

명세서

발명의 명칭: 암의 예방 또는 치료를 위한 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 결합체 및 면역관문 억제제의 병용 요법 기술분야

- [1] 본 발명은 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 결합체; 및 면역관문 억제제의 암의 예방 또는 치료를 위한 병용 요법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 인터루킨 2 (Interleukin 2)는 총 133개의 아미노산 잔기로 구성된 분자량 약 15 kDa의 중요한 면역 자극제로서, T 세포와 B 세포를 포함하는 면역 체계의 다양한 세포를 활성화시킨다. 인터루킨 2의 면역 자극제로서의 높은 효능은 암과 에이즈를 포함한 다양한 면역관련 병증을 치료하기 위해 사용할 수 있다 (대한민국 공개특허 제10-2017-0070091호). 현재 인터루킨 2(상표명 Proleukin)는 전이성 신세포암 및 전이성 흑색종의 치료용으로 FDA 승인을 받은 의약이다. 그러나 높은 복용량의 인터루킨 2 요법과 연관된 심각한 독성 때문에 적용 가능한 환자가 제한되며, 실제로 적합한 환자의 소수에 대해서만 이 치료 요법을 수행하고 있다. 인터루킨 2에 연관된 독성은 심한 열, 메스꺼움, 구토, 혈관 누출(vascular leak), 심한 저혈압, 폐 부종, 및 간 손상을 일으키는 혈관 누출 증후군(Vascular leak syndrome)을 포함한다.

[3]

- [4] 인터루킨 2 수용체에는 3가지 서브유닛 수용체가 있다. 그 서브유닛은 알파 체인(IL-2R α , CD25), 베타 체인(IL-2R β 또는 CD122) 및 감마 체인(IL-2R γ 또는 CD132)으로 이루어져 있고, 인터루킨 2가 수용체 서브유닛들의 다양한 조합에 결합함으로써 여러가지 기능을 발휘 할 수 있다. 단일의 인터루킨 2 알파 수용체는 낮은 친화성 인터루킨 2 수용체로 불리며, 신호전달에는 관여하지 않는다. 인터루킨 2 베타 및 감마 수용체의 복합체는 중간 친화성으로 인터루킨 2에 결합한다. 인터루킨 2 알파, 베타 및 감마 수용체의 복합체는 높은 친화성으로 인터루킨 2에 결합한다. 인터루킨 2 베타 및 감마 수용체의 복합체는 다중 신호전달 경로의 키나아제 활성화를 통한 효과적인 신호 변환에 필요하다. 특히 인터루킨 2 베타 및 감마 결합 수용체는 CD8⁺ 세포 및 자연 살해(NK) 세포에서 두드러진다. 또한 높은 친화성의 인터루킨 2 알파, 베타 및 감마 수용체의 복합체는 보통 CD4⁺ T 조절 세포(Treg)뿐 만 아니라 최근 활성화된 T 세포에서 발견된다. 인터루킨 2 베타 수용체는 CD8⁺ T 세포 혹은 자연 살해 세포(NK cell)에 분포하여 체내 면역 반응에 관여하므로, 면역 활성화를 위해 베타 수용체에 대한 활성을 높임으로써 치료제를 개발하려는 연구가 이루어지고 있다.

[5]

- [6] 한편, 일반적으로 면역세포들은 면역관문(immune checkpoint)이라고 불리는 단백질들을 세포막에 갖고 있어서 불필요한 자가면역반응을 억제하는 한편 암세포에서 일어나는 돌연변이 등의 변화로 인해 발현되는 종양특이항원을 감지함으로써 암세포를 제거할 수 있다. 그러나, 암세포는 상기와 같은 면역작용을 회피하기 위해 상기 면역관문의 기능을 변화시켜 T 세포의 기능을 억제하고 면역반응이 적절히 일어나지 못하도록 한다.
- [7]
- [8] 면역관문 억제제(immune checkpoint inhibitor)는 환자의 자가면역체계를 활성화해 체내 면역세포가 암세포 성장을 억제하도록 유도하는 치료제로서, 기존의 면역치료제와는 달리 암세포와 T 세포의 결합 부위에 결합하여 면역회피 신호를 차단함으로써 T 세포가 면역회피에 영향을 받지 않고 암세포를 파괴할 수 있도록 한다. 이에, 면역관문 억제제를 암 환자를 대상으로 한 면역 요법에 이용하여 암을 치료하려는 연구가 계속되고 있다.
- [9]
- [10] 이와 같이 인체의 면역 체계를 활성화해 체내의 면역 세포가 암세포에 작용하여 항암 효과를 얻도록 하는 치료 방법이 활발히 연구되고 있으나, 이러한 면역 체계를 자극하는 약물을 항암 치료에 이용할 경우, 면역세포 과활성으로 인한 부작용이 문제되기 때문에, 안전하면서도 효과적인 항암 치료제 및 치료 요법을 발굴하는 것이 필요하다.

[11]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [12] 면역 체계를 활성화하여 항암 효과를 나타낼 수 있으면서도 안전한 치료제 및 이를 이용한 치료 요법의 개발이 요구된다.

[13]

과제 해결 수단

- [14] 본 발명의 하나의 목적은 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 면역관문 억제제와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 다른 하나의 목적은 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 및 면역관문 억제제를 병용하는 암의 예방 또는 치료를 위한 요법을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 및 면역관문 억제제를 포함하는 조합물을 제공하는 것이다.
- [17] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조합물을 포함하는, 암의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

- [18] 본 발명의 또 하나의 목적은 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 및 면역관문 억제제를 포함하는, 암의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약학적 키트를 제공하는 것이다.
- [19] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 조합물, 약학적 조성물, 또는 약학적 키트를 이를 필요로 하는 개체에 투여 및/또는 사용하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [20] 본 발명의 또 하나의 목적은 약학적 유효량의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 함유하는 조성물과, 약학적 유효량의 면역관문 억제제를 함유하는 조성물을 필요로 하는 개체에 병용 투여 및/또는 병용 사용하는 단계를 포함하는, 암의 예방, 개선 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [21] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조합물, 약학적 조성물, 또는 약학적 키트의 암의 예방, 개선 또는 치료 용도; 및/또는 암의 예방, 개선 또는 치료를 위한 약제의 제조를 위한 용도를 제공하는 것이다.

[22]

발명의 효과

- [23] 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그 또는 이를 포함하는 지속형 결합체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 면역관문 억제제와 병용 투여되어 종양 성장 억제 효과를 나타내면서도 부작용을 낮추어 우수한 항암 치료제로 이용될 수 있다.

[24]

도면의 간단한 설명

- [25] 도 1은 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체(아날로그 21, 41 및 52번)의 SDS-PAGE 결과이다.
- [26] 도 2a 내지 2c는 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체(아날로그 21, 41 및 52번)의 순도 분석 결과이다.
- [27] 도 3은 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체 및 면역관문 억제제(항-PD-1 항체)의 악성 흑색종 동물 모델에서 병용 요법에 따른 항종양 효력을 평가한 결과로, 알테스루킨 또는 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체를 단독 투여하거나, 알테스루킨과 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체를 면역관문 억제제와 각각 병용 투여한 마우스 모델에서의 종양 크기(도 3의 A), 및 마우스 모델의 생존률(도 3의 B)을 확인한 결과이다. 도 3에서 지속형 결합체의 투여량은 해당 결합체 전체에서 인터루킨 2 아날로그 부위가 차지하는 무게만을 기준으로 나타낸 값이다.
- [28] 도 4는 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체 및 면역관문 억제제(항-PD-1 항체)의 폐암 동물 모델에서 병용 요법에 따른 항종양 효력을 평가한 결과로, 알테스루킨 또는 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체를 단독 투여하거나, 알테스루킨과 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체를 면역관문 억제제와 각각 병용 투여한 마우스 모델에서의 종양 크기를 확인한 결과이다. 도 4에서 지속형 결합체의 투여량

은 해당 결합체 전체에서 인터루킨 2 아날로그 부위가 차지하는 무게만을 기준으로 나타낸 값이다.

[29] 도 5는 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체 및 면역관문 억제제(항-PD-1 항체)의 폐암 동물 모델에서 병용 요법에 따른 항종양 효력을 Bliss 독립모형을 이용하여 분석한 결과이다. 도 5에서 지속형 결합체의 투여량은 해당 결합체 전체에서 인터루킨 2 아날로그 부위가 차지하는 무게만을 기준으로 나타낸 값이다.

[30] 도 6은 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체 및 면역관문 억제제(항-PD-1 항체)의 체장암 마우스 모델에서 병용 요법에 따른 항암 효능 및 기억 반응에 의한 재발 예방 효능을 확인한 결과이다. 도 6에서 지속형 결합체의 투여량은 해당 결합체 전체에서 인터루킨 2 아날로그 부위가 차지하는 무게만을 기준으로 나타낸 값이다.

[31]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[32] 본 발명의 하나의 양태는 신규한 인터루킨 2 아날로그(interleukin 2 analog, 또는 IL-2 analog) 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 조성물로서, 면역관문 억제제와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물이다. 상기 인터루킨 2 (interleukin 2, IL-2) 아날로그는 천연형 인터루킨 2 또는 인터루킨 2 아날로그인 알데스루킨(aldesleukin)에 비해 인터루킨 2 베타 수용체 결합력이 증대된 인터루킨 2 아날로그로서, 천연형 인터루킨 2에서 하나 이상의 아미노산이 변이된 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[33] 하나의 구체예로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 3 내지 106으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[34] 다른 하나의 구체예로서, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 지속형 결합체인 것을 특징으로 한다:

[35] [화학식 1]

[36] X - L - F

[37] 이 때 X는 서열번호 3 내지 106의 아미노산 서열에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 인터루킨 2 아날로그이고;

[38] L은 폴리에틸렌글리콜 링커이며;

[39] F는 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;

[40] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타내며,

[41] 상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태의 Fc 영역 중 한 폴리펩타이드 사슬에만 L의 일 말단이 공유결합으로 연결되어 있고, 이 L의 반대쪽 말단에 X가 공유결합으로 연결됨.

[42] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 지속형 결합체는 천연형 인터루킨 2 또는 알데스루킨에 비해 인터루킨 2 알파 수용체 결합력이 변화되고,

인터루킨 2 베타 수용체 결합력이 증대된 인터루킨 2 아날로그를 결합체의 일부로서 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [43] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 인터루킨 2 베타 수용체에 대한 결합력이 알테스루킨에 비해 증가된 것을 특징으로 한다.
- [44] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 10, 13 내지 15, 17, 20 내지 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 56, 58 내지 60, 62, 71, 72, 74 내지 78, 85, 87, 89, 91 내지 94, 및 97 내지 106 10, 13, 14, 16, 17, 20, 21, 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 98, 99, 100, 101, 103, 104, 및 105의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [45] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 17, 22, 42, 53, 56, 58 내지 60, 62, 71, 72, 74 내지 77, 87, 89, 91 내지 93, 98 내지 101, 및 103 내지 106의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [46] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 22, 42, 53, 87, 105 및 106의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [47] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 C-말단에 하나 이상의 아미노산을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [48] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역관문 억제제는 PD-1 길항제인 것을 특징으로 한다.
- [49] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역관문 억제제는 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 한다.
- [50] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 항-PD-1 항체는 니볼루맵(nivolumab), 펌브롤리주맵(pembrolizumab), 세미플리맵(cemiplimab), 스파탈리주맵(spartalizumab), 캄렐리주맵(camrelizumab), 신틸리맵(sintilimab), 티슬렐리주맵(tislelizumab), 토리팔리맵(toripalimab), 도스타리맵(dostarlimab), INCMGA00012, AMP-224 및 AMP-514로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 특징으로 한다.
- [51] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 지속형 결합체는 IgG4 Fc 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [52] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 지속형 결합체는 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [53] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역에서 유래한 것을 특징으로 한다.

- [54] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 2 개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결된 것을 특징으로 한다.
- [55] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 438의 아미노산 서열을 갖는 단량체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [56] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 438의 아미노산 서열의 단량체의 동중이량체인 것을 특징으로 한다.
- [57] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된 것을 특징으로 한다.
- [58] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태 면역글로불린 Fc 영역 중 하나의 Fc 영역에 X가 상기 폴리에틸렌글리콜 링커를 통하여 서로 공유결합적으로 연결된 것을 특징으로 한다.
- [59] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 링커의 한 말단이 상기 이량체 형태 면역글로불린 Fc 영역의 두 Fc 영역 사슬 중 하나의 Fc 영역 사슬에만 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [60] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 폴리에틸렌글리콜 링커는 분자량 1 kDa 내지 100 kDa의 링커인 것을 특징으로 한다.
- [61] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [62] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 암은 신세포암, 흑색종, 대장암, 간암, 자궁암, 난소암, 췌장암, 담낭암, 폐암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 피부암, 유방암, 방광암, 위암, 두부 또는 경부암, 식도암, 후두암, 골암, 직장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장골반 암종, CNS 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌종양, 신경교종(성상세포종(astrocytoma), 교모세포종(glioblastoma), 핍지교종(oligodendroglioma) 상의세포종(ependymoma), 배아세포종, 수막종, 뇌간신경교종, 뇌하수체 선종, 신경초종, 선천성종양, 두개인두종, 및 뇌종양으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 한다.
- [63] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 암은 PD-1 길항제에 대해 반응성이 낮은 암종인 것을 특징으로 한다.
- [64] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 PD-1 길항제에 대해 반응성이 낮은 암은 면역-비침투성 종양(cold tumor)인 것을 특징으로 한다.
- [65] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 조성물은 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 또는 직장 내 투여 경로로 투여되는 것을 특징으로 한다.

- [66] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 조성물은 1주 내지 1개월 범위의 시간 간격으로 투여되는 것을 특징으로 한다.
- [67] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 조성물로서, 상기 조성물은 면역관문 억제제 또는 이를 포함하는 조성물과 동시, 순차적 또는 역순으로 병용 투여되는 것을 특징으로 한다.
- [68] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물 및 면역관문 억제제 또는 이를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법이다.
- [69] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물 및 면역관문 억제제 또는 이를 포함하는 조성물의 암의 예방 또는 치료를 위한 병용 용도이다.
- [70] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물로서, 면역관문 억제제와 병용 투여하는 조성물의 암의 예방 또는 치료를 위한 약제를 제공하기 위한 용도이다.
- [71] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 약학적 키트로서, 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 면역관문 억제제와 병용 투여하기 위한 약학적 키트이다.

[72]

발명의 실시를 위한 형태

- [73] 본 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용을 설명하면 다음과 같다. 한편, 본원에서 개시된 각각의 설명 및 실시 형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다. 또한, 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

[74]

- [75] 본 명세서 전반을 통하여, 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가 사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재하였다.

[76] 알라닌 A 아르기닌 R

[77] 아스파라긴 N 아스파르트산 D

[78] 시스테인 C 글루탐산 E

[79] 글루타민 Q 글리신 G

[80] 히스티딘 H 이소류신 I

[81] 류신 L 라이신 K

- [82] 메티오닌 M 페닐알라닌 F
- [83] 프롤린 P 세린 S
- [84] 트레오닌 T 트립토판 W
- [85] 티로신 Y 발린 V

[86]

[87]

[88] 본 발명의 하나의 양태는 인터루킨 2 아날로그(analog) 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 면역관문 억제제와 병용 투여되는 조성물을 제공한다.

[89] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 인터루킨 2 수용체에 대한 결합력이 변경된 것, 특히 인터루킨 2 베타 수용체 결합력이 증대된 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2 또는 공지된 알테스루킨에 비해 인터루킨 2 베타 수용체에 대한 결합력이 증대된 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 인터루킨 2 알파 수용체에 대한 결합력도 변화(증가 또는 감소)된 것으로서, 천연형 인터루킨 2에서 하나 이상의 아미노산이 변이된 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[90]

[91] 본 발명의 조성물을 구현하는 한 양태로는 서열번호 3 내지 106의 아미노산 서열에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 구성되는 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[92]

[93] 구체적으로, 본 발명의 조성물은 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있으며, 더 구체적으로는 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체, 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하면서 면역관문 억제제와 병용 투여되는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[94]

[95] 본 발명의 약학적 조성물은

[96] a) (i) 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 및 (ii) 면역관문 억제제가 혼합된 하나의 혼합물(mixture)로 투여되거나; 또는

[97] b) (i) 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 및 (ii) 면역관문 억제제가 분리된 형태로 투여될 수 있는 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[98] 예를 들어, 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 및 면역관문 억제제가 하나의 제제로 제제화된 것이거나, 또는 개별적으로 제제화된 것일 수 있다. 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 및 면역관문 억제제가 분리된 형태일 경우, 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 및 면역관문 억제제가 별개의 제제로 제제화되어 동시, 개별, 순차, 또는 역순으로 투여될 수 있는 것일 수 있다.

