



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2019-0094222  
(43) 공개일자 2019년08월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C07K 14/54 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)  
A61P 21/00 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)  
A61P 37/02 (2006.01) C07K 14/55 (2006.01)  
C07K 16/28 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C07K 14/54 (2013.01)  
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7020221
- (22) 출원일자(국제) 2017년12월13일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2019년07월11일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/066163
- (87) 국제공개번호 WO 2018/112069  
국제공개일자 2018년06월21일
- (30) 우선권주장  
62/433,533 2016년12월13일 미국(US)

- (71) 출원인  
테리니아, 인크.  
미국 94608 캘리포니아주 에머리빌 호턴 스트리트  
5980 스위트 470
- (72) 발명자  
그리브 제프리  
미국 94708 캘리포니아주 버클리 파크 힐즈 로드  
1066  
김 정민  
미국 94702 캘리포니아주 버클리 66번가 1329 유  
닛 비  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
김진희, 김태홍

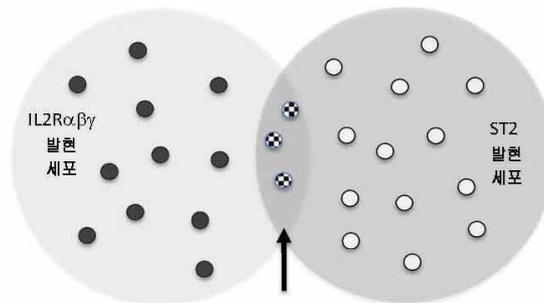
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 **다가 조절성 T 세포 조절제**

**(57) 요약**

본 개시는 IL-2 수용체-결합 모이어티 및 ST2-결합 모이어티를 함유하는 화합물을 제공한다. 본 개시에 기재된 방법은 IL-2 수용체-결합 모이어티 및 ST2-결합 모이어티를 함유하는 화합물의 치료 유효량을, 병태의 치료가 필요한 대상체에게 투여함으로써 병태를 치료하는 방법을 제공한다.

**대표도 - 도1**



(52) CPC특허분류

*A61P 21/00* (2018.01)

*A61P 29/00* (2018.01)

*A61P 37/02* (2018.01)

*C07K 14/55* (2013.01)

*C07K 16/2866* (2013.01)

*C07K 2317/52* (2013.01)

*C07K 2317/55* (2013.01)

*C07K 2317/71* (2013.01)

*C07K 2317/92* (2013.01)

(72) 발명자

**나가라잔 니란자나**

미국 94611 캘리포니아주 오클랜드 스네이크 로드  
5650

**조 존**

미국 02180 메사추세츠주 스톤엄 비컨 스트리트 12  
#1

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- a) 인간 IL-2 단백질 도메인;
- b) 면역글로불린 Fc 단백질 도메인; 및
- c) 인터루킨 1 수용체-유사 1(ST2)에 결합하는 단백질 도메인을 포함하는 융합 단백질.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, ST2에 결합하는 단백질 도메인은 인간 IL-33 단백질 도메인인 융합 단백질.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, ST2에 결합하는 단백질 도메인은 ST2에 특이적인 항체, 또는 이의 항원 결합 단편인 융합 단백질.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 펩티드 링커 도메인을 추가로 포함하는 융합 단백질.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 IL-2 단백질 도메인은 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 T3A, N88R, N88G, D20H, C125S, Q126L 및 Q126F로 구성된 군으로부터 선택된 치환을 갖는 인간 IL-2를 포함하는 것인 융합 단백질.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 Fc 단백질 도메인은 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 8 또는 서열번호 9의 인간 IgG1 Fc 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 융합 단백질.

#### 청구항 7

제2항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 IL-33 단백질 도메인은 서열번호 10의 아미노산 서열에 대해 C208S, C227S, C232S 및 C259S로 구성된 군으로부터 선택된 치환을 갖는 인간 IL-33을 포함하는 것인 융합 단백질.

#### 청구항 8

제4항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 펩티드 링커 도메인은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것인 융합 단백질.

#### 청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 펩티드 링커 도메인 및 제2 펩티드 링커 도메인을 추가로 포함하는 융합 단백질.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, 각각의 도메인은 아미노 말단(N-말단) 및 카르복시 말단(C-말단)을 보유하고; 이때 융합 단백질은

- a) 인간 IL-2 단백질 도메인의 C-말단이 제1 펩티드 링커 도메인의 N-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되고;
- b) IgG Fc 단백질 도메인의 N-말단이 제1 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되며;
- c) 제2 펩티드 링커 도메인의 N-말단이 IgG Fc 단백질 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되고;
- d) ST2에 결합하는 단백질 도메인의 N-말단이 제2 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되도록

구성되는 것인 융합 단백질.

