

명세서

발명의 명칭: 신규한 면역 활성화 인터루킨 2 아날로그 결합체 및 이의 제조 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 신규한 인터루킨 2 아날로그 결합체, 이의 제조 방법, 및 이의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 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(상표 명 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.

[4]

- [5] 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.

- [6]
- [7] 한편, 인터루킨 2의 다양한 면역 관련 병증의 치료제로서의 가능성에도 불구하고, 독성 및 부작용을 감소시키면서도 복용량의 감소를 시킬 수 있는 약제의 존재가 미비한 상태로, 새롭고 향상된 약제에 관한 연구가 더욱 필요하다.
- [8]
- 발명의 상세한 설명**
- 기술적 과제**
- [9] 면역 관련 병증의 치료제 개발의 일환으로, 인터루킨 2 아날로그를 포함하면서 지속성이 우수하면서 약리 효과가 우수한 약제의 개발이 요구된다.
- [10]
- 과제 해결 수단**
- [11] 본 발명의 하나의 목적은 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 지속형 결합체 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 지속형 결합체를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 인터루킨 2 아날로그, 이의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 인터루킨 2 아날로그, 이의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 암의 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 약제를 제공하기 위한 용도를 제공하는 것이다.
- [17]
- 발명의 효과**
- [18] 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그 또는 이를 포함하는 지속형 결합체는 생체 인터루킨 2 베타 수용체 결합력이 증대된 아날로그로서, 항암 치료 목적의 투여 편의성 및 부작용을 개선하는 효과가 있다.
- [19]
- 도면의 간단한 설명**
- [20] 도 1은 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체(아날로그 21, 41 및 52번)의 SDS-PAGE 결과이다.
- [21] 도 2는 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체(아날로그 21, 41 및 52번)의 순도

분석 결과이다.

- [22] 도 3은 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체의 ICR 및 C57BL/6 마우스에서 약동학을 분석한 결과이다. A는 ICR 마우스에서 인터루킨 2 아날로그 41번 결합체, 및 인터루킨 2 아날로그 52번 결합체의 약동학, B는 C57BL/6 마우스에서 인터루킨 2 아날로그 21번 결합체, 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체, 인터루킨 2 아날로그 104번 결합체, 및 인터루킨 2 아날로그 105번 결합체의 약동학을 분석한 결과이다. 도 3에서 지속형 결합체의 투여량과 혈청내 농도 수치는 해당 결합체 전체에서 인터루킨 2 아날로그 부위가 차지하는 무게만을 기준으로 나타낸 값이다.
- [23] 도 4는 마우스에서 인터루킨 2 아날로그 21번 결합체, 인터루킨 2 아날로그 41번 결합체, 인터루킨 2 아날로그 52번 결합체의 동물 모델에서 항암 효력을 확인한 결과이다. 도 4에서 지속형 결합체의 투여량은 해당 결합체 전체에서 인터루킨 2 아날로그 부위가 차지하는 무게만을 기준으로 나타낸 값이다.
- [24] 도 5는 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체의 동물 모델에서 기억 T 세포 변화를 확인한 결과이다. A는 인터루킨 2 아날로그 21번 결합체, 인터루킨 2 아날로그 41번 결합체, 인터루킨 2 아날로그 52번 결합체의 종양 성장 억제 효과, B는 인터루킨 2 아날로그 21번 결합체, 인터루킨 2 아날로그 41번 결합체, 인터루킨 2 아날로그 52번 결합체의 기억 T 세포 수를 분석한 결과이다. 도 5에서 지속형 결합체의 투여량은 해당 결합체 전체에서 인터루킨 2 아날로그 부위가 차지하는 무게만을 기준으로 나타낸 값이다.
- [25] 도 6은 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체의 악성 흑색종 동물 모델에서 항종양 효력을 평가한 결과이다. A는 알데스루킨과 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체의 종양 크기, B는 알데스루킨과 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체의 생존률을 확인한 결과이다. 도 6에서 지속형 결합체의 투여량은 해당 결합체 전체에서 인터루킨 2 아날로그 부위가 차지하는 무게만을 기준으로 나타낸 값이다.

[26]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [27] 본 발명의 하나의 양태는 신규한 인터루킨 2 아날로그(interleukin 2 analog, 또는 IL-2 analog)를 포함하는 지속형 결합체이다. 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, 상기 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2에서 하나 이상의 아미노산이 변이된 서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [28] 하나의 구체예로서, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 지속형 결합체인 것을 특징으로 한다:
- [29] [화학식 1]

- [30] X - La - F
- [31] 여기서, X는 인터루킨 2 아날로그(analog)로서, 이 아날로그는 지속형 결합체의 일부를 이루지 않고 X 단독으로 있을 때 알테스루킨에 비해 인터루킨 2 베타 수용체 결합력이 증대된 인터루킨 2 아날로그이고;
- [32] L은, 폴리에틸렌 글리콜 링커이며;
- [33] a는, 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고;
- [34] F는, 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;
- [35] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타내며;
- [36] 상기 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2에서 1번, 12번, 18번, 19번, 20번, 22번, 32번, 35번, 38번, 42번, 43번, 45번, 48번, 49번, 61번, 68번, 69번, 74번, 76번, 80번, 81번, 82번, 84번, 85번, 86번, 87번, 88번, 89번, 91번, 92번, 94번, 95번, 96번, 125번, 126번 및 133번 위치에 상응하는 아미노산 중 하나 이상이 변이된 서열을 포함함.
- [37] 다른 하나의 구체예로서, 상기 지속형 결합체는 천연형 인터루킨 2 중 하나 이상의 아미노산이 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변이가 일어난 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [38] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 천연형 인터루킨 2 또는 알테스루킨에 비해 인터루킨 2 알파 수용체 결합력이 변화되고, 인터루킨 2 베타 수용체 결합력이 증대된 인터루킨 2 아날로그를 결합체의 일부로서 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [39] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 상기 133번 위치에 상응하는 아미노산에 하나 이상의 아미노산이 추가된 인터루킨 2 아날로그를 결합체의 일부로서 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [40] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 서열을 포함하는 인터루킨 2 아날로그를 결합체의 일부로서 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [41] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 1개 내지 10개의 아미노산 치환을 추가로 포함하는 인터루킨 2 아날로그를 결합체의 일부로서 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [42] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 인터루킨 2 아날로그 부위의 18번, 19번, 20번, 22번, 38번, 42번, 43번, 45번, 61번, 68번, 69번, 74번, 80번, 81번, 84번, 85번, 86번, 88번, 89번, 91번, 92번, 94번, 및 96번 위치에 상응하는 아미노산 중 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 추가로 치환된 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [43] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 18번, 22번, 38번, 42번, 61번, 68번, 80번, 81번, 85번, 86번 및 92번 위치에 상응하는 아미노산 중 하나 이상의

아미노산이 다른 아미노산으로 추가로 치환된 인터루킨 2 아날로그를 결합체의 일부로서 포함하는 것을 특징으로 한다.

- [44] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 하기 아날로그 중 어느 하나의 인터루킨 2 아날로그를 결합체의 일부로서 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [45] (a) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 32번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (b) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 35번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (c) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 38번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (d) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 42번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (e) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 43번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (f) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 48번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (g) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 49번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (h) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 76번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (i) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 81번, 92번, 94번 및 96번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (j) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 87번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (k) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 및 42번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (l) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 및 80번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (m) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 및 84번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (n) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 19번, 38번, 및 42번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (o) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 12번, 38번, 및 42번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (p) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 및 61번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (q) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 및 84번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (r) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 및 88번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (s) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 및 89번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2

[illegible]

[illegible]

85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bf) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 68번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bg) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 35번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bh) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 45번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bi) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 91번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bj) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 92번, 및 95번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bk) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 35번, 38번, 42번, 74번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bl) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 43번, 61번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bm) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 91번, 92번, 및 95번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bn) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 35번, 38번, 42번, 74번, 80번, 81번, 82번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bo) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 86번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; 및 (bp) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 85번, 및 86번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그.

- [46] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 하기 아미노산 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 치환을 포함하는 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [47] (a) 12번 아미노산이 발린 또는 페닐알라닌으로 치환; (b) 18번 아미노산이 아르기닌으로 치환; (c) 19번 아미노산 티로신, 발린, 페닐알라닌, 아르기닌으로 치환; (d) 20번 아미노산이 발린 또는 페닐알라니움으로 치환; (e) 22번 아미노산이 글루탐산으로 치환; (f) 32번 아미노산이 시스테인으로 치환; (g) 35번 아미노산이 시스테인 또는 글루탐산으로 치환; (h) 38번 아미노산이 알라닌 또는 아스파르트산으로 치환; (i) 42번 아미노산이 라이신, 알라닌, 또는 트립토판으로 치환; (j) 43번 아미노산이 시스테인, 글루탐산, 또는 글루타민으로 치환; (k) 45번 아미노산이 알라닌으로 치환; (l) 48번 아미노산이 시스테인으로 치환; (m) 49번 아미노산이 시스테인으로 치환; (n) 61번 아미노산이 글루타민, 아르기닌, 또는

- 아스파르트산으로 치환; (o) 68번 아미노산이 아스파르트산, 또는 글루타민으로 치환; (p) 69번 아미노산이 글리신으로 치환; (q) 74번 아미노산이 히스티딘 또는 알라닌으로 치환; (r) 76번 아미노산이 시스테인으로 치환; (s) 80번 아미노산이 페닐알라닌, 티로신, 발린, 아스파르트산, 또는 트립토판으로 치환; (t) 81번 아미노산이 아스파르트산, 글루탐산, 또는 아스파라긴으로 치환; (u) 82번 아미노산이 글리신, 또는 발린으로 치환; (v) 84번 아미노산이 글루탐산, 발린, 또는 페닐알라닌으로 치환; (w) 85번 아미노산이 발린, 알라닌, 글리신, 트립토판, 티로신, 트레오닌, 이소류신, 글루탐산, 또는 페닐알라닌으로 치환; (x) 86번 아미노산이 발린, 알라닌, 글리신, 또는 류신으로 치환; (y) 87번 아미노산이 시스테인으로 치환; (z) 88번 아미노산이 글루타민, 발린, 또는 페닐알라닌으로 치환; (aa) 89번 아미노산이 페닐알라닌으로 치환; (ab) 91번 아미노산이 트레오닌, 페닐알라닌, 또는 글루탐산으로 치환; (ac) 92번 아미노산이 페닐알라닌, 류신, 티로신, 또는 트립토판으로 치환; (ad) 94번 아미노산이 페닐알라닌, 또는 발린으로 치환; (ae) 95번 아미노산이 아스파르트산으로 치환; (af) 96번 아미노산이 페닐알라닌, 발린, 또는 이소류신으로 치환; (ag) 125번 아미노산이 세린으로 치환; 및 (ah) 126번 아미노산이 트레오닌으로 치환.
- [48] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 서열번호 3 내지 106으로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하는 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [49] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 하기 아날로그 중 어느 하나의 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [50] (a) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (b) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 85번, 86번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (c) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (d) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (e) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 61번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; 및 (f) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 68번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그.
- [51] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 하기 아미노산 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 것을 특징으로 한다:
- [52] (a) 18번 아미노산이 아르기닌으로 치환; (b) 22번 아미노산이 글루탐산으로

치환; (c) 38번 아미노산이 알라닌으로 치환; (d) 42번 아미노산이 라이신으로 치환; (e) 61번 아미노산이 아스파르트산으로 치환; (f) 68번 아미노산이 아스파르트산으로 치환; (g) 80번 아미노산이 페닐알라닌으로 치환; (h) 81번 아미노산이 글루탐산으로 치환; (i) 85번 아미노산이 발린으로 치환; (j) 86번 아미노산이 발린으로 치환; (k) 92번 아미노산이 페닐알라닌으로 치환; 및 (l) 125번 아미노산이 세린으로 치환.

- [53] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 하이브리드(hybrid)인 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [54] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 IgG4 Fc 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [55] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 비당쇄화된 면역글로불린 Fc 영역을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [56] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 상기 면역글로불린 Fc 영역은 인간 IgG4 유래의 비-당쇄화된 Fc 영역에서 유래한 것을 특징으로 한다.
- [57] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결된 것을 특징으로 한다.
- [58] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 438의 아미노산 서열을 갖는 단량체를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [59] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 상기 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 438의 아미노산 서열의 단량체의 동종이량체인 것을 특징으로 한다.
- [60] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 상기 면역글로불린 Fc 영역은 그 N-말단 프롤린의 질소 원자를 통하여 연결된 것을 특징으로 한다.
- [61] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 상기 L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하고, 상기 에틸렌글리콜 반복 단위 부위(moiety)의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 것을 특징으로 한다.
- [62] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 상기 이량체 형태 면역글로불린 Fc 영역 중 하나의 Fc 영역에 X 한 분자가 상기 폴리에틸렌글리콜 링커를 통하여 서로 공유결합적으로 연결된 것을 특징으로 한다.
- [63] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체로서, 상기 에틸렌글리콜 반복 단위는 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 으로서, n은 자연수로, 상기 인터루킨 2 아날로그 결합체 내 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균 분자량이 1 내지 100 kDa이 되도록 정해지는 것을 특징으로 한다.
- [64] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체로서, 상기 n의 값은 상기 인터루킨 2 아날로그 결합체 내 $[\text{OCH}_2\text{CH}_2]_n$ 부위의 평균 분자량, 예컨대 수평균

- 분자량이 3.4 kDa이 되도록 정해지는 것을 특징으로 한다.
- [65] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체로서, 상기 a는 1이고, 상기 이량체 형태 변역글로불린 Fc 영역 중 하나의 Fc 영역 사슬에 X 한 분자가 상기 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커를 통하여 서로 공유결합적으로 연결된 것을 특징으로 한다.
- [66] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체로서, 상기 링커의 한 말단이 상기 이량체 형태 변역글로불린 Fc 영역의 두 Fc 영역 사슬 중 하나의 Fc 영역 사슬에만 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [67] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체로서, 상기 결합체는 L의 한쪽 말단이 F의 아민기 또는 티올기와, L의 다른 말단이 X의 아민기 또는 티올기에 각각 반응하여 형성된 공유결합으로 F 및 X에 각각 연결되어 있는 것을 특징으로 한다.
- [68] 본 발명의 다른 하나의 양태는 하기 화학식 2로 표시되는 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체이다:
- [69] [화학식 2]
- [70] X - Z - Fc
- [71] 이 때 X는 서열번호 3 내지 106의 아미노산 서열에서 선택되는 어느 하나의 폴리펩타이드 서열을 포함하는 인터루킨 2 아날로그이고;
- [72] Z는 폴리에틸렌글리콜 링커로서 분자량 2 kDa 내지 30 kDa의 링커이며;
- [73] Fc는 이량체 형태의 변역글로불린 Fc 영역이고;
- [74] -는 X와 Z 사이, Z와 Fc 사이의 공유결합 연결을 나타내며,
- [75] 상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태의 Fc 영역 중 한 폴리펩타이드 사슬에만 Z의 일 말단이 공유결합으로 연결되어 있고, 이 Z의 반대쪽 말단에 X 한 분자가 공유결합으로 연결되어 있는 지속형 결합체.
- [76] 하나의 구체예로서, 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 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [77] 다른 구체예로서, 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 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [78] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체는 서열번호 22, 42, 53, 87, 105 및 106의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [79] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 지속형 결합체의 인터루킨 2 아날로그는 C-말단에 하나 이상의 아미노산을 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [80] 본 발명의 다른 하나의 양태는 하기 화학식 3으로 표시되는 인터루킨 2