- [99] 본 발명에서, 병용 투여는 동시 투여를 의미하는 것뿐만이 아니라, 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 및 면역관문 억제제가 개체에 함께 작용하여 각 물질이 본연의 기능과 동등하거나 그 이상의 수준을 수행할 수 있는 투여 형태로 이해되어야 한다. 따라서, 본원에서, "병용"이란 용어는 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 및 면역관문 억제제의 동시, 개별, 순차, 또는 역순 투여를 모두 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 상기 투여가 순차, 역순 또는 개별적인 경우, 투여의 순서는 특별히 제한되지 않고 다만 2차 성분 투여의 간격은 상기 병용의 이로운 효과를 잃지 않도록 하는 것이어야 한다.
- [100]
- [101] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체, 및 면역관문 억제제; 또는 이들을 포함하는 조성물은 키트 형태로 제공되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 용어 "키트"는 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체와 면역관문 억제제를 병용 투여하기 위해, 본 발명에 따른 조성물을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 본 발명에 따른 키트에는 하나의 제제로 제제화된 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체, 및 면역관문 억제제가 포함되거나, 또는 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체, 및 면역관문 억제제의 개별 제제를 포함하는 것일 수 있고, 두 물질의 병용 투여에 필요한 물질을 추가적으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [102]
- [103] 본 발명에서 용어, "인터루킨 2(interleukin 2, IL-2)"란 생체 내 면역 시스템에서 신호 전달을 하는 사이토카인의 일종으로 면역 조절제를 의미한다. 인터루킨 2는 일반적으로 약 15 kDa의 중요한 면역 자극제로 알려져 있다.
- [104] 본 발명에서 용어, "인터루킨 2 아날로그"란 천연형 서열에서 하나 이상의 아미노산이 변이된 것을 의미하며, 특히 본 발명에서는 천연형에 비해 인터루킨 2 수용체에 대한 결합력이 감소되거나 증가한, 천연형 인터루킨 2의 아미노산이 변이된 인터루킨 2 아날로그일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 비자연적인(non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [105] 상기 천연형 인터루킨 2는 인간 인터루킨 2 일 수 있으며, 이의 서열은 공지된 데이터베이스 등에서 얻을 수 있다. 구체적으로는 서열번호 1의 아미노산 서열일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [106] 본 발명에서, 천연형 인터루킨 2가 서열번호 1의 아미노산 서열일 수 있다는 의미는 서열번호 1과 동일한 서열뿐만 아니라, 서열번호 1과 상동성 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 역시 본 발명의 천연형 인터루킨 2의 범주에 속한다는 의미이며, 아미노산의 변이 위치는 서열번호 1을 기준으로 상동성 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열을 배열(aligned)했을 때 서열번호 1의 아미노산 서열 상에서 상응되는 위치가 변이된 것을 의미한다.
- [107]

- [108] 본 발명에서 용어, “알데스루킨(aldesleukin)”는 상업적으로 구매 가능한 인터루킨 2 아날로그로서, aldesleukin(상표명: Proleukin®)일 수 있으며, 구체적으로는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 본 발명에서는 “인터루킨 2 아날로그 1”과 혼용되어 사용된다. 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그는 상기 인터루킨 2 아날로그 1에 비해 변화된 인터루킨 2 알파 수용체 결합력 및/또는 증대된 인터루킨 2 베타 수용체 결합력을 갖는 것일 수 있다.
- [109] 인터루킨 2 알파 수용체는 인터루킨 2의 신호전달 체계에는 관여하지 않는 것으로 알려져 있지만, 다른 인터루킨 2 수용체(베타 혹은 감마)와 인터루킨 2의 결합력을 10배~100배 증가시키며, CD4⁺ 조절 T세포 등에 발현되어 있다.
- [110] 인터루킨 2 베타 수용체는 CD8⁺ T세포 혹은 자연 살해 세포(NK cell)에 주로 분포되어 면역 반응과 대식세포 작용을 활성화 하는데 주요한 기능을 수행하므로, 인터루킨 2 베타 수용체의 활성화를 통해 종양 세포 사멸 및 신체 면역 반응 활성화를 기대할 수 있다.
- [111] 따라서, 본 발명의 인터루킨 2 베타 수용체에 대한 결합력이 증가된 인터루킨 2 아날로그는 종양 억제 및 사멸과 같은 치료효과는 증대되고, 부작용은 감소한 치료효과를 가질 수 있다.
- [112]
- [113] 하나의 예로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 3 내지 106으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [114] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 10, 13 내지 15, 17, 20 내지 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 56, 58 내지 60, 62, 71, 72, 74 내지 78, 85, 87, 89, 91 내지 94, 및 97 내지 106 10, 13, 14, 16, 17, 20, 21, 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 98, 99, 100, 101, 103, 104, 및 105의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [115] 다른 구체적인 실시 형태에서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 17, 22, 42, 53, 56, 58 내지 60, 62, 71, 72, 74 내지 77, 87, 89, 91 내지 93, 98 내지 101, 및 103 내지 106의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 다른 구체적인 실시 형태에서 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 10, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 21, 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 56, 58, 59, 60, 62, 71, 72, 74, 75, 76, 77, 78, 85, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 95, 98, 99, 100, 101, 103, 104, 105, 및 106의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [116] 다른 구체적인 실시 형태에서 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 10, 13, 14, 16, 17, 20, 21, 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 87, 89, 91, 92, 93, 94, 98, 99, 100, 101, 103,

104, 및 105의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [117] 다른 구체적인 실시 형태에서 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 22, 42, 53, 87, 105 및 106의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 구성되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [118] 또한, 상기 인터루킨 2 아날로그는 C-말단에 하나 이상의 아미노산을 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [119]
- [120] 또한, 본 명세서에서 '특정 서열번호로 구성되는 인터루킨 2 아날로그'라고 기재되어 있다 하더라도, 해당 서열번호의 아미노산 서열로 이루어진 인터루킨 2 아날로그와 동일 혹은 상응하는 활성을 가지는 경우라면 해당 서열번호의 아미노산 서열 앞뒤의 무의미한 서열 추가 또는 자연적으로 발생할 수 있는 돌연변이, 혹은 이의 잠재성 돌연변이 (silent mutation)를 제외하는 것이 아니며, 이러한 서열 추가 혹은 돌연변이를 가지는 경우에도 본원의 범위 내에 속하는 것이 자명하다.
- [121] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 3 내지 106의 아미노산 서열과 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 상동성 또는 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [122] 본 발명에서 용어, '상동성(homology)' 또는 '동일성(identity)'은 두 개의 주어진 아미노산 서열 또는 염기 서열과 서로 관련된 정도를 의미하며 백분율로 표시될 수 있다.
- [123] 보존된(conserved) 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드의 서열 상동성 또는 동일성은 표준 배열 알고리즘에 의해 결정되며, 사용되는 프로그램에 의해 확립된 디폴트 갭 페널티가 함께 이용될 수 있다. 실질적으로, 상동성을 갖거나 (homologous) 또는 동일한(identical) 서열은 일반적으로 서열 전체 또는 일부분과 중간 또는 높은 엄격한 조건(stringent conditions)에서 하이브리드할 수 있다. 하이브리드화는 폴리뉴클레오티드에서 일반 코돈 또는 코돈 축퇴성을 고려한 코돈을 함유하는 폴리뉴클레오티드와의 하이브리드화 역시 포함됨이 자명하다.
- [124] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [125] 임의의 두 염기 서열 또는 펩타이드 서열이 상동성, 유사성 또는 동일성을 갖는지 여부는 예를 들어, Pearson et al (1988)[Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85]: 2444에서와 같은 디폴트 파라미터를 이용하여 "FASTA" 프로그램과 같은 공지된 컴퓨터 알고리즘을 이용하여 결정될 수 있다. 또는, EMBOSS 패키지의 니들만 프로그램(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et

al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277)(버전 5.0.0 또는 이후 버전)에서 수행되는
바와 같은, 니들만-운치(Needleman-Wunsch) 알고리즘(Needleman and Wunsch,
1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453)이 사용되어 결정될 수 있다. (GCG 프로그램 패키
지 (Devereux, J., et al, Nucleic Acids Research 12: 387 (1984)), BLASTP, BLASTN,
FASTA (Atschul, [S.] [F.,] [ET AL, J MOLEC BIOL 215]: 403 (1990); Guide to Huge
Computers, Martin J. Bishop, [ED.,] Academic Press, San Diego, 1994, 및 [CARILLO
ETA/.(1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공
학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성
또는 동일성을 결정할 수 있다.

- [126] 염기 서열 또는 펩타이드의 상동성, 유사성 또는 동일성은 예를 들어, Smith and Waterman, Adv. Appl. Math (1981) 2:482에 공지된 대로, 예를 들면, Needleman et al. (1970), J Mol Biol.48: 443과 같은 GAP 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. 요약하면, GAP 프로그램은 두 서열 중 더 짧은 것에서의 기호의 전체 수로, 유사한 배열된 기호(즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 수를 나눈 값으로 정의한다. GAP 프로그램을 위한 디폴트 파라미터는 (1) 일진법 비교 매트릭스(동일성을 위해 1 그리고 비-동일성을 위해 0의 값을 함유함) 및 Schwartz and Dayhoff, eds., Atlas Of Protein Sequence And Structure, National Biomedical Research Foundation, pp. 353-358 (1979)에 의해 개시된 대로, Gribskov et al(1986) Nucl. Acids Res. 14: 6745의 가중된 비교 매트릭스(또는 EDNAFULL(NCBI NUC4.4의 EMBOSS 버전) 치환 매트릭스); (2) 각 갭을 위한 3.0의 페널티 및 각 갭에서 각 기호를 위한 추가의 0.10 페널티(또는 갭 개방 페널티 10, 갭 연장 페널티 0.5); 및 (3) 말단 갭을 위한 무 페널티를 포함할 수 있다. 따라서, 본 발명에서 사용된 것으로서, 용어 "상동성" 또는 "동일성"은 서열들간의 관련성(relevance)을 나타낸다.

[127]

- [128] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 인터루킨 2 알파 및/또는 베타 수용체와의 결합력을 약화 또는 증가시켜 *in vitro* 활성을 변화시키는 새로운 인터루킨 2의 대체제로 이용될 수 있다. 특히, 베타 수용체에 대한 결합력을 증가시킬 뿐만 아니라, 알파 수용체에 대한 결합력이 변화(증가 또는 감소)되어 두 수용체에 대한 활성으로 인해 효과적인 치료제로 이용될 수 있다.

[129]

- [130] 본 발명에서, 인터루킨 2의 아날로그의 제조를 위한 이러한 변형은 L-형 혹은 D-형 아미노산, 및/또는 비-천연형 아미노산을 이용한 변형; 및/또는 천연형 서열을 개질, 예를 들어 측쇄 작용기의 변형, 분자 내 공유결합, 예컨대, 측쇄 간 고리형성, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 인산화, 아미노헥산화, 바이오틴화 등과 같이 개질함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다.

- [131] 또한, 천연형 인터루킨 2의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다.

- [132] 상기 치환되거나 추가되는 아미노산은 인간 단백질에서 통상적으로 관찰되는 20개의 아미노산뿐만 아니라 비정형 또는 비-자연적 발생 아미노산을 사용할 수 있다. 비정형 아미노산의 상업적 출처에는 Sigma-Aldrich, ChemPep과 Genzyme pharmaceuticals가 포함된다. 이러한 아미노산이 포함된 펩타이드와 정형적인 펩타이드 서열은 상업화된 펩타이드 합성 회사, 예를 들어 미국의 American peptide company나 Bachem, 또는 한국의 Anygen을 통해 합성 및 구매 가능하다.
- [133] 아미노산 유도체도 마찬가지로 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부만 들자면 4-이미다조아세트산 (4-imidazoacetic acid) 등을 사용할 수 있다.
- [134]
- [135] 또한, 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그는 생체 내의 단백질 절단 효소들로부터 보호하고 안정성을 증가시키기 위하여 이의 N-말단 및/또는 C-말단 등이 화학적으로 수식되거나 유기단으로 보호되거나, 또는 펩타이드 말단 등에 아미노산이 추가되어 변형된 형태일 수 있다.
- [136] 특히, 화학적으로 합성한 펩타이드의 경우, N- 및 C-말단이 전하를 띠고 있기 때문에, 이러한 전하를 제거하기 위하여 N-말단을 아세틸화 (acetylation) 및/또는 C-말단을 아미드화 (amidation)할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [137]
- [138] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 Solid phase 합성법을 통하여 합성될 수 있으며, 재조합 방법으로도 생산 가능하고, 상업적으로 의뢰하여 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [139] 또한, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 그 길이에 따라 이 분야에서 잘 알려진 방법, 예를 들어 자동 펩타이드 합성기에 의해 합성할 수 있으며, 유전자 조작 기술에 의하여 생산할 수도 있다.
- [140] 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 표준 합성 방법, 재조합 발현 시스템, 또는 임의의 다른 당해 분야의 방법에 의해 제조될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그는, 예를 들어 하기를 포함하는 방법을 포함하는 다수의 방법으로 합성될 수 있다:
- [141] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는
- [142] (b) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는
- [143] (c) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는
- [144] (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을 연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.
- [145]

- [146] 본 발명에서 천연형 인터루킨 2 수용체에 대한 어떠한 인터루킨 2 아날로그 (또는 이를 포함하는 지속형 결합체)의 결합력이란 수용체에 대한 친화력을 측정하는 방법으로, SPR(surface plasmon resonance)를 이용할 수 있다.
- [147] 구체적으로, SPR 분석 시 단백질-리간드 결합 원리를 이용하여 센서 칩에 인터루킨 2 수용체를 고정화하고, 연속 희석법을 이용하여 실험 버퍼에 희석된 인터루킨 2 아날로그를 흘려주어 고정화된 수용체와의 결합을 유도한 후, 동일한 유속으로 실험 버퍼만을 흘려주어 수용체와 인터루킨 2 아날로그의 해리를 유도하여 결합력을 측정하거나, 센서 칩에 인간 면역글로불린 Fc 영역에 대한 항체를 먼저 고정시킨 뒤 Fc 영역이 결합된 인터루킨 2 수용체를 고정화하고 인터루킨 2 아날로그를 흘려주어 결합력을 측정하는 방법이 있을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [148] 보다 구체적으로, 비오틴이 표지된 인간 인터루킨 2 수용체를 스트렙타비딘 바이오 센서칩에 고정화하고, 2배 연속 희석법으로 HBS-EP+ 버퍼에 희석된 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체를 분당 20 μ L의 유속으로 3분간 흘려준 후, 동일한 유속으로 HBS-EP+ 버퍼만을 3분간 흘려주어 인터루킨 2 수용체와 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체의 해리를 유도한 다음 얻어진 결합 상수 및 해리 상수를 Bioevaluation 프로그램을 사용하여 1:1 binding fitting model에 따라 결합력을 측정할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [149] 보다 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2 또는 알데스루킨(aldesleukin; 또는 인터루킨 2 아날로그 1)에 비해 감소되거나 증가된 인터루킨 2 알과 수용체 결합력을 가질 수 있다.
- [150] 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2 또는 알데스루킨의 인터루킨 2 알과 수용체 결합력과 비교하여 약 0.001배 이상, 약 0.005배 이상, 약 0.01배 이상, 약 0.05배 이상, 약 0.1배 이상, 약 0.3배 이상, 약 0.5배 이상, 약 0.7배 이상, 약 0.9배 이상, 약 1.1배 이상, 약 1.3배 이상, 약 1.5배 이상, 약 1.7배 이상의 인터루킨 2 알과 수용체 결합력을 갖는 것일 수 있으나, 그 수치는 한정되지 않으며 결합력이 천연형 인터루킨 2 또는 알데스루킨과 대비하여 변경되었으면 본 발명의 범주에 속한다.
- [151] 또는, 알데스루킨의 인터루킨 2 알과 수용체 결합력(100%)을 기준으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 아예 결합력을 상실하거나, 약 1% 이상, 약 5% 이상, 약 7% 이상, 약 10% 이상, 약 15% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 50% 이상, 약 70% 이상, 약 90% 이상, 약 100% 이상, 약 150% 이상, 약 200% 이상의 결합력을 갖는 것일 수 있으나, 그 수치는 한정되지 않으며 결합력이 천연형 인터루킨 2 또는 알데스루킨과 대비하여 변경되었으면 본 발명의 범주에 속한다.
- [152]
- [153] 또한, 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2 또는 알데스루킨의 인터루킨 2 베타 수용체 결합력과 비교하여 약 0.1배 이상, 약 0.3배 이상, 약 0.5배 이상, 약 0.7배 이상, 약 1.0배 이상, 약 10배 이상, 약 20배 이상, 약

30배 이상, 약 40배 이상, 약 50배 이상, 약 60배 이상, 약 70배 이상, 약 80배 이상, 약 90배 이상, 약 100배 이상의 인터루킨 2 베타 수용체 결합력을 갖는 것일 수 있으나, 그 수치는 한정되지 않으며 결합력이 천연형 인터루킨 2 또는 알테스루킨과 대비하여 변경, 또는 증가되었으면 본 발명의 범주에 속한다.

[154] 또는, 알테스루킨의 인터루킨 2 베타 수용체 결합력(100%)을 기준으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 약 5% 이상, 약 9% 이상, 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 50% 이상, 약 100% 이상, 약 200% 이상, 약 500% 이상, 약 700% 이상, 약 1000% 이상, 약 1500% 이상, 약 3000% 이상, 약 5000% 이상, 약 7000% 이상, 약 10000% 이상, 약 12000% 이상, 약 15000% 이상, 약 20000% 이상, 약 25000% 이상의 결합력을 갖는 것일 수 있으나, 그 수치는 한정되지 않으며 결합력이 천연형 인터루킨 2 또는 알테스루킨과 대비하여 증가되었으면 본 발명의 범주에 속한다.

[155]

[156] 본 발명에서 용어, "약"은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[157] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2 또는 알테스루킨에 비해 인터루킨 2 알파 수용체에 대한 결합력이 변경되고, 인터루킨 2 베타 수용체에 대한 결합력이 증가된 것을 특징으로 한다.

[158]

[159] 본 발명의 구체적인 실시 형태에서는 본 발명의 인터루킨 2 아날로그를 제조하기 위하여, 천연형 인터루킨 2(서열번호 1)를 바탕으로 변이를 도입한 인터루킨 2 아날로그를 제조하였다. 본 발명에서 제조된 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 3 내지 106 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있고, 또는 서열번호 108 내지 211 중 어느 하나의 염기 서열로 코딩되는 것일 수 있다.

[160]

[161] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그를 코딩하는 핵산은 서열번호 1의 천연형 인터루킨 2를 코딩하는 염기 서열에서 특정 위치의 아미노산에 변이(아미노산 결실, 치환, 및/또는 추가)를 도입할 수 있도록 변형된 것일 수 있고, 구체적으로는 서열번호 3 내지 106 중 어느 하나의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열을 포함할 수 있다. 일 예로서, 본 발명의 핵산은 서열번호 108 내지 211 중 어느 하나의 염기 서열을 가지거나 포함할 수 있다.

[162]

본 발명의 염기 서열은 코돈의 축퇴성(degeneracy) 또는 본 발명의 핵산을 발현 시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위 내에서 코딩 영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 핵산은 서열번호 108 내지 211 중 어느 하나의 서열과 상동성 또는 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서

열을 가지거나 포함하거나, 또는 서열번호 108 내지 211의 서열 중 어느 하나의 서열과 상동성 또는 동일성이 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 및 100% 미만인 염기서열로 이루어지거나 필수적으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [163] 또한, 본 발명의 핵산은 공지의 유전자 서열로부터 제조될 수 있는 프로브, 예를 들면, 본 발명의 핵산 서열의 전체 또는 일부에 대한 상보 서열과 엄격한 조건 하에 하이브리드화할 수 있는 서열이라면 제한없이 포함될 수 있다. 상기 "엄격한 조건(stringent condition)"이란 폴리뉴클레오티드 간의 특이적 혼성화를 가능하게 하는 조건을 의미한다. 이러한 조건은 문헌(J. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York, 1989; F.M. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., New York, 9.50-9.51, 11.7-11.8 참조)에 구체적으로 기재되어 있다.
- [164] 혼성화는 비록 혼성화의 엄격도에 따라 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능할지라도, 두 개의 핵산이 상보적 서열을 가질 것을 요구한다. 용어, "상보적"은 서로 혼성화가 가능한 뉴클레오티드 염기 간의 관계를 기술하는데 사용된다. 예를 들면, DNA에 관하여, 아데닌은 티민에 상보적이며 시토신은 구아닌에 상보적이다. 따라서, 본 발명의 핵산은 또한 실질적으로 유사한 핵산 서열뿐만 아니라 전체 서열에 상보적인 단리된 핵산 단편을 포함할 수 있다.
- [165] 상기 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).
- [166] 상동성 또는 동일성에 관해서는 상술한 바와 같다.
- [167]
- [168] 또한, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨, 또는 알데스루킨 대비 체내 반감기가 증가된 것일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 반감기 증가를 위한 생체적합성 물질(예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역)이 인터루킨 2 아날로그에 직접 또는 링커를 통해 결합하여, 반감기가 증가된 지속형 결합체 형태를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [169] 본 발명에 따른 지속형 결합체는 인터루킨 2 베타 수용체에 대한 결합력을 높인 인터루킨 2 아날로그를 포함할 뿐만 아니라, 이의 반감기를 증가시키기 위한 대표적인 캐리어로서 면역글로불린 Fc 영역과 결합시켜 인터루킨 2 아날로그의 반감기가 증가되고, 혈중 노출도가 높아지며 생체 내 면역반응이 증가하여 암세포의 성장 억제 및 감소를 효과적으로 달성할 수 있다.
- [170]
- [171] 이상의 내용은 본 발명의 다른 구체예 혹은 다른 양태에도 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [172]

