게 성장하는 세포에 대한 비특이적 부작용으로 인해 독성이 있는 것으로 악명이 높고, 예를 들어 화학 요법제는 골수 억제, 면역 억제 및 위장 장애 등을 포함하는 심각하고 종종 위험한 부작용을 유발한다.

[0009] 암 줄기 세포

[0010] 암 줄기 세포는 종양의 나머지 90%(즉, 종양 덩어리)에 비해 더 종양을 유발하고 상대적으로 더 느리게 성장하거나 휴지 상태이며 종종 종양 덩어리보다 상대적으로 화학 내성이 더 높은, 종양의 고유한 하위 집단(종종 0.1-10% 정도)을 포함한다. 기존의 치료법 및 요법이 대부분 빠르게 증식하는 세포(즉, 종양 덩어리를 구성하는 암 세포)를 공격하도록 설계되었기 때문에, 종종 느리게 성장하는 암 줄기 세포는 빠르게 성장하는 종양 덩어리보다 기존의 치료법 및 요법에 대해 상대적으로 저항성이 더 클 수 있다. 암 줄기 세포는 다중 약물 내성 및 항-아포토시스 경로와 같이 세포를 상대적으로 화학 내성으로 만드는 다른 특징을 발현할 수 있다. 앞서 언급한 것은 대부분의 진행된 병기의 암 환자에서 장기적인 이익을 보장하기 위한 표준 종양 치료 요법이 실패한, 즉, 암 줄기 세포를 적절히 표적으로 하여 이를 근절하지 못한 주요 원인이 될 것이다. 일부 예에서, 암 줄기 세포(들)는 종양의 원조 세포이다(즉, 종양 덩어리를 구성하는 암 세포의 전구 세포이다).

[0011] IL-2는 신장 세포 암종 및 전이성 흑색종과 같은 여러 암 치료에 사용되어 왔다. 시판되는 IL-2 알데스류킨(Aldesleukin)®은 비글리코실화되고 제거된 알라닌-1 및 세린-125로 대체된 잔기 시스테인-125를 갖는 재조합 단백질이다(Whittington et al., 1993). IL-2는 암 치료에서 FDA 승인을 받은 최초의 사이토카인이지만, IL-2는 고용량으로 사용될 때 심각한 부작용을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 이것은 잠재적 환자에 대한 그의 적용을 크게 제한하였다. 심각한 부작용의 근본적인 메커니즘은 IL-2가 그의 수용체 중 하나인 IL-2R α 에 결합하기 때문이다. 일반적으로, IL-2는 3개의 모든 수용체가 조직에 존재할 때 IL-2R α (또는 CD25), IL-2R β (또는 CD122) 및 IL-2R γ (또는 CD132)를 포함하는 그의 수용체와 이종삼량체 복합체를 형성할 수 있을 뿐만 아니라, IL-2R β 및 IL-2R γ 와 이종이량체 복합체를 형성할 수도 있다. 임상 환경에서, 고용량의 IL-2를 사용하면, IL-2가 T_{reg} 세포의 주요 수용체 형태인 IL-2 $\alpha\beta\gamma$ 에 결합하기 시작한다. T_{reg} 세포의 억제 효과는 암 면역 요법에서 IL-2 적용의 원하지 않는 효과를 유발한다. IL-2의 부작용을 완화하기 위해, 당업계에서 다수의 접근법이 이용되었다. 예를 들어, 넥타르(Nektar)에 의해 만들어진 IL-2의 한 형태는, 6개의 PEG화된 라이신을 사용하여 IL-2 표면의 IL2R α 결합 영역을 차폐한다(Charych et al., 2016). 이러한 형태의 PEG화된 IL-2는 연장된 반감기를 가지며, 단일 및 다중 PEG화된 형태의 혼합물을 포함하고, 매우 많은 양의 PEG를 함유하고, 또한 개선된

부작용을 나타냈다. 그러나, 활성 연구의 결과는 상기 이중성 6-PEG화된 IL-2 혼합물에서 PEG화된 IL-2의 효과적인 형태가 오직 단일 PEG화된 형태임을 보여주었다. 따라서, IL-2의 부작용을 조절하는 생성물의 균일하고 잘 정의된 조성을 갖는 보다 효과적인 PEG화된 IL-2가 필요하다.

[0012] 비유전적으로 코딩된 아미노산을 단백질에 도입하는 능력은 라이신의 엡실론-NH₂, 시스테인의 설프히드릴 -SH, 히스티딘의 이미노 기 등과 같은 천연 발생 작용기에 대한 가치있는 대안을 제공할 수 있는 화학적 작용기의 도입을 허용한다. 특정 화학 작용기는 유전적으로 코딩되는 20개의 일반적인 아미노산에서 발견되는 작용기에 불활성인 것으로 알려져 있지만, 쉽고 효율적으로 반응하여 안정한 연결을 형성한다. 예를 들어, 아지드 및 아세틸렌 기는 촉매량의 구리의 존재 하에 수성 조건 하에서 휘스겐(Huisgen) [3+2] 고리 부가 반응을 겪는 것으로 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Tornøe, et al., (2002) J. Org. Chem. 67:3057-3064]; 및 [Rostovtsev, et al., (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599]을 참조한다. 예를 들어, 아지드 모이어티를 단백질 구조에 도입함으로써, 단백질에서 발견되는 아민, 설프히드릴, 카르복실산, 히드록실 기에 화학적으로 불활성이지만 또한 아세틸렌 모이어티와 원활하고 효율적으로 반응하여 고리 부가 생성물을 형성하는 작용기를 도입할 수 있다. 중요한 것은 아세틸렌 모이어티가 없을 때 아지드가 다른 단백질 측쇄의 존재 하에 및 생리적 조건 하에서 화학적으로 불활성이고 비반응성을 유지한다는 것이다.

[0013] 본 발명은 무엇보다도 IL-2 폴리펩타이드 접합체의 활성 및 생산과 관련된 문제를 다루고, 또한 종양에 대한 향상된 활성 및/또는 개선된 접합 및/또는 개선된 치료 반감기와 같은 개선된 생물학적 또는 약리학적 특성을 갖는 IL-2 폴리펩타이드의 생산을 다룬다. 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드는 삼량체성 IL-2 수용체(알파, 베타 및 감마)를 발현하는 것으로 알려진 Treg 세포 및 IL-2 수용체의 베타 및 감마 이량체를 주로 발현하는 CD8 세포들 모두를 표적으로 한다. 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드는 Treg 세포의 알파 수용체에 대한 결합을 감소시키고, CD8 세포의 베타 및 감마 이량체에 대한 편향된 결합을 촉진하고, 이에 의해 IL-2 수용체 알파가 고도로 발현되는 질환 또는 병태에 대한 개선된 치료 적용 및 개선된 예후를 제공할 수 있다.

발명의 내용

[0014] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드로서, 위치 42에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산; 서열번호 2 내의 선택된 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환; 및 하나 이상의 PEG 분자를 포함하고, 폴리펩타이드는 폴리펩타이드에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 통해 하나 이상의 PEG 분자에 접합되는 것인 변형된 IL-2 폴리펩타이드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드로서, 위치 45에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산; 서열번호 2 내의 선택된 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환; 및 하나 이상의 PEG 분자를 포함하고, 폴리펩타이드는 폴리펩타이드에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 통해 하나 이상의 PEG 분자에 접합되는 것인 변형된 IL-2 폴리펩타이드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 2에 상응하는 아미노산 서열의 위치 42에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 2의 위치 45에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드로서, 위치 42에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산; 하나 이상의 PEG 분자; 및 임의로 서열번호 2 내의 선택된 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고; 폴리펩타이드는 폴리펩타이드에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 통해 하나 이상의 PEG 분자에 접합되는 것인 변형된 IL-2 폴리펩타이드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드로서, 위치 45에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산; 하나 이상의 PEG 분자; 및 임의로 서열번호 2 내의 선택된 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고; 폴리펩타이드는 폴리펩타이드에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 통해 하나 이상의 PEG 분자에 접합되는 것인 변형된 IL-2 폴리펩타이드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 2 내의 선택된 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환을 임의로 포함한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 파라-아세틸 페닐알라닌, *p*-니트로페닐알라닌, *p*-술포티로신, *p*-카르복시페닐알라닌, *o*-니트로페닐알라닌, *m*-니트로페닐알라닌, *p*-보로닐페닐알라닌, *o*-보로닐페닐알라닌, *m*-보로닐페닐알라닌, *p*-아미노페닐알라닌, *o*-아미노페닐알라닌, *m*-아미노페닐알라닌, *o*-아실페닐알라닌, *m*-아실페닐알라닌, *p*-OMe 페닐알라닌, *o*-OMe 페닐알라닌, *m*-OMe 페닐알라닌, *p*-술포페닐알라닌, *o*-술포페닐알라닌, *m*-술포페닐알라닌, 5-니트로 His, 3-니트로 Tyr, 2-니트로 Tyr, 니트로 치환된 Leu, 니트로 치환된 His, 니트로 치환된 De, 니트로 치환된 Trp, 2-니트로 Trp, 4-니트로 Trp, 5-니트로 Trp, 6-니트로 Trp, 7-니트로 Trp, 3-아미노티로신, 2-아미노티로신, 0-술포티로신, 2-술포옥시페닐알라닌, 3-술포옥시페닐알라닌, *o*-카르복시페닐알라

닌, m-카르복시페닐알라닌, p-아세틸-L-페닐알라닌, p-프로파길-페닐알라닌, O-메틸-L-티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-O-아세틸-GlcNAc β -세린, L-도파, 불소화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, p-요오도-페닐알라닌, p-브로모페닐알라닌, p-아미노-L-페닐알라닌, p-프로파길옥시-L-페닐알라닌, 4-아지도-L-페닐알라닌, 파라-아지도에톡시 페닐알라닌, 및 파라-아지도메틸-페닐알라닌의 군으로부터 선택된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 파라-아세틸 페닐알라닌이다.

[0016] 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 2의 위치 R38 및 P65에 있는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 2의 위치 38 및 65에 있는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 2의 위치 38 또는 65에 있는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 2의 위치 38에 있는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 2의 위치 65에 있는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열 2의 위치 38에서의 아미노산 치환은 알라닌으로의 치환이다.

[0017] 일부 실시양태에서, 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 하나 이상의 PEG 분자를 포함하며, 여기서 하나 이상의 PEG 분자는 선형 또는 분지형 또는 다중암형(multiarmed)이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 PEG 분자는 선형이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 PEG 분자는 분지형이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 PEG 분자는 다중암형이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 PEG 분자는 5 kDa의 평균 분자량, 10 kDa의 평균 분자량, 15 kDa의 평균 분자량, 20 kDa의 평균 분자량, 25 kDa의 평균 분자량, 30 kDa의 평균 분자량, 35 kDa의 평균 분자량, 40 kDa의 평균 분자량, 45 kDa의 평균 분자량, 50 kDa 이상의 평균 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 PEG 분자는 30 kDa이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 PEG 분자는 40 kDa이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 PEG 분자는 선형 30 kDa PEG 분자이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 PEG 분자는 분지형 30 kDa PEG 분자이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 PEG 분자는 선형 40 kDa PEG 분자이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 PEG 분자는 분지형 40 kDa PEG 분자이다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 변형된 IL-2 폴리펩타이드는, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산, 서열번호 2 내의 선택된 위치에서 하나 이상의 아미노산 치환, 및 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 통해 접합된 하나 이상의 PEG 분자를 포함하는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 변형된 IL-2 폴리펩타이드는, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산, 및 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 통해 접합된 하나 이상의 PEG 분자를 포함하는 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 및 23으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열 9이다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 10이다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 11이다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 12이다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 13이다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산은 서열 14이다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 15이다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 16이다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 17이다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 18이다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 19이다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 20이다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 21이다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 22이다. 일부 실시양태에서, 부위 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드는 서열번호 23이다.

[0018] 일부 실시양태에서, 본 발명은 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 인터류킨-2(IL-2) 폴리펩

타이드에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드 접합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 PEG와 같은 수용성 중합체가 IL-2 변이체 내의 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 통해 IL-2 변이체에 접합된 IL-2 폴리펩타이드 접합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산 및 하나 이상의 천연 아미노산 치환을 갖는 IL-2 폴리펩타이드 접합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산 및 하나 이상의 천연 아미노산 치환 및 하나 이상의 PEG 분자를 갖는 IL-2 폴리펩타이드 접합체를 제공한다. 하나 이상의 천연 아미노산 치환은 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 티로신 및 발린을 포함하나 이들로 제한되지 않는 20개의 공통 아미노산 중 어느 하나로부터 선택될 수 있다.

[0019] 한 실시양태에서, PEG-IL-2는 모노페길화된다. 한 실시양태에서, PEG-IL-2는 디페길화된다. 한 실시양태에서, PEG-IL-2에는 2개 초과와 폴리에틸렌 글리콜 분자가 부착되어 있다. 본 발명의 또 다른 실시양태는 면역계 세포의 활성을 조절하기 위해 본 발명의 PEG-IL-2 폴리펩타이드를 사용하는 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 상기 또는 임의의 실시양태에서, PEG-IL-2는 PEG 중합체에 연결된 전장 성숙(신호 펩타이드가 없음) 인간 인터류킨-2를 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 또는 임의의 실시양태에서, PEG-IL-2는 공유 결합에 의해 PEG 중합체 또는 다른 생물학적 활성 분자에 연결된 전장 성숙(신호 펩타이드가 없음) 인간 인터류킨-2를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 생물학적 활성 분자는 변형되며, 비제한적인 예로서 생물학적 활성 분자는 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함할 수 있다.

[0021] PEG-IL2 접합체에서, PEG 또는 다른 수용성 중합체는 IL-2 단백질 또는 생물학적 활성 분자에 직접 접합되거나 링커를 통해 접합될 수 있다. 적합한 링커는 예를 들어 절단 가능 및 절단 불가능 링커를 포함한다.

[0022] 본 발명은 유효량의 PEG-IL-2 폴리펩타이드를 투여함으로써 포유동물, 예를 들어 다음 병태 중 하나 이상을 갖는 포유동물을 포함하지만 이로 제한되지 않는 포유동물에서 암을 치료하는 방법을 제공한다: 고형 종양, 혈액 종양, 결장암, 난소암, 유방암, 흑색종, 폐암, 교모세포종 및 백혈병. 일부 실시양태에서, 암은 유방암, 소세포 폐암, 난소암, 전립선암, 위 암종, 위장췌장 종양(gastroenteropancreatic tumor), 자궁경부암, 식도 암종, 결장암, 결장직장암, 상피 유래 암 또는 종양, 신장암, 뇌암, 교모세포종, 췌장암, 갑상선 암종, 자궁내막암, 췌장암, 두경부암 또는 피부암이다. 일부 실시양태에서, 암은 높은 수준의 Treg 세포를 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 암은 IL-2 수용체 알파의 높은 발현을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드를 포함하는 유효량의 조성물을 대상체에게 투여함으로써 암 또는 병태 또는 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 IL-2 조성물을 환자에게 투여함으로써 유전성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 병태 또는 질환은 IL-2 수용체 알파의 높은 발현을 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 병태 또는 질환은 높은 수준의 Treg 세포를 특징으로 한다. 일부 실시양태에서, 암, 병태 또는 질환은 IL-2 수용체 알파 발현을 감소, 차단 또는 침묵시킴으로써 치료된다. 일부 실시양태에서, 암, 병태 또는 질환은 치료할 암, 병태 또는 질환에서 Treg 세포의 증식을 감소시키는, Treg 세포 표면 상의 IL-2 수용체 알파의 결합을 감소시킴으로써 치료된다.

[0023] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 인터류킨 2 또는 IL-2는 (a) IL-2 유전자, 성숙 IL-2 서열(즉, 분비 리더 서열이 없음), 및 본 출원의 서열번호 1, 2, 3, 5 또는 7에 개시된 IL-2를 포함하는 알려진 IL-2의 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖고, (b) 천연 또는 야생형 IL-2에 공통적인 적어도 하나의 생물학적 활성을 갖는 단백질로서 정의된다. 본 발명의 목적을 위해, 글리코실화(예를 들어, 효모 또는 CHO 세포와 같은 진핵 세포에서 생성됨) 및 비글리코실화(예를 들어, 화학적으로 합성되거나 이. 콜라이(*E. coli*)에서 생성됨) IL-2는 동등하며, 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다. 또한, IL-2의 생물학적 활성을 유지하는 바이러스 IL-2를 포함한 다른 돌연변이체 및 다른 유사체도 포함된다.

[0024] 본 발명은 폴리펩타이드에 혼입된 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 통해 하나 이상의 수용성 중합체에 접합된 IL-2 폴리펩타이드를 제공한다. 본 발명은 하나 이상의 수용성 중합체에 접합된 IL-2 폴리펩타이드를 제공하며, 여기서 PEG화된 IL-2 폴리펩타이드는 또한 다른 약물 또는 생물학적 활성 분자에 연결되고, IL-2 폴리펩타이드는 하나 이상의 수용성 중합체에 접합된 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다. 본 발명은 또한 IL-2 폴리펩타이드의 단량체 및 이량체를 제공한다. 본 발명은 또한 IL-2 폴리펩타이드의 삼량체를 제공한다. 본 발명은 IL-2 폴리펩타이드의 다량체를 제공한다. 본 발명은 또한 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 이량체를 제공한다. 본 발명은 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을

포함하는 IL-2 다량체를 제공한다. 본 발명은 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 균질한 IL-2 다량체를 제공하며, 여기서 각각의 IL-2 폴리펩타이드는 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 본 발명은 이중성 IL-2 다량체를 제공하며, IL-2 폴리펩타이드의 적어도 하나는 적어도 하나의 비천연적으로 코딩하는 아미노산을 포함하고, 다량체 내의 임의의 또는 각각의 IL-2 폴리펩타이드는 상이한 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0025] 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩타이드는 하나 이상의 번역 후 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩타이드는 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, IL-2 다량체는 균질하다. 일부 실시양태에서, IL-2 이량체는 균질하다. 일부 실시양태에서, IL-2 다량체는 하나의 수용성 중합체에 접합된다. 일부 실시양태에서, IL-2 다량체는 2개의 수용성 중합체에 접합된다. 일부 실시양태에서, IL-2 다량체는 3개의 수용성 중합체에 접합된다. 일부 실시양태에서, IL-2 다량체는 3개 초과 수용성 중합체에 접합된다. 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩타이드는 이량체의 형성을 허용하기에 충분히 긴 링커에 연결된다. 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩타이드는 삼량체의 형성을 허용하기에 충분히 긴 링커에 연결된다. 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩타이드는 다량체의 형성을 허용하기에 충분히 긴 링커에 연결된다. 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩타이드는 이작용성 중합체, 이작용성 링커 또는 적어도 하나의 추가의 IL-2 폴리펩타이드에 연결된다. 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩타이드는 하나 이상의 번역 후 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩타이드는 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 연결된다.

[0026] 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG) 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 링커를 사용하여 수용성 중합체에 연결되거나 수용성 중합체에 결합된다. 일부 실시양태에서, 폴리에틸렌 글리콜 분자는 이작용성 중합체이다. 일부 실시양태에서, 이작용성 중합체는 제2 폴리펩타이드에 연결된다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리펩타이드는 IL-2이다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체는 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티를 포함하는 수용성 중합체에 연결된 적어도 2개의 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 아미노산은 비천연적으로 코딩된 아미노산이다.

[0027] 일부 실시양태에서, 본 발명의 IL-2 또는 PEG-IL-2는 면역 조절제와 같은 치료제에 연결된다. 면역 조절제는 IL-2, PEG-IL-2 또는 IL-2 변이체에 대한 접합을 위한 치료제로서 사용될 수 있는, 면역 세포에 대한 치료 효과를 발휘하는 임의의 작용제일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 IL-2 또는 PEG-IL-2는 치료제, 예컨대 사이토카인, 화학요법제, 면역치료제, 호르몬제, 항종양제, 면역자극제, 또는 이들의 조합과 같은 치료제에 연결된다.

[0028] 일부 실시양태에서, 하나의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 1 앞(즉, N-말단), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 중 하나 이상의 위치에 도입되거나, 또는 단백질의 카르복실 말단, 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산)에 부가된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 생물학적 활성 분자는 IL-2 변이체에 직접 접합된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 생물학적 활성 분자는 IL-2 폴리펩타이드에서 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산(들)에 접합된다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 IL-2 변이체는 링커에 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커에 연결된 IL-2 변이체는 생물학적 활성 분자를 추가로 포함한다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 링커는 비천연적으로 코딩된 아미노산에 연결된다.

[0029] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상에 도입된다: 위치 3, 32, 35, 37, 38, 42, 43, 44, 45, 48, 49, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 76 및 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상에 도입된다: 위치 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산). 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상에 도입된다: 위치 35, 37, 42, 45, 49, 61 또는 65, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나

이상에 도입된다: 위치 42, 45, 61, 및 65, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상에 도입된다: 위치 45 및 65, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 3에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 32에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 35에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 37에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 38에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 41에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 42에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 43에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 44에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 45에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 48에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 49에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 61에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 62에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 64에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 65에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 68에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 72에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 76에 도입된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 107에 도입된다.

[0030] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 다음과 같이 IL-2 또는 그의 변이체의 2차 구조 또는 특정 아미노산에 상응하는 다음 영역 중 하나 이상의 영역의 임의의 위치에 도입된다: 소수성 상호작용 부위; IL2R α 를 포함하는 IL-2 수용체 서브유닛과의 상호작용 부위 또는 그 근처; 아미노산 위치 3, 또는 35 내지 45 내; 처음 107개의 N-말단 아미노산 내; 아미노산 위치 61-72 내; 각각의 서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상에 도입된다: 위치 1 앞(즉, N-말단), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 및 서열번호 2의 임의의 조합, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 중 하나 이상의 위치에 도입되거나, 또는 단백질의 카르복실 말단, 서열번호 2의 임의의 조합, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산에 부가된다.

[0031] 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체 내의 상기 위치 중 하나 이상의 위치의 비천연 발생 아미노산은 위치 1 앞(즉, N-말단), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 단백질의 카르복실 말단, 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산)을 포함하지만 이로 제한되지 않는 위치에서 약물 또는 다른 생물학적 활성 분자에 연결된다.

- [0032] 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체 내의 상기 위치 중 하나 이상의 위치의 비천연 발생 아미노산은 소수성 상호작용 부위; IL2R α 를 포함하는 IL-2 수용체 서브유닛과의 상호작용 부위 또는 그 근처; 아미노산 위치 3, 또는 35 내지 45 내; 처음 107개의 N-말단 아미노산 내; 아미노산 위치 61-72 내; 각각의 서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치를 포함하지만 이로 제한되지 않는 위치에서 약물 또는 다른 생물학적 활성 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체 내의 상기 위치 중 하나 이상의 위치의 비천연 발생 아미노산은 위치 1 앞(즉, N-말단), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 및 서열번호 2의 임의의 조합, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산을 포함하지만 이로 제한되지 않는 위치에서 약물 또는 다른 생물학적 활성 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체 내의 상기 위치 중 하나 이상의 위치의 비천연 발생 아미노산은 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 단백질의 카르복실 말단, 서열번호 2의 임의의 조합, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산을 포함하지만 이로 제한되지 않는 IL-2 또는 그의 변이체의 위치에서 약물 또는 다른 생물학적 활성 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상의 위치에 도입되고 약물 또는 다른 생물학적 활성 분자에 연결된다: 위치 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72 및 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산).
- [0033] 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체 내의 상기 위치 중 하나 이상의 위치의 비천연 발생 아미노산은 위치 1 앞(즉, N-말단), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 단백질의 카르복실 말단, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산)을 포함하지만 이로 제한되지 않는 위치에서 링커에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상의 위치에 도입되고 링커에 연결된다: 위치 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 및 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산).
- [0034] 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체 내의 상기 위치 중 하나 이상의 위치의 비천연 발생 아미노산은 위치 1 앞(즉, N-말단), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 단백질의 카르복실 말단, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산)을 포함하지만 이로 제한되지 않는 위치에서 수용성 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 추가로 연결된 링커에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상의 위치에 도입되고 수용성 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 추가로 연결된 링커에 연결된다: 위치 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 및 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산)(상기 위치를 포함하지만 이로 제한되지 않음).
- [0035] 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체 내의 상기 위치 중 하나 이상의 위치의 비천연 발생 아미노산은 위치 1 앞(즉, N-말단), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97,

98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 또는 단백질의 카르복실 말단, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산)을 포함하지만 이로 제한되지 않는 위치에서 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상의 위치에 도입되고 수용성 중합체에 추가로 연결된 링커에 연결된다: 위치 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 및 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산). 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 특이적으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산 부위를 포함하는 서열번호 9-23에 상응하는 IL-2 폴리펩타이드를 제공한다.

[0036] 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체는 IL-2 수용체 서브유닛 또는 그의 변이체에 대한 IL-2의 친화도를 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체는 단백질, 폴리펩타이드, 지질, 지방산, 소분자 또는 핵산을 포함하지만 이로 제한되지 않는 IL-2 수용체 또는 결합 파트너에 대한 IL-2 또는 그의 변이체의 친화도를 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 IL-2의 안정성과 비교할 때 IL-2의 안정성을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 안정성 및/또는 용해도는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 알려진 다수의 상이한 분석을 사용하여 측정될 수 있다. 이러한 분석은 SE-HPLC 및 RP-HPLC를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, IL-2는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 IL-2의 면역원성과 비교할 때 IL-2의 면역원성을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 IL-2의 혈청 반감기 또는 순환 시간과 비교할 때 IL-2의 혈청 반감기 또는 순환 시간을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다.

[0037] 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 IL-2 또는 그의 변이체의 수 용해도와 비교할 때 IL-2의 수 용해도를 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 IL-2 또는 그의 변이체의 용해도와 비교할 때 숙주 세포에서 생성된 IL-2 또는 그의 변이체의 용해도를 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 IL-2 또는 그의 변이체의 발현 또는 합성과 비교할 때 숙주 세포 내에서 IL-2의 발현을 증가시키거나 시험관 내에서 합성을 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 이러한 치환을 포함하는 IL-2 또는 그의 변이체는 아고니스트 활성을 유지하고 숙주 세포에서 발현 수준을 유지하거나 개선한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 IL-2 또는 그의 변이체의 프로테아제 저항성과 비교할 때 IL-2 또는 그의 변이체의 프로테아제 저항성을 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 IL-2 또는 그의 변이체와 상호작용할 때의 수용체의 활성화와 비교할 때 IL-2 수용체의 신호 전달 활성을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 IL-2의 결합과 비교할 때 수용체와 같은 또 다른 분자에 대한 그의 결합을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다.

[0038] 일부 실시양태에서, 본 발명은 PEG-IL-2 및 적어도 하나의 추가의 치료제 또는 진단제로 증식성 병태, 암, 종양, 또는 전암성 병태, 예를 들어 이형성증을 치료하는 방법을 제공한다. 추가의 치료제는 예를 들어 사이토카인 또는 사이토카인 길항제, 예를 들어 IL-12, 인터페론-알파, 또는 항-표피 성장 인자 수용체, 독소루비신, 에피루비신, 항-염산, 예를 들어 메토틱세이트 또는 플루오로우라실, 이리노테칸, 사이클로포스파미드, 방사선 요법, 호르몬 또는 항-호르몬 요법, 예를 들어 안드로젠, 에스트로젠, 항-에스트로젠, 플루타미드 또는 디에틸stil베스트롤, 수술, 타목시펜, 이포스파미드, 미툴락톨, 알킬화제, 예를 들어 멜팔란 또는 시스-플라틴, 에토포사이드, 비노렐빈, 빈블라스틴, 빈데신, 글루코코르티코이드, 히스타민 수용체 길항제, 혈관신생 억제제, 방사선, 방사선 민감제, 안트라사이클린, 빈카 알칼로이드, 탁산, 예를 들어 파클리탁셀 및 도세탁셀, 세포 주기 억제제, 예를 들어 사이클린 의존성 키나제 억제제, 체크포인트 억제제, 면역 조절 약물, 면역 자극 약물, 또 다른 종양 항원에 대한 모노클로날 항체, 모노클로날 항체와 생물학적 활성 분자의 복합체, T 세포 보조제, 골수 이식, 또는 항원 제시 세포, 예를 들어 수지상 세포 요법일 수 있다. 백신은 예를 들어 가용성 단백질 또는 단백질을 코딩하는 핵산으로서 제공될 수 있다(예를 들어, 문헌 [Le, et al., supra]; [Greco and Zellefsky (eds.) (2000) Radiotherapy of Prostate Cancer, Harwood Academic, Amsterdam]; [Shapiro and Recht (2001) New Engl. J. Med. 344:1997-2008]; [Hortobagyi (1998) New Engl. J. Med. 339:974-984]; [Catalona (1994) New Engl. J. Med. 331:996-1004]; [Naylor and Hadden (2003) Int. Immunopharmacol. 3:1205-1215]; [The Int. Adjuvant Lung Cancer Trial Collaborative Group (2004) New Engl. J. Med.

350:351-360]; [Slamon, et al. (2001) New Engl. J. Med. 344:783-792]; [Kudelka, et al. (1998) New Engl. J. Med. 338:991-992]; [van Netten, et al. (1996) New Engl. J. Med. 334:920-921] 참조).

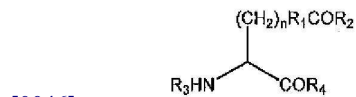
- [0039] 또한 암의 골수의 조혈(EMH)을 치료하는 방법이 제공된다. EMH는 문헌에 기재되어 있다(예를 들어, 문헌 [Rao, et al. (2003) Leuk. Lymphoma 44:715-718]; [Lane, et al. (2002) J. Cutan. Pathol. 29:608-612] 참조).
- [0040] 일부 실시양태에서, PEG-IL-2 또는 그의 변이체는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 IL-2 또는 그의 변이체의 수용체 또는 수용체 서브유닛 결합 활성과 비교할 때 그의 수용체 또는 수용체 서브유닛 결합을 조절하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 IL-2 또는 그의 변이체의 수용체 또는 수용체 서브유닛 결합 활성과 비교할 때 수용체 또는 수용체 서브유닛 결합과 관련된 그의 활성을 억제하는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다.
- [0041] 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체는 치환, 부가 또는 결실이 없는 상응하는 야생형 IL-2의 상응성과 비교할 때 IL-2 또는 그의 변이체와 약학적 보존제(예를 들어, m-크레졸, 페놀, 벤질 알코올)의 상응성을 증가시키는 치환, 부가 또는 결실을 포함한다. 이러한 상응성의 증가는 저장 동안 단백질의 물리화학적 특성 및 생물학적 활성을 유지하는 보존된 약학적 제제의 제조를 가능하게 할 것이다.
- [0042] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 조각된 결합이 하나 이상의 비천연 아미노산으로 생성된다. 분자내 결합은 적절한 조건 하에서 단백질 내의 2개의 아미노산 사이의 반응(하나 또는 두 아미노산 모두 비천연 아미노산일 수 있음); 적절한 조건 하에 각각 천연적으로 코딩되거나 비천연적으로 코딩될 수 있는 2개의 아미노산과 링커, 중합체 또는 다른 분자의 반응 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는 다양한 방식으로 생성될 수 있다.
- [0043] 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서 하나 이상의 아미노산 치환은 하나 이상의 천연 발생 또는 비천연 발생 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서 아미노산 치환은 천연 발생 또는 비천연 발생 아미노산으로 일 수 있으며, 여기서 적어도 하나의 치환은 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서 하나 이상의 아미노산 치환은 하나 이상의 천연 발생 아미노산으로 이루어질 수 있고, 추가로 적어도 하나의 치환은 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서 아미노산 치환은 임의의 천연 발생 아미노산으로 이루어지고, 적어도 하나의 치환은 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 천연 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상에서 치환될 수 있다: 위치 1 앞(즉, N-말단), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, 하나 이상의 천연 아미노산 치환은 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 중 하나 이상의 위치에서 이루어지거나, 또는 단백질의 카르복실 말단, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에서 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서 아미노산 치환은 적어도 하나의 천연 발생 아미노산으로 이루어지고 적어도 하나의 치환은 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서 아미노산 치환은 적어도 2개의 천연 발생 아미노산으로 이루어지고 적어도 하나의 치환은 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 천연 발생 또는 코딩된 아미노산은 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루타민산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 타이로신 및 발린을 포함하지만 이에 제한되지 않는 20개의 일반적인 아미노산 중 임의의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 천연 발생 아미노산 치환은 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치에서 이루어질 수 있다: 위치 38, 및/또는 46, 및/또는 65, 또는 이들의 조합. 일부 실시양태에서, 천연 발생 아미노산 치환은 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 38에서 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체의 위치 38에서의 천연 발생 아미노산 치환은 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루타민산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 타이로신 및 발린을 포함하지만 이에 제한되지 않는 20개의 통상적인 천연 아미노산 중 임의의 아미노산으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체의 위치 38에서의 천연 발생 아미노산 치환은 알라닌 치환일 수 있다. 일부 실시양태에서, 천연 발생 아미노산 치환은 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 46에서 이루어질 수 있다.

일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체의 위치 46에서의 천연 발생 아미노산 치환은 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루타민산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 타이로신 및 발린을 포함하지만 이에 제한되지 않는 20개의 통상적인 천연 아미노산 중 임의의 아미노산으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체의 위치 46에서의 천연 발생 아미노산 치환은 류신 또는 이소류신 치환일 수 있다. 일부 실시양태에서, 천연 발생 아미노산 치환은 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 65에서 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체의 위치 65에서의 천연 발생 아미노산 치환은 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루타민산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 타이로신 및 발린을 포함하지만 이에 제한되지 않는 20개의 통상적인 천연 아미노산 중 임의의 아미노산으로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체의 위치 65에서의 천연 발생 아미노산 치환은 아르기닌 치환일 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서의 아미노산 치환은 위치 38, 46 또는 65에서의 천연 발생 아미노산 치환 및 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상의 위치에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 적어도 하나의 치환일 수 있다: 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 및 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서의 아미노산 치환은 위치 38에서의 천연 발생 아미노산 치환 및 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상의 위치에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 적어도 하나의 치환일 수 있다: 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 및 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서의 아미노산 치환은 위치 46에서의 천연 발생 아미노산 치환 및 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상의 위치에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 적어도 하나의 치환일 수 있다: 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 및 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서의 아미노산 치환은 위치 65에서의 천연 발생 아미노산 치환 및 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상의 위치에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 적어도 하나의 치환일 수 있다: 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 및 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서의 아미노산 치환은 위치 38 및/또는 46 및/또는 65에서의 천연 발생 아미노산 치환 및 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상의 위치에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 적어도 하나의 치환일 수 있다: 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 및 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치). 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서의 아미노산 치환은 위치 38에서의 천연 발생 아미노산 치환 및 위치 42(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에서 IL-2 또는 그의 변이체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 치환일 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서의 아미노산 치환은 위치 38 및 46에서의 천연 발생 아미노산 치환 및 위치 42(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에서 IL-2 또는 그의 변이체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 치환일 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서의 아미노산 치환은 위치 38 및 65에서의 천연 발생 아미노산 치환 및 위치 42(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에서 IL-2 또는 그의 변이체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 치환일 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서의 아미노산 치환은 위치 38, 46 및 65에서의 천연 발생 아미노산 치환 및 위치 42(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에서 IL-2 또는 그의 변이체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 치환일 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서의 아미노산 치환은 위치 38 및 45(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에서 IL-2 또는 그의 변이체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 치환일 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서의 아미노산 치환은 위치 38 및 65에서의 천연 발생 아미노산 치환 및 위치 45(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에서 IL-2 또는 그의 변이체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 치환일 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서의 아미노산 치환은 위치 38, 46 및 65에서의 천연 발생 아미노산 치환 및 위치 45(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에서 IL-2 또는 그의 변이체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 치환일 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는

는 그의 변이체에서의 아미노산 치환은 위치 38에서의 천연 발생 아미노산 치환 및 위치 65(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에서 IL-2 또는 그의 변이체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 치환일 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에서의 아미노산 치환은 위치 38 및 46에서의 천연 발생 아미노산 치환 및 위치 65(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에서 IL-2 또는 그의 변이체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의한 치환일 수 있다.

[0044] 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 카르보닐기, 아세틸 기, 아미노옥시기, 하이드라진기, 하이드라지드기, 세미카르바지드기, 아지드기 또는 알킨기를 포함한다.

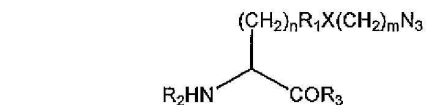
[0045] 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 카르보닐기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 다음의 구조를 갖는다:



[0047] 여기서, n은 0-10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이고; R₂는 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이고; R₃은 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 아미노 말단 변형기이며, R₄는 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 카르복시 말단 변형기이다.

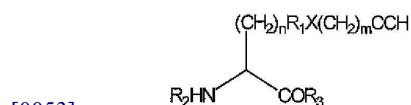
[0048] 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 아미노옥시기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 하이드라지드기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 하이드라진기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 세미카르바지드기를 포함한다.

[0049] 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 아지드기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 다음의 구조를 갖는다:



[0051] 여기서, n은 0-10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 치환된 아릴이거나 존재하지 않고; X는 O, N, S이거나 존재하지 않으며; m은 0-10이고; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 아미노 말단 변형기이고, R₃은 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 카르복시 말단 변형기이다.

[0052] 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 알킨기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 다음의 구조를 갖는다:



[0054] 여기서, n은 0-10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이고; X는 O, N, S이거나 존재하지 않으며; m은 0-10이고; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 아미노 말단 변형기이고, R₃은 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 카르복시 말단 변형기이다.

[0055] 일부 실시양태에서, 폴리펩타이드는 IL-2 아고니스트, 부분 아고니스트, 길항제, 부분 길항제 또는 역아고니스트이다. 일부 실시양태에서, IL-2 아고니스트, 부분 아고니스트, 길항제, 부분 길항제 또는 역아고니스트는 수용성 중합체에 연결된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 아고니스트, 부분 아고니스트, 길항제, 부분 길항제 또는 역아고니스트는 비천연적으로 코딩된 아미노산 및 하나 이상의 번역 후 변형, 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자를 포함한다.

[0056] 본 발명은 또한 서열번호 1, 2, 3, 5 또는 7의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 단리된 핵산을 제공하고, 본 발명은 엄격한 조건 하에 서열번호 1, 2, 3, 5 또는 7의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴

클레오타이드에 혼성화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 본 발명은 또한 서열번호 1, 2, 3, 5 또는 7로 제시된 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 단리된 핵산을 제공하며, 여기서 폴리뉴클레오타이드는 적어도 하나의 선택터(selector) 코돈을 포함한다. 본 발명은 또한 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산과 함께 서열번호 1, 2, 3, 5 또는 7로 제시된 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 많은 상이한 폴리뉴클레오타이드가 본 발명의 임의의 폴리펩타이드를 코딩할 수 있음을 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 쉽게 알 것이다.

[0057] 일부 실시양태에서, 선택터 코돈은 앰버(amber) 코돈, 오크(ochre) 코돈, 오팔(opal) 코돈, 유니크 코돈, 희귀 코돈, 5 염기 코돈, 및 4 염기 코돈으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0058] 본 발명은 또한 생물학적 활성 분자에 연결된 IL-2 또는 그의 변이체를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 단리된 IL-2 또는 그의 변이체를 비천연적으로 코딩된 아미노산과 반응하는 모이어티를 포함하는 생물학적 활성 분자와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산은 20개의 일반적인 아미노산 중 임의의 것에 대해서는 비반응성인 생물학적 활성 분자에 대해 반응성이다. 일부 실시양태에서, IL-2에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산은 생물학적 활성 분자에 연결된, 20개의 일반적인 아미노산 중 임의의 것에 대해서는 비반응성인 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 대해 반응성이다.

[0059] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 연결된 IL-2 또는 그의 변이체는 카르보닐 함유 아미노산을 포함하는 IL-2 또는 그의 변이체를 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바지드기를 포함하는 중합체 또는 생물학적 활성 분자와 반응시킴으로써 제조된다. 일부 실시양태에서, 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바지드기는 아마이드 연결을 통해 생물학적 활성 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바지드기는 카르바메이트 연결을 통해 수용성 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 연결된다.

[0060] 본 발명은 또한 수용성 중합체에 연결된 IL-2 접합체의 제조 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 단리된 IL-2-생물학적 활성 분자 접합체를 비천연적으로 코딩된 아미노산과 반응하는 모이어티를 포함하는 수용성 중합체와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산은 20개의 일반적인 아미노산 중 임의의 것에 대해서는 비반응성인 수용성 중합체에 대해 반응성이다. 일부 실시양태에서, IL-2 접합체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산은 20개의 일반적인 아미노산 중 임의의 것에 대해서는 비반응성인 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 대해 반응성이다.

[0061] 본 발명은 또한 수용성 중합체에 연결된 IL-2 또는 그의 변이체를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 단리된 IL-2 또는 그의 변이체를 비천연적으로 코딩된 아미노산과 반응하는 모이어티를 포함하는 수용성 중합체와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산은 20개의 일반적인 아미노산 중 임의의 것에 대해서는 비반응성인 수용성 중합체에 대해 반응성이다. 일부 실시양태에서, IL-2에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산은 20개의 일반적인 아미노산 중 임의의 것에 대해서는 비반응성인 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 대해 반응성이다.

[0062] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체에 연결된 IL-2 또는 그의 변이체는 카르보닐 함유 아미노산을 포함하는 IL-2 또는 그의 변이체를 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바지드기를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자와 반응시킴으로써 제조된다. 일부 실시양태에서, 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바지드기는 아마이드 연결을 통해 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바지드기는 카르바메이트 연결을 통해 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다.

[0063] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체에 연결된 IL-2 또는 그의 변이체는 카르보닐기를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자를 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바지드기를 포함하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드와 반응시킴으로써 제조된다.

[0064] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체에 연결된 IL-2 또는 그의 변이체는 알킨 함유 아미노산을 포함하는 IL-2를 아지드 모이어티를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자와 반응시킴으로써 제조된다. 일부 실시양태에서, 아지드 또는 알킨기는 아마이드 연결을 통해 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다.

[0065] 일부 실시양태에서, 수용성 중합체에 연결된 IL-2 또는 그의 변이체는 아지드 함유 아미노산을 포함하는 IL-2 또는 그의 변이체를 알킨 모이어티를 포함하는 폴리(에틸렌 글리콜) 분자와 반응시킴으로써 제조된다. 일부 실시양태에서, 아지드 또는 알킨기는 아미드 연결을 통해 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다.

[0066] 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 약 0.1 kDa 내지 약 100 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 0.1 내지 50 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜)은 1 kDa 내지 50 kDa, 1 kDa 내지 25 kDa, 또는 2 내지 22 kDa, 또는 5 kDa 내지 20 kDa, 또는 5 kDa 내지 30 kDa, 또는 5 kDa 내지 40 kDa의 분자량을 갖는다. 예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체의 분자량은 약 5 kDa, 약 10 kDa, 또는 약 20 kDa, 또는 약 30 kDa, 또는 약 40 kDa일 수 있다. 예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체의 분자량은 5 kDa 또는 10 kDa 또는 20 kDa 또는 30 kDa 또는 40 kDa일 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 20K 2-분지형 PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 40K 2-분지형 PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 30K 분지형 PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 40K 이상의 분지형 PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 5K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 10K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 15K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 20K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 25K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 30K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 25K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 40K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 45K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 50K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 선형 60K PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체의 분자량은 평균 분자량이다. 특정 실시양태에서, 평균 분자량은 수 평균 분자량(Mn)이다. 평균 분자량은 GPC 또는 SEC, SDS/PAGE 분석, RP-HPLC, 질량 분광분석법 또는 모세관 전기영동을 사용하여 결정하거나 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72 또는 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치) 중 하나 이상의 위치에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 선형 20K 또는 30K 또는 40K 또는 50K 또는 60K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 35, 37, 42, 45, 49, 61, 또는 65, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치) 중 하나 이상의 위치에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 선형 20K 또는 30K 또는 40K 또는 50K 또는 60K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 65(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에 있는 폴리펩타이드에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 선형 20K 또는 30K 또는 40K 또는 50K 또는 60K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 61(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에 있는 폴리펩타이드에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 선형 20K 또는 30K 또는 40K 또는 50K 또는 60K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 49(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에 있는 폴리펩타이드에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 선형 20K 또는 30K 또는 40K 또는 50K 또는 60K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 45(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에 있는 폴리펩타이드에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 선형 20K 또는 30K 또는 40K 또는 50K 또는 60K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 42(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에 있는 폴리펩타이드에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 선형 20K 또는 30K 또는 40K 또는 50K 또는 60K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 37(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에 있는 폴리펩타이드에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 선형 20K 또는 30K 또는 40K 또는 50K 또는 60K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 35(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 선형 20K 또는 30K 또는 40K 또는 50K 또는 60K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 또

는 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치), IL-2 또는 이의 변이체는 선형 20K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 하기 위치 중 하나 이상에 도입되고: 위치 35, 37, 42, 45, 49, 61, 또는 65, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치), IL-2 또는 이의 변이체는 선형 20K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 하기 위치 중 하나 이상에 도입되고: 위치 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 또는 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치), IL-2 또는 이의 변이체는 선형 30K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 하기 위치 중 하나 이상에 도입되고: 위치 35, 37, 42, 45, 49, 61, 또는 65, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치), IL-2 또는 이의 변이체는 선형 30K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 하기 위치 중 하나 이상에 도입되고: 위치 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 또는 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치), IL-2 또는 이의 변이체는 선형 40K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 하기 위치 중 하나 이상에 도입되고: 위치 35, 37, 42, 45, 49, 61, 또는 65, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치), IL-2 또는 이의 변이체는 선형 40K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다.

[0067]

일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 분지형 중합체이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분지형 중합체의 각각의 분지는 1 kDa 내지 100 kDa, 또는 1 kDa 내지 50 kDa의 분자량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분지형 중합체의 각각의 분지는 1 kDa 내지 25 kDa, 또는 2 내지 22 kDa, 또는 5 kDa 내지 20 kDa, 또는 5 kDa 내지 30 kDa, 또는 5 kDa 내지 40 kDa, 또는 5 kDa 내지 50 kDa, 또는 5 kDa 내지 60 kDa의 분자량을 갖는다. 예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜) 분지형 중합체의 각각의 분지의 분자량은 약 5 kDa, 또는 약 10 kDa, 또는 약 20 kDa, 또는 약 30 kDa, 또는 약 40 kDa, 또는 약 50 kDa, 또는 약 60 kDa 또는 그 초과일 수 있다. 예를 들어, 폴리(에틸렌 글리콜) 분지형 중합체의 각각의 분지의 분자량은 5 kDa, 또는 10 kDa, 또는 15 kDa, 또는 20 kDa, 또는 25 kDa, 또는 30 kDa, 또는 35 kDa, 또는 40 kDa, 또는 45 kDa, 또는 50 kDa, 또는 55 kDa, 또는 60 kDa 또는 그 초과일 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 20K 2-분지형 PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 20K 4-분지형 PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 분자는 40K 2-분지형 PEG이다. 일부 실시양태에서, 폴리(에틸렌 글리콜) 중합체의 분자량은 평균 분자량이다. 특정 실시양태에서, 평균 분자량은 수 평균 분자량(Mn)이다. 평균 분자량은 GPC 또는 SEC, SDS/PAGE 분석, RP-HPLC, 질량 분광분석법 또는 모세관 전기영동을 사용하여 결정하거나 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72 또는 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치) 중 하나 이상의 위치에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 분지형 20K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 35, 37, 42, 45, 49, 61 또는 65, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치) 중 하나 이상의 위치에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 분지형 20K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 또는 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치) 중 하나 이상의 위치에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 분지형 30K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 35, 37, 42, 45, 49, 61, 또는 65, 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치) 중 하나 이상의 위치에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 분지형 30K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 또는 107, 이들의 임의의 조합(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치) 중 하나 이상의 위치에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 분지형 40K 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 35, 37, 42, 45, 49, 61, 또는 65, 이들의 임의의 조합(서

[illegible]

아미노산 위치)에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 40K 2-분지형 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 49(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 40K 2-분지형 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 45(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 40K 2-분지형 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 42(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 40K 2-분지형 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 37(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 40K 2-분지형 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 위치 35(서열번호 2의, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치)에 도입되고, IL-2 또는 그의 변이체는 40K 2-분지형 폴리(에틸렌 글리콜) 분자에 연결된다.

[0068] 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에 연결된 수용성 중합체는 폴리알킬렌 글리콜 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 카르보닐기, 아미노옥시기, 하이드라지드기, 하이드라진, 세미카르바지드기, 아지드기 또는 알킨기를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 카르보닐 모이어티를 포함하고, 수용성 중합체는 아미노옥시, 하이드라지드, 하이드라진 또는 세미카르바지드 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 알킨 모이어티를 포함하고, 수용성 중합체는 아지드 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산 잔기는 아지드 모이어티를 포함하고, 수용성 중합체는 알킨 모이어티를 포함한다.

[0069] 본 발명은 또한 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 또는 그의 변이체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다.

[0070] 본 발명은 또한 선택적 코돈을 포함하는 IL-2 또는 그의 IL-2 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 IL-2 내로 치환하기 위한 오르토고날(orthogonal) RNA 합성효소 및/또는 오르토고날 tRNA를 포함한다.

[0071] 본 발명은 또한 선택적 코돈을 포함하는 IL-2 또는 그의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 IL-2 또는 그의 변이체 내로 치환하기 위한 오르토고날 RNA 합성효소 및/또는 오르토고날 tRNA를 포함한다.

[0072] 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드의 수용체 상호작용을 조절하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 PEG화된 IL-2 폴리펩타이드를 사용하여 삼량체 IL-2 수용체의 IL2R α 서브유닛과 PEG화된-IL-2의 상호작용을 억제하거나 감소시키는 방법을 제공한다.

[0073] 본 발명은 또한 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG-IL-2, IL-2 또는 그의 임의의 변이체의 제조 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 IL-2 또는 그의 변이체의 발현을 허용하는 조건 하에서 IL-2, 오르토고날 RNA 합성효소 및/또는 오르토고날 tRNA를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드들을 포함하는 세포를 배양하는 단계; 및 세포 및/또는 배양 배지로부터 IL-2 또는 그의 변이체를 정제하는 단계를 포함한다.

[0074] 본 발명은 또한 IL-2 또는 그의 변이체의 치료 반감기, 혈청 반감기 또는 순환 시간을 증가시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 IL-2 변이체, 또는 PEG화된 IL-2 접합체, 또는 글리코실화된 IL-2 접합체의 반감기($t_{1/2}$) 또는 순환 시간은 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 36, 48, 72, 96, 120, 240 시간 이상이다. 본 발명은 또한 IL-2 또는 그의 변이체의 면역원성을 조절하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 천연 발생 IL-2 또는 그의 변이체에서 임의의 하나 이상의 아미노산을 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환하고/하거나, IL-2 또는 그의 변이체를 링커, 중합체, 수용성 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 연결하는 것을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 링커는 유연성을 허용하고 이량체 형성을 허용할 수 있을 정도로 충분히 길다. 본 발명의 한 실시양태에서, 링커의 길이는 이량체 형성을 허용하도록 적어도 3개의 아미노산 또는 18개 원자이다.

- [0075] 본 발명은 또한 유효량의 본 발명의 PEG-IL-2 접합체 또는 그의 변이체를 사용하여 그 치료를 필요로 하는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 PEG-IL-2 또는 그의 변이체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물의 치료 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 비천연적으로 코딩된 아미노산 및 천연 아미노산 치환을 포함하는 PEG-IL-2 또는 그의 변이체, 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물의 치료 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시양태에서, PEG-IL-2 또는 그의 변이체는 글리코실화된다. 일부 실시양태에서, PEG-IL-2 또는 그의 변이체는 글리코실화되지 않는다.
- [0076] 본 발명은 또한 유효량의 본 발명의 IL-2 또는 IL-2 변이체 분자를 사용하여 그 치료를 필요로 하는 환자를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 또는 IL-2 변이체 분자 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물의 치료 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산 및 하나 이상의 천연 아미노산 치환을 포함하는 IL-2 또는 그의 변이체 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약학적 조성물의 치료 유효량을 환자에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시양태에서, 천연 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시양태에서, IL-2는 글리코실화된다. 일부 실시양태에서, IL-2는 글리코실화되지 않는다. 일부 실시양태에서, 치료를 필요로 하는 환자는 IL-2 수용체 알파의 높은 발현을 특징으로 하지만 이로 제한되지 않는 암, 병태 또는 질환을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 본 발명의 IL-2 조성물을 대상체에게 투여함으로써 암 또는 병태 또는 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 IL-2 조성물의 치료 유효량을 환자에게 투여함으로써 유전성 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드는 높은 IL-2 수용체 알파 발현을 갖는 세포에서 질환 또는 병태를 치료하는데 사용하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 암, 병태 또는 질환은 IL-2 수용체 알파 발현을 감소, 차단 또는 침묵시킴으로써 치료된다. 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드 또는 변이체는 높은 IL-2 수용체 알파 발현과 관련된 암, 질환 또는 병태를 치료하기 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 것이다. 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드 또는 변이체는 암 치료용 의약의 제조에 사용하기 위한 것이다. 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드 또는 변이체는 유전성 질환 치료용 의약의 제조에 사용하기 위한 것이다.
- [0077] 본 발명은 또한 적어도 하나의 아미노산이 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의해 치환된, 서열번호 1, 2, 3, 5 또는 7에 나타난 서열 또는 임의의 다른 IL-2 서열을 포함하는 IL-2를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된 적어도 하나의 아미노산을 갖는, 서열번호 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 및 23에 상응하는 신규한 IL-2 폴리펩타이드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 비천연적으로 코딩된 아미노산 부위가 특이적으로 도입된, 서열번호 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 및 23을 포함하는 신규한 IL-2 폴리펩타이드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 수용성 중합체에 연결된다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 카르보닐기, 아미노옥시기, 하이드라지드기, 하이드라진기, 세미카르바지드기, 아지드기 또는 알킨기를 포함한다.
- [0078] 본 발명은 또한 약학적으로 허용되는 담체, 및 적어도 하나의 아미노산이 비천연적으로 코딩된 아미노산에 의해 치환된, 서열번호 1, 2, 3, 5 또는 7에 제시된 서열, 또는 임의의 다른 IL-2 서열을 포함하는 PEG-IL-2 또는 그의 천연 변이체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명은 또한 약학적으로 허용되는 담체, 및 서열번호 1, 2, 3, 5 또는 7에 제시된 서열을 포함하는 IL-2 또는 그의 천연 변이체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 사카라이드 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 사카라이드 모이어티를 통해 IL-2 또는 그의 천연 변이체에 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커, 중합체, 또는 생물학적 활성 분자는 사카라이드 모이어티를 통해 IL-2 또는 그의 천연 변이체에 연결된다.
- [0079] 본 발명은 또한 단일 아미노에서 IL-2에 공유 결합에 의해 연결된 수용성 중합체를 포함하는 IL-2 또는 그의 천연 변이체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체에 공유 연결된 아미노산은 폴리펩타이드에 존재하는 비천연적으로 코딩된 아미노산이다.
- [0080] 본 발명은 적어도 하나의 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자를 포함하는 IL-2 또는 그의 변이체를 제공하며, 여기서 상기 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자는 리보솜에 의해 폴리펩타이드에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산의 작용기를 통해 폴리펩타이드에 부착된다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체는 모노PEG화된다. 본 발명은 또한 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산에 부착된 링커, 중합체 또는 생

물학적 활성 분자를 포함하는 IL-2 또는 그의 변이체를 제공하며, 여기서 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 리보솜에 의해 미리 선택된 위치에서 폴리펩타이드에 도입된다.

[0081] 본 발명의 범위에는 IL-2 코딩 영역에 연결된 리더 또는 신호 서열, 및 IL-2 코딩 영역에 연결된 이중 신호 서열을 포함하는 IL-2 또는 그의 변이체가 포함된다. 선택된 이중 리더 또는 신호 서열은 예를 들어 숙주 세포 분비 시스템에 의해 인식되고 프로세싱되어 분비되고 가능하게는 숙주 세포에 의해 신호 펩티다제에 의해 절단되는 것이어야 한다. 본 발명의 IL-2를 사용하여 병태 또는 장애를 치료하는 방법은 신호 또는 리더 펩타이드가 존재하거나 존재하지 않는 IL-2 또는 그의 변이체를 사용하여 치료하는 것을 의미한다.

[0082] 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 포함하는 IL-2 또는 그의 변이체를, PEG를 포함하지만 이로 제한되지 않는 또 다른 분자에 접합하면, 비천연 아미노산에 대한 접합에 사용되는 특유한 화학 반응으로 인해 실질적으로 정제된 IL-2를 제공할 수 있다. 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 또는 그의 변이체를 PEG와 같은 또 다른 분자에 접합하는 것은 접합 단계 전 또는 후에 수행되는 다른 정제 기술을 사용하여 수행함으로써 실질적으로 순수한 IL-2 또는 그의 변이체를 제공할 수 있다.

[0083] 일부 실시양태에서, 본 발명은 의약 제조에 사용하기 위한 변형된 IL-2 폴리펩타이드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 치료 유효량의 IL-2 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0084] 도 1은 IL-2R α 의 구조 및 IL-2와의 계면으로 표시된 잠재적 수용체 상호작용 부위를 갖는 IL-2 폴리펩타이드의 모습을 보여주는 모델을 도시한다.

도 2는 이. 콜라이에서 IL-2의 발현을 위한 발현 벡터의 플라스미드 지도를 도시한다.

도 3a-3b는 이. 콜라이에서의 IL-2 단백질의 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석(도 3a) 및 이. 콜라이에서의 IL-2 변이체의 역가(도 3b)를 도시한다.

도 4a-4b는 CD25에 대한 IL-2 야생형의 결합 동역학 센서그램 및 모델 피팅 라인 및 계산된 측정(도 4a) 및 포유동물 세포에서 IL-2의 발현을 위한 발현 벡터의 플라스미드 지도(도 4b)를 도시한다.

도 5는 UPF1 게놈 DNA 서열 및 CRISPR gRNA 부위의 디자인을 도시한다.

도 6은 UPF1 녹아웃 세포주의 서열 검증을 도시한다.

도 7a-7b는 포유동물 세포에서 다양한 IL-2 변이체의 일시적인 발현(도 7a) 및 포유동물 세포에서 생성된 야생형 IL-2 및 IL-2 변이체의 웨스턴 블롯 분석(도 7b)을 도시한다.

도 8은 IL-2의 F42 변이체의 CTLL-2 확장 분석을 도시한다.

도 9는 CTLL-2 증식 분석에 의한 IL-2 변이체의 스크리닝을 도시한다.

도 10a-10c는 IL-2 야생형 및 F42 변이체에 대한 결합 동역학 센서그램(도 10a), K35 및 Y45 변이체에 대한 결합 동역학 센서그램(도 10b), 그리고 T37 및 P65 변이체에 대한 결합 동역학 센서그램(도 10c)을 도시한다.

도 11은 IL-2 수용체 이량체화 분석의 예시를 도시한다.

도 12는 생체의 pSTAT5 분석의 예시를 도시한다.

도 13은 글리코실화 또는 비글리코실화 IL-2의 존재 하에서의 CTLL-2 세포의 클론 성장 및 장기간 증식을 도시한다.

도 14는 상응하는 야생형 IL-2 또는 그의 선택된 변이체의 안정한 풀(pool)의 생성 전후의 역가 비교를 도시한다.

도 15a-15c는 F42-R38A 변이체를 발현하는 포유동물 세포에서의 역가(도 15a), F42-R38A 변이체의 CTLL-2 결합 분석(도 15b) 및 F42-R38A 변이체에 대한 결합 동역학 센서그램(도 15c)을 도시한다.

도 16은 Y45-PEG20K-BR2 및 F42-R38A-PEG20K-BR2 변이체의 시간 프로파일에 대한 평균 혈장 농도를 도시한다.

도 17a-17d는 IL-2 야생형(WT; 도 17a)에 대한 결합 동역학 센서그램을 도시하고; 이에 대비한 F42-R38A-P65R-PEG20K-BR2(도 17b); IL2-Y45-M46L-PEG20K-BR2(도 17c); 및 IL2-Y45-M46I-PEG20K-BR2(도 17d) 변이체의 그것들

도시한다.

도 18은 PEG화된 IL-2 변이체의 CTLL-2 세포 증식 검정을 도시한다.

도 19는 PEG화된 IL-2 변이체의 시간 프로파일에 대한 평균 혈장 농도를 도시한다.

도 20a-20b는 종양 부피(도 20a) 및 체중(도 20b)에 대한 PEG화된 IL-2 변이체의 활성을 도시한다.

도 21a-21b는 2 mg/kg(도 21a) 및 5-8 mg/kg(도 21b)의 C57BL/6 마우스에서의 B16F10 종양 성장 억제에 대한 IL-2 변이체 F42-R38A-P65R-PEG30K-L, F42-R38A-P65R-PEG40K-BR2, Y45-PEG30K-L 및 Y45-PEG40K-BR2의 효과를 도시한다.

도 22는 B16F10 종양을 보유하는 BALB/c 마우스에서 최종 종양 부피를 도시한다.

도 23a-23c는 CT26 종양 성장 억제 및 마우스 체중(도 23c)에 대한 PEG화된 IL-2 변이체 F42-R38A-P65R-PEG30K-L(도 23a) 및 Y45-PEG30K-L(도 23b)의 효과를 도시한다.

도 24는 CT26 종양을 보유하는 BALB/c 마우스에서 최종 종양 부피를 도시한다.

도 25a-25c는 CT26 종양을 보유하는 마우스의 혈액에서의, CD8+ 세포(도 25a), CD4+ 세포(도 25b), 및 CD8+/CD4+의 비율(도 25c)에 대한 PEG화된 IL-2 변이체 F42-R38A-P65R-PEG30K-L 및 Y45-PEG30K-L의 효과를 도시한다.

도 26은 DSF에 의해 분석된 야생형 IL-2의 용융 온도를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0085] 정의

[0086] 본 발명은 본원에서 설명되는 특정 방법, 프로토콜, 세포주, 구축물 및 시약으로 제한되지 않고, 이는 달라질 수 있음을 이해하여야 한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어는 단지 특정 실시양태를 설명하기 위한 것으로서 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니고, 상기 범위는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것임을 이해하여야 한다.

[0087] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥이 달리 명확하게 나타내지 않는 한, 복수의 참조 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "IL-2", "PEG-IL-2", "PEG-IL-2 접합체" 및 다양한 대문자, 하이픈이 붙은 및 하이픈이 붙지 않은 형태에 대한 언급은 하나 이상의 이러한 단백질에 대한 언급이며, 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 그의 동등물 등을 포함한다.

[0088] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 통상 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 설명되는 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법, 장치, 및 물질이 본 발명을 실시하거나 시험하기 위해 사용될 수 있지만, 바람직한 방법, 장치 및 물질의 이제 설명된다.

[0089] 본원에서 언급되는 모든 공개 문헌 및 특허는 예를 들어 공개 문헌에 기술된 구축물 및 방법을 기술하고 개시하기 위한 목적으로 본원에 참조로 포함되며, 이는 현재 설명되는 본 발명과 관련하여 사용될 수 있다. 본원에서 논의되는 공개 문헌은 본원의 출원일 이전의 오직 그의 개시내용에 대해서만 제공된다. 본원에 기술된 어느 내용도, 본 발명자들이 선행 발명에 의해서 또는 임의의 다른 이유로 상기 개시내용보다 선행할 자격이 없다는 것을 인정하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0090] 용어 "실질적으로 정제된"은, 단백질의 천연 발생 환경, 즉 천연 세포, 또는 재조합 방식으로 생성되는 IL-2의 경우 숙주 세포에서 발견되는 단백질에 통상적으로 동반되거나 상기 단백질과 상호작용하는 구성 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없을 수 있는 IL-2 또는 그의 변이체를 지칭한다. 세포성 물질이 실질적으로 없을 수 있는 IL-2는 약 30% 미만, 약 25% 미만, 약 20% 미만, 약 15% 미만, 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 4% 미만, 약 3% 미만, 약 2% 미만 또는 약 1% 미만(건조 중량을 기준으로)의 오염 단백질을 갖는 단백질 조제물을 포함한다. IL-2 또는 그의 변이체가 숙주 세포에 의해 재조합 방식으로 생성되는 경우, 단백질은 세포의 건조 중량을 기준으로, 약 30%, 약 25%, 약 20%, 약 15%, 약 10%, 약 5%, 약 4%, 약 3%, 약 2% 또는 약 1% 또는 그 미만으로 존재할 수 있다. IL-2 또는 그의 변이체가 숙주 세포에 의해 재조합 방식으로 생성되는 경우, 단백질은 배양 배지 내에 세포의 건조 중량을 기준으로, 약 5 g/L, 약 4 g/L, 약 3 g/L, 약 2 g/L, 약 1 g/L, 약 750 mg/L, 약 500 mg/L, 약 250 mg/L, 약 100 mg/L, 약 50 mg/L, 약 10 mg/L 또는 약 1 mg/L 또는 그 미만으로 존재할 수 있다.

따라서, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 바와 같이 "실질적으로 정제된" IL-2는 적절한 방법, 예를 들어 SDS/PAGE 분석, RP-HPLC, SEC 및 모세관 전기영동에 의해 확인되는 바와 같이, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%의 순도 수준, 구체적으로 적어도 약 75%, 80%, 85%의 순도 수준, 보다 구체적으로 적어도 약 90%의 순도 수준, 적어도 약 95%의 순도 수준, 적어도 약 99% 이상의 순도 수준 또는 그 초과 순도 수준을 가질 수 있다.

[0091] "재조합 숙주 세포" 또는 "숙주 세포"는 재조합 숙주 세포를 제조하기 위해 삽입에 사용되는 방법, 예를 들어 직접 흡수, 형질도입, f-메이팅(f-mating) 또는 관련 기술 분야에 공지된 다른 방법과는 상관없이, 외인성 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포를 지칭한다. 외인성 폴리뉴클레오타이드는 비통합된 벡터, 예를 들어 플라스미드로서 유지될 수 있거나, 대안적으로 숙주 게놈 내로 통합될 수 있다.

[0092] 본원에서 사용되는 바와 같이, "배지" 또는 "배지들"이라는 용어는 박테리아 숙주 세포, 효모 숙주 세포, 곤충 숙주 세포, 식물 숙주 세포, 진핵 숙주 세포, 포유동물 숙주 세포, CHO 세포, 원핵 숙주 세포, 이. 콜라이 또는 슈도모나스(*Pseudomonas*) 숙주 세포를 비롯한 임의의 숙주 세포, 및 세포 내용물을 유지시키거나 함유할 수 있는 임의의 배양 배지, 용액, 고체, 반고체 또는 강성 지지체를 포함한다. 따라서, 상기 용어는 숙주 세포가 그 안에서 성장한 배지, 예를 들어 증식 단계 이전 또는 이후의 배지를 비롯하여 IL-2가 그 안으로 분비된 배지를 포함할 수 있다. 또한, 상기 용어는 예를 들어 IL-2가 세포 내에서 생성되고 숙주 세포가 용해되거나 파괴됨으로써 IL-2를 방출하는 경우에 숙주 세포 용해물을 함유하는 완충제 또는 시약을 포함할 수 있다.

[0093] 단백질 재폴딩과 관련하여 본원에서 사용되는 "환원제"는 설프히드릴기를 환원된 상태로 유지하고 분자내 또는 분자간 디설파이드 결합을 환원시키는 임의의 화합물 또는 물질로 정의된다. 적합한 환원제는 디티오프레이톨(DTT), 2-머캅토에탄올, 디티오에리트릴, 시스테인, 시스테아민(2-아미노에탄티올) 및 환원된 글루타티온을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 매우 다양한 환원제가 본 발명의 방법 및 조성물에 사용하기에 적합하다는 것은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 자명할 것이다.

[0094] 본 명세서에서 단백질 재폴딩과 관련하여 사용되는 "산화제"는 산화되는 화합물로부터 전자를 제거할 수 있는 임의의 화합물 또는 물질로서 정의된다. 적절한 산화제로는 산화된 글루타티온, 시스틴, 시스타민, 산화된 디티오프레이톨, 산화된 에리트레이톨 및 산소를 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 매우 다양한 산화제가 본 발명의 방법에 사용하기에 적합하다는 것은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 자명할 것이다.

[0095] 본 명세서에서 사용되는 "변성 제제" 또는 "변성제"는 단백질의 가역적인 언폴딩(unfolding)을 유발하는 임의의 화합물 또는 물질로서 정의된다. 변성 제제 또는 변성제의 강도는 특정 변성 제제 또는 변성제의 특성 및 농도 둘 모두에 의해 결정될 것이다. 적절한 변성 제제 또는 변성제는 카오토프(chaatrope), 세제, 유기 용매, 수 혼화성 용매, 인지질, 또는 상기 물질 중 2종 이상의 조합물일 수 있다. 적절한 카오토프로는 우레아, 구아니딘 및 나트륨 티오시아네이트를 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 유용한 세제로는 강력한 세제, 예를 들어 소듐 도데실 설페이트, 또는 폴리옥시에틸렌 에테르(예를 들어, 트윈(Tween) 또는 트리톤(Triton) 세제), 사르코실, 약한 비이온성 세제(예를 들어, 디기토닌), 약한 양이온성 세제, 예를 들어, N-2,3-(디올레일옥시)-프로필-N,N,N-트리메틸암모늄, 약한 이온성 세제(예를 들어, 콜산나트륨 또는 데옥시콜산나트륨) 또는 양쪽이온성 세제[설포베타인(Zwittergent), 3-(3-클로라미도프로필)디메틸암모니오-1-프로판 설페이트(CHAPS) 및 3-(3-클로라미도프로필)디메틸암모니오-2-하이드록시-1-프로판 설포네이트(CHAPSO)를 포함하지만 이들로 제한되지 않음]를 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 아세토니트릴, 저급 알칸올(특히, 에탄올 또는 이소프로판올과 같은 C₂-C₄ 알칸올), 또는 저급 알칸디올(특히, 에틸렌-글리콜과 같은 C₂-C₄ 알칸디올)과 같은 유기 수혼화성 용매를 세제로서 사용할 수 있다. 본 발명에 유용한 인지질은 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 및 포스파티딜이노시톨 또는 합성 인지질 유도체 또는 변이체, 예를 들어 디헥사노일포스파티딜콜린 또는 디헵타노일포스파티딜콜린과 같은 천연 발생 인지질일 수 있다.

[0096] 본 명세서에서 사용되는 "재폴딩(refolding)"은 디설파이드 결합을 포함하는 폴리펩타이드를 부적절하게 폴딩된 또는 폴딩되지 않은 상태에서부터 디설파이드 결합에 대하여 본래의 또는 적절하게 폴딩된 입체구조로 전환시키는 임의의 과정, 반응 또는 방법을 나타낸다.

[0097] 본 명세서에서 사용되는 "코폴딩(cofolding)"은 구체적으로 서로 상호작용하는 적어도 2개의 폴리펩타이드를 이용하여 폴딩되지 않은 또는 부적절하게 폴딩된 폴리펩타이드를 본래의 적절히 폴딩된 폴리펩타이드로 전환시키는 재폴딩 과정, 반응 또는 방법을 나타낸다.

[0098] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "인터류킨-2", "IL-2" 및 이들의 하이픈이 있는 및 없는 형태의 용어들은

IL-2의 적어도 하나의 생물학적 활성을 갖는 폴리펩타이드 및 단백질뿐만 아니라, 그 생물학적 활성에 관계없이, 및 재조합체(cDNA, 게놈 DNA 또는 합성 DNA로부터 제조되든지 또는 다른 형태의 핵산으로부터 제조되든지 간에), 시험관내, 생체내, 핵산 분자의 미세주입, 합성, 유전자 도입 및 유전자 활성화 방법을 포함하지만 이로 제한되지 않는 그의 합성 또는 제조 방법에 관계없이, 이들의 IL-2 유사체, IL-2 뮤테인, IL-2 변이체, IL-2 이소형, IL-2 모방체, IL-2 단편, 하이브리드 IL-2 단백질, 융합 단백질, 올리고머 및 다량체, 상동체, 글리코실화 패턴 변이체, 변이체, 스플라이스 변이체 및 뮤테인을 포함한다. "IL-2", "IL-2", "IL-2 변이체" 및 "IL-2 폴리펩타이드"란 용어는 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 IL-2를 포함한다.

[0099] 리더 서열이 없고 N-말단에 메티오닌이 없는 IL-2의 서열에 대해서는 본 명세서의 서열번호 2를 참조한다. 리더 서열이 없고 N-말단에 메티오닌이 있는 IL-2의 서열에 대해서는 서열번호 3, 5 또는 7을 참조한다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 IL-2 또는 그의 변이체는 서열번호 2, 3, 5 또는 7, 또는 IL-2의 임의의 다른 서열과 실질적으로 동일하다. 돌연변이체 IL-2 및 다른 변이체를 포함하는 IL-2를 코딩하는 핵산 분자뿐만 아니라, 이들 폴리펩타이드를 발현 및 정제하는 방법은 관련 기술 분야에 잘 알려져 있다.

[0100] 용어 "IL-2"는 또한 천연 발생 IL-2의 약학적으로 허용되는 염 및 프로드러그, 및 상기 염의 프로드러그, 다형체, 수화물, 용매화물, 생물학적 활성 단편, 생물학적 활성 변이체 및 입체 이성질체뿐만 아니라, 천연 발생 IL-2의 아고니스트, 모방체 및 길항제 변이체 및 이들의 폴리펩타이드 융합체를 포함한다.

[0101] 다양한 참고 문헌이 중합체 접합 또는 글리코실화에 의한 폴리펩타이드의 변형에 관해 개시하고 있다. "IL-2"란 용어는 PEG와 같은 중합체에 접합된 폴리펩타이드를 포함하며, 시스테인, 라이신, 또는 다른 잔기의 하나 이상의 추가적인 유도체화로 이루어질 수 있다. 또한, IL-2 폴리펩타이드는 링커 또는 중합체를 포함할 수 있거나 (여기서, 상기 링커 또는 중합체가 접합되는 아미노산은 본 발명에 따른 비천연 아미노산일 수 있음), 또는 라이신 또는 시스테인에 대한 커플링과 같이 관련 기술 분야에 공지된 기술을 이용하여 천연적으로 코딩된 아미노산에 접합시킬 수 있다.