#### 청구항 11

제9항에 있어서, 각각의 도메인은 아미노 말단(N-말단) 및 카르복시 말단(C-말단)을 보유하고; 이때 융합 단백질은

- a. ST2에 결합하는 단백질 도메인의 C-말단이 제1 펩티드 링커 도메인의 N-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되고;
- b. IgG Fc 단백질 도메인의 N-말단이 제1 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되며;
- c. 제2 펩티드 링커 도메인의 N-말단이 IgG Fc 단백질 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되고;
- d. 인간 IL-2 단백질 도메인의 N-말단이 제2 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되도록

구성되는 것인 융합 단백질.

#### 청구항 12

제1항에 있어서, 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 또는 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하는 융합 단백질.

#### 청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 코딩하는 핵산.

#### 청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 이량체 단백질.

#### 청구항 15

제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질을 포함하는 이량체 단백질로서,

- a. 각각의 융합 단백질은 면역글로불린(IgG) Fc 단백질 도메인과,
  - i. 인간 IL-2 단백질 도메인; 및
  - ii. 인터루킨 1 수용체-유사 1(ST2)에 결합하는 단백질 도메인

으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가 단백질 도메인을 포함하고;

- b. 이량체 단백질은 적어도 하나의 인간 IL-2 단백질 도메인 및 ST2에 결합하는 적어도 하나의 단백질 도메인을 포함하는 것인 이량체 단백질.

#### 청구항 16

제15항에 있어서,

- a. 제1 융합 단백질은 인간 IL-2 단백질 도메인, 제1 면역글로불린 Fc 단백질 도메인, 및 제1 펩티드 링커를 포함하고;
- b. 제2 융합 단백질은 ST2에 결합하는 단백질 도메인, 제2 면역글로불린 Fc 단백질 도메인, 및 제2 펩티드 링커 도메인을 포함하는 것인 이량체 단백질.

**청구항 17**

제16항에 있어서,

a. 각각의 도메인은 아미노 말단(N-말단) 및 카르복시 말단(C-말단)을 보유하고;

b. 제1 융합 단백질은

i. 인간 IL-2 단백질 도메인의 C-말단이 제1 펩티드 링커 도메인의 N-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되고;

ii. 제1 IgG Fc 단백질 도메인의 N-말단이 제1 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되도록 구성되며;

c. 제2 융합 단백질은

i. 제2 IgG Fc 단백질 도메인의 C-말단이 제2 펩티드 링커 도메인의 N-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되고;

ii. ST2에 결합하는 단백질 도메인의 N-말단이 제2 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되도록 구성되는 것인 이량체 단백질.

**청구항 18**

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, ST2에 결합하는 단백질 도메인은 인간 IL-33 단백질 도메인인 이량체 단백질.

**청구항 19**

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, ST2에 결합하는 단백질 도메인은 ST2에 특이적인 항체, 또는 이의 항원 결합 단편인 이량체 단백질.

**청구항 20**

제15항에 있어서, 융합 단백질 중 적어도 하나는 적어도 하나의 펩티드 링커 도메인을 추가로 포함하는 것인 이량체 단백질.

**청구항 21**

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 IL-2 단백질 도메인은 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 T3A, N88R, N88G, D20H, C125S, Q126L 및 Q126F로 구성된 군으로부터 선택된 치환을 갖는 인간 IL-2를 포함하는 것인 이량체 단백질.

**청구항 22**

제15항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 면역글로불린 Fc 단백질 도메인은 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 8 또는 서열번호 9의 인간 IgG1 Fc 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인 이량체 단백질.

**청구항 23**

제18항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 IL-33 단백질 도메인은 서열번호 10의 아미노산 서열에 대해 C208S, C227S, C232S 및 C259S로 구성된 군으로부터 선택된 치환을 갖는 인간 IL-33을 포함하는 것인 이량체 단백질.

**청구항 24**

제15항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 펩티드 링커 도메인은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것인 이량체 단백질.

**청구항 25**

제15항에 있어서,

a. 제1 융합 단백질은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 13의 아미노산 서

열을 포함하거나;