- [173] 본 발명의 조성물을 구현하는 다른 양태로는 상기 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [174]
- [175] 본 발명에서 상기 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체는, 인터루킨 2 아날로그에 이의 생체 내 반감기를 증가시키기 위한 생체적합성 물질이 결합된 형태일 수 있다. 본 명세서에서 상기 생체적합성 물질은 캐리어와 혼용될 수 있다.
- [176] 본 발명에서 상기 지속형 결합체는 캐리어가 결합되지 않은 인터루킨 2 아날로그에 대비하여 증가된 효력의 지속성을 나타낼 수 있으며, 본 발명에서는 이러한 결합체를 "지속형 결합체" 또는 "결합체"로 지칭한다.
- [177] 한편, 이러한 결합체는 비자연적으로 발생된(non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [178]
- [179] 본 발명의 하나의 구체예에서, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는, 지속형 결합체이다:
- [180] [화학식 1]
- [181] X - L - F
- [182] 이 때 X는 상기 인터루킨 2 아날로그이고;
- [183] L은 폴리에틸렌글리콜 링커이며;
- [184] F는 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;
- [185] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타내며,
- [186] 상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태의 Fc 영역 중 한 폴리펩타이드 사슬에만 L의 일 말단이 공유결합으로 연결되어 있고, 이 L의 반대쪽 말단에 X가 공유결합으로 연결됨.
- [187] 보다 구체적으로, 상기 지속형 결합체는 Fc 영역 중 한 폴리펩타이드 사슬에 X 한 분자가 L을 통하여 연결된 것일 수 있다. 또한, 본 발명의 지속형 결합체에서 X와 L, 및 L과 F는 공유결합으로 서로 연결되는 것일 수 있으며, 이때 상기 결합체는 화학식 1의 순서로, X, L, 및 F가 공유결합을 통하여 각각 연결된 결합체일 수 있다.
- [188]
- [189] 본 발명의 지속형 결합체의 인터루킨 2 아날로그는 결합체의 일부를 이루지 않고 단독으로 존재할 때 인터루킨 2 수용체에 대한 결합력이 변경된 것, 특히 인터루킨 2 베타 수용체 결합력이 증대된 것을 특징으로 한다. 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 결합체의 일부를 이루지 않고 단독으로 존재할 때 천연 연형 인터루킨 2 또는 공지된 알데스루킨에 비해 인터루킨 2 베타 수용체에 대한 결합력이 증대된 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 인터루킨 2 알파 수용체에 대한 결합력도 변화(증가 또는 감소)된 것일 수 있다.
- [190]

- [191] 본 발명에서, 인터루킨 2 아날로그는 상기 결합체를 구성하는 일 모이어티의 구성에 해당할 수 있다. 구체적으로, 상기 화학식 1에서 X에 해당하고, 인터루킨 2 아날로그에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [192] 상기 결합체에서 F는 X, 즉 인터루킨 2 아날로그의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질로서, 본 발명의 결합체를 구성하는 모이어티의 일 구성에 해당한다.
- [193] 상기 F는 X와 공유 화학결합으로 서로 결합되는 것일 수 있으며, 공유 화학결합으로 L을 통하여 F와 X가 서로 결합되는 것일 수 있다.
- [194] 구체적으로, 상기 F는 면역글로불린 Fc 영역이고, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG Fc 영역, 또는 비당쇄화된 IgG4 Fc 영역일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [195] 본 발명의 구체적인 한 예로, 상기 F(면역글로불린 Fc 영역)는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이량체며, L의 한 말단이 상기 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 연결되어 있는 구조를 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [196]
- [197] 본 발명의 펩타이드 내의 하나 이상의 아미노산 측쇄는 생체 내에서 가용성 및/또는 반감기를 증가시키고/시키거나 생체이용율을 증가시키기 위해 이러한 생체적합성 물질에 접합될 수 있다. 이러한 변형은 또한 치료학적 단백질 및 펩타이드의 소거(clearance)를 감소시킬 수 있다.
- [198] 상술한 생체적합성 물질은 수용성(양친매성 또는 친수성) 및/또는 무독성 및/또는 약학적으로 허용가능한 것일 수 있다.
- [199]
- [200] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 본 발명의 지속형 결합체는 인터루킨 2 아날로그와 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [201]
- [202] 본 발명에서, "면역글로불린 Fc 영역"은, 면역글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역을 제외한, 중쇄 불변영역 2(CH2) 및/또는 중쇄 불변영역 3(CH3)부분을 포함하는 부위를 의미한다. 상기 면역글로불린 Fc 영역은 본 발명의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있다. 구체적으로, 상기 화학식 1에서 F에 해당한다.
- [203] 본 명세서에서 Fc 영역이라고 하면 면역글로불린의 파파인 소화에서 얻는 천연형 서열뿐 아니라 그 유도체, 예컨대 천연 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 변환되어 천연형과 상이하게 된 서열등 변형체까지 망라하여 포함된다. 상기 유도체, 치환체, 변형체는 FcRn에 결합하는 능력을 보유하는 것을 전제로 한다. 본 발명에서, F는 사람 면역글로불린 영역일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에서 "생체적합성 물질" 또는 "캐리어"는 상기 Fc 영역을 의미할 수 있다.
- [204] 상기 F(면역글로불린 Fc 영역)는, 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결

되어 있는 구조일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 질소 원자를 통한 연결은 라이신의 입실론 아미노 원자나 N-말단 아미노기에 환원적 아민화를 통하여 연결될 수 있다.

- [205] 환원적 아민화 반응이란 반응물의 아민기 또는 아미노기가 다른 반응물의 알데히드(즉, 환원적 아민화가 가능한 작용기)와 반응하여 아민을 생성한 다음, 환원 반응에 의해 아민 결합을 형성시키는 반응을 의미하여, 당해 기술 분야에 널리 알려져 있는 유기합성 반응이다.
- [206] 본 발명의 지속형 결합체의 하나의 구체예로서, 상기 지속형 결합체는 상기 면역글로불린 Fc 영역이 그 N-말단 질소 원자를 통하여 링커에 연결된 것일 수 있다.
- [207]
- [208] 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [209] 본 발명에서, 면역글로불린 Fc 영역은 N-말단에 특정 힌지 서열을 포함할 수 있다.
- [210] 본 발명의 용어, "힌지 서열"은 중쇄에 위치하여 이황화결합(inter disulfide bond)를 통하여 면역글로불린 Fc 영역의 이량체를 형성하는 부위를 의미한다.
- [211] 본 발명에서, 상기 힌지 서열은 하기의 아미노산 서열을 갖는 힌지 서열 중 일부가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 갖도록 변이된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다:
- [212] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 418).
- [213] 상기 힌지 서열은 서열번호 418의 힌지 서열 중 8번째 또는 11번째 시스테인 잔기가 결실되어 하나의 시스테인 잔기만을 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 힌지 서열은 하나의 시스테인 잔기만을 포함하는, 3 내지 12개의 아미노산으로 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로, 본 발명의 힌지 서열은 다음과 같은 서열을 가질 수 있다: Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 419), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro(서열번호 420), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 421), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro(서열번호 422), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser(서열번호 423), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 424), Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 425), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 426), Glu-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 427), Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 428), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 429), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 430), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 431), Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys(서열번호 432), Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro(서열번호 433), Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 434), Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 435), Glu-Pro-Ser-Cys(서열번호 436), Ser-Cys-Pro(서열번호 437).

- [214] 더욱 구체적으로는 상기 힌지 서열은 서열번호 428(Pro-Ser-Cys-Pro)또는 서열번호 437(Ser-Cys-Pro)의 아미노산 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [215] 본 발명의 지속형 결합체의 한 더욱 구체적인 형태에서, 상기 결합체내 상기 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단은 프롤린이고, 이 결합체는 상기 프롤린의 질소 원자를 통하여 Fc 영역이 링커에 연결된 것이다.
- [216] 본 발명의 지속형 결합체의 한 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 힌지 서열이 존재함으로써 면역글로불린 Fc 영역의 사슬 두 개가 동종이량체(homodimer)나 이종이량체(heterodimer)를 형성한 이량체 형태일 수 있다. 본 발명의 화학식 1의 결합체는 링커의 일 말단이 이량체의 면역글로불린 Fc 영역의 한 사슬에 연결된 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [217] 본 발명의 용어, "N-말단"은 단백질 또는 폴리펩티드의 아미노 말단을 의미하는 것으로, 아미노 말단의 최말단, 또는 최말단으로부터 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 이상의 아미노산까지 포함하는 것일 수 있다. 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 힌지 서열을 N-말단에 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [218]
- [219] 또한 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형과 실질적으로 동등하거나 향상된 효과를 갖는 한, 면역 글로불린의 중쇄와 경쇄 가변영역만을 제외하고, 일부 또는 전체 중쇄 불변영역 1(CH1) 및/또는 경쇄 불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc 영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.
- [220] 예컨대, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 1) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인, 2) CH1 도메인 및 CH2 도메인, 3) CH1 도메인 및 CH3 도메인, 4) CH2 도메인 및 CH3 도메인, 5) CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인 및 CH4 도메인 중 1개 또는 2개의 이상의 도메인과 면역글로불린 힌지 영역(또는 힌지 영역의 일부)와의 조합, 또는 6) 중쇄 불변 영역 각 도메인과 경쇄 불변영역의 이량체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [221] 본 발명에서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린들로 구성된, 이량체 또는 다량체 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [222]
- [223] 또한, 본 발명의 지속형 결합체의 하나의 실시 형태로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역 F는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이량체(이합체 dimer)이며, 이때 상기 Fc 영역 이량체 F와 X는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 하나의 링커 L을 통하여 공유결합적으로 연결되어 있다. 이 실시 형태의 한 구체예에서, X는 이러한 Fc 영역 이량체 F의 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 링커 L을 통하여 공유결합으로 연결되어 있다. 이 실시 형태의 더욱 구체

- 적인 예시에서, 이러한 Fc 영역 이량체 F의 두 폴리펩타이드 사슬 중 X가 연결된 하나의 폴리펩타이드 사슬에는 한 분자의 X만이 L을 통하여 공유결합적으로 연결되어 있다. 이 실시 형태의 가장 구체적인 예시에서 상기 F는 동종이량체이다.
- [224] 다른 구체예에서, 상기 면역글로불린 Fc 영역 F는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이량체며, L의 한 말단이 상기 두 폴리펩타이드 사슬 중 하나의 폴리펩타이드 사슬에만 연결되어 있는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [225] 본 발명의 지속형 결합체의 다른 실시 형태에서는, 이량체 형태의 하나의 Fc 영역에 X 두 분자가 대칭적으로 결합하는 것 역시 가능하다. 이때 상기 면역글로불린 Fc 영역과 X는 L에 의해 서로 연결될 수 있다. 그러나, 상기 기술된 예에 제한되는 것은 아니다.
- [226] 또한, 본 발명의 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 아미노산 서열뿐만 아니라 이의 서열 유도체를 포함한다. 아미노산 서열 유도체란 천연 아미노산 서열 중의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 상이한 서열을 가지는 것을 의미한다.
- [227] 예를 들면, IgG Fc의 경우 결합에 중요하다고 알려진 214 내지 238, 297 내지 299, 318 내지 322 또는 327 내지 331번 아미노산 잔기들이 변형을 위해 적당한 부위로서 이용될 수 있다.
- [228] 또한, 이황화 결합을 형성할 수 있는 부위가 제거되거나, 천연형 Fc에서 N-말단의 몇몇 아미노산이 제거되거나 또는 천연형 Fc의 N-말단에 메티오닌 잔기가 부가될 수도 있는 등 다양한 종류의 유도체가 가능하다. 또한, 이펙터 기능을 없애기 위해 보체결합부위, 예로 C1q 결합부위가 제거될 수도 있고, ADCC(antibody dependent cell mediated cytotoxicity) 부위가 제거될 수도 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 영역의 서열 유도체를 제조하는 기술은 국제특허공개 제WO 97/34631호, 국제특허공개 제96/32478호 등에 개시되어 있다.
- [229] 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다(H.Neurath, R.L.Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation), 아세틸화(acetylation) 및 아미드화(amidation) 등으로 수식(modification)될 수도 있다.
- [230] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.
- [231] 또한, 이러한 Fc 영역은 인간, 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트 또는 기니아 피그 등의 동물의 생체 내에서 분리한 천연형으로부터 얻어질 수도 있고, 형질전환된 동물세포 또는 미생물로부터 얻어진 재조합형 또는 이의 유도체일 수 있다. 여기서, 천연형으로부터 획득하는 방법은 전체 면역글로불린을 인간

또는 동물의 생체로부터 분리한 후, 단백질 분해효소를 처리하여 획득하는 방법일 수 있다. 파파인을 처리할 경우에는 Fab 및 Fc로 절단되고, 펩신을 처리할 경우에는 pFc 및 F(ab)₂로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pFc를 분리할 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 제조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.

- [232] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 천연형 당쇄, 천연형에 비해 증가된 당쇄, 천연형에 비해 감소한 당쇄 또는 당쇄가 제거된 형태일 수 있다. 이러한 면역글로불린 Fc 당쇄의 증감 또는 제거에는 화학적 방법, 효소학적 방법 및 미생물을 이용한 유전 공학적 방법과 같은 통상적인 방법이 이용될 수 있다. 여기서, Fc에서 당쇄가 제거된 면역글로불린 Fc 영역은 보체(c1q)와의 결합력이 현저히 저하되고, 항체-의존성 세포독성 또는 보체-의존성 세포 독성이 감소 또는 제거되므로, 생체 내에서 불필요한 면역 반응을 유발하지 않는다. 이런 점에서 약물의 캐리어로서의 본래의 목적에 보다 부합하는 형태는 당쇄가 제거되거나 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역이라 할 것이다.
- [233] 본 발명에서 "당쇄의 제거(Deglycosylation)"는 효소로 당을 제거한 Fc 영역을 말하며, 비당쇄화(Aglycosylation)는 원핵동물, 더 구체적인 실시 형태에서는 대장균에서 생산하여 당쇄화되지 않은 Fc 영역을 의미한다.
- [234] 한편, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 또는 소, 염소, 돼지, 마우스, 래빗, 햄스터, 랫트, 기니아 피그 등의 동물기원일 수 있으며, 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 기원이다.
- [235] 또한, 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 혼성(hybrid)에 의한 Fc 영역일 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 혈액에 가장 풍부한 IgG 또는 IgM 유래이며 보다 더 구체적인 실시 형태에서는 리간드 결합 단백질의 반감기를 향상시키는 것으로 공지된 IgG 유래이다. 더욱 더 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역이며, 가장 구체적인 실시 형태에서 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [236] 또한, 하나의 구체예로서, 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 Fc의 단편으로서, 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이의 이황화 결합(inter-chain 형태)을 통해 2개의 단량체가 연결된 동종이합량체일 수 있으며, 이 때 동종이합량체는 각 단량체에서 35번 및 95번의 시스테인 사이 및 141번 및 199번의 시스테인 사이에 이황화 결합, 즉 2개의 이황화 결합(intra-chain 형태)을 가지거나/가질 수 있다.
- [237] 각 단량체의 아미노산 수는 221개의 아미노산으로 구성될 수 있으며, 동종이합량을 형성하는 아미노산은 전체 442개의 아미노산으로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 면역글로불린 Fc 절편은 서열번호 438의 아미노산 서열(221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동종이합량을 형성하고, 상기

동종이량체의 단량체는 각각 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합을 형성하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [238] 상기 화학식 1의 F는 서열번호 438의 아미노산 서열인 단량체를 포함하는 것일 수 있으며, 상기 F는 서열번호 438의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [239] 하나의 예로, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 439의 아미노산 서열 (442개의 아미노산으로 구성됨)을 포함하는 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [240] 하나의 구체예로, 상기 면역글로불린 Fc 영역과 X는 당쇄화되어 있지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [241]
- [242] 한편, 본 발명에서 "조합(combination)"이란 이량체 또는 다량체를 형성할 때, 동일 기원 단쇄 면역글로불린 Fc 영역을 암호화하는 폴리펩타이드가 상이한 기원의 단쇄 폴리펩타이드와 결합을 형성하는 것을 의미한다. 즉, IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc 및 IgE의 Fc 단편으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 2개 이상의 단편으로부터 이량체 또는 다량체의 제조가 가능하다.
- [243] 본 발명에서 "하이브리드(hybrid)"란 단쇄의 면역글로불린 불변영역 내에 2개 이상의 상이한 기원의 면역글로불린 Fc 단편에 해당하는 서열이 존재함을 의미하는 용어이다. 본 발명의 경우 여러 형태의 하이브리드가 가능하다. 즉, IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc 및 IgD Fc의 CH1, CH2, CH3 및 CH4로 이루어진 그룹으로부터 1개 내지 4개 도메인으로 이루어진 도메인의 하이브리드가 가능하며, 힌지를 포함할 수 있다.
- [244] 한편, IgG 역시 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4의 서브클래스로 나눌 수 있고 본 발명에서는 이들의 조합 또는 이들의 혼성화도 가능하다. 구체적으로는 IgG2 및 IgG4 서브클래스이며, 가장 구체적으로는 보체 의존적 독성(CDC, Complement dependent cytotoxicity)과 같은 이펙터 기능(effector function)이 거의 없는 IgG4의 Fc 영역이다.
- [245] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 천연형 인터루킨 2 또는 알데스루킨에 비해, 또는 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [246]
- [247] 본 발명에서 "폴리에틸렌 글리콜 링커"는 에틸렌글리콜 반복 단위가 2개 이상 결합된 생체 적합성 중합체를 포함한다. 상기 반복 단위들은 펩타이드 결합이 아닌 임의의 공유결합을 통해 서로 연결된다. 상기 폴리에틸렌 글리콜 링커는 본 발명의 결합체의 모이어티를 이루는 일 구성일 수 있으며, 본 명세서에서, 상기

링커는 “비펩타이드성 링커” 또는 “비펩타이드성 중합체”와 혼용되어 사용될 수 있다.

[248] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 결합체는 양쪽 말단에 F(구체적으로 면역 글로불린 Fc 영역) 및 X(구체적으로 인터루킨 2 아날로그)와 결합될 수 있는 반응기를 포함하는 비펩타이드성 링커를 통하여 F와 X가 서로 공유결합적으로 연결된 것일 수 있다.

[249] 구체적으로, 본 발명에서 비펩타이드성 링커는 말단에 반응기를 포함하여, 결합체를 구성하는 다른 구성 요소와 반응을 통해 결합체를 형성할 수 있다. 양 말단에 반응성 작용기를 갖는 비펩타이드성 링커가 각 반응기를 통해 상기 화학식 1의 X 및 F와 결합하여 결합체를 형성할 경우, 상기 비펩타이드성 링커 또는 비펩타이드성 중합체는 비펩타이드성 중합체 연결부(linker moiety) 또는 비펩타이드성 링커 연결부로 명명할 수 있다.

[250]

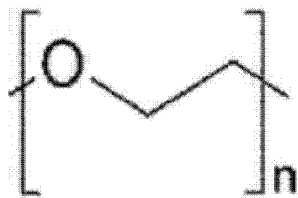
[251] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 상기 L(폴리에틸렌글리콜 링커)은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커, 예를 들어, 폴리에틸렌글리콜일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 명세서에서 상기 폴리에틸렌글리콜은 에틸렌글리콜 동중 중합체, PEG 공중합체, 또는 모노메틸-치환된 PEG 중합체(mPEG)의 형태를 모두 포괄하는 용어이나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 당해 분야에 이미 알려진 이의 유도체 및 당해 분야의 기술 수준에서 용이하게 제조할 수 있는 유도체들도 본 발명의 범위에 포함된다.