[0102] "IL-2 폴리펩타이드"란 용어는 또한 임의의 아미노산 위치에서 글리코실화된 폴리펩타이드, 이 폴리펩타이드의 N 연결 또는 O 연결 글리코실화 형태를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 글리코실화된 IL-2를 포함한다. 하나의 뉴클레오타이드 변화를 포함하는 변이체 역시 IL-2 폴리펩타이드의 생물학적 활성 변이체로서 간주된다. 또한, 스플라이스 변이체 역시 포함된다.

[0103] "IL-2"란 용어는 또한 화학적 수단에 의해 연결되거나 융합 단백질로서 발현된, 임의의 하나 이상의 IL-2 또는 임의의 다른 폴리펩타이드, 단백질, 탄수화물, 중합체, 소분자, 링커, 리간드, 또는 임의의 유형의 다른 생물학적 활성 분자의 이중이량체, 동종이량체, 이종다량체, 또는 동종다량체뿐만 아니라, 예를 들어 생물학적 활성을 유지한 채로 특정 결실 또는 다른 변형을 포함하는 폴리펩타이드 유사체를 포함한다.

[0104] 본원에서 사용되는 "인터류킨-2" 또는 "IL-2"는 생물학적 활성 분자에 접합되든, 폴리에틸렌 글리콜에 접합되든, 또는 비접합 형태이든 간에, 비공유적으로 연결되어 동종이량체를 형성하는 2개의 서브유닛을 포함하는 단백질이다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "인터류킨-2" 및 "IL-2"는 "hIL-2" 또는 "mIL-2"로도 지칭되는 인간 또는 마우스 IL-2를 지칭할 수 있다.

[0105] 용어 "폐길화된 IL-2", "PEG화된 IL-2" 또는 "PEG-IL-2"는 부착이 안정하도록 링커를 통해 IL-2 단백질의 하나 또는 하나 초과 아미노산 잔기에 공유 부착된 하나 이상의 폴리에틸렌 글리콜 분자를 갖는 IL-2 분자이다. 용어 "모노폐길화된 IL-2" 및 "모노-PEG-IL-2"는 하나의 폴리에틸렌 글리콜 분자가 링커를 통해 IL-2 이량체의 하나의 서브유닛 상의 단일 아미노산 잔기에 공유 부착됨을 의미한다. PEG 모이어티의 평균 분자량은 바람직하게는 약 5,000 내지 약 50,000 달톤이다. IL-2에 대한 PEG 부착의 방법 또는 부위는 중요하지 않지만, 바람직하게는 폐길화는 생물학적 활성 분자의 활성을 변경하지 않거나, 단지 최소한으로만 변경한다. 바람직하게는, 반감기의 증가는 임의의 생물학적 활성의 감소보다 크다.

[0106] 본원에서 설명되는 IL-2의 아미노산 위치에 대한 모든 언급은 달리 명시되지 않는 한(즉, 비교가 서열번호 3, 5, 또는 7 또는 다른 IL-2에 기초한다고 언급되는 경우) 서열번호 2의 위치를 기초로 한다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 서열번호 2의 위치에 상응하는 아미노산 위치가 서열번호 3, 5, 또는 7과 같은 임의의 다른 IL-2에서 쉽게 확인될 수 있음을 이해할 것이다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 서열번호 2, 3, 5 또는 7의 위치에 상응하는 아미노산 위치 또는 임의의 다른 IL-2 서열이 IL-2 융합체, 변이체, 단편 등과 같은 임의의 다른 IL-2 분자에서 쉽게 확인될 수 있음을 이해할 것이다. 예를 들어, BLAST와 같은 서열 정렬 프로그램을 사용하여 서열번호 2, 3, 5, 또는 7, 또는 다른 IL-2 서열의 위치에 해당하는 단백질 내의 특정 위치를 정렬하고 확

인할 수 있다. 서열번호 2, 3, 5 또는 7, 또는 다른 IL-2 서열과 관련하여 본원에서 설명되는 아미노산의 치환, 결실 또는 부가는 또한 본원에서 설명되거나 관련 기술 분야에 알려져 있고 본 발명에 분명히 포함되는 IL-2 용합체, 변이체, 단편 등 내의 상응하는 위치에서의 치환, 결실 또는 부가를 지칭하는 것으로 의도된다.

[0107] IL-2(IL2): 관련 기술 분야에 공지된 임의의 형태의 IL-2가 본원에서 설명되는 조성물에 사용될 수 있다. 실험 작업의 경우, IL-2의 마우스 형태가 특히 유용하다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 IL2의 아미노산 잔기의 일부가 그의 활성에 영향을 주지 않으면서 변경될 수 있으며 이러한 변형된 형태의 IL2가 또한 담체에 결합되어 본원에서 설명되는 방법에 사용될 수 있음을 인식할 것이다.

[0108] 용어 "인터류킨-2" 또는 "IL-2"는 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 IL-2를 포함한다. 본 발명의 IL-2는 하나 이상의 비천연 아미노산 변형과 함께 하나 이상의 천연 아미노산에 의한 변형으로 이루어질 수 있다. 천연 발생 IL-2 폴리펩타이드 내의 매우 다양한 아미노산 위치에 있어서의 대표적인 치환으로서, 약학적 안정성을 조절하는 치환, 상기 IL-2 폴리펩타이드의 생물학적 활성 중 하나 이상을 조절하는 치환(예를 들어, 아고니스트 활성을 증가시키는 치환을 포함하지만 이로 제한되지 않음), 상기 폴리펩타이드의 용해도를 증가시키는 치환, 프로테아제 감수성을 감소시키는 치환, 상기 폴리펩타이드를 길항제로 전환시키는 치환 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 치환들이 개시되었으며, 이들은 "IL-2 폴리펩타이드"란 용어에 포함된다. 일부 실시양태에서, 상기 IL-2 길항제는 IL-2 분자의 수용체 결합 영역에 존재하는 수용성 중합체에 연결된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다.

[0109] 일부 실시양태에서, IL-2 또는 그의 변이체는 IL-2 또는 변이체 폴리펩타이드의 생물학적 활성을 조절하는 부가, 치환 또는 결실을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 또는 변이체는 하나 이상의 암 증상의 치료 또는 완화와 같은 연구를 통해 알려지고 입증된 IL-2의 특질을 조절하는 부가, 치환 또는 결실을 추가로 포함한다. 부가, 치환 또는 결실은 IL-2 또는 변이체의 하나 이상의 특성 또는 활성을 조절할 수 있다. 예를 들어, 부가, 치환 또는 결실은 IL-2 수용체 또는 수용체의 하나 이상의 서브유닛에 대한 친화도를 조절하거나, 순환 반감기를 조절하거나, 치료 반감기를 조절하거나, 폴리펩타이드의 안정성을 조절하거나, 프로테아제에 의한 절단을 조절하거나, 용량을 조절하거나, 방출 또는 생체 이용률을 조절하거나, 정제를 촉진하거나, 특정 투여 경로를 개선 또는 변경할 수 있다. 이와 유사하게, IL-2 또는 변이체는 프로테아제 절단 서열, 반응성 기, 항체 결합 도메인(FLAG 또는 폴리-His를 포함하지만 이로 제한되지 않음) 또는 다른 친화도 기반 서열(FLAG, 폴리-His, GST 등을 포함하지만 이로 제한되지 않음) 또는 폴리펩타이드의 검출(GFP를 포함하지만 이로 제한되지 않음), 정제 또는 다른 특질을 개선하는 연결된 분자(비오틴을 포함하지만 이로 제한되지 않음)를 포함할 수 있다.

[0110] 용어 "IL-2 폴리펩타이드"는 또한 동일하거나 상이한 비천연적으로 코딩된 아미노산 측쇄에, 천연적으로 코딩된 아미노산 측쇄에 비천연적으로 코딩된 아미노산 측쇄를 통해 직접 연결되거나 또는 링커를 통해 간접적으로 연결된 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는 동종이량체, 이종이량체, 동종다량체 및 이종다량체를 포함한다. 예시적인 링커는 작은 유기 화합물, 폴리(에틸렌 글리콜) 또는 폴리텍스트란과 같은 다양한 길이의 수용성 중합체, 또는 다양한 길이의 폴리펩타이드를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0111] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "본 발명의 접합체", "IL-2-생물학적 활성 분자 접합체" 또는 "PEG-IL-2"는 생물학적 활성 분자, 이의 일부 또는 이의 유사체에 접합된 인터류킨-2 수용체 또는 이의 서브유닛에 결합하는 인터류킨-2 또는 이의 일부, 유사체 또는 유도체를 지칭한다. 달리 명시되지 않는 한, 용어 "본 발명의 화합물" 및 "본 발명의 조성물"은 용어 "본 발명의 접합체"에 대한 대안적으로 사용된다.

[0112] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "세포독성제"는 IL-2, PEG-IL-2 또는 IL-2 변이체와 함께 사용하기 위한 치료제로서 사용될 수 있는, 암 세포 또는 활성화된 면역 세포에 치료 효과를 발휘하는 임의의 작용제일 수 있다 (예를 들어, WO 2004/010957, "Drug Conjugates and Their Use for Treating Cancer, An Autoimmune Disease or an Infectious Disease" 참조). 본 발명에서 사용하기 위한 세포독성제 또는 면역억제제의 클래스는 예를 들어 항류블린제, 아우리스타틴, DNA 마이너 그루브 결합제, DNA 복제 억제제, 알킬화제(예를 들어, 백금 착체, 예를 들어, 시스플라틴, 모노(백금), 비스(백금) 및 트리-핵 백금 착체 및 카르보플라틴), 안트라사이클린, 항생제, 항염산제, 항대사물질, 화학 요법 감작제, 듀오카르마이신, 에토포시드, 불소화된 피리미딘, 이오노포어, 렉시트롭신, 니트로소우레아, 플라티놀, 예비 형성(pre-forming) 화합물, 퓨린 항대사물질, 퓨로마이신, 방사선 감작제, 스테로이드제, 탁산, 토포이소머라제 억제제, 빈카 알칼로이드 등을 포함한다.

[0113] 개별 세포독성제 또는 면역억제제는 예를 들어, 안드로젠, 안트라마이신(AMC), 아스파라기나제, 5-아자시티딘, 아자티오프린, 블레오마이신, 부술판, 부티오닌 설폭스이민, 캄프토테신, 카르보플라틴, 카르무스틴(BSNU), CC-

1065, 클로람부실, 시스플라틴, 콜히친, 사이클로포스파미드, 시타라빈, 시티딘 아라비노시드, 사이토잘라신 B, 다카르바진, 닥티노마이신(예전의 악티노마이신), 다우노루비신, 데카르바진, 도세탁셀, 독소루비신, 에스트로젠, 5-플루오르데옥시우리딘, 5-플루오로우라실, 그라미시딘 D, 하이드록시우레아, 이다루비신, 이포스파미드, 이리노테칸, 로무스틴(CCNU), 메클로레타민아민, 멜팔란, 6-머캅토피린, 메토티렉세이트, 미트라마이신, 미토마이신 C, 미톡산트론, 니트로이미다졸, 파클리탁셀, 플리카마이신, 프로카르바진, 스트렙토조토신, 테노포시드, 6-티오구아닌, 티오TEPA, 토포테칸, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 비노렐빈, VP-16 및 VM-26을 포함한다.

[0114] 일부 전형적인 실시양태에서, 치료제는 세포독성제이다. 적합한 세포독성제는 예를 들어, 돌라스타틴(예를 들어, 아우리스타틴 E, AFP, MMAF, MMAE), DNA 마이너 그루브 결합제(예를 들어, 엔다이인 및 렉시트롭신), 듀오카르마이신, 탁산(예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀), 푸로마이신, 빈카 알칼로이드, CC-1065, SN-38, 토포테칸, 모르폴리노-독소루비신, 리족신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 에키노마이신, 콤브레타스타틴, 네트롭신, 에포틸론 A 및 B, 에스트라무스틴, 크립토피신, 세마도틴, 메이탄시노이드, 디스코테르몰라이드, 엘레우테로빈, 및 미톡산트론을 포함한다.

[0115] "비천연적으로 코딩된 아미노산"은 20개의 일반적인 아미노산 중 하나 또는 파이로라이신 또는 셀레노시스테인이 아닌 아미노산을 지칭한다. "비천연적으로 코딩된 아미노산"이란 용어와 동의어로 사용될 수 있는 다른 용어로는 "비천연 아미노산", "비천연 아미노산", "비천연 발생 아미노산" 및 그의 다양한 하이픈이 붙은 및 하이픈이 붙지 않은 형태 등이 있다. "비천연적으로 코딩된 아미노산"이란 용어는 또한 천연적으로 코딩된 아미노산(20개의 일반적인 아미노산 또는 파이로라이신 및 셀레노시스테인을 포함하지만 이들로 제한되지 않음)의 변형(예를 들어, 번역 후 변형)에 의해 발생되지만 그 자체가 번역 복합체에 의해 성장하는 폴리펩타이드 사슬 내로 자연적으로 도입되는 것은 아닌 아미노산을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산의 예로는 N-아세틸글루코사미닐-L-세린, N-아세틸글루코사미닐-L-트레오닌 및 O-포스포타이로신을 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0116] "아미노 말단 변형기"는 폴리펩타이드의 아미노 말단에 부착될 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 이와 유사하게, "카르복시 말단 변형기"는 폴리펩타이드의 카르복시 말단에 부착될 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 말단 변형기로는 다양한 수용성 중합체, 펩타이드 또는 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 또는 펩타이드의 혈청 반감기를 증가시키는 다른 모이어티를 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다.

[0117] "작용기", "활성 모이어티", "활성화 기", "이탈기", "반응성 부위", "화학적 반응성 기" 및 "화학적 반응성 모이어티"란 용어들은 관련 기술 분야에서 사용되는 것들로서, 본 명세서에서는 분자의 정의 가능한 별개의 부분 또는 단위를 지칭한다. 상기 용어들은 화학 분야에서 어느 정도 동의어로 사용되며, 몇 가지 기능 또는 활성을 수행하고 다른 분자와 반응하는 분자의 일부분을 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다.

[0118] 본 명세서에서 "연결" 또는 "링커"란 용어는 일반적으로 화학 반응의 결과로서 형성되며 전형적으로 공유 연결인 기 또는 결합을 나타내기 위해 사용된다. 가수분해에 안정한 연결은, 연결이 물 내에서 실질적으로 안정하고 생리학적 조건을 포함하지만 이로 한정되지 않는 유용한 pH 값에서 장기간 동안, 가능한 경우 심지어 무기한적으로 물과 반응하지 않는다는 것을 의미한다. 가수분해에 불안정한 또는 가수분해에 의해 분해 가능한 연결은, 연결이 물 내에서 또는 수용액(예를 들어, 혈액을 포함함) 중에서 분해될 수 있다는 것을 의미한다. 효소에 불안정한 또는 효소에 의해 분해 가능한 연결은, 연결이 하나 이상의 효소에 의해 분해될 수 있다는 것을 의미한다. 관련 기술 분야에서 이해되고 있는 바와 같이, PEG 및 관련 중합체는 중합체 골격 내에, 또는 중합체 골격과 중합체 분자의 말단 작용기들 중 하나 이상의 말단 작용기 사이의 링커기 내에 분해 가능한 연결을 포함할 수 있다. 예를 들어, 생물학적 활성제 상의 알코올기와 PEG 카르복실산 또는 활성화된 PEG 카르복실산의 반응에 의해 형성된 에스테르 연결은 생리학적 조건 하에서 일반적으로 가수분해되어 생물학적 활성제를 방출시킨다. 가수분해에 의해 분해 가능한 다른 연결로는 카르보네이트 연결; 아민과 알데하이드의 반응으로부터 생성된 이민 연결; 알코올과 포스페이트기의 반응에 의해 형성된 포스페이트 에스테르 연결; 하이드라지드와 알데하이드의 반응 생성물인 하이드라존 연결; 알데하이드와 알코올의 반응 생성물인 아세탈 연결; 포르메이트와 알코올의 반응 생성물인 오르토에스테르 연결; 아민기(PEG와 같은 중합체의 말단에 존재하는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않음)와 펩타이드의 카르복실기에 의해 형성된 펩타이드 연결; 및 포스포아미다이트기(중합체의 말단에 존재하는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않음)와 올리고뉴클레오타이드의 5' 하이드록실기에 의해 형성된 올리고뉴클레오타이드 연결을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다.

[0119] 본 명세서에서 사용될 때, "생물학적 활성 분자", "생물학적 활성 모이어티" 또는 "생물학적 활성제"란 용어는 바이러스, 박테리아, 박테리오파지, 트랜스포존(transposon), 프리온, 곤충, 진균, 식물, 동물 및 인간을 포함

하지만 이들로 제한되지 않는 유기체에 관한 생물학적 시스템, 경로, 분자 또는 상호작용의 임의의 물리적 또는 생화학적 특성에 영향을 줄 수 있는 임의의 물질을 의미한다. 특히, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 생물학적 활성 분자는 인간 또는 다른 동물에서 질환을 진단하거나, 치유하거나, 완화하거나, 치료하거나, 예방하기 위한, 또는 인간 또는 동물의 신체적 또는 정신적 복지를 향상시키기 위한 임의의 물질을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 생물학적 활성 분자의 예로는 펩타이드, 단백질, 효소, 소분자 약물, 백신, 면역원, 경질 약물, 연질 약물, 탄수화물, 무기 원자 또는 분자, 염료, 지질, 뉴클레오사이드, 방사성 핵종, 올리고뉴클레오타이드, 변성 독소, 생물학적 활성 분자, 원핵 및 진핵 세포, 바이러스, 폴라사카라이드, 바이러스, 박테리아, 곤충, 동물 또는 임의의 다른 세포 또는 세포 유형로부터 얻어지거나 이로부터 유래되는 핵산 및 그의 일부, 리포솜, 마이크로입자 및 미셀을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 본 발명에 사용하기에 적합한 생물학적 활성체의 클래스에는 약물, 프로드러그, 방사성 핵종, 조영제, 중합체, 항생제, 살진균제, 담즙산 수지, 니아신 및/또는 스타틴, 항염증제, 항종양제, 심혈관계, 항불안제, 호르몬, 성장 인자, 스테로이드제, 미생물 유래 생물학적 활성 분자 등이 포함되지만, 이들로 제한되지 않는다. 생물학적 활성체는 또한 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드의 투여 전에, 투여 후에 및/또는 공동 투여될 수 있는, 특허 출원 공개 제20080221112호(Yamamori et al.)에 기재된 것과 같은 아마이드 화합물을 포함한다.

[0120] "이작용성 중합체"는 다른 모이어티(아미노산 측기를 포함하지만 이로 제한되지 않음)와 특이적으로 반응하여 공유 결합 또는 비공유 결합을 형성할 수 있는 2개의 별개의 작용기를 포함하는 중합체를 말한다. 특정 생물학적 활성 성분 상의 기와 반응하는 1개의 작용기, 및 제2 생물학적 활성 성분 상의 기와 반응하는 또 다른 기를 갖는 이작용성 링커를 이용함으로써, 제1 생물학적 활성 성분, 이작용성 링커 및 제2 생물학적 활성 성분을 포함하는 접합체를 형성할 수 있다. 다양한 화합물을 펩타이드에 부착시키기 위한 다수의 방법 및 링커 분자가 알려져 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 참고 문헌으로 포함되는 유럽 특허 공개 제188,256호; 미국 특허 제4,671,958호; 제4,659,839호; 제4,414,148호; 제4,699,784호; 제4,680,338호; 및 제4,569,789호를 참조한다. "다작용성 중합체"는 다른 모이어티(아미노산 측기를 포함하지만 이로 제한되지 않음)와 특이적으로 반응하여 공유 결합 또는 비공유 연결을 형성할 수 있는 2개 이상의 별개의 작용기를 포함하는 중합체를 지칭한다. 이작용성 중합체 또는 다작용성 중합체는 임의의 원하는 길이 또는 분자량을 가질 수 있고, IL-2에 연결된 하나 이상의 분자와 IL-2의 수용체 또는 IL-2 사이에 특정한 요구되는 공간 또는 입체구조를 제공하도록 선택될 수 있다.

[0121] 치환체 기가 왼쪽에서 오른쪽으로 표기되는 기존의 화학식에 의해 특정되는 경우, 이들은 구조를 오른쪽에서 왼쪽으로 기록하여 생성되는 화학적으로 동일한 치환체를 동등하게 포함하고, 예를 들어, 구조 $-CH_2O-$ 는 구조 $-OCH_2-$ 와 동등하다.

[0122] 용어 "치환체"는 "비간섭 치환체"를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. "비간섭 치환체"는 안정한 화합물을 생성하는 기이다. 적절한 비간섭 치환체 또는 라디칼로는 할로, C_1-C_{10} 알킬, C_2-C_{10} 알케닐, C_2-C_{10} 알키닐, C_1-C_{10} 알콕시, C_1-C_{12} 아르알킬, C_1-C_{12} 알콕아릴, C_3-C_{12} 사이클로알킬, C_3-C_{12} 사이클로알케닐, 페닐, 치환된 페닐, 톨루오일, 크실레닐, 비페닐, C_2-C_{12} 알콕시알킬, C_2-C_{12} 알콕시아릴, C_7-C_{12} 아릴옥시알킬, C_7-C_{12} 옥시아릴, C_1-C_6 알킬설페닐, C_1-C_{10} 알킬설포닐, $-(CH_2)_m-O-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})$ (여기서, m 은 1 내지 8임), 아릴, 치환된 아릴, 치환된 알콕시, 플루오로알킬, 헤테로사이클릭 라디칼, 치환된 헤테로사이클릭 라디칼, 니트로알킬, $-NO_2$, $-CN$, $-NRC(O)-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})$, $-C(O)-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})$, C_2-C_{10} 알킬 티오알킬, $-C(O)O-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})$, $-OH$, $-SO_2$, $=S$, $-COOH$, $-NR_2$, 카르보닐, $-C(O)-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})-CF_3$, $-C(O)-CF_3$, $-C(O)NR_2$, $-(C_1-C_{10} \text{ 아릴})-S-(C_6-C_{10} \text{ 아릴})$, $-C(O)-(C_1-C_{10} \text{ 아릴})$, $-(CH_2)_m-O-(CH_2)_m-O-(C_1-C_{10} \text{ 알킬})$ (여기서, m 은 각각 1 내지 8임), $-C(O)NR_2$, $-C(S)NR_2$, $-SO_2NR_2$, $-NRC(O)NR_2$, $-NRC(S)NR_2$, 이들의 염 등을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 여기서 사용된 각각의 R은 H, 알킬 또는 치환된 알킬, 아릴 또는 치환된 아릴, 아르알킬, 또는 알콕아릴이다.

[0123] 용어 "할로젠"은 불소, 염소, 요오드 및 브롬을 포함한다.

[0124] 그 자체로서 또는 또 다른 치환체의 일부로서 사용되는 "알킬"이란 용어는, 달리 명시하지 않는다면, 완전 포화, 단일 불포화 또는 다불포화일 수 있는 직쇄, 분지쇄 또는 사이클릭 탄화수소 라디칼 또는 이들의 조합을 의미하며, 표시된 수의 탄소 원자를 갖는(즉, C_1-C_{10} 은 1 내지 10개의 탄소를 의미함) 2가 또는 다가 라디칼을 포함할 수 있다. 포화 탄화수소 라디칼의 예로는 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, t-부틸, 이소부틸, sec-부틸, 사이클로헥실, (사이클로헥실)메틸, 사이클로프로필메틸, 이들의 상동체 및 이성질체, 예

를 들어, n-펜틸, n-헥실, n-헵틸, n-옥틸 등과 같은 기를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 불포화 알킬기는 하나 이상의 이중 결합 또는 삼중 결합을 갖는 알킬기이다. 불포화 알킬기의 예로는 비닐, 2-프로페닐, 크로틸, 2-이소펜테닐, 2-(부타디에닐), 2,4-펜타디에닐, 3-(1,4-펜타디에닐), 에티닐, 1-프로피닐 및 3-프로피닐, 3-부티닐, 및 고급 상동체 및 이성질체를 포함하지만, 이들에 제한되지 않는다. 또한, "알킬"이란 용어는, 달리 명시하지 않는다면, 이하에서 보다 상세히 정의하는 알킬의 유도체, 예를 들어 "헤테로알킬"을 포함하는 의미이다. 탄화수소 기로 한정되는 알킬기는 "호모알킬"로 명명된다.

[0125] 그 자체로서 또는 또 다른 치환체의 일부로서 사용되는 "알킬렌"이란 용어는, 구조식 $-CH_2CH_2-$ 및 $-CH_2CH_2CH_2CH_2-$ 의 기를 예로 들 수 있지만 이들로 제한되지 않는, 알칸으로부터 유래된 2가 라디칼을 의미하며, 이하에서 "헤테로알킬렌"으로서 지칭되는 기를 추가로 포함한다. 일반적으로, 알킬(또는 알킬렌) 기는 1 내지 24개의 탄소 원자를 가지며, 10개 이하의 탄소 원자를 갖는 기가 본 명세서에서 설명되는 방법 및 조성물의 특정 실시양태이다. "저급 알킬" 또는 "저급 알킬렌"은 일반적으로 8개 이하의 탄소 원자를 갖는 보다 짧은 사슬의 알킬 또는 알킬렌 기이다.

[0126] "알콕시", "알킬아미노" 및 "알킬티오"(또는 티오알콕시)라는 용어는 통상의 의미로 사용되며, 각각 산소 원자, 아미노기 또는 황 원자를 통해 분자의 나머지 부분에 부착된 알킬기를 말한다.

[0127] 그 자체로서 또는 또 다른 용어와 함께 사용되는 "헤테로알킬"이란 용어는, 달리 명시하지 않는다면, O, N, Si 및 S로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 헤테로원자 및 언급된 수의 탄소 원자로 이루어진, 안정한 직쇄 또는 분지쇄 또는 사이클릭 탄화수소 라디칼 또는 이들의 조합을 의미하며, 여기서 상기 질소 및 황 원자는 선택적으로 산화될 수 있고, 질소 헤테로원자는 선택적으로 4차화될 수 있다. 헤테로원자(들) O, N, S 및 Si는 헤테로알킬기의 임의의 내부 위치, 또는 알킬기가 분자의 나머지 부분에 부착되는 위치에 위치할 수 있다. 그 예로는 $-CH_2-CH_2-O-CH_3$, $-CH_2-CH_2-NH-CH_3$, $-CH_2-CH_2-N(CH_3)-CH_3$, $-CH_2-S-CH_2-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)-CH_3$, $-CH_2-CH_2-S(O)_2-CH_3$, $-CH=CH-O-CH_3$, $-Si(CH_3)_3$, $-CH_2-CH=N-OCH_3$, 및 $-CH=CH-N(CH_3)-CH_3$ 을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, $-CH_2-NH-OCH_3$ 및 $-CH_2-O-Si(CH_3)_3$ 과 같이 최대 2개의 헤테로원자가 연속될 수 있다. 이와 유사하게, "헤테로알킬렌"이란 용어는 $-CH_2-CH_2-S-CH_2-CH_2-$ 및 $-CH_2-S-CH_2-CH_2-NH-CH_2-$ 로 예시되고 이들로 제한되지 않는, 헤테로알킬로부터 유래된 2가 라디칼을 의미한다. 헤테로알킬렌기의 경우, 동일하거나 상이한 헤테로원자가 사슬 말단 중 어느 한쪽 또는 양쪽에 존재할 수도 있다(알킬렌옥시, 알킬렌디옥시, 알킬렌아미노, 알킬렌디아미노, 아미노옥시알킬렌 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않음). 또한, 알킬렌 및 헤테로알킬렌 연결기의 경우, 연결기의 배향은 연결기의 화학식이 기재된 방향에 내포되어 있지 않다. 예를 들어, 화학식 $-C(O)_2R'-$ 은 $-C(O)_2R'-$ 및 $-R'C(O)_2-$ 둘 모두를 나타낸다.

[0128] 그 자체로서 또는 또 다른 용어와 함께 사용되는 "사이클로알킬" 및 "헤테로사이클로알킬"이란 용어는, 달리 명시하지 않는다면, 각각 "알킬" 및 "헤테로알킬"의 사이클릭 버전을 나타낸다. 따라서, 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬은 포화, 부분 불포화 및 완전 불포화 고리 연결을 포함한다. 추가로, 헤테로사이클로알킬의 경우, 헤테로원자가, 헤테로사이클이 분자의 나머지 부분에 부착되는 위치를 차지할 수 있다. 사이클로알킬의 예로는 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 1-사이클로헥세닐, 3-사이클로헥세닐, 사이클로헵틸 등을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 헤테로사이클로알킬의 예로는 1-(1,2,5,6-테트라하이드로피리디닐), 1-피페리디닐, 2-피페리디닐, 3-피페리디닐, 4-모르폴리닐, 3-모르폴리닐, 테트라하이드로푸란-2-일, 테트라하이드로푸란-3-일, 테트라하이드로티엔-2-일, 테트라하이드로티엔-3-일, 1-피페라지닐, 2-피페라지닐 등을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 추가로, 상기 용어는 비사이클릭 및 트리사이클릭 고리 구조를 포함한다. 이와 유사하게, 그 자체로서 또는 또 다른 치환체의 일부로서 사용되는 "헤테로사이클로알킬렌"이란 용어는 헤테로사이클로알킬로부터 유래된 2가 라디칼을 의미하고, 그 자체로서 또는 또 다른 치환체의 일부로서 사용되는 "사이클로알킬렌"이란 용어는 사이클로알킬로부터 유래된 2가 라디칼을 의미한다.

[0129] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "수용성 중합체"란 용어는 수성 용매 중에서 용해될 수 있는 임의의 중합체를 말한다. IL-2에 대한 수용성 중합체의 연결은 비변형 형태에 비해 증가 또는 조절된 혈청 반감기, 또는 증가 또는 조절된 치료 반감기, 조절된 면역원성, 응집 및 다량체 형성과 같이 조절된 물리적 회합 특성, 변경된 수용체 결합, 하나 이상의 결합 파트너에 대한 변경된 결합 및 변경된 수용체 이량체화 또는 다량체화를 포함하지만 이로 제한되지 않는 변화를 유발할 수 있다. 수용성 중합체는 그 자신의 생물학적 활성을 보유할 수도 있고 보유하지 않을 수도 있으며, IL-2을, 하나 이상의 IL-2 또는 하나 이상의 생물학적 활성 분자를 포함하지만 이로 제한되지 않는 다른 물질에 부착시키기 위한 링커로서 이용될 수 있다. 적절한 중합체로는 폴리에틸렌 글리

콜, 폴리에틸렌 글리콜 프로피온알데하이드, 모노 C1-C10 알콕시 또는 이의 아릴옥시 유도체(본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제5,252,714호에 기재되어 있음), 모노메톡시-폴리에틸렌 글리콜, 폴리비닐 피롤리돈, 폴리비닐 알코올, 폴리아미노산, 디비닐에테르 말레산 무수물, N-(2-하이드록시프로필)-메타크릴아마이드, 텍스트란, 텍스트란 유도체(텍스트란 설페이트를 포함함), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리프로필렌 옥사이드/에틸렌 옥사이드 공중합체, 폴리옥시에틸화 폴리올, 헤파린, 헤파린 단편, 폴리사카라이드, 올리고사카라이드, 글리칸, 셀룰로스 및 셀룰로스 유도체(메틸셀룰로스 및 카르복시메틸 셀룰로스를 포함하지만, 이들로 제한되지 않음), 전분 및 전분 유도체, 폴리펩타이드, 폴리알킬렌 글리콜 및 그의 유도체, 폴리알킬렌 글리콜의 공중합체 및 그의 유도체, 폴리비닐 에틸 에테르, 및 알파-베타-폴리[(2-하이드록시에틸)-DL-아스파르트아마이드 등, 또는 이들의 혼합물을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 이러한 수용성 중합체의 예로는 폴리에틸렌 글리콜 및 혈청 알부민을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다.

[0130] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "폴리알킬렌 글리콜" 또는 "폴리(알켄 글리콜)"이란 용어는 폴리에틸렌 글리콜(폴리(에틸렌 글리콜)), 폴리프로필렌 글리콜, 폴리부틸렌 글리콜 및 이들의 유도체를 지칭한다. "폴리알킬렌 글리콜"이란 용어는 평균 분자량이 0.1 kDa 내지 100 kDa인 선형 및 분지형 중합체 둘 모두를 포함한다. 다른 예시적 실시양태는 예를 들어 쉬어워터 코퍼레이션(Shearwater Corporation)의 카탈로그 ["Polyethylene Glycol and Derivatives for Biomedical Applications" (2001)]와 같은 상업적 공급업체의 카탈로그에 기재되어 있다.

[0131] 달리 명시하지 않으면, "아릴"이란 용어는 서로 융합되거나 공유 연결되는 단일 고리 또는 다중 고리(1 내지 3개의 고리를 포함하지만 이로 제한되지 않음)일 수 있는 다불포화, 방향족, 탄화수소 치환체를 의미한다. "헤테로아릴"이란 용어는 N, O 및 S로부터 선택되는 1 내지 4개의 헤테로원자를 함유하는 아릴기(또는 고리)를 지칭하며, 여기서 상기 질소 및 황 원자는 선택적으로 산화되고, 상기 질소 원자(들)는 선택적으로 4차화된다. 헤테로아릴기는 헤테로원자를 통해 분자의 나머지 부분에 부착될 수 있다. 아릴기 및 헤테로아릴기의 비제한적인 예로는 페닐, 1-나프틸, 2-나프틸, 4-비페닐, 1-피롤릴, 2-피롤릴, 3-피롤릴, 3-피라졸릴, 2-이미다졸릴, 4-이미다졸릴, 피라지닐, 2-옥사졸릴, 4-옥사졸릴, 2-페닐-4-옥사졸릴, 5-옥사졸릴, 3-이속사졸릴, 4-이속사졸릴, 5-이속사졸릴, 2-티아졸릴, 4-티아졸릴, 5-티아졸릴, 2-푸릴, 3-푸릴, 2-티에닐, 3-티에닐, 2-피리딜, 3-피리딜, 4-피리딜, 2-피리미딜, 4-피리미딜, 5-벤조티아졸릴, 퓨리닐, 2-벤조이미다졸릴, 5-인돌릴, 1-이소퀴놀릴, 5-이소퀴놀릴, 2-퀴녹살리닐, 5-퀴녹살리닐, 3-퀴놀릴 및 6-퀴놀릴을 들 수 있다. 상기 아릴 및 헤테로아릴 고리 시스템 각각에 대한 치환체는 아래에서 설명되는 허용 가능한 치환체의 군으로부터 선택된다.

[0132] 간결함을 위해, 다른 용어들(아릴옥시, 아릴티옥시, 아릴알킬을 포함하지만 이로 제한되지 않는)과 함께 사용될 때, "아릴"이란 용어는 상기에 정의한 바와 같은 아릴 고리 및 헤테로아릴 고리를 둘 다 포함한다. 따라서, "아릴알킬"이란 용어는, 탄소 원자(메틸렌기를 포함하지만 이로 제한되지 않음)가 예를 들어 산소 원자로 치환된 알킬기(페녹시메틸, 2-피리딜옥시메틸, 3-(1-나프틸옥시)프로필 등을 포함하지만 이로 제한되지 않음)를 포함하는 알킬기에 아릴기가 부착된 라디칼(벤질, 펜에틸, 피리딜메틸 등을 포함하지만 이로 제한되지 않음)을 포함하는 의미이다.

[0133] 상기 용어("알킬", "헤테로알킬", "아릴" 및 "헤테로아릴"을 포함하지만 이로 제한되지 않음)는 각각 표시된 라디칼의 치환 형태와 비치환 형태 둘 모두를 포함한다. 각각의 유형의 라디칼에 대한 예시적인 치환체가 아래에 제시된다.

[0134] 알킬 및 헤테로알킬 라디칼(종종 알킬렌, 알케닐, 헤테로알킬렌, 헤테로알케닐, 알키닐, 사이클로알킬, 헤테로사이클로알킬, 사이클로알케닐 및 헤테로사이클로알케닐로 칭해지는 기를 포함함)에 대한 치환체는 -OR', =O, =NR', =N-OR', -NR'R'', -SR', -할로젠, -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR'R'', -NR'C(O)₂R', -NR-C(NR'R'R'')=NR'', -NR-C(NR'R'R'')=NR'', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NRSO₂R', -CN 및 -NO₂[수의 범위는 0 내지 (2m'+1)이고, 여기서 m'은 이러한 라디칼 내의 총 탄소 원자수임]로부터 선택되는 다양한 기 중 하나 이상일 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. R', R'', R''' 및 R''''는 각각 독립적으로 수소, 치환된 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환된 또는 비치환된 아릴(1-3개의 할로겐으로 치환된 아릴을 포함하지만 이로 제한되지 않음), 치환된 또는 비치환된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시기, 또는 아릴알킬기를 지칭한다. 예를 들어, 본 발명의 화합물이 하나 초과 R 기를 포함할 경우, 각각의 R 기는 R', R'', R''' 및 R'''' 기가 하나 초과로 존재할 때 이들 각각의 기와 마찬가지로 독립적으로 선택된다. R' 및 R''가 동일한 질소 원자에 부착될 경우, 이들은 질소 원자와 함께 조합되어 5원, 6원 또는 7원 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어, -NR'R''은 1-피롤리디닐 및 4-모르폴리닐을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 상기 치환체

설명으로부터, 관련 기술 분야의 통상의 기술자라면 "알킬"이란 용어가 수소기가 아닌 다른 기에 결합된 탄소 원자를 포함하는 기, 예를 들어 할로알킬($-\text{CF}_3$ 및 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 를 포함하지만 이로 제한되지 않음) 및 아실($-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 등을 포함하지만 이로 제한되지 않음)를 포함하는 것임을 이해할 것이다.

[0135] 상기 알킬 라디칼에 대해 기재된 치환체와 유사하게, 아릴 및 헤테로아릴기에 대한 치환체는 달라지며, 할로젠, $-\text{OR}'$, $=\text{O}$, $=\text{NR}'$, $=\text{N}-\text{OR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{SR}'$, $-\text{할로젠}$, $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$, $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{CO}_2\text{R}'$, $-\text{CONR}'\text{R}''$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{NR}'-\text{C}(\text{O})\text{NR}''\text{R}'''$, $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')=\text{NR}''''$, $-\text{NR}-\text{C}(\text{NR}'\text{R}''')=\text{NR}''''$, $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{NRSO}_2\text{R}'$, $-\text{CN}$ 및 $-\text{NO}_2$, $-\text{R}'$, $-\text{N}_3$, $-\text{CH}(\text{Ph})_2$, 플루오로(C_1-C_4)알콕시, 및 플루오로(C_1-C_4)알킬[수의 범위는 0 내지 방향족 고리 시스템 상의 열린 원자가(open valence)의 총수이고, 여기서 R' , R'' , R''' 및 R'''' 은 독립적으로 수소, 알킬, 헤테로알킬, 아릴 및 헤테로아릴로부터 선택되]로부터 선택되지만, 이들로 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 발명의 화합물이 하나 초과 R 기를 포함할 경우, 각각의 R 기는 R' , R'' , R''' 및 R'''' 기가 하나 초과로 존재할 때 이들 각각의 기와 마찬가지로 독립적으로 선택된다.

[0136] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "조절된 혈청 반감기"란 표현은 비변형 형태와 비교할 때 변형된 IL-2의 순환 반감기에 양의 또는 음의 변화가 있음을 의미한다. 혈청 반감기는 IL-2를 투여한 후 다양한 시점에서 혈액 샘플을 채취하여 각각의 샘플 중의 해당 분자의 농도를 결정함으로써 측정한다. 혈청 농도와 시간의 상관관계를 통해 혈청 반감기를 계산할 수 있다. 증가된 혈청 반감기는 적어도 약 2배인 것이 바람직하지만, 예를 들어, 만족스러운 투여 계획이 가능하거나 독성 효과를 피할 수 있는 경우라면 더 작은 증가도 유용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 증가는 적어도 약 3배, 적어도 약 5배, 또는 적어도 약 10배이다.

[0137] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "조절된 치료 반감기"란 표현은 비변형 형태와 비교할 때 치료 유효량의 IL-2의 반감기에 양의 또는 음의 변화가 있음을 의미한다. 치료 반감기는 투여 후 다양한 시점에 분자의 약동학적 및/또는 약력학적 특성을 결정함으로써 측정한다. 증가된 치료 반감기는 바람직하게는 유리한 특정 투여 계획 또는 유리한 특정 총 투여량을 이용할 수 있게 하거나, 원치 않는 효과를 피할 수 있게 한다. 일부 실시양태에서, 증가된 치료 반감기는 증가된 효능, 변형된 분자의 그 표적에 대한 증가 또는 감소된 결합, 프로테아제와 같은 효소에 의한 분자의 증가된 또는 감소된 분해, 또는 비변형 분자의 또 다른 파라미터 또는 작용 메커니즘의 증가 또는 감소, 또는 수용체 매개 분자 제거의 증가 또는 감소로부터 비롯된다.

[0138] 핵산 또는 단백질에 적용될 때의 "단리된"이란 용어는 핵산 또는 단백질이 자연 상태에서 서로 회합되어 있는 세포내 성분들 중 적어도 일부를 포함하고 있지 않는 것, 또는 핵산 또는 단백질이 그 생체내 또는 시험관내 생산 농도보다 높은 수준으로 농축되었음을 의미한다. 이것은 균질한 상태일 수 있다. 단리된 물질은 건조 또는 반건조 상태이거나, 또는 수용액을 포함하지만 이로 제한되지 않는 용액 중에 존재할 수 있다. 단리된 성분은 추가의 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 포함하는 약학적 조성물의 성분일 수 있다. 순도 및 균질도는 일반적으로 폴리아크릴아마이드 겔 전기영동 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 포함하지만 이로 제한되지 않는 분석 화학 기술을 이용하여 측정한다. 제제 중에 존재하는 주된 성분이 단백질인 경우, 그 단백질은 실질적으로 정제된 것이다. 특히, 단리된 유전자는 이 유전자의 측면에 위치하고 관심 유전자가 아닌 다른 단백질을 코딩하는 개방 해독 프레임(open reading frame)으로부터 분리되어 있다. "정제된"이란 표현은 핵산 또는 단백질이 전기영동 겔에서 실질적으로 하나의 밴드를 형성하는 것을 의미한다. 특히, 이것은 핵산 또는 단백질의 순도가 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 그 초과인 것을 의미할 수 있다.

[0139] "핵산"이란 용어는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드, 데옥시리보뉴클레오사이드, 리보뉴클레오사이드, 또는 리보뉴클레오타이드 및 이들의 중합체를 말한다. 특별히 제한되지 않는다면, 이 용어는 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 가지며 천연 발생 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 포함하는 핵산을 포함한다. 특별히 달리 제한되지 않는다면, 이 용어는 또한 PNA(펩티도핵산), 안티센스 기술에 사용되는 DNA의 유사체(포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트 등)를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 유사체를 지칭한다. 달리 명시하지 않는다면, 특정 핵산 서열은 또한 이들의 보존적으로 변형된 변이체(축퇴성 코돈 치환을 포함하지만 이로 제한되지 않음) 및 상보적 서열뿐만 아니라, 명시적으로 표시된 서열을 내포하고 있다. 특히, 축퇴성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3의 위치가 혼합 염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 이루어질 수 있다([Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991)]; [Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985)]; [Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)]).

[0140] "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"이란 용어는 아미노산 잔기들로 이루어진 중합체를 지칭하기 위해 본원

에서 상호 가능하게 사용된다. 즉, 폴리펩타이드에 대한 설명은 펩타이드의 설명 및 단백질의 설명에 동일하게 적용되고, 그 반대도 마찬가지이다. 상기 용어들은 천연 발생 아미노산 중합체뿐만 아니라, 하나 이상의 아미노산 잔기가 비천연적으로 코딩된 아미노산인 아미노산 중합체에도 적용된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 이 용어들은 전장 단백질을 비롯한 임의의 길이의 아미노산 사슬을 포함하며, 여기서 아미노산 잔기들은 공유 펩타이드 결합에 의해 연결되어 있다.

[0141] "아미노산"이란 용어는 천연 발생 및 비천연 발생 아미노산뿐만 아니라, 천연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 지칭한다. 천연적으로 코딩된 아미노산은 20개의 일반적인 아미노산(알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 타이로신 및 발린), 파이로라이신 및 셀레노시스테인이다. 아미노산 유사체는 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조, 예를 들어, 수소에 결합된 α -탄소, 카르복실기, 아미노기 및 R 기를 갖는 화합물, 예를 들어 호모세린, 노르류신, 메티오닌 설폭사이드, 메티오닌 메틸 설포늄을 지칭한다. 그러한 유사체는 변형된 R 기(예를 들어, 노르류신) 또는 변형된 펩타이드 골격을 갖지만, 천연 발생 아미노산과 동일한 기본 화학 구조를 유지한다. 아미노산으로 언급되는 것은 예를 들어 천연 발생 단백질 형성 L-아미노산; D-아미노산, 화학적 변형 아미노산, 예를 들어 아미노산 변이체 및 유도체; 천연 발생 비단백질 형성 아미노산, 예를 들어 β -알라닌, 오르니틴 등; 및 아미노산의 특징인 것으로 관련 기술 분야에 알려져 있는 특성을 갖는 화학적 합성 화합물을 포함한다. 비천연 발생 아미노산의 예로는 α -메틸 아미노산(예를 들어, α -메틸 알라닌), D-아미노산, 히스티딘 유사 아미노산(예를 들어, 2-아미노-히스티딘, β -하이드록시-히스티딘, 호모히스티딘, α -플루오로메틸-히스티딘 및 α -메틸-히스티딘), 측쇄에 추가적인 메틸렌을 갖는 아미노산("호모" 아미노산), 및 측쇄의 카르복실산 작용기가 설포나기로 치환된 아미노산(예를 들어, 시스테인산)을 들 수 있으나, 이들에 제한되지 않는다. 합성 비천연 아미노산, 치환된 아미노산, 또는 하나 이상의 D-아미노산을 포함하는 비천연 아미노산을 본 발명의 단백질에 도입하는 것은 많은 상이한 방식에서 유리할 수 있다. D-아미노산 함유 펩타이드 등은 L-아미노산 함유 대응물에 비해 시험관 내에서 또는 생체 내에서 증가된 안정성을 나타낸다. 따라서, D-아미노산을 포함하는 펩타이드 등의 구축은 더 큰 세포내 안정성이 요구되거나 요구될 때 특히 유용할 수 있다. 보다 구체적으로, D-펩타이드 등은 내인성 펩티다제 및 프로테아제에 내성이 있고, 따라서 분자의 생체 이용률을 개선하고 그러한 특성이 바람직할 때 생체 내에서 수명을 연장시킨다. 추가로, D-펩타이드 등은 T 헬퍼 세포에 대한 주요 조직 적합성 복합체 클래스 II 제한 체시를 위해 효율적으로 프로세싱될 수 없고, 따라서 전체 유기체에서 체액성 면역 반응을 유도할 가능성이 낮다.

[0142] 본 명세서에서 아미노산은 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회(Biochemical Nomenclature Commission)에서 권장하는 널리 알려진 3 문자 기호 또는 1 문자 기호로 지칭될 수 있다. 뉴클레오타이드 역시 통상적으로 인정되는 1 문자 코드로 지칭될 수 있다.

[0143] "보존적으로 변형된 변이체"는 아미노산 서열과 핵산 서열 둘 모두에 적용된다. 특정한 핵산 서열에 있어서, "보존적으로 변형된 변이체"란 동일하거나 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 핵산을 지칭하거나, 핵산이 아미노산 서열을 코딩하지 않는 경우 실질적으로 동일한 서열을 지칭한다. 예를 들어, 유전자 코드의 축퇴성으로 인하여, 기능상 동일한 매우 많은 핵산이 임의의 제시된 단백질을 코딩한다. 예를 들어, 코돈 GCA, GCC, GCG 및 GCU는 모두 아미노산 알라닌을 코딩한다. 따라서, 알라닌이 코돈에 의해 특정되는 모든 위치에서, 그 코돈은 코딩되는 폴리펩타이드를 변경하지 않으면서 상기 설명한 임의의 상응하는 코돈으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이가 보존적으로 변형된 변이의 한 종류인 "침묵 변이"이다. 본 명세서에서 폴리펩타이드를 코딩하는 모든 핵산 서열은 또한 핵산의 가능한 모든 침묵 변이를 포함한다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자라면, 핵산 내의 각각의 코돈(통상적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 AUG와, 통상적으로 트립토판에 대한 유일한 코돈인 TGG는 제외)은 변형되어 기능상 동일한 분자를 생성할 수 있다. 따라서, 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산의 각각의 침묵 변이는 기재된 각각의 서열에 내포되어 있다.

[0144] 아미노산 서열의 경우, 관련 기술 분야의 통상의 기술자라면, 코딩되는 서열에 대해 단일 아미노산 또는 작은 백분율의 아미노산을 변경, 부가 또는 결실시키는 핵산, 펩타이드, 폴리펩타이드 또는 단백질 서열에 대한 개개의 치환, 결실 또는 부가가, 그 변경이 아미노산의 결실, 아미노산의 부가 또는 화학적으로 유사한 아미노산으로의 아미노산의 치환으로 귀결될 경우, "보존적으로 변형된 변이체"라는 것을 이해할 것이다. 기능상 유사한 아미노산을 제시한 보존적 치환 표가 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 알려져 있다. 이와 같은 보존적으로 변형된 변이체는 본 발명의 다형성 변이체, 중간 상동체 및 대립유전자에 추가적인 것으로서, 이들을 배제하지 않는다.

[0145] 기능상 유사한 아미노산을 제시한 보존적 치환 표는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 알려져 있다. 하기 8

개의 군은 각각 서로에 대해 보존적 치환인 아미노산들을 포함한다: 1) 알라닌(A), 글리신(G); 2) 아스파르트산(D), 글루탐산(E); 3) 아스파라긴(N), 글루타민(Q); 4) 아르기닌(R), 라이신(K); 5) 이소류신(I), 류신(L), 메티오닌(M), 발린(V); 6) 페닐알라닌(F), 타이로신(Y), 트립토판(W); 7) 세린(S), 트레오닌(T); 및 8) 시스테인(C), 메티오닌(M)(예를 들어, 문헌[Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W H Freeman & Co.; 2nd edition (December 1993)) 참조].

[0146] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩타이드 서열과 관련하여 "동일한" 또는 "동일성" (%)이란 용어는 동일한 2개 이상의 서열 또는 부분 서열을 지칭한다. "실질적으로 동일한" 서열이란, 서열이, 하기 서열 비교 알고리즘(또는 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 입수 가능한 다른 알고리즘) 중 하나를 이용하거나 수동 정렬 및 시각적 조사에 의해 측정할 경우, 비교 윈도우 또는 지정된 영역에 대하여 최대 상응도로 비교 및 정렬할 때 일정 백분율의 동일한(즉, 특정 영역에 대하여 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90% 또는 약 95%의 동일성) 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드를 가질 경우를 지칭한다. 또한, 상기 정의는 시험 서열의 상보체를 지칭하기도 한다. 동일성은 적어도 약 50개의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 길이에 해당하는 영역, 또는 75-100개의 아미노산 또는 뉴클레오타이드 길이에 해당하는 영역, 또는 특정되지 않은 경우, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 전체 서열에 걸쳐 나타날 수 있다. 인간 이외의 다른 종 유래의 상동체를 비롯하여 본 발명의 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 엄격한 혼성화 조건 하에 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 그의 단편을 갖는 표지된 프로브를 사용하여 라이브러리를 스크리닝하는 단계 및 상기 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 전장 cDNA 및 게놈 클론을 단리하는 단계를 포함하는 방법에 의해 얻을 수 있다. 이러한 혼성화 기술은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 잘 알려져 있다.

[0147] "~에 선택적으로(또는 특이적으로) 혼성화하는"이란 어구는 특정 뉴클레오타이드 서열이 복합 혼합물(전체 세포 또는 라이브러리 DNA 또는 RNA를 포함하지만 이로 제한되지 않음) 중에 존재할 경우, 엄격한 혼성화 조건 하에 분자가 상기 특정 서열에만 결합하거나 이중체를 형성하거나 혼성화하는 것을 말한다.

[0148] "엄격한 혼성화 조건"이란 어구는 관련 기술 분야에 공지되어 있는 바와 같이 저이온 강도 및 고온의 조건 하에 서의 DNA, RNA, PNA 서열, 또는 다른 핵산 모방체, 또는 이들의 조합물의 혼성화를 지칭한다. 일반적으로, 엄격한 조건 하에서는, 프로브가 복합 핵산 혼합물(전체 세포 또는 라이브러리 DNA 또는 RNA를 포함하지만 이로 제한되지 않음) 중의 표적 서열에 혼성화하지만, 복합 혼합물 중의 다른 서열에는 혼성화하지 않는다. 엄격한 조건은 서열 의존적이며, 상이한 환경하에서는 상이할 것이다. 더 긴 서열일수록 더 높은 온도에서 특이적으로 혼성화한다.

[0149] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "진핵생물"이란 용어는 동물(포유동물, 곤충, 파충류, 조류 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않음), 섬모충, 식물(외떡잎 식물, 쌍떡잎 식물 및 조류(藻類) 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않음), 진균류, 효모, 편모충, 미포자충 및 원생생물 등을 비롯한 계통발생적 진핵생물(Eucarya) 영역에 속하는 유기체를 지칭한다.

[0150] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "비진핵생물"이란 용어는 비진핵생물 유기체를 지칭한다. 예를 들어, 비진핵생물 유기체는 진정세균(Eubacteria)[에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*), 썬머스 썬모필러스(*Thermus thermophilus*), 또는 바실러스 스테아로썬모필러스(*Bacillus stearothermophilus*), 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*) 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않음] 계통발생적 영역, 또는 고세균(Archaea)[메타노코커스 잔나스키이(*Methanococcus jannaschii*), 메타노박테리움 썬모오토트로피쿰(*Methanobacterium thermoautotrophicum*), 할로박테리움(*Halobacterium*), 예를 들어 할로페락스 볼카니이(*Haloferax volcanii*) 및 할로박테리움 종 NRC-1, 아카에오글로버스 풀기더스(*Archaeoglobus fulgidus*), 파이로코커스 푸리오서스(*Pyrococcus furiosus*), 파이로코커스 호리코쉬이(*Pyrococcus horikoshii*), 아에우로피룸 페르닉스(*Aeuropyrum pernix*) 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않음] 계통발생적 영역에 속할 수 있다.

[0151] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "대상체"란 용어는, 일부 실시양태에서 처치, 관찰 또는 실험의 대상이 되는 포유동물, 다른 실시양태에서는 인간을 지칭한다. 동물은 반려 동물(예를 들어, 개, 고양이 등), 농장 동물(예를 들어, 소, 양, 돼지, 말 등) 또는 실험 동물(예를 들어, 래트, 마우스, 기니 피그 등)일 수 있다.

[0152] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "유효량"이란 용어는, 치료되는 질환, 병태 또는 장애의 증상 중 하나 이상을 어느 정도까지 경감시키는, 변형된 비천연 아미노산 폴리펩타이드의 투여량을 지칭한다. 본 명세서에서 설명되는 변형된 비천연 아미노산 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 예방, 증진 및/또는 치료적 처치를 위해 투여될 수 있다.

- [0153] "증진시키다" 또는 "증진시키는"이란 표현은 원하는 효과를 효능 또는 지속 기간의 측면에서 증가시키거나 연장시키는 것을 의미한다. 따라서, 치료제의 효과를 "증진시키는" 것에 있어서 "증진시키는"이란 표현은 특정 시스템에 대한 다른 치료제의 효과를 효능 또는 지속 기간의 측면에서 증가시키거나 연장시키는 능력을 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "증진시키는 유효량"이란 요구되는 시스템에 있어서 또 다른 치료제의 효과를 증진시키기에 적당한 양을 지칭한다. 환자에게 사용될 경우, 이러한 용도에 효과적인 양은 질환, 장애 또는 병태의 중증도 및 경과, 선행 요법, 환자의 건강 상태 및 약물에 대한 반응, 및 치료 의사의 판단에 따라 달라진다.
- [0154] 본 명세서에서 사용되는 "변형된"이란 표현은 제시된 폴리펩타이드에 가해진 임의의 변화, 예를 들어 폴리펩타이드의 길이, 폴리펩타이드의 아미노산 서열, 화학적 구조, 번역과 동시에 일어나는 변형 또는 번역 후 변형에 가해진 변경을 의미한다. "(변형된)"의 형태로 제시된 용어는 논의된 폴리펩타이드가 선택적으로 변형될 수 있음을 의미하고, 즉, 논의되고 있는 폴리펩타이드가 변형될 수도 있고 변형되지 않을 수도 있음을 의미한다.
- [0155] "번역 후 변형"이란 용어는 천연 또는 비천연 아미노산이 폴리펩타이드 사슬에 도입된 후 그러한 아미노산에 대해 일어나는 천연 또는 비천연 아미노산의 임의의 변형을 지칭한다. 이 용어는 예를 들어 생체 내에서 번역과 동시에 일어나는 변형, 시험관 내에서 번역과 동시에 일어나는 변형(예를 들어, 무세포 번역 시스템 내에서의 변형), 생체 내에서의 번역 후 변형 및 시험관 내에서의 번역 후 변형을 포함한다.
- [0156] 예방 용도에 있어서, IL-2를 함유하는 조성물은 특정 질환, 장애 또는 병태에 감수성이 있거나 달리 위험이 있는 환자에게 투여된다. 이러한 양은 "예방 유효량"으로서 정의된다. 이를 사용할 때, 정확한 양은 역시 환자의 건강 상태, 체중 등에 따라 달라진다. 관련 기술 분야에서는 통상적인 실험(예를 들어, 용량 증가 임상 시험)을 통해 이같은 예방 유효량을 결정할 수 있는 것으로 널리 인정되고 있다.
- [0157] 치료 용도에 있어서, 변형된 비천연 아미노산 폴리펩타이드를 함유하는 조성물은 질환, 병태 또는 장애를 이미 앓고 있는 환자에게, 상기 질환, 장애 또는 병태의 증상을 치유하거나 적어도 부분적으로 저지하기에 충분한 양으로 투여된다. 이러한 양은 "치료 유효량"으로 정의되며, 질환, 장애 또는 병태의 중증도 및 경과, 선행 요법, 환자의 건강 상태 및 약물에 대한 반응, 및 치료 의사의 판단에 따라 달라질 것이다. 관련 기술 분야에서는 통상적인 실험(예를 들어, 용량 증가 임상 시험)을 통해 이같은 치료 유효량을 결정할 수 있는 것으로 널리 인정되고 있다.
- [0158] "치료하는"이란 용어는 예방적 및/또는 치료적 처치를 지칭하는 것으로 사용된다.
- [0159] 본 명세서에 제시된 비천연적으로 코딩된 아미노산 폴리펩타이드는 하나 이상의 원자가 자연 상태에서 통상적으로 발견되는 원자량 또는 질량수와는 상이한 원자량 또는 질량수를 갖는 원자로 치환된 동위원소 표지 화합물을 포함할 수 있다. 본 발명의 화합물 내로 도입될 수 있는 동위원소의 예는 각각 ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl 과 같은 수소, 탄소, 질소, 산소, 불소 및 염소의 동위원소를 포함한다. 본 명세서에서 설명되는 특정 동위원소 표지 화합물, 예를 들어, ^3H 및 ^{14}C 와 같은 방사성 동위원소가 도입된 화합물은 약물 및/또는 기질 조직 분포 분석에 유용할 수 있다. 또한, 중수소, 즉 ^2H 와 같은 동위원소에 의한 치환은 보다 큰 대사 안정성, 예를 들어 생체내 반감기 증가 또는 투여량 요구 감소에 따른 치료상 이점을 제공할 수 있다.
- [0160] 부분입체 이성질체, 거울상 이성질체 및 이들의 혼합물을 포함하지만 이로 제한되지 않는 모든 이성질체는 본 명세서에서 설명되는 조성물의 일부로서 간주된다. 또 다른 또는 추가적인 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산 폴리펩타이드는 이를 필요로 하는 유기체에게 투여시에 대사되어 대사물질을 생성하고, 이 대사물질은 원하는 치료 효과를 비롯한 원하는 효과를 생성하기 위해 사용된다. 추가적인 또는 또 다른 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산 폴리펩타이드의 활성 대사물질이 제공된다.
- [0161] 일부 경우에, 비천연적으로 코딩된 아미노산 폴리펩타이드는 호변 이성질체로서 존재할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 설명되는 비천연적으로 코딩된 아미노산 폴리펩타이드는 비용매화된 형태로 존재할 수 있고, 물, 에탄올 등과 같은 약학적으로 허용되는 용매에 의해 용매화된 형태로 존재할 수도 있다. 상기 용매화된 형태 역시 본 명세서에서 개시된 것으로 간주된다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자라면, 본 명세서에서 개시되는 화합물 중 일부가 몇 종의 호변 이성질체 형태로 존재할 수 있다는 것을 알 것이다. 이같은 모든 호변 이성질체는 본 명세서에서 개시되는 조성물의 일부로서 간주된다.
- [0162] 달리 명시하지 않는다면, 관련 기술 분야의 기술 범위에 있는 질량 분광분석법, NMR, HPLC, 단백질 화학법, 생

화학법, 제조합 DNA 기술 및 약리학적 기술과 같은 통상적인 방법이 사용된다.

[0163] 상세한 설명

[0164] I. 도입

[0165] 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함하는 IL-2 분자가 본 발명에서 제공된다. 본 발명의 특정 실시양태에서, 적어도 하나의 비천연 아미노산을 갖는 IL-2는 적어도 하나의 번역 후 변형을 포함한다. 한 실시양태에서, 상기 적어도 하나의 번역 후 변형은 특정 반응성 기에 적합한 것으로 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 알려진 화학적 방법을 이용하여 제1 반응성 기를 포함하는 적어도 하나의 비천연 아미노산에, 제2 반응성 기를 포함하는, 표지, 염료, 중합체, 수용성 중합체, 폴리에틸렌 글리콜의 유도체, 광가교결합체, 방사성핵종, 세포 독성 화합물, 약물, 친화도 표지, 광친화도 표지, 반응성 화합물, 수지, 제2 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 유사체, 항체 또는 항체 단편, 금속 킬레이팅제, 보조 인자, 지방산, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, DNA, RNA, 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 사카라이드, 수용성 텐드리머, 사이클로덱스트린, 억제성 리보핵산, 생물학적 물질, 나노입자, 스핀 표지, 형광단, 금속 함유 모이어티, 방사성 모이어티, 신규 작용기, 다른 분자와 공유 또는 비공유적으로 상호작용하는 기, 광케이지된(photocaged) 모이어티, 화학선에 의해 여기 가능한 모이어티, 광이성질체화 가능 모이어티, 바이오틴, 바이오틴 유사체, 무거운 원자를 포함하는 모이어티, 화학적으로 절단 가능한 기, 광절단 가능한 기, 연장된 측쇄, 탄소 결합된 당, 산화환원 활성 물질, 아미노 티오산, 독성 모이어티, 동위원소 표지 모이어티, 생물물리적 프로브, 인광성 기, 화학발광성 기, 전자 밀집 기, 자성 기, 인터칼레이팅(intercalating) 기, 발색단, 에너지 전달제, 생물학적 활성 물질, 검출 가능한 표지, 소분자, 양자점, 나노트랜스미터(nanotransmitter), 방사성 뉴클레오타이드, 라디오투랜스미터(radiotransmitter), 중성자 포획제, 또는 상기 화합물 또는 물질 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질의 임의의 조합물을 포함하지만 이들 에 제한되지 않는 분자를 부착시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 상기 제1 반응성 기는 알킬닐 모이어티(비천연 아미노산 p-프로파길옥시페닐알라닌(여기서, 프로파길기는 또한 때때로 아세틸렌 모이어티로도 칭해짐)을 포함 하지만 이로 제한되지 않음)이고, 상기 제2 반응성 기는 아지도 모이어티이며, [3+2] 고리 부가 화학 방법이 이용된다. 또 다른 예로서, 상기 제1 반응성 기는 아지도 모이어티(비천연 아미노산 p-아지도-L-페닐알라닌(pAZ)를 포함하지만 이로 제한되지 않음)이고, 상기 제2 반응성 기는 알킬닐 모이어티이다. 본 발명의 변형된 IL-2의 특정 실시양태에서, 사카라이드 모이어티를 포함하는 적어도 하나의 번역 후 변형을 포함하는 적어도 하나의 비천연 아미노산(케토 작용기를 포함하는 비천연 아미노산을 포함하지만 이로 제한되지 않음)이 사용된다. 특정 실시양태에서, 상기 번역 후 변형은 진핵 세포 또는 비진핵 세포에서 생체 내에서 이루어진다. 링커, 중합체, 수용성 중합체, 또는 다른 분자가 상기 분자를 폴리펩타이드에 부착시킬 수 있다. 추가의 실시양태에서, IL-2에 부착되는 링커는 이량체의 형성을 허용할 수 있을 정도로 충분히 길다. 또한, 상기 분자는 폴리펩타이드에 직접 연결될 수도 있다.

[0166] 특정 실시양태에서, IL-2 단백질은 한 숙주 세포에 의해 생체 내에서 이루어지는 적어도 하나의 번역 후 변형을 포함하는데, 여기서 상기 번역 후 변형은 또 다른 종류의 숙주 세포에 의해서는 정상적으로 만들어지지 않는다. 특정 실시양태에서, 상기 단백질은 진핵 세포에 의해 생체 내에서 이루어지는 적어도 하나의 번역 후 변형을 포함하는데, 여기서 상기 번역 후 변형은 비진핵 세포에 의해서는 정상적으로 이루어지지 않는다. 이러한 번역 후 변형의 예로는 글리코실화, 아세틸화, 아실화, 지질 변형, 팔미토일화, 팔미테이트 부가, 인산화, 당지질 연결 변형 등을 들 수 있으나, 이들에 제한되지 않는다.

[0167] 일부 실시양태에서, IL-2는 폴리펩타이드의 글리코실화, 아세틸화, 아실화, 지질 변형, 팔미토일화, 팔미테이트 부가, 인산화, 또는 당지질 연결 변형을 위한 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 폴리펩타이드의 글리코실화를 위한 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 폴리펩타이드의 글리코실화, 아세틸화, 아실화, 지질 변형, 팔미토일화, 팔미테이트 부가, 인산화 또는 당지질 연결 변형을 위한 하나 이상의 천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 폴리펩타이드의 글리코실화를 위한 하나 이상의 천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다.

[0168] 일부 실시양태에서, IL-2는 폴리펩타이드의 글리코실화를 향상시키는 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산 부가 및/또는 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 폴리펩타이드의 글리코실화를 향상시키는 하나 이상의 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 폴리펩타이드의 상이한 아미노산에서 글리코실화를 향상시키는 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산 부가 및/또는 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 폴리펩타이드의 상이한 아미노산에서 글리코실화를 향상시키는 하나 이상의 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 폴리펩타이드의 비천연적으로 코딩된 아미노산에서 글리코실화를 향상시키는 하나 이상의 비천연적으로

코딩된 아미노산 부가 및/또는 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 폴리펩타이드의 자연적으로 코딩된 아미노산에서 글리코실화를 향상시키는 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산 부가 및/또는 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 폴리펩타이드의 다른 아미노산에서 글리코실화를 향상시키는 하나 이상의 천연적으로 코딩된 아미노산 부가 및/또는 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 폴리펩타이드의 천연적으로 코딩된 아미노산에서 글리코실화를 향상시키는 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산 부가 및/또는 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 폴리펩타이드의 비천연적으로 코딩된 아미노산에서 글리코실화를 향상시키는 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산 부가 및/또는 치환을 포함한다.

[0169] 한 실시양태에서, 상기 번역 후 변형은 GlcNAc-아스파라긴 연결에 의해 올리고사카라이드를 아스파라긴에 부착시키는 것을 포함한다(올리고사카라이드가 (GlcNAc-Man)₂-Man-GlcNAc-GlcNAc 등을 포함하는 경우를 포함하지만 이로 제한되지 않음). 또 다른 실시양태에서, 상기 번역 후 변형은 GalNAc-세린, GalNAc-트레오닌, GlcNAc-세린, 또는 GlcNAc-트레오닌 연결에 의해 세린 또는 트레오닌에 올리고사카라이드(Gal-GalNAc, Gal-GlcNAc 등을 포함하지만 이로 제한되지 않음)를 부착시키는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 단백질 또는 폴리펩타이드는 분비 또는 위치 지정 서열, 에피토프 태그, FLAG 태그, 폴리히스티딘 태그, GST 융합 등을 포함할 수 있다. 분비 신호 서열의 예로는 원핵 분비 신호 서열, 진핵 분비 신호 서열, 박테리아 발현을 위해 5' 최적화된 진핵 분비 신호 서열, 새로운 분비 신호 서열, 펩타이드 리아제 분비 신호 서열, Omp A 분비 신호 서열, 및 파지 분비 신호 서열을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 분비 신호 서열의 예로는 STII (원핵), Fd GIII 및 M13(파지), Bgl2(효모), 및 트랜스포존으로부터 유래된 신호 서열 bla를 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 임의의 상기 서열은 원하는 결과를 폴리펩타이드에 제공하도록 변형될 수 있다(한 신호 서열을 상이한 신호 서열로 치환하는 것, 리더 서열을 상이한 리더 서열로 치환하는 것 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않음).

[0170] 관심 단백질 또는 폴리펩타이드는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 10개, 또는 그 초과 비천연 아미노산을 포함할 수 있다. 상기 비천연 아미노산은 동일하거나 상이할 수 있으며, 예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 초과 상이한 비천연 아미노산을 포함하는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 초과 상이한 부위가 단백질 내에 존재할 수 있다. 특정 실시양태에서, 천연 발생 형태의 단백질 내에 존재하는 적어도 1개(그러나 전부보다는 적은)의 특정 아미노산이 비천연 아미노산으로 치환된다.

[0171] 본 발명은 적어도 하나의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2에 기초한 방법 및 조성물을 제공한다. 적어도 하나의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 IL-2 내에 도입하는 것은 통상적으로 발생하는 20개의 아미노산과는 반응하지 않으면서 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산(이를 포함하지만 이로 제한되지 않음)과의 특정한 화학 반응을 포함하는 접합 화학의 적용을 가능하게 할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2는 수용성 중합체, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜(PEG)에 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄를 통해 연결된다. 본 발명은 케톤, 아지드 또는 아세틸렌 모이어티를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 20개의 천연적으로 도입되는 아미노산에 존재하지 않는 작용기 또는 치환체를 포함하는 아미노산을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 비유전적으로 코딩된 아미노산을 선택적 코돈에 반응하여 단백질로 선택적으로 도입하고, 그러한 아미노산을 적절한 반응성 PEG 유도체로 후속 변형하는 것을 수반하는, 단백질을 PEG 유도체로 선택적으로 변형하기 위한 매우 효율적인 방법을 제공한다. 일단 도입되면, 아미노산 측쇄는 비천연적으로 코딩된 아미노산에 존재하는 특정 작용기 또는 치환체에 적절한 것으로 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 알려진 화학 방법을 이용하여 변형시킬 수 있다. 매우 다양한 공지된 화학 방법이 수용성 중합체를 단백질 내로 도입하기 위해 본 발명에 사용하기 적합하다. 이러한 방법으로는 각각 아세틸렌 또는 아지드 유도체(이를 포함하지만 이로 제한되지 않음)와의 휘스젠 [3+2] 고리 부가 반응을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다(문헌 [Padwa, A. in Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, (1991) Ed. Trost, B. M., Pergamon, Oxford, p. 1069-1109]; 및 [Huisgen, R. in 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, (1984) Ed. Padwa, A., Wiley, New York, p. 1-176] 참조).

[0172] 휘스젠 [3+2] 고리 부가 방법은 친핵성 치환 반응이 아니라 고리 부가 반응을 수반하기 때문에, 단백질을 매우 높은 선택도로 변형시킬 수 있다. 이 반응은 반응 혼합물에 촉매량의 Cu(I) 염을 첨가하여 우수한 위치선택성 (1,4 > 1,5)으로 수성 조건 하에 실온에서 행해질 수 있다(문헌 [Tornøe, et al., (2002) J. Org. Chem. 67:3057-3064]; 및 [Rostovtsev, et al., (2002) Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599]; 및 WO 03/101972 참조). [3+2] 고리 부가 반응을 통해 본 발명의 단백질에 부가될 수 있는 분자로는 아지도 또는 아세틸렌 유도체를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 적절한 작용기 또는 치환체를 갖는 실질적으로 임의의 분자를 포함한다.

이러한 분자들은 각각 p-프로파르길옥시페닐알라닌을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 아세틸렌기, 또는 p-아지도-페닐알라닌을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 아지도기에 의해 비천연 아미노산에 부가될 수 있다.

[0173] 휘스겐 [3+2] 고리 부가 반응으로부터 형성되는 5원 고리는 일반적으로 환원 환경에서 가역적이 아니며, 수성 환경에서 장기간 동안 가수분해에 대해 안정하다. 따라서, 요구되는 수성 조건 하에서 매우 다양한 물질의 물리적 및 화학적 특성이 본 발명의 활성 PEG 유도체에 의해 변형될 수 있다. 아지드 및 아세틸렌 모이어티는 서로에 대해 특이적이기 때문에(예를 들어, 유전적으로 코딩되는 20개의 일반적인 아미노산 중 어느 것과 반응하지 않음), 단백질이 매우 높은 특이성으로 하나 이상의 특정 부위에서 변형될 수 있다는 것이 훨씬 더 중요하다.

[0174] 본 발명은 또한 하나 이상의 아세틸렌 또는 아지드 모이어티를 갖는 수용성이며 가수분해에 대해 안정한 PEG 유도체의 유도체 및 관련 친수성 중합체를 제공한다. 아세틸렌 모이어티를 포함하는 PEG 중합체 유도체는 선택적 코돈에 반응하여 단백질 내로 선택적으로 도입된 아지드 모이어티와의 커플링에 매우 선택적이다. 이와 유사하게, 아지드 모이어티를 포함하는 PEG 중합체 유도체는 선택적 코돈에 반응하여 단백질에 선택적으로 도입된 아세틸렌 모이어티와의 커플링에 매우 선택적이다.

[0175] 보다 구체적으로, 상기 아지드 모이어티는 알킬 아지드, 아릴 아지드 및 이들 아지드의 유도체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 상기 알킬 및 아릴 아지드의 유도체는 아세틸렌 특이적 반응성이 유지되는 한, 다른 치환체들도 포함할 수 있다. 상기 아세틸렌 모이어티는 알킬 및 아릴 아세틸렌 및 각각의 유도체를 포함한다. 상기 알킬 및 아릴 아세틸렌의 유도체는 아지드 특이적 반응성이 유지되는 한, 다른 치환체들도 포함할 수 있다.