아날로그의 지속형 결합체이다:

- [81] [화학식 3]
- [82] X' - Z - Fc
- [83] 이 때 X'는 하기 일반식 1로 표현되는 아미노산 서열을 포함하는, 인터루킨 2 아날로그이고,
- [84] [일반식 1]
- [85] X1-P-T-S-S-S-T-K-K-T-Q-L-Q-L-E-H-L-X18-X19-D-L-X22-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-X38-M-L-T-X42-X43-F-X45-M-P-K-K-A-T-E-L-K-H-L-Q-C-L-E-X61-E-L-K-P-L-E-X68-V-L-N-L-A-X74-S-K-N-F-H-X80-X81-P-R-X84-X85-X86-S-N-I-N-X91-X92-V-X94-E-X96-K-G-S-E-T-T-F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-S-Q-S-I-I-S-T-L-T(일반식 1, 서열번호 212)
- [86] 상기 일반식 1에서,
- [87] X1은 결실이고,
- [88] X18은 류신(L), 또는 아르기닌(R)이고,
- [89] X19는 류신(L), 또는 티로신(Y)이고,
- [90] X22는 글루탐산(E), 또는 글루타민(Q)이고,
- [91] X38은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 또는 아르기닌(R)이고,
- [92] X42는 알라닌(A), 페닐알라닌(F), 리신(K), 또는 트립토판(W)이고,
- [93] X43은 글루탐산(E), 리신(K), 또는 글루타민(Q)이고,
- [94] X45는 알라닌(A), 또는 티로신(Y)이고,
- [95] X61은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이고,
- [96] X68은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
- [97] X74는 히스티딘(H), 또는 글루타민(Q)이고,
- [98] X80은 페닐알라닌(F), 류신(L), 발린(V), 또는 티로신(Y)이고,
- [99] X81은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 또는 아르기닌(R)이고,
- [100] X84는 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
- [101] X85는 알라닌(A), 글루탐산(E), 글리신(G), 류신(L), 발린(V), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이고,
- [102] X86은 알라닌(A), 글리신(G), 이소류신(I), 또는 발린(V)이고,
- [103] X91은 트레오닌(T), 또는 발린(V)이고,
- [104] X92는 페닐알라닌(F), 이소류신(I), 또는 티로신(Y)이고,
- [105] X94는 페닐알라닌(F), 또는 류신(L)이고,
- [106] X96은 페닐알라닌(F), 또는 류신(L)임;
- [107] Z는 폴리에틸렌글리콜 링커로서 분자량 2 kDa 내지 30 kDa의 링커이며;
- [108] Fc는 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;
- [109] -는 X'와 Z 사이, Z와 Fc 사이의 공유결합 연결을 나타내며,
- [110] 상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태의 Fc 영역 중 한 폴리펩타이드 사슬에만 Z의 일 말단이 공유결합으로 연결되어 있고, 이 Z의 반대쪽 말단에 X'

한 분자가 공유결합으로 연결됨.

- [111] 하나의 구체예로서, 상기 일반식 1에서,
- [112] X43은 리신(K)이고,
- [113] X45는 티로신(Y)이고,
- [114] X61은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 또는 글루타민(Q)이고,
- [115] X68은 글루탐산(E)이고,
- [116] X74는 글루타민(Q)이고,
- [117] X80은 페닐알라닌(F), 또는 류신(L)이고,
- [118] X85는 류신(L), 발린(V), 또는 티로신(Y)이고,
- [119] X86은 이소류신(I), 또는 발린(V)이고,
- [120] X92는 페닐알라닌(F), 또는 이소류신(I)인 것을 특징으로 한다.
- [121] 다른 구체예로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 C-말단에 하나 이상의 아미노산이 추가로 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [122] 본 발명의 다른 하나의 양태는 하기 화학식 4로 표시되는 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체이다:
- [123] [화학식 4]
- [124] X" - Z - Fc
- [125] 이 때 X"는 하기 일반식 2로 표현되는 아미노산 서열을 포함하는, 인터루킨 2 아날로그이고,
- [126] [일반식 2]
- [127] X1-P-T-S-S-S-T-K-K-T-Q-L-Q-L-E-H-L-X18-L-D-L-X22-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-X38-M-L-T-X42-K-F-Y-M-P-K-K-A-T-E-L-K-H-L-Q-C-L-E-X61-E-L-K-P-L-E-X68-V-L-N-L-A-Q-S-K-N-F-H-F-X81-P-R-D-X85-X86-S-N-I-N-V-F-V-L-E-L-K-G-S-E-T-T-F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-S-Q-S-I-I-S-T-L-T(일반식 2, 서열번호 213)
- [128] X1은 결실이고,
- [129] X18은 류신(L), 또는 아르기닌(R)이고,
- [130] X22는 글루탐산(E), 또는 글루타민(Q)이고,
- [131] X38은 알라닌(A), 또는 아르기닌(R)이고,
- [132] X42는 페닐알라닌(F), 또는 리신(K) 이고,
- [133] X61은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
- [134] X68은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
- [135] X81은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
- [136] X85는 류신(L), 또는 발린(V)이고,
- [137] X86은 이소류신(I), 또는 발린(V)임;
- [138] Z는 폴리에틸렌글리콜 링커로서 분자량 2 kDa 내지 30 kDa의 링커이며;
- [139] Fc는 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;
- [140] -는 X"와 Z 사이, Z와 Fc 사이의 공유결합 연결을 나타내며,

- [141] 상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태의 Fc 영역 중 한 폴리펩타이드 사슬에만 Z의 일 말단이 공유결합으로 연결되어 있고, 이 Z의 반대쪽 말단에 X" 한 분자가 공유결합으로 연결됨.
- [142] 하나의 구체예로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 22, 42, 53, 87, 105 및 106의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [143] 본 발명의 다른 하나의 양태는 인터루킨 2 아날로그를 비펩타이드성 중합체를 통해 면역글로불린 Fc 영역과 연결시키는 단계를 포함하는, 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 지속형 결합체를 제조하는 방법이다.
- [144] 하나의 구체예로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2에서 1번, 12번, 18번, 19번, 20번, 22번, 32번, 35번, 38번, 42번, 43번, 45번, 48번, 49번, 61번, 68번, 69번, 74번, 76번, 80번, 81번, 82번, 84번, 85번, 86번, 87번, 88번, 89번, 91번, 92번, 94번, 95번, 96번, 125번, 126번 및 133번 위치에 상응하는 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산이 변이된 것을 특징으로 한다.
- [145] 본 발명의 다른 하나의 양태는 인터루킨 2 아날로그(analog) 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물이다.
- [146] 하나의 구체예로서, 상기 약학 조성물은 약학적 유효량의 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체와 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [147] 다른 구체예로서, 상기 약학 조성물의 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2에서 1번, 12번, 18번, 19번, 20번, 22번, 32번, 35번, 38번, 42번, 43번, 45번, 48번, 49번, 61번, 68번, 69번, 74번, 76번, 80번, 81번, 82번, 84번, 85번, 86번, 87번, 88번, 89번, 91번, 92번, 94번, 95번, 96번, 125번, 126번 및 133번 위치에 상응하는 아미노산 중 하나 이상이 변이된 서열을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [148] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물은 알데스루킨에 비해 인터루킨 2 베타 수용체 결합력이 증대된 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [149] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 3 내지 106으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 한다.
- [150] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 22, 42, 53, 87, 105, 및 106으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 한다.
- [151] 앞선 구체예 중 어느 하나에 따른 약학 조성물로서, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 것을 특징으로 한다:
- [152] [화학식 1]
- [153] X - La - F

- [154] 여기서, X는, 알테스루킨에 비해 인터루킨 2 베타 수용체 결합력이 증대된 인터루킨 2 아날로그이고;
- [155] L은, 폴리에틸렌 글리콜 링커이며;
- [156] a는, 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고;
- [157] F는, 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;
- [158] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타냄.
- [159] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학 조성물로서, 상기 암은 전이성 신세포암, 전이성 흑색종, 대장암, 간암, 난소암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 대장암, 폐암, 피부암, 흑색종, 유방암, 방광암, 및 위암으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 한다.
- [160] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학 조성물로서, 조성물은 알테스루킨에 비해 높은 혈중 노출도, 종양 성장 억제, 및/또는 기억 T 세포 반응을 나타내는 것을 특징으로 한다.
- [161] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학 조성물로서, 상기 약학 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.
- [162] 앞선 구체에 중 어느 하나에 따른 약학 조성물로서, 상기 약학 조성물은 1주 내지 1개월 범위의 시간 간격으로 투여되는 것을 특징으로 한다.
- [163] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 인터루킨 2 아날로그, 이의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법이다.
- [164] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 인터루킨 2 아날로그, 이의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 암의 예방 또는 치료 용도이다.
- [165] 본 발명의 다른 하나의 양태는 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 암의 예방 또는 치료를 위한 약제를 제공하기 위한 용도이다.
- [166]

발명의 실시를 위한 형태

- [167] 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.
- [168]
- [169] 본 명세서 전반을 통하여, 아미노산에 대한 통상의 1문자 및 3문자 코드가

사용된다. 또한 본 명세서에서 약어로 언급된 아미노산은 IUPAC-IUB 명명법에 따라 기재하였다.

- [170] 알라닌 A 아르기닌 R
- [171] 아스파라긴 N 아스파르트산 D
- [172] 시스테인 C 글루탐산 E
- [173] 글루타민 Q 글리신 G
- [174] 히스티딘 H 이소류신 I
- [175] 류신 L 라이신 K
- [176] 메티오닌 M 페닐알라닌 F
- [177] 프롤린 P 세린 S
- [178] 트레오닌 T 트립토판 W
- [179] 티로신 Y 발린 V
- [180]
- [181] 본 명세서에서 “Aib”는 “2-아미노이소부티르산(2-aminoisobutyric acid)” 또는 “아미노이소부티르산 (aminoisobutyric acid)”으로 혼용될 수 있으며, 2-아미노이소부티르산(2-aminoisobutyric acid)과 아미노이소부티르산 (aminoisobutyric acid)은 혼용되어 사용될 수 있다.
- [182]
- [183] 본 발명의 하나의 양태는 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 지속형 결합체를 제공한다.
- [184] 구체적으로, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는 것일 수 있다:
- [185] [화학식 1]
- [186] X - La - F
- [187] 여기서, X는, 알데스루킨에 비해 인터루킨 2 베타 수용체 결합력이 증대된 인터루킨 2 아날로그(analog)이고;
- [188] L은, 폴리에틸렌 글리콜 링커이며;
- [189] a는, 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고;
- [190] F는, 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;
- [191] -는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타냄.
- [192]
- [193] 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 천연형 인터루킨 2 또는 공지된 알데스루킨에 비해 인터루킨 2 베타 수용체에 대한 결합력이 증대된 것일 수 있고, 보다 구체적으로, 인터루킨 2 알과 수용체에 대한 결합력도 변화(증가 또는 감소)된 것으로서, 천연형 인터루킨 2에서 하나 이상의 아미노산이 변이된 서열을 포함하는 것일 수 있다.

[194]

[195] 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.

[196] 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.

[197] 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.

[198] 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.

[199]

[200] 본 발명에서, 천연형 서열에서 하나 이상의 아미노산이 변이된 것이란 천연형 인터루킨 2에서 적어도 하나 이상의 아미노산에 치환(substitution), 추가(addition), 제거(deletion), 수식(modification) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 변형이 일어난 것일 수 있다.

[201]

[202] 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2에서 1번, 12번, 18번, 19번, 20번, 22번, 32번, 35번, 38번, 42번, 43번, 45번, 48번, 49번, 61번, 68번, 69번, 74번, 76번, 80번, 81번, 82번, 84번, 85번, 86번, 87번, 88번, 89번, 91번, 92번, 94번, 95번, 96번, 125번, 126번 및 133번 위치에 상응하는 아미노산 중 하나 이상이 변이된 서열을 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2에서 1번 아미노산이 제거되고, 125번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 추가적으로 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 포함하는 것일 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 125번 아미노산인 시스테인이 세린으로 치환될 수 있고, 추가 치환이 일어나는 아미노산은 12번, 18번, 19번, 20번, 22번, 32번, 35번, 38번, 42번, 43번, 45번, 48번, 49번, 61번, 68번, 69번, 74번, 76번, 80번, 81번, 82번, 84번, 85번, 86번, 87번, 88번, 89번, 91번, 92번, 94번, 95번, 96번, 126번 및 133번 위치에 상응하는 아미노산이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[203]

[204] 또한, 상기 변이 위치 외에 당업계에서 알려진, 펩타이드의 안정성 및 반감기 증가를 위해 수행될 수 있는 정도의 아미노산 잔기의 치환, 부가, 결실, 수식 등을 포함하는 인터루킨 2 아날로그 역시 본 발명의 범주에 포함된다.

[205]

[206] 본 발명에서 용어, “알데스루킨(aldesleukin)” 또는 “인터루킨 2 아날로그(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.

[207] 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.

[208] 인터루킨 2 베타 수용체는 CD8⁺ T 세포 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.

[209] 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.

[210]

[211] 본 발명에서 상기 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 서열을 포함하는 것일 수 있고, 1 내지 10개의 아미노산 변이를 추가로 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, 125번 아미노산이 세린으로 치환되고, 12번, 18번, 19번, 20번, 22번, 32번, 35번, 38번, 42번, 43번, 45번, 48번, 49번, 61번, 68번, 69번, 74번, 76번, 80번, 81번, 82번, 84번, 85번, 86번, 87번, 88번, 89번, 91번, 92번, 94번, 95번, 96번, 및 126번 중 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 추가로 치환되고/되거나, 133번 아미노산에 하나 이상의 아미노산이 추가된 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 천연형 인터루킨 2 및/또는 알데스루킨에 비해 인터루킨 2 알파 수용체 결합력이 변화되고, 인터루킨 2 베타 수용체 결합력이 증가된 인터루킨 2 아날로그는 제한 없이 포함된다.