- b. 제1 융합 단백질은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하거나;
- c. 제1 융합 단백질은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하거나;
- d. 제1 융합 단백질은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하거나;
- e. 제1 융합 단백질은 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하거나;
- f. 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질은 각각 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하거나;
- g. 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질은 각각 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하거나;
- h. 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질은 각각 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하고, 이량체 단백질은 서열번호 29의 아미노산 서열을 추가로 포함하거나;
- i. 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질은 각각 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하고, 이량체 단백질은 서열번호 30의 아미노산 서열을 추가로 포함하거나;
- j. 제1 융합 단백질은 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하며, 이량체 단백질은 서열번호 29의 아미노산 서열을 추가로 포함하거나;
- k. 제1 융합 단백질은 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하고, 이량체 단백질은 서열번호 30의 아미노산 서열을 추가로 포함하거나;
- l. 제1 융합 단백질은 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하며, 이량체 단백질은 서열번호 29의 아미노산 서열을 추가로 포함하거나;
- m. 제1 융합 단백질은 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하며, 이량체 단백질은 서열번호 30의 아미노산 서열을 추가로 포함하거나;
- n. 제1 융합 단백질은 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하며, 이량체 단백질은 서열번호 29의 아미노산 서열을 추가로 포함하거나;
- o. 제1 융합 단백질은 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하며, 이량체 단백질은 서열번호 30의 아미노산 서열을 추가로 포함하거나;
- p. 제1 융합 단백질은 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하며, 이량체 단백질은 서열번호 29의 아미노산 서열을 추가로 포함하거나; 또는
- q. 제1 융합 단백질은 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하며, 이량체 단백질은 서열번호 30의 아미노산 서열을 추가로 포함하는 것인 이량체 단백질.

**청구항 26**

제15항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, IgG Fc 단백질은 시스테인 잔기를 포함하고, 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질은 IgG Fc 단백질 도메인의 시스테인 잔기를 통해 서로 연결되는 것인 이량체 단백질.

**청구항 27**

제14항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,  $ST2^-$  조절성 T 세포에 비해  $ST2^+$  조절성 T 세포를 선택적으로 표적화하는 이량체 단백질.

**청구항 28**

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 융합 단백질, 또는 제14항 내지 제27항 중 어느 한 항의 이량체 단백질을 포함하는 약학 조성물.

**청구항 29**

병태의 치료가 필요한 대상체에게 치료 유효량의 제28항의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 병태의 치료 방법.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 투여는 대상체내  $ST2^-$  조절성 T 세포의 레벨에 비해 대상체내  $ST2^+$  조절성 T 세포의 레벨을 더 크게 증가시키는 것인 방법.

**청구항 31**

제29항 또는 제30항에 있어서, 투여는 대상체내  $ST2^-$  조절성 T 세포에 비해 대상체내  $ST2^+$  조절성 T 세포를 선택적으로 활성화하는 것인 방법.

**청구항 32**

제29항에 있어서, 치료 유효량은 약 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 약 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 인 방법.

**청구항 33**

제29항에 있어서, 병태는 염증성 근육병증인 방법.

**청구항 34**

제33항에 있어서, 염증성 근육병증은 근이영양증, 다발성 근염, 피부근염으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 35**

제29항에 있어서, 병태는 지방 조직의 염증성 병태, 대장의 염증성 병태, 및 폐의 염증성 병태로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 지방 조직은 내장 지방 조직인 방법.

**청구항 37**

제29항에 있어서, 병태는 자가면역 질환인 방법.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 자가면역 질환은 이식편대숙주병, 심상성천포창, 전신 홍반성 루푸스, 피부경화증, 궤양성 대장염, 크론병, 건선, 1형 당뇨병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 원형탈모증, 포도막염, 시속척수염, 및 뒤센형 근이영양증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

**청구항 39**

제29항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 정맥내 투여인 방법.

**청구항 40**

제29항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 피하 투여인 방법.

**청구항 41**

제29항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 인간인 방법.

**청구항 42**

대상체에게 치료 유효량의 제28항의 약학 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 ST2<sup>-</sup> 조절성 T 세포에 비해 ST2<sup>+</sup> 조절성 T 세포를 선택적으로 활성화하는 방법.

**청구항 43**

제42항에 있어서, 치료 유효량은 약 1 μg/kg 내지 약 250 μg/kg인 방법.

**청구항 44**

제42항 또는 제43항에 있어서, 투여는 정맥내 투여인 방법.

**청구항 45**

제42항 또는 제43항에 있어서, 투여는 피하 투여인 방법.

**청구항 46**

제42항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체는 인간인 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

- [0001] 관련 출원
- [0002] 본 출원은 2016년 12월 13일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/433,533호를 우선권으로 주장하며, 상기 가특허 출원은 그 전체가 참고로 본 출원에 인용된다.
- [0003] 서열목록의 제출
- [0004] 본 출원과 관련된 서열목록은 EFS-Web에 의해 전자적 포맷으로 제출되고, 그 전체가 참고로 본 명세서에 인용된다. 서열목록을 함유하는 텍스트 파일의 명칭은 127754\_00502\_Sequence\_Listing이다. 텍스트 파일의 크기는 91 KB이고, 그 텍스트 파일은 2017년 12월 13일에 생성되었다.