[0176] 본 발명은 매우 다양한 작용기, 치환체 또는 모이어티를 갖는 물질과, 표지, 염료, 중합체, 수용성 중합체, 폴리에틸렌 글리콜의 유도체, 광가교결합체, 방사성핵종, 세포 독성 화합물, 약물, 친화도 표지, 광친화도 표지, 반응성 화합물, 수지, 제2 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 유사체, 항체 또는 항체 단편, 금속 킬레이팅제, 보조 인자, 지방산, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, DNA, RNA, 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 사카라이드, 수용성 텐드리머, 사이클로덱스트린, 역제성 리보핵산, 생물학적 물질, 나노입자, 스핀 표지, 형광단, 금속 함유 모이어티, 방사성 모이어티, 신규 작용기, 다른 분자와 공유 또는 비공유적으로 상호작용하는 기, 광케이징된 모이어티, 화학선에 의해 여기 가능한 모이어티, 광이성질체화 가능 모이어티, 바이오틴, 바이오틴 유도체, 바이오틴 유사체, 무거운 원자를 포함하는 모이어티, 화학적으로 절단 가능한 기, 광절단 가능한 기, 연장된 측쇄, 탄소 결합된 당, 산화환원 활성 물질, 아미노 티오산, 독성 모이어티, 동위원소 표지 모이어티, 생물물리적 프로브, 인광성 기, 화학발광성 기, 전자 밀집 기, 자성 기, 인터칼레이팅 기, 발색단, 에너지 전달체, 생물학적 활성 물질, 검출 가능한 표지, 소분자, 양자점, 나노트랜스미터, 방사성 뉴클레오타이드, 라디오트랜스미터, 중성자 포획제, 또는 상기 화합물 또는 물질 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질의 임의의 조합물을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 다른 물질과의 접합체를 제공한다. 본 발명은 또한 상응하는 아세틸렌 또는 아지드 모이어티를 갖는 PEG 중합체 유도체와 아지드 또는 아세틸렌 모이어티를 갖는 물질의 접합체를 포함한다. 예를 들어, 아지드 모이어티를 포함하는 PEG 중합체는 아세틸렌 작용기를 보유하는 비유전적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 단백질 내의 위치에서 생물학적 활성 분자에 커플링될 수 있다. PEG와 생물학적 활성 분자를 커플링시키는 결합은 휘스겐 [3+2] 고리 부가 반응 생성물을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0177] PEG가 생물학적 물질의 표면을 변형시키는 데 사용될 수 있다는 것은 잘 확립되어 있다(예를 들어, 본 명세서에서 참고로 포함하는 미국 특허 제6,610,281호; 문헌 [Mehvar, R, J Pharm Pharm Sci, 3(1):125-136 (2000)] 참조). 본 발명은 또한 하나 이상의 반응성 아지드 또는 아세틸렌 부위 및 휘스겐 [3+2] 고리 부가 연결을 통해 표면에 커플링된 본 발명의 아지드 또는 아세틸렌 함유 중합체 중 하나 이상을 갖는 표면을 포함하는 생물학적 물질을 포함한다. 생물학적 물질 및 다른 물질은 또한, 후속 반응에 이용될 수 있는 아지드 또는 아세틸렌 모이어티를 남기는, 아지드 또는 아세틸렌 연결 이외의 다른 연결을 통해, 예를 들어 카르복실산, 아민, 알코올 또는 티올 모이어티를 포함하는 연결을 통해 아지드 또는 아세틸렌 활성화 중합체 유도체에 커플링될 수 있다.

[0178] 본 발명은 본 발명의 아지드 및 아세틸렌 함유 중합체를 합성하는 방법을 포함한다. 아지드 함유 PEG 유도체의 경우, 상기 아지드는 상기 중합체의 탄소 원자에 직접 결합될 수 있다. 대안적으로, 상기 아지드 함유 PEG 유도체는 아지드 모이어티를 갖는 연결체를 통상적인 활성화된 중합체의 한쪽 말단에 부착시켜, 생성된 중합체가 그 말단에 아지드 모이어티를 갖도록 함으로써 제조할 수 있다. 아세틸렌 함유 PEG 유도체의 경우, 상기 아세틸렌은 상기 중합체의 탄소 원자에 직접 결합될 수 있다. 대안적으로, 상기 아세틸렌 함유 PEG 유도체는 아세틸렌 모이어티를 갖는 연결체를 통상적인 활성화된 중합체의 한쪽 말단에 부착시켜, 생성된 중합체가 그 말단에 아세틸렌 모이어티를 갖도록 함으로써 제조할 수 있다.

[0179] 보다 구체적으로, 상기 아지드 함유 PEG 유도체의 경우, 적어도 하나의 활성 하이드록실 모이어티를 갖는 수용성 중합체는 반응을 거쳐, 그 위에 반응성이 더 큰 모이어티, 예를 들어 메실레이트, 트레실레이트, 토실레이트 또는 할로겐 이탈기를 갖는 치환된 중합체를 생성한다. 설포닐산 할라이드, 할로겐 원자 및 다른 이탈기를 포함하는 PEG 유도체의 제조 및 용도는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 알려져 있다. 이어서, 얻어진 치환된 중합체는 반응을 거쳐, 중합체의 말단에서 반응성이 더 큰 모이어티를 아지드 모이어티로 치환한다. 대안적으로, 적어도 하나의 활성 친핵성 또는 친전자성 모이어티를 갖는 수용성 중합체는 한쪽 말단에 아지드를 갖는 연결체와 반응하여, PEG 중합체와 연결체 사이에 공유 결합이 형성되고, 상기 중합체의 말단에 아지드 모이어티가 위치한다. 아민, 티올, 하이드라지드, 하이드라존, 알코올, 카르복실레이트, 알데하이드, 케톤, 티오에스테르 등을 비롯한 친핵성 및 친전자성 모이어티는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.

[0180] 보다 구체적으로, 아세틸렌 함유 PEG 유도체의 경우, 적어도 하나의 활성 하이드록실 모이어티를 갖는 수용성 중합체가 반응을 거쳐, 아세틸렌 모이어티를 포함하는 전구체로부터 할로겐 또는 다른 활성화된 이탈기를 치환한다. 대안적으로, 적어도 하나의 활성 친핵성 또는 친전자성 모이어티를 갖는 수용성 중합체가 한쪽 말단에 아세틸렌을 갖는 연결체와 반응함으로써 PEG 중합체와 연결체 사이에 공유 결합이 형성되고, 상기 중합체의 말단에 아세틸렌 모이어티가 위치한다. 유기 합성 및 PEG 유도체의 제조 및 사용 측면에서의 할로겐 모이어티, 활성화된 이탈기, 친핵성 및 친전자성 모이어티의 사용은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 잘 확립되어 있다.

[0181] 본 발명은 또한 아지드 또는 아세틸렌 모이어티를 포함하는 PEG 또는 PEG 유도체와 같은 수용성 중합체를 포함하지만 이로 제한되지 않는, 변형된 단백질에 다른 물질을 부가하기 위한 단백질의 선택적인 변형 방법을 제공한다. 상기 아지드 및 아세틸렌 함유 PEG 유도체는 생체적합성, 안정성, 용해도, 및 면역원성 결여가 중요한 표면 및 분자의 특성을 변형시킴과 동시에, 관련 기술 분야에 이전에 알려진 것이 아닌, 단백질에 대해 PEG 유도체를 부착시키는 보다 선택적인 방법을 제공하기 위해 사용될 수 있다.

[0182] II. 본 발명과 함께 사용하기 위한 일반적인 제조합 핵산 방법

[0183] 본 발명의 많은 실시양태에서, 관심 IL-2를 코딩하는 핵산은 단리, 클로닝되고, 종종 제조합 방법을 사용하여 변경될 것이다. 이러한 실시양태는 단백질 발현을 위해 또는 변이체, 유도체, 발현 카세트, 또는 IL-2로부터 유래된 다른 서열의 생성 동안 사용되지만, 이로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩타이드를 코딩하는 서열은 이중성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0184] 성숙 인간 IL-2 단백질의 아미노산 서열은 하기 표 1에 제시된다.

[0185] 표 1 - IL-2 단백질 및 DNA 서열

서열 번호	설명	서열
1	아미노산 서열 - 리더 서열을 갖는 야생형 IL-2, (진핵 세포 발현)	MYRMQLLSICIALSLALVTNSAPTSST KKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNP KLTRMLTFKFYMPKKATELKHLQCLE EELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISN INVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFCQSIISTLT
2	아미노산 서열 - 성숙 인간 IL-2 단백질 (진핵 세포 발현)	APTSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNG INNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEELKPLEEVLNLAQSKNFH LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

[0186]

3	아미노산 서열 - 이. 콜라이에서 발현된 성숙 인간 IL-2 단백질	MPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGI NNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELK HLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLR PRDLISININVIVLELKGSETTFMCEYAD ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
4	DNA 서열 - pKG0269 발현 플라스미드 내로 클로닝된 합성 인간 IL-2 유전자 (이. 콜라이 코돈 최적화됨).	ATGCCGACCAGCAGTAGCACCAAGA AAACTCAGCTGCAGCTGGAGCATCT GCTGCTGGATTACAGATGATTCTG AATGGCATTAAATAATTACAAAAATC CGAAACTGACCCGCATGCTGACCTT CAAGTTCTACATGCCGAAGAAGGCC ACCGAACTGAAGCATCTGCAGTGTT TAGAAGAGGAACTGAAGCCGCTGG AAGAGGTGCTGAATTTAGCCCAGAG CAAAAACCTCCATCTGCGCCCGCGC GATTAAATTAGCAATATTAACGTGA TTGTGCTGGAAGTGAAGGCAGCGA GACCACCTTTATGTGCGAGTACGCA GATGAGACCGCCACCATCGTGGAAT TTTTAAACCGCTGGATCACCTTCAGC CAGAGTATCATTAGCACTTTAACC
5	아미노산 서열 - 이. 콜라이에서 발현된, 출발 코돈, ATG 다음에 N- 말단 알라닌을 갖는 성숙 인간 IL-2 단백질	MAPTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMIL NGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKAT ELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKN FHLRPRDLISININVIVLELKGSETTFMC EYADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
6	DNA 서열 - 출발 코돈, ATG 다음에 N-말단 알라닌을 갖는 인간 IL-2 단백질	ATG GCA CCG ACC AGC AGT AGC ACC AAG AAA ACT CAG CTG CAG CTG GAG CAT CTG CTG CTG GAT TTA CAG ATG ATT CTG AAT GGC ATT AAT AAT TAC AAA AAT CCG AAA CTG ACC CGC ATG CTG ACC TTC AAG TTC TAC ATG CCG AAG AAG GCC ACC GAA CTG AAG CAT CTG CAG TGT TTA GAA GAG GAA CTG AAG CCG CTG GAA GAG GTG CTG AAT TTA GCC CAG AGC AAA AAC TTC CAT CTG CGC CCG CGC GAT TTA ATT AGC AAT ATT AAC GTG ATT GTG CTG GAA CTG AAA GGC AGC GAG ACC ACC TTT ATG TGC GAG TAC GCA GAT GAG ACC GCC ACC ATC GTG GAA TTT TTA AAC CGC TGG ATC ACC TTC AGC CAG AGT ATC ATT AGC ACT TTA ACC

[0187]

7	아미노산 서열 - 이. 콜라이에서 발현된, 출발 코돈, ATG 다음에 N- 말단 프롤린 결실을 갖는 성숙 인간 IL-2 단백질	MTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGI NNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATEL KHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFH LRPRDLISNINIVIVLELKGSETTFMCEY ADETATIVEFLNRWITFSQSIISTLT
8	DNA 코딩 서열 - 출발 코돈, ATG 다음에 N- 말단 프롤린 결실을 갖는 인간 IL-2 단백질	ATG ACC AGC AGT AGC ACC AAG AAA ACT CAG CTG CAG CTG GAG CAT CTG CTG CTG GAT TTA CAG ATG ATT CTG AAT GGC ATT AAT AAT TAC AAA AAT CCG AAA CTG ACC CGC ATG CTG ACC TTC AAG TTC TAC ATG CCG AAG AAG GCC ACC GAA CTG AAG CAT CTG CAG TGT TTA GAA GAG GAA CTG AAG CCG CTG GAA GAG GTG CTG AAT TTA GCC CAG AGC AAA AAC TTC CAT CTG CGC CCG CGC GAT TTA ATT AGC AAT ATT AAC GTG ATT GTG CTG GAA CTG AAA GGC AGC GAG ACC ACC TTT ATG TGC GAG TAC GCA GAT GAG ACC GCC ACC ATC GTG GAA TTT TTA AAC CGC TGG ATC ACC TTC AGC CAG AGT ATC ATT AGC ACT TTA ACC

[0188]

[0189]

비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1, 2, 3, 5, 또는 7에 제시된 아미노산 서열을 포함하지만 이로 제한되지 않는 아미노산 서열을 갖는 모 폴리펩타이드의 아미노산 서열을 기초로 하여 합성한 후, 관련 아미노산 잔기(들)의 도입(즉, 통합 또는 치환) 또는 제거(즉, 결실 또는 치환)하도록 뉴클레오타이드 서열을 변경될 수 있다. 뉴클레오타이드 서열은 통상적인 방법에 따라 부위 지정 돌연변이 유발법에 의해 편리하게 변형될 수 있다. 대안적으로, 뉴클레오타이드 서열은 올리고뉴클레오타이드 합성기의 사용을 포함하지만 이로 제한되지 않는 화학적 합성에 의해 제조될 수 있으며, 여기서 올리고뉴클레오타이드는 원하는 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 기초하여, 바람직하게는, 재조합 폴리펩타이드가 생산되는 숙주 세포에서 선호되는 코돈을 선택하여 디자인한다. 예를 들어, 원하는 폴리펩타이드의 일부를 코딩하는 몇몇 작은 올리고뉴클레오타이드는 PCR, 라이게이션 또는 라이게이션 연쇄 반응에 의해 합성되고 조립될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 참고로 포함하는 문헌 [Barany, et al., Proc Natl Acad Sci 88:189-193(1991)], 및 미국 특허 제6,521,427호를 참조한다.

[0190]

pKG0269 발현 플라스미드에 클로닝된 합성 인간 IL-2 유전자의 DNA 서열은 서열번호 4로서 상기 표 1에 제시되어 있다. 이 DNA 서열은 이. 콜라이 코돈에 최적화되어 있다.

[0191]

본 발명은 재조합 유전학 분야에서 통상적인 기술을 사용한다. 본 발명에서 사용하는 일반적인 방법을 개시하는 기본 텍스트에는 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (3rd ed. 2001)]; [Kriegler, Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (1990)]; 및 [Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel et al., eds., 1994)]을 포함한다.

[0192]

본 발명은 또한 오르토고날 tRNA/RS 쌍을 통한 비천연 아미노산의 생체내 도입을 위한 진핵 숙주 세포, 비진핵 숙주 세포 및 유기체에 관한 것이다. 숙주 세포는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드, 또는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 구축물(예를 들어, 클로닝 벡터 또는 발현 벡터일 수 있는 본 발명의 벡터를 포함하지만 이로 제한되지 않음)에 의해 유전공학적으로 조작된다(형질전환, 형질도입 또는 형질감염을 포함하지만 이들로 제한되지 않음).

[0193]

표적 핵산을 세포 내로 도입하는 몇 가지 공지된 방법이 이용 가능하며, 이들 중 임의의 방법이 본 발명에 이용될 수 있다. 이들 방법은 수용 세포와, DNA를 함유하는 박테리아 원형질체의 융합, 전기천공, 추진체 폭격(projectile bombardment), 및 바이러스 벡터를 이용한 감염(아래에서 추가로 설명함) 등을 포함한다. 박테리아 세포는 본 발명의 DNA 구축물을 함유하는 다수의 플라스미드를 증폭시키는 데 사용될 수 있다. 박테리아는 대수기(log phase)까지 증식시키고, 박테리아 내의 플라스미드는 관련 기술 분야에 공지된 다양한 방법(예를 들어, Sambrook의 문헌 참조)에 의해 분리될 수 있다. 또한, 박테리아로부터 플라스미드를 정제하기 위한 키트가 시판되고 있다(예를 들어, Pharmacia Biotech에서 시판하는 EasyPrep™ 및 FlexiPrep™; Stratagene에서 시판하는 StrataClean™; 및 Qiagen에서 시판하는 QIAprep™). 그 후, 분리되고 정제된 플라스미드를, 다른 플라스미드를

제조하기 위해 추가로 조작하거나, 세포를 형질감염시키는 데 사용하거나, 유기체를 감염시키기 위해 관련 벡터 내로 도입한다. 전형적인 벡터는 전사 및 번역 종결 인자, 전사 및 번역 개시 서열, 및 특정 표적 핵산의 발현 조절에 유용한 프로모터를 포함한다. 벡터는 선택적으로 적어도 하나의 독립된 종결 인자 서열, 진핵생물, 원핵생물 또는 이들 둘 모두에서 카세트의 복제를 가능하게 하는 서열(서열 벡터를 포함하지만 이로 제한되지 않음), 및 원핵 및 진핵 시스템 둘 모두에 대한 선택 마커를 포함하는 범용 발현 카세트를 포함한다. 벡터는 원핵생물, 진핵생물, 또는 이들 둘 모두에 있어서 복제 및 도입에 적합하다. 문헌 [Gillam & Smith, *Gene* 8:81 (1979)]; [Roberts, et al., *Nature*, 328:731 (1987)]; [Schneider, E., et al., *Protein Expr. Purif.* 6(1):10-14 (1995)]; [Ausubel, Sambrook, Berger (all supra)]을 참조한다. 클로닝에 유용한 박테리아 및 박테리오파지의 카탈로그는 예를 들어 ATCC에 의해 제공되며, 그 예로는 ATCC가 발행한 카탈로그 [The ATCC Catalogue of Bacteria and Bacteriophage (1992) Gherna et al. (eds)]가 있다. 또한, 서열결정, 클로닝 및 분자생물학의 다른 측면에 대한 추가의 기본 절차 및 기초적인 이론적 고려사항은 문헌 [Watson et al. (1992) *Recombinant DNA Second Edition* Scientific American Books, NY.]에서 볼 수 있다. 또한, 실질적으로 어떠한 핵산도(및 표준 또는 비표준의 사실상 어떠한 표지된 핵산도) 다양한 임의의 상업적 공급업체로부터, 예를 들어 미들랜드 서티파이드 리에이전트 컴퍼니(Midland Certified Reagent Company)(미국 텍사스주 미들랜드 소재, www.mcrc.com에서 이용 가능함), 더 그레이트 어메리칸 진 컴퍼니(The Great American Gene Company)(미국 캘리포니아주 라모나 소재, www.genco.com에서 이용 가능함), 익스프레스젠 인크.(ExpressGen Inc.)(미국 일리노이주 시카고 소재, www.expressgen.com에서 이용 가능함), 오페론 테크놀로지스 인크.(Operon Technologies Inc.)(미국 캘리포니아주 알라메다 소재) 및 많은 다른 공급업체로부터 맞춤 주문 또는 일반 주문할 수 있다.

[0194] 셀렉터 코돈

[0195] 셀렉터 코돈은 단백질 생합성 기구의 유전자 코돈 프레임워크를 확장한다. 예를 들어, 셀렉터 코돈은 고유한 3 염기 코돈, 넌센스 코돈, 예를 들어 앰버 코돈(UAG), 오키 코돈 또는 오팔 코돈(UGA)을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 정지 코돈, 비천연 코돈, 4개 염기 이상의 코돈, 회귀 코돈 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. IL-2의 적어도 일부를 코딩하는 단일 폴리뉴클레오타이드에서 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 또는 그 초과를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 매우 다양한 수의 셀렉터 코돈을 원하는 유전자 또는 폴리뉴클레오타이드 내로 도입할 수 있다는 것이 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게는 자명하다.

[0196] 한 실시양태에서, 본 방법은 하나 이상의 비천연 아미노산을 생체 내로 도입하기 위한 정지 코돈인 셀렉터 코돈의 사용을 포함한다. 예를 들어, UAG를 포함하지만 이로 제한되지 않는 정지 코돈을 인식하며 O-RS에 의해 원하는 비천연 아미노산으로 아미노아실화되는 O-tRNA가 생성된다. 이 O-tRNA는 천연 발생 숙주의 아미노아실-tRNA 합성효소에 의해서 인식되지 않는다. 통상적인 부위 지정 돌연변이 유발을 이용하여, 관심 폴리펩타이드 내의 관심 부위에, TAG를 포함하지만 이로 제한되지 않는 정지 코돈을 도입할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Sayers, J.R., et al. (1988), 5'-3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis. *Nucleic Acids Res.* 16:791-802]을 참조한다. O-RS, O-tRNA, 및 관심 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산이 생체 내에서 조합되는 경우, 상기 비천연 아미노산은 UAG 코돈에 반응하여 도입되고, 이를 통해 특정 위치에 비천연 아미노산을 함유하는 폴리펩타이드를 제공한다.

[0197] 비천연 아미노산의 생체내 도입은 진핵 숙주 세포에 유의한 영향을 주지 않으면서 수행될 수 있다. 예를 들어, UAG 코돈에 대한 억제 효율은 O-tRNA(앰버 서프레스 tRNA를 포함하지만 이로 제한되지 않음)와 진핵 방출 인자(eRF를 포함하지만 이로 제한되지 않음)(이는 정지 코돈에 결합하여, 리보솜으로부터 성장하는 펩타이드의 방출을 개시함) 사이의 경쟁에 좌우되기 때문에, 억제 효율은 O-tRNA 및/또는 서프레스 tRNA의 발현 수준을 증가시키는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는 방법에 의해 조절할 수 있다.

[0198] 또한, 비천연 아미노산은 회귀 코돈으로 코딩될 수도 있다. 예를 들어, 시험관 내에서의 단백질 합성 반응에서 아르기닌 농도를 감소시킬 경우, 회귀 아르기닌 코돈인 AGG가 알라닌에 의해 아실화된 합성 tRNA에 의한 Ala의 삽입에 효율적인 것으로 입증된 바 있다. 예를 들어, 문헌 [Ma et al., *Biochemistry* 32:7939 (1993)]을 참조한다. 이 경우, 합성 tRNA는 에스케리키아 콜라이에서 소수 종으로서 존재하는 천연 발생 tRNA^{Arg}와 경쟁한다. 일부 유기체는 모든 3 염기 코돈을 이용하지는 않는다. 마이크로코커스 루테우스(*Micrococcus luteus*)에 있어서 미지정 코돈인 AGA는 시험관내 전사/번역 추출물 중에서의 아미노산의 삽입에 이용되고 있다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Kowal and Oliver, *Nucl. Acid. Res.*, 25:4685 (1997)]을 참조한다. 본 발명의 구성요소들은 생체 내에서 이같은 회귀 코돈을 사용하도록 생성될 수 있다.

- [0199] 셀렉터 코돈은 또한 4 이상의 염기 코돈, 예를 들어, 4 염기 코돈, 5 염기 코돈 또는 6 염기 또는 그 초과 염기 코돈을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 연장된 코돈을 포함한다. 4 염기 코돈의 예로는 AGGA, CUAG, UAGA, CCCU 등을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 5 염기 코돈의 예로는 AGGAC, CCCC, CCCUC, CUAGA, CUACU, UAGGC 등을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 본 발명의 특징은 프레임쉬프트 억제제 기제로 하여 연장된 코돈을 이용하는 것을 포함한다. 4 이상의 염기 코돈은 하나 또는 복수의 비천연 아미노산을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 아미노산을 동일한 단백질 내로 삽입할 수 있다. 예를 들어, 안티코돈(anticodon) 루프, 예를 들어 적어도 8-10개의 안티코돈 루프를 갖는 특수 프레임쉬프트 서프레서 tRNA를 포함하지만 이로 제한되지 않는 돌연변이된 O-tRNA의 존재 하에, 4 이상의 염기 코돈은 단일 아미노산으로서 판독된다. 다른 실시양태에서, 상기 안티코돈 루프는 적어도 4개의 염기로 구성된 코돈, 적어도 5개의 염기로 구성된 코돈, 또는 적어도 6개의 염기, 또는 그 초과 염기로 구성된 코돈을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 코돈을 디코딩할 수 있다. 256개의 가능한 4 염기 코돈이 존재하기 때문에, 4개 이상의 염기로 구성된 코돈의 사용에 의해 동일한 세포에서 다수의 비천연 아미노산이 코딩될 수 있다. 이와 관련하여, 문헌 [Anderson et al., Exploring the Limits of Codon and Anticodon Size, Chemistry and Biology, 9:237-244, (2002)]; [Magliery, Expanding the Genetic Code: Selection of Efficient Suppressors of Four-base Codons and Identification of "Shifty" Four-base Codons with a Library Approach in Escherichia coli, J. Mol. Biol. 307: 755-769, (2001)]을 참조할 수 있다.
- [0200] 예를 들어, 4 염기 코돈은 시험관내 생합성 방법을 이용하여 비천연 아미노산을 단백질 내로 도입하기 위해 사용되어 왔다. 예를 들어, 문헌 [Ma et al., Biochemistry, 32:7939, (1993)]; 및 [Hohsaka et al., J. Am. Chem. Soc., 121:34, (1999)]을 참조할 수 있다. CGGG 및 AGGU는 시험관 내에서 2개의 화학적으로 아실화된 프레임쉬프트 서프레서 tRNA를 사용하여 2-나프틸알라닌 및 라이신의 NBD 유도체를 동시에 스트렙타비딘 내에 도입하기 위해 사용되었다. 예를 들어, 문헌 [Hohsaka et al., J. Am. Chem. Soc., 121:12194 (1999)]을 참조할 수 있다. 생체내 연구에서, 무어(Moore) 등은 NCUA 안티코돈을 갖는 tRNA^{Leu} 유도체가 UAGN 코돈(N은 U, A, G 또는 C일 수 있음)을 억제하는 능력을 조사하였고, 4개의 염기로 구성된 UAGA가 0 또는 -1 프레임에서 거의 디코딩되지 않은 채 13 내지 26%의 효율로 UCUA 안티코돈을 갖는 tRNA^{Leu}에 의해 디코딩될 수 있다는 것을 발견하였다. 이와 관련하여, 문헌 [Moore et al., J. Mol. Biol., 298:195, (2000)]을 참조할 수 있다. 한 실시양태에서, 회귀 코돈 또는 넌센스 코돈을 기제로 한 연장된 코돈이 본 발명에서 사용될 수 있으며, 이는 원치 않는 다른 부위에서의 미스센스 리드쓰루(missense readthrough) 및 프레임쉬프트 억제를 감소시킬 수 있다.
- [0201] 특정 시스템의 경우, 셀렉터 코돈은 또한 천연 3 염기 코돈 중 하나를 포함할 수 있으며, 이때 내인성 시스템은 천연 염기 코돈을 사용하지 않는다(또는 드물게 사용한다). 예를 들어, 이는 천연 3 염기 코돈을 인식하는 tRNA가 결여된 시스템, 및/또는 3 염기 코돈이 회귀 코돈인 시스템을 포함한다.
- [0202] 셀렉터 코돈은 선택적으로 비천연 염기쌍을 포함한다. 이러한 비천연 염기쌍은 기존의 유전자 알파벳을 더 확장시킨다. 추가의 하나의 염기쌍은 3 염기 코돈의 수를 64개에서 125개로 증가시킨다. 세 번째 염기쌍의 특성은 안정하고 선택적인 염기쌍 형성, 높은 충실도로 폴리머라제에 의한 DNA 내로의 효율적인 효소적 도입, 및 초기(nascent) 비천연 염기쌍의 합성 후 효율적인 연속적 프라이머 연장을 포함한다. 본 발명의 방법 및 조성물에서 사용될 수 있는 비천연 염기쌍에 대한 설명은 예를 들어 문헌 [Hirao, et al., An unnatural base pair for incorporating amino acid analogues into protein, Nature Biotechnology, 20:177-182, (2002)]을 포함한다. 또한, 문헌 [Wu, Y., et al., J. Am. Chem. Soc. 124:14626-14630, (2002)]을 참조할 수 있다. 다른 관련 간행물이 아래에 제시된다.
- [0203] 생체내 사용에 있어서, 비천연 뉴클레오타이드는 막 투과성이고, 인산화되어 상응하는 트리포스페이트를 형성한다. 또한, 증가된 유전 정보는 안정성이 있고, 세포내 효소에 의해 파괴되지 않는다. 베너(Benner) 등에 의해 이루어진 종래의 연구는 정규(canonical) 왓슨-크릭(Watson-Crick) 쌍에서의 수소 결합 패턴과 상이한 수소 결합 패턴을 이용하였는데, 이 중 가장 주목할 만한 예는 이소-C:이소-G 쌍이다. 이와 관련해서는, 예를 들어 문헌 [Switzer et al., J. Am. Chem. Soc., 111:8322, (1989)]; [Piccirilli et al., Nature, 343:33, (1990)]; 및 [Kool, Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602, (2000)]을 참조한다. 이 염기들은 일반적으로 어느 정도까지 천연 염기와 쌍을 잘못 이루고, 효소적으로 복제될 수 없다. 쿨(Kool)과 그의 동료들은 염기 사이의 수소성 패킹 상호작용이 수소 결합을 대체하여 염기쌍의 형성을 유도할 수 있다는 것을 입증하였다. 이에 관해서는, 문헌 [Kool, Curr. Opin. Chem. Biol., 4:602, (2000) 및 [Guckian and Kool, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 36, 2825, (1998)]을 참조한다. 상기 요건을 전부 충족하는 비천연 염기쌍을 개발하기 위한 노력으로, 슐츠(Schultz), 롬스버그(Romesberg) 및 그 동료들은 일련의 비천연 소수성 염기를 체계적으로 합성하여

연구하였다. PICS:PICS 자가 쌍(self-pair)은 천연 염기쌍보다 안정한 것으로 밝혀졌고, 에스케리키아 콜라이 DNA 폴리머라제 I의 클레나우(Klenow) 단편(KF)에 의해 DNA 내로 효율적으로 도입될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [McMinn et al., J. Am. Chem. Soc., 121:11585-6, (1999)]; 및 [Ogawa et al., J. Am. Chem. Soc., 122:3274, (2000)]을 참조한다. 3MN:3MN 자가 쌍은 생물학적 기능에 충분한 효율성 및 선택성으로 KF에 의해 합성될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Ogawa et al., J. Am. Chem. Soc., 122:8803, (2000)]을 참조한다. 그러나, 양쪽 염기 둘 모두가 추가의 복제를 위한 사슬 종결 인자로서 작용한다. 최근에 PICS 자가 쌍을 복제하는 데 사용될 수 있는 돌연변이 DNA 폴리머라제가 개발되었다. 또한, 7AI 자가 쌍도 복제될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Tae et al., J. Am. Chem. Soc., 123:7439, (2001)]을 참조할 수 있다. 또한, 새로운 메탈로염기쌍인 Dipic:Py도 개발되었는데, 이것은 Cu(II)와 결합할 때 안정한 쌍을 형성한다. 문헌 [Meggers et al., J. Am. Chem. Soc., 122:10714, (2000)]을 참조한다. 연장된 코돈 및 비천연 코돈은 본질적으로 천연 코돈에 오르토고날하기 때문에, 본 발명의 방법은 이 특성을 이용하여 이들에 대한 오르토고날 tRNA를 생성할 수 있다.

[0204] 또한, 번역 우회(translational bypassing) 시스템을 이용하여, 원하는 폴리펩타이드 내로 비천연 아미노산을 도입할 수 있다. 번역 우회 시스템에서, 큰 서열이 유전자 내로 도입되지만, 단백질로 번역되지는 않는다. 이 서열은 리보솜이 서열을 건너 뛰어, 삽입 부위 하류의 번역을 재개하도록 유도하는 신호(cue)로서 작용하는 구조를 포함한다.

[0205] 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법 및/또는 조성물에 있어서 관심 단백질 또는 폴리펩타이드(또는 그의 일부)는 핵산에 의해 코딩된다. 일반적으로, 상기 핵산은 적어도 1개의 선택터 코돈, 적어도 2개의 선택터 코돈, 적어도 3개의 선택터 코돈, 적어도 4개의 선택터 코돈, 적어도 5개의 선택터 코돈, 적어도 6개의 선택터 코돈, 적어도 7개의 선택터 코돈, 적어도 8개의 선택터 코돈, 적어도 9개의 선택터 코돈, 10개 또는 그 초과 선택터 코돈을 포함한다.

[0206] 관심 단백질 또는 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자는 예를 들어 비천연 아미노산의 도입을 위한 하나 이상의 선택터 코돈을 포함하도록, 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고 본 명세서에서 설명되는 방법을 이용하여 돌연변이시킬 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 선택터 코돈을 포함하도록 관심 단백질에 대한 핵산을 돌연변이시켜, 하나 이상의 비천연 아미노산이 도입되도록 할 수 있다. 본 발명은 예를 들어 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함하는, 임의의 단백질의 임의의 상기 변이체(돌연변이체, 변형체를 포함하지만 이로 제한되지 않음)를 포함한다. 이와 유사하게, 본 발명은 또한 상응하는 핵산, 즉, 하나 이상의 비천연 아미노산을 코딩하는 하나 이상의 선택터 코돈을 갖는 임의의 핵산을 포함한다.

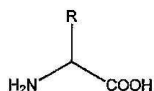
[0207] IL-2와 같은 관심 단백질을 코딩하는 핵산 분자는 상기 폴리펩타이드의 임의의 원하는 위치에 시스테인이 도입되도록 용이하게 돌연변이될 수 있다. 시스테인은 반응성 분자, 수용성 중합체, 단백질 또는 매우 다양한 다른 분자를 관심 단백질에 도입하기 위해 널리 사용된다. 시스테인을 폴리펩타이드의 원하는 위치로 도입하기에 적합한 방법은 본 명세서에서 참고로 포함되는 미국 특허 제6,608,183호에 기재된 방법 및 표준 돌연변이 유발 기술과 같이 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.

[0208] *III. 비천연적으로 코딩된 아미노산*

[0209] 매우 다양한 비천연적으로 코딩된 아미노산이 본 발명에 사용하기에 적합하다. 임의의 수의 비천연적으로 코딩된 아미노산이 IL-2 내에 도입될 수 있다. 일반적으로, 도입되는 비천연적으로 코딩된 아미노산은 20개의 유전적으로 코딩된 아미노산(즉, 알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 타이로신 및 발린)에 대하여 실질적으로 화학적 활성을 나타내지 않는다. 일부 실시양태에서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 20개의 일반적인 아미노산에 존재하지 않는 작용기와 효율적이고 선택적으로 반응하여 안정한 접합체를 형성하는 측쇄 작용기(아지도, 케톤, 알데하이드 및 아미노옥시 기를 포함하지만 이들로 제한되지 않음)를 포함한다. 예를 들어, 아지도 작용기를 포함하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2는 중합체(폴리(에틸렌 글리콜), 또는 대안적으로, 알킨 모이어티를 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하지만 이들로 제한되지 않음)와 반응하여, 아지도 및 알킨 작용기의 선택적 반응에 의해 안정한 접합체를 형성함으로써 휘스젠 [3+2] 고리 부가 반응 생성물을 형성할 수 있다.

[0210] α-아미노산의 일반 구조는 다음과 같이 예시된다(화학식 I):

I



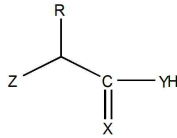
[0211]

[0212] 비천연적으로 코딩된 아미노산은 일반적으로 R 기가 20개의 천연 아미노산에서 사용되는 것 이외의 다른 임의의 치환체인 상기 제시된 화학식을 갖는 임의의 구조이며, 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있다. 본 발명의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 일반적으로 측쇄의 구조에서만 천연 아미노산과 상이하기 때문에, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 이들이 천연 발생 폴리펩타이드에서 형성되는 것과 동일한 방식으로 다른 아미노산(천연 아미노산 또는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하지만 이로 제한되지 않음)과 아마이드 결합을 형성한다. 그러나, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산은 천연 아미노산과 이들을 구별하는 측쇄를 갖는다. 예를 들어, R은 선택적으로 알킬-, 아릴-, 아실-, 케토-, 아지도-, 하이드록실-, 하이드라진, 시아노-, 할로-, 하이드라지드, 알케닐, 알킬닐, 에테르, 티올, 셀레노-, 설포닐-, 브레이트, 보로네이트, 포스포, 포스포노, 포스핀, 헥테로사이클릭, 에논, 이민, 알데하이드, 에스테르, 티오산, 하이드록실아민, 아미노 기 등, 또는 이들의 임의의 조합을 포함한다. 본 발명에 사용하기 적합할 수 있는 관심있는 다른 비천연 발생 아미노산으로는 광활성화 가능한 가교결합제를 포함하는 아미노산, 스핀 표지 아미노산, 형광 아미노산, 금속 결합 아미노산, 금속 함유 아미노산, 방사성 아미노산, 신규한 작용기를 갖는 아미노산, 다른 분자와 공유 또는 비공유적으로 상호작용하는 아미노산, 광케이지된 및/또는 광이성질체화 가능한 아미노산, 바이오틴 또는 바이오틴 유사체를 포함하는 아미노산, 글리코실화된 아미노산, 예를 들어 당 치환된 세린, 탄수화물에 의해 변형된 다른 아미노산, 케토 함유 아미노산, 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에테르를 포함하는 아미노산, 무거운 원자 치환된 아미노산, 화학적으로 절단 가능한 및/또는 광절단 가능한 아미노산, 천연 아미노산에 비해 연장된 측쇄(폴리에테르 또는 탄소 원자수가 약 5를 초과하거나 약 10을 초과하는(이로 제한되지 않음) 장쇄 탄화수소를 포함함)를 갖는 아미노산, 탄소 연결된 당 함유 아미노산, 산화환원 활성 아미노산, 아미노 티오산 함유 아미노산 및 하나 이상의 독성 모이어티를 포함하는 아미노산을 들 수 있으나, 이들에 제한되지 않는다.

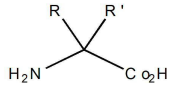
[0213] 본 발명에서 사용하기 적합할 수 있고 수용성 중합체와의 반응에 유용한 비천연적으로 코딩되는 예시적인 아미노산은 카르보닐, 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드, 세미카바지드, 아지드 및 알킨 반응성 기를 갖는 것들을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 사카라이드 모이어티를 포함한다. 이러한 아미노산의 예로는 N-아세틸-L-글루코사미닐-L-세린, N-아세틸-L-갈락토사미닐-L-세린, N-아세틸-L-글루코사미닐-L-트레오닌, N-아세틸-L-글루코사미닐-L-아스파라긴 및 O-만노사미닐-L-세린이 있다. 또한, 이러한 아미노산의 예로는 아미노산과 사카라이드 사이의 천연 발생 N 연결 또는 O 연결이 알켄, 옥심, 티오에테르, 아마이드 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 자연에 일반적으로 발견되지 않는 공유 연결에 의해 대체되는 예들을 포함한다. 이러한 아미노산의 예는 또한 천연 발생 단백질에서는 일반적으로 발견되지 않는 사카라이드, 예를 들어 2-데옥시-글루코스, 2-데옥시갈락토스 등을 포함한다.

[0214] 본 명세서에서 제공되는 비천연적으로 코딩되는 많은 아미노산은 예를 들어 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)(미국 미주리주 세인트루이스 소재), 노바바이오켄(Novabiochem)(독일 다름슈타트 소재의 EMD Biosciences의 자회사), 또는 펩테크(Peptech)(미국 매사추세츠주 버링턴 소재)에서 시판된다. 시판되지 않는 것들은 선택적으로 본 명세서에서 설명되는 바와 같이 또는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 방법을 이용하여 합성한다. 유기 합성 기술의 경우, 예를 들어 문헌 [Organic Chemistry by Fessenden and Fessenden, Second Edition, Willard Grant Press, Boston Mass, (1982)]; [Advanced Organic Chemistry by March Third Edition, Wiley and Sons, New York, (1985)]; 및 [Advanced Organic Chemistry by Carey and Sundberg, Third Edition, Parts A and B, Plenum Press, New York, (1990)]을 참조한다. 또한, 본 명세서에서 참고로 포함하는 미국 특허 제7,045,337호 및 제7,083,970호를 참조한다. 신규한 측쇄를 포함하는 비천연 아미노산에 추가하여, 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는 비천연 아미노산은 또한 하기 화학식 II 및 III의 구조로 예시되는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는 변형된 골격 구조를 선택적으로 포함한다:

II



III



상기 식에서, Z는 일반적으로 OH, NH₂, SH, NH-R' 또는 S-R'을 포함하고; X 및 Y는 동일하거나 상이할 수 있으며, 일반적으로 S 또는 O를 포함하며, R 및 R'은 선택적으로 동일하거나 상이하며, 일반적으로 화학식 I로 표시되는 상기 비천연 아미노산에 대해 상기에서 설명된 R 기에 대한 구성요소와 동일한 목록 및 수소로부터 선택된다. 예를 들어, 본 발명의 비천연 아미노산은 선택적으로 화학식 II 및 III으로 예시되는 바와 같이 아미노 또는 카르복실 기에 치환을 포함한다. 이러한 유형의 비천연 아미노산은 20개의 통상적인 천연 아미노산에 해당하는 측쇄 또는 비천연 측쇄를 갖는 것을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 α-하이드록시산, α-티오산, α-아미노티오키아르복실레이트를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 또한, α-탄소에서의 치환은 선택적으로 L, D 또는 α-α-이치환 아미노산, 예를 들어 D-글루타메이트, D-알라닌, D-메틸-O-타이로신, 아미노부티르산 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 다른 구조적 대체물로는 사이클릭 아미노산, 예를 들어 프롤린 유사체 및 3원, 4원, 6원, 7원, 8원 및 9원 고리 프롤린 유사체, β 및 γ 아미노산, 예를 들어 치환된 β-알라닌 및 γ-아미노 부티르산을 포함한다.

다수의 비천연 아미노산이 천연 아미노산, 예를 들어 타이로신, 글루타민, 페닐알라닌 등에 기초한 것으로서, 본 발명에 사용하기에 적합하다. 타이로신 유사체는 파라 치환 타이로신, 오르토 치환 타이로신 및 메타 치환 타이로신을 포함하지만 이들로 제한되지 않으며, 여기에서 치환 타이로신은 케토기(아세틸기를 포함하지만 이로 제한되지 않음), 벤조일기, 아미노기, 하이드라진기, 하이드록시아민기, 티올기, 카르복시기, 이소프로필기, 메틸기, C₆-C₂₀ 직쇄 또는 분지쇄 탄화수소, 포화 또는 불포화 탄화수소, O-메틸기, 폴리테트라기, 니트로기, 알킬기 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 추가로, 다중 치환된 아릴 고리 역시 고려된다. 본 발명에 사용하기 적합할 수 있는 글루타민 유사체는 α-하이드록시 유도체, γ 치환 유도체, 사이클릭 유도체 및 아미노 치환 글루타민 유도체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는 페닐알라닌 유사체의 예로는 파라 치환 페닐알라닌, 오르토 치환 페닐알라닌 및 메타 치환 페닐알라닌을 들 수 있으며, 여기서 치환체는 하이드록시기, 메톡시기, 메틸기, 알릴기, 알데하이드, 아지도, 요오도, 브로모, 케토기(아세틸기를 포함하지만, 이로 제한되지 않음), 벤조일, 알킬기 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 본 발명에 사용하기에 적합할 수 있는 비천연 아미노산의 구체적인 예로는 p-아세틸-L-페닐알라닌, O-메틸-L-타이로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, O-4-알릴-L-타이로신, 4-프로필-L-타이로신, 트리-O-아세틸-GlcNAc β-세린, L-도파, 불소화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, p-아지도-L-페닐알라닌, p-아실-L-페닐알라닌, p-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노타이로신, p-요오도-페닐알라닌, p-브로모페닐알라닌, p-아미노-L-페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌 및 p-프로파르길옥시-페닐알라닌 등을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 본 발명에서 사용하기 적합할 수 있는 다양한 비천연 아미노산의 구조의 예가 예를 들어 WO 2002/085923(발명의 명칭: "In vivo incorporation of unnatural amino acids")에 제시되어 있다. 또한, 추가의 메티오닌 유사체에 대해서는, 본 명세서에서 참고로 포함하는 문헌 [Kiick et al., Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24, (2002)]도 참조할 수 있다. 본 명세서에 참고로 포함하는 국제 특허 출원 PCT/US06/47822(발명의 명칭: "Compositions Containing, Methods Involving, and Uses of Non-natural Amino Acids and Polypeptides")는 p-아미노-페닐알라닌을 포함하지만 이로 제한되지 않는 방향족 아민 모이어티의 환원적 알킬화 및 환원적 아민화에 관해 설명하고 있다.

본 발명의 또 다른 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 갖는 IL-2 폴리펩타이드는 공유적으로 변형된다. 생물학적 시스템의 다양한 기능에 대해 오르토고날인 선택적 화학 반응은 화학 생물학에서 중요한 도구로 인식된다. 합성 화학의 레퍼토리에 대해 상대적으로 새롭게 제시된 방식으로, 이러한 생체 오르토고날 반응은 화합물 라이브러리 합성, 단백질 공학, 기능적 단백질체학 및 세포 표면의 화학적 리모델링을 위

한 새로운 전략에 영감을 주었다. 아지드는 생체 접합을 위한 독특한 화학적 핸들로서 두드러진 역할을 제시하였다. 슈타우딩거(Staudinger) 라이게이션은 포스핀과 함께 사용되어 세포의 당접합체 내에 대사적으로 도입된 아지도당에 태그를 지정하였다. 슈타우딩거 라이게이션은 생리적 손상없이 살아있는 동물에서 수행할 수 있지만, 슈타우딩거 반응이 책임이 없는 것은 아니다. 필수 포스핀은 공기 산화에 민감하며, 개선된 수 용해도 및 증가된 반응 속도를 위한 최적화는 합성 방식으로는 어려운 것으로 입증되었다.

[0220] 아지드 기는 생체 오르토고날 반응성의 대체 모드를 갖는다: 휘스겐에 의해 설명된 알킨을 사용한 [3+2] 고리 부가 반응. 고전적인 형태에서, 이 반응은 합리적인 반응 속도를 위해 높은 온도(또는 압력)가 필요하기 때문에 생물학적 시스템에서 제한적으로 적용된다. 샤프레스(Sharpless)와 동료들은 생리학적 온도에서 및 기능이 풍부한 생물학적 환경에서 쉽게 진행되는 "클릭 화학"으로 명명된 구리(I) 촉매 버전의 개발로 상기 장애물을 극복하였다. 이 발견은 복잡한 조직 용해물에서 바이러스 입자, 핵산 및 단백질의 선택적 변형을 가능하게 하였다. 불행히도, 필수 구리 촉매는 박테리아 세포와 포유동물 세포 둘 모두에 독성이 있고, 따라서 세포가 생존 가능해야 하는 적용을 배제한다. 전자를 끌어 당기는 치환체에 의해 활성화된 알킨의 무촉매 휘스겐 고리 부가 반응은 주변 온도에서 발생하는 것으로 보고되었다. 그러나, 이러한 화합물은 생물학적 친핵체와 마이클(Michael) 반응을 겪는다.

[0221] 한 실시양태에서, 비천연 아미노산(예를 들어, p-(프로파르길옥시)-페닐알라닌)을 포함하는 IL-2의 조성물이 제공된다. 또한, p-(프로파르길옥시)-페닐알라닌 및 단백질 및/또는 세포(이를 포함하지만 이들로 제한되지 않음)를 포함하는 다양한 조성물이 제공된다. 한 측면에서, 상기 p-(프로파르길옥시)-페닐알라닌 비천연 아미노산을 포함하는 조성물은 오르토고날 tRNA를 추가로 포함한다. 상기 비천연 아미노산은 아미노-아실 결합을 통해 오르토고날 tRNA에 공유 결합되는 것, 오르토고날 tRNA의 말단 리보스 당의 3' OH 또는 2' OH에 공유 결합되는 것 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 상기 오르토고날 tRNA에 결합(공유 결합을 포함하지만 이로 제한되지 않음)될 수 있다.

[0222] 비천연 아미노산을 통해 단백질로 도입될 수 있는 화학적 모이어티는 단백질의 다양한 이점 및 조작을 제공한다. 예를 들어, 케토 작용기는 그 특유의 반응성으로 인해 시험관 내에서 및 생체 내에서 다수의 하이드라진 또는 하이드록실아민 함유 시약 중 임의의 것에 의한 단백질의 선택적 변형을 가능하게 한다. 예를 들어, 무거운 원자 비천연 아미노산이 X선 구조 데이터의 페이징(phasing)에 유용할 수 있다. 비천연 아미노산을 사용하는 무거운 원자의 부위 특이적 도입은 또한 무거운 원자의 위치를 선택함에 있어서 선택성 및 융통성을 제공한다. 예를 들어, 광반응성 비천연 아미노산(벤조페논 및 아릴아지드(페닐아지드를 포함하지만 이로 제한되지 않음) 측쇄를 갖는 아미노산을 포함하지만 이로 제한되지 않음)은 단백질의 생체내 및 시험관내 광교결합이 효율적으로 이루어지게 한다. 광반응성 비천연 아미노산의 예로는 p-아지도-페닐알라닌 및 p-벤조일-페닐알라닌을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 그 후, 광반응성 비천연 아미노산을 갖는 단백질은 광반응성 기를 제공하는 일시적 제어물의 여기에 의해 선택적으로 광교결합될 수 있다. 일례로서, 비천연 아미노의 메틸기는 핵 자기 공명 및 진동 분광분석법의 이용을 포함하지만 이로 제한되지 않는 방법에 의해 국소 구조 및 역학의 프로브로서, 동위원소로 표지된 메틸기를 포함하지만 이로 제한되지 않는 기로 치환될 수 있다. 예를 들어, 알킬닐 또는 아지도 작용기는 [3+2] 고리 부가 반응을 통해 분자에 의한 단백질의 선택적 변형을 가능하게 한다.

[0223] 폴리펩타이드의 아미노 말단에 도입되는 비천연 아미노산은 20개의 천연 아미노산에서 사용되는 것이 아닌 다른 임의의 치환체인 R 기, 및 α-아미노산에 일반적으로 존재하는 NH₂ 기와는 상이한 제2의 반응성 기로 이루어질 수 있다(화학식 I 참조). 유사한 비천연 아미노산이 α-아미노산에 일반적으로 존재하는 COOH 기와는 상이한 제2의 반응성 기에 의해 카르복시 말단에 도입될 수 있다(화학식 I 참조).

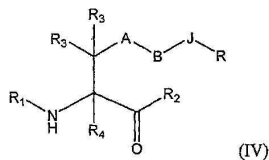
[0224] 본 발명의 비천연 아미노산은 20개의 천연 아미노산에서 이용되지 않는 추가의 특성을 제공하도록 선택 또는 설계될 수 있다. 예를 들어, 비천연 아미노산은 선택적으로, 예를 들어 이들이 도입되는 단백질의 생물학적 특성을 변경하도록 설계 또는 선택될 수 있다. 예를 들어, 비천연 아미노산을 단백질 내로 포함시킴으로써 하기 특성들을 선택적으로 변경할 수 있다: 독성, 생체내 분포, 용해도, 안정성, 예를 들어, 열 안정성, 가수분해 안정성, 산화 안정성, 효소 분해에 대한 내성 등, 정제 및 가공의 용이성, 구조적 특성, 분광학적 특성, 화학적 및/또는 광화학적 특성, 촉매 활성, 산화환원 전위, 반감기, 다른 분자와 반응할 수 있는 능력(예를 들어, 공유 또는 비공유적으로) 등.

[0225] 일부 실시양태에서, 본 발명은 옥심 결합에 의해 수용성 중합체(예를 들어, PEG)에 연결된 IL-2를 제공한다. 많은 유형의 비천연적으로 코딩된 아미노산이 옥심 결합의 형성에 적합하다. 이들은 카르보닐, 디카르보닐, 또는 하이드록실아민 기를 포함하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 상기 아

미노산은 본 명세서에 그 전체가 참고로 포함하는 미국 특허 출원 공개 제2006/0194256호, 제2006/0217532호, 및 제2006/0217289호, 및 WO 2006/069246(발명의 명칭: "Compositions containing, methods involving, and uses of non-natural amino acids and polypeptides)에 기재되어 있다. 비천연적으로 코딩된 아미노산은 또한 본 명세서에서 참고로 포함하는 미국 특허 제7,083,970호 및 미국 특허 제7,045,337호에도 기재되어 있다.

[0226] 본 발명의 일부 실시양태는 하나 이상의 위치에서 파라-아세틸페닐알라닌 아미노산으로 치환된 IL-2 폴리펩타이드를 이용한다. p-아세틸-(+/-)-페닐알라닌 및 m-아세틸-(+/-)-페닐알라닌의 합성은 본 명세서에 참고로 포함하는 문헌 [Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003)]에 기재되어 있다. 다른 카르보닐- 또는 디카르보닐 함유 아미노산도 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 유사하게 제조할 수 있다. 또한, 본원에 포함되는 비천연 아미노산의 비제한적인 예시적 합성은 본 명세서에 그 전체가 참고로 포함되는 미국 특허 제7,083,970호의 도 4, 24-34 및 36-39에 제시되어 있다.

[0227] 친전자성 반응성 기를 갖는 아미노산은 특히 친핵성 부가 반응을 통해 분자를 연결하는 다양한 반응을 가능하게 한다. 이러한 친전자성 반응성 기로는 카르보닐기(케톤기 및 디카르보닐기를 포함함), 카르보닐 유사 기(카르보닐기(케토기 및 디카르보닐기를 포함함)와 유사한 반응성을 가지며 카르보닐기와 구조적으로 유사함), 마스킹된 카르보닐기(카르보닐기(케토기 및 디카르보닐기를 포함함)로 용이하게 전환될 수 있음), 또는 보호된 카르보닐기(탈보호시 카르보닐기(케토기 및 디카르보닐기를 포함함)와 유사한 반응성을 가짐)를 포함한다. 이러한 아미노산은 하기 화학식 (IV)의 구조를 갖는 아미노산을 포함한다:

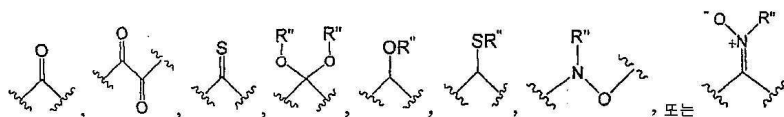


[0228]

[0229] 상기 식에서,

[0230] A는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알킬닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0231] B는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, -O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, -S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S(O)_k-(여기서, k는 1, 2 또는 3임), -S(O)_k(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)-, -C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(S)-, -C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')-, -NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N=N-, -C(R')₂-N=N- 및 -C(R')₂-N(R')-N(R')-(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 링커이며;



[0232] J는 이고;

[0233] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0234] 각각의 R''은 독립적으로 H, 알킬, 치환된 알킬, 또는 보호기이거나, 또는 1개보다 많은 R'' 기가 존재할 경우, 2개의 R''이 선택적으로 헤테로사이클로알킬을 형성하며;

[0235] R₁은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0236] R_2 는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이며;

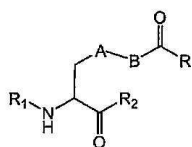
[0237] R_3 및 R_4 는 각각 독립적으로 H, 할로젠, 저급 알킬, 또는 치환된 저급 알킬이거나, 또는 R_3 과 R_4 , 또는 2개의 R_3 기가 선택적으로 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬을 형성하거나; 또는

[0238] -A-B-J-R 기가 함께 디카르보닐기, 보호된 디카르보닐기를 비롯한 보호된 카르보닐기, 또는 마스킹된 디카르보닐기를 비롯한 마스킹된 카르보닐기를 비롯한 적어도 하나의 카르보닐기를 포함하는 비사이클릭 또는 트리사이클릭 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬을 형성하거나; 또는

[0239] -J-R 기가 함께 디카르보닐기, 보호된 디카르보닐기를 비롯한 보호된 카르보닐기, 또는 마스킹된 디카르보닐기를 비롯한 마스킹된 카르보닐기를 비롯한 적어도 하나의 카르보닐기를 포함하는 모노사이클릭 또는 비사이클릭 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬을 형성하지만;

[0240] A가 페닐렌이고 각각의 R_3 이 H인 경우에 B가 존재하고; A가 $-(CH_2)_4$ 이고 각각의 R_3 이 H인 경우에 B는 $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$ 가 아니며; A와 B가 존재하지 않고 각각의 R_3 이 H인 경우, R은 메틸이 아니다.

[0241] 또한, 하기 화학식 (V)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0242]

[0243] 여기서, A는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0244] B는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, -O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, -S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-S(O)_k$ -(여기서, k는 1, 2 또는 3임), $-S(O)_k$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-C(O)-$, $-C(O)-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-C(S)-$, $-C(S)-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-N(R')-$, $-NR'-($ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-C(O)N(R')-$, $-CON(R')-($ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-CSN(R')-$, $-CSN(R')-($ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-N(R')CO-($ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_kN(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(S)N(R')-$, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, $-N(R')=N-$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')-$, $-C(R')=N=N-$, $-C(R')_2-N=N-$ 및 $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$ (여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 링커이며;

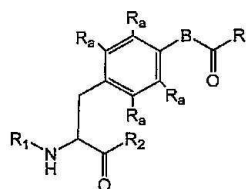
[0245] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0246] R_1 은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0247] R_2 는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이지만;

[0248] A가 페닐렌인 경우에 B가 존재하고; A가 $-(CH_2)_4$ 인 경우에 B는 $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$ 가 아니며; A와 B가 존재하지 않을 경우, R은 메틸이 아니다.

[0249] 또한, 하기 화학식 (VI)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



(VI)

상기 식에서,

B는 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, -O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, -S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S(O)_k-(여기서, k는 1, 2 또는 3임), -S(O)_k(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)-, -C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(S)-, -C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')-, -NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N-N=, -C(R')₂-N=N- 및 -C(R')₂-N(R')-N(R')-(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 링 커이며;

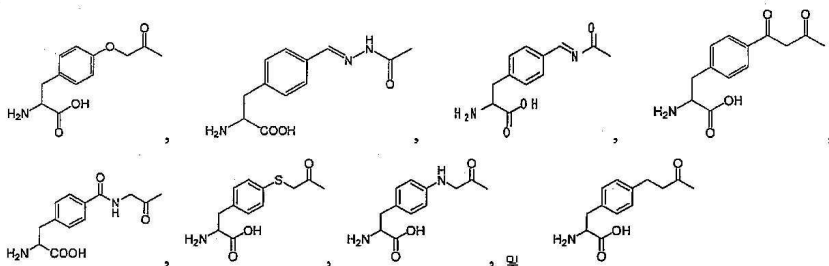
R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

R₁은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

R₂는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

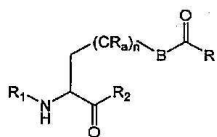
각각의 R_a는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, -N(R')₂, -C(O)_kR'(여기서, k는 1, 2 또는 3임), -C(O)N(R')₂, -OR' 및 -S(O)_kR'(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

또한, 다음 아미노산이 포함된다:



여기서, 상기 화합물은 선택적으로 아미노 보호된 기, 카르복실 보호된 기 또는 이들의 염이다. 또한, 하기 비천연 아미노산 중 임의의 것이 비천연 아미노산 폴리펩타이드 내에 도입될 수 있다.

또한, 하기 화학식 (VII)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



(VII)

상기 식에서,

B는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, -O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, -S-(알

킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-S(O)_k-$ (여기서, k 는 1, 2 또는 3임), $-S(O)_k$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-C(O)-$, $-C(O)-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-C(S)-$, $-C(S)-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-N(R')-$, $-NR'-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-C(O)N(R')-$, $-CON(R')-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-CSN(R')-$, $-CSN(R')-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-N(R')CO-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_kN(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(S)N(R')-$, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, $-N(R')-N=$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')-$, $-C(R')=N=N=$, $-C(R')_2=N=N-$ 및 $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$ (여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 링커이며;

[0264] R 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0265] R_1 은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

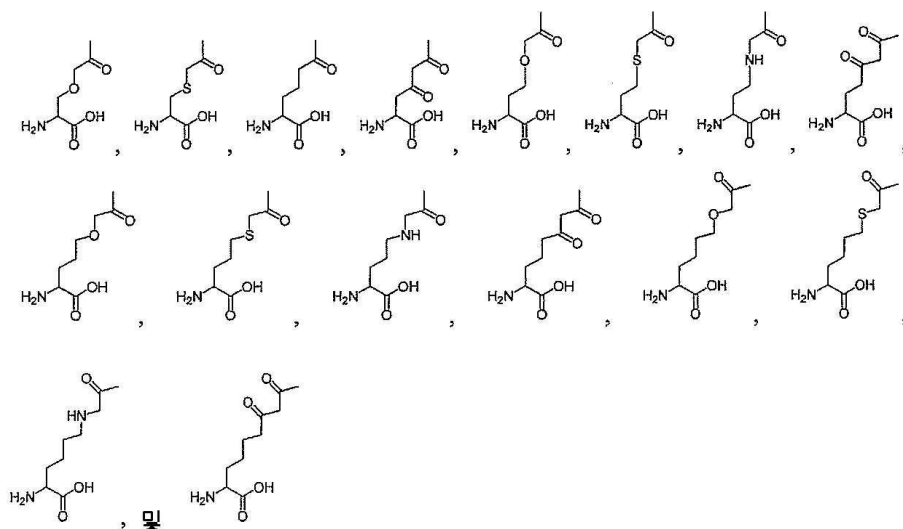
[0266] R_2 는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0267] 각각의 R_a 는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ (여기서, k 는 1, 2 또는 3임), $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$ 및 $-S(O)_kR'$ (여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

[0268] n 은 0 내지 8이지만;

[0269] A 가 $-(CH_2)_4-$ 인 경우, B 는 $-NHC(O)(CH_2CH_2)-$ 가 아니다.

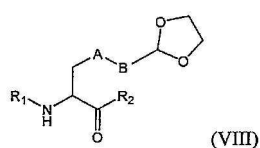
[0270] 또한, 다음 아미노산이 포함된다:



[0271]

[0272] 여기서, 상기 화합물들은 선택적으로 아미노 보호된 것, 선택적으로 카르복실 보호된 것, 선택적으로 아미노 보호 및 카르복실 보호된 것, 또는 이들의 염이다. 또한, 이러한 비천연 아미노산 및 하기 비천연 아미노산 중 임의의 것이 비천연 아미노산 폴리펩타이드 내에 도입될 수 있다.

[0273] 또한, 하기 화학식 (VIII)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0274]

[0275] 여기서, A 는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬

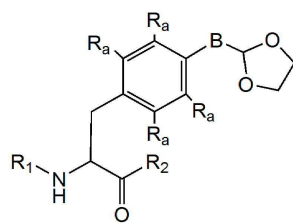
렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0276] B는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, $-O-$, $-O-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-S-$, $-S-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-S(O)_k-$ (여기서, k 는 1, 2 또는 3임), $-S(O)_k$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-C(O)-$, $-C(O)-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-C(S)-$, $-C(S)-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-N(R')-$, $-NR'-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-C(O)N(R')-$, $-CON(R')-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-CSN(R')-$, $-CSN(R')-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-N(R')CO-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_kN(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(S)N(R')-$, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, $-N(R')-N=$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')-$, $-C(R')=N=N-$, $-C(R')_2-N=N-$ 및 $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$ (여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 링커이며;

[0277] R_1 은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0278] R_2 는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이다.

[0279] 또한, 하기 화학식 (IX)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0280]

[0281] B는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, $-O-$, $-O-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-S-$, $-S-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-S(O)_k-$ (여기서, k 는 1, 2 또는 3임), $-S(O)_k$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-C(O)-$, $-C(O)-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-C(S)-$, $-C(S)-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-N(R')-$, $-NR'-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-C(O)N(R')-$, $-CON(R')-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-CSN(R')-$, $-CSN(R')-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-N(R')CO-$ (알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, $-N(R')C(O)O-$, $-S(O)_kN(R')-$, $-N(R')C(O)N(R')-$, $-N(R')C(S)N(R')-$, $-N(R')S(O)_kN(R')-$, $-N(R')-N=$, $-C(R')=N-$, $-C(R')=N-N(R')-$, $-C(R')=N=N-$, $-C(R')_2-N=N-$ 및 $-C(R')_2-N(R')-N(R')-$ (여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 링커이며;

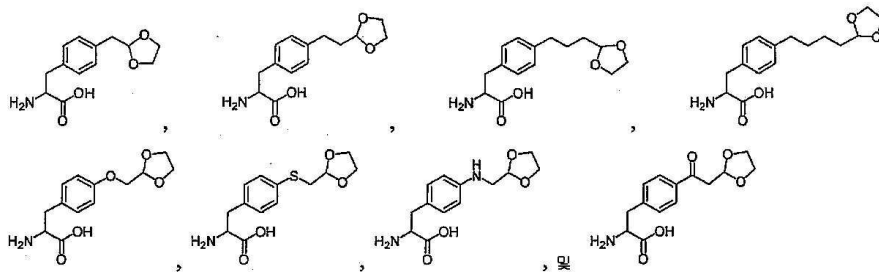
[0282] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0283] R_1 은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0284] R_2 는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0285] 각각의 R_a 는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, $-N(R')_2$, $-C(O)_kR'$ (여기서, k 는 1, 2 또는 3임), $-C(O)N(R')_2$, $-OR'$ 및 $-S(O)_kR'$ (여기서, 각각의 R' 은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

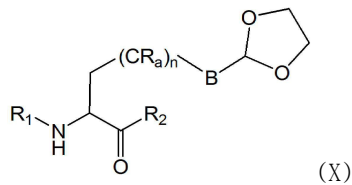
[0286] 또한, 다음 아미노산이 포함된다:



[0287]

[0288] 여기서, 상기 화합물들은 선택적으로 아미노 보호된 것, 선택적으로 카르복실 보호된 것, 선택적으로 아미노 보호 및 카르복실 보호된 것, 또는 이들의 염이다. 또한, 이러한 비천연 아미노산 및 하기 비천연 아미노산 중 임의의 것이 비천연 아미노산 폴리펩타이드 내로 도입될 수 있다.

[0289] 또한, 하기 화학식 (X)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0290]

[0291] 상기 식에서,

[0292] B는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, -O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, -S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S(O)_k-(여기서, k는 1, 2 또는 3임), -S(O)_k(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)-, -C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(S)-, -C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')-, -NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N=N-, -C(R')₂-N=N- 및 -C(R')₂-N(R')-N(R')-(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 링커이며;

[0293] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

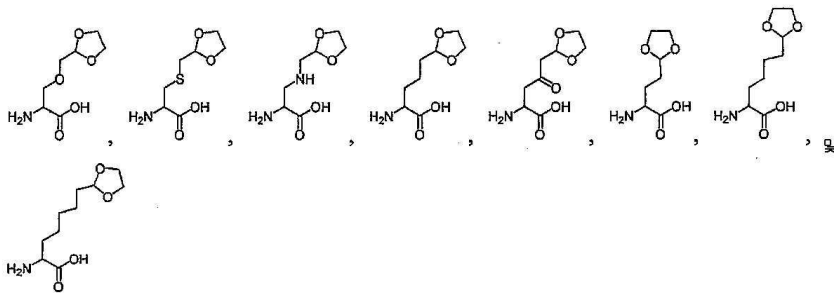
[0294] R₁은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0295] R₂는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0296] 각각의 R_a는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, -N(R')₂, -C(O)_kR'(여기서, k는 1, 2 또는 3임), -C(O)N(R')₂, -OR' 및 -S(O)_kR'(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

[0297] n은 0 내지 8이다.

[0298] 또한, 다음 아미노산이 포함된다:

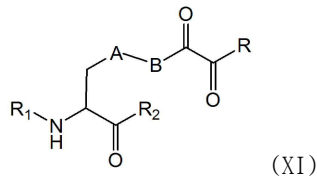


[0299]

[0300] 여기서, 상기 화합물들은 선택적으로 아미노 보호된 것, 선택적으로 카르복실 보호된 것, 선택적으로 아미노 보호 및 카르복실 보호된 것, 또는 이들의 염이다. 또한, 이러한 비천연 아미노산 및 하기 비천연 아미노산 중 임의의 것이 비천연 아미노산 폴리펩타이드 내로 도입될 수 있다.

[0301] 모노카르보닐 구조 이외에, 본 명세서에서 설명되는 비천연 아미노산은 디카르보닐기, 디카르보닐 유사 기, 마스킹된 디카르보닐기 및 보호된 디카르보닐기와 같은 기를 포함할 수 있다.

[0302] 예를 들어, 하기 화학식 (XI)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0303]

[0304] 여기서, A는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

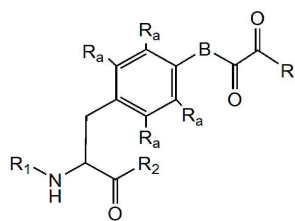
[0305] B는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, -O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, -S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S(O)_k-(여기서, k는 1, 2 또는 3임), -S(O)_k(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)-, -C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(S)-, -C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')-, -NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N=N-, -C(R')₂-N=N- 및 -C(R')₂-N(R')-N(R')-(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 링커이며;

[0306] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0307] R₁은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0308] R₂는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이다.

[0309] 또한, 하기 화학식 (XII)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



(XII)

상기 식에서,

B는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, -O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, -S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S(O)_k-(여기서, k는 1, 2 또는 3임), -S(O)_k(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)-, -C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(S)-, -C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')-, -NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N=N-, -C(R')₂-N=N- 및 -C(R')₂-N(R')-N(R')-(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 링커이며;

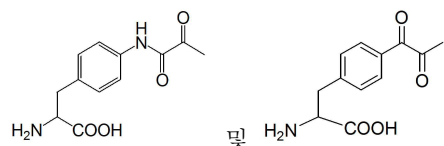
R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

R₁은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

R₂는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

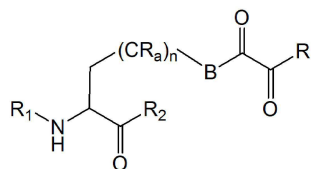
각각의 R_a는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, -N(R')₂, -C(O)_kR'(여기서, k는 1, 2 또는 3임), -C(O)N(R')₂, -OR' 및 -S(O)_kR'(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

또한, 다음 아미노산이 포함된다:



여기서, 상기 화합물들은 선택적으로 아미노 보호된 것, 선택적으로 카르복실 보호된 것, 선택적으로 아미노 보호 및 카르복실 보호된 것, 또는 이들의 염이다. 또한, 이러한 비천연 아미노산 및 하기 비천연 아미노산 중 임의의 것이 비천연 아미노산 폴리펩타이드 내로 도입될 수 있다.

또한, 하기 화학식 (XIII)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



(XIII)

상기 식에서,

B는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 저급 헤테로알킬렌, -O-, -O-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S-, -S-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -S(O)_k-(여기서, k는 1, 2 또는 3임), -S(O)_k(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-,

-C(O)-, -C(O)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(S)-, -C(S)-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')-, -NR'-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -C(O)N(R')-, -CON(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -CSN(R')-, -CSN(R')-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')CO-(알킬렌 또는 치환된 알킬렌)-, -N(R')C(O)O-, -S(O)_kN(R')-, -N(R')C(O)N(R')-, -N(R')C(S)N(R')-, -N(R')S(O)_kN(R')-, -N(R')-N=, -C(R')=N-, -C(R')=N-N(R')-, -C(R')=N=N-, -C(R')₂-N=N- 및 -C(R')₂-N(R')-N(R')-(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 링커이며;

[0324] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

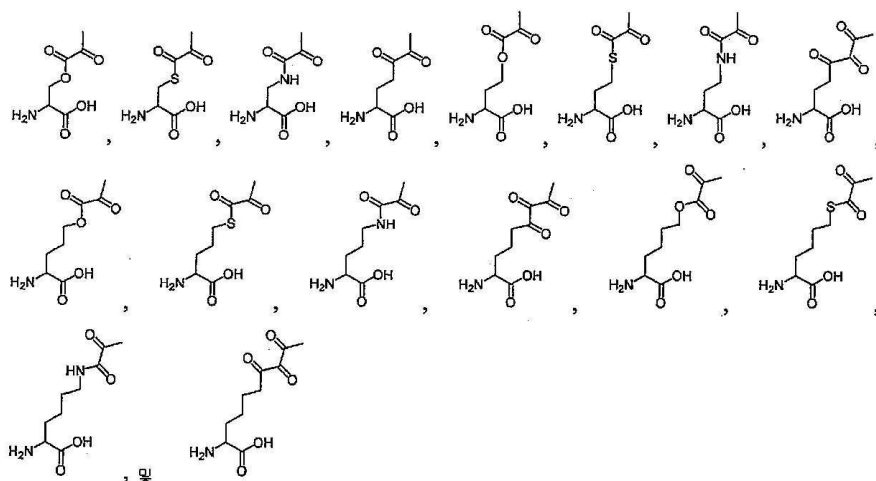
[0325] R₁은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0326] R₂는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0327] 각각의 R_a는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, -N(R')₂, -C(O)_kR'(여기서, k는 1, 2 또는 3임), -C(O)N(R')₂, -OR' 및 -S(O)_kR'(여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬임)으로 이루어지는 군으로부터 선택되고;

[0328] n은 0 내지 8이다.

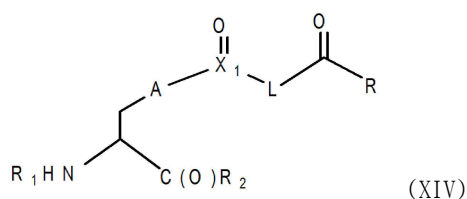
[0329] 또한, 다음 아미노산이 포함된다:



[0330] , 및

[0331] 여기서, 상기 화합물들은 선택적으로 아미노 보호된 것, 선택적으로 카르복실 보호된 것, 선택적으로 아미노 보호 및 카르복실 보호된 것, 또는 이들의 염이다. 또한, 이러한 비천연 아미노산 및 하기 비천연 아미노산 중 임의의 것이 비천연 아미노산 폴리펩타이드 내로 도입될 수 있다.