[252] 상기 폴리에틸렌글리콜 링커는 에틸렌글리콜 반복 단위를 포함하면서, 결합체로 구성되기 이전에는 결합체의 제조에 이용되는 작용기를 말단에 포함하는 것일 수 있다. 본 발명에 따른 지속형 결합체는 상기 작용기를 통해 X와 F가 연결된 형태일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명에서, 상기 비펩타이드성 링커는 2개, 또는 3개 이상의 작용기를 포함할 수 있고, 각 작용기는 동일하거나, 서로 상이할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[253] 구체적으로, 상기 링커는 하기 화학식 2로 표시되는 반복단위를 포함하는 것일 수 있다. 그 예로 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:

[254] [화학식 2]

[255]



[256]

- [257] 여기서, $n = 10$ 내지 2400, $n = 10$ 내지 480, 또는 $n = 50$ 내지 250이나, 이에 제한되지 않는다.
- [258] 상기 지속형 결합체에서 PEG 모이어티는, $-(CH_2CH_2O)_n$ -구조 뿐만 아니라 연결 요소와 이 $-(CH_2CH_2O)_n$ - 사이에 개재하는 산소 원자도 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [259]
- [260] 하나의 구체예로, 상기 에틸렌글리콜 반복단위는 그 예로, $[OCH_2CH_2]_n$ 로 표시될 수 있으며, n 값은 자연수로 상기 인터루킨 2 아날로그 결합체 내의 $[OCH_2CH_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 0 초과 내지 약 100 kDa이 되도록 정해질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또 하나의 예로, 상기 n 값은 자연수로 상기 인터루킨 2 아날로그 결합체 내의 $[OCH_2CH_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 약 1 내지 약 100 kDa, 약 1 내지 약 80 kDa, 약 1 내지 약 50 kDa, 약 1 내지 약 30 kDa, 약 1 내지 약 25 kDa, 약 1 내지 약 20 kDa, 약 1 내지 약 15 kDa, 약 1 내지 약 13 kDa, 약 1 내지 약 11 kDa, 약 1 내지 약 10 kDa, 약 1 내지 약 8 kDa, 약 1 내지 약 5 kDa, 약 1 내지 약 3.4 kDa, 약 2 내지 약 30 kDa, 약 3 내지 약 30 kDa, 약 3 내지 약 27 kDa, 약 3 내지 약 25 kDa, 약 3 내지 약 22 kDa, 약 3 내지 약 20 kDa, 약 3 내지 약 18 kDa, 약 3 내지 약 16 kDa, 약 3 내지 약 15 kDa, 약 3 내지 약 13 kDa, 약 3 내지 약 11 kDa, 약 3 내지 약 10 kDa, 약 3 내지 약 8 kDa, 약 3 내지 약 5 kDa, 약 3 내지 약 3.4 kDa, 약 8 내지 약 30 kDa, 약 8 내지 약 27 kDa, 약 8 내지 약 25 kDa, 약 8 내지 약 22 kDa, 약 8 내지 약 20 kDa, 약 8 내지 약 18 kDa, 약 8 내지 약 16 kDa, 약 8 내지 약 15 kDa, 약 8 내지 약 13 kDa, 약 8 내지 약 11 kDa, 약 8 내지 약 10 kDa, 약 9 내지 약 15 kDa, 약 9 내지 약 14 kDa, 약 9 내지 약 13 kDa, 약 9 내지 약 12 kDa, 약 9 내지 약 11 kDa, 약 9.5 내지 약 10.5 kDa, 또는 약 10 kDa일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [261]
- [262] 또한, 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 결합체는 인터루킨 2 아날로그와 면역글로불린 Fc 영역(F)이 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커(L)를 통해 공유 결합으로 연결된 구조 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [263] 다른 하나의 구체적인 실시 형태에서, 상기 지속형 결합체에서, 상기 L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며, F는 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역일 수 있다. 보다 구체적으로는, 상기 이량체 형태 면역글로불린 Fc 영역 중 하나의 Fc 영역에 X 한 분자가 상기 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커를 통하여 서로 공유결합적으로 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 다른 구체적인 실시 형태에서는 상기 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커의 한 말단이 상기 이량체 형태 면역글로불린 Fc 영역의 두 Fc 영역 사슬 중 하나의 Fc 영역 사슬에만 연결되어 있을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [264] 본 발명에서 사용될 수 있는 폴리에틸렌 글리콜 링커의 분자량은 0 초과 200 kDa 범위, 구체적으로, 약 1 내지 100 kDa 범위, 약 1 내지 50 kDa 범위, 약 1 내지 30 kDa 범위, 약 2 내지 30 kDa 범위, 약 1 내지 20kDa 범위, 보다 더 구체적으로 약 3.4kDa 내지 10 kDa, 범위, 보다 더 구체적으로 약 3.4kDa일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 F에 해당하는 폴리펩타이드와 결합되는 본 발명의 비펩타이드성 링커는 한 종류의 중합체뿐만 아니라 상이한 종류의 중합체들의 조합이 사용될 수도 있다.
- [265] 본 발명에서 용어, "약"은 ± 0.5 , ± 0.4 , ± 0.3 , ± 0.2 , ± 0.1 등을 모두 포함하는 범위로, 약 이란 용어 뒤에 나오는 수치와 동등하거나 유사한 범위의 수치를 모두 포함하나, 이에 제한되지 않는다.
- [266]
- [267] 구체적으로, 상기 비펩타이드성 링커는 F 및 X와 결합하지 않은 상태에서 양 말단에 반응기를 갖고, 상기 반응기를 통해 F 및 X와 결합하는 것일 수 있다.
- [268] 하나의 구체예로, 상기 링커의 양 말단은 면역글로불린 Fc 영역의 티올기, 아미노기, 하이드록실기 및 인터루킨 2 아날로그(X)의 티올기, 아미노기, 아지드기, 하이드록실기에 결합할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [269] 구체적으로, 상기 링커는 양쪽 말단에 각각 면역글로불린 Fc 영역 및 인터루킨 2 아날로그(X)와 결합될 수 있는 반응기, 구체적으로는 면역글로불린 Fc 영역의 시스테인의 티올기; N-말단, 리신, 아르기닌, 글루타민 및/또는 히스티딘에 위치한 아미노기; 및/또는 C-말단에 위치한 하이드록실기와 결합되고, 인터루킨 2 아날로그(X)의 시스테인의 티올기; 리신, 아르기닌, 글루타민 및/또는 히스티딘의 아미노기; 아지도리신의 아지드기; 및/또는 하이드록실기와 결합될 수 있는 반응기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [270] 보다 구체적으로, 상기 링커의 반응기는 알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석시니미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [271] 상기에서, 알데히드기로 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기를 예로 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [272] 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 발레르에이트, 석시니미딜 메틸 부타노에이트, 석시니미딜 메틸프로피온에이트, 석시니미딜 부타노에이트, 석시니미딜 프로피오네이트, N-하이드록시석시니미드, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [273] 상기 링커는 상기와 같은 반응기를 통해 면역글로불린 Fc 영역인 F 및 인터루킨 2 아날로그인 X에 연결되어, 링커 연결부로 전환될 수 있다.
- [274] 또한, 알데히드 결합에 의한 환원성 알킬화로 생성된 최종 산물은 아미드 결합으로 연결된 것보다 훨씬 안정적이다. 알데히드 반응기는 낮은 pH에서 N-말단에

선택적으로 반응하며, 높은 pH, 예를 들어 pH 9.0 조건에서는 라이신 잔기와 공유 결합을 형성할 수 있다.

[275] 또한, 상기 링커의 양쪽 말단의 반응기는 서로 동일하거나 또는 서로 상이할 수 있으며, 예를 들어, 양 말단에 알데히드기를 갖거나, 또는, 한쪽 말단에는 말레이미드기를, 다른 쪽 말단에는 알데히드기, 프로피온 알데히드기, 또는 부틸 알데히드기를 가질 수 있다. 그러나, 링커의 각 말단에 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역과 X가 결합될 수 있다면, 특별히 이에 제한되지 않는다.

[276] 예를 들어, 상기 링커의 한쪽 말단에는 반응기로서 말레이미드기를 포함하고, 다른 쪽 말단에는 알데히드기, 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기 등을 포함할 수 있다.

[277] 양쪽 말단에 히드록시 반응기를 갖는 폴리에틸렌글리콜을 링커로 이용하는 경우에는 공지의 화학반응에 의해 상기 히드록시기를 상기 다양한 반응기로 활성화하거나, 상업적으로 입수 가능한 변형된 반응기를 갖는 폴리에틸렌글리콜을 이용하여 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체를 제조할 수 있다.

[278] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 링커는 X의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[279] 구체적으로, 상기 시스테인 잔기의 -SH 기에 링커의 반응기가 연결될 수 있으며, 반응기에 대해서는 앞서 기술한 내용이 모두 적용된다. 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드기는 X의 -SH 기와 티오에테르(thioether) 결합으로 연결하고, 알데히드기는 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc의 -NH₂기와 환원적 아민화 반응을 통해 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[280] 다른 구체적인 실시 형태에서 상기 링커는 X의 라이신 잔기, 보다 구체적으로, 라이신의 아미노기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[281] 또한, 상기 결합체에서, 링커의 반응기가 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단에 위치한 -NH₂와 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[282] 또한, 상기 결합체에서, 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그는 반응기를 갖는 링커와 C-말단을 통해 연결될 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.

[283] 본 발명에서 "C-말단"은, 펩타이드의 카르복시 말단을 의미하는 것으로, 본 발명의 목적상 링커와 결합할 수 있는 위치를 말한다. 그 예로, 이에 제한되지는 않으나, C-말단의 최말단 아미노산 잔기뿐만 아니라 C-말단 주위의 아미노산 잔기를 모두 포함할 수 있으며, 구체적으로는 최말단으로부터 첫 번째 내지 20 번째의 아미노산 잔기를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[284]

[285] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함한다.

[286]

- [287] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체는 천연형 인터루킨 2, 알테스루킨, 또는 이를 포함하는 지속형 결합체의 인터루킨 2 알파 수용체 결합력과 비교하여, 아예 결합력을 상실하거나, 약 0.001배 이상, 약 0.005배 이상, 약 0.01배 이상, 약 0.05배 이상, 약 0.1배 이상, 약 0.3배 이상, 약 0.5배 이상, 약 0.6배 이상, 약 0.7배 이상, 약 0.8배 이상, 약 0.9배 이상, 약 1.1배 이상, 약 1.3배 이상, 약 1.5배 이상, 약 1.7배 이상의 인터루킨 2 알파 수용체 결합력을 갖는 것일 수 있으나, 그 수치는 한정되지 않으며 결합력이 천연형 인터루킨 2 또는 알테스루킨과 대비하여 변경되었으면 본 발명의 범주에 속한다.
- [288] 또한, 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체는 천연형 인터루킨 2, 알테스루킨, 또는 이를 포함하는 지속형 결합체의 인터루킨 2 베타 수용체 결합력과 비교하여 약 0.1배 이상, 약 0.3배 이상, 약 0.5배 이상, 약 0.7배 이상, 약 1.0배 이상, 약 10배 이상, 약 20배 이상, 약 30배 이상, 약 40배 이상, 약 50배 이상, 약 60배 이상, 약 70배 이상, 약 80배 이상, 약 90배 이상, 약 100배, 약 130배, 약 150배, 약 200배 이상의 인터루킨 2 베타 수용체 결합력을 갖는 것일 수 있으나, 그 수치는 한정되지 않으며 결합력이 천연형 인터루킨 2 또는 알테스루킨과 대비하여 변경, 또는 증가되었으면 본 발명의 범주에 속한다.
- [289]
- [290] 본 명세서에서 따로 가리키는 바가 없으면, 본 발명에 따른 "인터루킨 2 아날로그" 또는 인터루킨 2 아날로그가 생체적합성 물질에 공유결합으로 연결된 "결합체"에 대한 명세서 상세한 설명이나 청구 범위의 기술은 해당 인터루킨 2 아날로그 또는 결합체는 물론이고, 해당 인터루킨 2 아날로그 또는 결합체의 염(예컨대, 상기 인터루킨 2 아날로그의 약학적으로 허용가능한 염), 또는 이의 용매화물의 형태를 모두 포함하는 범주에도 적용된다. 따라서 명세서에 "인터루킨 2 아날로그" 또는 "결합체"라고만 기재되어 있더라도 해당 기재 내용은 그 특정 염, 그 특정 용매화물, 그 특정 염의 특정 용매화물에도 마찬가지로 적용된다. 이러한 염 형태는 예를 들어 약학적으로 허용되는 염의 염을 사용한 형태일 수 있다. 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [291] 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [292] 상기 용어, "약학적으로 허용되는"은 의약학적 판단의 범위 내에서, 과도한 독성, 자극, 또는 알레르기 반응 등을 유발하지 않고 원하는 용도에 효과적으로 사용 가능한 물질을 의미한다.
- [293] 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용되는 염"이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 적합

한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.

[294] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.

[295]

[296] 본 발명에 따른 조성물은 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 조성물일 수 있고, 구체적으로는 암 예방 또는 치료 용도를 갖는 약학적 조성물이면서 면역관문 억제제 또는 이를 포함하는 조성물과 병용 투여되는 것일 수 있다. 상기 인터루킨 2 아날로그, 이의 지속형 결합체는 상기에서 설명한 바와 같다. 더 구체적으로는, 약리학적 유효량의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 포함하고, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하면서, 약리학적 유효량의 면역관문 억제제 또는 이를 포함하는 조성물과 병용 투여되는 것일 수 있다.

[297] 또는, 본 발명의 조성물은 면역관문 억제제를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[298]

[299] 본 발명에 따른 조성물의 구체적인 예로, 서열번호 3 내지 106으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 인터루킨 2 아날로그 또는 이를 포함하는 지속형 결합체를 포함할 수 있고, 보다 구체적으로, 서열번호 22, 42, 53, 87, 105, 및 106으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 인터루킨 2 아날로그 또는 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이를 포함하는 지속형 결합체를 포함하면서 면역관문 억제제 또는 이를 포함하는 조성물과 병용 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[300]

[301] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 또는 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체를 포함하는 조성물은 면역관문 억제제를 포함하는 조성물과 동시, 순차적 또는 역순으로 병용 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[302] 본 발명에서, "약리학적 유효량"이란, 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 및 면역관문 억제제가 암의 예방 또는 치료 효과를 나타내면서도 환자에게 독성이나 부작용을 나타내지 않는 안전한 투여 용량을 의미한다. 구체적으로는, 인터루킨 2 수용체(예를 들어 베타 및/또는 알파 수용체)에 유의미한 활성을 나타낼 수 있는 투여 용량 또는 T 세포를 활성화시킬 수 있는 투여 용량을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[303]

[304] 본 발명에 따른 조성물은 하기 특성 중 하나 이상의 특성을 나타내는 것일 수 있으나, 면역 반응 증가 및 항암 효과 등을 나타내는 이상, 제한되는 것은 아니다:

[305] (i) 알데스루킨 단독 투여 또는 알데스루킨과 면역관문 억제제의 병용 투여에 비해 높은 혈중 노출도;

- [306] (ii) 알테스루킨 단독 투여 또는 알테스루킨과 면역관문 억제제의 병용 투여에 비해 우수한 종양 성장 억제;
- [307] (iii) 알테스루킨 단독 투여 또는 알테스루킨과 면역관문 억제제의 병용 투여에 비해 우수한 기억 T 세포 생성 반응.
- [308] (iv) 알테스루킨 단독 투여 또는 알테스루킨과 면역관문 억제제의 병용 투여에 비해 우수한 면역관문 단백질 활성화 억제; 및
- [309] (v) 알테스루킨 단독 투여 또는 알테스루킨과 면역관문 억제제의 병용 투여에 비해 우수한 T 세포 활성화.
- [310]
- [311] T 세포 성장 인자로 알려진 인터루킨 2는 면역 조절에 관여하는 단백질로, T세포를 증식시키고, B세포를 자극시키며, T세포에 작용하여 γ -인터페론을 분비시키는 활성을 갖는다. 이러한 인터루킨 2의 면역 조절 활성화에 기초하여 체내 면역 시스템을 이용해 암 세포를 제거함으로써 암의 예방 및 치료 효과를 얻을 수 있다.
- [312] 특히, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 신호 전달에서 주요한 역할을 담당하는 인터루킨 2 베타 수용체에 대한 증대된 결합력을 갖고, 이는 개체의 면역 시스템에서 보다 효과적인 항암 효과로 이어지게 된다. 또한, 상기 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 지속형 결합체는 증대된 인터루킨 2 베타 수용체에 대한 결합력을 가지면서도 지속성이 높아지면서 혈중 노출도가 높아져 우수한 생체 이용율을 나타내며, 결국 우수한 종양 성장 억제능을 가져 효과적인 암 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다. 뿐만 아니라, 우수한 기억 T 세포 생성능을 가져 개체의 면역 기억 반응을 통한 암의 재발 억제 효과를 나타낼 수 있어, 안전하면서도 효과적인 암 치료제로 활용될 수 있다.
- [313]
- [314] 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그와 함께 면역관문 억제제를 이용할 경우, 면역관문 억제제가 T 세포를 활성화시킴으로써 T 세포의 면역관문을 활용하여 면역을 회피하는 암 세포를 공격하도록 하여 우수한 병용 투여 효과를 얻을 수 있다.
- [315] 본 발명에서, “면역관문 억제제(immune checkpoint inhibitor)”는 T 세포 억제에 관여하는 면역관문 단백질(immune checkpoint protein)에 결합하여 이의 활성을 차단함으로써 T 세포를 활성화시켜 암세포를 공격하는 치료제를 의미한다.
- [316] 상기 면역관문 억제제는 면역관문 단백질(예: PD-1)과 암세포의 리간드(예: PD-L1)가 결합하지 못하도록 방해함으로써 원래 면역세포(예: T 세포) 기능을 유지하도록 하는 치료제를 의미한다.
- [317] 상기 면역관문 억제제는 펩티드, 항체 또는 이의 항원-결합 단편, 핵산 분자 및 소형 분자를 포함할 수 있으나, 길항 작용을 할 수 있는 한 이에 제한되지 않는다.
- [318] 본 발명의 면역관문 억제제의 예로, 항-PD-1 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 들 수 있다.

[319]

[320] PD-1(programmed cell death-1)은 가장 잘 알려진 면역관문 단백질로, 면역세포 바깥쪽에 존재하며 인체의 다양한 세포들의 PD-L1(programmed death-ligand 1) 단백질과 특이적으로 결합할 수 있다. PD-L1과 PD-1이 결합하면 면역세포 기능이 비활성화돼 면역반응이 억제되어 불필요한 자가면역반응이 일어나지 않게 된다. 그러나, 암세포가 표면에 PD-L1 단백질을 많이 발현하여 면역세포의 PD-1과 결합하도록 함으로써 T 세포가 기능하지 못하도록 하고 체내 면역반응이 일어나지 않게 할 수 있다. 이 경우, 암세포가 면역반응을 회피하여 생존할 수 있게 된다.

[321]

[322] 본 발명의 면역관문 억제제는 암세포가 면역회피를 위해 이용하는 면역관문 단백질에 대해 길항 작용을 함으로써 암세포가 무력화시키는 면역반응이 적절히 일어날 수 있도록 하여 체내 면역 반응을 이용한 항암 작용을 할 수 있다.

[323]

[324] 본 발명에서, 상기 항-PD-1 (programmed cell death-1) 항체는 니볼루맵(nivolumab), 펌브롤리주맵(pembrolizumab), 세미플리맵(cemiplimab), 스파탈리주맵(spartalizumab), 캄렐리주맵(camrelizumab), 신틸리맵(sintilimab), 티슬렐리주맵(tislelizumab), 토리팔리맵(toripalimab), 도스타리맵(dostarlimab), INCMGA00012, AMP-224 및 AMP-514로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[325]

[326] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 면역관문 억제제 또는 이를 포함하는 조성물과 병용 투여되어 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체와 면역관문 억제제의 상승 작용을 통해 우수한 항암 효능을 보이면서도 부작용을 낮추는 것일 수 있다.