[212]

[213] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그의 하나의 예로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 상기 133번 위치에 상응하는 아미노산에 하나 이상의 아미노산이 추가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 목적상, 상기 추가되는 아미노산은

천연형 인터루킨 2 또는 알테스루킨에 비해 인터루킨 2 알파 수용체 결합력이 변화되고, 인터루킨 2 베타 수용체 결합력이 증대되는 이상, 그 종류나 길이에 제한이 없으며, 천연형 아미노산 외에도 비천연형 아미노산, 화학적 변형을 포함하는 아미노산 역시 추가될 수 있다.

[214]

[215] 다른 하나의 예로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 18번, 19번, 20번, 22번, 38번, 42번, 43번, 45번, 61번, 68번, 69번, 74번, 80번, 81번, 84번, 85번, 86번, 88번, 89번, 91번, 92번, 94번, 및 96번 아미노산 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[216]

[217] 또 다른 예로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 18번, 19번, 22번, 38번, 42번, 43번, 45번, 61번, 68번, 74번, 80번, 81번, 84번, 85번, 86번, 88번, 91번, 92번, 94번, 및 96번 아미노산 중 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 그 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 추가로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[218]

[219] 또 다른 예로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환되고, 18번, 22번, 38번, 42번, 61번, 68번, 80번, 81번, 85번, 86번 및 92번 위치에 상응하는 아미노산 중 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 추가로 치환된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[220]

[221] 또 다른 예로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 하기 아날로그로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다:

[222] (a) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 32번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (b) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 35번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (c) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 38번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (d) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 42번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (e) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 43번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (f) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 48번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (g) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 49번 아미노산이 다른

[illegible]

[illegible]

91번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (av) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (aw) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (ax) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 45번, 74번, 80번, 81번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (ay) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 68번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (az) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 69번, 74번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (ba) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 84번, 85번, 86번, 91번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bb) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 85번, 86번, 92번, 94번, 및 96번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bc) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 19번, 22번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bd) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 38번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (be) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 61번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bf) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 68번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bg) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 35번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bh) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 45번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bi) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 91번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bj) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 92번, 및 95번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bk) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 35번, 38번, 42번, 74번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bl) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 43번, 61번, 80번,

81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bm) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 91번, 92번, 및 95번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bn) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 35번, 38번, 42번, 74번, 80번, 81번, 82번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (bo) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 86번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; 및 (bp) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 85번, 및 86번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그.

- [223] 여기에서, 상기 인터루킨 2 아날로그가 포함하는 아미노산 치환은 하기 아미노산 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다:
- [224] (a) 12번 아미노산이 발린 또는 페닐알라닌으로 치환; (b) 18번 아미노산이 아르기닌으로 치환; (c) 19번 아미노산 티로신, 발린, 페닐알라닌, 아르기닌으로 치환; (d) 20번 아미노산이 발린 또는 페닐알라닌으로 치환; (e) 22번 아미노산이 글루탐산으로 치환; (f) 32번 아미노산이 시스테인으로 치환; (g) 35번 아미노산이 시스테인 또는 글루탐산으로 치환; (h) 38번 아미노산이 알라닌 또는 아스파르트산으로 치환; (i) 42번 아미노산이 라이신, 알라닌, 또는 트립토판으로 치환; (j) 43번 아미노산이 시스테인, 글루탐산, 또는 글루타민으로 치환; (k) 45번 아미노산이 알라닌으로 치환; (l) 48번 아미노산이 시스테인으로 치환; (m) 49번 아미노산이 시스테인으로 치환; (n) 61번 아미노산이 글루타민, 아르기닌, 또는 아스파르트산으로 치환; (o) 68번 아미노산이 아스파르트산, 또는 글루타민으로 치환; (p) 69번 아미노산이 글리신으로 치환; (q) 74번 아미노산이 히스티딘 또는 알라닌으로 치환; (r) 76번 아미노산이 시스테인으로 치환; (s) 80번 아미노산이 페닐알라닌, 티로신, 발린, 아스파르트산, 또는 트립토판으로 치환; (t) 81번 아미노산이 아스파르트산, 글루탐산, 또는 아스파라긴으로 치환; (u) 82번 아미노산이 글리신, 또는 발린으로 치환; (v) 84번 아미노산이 글루탐산, 발린, 또는 페닐알라닌으로 치환; (w) 85번 아미노산이 발린, 알라닌, 글리신, 트립토판, 티로신, 트레오닌, 이소류신, 글루탐산, 또는 페닐알라닌으로 치환; (x) 86번 아미노산이 발린, 알라닌, 글리신, 또는 류신으로 치환; (y) 87번 아미노산이 시스테인으로 치환; (z) 88번 아미노산이 글루타민, 발린, 또는 페닐알라닌으로 치환; (aa) 89번 아미노산이 페닐알라닌으로 치환; (ab) 91번 아미노산이 트레오닌, 페닐알라닌, 또는 글루탐산으로 치환; (ac) 92번 아미노산이 페닐알라닌, 류신, 티로신, 또는 트립토판으로 치환; (ad) 94번 아미노산이 페닐알라닌, 또는 발린으로 치환; (ae) 95번 아미노산이 아스파르트산으로 치환; (af) 96번 아미노산이 페닐알라닌, 발린, 또는 이소류신으로 치환; (ag) 125번 아미노산이 세린으로 치환; 및 (ah) 126번 아미노산이 트레오닌으로 치환.

[225]

- [226] 또 다른 예로서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 하기 인터루킨 2 아날로그 중 선택되는 어느 하나인 것을 수 있다:
- [227] (a) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (b) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 85번, 86번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (c) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (d) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; (e) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 61번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그; 및 (f) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 68번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된, 인터루킨 2 아날로그.
- [228] 여기에서, 상기 인터루킨 2 아날로그가 포함하는 아미노산 치환은 하기 아미노산 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있다:
- [229] (a) 18번 아미노산이 아르기닌으로 치환; (b) 22번 아미노산이 글루탐산으로 치환; (c) 38번 아미노산이 알라닌으로 치환; (d) 42번 아미노산이 라이신으로 치환; (e) 61번 아미노산이 아스파르트산으로 치환; (f) 68번 아미노산이 아스파르트산으로 치환; (g) 80번 아미노산이 페닐알라닌으로 치환; (h) 81번 아미노산이 글루탐산으로 치환; (i) 85번 아미노산이 발린으로 치환; (j) 86번 아미노산이 발린으로 치환; (k) 92번 아미노산이 페닐알라닌으로 치환; 및 (l) 125번 아미노산이 세린으로 치환.
- [230]
- [231] 본 명세서에서, 용어 "상응하는(corresponding to)"은, 펩타이드에서 열거되는 위치의 아미노산 잔기이거나, 또는 펩타이드에서 열거되는 잔기와 유사하거나 동일하거나 상동한 아미노산 잔기를 지칭한다. 상응하는 위치의 아미노산을 확인하는 것은 특정 서열을 참조하는 서열의 특정 아미노산을 결정하는 것일 수 있다.
- [232] 예를 들어, 임의의 아미노산 서열을 서열번호 1과 정렬(align)하고, 이를 토대로 상기 아미노산 서열의 각 아미노산 잔기는 서열번호 1의 아미노산 잔기와 상응하는 아미노산 잔기의 숫자 위치를 참조하여 넘버링 할 수 있다.
- [233] 이러한 정렬에는 예를 들어 Needleman-Wunsch 알고리즘 (Needleman 및 Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453), EMBOSS 패키지의 Needle 프로그램 (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000), Trends Genet. 16: 276-277) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않고 당업계에 알려진 서열 정렬 프로그램, 쌍 서열(pairwise sequence) 비교 알고리즘 등을

적절히 사용할 수 있다.

- [234] 본 발명에서 펩타이드 내 아미노산의 특정 위치로 표현되었더라 하더라도, 참조 서열에서 상응하는 위치를 의미하는 것일 수 있다.
- [235]
- [236] 또 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.
- [237] 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.
- [238] 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.
- [239] 구체적인 예로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 21, 41, 52, 86, 104, 및 105로 이루어진 군에서 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 구성되거나, 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [240] 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.
- [241] 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.
- [242] 용어 상동성 및 동일성은 종종 상호교환적으로 이용될 수 있다.
- [243]
- [244] 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

공지의 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 패키지 (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 ET AL.](1988) SIAM J Applied Math 48: 1073을 포함한다). 예를 들어, 국립 생물공학 정보 데이터베이스 센터의 BLAST, 또는 ClustalW를 이용하여 상동성, 유사성 또는 동일성을 결정할 수 있다.

- [245] 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)를 나타낸다.

- [246] 이상의 내용은 본 발명의 다른 구체에 혹은 다른 양태에도 적용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[247]

- [248] 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.

[249]

- [250] 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

고리 형성, 메틸화, 아실화, 유비퀴틴화, 인산화, 아미노핵산화, 바이오틴화 등과 같이 개질함으로써 변형하는 것을 모두 포함한다.

- [251] 또한, 천연형 인터루킨 2의 아미노 및/또는 카르복시 말단에 하나 또는 그 이상의 아미노산이 추가된 것을 모두 포함한다.
- [252] 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.
- [253] 아미노산 유도체도 마찬가지로 방식으로 입수할 수 있는데, 그 예를 일부분 들자면 4-이미다조아세트산 (4-imidazoacetic acid) 등을 사용할 수 있다.
- [254]
- [255] 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.
- [256] 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.
- [257]
- [258] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 Solid phase 합성법을 통하여 합성될 수 있으며, 재조합 방법으로도 생산 가능하고, 상업적으로 의뢰하여 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [259] 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.
- [260] 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:
- [261] (a) 펩타이드를 고체상 또는 액체상 방법의 수단으로 단계적으로 또는 단편 조립에 의해 합성하고, 최종 펩타이드 생성물을 분리 및 정제하는 방법; 또는
- [262] (b) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물을 숙주세포 내에서 발현시키고, 발현 생성물을 숙주 세포 배양물로부터 회수하는 방법; 또는
- [263] (c) 펩타이드를 인코딩하는 핵산 작제물의 무세포 시험관 내 발현을 수행하고, 발현 생성물을 회수하는 방법; 또는
- [264] (a), (b) 및 (c)의 임의의 조합으로 펩타이드의 단편을 수득하고, 이어서 단편을

연결시켜 펩타이드를 수득하고, 당해 펩타이드를 회수하는 방법.

[265]

[266] 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.

[267] 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.

[268] 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.

[269] 보다 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2 또는 인터루킨 2 아날로그(aldesleukin; 또는 인터루킨 2 아날로그 1)에 비해 감소되거나 증가된 인터루킨 2 알파 수용체 결합력을 가질 수 있다.

[270] 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2 또는 알데스루킨의 인터루킨 2 알파 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 알파 수용체 결합력을 갖는 것일 수 있으나, 그 수치는 한정되지 않으며 결합력이 천연형 인터루킨 2 또는 알데스루킨과 대비하여 변경되었으면 본 발명의 범주에 속한다.

[271] 또는, 알데스루킨의 인터루킨 2 알파 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.

[272]

- [273] 또한, 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2 또는 알테스루킨의 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.
- [274] 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.
- [275]
- [276] 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.
- [277] 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.
- [278]
- [279] 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.
- [280]
- [281] 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.
- [282] 본 발명의 염기 서열은 코돈의 축퇴성(degeneracy) 또는 본 발명의 핵산을 발현시키고자 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 염기서열을 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.

- [283] 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.
- [284] 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.
- [285] 상기 폴리뉴클레오티드를 혼성화하는 적절한 엄격도는 폴리뉴클레오티드의 길이 및 상보성 정도에 의존하고 변수는 해당기술분야에 잘 알려져 있다(예컨대, J. Sambrook et al., 상동).
- [286] 상동성 또는 동일성에 관해서는 상술한 바와 같다.
- [287] 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.
- [288] 본 발명에 따른 지속형 결합체는 인터루킨 2 베타 수용체에 대한 결합력을 높은 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.
- [289]

- [290] 본 발명을 구현하기 위한 다른 하나의 양태는 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체를 제공한다.
- [291] 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.
- [292] 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.
- [293] 한편, 이러한 결합체는 비자연적으로 발생된(non-naturally occurring) 것일 수 있다.
- [294] 본 발명의 하나의 구체예에서, 상기 지속형 결합체는 하기 화학식 1로 표시되는, 지속형 결합체이다:
- [295] [화학식 1]
- [296] X - La - F
- [297] 여기서,
- [298] X는, 알테스루킨에 비해 인터루킨 2 베타 수용체 결합력이 증대된 인터루킨 2 아날로그(analog)이고;
- [299] L은, 폴리에틸렌 글리콜 링커이며;
- [300] a는, 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고;
- [301] F는, 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;
- [302] 상기 "-"는 공유결합이다.
- [303] 보다 구체적으로, 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.
- [304] 또한, 상기 F는 X와 직접적으로 연결되거나(즉, 상기 화학식 1에서 a가 0이거나), 또는 링커(L)를 통해 연결된 것일 수 있다.
- [305]
- [306] 본 발명에서, 상기 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.
- [307] 상기 결합체에서 F는 X, 즉 인터루킨 2 아날로그의 반감기를 증가시킬 수 있는 물질로서, 본 발명의 결합체를 구성하는 모이어티의 일 구성에 해당한다.
- [308] 상기 F는 X와 공유 화학결합으로 서로 결합되는 것일 수 있으며, 공유 화학결합으로 L을 통하여 F와 X가 서로 결합되는 것일 수 있다.
- [309] 구체적으로, 상기 F는 면역글로불린 Fc 영역이고, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG Fc 영역, 또는 비당쇄화된 IgG4 Fc 영역일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.

- [310] 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.
- [311]
- [312] 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.
- [313] 상술한 생체적합성 물질은 수용성(양친매성 또는 친수성) 및/또는 무독성 및/또는 약학적으로 허용가능한 것일 수 있다.
- [314] 상기 F는 X와 직접적으로 연결되거나(즉, 상기 화학식 1에서 a가 0이거나), 또는 폴리에틸렌 글리콜 링커(L)를 통해 연결된 것일 수 있다.
- [315]
- [316] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 본 발명의 지속형 결합체는 인터루킨 2 아날로그와 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [317]
- [318] 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.
- [319] 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.
- [320] 상기 F(면역글로불린 Fc 영역)는, 2개의 폴리펩타이드 사슬이 이황화결합으로 연결되어 있는 구조이며, 상기 두 사슬 중 한 사슬의 질소 원자를 통해서만 연결되어 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.
- [321] 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.