[0332] 또한, 하기 화학식 (XIV)의 구조를 갖는 다음과 같은 아미노산이 포함된다:



[0333]

[0334] 여기서,

[0335] A는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0336] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

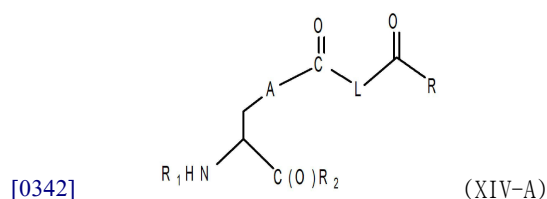
[0337] R₁은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0338] R₂는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0339] X₁은 C, S, 또는 S(O)이고;

[0340] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이고, 여기서 R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0341] 또한, 하기 화학식 (XIV-A)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0343] 여기서,

[0344] A는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알킬렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

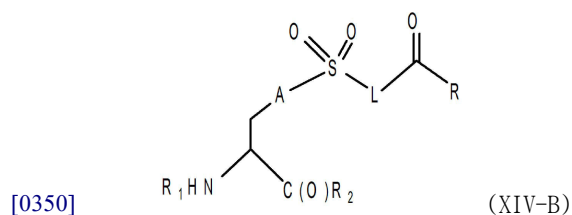
[0345] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0346] R₁은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0347] R₂는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0348] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이고, 여기서 R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0349] 또한, 하기 화학식 (XIV-B)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0351] 여기서,

[0352] A는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알킬렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

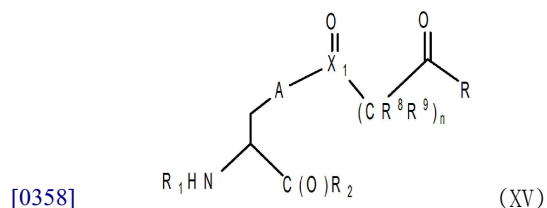
[0353] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0354] R₁은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0355] R_2 는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0356] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, $N(R')$ (알킬렌) 또는 $N(R')$ (치환된 알킬렌)이고, 여기서 R' 은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0357] 또한, 하기 화학식 (XV)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0359] 여기서,

[0360] A는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0361] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0362] R_1 은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

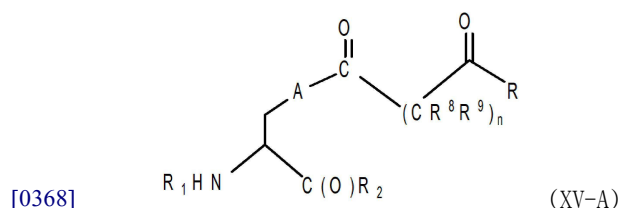
[0363] R_2 는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0364] X_1 은 C, S, 또는 S(O)이고;

[0365] n은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고;

[0366] 각각의 CR^8R^9 기 상의 각각의 R^8 및 R^9 는 H, 알콕시, 알킬아민, 할로젠, 알킬, 아릴로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 임의의 R^8 및 R^9 는 함께 =O 또는 사이클로알킬을 형성할 수 있거나, 또는 임의의 인접한 R^8 기가 함께 사이클로알킬을 형성할 수 있다.

[0367] 또한, 하기 화학식 (XV-A)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0369] 여기서,

[0370] A는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0371] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

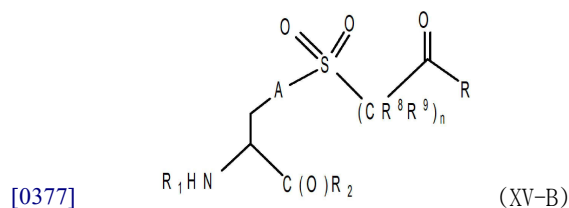
[0372] R_1 은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0373] R_2 는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0374] n 은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고;

[0375] 각각의 CR^8R^9 기 상의 각각의 R^8 및 R^9 는 H, 알콕시, 알킬아민, 할로젠, 알킬, 아릴로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 임의의 R^8 및 R^9 는 함께 =O 또는 사이클로알킬을 형성할 수 있거나, 또는 임의의 인접한 R^8 기가 함께 사이클로알킬을 형성할 수 있다.

[0376] 또한, 하기 화학식 (XV-B)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0378] 여기서,

[0379] A는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0380] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

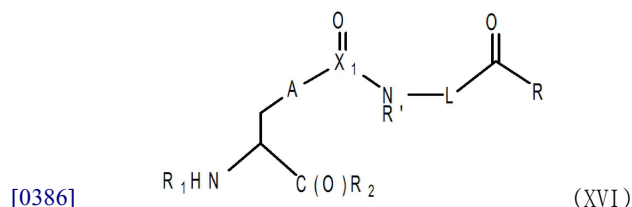
[0381] R_1 은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0382] R_2 는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0383] n 은 0, 1, 2, 3, 4 또는 5이고;

[0384] 각각의 CR^8R^9 기 상의 각각의 R^8 및 R^9 는 H, 알콕시, 알킬아민, 할로젠, 알킬, 아릴로 이루어지는 군으로부터 독립적으로 선택되거나, 또는 임의의 R^8 및 R^9 는 함께 =O 또는 사이클로알킬을 형성할 수 있거나, 또는 임의의 인접한 R^8 기가 함께 사이클로알킬을 형성할 수 있다.

[0385] 또한, 하기 화학식 (XVI)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0387] 여기서,

[0388] A는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

[0389] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0390] R_1 은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드

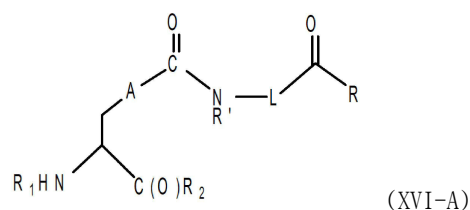
이드이고;

[0391] R_2 는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0392] X_1 은 C, S, 또는 S(O)이고;

[0393] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이고, 여기서 R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0394] 또한, 하기 화학식 (XVI-A)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0396] 여기서,

[0397] A는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

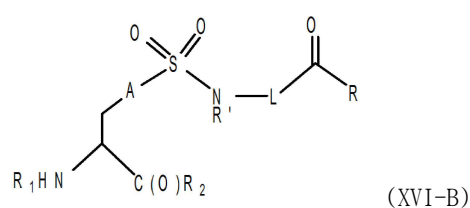
[0398] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0399] R_1 은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0400] R_2 는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0401] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이고, 여기서 R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0402] 또한, 하기 화학식 (XVI-B)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0404] 여기서,

[0405] A는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, 저급 알킬렌, 치환된 저급 알킬렌, 저급 사이클로알킬렌, 치환된 저급 사이클로알킬렌, 저급 알케닐렌, 치환된 저급 알케닐렌, 알키닐렌, 저급 헤테로알킬렌, 치환된 헤테로알킬렌, 저급 헤테로사이클로알킬렌, 치환된 저급 헤테로사이클로알킬렌, 아릴렌, 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 치환된 헤테로아릴렌, 알카릴렌, 치환된 알카릴렌, 아랄킬렌, 또는 치환된 아랄킬렌이고;

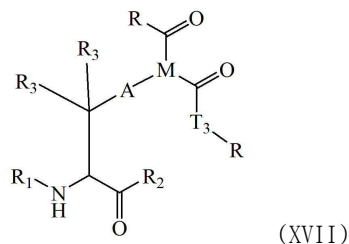
[0406] R은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

[0407] R_1 은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

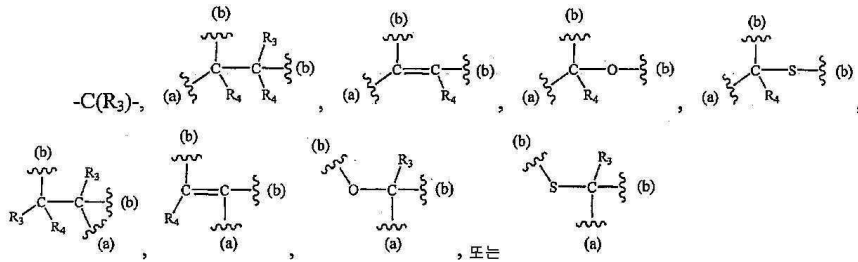
[0408] R_2 는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0409] L은 알킬렌, 치환된 알킬렌, N(R')(알킬렌) 또는 N(R')(치환된 알킬렌)이고, 여기서 R'은 H, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0410] 또한, 하기 화학식 (XVII)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0424] M은



[0425] 이고,

[0426] 여기서, (a)는 A 기에 대한 결합을 나타내고, (b)는 각각의 카르보닐기에 대한 결합을 나타내며, R₃ 및 R₄는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬로부터 선택되거나, 또는 R₃과 R₄, 또는 2개의 R₃ 기 또는 2개의 R₄ 기가 선택적으로 사이클로알킬 또는 헤테로사이클로알킬을 형성하고;

[0427] R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이며;

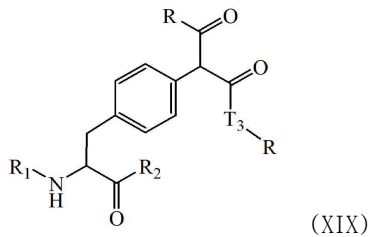
[0428] T₃은 결합, C(R)(R), O, 또는 S이고, R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬, 또는 치환된 사이클로알킬이고;

[0429] R₁은 선택적인 것으로서, 존재할 경우, H, 아미노 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0430] R₂는 선택적인 것으로서, 존재할 경우, OH, 에스테르 보호기, 수지, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 폴리뉴클레오타이드이고;

[0431] 각각의 R_a는 독립적으로 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, -N(R')₂, -C(O)_kR' (여기서, k는 1, 2 또는 3임), -C(O)N(R')₂, -OR' 및 -S(O)_kR'로 이루어지는 군으로부터 선택되고, 여기서, 각각의 R'은 독립적으로 H, 알킬, 또는 치환된 알킬이다.

[0432] 또한, 하기 화학식 (XIX)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:

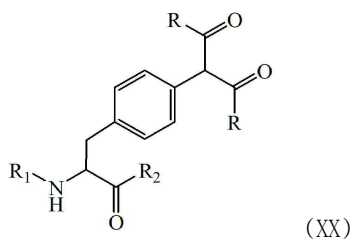


[0433] 여기서,

[0435] R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이고;

[0436] T₃은 O, 또는 S이다.

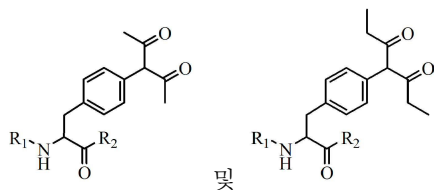
[0437] 또한, 하기 화학식 (XX)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0438] 여기서,

[0440] R은 H, 할로젠, 알킬, 치환된 알킬, 사이클로알킬 또는 치환된 사이클로알킬이다.

[0441] 또한, 하기 화학식 (XXI)의 구조를 갖는 아미노산이 포함된다:



[0442]

[0443] 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드는 반응성 카르보닐 또는 디카르보닐 작용기를 생성하도록 화학적으로 변형된다. 예를 들어, 접합 반응에 유용한 알데하이드 작용기는 인접 아미노 및 하이드록실기를 갖는 작용기로부터 생성될 수 있다. 상기 생물학적 활성 분자가 폴리펩타이드일 경우, 예를 들어, N 말단 세린 또는 트레오닌(정상적으로 존재할 수 있거나 화학적 또는 효소적 분해를 통해 노출될 수 있음)이, 과요오드산염을 사용한 온건한 산화적 절단 조건 하에 알데하이드 작용기를 생성시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Gaertner, et. al., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992)]; [Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992)]; [Gaertner et al., J. Biol. Chem. 269:7224-7230 (1994)]을 참조한다. 그러나, 관련 기술 분야에 공지된 방법은 펩타이드 또는 단백질의 N 말단의 아미노산에 국한된다.

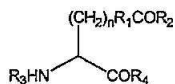
[0444] 본 발명에서, 인접 하이드록실 및 아미노기를 갖는 비천연 아미노산이 "마스킹된" 알데하이드 작용기로서 폴리펩타이드 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 5-하이드록시라이신은 엡실론 아민에 인접하게 하이드록실기를 보유한다. 상기 알데하이드를 생성하기 위한 반응 조건은 일반적으로 폴리펩타이드 내의 다른 부위에서의 산화를 피하기 위해 온건한 조건 하에 물 과량의 메타과요오드산나트륨을 첨가하는 것을 포함한다. 산화 반응의 pH는 일반적으로 약 7.0이다. 전형적인 반응은 폴리펩타이드의 완충된 용액에 약 1.5배 물 과량의 메타과요오드산나트륨을 첨가한 후, 약 10분 동안 암소에서 인큐베이팅하는 것을 포함한다. 이에 대해서는, 예를 들어, 미국 특허 제6,423,685호를 참조한다.

[0445] 상기 카르보닐 또는 디카르보닐 작용기는 수용액 중에서 온건한 조건 하에 하이드록실아민 함유 시약과 선택적으로 반응하여, 생리학적 조건 하에서 안정한 상응하는 옥심 연결을 형성할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959)]; [Shao, J. and Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)]을 참조한다. 또한, 상기 카르보닐기 또는 디카르보닐기는 그 특유의 반응성으로 인해, 다른 아미노산 측쇄의 존재 하에서의 선택적인 변형이 가능하다. 이에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Cornish, V. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996)]; [Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992)]; [Mahal, L. K., et al., Science 276:1125-1128 (1997)]을 참조할 수 있다.

[0446] A. 카르보닐 반응성 기

[0447] 카르보닐 반응성 기를 갖는 아미노산은 특히 친핵성 부가 반응 또는 알돌 축합 반응을 통해 분자(PEG 또는 다른 수용성 분자를 포함하지만 이들로 제한되지 않음)를 연결하는 다양한 반응을 가능하게 한다.

[0448] 대표적인 카르보닐 함유 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다:



[0449]

[0450] 상기 식에서, n은 0-10이고; R1은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이며; R2는 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴이고; R3은 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 아미노 말단 변형기이며; R4는 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 카르복시 말단 변형기이다. 일부 실시양태에서, n은 1이고, R1은 페닐이며, R2는 간단한 알킬(즉, 메틸, 에틸, 또는 프로필)이고, 케톤 모이어티는 알킬 측쇄에 대해 파라 위치에 위치한다. 일부 실시양태에서, n은 1이고, R1은 페닐이며, R2는 간단한 알킬(즉, 메틸, 에틸, 또는 프로필)이고, 케톤 모이어티는 알킬 측쇄에 대해 메타 위치에 위치한다.

[0451] p-아세틸-(+/-)-페닐알라닌 및 m-아세틸-(+/-)-페닐알라닌의 합성은 본 명세서에서 참고로 포함되는 문헌 [Zhang, Z., et al., Biochemistry 42: 6735-6746 (2003)]에 기재되어 있다. 다른 카르보닐 함유 아미노산도 관련 기술 분야의 통상의 기술에 의해 유사하게 제조될 수 있다.

[0452] 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드는 반응성 카르보닐 작용기를 생성하도록 화학적으로 변형된다. 예를 들어, 접합 반응에 유용한 알데하이드 작용기는 인접 아미노 및 하이드록실기를 갖는 작용기로부터 생성될 수 있다. 상기 생물학적 활성 분자가 폴리펩타이드일 경우, 예를 들어, N 말단 세린 또는 트레오닌(정상적으로 존재할 수 있거나 화학적 또는 효소적 분해를 통해 노출될 수 있음)이, 과요오드산염을 사용한 온건한 절단 조건 하에 알데하이드 작용기를 생성시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Gaertner, et al., Bioconjug. Chem. 3: 262-268 (1992)]; [Geoghegan, K. & Stroh, J., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992)]; [Gaertner et al., J. Biol. Chem. 269:7224-7230 (1994)]을 참조한다. 그러나, 관련 기술 분야에 공지된 방법은 펩타이드 또는 단백질의 N 말단의 아미노산에 국한된다.

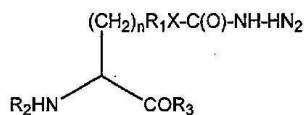
[0453] 본 발명에 있어서, 인접 하이드록실 및 아미노 기를 갖는 비천연적으로 코딩된 아미노산이 "마스킹된" 알데하이드 작용기로서 폴리펩타이드 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 5-하이드록시라이신은 엡실론 아민에 인접하게 하이드록실기를 보유한다. 상기 알데하이드를 생성하기 위한 반응 조건은 일반적으로 폴리펩타이드 내의 다른 부위에서의 산화를 피하기 위해 온건한 조건 하에서 물 과량의 메타과요오드산나트륨을 첨가하는 것을 포함한다. 산화 반응의 pH는 일반적으로 약 7.0이다. 전형적인 반응은 폴리펩타이드의 완충된 용액에 약 1.5배 물 과량의 메타과요오드산나트륨을 첨가한 후, 약 10분 동안 암소에서 인큐베이팅하는 것을 포함한다. 예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제6,423,685호를 참조한다.

[0454] 상기 카르보닐 또는 디카르보닐 작용기는 수용액 중에서 온건한 조건 하에 하이드라진, 하이드라지드, 하이드록실아민 또는 세미카르바지드 함유 시약과 선택적으로 반응하여, 각각 생리학적 조건 하에서 안정한 상응하는 하이드라존, 옥심 또는 세미카르바존 연결을 형성할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Jencks, W. P., J. Am. Chem. Soc. 81, 475-481 (1959)]; [Shao, J. and Tam, J. P., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)]을 참조한다. 또한, 상기 카르보닐기는 그 특유의 반응성으로 인해, 다른 아미노산 측쇄의 존재 하에서의 선택적인 변형이 가능하다. 예를 들어 문헌 [Cornish, V. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 118:8150-8151 (1996)]; [Geoghegan, K. F. & Stroh, J. G., Bioconjug. Chem. 3:138-146 (1992)]; [Mahal, L. K., et al., Science 276:1125-1128 (1997)]을 참조한다.

[0455] B. 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바지드 반응성 기

[0456] 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바지드와 같은 친핵성 기를 포함하는 비천연적으로 코딩된 아미노산은 다양한 친전자성 기와 반응하여 접합체(PEG 또는 다른 수용성 중합체를 포함하지만, 이들로 제한되지 않음)를 형성할 수 있게 한다.

[0457] 예시적인 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바지드 함유 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다:



[0458]

[0459] 상기 식에서, n은 0-10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이거나, 존재하지 않으며; X는 O, N, 또는 S이거나, 존재하지 않고; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 아미노 말단 변형기이며; R₃은 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 카르복시 말단 변형기이다.

[0460] 일부 실시양태에서, n은 4이고, R₁은 존재하지 않으며, X는 N이다. 일부 실시양태에서, n은 2이고, R₁은 존재하지 않으며, X도 존재하지 않는다. 일부 실시양태에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며, X는 O이고, 산소 원자는 아릴 고리 상의 지방족 기에 대해 para 위치에 위치한다.

[0461] 하이드라지드, 하이드라진 및 세미카르바지드 함유 아미노산은 상업적 공급처로부터 입수할 수 있다. 예를 들어, L-글루타메이트-γ-하이드라지드는 시그마-알드리치(미국 미주리주 세인트루이스 소재)로부터 입수할 수 있다. 상업적으로 입수할 수 없는 다른 아미노산은 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 제조할 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에서 참고로 포함되는 미국 특허 제6,281,211호를 참조한다.

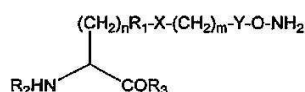
[0462] 하이드라지드, 하이드라진 또는 세미카르바지드 작용기를 보유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드는 알데하이드 또는 유사한 화학적 반응성을 갖는 다른 작용기를 포함하는 다양한 분자와 효율적으로 및 선택적으로 반응할 수 있다. 예를 들어 문헌 [Shao, J. and Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)]을 참조한다. 하이드라지드, 하이드라진 및 세미카르바지드 작용기는 그 특유의 반응성으로 인해, 20개

의 일반적인 아미노산에 존재하는 친핵성 기(세린 또는 트레오닌의 하이드록실기 또는 라이신 및 N 말단의 아미노기를 포함하지만 이들로 제한되지 않음)에 비해 알데하이드, 케톤 및 다른 친전자성 기에 대해 현저히 더 큰 반응성을 갖게 된다.

[0463] C. 아미노옥시 함유 아미노산

[0464] 아미노옥시(하이드록실아민으로도 칭해짐) 기를 포함하는 비천연적으로 코딩된 아미노산은 다양한 친전자성 기와의 반응에 의해 접합체(PEG 또는 다른 수용성 중합체를 포함하지만 이들로 제한되지 않음)를 형성할 수 있게 한다. 하이드라진, 하이드라지드 및 세미카르바지드와 마찬가지로, 아미노옥시기의 증대된 친핵성은, 이것이 알데하이드 또는 유사한 화학적 반응성을 갖는 다른 작용기를 포함하는 다양한 분자와 효율적이고 선택적으로 반응할 수 있게 한다. 예를 들어 문헌 [Shao, J. and Tam, J., J. Am. Chem. Soc. 117:3893-3899 (1995)]; [H. Hang and C. Bertozzi, Acc. Chem. Res. 34: 727-736 (2001)]을 참조한다. 하이드라진기와의 반응에 의해 상응하는 하이드라존이 생성되지만, 아미노옥시기와 카르보닐 함유 기, 예를 들어 케톤의 반응에 의해서는 일반적으로 옥심이 생성된다.

[0465] 아미노옥시기를 포함하는 예시적인 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다:



[0466] 상기 식에서, n은 0-10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이거나, 존재하지 않으며; X는 O, N, S이거나, 존재하지 않으며; m은 0-10이고; Y는 C(O)이거나 존재하지 않으며; R₂는 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 아미노 말단 변형기이고; R₃은 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 카르복시 말단 변형기이다. 일부 실시양태에서, n은 1이고, R₁은 페닐이며, X는 O이고, m은 1이며, Y는 존재한다. 일부 실시양태에서, n은 2이고, R₁ 및 X는 존재하지 않으며, m은 0이고, Y는 존재하지 않는다.

[0468] 아미노옥시 함유 아미노산은 용이하게 입수할 수 있는 아미노산 전구체(호모세린, 세린 및 트레오닌)로부터 제조될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [M. Carrasco and R. Brown, J. Org. Chem. 68: 8853-8858 (2003)]을 참조한다. 특정 아미노옥시 함유 아미노산, 예를 들어 L-2-아미노-4-(아미노옥시)부티르산이 천연 공급원으로부터 단리되었다(Rosenthal, G., Life Sci. 60: 1635-1641 (1997)). 다른 아미노옥시 함유 아미노산은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 제조될 수 있다.

[0469] D. 아지드 및 알킨 반응성 기

[0470] 아지드 및 알킨 작용기는 그 특유의 반응성으로 인해, 폴리펩타이드 및 다른 생물학적 분자의 선택적인 변형에 매우 유용하다. 유기 아지드, 특히 지방족 아지드 및 알킨은 일반적으로 통상적인 반응 화학 조건에 대해 안정하다. 특히, 아지드 작용기와 알킨 작용기는 둘 모두 천연 발생 폴리펩타이드에 존재하는 20개의 일반적인 아미노산의 측쇄(즉, R 기)에 대해 비활성이다. 그러나, 아지드기와 알킨기가 가까이 접하게 될 경우, 이들 기의 "스프링 장작(spring-loaded)" 특성이 나타나고, 이들이 휘스겐 [3+2] 고리 부가 반응을 통해 선택적이고 효율적으로 반응하여 상응하는 트리아졸을 형성한다. 예를 들어, 문헌 [Chin J., et al., Science 301:964-7 (2003)]; [Wang, Q., et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003)]; [Chin, J. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002)]을 참조한다.

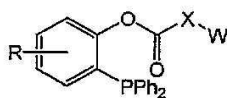
[0471] 상기 휘스겐 고리 부가 반응은 친핵성 치환 반응이 아니라 선택적인 고리 부가 반응을 수반하기 때문에(예를 들어, 문헌 [Padwa, A., in Comprehensive Organic Synthesis, Vol. 4, ed. Trost, B. M., (1991), p. 1069-1109]; [Huisgen, R. in 1,3-Dipolar Cycloaddition Chemistry, ed. Padwa, A., (1984), p. 1-176] 참고), 아지드 및 알킨 함유 측쇄를 보유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산의 도입은, 생성된 폴리펩타이드가 비천연적으로 코딩된 아미노산의 위치에서 선택적으로 변형될 수 있게 한다. 아지드 또는 알킨 함유 IL-2를 수반하는 고리 부가 반응은 계내에서 Cu(II)를 Cu(I)로 환원시키기 위한 환원제의 존재 하에 촉매량의 Cu(II)(촉매량의 CuSO₄의 형태를 포함하지만 이로 제한되지 않음)의 첨가에 의해 수성 조건 하에서 실온에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Wang, Q., et al., J. Am. Chem. Soc. 125, 3192-3193 (2003)]; [Tornøe, C. W., et al., J. Org. Chem. 67:3057-3064 (2002)]; [Rostovtsev, et al., Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596-2599 (2002)]을 참조한다. 예시적인 환원제로는 아스코르베이트, 금속 구리, 퀴닌, 하이드로퀴논, 비타민 K, 글루타티온, 시스테인

인, Fe^{2+} , Co^{2+} 및 인가 전위를 들 수 있으나, 이들에 제한되지 않는다.

[0472] 일부 경우에 있어서, 아지드와 알킬 사이의 휘스젠 [3+2] 고리 부가 반응이 요망되는 경우, IL-2는 알킬 모이더를 포함하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하고, 아미노산에 부착되는 수용성 중합체는 아지드 모이더를 포함한다. 대안적으로, 전환 반응(즉, 아미노산 상의 아지드 모이더 및 수용성 중합체 상의 알킬 모이더와의 반응) 역시 수행될 수 있다.

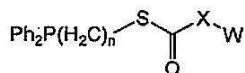
[0473] 상기 아지드 작용기는 또한 아릴 에스테르를 포함하는 수용성 중합체와 선택적으로 반응하고, 아릴 포스핀 모이더에 의해 적절히 작용기화되어 아마이드 연결을 형성할 수 있다. 상기 아릴 포스핀 기는 계내에서 아지드를 환원시키며, 그 후, 생성된 아민은 근접한 에스테르 연결과 효율적으로 반응하여 상응하는 아마이드를 생성한다. 예를 들어, 문헌 [E. Saxon and C. Bertozzi, Science 287, 2007-2010 (2000)]을 참조한다. 상기 아지드 함유 아미노산은 알킬 아지드(2-아미노-6-아지도-1-헥산산을 포함하지만 이로 제한되지 않음) 또는 아릴 아지드(p-아지도-페닐알라닌)일 수 있다.

[0474] 아릴 에스테르 및 포스핀 모이더를 포함하는 예시적인 수용성 중합체는 다음과 같이 나타낼 수 있다:



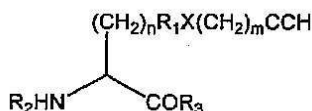
[0475] 상기 식에서, X는 O, N, S이거나 존재하지 않고, Ph는 페닐이며, W는 수용성 중합체이고, R은 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴 기이다. 예시적인 R 기로는 $-\text{CH}_2$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{OR}'$, $-\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{SR}'$, -할로젠, $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$, $-\text{CONR}'\text{R}''$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$, $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$, $-\text{CN}$ 및 $-\text{NO}_2$ 를 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. R' , R'' , R' 및 R'' 은 각각 독립적으로 수소, 치환된 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환된 또는 비치환된 아릴(1-3개의 할로젠으로 치환된 아릴을 포함하지만 이로 제한되지 않음), 치환된 또는 비치환된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시기, 또는 아릴알킬기를 나타낸다. 본 발명의 화합물이 하나 초과 R 기를 포함할 경우, 각각의 R 기는 R' , R'' , R' 및 R'' 기가 하나 초과로 존재할 때 이들 각각의 기와 마찬가지로 독립적으로 선택된다. R' 및 R'' 가 동일한 질소 원자에 부착될 경우, 이들은 질소 원자와 함께 조합되어 5원, 6원 또는 7원 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어, $-\text{NR}'\text{R}''$ 은 1-피롤리디닐 및 4-모르폴리닐을 포함하지만, 이로 제한되지 않는 의미이다. 상기 치환체 설명으로부터, 관련 기술 분야의 통상의 기술자라면 "알킬"이란 용어가 수소가 아닌 다른 기에 결합된 탄소 원자를 포함하는 기, 예를 들어 할로알킬($-\text{CF}_3$ 및 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 를 포함하지만 이로 제한되지 않음) 및 아실($-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CF}_3$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2\text{OCH}_3$ 등을 포함하지만 이로 제한되지 않음)를 포함하는 것임을 이해할 것이다.

[0477] 상기 아지드 작용기는 또한 티오에스테르를 포함하는 수용성 중합체와 선택적으로 반응하고, 선택적으로 아릴 포스핀 모이더로 작용기화되어 아마이드 연결을 생성할 수 있다. 상기 아릴 포스핀기는 계내에서 아지드를 환원시키고, 그 후, 생성된 아민은 티오에스테르 연결과 효율적으로 반응하여 상응하는 아마이드를 생성한다. 티오에스테르 및 포스핀 모이더를 포함하는 예시적인 수용성 중합체는 다음과 같이 나타낼 수 있다:



[0478] 상기 식에서, n은 1-10이고; X는 O, N, S이거나 존재하지 않으며, Ph는 페닐이고, W는 수용성 중합체이다.

[0480] 예시적인 알킬 함유 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다:

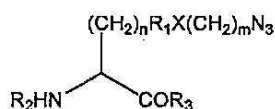


[0481] 상기 식에서, n은 0-10이고; R_1 은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이거나 존재하지 않으며; X는 O, N, S이거나, 존재하지 않고; m은 0-10이며; R_2 는 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 아미노 말단 변형기이며, R_3 은 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 카르복시 말단 변형기이다. 일부 실시양태에서, n은 1이고, R_1 은 페닐이며, X는 존재하지 않고; m은 0이며; 아세틸렌 모이더는 알킬 측쇄에 대해 파라 위치에 위치한다. 일부

실시양태에서, n 은 1이고, R_1 은 페닐이며, X 는 0이고; m 은 1이며; 프로파르길옥시기는 알킬 측쇄에 대해 파라 위치에 위치한다(즉, 0-프로파르길-타이로신). 일부 실시양태에서, n 은 1이고, R_1 및 X 는 존재하지 않으며, m 은 0이다(즉, 프로파르길글리신).

[0483] 알킨 함유 아미노산은 상업적으로 이용이 가능하다. 예를 들어, 프로파르길글리신은 펩테크(미국 매사추세츠주 버링턴 소재)에서 시판된다. 대안적으로, 알킨 함유 아미노산은 표준 방법에 따라 제조할 수 있다. 예를 들어, p-프로파르길옥시페닐알라닌은 예를 들어 문헌 [Deiters, A., et al., J. Am. Chem. Soc. 125: 11782-11783 (2003)]에 기재된 바와 같이 합성할 수 있으며, 4-알키닐-L-페닐알라닌은 문헌 [Kayser, B., et al., Tetrahedron 53(7): 2475-2484 (1997)]에 기재된 바와 같이 합성할 수 있다. 다른 알킨 함유 아미노산은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 제조될 수 있다.

[0484] 예시적인 아지드 함유 아미노산은 다음과 같이 나타낼 수 있다:



[0485]

[0486] 상기 식에서, n 은 0-10이고; R_1 은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 치환된 아릴이거나 존재하지 않으며; X 는 O, N, S이거나 존재하지 않고; m 은 0-10이며; R_2 는 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 아미노 말단 변형기이며, R_3 은 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 카르복시 말단 변형기이다. 일부 실시양태에서, n 은 1이고, R_1 은 페닐이며, X 는 존재하지 않고; m 은 0이며; 아지드 모이어티는 알킬 측쇄에 대해 파라 위치에 위치한다. 일부 실시양태에서, n 은 0-4이고, R_1 및 X 는 존재하지 않고; m 은 0이다. 일부 실시양태에서, n 은 1이고, R_1 은 페닐이고, X 는 0이고; m 은 2이고, β -아지도메톡시 모이어티는 알킬 측쇄에 대해 파라 위치에 위치한다.

[0487] 아지드 함유 아미노산은 상업적 공급처로부터 입수할 수 있다. 예를 들어, 4-아지도페닐알라닌은 캠-임팩스 인터내셔널, 인크.(Chem-Impex International, Inc.)(미국 일리노이주 우드 데일 소재)로부터 입수할 수 있다. 상업적으로 입수할 수 없는 아지드 함유 아미노산의 경우, 적절한 이탈기(할라이드, 메실레이트, 토실레이트를 포함하지만 이들로 제한되지 않음)의 치환 또는 적절히 보호된 락톤의 개환을 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 방법을 이용하여 비교적 용이하게 제조할 수 있다. 예를 들어 문헌 [Advanced Organic Chemistry by March (Third Edition, 1985, Wiley and Sons, New York)]을 참조한다.

[0488] E. 아미노티올 반응성 기

[0489] 베타-치환 아미노티올 작용기는 그 특유의 반응성으로 인해, 폴리펩타이드 및 알데하이드기를 포함하는 다른 생물학적 분자의 티아졸리딘의 형성을 통한 선택적 변형에 매우 유용하다. 예를 들어, 문헌 [J. Shao and J. Tam, J. Am. Chem. Soc., 117 (14) 3893-3899, (1995)]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 베타-치환 아미노티올 아미노산은 IL-2 폴리펩타이드 내로 도입된 후, 알데하이드 작용기를 포함하는 수용성 중합체와 반응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 수용성 중합체, 약물 접합체 또는 다른 탐재물은 티아졸리딘의 형성을 통해 베타-치환 아미노티올 아미노산을 포함하는 IL-2에 커플링될 수 있다.

[0490] F. 추가의 반응성 기

[0491] 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드 내로 도입될 수 있는 추가의 반응성 기 및 비천연적으로 코딩된 아미노산은 본 명세서에서 그 전체가 참고로 포함되는 하기 특허 출원들에 기재되어 있다: 미국 특허 출원 공개 제2006/0194256호, 미국 특허 출원 공개 제2006/0217532호, 미국 특허 출원 공개 제2006/0217289호, 미국 특허 가출원 제60/755,338호; 미국 특허 가출원 제60/755,711호; 미국 특허 가출원 제60/755,018호; 국제 특허 출원 PCT/US06/49397; WO 2006/069246; 미국 특허 가출원 제60/743,041호; 미국 특허 가출원 제60/743,040호; 국제 특허 출원 PCT/US06/47822; 미국 특허 가출원 제60/882,819호; 미국 특허 출원 제60/882,500호; 및 미국 특허 가출원 제60/870,594호. 이들 출원은 또한 PEG 또는 접합을 위한 하이드록실 아민(아미노옥시) 기를 포함하지만 이로 제한되지 않는 다른 중합체에 존재할 수 있는 반응성 기에 대해 논의하고 있다.

[0492] 비천연 아미노산을 갖는 폴리펩타이드

[0493] 비천연 아미노산의 도입은 단백질과 그의 수용체 또는 그의 수용체의 하나 이상의 서브유닛의 상호작용의 조절,

단백질 구조 및/또는 기능 변화의 조정, 크기, 산도, 친핵성, 수소 결합, 소수성, 프로테아제 표적 부위의 접근 용이성의 변화, 모이어티에 대한 표적화(단백질 어레이의 경우를 포함하지만 이로 제한되지 않음)의 변화, 생물학적 활성 분자의 부가, 중합체의 부착, 방사성핵종의 부착, 혈청 반감기의 조절, 조직 투과(예를 들어, 종양)의 조절, 능동 수송의 조절, 조직, 세포 또는 기관 특이성 또는 분포의 조절, 면역원성의 조절, 프로테아제 내성의 조절 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 다양한 목적을 위해 수행될 수 있다. 비천연 아미노산을 포함하는 단백질은 증대된 또는 심지어 완전히 새로운 촉매 특성 또는 생물물리적 특성을 지닐 수 있다. 예를 들면, 비천연 아미노산을 단백질 내로 포함시킴으로써 하기 특성들이 선택적으로 변경된다: 수용체 결합, 독성, 생체 내 분포, 구조적 특성, 분광학적 특성, 화학적 및/또는 광화학적 특성, 촉매 능력, 반감기(혈청 반감기를 포함하지만 이로 제한되지 않음), 공유 결합 또는 비공유 결합을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 다른 분자와 반응할 수 있는 능력 등. 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함하는 단백질을 포함하는 조성물은 신규한 치료제, 진단제, 촉매 효소, 산업용 효소, 결합 단백질(항체를 포함하지만 이로 제한되지 않음), 및 단백질 구조 및 기능의 연구를 포함하지만 이로 제한되지 않는 연구에 유용하지만, 이로 제한되지 않는다. 예를 들어 문헌 [Dougherty, Unnatural Amino Acids as Probes of Protein Structure and Function, Current Opinion in Chemical Biology, 4:645-652, (2000)]을 참조한다.

[0494] 본 발명의 한 측면에서, 조성물은 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 적어도 10개, 또는 그 초과와 비천연 아미노산을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 적어도 하나의 비천연 아미노산을 갖는 적어도 하나의 단백질을 포함한다. 상기 비천연 아미노산은 동일하거나 상이할 수 있으며, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개, 또는 그 초과와 상이한 비천연 아미노산을 포함하는, 단백질 내에 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개, 또는 그 초과와 상이한 부위가 존재할 수 있다. 또 다른 측면에서, 조성물은 단백질 내에 존재하는 적어도 1개(그러나, 전체 아미노산보다는 적은 수)의 특정 아미노산이 비천연 아미노산으로 치환된 단백질을 포함한다. 1개 초과와 비천연 아미노산을 갖는 소정의 단백질의 경우, 상기 비천연 아미노산은 동일하거나 상이할 수 있다(예를 들어, 상기 단백질은 2개 이상의 상이한 종류의 비천연 아미노산을 포함할 수 있거나, 동일한 2개의 비천연 아미노산을 포함할 수 있지만 이로 제한되지 않음). 2개 초과와 비천연 아미노산을 갖는 소정의 단백질의 경우, 상기 비천연 아미노산은 동일하거나 상이하거나 또는 동일한 종류의 다수의 비천연 아미노산과 적어도 1개의 상이한 비천연 아미노산의 조합일 수 있다.

[0495] 적어도 하나의 비천연 아미노산을 갖는 관심 단백질 또는 폴리펩타이드가 본 발명의 특징이다. 본 발명은 또한 본 발명의 조성물 및 방법을 이용하여 제조한 적어도 하나의 비천연 아미노산을 갖는 폴리펩타이드 또는 단백질을 포함한다. 또한, 부형제(약학적으로 허용되는 부형제를 포함하지만 이로 제한되지 않음)가 단백질 내에 존재할 수 있다.

[0496] 적어도 하나의 비천연 아미노산을 갖는 관심 단백질 또는 폴리펩타이드를 진핵 세포에서 생산하는 것에 의하면, 단백질 또는 폴리펩타이드는 일반적으로 진핵 세포에서의 번역 후 변형을 포함할 것이다. 일부 실시양태에서, 단백질은 적어도 하나의 비천연 아미노산, 및 진핵 세포에 의해 생체 내에서 만들어지는 적어도 하나의 번역 후 변형을 포함하며, 여기서 상기 번역 후 변형은 원핵 세포에 의해서는 만들어지지 않는 것이다. 예를 들어, 상기 번역 후 변형은 아세틸화, 아실화, 지질 변형, 팔미토일화, 팔미테이트 부가, 인산화, 당지질 연결 변형, 글리코실화 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0497] 비천연 아미노산의 이점 중 하나는 이 아미노산이 추가의 분자를 부가하기 위해 사용될 수 있는 추가의 화학적 모이어티를 제공한다는 것이다. 이러한 변형은 진핵 세포 또는 비진핵 세포의 생체 내에서 또는 시험관 내에서 이루어질 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 상기 번역 후 변형은 비천연 아미노산을 통해 이루어진다. 예를 들어, 상기 번역 후 변형은 친핵성-친전자성 반응을 통해 이루어질 수 있다. 현재, 단백질의 선택적 변형에 사용되는 대부분의 반응은 α -할로케톤과 히스티딘 또는 시스테인 측쇄의 반응을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 친핵성 반응 파트너와 친전자성 반응 파트너 사이의 공유 결합 형성을 수반한다. 이러한 경우, 선택성은 단백질 내의 친핵성 잔기의 수 및 접근 용이성에 의해 결정된다. 본 발명의 단백질의 경우, 시험관 내에서 및 생체 내에서의 비천연 케토-아미노산과 하이드라지드 또는 아미노옥시 화합물과의 반응과 같은 다른 보다 선택적인 반응이 이용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Cornish, et al., J. Am. Chem. Soc., 118:8150-8151, (1996)]; [Mahal, et al., Science, 276:1125-1128, (1997)]; [Wang, et al., Science 292:498-500, (2001)]; [Chin, et al., J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027, (2002)]; [Chin, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 99:11020-11024, (2002)]; [Wang, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 100:56-61, (2003)]; [Zhang, et al., Biochemistry, 42:6735-6746, (2003)]; 및 [Chin, et al., Science, 301:964-7, (2003)]을 참조하며, 이들 문

현은 모두 본 명세서에 참고로 포함된다. 이는 형광단, 가교결합제, 사카라이드 유도체 및 세포 독성 분자를 비롯한 다수의 시약을 사용하여 사실상 어떠한 단백질도 선택적으로 표지할 수 있게 한다. 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제6,927,042호(발명의 명칭: "Glycoprotein synthesis")를 참조한다. 또한, 아직도 아미노산을 통한 번역 후 변형을 포함하지만 이로 제한되지 않는 번역 후 변형은 슈타우딩거 라이게이션(트리아릴포스핀 시약을 이용한 라이게이션을 포함하지만 이로 제한되지 않음)을 통해 이루어질 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Kiick et al., Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation, PNAS 99:19-24, (2002)]을 참조한다.

[0498] **IV. 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2의 생체내 생성**

[0499] 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드는 천연 발생 시스템에서 코딩되지 않는 아미노산을 부가하거나 대체하기 위해 변형된 tRNA 및 tRNA 합성효소를 사용하여 생체 내에서 생성될 수 있다.

[0500] 천연 발생 시스템에서 코딩되지 않는 아미노산을 사용하는 tRNA 및 tRNA 합성효소를 생성하는 방법은 예를 들어 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제7,045,337호 및 미국 특허 제7,083,970호에 기재되어 있다. 이러한 방법은 번역 시스템에 대해 내인성인 합성효소 및 tRNA와는 독립적으로 기능하는(따라서, 때때로 "오르토고날"로 지칭됨) 번역 기구를 생성하는 것을 포함한다. 일반적으로, 이 번역 시스템은 오르토고날 tRNA(O-tRNA) 및 오르토고날 아미노아실 tRNA 합성효소(O-RS)를 포함한다. 일반적으로, 상기 O-RS는 번역 시스템에서 O-tRNA를 적어도 하나의 비천연 발생 아미노산으로 우선적으로 아미노아실화하고, 이 O-tRNA는 이 시스템에서 다른 tRNA에 의해 인식되지 않는 적어도 하나의 선택적 코돈을 인식한다. 따라서, 이 번역 시스템은 코딩되는 선택적 코돈에 반응하여 비천연적으로 코딩된 아미노산을 상기 시스템에서 생산된 단백질 내에 삽입함으로써, 코딩되는 폴리펩타이드 내의 특정 위치의 아미노산을 "치환"한다.

[0501] 특정 합성 아미노산을 폴리펩타이드 내로 삽입하기 위한 매우 다양한 오르토고날 tRNA 및 아미노아실 tRNA 합성효소가 관련 기술 분야에서 알려져 있으며, 본 발명에 사용하기에 일반적으로 적합하다. 예를 들어, 케토 특이적 O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소가 문헌 [Wang, L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:56-61 (2003)] 및 [Zhang, Z. et al., Biochem. 42(22):6735-6746 (2003)]에 기재되어 있다. 예시적인 O-RS 또는 그 일부는 각각 본 명세서에서 참고로 포함되는 미국 특허 제7,045,337호 및 제7,083,970호에 개시된 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩되고 상기 특허에 개시된 아미노산 서열을 포함한다. 또한, O-RS와 함께 사용되는 상응하는 O-tRNA 분자도 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제7,045,337호 및 제7,083,970호에 개시되어 있다. 또한, O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소 쌍의 추가적인 예가 WO 2005/007870, WO 2005/007624; 및 WO 2005/019415에 기재되어 있다.

[0502] 아직도 특이적 O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소 시스템의 한 예가 문헌 [Chin, J. W., et al., J. Am. Chem. Soc. 124:9026-9027 (2002)]에 기재되어 있다. p-아지도-L-Phe에 대한 예시적인 O-RS 서열로는 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제7,083,970호에 개시된 서열번호 14-16 및 29-32의 뉴클레오타이드 서열 및 서열번호 46-48 및 61-64의 아미노산 서열을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 본 발명에 사용하기 적합한 예시적인 O-tRNA 서열로는 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제7,083,970호에 개시된 서열번호 1-3의 뉴클레오타이드 서열을 들 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 비천연적으로 코딩되는 특정 아미노산에 특이적인 O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소 쌍의 다른 예는 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제7,045,337호에 기재되어 있다. 사카로마이세스 세레비시아에(*S. cerevisiae*)에서 케토 함유 아미노산과 아지도 함유 아미노산을 둘 모두 도입하는 O-RS 및 O-tRNA는 문헌 [Chin, J. W., et al., Science 301:964-967 (2003)]에 기재되어 있다.

[0503] 몇 종의 다른 오르토고날 쌍도 보고되었다. 에스. 세레비시아에 tRNA 및 합성효소로부터 유래된 글루타밀(예를 들어, 문헌 [Liu, D. R., and Schultz, P. G. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 96:4780-4785] 참조), 아스파르트(예를 들어, 문헌 [Pastrnak, M., et al., (2000) Helv. Chim. Acta 83:2277-2286] 참조) 및 타이로실(예를 들어, 문헌 [Ohno, S., et al., (1998) J. Biochem. (Tokyo, Jpn.) 124:1065-1068]; 및 [Kowal, A. K., et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273] 참조) 시스템이 이. 콜라이에서 비천연 아미노산을 도입할 수 있는 가능성이 있는 것으로 설명된 바 있다. 이. 콜라이 글루타밀(예를 들어, 문헌 [Kowal, A. K., et al., (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98:2268-2273] 참조) 및 타이로실(예를 들어, 문헌 [Edwards, H., and Schimmel, P. (1990) Mol. Cell. Biol. 10:1633-1641] 참조) 합성효소는 에스. 세레비시아에서 사용할 수 있는 것으로 설명되었다. 포유동물 세포에서의 생체 내에서 3-요오도-L-타이로신의 도입을 위해 이. 콜라이 타이로실 시스템이 사용되었다. 문헌 [Sakamoto, K., et al., (2002) Nucleic Acids Res. 30:4692-4699]을 참조한다.

- [0504] O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소의 사용은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 코딩하는 특정한 코돈(셀렉터 코돈)의 선택을 포함한다. 임의의 코돈이 사용될 수 있지만, 일반적으로는 O-tRNA/아미노아실-tRNA 합성효소가 발현되는 세포에서 거의 또는 전혀 사용되지 않는 코돈을 선택하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 예시적인 코돈은 넌센스 코돈, 예를 들어 정지 코돈(옴버, 오키 및 오팔), 4개 이상의 염기 코돈, 및 거의 또는 전혀 사용되지 않는 다른 천연 3 염기 코돈을 포함한다.
- [0505] 특정한 셀렉터 코돈(들)을, 관련 기술 분야에 공지된 돌연변이 유발 방법(부위 특이적 돌연변이 유발, 카세트 돌연변이 유발, 제한 선택 돌연변이 유발 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않음)을 이용하여 IL-2 코딩 서열 내의 적절한 위치에 도입할 수 있다.
- [0506] **V. IL-2 내의 비천연 발생 아미노산의 위치**
- [0507] 본 발명은 하나 이상의 비천연 발생 아미노산을 IL-2 내로 도입하는 것을 포함한다. 하나 이상의 비천연 발생 아미노산은 폴리펩타이드의 활성을 파괴하지 않는 특정 위치에 도입될 수 있다. 이것은 소수성 아미노산을 소수성 아미노산으로, 부피가 큰(bulky) 아미노산을 부피가 큰 아미노산으로, 친수성 아미노산을 친수성 아미노산으로 치환하는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는 "보존적" 치환을 수행하고/하거나, 비천연 발생 아미노산을 활성에 필요하지 않은 위치에 삽입함으로써 수행할 수 있다.
- [0508] 다양한 생화학적 및 구조적 방법을 이용하여, 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환하고자 하는 IL-2 내의 원하는 부위를 선택할 수 있다. 폴리펩타이드 사슬의 어떠한 위치도 비천연적으로 코딩된 아미노산을 도입하기 위한 선택에 적합하고, 선택은 합리적 디자인에 기초하거나 또는 임의의 또는 불특정한 소정의 목적을 위한 무작위 선택으로 행해질 수 있다는 것이 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 자명하다. 원하는 부위의 선택은 수용체 결합 또는 그의 수용체, 아고니스트, 슈퍼아고니스트(super-agonist), 역아고니스트, 길항제, 수용체 결합 조절제, 수용체 활성 조절제의 하나 이상의 서브유닛에 대한 결합의 조절, 이량체 또는 다량체 형성, 본래의 분자와 비교하여 활성 또는 특성을 변화시키지 않는 것, 또는 폴리펩타이드의 임의의 물리적 또는 화학적 특성, 예를 들어 용해도, 응집도, 또는 안정성의 조절을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 임의의 요구되는 특성 또는 활성을 갖는 IL-2 분자를 생산하기 위한 것일 수 있다. 예를 들어, IL-2의 생물학적 활성에 요구되는 폴리펩타이드 내의 위치는 관련 기술 분야에 공지된 포인트 돌연변이 분석, 알라닌 스캐닝, 포화 돌연변이 유발 및 생물학적 활성의 스크리닝, 또는 상동체 스캐닝 방법을 이용하여 확인할 수 있다. IL-2의 변형을 위한 잔기를 확인하기 위해 사용될 수 있는 다른 방법은 다음을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다: 서열 프로파일링(Bowie and Eisenberg, Science 253(5016): 164-70, (1991)), 로타머 라이브러리 선택([Dahiyat and Mayo, Protein Sci 5(5): 895-903 (1996)]; [Dahiyat and Mayo, Science 278(5335): 82-7 (1997)]; [Desjarlais and Handel, Protein Science 4: 2006-2018 (1995)]; [Harbury et al., PNAS USA 92(18): 8408-8412 (1995)]; [Kono et al., Proteins: Structure, Function and Genetics 19: 244-255 (1994)]; [Hellings and Richards, PNAS USA 91: 5803-5807 (1994)]); 및 잔류 쌍 잠재력(Jones, Protein Science 3: 567-574, (1994)), 및 프로테인 디자인 오토메이션(Protein Design Automation[®]) 기술(참고로 포함되는 미국 특허 제6,188,965호; 제6,269,312호; 제6,403,312호; W098/47089 참조). 알라닌 또는 상동체 스캐닝 돌연변이 유발에 의해 생물학적 활성에 중요한 것으로 확인된 것 이외의 다른 잔기는 폴리펩타이드에 대해 추구되는 원하는 활성에 따라 비천연적으로 코딩된 아미노산으로의 치환을 위한 좋은 후보일 수 있다. 대안적으로, 생물학적 활성에 중요한 것으로 확인된 부위도 폴리펩타이드에 대해 요구되는 원하는 활성에 따라 비천연적으로 코딩된 아미노산으로의 치환을 위한 좋은 후보일 수 있다. 또 다른 대안은 단순히 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 폴리펩타이드 사슬의 각각의 위치에서 연속 치환을 만들고 폴리펩타이드의 활성에 미치는 영향을 관찰하는 것이다. 비천연 아미노산을 임의의 폴리펩타이드 내로 치환하기 위한 위치를 선택하기 위한 임의의 수단, 기술 또는 방법이 본 발명에 사용하기에 적합하다는 것은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 자명하다.
- [0509] 또한, 결실을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드의 돌연변이체의 구조 및 활성은 비천연적으로 코딩된 아미노산으로의 치환을 허용하기 쉬운 단백질의 영역을 결정하기 위해 조사될 수 있다. 유사한 방식으로, 프로테아제 분해 및 모노클로날 항체를 사용하여, IL-2 수용체의 결합에 관여하는 IL-2의 영역을 확인할 수 있다. 비천연적으로 코딩된 아미노산으로의 치환을 허용하지 않을 것 같은 잔기가 일단 제거되면, 각각의 나머지 위치에서 제안된 치환의 영향을 조사할 수 있다. 따라서, 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환될 수 있는 아미노산 위치를 용이하게 확인할 수 있다.
- [0510] 관련 기술 분야의 통상의 기술자라면 IL-2의 이러한 분석에 의해 어느 아미노산 잔기가 단백질의 3차 구조 내에 매립된 아미노산 잔기에 비해 표면에 노출되는지를 결정할 수 있다는 것을 알 수 있다. 따라서, 본 발명의 한

실시양태는 표면에 노출된 잔기인 아미노산을 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환하는 것이다.

- [0511] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2의 다음 위치 중 하나 이상에 도입된다: 위치 1 앞(즉, N-말단), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 중 하나 이상의 위치에 도입되거나, 또는 단백질의 카르복실 말단, 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산)에 추가된다.
- [0512] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체에서 다음 위치 중 하나 이상에 도입된다: 위치 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 및 107, 및 이들의 임의의 조합(서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치).
- [0513] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 다음과 같이 IL-2 또는 그의 변이체의 2차 구조 또는 특정 아미노산에 상응하는 다음 영역 중 하나 이상의 영역의 임의의 위치에 도입된다: 소수성 상호작용 부위; IL2R α 를 포함하는 IL-2 수용체 서브유닛과의 상호작용 부위 또는 그 근처; 아미노산 위치 3, 또는 35 내지 45 내; 처음 107개의 N-말단 아미노산 내; 아미노산 위치 61-72 내; 각각의 서열번호 2, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산 위치. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 다음 위치 중 하나 이상에 도입된다: 위치 1 앞(즉, N-말단), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43 및 서열번호 2의 임의의 조합, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산은 IL-2 또는 그의 변이체의 위치 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133 중 하나 이상의 위치에 도입되거나, 또는 단백질의 카르복실 말단, 서열번호 2의 임의의 조합, 또는 서열번호 3, 5 또는 7에서의 상응하는 아미노산에 추가된다.
- [0514] 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩타이드는 아고니스트이고, 비천연적으로 발생하는 아미노산은 다음을 포함하지만 이로 제한되지 않는, 이들 영역 중 하나 이상에서 수용성 중합체에 연결된다: 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 및 107. 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩타이드는 아고니스트이고, 비천연적으로 발생하는 아미노산은 다음을 포함하지만 이로 제한되지 않는 이들 영역 중 하나 이상에서 수용성 중합체에 연결된다: 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72, 및 107에 근접한 위치.
- [0515] 매우 다양한 비천연적으로 코딩된 아미노산이 IL-2의 주어진 위치를 치환하거나 그 위치에 도입될 수 있다. 일반적으로, IL-2 폴리펩타이드 또는 다른 IL-2 패밀리 구성원과 그의 수용체의 3차원 결정 구조의 조사, 보존적 치환의 선호도(즉, Phe, Tyr 또는 Trp을 아릴에 기초한 비천연적으로 코딩된 아미노산, 예를 들어 p-아세틸페닐 알라닌 또는 O-프로파르길타이로신으로 치환함) 및 IL-2 내로 도입하길 원하는 특정한 접합 화학 반응(예를 들어, 알킨 모이어티를 보유하는 수용성 중합체와의 휘스겐 [3+2] 고리 부가 반응 또는 아릴 에스테르를 보유하는 (이것은 다시 포스포 모이어티를 도입함) 수용성 중합체와의 아마이드 결합 형성이 일어나길 원한다면 4-아지도 페닐알라닌의 도입)에 기초하여 비천연적으로 코딩되는 특정 아미노산을 도입을 위해 선택한다.
- [0516] 한 실시양태에서, 상기 방법은 또한 단백질에 제1 반응성 기를 포함하는 비천연 아미노산을 도입하는 단계; 및 상기 단백질을 제2 반응성 기를 포함하는 분자(표지, 염료, 중합체, 수용성 중합체, 폴리에틸렌 글리콜의 유도체, 광가교결합제, 방사성핵종, 세포 독성 화합물, 약물, 친화도 표지, 광친화도 표지, 반응성 화합물, 수지, 제2 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 유사체, 항체 또는 항체 단편, 금속 킬레이팅제, 보조 인자, 지방산, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, DNA, RNA, 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 사카라이드, 수용성 덴드리머, 사이클로텍스트린, 억제성 리보핵산, 생물학적 물질, 나노입자, 스핀 표지, 형광단, 금속 함유 모이어티, 방사성 모이어티, 신규 작용기, 다른 분자와 공유 또는 비공유적으로 상호작용하는 기, 광케이지된 모이어티, 화학선에 의해 여기 가능한 모이어티, 광이성질체화 가능 모이어티, 바이오틴, 바이오틴 유도체, 바이오

틴 유사체, 무거운 원자를 포함하는 모이어티, 화학적으로 절단 가능한 기, 광절단 가능한 기, 연장된 측쇄, 탄소 결합된 당, 산화환원 활성 물질, 아미노 티오산, 독성 모이어티, 동위원소 표지 모이어티, 생물물리적 프로브, 인광성 기, 화학발광성 기, 전자 밀집 기, 자성 기, 인터칼레이팅 기, 발색단, 에너지 전달제, 생물학적 활성 물질, 검출 가능한 표지, 소분자, 양자점, 나노트랜스미터, 방사성 뉴클레오타이드, 라디오트랜스미터, 중성자 포획제, 또는 상기 화합물 또는 물질 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질의 임의의 조합물)와 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 상기 제1 반응성 기는 제2 반응성 기와 반응하여, [3+2] 고리 부가 반응을 통해 비천연 아미노산에 분자를 부착시킨다. 한 실시양태에서, 상기 제1 반응성 기는 알킬닐 또는 아지도 모이어티이고, 상기 제2 반응성 기는 아지도 또는 알킬닐 모이어티이다. 예를 들어, 상기 제1 반응성 기는 알킬닐 모이어티(비천연 아미노산 p-프로파르길옥시페닐알라닌을 포함하지만 이로 제한되지 않음)이고, 상기 제2 반응성 기는 아지도 모이어티이다. 또 다른 예로서, 상기 제1 반응성 기는 아지도 모이어티(비천연 아미노산 p-아지도-L-페닐알라닌을 포함하지만 이로 제한되지 않음)이고, 상기 제2 반응성 기는 알킬닐 모이어티이다.

[0517] 일부 경우에, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산 치환(들)은 IL-2 내의 다른 부가, 치환 또는 결실과 조합되어 IL-2 폴리펩타이드의 다른 생물학적 특질에 영향을 줄 것이다. 일부 경우에, 상기 다른 부가, 치환 또는 결실은 IL-2의 안정성(단백질 분해에 대한 내성을 포함하지만 이로 제한되지 않음)을 증가시키거나 그의 수용체에 대한 IL-2 폴리펩타이드의 친화도를 증가시킬 수 있다. 일부 경우에, 상기 다른 부가, 치환 또는 결실은 IL-2의 약학적 안정성을 증가시킬 수 있다. 일부 경우에, 상기 다른 부가, 치환 또는 결실은 종양 억제 및/또는 종양 감소를 위한 IL-2의 활성을 향상시킬 수 있다. 일부 경우에, 상기 다른 부가, 치환 또는 결실은 IL-2 또는 변이체의 용해도(이. 콜라이 또는 다른 숙주 세포에서 발현되는 경우를 포함하지만, 이로 제한되지 않음)를 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 부가, 치환 또는 결실은 이. 콜라이 또는 다른 재조합 숙주 세포에서 발현된 후 IL-2의 용해도를 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 이. 콜라이 또는 다른 재조합 숙주 세포에서 발현된 후 폴리펩타이드의 용해도를 증가시키는 비천연 아미노산을 도입하기 위한 또 다른 부위 이외에, 천연적으로 코딩되는 또는 비천연 아미노산으로의 치환을 위한 부위를 선택한다. 일부 실시양태에서, 상기 IL-2 폴리펩타이드는 IL-2 수용체, 결합 단백질, 또는 회합된 리간드에 대한 친화도를 친화도를 조절하거나, IL-2 수용체에 결합된 후의 신호 전달을 조절하거나, 순환 반감기를 조절하거나, 방출 또는 생체이용률을 조절하거나, 정제를 용이하게 하거나, 또는 특정 투여 경로를 개선하거나 변경하는 또 다른 부가, 치환 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 IL-2 폴리펩타이드는 IL-2 변이체의 그의 수용체에 대한 친화도를 증가시키는 부가, 치환 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 IL-2-R1 및/또는 IL-2-R2에 대한 IL-2 변이체의 친화도를 증가시키는 부가, 치환 또는 결실을 포함한다. 이와 유사하게, IL-2 폴리펩타이드는 검출(GFP를 포함하지만, 이로 제한되지 않음), 정제, 조직 또는 세포 막을 통한 수송, 프로드러그 방출 또는 활성화, IL-2 크기 축소, 또는 이 폴리펩타이드의 다른 특징을 개선하는 화학적 또는 효소 절단 서열, 프로테아제 절단 서열, 반응성 기, 항체 결합 도메인(FLAG 또는 폴리-His를 포함하지만, 이로 제한되지 않음), 또는 친화도에 기초한 다른 서열(FLAG, 폴리-His, GST 등을 포함하지만, 이로 제한되지 않음) 또는 연결된 분자(바이오틴을 포함하지만, 이로 제한되지 않음)를 포함할 수 있다.

[0518] 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산의 치환은 IL-2 길항제를 생성한다. 일부 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 수용체 결합과 관련된 영역에서 치환되거나 부가된다. 일부 실시양태에서, IL-2 길항제는 IL-2가 길항제로서 작용하게 하는 적어도 하나의 치환을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2 길항제는 IL-2 분자의 수용체 결합 영역에 존재하는 수용성 중합체에 연결된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다.

[0519] 일부 경우에, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 아미노산이 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된다. 일부 경우에, IL-2는 천연 발생 아미노산에 대한 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 치환을 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, IL-2의 하나 이상의 잔기는 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환된다. 일부 경우에, 하나 이상의 비천연적으로 코딩되는 잔기는 하나 이상의 저분자량 선형 또는 분지형 PEG에 연결되어, 단일 고분자량 PEG에 부착된 종에 비해 결합 친화도 및 유사한 혈청 반감기를 향상시킨다.

[0520] VI. 비진핵 생물 및 진핵 생물에서의 발현

[0521] 클로닝된 IL-2 폴리뉴클레오타이드의 발현 수준을 높이기 위해, 일반적으로, 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를, 전사를 지시하는 강력한 프로모터, 전사/번역 종결 서열, 및 핵산이 단백질을 코딩할 경우, 번역 개시를 위한 리보솜 결합 부위를 포함하는 발현 벡터로 서브클로닝한다. 적절한 박테리아 프로모터는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 알려져 있으며, 예를 들어 문헌 [Sambrook *et al.*] 및 [Ausubel *et*

al.]에 기재되어 있다.

[0522] 본 발명의 IL-2를 발현시키기 위한 박테리아 발현 시스템은 이. 콜라이, 바실러스 중, 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 아에루기노사, 슈도모나스 푸티다 및 살모넬라(*Salmonella*)(이들을 포함하지만, 이들로 제한되지 않음)에서 이용 가능하다([Palva *et al.*, *Gene* 22:229-235 (1983)]; [Mosbach *et al.*, *Nature* 302:543-545 (1983)]). 이러한 발현 시스템을 위한 키트는 상업적으로 입수 가능하다. 포유동물 세포, 효모 및 곤충 세포를 위한 진핵생물 발현 시스템은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 또한 상업적으로 입수 가능하다. 오르토고날 tRNA 및 아미노아실 tRNA 합성효소(상기에 기재된)가 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드를 발현시키는 데 사용될 경우, 발현용 숙주 세포는 오르토고날 성분을 사용할 수 있는 능력에 기초하여 선택된다. 예시적인 숙주 세포로는 그람 양성 박테리아(비. 브레비스(*B. brevis*), 비. 서브틸리스(*B. subtilis*) 또는 스트렙토마이세스를 포함하지만 이들로 제한되지 않음) 및 그람 음성 박테리아(이. 콜라이, 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 아에루기노사, 슈도모나스 푸티다)뿐만 아니라, 효모 및 다른 진핵 세포를 들 수 있다. O-tRNA/O-RS 쌍을 포함하는 세포도 본 명세서에 설명되는 바와 같이 사용될 수 있다.

[0523] 본 발명의 진핵 숙주 세포 또는 비진핵 숙주 세포는 비천연 아미노산을 유용한 다량으로 포함하는 단백질을 합성할 수 있는 능력을 제공한다. 한 측면에서, 조성물은 선택적으로 적어도 10 마이크로그램, 적어도 50 마이크로그램, 적어도 75 마이크로그램, 적어도 100 마이크로그램, 적어도 200 마이크로그램, 적어도 250 마이크로그램, 적어도 500 마이크로그램, 적어도 1 밀리그램, 적어도 10 밀리그램, 적어도 100 밀리그램, 적어도 1 g, 또는 그 초과인 비천연 아미노산 함유 단백질, 또는 생체내 단백질 생산 방법(재조합 단백질 생산 및 정제에 대한 상세한 설명은 본 명세서에 제공되어 있음)에 의해 얻을 수 있는 양의 비천연 아미노산 함유 단백질을 포함한다. 또 다른 측면에서, 상기 단백질은 선택적으로 세포 용해물, 완충제, 약학적 완충제 또는 다른 액체 현탁액을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 액체(약 1 nL 내지 약 100 L 또는 그 초과인 임의의 부피를 포함하지만 이로 제한되지 않는 부피를 가짐) 1 리터당 적어도 10 마이크로그램의 단백질, 1 리터당 적어도 50 마이크로그램의 단백질, 1 리터당 적어도 75 마이크로그램의 단백질, 1 리터당 적어도 100 마이크로그램의 단백질, 1 리터당 적어도 200 마이크로그램의 단백질, 1 리터당 적어도 250 마이크로그램의 단백질, 1 리터당 적어도 500 마이크로그램의 단백질, 1 리터당 적어도 1 밀리그램의 단백질, 또는 1 리터당 적어도 10 밀리그램의 단백질, 또는 그 초과인 농도(이로 제한되지 않음)로 조성물 중에 존재한다. 진핵 세포에서 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함하는 단백질을 다량(시험관내 번역을 포함하지만 이로 제한되지 않는 다른 방법을 이용하여 얻을 수 있는 전형적인 양보다 많은 양을 포함하지만 이로 제한되지 않음) 제조하는 것은 본 발명의 한 특징이다.

[0524] 본 발명의 진핵 숙주 세포 또는 비진핵 숙주 세포는 비천연 아미노산을 포함하는 단백질을 유용한 다량으로 생합성하는 능력을 제공한다. 예를 들어, 비천연 아미노산을 포함하는 단백질은 세포 추출물, 세포 용해물, 배양 배지, 완충제 등 내의 적어도 10 μ g/리터, 적어도 50 μ g/리터, 적어도 75 μ g/리터, 적어도 100 μ g/리터, 적어도 200 μ g/리터, 적어도 250 μ g/리터, 또는 적어도 500 μ g/리터, 적어도 1 mg/리터, 적어도 2 mg/리터, 적어도 3 mg/리터, 적어도 4 mg/리터, 적어도 5 mg/리터, 적어도 6 mg/리터, 적어도 7 mg/리터, 적어도 8 mg/리터, 적어도 9 mg/리터, 적어도 10 mg/리터, 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 mg/리터, 1 g/리터, 5 g/리터, 10 g/리터 또는 그 초과인 단백질의 농도(이로 제한되지 않음)로 제조될 수 있다.

[0525] IL-2의 발현에 적합한 많은 벡터가 시판되고 있다. 진핵 숙주에 유용한 발현 벡터는 SV40, 소 유두종 바이러스, 아데노바이러스 및 사이토메갈로바이러스로부터의 발현 조절 서열을 포함하는 벡터를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 이러한 벡터는 pCDNA3.1(+)\Hyg(Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재) 및 pCI-neo(Stratagene, 미국 캘리포니아주 라 호야 소재)를 포함한다. 박테리아 플라스미드, 예를 들어 pBR322, pET3a 및 pET12a를 포함하는 이. 콜라이로부터의 플라스미드, 더 넓은 숙주 범위 플라스미드, 예를 들어 RP4, 파지 DNA, 예를 들어 파지 람다의 많은 유도체, 예를 들어 NM989, 및 다른 DNA 파지, 예를 들어 M13 및 필라멘트 단일 가닥 DNA 파지가 사용될 수 있다. 2 μ 플라스미드 및 이의 유도체, POT1 벡터(참고로 포함된 미국 특허 제 4,931,373호), 문헌 [Okkels, Ann. New York Acad. Sci. 782, 202-207, 1996]에 기재된 pJS037 벡터 및 pPICZ A, B 또는 C(Invitrogen)를 효모 숙주 세포와 함께 사용할 수 있다. 곤충 세포의 경우, 벡터는 pVL941, pBG311(Cate *et al.*, "Isolation of the Bovine and Human Genes for Mullerian Inhibiting Substance And Expression of the Human Gene In Animal Cells", Cell, 45, pp. 685-98 (1986)), pBluebac 4.5 및 pMelbac(Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0526] IL-2 또는 그의 변이체를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 신호 펩타이드를 코딩하는 서열을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 신호 펩타이드는 폴리펩타이드가 발현되는 세포로부터 분비되어야 할 때 존재한다. 이러한 신

호 펩타이드는 임의의 서열일 수 있다. 신호 펩타이드는 원핵 또는 진핵성일 수 있다. 문헌 [Coloma, M (1992) J. Imm. Methods 152:89-104]에는 포유동물 세포에서 사용하기 위한 신호 펩타이드(뮤린 Ig 카파 경쇄 신호 펩타이드)가 설명되어 있다. 다른 신호 펩타이드는 에스. 세레비시아에로부터의 α -인자 신호 펩타이드(본원에 참고로 포함된 미국 특허 제4,870,008호), 마우스 타액 아밀라제의 신호 펩타이드(O. Hagenbuchle et al., Nature 289, 1981, pp. 643-646), 변형된 카르복시펩티다제 신호 펩타이드(L. A. Valls et al., Cell 48, 1987, pp. 887-897), 효모 BAR1 신호 펩타이드(본원에 참고로 포함되는 WO 87/02670), 및 효모 아스파르트산 프로테아제 3(YAP3) 신호 펩타이드(문헌 [M. Egel-Mitani et al., Yeast 6, 1990, pp. 127-137] 참조)를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0527] 적합한 포유동물 숙주 세포의 예는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 이러한 숙주 세포는 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포(예를 들어, CHO-K1; ATCC CCL-61), 녹색 원숭이 세포(COS)(예를 들어, COS 1(ATCC CRL-1650), COS 7(ATCC CRL-1651); 마우스 세포(예를 들어, NS/O), 베이비 햄스터 신장(BHK) 세포주(예를 들어, ATCC CRL-1632 또는 ATCC CCL-10) 및 인간 세포(예를 들어, HEK 293(ATCC CRL-1573)), 및 조직 배양 중의 식물 세포일 수 있다. 이러한 세포주 및 다른 세포주는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection, 미국 메릴랜드주 록빌 소재)와 같은 공공 기탁기관으로부터 입수할 수 있다. IL-2 폴리펩타이드의 개선된 글리코실화를 제공하기 위해, 포유동물 숙주 세포는 예를 들어 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제 5,047,335호에 기재된 바와 같이 시알릴트랜스퍼라제, 예를 들어 1,6-시알릴트랜스퍼라제를 발현하도록 변형될 수 있다.

[0528] 포유동물 숙주 세포에 외인성 DNA를 도입하는 방법에는 인산칼슘 매개 형질감염, 전기천공, DEAE-덱스트란 매개 형질감염, 리포솜 매개 형질감염, 바이러스 벡터 및 리포펙타민(Lipofectamin) 2000을 사용하는 라이프 테크놀로지스 엘티디(Life Technologies Ltd, 영국 페이슬리 소재)에 의해 기술된 및 FuGENE 6을 사용하는 로슈 다이아그노스틱스 코퍼레이션(Roche Diagnostics Corporation, 미국 인디애나폴리스 소재)에 의해 기술된 형질감염 방법이 포함되지만, 이로 제한되지 않는다. 이러한 방법은 관련 기술 분야에 잘 알려져 있으며, 문헌 [Ausbel et al. (eds.), 1996, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, USA]에 기재되어 있다. 포유동물 세포의 배양은 예를 들어 문헌 [Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, Edited by Nigel Jenkins, 1999, Human Press Inc. Totowa, N.J., USA] 및 [Harrison Mass. and Rae IF, General Techniques of Cell Culture, Cambridge University Press 1997]에 개시된 바와 같이 확립된 방법에 따라 수행될 수 있다.

[0529] 1. 이. 콜라이. 슈도모나스 중 및 다른 원핵 생물 박테리아 발현 기술은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 매우 다양한 벡터가 박테리아 숙주에 이용될 수 있다. 벡터는 단일 카피 또는 카피수가 적거나 많은 다중 카피 벡터일 수 있다. 벡터는 클로닝 및/또는 발현에 이용될 수 있다. 벡터에 관한 다수의 문헌, 많은 벡터의 상업적 입수 용이성, 및 벡터와 그 제한 지도 및 특성을 기술한 매뉴얼을 감안할 때, 본원에서는 심도있는 설명이 필요하지 않다. 잘 알려져 있는 바와 같이, 벡터는 일반적으로 선택을 가능하게 하는 마커, 세포 독성제 내성을 제공할 수 있는 마커, 자가영양성 또는 면역원성을 제공할 수 있는 마커를 포함한다. 종종, 상이한 특성을 제공하는 복수의 마커가 존재한다.

[0530] 박테리아 프로모터는 박테리아 RNA 폴리머라제에 결합하여 코딩 서열(예를 들어, 구조 유전자)의 mRNA로의 하류(3') 전사를 개시할 수 있는 임의의 DNA 서열이다. 프로모터는 일반적으로 코딩 서열의 5' 말단 가까이에 위치하는 전사 개시 영역을 가질 것이다. 이 전사 개시 영역은 전형적으로 RNA 폴리머라제 결합 부위 및 전사 개시 부위를 포함한다. 박테리아 프로모터는 또한 RNA 합성이 시작되는 인접 RNA 폴리머라제 결합 부위와 중첩될 수 있는 오퍼레이터라 불리는 제2의 도메인을 가질 수 있다. 이 오퍼레이터는 유전자 리프레서 단백질이 오퍼레이터에 결합함에 따라 음으로 조절되는(유도성) 전사를 허용하여, 특정 유전자의 전사를 억제한다. 오퍼레이터와 같은 음성 조절 요소가 없어도 구성적 발현은 일어날 수 있다. 또한, 존재할 경우, 일반적으로 RNA 폴리머라제 결합 서열 가까이에(5') 위치하는 유전자 활성제 단백질 결합 서열에 의해 양성 조절이 일어날 수 있다. 유전자 활성제 단백질의 한 예로는 이화물질 활성제 단백질(CAP)이 있으며, 이것은 에스케리키아 콜라이(이. 콜라이)에서 lac 오페론의 전사 개시를 돕는다(Raibaud et al., Annu. Rev. Genet. (1984) 18:173). 따라서, 조절된 발현은 양성일 수도 있고 음성일 수 있기 때문에, 전사를 증대시키거나 감소시킬 수 있다.