[327]

[328] 면역관문 억제제는 종양미세환경(tumor microenvironment, TME)의 표현형에 따라 반응성이 다른 것으로 알려져 있는데, 면역-비침투성 종양(cold tumor)에서는 면역관문 억제제의 반응성이 매우 낮기 때문에 면역관문 억제제를 암 치료제로서 사용하기 어려운 한계를 갖는다.

[329]

본 발명의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체는 면역관문 억제제에 대한 반응성이 낮은 종양미세환경을 변화시켜 면역-비침투성 종양에서 침투성 종양(hot tumor)으로의 전환을 유도할 수 있다. 따라서, 면역관문 억제제와 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 함께 투여했을 때 우수한 치료 효과를 거둘 수 있다.

[330]

- [331] 면역관문 단백질 중 하나인, PD-1(programmed cell death-1)은 면역세포 바깥쪽에 존재하며 인체의 다양한 세포들의 PD-L1(programmed death-ligand 1) 단백질과 특이적으로 결합할 수 있다.
- [332] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 PD-1 길항제에 대한 낮은 반응성을 갖는 암을 보다 효과적으로 치료할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [333] 본 발명에서, 상기 암은 신세포암, 흑색종, 대장암, 간암, 자궁암, 난소암, 췌장암, 담낭암, 폐암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 피부암, 유방암, 방광암, 위암, 두부 또는 경부암, 식도암, 후두암, 골암, 직장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장골반 암종, CNS 종양, 1차 CNS 림프종, 척수종양, 뇌종양, 신경교종(성상세포종(astrocytoma), 교모세포종(glioblastoma), 핍지교종(oligodendroglioma) 상의세포종(ependymoma), 배아세포종, 수막종, 뇌간신경교종, 뇌하수체 선종, 신경초종, 선천성종양, 두개인두종, 또는 뇌종양을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [334] 구체적으로, 상기 암은 대장암, 간암, 난소암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 폐암, 피부암, 흑색종, 유방암, 방광암, 및 위암으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있다. 또는 본 발명에 따른 암은 원발성 암, 재발성 암, 또는 전이성 암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 전이성 신세포암, 또는 전이성 흑색종을 포함할 수 있다. 더욱 구체적으로, 상기 암은 PD-1 길항제에 대해 반응성이 낮은 암종일 수 있다.
- [335]
- [336] 특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 0.01 내지 99% 중량 대 부피로 함유할 수 있다.
- [337] 구체적으로, 본 발명의 조성물은 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 및 면역관문 억제제를 각각 0.00001 mg/mL ~ 100 mg/mL으로 투여하도록 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [338] 보다 구체적으로, 본 발명의 조성물은 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체를 0.0001 내지 2120 mg/kg으로 포함하고, 면역관문 억제제는 0.0001 내지 1000 mg/kg으로 상기 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체와 병용 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또는 본 발명의 조성물은 인터루킨 2 아날로그를 0.00005 내지 500 mg/kg으로 포함하고 면역관문 억제제는 0.0001 내지 1000 mg/kg으로 병용 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [339] 다만, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체와 우수한 병용 투여의 효과를 나타낼 수 있도록 면역관문 억제제의 투여 용량을 변경할 수 있다.

- [340] 예를 들어, 상기 본 발명의 조성물의 면역관문 억제제가 포함되는 용량은 PD-1 억제제 기준으로 표현되는 것일 수 있고, 다른 면역관문 억제제를 포함하는 경우에는 상기 PD-1 억제제의 투여량에 상응하는 용량으로 면역관문 억제제를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [341] 또한, 상기 본 발명의 조성물에 포함되는 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체와 면역관문 억제제는 적절한 횟수로 나누어 투여될 수 있고, 투여 횟수는 서로 동일하거나 다를 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체가 주당 1회 투여될 때 면역관문 억제제는 주당 1회, 2회 또는 그 이상 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [342]
- [343] 본 발명에서 용어 "예방"은 상기 인터루킨 2 아날로그 (예컨대 상기 인터루킨 2 아날로그 자체 또는 이에 생체적합성 물질이 결합된 지속형 결합체 형태) 또는 이를 포함하는 조성물; 및 면역관문 억제제 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 암 또는 종양을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [344] 본 발명에서 용어 "치료"는 상기 인터루킨 2 아날로그 (예컨대 상기 인터루킨 2 아날로그 자체 또는 이에 생체적합성 물질이 결합된 지속형 결합체 형태) 또는 이를 포함하는 조성물; 및 면역관문 억제제 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 암의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.
- [345] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체 및 면역관문 억제제의 사용은 혈중 노출도, 혈중 반감기 및 생체 내 효력 지속 효과의 획기적인 증가로 인해 매일 투여되어야 하는 만성환자에게 투여 횟수를 감소시켜 환자의 삶의 질을 향상시킬 수 있는 큰 장점이 있다.
- [346]
- [347] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 약학적으로 허용가능한 담체, 또는 희석제는 비자연적으로 발생된 것일 수 있다.
- [348]
- [349] 본 발명에서 용어 "약학적으로 허용가능한"이란 치료효과를 나타낼 수 있을 정도의 충분한 양과 부작용을 일으키지 않는 것을 의미하며, 암의 종류, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 방법, 투여횟수, 치료 기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물 등 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [350] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 또는 면역관문 억제제를 포함한 약학적 조성물은 약학적으로 허용가능한 부형제를 포함할 수 있다. 상기 부형제는 특별히 이에 제한되지는 않으나, 경구 투여 시에는 결합제, 활택제, 붕해제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있고, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장화제, 안정화제

등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 율활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

- [351] 본 발명의 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용가능한 부형제와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 제조할 수 있으며, 주사제의 경우에는 단위 투여 앰플 또는 다수회 투여 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.
- [352] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아, 알지네이트, 젤라틴, 인산칼슘, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 스테아르산마그네슘 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충전제, 항응집제, 율활제, 습윤제, 향료, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [353] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [354] 또한, 상기 조성물은 약학 분야에서 통상의 방법에 따라 환자의 신체 내 투여에 적합한 단위 투여형의 제제, 구체적으로는 단백질 의약품의 투여에 유용한 제제 형태로 제형화시켜 당업계에서 통상적으로 사용하는 투여 방법을 이용하여 경구, 또는 피부, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 수막강 내, 심실 내, 폐, 경피, 피하, 복 내, 비강 내, 소화관 내, 국소, 설하, 질 내 또는 직장 경로를 포함하는 비경구 투여 경로에 의하여 투여될 수 있으나, 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [355] 또한, 상기 결합체는 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 탄수화물, 아스코르브산(ascorbic acid) 또는 글루타티온과 같은 항산화제(antioxidants), 킬레이트제, 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers) 등이 약제로 사용될 수 있다.
- [356]
- [357] 본 발명의 다른 양태는 인터루킨 2 아날로그 또는 이를 포함하는 지속형 결합체를 포함하는 약학적 조성물을 면역관문 억제제 또는 이를 포함하는 조성물과 병용하여 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 상기 방법에서, 인터루킨 2 아날로그 또는 이를 포함하는 지속형 결합체를 포함하는 약학적 조성물 및 면역관문 억제제 또는 이를 포함하는 조성물은 동시, 순차, 또는 역순으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [358] 상기 인터루킨 2 아날로그 및/또는 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체, 면역관문 억제제, 이들을 포함하는 조성물, 암, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

- [359] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 인터루킨 2 아날로그 또는 이를 포함하는 지속형 결합체, 및 면역관문 억제제를 개체에 병용 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법이다.
- [360] 상기 방법은 인터루킨 2 아날로그 또는 이를 포함하는 지속형 결합체, 및 면역관문 억제제를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 것이거나, 또는 인터루킨 2 아날로그 또는 이를 포함하는 지속형 결합체, 및 면역관문 억제제를 별개 제제로 병용 투여 하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [361] 본 발명의 방법은 (i) 인터루킨 2 아날로그 또는 이를 포함하는 지속형 결합체 및 (ii) 면역관문 억제제를 하나의 제제로서 투여하거나, 또는 개별 제제를 동시, 개별, 순차 또는 역순으로 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [362] 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이를 포함하는 지속형 결합체, 면역관문 억제제, 조성물, 암, 예방, 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [363]
- [364] 본 발명에서 상기 개체는 암이 발병하였거나 의심되는 개체로서, 인간을 포함 한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미하나, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 및/또는 결합체, 면역관문 억제제, 또는 이들을 포함하는 상기 조성물로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다.
- [365] 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질(예를 들어, 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체, 또는 면역관문 억제제)을 도입하는 것을 의미하며, 투여 경로는 특별히 이에 제한되지 않으나, 생체 내 표적에 도달할 수 있는 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 예를 들어 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 또는 직장 내 투여 등이 될 수 있다.
- [366]
- [367] 본 발명의 방법은 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 약학적 조성물을 약학적 유효량으로 투여하고, 면역관문 억제제 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 약학적 유효량으로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의에 의해 결정될 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적인 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적인 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.
- [368]
- [369] 본 발명의 방법에서, 투여시 투여량과 횟수는 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중등도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약

물의 종류에 따라 결정된다. 구체적으로, 본 발명의 조성물은 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이를 포함하는 지속형 결합체 및 면역관문 억제제를 약학적 유효량으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [370] 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 지속형 결합체 및 면역관문 억제제를 약학적 유효량으로 포함하는 것은, 인터루킨 2 아날로그 또는 지속형 결합체 및 면역관문 억제제로 인한 목적하는 약리 활성(예를 들어, 암의 예방, 개선 또는 치료)을 얻을 수 있는 정도를 의미하고, 또한 투여되는 개체에서 독성 또는 부작용이 일어나지 않거나 미미한 수준으로서 약학적으로 허용되는 수준을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이와 같은 약학적 유효량은 투여 횟수, 환자, 제형 등을 종합적으로 고려하여 결정될 수 있다.
- [371] 특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 상기 약학적 조성물은 상기 성분(유효성분)을 0.01 내지 99% 중량 대 부피로 함유할 수 있다.
- [372]
- [373] 본 발명의 조성물의 총 유효량은 단일 투여량 (single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량 (multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법 (fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 병용 투여되는 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체 및 면역관문 억제제의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg 일 수 있다. 그러나 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 결합체 및 면역관문 억제제의 용량은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설을 등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 본 발명의 조성물의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.
- [374] 본 발명의 약학적 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하여, 본 발명의 약학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다. 상기 약학적 조성물은 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 또는 직장 내 투여 경로로 투여되는 것일 수 있으나, 목적하는 약리 효과를 얻을 수 있다면 특정 투여 경로로 제한되지 않는다.
- [375] 한 예로, 본 발명의 약학적 조성물은 1주에 1회, 2주에 1회, 3주에 1회, 4주에 1회, 또는 1개월에 1회 투여되는 것일 수 있고, 또는 1주 내지 1개월 범위의 시간 간격으로 1회 또는 다회 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [376] 구체적으로, 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체 및 면역관문 억제제는 각각 일주일에 환자 체중 1 kg당 약 0.00001 mg 이상, 0.0000001 mg 이상 투여

되는 것일 수 있고, 두 물질을 병용할 때에는 총량이 일주일에 환자 체중 1 kg당 약 0.00001 mg 이상 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [377] 구체적으로, 본 발명의 방법은 일주일에 환자 체중 1 kg당 인터루킨 2 아날로그 그 지속형 결합체를 0.00001 내지 175 mg, 면역관문 억제제를 0.0000001 내지 100 mg 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또는 본 발명의 방법은 일주일에 환자 체중 1 kg당 인터루킨 2 아날로그를 0.000001 내지 50 mg, 면역관문 억제제를 0.0000001 내지 100 mg 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [378] 또는 본 발명의 방법은 일주일 동안 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 0.001 내지 33000 nmol/kg으로, 면역관문 억제제를 0.0001 내지 7000 nmol/kg으로 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [379] 또한, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체와 면역관문 억제제는 적절한 횟수로 나누어 투여될 수 있고, 투여 횟수는 서로 동일하거나 다를 수 있다. 예를 들어, 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체가 주당 1회 투여될 때 면역관문 억제제는 주당 1회, 2회 또는 그 이상 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [380]
- [381] 다만, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체와 우수한 병용 투여의 효과를 나타낼 수 있도록 면역관문 억제제의 투여 용량을 변경할 수 있다.
- [382] 예를 들어, 상기 면역관문 억제제의 투여 용량은 PD-1 억제제 기준으로 표현되는 것일 수 있고, 다른 면역관문 억제제의 경우, 상기 PD-1 억제제의 투여량과 대응되는 용량으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [383]
- [384] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 암의 예방 또는 치료용 약제의 제조를 위한 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 또는 이를 포함하는 조성물로서, 면역관문 억제제와 병용 투여되는 조성물의 용도이다.
- [385] 본 발명을 구현하는 또 다른 하나의 양태는 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체 및 면역관문 억제제의 암 예방 또는 치료를 위한 병용 용도이다.
- [386] 상기 인터루킨 2 아날로그 및/또는 이의 지속형 결합체, 면역관문 억제제, 또는 이들을 포함하는 조성물, 암, 예방, 치료, 투여 경로 및 투여 횟수에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [387]
- [388] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체; 또는 이를 포함하는 조성물로서, 면역관문 억제제와 병용 투여되는 조성물의 암 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.
- [389] 상기 인터루킨 2 아날로그 및/또는 이의 지속형 결합체, 면역관문 억제제, 또는 이들을 포함하는 조성물, 암, 예방, 치료, 투여 경로 및 투여 횟수에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[390]

[391] 한편, 본원 명세서에서 문맥상 달리 요구하지 않는 한, “포함한다”, “포함하는”, “함유하는”, 등의 표현은 명시된 정수(integer) 또는 정수 그룹의 포함을 의미하지만, 다른 정수 또는 정수의 집합을 배제하는 것이 아니라고 이해되어야 한다.

[392]

[393] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[394]

[395] **실시예 1: 천연형 인터루킨 2 및 인터루킨 2 아날로그 발현 벡터의 제작**

[396]

[397] 133개의 아미노산을 코딩하는 천연형 인터루킨 2 발현 벡터를 제작하기 위해, 보고된 인터루킨 2 서열 (NM_000586.3; 서열번호 1)을 바탕으로 합성한 인터루킨 2를 pET-22b 벡터 (Novagen)에 클로닝하였다. 아울러, 상기 인터루킨 2를 주형으로 하여 인터루킨 2의 아미노산을 변형시킨 신규한 인터루킨 2 아날로그를 제작하였다.

[398]

인터루킨 2 아날로그 증폭을 위한 PCR 조건은 95°C 30초, 55°C에서 60초, 65°C에서 6.5분으로 이 과정을 16회 반복하였다. 상기 조건에서 얻어진 돌연변이 (mutagenesis) 생성물에 대하여 서열 분석을 수행하였으며, 각각의 인터루킨 2 아날로그의 목적하는 변이 위치에 천연형 기준으로 아래 표 1에 표시한 변이가 있는 것을 확인하였다. 이렇게 얻어진 발현 벡터를 pET22b-인터루킨 2 아날로그 1 내지 105라 명명하였다.

[399]

하기 표 1에 각각의 아미노산의 변화 서열 및 아날로그 이름을 나타냈다. 이들 인터루킨 2 아날로그를 제작하기 위해 순방향 (F) 및 역방향 (R) 프라이머로 PCR을 진행하여 각각의 아날로그 유전자를 증폭하였다.

[400]

아래 표 1에서 아날로그 1은 알테스루킨이고, 프라이머 #1 내지 #204는 서열번호 214 내지 417에 각각 해당한다. 표 1은 인터루킨 2 아날로그 종류와 변이 위치 및 그 변화 서열을 정리한 것이다.

[401]

[402] [표1]

아날로그	변이 위치 및 변화 서열	프라이머# (프라이머 번호)
1	desA1, C125S	197, 198, 201, 202
2	desA1, C125S, S87C	197, 198, 201, 202, 149, 150
3	desA1, C125S, K32C	197, 198, 201, 202, 19, 20
4	desA1, C125S, K35C	197, 198, 201, 202, 21, 22
5	desA1, C125S, K43C	197, 198, 201, 202, 47, 48
6	desA1, C125S, K48C	197, 198, 201, 202, 53, 54
7	desA1, C125S, K49C	197, 198, 201, 202, 55, 56
8	desA1, C125S, K76C	197, 198, 201, 202, 73, 74
9	desA1, C125S, R38A	197, 198, 201, 202, 25, 26
10	desA1, C125S, F42K	197, 198, 201, 202, 35, 36
11	desA1, C125S, F42A	197, 198, 201, 202, 33, 34
12	desA1, C125S, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36
13	desA1, C125S, R38A, F42A	197, 198, 201, 202, 25, 26, 33, 34
14	desA1, C125S, L19Y, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 13, 14, 25, 26, 35, 36
15	desA1, C125S, R38A, F42K, D84E	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 109, 110
16	desA1, C125S, R38A, F42K, N86Q	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 153, 154
17	desA1, C125S, R38A, F42K, V91T	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 165, 166
18	desA1, C125S, R38A, F42K, E61Q	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 59, 60
19	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 97, 98, 167, 168
20	desA1, C125S, R38A, F42K, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26,

[403]

		35, 36, 139, 140, 167, 168
21	desAl, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 167, 168
22	desAl, C125S, L12V, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 3, 4, 25, 26, 35, 36
23	desAl, C125S, L12F, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 1, 2, 25, 26, 35, 36
24	desAl, C125S, L19V, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 11, 12, 25, 26, 35, 36
25	desAl, C125S, L19F, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 9, 10, 25, 26, 35, 36
26	DesAl, C125S, R38A, F42K, I89F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 157, 158
27	desAl, C125S, R38A, F42K, V91F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 163, 164
28	desAl, C125S, R38A, F42K, L94V	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36
29	desAl, C125S, R38A, F42K, Q126T	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 199, 200
30	desAl, C125S, R38A, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 97, 98, 169, 170
31	desAl, C125S, R38A, D84E	197, 198, 201, 202, 27, 28, 109, 110
32	desAl, C125S, R38A, R81D, D84E, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 95, 96, 169, 170
33	desAl, C125S, R38A, L80F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 77, 78
34	desAl, C125S, R38A, L80F, D84E	197, 198, 201, 202, 27, 28, 77, 78, 109, 110
35	desAl, C125S, R38A, L94F, L96F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 189, 190
36	desAl, C125S, R38A, L94F, L96V	197, 198, 201, 202, 27, 28,

[404]

		193, 194
37	desAl, C125S, R38A, L94F, L96I	197, 198, 201, 202, 27, 28, 191, 192
38	desAl, C125S, R38A, F42X, R81D, I92F, L94F, L96F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 97, 98, 175, 176
39	desAl, C125S, R38A, F42X, R81D, I92F, L94F, L96V	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 97, 98, 179, 180
40	desAl, C125S, R38A, F42X, R81D, I92F, L94F, L96I	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 97, 98, 177, 178
41	desAl, C125S, L80F, R81D, L85V, L86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 41, 42, 79, 80, 167, 168
42	desAl, C125S, R38A, F42X, R81E, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 103, 104, 169, 170
43	desAl, C125S, R38A, F42X, R81D, I92L	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 183, 184
44	desAl, C125S, R38A, F42X, R81D, D84V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 113, 114, 169, 170
45	desAl, C125S, R38A, F42X, R81D, D84F, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 111, 112, 169, 170
46	desAl, C125S, D20V, R38A, F42X, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 17, 18, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 169, 170
47	desAl, C125S, D20F, R38A, F42X, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 15, 16, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 169, 170
48	desAl, C125S, R38A, F42X, R81D, N88V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 155, 156, 169, 170
49	desAl, C125S, R38A, F42X, R81D, N88F, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26,