- [322] 본 발명의 지속형 결합체의 하나의 구체예로서, 상기 지속형 결합체는 상기 면역글로불린 Fc 영역이 그 N-말단 질소 원자를 통하여 링커에 연결된 것일 수 있다.
- [323]
- [324] 이러한 면역글로불린 Fc 영역은 중쇄 불변영역에 힌지(hinge) 부분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [325] 본 발명에서, 면역글로불린 Fc 영역은 N-말단에 특정 힌지 서열을 포함할 수 있다.
- [326] 본 발명의 용어, "힌지 서열"은 중쇄에 위치하여 이황화결합(inter disulfide bond)를 통하여 면역글로불린 Fc 영역의 이량체를 형성하는 부위를 의미한다.
- [327] 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:
- [328] Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro(서열번호 418).
- [329] 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).
- [330] 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.

- [331] 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.
- [332] 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.
- [333] 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.
- [334]
- [335] 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 경쇄불변영역 1(CL1)을 포함하는 확장된 Fc 영역일 수 있다. 또한, CH2 및/또는 CH3에 해당하는 상당히 긴 일부 아미노산 서열이 제거된 영역일 수도 있다.
- [336] 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.
- [337] 본 발명에서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 동일한 기원의 도메인으로 이루어진 단쇄 면역글로불린들로 구성된, 이량체 또는 다량체 형태일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [338]
- [339] 또한, 본 발명의 지속형 결합체의 하나의 실시 형태로서, 상기 면역글로불린 Fc 영역 F는 두 개의 폴리펩타이드 사슬로 이루어진 이량체(이합체 dimer)이며, 이 때 상기 Fc 영역 이량체 F와 X는 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 하나의 동일한 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 구체적인 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.

- [340] 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.
- [341] 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.
- [342] 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.
- [343] 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.
- [344] 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.
- [345] 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.
- [346] 상기 기술한 Fc 유도체는 본 발명의 Fc 영역과 동등한 생물학적 활성을 나타내며 Fc 영역의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성을 증대시킨 것일 수 있다.
- [347] 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,
- [348] 펩신을 처리할 경우에는 pF'c 및 F(ab)₂로 절단된다. 이를 크기 배제 크로마토그래피(size-exclusion chromatography) 등을 이용하여 Fc 또는 pF'c를 분리할 수 있다. 더 구체적인 실시 형태에서는 인간 유래의 Fc 영역을 미생물로부터 수득한 제조합형 면역글로불린 Fc 영역이다.
- [349] 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.
- [350] 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.
- [351] 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.
- [352] 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.
- [353] 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.
- [354] 각 단량체의 아미노산 수는 221개의 아미노산으로 구성될 수 있으며, 동종이합량체를 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 동종이합량체를

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.

[355]

[356] 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.

[357] 하나의 예로, 면역글로불린 Fc 영역은 서열번호 439의 아미노산 서열 (442개의 아미노산으로 구성됨)을 포함하는 동종이량체일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[358] 하나의 구체예로, 상기 면역글로불린 Fc 영역과 X는 당쇄화되어 있지 않을 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[359]

[360] 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.

[361] 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.

[362] 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.

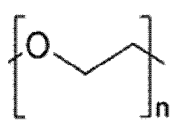
[363] 또한, 상술한 결합체는 효력의 지속성이 천연형 인터루킨 2 또는 알테스루킨에 비해, 또는 F가 수식되지 않은 X에 비해 증가된 것일 수 있으며, 이러한 결합체는 상술한 형태뿐만 아니라, 생분해성 나노파티클에 봉입된 형태 등을 모두 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[364]

[365] 상기 화학식 1에서 상기 L은 폴리에틸렌 글리콜 링커일 수 있다.

[366] 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, 상기 화학식 1에서 L에 해당된다. 본 명세서에서, 상기 링커는 “비펩타이드성 링커” 또는 “비펩타이드성 중합체”와 혼용되어 사용될 수 있다.

- [367] 상기 La에서 a는 1 이상일 수 있으며, a가 2 이상일 때 각각의 L은 독립적일 수 있다.
- [368] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 결합체는 양쪽 말단에 F, (구체적으로 면역글로불린 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.
- [369] 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.
- [370]
- [371] 하나의 구체적인 실시 형태에서, 상기 L(폴리에틸렌 글리콜 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.
- [372] 상기 폴리에틸렌 글리콜 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.
- [373] 구체적으로, 상기 링커는 하기 화학식 5로 표시되는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다:
- [374] [화학식 5]
- [375]
- 
- [376]
- [377] 여기서, n= 10 내지 2400, n= 10 내지 480, 또는 n= 50 내지 250이나, 이에

제한되지 않는다.

[378] 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.

[379]

[380] 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 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.

[381]

[382] 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 구조일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[383] 다른 하나의 구체적인 실시 형태에서, 상기 지속형 결합체에서, 상기 L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하는 링커이며, a 는 1이고, 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.

[384] 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.

- [385] 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.
- [386]
- [387] 구체적으로, 상기 비펩타이드성 링커는 F 및 X와 결합하지 않은 상태에서 양 말단에 반응기를 갖고, 상기 반응기를 통해 F 및 X와 결합하는 것일 수 있다.
- [388] 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.
- [389] 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.
- [390] 보다 구체적으로, 상기 링커의 반응기는 알데히드 그룹, 말레이미드 그룹 및 석시니미드 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [391] 상기에서, 알데히드기로 프로피온 알데히드기 또는 부틸 알데히드기를 예로서 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [392] 상기에서, 석시니미드 유도체로는 석시니미딜 발레르에이트, 석시니미딜 메틸부타노에이트, 석시니미딜 메틸프로피온에이트, 석시니미딜 부타노에이트, 석시니미딜 프로피오네이트, N-하이드록시석시니미드, 히드록시 석시니미딜, 석시니미딜 카르복시메틸 또는 석시니미딜 카보네이트가 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [393] 상기 링커는 상기와 같은 반응기를 통해 면역글로불린 Fc 영역인 F 및 인터루킨 2 아날로그인 X에 연결되어, 링커 연결부로 전환될 수 있다.
- [394] .
- [395] 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 공유결합을 형성할 수 있다.

- [396] 또한, 상기 링커의 양쪽 말단의 반응기는 서로 동일하거나 또는 서로 상이할 수 있으며, 예를 들어, 양 말단에 알데히드를 갖거나, 또는, 한쪽 말단에는 말레이미드를, 다른 쪽 말단에는 알데히드, 프로피온 알데히드, 또는 부틸 알데히드를 가질 수 있다. 그러나, 링커의 각 말단에 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc 영역과 X가 결합될 수 있다면, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [397] 예를 들어, 상기 링커의 한쪽 말단에는 반응기로서 말레이미드를 포함하고, 다른 쪽 말단에는 알데히드, 프로피온 알데히드 또는 부틸 알데히드 등을 포함할 수 있다.
- [398] 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.
- [399] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 링커는 X의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 시스테인의 -SH 기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [400] 구체적으로, 상기 시스테인 잔기의 -SH 기에 링커의 반응기가 연결될 수 있으며, 반응기에 대해서는 앞서 기술한 내용이 모두 적용된다. 만약, 말레이미드-PEG-알데히드를 사용하는 경우, 말레이미드는 X의 -SH 기와 티오에테르(thioether) 결합으로 연결하고, 알데히드는 F, 구체적으로 면역글로불린 Fc의 -NH₂기와 환원적 아민화 반응을 통해 연결할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [401] 다른 구체적인 실시 형태에서 상기 링커는 X의 라이신 잔기, 보다 구체적으로, 라이신의 아미노기에 연결되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [402] 또한, 상기 결합체에서, 링커의 반응기가 면역글로불린 Fc 영역의 N-말단에 위치한 -NH₂와 연결된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [403] 또한, 상기 결합체에서, 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그는 반응기를 갖는 링커와 C-말단을 통해 연결될 수 있으나, 이는 하나의 일례에 해당한다.
- [404] 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.
- [405]
- [406] 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.
- [407]

- [408] 본 발명을 구현하기 위한 다른 양태는 서열번호 3 내지 106의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 인터루킨 2 아날로그 및 번역글로불린 Fc 영역이 링커를 통해 연결된, 지속형 결합체를 제공한다.
- [409] 상기 인터루킨 2 아날로그, 링커, 및 이를 포함하는 지속형 결합체는 상술한 바와 같다.
- [410]
- [411] 본 발명을 구현하기 위한 다른 양태는 하기 화학식 2로 표시되는 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체를 제공한다:
- [412] [화학식 2]
- [413] X - Z - Fc
- [414] 이 때 X는 서열번호 3 내지 106의 아미노산 서열에서 선택되는 어느 하나의 폴리펩타이드 서열을 포함하는 인터루킨 2 아날로그이고;
- [415] Z는 폴리에틸렌글리콜 링커로서 분자량 2 kDa 내지 30 kDa의 링커이며;
- [416] Fc는 이량체 형태의 번역글로불린 Fc 영역이고;
- [417] -는 X와 Z 사이, Z와 Fc 사이의 공유결합 연결을 나타내며,
- [418] 상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태의 Fc 영역 중 한 폴리펩타이드 사슬에만 Z의 일 말단이 공유결합으로 연결되어 있고, 이 Z의 반대쪽 말단에 X 한 분자가 공유결합으로 연결됨.
- [419] 상기 인터루킨 2 아날로그, 링커, Fc 영역 및 이를 포함하는 지속형 결합체는 상술한 바와 같다.
- [420] 하나의 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.
- [421] 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.
- [422] 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.
- [423] 또한, 상기 인터루킨 2 아날로그는 C-말단에 하나 이상의 아미노산을 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [424]

- [425] 본 발명을 구현하기 위한 다른 양태는 하기 화학식 3으로 표시되는 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체를 제공한다:
- [426] [화학식 3]
- [427] $X' - Z - Fc$
- [428] 이 때 X' 는 하기 일반식 1로 표현되는 아미노산 서열을 포함하는, 인터루킨 2 아날로그이고,
- [429] [일반식 1]
- [430] X1-P-T-S-S-T-K-K-T-Q-L-Q-L-E-H-L-X18-X19-D-L-X22-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-X38-M-L-T-X42-X43-F-X45-M-P-K-K-A-T-E-L-K-H-L-Q-C-L-E-X61-E-L-K-P-L-E-X68-V-L-N-L-A-X74-S-K-N-F-H-X80-X81-P-R-X84-X85-X86-S-N-I-N-X91-X92-V-X94-E-X96-K-G-S-E-T-T-F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-S-Q-S-I-I-S-T-L-T(일반식 1, 서열번호 212)
- [431] 상기 일반식 1에서,
- [432] X1은 결실이고,
- [433] X18은 류신(L), 또는 아르기닌(R)이고,
- [434] X19는 류신(L), 또는 티로신(Y)이고,
- [435] X22는 글루탐산(E), 또는 글루타민(Q)이고,
- [436] X38은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 또는 아르기닌(R)이고,
- [437] X42는 알라닌(A), 페닐알라닌(F), 리신(K), 또는 트립토판(W)이고,
- [438] X43은 글루탐산(E), 리신(K), 또는 글루타민(Q)이고,
- [439] X45는 알라닌(A), 또는 티로신(Y)이고,
- [440] X61은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이고,
- [441] X68은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
- [442] X74는 히스티딘(H), 또는 글루타민(Q)이고,
- [443] X80은 페닐알라닌(F), 류신(L), 발린(V), 또는 티로신(Y)이고,
- [444] X81은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 또는 아르기닌(R)이고,
- [445] X84는 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
- [446] X85는 알라닌(A), 글루탐산(E), 글리신(G), 류신(L), 발린(V), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이고,
- [447] X86은 알라닌(A), 글리신(G), 이소류신(I), 또는 발린(V)이고,
- [448] X91은 트레오닌(T), 또는 발린(V)이고,
- [449] X92는 페닐알라닌(F), 이소류신(I), 또는 티로신(Y)이고,
- [450] X94는 페닐알라닌(F), 또는 류신(L)이고,
- [451] X96은 페닐알라닌(F), 또는 류신(L)임;
- [452] Z는 폴리에틸렌글리콜 링커로서 분자량 2 kDa 내지 30 kDa의 링커이며;
- [453] Fc는 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;
- [454] -는 X' 와 Z 사이, Z와 Fc 사이의 공유결합 연결을 나타내며,
- [455] 상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태의 Fc 영역 중 한 폴리펩타이드

사슬에만 Z의 일 말단이 공유결합으로 연결되어 있고, 이 Z의 반대쪽 말단에 X' 한 분자가 공유결합으로 연결됨.