[0531] 대사 경로 효소를 코딩하는 서열이 특히 유용한 프로모터 서열을 제공한다. 그 예는 갈락토스, 락토스(lac)(Chang et al., Nature (1977) 198:1056) 및 말토스와 같은 당 대사 효소 유래의 프로모터 서열을 포함한다. 추가적인 예로는 트립토판(trp)과 같은 생합성 효소로부터 유래된 프로모터 서열을 들 수 있다(본원에서 참고로 포함된 [Goeddel et al., Nuc. Acids Res. (1980) 8:4057; Yelverton et al., Nucl. Acids Res. (1981)

9:731]; 미국 특허 제4,738,921호; EP 공개 제036 776호 및 제121 775호 참조). 또한, β -갈락토시다제(bla) 프로모터 시스템(Weissmann (1981) "The cloning of interferon and other mistakes." In Interferon 3 (Ed. I. Gresser)), bacteriophage lambda PL (Shimatake et al., Nature (1981) 292:128) 및 T5(본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제4,689,406호 참조) 프로모터 시스템 역시 유용한 프로모터 서열을 제공한다. 본 발명의 바람직한 방법은 IL-2 폴리펩타이드를 높은 수준으로 유도하기 위해 T7 프로모터와 같은 강력한 프로모터를 이용한다. 이러한 벡터의 예는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 노바젠(Novagen)의 pET29 시리즈 및 본 명세서에 참고로 포함되는 WO 99/05297에 기재된 pPOP 벡터를 포함한다. 이러한 발현 시스템은 숙주 세포 생존력 또는 성장 파라미터에 불리한 영향을 미치지 않으면서 IL-2 폴리펩타이드를 높은 수준으로 생산한다. pET19(Novagen)는 관련 기술 분야에 공지된 또 다른 벡터이다.

[0532] 또한, 자연에 존재하지 않는 합성 프로모터도 박테리아 프로모터로서 기능한다. 예를 들어, 한 박테리아 또는 박테리오파지 프로모터의 전사 활성화 서열을 다른 박테리아 또는 박테리오파지 프로모터의 오프론 서열과 연결하여, 합성 하이브리드 프로모터를 생성할 수 있다(본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 제4,551,433호 참조). 예를 들어, 상기 tac 프로모터는 lac 리프레서에 의해 조절되는 lac 오프론 서열과 trp 프로모터 양자로 이루어진 하이브리드 trp-lac 프로모터이다([Amann et al., Gene (1983) 25:167]; [de Boer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1983) 80:21])). 또한, 박테리아 프로모터는 박테리아 RNA 폴리머라제에 결합하여 전사를 개시시키는 능력을 갖는 비박테리아 기원의 천연 발생 프로모터를 포함할 수 있다. 또한, 비박테리아 기원의 천연 발생 프로모터 역시 상용성 RNA 폴리머라제와 커플링되어, 원핵생물에서 몇몇의 유전자를 높은 수준으로 발현시킬 수 있다. 박테리오파지 T7 RNA 폴리머라제/프로모터 시스템이 커플링된 프로모터 시스템의 한 예이다([Studier et al., J. Mol. Biol. (1986) 189:113]; [Tabor et al., Proc Natl. Acad. Sci. (1985) 82:1074]). 또한, 하이브리드 프로모터는 또한 박테리오파지 프로모터 및 이. 콜라이 오퍼레이터 영역으로 이루어질 수 있다(EP 공개 제267 851호).

[0533] 기능성 프로모터 서열 이외에도, 효율적인 리보솜 결합 부위 역시 원핵생물에서 외래 유전자의 발현에 유용하다. 이. 콜라이의 경우, 리보솜 결합 부위는 샤인-달가노(SD) 서열로 불리며, 개시 코돈(ATG) 및 상기 개시 코돈의 3-11개 뉴클레오타이드 상류에 위치하는 3-9개 뉴클레오타이드 길이의 서열을 포함한다(Shine et al., Nature (1975) 254:34). SD 서열이 SD 서열과 이. 콜라이 16S rRNA의 3' 사이의 염기쌍 형성에 의해 mRNA가 리보솜에 결합하는 것을 촉진하는 것으로 생각된다(Steitz et al. "Genetic signals and nucleotide sequences in messenger RNA", In Biological Regulation and Development: Gene Expression (Ed. R. F. Goldberger, 1979)). 약한 리보솜 결합 부위를 갖는 진핵생물 유전자 및 원핵생물 유전자를 발현시키는 것에 대해서는. 문헌 [Sambrook et al. "Expression of cloned genes in Escherichia coli", Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989]을 참조한다.

[0534] "박테리아 숙주" 또는 "박테리아 숙주 세포"란 용어는 재조합 벡터 또는 다른 운반 DNA에 대한 수용체로서 사용될 수 있거나 사용된 박테리아를 말한다. 이 용어는 형질감염된 본래의 박테리아 숙주 세포의 자손체를 포함한다. 단일 모세포의 자손체는 우연한 또는 의도된 돌연변이로 인하여 본래의 모세포와 형태에 있어서, 또는 게놈 DNA 또는 전체 DNA 상보체에 있어서 반드시 완전히 동일하지 않을 수 있는 것으로 이해되어야 한다. IL-2 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 존재와 같은 관련된 특성을 갖는 것을 특징으로 하는 모세포와 충분히 유사한 모세포의 자손체는 이 정의가 의도하는 자손체에 포함된다.

[0535] IL-2 폴리펩타이드의 발현을 위한 적절한 숙주 박테리아의 선택은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 발현용 박테리아 숙주를 선택함에 있어서, 적절한 숙주는 특히 우수한 봉입체 형성 능력, 낮은 단백질 분해 활성 및 종합적인 견실성을 갖는 것으로 확인된 것들을 포함할 수 있다. 박테리아 숙주는 일반적으로 유니버시티 오브 캘리포니아(미국 캘리포니아주 버클리 소재)의 생물물리학 및 의학물리학과와 박테리아 유전자 보존 센터(Bacterial Genetic Stock Center)와, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션("ATCC")(미국 버지니아주 매너사스 소재)을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 다양한 공급업체로부터 입수가 가능하다. 산업적/약학적 발효는 일반적으로 K 균주(예를 들어, W3110)로부터 유래된 박테리아 또는 B 균주(예를 들어, BL21)로부터 유래된 박테리아를 사용한다. 이들 균주는 그 성장 파라미터가 매우 잘 알려져 있고 견실성이 있기 때문에 특히 유용하다. 또한, 이들 균주는 비병원성이며, 이는 안전성 및 환경적 이유로 상업상 중요하다. 적절한 이. 콜라이 숙주의 다른 예로는 BL21 균주, DH10B 균주, 또는 이들의 유도체를 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 본 발명 방법의 또 다른 실시양태에서, 상기 이. 콜라이 숙주는 OMP- 및 LON-를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 프로테아제가 없는 균주이다. 숙주 세포 균주는 슈도모나스 플루오레센스, 슈도모나스 아에루기노사 및 슈도모나스 푸티다를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 슈도모나스 종일 수 있다. MB101 균주로 명명되는 슈도모나스 플루오

레센스 비오바 1(*Pseudomonas fluorescens* biovar 1)이 재조합 생산에 유용한 것으로 알려져 있으며, 치료용 단백질의 생산 공정에 이용 가능하다. 슈도모나스 발현 시스템의 예는 더 다우 케미칼 컴퍼니(The Dow Chemical Company)로부터 입수 가능한 시스템을 숙주 균주로서 포함한다(미국 마시건주 미들랜드 소재, www.dow.com으로 접속 가능함).

[0536] 일단 재조합 숙주 세포 균주가 확립되면(즉, 발현 구축물이 숙주 세포에 도입되고 적절한 발현 구축물을 갖는 숙주 세포가 단리되면), 재조합 숙주 세포 균주를 IL-2 폴리펩타이드의 제조에 적합한 조건 하에 배양한다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 알고 있는 바와 같이, 재조합 숙주 세포 균주의 배양 방법은 이용된 발현 구축물의 성질 및 숙주 세포의 종류에 따라 달라질 것이다. 재조합 숙주 균주는 일반적으로 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 이용하여 배양한다. 재조합 숙주 세포는 일반적으로 탄소, 질소 및 무기염의 동화 가능한 공급원을 함유하고 선택적으로 비타민, 아미노산, 성장 인자 및 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 기타 단백질성 배양 보충물을 함유하는 액체 배지에서 배양한다. 숙주 세포 배양을 위한 액체 배지는 선택적으로 바람직하지 않은 미생물의 증식을 방지하기 위한 항생제 또는 항진균제 및/또는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 선택하기 위한 항생제(이로 제한되지 않음)를 비롯한 화합물을 함유할 수 있다.

[0537] 재조합 숙주 세포는, 회분식 또는 연속식으로 세포를 회수하거나(IL-2 폴리펩타이드가 세포 내에 축적되는 경우), 또는 배양 상청액을 회수하면서, 회분식 또는 연속식으로 배양할 수 있다. 진핵 숙주 세포에서의 생산을 위해서는, 회분식 배양 및 세포 회수가 바람직하다.

[0538] 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드는 일반적으로 재조합 시스템에서 발현시킨 후 정제한다. 상기 IL-2 폴리펩타이드는 관련 기술 분야에 공지된 다양한 방법에 의해 숙주 세포 또는 배양 배지로부터 정제될 수 있다. 박테리아 숙주 세포에서 생산되는 IL-2 폴리펩타이드는 난용성 또는 불용성(봉입체의 형태)일 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 본 명세서에 개시된 방법 및 관련 기술 분야에 공지된 방법을 이용하여 재조합적으로 생산된 단백질의 용해도를 증가시키기 위한 목적으로 선택된 아미노산 치환을 IL-2 폴리펩타이드 내로 용이하게 도입할 수 있다. 불용성 단백질의 경우, 이 단백질을 원심분리에 의해 숙주 세포 용해물로부터 수거한 후, 추가로 세포의 균질화를 실시할 수 있다. 난용성 폴리펩타이드의 경우, 폴리에틸렌 이민(PEI)을 포함하지만 이로 제한되지 않는 화합물을 첨가하여 부분 용해성 단백질의 침전을 유도할 수 있다. 그 후, 침전된 단백질을 원심분리에 의해 편리하게 수거할 수 있다. 재조합 숙주 세포를 파괴하거나 균질화하여, 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 방법을 이용하여 세포 내로부터 봉입체를 방출시킬 수 있다. 숙주 세포 파괴 또는 균질화는 효소에 의한 세포 파괴, 초음파 처리, 다운스(dounce) 균질화 또는 고압 방출 파괴를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 잘 알려진 기술을 이용하여 수행할 수 있다. 본 발명 방법의 한 실시양태에서, 고압 방출 기술을 이용하여 이. 콜라이 숙주 세포를 파괴함으로써 IL-2 폴리펩타이드의 봉입체를 방출시킬 수 있다. IL-2 폴리펩타이드의 봉입체를 취급하는 경우, 가용화, 기계적 전단 또는 단백질 분해와 같은 요인으로 인한 손실없이 봉입체의 수율을 최대화하기 위해, 반복 수행시 균질화 시간을 최소화하는 것이 유리할 수 있다.

[0539] 이어서, 관련 기술 분야에 공지된 다수의 적절한 가용화제 중 임의의 것을 사용하여 불용성의 또는 침전된 IL-2 폴리펩타이드를 가용화할 수 있다. IL-2 폴리펩타이드는 우레아 또는 구아니딘 하이드로클로라이드로 가용화할 수 있다. 취급이 편리한 회분 크기를 이용하여 대형 회분을 생산할 수 있도록, 가용화된 IL-2 폴리펩타이드의 부피를 최소화해야 한다. 이 요인은 재조합 숙주가 부피가 수천 리터인 회분에서 배양될 수 있는 대규모 상업적 환경에서 중요할 수 있다. 또한, 특히 인간을 대상으로 한 의약 용도에 있어서는, 대규모 상업적 환경에서 IL-2 폴리펩타이드를 제조하는 경우, 기계류 및 용기, 또는 단백질 생성물 자체에 손상을 줄 수 있는 독한 화학물질은 가능한 한 피해야 한다. 보다 더 독한 변성제인 구아니딘 하이드로클로라이드 대신에 더 순한 변성제인 우레아를 사용하여 IL-2 폴리펩타이드 봉입체를 가용화할 수 있다는 점이 본 발명의 방법에서 확인되었다. 우레아의 사용은 IL-2 폴리펩타이드 봉입체를 효율적으로 가용화하면서 IL-2 폴리펩타이드의 제조 및 정제 공정에서 사용되는 스테인레스 스틸 장치에 대한 손상 위험을 현저하게 감소시킨다.

[0540] 가용성 IL-2 단백질의 경우, IL-2는 주변세포질 공간 또는 배양 배지 내로 분비될 수 있다. 또한, 가용성 IL-2는 숙주 세포의 세포질에 존재할 수 있다. 정제 단계를 수행하기 전에 가용성 IL-2를 농축하는 것이 바람직할 수 있다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 알려진 표준 기술을 사용하여, 예를 들어 세포 용해물 또는 배양 배지로부터 가용성 IL-2를 농축할 수 있다. 또한, 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 기술을 사용하여, 숙주 세포를 파괴하고 숙주 세포의 세포질 또는 주변세포질 공간으로부터 가용성 IL-2를 방출할 수 있다.

[0541] 일반적으로, 발현된 폴리펩타이드를 변성시키고 환원시킨 후, 폴리펩타이드를 바람직한 입체구조로 재폴딩하는

것이 종종 바람직하다. 예를 들어, 구아니딘, 우레아, DTT, DTE 및/또는 샤페로닌을 관심 번역 생성물에 첨가할 수 있다. 단백질의 환원, 변성 및 재생 방법은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다(상기 참고문헌 및 문헌 [Debinski, et al. (1993) J. Biol. Chem., 268: 14065-14070]; [Kreitman and Pastan (1993) Bioconjug. Chem., 4: 581-585]; 및 [Buchner, et al., (1992) Anal. Biochem., 205: 263-270] 참조). 예를 들어, 데빈스키(Debinski) 등의 문헌은 구아니딘-DTE 중에서의 봉입체 단백질의 변성 및 환원에 관해 설명하고 있다. 이 단백질은 산화된 글루타티온 및 L-아르기닌을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 산화환원 완충제 중에서 재폴딩될 수 있다. 재폴딩 시약은 유동하거나 다른 방식으로 이동하여 하나 이상의 폴리펩타이드 또는 다른 발현 생성물과 접촉할 수 있고, 반대로 하나 이상의 폴리펩타이드 또는 다른 발현 생성물이 유동하거나 다른 방식으로 이동하여 재폴딩 시약과 접촉할 수 있다.

[0542] IL-2 폴리펩타이드를 원핵생물에서 생산하는 경우, 제조된 IL-2 폴리펩타이드는 미스폴딩되어 생물학적 활성을 갖지 않거나 감소된 생물학적 활성을 가질 수 있다. 이 단백질의 생물학적 활성은 "재폴딩"에 의해 회복될 수 있다. 일반적으로, 미스폴딩된 IL-2 폴리펩타이드는 예를 들어 하나 이상의 카오토로픽제(예를 들어, 우레아 및/또는 구아니딘), 및 디설파이드 결합을 환원시킬 수 있는 환원제(예를 들어, 디티오프레이톨(DTT) 또는 2-머캅토에탄올(2-ME))를 사용하여 폴리펩타이드 사슬을 가용화하고(여기서, IL-2 폴리펩타이드 또한 불용성임), 언폴딩하고, 환원시킴으로써 재폴딩한다. 그 후, 중간 정도의 무질서 상태에서, 디설파이드 결합을 재형성시킬 수 있는 산화제(예를 들어, 산소, 시스틴 또는 시스타민)를 첨가한다. IL-2 폴리펩타이드는 관련 기술 분야에 공지된 표준 방법, 예를 들어 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제4,511,502호, 제4,511,503호 및 제4,512,922호에 기재된 방법을 이용하여 재폴딩할 수 있다. 또한, IL-2 폴리펩타이드를 다른 단백질과 코폴딩하여 이중량체 또는 이종다량체를 형성할 수 있다.

[0543] 재폴딩 후, IL-2를 추가로 정제할 수 있다. IL-2의 정제는 소수성 상호작용 크로마토그래피, 크기 배제 크로마토그래피, 이온 교환 크로마토그래피, 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 등 또는 이들의 임의의 조합을 비롯하여 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 다양한 기술을 이용하여 수행할 수 있다. 또한, 추가적인 정제는 정제된 단백질의 건조 또는 침전 단계를 포함할 수 있다.

[0544] 정제 후, IL-2을 상이한 완충제로 교환하고/하거나, 정용여과 및 투석을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 관련 기술 분야에 공지된 다양한 임의의 방법에 의해 농축시킬 수 있다. 단일 정제 단백질로서 제공되는 IL-2는 응집 시키고 침전시킬 수 있다.

[0545] 상기 정제된 IL-2의 순도는 (역상 고성능 액체 크로마토그래피, 즉 RP-HPLC, 또는 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동, 즉 SDS-PAGE에 의해 측정시) 적어도 90%, 또는 적어도 95%, 또는 적어도 96%, 또는 적어도 97%, 또는 적어도 98% 또는 적어도 99% 또는 그 초과일 수 있다. IL-2의 순도의 정확한 수치값과 관계없이, 상기 IL-2의 순도는 약학적 제품으로서 사용하거나 또는 PEG와 같은 수용성 중합체와의 접합과 같은 추가의 공정에 사용하기에 충분하다.

[0546] 특정 IL-2 분자는 (부형제, 담체, 및 안정화제, 혈청 알부민 등 이외의) 다른 활성 성분 또는 단백질 없이도 치료제로서 사용될 수 있거나, 또는 상기 분자는 또 다른 단백질 또는 중합체와 복합체화될 수 있다.

[0547] 이전에, 원하는 앰버 년센스 돌연변이를 포함하는 유전자로 프로그래밍된 단백질 합성 반응에 화학적으로 아미노아실화된 서프레스 tRNA를 첨가함으로써 비천연 아미노산이 시험관 내에서 부위 특이적으로 단백질에 도입될 수 있다는 것이 밝혀졌다. 이러한 접근법을 사용하여, 특정 아미노산에 대한 영양요구성(auxotrophic) 균주를 사용하여 페닐알라닌 대신 플루오로페닐알라닌과 같은 근접한 구조적 상동체로 통상적인 20개의 아미노산을 치환할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Noren, C.J., Anthony-Cahill, Griffith, M.C., Schultz, P.G. *A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins*, Science, 244: 182-188 (1989)]; [M.W. Nowak, et al., Science 268:439-42 (1995)]; [Bain, J.D., Glabe, C.G., Dix, T.A., Chamberlin, A.R., Diala, E.S. *Biosynthetic site-specific Incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide*, J. Am Chem Soc, 111:8013-8014 (1989)]; [N. Budisa et al., FASEB J. 13:41-51 (1999)]; [Ellman, J.A., Mendel, D., Anthony-Cahill, S., Noren, C.J., Schultz, P.G. *Biosynthetic method for introducing unnatural amino acids site-specifically into proteins*, Methods in Enz., vol. 202, 301-336 (1992)]; 및 [Mendel, D., Cornish, V.W. & Schultz, P.G. *Site-Directed Mutagenesis with an Expanded Genetic Code*, Annu Rev Biophys. Biomol Struct. 24, 435-62 (1995)]을 참조한다.

[0548] 예를 들어, 정지 코돈 UAG를 인식하고 비천연 아미노산에 의해 화학적으로 아미노아실화된 서프레스 tRNA를 제조하였다. 단백질 유전자의 관심 부위에 정지 코돈 UAG을 도입하기 위해 통상적인 부위 지정 돌연변이 유발을

이용하였다. 예를 들어, 문헌 [Sayers, J.R., Schmidt, W. Eckstein, F. 5'-3' *Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis*, Nucleic Acids Res, 16(3):791-802 (1988)]을 참조한다. 아실화된 서프레스 tRNA 및 돌연변이 유전자가 시험관내 전사/번역 시스템에서 조합될 경우, 비천연 아미노산은 UAG 코돈에 반응하여 도입되어, 특정 위치에 아미노산을 포함하는 단백질을 생성하였다. [³H]-Phe를 사용한 실험 및 α-하이드록시산을 사용한 실험을 통해, 원하는 아미노산만이 UAG 코돈에 의해 지정된 위치에 도입되며, 이 아미노산은 단백질 내의 임의의 다른 위치에는 도입되지 않는다는 것이 입증되었다. 예를 들어, 문헌 [Noren, et al., *supra*]; [Kobayashi et al., (2003) Nature Structural Biology 10(6):425-432]; 및 [Ellman, J.A., Mendel, D., Schultz, P.G. *Site-specific incorporation of novel backbone structures into proteins*, Science, 255(5041):197-200 (1992)]을 참조한다.

[0549] 화학적 또는 효소적 아미노아실화를 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 방법 또는 기술을 이용하여 tRNA를 원하는 아미노산으로 아미노아실화할 수 있다.

[0550] 아미노아실화는 아미노아실 tRNA 합성효소 또는 리보자임을 포함하지만 이로 제한되지 않는 다른 효소 분자를 사용하여 수행할 수 있다. "리보자임"이란 용어는 "촉매 RNA"와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다. 체크 (Cech)와 동료들([Cech, 1987, Science, 236:1532-1539]; [McCorkle et al., 1987, Concepts Biochem. 64:221-226])은 촉매로서 작용할 수 있는 천연 발생 RNA(리보자임)의 존재를 입증하였다. 그러나, 이러한 천연 RNA 촉매는 절단 및 스플라이싱을 위해 단지 리보핵산 기질에 작용하는 것으로 나타났음에도 불구하고, 리보자임의 인위적 진화에 대한 최근의 발전은 촉매 작용 레퍼토리를 다양한 화학 반응으로 확장시켰다. 연구에 의해, 그 자신의 (2')3' 말단에 있는 아미노아실-RNA 결합을 촉매할 수 있는 RNA 분자(Illangakekare et al., 1995 Science 267:643-647), 한 RNA 분자로부터 또 다른 분자로 아미노산을 전달할 수 있는 RNA 분자가 확인되었다 (Lohse et al., 1996, Nature 381:442-444).

[0551] 본 명세서에서 참고로 포함되는 미국 특허 출원 공개 제2003/0228593호는 리보자임을 구축하는 방법 및 천연적으로 코딩된 아미노산과 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 tRNA를 아미노아실화하는 데 있어서의 그의 용도에 관해 기재한다. 리보자임을 포함하지만 이로 제한되지 않는, tRNA를 아미노아실화할 수 있는 효소 분자의 기질 비고정 형태는 아미노아실화된 생성물의 효율적인 진화도 정제를 가능하게 할 수 있다. 적절한 기질의 예로는 아가로스, 세파로스 및 자성 비드를 들 수 있다. 아미노아실화를 위한 리보자임의 기질 비고정 형태의 제조 및 사용은 문헌 [Chemistry and Biology 2003, 10:1077-1084] 및 미국 특허 출원 공개 제2003/0228593호에 기재되어 있으며, 이들 문헌은 본 명세서에서 참고로 포함된다.

[0552] 아미노아실화에서 합성효소의 사용을 피한 화학적 아미노아실화 방법은 헤흐트(Hecht)와 그의 동료에 의해 도입된 것([Hecht, S. M. Acc. Chem. Res. 1992, 25, 545]; [Heckler, T. G.; Roesser, J. R.; Xu, C.; Chang, P.; Hecht, S. M. Biochemistry 1988, 27, 7254]; [Hecht, S. M.; Alford, B. L.; Kuroda, Y.; Kitano, S. J. Biol. Chem. 1978, 253, 4517]) 및 숄츠(Schultz), 챔벌린(Chamberlin), 도허티(Dougherty) 등에 의해 도입된 것([Cornish, V. W.; Mendel, D.; Schultz, P. G. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 1995, 34, 621; Robertson, S. A.; Ellman, J. A.; Schultz, P. G. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 2722]; [Noren, C. J.; Anthony-Cahill, S. J.; Griffith, M. C.; Schultz, P. G. Science 1989, 244, 182]; [Bain, J. D.; Glabe, C. G.; Dix, T. A.; Chamberlin, A. R. J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, 8013]; [Bain, J. D. et al. Nature 1992, 356, 537]; [Gallivan, J. P.; Lester, H. A.; Dougherty, D. A. Chem. Biol. 1997, 4, 740]; [Turcatti, et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 19991]; [Nowak, M. W. et al. Science, 1995, 268, 439]; [Saks, M. E. et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 23169]; [Hohsaka, T. et al. J. Am. Chem. Soc. 1999, 121, 34])을 포함하지만 이들로 제한되지 않으며, 상기 문헌들은 본 명세서에서 참고로 포함된다. 이러한 방법들 및 다른 화학적 아미노아실화 방법을 tRNA 분자를 아미노아실화하는 데 이용할 수 있다.

[0553] 촉매 RNA를 생성하는 방법은 무작위화된 리보자임 서열의 별개의 풀을 생성하는 단계, 상기 풀에 대해 방향성 진화를 수행하는 단계, 바람직한 아미노아실화 활성에 대해 상기 풀을 스크리닝하는 단계 및 원하는 아미노아실화 활성을 나타내는 리보자임의 서열을 선택하는 단계를 포함할 수 있다.

[0554] 또한, 재구성된 번역 시스템을 사용할 수도 있다. 정제된 번역 인자의 혼합물뿐만 아니라, 개시 인자-1(IF-1), IF-2, IF-3 (α 또는 β), 연장 인자 T(EF-Tu), 또는 종결 인자와 같은 정제된 번역 인자가 보충된 용해물 또는 용해물들의 조합도 역시 mRNA를 단백질로 번역하기 위해 성공적으로 사용되었다. 또한, 무세포 시스템은 또한 커플링된 전사/번역 시스템일 수 있으며, 이때 DNA는 시스템으로 도입되어 mRNA로 전사되고, 그 mRNA는 본 명세서에서 구체적으로 참고로 포함되는 문헌 [Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al.

editors, Wiley Interscience, 1993)]에 기재된 바와 같이 번역된다. 진핵 세포 전사 시스템에서 전사된 RNA는 이중핵 RNA(hnRNA) 또는 5' 말단 캡(7-메틸 구아노신) 및 3' 말단 폴리 A 테일 성숙 mRNA의 형태일 수 있으며, 이것은 특정 번역 시스템에서 유익할 수 있다. 예를 들어, 캐핑된 mRNA는 망상적혈구 용해물 시스템에서 고효율로 번역된다.

[0555] IX. IL-2 폴리펩타이드에 커플링된 거대분자 중합체

[0556] 본 명세서에서 설명되는 비천연 아미노산 폴리펩타이드에 대한 다양한 변형은 본 명세서에서 설명되는 조성물, 방법, 기술 및 전략을 이용하여 수행할 수 있다. 이러한 변형은 표지, 염료, 중합체, 수용성 중합체, 폴리에틸렌 글리콜의 유도체, 광가교결합체, 방사성핵종, 세포 독성 화합물, 약물, 친화도 표지, 광친화도 표지, 반응성 화합물, 수지, 제2 단백질 또는 폴리펩타이드 또는 폴리펩타이드 유사체, 항체 또는 항체 단편, 금속 킬레이팅제, 보조 인자, 지방산, 탄수화물, 폴리뉴클레오타이드, DNA, RNA, 안티센스 폴리뉴클레오타이드, 사카라이드, 수용성 텐드머, 사이클로텍스트린, 억제성 리보핵산, 생물학적 물질, 나노입자, 스핀 표지, 형광단, 금속 함유 모이어티, 방사성 모이어티, 신규 작용기, 다른 분자와 공유 또는 비공유적으로 상호작용하는 기, 광케이지된 모이어티, 화학선에 의해 여기 가능한 모이어티, 광이성질체화 가능 모이어티, 바이오틴, 바이오틴 유도체, 바이오틴 유사체, 무거운 원자를 포함하는 모이어티, 화학적으로 절단 가능한 기, 광절단 가능한 기, 연장된 측쇄, 탄소 결합된 당, 산화환원 활성 물질, 아미노 티오산, 독성 모이어티, 동위원소 표지 모이어티, 생물물리적 프로브, 인광성 기, 화학발광성 기, 전자 밀집 기, 자성 기, 인터칼레이팅 기, 발색단, 에너지 전달체, 생물학적 활성 물질, 검출 가능한 표지, 소분자, 양자점, 나노트랜스미터, 방사성 뉴클레오타이드, 라디오트랜스미터, 중성자 포획체, 또는 상기 화합물 또는 물질 또는 임의의 다른 바람직한 화합물 또는 물질의 임의의 조합물을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 추가 작용기를 폴리펩타이드의 비천연 아미노산 성분에 도입하는 것을 포함한다. 본 명세서에서 설명되는 조성물, 방법, 기술 및 전략의 예시적인 비제한적인 예로서, 하기 설명은, 여기에 기재된 조성물, 방법, 기술 및 전략이 또한 상기 설명한 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는 다른 작용기를 추가하기 위해 적용될 수 있다는 이해 하에(필요에 따라, 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 본 명세서의 개시내용을 통해 실시할 수 있는, 적절한 변형이 가해짐), 비천연 아미노산 폴리펩타이드에 거대분자 중합체를 추가하는 것에 초점을 맞출 것이다.

[0557] 매우 다양한 거대분자 중합체 및 기타 분자를 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드에 연결하여, IL-2 폴리펩타이드의 생물학적 특성을 조절하고/하거나 IL-2 분자에 새로운 생물학적 특성을 제공할 수 있다. 이러한 거대분자 중합체는 천연적으로 코딩된 아미노산, 비천연적으로 코딩된 아미노산, 또는 천연 또는 비천연 아미노산의 임의의 기능성 치환체, 또는 천연 또는 비천연 아미노산에 부가된 임의의 치환체 또는 작용기를 통해 IL-2 폴리펩타이드에 연결될 수 있다. 상기 중합체의 분자량은 약 100 Da 내지 약 100,000 Da 또는 그 초과를 포함하는 다양한 범위일 수 있으나, 이로 제한되지 않는다. 상기 중합체의 분자량은 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, 및 100 Da를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 약 100 Da 내지 약 100,000 Da일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 중합체의 분자량은 약 100 Da 내지 약 50,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 상기 중합체의 분자량은 약 100 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 상기 중합체의 분자량은 약 1,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 상기 중합체의 분자량은 약 5,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 상기 중합체의 분자량은 약 10,000 Da 내지 약 40,000 Da이다.

[0558] 본 발명은 실질적으로 균질한 중합체:단백질 접합체 제제를 제공한다. 본 명세서에서 사용되는 "실질적으로 균질한"이란 중합체:단백질 접합체가 전체 단백질의 절반보다 더 많은 것으로 관찰된다는 것을 의미한다. 상기 중합체:단백질 접합체는 생물학적 활성을 가지며, 본 발명에서 제공되는 "실질적으로 균질한" PEG화된 IL-2 폴리펩타이드 제제는 균질한 제제의 이점, 예를 들어, 로트 대 로트 약력학의 예측성에 있어서의 임상적 적용의 용이성을 나타내기에 충분히 균질한 것이다.

[0559] 또한, 중합체:단백질 접합체 분자의 혼합물의 제조를 선택할 수 있고, 본 발명에서 제공되는 이점은 혼합물 중에 포함시키기 위한 단독 중합체:단백질 접합체의 비율을 선택할 수 있다는 것이다. 따라서, 필요에 따라, 다양한 단백질과 다양한 수의 부착된 중합체 모이어티(즉, 디-, 트리-, 테트라- 등)과의 혼합물을 제조하고, 상기 접합체를 본 발명의 방법을 이용하여 제조한 단독 중합체:단백질 접합체와 조합하고, 미리 결정된 비율의 단독 중합체:단백질 접합체를 갖는 혼합물을 얻을 수 있다.

- [0560] 선택된 중합체는, 이것이 부착된 단백질이 수성 환경, 예를 들어 생리학적 환경에서 침전되지 않도록 수용성일 수 있다. 상기 중합체는 분지형 또는 비분지형일 수 있다. 최종 생성물 제제의 치료 용도를 위해서는, 상기 중합체는 약학적으로 허용 가능한 것이다.
- [0561] 중합체의 예로는 다음을 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다: 폴리알킬 에테르 및 이의 알콕시 캐핑된 유사체(예를 들어, 폴리옥시에틸렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌/프로필렌 글리콜, 및 이의 메톡시 또는 에톡시 캐핑된 유사체, 특히 폴리에틸렌 글리콜 또는 PEG로도 알려진 폴리옥시에틸렌 글리콜); 폴리비닐피롤리돈; 폴리비닐알킬 에테르; 폴리옥사졸린, 폴리알킬 옥사졸린 및 폴리하이드록시알킬 옥사졸린; 폴리아크릴아마이드, 폴리알킬 아크릴아마이드, 및 폴리하이드록시알킬 아크릴아마이드(예를 들어, 폴리하이드록시프로필메타크릴아마이드 및 이의 유도체); 폴리하이드록시알킬 아크릴레이트; 폴리시알산 및 이의 유사체; 친수성 펩타이드 서열; 텍스트란 및 텍스트란 유도체, 예를 들어 카르복시메틸텍스트란, 텍스트란 설페이트, 아미노텍스트란을 포함하는 폴리사카라이드 및 이의 유도체; 셀룰로스 및 이의 유도체, 예를 들어, 카르복시메틸 셀룰로스, 하이드록시알킬 셀룰로스; 키틴 및 이의 유도체, 예를 들어, 키토산, 숙시닐 키토산, 카르복시메틸키틴, 카르복시메틸키토산; 히알루론산 및 이의 유도체; 전분; 알기네이트; 콘드로이틴 설페이트; 알부민; 폴루란 및 카르복시메틸 폴루란; 폴리아미노산 및 이의 유도체, 예를 들어 폴리글루탐산, 폴리라이신, 폴리아스파르트산, 폴리아스파르트아마이드; 말레산 무수물 공중합체, 예를 들어 스티렌 말레산 무수물 공중합체, 디비닐에틸 에테르 말레산 무수물 공중합체; 폴리비닐 알코올; 이들의 공중합체; 이들의 삼원 공중합체; 이들의 혼합물; 및 이들의 유도체.
- [0562] 단백질 분자에 대한 폴리에틸렌 글리콜 분자의 비율은 반응 혼합물 중 그 농도에 따라 달라지게 된다. 일반적으로, (최소한의 과량의 미반응 단백질 또는 중합체가 존재한다는 점에서 반응 효율에 비추어) 최적 비는 선택되는 폴리에틸렌 글리콜의 분자량 및 이용 가능한 반응성 기의 수에 의해 결정될 수 있다. 분자량의 경우에는, 일반적으로 중합체의 분자량이 클수록, 단백질에 부착될 수 있는 중합체 분자의 수가 적다. 이와 유사하게, 이들 파라미터를 최적화할 때 중합체의 분지화를 고려해야 한다. 일반적으로, 분자량이 클수록(또는 분지가 많을수록) 중합체:단백질 비가 크다.
- [0563] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, PEG:IL-2 폴리펩타이드 접합체를 고려할 경우, "치료 유효량"이란 표현은 환자에게 원하는 이익을 제공하는 양을 말한다. 이 양은 개체마다 다르고, 환자의 전체적인 신체 조건 및 치료하고자 하는 병태의 기본 원인을 비롯한 다수의 요인에 따라 달라진다. 치료에 사용되는 IL-2 폴리펩타이드의 양은 허용 가능한 변화율을 제공하고, 원하는 반응을 유익한 수준으로 유지한다. 본 발명에 따른 조성물의 치료 유효량은 공개적으로 입수 가능한 물질 및 절차를 이용하여 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 용이하게 확인할 수 있다.
- [0564] 상기 수용성 중합체는 선형, 포크형(forked) 또는 분지형을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 임의의 구조 형태일 수 있다. 일반적으로, 상기 수용성 중합체는 폴리(알킬렌 글리콜), 예를 들어 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG)이지만, 다른 수용성 중합체도 사용될 수 있다. 예를 들어, PEG가 본 발명의 특정 실시양태를 설명하기 위해 사용된다.
- [0565] PEG는 상업적으로 입수할 수 있거나 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 따라 에틸렌 글리콜의 개환 중합에 의해 제조할 수 있는 잘 알려진 수용성 중합체이다(Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161). "PEG"란 용어는 PEG의 크기 또는 말단 변형에 관계없이 임의의 폴리에틸렌 글리콜 분자를 포함하는 것으로 넓은 의미로 사용되며, 하기 식에 의해 IL-2 폴리펩타이드에 연결된 것으로 나타낼 수 있다:
- [0566]
$$XO-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-Y$$
- [0567] 상기 식에서, n은 2 내지 10,000이고, X는 H, 또는 C₁₋₄ 알킬, 보호기, 또는 말단 작용기를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 말단 변형기이다.
- [0568] 일부 경우에, 본 발명에서 사용되는 PEG는 한쪽 말단에 하이드록시 또는 메톡시(즉, X는 H 또는 CH₃임)("메톡시 PEG")를 갖도록 종결된다. 대안적으로, PEG는 반응성 기를 갖도록 종결되어 이작용성 중합체를 형성할 수 있다. 전형적인 반응성 기는 20개의 일반적인 아미노산에 존재하는 작용기와 반응하는 데 통상적으로 사용되는 반응성 기[말레이미드기, 활성화된 카르보네이트(p-니트로페닐 에스테르를 포함하지만 이로 제한되지 않음), 활성화된 에스테르(N-하이드록시숙신이미드, p-니트로페닐 에스테르를 포함하지만 이들로 제한되지 않음) 및 알데하이드를 포함하지만 이들로 제한되지 않음]뿐만 아니라, 20개의 일반적인 아미노산에 대해 비활성이지만 비천연적으

로 코딩된 아미노산에 존재하는 상보적 작용기(아지드기 및 알킨기를 포함하지만 이로 제한되지 않음)와 특이적으로 반응하는 작용기를 포함할 수 있다. 상기 화학식에서 Y로 표시되는 PEG의 다른 쪽 말단이 비천연 발생 아미노산 또는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 통해 IL-2 폴리펩타이드에 직접 또는 간접적으로 부착된다는 것을 인식해야 한다. 예를 들어, Y는 폴리펩타이드의 아민기(라이신의 엡실론 아민 또는 N 말단을 포함하지만 이로 제한되지 않음)에 대한 아마이드, 카르바메이트 또는 우레아 연결일 수 있다. 대안적으로, Y는 티올기(시스테인의 티올기를 포함하지만 이로 제한되지 않음)에 대한 말레이미드 연결일 수 있다. 대안적으로, Y는 20개의 일반적인 아미노산을 통해서는 일반적으로 얻을 수 없는 잔기에 대한 연결일 수 있다. 예를 들어, PEG 상의 아지드기는 IL-2 폴리펩타이드 상의 알킨기와 반응하여, 휘스젠 [3+2] 고리 부가 반응 생성물을 형성할 수 있다. 대안적으로, PEG 상의 알킨기가 비천연적으로 코딩된 아미노산에 존재하는 아지드기와 반응하여 유사한 생성물을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 강한 친핵체(하이드라진, 하이드라지드, 하이드록실아민, 세미카르바지드를 포함하지만 이들로 제한되지 않음)를 비천연적으로 코딩된 아미노산에 존재하는 알데하이드 또는 케톤 기와 반응시켜, 선택적으로 하이드라존, 옥심 또는 세미카르바존을 형성할 수 있으며, 이것은 일부 경우 적절한 환원제를 사용한 처리로 추가로 환원시킬 수 있다. 대안적으로, 강한 친핵체를 비천연적으로 코딩된 아미노산을 통해 IL-2 폴리펩타이드로 도입하여, 수용성 중합체에 존재하는 케톤 또는 알데하이드 기와 우선적으로 반응시키는 데 사용할 수 있다.

[0569] 약 100 달톤(Da) 내지 100,000 Da 또는 그 초과(때때로 0.1-50 kDa 또는 10-40 kDa을 포함하지만 이로 제한되지 않음)을 포함하지만 이로 제한되지 않는 PEG의 임의의 분자량이 실제 필요에 따라 사용될 수 있다. PEG의 분자량은 약 100 Da 내지 약 100,000 Da 또는 그 초과를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 다양한 범위일 수 있다. PEG는 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, 및 100 Da을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 약 100 Da 내지 약 100,000 Da일 수 있다. 일부 실시양태에서, PEG는 약 100 Da 내지 약 50,000 Da이다. 일부 실시양태에서, PEG는 약 100 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, PEG는 약 1,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, PEG는 약 5,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, PEG는 약 10,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 각각의 사슬의 분자량 범위가 1-100 kDa(1-50 kDa 또는 5-20 kDa을 포함하지만 이들로 제한되지 않음)인 PEG 분자를 포함하지만 이로 제한되지 않는 분지쇄 PEG 또한 사용될 수 있다. 분지쇄 PEG의 각각의 사슬의 분자량은 약 1,000 Da 내지 약 100,000 Da 또는 그 초과를 포함할 수 있지만, 이로 제한되지 않는다. 상기 분지쇄 PEG의 각각의 사슬의 분자량은 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 및 1,000 Da을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 약 1,000 Da 내지 약 100,000 Da일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 분지쇄 PEG의 각각의 사슬의 분자량은 약 1,000 Da 내지 약 50,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 상기 분지쇄 PEG의 각각의 사슬의 분자량은 약 1,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 상기 분지쇄 PEG의 각각의 사슬의 분자량은 약 5,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 상기 분지쇄 PEG의 각각의 사슬의 분자량은 약 5,000 Da 내지 약 20,000 Da이다. 다양한 PEG 분자가 본 명세서에 참고로 포함되는 쉬어워터 폴리머즈, 인크.(Shearwater Polymers, Inc.) 카탈로그, 넥타르써라퓨틱스(Nektar Therapeutics) 카탈로그에 기재되어 있지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0570] 일반적으로, 상기 PEG 분자의 적어도 하나의 말단은 비천연적으로 코딩된 아미노산과의 반응에 이용될 수 있다. 예를 들어, 아미노산 측쇄와의 반응을 위한 알킨 및 아지드 모이어티를 보유하는 PEG 유도체를 사용하여, PEG를 본 명세서에 설명되는 비천연적으로 코딩된 아미노산에 부착시킬 수 있다. 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산이 아지드를 포함할 경우, PEG는 일반적으로 [3+2] 고리 부가 반응 생성물을 형성할 수 있도록 알킨 모이어티를 포함하거나 아마이드 연결을 형성할 수 있도록 포스포닌기를 포함하는 활성화된 PEG 중(즉, 에스테르, 카르보네이트)을 포함한다. 대안적으로, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산이 알킨을 포함할 경우, PEG는 일반적으로 [3+2] 휘스젠 고리 부가 반응 생성물을 형성할 수 있도록 아지드 모이어티를 포함한다. 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산이 카르보닐기를 포함할 경우, PEG는 일반적으로 각각 상응하는 하이드라존, 옥심 및 세미카르바존 연결을 형성할 수 있도록 강한 친핵체(하이드라지드, 하이드라진, 하이드록실아민, 또는 세미카르바지드 작용기를 포함하지만 이들로 제한되지 않음)를 포함할 것이다. 대안적으로, 상기 설명한 반응성 기 배향의 역배향이 이용될 수 있으며, 즉, 비천연적으로 코딩된 아미노산의 아지드 모이어티를 알킨을 포함하는 PEG 유도체와 반응시킬 수 있다.

- [0571] 일부 실시양태에서, PEG 유도체를 갖는 IL-2 폴리펩타이드 변이체는 비천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄 상에 존재하는 화학적 작용기에 반응성인 화학적 작용기를 포함한다.
- [0572] 본 발명은 일부 실시양태에서 평균 분자량이 약 800 Da 내지 약 100,000 Da인 수용성 중합체 골격을 포함하는 아지드 및 아세틸렌 함유 중합체 유도체를 제공한다. 상기 수용성 중합체의 중합체 골격은 폴리(에틸렌 글리콜)일 수 있다. 그러나, 폴리(덱스트란) 및 폴리(프로필렌 글리콜)를 비롯한 폴리(에틸렌)글리콜 및 다른 관련 중합체를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 매우 다양한 수용성 중합체도 본 발명의 실시예에 사용하기에 적합하며, PEG 또는 폴리(에틸렌 글리콜)이란 명칭의 사용은 그러한 분자를 모두 포함하고 포괄하는 것임이 이해되어야 한다. PEG란 용어는 이작용성 PEG, 다중 아암형(multiarmed) PEG, 유도체화 PEG, 포크형 PEG, 분지형 PEG, 현수형(pendent) PEG(즉, 중합체 골격에 현수된 하나 이상의 작용기를 갖는 PEG 또는 관련 중합체), 또는 내부에 분해 가능한 연결을 갖는 PEG를 비롯하여 그의 임의의 형태의 폴리(에틸렌 글리콜)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0573] PEG는 일반적으로 투명하고, 무색 무취이며, 수용성이고, 열에 안정하고, 많은 화학 물질에 대해 비활성이며, 가수분해 또는 열화되지 않고, 일반적으로 비독성이다. 폴리(에틸렌 글리콜)은 생체적합성 물질로서 간주된다. 즉, PEG는 살아있는 조직 또는 유기체에 손상을 주지 않으면서 공존할 수 있다. 더욱 구체적으로, PEG는 실질적으로 비면역원성이다. 즉, PEG는 체내에서 면역 반응을 일으키지 않는 경향이 있다. PEG가 체내에서 일정한 바람직한 기능을 갖는 분자, 예를 들어 생물학적 활성 물질에 부착될 경우, PEG는 상기 물질을 마스킹하는 경향이 있어서 유기체가 상기 물질의 존재를 허용할 수 있도록 임의의 면역 반응을 감소시키거나 제거할 수 있다. PEG 접합체는 실질적인 면역 반응을 유발하거나 응고 또는 다른 바람직하지 않은 효과를 유발하는 경향을 나타내지 않는다. 화학식 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ (여기서, n 은 약 3 내지 약 4,000이고, 일반적으로 약 20 내지 약 2,000임)로 표시되는 PEG가 본 발명에 사용하기에 적합하다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 분자량이 약 800 Da 내지 약 100,000 Da인 PEG가 중합체 골격으로서 특히 유용하다. PEG의 분자량은 약 100 Da 내지 약 100,000 Da 또는 그 초과를 포함하지만 이로 제한되지 않는 다양한 범위일 수 있다. PEG의 분자량은 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da, 및 100 Da를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 약 100 Da 내지 약 100,000 Da일 수 있다. 일부 실시양태에서, PEG의 분자량은 약 100 Da 내지 약 50,000 Da이다. 일부 실시양태에서, PEG의 분자량은 약 100 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, PEG의 분자량은 약 1,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, PEG의 분자량은 약 5,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, PEG의 분자량은 약 10,000 Da 내지 약 40,000 Da이다.
- [0574] 상기 중합체 골격은 선형 또는 분지형일 수 있다. 분지형 중합체 골격은 일반적으로 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 전형적으로, 분지형 중합체는 중심 분지 코어 부분과 이 중심 분지 코어에 연결된 다수의 선형 중합체 사슬을 갖는다. PEG는 다양한 폴리올, 예를 들어 글리세롤, 글리세롤 올리고머, 펜타에리트리톨 및 소르비톨에 에틸렌 옥사이드를 첨가함으로써 제조할 수 있는 분지형으로 사용된다. 또한, 상기 중심 분지 부분은 몇몇 아미노산, 예를 들어 라이신으로부터 유도될 수 있다. 분지형 폴리(에틸렌 글리콜)은 일반적으로 화학식 $\text{R}(-\text{PEG}-\text{OH})_m$ (여기서, R은 코어 모이어티, 예를 들어 글리세롤, 글리세롤 올리고머 또는 펜타에리트리톨로부터 유도되고, m 은 아암의 수를 나타냄)으로 표시될 수 있다. 또한, 다중 아암형 PEG 분자, 예를 들어 본 명세서에 각각 그 전체가 참고로 포함되는 미국 특허 제5,932,462호, 제5,643,575호, 제5,229,490호 및 제4,289,872호; 미국 특허 출원 제2003/0143596호; WO 96/21469; 및 WO 93/21259에 기재된 것들도 중합체 골격으로서 사용될 수 있다.
- [0575] 또한, 분지형 PEG는 $\text{PEG}(-\text{YCH}_2)_n$ (여기서, Y는 링커기이고, Z는 일정한 길이의 원자 사슬에 의해 CH에 연결된 활성화된 말단 기임)으로 표시되는 포크형 PEG의 형태일 수 있다.
- [0576] 또 다른 분지 형태인 현수형 PEG는 PEG 사슬의 말단이 아니라 PEG 골격을 따라 카르복실기와 같은 반응성 기를 갖는다.
- [0577] 또한, 이러한 PEG 형태 이외에, 골격 내에 약한 또는 분해 가능한 연결을 갖는 중합체를 제조할 수 있다. 예를 들어, 중합체 골격 내에 가수 분해되기 쉬운 에스테르 결합을 갖는 PEG를 제조할 수 있다. 아래에서 제시되는 바와 같이, 이러한 가수분해는 상기 중합체를 저분자량의 단편으로 절단시킨다:

- [0578] $\text{-PEG-CO}_2\text{-PEG-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{PEG-CO}_2\text{H} + \text{HO-PEG-}$
- [0579] 관련 기술 분야의 통상의 기술자라면, 폴리에틸렌 글리콜 또는 PEG라는 용어가 본 명세서에 개시된 것들을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 공지된 모든 형태를 나타내거나 포함한다는 것을 이해할 수 있다.
- [0580] 또한, 다수의 다른 중합체도 본 발명에 사용하기에 적합하다. 일부 실시양태에서, 2개 내지 약 300개의 말단을 갖는 수용성 중합체 골격이 본 발명에 특히 유용하다. 적절한 중합체의 예로는 다른 폴리(알킬렌 글리콜), 예를 들어 폴리(프로필렌 글리콜)("PPG"), 이들의 공중합체(에틸렌 글리콜 및 프로필렌 글리콜의 공중합체를 포함하지만 이로 제한되지 않음), 이들의 삼원 공중합체, 이들의 혼합물 등을 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 상기 중합체 골격의 각각의 사슬의 분자량은 다양할 수 있으나, 일반적으로 약 800 Da 내지 약 100,000 Da, 종종 약 6,000 Da 내지 약 80,000 Da의 범위이다. 상기 중합체 골격의 각각의 사슬의 분자량은 100,000 Da, 95,000 Da, 90,000 Da, 85,000 Da, 80,000 Da, 75,000 Da, 70,000 Da, 65,000 Da, 60,000 Da, 55,000 Da, 50,000 Da, 45,000 Da, 40,000 Da, 35,000 Da, 30,000 Da, 25,000 Da, 20,000 Da, 15,000 Da, 10,000 Da, 9,000 Da, 8,000 Da, 7,000 Da, 6,000 Da, 5,000 Da, 4,000 Da, 3,000 Da, 2,000 Da, 1,000 Da, 900 Da, 800 Da, 700 Da, 600 Da, 500 Da, 400 Da, 300 Da, 200 Da 및 100 Da를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 약 100 Da 내지 약 100,000 Da의 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 중합체 골격의 각각의 사슬의 분자량은 약 100 Da 내지 약 50,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 상기 중합체 골격의 각각의 사슬의 분자량은 약 100 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 상기 중합체 골격의 각각의 사슬의 분자량은 약 1,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 상기 중합체 골격의 각각의 사슬의 분자량은 약 5,000 Da 내지 약 40,000 Da이다. 일부 실시양태에서, 상기 중합체 골격의 각각의 사슬의 분자량은 약 10,000 Da 내지 약 40,000 Da이다.
- [0581] 관련 기술 분야의 통상의 기술자라면, 실질적으로 수용성인 골격의 상기 목록이 총망라한 것이 아니라 단지 예시적인 것이며, 상기 설명한 특징을 갖는 모든 중합체 물질이 본 발명에 사용하기에 적합한 것으로 간주된다는 것을 알 것이다.
- [0582] 본 발명의 일부 실시양태에서, 상기 중합체 유도체는 "다작용성"이며, 이는 중합체 골격이 작용기에 의해 작용기화 또는 활성화된 적어도 2개의 말단, 선택적으로 약 300개만큼 많은 말단을 갖는다는 것을 의미한다. 다작용성 중합체 유도체의 예로는 각각의 말단이 동일하거나 상이할 수 있는 작용기에 결합된 2개의 말단을 갖는 선형 중합체를 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0583] 한 실시양태에서, 상기 중합체 유도체는 하기 구조를 갖는다:
- [0584] X-A-POLY-B-N=N=N
- [0585] 상기 식에서,
- [0586] N=N=N 은 아지드 모이어티이고;
- [0587] B는 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있는 연결 모이어티이며;
- [0588] POLY는 수용성 비항원성 중합체이고;
- [0589] A는 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있으며 B와 동일하거나 상이할 수 있는 연결 모이어티이며;
- [0590] X는 제2 작용기이다.
- [0591] A 및 B에 대한 연결 모이어티의 예로는 18개 이하, 예를 들어 1-10개의 탄소 원자를 포함할 수 있는 다작용기화 알킬기를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 질소, 산소 또는 황과 같은 헤테로원자를 상기 알킬 사슬에 포함시킬 수 있다. 상기 알킬 사슬은 또한 헤테로원자에서 분지될 수 있다. A 및 B에 대한 연결 모이어티의 다른 예로는 10개 이하, 예를 들어 5-6개의 탄소 원자를 포함할 수 있는 다작용기화 아릴기를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 상기 아릴기는 하나 이상의 탄소 원자, 질소, 산소 또는 황 원자로 치환될 수 있다. 적절한 연결기의 다른 예는 미국 특허 제5,932,462호; 제5,643,575호; 및 미국 특허 출원 공개 제2003/0143596호(이들 각각은 본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 연결기를 포함한다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자라면 연결 모이어티에 대한 상기 목록이 총망라한 것이 아니고 단지 예시적인 것이며, 상기 설명한 특징을 갖는 모든 연결 모이어티가 본 발명에 사용하기에 적합한 것으로 간주된다는 것을 알 것이다.
- [0592] X로서 사용하기에 적합한 작용기의 예로는 하이드록실, 보호된 하이드록실, 알콕실, 활성 에스테르, 예를 들어 N-하이드록시숙신이미딜 에스테르 및 1-벤조트리아졸릴 에스테르, 활성 카르보네이트, 예를 들어 N-하이드록시

숙신이미딜 카르보네이트 및 1-벤조트리아졸릴 카르보네이트, 아세탈, 알데하이드, 알데하이드 수화물, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아마이드, 활성 설펜, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 하이드라지드, 보호된 하이드라지드, 보호된 티올, 카르복실산, 보호된 카르복실산, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐설펜, 디티오피리딘, 비닐피리딘, 요오도아세트아마이드, 에폭사이드, 글리옥살, 디온, 메실레이트, 토실레이트, 트레실레이트, 알켄, 케톤 및 아지드를 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, 선택된 X 모이어티는 아지드기와 반응이 발생하지 않도록 아지드기와 상용성이어야 한다. 아지드 함유 중합체 유도체는 호모이작용성(이는 제2 작용기(즉, X) 역시 아지드 모이어티임을 의미함), 또는 헤테로이작용성(이는 제2 작용기가 상이한 작용기임을 의미함)일 수 있다.

[0593] "보호된"이란 표현은 특정한 반응 조건 하에 화학적 반응성 작용기의 반응을 방지하는 보호기 또는 모이어티가 존재함을 의미한다. 보호기는 보호되는 화학적 반응성 기의 종류에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 화학적 반응성 기가 아민 또는 하이드라지드인 경우, 보호기는 tert-부틸옥시카르보닐(t-Boc) 및 9-플루오렌릴메톡시카르보닐(Fmoc)로부터 선택될 수 있다. 화학적 반응성 기가 티올인 경우, 보호기는 오르토포리딜디설파이드일 수 있다. 화학적 반응성 기가 카르복실산, 예를 들어 부탄산 또는 프로피온산, 또는 하이드록실기인 경우, 보호기는 벤질 또는 알킬 기, 예를 들어 메틸, 에틸 또는 tert-부틸일 수 있다. 또한, 관련 기술 분야에 공지된 다른 보호기도 본 발명에 사용될 수 있다.

[0594] 문헌에 기재된 말단 작용기의 구체적인 예로는 N-숙신이미딜 카르보네이트(예를 들어, 미국 특허 제5,281,698호 및 제5,468,478호 참조), 아민(예를 들어, 문헌 [Buckmann et al., Makromol. Chem. 182:1379 (1981)] 및 [Zalipsky et al., Eur. Polym. J. 19:1177 (1983)] 참조), 하이드라지드(예를 들어, 문헌 [Andresz et al., Makromol. Chem. 179:301 (1978)] 참조), 숙신이미딜 프로피오네이트 및 숙신이미딜 부타노에이트(예를 들어, 문헌 [Olson et al., in Poly(ethylene glycol) Chemistry & Biological Applications, pp 170-181], 문헌 [Harris & Zalipsky Eds., ACS, Washington, D.C., 1997]; 및 미국 특허 제5,672,662호 참조), 숙신이미딜 숙시네이트(예를 들어, 문헌 [Abuchowski et al., Cancer Biochem. Biophys. 7:175 (1984)] 및 [Joppich et al., Makromol. Chem. 180:1381 (1979)] 참조), 숙신이미딜 에스테르(예를 들어, 미국 특허 제4,670,417호 참조), 벤조트리아졸 카르보네이트(예를 들어, 미국 특허 제5,650,234호 참조), 글리시딜 에테르(예를 들어, 문헌 [Pitha et al., Eur. J Biochem. 94:11 (1979)], [Elling et al., Biotech. Appl. Biochem. 13:354 (1991)] 참조), 옥시카르보닐이미다졸(예를 들어, 문헌 [Beauchamp, et al., Anal. Biochem 131:25 (1983)], [Tondelli et al., J Controlled Release 1:251 (1985)] 참조), p-니트로페닐 카르보네이트(예를 들어, 문헌 [Veronese, et al., Appl. Biochem. Biotech., 11:141 (1985)]; 및 [Sartore et al., Appl. Biochem. Biotech., 27:45 (1991)] 참조), 알데하이드(예를 들어, 문헌 [Harris et al., J. Polym. Sci. Chem. Ed. 22:341 (1984)], 미국 특허 제5,824,784호 및 미국 특허 제5,252,714호 참조), 말레이미드(예를 들어, 문헌 [Goodson et al. Biotechnology (NY) 8:343 (1990)], [Romani et al. in Chemistry of Peptides and Proteins 2:29 (1984)], 및 [Kogan, Synthetic Comm. 22:2417 (1992)] 참조), 오르토포리딜-디설파이드(예를 들어, 문헌 [Woghiren, et al., Bioconj. Chem. 4:314 (1993)] 참조), 아크릴올(예를 들어, 문헌 [Sawhney et al., Macromolecules, 26:581 (1993)] 참조), 비닐설펜(예를 들어, 미국 특허 제5,900,461호 참조)을 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 상기 모든 참고 문헌 및 특허는 본 명세서에 그 전체가 참고로 포함된다.

[0595] 본 발명의 특정 실시양태에서, 본 발명의 중합체 유도체는 하기 구조를 갖는 중합체 골격을 포함한다:

[0596] $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-N=N=N$

[0597] 상기 식에서,

[0598] X는 상기 설명한 것과 같은 작용기이고;

[0599] n은 약 20 내지 약 4,000이다.

[0600] 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 중합체 유도체는 하기 구조를 갖는 중합체 골격을 포함한다:

[0601] $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2-O-(CH_2)_m-W-N=N=N$

[0602] 상기 식에서,

[0603] W는 1-10개의 탄소 원자를 포함하는 지방족 또는 방향족 링커 모이어티이고;

[0604] n은 약 20-약 4,000이며;

- [0605] X는 상기 설명한 것과 같은 작용기이고;
- [0606] m은 1 내지 10이다.
- [0607] 본 발명의 아지드 함유 PEG 유도체는 관련 기술 분야에 공지되고/되거나 본 명세서에 개시된 다양한 방법으로 제조할 수 있다. 아래에서 제시되는 한 방법에서, 평균 분자량이 약 800 Da 내지 약 100,000 Da인 수용성 중합체 골격으로서, 제1 작용기에 결합된 제1 말단과, 적절한 이탈기에 결합된 제2 말단을 갖는 중합체 골격을 아지드 음이온(이것은 나트륨, 칼륨, tert-부틸암모늄 등을 비롯한 다수의 임의의 적절한 반대 이온과 쌍을 형성할 수 있음)과 반응시킨다. 이탈기는 친핵성 치환을 겪게 되고 아지드 모이어티에 의해 대체되어, 요구되는 아지드 함유 PEG 중합체가 수득된다.
- [0608] $X-PEG-L + N_3^- \rightarrow X-PEG-N_3$
- [0609] 제시된 바와 같이, 본 발명에 사용하기 위한 적절한 중합체 골격은 화학식 X-PEG-L(식 중, PEG는 폴리(에틸렌 글리콜)이고, X는 아지드기와 반응하지 않는 작용기이며, L은 적절한 이탈기임)로 표시된다. 적절한 작용기의 예로는 하이드록실, 보호된 하이드록실, 아세탈, 알케닐, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 보호된 하이드라지드, 보호된 티올, 카르복실산, 카르복실산 보호된 카르복실산, 말레이미드, 디티오피리딘 및 비닐피리딘 및 케톤을 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 적절한 이탈기의 예로는 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 메실레이트, 트레실레이트 및 토실레이트를 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0610] 본 발명의 아지드 함유 중합체 유도체의 또 다른 제조 방법에서, 아지드 작용기를 보유하는 연결체를 평균 분자량이 약 800 Da 내지 약 100,000 Da인 수용성 중합체 골격과 접촉시켜서 아지드 함유 중합체 유도체 생성물을 형성하고, 이때 상기 연결체는 PEG 중합체 상의 화학적 작용기와 선택적으로 반응하는 화학적 작용기를 보유하고, 상기 아지드는 연결기에 의해 중합체 골격으로부터 분리된다.
- [0611] 예시적인 반응식은 다음과 같이 제시된다:
- [0612] $X-PEG-M + N-링커-N=N=N \rightarrow PG-X-PEG-링커-N=N=N$
- [0613] 상기 식에서,
- [0614] PEG는 폴리(에틸렌 글리콜)이고, X는 알콕시와 같은 캐핑기 또는 상기 설명한 작용기이며;
- [0615] M은 아지드 작용기와는 반응하지 않지만 N 작용기와는 효율적이고 선택적으로 반응하는 작용기이다.
- [0616] 적절한 작용기의 예로는, N이 아민인 경우 M은 카르복실산, 카르보네이트 또는 활성 에스테르인 것; N이 하이드라지드 또는 아미노옥시 모이어티인 경우 M이 케톤인 것; N이 친핵체인 경우 M이 이탈기인 것을 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.
- [0617] 조질 생성물의 정제는 생성물의 침전, 이어서, 필요에 따라 크로마토그래피를 수행하는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는 공지된 방법에 의해 수행할 수 있다.
- [0618] PEG 디아민의 경우, 보다 구체적인 예가 아래에 제시되며, 여기서 아민 중 하나는 tert-부틸-Boc와 같은 보호기에 의해 보호되고, 생성된 단일보호 PEG 디아민은 아지드 작용기를 보유하는 연결 모이어티와 반응한다:
- [0619] $BocHN-PEG-NH_2 + HO_2C-(CH_2)_3-N=N=N$
- [0620] 이 경우, 상기 아민기를, 티오닐 클로라이드 또는 카르보디이미드 반응제 및 N-하이드록시숙신이미드 또는 N-하이드록시벤조트리아졸과 같은 다양한 활성화제를 사용하여 카르복실산기에 커플링하여, 모노아민 PEG 유도체와 아지드 함유 링커 모이어티 사이에 아마이드 결합을 형성한다. 아마이드 결합이 성공적으로 형성되면, 형성된 N-tert-부틸-Boc-보호 아지드 함유 유도체는 생물 활성 분자를 변경하는 데 바로 사용되거나, 또는 이것은 다른 유용한 작용기를 설치하기 위해 추가로 처리될 수 있다. 예를 들어, 상기 N-t-Boc 기를 강산을 사용한 처리에 의해 가수분해하여 오메가-아미노-PEG-아지드를 생성할 수 있다. 생성된 아민은, 유용한 헤테로이작용성 시약의 생성을 위한, 말레이미드기, 활성화된 디설파이드, 활성화된 에스테르 등과 같은 다른 유용한 작용기를 추가하기 위한 합성 수단으로서 사용될 수 있다.
- [0621] 헤테로이작용성 유도체는 중합체의 각각의 말단에 상이한 분자를 부착시킬 것이 요망될 경우 특히 유용하다. 예를 들어, 오메가-N-아미노-N-아지드 PEG는 PEG의 한쪽 말단에 대한 활성화된 친전자성 기, 예를 들어 알데하이드, 케톤, 활성화된 에스테르, 활성화된 카르보네이트 등을 갖는 분자의 부착을 가능하게 하고, PEG의 다른 쪽

말단에 대한 아세틸렌기를 갖는 분자의 부착을 가능하게 한다.

[0622] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 상기 중합체 유도체는 하기 구조를 갖는다:

[0623] $X-A-POLY-B-C\equiv C-R$

[0624] 상기 식에서,

[0625] R은 H, 또는 알킬, 알켄, 알콕시, 또는 아릴 또는 치환된 아릴 기이고;

[0626] B는 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있는 연결 모이어티이며;

[0627] POLY는 수용성 비항원성 중합체이고;

[0628] A는 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있으며 B와 동일할 수도 있고 상이할 수도 있는 연결 모이어티이며;

[0629] X는 제2 작용기이다.

[0630] A 및 B에 대한 연결 모이어티의 예로는 18개 이하, 예를 들어 1-10개의 탄소 원자를 포함할 수 있는 다작용기화 알킬기를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 질소, 산소 또는 황과 같은 헤테로원자를 상기 알킬 사슬에 포함시킬 수 있다. 상기 알킬 사슬은 또한 헤테로원자에서 분지될 수 있다. A 및 B에 대한 연결 모이어티의 다른 예로는 10개 이하, 예를 들어 5-6개의 탄소 원자를 포함할 수 있는 다작용기화 아릴기를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 상기 아릴기는 하나 이상의 탄소 원자, 질소, 산소 또는 황 원자로 치환될 수 있다. 적절한 연결기의 다른 예로는 각각 본 명세서에서 참고로 포함된 미국 특허 제5,932,462호; 제5,643,575호; 및 미국 특허 출원 공개 제2003/0143596호에 기재된 연결기를 포함한다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자라면 연결 모이어티에 대한 상기 목록이 총망라한 것이 아니고 단지 예시적인 것이며, 상기 설명한 특징을 갖는 매우 다양한 연결 모이어티가 본 발명에 사용하기에 적합한 것으로 간주된다는 것을 알 것이다.

[0631] X로서 사용하기에 적합한 작용기의 예로는 하이드록실, 보호된 하이드록실, 알콕실, 활성 에스테르, 예를 들어 N-하이드록시숙신이미딜 에스테르 및 1-벤조트리아졸릴 에스테르, 활성 카르보네이트, 예를 들어 N-하이드록시숙신이미딜 카르보네이트 및 1-벤조트리아졸릴 카르보네이트, 아세탈, 알데하이드, 알데하이드 수화물, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아마이드, 활성 설펜, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 하이드라지드, 보호된 하이드라지드, 보호된 티올, 카르복실산, 보호된 카르복실산, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐설펜, 디티오피리딘, 비닐피리딘, 요오도아세트아마이드, 에폭사이드, 글리옥살, 디온, 메실레이트, 토실레이트, 트레실레이트, 알켄, 케톤 및 아세틸렌을 들 수 있다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, 선택된 X 모이어티는 아세틸렌기와 반응이 발생하지 않도록 아세틸렌기와 상용성이어야 한다. 아세틸렌 함유 중합체 유도체는 호모이작용성(이는 제2 작용기(즉, X) 역시 아세틸렌 부분임을 의미함), 또는 헤테로이작용성(이는 제2 작용기가 상이한 작용기임을 의미함)일 수 있다.

[0632] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 상기 중합체 유도체는 하기 구조를 갖는 중합체 골격을 포함한다:

[0633] $X-CH_2CH_2O-(CH_2CH_2O)_n-CH_2CH_2O-(CH_2)_m-C\equiv CH$

[0634] 상기 식에서,

[0635] X는 상기 설명한 것과 같은 작용기이고;

[0636] n은 약 20 내지 약 4,000이며;

[0637] m은 1-10이다.

[0638] 상기 헤테로이작용성 PEG 중합체 각각의 구체적인 예는 아래에 제시되어 있다.

[0639] 본 발명의 아세틸렌 함유 PEG 유도체는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되고/되거나 본 명세서에 개시된 방법을 이용하여 제조할 수 있다. 한 방법에서, 평균 분자량이 약 800 Da 내지 약 100,000 Da인 수용성 중합체 골격으로서, 제1 작용기에 결합된 제1 말단과, 적절한 친핵성 기에 결합된 제2 말단을 갖는 중합체 골격을, PEG 상의 친핵성 기와의 반응에 적합한 이탈기 및 아세틸렌 작용기를 보유하는 화합물과 반응시킨다. 친핵성 모이어티를 보유하는 PEG 중합체와 이탈기 보유 분자를 조합할 경우, 이탈기는 친핵성 치환을 겪게 되고 친핵성 모이어티에 의해 대체되어, 요구되는 아세틸렌 함유 중합체가 수득된다.

[0640] $X-PEG-Nu + L-A-C \rightarrow X-PEG-Nu-A-C\equiv CR'$

- [0641] 제시된 바와 같이, 상기 반응에 사용하기에 바람직한 중합체 골격은 화학식 X-PEG-Nu(식 중, PEG는 폴리(에틸렌 글리콜)이고, Nu는 친핵성 모이어티이며, X는 Nu, L 또는 아세틸렌 작용기와 반응하지 않는 작용기임)로 표시된다.
- [0642] Nu의 예로는 주로 SN2 타입 메커니즘을 통해 반응하는 아민, 알콕시, 아릴옥시, 설프하이드릴, 이미노, 카르복실레이트, 하이드라지드, 아미노옥시 기를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. Nu 기의 추가적인 예는 주로 친핵 첨가 반응을 통해 반응하는 작용기를 포함한다. L 기의 예로는 클로라이드, 브로마이드, 요오다이드, 메실레이트, 트레실레이트 및 토실레이트, 및 친핵 치환 반응을 겪을 것으로 예상되는 다른 기뿐만 아니라, 케톤, 알데하이드, 티오에스테르, 올레핀, α - β 불포화 카르보닐기, 카르보네이트 및 친핵체에 의한 첨가 반응을 겪을 것으로 예상되는 다른 친전자성 기를 들 수 있다.
- [0643] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, A는 탄소 원자수 1-10의 지방족 링커 또는 탄소 원자수 6-14의 치환된 아릴 고리이다. X는 아지드기와 반응하지 않는 작용기이고, L은 적절한 이탈기이다.
- [0644] 본 발명의 아세틸렌 함유 중합체 유도체의 제조를 위한 또 다른 방법에서, 한쪽 말단에 보호된 작용기 또는 캐핑제를 보유하고 다른 쪽 말단에 적절한 이탈기를 보유하는, 평균 분자량이 약 800 Da 내지 약 100,000 Da인 PEG 중합체를 아세틸렌 음이온과 접촉시킨다:
- [0645] 대표적인 반응식은 아래에 제시된다:
- [0646] $X-PEG-L + -C \equiv CR' \rightarrow X-PEG-C \equiv CR'$
- [0647] 상기 식에서,
- [0648] PEG는 폴리(에틸렌 글리콜)이고, X는 알콕시와 같은 캐핑기 또는 상기 설명한 작용기이고;
- [0649] R'은 H, 알킬, 알콕시, 아릴 또는 아릴옥시 기 또는 치환된 알킬, 알콕실, 아릴 또는 아릴옥시 기이다.
- [0650] 상기 예에서, 이탈기 L은 충분한 농도의 아세틸렌 음이온과 접촉할 경우 SN2 타입 치환 반응을 겪을 수 있도록 충분히 반응성이 있어야 한다. 아세틸렌 음이온에 의한 이탈기의 SN2 치환을 수행하는 데 필요한 반응 조건은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다.
- [0651] 조절 생성물의 정제는 통상적으로 생성물의 침전, 이어서 필요에 따라 크로마토그래피를 수행하는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않는 방법에 의해 수행할 수 있다.
- [0652] 수용성 중합체는 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드에 연결될 수 있다. 상기 수용성 중합체는 IL-2 폴리펩타이드로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산 또는 비천연적으로 코딩되거나 천연적으로 코딩된 아미노산의 임의의 작용기 또는 치환체, 또는 비천연적으로 코딩되거나 천연적으로 코딩된 아미노산에 부가된 임의의 작용기 또는 치환체를 통해 연결될 수 있다. 대안적으로, 상기 수용성 중합체는 천연 발생 아미노산(시스테인, 라이신 또는 N 말단 잔기의 아민기를 포함하지만 이로 제한되지 않음)을 통해 비천연적으로 코딩된 아미노산을 도입한 IL-2 폴리펩타이드에 연결된다. 일부 경우에, 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개의 비천연 아미노산을 포함하며, 이때 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산(들)은 수용성 중합체(들)(PEG 및/또는 올리고사카라이드를 포함하지만 이로 제한되지 않음)에 연결된다. 일부 경우에, 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드는 수용성 중합체에 연결된 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 비천연적으로 코딩된 아미노산(들)을 추가로 포함한다. 일부 경우에, 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드는 수용성 중합체에 연결된 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산(들) 및 수용성 중합체에 연결된 하나 이상의 천연 발생 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 사용되는 수용성 중합체는 비접합 형태에 비해 IL-2 폴리펩타이드의 혈청 반감기를 증대시킨다.
- [0653] 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드에 연결되는 수용성 중합체의 수(즉, PEG화 또는 글리코실화 정도)는 생체내 반감기와 같은 약리학적, 약동학적 또는 약력학적 특성이 변경(증가 또는 감소를 포함하지만 이로 제한되지 않음)되도록 조절할 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2의 반감기는 비변형 폴리펩타이드에 비해 적어도 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 2배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 11배, 12배, 13배, 14배, 15배, 16배, 17배, 18배, 19배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 50배, 또는 적어도 약 100배 증가된다.
- [0654] **강한 친핵성 기(즉, 하이드라지드, 하이드라진, 하이드록실아민 또는 세미카르바지드)를 포함하는 PEG 유도체**
- [0655] 본 발명의 한 실시양태에서, 카르보닐을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드는 PEG 골격에 직접 연결된 말단 하이드라진, 하이드록실아민, 하이드라지드 또는 세미카르바지드 모이어티를

포함하는 PEG 유도체로 변형된다.