[405]

		35, 36, 99, 100, 151, 152, 169, 170
50	desk1, C125S, F42X, L80F, R81D, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 79, 80, 139, 140, 169, 170
51	desk1, C125S, B61Q, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 59, 60, 99, 100, 169, 170
52	desk1, C125S, B38A, F42X, L80F, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 169, 170
53	desk1, C125S, B38A, F42X, L80F, R81D, D84E, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 95, 96, 169, 170
54	desk1, C125S, B38A, F42X, Q74H, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 71, 72, 99, 100, 169, 170
55	desk1, C125S, B38A, F42X, Q74H, L80F, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 71, 72, 79, 80, 169, 170
56	desk1, C125S, B38A, F42X, Y45A, Q74H, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 49, 50, 71, 72, 99, 100, 169, 170
57	desk1, C125S, B38A, F42X, Y45A, Q74H, L80F, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 49, 50, 71, 72, 79, 80, 169, 170
58	desk1, C125S, B38A, F42X, L80F, R81D, L85A, I86A, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 115, 116, 167, 168
59	desk1, C125S, B38A, F42X, L80F, R81D, L85A, I86A, I92Y	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 115, 116, 187, 188
60	desk1, C125S, B38A, F42X, Y45A, L80Y, L85A, I86A, I92Y	197, 198, 201, 202, 27, 28, 35, 36, 41, 42, 51, 52, 93, 94, 115, 116, 187, 188

[406]

61	desA1, C125S, R38A, F42X, L80Y, R81D, L85G, I86V, I92Y	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 87, 88, 125, 126, 187, 188
62	desA1, C125S, R38A, F42X, L80W, R81E, L85G, I86A, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 35, 36, 41, 42, 85, 86, 123, 124, 171, 172
63	desA1, C125S, R38A, F42X, L80D, R81E, L85T, I86G, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 75, 76, 133, 134, 167, 168
64	desA1, C125S, R38A, F42X, L80Y, R81N, L85V, I86V, I92Y	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 91, 92, 139, 140, 167, 168
65	desA1, C125S, R38A, F42X, L80Y, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 89, 90, 139, 140, 167, 168
66	desA1, C125S, R38A, F42X, L80F, R81E, L85F, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 81, 82, 121, 122, 167, 168
67	desA1, C125S, R38A, F42X, L80Y, R81D, L85F, I86V, I92W, E95D	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 87, 88, 121, 122, 185, 186, 195, 196
68	desA1, C125S, R38A, F42X, L80F, R81E, L85I, I86V, V91E, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 81, 82, 127, 128, 159, 160, 167, 168
69	desA1, C125S, R38A, F42X, L80Y, R81E, L85F, I86L, V91E, I92W, E95D	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 89, 90, 119, 120, 161, 162, 185, 186, 195, 196
70	desA1, C125S, R38A, F42X, L80Y, R81D, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 87, 88, 139, 140, 167, 168
71	desA1, C125S, R38A, F42X, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 81, 82, 139, 140,

[407]

		167, 168
72	desA1, C125S, R38A, F42X, L80F, R81D, L85V, I86G, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 135, 136, 167, 168
73	desA1, C125S, R38A, F42X, L80F, R81D, L85W, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 141, 142, 167, 168
74	desA1, C125S, R38D, F42X, L80Y, R81D, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 31, 32, 35, 36, 87, 88, 139, 140, 167, 168
75	desA1, C125S, R38A, F42X, Y45A, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 51, 52, 81, 82, 139, 140, 167, 168
76	desA1, C125S, R38A, F42X, K43Q, E61R, L80F, R81D, L85V, I86G, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 39, 40, 61, 62, 79, 80, 135, 136, 167, 168
77	desA1, C125S, R38A, F42X, K43E, E61R, L80F, R81D, L85W, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 37, 38, 61, 62, 79, 80, 143, 144, 167, 168
78	desA1, C125S, K35E, R38A, F42X, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 23, 24, 25, 26, 35, 36, 81, 82, 139, 140, 167, 168
79	desA1, C125S, K35E, R38A, F42X, Q74K, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 23, 24, 25, 26, 35, 36, 71, 72, 81, 82, 139, 140, 167, 168
80	desA1, C125S, K35E, R38A, F42X, Q74K, L80F, R81E, P82G, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 23, 24, 25, 26, 35, 36, 71, 72, 81, 82, 105, 106, 139, 140, 167, 168
81	desA1, C125S, K35E, R38A, F42X, Q74K, L80F, R81E, P82V, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 23, 24, 25, 26, 35, 36, 71, 72, 81, 82, 107, 108, 139, 140, 167, 168

[408]

82	desA1, C125S, L18R, Q22E, L80F, R81D, L85E, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 7, 8, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 79, 80, 117, 118, 167, 168
83	desA1, C125S, L18R, L19R, Q22E, L80F, R81D, L85E, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 5, 6, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 79, 80, 117, 118, 167, 168
84	desA1, C125S, L18R, Q22E, L80V, R81D, L85E, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 7, 8, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 83, 84, 117, 118, 167, 168
85	desA1, C125S, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 81, 82, 139, 140, 167, 168
86	desA1, C125S, L18R, Q22E, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 7, 8, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 81, 82, 139, 140, 167, 168
87	desA1, C125S, L18R, L19R, Q22E, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 5, 6, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 81, 82, 139, 140, 167, 168
88	desA1, C125S, E61D, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 57, 58, 81, 82, 139, 140, 167, 168
89	desA1, C125S, R38A, E68Q, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 35, 36, 43, 44, 65, 66, 81, 82, 139, 140, 167, 168
90	desA1, C125S, F42W, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 45, 46, 81, 82, 139, 140, 167, 168

[409]

91	desA1, C125S, E61Q, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 59, 60, 81, 82, 139, 140, 167, 168
92	desA1, C125S, L80F, R81E, L85V, I86V, V91T, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 81, 82, 139, 140, 147, 148, 167, 168
93	desA1, C125S, L80F, R81E, D84E, L85V, I86V, V91T, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 81, 82, 101, 102, 139, 140, 167, 168
94	desA1, C125S, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F, L94F, L96F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 81, 82, 139, 140, 173, 174
95	desA1, C125S, V69G, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 67, 68, 81, 82, 139, 140, 167, 168
96	desA1, C125S, V69G, Q74A, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 43, 44, 69, 70, 81, 82, 139, 140, 167, 168
97	desA1, C125S, R38A, L80F, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 35, 36, 41, 42, 79, 80, 167, 168
98	desA1, C125S, R38A, L80F, R81E, L85V, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 35, 36, 41, 42, 81, 82, 137, 138, 167, 168
99	desA1, C125S, R38A, L80F, R81E, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 35, 36, 41, 42, 81, 82, 131, 132, 167, 168
100	desA1, C125S, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26,

[410]

		29, 30, 35, 36, 41, 42, 81, 82, 145, 146, 167, 168
101	desA1, C125S, L80F, R81E, I86A, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 41, 42, 81, 82, 129, 130, 167, 168
102	desA1, C125S, L80F, R81E, L85V, I86V	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 41, 42, 81, 82, 139, 140, 181, 182
103	desA1, C125S, L18R, Q22E, R38A, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 7, 8, 27, 28, 35, 36, 41, 42, 81, 82, 139, 140, 167, 168
104	desA1, C125S, L18R, Q22E, E61D, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 7, 8, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 41, 42, 57, 58, 81, 82, 139, 140, 167, 168
105	desA1, C125S, L18R, Q22E, E68D, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 7, 8, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 41, 42, 63, 64, 81, 82, 139, 140, 167, 168

[411]

[412] desA1은 인터루킨 2의 첫번째 아미노산인 알라닌을 결실시킨 것을 의미한다.
 하기 표 2에 인터루킨 2 아날로그의 전장 길이 단백질 서열을 나타냈다. 하기 표
 2 내의 볼드체는 변이 위치를 나타낸 것이다. 표 2는 인터루킨 2 아날로그 아미노
 산 서열을 정리한 것이다.

[413]

[414] [표2]

아날로그	아미노산 서열	아미노산 서열 서열번호	염기 서열 서열번호
1	PTSSSTEKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPEKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENFHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	2	107
2	PTSSSTEKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPEKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENFHL RPRDLICNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	3	108
3	PTSSSTEKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YCNPKLTRML TFEFYMPEKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENFHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	4	109
4	PTSSSTEKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPEKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENFHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	5	110
5	PTSSSTEKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFCFYMPEKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENFHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	6	111
6	PTSSSTEKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPCIA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENFHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	7	112
7	PTSSSTEKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPECA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENFHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	8	113
8	PTSSSTEKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPEKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENFHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	9	114
9	PTSSSTEKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTAML TFEFYMPEKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENFHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	10	115

[415]

10	PTSSSTEXT QLOLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRL TKFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSNFHL RPDLSNIN VIVLELGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	11	116
11	PTSSSTEXT QLOLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRL TKFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSNFHL RPDLSNIN VIVLELGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	12	117
12	PTSSSTEXT QLOLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTAML TKFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSNFHL RPDLSNIN VIVLELGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	13	118
13	PTSSSTEXT QLOLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTAML TKFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSNFHL RPDLSNIN VIVLELGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	14	119
14	PTSSSTEXT QLOLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTAML TKFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSNFHL RPDLSNIN VIVLELGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	15	120
15	PTSSSTEXT QLOLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTAML TKFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSNFHL RPDLSNIN VIVLELGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	16	121
16	PTSSSTEXT QLOLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTAML TKFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSNFHL RPDLSNIN VIVLELGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	17	122
17	PTSSSTEXT QLOLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTAML TKFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSNFHL RPDLSNIN VIVLELGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	18	123
18	PTSSSTEXT QLOLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTAML TKFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSNFHL RPDLSNIN VIVLELGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	19	124
19	PTSSSTEXT QLOLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTAML TKFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSNFHL RPDLSNIN VIVLELGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	20	125
20	PTSSSTEXT QLOLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTAML TKFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSNFHL RPDLSNIN VIVLELGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	21	126

[416]

21	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHL BPRDLYSNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNB WITFSQSIIS TLT	22	127
22	PTSSSTKKT QVQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNB WITFSQSIIS TLT	23	128
23	PTSSSTKKT QVQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNB WITFSQSIIS TLT	24	129
24	PTSSSTKKT QLQLEHLWD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNB WITFSQSIIS TLT	25	130
25	PTSSSTKKT QLQLEHLFD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNB WITFSQSIIS TLT	26	131
26	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNB WITFSQSIIS TLT	27	132
27	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHL RPRDLISNIN FIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNB WITFSQSIIS TLT	28	133
28	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHL RPRDLISNIN VIVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNB WITFSQSIIS TLT	29	134
29	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNB WITFSQSIIS TLT	30	135
30	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHL BPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNB WITFSQSIIS TLT	31	136
31	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHL RPRELISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNB WITFSQSIIS TLT	32	137

[417]

32	PTSSSTEXT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TFEFYMPKEA TELEHLOCLE EELKPLEEVL NLAQSENPHL DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	33	138
33	PTSSSTEXT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TFEFYMPKEA TELEHLOCLE EELKPLEEVL NLAQSENPHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	34	139
34	PTSSSTEXT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TFEFYMPKEA TELEHLOCLE EELKPLEEVL NLAQSENPHL RPRDLISNIN VIVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	35	140
35	PTSSSTEXT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TFEFYMPKEA TELEHLOCLE EELKPLEEVL NLAQSENPHL RPRDLISNIN VIVFELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	36	141
36	PTSSSTEXT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TFEFYMPKEA TELEHLOCLE EELKPLEEVL NLAQSENPHL RPRDLISNIN VIVFELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	37	142
37	PTSSSTEXT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TFEFYMPKEA TELEHLOCLE EELKPLEEVL NLAQSENPHL RPRDLISNIN VIVFELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	38	143
38	PTSSSTEXT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TFEFYMPKEA TELEHLOCLE EELKPLEEVL NLAQSENPHL DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	39	144
39	PTSSSTEXT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TFEFYMPKEA TELEHLOCLE EELKPLEEVL NLAQSENPHL DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	40	145
40	PTSSSTEXT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TFEFYMPKEA TELEHLOCLE EELKPLEEVL NLAQSENPHL DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	41	146
41	PTSSSTEXT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTRML TFEFYMPKEA TELEHLOCLE EELKPLEEVL NLAQSENPHL DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	42	147
42	PTSSSTEXT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TFEFYMPKEA TELEHLOCLE EELKPLEEVL NLAQSENPHL RPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	43	148

[418]

43	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPKLTAML TKKFYMPKXA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENFHL DPRDLISNIN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	44	149
44	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPKLTAML TKKFYMPKXA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENFHL DPRDLISNIN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	45	150
45	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPKLTAML TKKFYMPKXA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENFHL DPRDLISNIN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	46	151
46	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPKLTAML TKKFYMPKXA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENFHL DPRDLISNIN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	47	152
47	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPKLTAML TKKFYMPKXA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENFHL DPRDLISNIN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	48	153
48	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPKLTAML TKKFYMPKXA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENFHL DPRDLISNIN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	49	154
49	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPKLTAML TKKFYMPKXA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENFHL DPRDLISNIN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	50	155
50	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPKLTAML TKKFYMPKXA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENFHL DPRDLISNIN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	51	156
51	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPKLTAML TKKFYMPKXA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENFHL DPRDLISNIN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	52	157
52	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPKLTAML TKKFYMPKXA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENFHL DPRDLISNIN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	53	158
53	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPKLTAML TKKFYMPKXA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENFHL DPRDLISNIN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	54	159

[419]

54	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELEPLEEVL NLAQSNFHL DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	55	160
55	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELEPLEEVL NLAQSNFHF DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	56	161
56	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELEPLEEVL NLAQSNFHL DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	57	162
57	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELEPLEEVL NLAQSNFHF DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	58	163
58	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELEPLEEVL NLAQSNFHF DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	59	164
59	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELEPLEEVL NLAQSNFHF DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	60	165
60	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELEPLEEVL NLAQSNFHY DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	61	166
61	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELEPLEEVL NLAQSNFHY DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	62	167
62	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELEPLEEVL NLAQSNFHW DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	63	168
63	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELEPLEEVL NLAQSNFHD DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	64	169
64	PTSSSTXT QLQLEHLLD LQMIINGINN YENPELTAML TKEFYMPKKA TELEHLQCLE EELEPLEEVL NLAQSNFHY DPRDLISNIN VVVELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	65	170

[420]

65	PTSSSTEXT QLQLEHLILD LQIILNGIRN YENPILTAML TKKFYMPKEA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHY EPRDFFSNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	66	171
66	PTSSSTEXT QLQLEHLILD LQIILNGIRN YENPILTAML TKKFYMPKEA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHY EPRDFFSNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	67	172
67	PTSSSTEXT QLQLEHLILD LQIILNGIRN YENPILTAML TKKFYMPKEA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHY EPRDFFSNIN VWVLDLEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	68	173
68	PTSSSTEXT QLQLEHLILD LQIILNGIRN YENPILTAML TKKFYMPKEA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHY EPRDFFSNIN EFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	69	174
69	PTSSSTEXT QLQLEHLILD LQIILNGIRN YENPILTAML TKKFYMPKEA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHY EPRDFFSNIN EVVLDLEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	70	175
70	PTSSSTEXT QLQLEHLILD LQIILNGIRN YENPILTAML TKKFYMPKEA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHY DPRDFFSNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	71	176
71	PTSSSTEXT QLQLEHLILD LQIILNGIRN YENPILTAML TKKFYMPKEA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHY EPRDFFSNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	72	177
72	PTSSSTEXT QLQLEHLILD LQIILNGIRN YENPILTAML TKKFYMPKEA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHY DPRDFFSNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	73	178
73	PTSSSTEXT QLQLEHLILD LQIILNGIRN YENPILTAML TKKFYMPKEA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHY DPRDFFSNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	74	179
74	PTSSSTEXT QLQLEHLILD LQIILNGIRN YENPILTAML TKKFYMPKEA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHY DPRDFFSNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	75	180
75	PTSSSTEXT QLQLEHLILD LQIILNGIRN YENPILTAML TKKFYMPKEA TELEHLQCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHY EPRDFFSNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	76	181

[421]

76	PTSSSTET QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TQFYMPKEA TELEHLQCLE BELEPLEEVL NLAQSENPHF DPROVSSNIN VFVLELIGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	77	182
77	PTSSSTET QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TQFYMPKEA TELEHLQCLE BELEPLEEVL NLAQSENPHF DPROVSSNIN VFVLELIGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	78	183
78	PTSSSTET QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TQFYMPKEA TELEHLQCLE BELEPLEEVL NLAQSENPHF DPROVSSNIN VFVLELIGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	79	184
79	PTSSSTET QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TQFYMPKEA TELEHLQCLE BELEPLEEVL NLAQSENPHF DPROVSSNIN VFVLELIGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	80	185
80	PTSSSTET QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TQFYMPKEA TELEHLQCLE BELEPLEEVL NLAQSENPHF DPROVSSNIN VFVLELIGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	81	186
81	PTSSSTET QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TQFYMPKEA TELEHLQCLE BELEPLEEVL NLAQSENPHF DPROVSSNIN VFVLELIGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	82	187
82	PTSSSTET QLQLEHLBD LEMILNGINN YENPILTRML TQFYMPKEA TELEHLQCLE BELEPLEEVL NLAQSENPHF DPROVSSNIN VFVLELIGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	83	188
83	PTSSSTET QLQLEHLBD LEMILNGINN YENPILTRML TQFYMPKEA TELEHLQCLE BELEPLEEVL NLAQSENPHF DPROVSSNIN VFVLELIGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	84	189
84	PTSSSTET QLQLEHLBD LEMILNGINN YENPILTRML TQFYMPKEA TELEHLQCLE BELEPLEEVL NLAQSENPHF DPROVSSNIN VFVLELIGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	85	190
85	PTSSSTET QLQLEHLBD LEMILNGINN YENPILTRML TQFYMPKEA TELEHLQCLE BELEPLEEVL NLAQSENPHF DPROVSSNIN VFVLELIGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	86	191
86	PTSSSTET QLQLEHLBD LEMILNGINN YENPILTRML TQFYMPKEA TELEHLQCLE BELEPLEEVL NLAQSENPHF DPROVSSNIN VFVLELIGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	87	192

[422]

87	PTSSSTKKT QLQLEHLEBD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENHFH EPRDVFVSNN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	88	193
88	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENHFH EPRDVFVSNN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	89	194
89	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTAML TFEFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENHFH EPRDVFVSNN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	90	195
90	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENHFH EPRDVFVSNN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	91	196
91	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENHFH EPRDVFVSNN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	92	197
92	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENHFH EPRDVFVSNN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	93	198
93	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENHFH EPRDVFVSNN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	94	199
94	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENHFH EPRDVFVSNN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	95	200
95	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENHFH EPRDVFVSNN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	96	201
96	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTRML TFEFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENHFH EPRDVFVSNN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	97	202
97	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPKLTAML TFEFYMPKKA TELEHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSENHFH EPRDVLISNN VVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNH WITFSQSIIS TLT	98	203

□

[423]

98	PTSSSTEET QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TFEFYMPKKA TELEHLOCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHF EPRDVISNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFINH WITFSQSIIS TLT	99	204
99	PTSSSTEET QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTAML TFEFYMPKKA TELEHLOCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHF EPRDVISNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFINH WITFSQSIIS TLT	100	205
100	PTSSSTEET QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTRML TFEFYMPKKA TELEHLOCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHF EPRDVISNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFINH WITFSQSIIS TLT	101	206
101	PTSSSTEET QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTRML TFEFYMPKKA TELEHLOCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHF EPRDLASNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFINH WITFSQSIIS TLT	102	207
102	PTSSSTEET QLQLEHLLD LQMILNGINN YENPILTRML TFEFYMPKKA TELEHLOCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHF EPRDVISNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFINH WITFSQSIIS TLT	103	208
103	PTSSSTEET QLQLEHLLD LEMILNGINN YENPILTAML TFEFYMPKKA TELEHLOCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHF EPRDVISNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFINH WITFSQSIIS TLT	104	209
104	PTSSSTEET QLQLEHLLD LEMILNGINN YENPILTRML TFEFYMPKKA TELEHLOCLE DELEPLEEVL NLAQSENPHF EPRDVISNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFINH WITFSQSIIS TLT	105	210
105	PTSSSTEET QLQLEHLLD LEMILNGINN YENPILTRML TFEFYMPKKA TELEHLOCLE EELXPLEEVL NLAQSENPHF EPRDVISNIN VFVLELEGSE TTFMCEYADE TATIVEFINH WITFSQSIIS TLT	106	211

[424]

[425]

실시예 2: 인터루킨 2 아날로그의 발현

[426]

[427]

상기 실시예 1에서 제조한 발현 벡터를 이용하여, T7 프로모터 조절하의 재조합 인터루킨 2 아날로그를 발현시켰다. 각각의 재조합 인터루킨 2 아날로그 발

현 벡터로 발현 대장균 균주, *E. coli* BL21DE3(*E. coli* B F *dcm ompT hsdS*($r_B^- m_B^-$) *gal* λ (DE3); 노바젠사)을 형질 전환하였다. 형질전환 방법은 노바젠사에서 추천하는 방법을 이용하였다. 각 재조합 발현 벡터가 형질 전환된 각각의 단일 콜로니를 취하여, 암피실린(50 μ g/mL)이 포함된 2X 루리아 브로스(Luria Broth) 배지에 접종하고, 37°C에서 15시간 동안 배양하였다. 재조합 균주 배양액과 30% 글리세롤이 포함된 2X LB 배지를 1:1(v/v)의 비율로 혼합하여, 각 1 mL씩 cryo-튜브에 분주하고, -150°C에 보관하였다. 이를 재조합 단백질의 생산을 위한 세포 스톡(cell stock)으로 사용하였다.