- [456] 상기 인터루킨 2 아날로그, 링커, Fc 영역 및 이를 포함하는 지속형 결합체는 상술한 바와 같다.
- [457] 상기 일반식 1에서 X133에 해당하는 트레오닌(T)에 하나 이상의 아미노산이 추가될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [458] 구체적으로, 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.
- [459] 이와 같은 인터루킨 2 아날로그는 알테스루킨 또는 천연형 인터루킨 2에 비해 증가된 베타 수용체 결합력을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [460] 하나의 구체적인 실시 형태에서 상기 일반식 1에서,
- [461] X43은 리신(K)이고,
- [462] X45는 티로신(Y)이고,
- [463] X61은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 또는 글루타민(Q)이고,
- [464] X68은 글루탐산(E)이고,
- [465] X74는 글루타민(Q)이고,
- [466] X80은 페닐알라닌(F), 또는 류신(L)이고,
- [467] X85는 류신(L), 발린(V), 또는 티로신(Y)이고,
- [468] X86은 이소류신(I), 또는 발린(V)이고,
- [469] X92는 페닐알라닌(F), 또는 이소류신(I)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [470] 구체적으로, 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 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [471] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그는 C-말단에 하나 이상의 아미노산이 추가로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [472]
- [473] 본 발명을 구현하기 위한 다른 양태는 하기 화학식 4로 표시되는 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체를 제공한다:
- [474] [화학식 4]
- [475] X" - Z - Fc
- [476] 이 때 X"는 하기 일반식 2로 표현되는 아미노산 서열을 포함하는, 인터루킨 2 아날로그이고,
- [477] [일반식 2]
- [478] X1-P-T-S-S-T-K-K-T-Q-L-Q-L-E-H-L-X18-L-D-L-X22-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-

N-P-K-L-T-X38-M-L-T-X42-K-F-Y-M-P-K-K-A-T-E-L-K-H-L-Q-C-L-E-X61-E-L-K
-P-L-E-X68-V-L-N-L-A-Q-S-K-N-F-H-F-X81-P-R-D-X85-X86-S-N-I-N-V-F-V-L-E-
L-K-G-S-E-T-T-F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-S-Q-S-I-I-S-T-L
-T(일반식 2, 서열번호 213)

- [479] X1은 결실이고,
- [480] X18은 류신(L), 또는 아르기닌(R)이고,
- [481] X22는 글루탐산(E), 또는 글루타민(Q)이고,
- [482] X38은 알라닌(A), 또는 아르기닌(R)이고,
- [483] X42는 페닐알라닌(F), 또는 리신(K) 이고,
- [484] X61은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
- [485] X68은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
- [486] X81은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
- [487] X85는 류신(L), 또는 발린(V)이고,
- [488] X86은 이소류신(I), 또는 발린(V)임;
- [489] Z는 폴리에틸렌글리콜 링커로서 분자량 2 kDa 내지 30 kDa의 링커이며;
- [490] Fc는 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;
- [491] -는 X"와 Z 사이, Z와 Fc 사이의 공유결합 연결을 나타내며,
- [492] 상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태의 Fc 영역 중 한 폴리펩타이드 사슬에만 Z의 일 말단이 공유결합으로 연결되어 있고, 이 Z의 반대쪽 말단에 X" 한 분자가 공유결합으로 연결됨.
- [493] 상기 인터루킨 2 아날로그, 링커, Fc 영역 및 이를 포함하는 지속형 결합체는 상술한 바와 같다.
- [494] 구체적으로, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 22, 42, 53, 87, 105 및 106의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [495] 또한, 상기 일반식 2에서 X133에 해당하는 트레오닌(T)에 하나 이상의 아미노산이 추가될 수 있고, 또는 인터루킨 2 아날로그는 C-말단에 하나 이상의 아미노산이 추가로 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [496]
- [497] 본 발명을 구현하기 위한 다른 양태는 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 지속형 결합체를 제조하는 방법을 제공한다.
- [498] 상기 인터루킨 2 아날로그, 및 이를 포함하는 지속형 결합체는 상술한 바와 같다.
- [499]
- [500] 구체적으로, 상기 방법은 천연형 인터루킨 2에서 1번, 12번, 18번, 19번, 20번, 22번, 32번, 35번, 38번, 42번, 43번, 45번, 48번, 49번, 61번, 68번, 69번, 74번, 76번, 80번, 81번, 82번, 84번, 85번, 86번, 87번, 88번, 89번, 91번, 92번, 94번, 95번, 96번, 125번, 126번 및 133번 위치에 상응하는 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된

하나 또는 그 이상의 아미노산에 변이가 도입된 인터루킨 2 아날로그를 링커(예를 들어, 비펩타이드성 중합체)를 통해 생체적합성 물질(예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역)과 연결시키는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[501]

[502] 본 발명의 지속형 결합체 제조 방법은, 천연형 인터루킨 2에서 1번, 12번, 18번, 19번, 20번, 22번, 32번, 35번, 38번, 42번, 43번, 45번, 48번, 49번, 61번, 68번, 69번, 74번, 76번, 80번, 81번, 82번, 84번, 85번, 86번, 87번, 88번, 89번, 91번, 92번, 94번, 95번, 96번, 125번, 126번 및 133번 위치에 상응하는 아미노산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 또는 그 이상의 아미노산에 변이를 도입하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 상술한 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그가 생체적합성 물질(예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역)과 연결된 지속형 결합체가 제조되는 이상, 특정 단계나 그 순서에 제한되지 않는다.

[503]

[504] 또한, 본 발명의 지속형 결합체 제조 방법은 a) 상기 인터루킨 2 아날로그를 코딩하는 핵산을 포함하는 형질전환체를 배양하여 인터루킨 2 아날로그를 발현시키는 단계; 및 b) 발현된 인터루킨 2 아날로그를 분리 및 정제하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[505]

상기 인터루킨 2 아날로그를 코딩하는 핵산은 서열번호 109 내지 212 중 어느 하나의 염기 서열을 포함하거나, (필수적으로) 구성된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[506]

[507] 본 발명에서 형질전환체의 배양에 사용되는 배지는 적절한 방식으로 숙주세포 배양의 요건을 충족해야 한다. 숙주세포의 성장을 위하여 배지 중에 포함될 수 있는 탄소원은 제조된 형질전환체의 종류에 따라 당업자의 판단에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 배양 시기 및 양을 조절하기 위해 적당한 배양 조건을 채택할 수 있다.

[508]

사용될 수 있는 당원으로는 글루코스, 사카로스, 락토스, 프룩토스, 말토스, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다.

[509]

사용될 수 있는 질소원으로는 펩톤, 효모 추출물, 육즙, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 대두밀 및 요소 또는 무기 화합물, 예를 들면 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄 및 질산암모늄이 포함된다. 질소원 또한 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다.

[510]

사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 배양 배지는 성장에 필요한 황산마그네슘 또는 황산철과 같은 금속염을 함유할 수 있다.

- [511] 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장물질이 사용될 수 있다. 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양 도중에 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식으로 또는 연속식으로 첨가될 수 있다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 염기성 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포체를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예: 공기)를 주입한다.
- [512] 본 발명에 따른 형질전환체의 배양은 보통 20°C 내지 45°C, 구체적으로는 25°C 내지 40°C의 온도에서 수행된다. 또한 배양은 원하는 인터루킨 2 아날로그의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 지속되는데, 이러한 목적으로 배양은 보통 10 내지 160시간 동안 지속될 수 있다.
- [513] 전술한 바와 같이 숙주세포에 따라 적절한 배양 조건을 조성해주면 본 발명에 따른 형질전환체는 인터루킨 2 아날로그를 생산하게 되며, 벡터의 구성 및 숙주세포의 특징에 따라 생산된 인터루킨 2 아날로그는 숙주세포의 세포질 내, 원형질막 공간(periplasmic space) 또는 세포 외로 분비될 수 있다.
- [514] 숙주세포 내 또는 외에서 발현된 단백질은 통상의 방식으로 정제될 수 있다. 정제 방법의 예로는 염석(예: 황산암모늄 침전, 인산나트륨 침전 등), 용매 침전(예: 아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전 등), 투석, 겔 여과, 이온 교환, 역상 칼럼 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을 단독 또는 조합하여 적용할 수 있다.
- [515] 또는, 펩타이드 합성법에 의해 제조된 인터루킨 2 아날로그를 비펩타이드성 중합체를 통해 생체적합성 물질(예를 들어, 면역글로불린 Fc 영역)과 연결시킬 수도 있다. 이와 같은 펩타이드 합성은 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 서열이 제공되어 있는 바, 공지의 펩타이드 합성법을 이용해 제한없이 제조할 수 있다.
- [516] 인터루킨 2 아날로그는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [517]
- [518] 본 발명을 구현하기 위한 다른 양태는 상기 방법으로 제조된 지속형 결합체를 제공한다.
- [519]
- [520] 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.

- [521] 상기 염의 종류는 특별히 제한되지는 않는다. 다만, 개체, 예컨대 포유류에게 안전하고 효과적인 형태인 것이 바람직하나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [522] 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.
- [523] 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. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.
- [524] 또한, 본 발명에서 사용된 용어 "용매화물"은 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 염이 용매 분자와 복합체를 형성한 것을 말한다.
- [525]
- [526] 본 발명을 구현하기 위한 다른 양태는 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 조성물을 제공한다. 인터루킨 2 아날로그, 이의 지속형 결합체는 상기에서 설명한 바와 같다. 본 발명에 따른 조성물은 약학 조성물일 수 있고, 구체적인 한 양태로는 암 예방 또는 치료 용도를 갖는 약학 조성물일 수 있다.
- [527] 본 발명에 따른 조성물은 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 것일 수 있고, 구체적으로 약리학적 유효량의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 것일 수 있다. 또한, 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [528] 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 아날로그를 포함하는 지속형 결합체를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [529] 본 발명에서, "약리학적 유효량"이란, 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체가 암의 예방 또는 치료 효과를 나타내면서도 환자에게 독성이나 부작용을 나타내지 않는 안전한 투여 용량을 의미하며, 인터루킨 2 수용체, 구체적으로는 베타 및/또는 알파 수용체에 유의미한 활성을 나타낼 수 있는 투여

용량을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[530]

[531] 본 발명에 따른 조성물은 하기 특성 중 하나 이상의 특성을 나타내는 것일 수 있으나, 증대된 인터루킨 2 베타 수용체에 대한 결합력을 바탕으로 한 면역 반응 증가 및 항암 효과 등을 나타내는 이상, 제한되는 것은 아니다:

[532] (i) 알데스루킨에 비해 높은 혈중 노출도;

[533] (ii) 알데스루킨에 비해 종양 성장 억제, 및

[534] (iii) 알데스루킨에 비해 기억 T 세포 생성 반응.

[535]

[536] 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 활성에 기초하여 체내 면역 시스템을 이용해 암 세포를 제거함으로써 암의 예방 및 치료 효과를 얻을 수 있다.

[537] 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 억제 및 기억 T 세포 생성능을 가져 효과적인 암 예방 또는 치료 효과를 나타낼 수 있다.

[538]

[539] 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체는 천연형 인터루킨 2, 알데스루킨, 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 알데스루킨과 대비하여 변경되었으면 본 발명의 범주에 속한다.

[540]

또한, 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체는 천연형 인터루킨 2, 알데스루킨, 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 알데스루킨과 대비하여 변경, 또는 증가되었으면 본 발명의 범주에 속한다.

[541]

[542] 본 발명에서, 암은 대장암, 간암, 난소암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 폐암, 피부암, 흑색종, 유방암, 방광암, 및 위암으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있고, 또는 전이암일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 전이성 신세포암, 또는 전이성 흑색종을 포함할 수 있다.

[543]

[544] 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 조성물의 투여로 암 또는 종양을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[545] 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 조성물의 투여로 암의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[546] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체의 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.

[547]

[548] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체, 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 약학적으로 허용가능한 담체, 또는 희석제는 비자연적으로 발생된 것일 수 있다.

[549]

[550] 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.

[551] 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 포함한 약학 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, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다.

[552] 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 투약 앰플 또는 다수회 투약 형태로 제조할 수 있다. 기타, 용액, 현탁액, 정제, 환약, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형화할 수 있다.

- [553] 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.
- [554] 또한, 본 발명의 약학 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.
- [555] 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.
- [556] 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.
- [557]
- [558] 본 발명의 다른 양태는 인터루킨 2 아날로그, 이를 포함하는 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 약학 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 암의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [559] 상기 인터루킨 2 아날로그 및/또는 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체, 이를 포함하는 조성물, 암, 예방 및 치료에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.
- [560]
- [561] 본 발명에서 상기 개체는 암이 발병 하였거나 의심되는 개체로서, 인간을 포함한 쥐, 가축 등을 포함하는 포유 동물을 의미하나, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 및/또는 결합체, 또는 이를 포함하는 상기 조성물로 치료 가능한 개체는 제한 없이 포함된다.
- [562] 본 발명에서 용어 "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질(예를 들어, 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체)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.

[563]

[564] 본 발명의 방법은 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체를 포함하는 약학 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.

[565]

[566] 본 발명의 방법에서, 투여시 투여량과 횟수는 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께, 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다. 구체적으로, 본 발명의 조성물은 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이를 포함하는 지속형 결합체를 약학적 유효량으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[567]

상기 인터루킨 2 아날로그 또는 지속형 결합체를 약학적 유효량으로 포함하는 것은, 인터루킨 2 아날로그 또는 지속형 결합체로 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.

[568]

특별히 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 상기 약학 조성물은 상기 성분 (유효성분)을 0.01 내지 99% 중량 대 부피로 함유할 수 있다.

[569]

[570] 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 약학 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 지속형 결합체의 바람직한 전체 용량은 하루에 환자 체중 1 kg당 약 0.0001 mg 내지 500 mg일 수 있다. 그러나 상기 인터루킨 2 아날로그 또는 이의 결합체의 용량은 약학 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도,

식이 및 배설물 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 약학 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

[571] 본 발명의 약학 조성물은 생체 내 지속성 및 역가가 우수하여, 본 발명의 약학적 제제의 투여 횟수 및 빈도를 현저하게 감소시킬 수 있다. 상기 약학 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.

[572] 한 예로, 본 발명의 약학 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.

[573]

[574] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 암의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 있어서 상기 인터루킨 2 아날로그, 이의 지속형 결합체, 이를 포함하는 조성물의 용도이다.

[575] 상기 인터루킨 2 아날로그 및/또는 이의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물, 암, 예방, 치료, 투여 경로 및 투여 횟수에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[576]

[577] 본 발명을 구현하는 다른 하나의 양태는 인터루킨 2 아날로그, 이의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물의 암 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것이다.

[578] 상기 인터루킨 2 아날로그 및/또는 이의 지속형 결합체, 또는 이를 포함하는 조성물, 암, 예방, 치료, 투여 경로 및 투여 횟수에 대해서는 앞서 설명한 바와 같다.

[579]

[580] 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.

[581]

[582] 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.

[583]

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

[585]

[586] 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.

[587] 인터루킨 2 아날로그 증폭을 위한 PCR 조건은 95°C 30초, 55°C에서 60초, 65°C에서 6.5분으로 이 과정을 16회 반복하였다. 원하는 부위의 아미노산이 정상적으로 바뀌어 있는지 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.

[588] 하기 표 1에 각각의 아미노산의 변화 서열 및 아날로그 이름을 나타냈다. 이들 인터루킨 2 아날로그를 제작하기 위해 순방향 (F) 및 역방향 (R) 프라이머를 합성한 후, PCR을 진행하여 각각의 아날로그 유전자를 증폭하였다.

[589] 아래 표 1에서 아날로그 1은 알테스루킨이고, 프라이머 #1 내지 #204는 명세서의 서열번호 214 내지 417에 각각 해당한다.