[0656] 일부 실시양태에서, 상기 하이드록실아민 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:

[0657] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-O-NH_2$

[0658] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이며, n은 100-1,000이다(즉, 평균 분자량이 5-40 kDa임).

[0659] 일부 실시양태에서, 상기 하이드라진 또는 하이드라지드 함유 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:

[0660] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-X-NH-NH_2$

[0661] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이며, n은 100-1,000이고, X는 선택적으로 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있는 카르보닐기(C=O)이다.

[0662] 일부 실시양태에서, 상기 세미카르바지드 함유 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:

[0663] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$

[0664] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이며, n은 100-1,000이다.

[0665] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 카르보닐 함유 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드는 아마이드 연결에 의해 PEG 골격에 연결되는 말단 하이드록실아민, 하이드라지드, 하이드라진 또는 세미카르바지드 모이어티를 포함하는 PEG 유도체로 변형된다.

[0666] 일부 실시양태에서, 상기 하이드록실아민 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:

[0667] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-O-NH_2$

[0668] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이며, n은 100-1,000이다(즉, 평균 분자량이 5-40 kDa임).

[0669] 일부 실시양태에서, 상기 하이드라진 또는 하이드라지드 함유 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:

[0670] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-X-NH-NH_2$

[0671] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이며, n은 100-1,000이고, X는 선택적으로 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있는 카르보닐기(C=O)이다.

[0672] 일부 실시양태에서, 상기 세미카르바지드 함유 PEG 유도체는 하기 구조를 갖는다:

[0673] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$

[0674] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이며, n은 100-1,000이다.

[0675] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 카르보닐 함유 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드를, 말단 하이드라진, 하이드록실아민, 하이드라지드 또는 세미카르바지드 모이어티를 포함하는 분지형 PEG 유도체로 변형시키는데, 이때 분지형 PEG의 각각의 사슬의 MW는 10-40 kDa, 예를 들어 5-20 kDa일 수 있다.

[0676] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드를 분지형 구조를 갖는 PEG 유도체로 변형시킨다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 상기 하이드라진 또는 하이드라지드 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:

[0677] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-NH-NH_2$

[0678] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이며, n은 100-1,000이고, X는 선택적으로 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있는 카르보닐기(C=O)이다.

[0679] 일부 실시양태에서, 세미카르바지드기를 포함하는 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:

[0680] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)_m-NH-C(O)-NH-NH_2$

[0681] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, X는 선택적으로 NH, O, S, C(O)이거나 또는 존재하

지 않으며, m은 2-10이고, n은 100-1,000이다.

[0682] 일부 실시양태에서, 하이드록실아민기를 포함하는 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:

[0683] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2]_2CH-X-(CH_2)_m-O-NH_2$

[0684] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, X는 선택적으로 NH, O, S, C(O)이거나 또는 존재하지 않으며, m은 2-10이고, n은 100-1,000이다.

[0685] 수용성 중합체(들)가 IL-2 폴리펩타이드에 연결되는 정도 및 부위는 IL-2 폴리펩타이드 수용체에 대한 IL-2 폴리펩타이드의 결합을 조절할 수 있다. 일부 실시양태에서, 결합은, 문헌 [Spencer *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 263:7862-7867 (1988)]에 기재된 바와 같이 IL-2에 대한 평형 결합 분석으로 측정시, IL-2 폴리펩타이드가 약 400 nM 이하의 K_d , 150 nM 이하의 K_d 로, 일부 경우에는 100 nM 이하의 K_d 로 IL-2 폴리펩타이드 수용체에 결합하도록 조정된다.

[0686] 중합체 활성화 및 펩타이드 접합에 대한 방법 및 화학 반응은 문헌에 기재되어 있고, 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 중합체의 활성화를 위해 일반적으로 이용되는 방법으로는, 시아노겐 브로마이드, 펄로오데이트, 글루타르알데하이드, 비에폭사이드, 에피클로로히드린, 디비닐설폰, 카르보다이미드, 설포닐 할라이드, 트리클로로트리아진 등에 의한 작용기의 활성화를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다(예를 들어, 문헌 [R. F. Taylor, (1991), *Protein Immobilisation. Fundamental and Applications*, Marcel Dekker, N.Y.]; [S. S. Wong, (1992), *Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking*, CRC Press, Boca Raton]; [G. T. Hermanson *et al.*, (1993), *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, Academic Press, N.Y.]; [Dunn, R.L., *et al.*, Eds. *POLYMERIC DRUGS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS*, ACS Symposium Series Vol. 469, American Chemical Society, Washington, D.C. 1991]) 참조).

[0687] PEG의 작용기화 및 접합에 대한 몇 가지 검토 문헌 및 논문이 입수 가능하다. 예를 들어, 문헌 [Harris, *Macromol. Chem. Phys.* C25: 325-373 (1985)]; [Scouten, *Methods in Enzymology* 135: 30-65 (1987)]; [Wong *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.* 14: 866-874 (1992)]; [Delgado *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9: 249-304 (1992)]; [Zalipsky, *Bioconjugate Chem.* 6: 150-165 (1995)]을 참조한다.

[0688] 또한, 중합체의 활성화 방법에 대해서는 WO 94/17039, 미국 특허 제5,324,844호, WO 94/18247 및 WO 94/04193, 미국 특허 제5,219,564호, 미국 특허 제5,122,614호, WO 90/13540, 미국 특허 제5,281,698호 및 WO 93/15189호에서 찾아볼 수 있으며, 응고 인자 VIII(WO 94/15625), 헤모글로빈(WO 94/09027), 산소 운반 분자(미국 특허 제4,412,989호), 리보뉴클레아제 및 슈퍼옥사이드 디스무타제(Veronese *et al.*, *App. Biochem. Biotech.* 11: 141-52 (1985))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 효소와 활성화된 중합체 사이의 접합 방법도 문헌에서 찾아볼 수 있다. 인용된 모든 문헌 및 특허는 본원에 참고로 포함된다.

[0689] p-아지도-L-페닐알라닌과 같은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드의 PEG화(즉, 임의의 수용성 중합체의 부가)는 임의의 편리한 방법으로 수행한다. 예를 들어, IL-2 폴리펩타이드를 알킨 말단 mPEG 유도체로 PEG화한다. 간단히 설명하면, 실온에서 과량의 고체 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH를 p-아지도-L-Phe 함유 IL-2 폴리펩타이드의 수용액에 교반하면서 첨가한다. 일반적으로, 상기 수용액은 반응이 수행되는 pH(일반적으로 약 pH 4-10) 가까이의 pK_a를 갖는 완충제로 완충시킨다. 예를 들어, pH 7.5에서의 PEG화를 위한 적절한 완충제의 예로는 HEPES, 포스페이트, 보레이트, TRIS-HCl, EPPS 및 TES를 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 상기 pH는 연속적으로 모니터링되며 필요에 따라 조절된다. 상기 반응은 일반적으로 약 1-48시간 동안 지속시킨다.

[0690] 그 후, 반응 생성물을 소수성 상호작용 크로마토그래피에 적용하여, 유리 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH 및 분자의 양쪽 말단에서 비차단 PEG가 활성화될 경우(이에 의해 IL-2 폴리펩타이드 변이체 분자가 가교결합됨) 형성될 수 있는 PEG화된 IL-2 폴리펩타이드의 임의의 고분자량 복합체로부터 PEG화된 IL-2 폴리펩타이드 변이체를 분리한다. 소수성 상호작용 크로마토그래피 동안의 조건은, 유리 mPEG(5000)-O-CH₂-C≡CH는 컬럼을 통과하는 반면, 하나 이상의 PEG 기에 접합된 하나의 IL-2 폴리펩타이드 변이체 분자를 포함하는 임의의 가교결합된 PEG화된 IL-2 폴리펩타이드 변이체 복합체는 목적하는 형태에 따라 용리되도록 하는 조건이다. 적절한 조건은, 가교결합된 복합체와 목적하는 접합체의 상대적인 크기에 따라 달라지며, 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 쉽게 결정할 수 있다. 목적하는 접합체를 함유하는 용리액은 한외여과로 농축시키고 정용여과로 탈염한다.

- [0691] 실질적으로 정제된 PEG-IL-2는 위에서 개관된 용리 방법을 사용하여 생산될 수 있고, 여기서 생산된 PEG-IL-2는 SDS/PAGE 분석, RP-HPLC, SEC 및 모세관 전기영동과 같은 적절한 방법에 의해 결정될 때 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%의 순도 수준, 구체적으로 약 75%, 80%, 85%의 순도 수준, 보다 구체적으로, 적어도 약 90%의 순도 수준, 적어도 약 95%의 순도 수준, 적어도 약 99%의 순도 수준 또는 그 초과와 순도 수준을 갖는다. 필요한 경우, 소수성 크로마토그래피로부터 얻은 PEG화된 IL-2 폴리펩타이드를 친화도 크로마토그래피; 음이온 교환 크로마토그래피 또는 양이온 교환 크로마토그래피(DEAE 세파로스를 사용하는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않음); 실리카 크로마토그래피; 역상 HPLC; 겔 여과(세파텍스 G-75를 사용하는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않음); 소수성 상호작용 크로마토그래피; 크기 배제 크로마토그래피, 금속 킬레이트 크로마토그래피; 환외여과/정용여과; 에탄올 침전; 황산암모늄 침전; 크로마토포커싱; 치환 크로마토그래피; 전기영동 절차(분취용 등전 포커싱을 포함하지만 이로 제한되지 않음); 차등 용해도법(황산암모늄 침전을 포함하지만 이로 제한되지 않음); 또는 추출을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 하나 이상의 절차에 의해 추가로 정제할 수 있다. 겔보기 분자량은 구형 단백질 표준 물질과 비교함으로써 GPC에 의해 추정할 수 있다(Preneta, AZ in Protein purification methods, a practical approach (Harris & Angal, Eds.) IRL Press 1989, 293-306). IL-2:PEG 접합체의 순도는 단백질 분해(트립신 분해를 포함하지만 이로 제한되지 않음), 이어서 질량 분광분석법에 의해 평가할 수 있다(Pepinsky RB., *et al.*, *J. Pharmacol. & Exp. Ther.* 297(3):1059-66 (2001)).
- [0692] 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드의 아미노산에 연결된 수용성 중합체는 비제한적으로 추가로 유도체화되거나 치환될 수 있다.
- [0693] **아지드 함유 PEG 유도체**
- [0694] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, IL-2 폴리펩타이드를 비천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄 상에 존재하는 알킨 모이어티와 반응하는 아지드 모이어티를 포함하는 PEG 유도체로 변형시킨다. 일반적으로, 상기 PEG 유도체의 평균 분자량은 1-100 kDa이고, 일부 실시양태에서, 10-40 kDa이다.
- [0695] 일부 실시양태에서, 상기 아지드 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:
- [0696] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-N_3$
- [0697] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이며, n은 100-1,000이다(즉, 평균 분자량이 5-40 kDa임).
- [0698] 또 다른 실시양태에서, 상기 아지드 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:
- [0699] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-N_3$
- [0700] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이며, p는 2-10이고, n은 100-1,000이다(즉, 평균 분자량이 5-40 kDa임).
- [0701] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 알킨 함유 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드를 말단 아지드 모이어티를 포함하는 분지형 PEG 유도체로 변형시키며, 이때 상기 분지형 PEG의 각각의 사슬의 MW는 10-40 kDa이고, 예를 들어 5-20 kDa일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 상기 아지드 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:
- [0702] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_pN_3$
- [0703] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이며, p는 2-10이고, n은 100-1,000이며, X는 선택적으로 O, N, S 또는 카르보닐기(C=O)(각각의 경우에 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있음)이다.
- [0704] **알킨 함유 PEG 유도체**
- [0705] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, IL-2 폴리펩타이드를 비천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄 상에 존재하는 아지드 모이어티와 반응하는 알킨 모이어티를 포함하는 PEG 유도체로 변형시킨다.
- [0706] 일부 실시양태에서, 상기 알킨 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:
- [0707] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-C \equiv CH$

[0708] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이며, n은 100-1,000이다(즉, 평균 분자량이 5-40 kDa임).

[0709] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 알킨을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드를 아마이드 연결에 의해 PEG 골격에 연결되는 말단 아지드 또는 말단 알킨 모이어티를 포함하는 PEG 유도체로 변형시킨다.

[0710] 일부 실시양태에서, 상기 알킨 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:

[0711] $RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_p-C\equiv CH$

[0712] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이며, p는 2-10이고, n은 100-1,000이다.

[0713] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 아지드 함유 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드를 말단 알킨 모이어티를 포함하는 분지형 PEG 유도체로 변형시키며, 이때 분지형 PEG의 각각의 사슬의 MW는 10-40 kDa이고, 예를 들어 5-20 kDa일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 상기 알킨 말단 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:

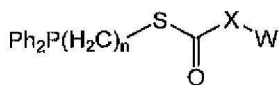
[0714] $[RO-(CH_2CH_2O)_n-O-(CH_2)_2-NH-C(O)]_2CH(CH_2)_m-X-(CH_2)_pC\equiv CH$

[0715] 상기 식에서, R은 간단한 알킬(메틸, 에틸, 프로필 등)이고, m은 2-10이며, p는 2-10이고, n은 100-1,000이며, X는 선택적으로 O, N, S 또는 카르보닐기(C=O)이거나 존재하지 않는다.

[0716] 포스핀 함유 PEG 유도체

[0717] 본 발명의 또 다른 실시양태에서, IL-2 폴리펩타이드는 비천연적으로 코딩된 아미노산의 측쇄 상에 존재하는 아지드 모이어티와 반응하는 아릴 포스핀기를 추가로 포함하는 활성화된 작용기(에스테르, 카르보네이트를 포함하지만 이로 제한되지 않음)를 포함하는 PEG 유도체로 변형된다. 일반적으로, 상기 PEG 유도체는 평균 분자량이 1-100 kDa이고, 일부 실시양태에서, 10-40 kDa이다.

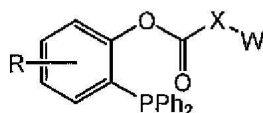
[0718] 일부 실시양태에서, 상기 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:



[0719]

[0720] 상기 식에서, n은 1-10이고; X는 O, N, S이거나 존재하지 않으며, Ph는 페닐이고, W는 수용성 중합체이다.

[0721] 일부 실시양태에서, 상기 PEG 유도체는 하기 구조를 가질 것이다:



[0722]

[0723] 상기 식에서, X는 O, N, S이거나 존재하지 않으며, Ph는 페닐이고, W는 수용성 중합체이며, R은 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬 및 치환된 아릴 기이다. 예시적인 R 기로는 $-CH_2$, $-C(CH_3)_3$, $-OR'$, $-NR'R''$, $-SR'$, $-할로젠$, $-C(O)R'$, $-CONR'R''$, $-S(O)_2R'$, $-S(O)_2NR'R''$, $-CN$ 및 $-NO_2$ 를 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. R', R'', R''' 및 R''''은 각각 독립적으로 수소, 치환된 또는 비치환된 헤테로알킬, 치환된 또는 비치환된 아릴(1-3개의 할로젠으로 치환된 아릴을 포함하지만, 이로 제한되지 않음), 치환된 또는 비치환된 알킬, 알콕시 또는 티오알콕시 기, 또는 아릴알킬기를 나타낸다. 본 발명의 화합물이 예를 들어 1개 초과 R 기를 포함할 경우, 각각의 R 기는 독립적으로 선택되고, 각각의 R', R'', R''' 및 R''''기도 이들이 1개 초과로 존재할 경우 독립적으로 선택된다. R' 및 R''이 동일한 질소 원자에 부착될 경우, 이들은 그 질소 원자와 함께 5원, 6원 또는 7원 고리를 형성할 수 있다. 예를 들어, $-NR'R''$ 은 1-피롤리딘 및 4-모르폴리닐을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 치환체에 관한 상기 논의로부터, 관련 기술 분야의 통상의 기술자라면, "알킬"이란 용어가 수소기 이외의 다른 기에 결합된 탄소를 포함하는 기, 예를 들어 할로알킬($-CF_3$ 및 $-CH_2CF_3$ 를 포함하지만 이들로 제한되지 않음) 및 아실($-C(O)CH_3$, $-C(O)CF_3$, $-C(O)CH_2OCH_3$ 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않음)을 포함한다는 것을 이해할 것이다.

[0724] 다른 PEG 유도체 및 일반적인 PEG화 기술

[0725] IL-2 폴리펩타이드에 연결될 수 있는 다른 예시적인 PEG 분자 및 PEG화 방법은 예를 들어 미국 특허 출원 공개

제2004/0001838호; 제2002/0052009호; 제2003/0162949호; 제2004/0013637호; 제2003/0228274호; 제2003/0220447호; 제2003/0158333호; 제2003/0143596호; 제2003/0114647호; 제2003/0105275호; 제2003/0105224호; 제2003/0023023호; 제2002/0156047호; 제2002/0099133호; 제2002/0086939호; 제2002/0082345호; 제2002/0072573호; 제2002/0052430호; 제2002/0040076호; 제2002/0037949호; 제2002/0002250호; 제2001/0056171호; 제2001/0044526호; 제2001/0021763호; 미국 특허 제6,646,110호; 제5,824,778호; 제5,476,653호; 제5,219,564호; 제5,629,384호; 제5,736,625호; 제4,902,502호; 제5,281,698호; 제5,122,614호; 제5,473,034호; 제5,516,673호; 제5,382,657호; 제6,552,167호; 제6,610,281호; 제6,515,100호; 제6,461,603호; 제6,436,386호; 제6,214,966호; 제5,990,237호; 제5,900,461호; 제5,739,208호; 제5,672,662호; 제5,446,090호; 제5,808,096호; 제5,612,460호; 제5,324,844호; 제5,252,714호; 제6,420,339호; 제6,201,072호; 제6,451,346호; 제6,306,821호; 제5,559,213호; 제5,747,646호; 제5,834,594호; 제5,849,860호; 제5,980,948호; 제6,004,573호; 제6,129,912호; WO 97/32607, EP 229,108, EP 402,378, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28024, WO 95/00162, WO 95/11924, WO95/13090, WO 95/33490, WO 96/00080, WO 97/18832, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/32134, WO 99/32139, WO 99/32140, WO 96/40791, WO 98/32466, WO 95/06058, EP 439 508, WO 97/03106, WO 96/21469, WO 95/13312, EP 921 131, WO 98/05363, EP 809 996, WO 96/41813, WO 96/07670, EP 605 963, EP 510 356, EP 400 472, EP 183 503 및 EP 154 316에 기재된 것들을 포함하지만 이들로 제한되지 않으며, 상기 문헌들은 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 명세서에 기재된 임의의 PEG 분자는 단일쇄, 분지쇄, 다중 아암형 사슬, 단일 작용성, 이작용성, 다작용성 분자, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 임의의 형태로 사용될 수 있다.

[0726] 히드록실아민(아미노옥시) PEG 유도체를 포함하지만 이로 제한되지 않는 추가의 중합체 및 PEG 유도체는 본 명세서에 그 전체가 참고로 포함되는 하기 특허 출원에 기재되어 있다: 미국 특허 출원 공개 제2006/0194256호, 미국 특허 출원 공개 제2006/0217532호, 미국 특허 출원 공개 제2006/0217289호, 미국 특허 가출원 제60/755,338호; 미국 특허 가출원 제60/755,711호; 미국 특허 가출원 제60/755,018호; 국제 특허 출원 PCT/US06/49397; WO 2006/069246; 미국 특허 가출원 제60/743,041호; 미국 특허 가출원 제60/743,040호; 국제 특허 출원 PCT/US06/47822; 미국 특허 가출원 제60/882,819호; 미국 특허 가출원 제60/882,500호; 및 미국 특허 가출원 제60/870,594호에 기재되어 있다.

[0727] X. IL-2 폴리펩타이드의 글리코실화

[0728] 본 발명은 사카라이드 잔기를 보유하는 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산이 도입된 IL-2 폴리펩타이드를 포함한다. 상기 사카라이드 잔기는 천연 사카라이드 잔기(N-아세틸글루코사민을 포함하지만 이로 제한되지 않음) 또는 비천연 사카라이드 잔기(3-플루오로갈락토스를 포함하지만 이로 제한되지 않음)일 수 있다. 상기 사카라이드는 N 연결 또는 O 연결 글리코사이드 연결(N-아세틸갈락토스-L-세린을 포함하지만 이로 제한되지 않음) 또는 비천연 연결(옥심 또는 상응하는 C 연결 또는 S 연결 글리코사이드를 포함하지만 이들로 제한되지 않음)에 의해 비천연적으로 코딩된 아미노산에 연결될 수 있다.

[0729] 상기 사카라이드(글리코실을 포함하지만 이로 제한되지 않음) 모이어티는 생체 내에서 또는 시험관 내에서 IL-2 폴리펩타이드에 부가될 수 있다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 카르보닐을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드를 아미노옥시기에 의해 유도체화된 사카라이드를 이용하여 변형시켜, 옥심 연결을 통해 연결된 상응하는 글리코실화된 폴리펩타이드를 생성한다. 일단 사카라이드가 비천연적으로 코딩된 아미노산에 부착되면, 이 사카라이드를 글리코실트랜스퍼라제 및 다른 효소로 추가로 처리하여 IL-2 폴리펩타이드에 결합된 올리고사카라이드를 얻을 수 있다. 예를 들어, 문헌 [H. Liu, et al. J. Am. Chem. Soc. 125: 1702-1703 (2003)]을 참조할 수 있다.

[0730] 본 발명의 일부 실시양태에서, 카르보닐을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드를 아미노옥시 유도체로서 제조된 규정된 구조를 갖는 글리칸으로 직접 변형시킨다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자라면, 아지드, 알킨, 하이드라지드, 하이드라진 및 세미카르바지드를 비롯한 다른 작용기가 사카라이드를 비천연적으로 코딩된 아미노산에 연결하는 데 사용될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 그 후, 아지드 또는 알킬닐을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드를, 각각 알킬닐 또는 아지드 유도체를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 것에 의해 휘스겐 [3+2] 고리 부가 반응을 포함하지만 이로 제한되지 않는 방법으로 변형시킬 수 있다. 이 방법에 의하면 매우 높은 선택도로 단백질을 변형시킬 수 있다.

[0731] **XI. IL-2 이량체 및 다량체**

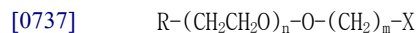
[0732] 본 발명은 또한 동종이량체, 이종이량체, 동종다량체 또는 이종다량체(즉, 삼량체, 사량체 등)와 같은 IL-2 및 IL-2 유사체 조합물을 제공하며, 여기서 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2은 또 다른 그의 IL-2 변이체 또는 그의 IL-2 변이체가 아닌 임의의 다른 폴리펩타이드 또는 그의 IL-2 변이체에 대해, 그 폴리펩타이드 골격에 직접 또는 링커를 통해 결합된다. 단량체에 비해 증가된 분자량으로 인해, IL-2 이량체 또는 다량체 접합체는 단량체 IL-2에 비해 상이한 약리학적, 약동학적 또는 약력학적 특성, 조절된 치료 반감기 또는 조절된 혈장 반감기를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 새로운 또는 바람직한 특성을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 IL-2 이량체는 IL-2 수용체의 신호 전달을 조절할 것이다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 IL-2 이량체 또는 다량체는 IL-2 수용체 길항제, 아고니스트 또는 조절제로서 작용할 것이다.

[0733] 일부 실시양태에서, 이량체 또는 다량체를 포함하는 IL-2 내에 존재하는 하나 이상의 IL-2 분자는 수용성 중합체에 연결된 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 IL-2 폴리펩타이드는 Asn-Lys 아마이드 연결 또는 Cys-Cys 디설파이드 연결을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 연결을 통해 직접 연결된다. 일부 실시양태에서, IL-2 폴리펩타이드 및/또는 연결된 비-IL-2 분자는, 휘스겐 [3+2] 고리 부가 반응을 통해 접합되는, 제1 IL-2 폴리펩타이드의 비천연적으로 코딩되는 제1 아미노산의 알킨과 제2 분자의 비천연적으로 코딩되는 제2 아미노산의 아지드를 포함하지만 이들로 제한되지 않는, 이량체화를 촉진하기 위한 비천연적으로 코딩되는 상이한 아미노산을 포함한다. 대안적으로, 케톤을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 및/또는 연결된 비-IL-2 분자가 하이드록실아민을 함유하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 제2 폴리펩타이드에 접합될 수 있으며, 이 폴리펩타이드는 상응하는 옥심의 형성을 통해 반응한다.

[0734] 대안적으로, 상기 2개의 IL-2 폴리펩타이드 및/또는 연결된 비-IL-2 분자는 링커를 통해 연결된다. 임의의 헤테로이작용성 또는 호모이작용성 링커가, 동일하거나 상이한 1차 서열을 가질 수 있는 2개의 분자 및/또는 연결된 비-IL-2 분자를 연결하는 데 사용될 수 있다. 일부 경우에, IL-2 및/또는 연결된 비-IL-2 분자를 서로 연결하는 데 사용되는 링커는 이작용성 PEG 시약일 수 있다. 이 링커는 다양한 범위의 분자량 또는 분자 길이를 가질 수 있다. IL-2와 연결된 물질 사이, 또는 IL-2와 그의 수용체 사이, 또는 연결된 물질과 그의 결합 파트너(존재할 경우) 사이의 목적하는 공간적 관계 또는 입체구조를 제공하기 위해 더 큰 또는 더 작은 분자량의 링커를 사용할 수 있다. IL-2와 연결된 물질 사이, 또는 연결된 물질과 그의 결합 파트너(존재할 경우) 사이에 목적하는 공간 또는 유연성을 제공하기 위해 더 긴 또는 더 짧은 분자 길이를 갖는 링커를 사용할 수도 있다.

[0735] 일부 실시양태에서, 본 발명은 다음을 포함하는 덤벨 구조를 갖는 수용성 이작용기성 링커를 제공한다: a) 중합체 골격의 적어도 제1 말단 상의 아지드, 알킨, 하이드라진, 하이드라지드, 하이드록실아민 또는 카르보닐 함유 모이어티; 및 b) 중합체 골격의 제2 말단 상의 적어도 제2 작용기. 상기 제2 작용기는 제1 작용기와 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 제2 작용기는 상기 제1 작용기와 반응하지 않는다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 분지형 분자 구조로 된 적어도 하나의 아암을 포함하는 수용성 화합물을 제공한다. 예를 들어, 상기 분지형 분자 구조는 수지상일 수 있다.

[0736] 일부 실시양태에서, 본 발명은 하기 구조를 갖는 활성화된 수용성 중합체와의 반응에 의해 형성된 하나 이상의 IL-2 폴리펩타이드를 포함하는 다량체를 제공한다:



[0738] 상기 식에서, n은 약 5 내지 3,000이고, m은 2-10이며, X는 아지드, 알킨, 하이드라진, 하이드라지드, 아미노옥시, 하이드록실아민, 아세틸, 또는 카르보닐 함유 모이어티이고, R은 X와 동일하거나 상이할 수 있는 캐핑기, 작용기 또는 이탈기이다. R은 예를 들어 하이드록실, 보호된 하이드록실, 알콕실, N-하이드록시숙신이미딜 에스테르, 1-벤조트리아졸릴 에스테르, N-하이드록시숙신이미딜 카르보네이트, 1-벤조트리아졸릴 카르보네이트, 아세탈, 알데하이드, 알데하이드 수화물, 알케닐, 아크릴레이트, 메타크릴레이트, 아크릴아마이드, 활성 설폰, 아민, 아미노옥시, 보호된 아민, 하이드라지드, 보호된 하이드라지드, 보호된 티올, 카르복실산, 보호된 카르복실산, 이소시아네이트, 이소티오시아네이트, 말레이미드, 비닐설펜, 디티오피리딘, 비닐피리딘, 요오도아세트아마이드, 에폭사이드, 글리옥살, 디온, 메실레이트, 토실레이트, 트레실레이트, 알켄 및 케톤으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 작용기일 수 있다.

[0739] **XII. IL-2 폴리펩타이드 활성화 및 IL-2 폴리펩타이드 수용체에 대한 IL-2 폴리펩타이드의 친화도의 측정**

[0740] IL-2 폴리펩타이드 활성화는 표준 또는 공지된 시험관내 또는 생체내 분석을 사용하여 결정될 수 있다. PEG-IL-2는 관련 기술 분야에 공지된 적합한 방법에 의해 생물학적 활성화에 대해 분석될 수 있다. 이러한 분석에는 IL-2

반응성 유전자의 활성화, 수용체 결합 분석, 항-바이러스 활성 분석, 세포 병변 효과 억제 분석, 항-증식 분석, 면역 조절 분석 및 MHC 분자의 유도를 모니터링하는 분석이 포함되지만, 이로 제한되지 않는다.

[0741] PEG-IL-2 폴리펩타이드는 IL-2 민감성 신호 전달 경로를 활성화하는 능력에 대해 분석될 수 있다. 한 가지 예는 인터페론 자극 반응 요소(ISRE) 분석이다. IL-2 수용체를 구성적으로 발현하는 세포는 ISRE-루시페라제 벡터(pISRE-luc, Clontech)로 일시적으로 형질감염된다. 형질감염 후, 세포는 IL-2 폴리펩타이드로 처리된다. 예를 들어, 0.0001-10 ng/mL의 많은 단백질 농도를 시험하여, 용량 반응 곡선을 생성한다. IL-2 폴리펩타이드가 IL-2 수용체에 결합하여 이를 활성화하면, 생성되는 신호 전달 캐스케이드가 루시페라제 발현을 유도한다. 발광은 TopCount™ 또는 Fusion™ 마이크로플레이트 판독기 및 Steady-Glo^R 루시페라제 분석 시스템(Promega)을 사용하여 여러 가지 방법으로 측정할 수 있다.

[0742] IL-2 폴리펩타이드는 IL-2 수용체에 결합하는 능력에 대해 분석될 수 있다. 비천연 아미노산을 포함하는 비-PEG화 또는 PEG화된 IL-2 폴리펩타이드의 경우, 그의 수용체에 대한 IL-2의 친화도는 비아코어(BIAcore)™ 바이오센서(Pharmacia)를 사용하여 측정할 수 있다. 적합한 결합 분석에는 비아코어 분석(Pearce et al., Biochemistry 38:81-89 (1999)) 및 알파스크린(AlphaScreen)™ 분석(PerkinElmer)이 포함되지만, 이로 제한되지 않는다.

[0743] IL-2 폴리펩타이드를 생성하기 위해 사용되는 방법에 관계없이, IL-2 폴리펩타이드의 생물학적 활성에 대한 분석이 수행된다. 일반적으로, 생물학적 활성에 대한 시험은 생물학적 활성의 증가 또는 감소(변형된 IL-2에 비해), 다른 생물학적 활성(변형된 IL-2에 비해), 수용체 또는 결합 파트너 친화도 분석, IL-2 자체 또는 그의 수용체의 입체형태적 또는 구조적 변화(변형된 IL-2와 비교) 또는 혈청 반감기 분석과 같은 원하는 결과에 대한 분석을 제공하여야 한다.

[0744] **XIII. 효능, 기능적 생체내 반감기 및 약동학적 파라미터의 측정**

[0745] 본 발명의 중요한 측면은 수용성 중합체 모이어티에 접합시키거나 접합시키지 않으면서 IL-2 폴리펩타이드를 구축하는 것에 의해 생물학적 반감기가 연장된다는 것이다. IL-2 폴리펩타이드의 투여 후 그 혈청 농도가 급속히 감소되는 것은 접합 및 비접합 IL-2 폴리펩타이드 및 그의 변이체를 사용한 처리에 대한 생물학적 반응을 평가하는 것을 중요하게 하였다. 본 발명의 접합 및 비접합 IL-2 폴리펩타이드 및 그의 변이체는 예를 들어 피하 또는 정맥내 투여에 의한 투여 후에도 연장된 혈청 반감기를 나타낼 수 있고, 따라서 예를 들어 ELISA 방법 또는 1차 스크리닝 분석법을 이용한 분석을 수행할 수 있다. 상업적 공급업체로부터 입수한 ELISA 또는 RIA 키트가 사용될 수 있다. 생체내 생물학적 반감기의 측정은 본 명세서에서 설명되는 바와 같이 수행된다.

[0746] 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드의 효능 및 기능적 생체내 반감기는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 프로토콜에 따라 측정할 수 있다.

[0747] 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드에 대한 약동학적 파라미터는 정상 스프래그-돌리 수컷 래트(N=5마리의 동물/처리군)에서 평가할 수 있다. 동물에게 래트당 25 μ g을 단일 용량으로 정맥 주사하거나 래트당 50 μ g을 단일 용량으로 피하 주사하고, 미리 정해진 시간 경로에 따라, 일반적으로 수용성 중합체에 접합되지 않은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드에 대해서는 약 6시간 동안, 수용성 중합체에 접합되고 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드에 대해서는 약 4일 동안 약 5-7개의 혈액 샘플을 채취할 것이다. 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하지 않은 IL-2에 대한 약동학적 데이터를, 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드에 대해 얻은 데이터와 바로 비교할 수 있다.

[0748] **XIV. 투여 및 약학적 조성물**

[0749] 본 발명의 폴리펩타이드 또는 단백질(하나 이상의 비천연 아미노산을 포함하는 IL-2, 합성효소, 단백질 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않음)는 선택적으로, 적절한 약학적 담체(이로 제한되지 않음)와 함께 치료적 용도로 사용된다. 이러한 조성물은 예를 들어 치료 유효량의 상기 화합물 및 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다. 이러한 담체 또는 부형제로는 식염수, 완충 식염수, 텍스트로스, 물, 글리세롤, 에탄올 및/또는 이들의 조합물을 들 수 있으나, 이들로 제한되지 않는다. 이 제제는 투여 방식에 적합하도록 제조된다. 일반적으로, 단백질 투여 방법은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 본 발명의 폴리펩타이드의 투여에 적용될 수 있다. 조성물은 산 및 염기 부가 염 둘 모두를 포함하는 것을 의미하는 약학적으로 허용되는 염으로서 존재하는 것과 같은 수용성 형태일 수 있다.

- [0750] 효능 및 조직 대사를 확인하고 투여량을 평가하기 위해, 본 발명의 1종 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 치료용 조성물을, 선택적으로 관련 기술 분야에 공지된 방법에 따라 1종 이상의 적절한 시험관내 및/또는 생체내 동물 질환 모델에서 시험한다. 특히, 투여량은 관련 분석에서 측정된 천연 아미노산 상동체에 대한 본원의 비천연 아미노산의 활성, 안정성 또는 다른 적절한 척도(하나 이상의 비천연 아미노산을 포함하도록 변형된 IL-2 폴리펩타이드와 천연 아미노산 IL-2 폴리펩타이드의 비교 및 IL-2 폴리펩타이드와 현재 이용 가능한 IL-2 치료에 대한 하나 이상의 비천연 아미노산을 포함하도록 변형된 IL-2 폴리펩타이드의 비교를 포함하지만, 이로 제한되지 않음)에 의해 초기에 결정할 수 있다.
- [0751] 투여는 분자를 최종적으로 혈액 또는 조직 세포와 접촉시키는 데 통상적으로 이용되는 임의의 경로에 의해 이루어진다. 본 발명의 비천연 아미노산 폴리펩타이드는 선택적으로 1종 이상의 약학적으로 허용되는 담체와 함께 임의의 적절한 방식으로 투여된다. 본 발명에 있어서 이러한 폴리펩타이드를 환자에게 투여하기에 적합한 방법이 이용 가능하고, 특정 조성물을 투여하는 데 하나 이상의 경로를 이용할 수 있지만, 대개 특정 경로가 또 다른 경로보다 더 즉각적이고 더 효과적인 작용 또는 반응을 제공할 수 있다.
- [0752] 약학적으로 허용되는 담체는 부분적으로는 투여되는 특정 조성물뿐만 아니라, 조성물을 투여하는 데 이용되는 특정 방법에 의해서도 결정된다. 따라서, 본 발명의 약학적 조성물의 매우 다양한 적절한 제제가 존재한다.
- [0753] 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드는 비경구 경로(예를 들어, 피하 또는 정맥 주사 또는 임의의 다른 형태의 주사 또는 주입을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 주사)를 포함하지만 이로 제한되지 않는, 단백질 또는 펩타이드에 적합한 임의의 편리한 경로를 통해 투여될 수 있다. 폴리펩타이드 조성물은 경구, 정맥내, 복강내, 근육내, 경피, 피하, 국소, 설하 또는 직장 경로를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 다수의 경로를 통해 투여될 수 있다. 또한, 변형 또는 비변형된 비천연 아미노산 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 리포솜을 통해 투여될 수도 있다. 이러한 투여 경로 및 적절한 제제는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 일반적으로 알려져 있다. IL-2 폴리펩타이드는 단독으로, 또는 약학적 담체와 같은 다른 적절한 성분들과 조합하여 사용될 수 있다. 상기 IL-2 폴리펩타이드는 다른 약제 또는 치료제들과 조합하여 사용될 수 있다.
- [0754] 또한, 비천연 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드를 단독으로 또는 다른 적절한 성분들과 함께, 흡입을 통해 투여되는 에어로졸 제제(즉, 이것은 "분무"될 수 있음)로 제조할 수 있다. 에어로졸 제제는 디클로로디플루오로메탄, 프로판, 질소 등과 같은 적절한 압축 추진제 중에 함유될 수 있다.
- [0755] 예를 들어, 관절내(관절 안), 정맥내, 근육내, 피내, 복강내 및 피하 경로에 의한 비경구 투여에 적합한 제제는 항산화제, 완충제, 정균제, 및 제제가 해당 수용자의 혈액과 등장성이 되도록 하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성의 등장성 멸균 주사액, 및 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정화제 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. IL-2의 제제는 앰플 및 바이알과 같이 단회 투여 또는 다회 투여용 밀봉 용기로 제공될 수 있다.
- [0756] 비경구 투여 및 정맥내 투여가 바람직한 투여 방법이다. 특히, 현재 사용되고 있는 제제와 함께, 천연 아미노산 상동체 치료제에 대해 이미 이용되고 있는 투여 경로(EPO, GH, G-CSF, GM-CSF, IFN, 예를 들어 IL-2, 인터류킨, 항체, FGF 및/또는 임의의 다른 약학적으로 전달되는 단백질에 대해 일반적으로 이용되는 투여 경로를 포함하지만 이로 제한되지 않음)가 본 발명의 폴리펩타이드에 대한 바람직한 투여 경로 및 제제를 제공한다.
- [0757] 본 발명에 있어서, 환자에게 투여되는 투여량은 시간이 경과함에 따라 환자에게 유익한 치료 반응을 나타내거나, 용도에 따라 다른 적절한 활성을 나타내기에 충분한 것이다. 투여량은 특정 벡터 또는 제제의 효능, 및 사용된 비천연 아미노산 폴리펩타이드의 활성, 안정성 또는 혈청 반감기 및 환자의 상태뿐만 아니라, 치료되는 환자의 체중 또는 체표면적에 의해 결정된다. 또한, 투여량의 크기는 특정 환자에 있어서의 특정 벡터, 제제의 투여에 동반되는 임의의 유해한 부작용의 존재, 성질 및 정도 등에 의해 결정된다.
- [0758] 질환(호중구 감소증, 재생 불량성 빈혈, 주기성 호중구 감소증, 특발성 호중구 감소증, 체디악-히가시(Chediak-Higashi) 증후군, 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 백혈병, 골수이형성 증후군 및 골수섬유증 등)의 치료 또는 예방을 위해 투여되는 벡터 또는 제제의 유효량을 결정함에 있어서, 의사는 순환 혈장 수준, 제제의 독성, 질환의 진행, 및/또는 관련되는 경우 항-비천연 아미노산 폴리펩타이드 항체의 생성을 평가한다.
- [0759] 예를 들어, 체중 70 kg의 환자에게 투여되는 투여량은 일반적으로 관련 조성물의 변경된 활성 또는 혈청 반감기에 맞추어 조정된, 현재 사용되는 치료용 단백질의 투여량과 동등한 범위 내에 있다. 본 발명의 벡터 또는 약학적 제제는 항체 투여, 백신 투여, 세포독성제의 투여, 천연 아미노산 폴리펩타이드의 투여, 핵산의 투여, 뉴클레오타이드 유사체의 투여, 생물학적 반응 변형제의 투여 등을 비롯한 임의의 공지된 통상적인 치료법에 의해

치료 조건을 보충할 수 있다.

- [0760] 투여에 있어서, 본 발명의 제제는 관련 제제의 LD-50 또는 ED-50, 및/또는 다양한 농도(예를 들어 환자의 체중 및 환자의 전반적인 건강 상태에 맞게 조정되는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않음)에서의 비천연 아미노산 폴리펩타이드의 임의의 부작용의 관찰에 의해 결정된 비율로 투여된다. 투여는 단회 투여 또는 분할 투여를 통해 이루어질 수 있다.
- [0761] 제제를 주입받고 있는 환자가 발열, 오한 또는 근육통을 보일 경우, 적정량의 아스피린, 이부프로펜, 아세트아미노펜 또는 다른 통증/발열 억제 약물을 투여한다. 발열, 근육통 및 오한과 같은 주입에 대한 반응을 보이는 환자에게는, 후속 주입 30분 전에 아스피린, 아세트아미노펜, 또는 디펜하이드라민을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 약물을 미리 투여한다. 해열제 및 항히스타민제에 빠르게 반응하지 않는 보다 심한 오한 및 근육통에 대해서는 메페리딘을 사용한다. 반응의 중증도에 따라 세포 주입을 늦추거나 중단한다.
- [0762] 본 발명의 인간 IL-2 폴리펩타이드를 포유동물 대상체에게 직접 투여할 수 있다. 투여는 IL-2 폴리펩타이드를 대상체에 도입하는 데 통상적으로 이용되는 임의의 경로에 의해 이루어진다. 본 발명의 실시양태에 따른 IL-2 폴리펩타이드 조성물은 경구, 직장, 국소, 흡입(에어로졸을 이용하는 것을 포함하지만 이로 제한되지 않음), 협측(설하를 포함하지만 이로 제한되지 않음), 질내, 비경구(피하, 근육내, 피내, 관절내, 흉막강내, 복강내, 뇌내, 동맥내 또는 정맥내 경로를 포함하지만 이들로 제한되지 않음), 국소(즉, 피부 및 기도 표면을 비롯한 점막 표면 둘 모두), 폐, 안구내, 비내 및 경피 투여에 적합한 것들을 포함하지만, 임의의 주어진 경우에 있어서 가장 적합한 경로는 치료되는 병태의 성질 및 중증도에 따라 달라질 것이다. 투여는 국소 또는 전신 투여일 수 있다. 화합물의 제제는 앰플 및 바이알과 같은 단회 투여 또는 다회 투여용의 밀봉 용기로 제공될 수 있다. 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드는 약학적으로 허용되는 담체와 함께 주사 가능 단위 투여 형태(용액제, 현탁제 또는 에멀션제를 포함하지만 이들로 제한되지 않음)의 혼합물로 제조될 수 있다. 또한, 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드는 연속 주입(삼투압 펌프와 같은 미니펌프를 포함하지만 이로 제한되지 않음), 단일 볼루스 또는 서방형 데포 제제에 의해 투여될 수도 있다.
- [0763] 투여에 적합한 제제는 항산화제, 완충제, 정균제, 및 제제를 등장성으로 만드는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성의 등장성 멸균 용액, 및 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정화제 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성의 멸균 현탁액을 포함한다. 용액 및 현탁액은 이미 알려진 유형의 멸균 분말, 과립 및 정제로부터 제조될 수 있다.
- [0764] 동결 건조는 관심 단백질 제제로부터 물을 제거하는 역할을 수행하는, 단백질을 제공하기 위해 통상적으로 이용되는 기술이다. 동결 건조 또는 냉동 건조는 건조시키고자 하는 물질을 먼저 동결시킨 후, 진공 환경 하에서 승화로 얼음 또는 동결된 용매를 제거하는 공정이다. 동결 건조 과정 동안 안정성을 향상시키고 저장시 동결 건조된 제품의 안정성을 개선하기 위해, 동결 건조 전의 제제에 부형제를 포함시킬 수 있다(Pikal, M. Biopharm. 3(9)26-30 (1990) and Arakawa et al. Pharm. Res. 8(3):285-291 (1991)).
- [0765] 또한, 제약물의 분무 건조 역시 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 이에 관해서는, 예를 들어 문헌 [Broadhead, J. et al., "The Spray Drying of Pharmaceuticals," in Drug Dev. Ind. Pharm, 18 (11 & 12), 1169-1206 (1992)]을 참조한다. 소분자 제약물 이외에도, 다양한 생물학적 물질이 분무 건조되었으며, 여기에는 효소, 혈청, 혈장, 미생물 및 효모가 포함된다. 분무 건조는 1단계 공정으로 액상 약학적 제제를 미세한 무분진 또는 응집 분말로 전환할 수 있기 때문에 유용한 기술이다. 기본적인 기술은 다음과 같은 4개의 단계를 포함한다: a) 공급 용액을 분무하여 분무물로 만드는 단계; b) 분무물과 공기를 접촉시키는 단계; c) 분무물을 건조시키는 단계; 및 d) 건조된 생성물을 건조 공기로부터 분리하는 단계. 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 제6,235,710호 및 제6,001,800호에는 분무 건조에 의한 재조합 에리트로포이에틴의 제조 방법이 기재되어 있다.
- [0766] 본 발명의 약학적 조성물 및 제제는 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체는 부분적으로는 투여되는 특정 조성물뿐만 아니라, 조성물을 투여하는 데 이용되는 특정 방법에 의해 결정된다. 따라서, 본 발명의 약학적 조성물(선택적인 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함함)의 매우 다양한 적절한 제제가 존재한다(예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. (1985)] 참조).
- [0767] 적절한 담체로는 숙시네이트, 포스페이트, 보레이트, HEPES, 시트레이트, 히스티딘, 이미다졸, 아세테이트, 바이카르보네이트 및 다른 유기산을 함유하는 완충제; 아스코르브산을 포함하지만 이로 제한되지 않는 항산화제; 약 10개 미만의 잔기를 갖는 폴리펩타이드를 포함하지만 이로 제한되지 않는 저분자량의 폴리펩타이드; 혈청 알

부민, 젤라틴 또는 면역글로불린을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 단백질; 폴리비닐피롤리돈을 포함하지만 이로 제한되지 않는 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌, 히스티딘 또는 히스티딘 유도체, 메티오닌, 글루타메이트 또는 라이신을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 아미노산; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물(트레할로스, 수크로스, 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함하지만 이들로 제한되지 않음); EDTA 및 에텐테이트 디소듐을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 킬레이팅제; 아연, 코발트 또는 구리를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 2가 금속 이온; 만니톨 또는 솔비톨을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 당 알코올; 나트륨 및 염화나트륨을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 염 형성 반대 이온; 및/또는 트윈™(트윈 80(폴리솔베이트 80) 및 트윈 20(폴리솔베이트 20)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않음), 플루로닉스(Pluronic)™ 및 다른 플루론산(플루론산 F68(폴록사머 188)을 포함하지만 이로 제한되지 않는 다른 플루론산을 포함하지만 이들로 제한되지 않음) 또는 PEG를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 비이온성 계면활성제를 들 수 있다. 적합한 계면활성제로는 예를 들어 폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드)-폴리(에틸렌 옥사이드), 즉 (PEO-PPO-PEO), 또는 폴리(프로필렌 옥사이드)-폴리(에틸렌 옥사이드)-폴리(프로필렌 옥사이드), 즉 (PPO-PEO-PPO)에 기초한 폴리에테르 또는 이들의 조합물을 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. PEO-PPO-PEO 및 PPO-PEO-PPO는 상표명 플루로닉스™, R-플루로닉스™, 테트로닉스(Tetronics)™ 및 R-테트로닉스™(BASF Wyandotte Corp., 미국 미시건주 와이언도트 소재)로 시판되고 있으며, 또한 본원에 그 전체가 참고로 포함되는 미국 특허 제4,820,352호에 추가로 기재되어 있다. 다른 에틸렌/폴리프로필렌 블록 중합체도 적절한 계면활성제일 수 있다. 계면활성제 또는 이의 조합물을 사용하여, 교반으로 인해 발생하는 스트레스를 포함하지만 이로 제한되지 않는 1종 이상의 스트레스로부터 PEG화된 IL-2를 안정화시킬 수 있다. 또한, 상기 물질들 중 일부 물질은 증량제로 불리기도 한다. 또한, 일부 물질은 "장성 조절제"로 불리기도 한다. 또한, 항미생물 보존제도 제품 안정성 및 항미생물 효능을 위해 사용될 수 있고; 적합한 보존제로는 벤질 알코올, 벤즈알코늄 클로라이드, 메타크레졸, 메틸/프로필 파라벤, 크레졸 및 페놀, 및 이들의 조합물을 들 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 제7,144,574호는 본 발명의 약학적 조성물 및 제제 및 다른 전달 제제에 적합할 수 있는 추가의 물질을 설명하고 있다.

[0768] PEG와 같은 수용성 중합체에 연결된 것들을 비롯한 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드는 서방형 시스템에 의해 또는 이의 일부에 의해 투여될 수도 있다. 서방형 조성물은 필름 또는 마이크로캡슐을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 성형품 형태의 반투과성 중합체 매트릭스를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 서방형 매트릭스는 생체 적합성 물질, 예를 들어 폴리(2-하이드록시에틸 메타크릴레이트)([Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 267-277 (1981)]; [Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)], 에틸렌 비닐 아세테이트(Langer *et al.*, *supra*) 또는 폴리-D(-)-3-하이드록시부티르산(유럽 특허 제133,988호), 폴리락타이드(폴리락탄)(미국 특허 제3,773,919호; 유럽 특허 제58,481호), 폴리글리콜라이드(글리콜산의 중합체), 폴리락타이드 코-글리콜라이드(락탄산과 글리콜산의 공중합체) 폴리무수물(polyanhydride), L-글루탐산과 감마-에틸-L-글루타메이트의 공중합체(Sidman *et al.*, *Biopolymers*, 22, 547-556 (1983)), 폴리(오르토)에스테르, 폴리펩타이드, 히알루론산, 콜라겐, 콘트로이틴 설페이트, 카르복실산, 지방산, 인지질, 폴리사카라이드, 핵산, 폴리아미노산, 아미노산, 예를 들어 페닐알라닌, 타이로신, 이소류신, 폴리뉴클레오타이드, 폴리비닐 프로필렌, 폴리비닐피롤리돈 및 실리콘을 포함한다. 또한, 서방형 조성물은 리포솜에 봉입된 화합물을 포함한다. 상기 화합물을 함유하는 리포솜은 그 자체가 독일 특허 제3,218,121호; 문헌 [Eppstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 3688-3692 (1985)]; [Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 4030-4034 (1980)]; 유럽 특허 제52,322호; 유럽 특허 제36,676호; 미국 특허 제4,169,794호; 유럽 특허 제143,949호; 미국 특허 제5,021,234호; 일본 특허 출원 제83-118008호; 미국 특허 제4,485,045호 및 제4,544,545호; 및 유럽 특허 제102,324호에 기재된 방법에 의해 제조된다. 인용된 모든 참고문헌 및 특허는 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0769] 리포솜에 봉입된 IL-2 폴리펩타이드는 예를 들어 독일 특허 제3,218,121호; 문헌 [Eppstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82: 3688-3692 (1985)]; [Hwang *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77: 4030-4034 (1980)]; 유럽 특허 제52,322호; 유럽 특허 제36,676호; 미국 특허 제4,169,794호; 유럽 특허 제143,949호; 미국 특허 제5,021,234호; 일본 특허 출원 제83-118008호; 미국 특허 제4,485,045호 및 제4,544,545호; 및 유럽 특허 제102,324호에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 리포솜의 조성 및 크기는 잘 알려져 있거나 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 실험적으로 쉽게 결정할 수 있다. 리포솜의 몇 가지 예가 예를 들어 문헌 [Park JW, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1327-1331 (1995)]; [Lasic D and Papahadjopoulos D (eds): *Medical Applications of Liposomes* (1998)]; [Drummond DC, *et al.*, *Liposomal drug delivery systems for cancer therapy*, in Teicher B (ed): *Cancer Drug Discovery and Development* (2002)]; [Park JW, *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 8:1172-1181 (2002)]; [Nielsen UB, *et al.*, *Biochim.*

Biophys. Acta 1591(1-3):109-118 (2002)]; [Mamot C, *et al.*, *Cancer Res.* 63: 3154-3161 (2003)]에 기재되어 있다. 인용된 모든 참고 문헌 및 특허는 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0770] 본 발명에서 환자에게 투여되는 투여량은 시간이 경과함에 따라 대상체에서 유익한 반응을 유발하기에 충분해야 한다. 일반적으로, 비경구로 투여되는 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드의 1회 투여당 총 약학적 유효량은 약 0.01 $\mu\text{g/kg/일}$ 내지 약 100 $\mu\text{g/kg/일}$, 또는 환자 체중 기준으로 약 0.05 mg/kg 내지 약 1 mg/kg이지만, 상기 양은 치료적 판단에 좌우된다. 상기 실시양태의 특정 측면에서, 접합체는 1일 4 $\mu\text{g/kg}$ 초과 내지 1일 약 20 $\mu\text{g/kg}$ 범위의 용량으로 투여될 수 있다. 또 다른 측면에서, 접합체는 1일 4 $\mu\text{g/kg}$ 초과 내지 1일 약 9 $\mu\text{g/kg}$ 범위의 용량으로 투여될 수 있다. 또 다른 측면에서, 접합체는 1일 약 4 $\mu\text{g/kg}$ 내지 1일 약 12.5 $\mu\text{g/kg}$ 범위의 용량으로 투여될 수 있다. 특정 측면에서, 접합체는 과도한 독성없이 허용되는 최대 용량 또는 그 미만의 용량으로 투여될 수 있다. 추가로, 접합체는 주당 적어도 2회 투여될 수 있거나, 접합체는 주당 적어도 3회, 주당 적어도 4회, 주당 적어도 5회, 주당 적어도 6회, 또는 7회 투여될 수 있다. 특정 측면에서, 접합체가 1회 초과로 투여되는 경우, 접합체는 매회 1일 4 $\mu\text{g/kg}$ 초과 용량으로 투여된다. 특히, 접합체는 2주 이상의 기간에 걸쳐 투여될 수 있다. 인터류킨-2 수용체 발현 세포의 성장은 참조 샘플, 즉 본 발명의 접합체와 접촉하지 않은 세포 샘플과 비교하여 적어도 50%, 적어도 65%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 억제될 수 있다. 이 실시양태의 특정 측면에서, 접합체는 1일 약 5.3 $\mu\text{g/kg}$ 의 용량으로, 또는 1일 약 7.1 $\mu\text{g/kg}$ 의 용량으로, 또는 1일 약 9.4 $\mu\text{g/kg}$ 의 용량으로, 또는 1일 약 12.5 $\mu\text{g/kg}$ 의 용량으로 투여될 수 있다. 또한, 투여 빈도 역시 치료적 판단에 달려 있지만, 인체 사용에 대해 승인된 시판되는 IL-2 폴리펩타이드보다 투여 빈도보다 더 적거나 더 많을 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드, PEG화된 IL-2 폴리펩타이드, 접합된 IL-2 폴리펩타이드, 또는 PEG화된 접합된 IL-2 폴리펩타이드는 상기 설명된 임의의 투여 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0771] **XV. 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드의 치료 용도**

[0772] 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드는 광범위한 장애를 치료하는데 유용하다. 본 발명은 또한 IL-2, CD8+ T-세포 자극 및/또는 IL-2 제제에 반응하는 암에 걸릴 위험이 있고/있거나, 상기 암이 존재하고/하거나, 상기 암에 걸린 포유동물을 치료하는 방법을 포함한다. IL-2 폴리펩타이드의 투여는 단기 효과를 초래할 수 있다. 즉, 여러 임상 파라미터에 대한 즉각적인 유익한 효과가 관찰될 수 있고, 이것은 투여 12시간 또는 24시간 후에 발생할 수 있으며, 다른 한편으로는 또한 장기적인 효과, 종양 성장 진행의 유익한 감소, 종양 크기의 감소 및/또는 증가된 순환 CD8+ T 세포 수준을 유발할 수 있고, 본 발명의 IL-2 폴리펩타이드는 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 수단에 의해 투여될 수 있고, 목적하는 약리학적 효과를 수득하기에 충분한 투여량으로 주입을 통해, 예를 들어 동맥내, 복강내 또는 정맥내 주사 및/또는 주입에 의해 유리하게 투여될 수 있다.

[0773] IL-2 폴리펩타이드 투여량은 치료당 체중 1 kg당 10-200 mg 또는 40-80 mg 범위의 IL-2 폴리펩타이드일 수 있다. 예를 들어, 투여되는 IL-2 폴리펩타이드의 투여량은 임상적으로 필요한 기간 동안, 예를 들어 수 분 내지 수 시간, 예를 들어, 최대 24시간까지의 시간 동안 볼루스 주사로서 및/또는 주입으로서 제공되는, 체중 1 kg당 약 20-100 mg의 IL-2 폴리펩타이드일 수 있다. 필요한 경우, IL-2 폴리펩타이드 투여는 1회 또는 수회 반복될 수 있다. IL-2 폴리펩타이드의 투여는 화학 요법제와 같은 다른 약제의 투여와 조합될 수 있다. 또한, 본 발명은 유효량의 IL-2 폴리펩타이드를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 암의 예방 및/또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0774] 상기 IL-2의 평균량은 다양할 수 있고, 특히 자격을 갖춘 의사의 권고 및 처방에 기초하여야 한다. IL-2의 정확한 양은 치료되는 병태의 정확한 유형, 치료되는 환자의 상태 및 조성물 중의 다른 성분들과 같은 요인들에 따라 달라진다. 또한, 본 발명은 치료 유효량의 또 다른 활성 물질을 투여하는 것을 제공한다. 투여되는 양은 IL-2를 사용한 치료에 기초하여 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0775] **실시예**

[0776] 하기 실시예는 예시를 위해 제공되지만, 특허 청구된 발명을 제한하는 것이 아니다.

[0777] 실시예 1 - 비천연 아미노산을 도입하기 위해 앰버 정지 코돈으로 돌연변이되는 IL-2 내의 잔기 위치의 결정.

[0778] IL-2는 신장 세포 암종 및 전이성 흑색종과 같은 여러 암 치료에 사용되어 왔다. 시판되는 IL-2 알데스류킨®은 비글리코실화되고 알라닌-1이 제거되고 잔기 시스테인-125가 세린-125로 대체된 재조합 단백질이다(Whittington *et al.*, *Drugs*, 46(3): pp: 446-514 (1993)). IL-2는 암 치료에서 FDA 승인을 받은 최초의 사이토카인이지만, IL-2를 고용량으로 사용하면 심각한 부작용이 나타나는 것으로 밝혀졌다. 이것은 잠재적 환자에 대한 적용을 크

게 제한하였다. 심각한 부작용의 근본적인 메커니즘은 IL-2가 그의 수용체 중 하나인 IL-2R α 에 결합하기 때문이었다. 일반적으로, IL-2는 3개의 수용체가 모두 조직에 존재할 때 IL-2R α (또는 CD25), IL-2R β (또는 CD122) 및 IL-2R γ (또는 CD132)를 포함하는 그의 수용체와 이중삼량체 복합체를 형성할 수 있을 뿐만 아니라, IL-2R β 및 IL-2R γ 와 이중이량체 복합체를 형성할 수도 있다. 임상 환경에서 고용량의 IL-2를 사용하면, IL-2가 T_{reg} 세포의 주요 수용체 형태인 IL-2 $\alpha\beta\gamma$ 에 결합하기 시작한다. T_{reg} 세포의 억제 효과는 암 면역 요법에서 IL-2 적용의 원하지 않는 효과를 유발한다. IL-2의 부작용을 완화하기 위해, 이전에 많은 접근법이 사용되었다. 주요 돌파구 중 하나는 6개의 PEG화된 라이신을 사용하여 IL-2 표면의 IL2R α 결합 영역을 가리는 넥타르의 발명이다(Charych et al., Clin Cancer Res, 22(3): pp: 680-90 (2016)). PEG화된 IL-2는 반감기가 길뿐만 아니라, 극적으로 감소한 부작용을 제시하였다. 그러나, 활성 연구의 결과는 상기 이중성 6-PEG화된 IL-2 혼합물에서 PEG화된 IL-2의 효과적인 형태는 오직 단일 PEG화 형태임을 보여주었다. 따라서, 균질한 생성물을 갖는 보다 효과적인 PEG화된 IL-2가 필요하다.

[0779] 본원에서, 도입된 비천연 아미노산은 IL-2 PEG화에 사용되는 특유한 접합 부위를 제공한다. 생성된 PEG화된 IL-2 뮤테인은 이전에 넥타르로부터의 이중성 6-PEG화된 IL-2보다는 균질한 생성물을 갖는다.

[0780] IL-2 뮤테인 생성에 사용되는 부위는 기존의 IL-2 결정 구조 및 그의 이중삼량체 수용체를 분석함으로써 선택할 수 있다. 구체적으로, IL-2R α 의 구조 및 IL-2와의 계면에 대해 자세히 조사하였다(도 1). 계면은 소수성 중심 및 편광 영역으로 이루어진 2개의 영역으로 나뉜다. 소수성 중심은 IL-2R α 잔기 Leu-2^a, Met-25^a, Leu-42^a 및 Tyr-43^a와 IL-2 잔기 Phe-42^{IL-2}, Phe-44^{IL-2}, Tyr-45^{IL-2}, Pro-65^{IL-2} 및 Leu-72^{IL-2} 사이에 형성된다. 편광 영역은 Lys-38^a/Glu-61^{IL-2}, Arg-36^a/Glu-62^{IL-2}, Glu-1^a/Lys-35^{IL-2}, Asp-6^a/Arg-38^{IL-2}, 및 Glu-29^a/Lys-43^{IL-2}를 포함하는 5개의 IL-2R α 와 IL-2 이온 쌍 사이에 형성된다. 추가로, 정전기 매핑은 몇몇의 다른 잔기가 IL-2R α 와 IL-2 사이의 상호작용을 매개하는 역할을 수행할 수 있음을 시사하였다. 이러한 잔기는 Thr-37^{IL-2}, Thre-41^{IL-2}, Lys-64^{IL-2}, Glu-68^{IL-2}, 및 Tyr-107^{IL-2}이다. 따라서, 사용할 수 있는 부위는 Phe-42^{IL-2}, Phe-44^{IL-2}, Tyr-45^{IL-2}, Pro-65^{IL-2}, Leu-72^{IL-2}, Glu-61^{IL-2}, Glu-62^{IL-2}, Lys-35^{IL-2}, Arg-38^{IL-2}, Lys-43^{IL-2}, Thr-37^{IL-2}, Thr-3^{IL-2}, Lys-64^{IL-2}, Glu-68^{IL-2}, 및 Tyr-107^{IL-2}이다. 비천연 아미노산을 사용하여 뮤테인을 생산하기 위해 사용되는 단백질 서열의 목록은 아래 표 2에 나열되어 있다.

[0781] 표 2. PEG화에 사용되는 잠재적 부위가 있는 IL-2 단백질 서열

서열 번호	잔기 위치	비천연 아미노산을 갖는 단백질 서열
9	F42	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLT*UKFY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
10	F44	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFK*UY MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
11	Y45	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKF*U MPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
12	P65	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYM PKKATELKHLQCLEEELK*ULEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI

[0782]

		VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
13	L72	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYM PKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLN*UAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
14	E61	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYM PKKATELKHLQCLE*UELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
15	E62	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYM PKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
16	K35	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNP*ULTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
17	R38	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT*UMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
18	K43	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTF*UFY MPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
19	T37	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLT*URMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
20	T3	AP*USSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFY MPKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
21	K64	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYM PKKATELKHLQCLEEEEL*UPLLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
22	E68	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYM PKKATELKHLQCLEEEELKPLE*UVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT
23	Y107	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYM PKKATELKHLQCLEEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVI LELKGSETTFMCE*UADETATIVEFLNRWITFCQSIISTLT

*U: 비천연 아미노산

[0783]

[0784]

실시예 2: 인간 IL-2 발현 시스템

[0785]

이 섹션은 비천연 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드에 사용되는 발현 방법을 설명한다. 숙주 세포는 오르토고달 tRNA, 오르토고달 아미노아실 tRNA 합성효소, 및 서열번호 4, 6 또는 8에서와 같이 IL-2 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 셀렉터 코돈을 포함하는 서열번호 1, 2, 3, 5, 7, 및 9 내지 23에 제시된 아미노산 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 대한 구축물로 형질전환된다.

[0786]

이. 콜라이 발현 벡터 구축물 및 서열 검증: 이 실시예는 이. 콜라이에서 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 인간 IL-2(hIL-2)의 클로닝 및 발현을 자세히 설명한다. 모든 인간 IL-2 발현 플라스미드는 아래에서 설명되는 바와 같이 이. 콜라이 NEB5 α 클로닝 균주(New England Biolabs, 미국 매사추세츠주 소재)에서 깃슨 어셈블리(Gibson Assembly) 키트(New England Biolabs(NEB), 미국 매사추세츠주 입스위치 소재)를 사용하는 재조합 기반 클로닝 방법에 의해 또는 퀵체인지(QuikChange) 돌연변이 유발 키트(Agilent Technologies, 미국 캘리포니아주 산타 클라라 소재)를 사용하여 구축되었다. 이. 콜라이 발현 플라스미드는 도 2에 제시되어 있다.

[0787]

깃슨 어셈블리: 공여자 단편을 포함하는 다양한 관심 유전자(GOI)를 증폭하기 위한 프라이머는 그의 5'-말단에 상동성 재조합을 위한 수용자 벡터 서열과 약 18-24 염기쌍(bp)의 중첩 서열을 가지고 있으며, 인테그레이티드 DNA 테크놀로지스(Integrated DNA Technologies; IDT)(미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)에서 합성되었다. PCR 단편은 고충실도 DNA 폴리머라제 믹스인 Pfu 울트라 II 핫스타트(Ultra II Hotstart) PCR 마스터 믹스(Cat. No: 600852, Agilent Technologies)를 사용하여 증폭되었다. PCR 산물을 37°C에서 2시간 동안 DpnI 제한 효소(NEB# R0176L)로 분해하여 플라스미드 배경을 제거한 다음, 퀴아젠(Qiagen) PCR 컬럼 정제 키트(Qiagen, 미국 캘리포니아주 발렌시아 소재; # 28104)를 사용하여 컬럼 정제하고, 나노드랍(ThermoFisher, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)에 의해 정량하였다. 수용자 벡터는 고유한 제한 효소(NEB, 미국 매사추세츠주 소재)로 벡터 내에서 공급업체 권장 온도에서 3 내지 5시간 동안 선형화하고, PCR 컬럼을 정제하고, 정량화하였다. 공여자 삽입물 및 적절하게 준비된 수용자 벡터를 3:1의 물비로 혼합하고, 깃슨 어셈블리 키트(NEB # E2611S)를 사용하여 50°C에서 15분 동안 인큐베이팅한 다음, 이. 콜라이 NEB5 α 균주(NEB # 2987)의 형질전환을 위해 사용하였다.

[0788]

적절한 항생제를 함유하는 LB 한천 플레이트에 깃슨 어셈블리 믹스를 플레이팅하여 재조합체를 회수하였다. 다

음날, 4 내지 6개의 잘 단리된 단일 콜로니들을 5 mL LB + 50 µg/mL 카나마이신 설페이트(Sigma, 미국 미주리주 세인트루이스 소재; cat# K0254) 배지에 접종하고, 37°C에서 밤새 성장시켰다. 재조합체 플라스미드는 퀴아겐 플라스미드 DNA 미니-프랩 키트(Qiagen #27104)를 사용하여 단리되었고, DNA 서열결정(Eton Biosciences, 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)에 의해 확인되었다. 완전한 GOI 영역 + 100 bp 상류 및 100 bp 하류 서열은 유전자 특이적 서열결정 프라이머를 사용하여 확인되었다.

[0789] 퀵체인지 돌연변이 유발(QCM): TAG 정지 코돈을 포함하는 모든 앰버 변이체는 퀵체인지 라이트닝(QuickChange Lightning) 부위 지정 돌연변이 유발 키트(Agilent Technologies # 201519)를 사용하여 생성되었다. 모든 QCM 올리고뉴클레오타이드는 퀵체인지 웹 포털(QuickChange Web Portal)(Agilent Technologies)을 사용하여 설계되었으며, IDT(캘리포니아 주 샌디에고)에서 주문하였다. QCM PCR 믹스는 5 µl의 10x 완충제, 2.5 µl의 dNTP 믹스, 1 µl(100 ng)의 플라스미드 주형, 1 µl의 올리고 믹스(각각 10 µM 농도), 1 µl의 퀵체인지 라이트닝 효소, 2.5 µl의 퀵 용액 및 37 µl의 증류수(DW)를 포함하였다. DNA는 키트에서 권장하는 PCR 프로그램을 사용하여 단지 18사이클 동안 증폭되었다.

[0790] PCR 반응이 완료된 후, 키트(Agilent Technologies)와 함께 제공되는 DpnI 효소로 37°C에서 2-3시간 동안 분해한 후, 증폭된 PCR 산물이 존재하는지 겔 상에서 확인하였다. 이어서, 2.5 내지 5 µl의 PCR 산물로 이. 콜라이 NEB5 α 균주를 형질전환시켰다. 이어서, 4 내지 6개의 콜로니의 재조합 플라스미드를 단리하고, 상기 겔슨 어셈블리 섹션에서 설명된 바와 같이 서열을 확인하였다.

[0791] 발현 균주(AXID) 구축 및 검증: AXID 생산 균주를 제조하기 위해, 화학적으로 적합한 이. 콜라이 W3110B60 숙주 세포를 서열 검증된 플라스미드 DNA(50 ng)로 형질전환하고, 재조합 세포를 50 µg/mL 카나마이신 설페이트(Sigma, cat# K0254)를 함유하는 2xYT+1% 글루코스 한천 플레이트에서 선택하고, 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 이어서, 새로운 형질전환 플레이트로부터의 단일 콜로니를 순차적으로 3회 스트리킹하고 37°C에서 밤새 인큐베이션함으로써 50 µg/mL 카나마이신 설페이트를 함유하는 2xYT+1% 글루코스 한천 플레이트 상에서 3회 증식시켰다. 마지막으로, 세 번째 스트리킹된 플레이트로부터의 단일 콜로니를 50 µg/mL 카나마이신 설페이트(Sigma, cat# K0254)를 함유하는 20 mL 슈퍼 브로쓰(Super Broth)(Fisher-Optigrow™, #BP1432-10B1) 내에 접종하고, 37°C 및 250 rpm에서 밤새 인큐베이션하였다. 이어서, 밤새 성장한 배양물을 글리세롤을 사용하여 20%(w/v)(KIC, Ref# 67790-GL99UK)의 최종 글리세롤 농도로 희석하였다. 이어서, 상기 세포 현탁액을 1 mL 분취량으로 여러 개의 냉동 바이알에 분배하고, -80°C에서 AXID 생산 균주 바이알로 냉동하였다.

[0792] 상기 서명된 바와 같이 AXID 생산 균주의 글리세롤 바이알을 생성한 후, 이들을 항생제 내성 마커의 DNA 서열결정 및 표현형 특성화에 의해 추가로 검증하였다. AXID 생산 균주 바이알이 생산 숙주에서 정확한 플라스미드를 가지고 있는지 확인하기 위해, 플라스미드를 서열 검증하였다. 50 µg/mL 카나마이신 설페이트를 함유하는 20 mL LB를 AXID 클론의 글리세롤 바이알로부터 천자(stab) 접종하고, 37°C, 250 rpm에서 밤새 성장시켰다. 플라스미드 DNA는 퀴아겐 미니프랩 키트(#27104)를 사용하여 단리되었고, 단리된 플라스미드 내의 온전한 GOI ORF의 존재는 DNA 서열결정(Eton Biosciences, 미국 캘리포니아주 소재)에 의해 확인되었다.

[0793] AXID 생산 균주의 균주 유전자형을 추가로 확인하기 위해, 동일한 바이알의 세포를 다음과 같은 4개의 벼개의 LB 플레이트에 스트리킹하였다: 50 µg/mL 카나마이신 설페이트를 포함하는 LB, 15 µg/mL 테트라 사이클린을 포함하는 LB, 34 µg/mL 클로람페니콜을 포함하는 LB 및 75 µg/mL 트리메토프림을 포함하는 LB. 그런 다음, W3110B60 생산 숙주 균주의 균주 유전자형으로 예상한 바와 같이, 이들 플레이트 모두에서 양성 성장을 확인하였다.

[0794] 발현 시스템: hIL-2의 아미노산 및 hIL-2를 코딩하는 이. 콜라이 최적화 DNA 서열은 표 1 및 2에 제시되어 있다. 오르토고날 tRNA(O-tRNA) 및 오르토고날 아미노아실 tRNA 합성효소(O-RS)를 포함하는 도입된 번역 시스템은 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 hIL-2를 발현하는 데 사용된다(플라스미드 지도 pKG0269 참조; 도 2). O-RS는 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 O-tRNA를 우선적으로 아미노아실화한다. 이어서, 번역 시스템은 코딩되는 셀렉터 코돈에 반응하여 비천연적으로 코딩된 아미노산을 IL-2 또는 IL-2 변이체에 삽입한다. 적합한 O-RS 및 O-tRNA 서열은 W02006/068802(발명의 명칭: "Compositions of Aminoacyl-tRNA Synthetase and Uses Thereof") 및 W02007/021297(발명의 명칭: "Compositions of tRNA and Uses Thereof")에 기재되어 있으며, 이들 출원은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0795] 변형된 IL-2 변이체 폴리뉴클레오타이드 서열 및 오르토고날 아미노아실 tRNA 합성효소/tRNA 쌍(목적하는 비천연적으로 코딩된 아미노산에 대해 특이적인)을 함유하는 플라스미드로 이. 콜라이를 형질전환하면, 비천연적으로 코딩된 아미노산의 IL-2 폴리펩타이드 내로의 부위 특이적 도입이 가능하다. IL-2 변이체 폴리펩타이드의 발

현은 T7 프로모터의 제어 하에 있으며, 배지에 아라비노스를 첨가함으로써 유도된다(플라스미드 지도 pKG0269; 도 2 참조).