- [428] 재조합 인터루킨 2 아날로그의 발현을 위하여, 각 세포 스톡 1 바이알(vial)을 녹여 500 mL의 2X LB에 접종하고, 37°C에서 14 ~ 16시간 동안 진탕 배양하였다. 600 nm에서의 흡광도 값이 4.0 이상을 나타내면 배양을 종료하고, 이를 종 배양액으로 사용하였다. 5 L 발효기(Bioflo-320, NBS, 미국)를 이용하여, 종 배양액을 1.6 L의 발효 배지에 접종하고, 초기 발효를 시작하였다. 배양조건은 온도 37°C, 공기량 2.0 L/min(1vvm), 교반 속도 650 rpm 및 30% 암모니아수를 사용하여, pH 6.7로 유지시켰다. 발효 진행은 배양액 내의 영양소가 제한되었을 때, 추가 배지(feeding solution)을 첨가하여 유가배양을 진행하였다. 균주의 성장은 OD 값에 의해 모니터링하고, 흡광도 값 70 이상에서 최종 농도 500 μ M의 IPTG를 도입하였다. 배양은 IPTG 도입 후 약 23~25시간까지 더 진행하였으며, 배양 종료 후 원심분리기를 사용하여 재조합 균주를 수확하여 사용 시까지 -80°C에 보관하였다.

[429]

[430] **실시예 3: 인터루킨 2 아날로그의 추출 및 재접힘(refolding)**

[431]

- [432] 상기 실시예 2에서 얻은 인터루킨 2 아날로그 발현 대장균으로부터 인터루킨 2 아날로그를 가용성 형태로 바꾸기 위해 세포를 파쇄하고 재접힘을 유도하였다. 배양액 100 mL 분량에 해당하는 세포 펠렛을 1 - 200 mL의 파쇄 완충 용액(20 mM Tris-HCl pH 9.0, 1 mM EDTA pH 9.0, 0.2 M NaCl, 0.5% Triton X-100)에 부유시킨 후, 미세용액화(Microfluidizer)를 이용하여 15,000 psi로 재조합 대장균을 파쇄하였다. 13,900 g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 버리고, 400 mL의 첫번째 세척 완충 용액(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA pH 9.0)으로 펠렛을 세척하였다. 상기와 동일 조건으로 원심분리하여 상층액을 버리고, 펠렛을 400 mL의 두번째 세척 완충 용액(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA pH 9.0, 2% Triton X-100)으로 펠렛을 세척하였다. 상기와 동일 조건으로 원심분리하여 상층액을 버리고, 펠렛을 400 mL의 세번째 세척 완충 용액(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA pH 9.0, 1% sodium deoxycholate)으로 펠렛을 세척하였다. 상기와 동일 조건으로 원심분리하여 상층액을 버리고, 펠렛을 400 mL의 네번째 세척 완충 용액(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA pH 9.0, 1 M NaCl)으로 펠렛을 세척하였다. 상기와 동일 조건으로 원심분리하여 세척된 대장균 봉입체(inclusion body) 펠렛을 수득하였다. 세척된 봉입체 펠렛을 400 mL의 가용/환원화 완충액(6 M

Guanidine, 100 mM Tris pH 8.0, 2 mM EDTA pH 9.0, 50 mM DTT)에 재부유하여 50°C에서 30분 동안 교반하였다. 가용/환원된 인터루킨 2 아날로그에 증류수 100 mL를 넣어 6 M Guanidine을 4.8 M Guanidine으로 희석한 후 13,900 g에서 30분간 원심분리하여 펠렛은 버리고 용액만 수득하였다. 희석된 용액에 증류수 185.7 mL를 추가로 넣어 4.8 M Guanidine을 3.5 M Guanidine으로 희석한 후 100% acetic acid를 이용하여 pH를 5.0로 맞추었다. pH 조정된 용액을 상온에서 1시간 교반하였다. 불순물이 침전된 용액은 13,900 g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 버리고, 펠렛을 마지막 세척 완충 용액 (3.5 M Guanidine, 20 mM Sodium Acetate pH 5.0, 5 mM DTT)으로 펠렛을 세척하였다. 상기와 동일 조건으로 원심분리하여 펠렛을 수득하였다. 세척된 인터루킨 2 아날로그를 400 mL의 재접힘 완충 용액 (6 mM Guanidine, 100 mM Tris pH 8.0, 0.1 mM CuCl₂)으로 용해시킨다. 혼합용액을 4°C에서 15 - 24 시간 동안 교반함으로써 재접힘 과정을 수행하였다.

[433]

[434] 실시예 4: 크기 배제 컬럼 크로마토그래피

[435]

[436] 상기 실시예 3에서 얻은 인터루킨 2 아날로그 재접힘 용액을 크기 배제 컬럼에 적용하여 정제하기 위하여 1 mL이하로 농축하였다. 컬럼은 재접힘 용액 도입 전 완충 용액 (2 M Guanidine, 100 mM Tris pH 8.0)으로 평형화하였고, 재접힘 용액 도입 후 완충 용액 흘려주어 용출하였다. 용출된 시료는 Guanidine을 포함하고 있어 안정화 용액 (10 mM Sodium Acetate pH 4.5, 5% Trehalose)로 바꾼 후 RP-HPLC, peptide mapping 분석을 통해 순도를 측정하였다. 측정된 순도가 80% 이상이면 실험에 사용하였다.

[437]

[438] 실시예 5: 인터루킨 2 아날로그의 수용체 결합력 평가

[439]

[440] 상기 실시예 4에서 얻은 인터루킨 2 아날로그의 인터루킨 2 알파 수용체와 베타 수용체 각각의 수용체 결합력을 측정하기 위하여 표면 플라즈몬 공명 (surface plasmon resonance, SPR, BIACORE T200, GE healthcare)을 사용하였다. 제조된 아날로그의 알파 수용체 및 베타 수용체에 대한 결합력을 측정하고, 인터루킨 2 아날로그 1(aldesleukin)과 각 결합력을 비교하였다.

[441]

[442] 먼저 CM5칩(GE healthcare사)에 아민 결합법(amine coupling)을 통해 항 인간 면역글로블린 항체(Abcam사, #ab97221)를 약 5,000 RU (resonance unit)만큼 고정화한 후, 항원 항체 결합 반응을 이용하여 인간 면역글로블린 Fc부위가 결합된 인터루킨 2 알파 수용체(SYMANSIS사, #4102H) 또는 인터루킨 2 베타 수용체(SYMANSIS사, #4122H)를 각각 면역글로블린 항체에 결합시켜 최종 고정화하였다. 그 다음으로 상기에서 제조한 제조합 인터루킨 2 아날로그를 농도별로 2배 연속희석법으로 HBS-P+ 버퍼(Cytiva사, BR100671)에 희석하고, 인터루킨 2 수용

체가 최종 고정된 CM5칩에 흘려주어 각 인터루킨 2 수용체의 결합력을 측정하였다. 결합력은 결합 속도(K_a)와 해리 속도(K_d)를 이용하여 측정하였으며, 10 uL/분의 유속으로 인터루킨 2 아날로그를 3분간 흘려 결합 속도를 측정하고, 동일한 시간과 유속으로 HBS-P+ 버퍼만 흘려 주어 각 인터루킨 2 수용체로부터의 해리 속도를 측정하였다. 측정이 완료되면, Biaevaluation 프로그램에서 1:1 binding fitting model에 따라 수용체의 결합력 평가를 진행하였다.

[443]

[444] 상대적 결합력 K_D (%) = 아날로그 1(aldesleukin) 해리상수(K_d) / 아날로그 해리상수(K_d) × 100

[445]

[446] 아래 표 3에서 “정의 불가”는 표면 플라스몬 공명 측정에서 해당 수용체에 대한 결합이 관측되지 않음에 따라 그 수용체에 한해서는 해당 물리량을 정의할 수 없다는 것을 가리킨다. 표 3은 인터루킨 2 아날로그 1(aldesleukin) 대비 인터루킨 2 아날로그의 인터루킨 2 알파 또는 베타 수용체 상대적 결합력을 정리한 것이다.

[447]

[448] [표3]

인터루킨 2 수용체	시험 물질	상대적 결합력 (%)
알파 수용체	아날로그 1	100.0
	아날로그 9	74.5
	아날로그 12	정의 불가
	아날로그 13	1.1
	아날로그 15	정의 불가
	아날로그 16	0.2
	아날로그 17	29.6
	아날로그 19	정의 불가
	아날로그 20	정의 불가
	아날로그 21	정의 불가
	아날로그 31	5.0
	아날로그 34	9.4
	아날로그 35	31.7
	아날로그 41	121.3
	아날로그 52	정의 불가
	아날로그 53	정의 불가
	아날로그 86	71.1
	아날로그 88	101.5
	아날로그 90	98.4
	아날로그 91	7.9
	아날로그 92	97.3
	아날로그 93	92.8
	아날로그 95	10.7
	아날로그 96	14.9
	아날로그 97	18.8
	아날로그 98	7.7

[449]

	아날로그 99	19.9
	아날로그 100	29.1
	아날로그 101	24.7
	아날로그 102	151.4
	아날로그 103	6.1
	아날로그 104	122.4
	아날로그 105	246.8
베타 수용체	아날로그 01	100.0
	아날로그 09	337.4
	아날로그 12	166.2
	아날로그 13	148.6
	아날로그 14	129.7
	아날로그 15	98.1
	아날로그 16	1261.8
	아날로그 17	9.4
	아날로그 18	35.3
	아날로그 19	455.0
	아날로그 20	156.5
	아날로그 21	14084.2
	아날로그 24	37.9
	아날로그 25	21.7
	아날로그 31	235.7
	아날로그 34	321.8
	아날로그 35	232.7
	아날로그 41	22776.2
	아날로그 52	3821.1
	아날로그 53	690.7
	아날로그 55	3025.7
	아날로그 57	2569.7
	아날로그 58	7771.2
	아날로그 59	1533.5
	아날로그 61	1039.1

[450]

아날로그 70	10199.2
아날로그 71	17083.8
아날로그 73	1591.8
아날로그 74	8153.4
아날로그 75	9571.2
아날로그 76	1040.4
아날로그 77	644.4
아날로그 84	710.7
아날로그 86	18745.8
아날로그 88	13856.6
아날로그 90	12776.2
아날로그 91	7361.9
아날로그 92	1510.3
아날로그 93	696.8
아날로그 94	35.5
아날로그 95	17.1
아날로그 96	229.3
아날로그 97	3019.4
아날로그 98	11084.5
아날로그 99	1509.1
아날로그 100	2534.1
아날로그 101	113.1
아날로그 102	4452.0
아날로그 103	13100.0
아날로그 104	25439.8
아날로그 105	26837.8

[451]

[452] 상기 시험 결과(표 3)에서 명시된 바와 같이 본 발명의 인터루킨 2 아날로그들은 인터루킨 2 알과 수용체 결합력을 아예 상실하거나, 인터루킨 2 아날로그 1에 비하여 감소 또는 증가하는 등 천연형 인터루킨 2 또는 알테스루킨과 상이한 인터루킨 2 알과 수용체 결합력을 나타내는 것을 확인하였다. 반면, 인터루킨 2 베

타 수용체에 대해서는 천연형 인터루킨 2 또는 알데스루킨에 비하여 더 강한 결합력이 확인되었다. 이를 통해 인터루킨 2 아날로그의 아미노산 서열이 인터루킨 2 알파 또는 베타 수용체의 결합에 영향력이 있음을 확인하였다. 이는 특정 위치의 아미노산을 치환 함으로써 인터루킨 2 수용체의 결합력을 변화시킬 수 있음을 시사하는 바이다.

[453] 상기와 같은 실험 결과는 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그가 변화된 인터루킨 2 알파 수용체 결합력 및 인터루킨 2 베타 수용체 결합력을 가져, 이를 활용한 다양한 약물 개발에 이용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[454]

[455] 실시예 6: 인터루킨 2 아날로그와 폴리에틸렌 글리콜 (3.4K PEG) 링커의 연결 반응 및 인터루킨 2 아날로그 연결체의 정제

[456]

[457] 상기 실시예 4에서 얻은 인터루킨 2 아날로그를 면역글로불린 Fc 영역에 결합한 지속형 결합체를 제조하기 위하여 인터루킨 2 아날로그를 폴리에틸렌글리콜(PEG) 링커의 한 말단에 연결시킨 연결체를 먼저 제조하였다. 연결체 제조에는 21번, 41번, 52번, 86번, 104번과 105번의 인터루킨 2 아날로그를 사용하였고, PEG 링커로는 분자량이 3.4 kDa이고, 양 말단의 히드록시 수소가 프로필알데히드로 개질된 폴리에틸렌글리콜(일본 NOF사의 ALD(2)3.4K PEG)을 사용하여 이를 상기 인터루킨 2 아날로그의 N-말단에 연결 반응 시켰다. 인터루킨 2 아날로그 : PEG 링커의 물 비율은 1:15~1:20으로, 인터루킨 2 아날로그 농도는 1 mg/mL 이하로 하여 2 내지 10°C에서 1시간 반응 시켰다. 이때 반응은 100 mM 인산칼륨(pH 5.5) 하에서 이루어 졌고, 환원제로서 20 mM 소듐 시아노보로하이드라이드(Sodium cyanoborohydride, SCB)를 첨가하였다. 반응액은 탈염 컬럼을 이용하여 20 mM 트리에틸아민(Triethylamine)(pH 8.0) 버퍼로 바뀌준 후, 트리에틸아민(pH 8.0)과 염화나트륨 농도 구배를 이용한 Fractogel® EMD TMAE (S) (Merck Millipore) 혹은 Source 15Q (Cytiva)컬럼을 사용하여 정제하여 인터루킨 2 아날로그-3.4K PEG 연결체를 얻었다.

[458]

[459] 실시예 7: 인터루킨 2 아날로그-3.4K PEG- 면역글로불린 Fc 영역 지속형 결합체의 제조

[460]

[461] 인터루킨 2 아날로그-3.4K PEG-면역글로불린 Fc 영역 지속형 결합체를 제조하기 위하여, 실시예 6의 방법을 이용하여 얻은 인터루킨 2 아날로그-3.4K PEG 연결체와 면역글로불린 Fc 영역(서열번호 438)의 물 비가 1:10이 되도록 하고, 전체 단백질 농도를 30 mg/mL로 하여 2 내지 10°C에서 15 내지 16시간 반응 시켰다. 이때 반응액은 100 mM 인산칼륨(pH 6.0)이며, 환원제로서 20 mM 소듐 시아노보로하이드라이드를 첨가하였다.

[462] 이 때 이용된 면역글로불린 영역은 서열번호 438의 아미노산 서열 (221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동중이량체를 형성하고, 상기 동중이량체의 단량체는 각각 독립적으로 35번 및 95번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합 및 141번 및 199번의 시스테인 간의 내부의 이황화 결합이 형성된 것이다.

[463]

[464] 표 4는 면역 글로불린 Fc 아미노산 서열을 정리한 것이다.

[465]

[466] [표4]

이름	아미노산 서열	서열번호
면역글로불린 Fc	PSCPAPEFLG GPSVLEPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTYRVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKGFPYSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGSEFL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLGLG K	438

[467]

[468] 반응이 종료된 후, 상기 반응액은 비스트리스 (Bis-Tris)(pH 6.5)와 염화 나트륨을 이용하여 Butyl FF (Cytiva)에서 미반응 면역글로불린 Fc 영역을 제거하고, 시트르산나트륨 완충액(pH 5.5)과 황산암모늄을 이용하여 Source 15ISO (Cytiva)으로 정제함으로써 인터루킨 2 아날로그의 N-말단이 3.4 kDa PEG 링커의 한 말단에 연결되고, 3.4 kDa PEG 링커의 반대쪽 말단이 Fc 영역의 N-말단 프롤린의 질소에 연결된 인터루킨 2 아날로그-3.4K PEG-면역글로불린 Fc 영역 결합체(지속형 결합체)를 얻었다. 이 지속형 결합체는 SDS-PAGE, RP-HPLC, SE-HPLC를 이용하여 분석하였다 (도 1 및 2).

[469]

[470] **실시예 8: 인터루킨 2 아날로그 결합체의 인터루킨 2 수용체 결합력 평가**

[471]

[472] 상기 실시예 7에서 얻은 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체와 인터루킨 2 알파, 베타 수용체 각각의 수용체 결합력을 측정하기 위하여 표면 플라즈마 공명 (SPR, BIACORE T200, GE healthcare)을 사용하였다.