[590]

[591] [표1]

인터루킨 2 아날로그 종류와 변이 위치 및 그 변화 서열

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, N88Q	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, 35, 36, 139, 140, 167, 168
21	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 167, 168
22	desA1, C125S, L12V, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 3, 4, 25, 26, 35, 36
23	desA1, C125S, L12F, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 1, 2, 25, 26, 35, 36
24	desA1, C125S, L19V, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 11, 12, 25, 26, 35, 36
25	desA1, C125S, L19F, R38A, F42K	197, 198, 201, 202, 9, 10, 25, 26, 35, 36
26	DesA1, C125S, R38A, F42K, I89F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 157, 158
27	desA1, C125S, R38A, F42K, V91F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 163, 164
28	desA1, C125S, R38A, F42K, L94V	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36
29	desA1, C125S, R38A, F42K, Q126T	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 199,

		200
30	desA1, C125S, R38A, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 97, 98, 169, 170
31	desA1, C125S, R38A, D84E	197, 198, 201, 202, 27, 28, 109, 110
32	desA1, C125S, R38A, R81D, D84E, I92F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 95, 96, 169, 170
33	desA1, C125S, R38A, L80F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 77, 78
34	desA1, C125S, R38A, L80F, D84E	197, 198, 201, 202, 27, 28, 77, 78, 109, 110
35	desA1, C125S, R38A, L94F, L96F	197, 198, 201, 202, 27, 28, 189, 190
36	desA1, C125S, R38A, L94F, L96V	197, 198, 201, 202, 27, 28, 193, 194
37	desA1, C125S, R38A, L94F, L96I	197, 198, 201, 202, 27, 28, 191, 192
38	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, I92F, L94F, L96F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 97, 98, 175, 176
39	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, I92F, L94F, L96V	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 97, 98, 179, 180
40	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, I92F, L94F, L96I	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 97, 98, 177, 178
41	desA1, C125S, L80F, R81D, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 41, 42, 79, 80, 167, 168
42	desA1, C125S, R38A, F42K, R81E, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 103,

		104, 169, 170
43	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, I92L	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 183, 184
44	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, D84V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 113, 114, 169, 170
45	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, D84F, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 111, 112, 169, 170
46	desA1, C125S, D20V, R38A, F42K, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 17, 18, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 169, 170
47	desA1, C125S, D20F, R38A, F42K, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 15, 16, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 169, 170
48	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, N88V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 155, 156, 169, 170
49	desA1, C125S, R38A, F42K, R81D, N88F, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 99, 100, 151, 152, 169, 170
50	desA1, C125S, F42K, L80F, R81D, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 29, 30, 35, 36, 79, 80, 139, 140, 169, 170
51	desA1, C125S, E61Q, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 59, 60, 99, 100, 169, 170
52	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80,

		169, 170
53	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, D84E, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 95, 96, 169, 170
54	desA1, C125S, R38A, F42K, Q74H, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 71, 72, 99, 100, 169, 170
55	desA1, C125S, R38A, F42K, Q74H, L80F, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 71, 72, 79, 80, 169, 170
56	desA1, C125S, R38A, F42K, Y45A, Q74H, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 49, 50, 71, 72, 99, 100, 169, 170
57	desA1, C125S, R38A, F42K, Y45A, Q74H, L80F, R81D, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 49, 50, 71, 72, 79, 80, 169, 170
58	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, L85A, I86A, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 115, 116, 167, 168
59	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, L85A, I86A, I92Y	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 115, 116, 187, 188
60	desA1, C125S, R38A, F42K, Y45A, L80Y, L85A, I86A, I92Y	197, 198, 201, 202, 27, 28, 35, 36, 41, 42, 51, 52, 93, 94, 115, 116, 187, 188
61	desA1, C125S, R38A, F42K, L80Y, R81D, L85G, I86V, I92Y	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 87, 88, 125, 126, 187, 188
62	desA1, C125S, R38A, F42K, 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, F42K, L80D, R81E, L85T, I86G, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 75, 76, 133, 134, 167, 168
64	desA1, C125S, R38A, F42K, L80Y, R81N, L85V, I86V, I92Y	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 91, 92, 139, 140, 167, 168
65	desA1, C125S, R38A, F42K, L80Y, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 89, 90, 139, 140, 167, 168
66	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81E, L85F, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 81, 82, 121, 122, 167, 168
67	desA1, C125S, R38A, F42K, 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, F42K, 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, F42K, 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, F42K, L80Y, R81D, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 87, 88, 139, 140, 167, 168
71	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81E, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 81, 82, 139, 140, 167, 168
72	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, L85V, I86G, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80, 135, 136, 167, 168
73	desA1, C125S, R38A, F42K, L80F, R81D, L85W, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 25, 26, 35, 36, 79, 80,

		141, 142, 167, 168
74	desA1, C125S, R38D, F42K, L80Y, R81D, L85V, I86V, I92F	197, 198, 201, 202, 31, 32, 35, 36, 87, 88, 139, 140, 167, 168
75	desA1, C125S, R38A, F42K, 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, F42K, 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, F42K, 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, F42K, 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, F42K, Q74H, 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, F42K, Q74H, 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, F42K, Q74H, 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
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
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, L85Y, I86V, I92F	197, 198, 201, 202,

		25, 26, 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

[592] 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.

[593]

[594] [표2]

인터루킨 2 아날로그 서열

아날로그	단백질 서열	단백질 서열서열번호	염기 서열서열번호
1	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	2	107
2	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLICNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	3	108
3	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YC NPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	4	109
4	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPC LTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	5	110
5	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFCFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	6	111
6	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPCKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	7	112

7	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKCA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	8	113
8	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSCNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	9	114
9	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	10	115
10	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	11	116
11	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TAKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	12	117
12	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	13	118
13	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TAKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	14	119
14	PTSSSTKKT QLQLEHLLYD LQMILNGINN	15	120

	YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT		
15	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRELISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	16	121
16	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISQIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	17	122
17	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN T IVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	18	123
18	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE Q ELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	19	124
19	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRDLISNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	20	125
20	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDVVSININ VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	21	126
21	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE	22	127

	EELKPLEEVL NLAQSKNFHFDPRDVVSNN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT		
22	PTSSSTKKT QVQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	23	128
23	PTSSSTKKT QFQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	24	129
24	PTSSSTKKT QLQLEHLLVD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	25	130
25	PTSSSTKKT QLQLEHLLFD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	26	131
26	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNFN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	27	132
27	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNN F IVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	28	133
28	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNN VIVV	29	134

	ELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT		
29	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITF ST SIIS TLT	30	135
30	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL D PRDLISNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	31	136
31	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRELISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	32	137
32	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL D PRELISNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	33	138
33	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	34	139
34	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF RPRELISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	35	140
35	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIV FEF KGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS	36	141

	TLT		
36	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVFEV KGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	37	142
37	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVFEI KGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	38	143
38	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRDLISNIN VFVFEF KGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	39	144
39	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRDLISNIN VFVFEV KGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	40	145
40	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRDLISNIN VFVFEI KGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	41	146
41	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDVVSININ VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	42	147
42	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL EPRDLISNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	43	148

43	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRDLISNIN VL VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	44	149
44	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRVLISNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	45	150
45	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRFLISNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	46	151
46	PTSSSTKKT QLQLEHLLLV LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRDLISNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	47	152
47	PTSSSTKKT QLQLEHLLLF LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRDLISNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	48	153
48	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRDLISVIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	49	154
49	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRDLISFIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	50	155
50	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN	51	156

	YKNPKLTRML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDVVSNN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT		
51	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE Q ELKPLEEVL NLAQSKNFHL DPRDLISNN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	52	157
52	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDLISNN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	53	158
53	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRELISNN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	54	159
54	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAH SKNFHL DPRDLISNN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	55	160
55	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAH SKNFHF DPRDLISNN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	56	161
56	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFAMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAH SKNFHL DPRDLISNN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	57	162
57	PTSSSTKKT QLQLEHLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFAMPKKA TELKHLQCLE	58	163

	EELKPLEEVL NLA H SKNFHF DPRDLISNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT		
58	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDAASNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	59	164
59	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDAASNIN VY VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	60	165
60	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFAMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHY RPRDAASNIN VY VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	61	166
61	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHY DPRDGVSNIN VY VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	62	167
62	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHW EPRDGASNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	63	168
63	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHD EPRDTGSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	64	169
64	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHY NPRDVVSNIN VY	65	170

	VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT		
65	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHY EPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	66	171
66	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDFVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	67	172
67	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHY DPRDFVSNIN VWVL DLKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	68	173
68	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDIVSNIN EF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	69	174
69	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHY EPRDFLSNIN EWVL DLKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	70	175
70	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHY DPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	71	176
71	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS	72	177

	QSIIS TLT		
72	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDVGSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	73	178
73	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDWVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	74	179
74	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTDM L TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHY DPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	75	180
75	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKKFAMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	76	181
76	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKQFYMPKKA TELKHLQCLE R ELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDVGSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	77	182
77	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TKEFYMPKKA TELKHLQCLE R ELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDWVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	78	183
78	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPE LTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	79	184

79	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPE LTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAH ~~SKNFHF~~ EPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	80	185
80	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPE LTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAH ~~SKNFHF~~ EGRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	81	186
81	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPE LTAML TKKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAH ~~SKNFHF~~ FEVRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	82	187
82	PTSSSTKKT QLQLEHLRLD LEMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDEVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	83	188
83	PTSSSTKKT QLQLEHLRRD LEMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDEVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	84	189
84	PTSSSTKKT QLQLEHLRLD LEMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHV DPRDEVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	85	190
85	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	86	191
86	PTSSSTKKT QLQLEHLRLD LEMILNGINN	87	192

	YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT		
87	PTSSSTKKT QLQLEHLRRD LEMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	88	193
88	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE D ELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	89	194
89	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEQVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	90	195
90	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TWKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	91	196
91	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE Q ELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	92	197
92	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN TF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	93	198
93	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE	94	199

	EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPREVVSNIN TF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT		
94	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VFVFE FKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFSQSIIS TLT	95	200
95	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEGL NLAQSKNFHF EPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	96	201
96	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEGL NLAASKNFHF EPRDVVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	97	202
97	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF DPRDLISNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	98	203
98	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVISNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	99	204
99	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDLVSNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	100	205
100	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDYVSNIN VF	101	206

	VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT		
101	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDLASNIN VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	102	207
102	PTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSININ VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	103	208
103	PTSSSTKKT QLQLEHLRLD LEMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSININ VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	104	209
104	PTSSSTKKT QLQLEHLRLD LEMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE D ELKPLEEVL NLAQSKNFHF EPRDVVSININ VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	105	210
105	PTSSSTKKT QLQLEHLRLD LEMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEDV L NLAQSKNFHF EPRDVVSININ VF VLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFS QSIIS TLT	106	211

[595] 실시예 2: 인터루킨 2 아날로그의 발현

[596]

[597] 상기 실시예 1에서 제조한 발현 벡터를 이용하여, T7 프로모터 조절하의 재조합 인터루킨 2 아날로그를 발현시켰다. 각각의 재조합 인터루킨 2 아날로그 발현 벡터로 발현 대장균 균주, *E.coli* BL21DE3(*E. coli* B F *dcmompThsdS*(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.

- [598] 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 6.70으로 유지시켰다. 발효 진행은 배양액 내의 영양소가 제한되었을 때, 추가 배지(feeding solution)를 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 원심 분리기를 사용하여 재조합 균주를 수확하여 사용 시까지 -80°C에 보관하였다.

[599]

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

[601]

- [602] 상기 실시예 2에서 얻은 인터루킨 2 아날로그 발현 대장균으로부터 인터루킨 2 아날로그를 가용성 형태로 바꾸기 위해 세포를 파쇄하고 재접힘하였다. 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.

[603]

[604] 실시예 4: 크기 배제 컬럼 크로마토그래피

[605]

[606] 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.

[607]

[608] 실시예 5: 인터루킨 2 아날로그의 수용체 결합력 평가

[609]

[610] 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(aldeisleukin)과 각 결합력을 비교하였다.

[611]

[612] 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 고정화 하였다. 그 다음으로 상기에서 제조한 제조합 인터루킨 2 아날로그를 농도별로 2배 연속희석법으로 HBS-P+ 버퍼(Cytiva사, BR100671)에 희석하고, 인터루킨 2 수용체가 최종 고정된 CM5칩에 흘려주어 각 인터루킨 2 수용체의 결합력을 측정하였다. 결합력은 결합 속도(Ka)와 해리 속도(Kd)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.

[613]

[614] 상대적 결합력 K_D (%) = 아날로그 1(aldesleukin) 결합력(K_D) / 아날로그 결합력(K_D) $\times$ 100

[615]

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

[617]

[618] [표3]

인티루킨 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
	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

[619]

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
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

[620]

[621] 시험 결과(도 1 및 2, 및 표 3)에서 명시된 바와 같이 본 발명의 인터루킨 2 아날로그들은 인터루킨 2 알파 수용체 결합력을 아예 상실하거나, 인터루킨 2 아날로그 1에 비하여 감소 또는 증가하는 등 천연형 인터루킨 2 또는 알데스루킨과 상이한 인터루킨 2 알파 수용체 결합력을 나타내는 것을 확인하였다. 반면, 인터루킨 2 베타 수용체에 대해서는 천연형 인터루킨 2 또는 알데스루킨에 비하여 최대 100배 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 치환함으로써 인터루킨 2 수용체의 결합력을 변화시킬 수 있음을 시사하는 바이다.

- [622] 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.

[623]

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

[625]

- [626] 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 몰 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 바꿔준 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.

[627]

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

[629]

- [630] 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 몰 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.

- [631] 이 때 이용된 면역글로불린 영역은 서열번호 423의 아미노산 서열 (221개의 아미노산으로 구성됨)을 갖는 단량체 2개가 각 단량체의 3번 아미노산인 시스테인 사이에 이황화 결합을 통해 동종이량체를 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.

[632]

[633] [표4]

면역 글로불린 Fc 단백질 서열

이름	단백질 서열	서열번호
면역글로불린 Fc	PSCPAPFLG GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SQEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPSSIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSQE EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTPP VLDSGDGSFFL YSRLTVDKSR WQEGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLGLG K	438

[634] 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)

[635]

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

[637]

[638] 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.

[639]

[640] 구체적으로, 비오틴이 표지된 인간 인터루킨 2 수용체 알파 및 베타 서브유닛(ACROBiosystems) 각각을 스트렙타비딘 바이오 센서칩(SA chip, Cytiva사)에 약 100 RU 및 500 RU씩 고정화하고 2배 연속 희석법으로 HBS-EP+ 버퍼(Cytiva사, BR100669)에 희석된 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체들 또는 알테스루킨을 분당 20 μ L의 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.

- [641] 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.
- [642] 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)

[643]

[644] [표5]

인터루킨 2 아날로그 결합체의 인터루킨 2 수용체 결합력

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

[645]

[646] 실시예 9: 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체의 약물 동태학 평가

[647]

[648] 상기 실시예 5 및 7에서 확인한 인터루킨 2 아날로그와 이를 포함하는 지속형 결합체의 인터루킨 2 수용체에 대한 결합력을 바탕으로 인터루킨 2 아날로그와 지속형 결합체를 이용한 약제에서 우수한 혈중 노출도 및 생체이용율을 갖는 것을 확인하고자 하였다.

[649]

[650] 구체적으로, 본 발명자들은 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체들과 알데스루킨의 약물 동태학을 ICR 및 C57BL/6 혈통 정상 마우스 모델에서 비교 분석하였다.