- [0796] 파라-아세틸-페닐알라닌(pAF)에 의한 억제; IL-2 폴리펩타이드 발현을 위한 플라스미드를 사용하여 W3110B60 이. 콜라이 세포를 형질전환시킨다. 파라-아세틸-페닐알라닌(pAF)을 세포에 첨가하고, 아라비노스를 첨가하여 단백질 발현을 유도한다. IL-2 폴리펩타이드의 발현에 대한 SDS-PAGE 분석을 수행하고, IL-2 폴리펩타이드를 관찰한다. 본래의 야생형 IL-2 폴리펩타이드와, 예를 들어 특정 아미노산 잔기에서 만들어진 파라-아세틸 페닐알라닌 치환을 갖는 IL-2인 pAF 치환된 IL-2 폴리펩타이드를 비교하기 위해 레인에서 이동시켰다. T7 폴리머라제의 발현은 아라비노스-유도성 T7 박테리오파지 프로모터의 제어 하에서 이루어진다. 파라-아세틸-페닐알라닌(pAF)을 세포에 첨가하고, 아라비노스(최종 0.2%)를 첨가하여 단백질 발현을 유도한다. 배양액을 수 시간(3-5시간) 동안 37°C에서 인큐베이팅한다.
- [0797] 이. 콜라이에서 hIL-2 발현을 증가시키기 위한 추가의 구축물: 이. 콜라이에서 hIL-2의 생산을 증가시키기 위해, 본원에서 보고된 이. 콜라이 코돈 사용을 기반으로 한 DNA 서열 최적화와 함께 다음과 같은 발현 파라미터를 추가로 최적화할 수 있다: 아라비노스 B(araB), pTrc 및 박테리오파지 T5 프로모터와 같은 T7 박테리오파지 프로모터 이외의 다른 프로모터의 시험; hIL-2 mRNA의 안정화; 표준 W3110B60 균주 외에 상이한 이. 콜라이 숙주 균주의 스크리닝; 온도, 배양 배지, 유도제 농도 등과 같은 생산 공정 파라미터의 최적화; 개시 및 정지 코돈, 리보솜 결합 부위(RBS), 전사 종결 인자 등과 같은 전사 및 번역 제어 요소의 최적화; 플라스미드 카피 수 및 플라스미드 안정성의 최적화; 번역 개시 영역(TIR)의 최적화.
- [0798] 실시예 3 - 본 실시예는 이. 콜라이 진탕 플라스크 발현 시험 및 높은 세포 밀도 발효를 자세히 설명한다.
- [0799] 진탕 플라스크 발현 시험: 진탕 플라스크 실험에서 hIL-2 발현을 시험하기 위해, 위에서 설명한 AXID 생산 균주를 사용하였다. 간단히 설명하면, AXID 글리세롤 바이알의 접종물을 50 µg/mL의 카나마이신 설페이트(Sigma, 미국 미주리주 소재)를 함유하는 5 mL의 수퍼 브로쓰(Fisher-Optigrow™, #BR1432-10B1) 배지에 넣고, 진탕하면서 37°C에서 밤새 성장시켰다. 밤새 배양물을 50 µg/mL의 카나마이신 설페이트(Sigma, 미국 미주리주 소재)를 함유하는 수퍼 브로쓰(Fisher-Optigrow™, #BP1432-10B1) 배지에서 1:100으로 희석하고, 진탕하면서 37°C에서 성장시켰다. 배양 밀도가 0.6-0.8의 OD600에 도달했을 때, 0.2% 아라비노스 및 pAF를 첨가하여 유도하고, 몇 시간(대체로 3 내지 5시간) 생산한 후, 수거하였다. 수거된 세포의 분취량은 채취하여 SDS-PAGE에 의해 분석하였다. hIL-2의 최적 발현은 다양한 온도, 유도 기간 및 유도제 농도에 따라 표준화되었다. hIL-2에 대한 표준 모노클로날 항체가 있는 조직 추출물의 면역블롯은 hIL2의 발현을 분석하기 위해 사용된 다음 웨스턴 분석에 따라 hIL-2의 발현을 추가로 확인하였다(도 3a): 수거된 세포 펠렛은 5의 OD600으로 정규화되고, 리소자임(100 µg/ml) 및 DNase I(1 U/ml)을 포함하는 계산된 양의 B-PER 용액(ThermoFisher)에 용해시켰다. 펠렛은 고속으로 2-5분 동안 볼텍싱하고 혼합물을 37°C, 250 rpm에서 인큐베이팅하여 혼합되었다. 샘플을 최종 농도를 1x로 조정하여 제조업체에서 제공한 샘플 완충제(4X) 및 샘플 환원제(10x)와 혼합하였다. 총 20 µl의 샘플을 hIL2 표준 물질(R&D Systems, 미국 미네소타주 미네아폴리스 소재)과 함께 프리캐스트(pre-cast) 폴리아크릴아마이드 겔(ThermoFisher)에 로딩하고, 1x MES 완충제(ThermoFisher)에서 전기영동 분리를 수행하였다. 단백질 샘플은 iBlot 장치 및 겔 전달 스택을 사용하여 니트로셀룰로스 막으로 전달되었다. hIL2는 염소 항-인간 IL-2 항원(R&D Systems)에 의해 포획되었고, opti 4CN 비색 기질(Bio-Rad, 미국 캘리포니아주 허큘레스 소재)과 함께 HRP 접합된 항-염소 IgG 2차 항체(R&D Systems)에 의해 검출되었다.
- [0800] 높은 세포 밀도 발효: hIL-2 생산을 위한 발효 공정은 (i) 접종물 준비 및 (ii) 발효기 생산이라는 두 단계로 구성된다. 접종물은 단일 글리세롤 바이알로부터 시작하여 해동하고, 250 mL 배플 삼각(baffled Erlenmeyer) 플라스크에서 정의된 씨드 배지 50 mL에 1:1000(v/v)으로 희석하고, 37°C 및 250 rpm에서 인큐베이팅한다. 사용하기 전에, 발효기를 세척하고, 오토클레이빙한다. 지정된 양의 기초 배지를 발효기에 첨가하고, 증기 멸균한다. 지정된 양의 카나마이신 설페이트 용액, 공급 배지 및 P2000 소포체를 접종 전에 기본 배지에 첨가한다. 오토클레이빙 후에 발효기에 첨가된 모든 용액은 무균 첨가 전에 0.2 µm 여과되거나 오토클레이빙된다.
- [0801] 발효기는 글리세롤을 탄소원으로 사용하는 4리터의 화학적으로 정의된 배지와 함께 회분 처리된다. 씨드 배양물은 0.05의 초기 OD600 nm로 발효기에 첨가된다. 용존 산소는 480 내지 1200 rpm의 교반 및 6 psig의 헤드 압력 및 5 slpm의 공기 흐름을 통한 산소 농축을 사용하여 30% 공기 포화 상태로 유지된다. 온도 및 pH는 각각 37°C 및 7.0으로 조절된다. 배양물이 35 ± 5의 OD600 nm에 도달하면, 0.25 mL/L/min의 속도로 공급이 시작된다. 그 결과, L-Ala-pAcF(L-Ala-pAF라고도 함) 디펩타이드가 0.4 g/L로 첨가된다. 디펩타이드 첨가 15분 후에, 최종 농도 2 g/L에서 L-아라비노스를 사용하여 배양물을 유도한다. 배양물은 유도 6시간 후에 수거된다.

- [0802] **역상-HPLC 역가 분석:** 1.0 mL의 이. 콜라이 발효 샘플(세포 페이스트)를 먼저 건조시키고, 무게를 측정하여 샘플 준비를 위한 질량을 결정하였다. 리소나제 바이오프로세싱(Lysonase Bioprocessing) 시약(EMD Millipore # 71230) 및 벤조나제 뉴클레아제(Benzonase Nuclease) 시약(EMD Millipore # 70664)를 버그버스터(BugBuster) 단백질 추출 시약(EMD Millipore # 70584)에서 각각 1:500으로 희석하고, 세포 페이스트의 화학적 용해를 위해 사용하였다. 1.0 mL의 버그버스터-리소나제-벤조나제 혼합물을 1.0 mL의 건조된 세포 페이스트에 첨가하고, 생성된 혼합물을 격렬하게 볼텍싱시켰다. 그 다음, 혼합물을 20분 동안 22℃에서 1000 rpm으로 진탕시키면서 에펜도르프 써모믹서(Eppendorf Thermomixer) R 진탕기에 두었다. 인큐베이팅 후, 세포 용해물을 16,050 rcf에서 5분 동안 원심분리하여 세포 파편을 펠렛화하였다. 이어서, 세포 용해물 상청액의 200 μ L 분취량을 0.22 μ m PVDF 원심분리 필터(EMD Millipore #UFC30GVNB)를 통해 16,050 rcf에서 1분 동안 여과하였다. 이어서, 여과된 생성물을 역상 크로마토그래피에 의해 분석하여 발효 샘플에 존재하는 hIL2의 양을 결정하였다. 3.5 μ m 입자로 충전된 4.6 x 150 mm 조르박스(Zorbax) 300SB-C3(Agilent #863973-909) 역상 컬럼을 사용하여 hIL2를 숙주 세포 단백질 오염물질로부터 분리하였다. hIL2에 결합하기 위해 사용되는 이동상 A는 물 내의 0.1% 트리플루오로아세트산을 함유하였다. 아세트오니트릴 내의 0.1% 트리플루오로아세트산을 함유하는 이동상 B를 사용하여 hIL2를 컬럼으로부터 용리하였다. 샘플 내의 hIL2의 양은 정제된 hIL2를 사용하여 생성된 표준 곡선으로부터 얻은 선 방정식에 대해 고정된 주입 부피에서 관찰된 영역의 수를 비교함으로써 결정되었다. 도 3b에 예시된 바와 같이, 시험된 IL-2 앰버 변이체 중 일부는 높은 세포 밀도 이. 콜라이 발효에서 약 65 내지 150 mg/L 범위의 높은 역가 발현을 나타냈다.
- [0803] **실시예 4 -** 본 실시예는 봉입체 제조, 재폴딩, 정제 및 PEG화를 상세히 설명한다.
- [0804] **봉입체 제조 및 가용화:** 높은 세포 밀도 발효에서 수거한 세포 페이스트를 4℃ 봉입체(IB) 완충제 I(50 mM Tris pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% 트리톤 X-100; 4℃) 내에서 최종 10% 고체로 혼합하여 재현탁한다. 재현탁된 물질을 미세 유동화 장치에 총 2회 통과시켜 세포를 용해한다. 그런 다음, 샘플을 원심분리(14,000 g; 15분, 4℃)하고, 상청액을 따라낸다. 봉입체 펠렛은 추가 부피의 IB 완충제 I(50 mM Tris pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% 트리톤 X-100; 4℃)에 재현탁하여 세척하고, 재현탁된 물질을 미세 유동화 장치에 총 2회 통과시킨다. 그런 다음, 샘플을 원심분리(14,000 g; 15분, 4℃)하고, 상청액을 따라낸다. 봉입체 펠렛은 각각 1 부피의 완충제 II(50 mM Tris pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 4℃)에 재현탁된다. 샘플을 원심분리(14,000 g; 15분, 4℃)하고, 상청액을 따라낸다. 봉입체 펠렛은 1/2 부피의 완충제 II(50 mM Tris pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA; 4℃)에 재현탁된다. 그런 다음, 봉입체를 적절한 용기에 분취한다. 샘플을 원심분리(14,000 g, 15분, 4℃)하고, 상청액을 따라낸다. 봉입체는 가용화하거나, 추가 사용시까지 -80℃에서 보관한다.
- [0805] 봉입체는 가용화 완충제(20 mM Tris, pH 8.0; 8M 구아니딘; 10 mM β -ME) 내에서 10 - 15 mg/mL의 최종 농도로 가용화된다. 이어서, 가용화된 봉입체는 1시간 동안 또는 완전히 용해될 때까지 일정한 혼합 하에서 실온에서 인큐베이팅된다. 그런 다음, 샘플을 원심분리(10,000 g, 20분, 4℃)하여 임의의 용해되지 않은 물질을 제거한다. 이어서, 각각의 샘플의 단백질 농도는 단백질 농도가 높으면 추가의 가용화 완충제로 희석하여 조정한다.
- [0806] **재폴딩 및 정제:** 재폴딩은 샘플을 4℃에서 20 mM Tris, pH 8.0; 60% 수크로스 내의 0.5 mg/mL의 최종 단백질 농도로 희석하여 수행한다. 4℃에서 5일 동안 재폴딩하도록 한다. 재폴딩된 물질은 Milli-Q H₂O를 사용하여 1:1로 희석한다. 물질은 0.22 μ m PES 필터를 통해 여과되고, 20 mM Tris, pH 8.0; 0.15 M NaCl(완충제 A)에서 평형화된 블루 세파로스(Blue Sepharose) FF 컬럼(GE Healthcare)에 로딩된다. 상향 흐름에서, 컬럼은 5 컬럼 부피의 30% 완충제 B(20 mM Tris, pH 8.0; 2 M NaCl; 50% 에틸렌 글리콜)로 세척된다. IL-2 폴리펩타이드는 10개의 컬럼 부피의 100% 완충제 B로 컬럼을 세척하여 용리된다.
- [0807] **PEG화 및 PEG화 후 정제:** IL-2 폴을 채취하고, Milli-Q 물로 10배 희석한다. 각각의 샘플의 pH는 50% 빙초산으로 4.0으로 조정된다. 샘플을 1.0 mg/mL까지 농축하고, 1:12 물 과량의 활성화된 PEG(하이드록실아민 PEG)를 각각의 샘플에 첨가한다. 그런 다음, 샘플을 27℃에서 48-72시간 동안 인큐베이팅한다. 샘플을 채취하고, 물(<8 m/S)로 8-10배 희석하고, 완충제 A(50 mM NaAc, pH 6.0; 50 mM NaCl; 0.05% Zwittergent 3-14)에서 평형화된 SP HP 컬럼(GE Healthcare)에 로딩한다. IL-2 폴리펩타이드는 5 컬럼 부피의 완충제 B(50 mM NaAc, pH 6.0; 500 mM NaCl; 0.05% Zwittergent 3-14)로 용리된다. IL-2의 분획을 모으고, IL-2 저장 완충제(20 mM NaAc, pH 5.0; 150 mM NaCl; 0.05% Zwittergent 3-14)에서 평형화된 슈퍼덱스(Superdex) 200 사이징 컬럼에서 이동시킨다. PEG화된 물질은 수집되고, 4℃에서 보관된다.
- [0808] **실시예 5 -** 본 실시예는 이. 콜라이 및 포유동물 발현 시스템으로부터 IL-2의 정제를 상세히 설명한다. 본 실시

에는 또한 PEG화, 부위 특이적 접합 및 PEG-IL-2 정제 공정을 개시한다.

- [0809] 이. 콜라이 봉입체로부터의 제조: IL-2 봉입체는 일련의 세척 단계를 통해 분리되었다. 동결된 세포 페이스트를 세척 완충제 I(50 mM Tris, pH 8.0; 1% 트리톤 X-100; 1 M 우레아, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF)에 10%(W/V) 농도로 재현탁하고, 4℃에서 균질화한 후, 원심분리(15,000 g, 30분, 4℃)하였다. 상청액을 버리고, 봉입체 펠렛을 세척 완충제 II(50 mM Tris, pH 8.0; 1% 트리톤 X-100; 1 M 우레아, 5 mM EDTA)에 재현탁시켰다. 재현탁된 봉입체를 15,000 g에서 30분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 상청액을 버리고, 봉입체 펠렛을 세척 완충제 III(50 mM Tris, pH 8.0; 데옥시콜산나트륨, 5 mM EDTA)에 재현탁시켰다. 재현탁된 봉입체를 15,000 g에서 30분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 상청액을 폐기하고, 봉입체 펠렛을 물에 재현탁한 후, 15,000 g에서 30분 동안 4℃에서 원심분리하였다. 세척된 봉입체는 추가 사용시까지 -80℃에서 보관되었다.
- [0810] 재폴딩: IL-2 봉입체를 물에 재현탁하고 혼합물의 pH를 12.2로 조정하여 용해시켰다. 불용성 물질은 원심분리(12,000 g, 15분)에 의해 제거되었다. 가용화된 IL-2는 pH를 8.8 ± 0.2 로 낮게 조정함으로써 재폴딩되었다. 50 μ M 시스틴을 재폴딩 반응물에 첨가함으로써 적절한 디설파이드 결합 형성이 촉진되었다. 재폴딩 반응물을 16-22시간 동안 실온에 두었다. 염산을 사용하여 재폴딩 반응물을 pH 6.8로 조정하여 숙주 세포 오염물질을 침전시켰다. 침전물을 원심분리(12,000 g, 15분)에 의해 제거하고, 정화된 상청액을 수산화나트륨으로 pH 7.8로 조정하고, 0.22 μ M 여과하였다.
- [0811] 컬럼 정제: 재폴딩된 IL-2를 완충제 A(20 mM 인산나트륨, pH 7.8)에서 평형화된 캡토 어드히어 임프레스(Capto Adhere Impres)(GE Healthcare) 컬럼에 로딩하였다. 로딩 후, 컬럼을 완충제 A(20 mM 인산나트륨, pH 7.8)로 세척하고, IL-2를 20 컬럼 부피에 걸쳐 선형 pH 구배를 사용하여 컬럼으로부터 100% 완충제 B(20 mM 인산나트륨, 20 mM 시트르산, pH 4.0)로 컬럼에서 용리하였다. IL-2를 포함하는 분획을 수집하고, 10% 아세트산으로 pH를 4.0으로 조정하고, 완충제를 20 mM 아세트산나트륨, 2.5% 트레할로스, pH 4.0으로 교환하였다. IL-2를 1-10 mg/mL로 농축하고, 0.22 μ M을 여과하고, -80℃에서 보관하였다.
- [0812] 진핵 발현 시스템으로부터 IL-2의 정제: His 태그가 부착된 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지를 수산화나트륨으로 pH 7.8로 조정하고, 20 mM 인산나트륨(pH 7.8)에서 평형화된 Ni 엑셀(Excel) 컬럼(GE Healthcare)에 로딩하였다. 로딩 후, 컬럼을 완충제 A(20 mM 인산나트륨, pH 7.8)로 세척한 다음, 세척 완충제 B(20 mM 인산나트륨, 1.0 M 염화나트륨, 30 mM 이미다졸, pH 7.8)로 세척하여 숙주 세포 오염물질을 제거하였다. IL-2를 용리 완충제(10 mM 인산나트륨, 300 mM 이미다졸, pH 7.8)를 사용하여 컬럼으로부터 용리시키고, IL-2를 함유하는 분획을 모았다. IL-2를 모은 물질을 완충제 A(20 mM 인산나트륨, pH 7.8)에서 평형화된 캡토 어드히어 임프레스(GE Healthcare) 컬럼에 로딩하였다. 로딩 후, 컬럼을 완충제 A(20 mM 인산나트륨, pH 7.8)로 세척하고, IL-2는 선형 pH 구배를 사용하여 컬럼으로부터 100% 완충제 B(20 mM 인산나트륨, 20 mM 시트르산, pH 4.0)로 20 컬럼 부피에 걸쳐 용리되었다. IL-2를 포함하는 분획을 수집하고, 10% 아세트산으로 pH를 4.0으로 조정하고, 완충제를 20 mM 아세트산나트륨, 2.5% 트레할로스, pH 4.0으로 교환하였다. IL-2를 1-10 mg/mL로 농축하고, 0.22 μ M을 여과하고, 추가 사용시까지 -80℃에서 보관하였다.
- [0813] 부위 특이적 접합 및 PEG-IL-2 정제: 비천연 아미노산(nnAA)인 파라-아세틸 페닐알라닌을 함유하는 IL-2 변이체를 접합 완충제(20 mM 아세트산나트륨, pH 4.0)로 완충제 교환하고, 1-10 mg/mL로 농축하였다. 최종 100 mM 아세트산 하이드라이드를 반응물에 첨가한 다음, 10몰 과량의 아미노옥시 작용기화 PEG를 첨가하였다. 접합 반응물은 25-30℃에서 18-20시간 동안 인큐베이션되었다. 접합 후, PEG화된 IL-2를 20 mM 아세트산나트륨(pH 5.0)으로 1:10으로 희석하고, 캡토 에스피 임프레스(Capto SP Impres) 컬럼에 로딩하였다. 로딩 후, 컬럼을 완충제 A(20 mM 아세트산나트륨, pH 5.0)로 세척하고, 선형 구배를 사용하여 20 컬럼 부피에 걸쳐 컬럼으로부터 100% 완충제 B(20 mM 아세트산나트륨, 1.0 M 염화나트륨, pH 5.0)로 PEG화된 IL-2를 용리시켰다. PEG화된 IL-2를 함유하는 분획을 수집하고, 완충제를 10 mM 인산나트륨, 100 mM 염화나트륨, 2.5% 트레할로스, pH 7.0으로 교환하였다. IL-2를 1-2 mg/mL로 농축하고, 0.22 μ M을 여과하고, 추가 사용시까지 -80℃에서 보관하였다.
- [0814] 생물층 간섭계에 의한 IL-2/CD-25 결합 분석: IL-2/CD25 다중 농도 결합 동역학 실험은 옥테트(Octet) RED96(PALL/ForteBio) 기기에서 30℃에서 수행하였다. 항-인간 Fc 포획 바이오센서(PALL/ForteBio, cat# 18-5063)에 IX HBS-P+ 완충제(GE Healthcare, cat# BR-1008-27)에서 정제된 CD25-Fc 융합 단백질을 로딩하였다. 0.8 nm와 1.0 nm 사이의 고정 수준에 도달하였다. 로딩된 바이오센서를 1X HBS-P+ 완충제로 세척하여 회합 및 해리 동역학을 측정하기 전에 결합되지 않은 임의의 단백질을 제거하였다. 회합 단계 모니터링을 위해, IL-2 분석물 샘플을 1X HBS-P+ 완충제로 희석하고, 솔리드 블랙 96웰 플레이트(Greiner Bio-One, cat# 655209)로 옮겼다. IL-2 샘플은 60초 동안 CD25-Fc 로딩된 바이오센서에 결합하도록 하였다. 해리 단계는 90초 동안 1X HBS-P+

완충제를 함유하는 솔리드 블랙 96웰 플레이트의 웰에 기록되었다. 데이터는 병렬 완충제 블랭크 차감을 사용하여 배열되었고, 기준선은 y축에 정렬되고, 옥테트 데이터 분석 소프트웨어 버전 10.0(PALL/ForteBio)에서 사비츠키-골레이(Savitzky-Golay) 필터에 의해 평활화되었다. 프로세싱된 동역학 센서그램은 1:1 결합 화학량론을 설명하는 랭뮈어(Langmuir) 모델을 사용하여 전역적으로 피팅되었다(도 4a).

[0815] 실시예 6 - 본 실시예는 포유동물 시스템에서 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2의 클로닝 및 발현을 자세히 설명한다. 본 실시예는 또한 변형된 IL-2의 생물학적 활성을 평가하는 방법을 설명한다.

[0816] 포유동물 세포에서 IL-2 변이체의 제조. 천연 인간 IL-2는 Thr-3에 O-연결된 글리코실화를 갖는 글리코실화된 단백질이다(Conradt et al., Eur J Biochem, 153(2): pp: 255-61 (1985)). 비글리코실화된 IL-2는 글리코실화된 IL-2와 유사한 활성을 갖는 것으로 나타났지만, 글리코실화된 인간 IL-2는 활성화된 인간 T 세포의 클론 성장 및 장기 증식 측면에서 더 나은 활성을 갖는 것으로 나타났다. 또한, 천연 IL-2가 더 높은 특이적 활성을 가지고 있음을 시사하는 일부 보고서도 존재한다. 또한, 포유동물 세포에서 IL2의 발현은 이. 콜라이에서의 발현에 비해 이점이 있음을 시사한다(Kim et al., J Microbiol Biotechnol, 14(4), 810-815 (2004)). 본 발명에서, 각각 상기 표 1 및 2에서 설계된 야생형 IL-2 및 그의 다양한 뮤테인은 본원의 실시예에서 설명되는 바와 같이 CHO 세포에서 생산될 수 있다.

[0817] 원하는 위치에 비천연 아미노산을 포함하는 IL-2 뮤테인을 생산하기 위해, 각각의 뮤테인은 조작된 오르토고날 tRNA/tRNA 합성효소 쌍을 포함하는 형질감염된 플랫폼 세포주로부터 유래된 안정한 풀 또는 안정한 세포주에서 생산된다(Tian et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 111(5): pp: 1766-71 (2014) 및 PCT/2018US/035764: 각각 그 전체가 본원에 참고로 포함됨). 간단히 설명하면, CHOK1 세포는 예를 들어 CHO 세포에서 IL-2와 같은 치료 단백질 내로의 비천연 아미노산, 예를 들어 pAF의 효율적인 도입을 위해 독점적인 오르토고날 tRNA 합성효소(O-RS) 및 그의 동족체 앰버 억제 tRNA(O-tRNA)를 안정적으로 발현하는 플랫폼 세포주(들)로 조작되었다. 그런 다음, 플랫폼 세포주는 생물 반응기 내로의 빠른 진행을 위해 현탁액 성장에 대해 미리 적응되었다. 플랫폼 세포주는 개선된 비천연 아미노산 도입 효율 및 클론 선택 효율로 잘 특성화되고 진화되었다. 플랫폼 세포주는 초기 단계 연구 사용을 위해 역가가 100 mg/L보다 크고 빠르고 효율적인 일시적 발현에 의해 비천연 아미노산 도입된 치료 단백질을 생산하기 위한 모세포로서 사용된다. 일시적 형질감염 및 안정적인 풀 생성을 수행하여 후보 분자의 발현을 평가하고 리드 분자를 확인하기 위한 기능 분석을 위한 물질을 제공한다. 생산 세포주는 GS 발현 시스템에서 관심 유전자를 포함하는 앰버 넌센스 코돈으로 플랫폼 세포주를 형질감염시킴으로써 비천연 아미노산이 도입된 IL-2 단백질을 생산하기 위해 생성된다. 플랫폼 세포주를 모세포로 사용하여 3-4개월에 5-10개의 PCD, 6개월에 20-30개의 PCD로 생산 세포주를 확보하기 위한 안정적인 세포주 개발 전략을 시행하고 있다.

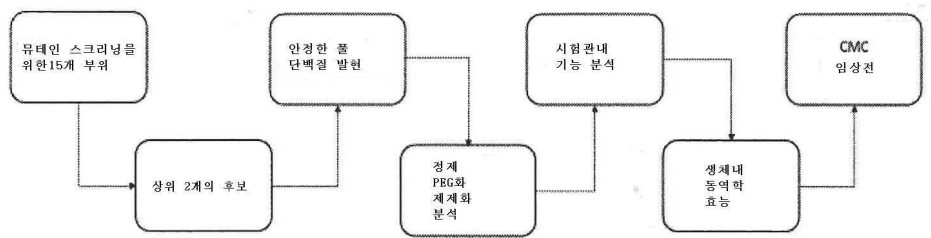
[0818] 본 발명에서는, 그의 천연 신호 펩타이드 서열을 갖는 인간 IL-2 cDNA(NM_000586.3)를 합성하고, GS 선택 마커를 포함하는 포유동물 발현 벡터로 클로닝하였다(도 4b). 표 1에 나타난 바와 같이, 클로닝된 야생형 인간 IL-2 cDNA는 임의의 돌연변이도 없이 각각의 아미노산의 원래의 DNA 서열을 유지한다. 이와 대조적으로, IL-2 변이체의 생성 동안(표 2), 15개의 뮤테인 각각은 nnAA 함유 단백질을 생성하도록 조작된 세포에서 억제 및 발현될 수 있는 앰버 정지 코돈(TAG)으로 돌연변이된 고유한 위치를 갖는다.

[0819] IL-2 변이체 발현을 위해 사용되는 조작된 CHO 세포의 확립. 조작된 CHO 세포는 이전에 확립된 독점 플랫폼 세포의 유전자 녹아웃(PCT/2018US/035764, 전체가 본원에 참조로 포함됨)으로부터 유래되었다. 간단히 설명하면, 웹 기반 표적 탐색 도구인 CRISPy를 사용하여, 바람직하게는 CHO-K1 세포에서 오프 타겟(off-target)이 없는 초기 엑손에서 gRNA 표적 서열을 빠르게 확인하였다. gRNA를 CHO 코돈 최적화 버전의 Cas9와 공동 발현하는 포유동물 발현 벡터 pGNCV 내에 클로닝하였다. 생산 세포주를 단백질 발현 벡터로 형질감염시켜 세포 풀을 생성한 다음, 클로닝하여 유전자 녹아웃을 갖는 단일 세포 단리물을 확인하였다. 여러 프로젝트의 복합적인 결과에서 indel(삽입/결실) 빈도는 세포의 풀 및 단일 세포 단리물에 대해 각각 30-90% 및 50-80%이었다. CRISPR은 CHO 세포에서 표적 유전자를 녹아웃시키는 데 사용되었다. 특히, IL-2의 mRNA 안정성을 높이기 위해 CRISPR 기술을 사용하여 UPF1 유전자를 녹아웃시켰다. 녹아웃에 사용된 gRNA는 도 5에 제시되어 있다. 192개의 클론을 스크리닝한 후, 2개의 UPF1-KO 세포주를 확보하고, UPF1 녹아웃을 갖는 것으로 서열 결정에 의해 확인하였다(도 6). 이어서, 수득된 UPF1-KO 세포주를 사용하여 IL-2 변이체를 일시적으로 발현시켰다.

[0820] 조작된 CHO 세포에서 IL-2의 일시적 발현. IL-2 변이체는 상기 실시예에 개시된 바와 같이 수득된 UPF1-KO 세포주에서 일시적으로 발현되었다. 현탁 세포용 아막사(Amaxa) 키트(Lonza)를 사용하여 전기천공으로 형질감염을 수행하였다. 상기 실시예에 개시된 바와 같이 제조한 6 µg의 플라스미드를 사용하여 2 X 10⁶개의 조작된 CHO 세포를 형질감염시켰다. 형질감염 후, 세포를 인비트로젠(Invitrogen, 미국 캘리포니아주 칼스바드 소재)의 시판

키트를 사용하여 ELISA에 의한 역가 분석 전에 4일 동안 37℃에서 인큐베이팅하였다. 도 7a 및 7b에 나타난 바와 같이, 변이체 F42는 일시적 발현 동안 15개의 변이체 중에서 가장 높은 발현 수준을 나타낸다.

[0821] CTLL-2 세포에서 IL-2 변이체의 T 세포 확장 시험. CTLL-2 세포 확장 분석은 형질감염된 조작된 CHO 세포로부터 일시적으로 발현된 F42 변이체 상청액을 사용하여 수행되었다. 세포 증식 분석 동안, 야생형 IL-2를 100% 증식의 대조군으로 사용하였다(도 8에 제시됨). 변이체 F42는 분석에서 10 ng/mL, 3.33 ng/mL, 1.11 ng/mL, 0.37 ng/mL, 0.12 ng/mL 및 0.04 ng/mL로 연속 희석액으로 준비되었다. 세포 증식은 셀 타이터 글로(Cell Titer Glo)(Promega, 미국 위스콘신주 소재)를 사용하여 수행되었다. 발광 신호는 TECAN genios pro.에서 판독하였다. 도 8에서 볼 수 있는 바와 같이, F42는 그의 야생형 대조군에 비해 기능의 95%를 유지하면서 약 0.24 ng/mL의 EC₅₀을 나타냈다. 본 발명의 IL-2 변이체를 연구하기 위한 일반적인 절차는 아래에 제시된다:



[0822]

[0823] 비천연 아미노산을 갖는 PEG화된 IL-2 뮤테인의 효능 연구에 대한 일반적인 절차

[0824] 실시예 7 - CTLL-2 세포 확장에 의한 IL-2 변이체 스크리닝

[0825] 실시예에 개시된 CTLL-2 세포 확장 분석을 이용하여, 관련 기술 분야에 공지된 16개의 원래 선택된 부위(야생형 포함) 및 4개의 추가의 부위(K32, K48, K49, K76)를 포함하는 20개의 상이한 IL-2 변이체가 스크리닝되었다(Charych, D., et al., PLoS One, 12(7): p. e0179431, 2017). 도 9 및 표 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 대부분의 변이체는 돌연변이 유발 후에도 활성을 유지하였다. IL-2R α 의 잔류 발현을 갖는 CTLL-2 세포의 특성으로 인해, CTLL2 세포에 대한 결합이 가장 적은 돌연변이를 갖는 변이체는 미미하지만 IL-2R α 에 대한 일부의 고유한 결합을 계속 나타냈다. 예를 들어, IL-2R α 에 대한 결합이 가장 적은 P65 IL-2 변이체는 IL-2R α 에 대한 일부의 고유한 편향된 결합을 나타냄이 관찰되었다. 확인된 변이체는 PEG화 후의 결합 능력에 대해 추가로 분석되었다.

[0826] 표 3. CTLL2 증식 분석을 사용한 IL-2 변이체의 활성

IL-2 변이체	EC50 (nM)
WT	1.96
T3	1.86
K32	0.27
K35	2.39
T37	1.64
R38	1.67
F42	8.70
K43	0.17
F44	0.37
Y45	1.87
K48	2.87
K49	3.93
E61	1.17
E62	1.98
K64	4.09
P65	13.90
E68	1.73
L72	2.45
K76	0.29
Y107	1.60

[0827]

[0828] 실시예 8 - 시험관내 결합 분석을 사용한 선택된 변이체의 분석

[0829] 선택된 변이체 P65, Y45, E61, F42, K35, K49 및 T37의 분석은 상기 실시예에서 설명된 바와 같이 시험관내 결합 분석, 생물층 간섭계 분석을 사용하여 수행되었다. 각각의 변이체는 그 각각의 특이적 부위에서 20K PEG와 접합되었다. 이어서, PEG화된 변이체는 실시예의 다른 곳에서 설명된 BLI(Bio-Layer Interferometry) 분석에 의해 분석되었다. 도 10a-10c에 제시된 바와 같이, PEG화된 변이체는 IL-2R α 에 대한 그의 결합에 대해 옥테트에서 시험되었다. 야생형 IL-2는 분석에서 양성 대조군으로 사용되었다. PEG화 후, 대부분의 변이체는 92.9% 내지 99.9%의 IL-2R α 에 대한 극적으로 감소된 결합을 나타냈다. 시험된 PEG화된 변이체 중에서, P65 및 Y45는 99% 이상의 차단 활성을 나타냈다(표 4).

[0830] 표 4. IL-2 변이체의 시험관내 결합 활성

IL-2 변이체	정상 상태 Kd (nM)	IL-2R α 에 대한 결합의 차단
IL-2 WT	11	0%
P65-PEG20K	32000	99.9%
Y45-PEG20K	1900	99.4%
E61-EPG20K	1400	99.0%
F42-PEG20K	1100	99.0%
K35-PEG20K	840	98.7%
K49-PEG20K	180	93.8%
T37-PEG20K	155	92.9%

[0831]

[0832] 실시예 9 - 패스헌터(PathHunter) 이량체화 분석을 사용한 선택된 변이체의 분석

[0833] PEG의 접합을 위한 최상의 부위를 찾기 위해, DiscoverX(미국 캘리포니아주 프리몬트 소재)에서 개발한 패스헌터 이량체화 분석을 사용하였다. 일반적으로, 분석 시스템은 효소의 상보적 결합 도메인을 갖도록 조작된 외인성 발현 IL-2 수용체를 사용하여 이전에 분리된 수용체가 추가된 IL-2 분자에 의한 이량체화 후에 활성화되면 화학발광 신호를 발생시킨다(도 11). U2OS 세포에서 2개의 세포주가 생성되었다. 하나의 세포주는 IL-2R α , IL-2R β 및 IL-2R γ 의 세 가지 수용체를 발현하였다. 다른 세포주는 IL-2R β 및 IL-2R γ 를 발현하였다. 각각의 변이체의 결합 EC₅₀ 값의 비율(EC₅₀- β γ / EC₅₀- α β γ)은 상대적으로 보유된 결합 능력을 추정하는 데 사용된다. 표 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 최상의 가능한 변이체는 1의 값을 가지며, 이것은 그의 β γ 결합 능력이 100% 유지되는 반면, α 결합은 100% 차단됨을 의미한다. 언급한 바와 같이, 변이체 Y45-BR4(20K 4-분지형 PEG가 접합된 변이체 Y45), 및 P65-PEG20K(20K 선형 PEG가 접합된 변이체 P65)는 가장 낮은 값을 보였고, 이것은 상기 2개의 PEG화된 변이체가 추가의 평가에 가장 적합한 후보임을 나타낸다.

[0834] 표 5. 이량체화 분석을 사용한 IL-2 변이체의 결합 활성 - 실험 1

화합물	β γ EC50 (nM)	α β γ EC50 (nM)	β γ / α β γ 비율
가능한 최상의 변이체	0.41	0.41	1
Y45-BR4	5.69	1.18	5
P65-PEG20K	7.40	1.51	5
Y45-BR2	6.10	0.46	13
IL-2 WT	0.41	0.02	25
E61-PEG20K	3.78	0.02	168
Y45-PEG20K	5.50	0.03	206

[0835]

[0836] 표 6에 제시된 바와 같이, 또한 수행된 추가의 실험에서, 변이체 P65-BR4(20K 4-분지형 PEG가 접합된 변이체 P65), 및 P65-BR2(20K 2-분지형 PEG가 접합된 변이체 P65)가 변이체 Y45-BR4 및 P65-PEG20K에 추가하여 추가의 평가를 위한 후보로서 선택되었다.

표 6. 이량체화 분석을 사용한 IL-2 변이체의 개선된 결합 활성 - 실험 2

화합물	$\beta\gamma$ EC50 (nM)	$\alpha\beta\gamma$ EC50 (nM)	$\beta\gamma/\alpha\beta\gamma$ 비율
가능한 최상의 변이체	0.41	0.41	1
P65-BR4	8.50	4.86	1.75
P65-BR2	13.06	4.80	2.96
Y45-BR4	3.67	0.84	4.31
P65-PEG20K	5.21	1.10	5.06
Y45-BR2	3.39	0.40	8.34
IL-2 WT	0.41	0.03	16.67
Y45-PEG20K	2.34	0.04	30.87

실시예 10 - IL-2 변이체의 생체의 pSTAT5 분석

PEG화된 변이체의 시험관내 기능을 추가로 평가하기 위해, PBMC를 사용한 생체의 분석이 사용되었다. 도 12에 제시된 바와 같이, 그의 수용체에 대한 IL-2의 결합은 STAT5의 인산화(pSTAT5) 증가를 촉발하였다. 따라서, pSTAT5 수준의 검출은 내인성 IL-2 수용체에 대한 IL-2 변이체의 결합에 대한 지표가 될 것이다. 인간 전체 PBMC는 Y45-BR2(20K 2-분지형 PEG가 접합된 변이체 Y45), Y45-BR4(20K 4-분지형 PEG가 접합된 변이체 Y45) 및 P65-PEG20K(선형 20K PEG를 갖는 변이체 P65)와 같은 선택된 PEG화된 변이체로 처리된 후, 두 집단, 즉 CD8+ T 세포 및 CD4+ Treg 세포로 분리되었다. 표 7에 제시된 바와 같이, 세 가지 변이체는 모두 보유된 $\beta\gamma$ 결합 능력과 관련하여 훨씬 개선된 활성을 나타내었고, α 결합 활성을 차단하였다. 이러한 결과는 표 8에 제시된 바와 같이 추가의 pSTAT5 분석에서 시험된 변이체에 의해 추가로 뒷받침되었다. 이 pSTAT5 분석의 결과(표 8)는 다수의 변이체가 Treg 세포에 결합하는 능력이 감소되고 상대적으로 CD8+ 세포에 대한 결합을 유지한다는 측면에서 극적으로 개선된 활성을 갖는다는 것을 보여주었다. 계산된 CD8+/Treg 비율은 패스헌터 분석 결과가 유사한 순위 시스템에 의해 pSTAT5 분석 결과와 직접 비교될 수 있도록 변이체의 순위를 나타내기 위해 표 8에 사용된다.

표 7 - 생체의 분석을 사용한 IL-2 변이체의 결합 활성 - 실험 1

화합물	EC50-CD8 (nM)	EC50-Treg (nM)	$\beta\gamma$ -보유 활성 (%)	$\alpha\beta\gamma$ -보유 활성 (%)	비율 ($\beta\gamma/\alpha\beta\gamma$)
IL-2 WT	0.1346	0.00034	100	100	1.00
Y45-BR2	1.065	0.4504	12.64	0.1	169.87
Y45-BR4	2.714	1.337	4.96	0.03	197.88
P65-PEG20K	9.204	4.179	1.46	0.01	182.38

표 8 - 생체의 분석을 사용한 IL-2 변이체의 개선된 결합 활성 - 실험 2

화합물	EC50-CD8(nM)	EC50-Treg (nM)	비율 (CD8/Treg)
IL-2 WT	0.03377	0.0002857	118.2
Y45-BR2	4.604	36.003	0.13
Y45-PEG20K	3.367	5.377	0.61
P65-BR2	41.467	111.644	0.37
Y45-BR4	7.462	3.398	2.20
P65-PEG20K	10.643	4.514	2.36
P65-BR4	23.961	4.351	5.51

실시예 11 - CHO 포유동물 세포에서 생산된 글리코실화된 IL-2 대 이. 콜라이에서 생산된 비-글리코실화된 IL-2의 존재 하에서의 CTLL-2 세포의 클론 성장 및 장기 증식.

천연 인간 IL-2는 Thr-3에 O-연결된 글리코실화를 갖는 글리코실화 단백질인 것으로 보고되었다(Conradt et al., Eur J Biochem 153(2): 255-261 (1985)). 비글리코실화된 IL-2와 비교할 때, 상기 글리코실화의 기능은 생리학적 pH에서 더 높은 용해도, 더 느린 생체내 제거 및 암 요법에서 더 적은 면역원성과 관련이 있다([Robb et al., Proc Natl Acad Sci U S A 81(20): 6486-6490 (1984)]; [Goodson et al., Biotechnology (NY) 8(4): 343-346 (1990)]). 보다 중요한 사실은 글리코실화된 IL-2가 알로 활성화된(alloactivated) 인간 T 세포의 클론 성장 및 장기 증식을 촉진하는 데 있어 비글리코실화된 IL-2보다 우수하다는 것이 밝혀졌다는 것이고(Pawelec et al., Immunobiology 174(1): 67-75 (1987)), 이것은 글리코실화된 IL-2가 치료 목적의 적용시에 더 나은 선택임을 시사한다.

- [0847] 글리코실화된 IL-2 및 비-글리코실화된 IL-2의 생물학적 기능을 추가로 분석하기 위해, CTLL-2 세포의 클론 성장을 및 장기 증식 빈도를 분석하는 실험을 수행하였다(도 13). 단일 CTLL-2 세포를 γ -조사된 CF1-MEF(마우스 배아 섬유모세포) 세포(Thermo Fisher, 미국 매사추세츠주 월담 소재, CAT#A34180)의 사전 코팅된 피더 층과 함께 96웰 플레이트에 침적시켰다. CHO 세포 또는 이. 콜라이에서 생산된 야생형 IL-2의 다양한 농도(0.005 nM, 0.05 nM, 0.5 nM 및 5 nM)의 단일 처리와 함께 19일의 성장 동안, 성장한 콜로니 수의 백분율 및 생존한 콜로니의 백분율을 19일 인큐베이팅 종료시에 계산하고, 분석하였다. 도 13에 제시된 바와 같이(예로서 0.5 nM 처리를 사용), 글리코실화된 IL-2는 비-글리코실화된 IL-2보다 클론 성장 촉진에서 우수한 활성을 보였다. 평균적으로, 글리코실화된 IL-2이 클론 성장을 촉진하는 능력은 CTLL-2 세포 성장을 위한 최적의 세포 배양 조건인 0.5 nM IL-2 농도의 존재 하에서 비글리코실화된 IL-2보다 2배 더 높았다. 장기간의 인큐베이팅(~19일) 후에, 글리코실화된 IL-2 처리로부터의 콜로니 생존율은 비-글리코실화된 IL-2 처리보다 4배 더 높았다. 데이터는 글리코실화된 IL-2가 IL-2 반응 세포의 클론 성장 및 장기 증식을 촉진하는 데 탁월한 활성을 가지고 있으며, 그의 유망한 치료 목적의 적용을 지지한다는 것을 분명히 보여준다.
- [0848] 실시예 12 - 새로운 안정한 숙주 CHO 세포주에서의 IL-2 발현에 대한 역가 개선
- [0849] CHO 세포에서 야생형 IL-2 및 그의 변이체의 발현을 증가시키기 위한 많은 접근법이 현장에서 시도되어 왔다(예를 들어, 문헌 [Kim et al., J Microbiol Biotechnol, 14(4), 810-815 (2004)] 참조). 그러나, 관련 산업계에서 비천연 아미노산 함유 단백질의 발현 증가는 포유동물 세포에서 상대적으로 낮은 수율로 인해 어려움을 겪고 있다. 본 발명에서 이러한 문제를 해결하기 위해, PCT/2018US/035764(그 전체 내용이 본원에 참고로 포함됨)에 개시된 바와 같이 단백질 역가의 생산을 개선하기 위한 진행 세포주의 독점 기술을 이용하여 IL-2 및 그 변이체의 안정한 풀 세포를 생성하기 위해 이용되고, 안정적인 IL-2 세포주를 생성하기 위해 사용되고 있다.
- [0850] 간단히 설명하면, Bax/Bak 녹아웃을 발현하는 5가지의 상이한 세대의 플랫폼 세포주가 IL-2의 단백질 발현을 극적으로 개선하고 IL-2 단백질의 생산을 모세포주에 비해 약 40%까지 증가시키는 것으로 밝혀졌다. Bax/Bak 녹아웃을 통해 이들 세포에서 아포토시스를 억제하는 것 이외에, UPF1 녹아웃이 IL-2의 발현을 더욱 개선하는 것으로 밝혀졌다.
- [0851] 야생형 IL-2와 그의 변이체(F42, Y45 및 P65)는 모두 이들의 안정적인 풀을 생성함으로써 시험되었다. 도 13에 제시된 바와 같이, 야생형 IL-2를 포함하여 3개의 IL-2 변이체 F42, Y45 및 P65의 안정한 풀은 각각의 안정적인 풀 생성 후에 야생형의 경우 최대 약 740 mg/L; F42 변이체의 경우 최대 120 mg/L(도 14에 제시됨)로서 관련 기술 분야에 비해 비약적으로 증가한 발현 수준을 보여주었다(예를 들어, 문헌 [Kim et. al., J Microbiol Biotechnol., 14(4), 810-815, (2004)] 참조). 데이터는 비천연 아미노산이 효율적으로 도입된 새로운 CHO 세포주의 생성에 의해 IL-2 단백질 생산 또는 수율이 개선되거나 증가될 수 있음을 보여준다. 또한, 이것은 발현 수준 및 기능이 부위 특이적으로 관련됨을 시사한다.
- [0852] 실시예 13 - IL-2 변이체 F42-R38A는 IL-2R 알파 결합의 완전한 차단을 보여주었다.
- [0853] 본원에서 개시되는 바와 같이, 비천연적으로 코딩된 아미노산 치환(들)은 IL-2 내의 다른 부가, 치환 또는 결실과 조합되어 다음을 포함하지만 이로 제한되지 않는 IL-2 폴리펩타이드의 다른 생물학적 특성에 영향을 미칠 것이다: IL-2의 안정성(단백질 분해에 대한 내성을 포함하지만 이로 제한되지 않음)의 증가 또는 그의 수용체에 대한 IL-2의 친화도의 증가; IL-2의 약학적 안정성의 증가; 중양 억제 및/또는 중양 감소를 위한 IL-2의 활성 향상; IL-2 또는 변이체의 용해도(이. 콜라이 또는 다른 숙주 세포에서 발현되는 경우를 포함하지만 이로 제한되지 않음)의 증가; 이. 콜라이 또는 다른 재조합 숙주 세포에서 발현 후 IL-2 용해도의 증가; 이. 콜라이 또는 다른 재조합 숙주 세포에서 발현 후 폴리펩타이드 용해도의 증가; IL-2 수용체, 결합 단백질 또는 관련 리간드에 대한 친화도를 조절, IL-2 수용체에 결합한 후 신호 전달의 조절, 순환 반감기의 조절, 방출 또는 생체 이용률의 조절, 정제 촉진, 특정 투여 경로의 개선 또는 변경; 그의 수용체에 대한 IL-2 변이체의 친화도 증가; IL-2 변이체의 IL-2-R베타 및/또는 IL-2-R감마에 대한 친화도의 증가.
- [0854] 따라서, 변이체 F42의 기능을 개선하기 위해, 추가의 돌연변이 R38A를 갖는 새로운 변이체를 CHO 세포에 제조하였다. 도 15a에 제시된 바와 같이, 역가는 안정한 세포주의 생성 동안 안정한 풀에서 IL-2 변이체 F42에서 비천연 아미노산 및 천연 아미노산 치환의 조합을 통해 118 mg/L로 증가하였다. 변이체 F42의 단백질 발현 수준은 유지될 뿐만 아니라, R38A 돌연변이의 존재 하에서 20% 증가를 보였다. PEG화된 F42-R38A 변이체의 기능을 시험하기 위해, CTLL-2 세포 결합 분석을 수행하였다. 표 9에 제시된 바와 같이, F42-R38A-20K 2-분지형 PEG(변이체 F42-R38-BR2) 접합체는 3.6 nM을 나타내는 F42의 EC₅₀과 대조적으로 15.9 nM의 EC₅₀을 보여주었고, 결합 차단 효

율은 4배 초과로 증가하였다(도 15b). 0.025 nM의 야생형 IL-2의 EC_{50} 을 기초로 할 때, 결합 차단 효율은 99.9%를 초과하였다. 이 변이체는 그의 높은 단백질 발현 수준 및 그의 IL-2R알파에 대한 결합을 차단하는 효율성 측면에서 그의 치료 목적의 적용에 대한 큰 잠재력을 보여주었다.

표 9. PEG화된 F42-R38A 변이체의 CTLL-2 결합 분석

	WT-IL2	F42-PEG20K-BR2	F42-R38A-PEG20K-BR2
EC50	0.025 nM	3.6 nM	15.9 nM

F42pAF 변이체, R38A-F42pAF 변이체(비천연 아미노산 및 점 돌연변이 포함) 및 F42-R38A-PEG20K-BR2의 결합 동역학을 BLI에 의해 평가하여, IL-2R알파에 대한 결합에 대한 R38A 돌연변이의 효과를 결정하였다. 도 15c는 3개의 구축물에 대한 결합 센서그램을 보여주고, 관련 결합 상수(KD)는 표 10에 제시되어 있다. 표 10에서 볼 수 있는 바와 같이, IL-2-F42pAF는 20 nM의 IL-2R알파 결합 KD를 갖는다. R38A 돌연변이가 추가된 IL-2-F42-R38ApAF는 233 nM의 IL-2R알파 결합 KD를 가지며, 이것은 IL-2R알파 결합의 12배 감소에 해당한다. IL-2-R38A-F42pAF를 20K 2-분지형 PEG 분자에 접합시키면, IL-2R알파 결합이 방지되었다. 그 결과는 추가의 돌연변이가 F42-R38A의 그의 수용체 IL-2R α 에 대한 결합을 효과적으로 차단한다는 것을 분명히 보여주었다.

표 10. 천연 및 비천연 아미노산 치환을 갖는 IL-2 PEG화된 변이체의 결합

	F42pAF	F42-PEG20K-BR2	F42-R38A-PEG20K-BR2
K _D	20 nM	233 nM	비결합

실시예 14 - 나이브 CD-1 마우스에서의 약동학(PK) 연구.

암컷 CD-1 마우스의 3개 그룹에 IL-2 야생형(IL-2-WT) 또는 PEG화된 IL-2 변이체 Y45-PEG20K-BR2 또는 F42-R38A-PEG20K-BR2의 단일 IV 볼루스 용량을 투여하고, 혈장 농도를 시간 경과에 따라 평가하였다. 연구 설계는 표 11에 요약되어 있다. 연구에는 14개의 시점(0, 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7, 24, 72, 168, 240, 336, 408 시간) 및 시점당 5마리의 마우스 희생이 포함되었다. 혈장 샘플의 생물학적 분석은 ELISA 분석을 사용하여 수행하였다. PK 데이터 분석은 WinNonlin 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 결과는, 시간 프로파일에 대한 평균 혈장 농도를 도시하는 도 16 및 표 12에 요약하였다. PEG화된 IL-2 변이체 Y45-PEG20K-BR2는 7.6의 $t_{1/2}$ 를 보인 PEG화된 IL-2 변이체 F42-R38A-PEG20K-BR2에 비해 8.5의 $t_{1/2}$ 를 보였다.

표 11. 나이브 CD-1 마우스에서의 IL-2 변이체의 PK 연구

치료	용량 (mg/kg)	경로, 스케줄	시점	N
IL-2 WT	1	IV, 단일	14	5
IL2-Y45-PEG20K-BR2	1	IV, 단일	14	5
IL2-F42-R38A-PEG20K-BR2	1	IV, 단일	14	5

표 12. CD-1 암컷 마우스에서의 IL-2 변이체 PK 파라미터

파라미터	단위	Y45-PEG20K-BR2	F42-R38A-PEG-20K-BR2	IL-WT
C _{max}	ng/mL	1457	1190	63
AUC _{0-t}	h*ng/mL	11170	8572	11
R ²		0.999	0.985	0.991
AUC _{INF}	h*ng/mL	12955	8939	19.1
$t_{1/2}$	시간	8.5	7.6	0.13

실시예 15 - IL-2 접합체의 시험관내 결합 분석.

IL-2 야생형(IL-2 WT; 도 17a), IL2-F42-R38A-P65R-PEG20K-BR2(도 17b), IL2-Y45-M46L-PEG20K-BR2(도 17c) 및

IL2-Y45-M46I-PEG20K-BR2(도 17d)의 결합 동력학을, IL-2R α에 결합하는 PEG화된 변이체를 결정하기 위해 상기 실시예에 기재된 BLI 검정을 이용하여 평가하였다. 도 17a-17d는 야생형 IL-2 및 3개의 변이체 에 대한 결합 센서그램을 도시한다. 도 17a-17c에서 볼 수 있는 바와 같이, 3개의 PEG화된 변이체 중 어느 것도 IL-2R α에 대한 결합을 보이지 않았다.

[0868] 실시예 16 - IL-2 변이체 F42-R38A-P65R의 CTLL-2 증식 검정

[0869] 변이체 F42-R38A의 기능을 추가로 개선하기 위해, 추가 돌연변이 P65R을 갖는 새로운 변이체를 CHO 세포에서 제조하였다. F42-R38A-P65R 변이체의 기능을 시험하기 위해, CTLL-2 세포 결합 검정을 상기 실시예에 기재된 바와 같이 수행하였다. 도 18 및 표 13에 나타난 바와 같이, PEG화된 F42-R38A-P65R은, 7.6 nM의 EC₅₀ 을 갖는 PEG화된 F42-R38A와 대조적으로 140.2 nM 의 EC₅₀을 나타냈다. 이는 결합 차단 효율이 18배 초과로 증가되었음을 보여준다. 0.025 nM의 야생형 IL-2 EC₅₀을 기준으로, 결합 차단 효율은 99.9% 초과이다. 따라서, PEG화된 F42-R38A-P65R 변이체는 높은 단백질 발현 수준 및 IL-2R알파에 대한 탁월한 차단 결합 측면에서 생체 내 적용에 대한 큰 잠재력을 보여주었다.

[0870] 표 13. PEG화된 IL-2 변이체의 EC₅₀(nM)

변이체	EC ₅₀ (nM)
Y45-PEG20K-BR2	4.1
Y45-M46I-PEG20K-BR2	9.8
Y45-M46L-PEG20K-BR2	11.1
P65-PEG20K-BR2	74.3
F42-R38A-PEG20K-BR2	7.6
F42-R38A-P65R-PEG20K-BR2	140.2
F42-PEG20K-BR2	2.8
IL-2 WT	0.020
IL-2 시판 대조군	0.025

[0871]

[0872] 실시예 17 - 나이브 CD-1 마우스에서의 IL-2 변이체의 약동학(PK) 연구.

[0873] PK 파라미터를 개선하기 위해, 더 큰 크기의 40K, PEG화된 IL-2 변이체에 대한 새로운 PK 연구가 수행하였다. 5 마리의 암컷 CD-1 마우스의 4개 그룹에 각각 IL-2 야생형(IL-2-WT) 또는 PEG화된 IL-2 변이체 Y45-PEG40K-BR2 또는 F42-R38A-P65R-PEG30K-L(L = 선형), 또는 F42-R38A-P65R-PEG40K-BR2(BR = 분지형)의 단일 IV 볼루스 용량을 투여하였다. 혈장 농도는 14개 시점(0, 0.08, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 7, 24, 72, 168, 240, 336, 408 시간)에 걸쳐 평가하였다. 혈장 샘플의 생물학적 분석은 ELISA 분석을 이용하여 수행하였다. PK 데이터 분석은 WinNonlin 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 결과는, 시간 프로필에 대한 평균 혈장 농도를 도시하는 도 18 및 표 14에 요약한다. PEG화된 IL-2 변이체 Y45-PEG40K-BR2, F42-R38A-P65R-PEG30K-L, 및 F42-R38A-P65R-PEG40K-BR2은 각각 24.2, 12.9 및 26.5의 t_{1/2}를 나타냈다.

[0874] 표 14. CD-1 암컷 마우스에서의 PEG화된 IL-2 변이체 PK 파라미터

파라미터	단위	Y45- PEG40K-BR2	F42-R38A-P65R- PEG30K-L	F42-R38A-P65R- PEG40K-BR2	IL- WT
C _{max}	ng/mL	8969	3998	3440	325
AUC _{0-t}	h*ng/mL	214121	43683	56997	196
R ²		0.999	0.941	0.982	1.000
AUC _{INF}	h*ng/mL	214478	44552	57188	199
t _{1/2}	시간	24.2	12.9	26.5	0.39

[0875]

[0876] 실시예 18 - C57BL/6 마우스에서의 효능 연구.

[0877] PEG화된 IL-2 변이체, Y45-PEG40K-BR2, F42-R38A-P65R-PEG30K-L 및 F42-R38A-P65R-PEG40K-BR2를, B16-F10 종양을 보유한 C57BL/6 마우스에서 항종양 효능에 대해 시험하였다. 종양이 대략 80-100 mm³일 때에, 모든 마우스에 10 mg/kg으로 정맥내 투여하였다. 동물을 캘리퍼스 측정에 의한 종양 성장(도 20a), 및 체중(도 20b)에 대해 모니터링하였다. 도 20a 및 20b에 나타난 결과는, 시험된 모든 PEG화된 IL-2 변이체에 대해 각각 종양 크기의 상당한 감소 및 체중 감소를 시사한다.

[0878] B16-F10 종양을 보유하는 마우스에서, PEG화된 IL-2 변이체, Y45-PEG40K-BR2, F42-R38A-P65R-PEG30K-L 및 F42-R38A-P65R-PEG40K-BR2의 항종양 효능 및 세포독성을 추가로 조사하기 위해 수행된 추가의 연구는, 0.01 mg/kg, 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 및 5 mg/kg을 포함하는 약 0.01 mg/kg~약 5 mg/kg 범위의 정맥내 투여량을 포함한다.

[0879] 실시예 19 - BALB/c 마우스에서의 B16F10 종양 모델의 효능 연구.

[0880] PEG화된 IL-2 변이체, F42-R38A-P65R-PEG30K-L, F42-R38A-P65R-PEG40K-BR2, Y45-PEG30K-L 및 Y45-PEG40K-BR2를, B16F10 종양을 보유하는 BALB/c 마우스에서 항종양 효능에 대해 시험하였다(표 15). 종양이 대략 100 mm³일 때에 모든 마우스에 정맥내 투여를 하고, 종양 성장을 모니터링하였다. 도 21a 및 21b에 도시된 바와 같이, 데이터는 시험된 모든 PEG화된 IL-2 변이체에서 종양 크기의 상당한 감소를 시사한다. 개개의 최종 종양 부피는 도 22에 도시되어 있고 14일째의 최종 종양 성장 억제(TGI)는 표 15에 요약되어 있다.

[0881] 표 15. BALB/c 마우스에서의 B16F10 종양 모델의 효능 연구.

시험 품목	농도, 경로	투약 계획	N	TGI (14일차)
비히클	-	2x	8	-
F42-R38A-P65R-PEG30K-L	2 mg/kg, IV	2x	8	59%
F42-R38A-P65R-PEG30K-L	4 mg/kg, IV	2x	8	65%
F42-R38A-P65R-PEG30K-L	8 mg/kg, IV	2x	8	42%
F42-R38A-P65R-PEG40K-BR2	2 mg/kg, IV	2x	8	51%
F42-R38A-P65R-PEG40K-BR2	5 mg/kg, IV	2x	8	51%
Y45-PEG30K-L	2 mg/kg, IV	2x	8	49%
Y45-PEG40K-BR2	2 mg/kg, IV	2x	8	48%
Y45-PEG40K-BR2	5 mg/kg, IV	2x	8	52%

[0882]

[0883] 실시예 20 - BALB/c 마우스에서의 CT26 종양 모델의 효능 연구.

[0884] PEG화된 IL-2 변이체, F42-R38A-P65R-PEG30K-L, 및 Y45-PEG30K-L을, CT26 종양을 보유한 BALB/c 마우스에서 항종양 효능에 대해 시험하였다(표 16). 종양이 대략 100 mm³일 때에 모든 마우스에 0.3 mg/kg, 1 mg/kg 및 3 mg/kg으로 정맥내 투여 하였다. 동물을 캘리퍼스 측정에 의한 종양 성장, 및 체중에 대해 모니터링하였다. 도 23a 및 23b에 도시된 데이터는, 시험된 모든 PEG화된 IL-2 변이체에 대해, 체중 감소 없는 종양 크기의 상당한 감소를 시사하였다(도 23c). 개개의 최종 종양 부피는 도 24에 제시되어 있고, 17일째의 최종 종양 성장 억제(TGI)는 표 16에 요약되어 있다.

[0885] 표 16. BALB/c 마우스에서의 CT26 종양 모델의 효능 연구.

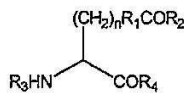
시험 품목	농도, 경로	투약 계획	N	TGI (17일차)
비히클	-	1x	9	-
F42-R38A-P65R-PEG30K-L	0.3 mg/kg, IV	1x	9	34%
F42-R38A-P65R-PEG30K-L	1 mg/kg, IV	1x	9	36%
F42-R38A-P65R-PEG30K-L	3 mg/kg, IV	1x	9	62%
Y45-PEG30K-L	0.3 mg/kg, IV	1x	9	35%
Y45-PEG30K-L	1 mg/kg, IV	1x	9	50%
Y45-PEG30K-L	3 mg/kg, IV	1x	9	74%

[0886]

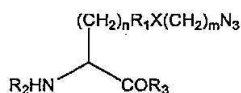
- [0887] 실시예 21 - PBMC에서의 CD8+ 및 CD4+ 세포에 대한 PEG화된 IL2의 효과
- [0888] 용량 투여 후 7일째에 각 처리군의 5마리 마우스로부터 혈액을 채취하고, CD45, CD3, CD8 및 CD4에 대한 FACS 분석에 의해 분석하였다. 그 결과의 그래프 도시를 도 25a-25c에 제시한다. 도 25a에 도시된 CD3+ 집단에서의 CD8+ 세포의 백분율은 PEG화된 IL2 처리에 의한 CD8+ 세포의 유의한 증가를 시사한다. 도 25b에 도시된 CD45+ 집단에서의 CD4+ 세포의 백분율은 PEG화된 IL2 처리에 의한 CD4+ 세포의 유의한 증가가 없음을 시사한다. 도 25c에 도시된 CD8+/CD4+ 세포의 비율은 용량-반응 패턴에서 CD8+/CD4+ 비율의 상당한 증가를 시사한다.
- [0889] 실시예 22 - CT26 종양에서의 CD8+ TIL에 대한 PEG화된 IL2의 효과
- [0890] 면역조직화학(IHC)을 수행하여 BALB/c 마우스의 CT26 종양에서 종양 침윤 림프구(TIL)에 대한 Y45-PEG30K-L의 효과를 평가하였다. 7일 동안 3 mg/kg의 Y45-PEG30K-L로 처리한 후 BALB/c 마우스로부터 CT26 종양 조직을 수집하였다. CD8+ T 세포를 염색하고 IHC로 분석하였다. 그 결과는, 비히클 대조군(제시하지 않은 데이터)과 비교하여 3 mg/kg의 Y45-PEG30K-L로 처리된 CT26 종양 영역에서 CD8+ TIL 응집이 대략적으로 약 5배의 극적인 증가를 나타냈다.
- [0891] 실시예 23 - DSF에 의한 용융 온도 분석
- [0892] 다양한 출처, 예컨대 *이. 콜라이* 및 CHO 세포의 야생형 IL-2의 용융 온도를 분석하기 위해 시차 주사 열광 측정(DSF)을 수행하였다. 도 26에 도시된 바와 같이, 그 결과는 CHO 세포에서 발현된 야생형 IL-2가 *이. 콜라이*에서 발현된 IL-2보다 최대 6.2°C 더 높은 용융 온도를 갖는다는 것을 시사한다. 이러한 개선된 열 안정성은 CHO 세포에서 발현되는 본 발명의 글리코실화된 IL-2의 이점을 명확히 입증하였다.
- [0893] 본 명세서에서 설명된 실시예 및 실시양태는 단지 예시를 위한 것이며, 그에 비추어 다양한 수정 또는 변경이 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 제안될 것이며, 본원의 취지 및 범위 및 첨부된 청구항의 범위 내에 포함되어야 함을 이해하여야 한다. 본원에서 인용되는 모든 간행물, 특허, 특허 출원 및/또는 다른 문헌은 각각의 개별 간행물, 특허, 특허 출원 및/또는 다른 문헌이 모든 목적을 위해 참조로 포함된다고 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전부가 참고로 포함된다.
- [0894] 본 발명은 다음과 같이 번호가 매겨진 실시양태에 의해 추가로 설명된다.
- [0895] 1. 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드로서, 상기 IL-2 폴리펩타이드는 그의 수용체 서브유닛과의 상호작용이 야생형 IL-2에 비해 감소된 IL-2 폴리펩타이드.
- [0896] 2. 실시양태 1에 있어서, IL-2 폴리펩타이드가 서열번호 2 또는 서열번호 3에 대해 90% 상동성인 IL-2.
- [0897] 3. 실시양태 1에 있어서, IL-2 폴리펩타이드가 서열번호 2에 대해 적어도 95% 상동성인 IL-2.
- [0898] 4. 실시양태 1에 있어서, IL-2 폴리펩타이드가 서열번호 2에 대해 적어도 98% 상동성인 IL-2.
- [0899] 5. 실시양태 1에 있어서, IL-2 폴리펩타이드가 서열번호 2에 대해 적어도 99% 상동성인 IL-2.
- [0900] 6. 실시양태 1에 있어서, IL-2가 하나 이상의 수용성 중합체에 접합되어 있는 것인 IL-2.
- [0901] 7. 실시양태 6에 있어서, 수용성 중합체 중 적어도 하나가 비천연적으로 코딩된 아미노산 중 적어도 하나에 연결되어 있는 것인 IL-2.
- [0902] 8. 실시양태 7에 있어서, 수용성 중합체가 PEG인 IL-2.
- [0903] 9. 실시양태 8에 있어서, PEG의 분자량이 10 내지 50인 IL-2.
- [0904] 10. 실시양태 1에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 위치 1 앞(즉, N-말단), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133의 잔기로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에서 치환되거나, 또는 단백질의 카르복실 말단에 부가되거나, 이들의 임의의 조합인 IL-2.
- [0905] 11. 실시양태 10에 있어서, IL-2가 야생형 IL-2에 비해 그의 IL-2R α 수용체 서브유닛에 대한 IL-2 폴리펩타이드

의 친화도를 조절하는 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 것인 IL-2.

- [0906] 12. 실시양태 10에 있어서, IL-2가 IL-2의 안정성 또는 용해도를 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 것인 IL-2.
- [0907] 13. 실시양태 10에 있어서, IL-2는 시험관 내에서 합성을 증가시키거나 재조합 숙주 세포 내에서 IL-2의 발현을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 것인 IL-2.
- [0908] 14. 실시양태 10에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 잔기 3, 35, 37, 38, 41, 42, 43, 44, 45, 61, 62, 64, 65, 68, 72 및 107, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 위치에서 치환되는 것인 IL-2.
- [0909] 15. 실시양태 10에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이, 폴리펩타이드의 20개의 일반적인 아미노산 중 임의의 것에 대해서 비반응성인 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 대해 반응성인 IL-2.
- [0910] 16. 실시양태 10에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 카르보닐기, 아미노옥시기, 하이드라진기, 하이드라지드기, 세미카르바지드기, 아지드기 또는 알킨기를 포함하는 것인 IL-2.
- [0911] 17. 실시양태 16에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 카르보닐기를 포함하는 것인 IL-2.
- [0912] 18. 실시양태 10에 있어서, IL-2가 생물학적 활성 분자, 세포독성제, 수용성 중합체 또는 면역 자극제에 연결되는 것인 IL-2.
- [0913] 19. 실시양태 18에 있어서, 접합된 IL-2가 하나 이상의 수용성 중합체에 부착되는 것인 IL-2.
- [0914] 20. 실시양태 18에 있어서, 생물학적 활성 분자, 세포독성제 또는 면역 자극제가 링커에 의해 IL-2에 연결되는 것인 IL-2.
- [0915] 21. 실시양태 18에 있어서, 생물학적 활성 분자, 세포독성제 또는 면역 자극제가 절단 가능하거나 절단 불가능한 링커에 의해 IL-2에 연결되는 것인 IL-2.
- [0916] 22. 실시양태 18에 있어서, 생물학적 활성 분자, 세포독성제 또는 면역 자극제가 IL-2 내의 비천연적으로 코딩된 아미노산 중 하나 이상에 직접 접합되는 것인 IL-2.
- [0917] 23. 실시양태 10에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 다음의 구조를 갖는 것인 IL-2.



- [0918]
- [0919] 여기서, n은 0-10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이고; R₂는 H, 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이고; R₃은 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 아미노 말단 변형기이며, R₄는 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 카르복시 말단 변형기이다.
- [0920] 24. 실시양태 23에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 아미노옥시기를 포함하는 것인 IL-2.
- [0921] 25. 실시양태 23에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 하이드라지드기를 포함하는 것인 IL-2.
- [0922] 26. 실시양태 23에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 하이드라진기를 포함하는 것인 IL-2.
- [0923] 27. 실시양태 23에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산 잔기가 세미카르바지드기를 포함하는 것인 IL-2.
- [0924] 28. 실시양태 23에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산 잔기가 아지드기를 포함하는 것인 IL-2 폴리펩타이드.
- [0925] 29. 실시양태 1에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 다음의 구조를 갖는 것인 IL-2.

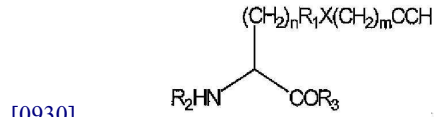


- [0926]
- [0927] 여기서, n은 0-10이고; R₁은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 치환된 아릴이거나 존재하지 않고; X는 O, N, S이거나

존재하지 않으며; m 은 0-10이고; R_2 는 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 아미노 말단 변형기이고, R_3 은 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 카르복시 말단 변형기이다.

[0928] 30. 실시양태 29에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 알킨기를 포함하는 것인 IL-2.

[0929] 31. 실시양태 1에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 다음의 구조를 갖는 것인 IL-2.



[0931] 여기서, n 은 0-10이고; R_1 은 알킬, 아릴, 치환된 알킬, 또는 치환된 아릴이고; X 는 O, N, S이거나 존재하지 않으며; m 은 0-10이고; R_2 는 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 아미노 말단 변형기이고, R_3 은 H, 아미노산, 폴리펩타이드, 또는 카르복시 말단 변형기이다.

[0932] 32. 실시양태 7에 있어서, 수용성 중합체의 분자량이 약 0.1 kDa 내지 약 100 kDa인 IL-2.

[0933] 33. 실시양태 32에 있어서, 수용성 중합체의 분자량이 약 0.1 kDa 내지 약 50 kDa인 IL-2.

[0934] 34. 실시양태 16에 있어서, 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바지드는 아마이드 연결을 통해 수용성 중합체에 연결되는 것인 IL-2.

[0935] 35. 실시양태 19에 있어서, 카르보닐기를 포함하는 수용성 중합체를, 아미노옥시기, 하이드라진기, 하이드라지드기 또는 세미카르바지드기를 포함하는 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드와 반응시킴으로써 제조된 IL-2.

[0936] 36. 실시양태 1에 있어서, IL-2는 글리코실화되는 것인 IL-2.

[0937] 37. 실시양태 1에 있어서, IL-2 폴리펩타이드가 비천연적으로 코딩된 아미노산을 통해 폴리펩타이드에 연결된 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자를 추가로 포함하는 것인 IL-2.

[0938] 38. 실시양태 37에 있어서, 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자가 사카라이드 모이어티를 통해 폴리펩타이드에 연결되는 것인 IL-2.

[0939] 39. 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 단리된 IL-2 폴리펩타이드를, 비천연적으로 코딩된 아미노산과 반응하는 모이어티를 포함하는 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 실시양태 1의 IL-2의 제조 방법.

[0940] 40. 실시양태 39에 있어서, 중합체가 수용성 중합체 및 폴리(에틸렌 글리콜)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 모이어티를 포함하는 것인 방법.

[0941] 41. 실시양태 39에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 카르보닐기, 아미노옥시기, 하이드라지드기, 하이드라진기, 세미카르바지드기, 아지드기 또는 알킨기를 포함하는 것인 방법.