[473]

[474] 구체적으로, 비오틴이 표지된 인간 인터루킨 2 수용체 알파 및 베타 서브유닛 (ACROBiosystems) 각각을 스트랩타비딘 바이오 센서칩(SA chip, Cytiva사)에 약 100 RU 및 500 RU씩 고정화하고 2배 연속 희석법으로 HBS-EP+ 버퍼(Cytiva사,

BR100669)에 회석된 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체들 또는 알테스루킨을 분당 20 μL 의 유속으로 흘려주었다. 3분간의 결합 과정 뒤, 동일한 유속으로 HBS-EP+ 버퍼만을 3분간 흘려주어 인터루킨 2 수용체에서 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체 또는 알테스루킨의 해리를 유도하였으며, 이때 얻어진 결합 상수 및 해리 상수를 통해 결합력을 산출하였다. 결합력 평가는 Biaevaluation 프로그램에서 1:1 binding fitting model에 따라 진행하였다.

- [475] 평가된 인터루킨 2 아날로그 결합체들은 고유의 인터루킨 2 수용체 결합력이 확인되었으며 특히 인터루킨 2 수용체 알파 서브유닛에서 각 후보 물질들 간에 명백한 결합력 차이가 확인되었다. 결과를 자세히 살펴보면, 인터루킨 2 아날로그 21번과 52번 결합체는 인터루킨 2 수용체 알파 서브유닛에 결합하지 않았으며 인터루킨 아날로그 41번, 86번, 104번, 그리고 105번 결합체는 알테스루킨에 비하여 각각 50.8%, 65.2%, 81.0%, 그리고 112.9%의 상대적인 결합력이 확인되었다. 인터루킨 2 수용체 베타 서브유닛의 경우, 인터루킨 2 아날로그 21번 결합체와 52번 결합체를 포함하는 모든 인터루킨 2 아날로그 결합체에서 알테스루킨에 비하여 높은 결합력이 확인되었다.
- [476] 아래 표 5에 알파와 베타 수용체별로 제조한 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체들의 알테스루킨의 결합력을 기준으로 비교한 상대적 결합력(%)을 정리하였다. 표 5에서 해당 지속형 결합체는 이를 구성하는 인터루킨 2 아날로그의 번호로 표시하였다(예: 인터루킨 2 아날로그 21번의 지속형 결합체는 “인터루킨 2 아날로그 21번 결합체”로 표시). 표 5는 인터루킨 2 아날로그 결합체의 인터루킨 2 수용체 결합력을 정리한 것이다.
- [477]
- [478] [표5]

평가 물질	인터루킨 2 수용체 알파 서브유닛	인터루킨 2 수용체 베타 서브유닛
	상대적 결합력 (%)	상대적 결합력 (%)
알데스루킨	100.0	100.0
인터루킨 2 아날로그 21번 결합체	-	5,426.6
인터루킨 2 아날로그 41번 결합체	50.8	5,483.0
인터루킨 2 아날로그 52번 결합체	-	2,271.8
인터루킨 2 아날로그 86번 결합체	65.2	15,393.1
인터루킨 2 아날로그 104번 결합체	81.0	13,423.5
인터루킨 2 아날로그 105번 결합체	112.9	13,293.8

[479]

[480] 실시예 9: 악성 흑색종에서 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체와 면역관문 억제제의 병용 투여에 따른 항암 효능 평가

[481]

[482] 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그 결합체와 면역관문 억제제를 병용 투여하였을 때의 항암 효과를 확인하고자, 흑색종 세포(B16F10)가 동종 이식된 악성 흑색종 마우스 모델(B16F10 melanoma tumor syngeneic mouse model)에 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체 또는 알데스루킨(대조군)을 단독 투여하거나, 생쥐 항-PD-1 항체(Bio X cell, Catalog# BP0146)와 각각 병용 투여한 후, 종양의 크기와 개체 생존율을 평가하였다.

[483]

구체적으로, B16F10 세포(ATCC)를 C57BL/6 마우스 허벅다리에 피하 주사하고 며칠 뒤 육안으로 종양이 관찰되면 종양의 크기가 비슷하도록 각 그룹당 8마리씩을 배정하였다. 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체는 0.08 mg/kg 또는 6.0 mg/kg(인터루킨 2 지속형 결합체 중 인터루킨 2 아날로그 부위의 무게 기준) 용량으로, 각각 피하 경로로 1주에 1회씩 총 4주간 반복 투여하였다. 또한 대조군(알데스루킨 투여군)은 3.0 mg/kg의 프로류킨 주(Novartis)를 복강내 경로로 하루에 1

회씩 5일간 연속 투여하고, 2일 휴지기를 갖는 방식으로 총 4주간 반복 투여하였다. 항-PD-1 항체 단독 투여군은 10.0 mg/kg의 생쥐 항-PD-1 항체(Bio X cell)를 복강내 경로로 1주에 2회씩 총 4주간 반복 투여하였다. 항-PD-1 항체 병용 그룹은 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체 0.08 mg/kg 투여군, 6.0 mg/kg 투여군, 알데스루킨 3.0 mg/kg 투여군 각각에 항-PD-1 단독 투여군과 동일한 용량(10.0 mg/kg)의 항-PD-1 항체를 투여하였다. 종양의 크기 2,000 mm³ 초과를 인도적 종료시점으로 설정하였다.

[484] 투여 10일 차에 각 그룹의 종양 크기(도 3의 A) 및 35일간 각 개체의 생존율(도 3의 B)을 관찰하였다. 그 결과, 단독 요법에서 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체 6.0 mg/kg 투여군이 주 1회 투여에도 불구하고 대조군 보다 높은 종양 억제능과 개체 생존율을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체 6.0 mg/kg 투여군에서는 8마리 중 2마리에서 종양이 완전히 제거된 완전관해가 관찰된 반면, 대조군에서는 완전관해가 발견되지 않았다.

[485] 항-PD-1 항체와의 병용 요법에서, 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체의 항-PD-1 항체 병용 투여군은 알데스루킨의 항-PD-1 항체 병용 투여군에 비해 높은 종양 억제능과 개체 생존율을 보였다. 특히, 알데스루킨에 비해 매우 낮은 용량을 투여한 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체 0.08 mg/kg과 항-PD-1 항체 병용 투여군에서 8마리 중 2마리에서 종양이 완전히 제거된 완전관해가 관찰되었다. 또한 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체 6.0 mg/kg과 항-PD-1 항체 병용 투여군에서는 100%의 개체 생존율과 8마리 중 7마리에서 완전관해가 발견되어 월등한 항암 효력을 보였다. 반면, 알데스루킨의 항-PD-1 항체 병용 투여군에서는 완전관해가 발견되지 않았다.

[486]

[487] 실시예 10: Lewis 폐암 마우스 모델에서 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체와 면역관문 억제제의 병용 투여에 따른 항암 효능 평가

[488]

[489] 폐암 마우스 모델에서 항암 효능을 평가하고자, Lewis lung carcinoma 세포(LL/2)가 동종 이식된 Lewis 폐암 마우스 모델(LL/2 tumor syngeneic mouse model)에 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체 또는 알데스루킨을 단독 투여하거나, 생쥐 항-PD1 항체(Bio X cell, Catalog#BP0146)와 각각 병용으로 투여 후 항 종양 효능을 평가하였다.

[490] LL/2 세포(ATCC)를 C57BL/6 마우스 허벅다리에 피하 주사하고 며칠 뒤 육안으로 종양이 관찰되면 종양의 크기가 비슷하도록 각 그룹당 10마리씩을 배정하였다. 각 그룹은 약물의 단독 투여군과 면역관문억제제와의 병용 투여군으로 나누었으며, 단독 투여군에는 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체, 알데스루킨, 또는 항-PD1 항체 투여군으로 각각 배정하였다. 구체적으로 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체 투여군은 IL-2 기준으로 6.0 mg/kg 용량의 결합체를 피하 경로로 1주에 1회씩 총 2회 반복 투여 하였고, 대조군은 3.0 mg/kg의 알데스루킨을 복강 경로로

하루에 1회씩 5일간 연속 투여하고, 2일 휴지기를 갖는 방식으로 총 2회 반복 투여하였다. 끝으로 면역관문억제제 단독 투여군은 항-PD1 항체를 복강 경로로 3일 내지 4일에 1회씩, 1주일에 총 2회를 투여하는 방식으로 2주간 반복 투여하였다.

[491] 단독 투여군과는 별도로 설정된 면역관문억제제 병용 투여군은 각 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체와 대조군에 항-PD1 항체를 추가로 투여하였으며 투여 농도 및 간격은 단독 투여군과 동일하게 설정하였다.

[492] 투여 12일 차에 각 그룹의 종양 크기를 관찰하고, 면역관문억제제와의 병용 투여에 따른 약물의 상호작용을 평가하기 위해 Bliss 독립모형(Bliss independence) 분석을 수행하였다.

[493] 그 결과, 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체는 Lewis 폐암 마우스 모델에서 단독 투여에 의한 우수한 항 종양 효능을 나타내었을 뿐만 아니라 (도 4), 알테스루킨과는 차별화되는 면역관문억제제와의 병용에 의한 유의적인 상승효과를 확인하였다(도 5의 A 및 B).

[494]

[495] Lewis 폐암 마우스 모델은 대표적인 면역-비침투성 종양 모델(cold tumor)로써, 항-PD1 항체를 포함하는 면역관문억제제 단독 처리에 의한 효능은 미비한 것으로 보고되어 있다(Maryland Franklin, 2019, Labcorp). 본 실시예에서도 면역관문억제제의 단독 투여시에는 유의미한 항암 효능을 확인할 수 없었으나(도 4), 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체와 면역관문억제제의 병용투여시에는 상승 효과가 나타나는 것을 확인하였다. 이로부터, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 결합체가 Lewis 폐암 모델의 종양미세환경(tumor microenvironment, TME)을 면역-비침투성 종양에서 침투성 종양(hot tumor)으로 전환을 유도한 것으로 판단할 수 있고, 이로 인해 면역관문억제제와의 병용 투여에서 우수한 효과를 나타내는 것으로 이해할 수 있다.

[496]

[497] 실시예 11: 췌장암(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 마우스 모델에서 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체와 항-PD-1 항체 병용 투여에 의한 항암 효능 평가 및 암 완치 모델에서 기억 반응 확인

[498]

[499] 가장 공격적인 악성 종양 중 하나인 췌장암(췌장 도관 선암종)에 대한 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체의 단독 및 항-PD-1 항체 병용에 의한 항암 효능을 평가하기 위하여, 마우스 유래 췌장 도관 선암종 세포(panc02)를 6주령 암컷 C57BL/6 마우스의 측면에 피하 주사하여 동종이식 종양 모델을 제작하였다. 14일 후, 종양부피(~80 mm³)를 기준으로 그룹당 7마리를 무작위로 배정하였다.

[500] 시험은 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체 단독 투여군, 항-PD-1 항체 단독 투여군과 두 약물의 병용 투여군으로 나누었고 각 약물의 투여 용법에 맞게 총 6주간 투여하였다. 각 실험군에 대한 항 종양 효능은 아래 식을 이용하여 종양 성장 억

제능(tumor growth inhibition, TGI)으로 평가하였다. 자세한 각 군의 약물 용량, 투여 경로, 횟수 및 항 종양 효능은 표 6과 같다.

[501] $\% \text{ TGI} = (1 - \text{실험군의 Day 0부터 Day X까지 증가된 종양부피} / \text{음성 대조군의 Day 0부터 Day X까지 증가된 종양부피}) \times 100$

[502]

[503] [표6]

실험군		용량	투여경로, 투여주기	종양 크기 (종양 성장 억제능) *
단독 투여군	음성 대조군	-	피하 경로, 주당 1회 x 6	397.37 mm ³
	인터루킨 2 아날로그 86번 결합체	0.3 mg/kg	피하 경로, 주당 1회 x 6	420.02 mm ³ (-7.36%)
		1.7 mg/kg	피하 경로, 주당 1회 x 6	293.15 mm ³ (33.05%)
		8.5 mg/kg	피하 경로, 주당 1회 x 6	30.66 mm ³ (116.67%)
		25 mg/kg	피하 경로, 주당 1회 x 6	10.33 mm ³ (123.20%)
	항-PD-1 항체	10 mg/kg	복막내 경로, 주당 2회 x 6	500.62 mm ³ (-33.00%)
병용 투여군	인터루킨 2 아날로그 86번 결합체 + 항-PD-1 항체	0.3 mg/kg + 10 mg/kg	피하 경로, 주당 1회 x 6 복막내 경로, 주당 2회 x 6	243.16 mm ³ (49.04%)
		25 mg/kg + 10 mg/kg	피하 경로, 주당 1회 x 6 복막내 경로, 주당 2회 x 6	13.21 mm ³ (122.26%)

[504]

[505] *각 그룹에서 종양의 괴사가 발생하기 전 마지막 계측일인 약물 투여 후, 32일차를 기준으로 분석

[506]

[507] 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체는 1.7 mg/kg 용량부터 항 종양 효능이 관찰되어 최대 25 mg/kg까지 용량 의존적으로 증가하였다. 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체의 0.3 mg/kg 투여군과 항-PD-1 항체 단독 투여군에서는 음성 대조군 대비

종양의 억제 효능이 관찰되지 않았으나, 동일한 용량의 두 약물을 병용 투여 했을 때 유의적인 수준의 종양 억제 효능이 확인되었다. 특히, 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체를 8.5 mg/kg 이상으로 단독 투여한 그룹에서 완전 관해가 관찰되었고, 25 mg/kg을 단독 투여하거나 항-PD-1 항체와 병용으로 투여한 그룹은 모든 개체에서 완전 관해가 관찰되었다.

[508]

[509] 완전 관해가 확인된 개체들에 대해, 약물 첫 투여일을 기준으로 89일차에 원발성 암과 동일한 panc02 종양 세포를 측면에 피하 주사하여, 기억 반응에 의한 재발 방지 효과를 조사했다. 그 결과, 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체(25 mg/kg)를 단독 투여하거나 항-PD-1 항체와 병용 투여한 그룹의 70% 이상에서 기억 반응에 의한 재발 방지 효능이 확인 되었다(도 6). 상기 결과는 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체가 원발성 췌장암의 치료뿐만 아니라, 동일한 종양의 재발에 대한 예방 가능성을 시사한다.

[510]

[511] 상기와 같은 실험 결과는 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체가 변화된 인터루킨 2 알파 수용체 및 베타 수용체 결합력을 통해 강력한 항암 효능 및 낮은 부작용 위험성을 보이고, 인간 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 지속형 결합체 구조를 통해 높은 혈중 노출을 가능하게 하여 기존 인터루킨 2 요법에 비해 투여 간격을 늘리고 적은 용량에서 높은 활성으로 생체 내 면역 반응을 증가시킬 수 있음을 시사한다. 또한, 면역관문 억제제와 상승 작용을 통해 월등한 항암 효능을 나타낼 수 있으므로, 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그 결합체를 면역관문 억제제와 병용 투여할 경우 안전하면서도 효과적인 항암 치료에 이용될 수 있고, 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그 또는 이를 포함하는 지속형 결합체는 개체의 면역 기억 반응을 유도하여 암의 재발을 억제할 수 있음을 시사하는 것이다.

[512]

[513] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있음을 이해할 수 있다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 제한적인 것이 아닌 것으로 이해하여야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 상세한 설명보다는 후술되는 특허 청구범위의 의미 및 범위, 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[514]

[515] [국가지원 연구개발에 대한 설명]

[516] 본 연구는 과학기술정보통신부, 산업통상자원부, 보건복지부의 재원으로 국가신약개발사업단의 국가신약개발사업 지원에 의하여 이루어진 것임 (RS-2022-00165557).

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 3 내지 106의 아미노산 서열에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 인터루킨 2 아날로그(analog)를 함유하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 상기 약학적 조성물은 면역관문 억제제와 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 지속형 결합체의 형태이고, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 조성물:
[화학식 1]
X - L - F
이 때 X는 서열번호 3 내지 106의 아미노산 서열에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 인터루킨 2 아날로그이고;
L은 폴리에틸렌글리콜 링커이며;
F는 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;
-는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타내며,
상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태의 Fc 영역 중 한 폴리펩타이드 사슬에만 L의 일 말단이 공유결합으로 연결되어 있고, 이 L의 반대쪽 말단에 X가 공유결합으로 연결됨.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 10, 13 내지 15, 17, 20 내지 22, 32, 35, 36, 42, 53, 54, 56, 58 내지 60, 62, 71, 72, 74 내지 78, 85, 87, 89, 91 내지 94, 및 97 내지 106의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 4] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 17, 22, 42, 53, 56, 58 내지 60, 62, 71, 72, 74 내지 77, 87, 89, 91 내지 93, 98 내지 101, 및 103 내지 106의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 5] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 22, 42, 53, 87, 105 및 106의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 6] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 C-말단에 하나 이상의 아미노산을 추가로 포함하는 것인 조성물.
- [청구항 7] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 인터루킨 2 베타 수용체에 대한 결합력이 알데스루킨에 비해 증가된 것인 조성물.
- [청구항 8] 제2항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 하이브리드(hybrid)인 조성물.
- [청구항 9] 제2항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역인 조성물.
- [청구항 10] 제2항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것인 조성물.

- [청구항 11] 제2항에 있어서, 상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태 면역글로불린 Fc 영역 중 하나의 Fc 영역에 X가 상기 폴리에틸렌글리콜 링커를 통하여 서로 공유결합적으로 연결된 것인 조성물.
- [청구항 12] 제2항에 있어서, 상기 폴리에틸렌글리콜 링커는 분자량 1 kDa 내지 100 kDa의 링커인 조성물.
- [청구항 13] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제를 추가로 포함하는 조성물.
- [청구항 14] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 암은 신세포암, 흑색종, 대장암, 간암, 자궁암, 난소암, 췌장암, 담낭암, 폐암, 소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 피부암, 유방암, 방광암, 위암, 두부 또는 경부암, 식도암, 후두암, 골암, 직장암, 항문부근암, 결장암, 나팔관암종, 자궁내막암종, 자궁경부암종, 질암종, 음문암종, 호지킨병, 소장암, 내분비선암, 갑상선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 음경암, 전립선암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 신장골반 암종, CNS 종양, 1차 CNS 림프종, 척수 종양, 뇌종양, 신경교종(성상세포종(astrocytoma), 교모세포종(glioblastoma), 핍지교종(oligodendroglioma) 상의세포종(ependymoma), 배아세포종, 수막종, 뇌간 신경교종, 뇌하수체 선종, 신경초종, 선천성종양, 두개인두종, 및 뇌종양으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 조성물.
- [청구항 15] 제1항 또는 제2항에 있어서 상기 암은 PD-1 길항제에 대한 반응성이 낮은 암인, 조성물.
- [청구항 16] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피 내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비 내 투여, 폐 내 투여, 또는 직장 내 투여 경로로 투여되는 것인 조성물.
- [청구항 17] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 1주 내지 1개월 범위의 시간 간격으로 투여되는 것인 조성물.
- [청구항 18] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 조성물은 면역관문 억제제를 함유하는 조성물과 동시, 개별, 순차 또는 역순으로 병용 투여되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 19] 제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 면역관문 억제제는 PD-1 길항제인 것인 조성물.
- [청구항 20] 제19항에 있어서, 상기 면역관문 억제제는 항-PD-1 항체, 또는 이의 항원-결합 단편으로부터 선택되는 하나 이상의 것인 조성물.
- [청구항 21] 제20항에 있어서, 상기 항-PD-1 항체는 니볼루맵(nivolumab), 펌브롤리주맵(pembrolizumab), 세미플리맵(cemiplimab), 스파탈리주맵(spartalizumab), 캄렐리주맵(camrelizumab), 신틸리맵(sintilimab), 티슬렐리주맵(tislelizumab), 토리팔리맵(toripalimab), 도스탈리맵(dostarlimab), INCMGA00012, AMP-224 및 AMP-514로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.