[651]

보다 구체적으로, 알데스루킨을 투여하는 대조군과 인터루킨 2 아날로그 결합체(인터루킨 2 아날로그 21번 결합체, 인터루킨 2 아날로그 41번 결합체, 인터루킨 2 아날로그 52번 결합체, 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체, 인터루킨 2 아날로그 104번 결합체, 및 인터루킨 2 아날로그 105번 결합체)를 투여하는 실험군을 정상 마우스에 피하, 정맥내 또는 복강내 주사 하였다. 인터루킨 2

아날로그 결합체를 피하 주사한 그룹은 1, 4, 8, 24, 48, 72, 그리고 96시간 후에 각각 3마리의 동물로부터 안와정맥을 통해 채혈하였고, 알테스루킨을 정맥내 또는 복강내 경로로 투약한 그룹은 0.08, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 그리고 24시간에 각각 3마리씩 동일한 방법으로 채혈하였다. 채혈된 각 군의 혈액은 원심분리하여 혈청으로 분리하였고 인간 인터루킨 2 항체를 이용한 ELISA 방법으로 혈중 인터루킨 2 아날로그 결합체 및 알테스루킨을 정량하였다. 그 결과, 인터루킨 2 아날로그 결합체는 알테스루킨에 비하여 ICR 및 C57BL/6 혈통의 정상 마우스에서 높은 혈중 노출도를 나타내었다 (도 3, 표 6 및 7). 아래 표에 나타난 결합체의 용량, AUC, 농도 수치에서는 전체 결합체 중 인터루킨 2 아날로그 부위가 차지하는 무게만을 기준으로 결합체량 수치(mg, ng)를 표시하였다.

[652]

[653] [표6]

ICR 마우스에서 인터루킨 2 아날로그 결합체의 약물 동태학

	알테스루킨	인터루킨 2 아날로그 41번 결합체	인터루킨 2 아날로그 52번 결합체
투약 용량 및 경로	0.8 mg/kg(정맥내 주사)	0.5 mg/kg(피하 주사)	0.5 mg/kg(피하 주사)
AUC (ng/mL×hr)	2,463.8	43,511.2	82,579.4
C ₀ 또는 C _{max} (ng/mL)	20,183.2	1,887.9	2,370.5
T _{1/2} (hr)	1.4	8.5	9.0

[654] [표7]

C57BL/6 마우스에서 인터루킨 2 아날로그 결합체의 약물 동태학

	알테스루킨	인터루킨 2 아날로그 21번 결합체	인터루킨 2 아날로그 86번 결합체	인터루킨 2 아날로그 104번 결합체	인터루킨 2 아날로그 105번 결합체
투약 용량 및 경로	3.0 mg/kg (복강내 주사)	0.5 mg/kg (피하 주사)	0.5 mg/kg (피하 주사)	0.5 mg/kg (피하 주사)	0.5 mg/kg (피하 주사)
AUC (ng/mL×hr)	1,458.2	375,794.2	136,373.5	186,068.4	107,487.6
C ₀ 또는 C _{max} (ng/mL)	1,018.6	13,319.0	7,371.1	9,288.3	6302.1

[655] 상기 결과에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그 결합체는 피하 경로로 투여되었음에도 불구하고 정맥내 주사 혹은 복강내 주사를 통한 알테스루킨에 비하여 높은 혈중 분포도를 나타내었다. 이러한 결과들은 약물 투여 시 상기 인터루킨 2 아날로그 결합체가 인간 재조합 인터루킨 2에 비하여 더욱 적은 양을 투약하여도 더 많은 양이 혈중에 노출되고 뿐만 아니라 투약의 편의성까지 확보할 수 있음을 시사하는 바이다.

[656]

[657] 실시예 10: 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체의 항암 효능 평가

[658]

[659] 상기 인터루킨 2 아날로그 결합체의 치료적 효능을 조사하고자, 동종 이식된 CT26 대장암종 마우스 모델 (CT26 colon tumor syngeneic mouse mode)에 인터루킨 2 아날로그 21번 결합체, 인터루킨 2 아날로그 41번 결합체, 그리고 인터루킨 2 아날로그 52번 결합체 및 대조 물질로 알테스루킨을 각각 투약 후 종양의 크기와 개체 사망률을 평가하였다.

[660] 구체적으로, 세포 배양용 플라스크에서 배양된 CT26 세포(ATCC)를 BALB/c 마우스의 다리에 피하 주사하고 며칠 뒤 육안으로 종양이 관찰되면 종양의 크기가 비슷하도록 각 그룹당 7마리씩을 배정하였다. 각 그룹에는 0.5 mg/kg의 인터루킨 2 아날로그 21번 결합체, 인터루킨 2 아날로그 41번 결합체, 그리고 인터루킨 2 아날로그 52번 결합체를 각각 피하 경로로 1주에 1회씩 총 2회 반복 투약하였다. 이 때 지속형 결합체의 투여량은 해당 결합체 중 인터루킨 2 아날로그 부위만의 무게를 나타낸다. 알테스루킨 투약 그룹에는 3.0 mg/kg의 프로류킨 주(Novartis)를 복강내 경로로 하루에 1회씩 5일간 연속 투약하였으며, 2일 휴식 후 동일한 일정으로 5일간 추가로 투약을 진행하였다.

- [661] 첫 투약 일을 기준으로 32일간 체중 및 개체 사망을 관찰하였으며, 그 결과를 바탕으로 모든 인터루킨 2 아날로그 결합체 투약 군에서 우수한 항암 효능이 확인되었다. 특히 인터루킨 2 아날로그 41번 결합체가 투약된 그룹은 모든 개체에서 완전관해가 관찰되었다. 반면, 알테스루킨을 투약한 군에서는 7마리 중 2마리가 사망에 이르렀으며, 단지 2마리에서만 완전관해가 나타났다. 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그 결합체는 아미노산 서열 변경으로 인간 인터루킨 2 수용체 베타 서브유닛에 강력히 결합하며 이를 통해 우수한 항암 효력이 나타난 것으로 풀이된다 (도 4). 그뿐만 아니라 인간 면역글로불린 Fc 영역이 연결된 지속형 결합체 구조를 통해 높은 혈중 노출을 가능하게 하여 투약 간격을 늘리고 기존 주사 요법을 피하 경로로 전환함으로써 환자 및 의료진에게 투약 편의성을 제공할 수 있음을 시사한다.
- [662]
- [663] 실시예 11: 종양의 반복 노출에 따른 기억 T 세포 반응 평가
- [664]
- [665] 상기 실시예 10의 항암 효능평가에 이어 종양의 반복 노출에 따른 기억 T 세포의 반응을 평가하였다. 구체적으로 상기 항암 효능평가가 완료된 이후 완전관해가 확인된 개체에 대하여, 첫 약물 투약 후 42일과 70일차에 각각 CT26 세포를 첫번째 노출과 동일한 방법으로 피하경로로 투여하여 재노출 시킨 뒤 종양의 성장 여부를 관찰하였고, 두번째 재 노출 이후 4일과 7일 뒤에는 마우스의 비장으로부터 기억 T 세포의 수를 FACS Canto II (Becton Dickinson) 장치로 분석하였다.
- [666] 그 결과, 음성 대조군을 제외한 모든 약물 투약 군에서 재 노출에 따른 종양의 생장이 억제되었을 뿐만 아니라 비장에서 기억 T 세포의 유의적인 증가가 관찰되었다(도 5). 결론적으로, 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그 결합체는 단일 제제 만으로도 동종 이식된 CT26 대장암종 마우스 모델에서 기억 면역반응을 유도하여 첫 번째 종양의 노출뿐만 아니라 종양의 재 노출에도 강력한 항암효능이 유지되었다.
- [667]
- [668] 실시예 12: 악성 흑색종에서 인터루킨 2 아날로그 지속형 결합체의 항암 효능평가
- [669]
- [670] 본 발명에 따른 인터루킨 2 아날로그 결합체의 항암 효능을 평가하고자, 흑색종 세포인 B16F10 세포가 동종 이식된 악성 흑색종 마우스 모델(B16F10 melanoma tumor syngeneic mouse model)에 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체 및 대조 물질로 알테스루킨을 각각 투약 후 종양의 크기와 개체 생존율을 평가하였다.
- [671] 구체적으로, 세포 배양용 플라스크에서 배양된 B16F10 세포(ATCC)를 C57BL/6 마우스 허벅다리에 피하 주사하고 며칠 뒤 육안으로 종양이 관찰되면 종양의 크기가 비슷하도록 각 그룹당 9마리씩을 배정하였다. 지속형 결합체 중

인터루킨 2 아날로그 부위의 무게를 기준으로 0.08 mg/kg부터 10 mg/kg의 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체를 각각 피하 경로로 1주에 1회씩 총 4회 반복 투약하였다. 또한 대조군으로서 알테스루킨 투약 그룹에는 3.0 mg/kg의 프로류킨 주(Novartis)를 복강내 경로로 하루에 1회씩 5일간 연속 투약하고, 2일 휴지기를 갖는 방식으로 총 4회 반복 투약하였다.

[672] 첫 투약 일을 기준으로 15일 차에서 각 그룹의 종양 크기(도 6의 A) 및 60일간 각 개체의 생존율(도 6의 B)을 관찰하였다. 그 결과, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체 투약 군이 알테스루킨 투약 그룹 보다 종양의 크기가 줄어들고 개체 생존률도 우수한 것을 확인하였으며, 본 발명의 지속형 결합체의 투약 용량 의존적인 항암 효능을 확인하였다. 특히, 주당 4.0 mg/kg 이상의 인터루킨 2 아날로그 86번 결합체가 투약된 그룹에서는 일부 개체에서 종양이 완전히 제거된 완전관해가 관찰되었다. 반면, 알테스루킨이 3.0 mg/kg으로 5일간 연속적으로 투약된 그룹에서는 어떠한 개체에서도 완전관해가 발견되지 않았다.

[673] 이는, 본 발명의 인터루킨 2 아날로그 결합체는 알테스루킨에 비하여 상대적으로 강력한 인간 인터루킨 2 수용체의 베타 서브유닛에 결합하는 특징을 갖도록 설계되었으며 이를 통해 우수한 항암효력을 나타낼 수 있는 것을 의미한다. 뿐만 아니라 원치 않는 부작용을 초래하지 않는 최소한의 인간 인터루킨 2 수용체의 알파 서브유닛에 결합력을 통해 과도한 면역반응을 효과적으로 제어하여 지속형 결합체 중 인터루킨 2 아날로그 부위의 무게 기준으로 10 mg/kg 이상의 고용량 투약군에서도 투약을 중단 할 정도의 부작용이 관찰되지 않았다.

[674]

[675] 상기와 같은 실험 결과는 본 발명에 따른 천연형 인터루킨 2에 아미노산 변이를 도입한 인터루킨 2 아날로그를 포함하는 지속형 결합체가 변화된 인터루킨 2 알파 수용체 결합력 및 인터루킨 2 베타 수용체 결합력을 가져, 이를 활용한 다양한 약물 개발, 특히 항암제 개발에 이용될 수 있음을 시사하는 것이다.

[676]

[677] 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.

청구범위

- [청구항 1] 인터루킨 2 아날로그(analog)를 포함하는 지속형 결합체로서, 하기 화학식 1로 표시되는 지속형 결합체:
- [화학식 1]
- $X - La - F$
- 여기서, X는, 알데스루킨(aldesleukin)에 비해 인터루킨 2 베타 수용체 결합력이 증대된 인터루킨 2 아날로그(analog)이고;
- L은, 폴리에틸렌 글리콜 링커이며;
- a는, 0 또는 자연수이며, 다만 a가 2 이상일 때, 각각의 L은 서로 독립적이고;
- F는, 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;
- 는 X와 L 사이, L과 F 사이의 공유결합 연결을 나타내며;
- 상기 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2에서 1번, 12번, 18번, 19번, 20번, 22번, 32번, 35번, 38번, 42번, 43번, 45번, 48번, 49번, 61번, 68번, 69번, 74번, 76번, 80번, 81번, 82번, 84번, 85번, 86번, 87번, 88번, 89번, 91번, 92번, 94번, 95번, 96번, 125번, 126번 및 133번 위치에 상응하는 아미노산 중 하나 이상이 변이된 서열을 포함함.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 인터루킨 2 알파 수용체에 대한 결합력이 알데스루킨과 달라진 것을 특징으로 하는, 지속형 결합체.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 133번 위치에 상응하는 아미노산에 하나 이상의 아미노산이 추가된 것인, 지속형 결합체.
- [청구항 4] 제1항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 것인, 지속형 결합체.
- [청구항 5] 제4항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 1개 내지 10개의 아미노산 치환을 추가로 포함하는 것인, 지속형 결합체.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 18번, 19번, 20번, 22번, 38번, 42번, 43번, 45번, 61번, 68번, 69번, 74번, 80번, 81번, 84번, 85번, 86번, 88번, 89번, 91번, 92번, 94번, 및 96번 중 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 추가로 치환된 것인, 지속형 결합체.
- [청구항 7] 제5항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 18번, 22번, 38번, 42번, 61번, 68번, 80번, 81번, 85번, 86번 및 92번 중 하나 이상의 아미노산이 다른 아미노산으로 추가로 치환된 것인, 지속형 결합체.
- [청구항 8] 제1항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 하기 아날로그 중 어느 하나인 것인, 지속형 결합체:
- (a) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 32번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;

- (b) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 35번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (c) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 38번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (d) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 42번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (e) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 43번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (f) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 48번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (g) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 49번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (h) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 76번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (i) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 81번, 92번, 94번 및 96번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (j) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 및 87번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (k) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 및 42번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (l) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 및 80번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (m) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 및 84번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (n) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 19번, 38번, 및 42번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (o) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 12번, 38번, 및 42번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (p) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 및 61번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (q) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 및 84번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (r) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 및 88번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (s) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 및 89번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (t) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 및

- 91번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (u) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 및 94번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (v) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 및 126번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (w) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 80번, 및 84번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (x) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 94번, 및 96번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (y) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 81번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (z) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 61번, 81번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (aa) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 81번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (ab) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 80번, 81번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (ac) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 81번, 84번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (ad) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 20번, 38번, 42번, 81번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (ae) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (af) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 74번, 81번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (ag) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 81번, 84번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (ah) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 81번, 88번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (ai) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번,

- 85번, 86번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (aj) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 80번, 81번, 85번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (ak) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 80번, 81번, 86번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (al) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 85번, 86번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (am) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 45번, 74번, 81번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (an) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 74번, 80번, 81번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (ao) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 84번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (ap) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 45번, 80번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (aq) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (ar) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (as) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 61번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (at) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 69번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (au) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 85번, 86번, 91번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;

- (av) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (aw) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (ax) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 45번, 74번, 80번, 81번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (ay) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 68번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (az) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 69번, 74번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (ba) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 84번, 85번, 86번, 91번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (bb) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 85번, 86번, 92번, 94번, 및 96번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (bc) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 19번, 22번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (bd) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 38번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (be) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 61번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (bf) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 68번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (bg) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 35번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (bh) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 45번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로

치환된 인터루킨 2 아날로그;

(bi) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 91번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;

(bj) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 92번, 및 95번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;

(bk) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 35번, 38번, 42번, 74번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;

(bl) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 43번, 61번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;

(bm) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 91번, 92번, 및 95번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;

(bn) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 35번, 38번, 42번, 74번, 80번, 81번, 82번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;

(bo) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 86번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그; 및

(bp) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 85번, 및 86번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그.