[0942] 42. 실시양태 39에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 카르보닐 모이어티를 포함하고, 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자는 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바지드 모이어티를 포함하는 것인 방법.

[0943] 43. 실시양태 39에 있어서, 아미노옥시, 하이드라진, 하이드라지드 또는 세미카르바지드 모이어티가 아마이드 연결을 통해 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자에 연결되는 것인 방법.

[0944] 44. 실시양태 39에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 알킨 모이어티를 포함하고 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자가 아지드 모이어티를 포함하는 것인 방법.

[0945] 45. 실시양태 39에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 아지드 모이어티를 포함하고, 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자가 알킨 모이어티를 포함하는 것인 방법.

[0946] 46. 실시양태 7에 있어서, 수용성 중합체가 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티인 IL-2 폴리펩타이드.

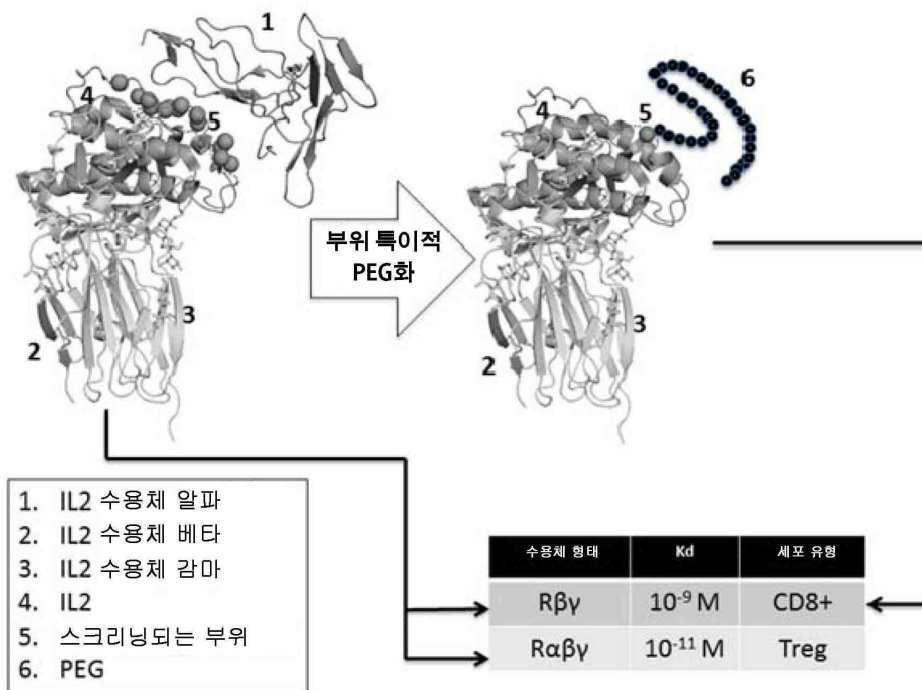
[0947] 47. 실시양태 46에 있어서, 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티가 분지형 또는 다중암형 중합체인 IL-2 폴리펩타이드.

- [0948] 48. 실시양태 10의 IL-2 및 약학적으로 허용되는 담체를 포함하는 조성물.
- [0949] 49. 실시양태 48에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산이 수용성 중합체에 연결된 것인 조성물.
- [0950] 50. 치료 유효량의 청구범위 제42항 또는 제36항의 조성물을 환자에게 투여하는 것을 포함하는, IL-2에 의해 조절되는 장애를 갖는 환자를 치료하는 방법.
- [0951] 51. 약학적으로 허용되는 담체와 함께 생물학적 활성 분자에 접합된 실시양태 10의 IL-2를 포함하는 조성물.
- [0952] 52. 링커 및 약학적으로 허용되는 담체와의 접합체를 추가로 포함하는 실시양태 10의 IL-2를 포함하는 조성물.
- [0953] 53. 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2를 제조하는 방법으로서, 셀렉터 코돈, 오르소고달 RNA 합성 효소 및 오르소고달 tRNA를 포함하는 IL-2 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드들을 포함하는 세포를, 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드의 발현을 허용하는 조건 하에 배양하는 단계; 및 상기 폴리펩타이드를 정제하는 단계를 포함하는 제조 방법.
- [0954] 54. IL-2 폴리펩타이드의 혈청 반감기 또는 순환 시간을 조절하는 방법으로서, 상기 방법이 IL-2 폴리펩타이드에서 임의의 하나 이상의 천연 아미노산을 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산으로 치환하는 단계를 포함하는 것인 방법.
- [0955] 55. 제조할 숙주 세포에서 IL-2 폴리펩타이드의 발현을 증가시키는 하나 이상의 아미노산 치환, 부가 또는 결실을 포함하는 IL-2 폴리펩타이드.
- [0956] 56. 적어도 하나의 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자를 포함하는 IL-2 폴리펩타이드로서, 상기 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자가 리보솜에 의해 폴리펩타이드에 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산의 작용기를 통해 폴리펩타이드에 부착되는 것인 IL-2 폴리펩타이드.
- [0957] 57. 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산에 부착된 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자를 포함하는 IL-2 폴리펩타이드로서, 상기 비천연적으로 코딩된 아미노산이 미리 선택된 부위에서 리보솜에 의해 폴리펩타이드에 도입된 것인 IL-2 폴리펩타이드.
- [0958] 58. 암으로 진단된 인간에서 종양 세포의 수를 감소시키는 방법으로서, 실시양태 56의 PEG-IL-2를 포함하는 약학적 조성물을 상기 감소를 필요로 하는 인간에게 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0959] 59. 실시양태 58에 있어서, 접합체가 약 0.1 μ /kg 내지 약 50 μ /kg의 용량으로 투여되는 것인 방법.
- [0960] 60. 실시양태 1-38, 46-47 및 55-57 중 어느 하나에 있어서, IL-2는 잔기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 및 133으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 적어도 하나의 천연 아미노산 치환을 추가로 포함하는 것인 IL-2.
- [0961] 61. 실시양태 39-45, 53-54, 및 58-59 중 어느 하나, 또는 청구범위 제48항 또는 제49항에 있어서, 방법 또는 조성물은 잔기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132 및 133으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 위치에 적어도 하나의 천연 아미노산 치환을 추가로 포함하는 것인 방법 또는 조성물.
- [0962] 62. 실시양태 60 또는 61에 있어서, 천연 아미노산 치환은 위치 38, 46 및/또는 65에 존재하는 것인 IL-2, 방법 또는 조성물.
- [0963] 63. 실시양태 60 또는 61에 있어서, 천연 아미노산 치환은 위치 38 및/또는 46에 존재하는 것인 IL-2, 방법 또는 조성물.

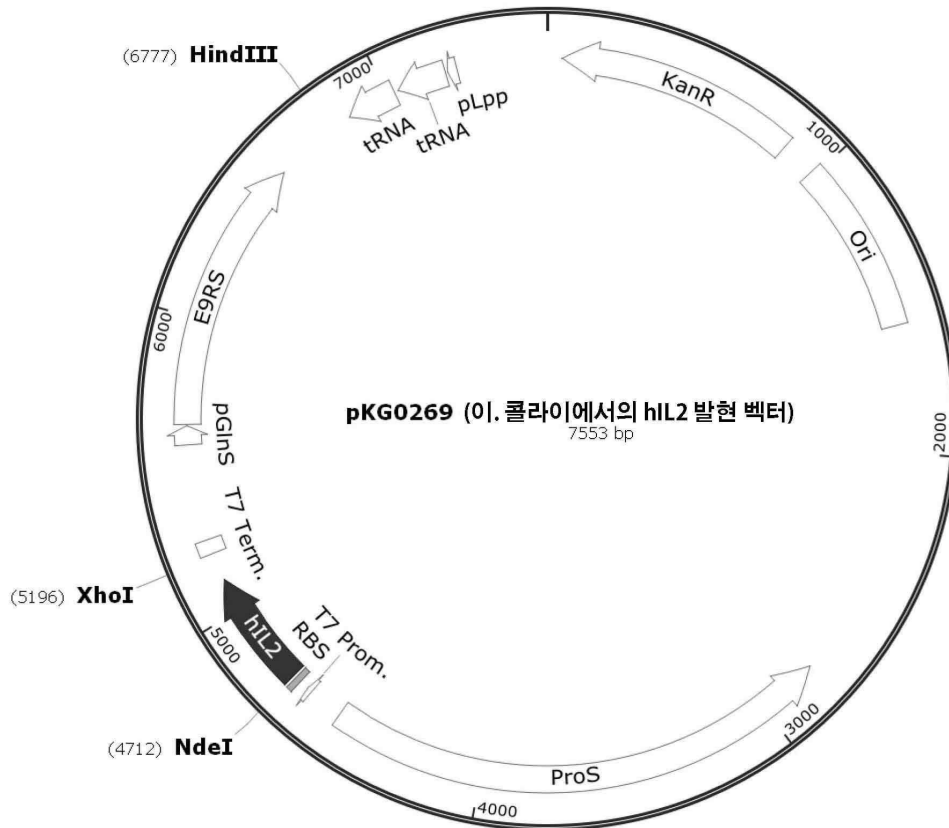
- [0964] 64. 실시양태 60 또는 61에 있어서, 천연 아미노산 치환은 위치 38 및/또는 65에 존재하는 것인 IL-2, 방법 또는 조성물.
- [0965] 65. 실시양태 62-64 중 어느 하나에 있어서, 위치 38에서의 천연 아미노산 치환은 알라닌인 IL-2, 방법 또는 조성물.
- [0966] 66. 실시양태 62-63에 있어서, 위치 46에서의 천연 아미노산 치환은 류신 또는 이소류신인 IL-2, 방법 또는 조성물.
- [0967] 67. 실시양태 62 또는 64에 있어서, 위치 65에서의 천연 아미노산 치환은 아르기닌인 IL-2, 방법 또는 조성물.
- [0968] 68. 하나 이상의 비천연적으로 코딩된 아미노산을 포함하는 글리코실화된 IL-2 폴리펩타이드.
- [0969] 69. 실시양태 68에 있어서, 비천연적으로 코딩된 아미노산은 파라-아세틸 페닐알라닌, *p*-니트로페닐알라닌, *p*-술포티로신, *p*-카르복시페닐알라닌, *o*-니트로페닐알라닌, *m*-니트로페닐알라닌, *p*-보로닐페닐알라닌, *o*-보로닐페닐알라닌, *m*-보로닐페닐알라닌, *p*-아미노페닐알라닌, *o*-아미노페닐알라닌, *m*-아미노페닐알라닌, *o*-아실페닐알라닌, *m*-아실페닐알라닌, *p*-OMe 페닐알라닌, *o*-OMe 페닐알라닌, *m*-OMe 페닐알라닌, *p*-술포페닐알라닌, *o*-술포페닐알라닌, *m*-술포페닐알라닌, 5-니트로 His, 3-니트로 Tyr, 2-니트로 Tyr, 니트로 치환된 Leu, 니트로 치환된 His, 니트로 치환된 De, 니트로 치환된 Trp, 2-니트로 Trp, 4-니트로 Trp, 5-니트로 Trp, 6-니트로 Trp, 7-니트로 Trp, 3-아미노티로신, 2-아미노티로신, 0-술포티로신, 2-술포옥시페닐알라닌, 3-술포옥시페닐알라닌, *o*-카르복시페닐알라닌, *m*-카르복시페닐알라닌, *p*-아세틸-L-페닐알라닌, *p*-프로파길-페닐알라닌, 0-메틸-L-티로신, L-3-(2-나프틸)알라닌, 3-메틸-페닐알라닌, 0-4-알릴-L-티로신, 4-프로필-L-티로신, 트리-0-아세틸-GlcNAc β -세린, L-도파, 불소화 페닐알라닌, 이소프로필-L-페닐알라닌, *p*-아지도-L-페닐알라닌, *p*-아실-L-페닐알라닌, *p*-벤조일-L-페닐알라닌, L-포스포세린, 포스포노세린, 포스포노티로신, *p*-요오도-페닐알라닌, *p*-브로모페닐알라닌, *p*-아미노-L-페닐알라닌, *p*-프로파길옥시-L-페닐알라닌, 4-아지도-L-페닐알라닌, 파라-아지도에톡시 페닐알라닌, 및 파라-아지도메틸-페닐알라닌인 글리코실화된 IL-2 폴리펩타이드.
- [0970] 70. 실시양태 68에 있어서, 하나 이상의 천연 아미노산을 추가로 포함하는 글리코실화된 IL-2 폴리펩타이드.
- [0971] 71. 실시양태 68에 있어서, 하나 이상의 링커, 중합체, 또는 생물학적 활성 분자를 추가로 포함하고, 상기 링커, 중합체 또는 생물학적 활성 분자는, 폴리펩타이드에 리보솜으로 도입된 비천연적으로 코딩된 아미노산 비천연의 작용기를 통해 폴리펩타이드에 부착되는 것이 글리코실화된 IL-2 폴리펩타이드.
- [0972] 72. 실시양태 71에 있어서, 중합체가 수용성 중합체인 글리코실화된 IL-2 폴리펩타이드.
- [0973] 73. 실시양태 72에 있어서, 수용성 중합체는 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티인 글리코실화된 IL-2 폴리펩타이드.
- [0974] 74. 실시양태 73에 있어서, 폴리(에틸렌 글리콜) 모이어티는 분지형 또는 다중암형 중합체인 글리코실화된 IL-2 폴리펩타이드.
- [0975] 75. 의약 제조에서의, 선행 청구항들 중 어느 한 항의 IL-2 폴리펩타이드의 용도.
- [0976] 76. a) 비천연적으로 코딩된 아미노산과 반응하는 모이어티를 포함하는 링커, 중합체, 또는 생물학적 활성 분자를 갖는 적어도 하나의 비천연적으로 코딩된 아미노산; 및 b) 적어도 하나의 천연 아미노산을 포함하는 변형된 IL-2 폴리펩타이드.

도면

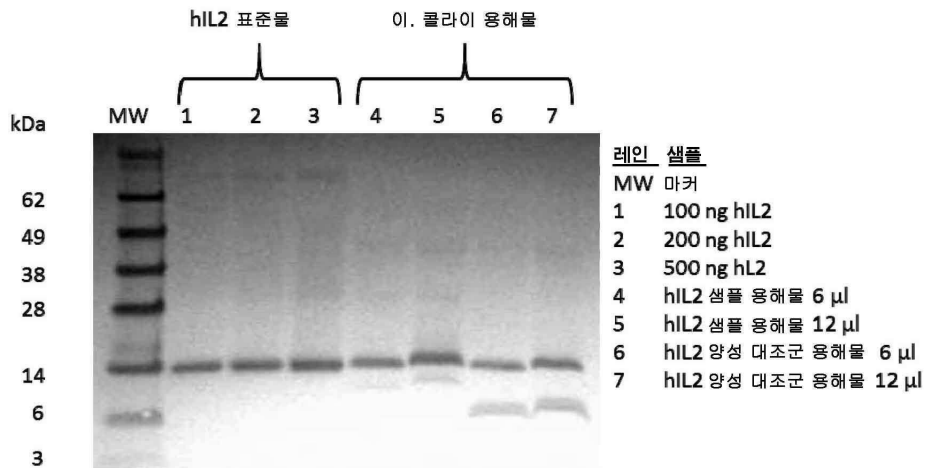
도면1



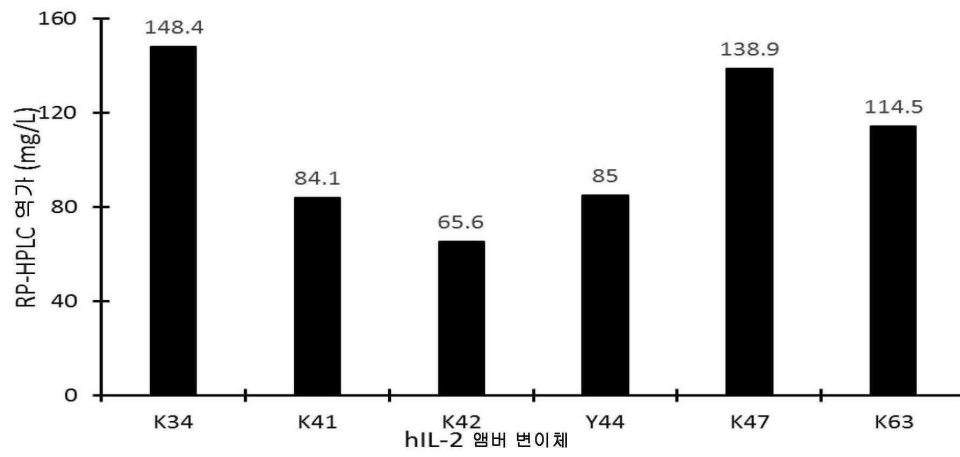
도면2



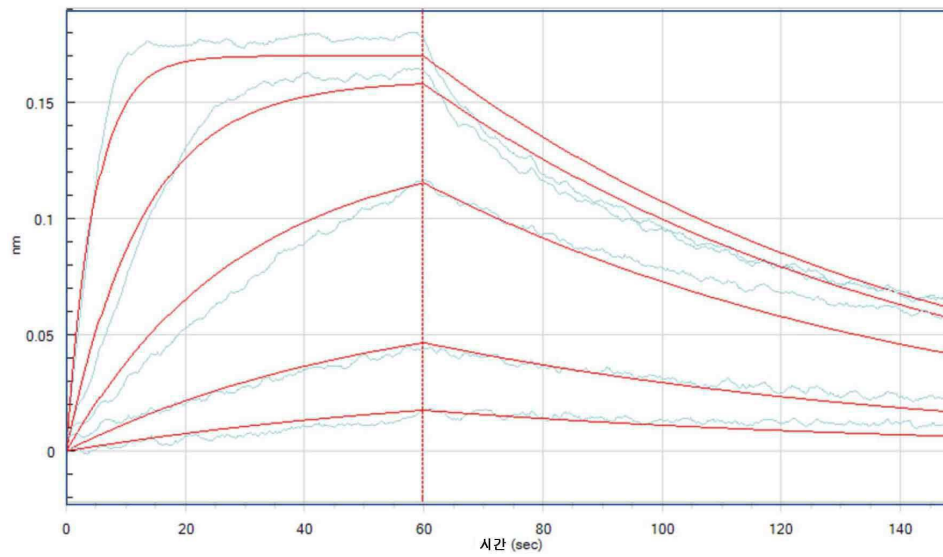
도면3a



도면3b



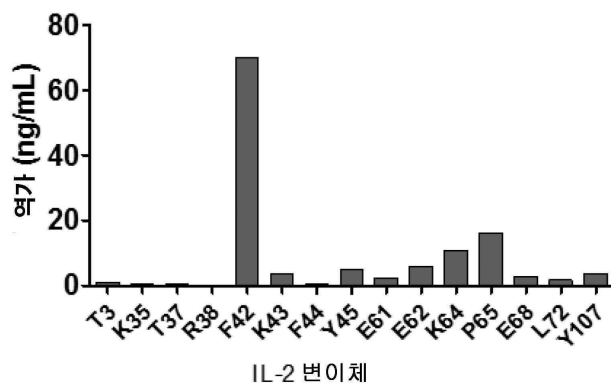
도면4a



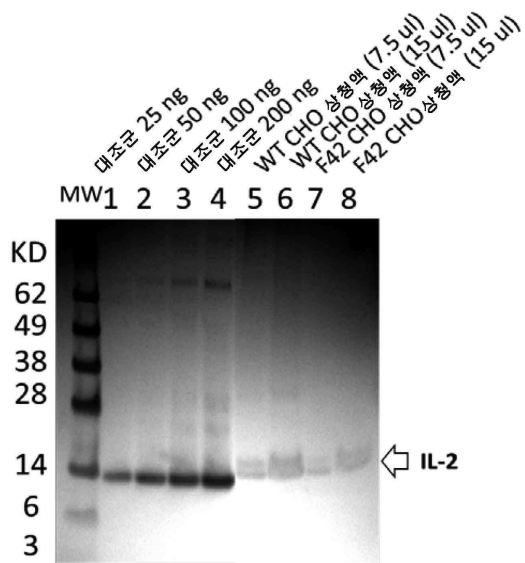
도면6

	(231)	231	240	250	260	270	280	290	300	316
UPF1-CHO-dDNA-클론-변형 (230)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_001_P1-UPF1-KO-3-41_UH-III-R_B06(202)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_002_P1-UPF1-KO-4-81_UH-III-R_B06(205)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_003_P1-UPF1-KO-5-C1_UH-III-R_D06(202)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_004_P1-UPF1-KO-6-D1_UH-III-R_E06(202)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_005_P1-UPF1-KO-10-E1_UH-III-R_F06(202)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_006_P1-UPF1-KO-14-F1_UH-III-R_G06(200)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_007_P1-UPF1-KO-17-G1_UH-III-R_H06(203)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_008_P1-UPF1-KO-18-H1_UH-III-R_A07(203)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_009_P1-UPF1-KO-38-A2_UH-III-R_B07(203)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_010_P1-UPF1-KO-52-B2_UH-III-R_C07(202)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_011_P1-UPF1-KO-72-C2_UH-III-R_D07(203)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_012_P1-UPF1-KO-93-D2_UH-III-R_E07(204)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_013_P1-UPF1-KO-105-E2_UH-III-R_F07(201)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_014_P1-UPF1-KO-126-F2_UH-III-R_G07(200)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_015_P1-UPF1-KO-127-G2_UH-III-R_H07(204)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_016_P1-UPF1-KO-129-H2_UH-III-R_A08(203)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_017_P1-UPF1-KO-137-A3_UH-III-R_B08(206)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_018_P1-UPF1-KO-139-B3_UH-III-R_C08(205)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
OD_019_P1-UPF1-KO-163-C3_UH-III-R_D08(203)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								
클론서스 (231)	CCAGCCATGACAGGAGACACCGGTCCTGGATCAGGGGCTGCCACT	-----GGAGCTGTCCCAATTGATGTCCTTCAG								

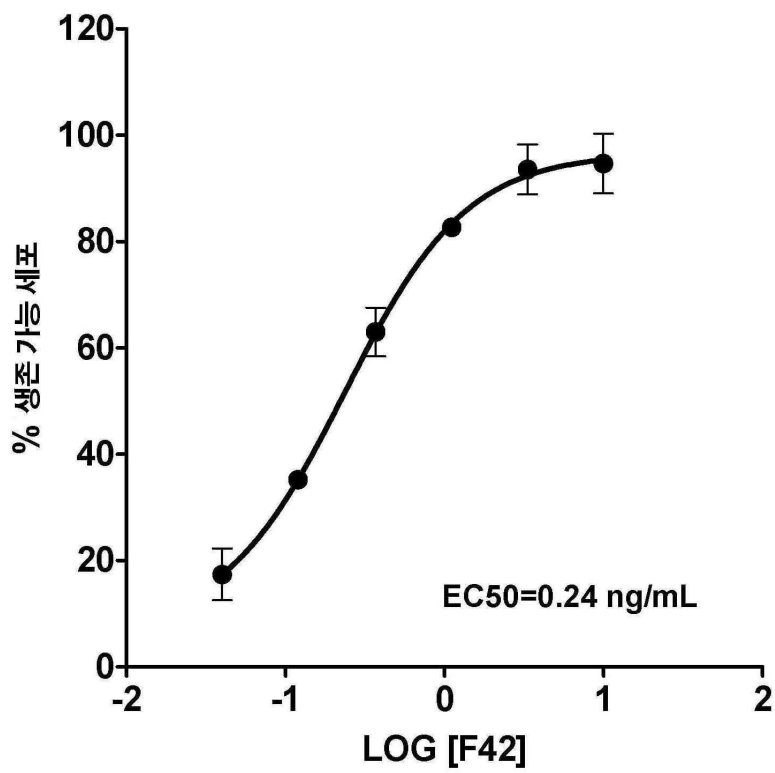
도면7a



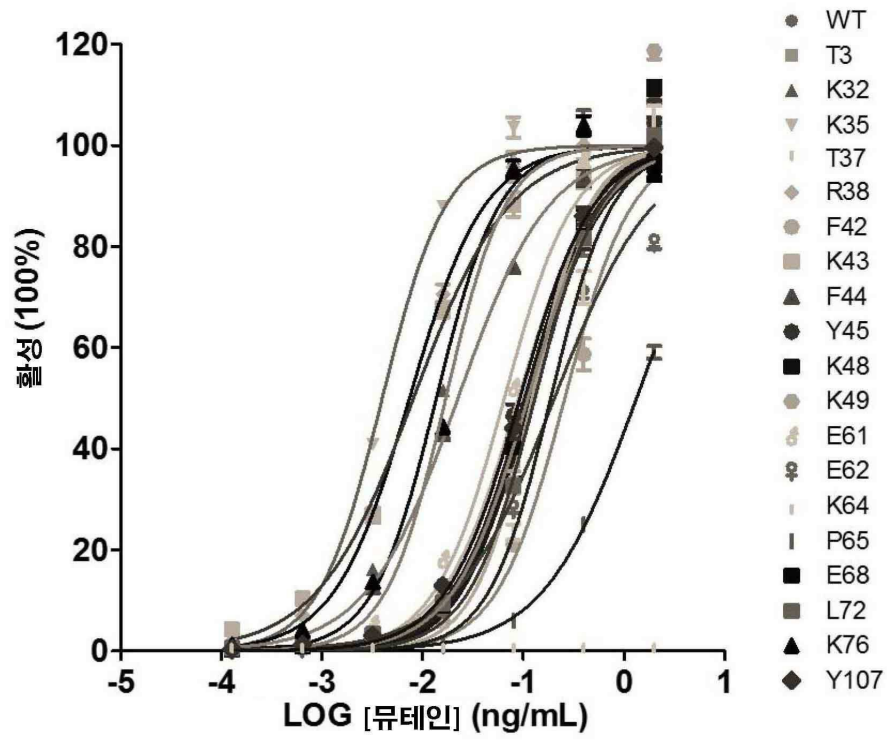
도면7b



도면8

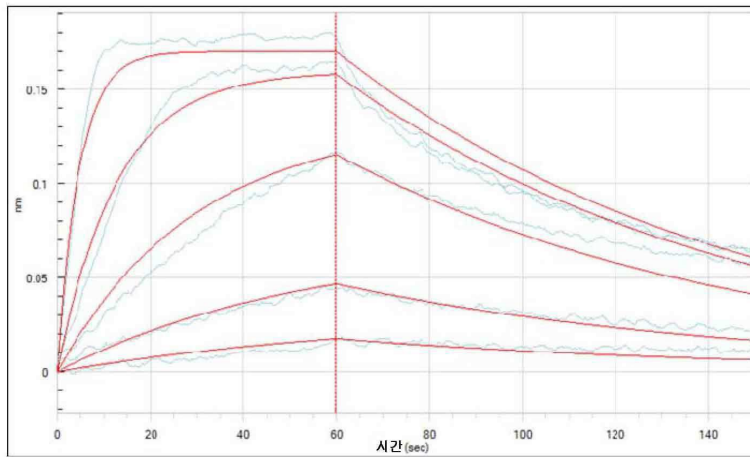


도면9

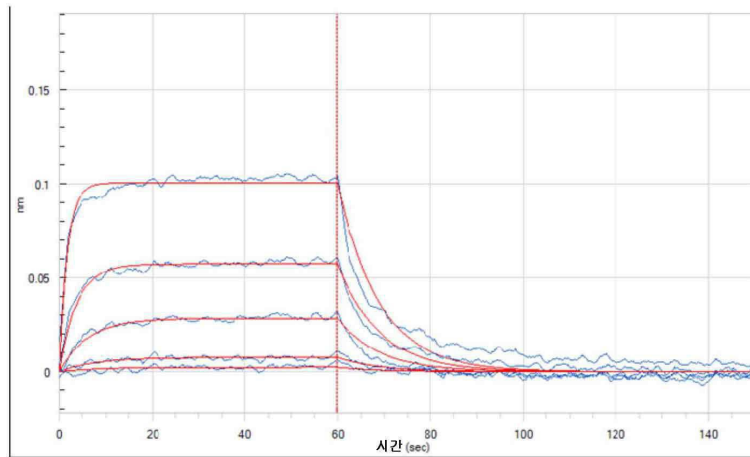


도면10a

WT

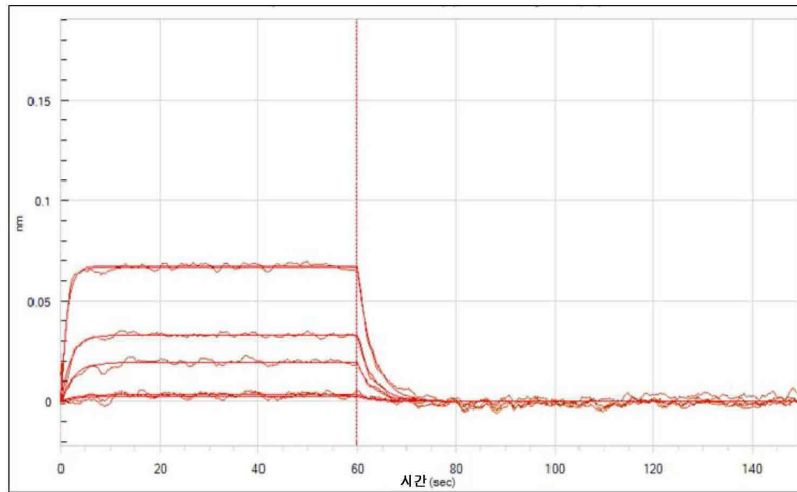


F42

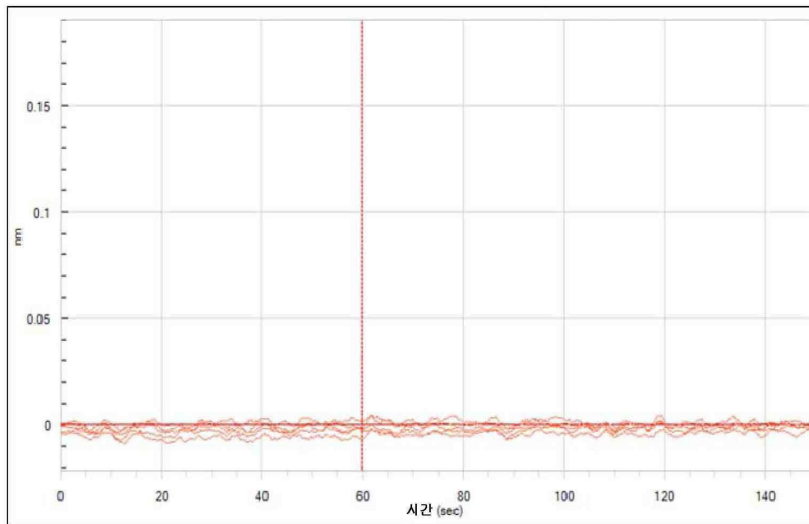


도면10b

K35

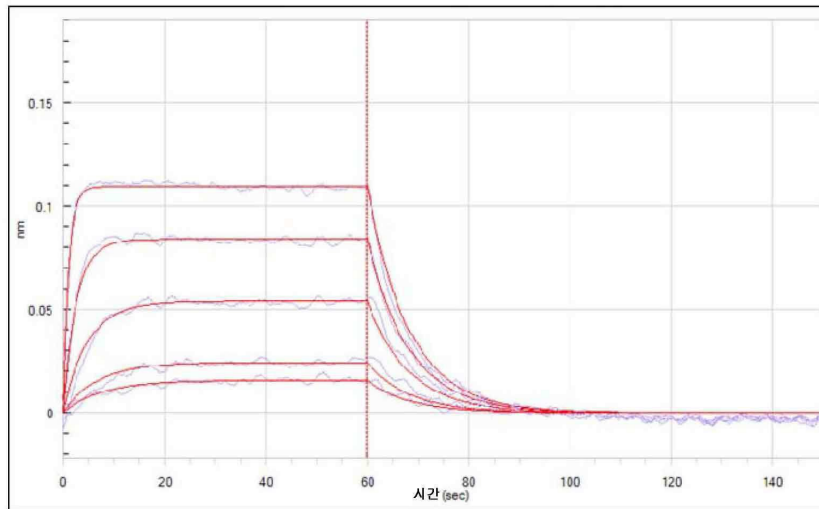


Y45

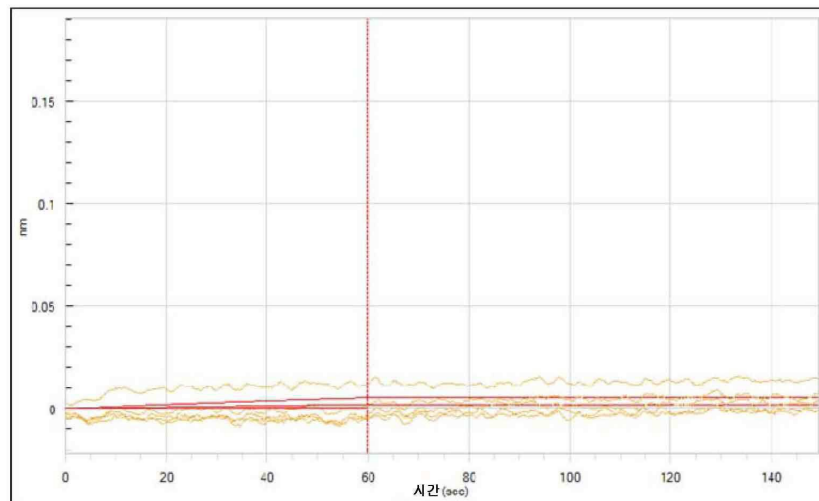


도면10c

T37



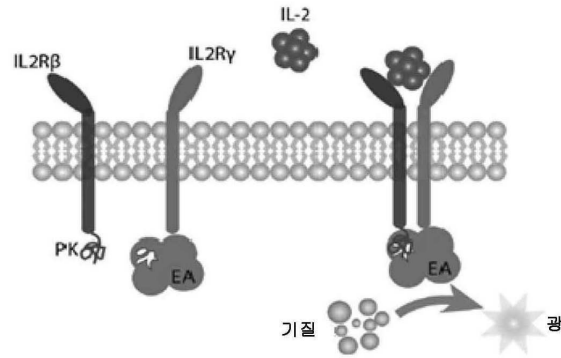
P65



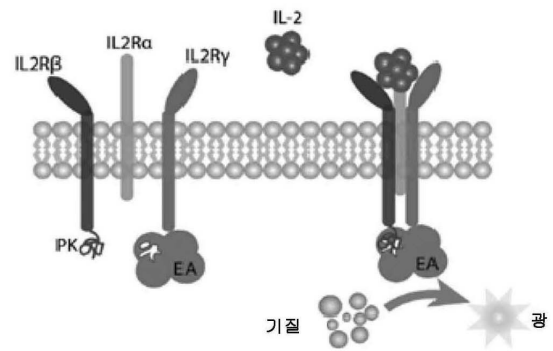
도면11

PathHunter 이량체화 분석

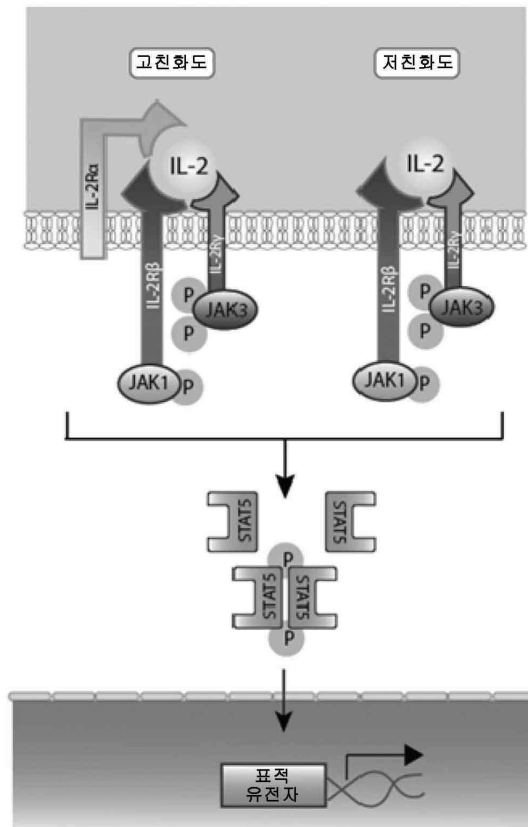
$\beta\gamma$ 활성 분석



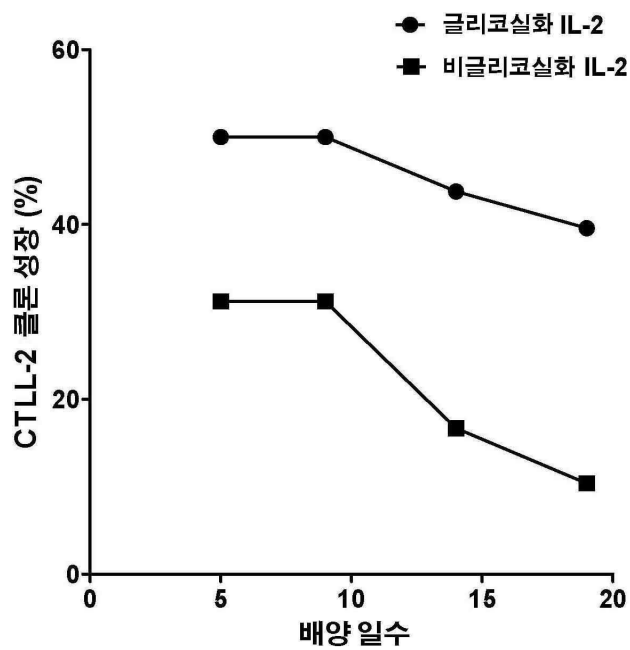
$\alpha\beta\gamma$ 활성 분석



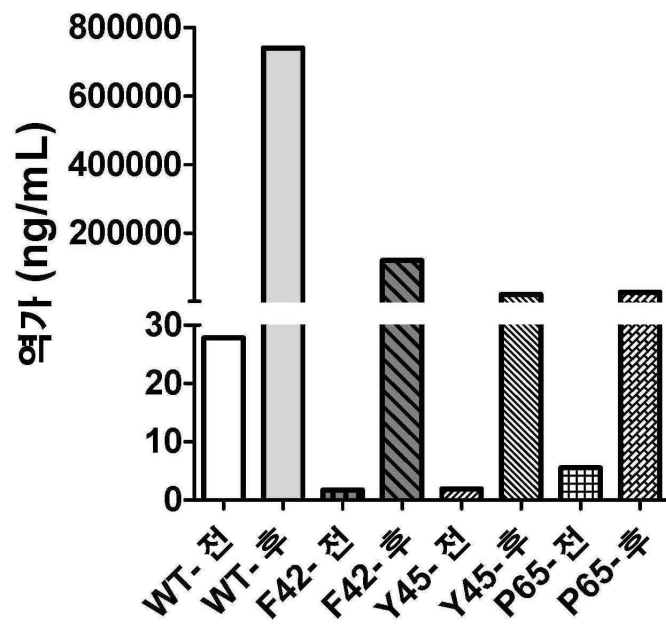
도면12



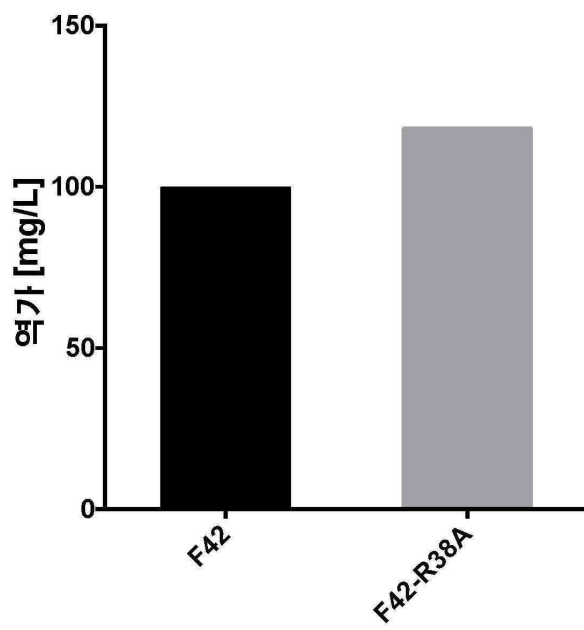
도면13



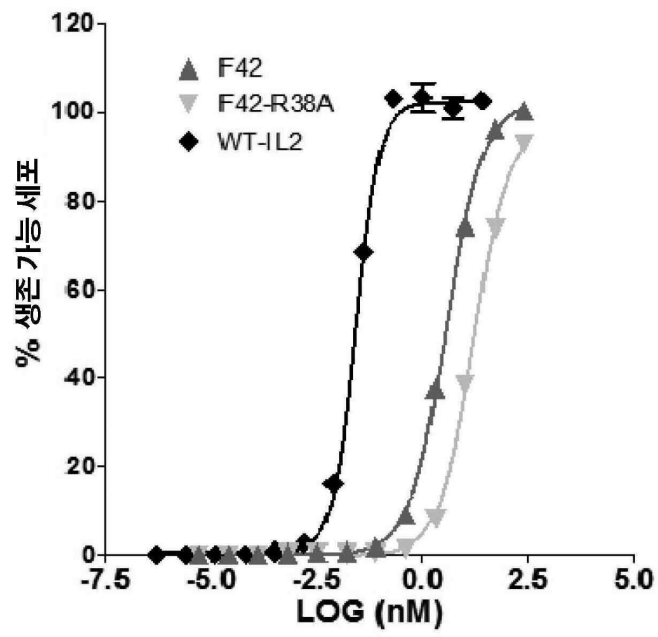
도면14



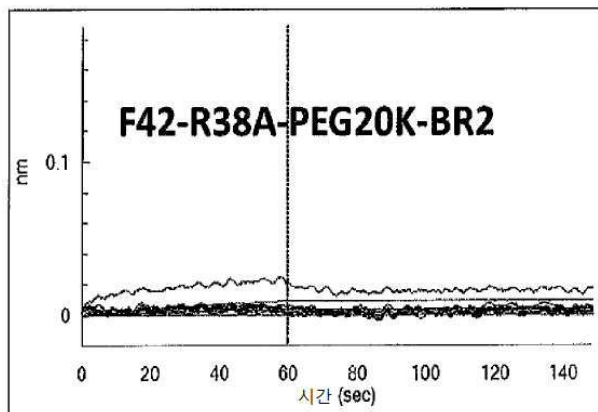
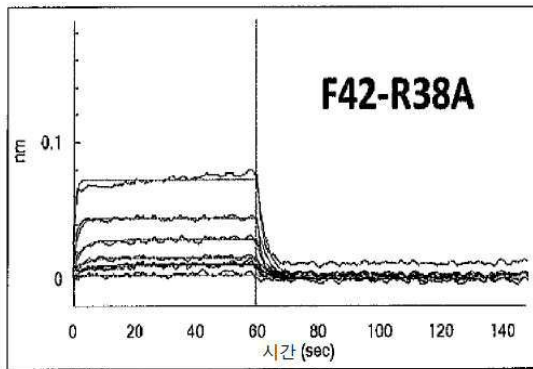
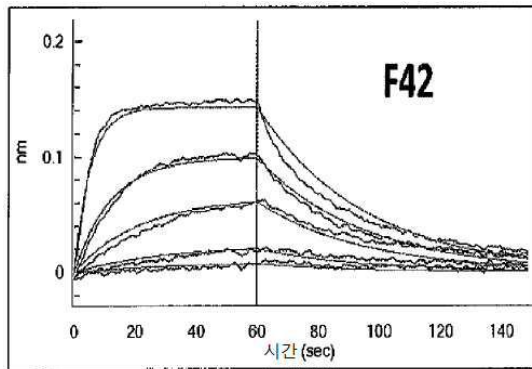
도면15a



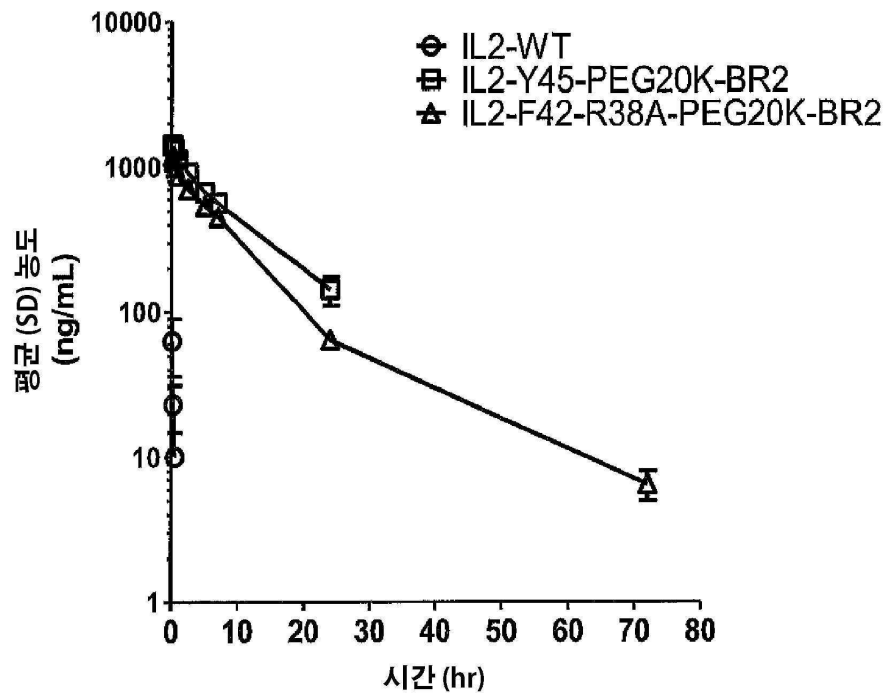
도면15b



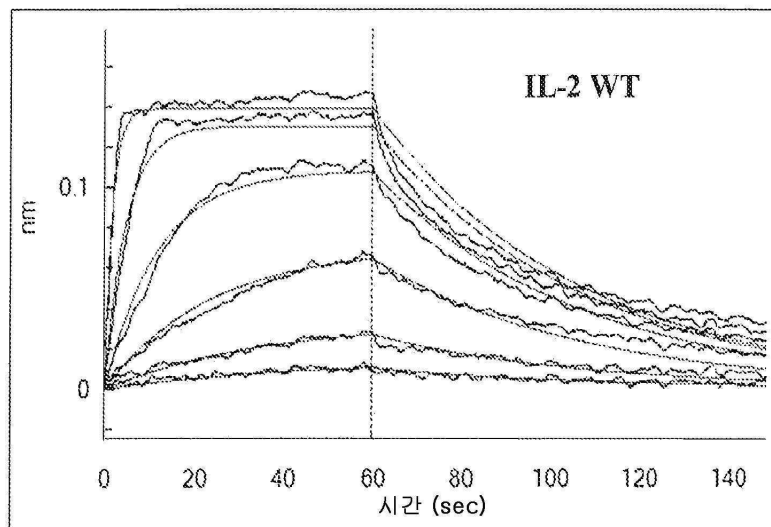
도면15c



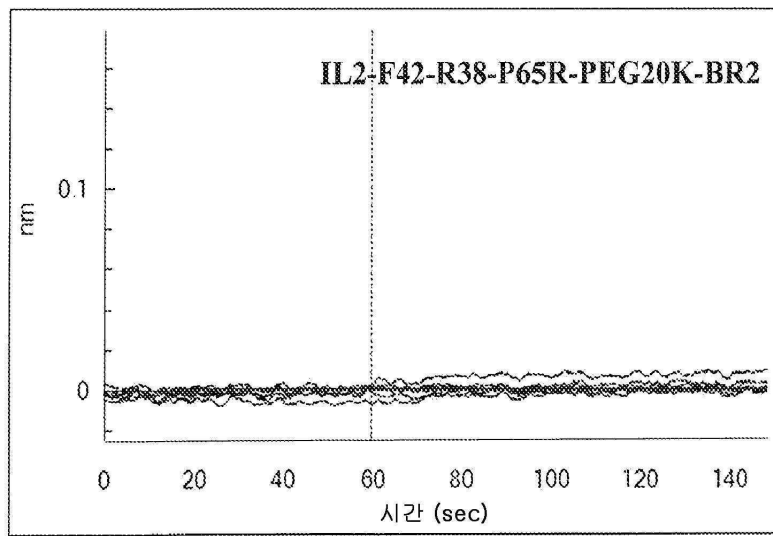
도면16



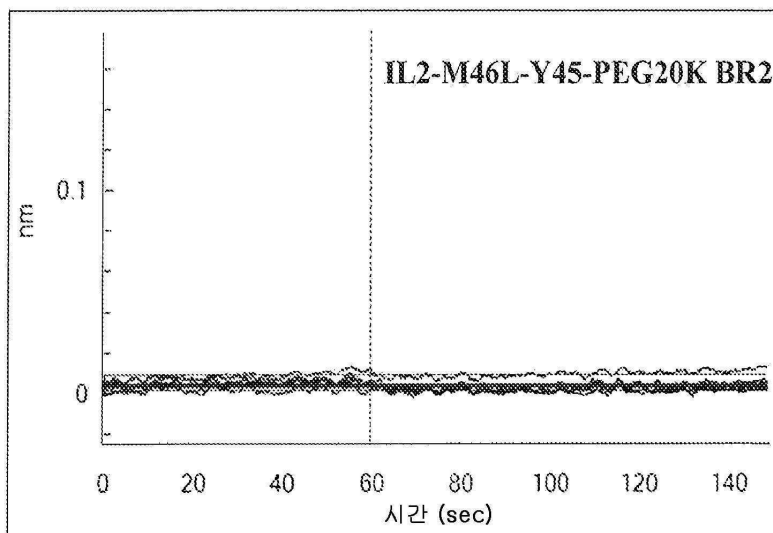
도면17a



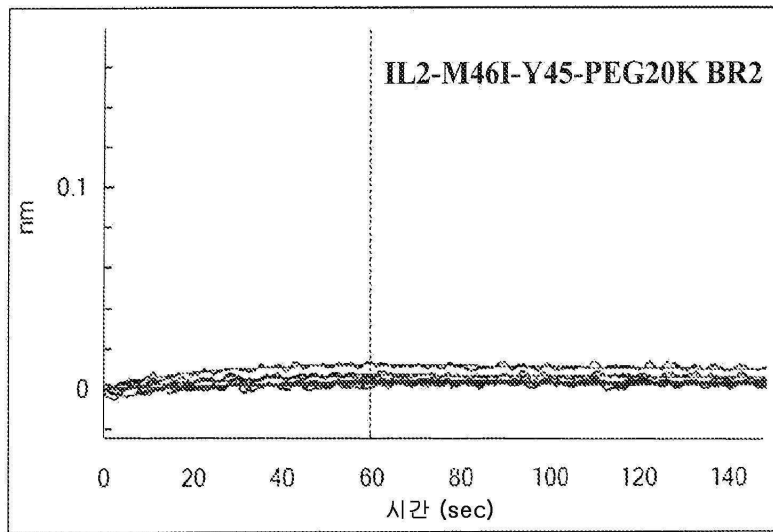
도면17b



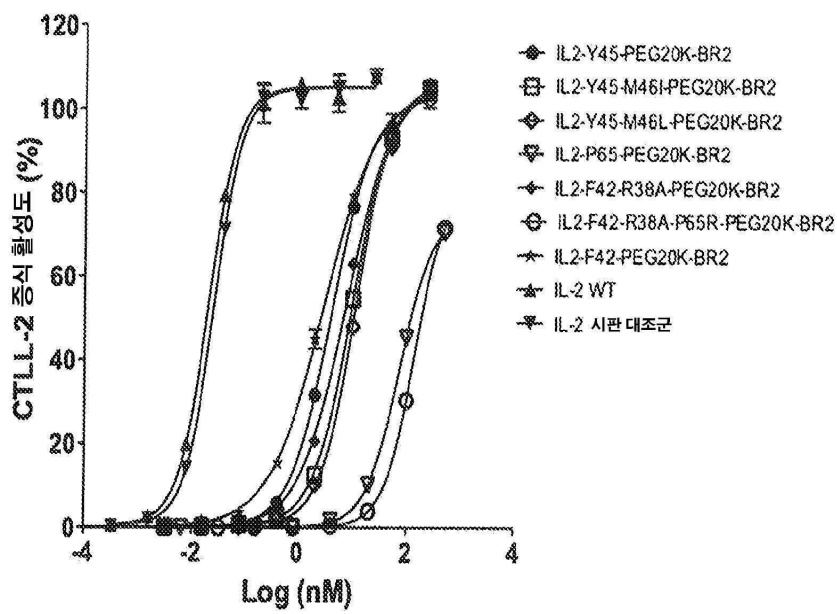
도면17c



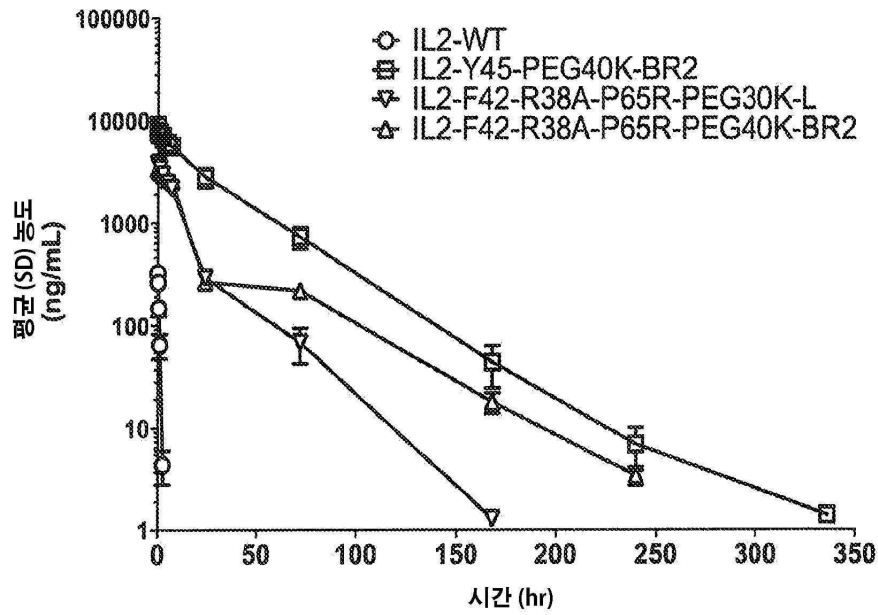
도면17d



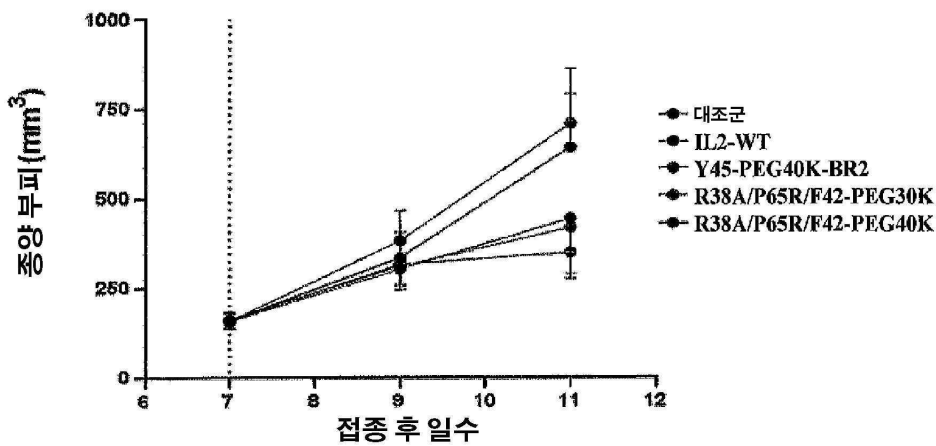
도면18



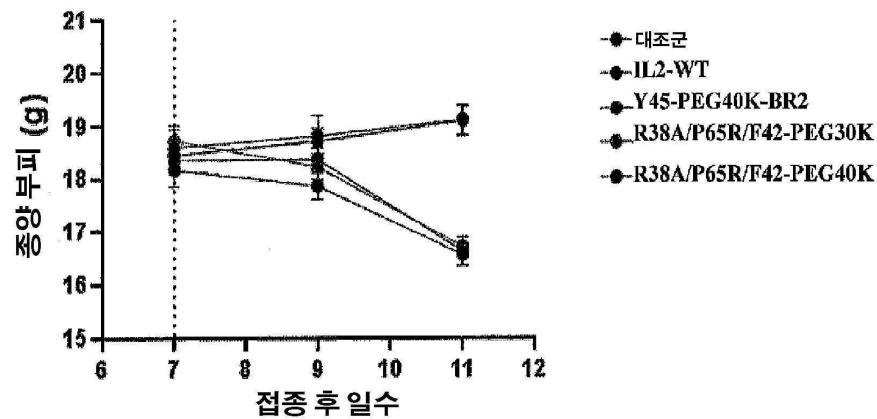
도면19



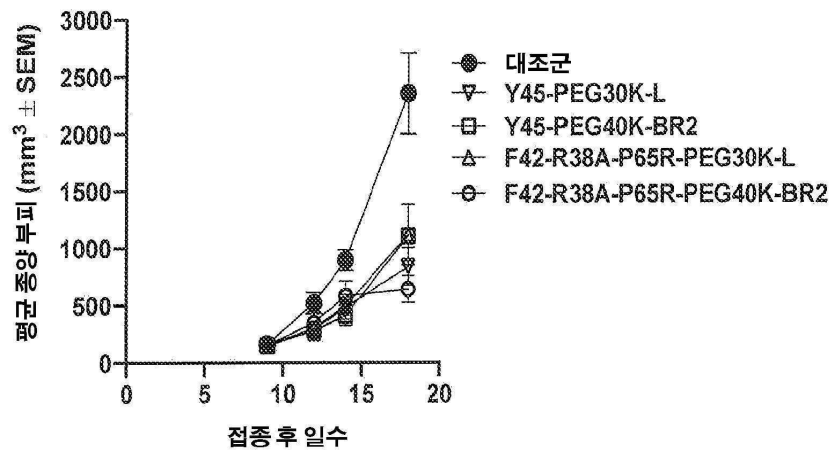
도면20a



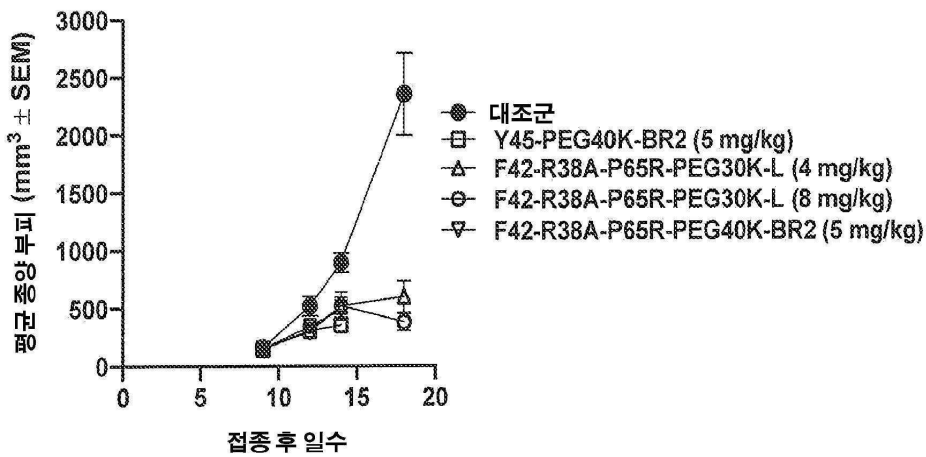
도면20b



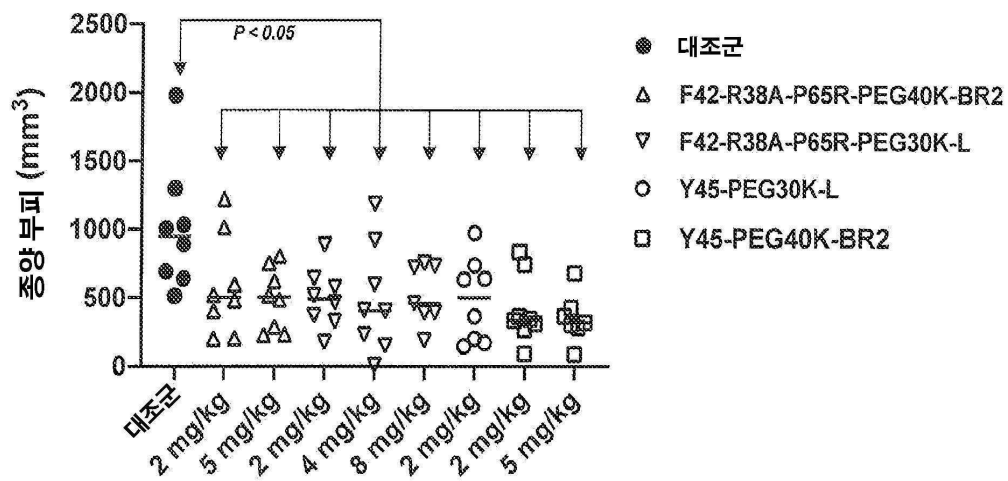
도면21a



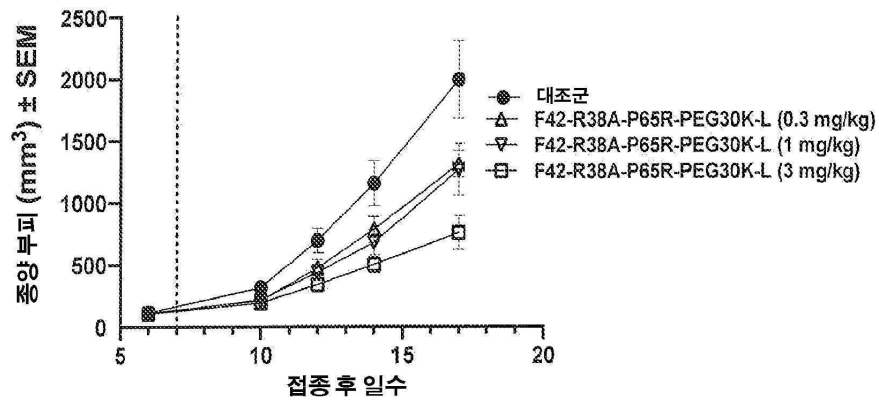
도면21b



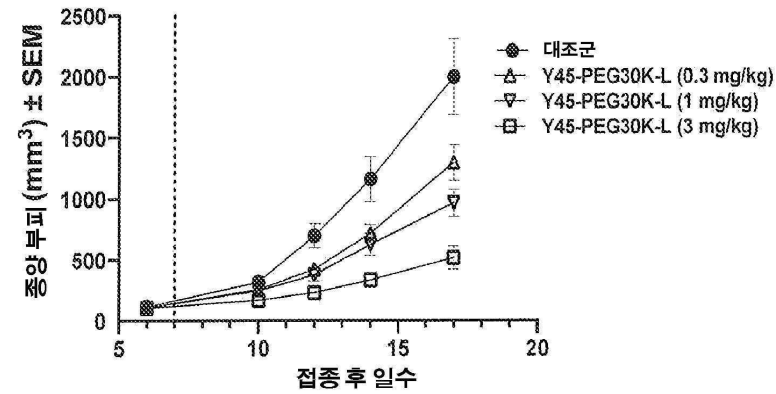
도면22



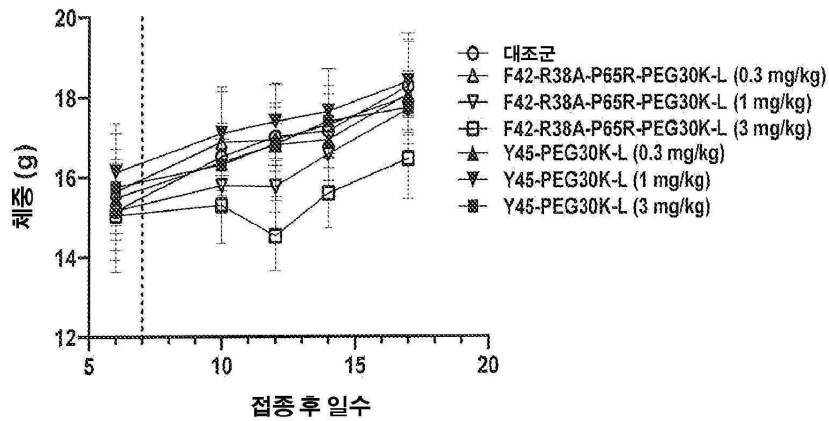
도면23a



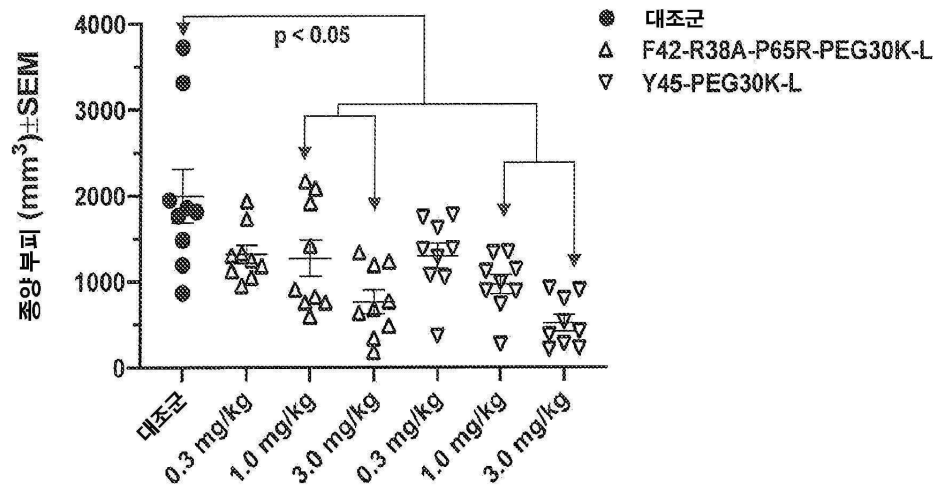
도면23b



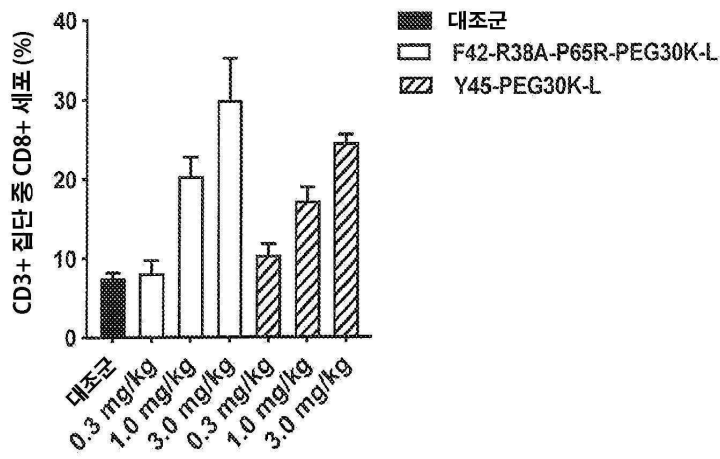
도면23c



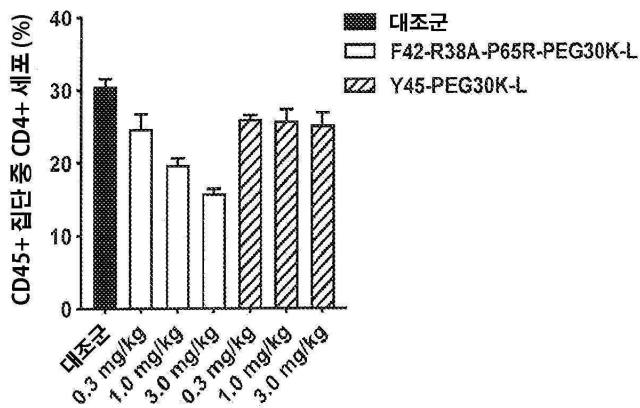
도면24



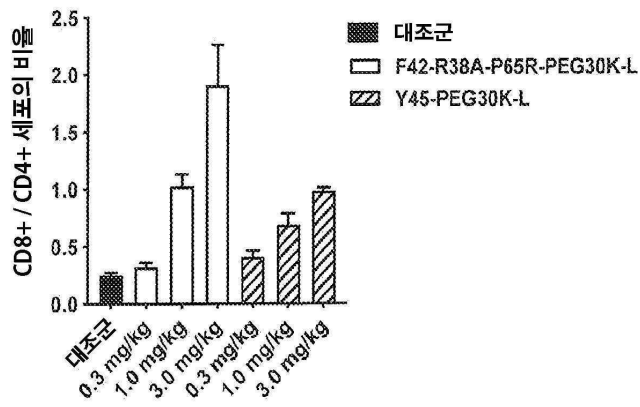
도면25a



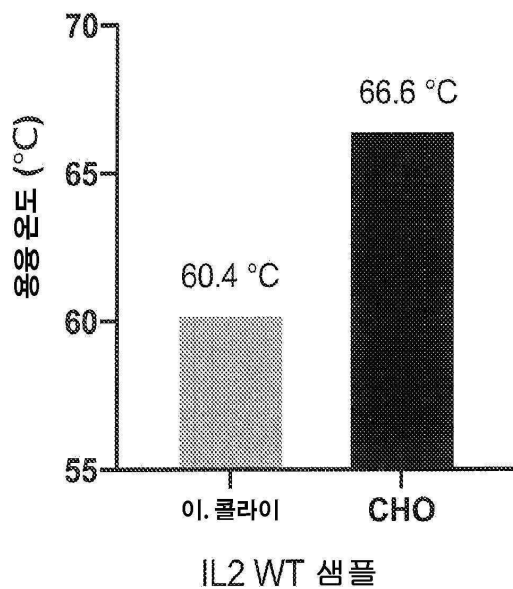
도면25b



도면25c



도면26



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Ambrx, Inc.

<120> Uses of Interleukin-2 Polypeptide Conjugates

<130> AMBX-0232.00PCT

<140> PCT/US2021/022011

<141> 2021-03-10

<150> 62/987,872

<151> 2020-03-11

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 153

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Eukaryote

<400> 1

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> 2

<211> 133

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Eukaryote

<400> 2

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

50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
 65 70 75 80
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
 85 90 95
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
 100 105 110
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

115 120 125
 Ile Ser Thr Leu Thr
 130

<210> 3

<211> 133

<212> PRT

<213> E. Coli

<400> 3

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

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
 50 55 60
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

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

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100 105 110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser
115 120 125
Ile Ile Ser Thr Leu Thr
130
<210> 6
<211> 402
<212> DNA
<213> Human
<400> 6
atggcaccga ccagcagtag caccaagaaa actcagctgc agctggagca tctgctgctg 60
gatttacaga tgattctgaa tggcattaat aattacaaaa atccgaaact gacccgcatg 120

ctgaccttca agttctacat gccgaagaag gccaccgaac tgaagcatct gcagtgttta 180
gaagaggaac tgaagccgct ggaagagggtg ctgaatttag cccagagcaa aaacttccat 240
ctgcgcccgc gcgatttaat tagcaatatt aacgtgattg tgctggaact gaaaggcagc 300
gagaccacct ttatgtgcga gtacgcagat gagaccgcca ccatcgtgga atttttaaac 360
cgctggatca cttcagcca gagtatcatt agcactttaa cc 402
<210> 7
<211> 132
<212> PRT
<213> Human
<400> 7
Met Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

20 25 30
 Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
 35 40 45
 Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg

 65 70 75 80
 Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
 85 90 95
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
 100 105 110
 Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
 115 120 125
 Ser Thr Leu Thr

130

<210> 8

<211> 396

<212> DNA

<213> Human

<400> 8

atgaccagca gtagcaccaa gaaaactcag ctgcagctgg agcatctgct gctggattta 60
 cagatgattc tgaatggcat taataattac aaaaatccga aactgaccgc catgctgacc 120
 ttcaagtctt acatgccgaa gaaggccacc gaactgaagc atctgcagtg tttagaagag 180
 gaactgaagc cgctggaaga ggtgctgaat ttagcccaga gcaaaaactt ccatctgcgc 240
 ccgcgcgatt taattagcaa tattaacgtg attgtgctgg aactgaaagg cagcgagacc 300
 acctttatgt gcgagtacgc agatgagacc gccaccatcg tggaattttt aaaccgctgg 360

atcaccttca gccagagtat cattagcact ttaacc 396

<210> 9

<211> 133

<212> PRT

<213> Human

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (42)..(42)

<223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid

<400> 9

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 Xaa 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> 10

<211> 133

<212> PRT

<213> Human

<220><221> misc_feature

<222> (44)..(44)

<223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid

<400> 10

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 Xaa 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> 11

<211> 133

<212> PRT

<213> Human

<220><221> misc_feature

<222> (45)..(45)

<223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid

<400> 11

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 Xaa 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>	12																	
<211>	133																	
<212>	PRT																	
<213>	Human																	
<220><221>	misc_feature																	
<222>	(65)..(65)																	
<223>	Xaa = *U = Unnatural Amino Acid																	
<400>	12																	
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	
Xaa	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> 13
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> Human
 <220><221> misc_feature
 <222> (72)..(72)
 <223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid
 <400> 13
 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 Xaa 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>
 > 14
 <211> 133
 <212> PRT

<213> Human

<220><221> misc_feature

<222> (61)..(61)

<223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid

<400> 14

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 Xaa 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> 15

<211> 133

<212> PRT

<213> Human

<220><221> misc_feature

<222> (62)..(62)

<223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid

<220><221> misc_feature

<222> (68)..(68)

<223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid

<400> 15

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 Xaa Leu Lys
50 55 60

Pro Leu Glu Xaa 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> 16

<211> 133

<212> PRT

<213> Human

<220><221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid

<400> 16

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 Xaa 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> 17

<211> 133

<212> PRT

<213> Human

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid

<400> 17

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 Xaa 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> 18

<211> 133

<212> PRT

<213> Human

<220><221> misc_feature

<222> (43)..(43)

<223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid

<400> 18

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 Xaa 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

> 19

<211> 133

<212> PRT

<213> Human

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid

<400> 19

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 Xaa 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> 20

<211> 133

<212> PRT

<213> Human

<220><221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid

<400> 20

Ala Pro Xaa 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> 21

<211> 133

<212> PRT

<213> Human

<220><221> misc_feature

<222> (64)..(64)

<223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid

<400> 21

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 Xaa
 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> 22

<211> 133

<212> PRT

<213> Human

<220><221> misc_feature

<222> (68)..(68)

<223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid

<400> 22

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 Xaa 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> 23

<211> 133

<212> PRT

<213> Human

<220><221> misc_feature

<222> (107)..(107)

<223> Xaa = *U = Unnatural Amino Acid

<400> 23

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 Xaa 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		