[청구항 9] 제8항에 있어서, 상기 아미노산 치환은 하기 아미노산 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 지속형 결합체:

(a) 12번 아미노산이 발린 또는 페닐알라닌으로 치환;

(b) 18번 아미노산이 아르기닌으로 치환;

(c) 19번 아미노산 티로신, 발린, 페닐알라닌, 아르기닌으로 치환;

(d) 20번 아미노산이 발린 또는 페닐알라닌으로 치환;

(e) 22번 아미노산이 글루탐산으로 치환;

(f) 32번 아미노산이 시스테인으로 치환;

(g) 35번 아미노산이 시스테인 또는 글루탐산으로 치환;

(h) 38번 아미노산이 알라닌 또는 아스파르트산으로 치환;

(i) 42번 아미노산이 라이신, 알라닌, 또는 트립토판으로 치환;

(j) 43번 아미노산이 시스테인, 글루탐산, 또는 글루타민으로 치환;

(k) 45번 아미노산이 알라닌으로 치환;

- (l) 48번 아미노산이 시스테인으로 치환;
- (m) 49번 아미노산이 시스테인으로 치환;
- (n) 61번 아미노산이 글루타민, 아르기닌, 또는 아스파르트산으로 치환;
- (o) 68번 아미노산이 아스파르트산, 또는 글루타민으로 치환;
- (p) 69번 아미노산이 글리신으로 치환;
- (q) 74번 아미노산이 히스티딘 또는 알라닌으로 치환;
- (r) 76번 아미노산이 시스테인으로 치환;
- (s) 80번 아미노산이 페닐알라닌, 티로신, 발린, 아스파르트산, 또는 트립토판으로 치환;
- (t) 81번 아미노산이 아스파르트산, 글루탐산, 또는 아스파라긴으로 치환;
- (u) 82번 아미노산이 글리신, 또는 발린으로 치환;
- (v) 84번 아미노산이 글루탐산, 발린, 또는 페닐알라닌으로 치환;
- (w) 85번 아미노산이 발린, 알라닌, 글리신, 트립토판, 티로신, 트레오닌, 이소류신, 글루탐산, 또는 페닐알라닌으로 치환;
- (x) 86번 아미노산이 발린, 알라닌, 글리신, 또는 류신으로 치환;
- (y) 87번 아미노산이 시스테인으로 치환;
- (z) 88번 아미노산이 글루타민, 발린, 또는 페닐알라닌으로 치환;
- (aa) 89번 아미노산이 페닐알라닌으로 치환;
- (ab) 91번 아미노산이 트레오닌, 페닐알라닌, 또는 글루탐산으로 치환;
- (ac) 92번 아미노산이 페닐알라닌, 류신, 티로신, 또는 트립토판으로 치환;
- (ad) 94번 아미노산이 페닐알라닌, 또는 발린으로 치환;
- (ae) 95번 아미노산이 아스파르트산으로 치환;
- (af) 96번 아미노산이 페닐알라닌, 발린, 또는 이소류신으로 치환;
- (ag) 125번 아미노산이 세린으로 치환; 및
- (ah) 126번 아미노산이 트레오닌으로 치환.

[청구항 10]

제8항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 하기 아날로그 중 어느 하나인 것인, 지속형 결합체:

- (a) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (b) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 80번, 81번, 85번, 86번 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (c) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그;
- (d) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 38번, 42번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된

인터루킨 2 아날로그;

(e) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 61번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그; 및

(f) 천연형 인터루킨 2 중 1번 아미노산이 제거되고, 125번, 18번, 22번, 68번, 80번, 81번, 85번, 86번, 및 92번 아미노산이 다른 아미노산으로 치환된 인터루킨 2 아날로그.

[청구항 11] 제10항에 있어서, 상기 아미노산 치환은 하기 아미노산 치환으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것인, 지속형 결합체:

- (a) 18번 아미노산이 아르기닌으로 치환;
- (b) 22번 아미노산이 글루탐산으로 치환;
- (c) 38번 아미노산이 알라닌으로 치환;
- (d) 42번 아미노산이 라이신으로 치환;
- (e) 61번 아미노산이 아스파르트산으로 치환;
- (f) 68번 아미노산이 아스파르트산으로 치환;
- (g) 80번 아미노산이 페닐알라닌으로 치환;
- (h) 81번 아미노산이 글루탐산으로 치환;
- (i) 85번 아미노산이 발린으로 치환;
- (j) 86번 아미노산이 발린으로 치환;
- (k) 92번 아미노산이 페닐알라닌으로 치환; 및
- (l) 125번 아미노산이 세린으로 치환.

[청구항 12] 제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG, IgA, IgD, IgE, IgM 유래 또는 이들의 조합(combination) 또는 이들의 하이브리드(hybrid)인 지속형 결합체.

[청구항 13] 제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 IgG4 Fc 영역인 지속형 결합체.

[청구항 14] 제1항에 있어서, 상기 면역글로불린 Fc 영역은 비당쇄화된 것인 지속형 결합체.

[청구항 15] 제1항에 있어서, 상기 L은 에틸렌글리콜 반복 단위를 함유하고, 상기 에틸렌글리콜 반복 단위 부위(moiety)의 화학식량은 1 내지 100 kDa 범위에 있는 지속형 결합체.

[청구항 16] 제1항에 있어서,
상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태 면역글로불린 Fc 영역 중 하나의 Fc 영역에 X 한 분자가 상기 폴리에틸렌글리콜 링커를 통하여 서로 공유결합적으로 연결된 지속형 결합체.

[청구항 17] 하기 화학식 2로 표시되는 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체:

[화학식 2]

X - Z - Fc

이 때 X는 서열번호 3 내지 106의 아미노산 서열에서 선택되는 어느 하나의 폴리펩타이드 서열을 포함하는 인터루킨 2 아날로그이고;
Z는 폴리에틸렌글리콜 링커로서 분자량 2 kDa 내지 30 kDa의 링커이며;
Fc는 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;

-는 X와 Z 사이, Z와 Fc 사이의 공유결합 연결을 나타내며,
상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태의 Fc 영역 중 한 폴리펩타이드 사슬에만 Z의 일 말단이 공유결합으로 연결되어 있고, 이 Z의 반대쪽 말단에 X 한 분자가 공유결합으로 연결되어 있는 지속형 결합체.

[청구항 18] 제17항에 있어서, 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 포함하는 것인 지속형 결합체.

[청구항 19] 제17항에 있어서, 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 포함하는 것인 지속형 결합체.

[청구항 20] 제17항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 22, 42, 53, 87, 105 및 106의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 것인 인터루킨 2 아날로그.

[청구항 21] 제17항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 C-말단에 하나 이상의 아미노산을 추가로 포함하는 것인 지속형 결합체.

[청구항 22] 하기 화학식 3으로 표시되는 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체:

[화학식 3]

X' - Z - Fc

이 때 X'는 하기 일반식 1로 표현되는 아미노산 서열을 포함하는 인터루킨 2 아날로그이고,

[일반식 1]

X1-P-T-S-S-T-K-K-T-Q-L-Q-L-E-H-L-X18-X19-D-L-X22-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-X38-M-L-T-X42-X43-F-X45-M-P-K-K-A-T-E-L-K-H-L-Q-C-L-E-X61-E-L-K-P-L-E-X68-V-L-N-L-A-X74-S-K-N-F-H-X80-X81-P-R-X84-X85-X86-S-N-I-N-X91-X92-V-X94-E-X96-K-G-S-E-T-T-F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-S-Q-S-I-I-S-T-L-T(일반식 1, 서열번호 212)

상기 일반식 1에서,

X1은 결실이고,

X18은 류신(L), 또는 아르기닌(R)이고,

X19는 류신(L), 또는 티로신(Y)이고,

X22는 글루탐산(E), 또는 글루타민(Q)이고,
 X38은 알라닌(A), 아스파르트산(D), 또는 아르기닌(R)이고,
 X42는 알라닌(A), 페닐알라닌(F), 리신(K), 또는 트립토판(W)이고,
 X43은 글루탐산(E), 리신(K), 또는 글루타민(Q)이고,
 X45는 알라닌(A), 또는 티로신(Y)이고,
 X61은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 글루타민(Q), 또는 아르기닌(R)이고,
 X68은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
 X74는 히스티딘(H), 또는 글루타민(Q)이고,
 X80은 페닐알라닌(F), 류신(L), 발린(V), 또는 티로신(Y)이고,
 X81은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 또는 아르기닌(R)이고,
 X84는 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
 X85는 알라닌(A), 글루탐산(E), 글리신(G), 류신(L), 발린(V), 트립토판(W), 또는 티로신(Y)이고,
 X86은 알라닌(A), 글리신(G), 이소류신(I), 또는 발린(V)이고,
 X91은 트레오닌(T), 또는 발린(V)이고,
 X92는 페닐알라닌(F), 이소류신(I), 또는 티로신(Y)이고,
 X94는 페닐알라닌(F), 또는 류신(L)이고,
 X96은 페닐알라닌(F), 또는 류신(L)임;
 Z는 폴리에틸렌글리콜 링커로서 분자량 2 kDa 내지 30 kDa의 링커이며;
 Fc는 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;
 -는 X'와 Z 사이, Z와 Fc 사이의 공유결합 연결을 나타내며,
 상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태의 Fc 영역 중 한 폴리펩타이드 사슬에만 Z의 일 말단이 공유결합으로 연결되어 있고, 이 Z의 반대쪽 말단에 X' 한 분자가 공유결합으로 연결되어 있는 지속형 결합체.

[청구항 23]

제22항에 있어서,
 상기 일반식 1에서,
 X43은 리신(K)이고,
 X45는 티로신(Y)이고,
 X61은 아스파르트산(D), 글루탐산(E), 또는 글루타민(Q)이고,
 X68은 글루탐산(E)이고,
 X74는 글루타민(Q)이고,
 X80은 페닐알라닌(F), 또는 류신(L)이고,
 X85는 류신(L), 발린(V), 또는 티로신(Y)이고,
 X86은 이소류신(I), 또는 발린(V)이고,
 X92는 페닐알라닌(F), 또는 이소류신(I)임.

[청구항 24]

제22항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 C-말단에 하나 이상의 아미노산이 추가로 포함하는 것인 인터루킨 2 아날로그.

- [청구항 25] 하기 화학식 4로 표시되는 인터루킨 2 아날로그의 지속형 결합체:
 [화학식 4]
 $X'' - Z - Fc$
 이 때 X'' 는 하기 일반식 2로 표현되는 아미노산 서열을 포함하는 인터루킨 2 아날로그이고,
 [일반식 2]
 $X1-P-T-S-S-S-T-K-K-T-Q-L-Q-L-E-H-L-X18-L-D-L-X22-M-I-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-X38-M-L-T-X42-K-F-Y-M-P-K-K-A-T-E-L-K-H-L-Q-C-L-E-X61-E-L-K-P-L-E-X68-V-L-N-L-A-Q-S-K-N-F-H-F-X81-P-R-D-X85-X86-S-N-I-N-V-F-V-L-E-L-K-G-S-E-T-T-F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-I-V-E-F-L-N-R-W-I-T-F-S-Q-S-I-I-S-T-L-T$ (일반식 2, 서열번호 213)
 $X1$ 은 결실이고,
 $X18$ 은 류신(L), 또는 아르기닌(R)이고,
 $X22$ 는 글루탐산(E), 또는 글루타민(Q)이고,
 $X38$ 은 알라닌(A), 또는 아르기닌(R)이고,
 $X42$ 는 페닐알라닌(F), 또는 리신(K) 이고,
 $X61$ 은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
 $X68$ 은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
 $X81$ 은 아스파르트산(D), 또는 글루탐산(E)이고,
 $X85$ 는 류신(L), 또는 발린(V)이고,
 $X86$ 은 이소류신(I), 또는 발린(V)임;
 Z 는 폴리에틸렌글리콜 링커로서 분자량 2 kDa 내지 30 kDa의 링커이며;
 Fc 는 이량체 형태의 면역글로불린 Fc 영역이고;
 -는 X'' 와 Z 사이, Z 와 Fc 사이의 공유결합 연결을 나타내며,
 상기 지속형 결합체는 상기 이량체 형태의 Fc 영역 중 한 폴리펩타이드 사슬에만 Z 의 일 말단이 공유결합으로 연결되어 있고, 이 Z 의 반대쪽 말단에 X'' 한 분자가 공유결합으로 연결되어 있는 지속형 결합체.
- [청구항 26] 제25항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 22, 42, 53, 87, 105 및 106의 아미노산 서열로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 서열을 포함하는 것인 인터루킨 2 아날로그.
- [청구항 27] 약학적 유효량의 제1항 또는 제17항의 지속형 결합체와 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 28] 제27항에 있어서, 상기 인터루킨 2 아날로그는 서열번호 22, 42, 53, 87, 105 및 106로 이루어진 군에서 선택된 것인 약학 조성물.
- [청구항 29] 제27항에 있어서, 상기 암은 전이성 신세포암, 전이성 흑색종, 대장암, 간암, 난소암, 췌장암, 담낭암, 신장암, 대장암, 폐암, 피부암, 흑색종, 유방암, 방광암, 및 위암으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 약학 조성물.

- [청구항 30] 제27항에 있어서, 상기 약학 조성물은 하기 특성 중 하나 이상의 특성을 나타내는 것인, 약학 조성물:
- (i) 알테스루킨에 비해 높은 혈중 노출도;
 - (ii) 알테스루킨에 비해 높은 종양 성장 억제 활성, 및
 - (iii) 알테스루킨에 비해 높은 기억 T 세포 생성 반응.
- [청구항 31] 제27항에 있어서, 상기 약학 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 약학 조성물.
- [청구항 32] 제27항에 있어서, 상기 약학 조성물은 1주 내지 1개월 범위의 시간 간격으로 투여되는 것인 약학 조성물.