**배경 기술**

- [0005] 염증성 근육병증은 만성 근육 염증 및 근육 약화를 특징으로 하는 병태이다. 근이영양증은 돌연변이된 디스트로핀 유전자에 의해 유발된 퇴행성 근육 질환이지만, 진행성 변성증의 근본적인 원인은 근육 염증이다. 이들 질환과 관련된 염증은 근 섬유를 손상시키고, 피로, 통증, 및 진행성 근육 변성을 초래한다. 조절성 T 세포(Treg)는 T 세포의 전문화된 부분집단이다. Treg은 면역계의 활성화를 억제함으로써 면역계의 자기-관용을 조절한다. 수용체 ST2와 같은 규정된 분자 마커를 발현하는 Treg의 부분집단은 손상된 골격근 및 염증성 폐와 같은 염증성 조직에서 발견된다. ST2-발현 Treg의 팽창 및 활성화는 급성 근육 손상의 해결 및 근이영양증과 관련된 근육 염증의 해결에 연루되어 있음이 확인되어 왔다. 추가로 ST2+ Treg은 내장 지방, 대장, 및 폐와 같은 조직에서 발견되고, 면역조절성 및 그들 조직에서 조직 수복 기능을 보유한다.

**발명의 내용**

- [0006] 몇몇 실시양태에서, 본 개시는 인간 IL-2 단백질 도메인; 면역글로불린 Fc 단백질 도메인; 및 인터루킨 1 수용체-유사 1(ST2)에 결합하는 단백질 도메인을 포함하는 융합 단백질을 제공한다. 특정 실시양태에서, ST2에 결합하는 단백질 도메인은 인간 IL-33 단백질 도메인이다. 특정 실시양태에서, ST2에 결합하는 단백질 도메인은 ST2에 특이적인 항체, 또는 이의 항원 결합 단편이다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 적어도 하나의 펩티드 링커 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간 IL-2 단백질 도메인은 하기로 구성된 군에서 선택된 치환을 갖는 인간 IL-2를 포함한다: 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 T3A, N88R, N88G, D20H, C125S, Q126L, 및 Q126F. 특정 실시양태에서, 면역글로불린 Fc 단백질 도메인은 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 8 또는 서열번호 9의 인간 IgG1 Fc 변이체로 구성된 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간 IL-33 단백질 도메인은 서열번호 10의 아미노산 서열에 대해 C208S, C227S, C232S 및 C259S로 구성된 군으로부터 선택된 치환을 갖는 인간 IL-33을 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 링커 도메인은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 제1 펩티드 링커 도메인 및 제2 펩티드 링커

도메인을 추가로 포함한다.

- [0007] 본 출원에 기재된 융합 단백질의 특정 실시양태에서, 각각의 도메인은 아미노 말단(N-말단) 및 카르복시 말단(C-말단)을 보유하고; 이때, 융합 단백질은, 인간 IL-2 단백질 도메인의 C-말단이 제1 펩티드 링커 도메인의 N-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되고; IgG Fc 단백질 도메인의 N-말단이 제1 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되며; 제2 펩티드 링커 도메인의 N-말단이 IgG Fc 단백질 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되고; ST2에 결합하는 단백질 도메인의 N-말단이 제2 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되도록 구성된다.
- [0008] 본 출원에 기재된 융합 단백질의 특정 실시양태에서, 각각의 도메인은 아미노 말단(N-말단) 및 카르복시 말단(C-말단)을 보유하고; 이때, 융합 단백질은, ST2에 결합하는 단백질 도메인의 C-말단이 제1 펩티드 링커 도메인의 N-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되고; IgG Fc 단백질 도메인의 N-말단이 제1 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되며; 제2 펩티드 링커 도메인의 N-말단이 IgG Fc 단백질 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되며; 인간 IL-2 단백질 도메인의 N-말단이 제2 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되도록 구성된다. 특정 실시양태에서, 융합 단백질은 서열번호 17, 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24, 또는 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0009] 몇몇 실시양태에서, 본 개시는 본 출원에 기재된 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 본 개시는 본 출원에 기재된 융합 단백질을 포함하는 이량체 단백질을 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 본 개시는 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질을 포함하는 이량체 단백질을 제공하는데, 이때 각각의 융합 단백질은 면역글로블린(IgG) Fc 단백질 도메인 및 인간 IL-2 단백질 도메인으로 구성된 군으로부터 선택된 적어도 하나의 추가의 단백질 도메인; 및 인터루킨 1 수용체-유사 1(ST2)에 결합하는 단백질 도메인을 포함하고; 이량체 단백질은 적어도 하나의 인간 IL-2 단백질 도메인 및 적어도 하나의 ST2에 결합하는 단백질 도메인을 포함한다.
- [0010] 특정 실시양태에서, 제1 융합 단백질은 인간 IL-2 단백질 도메인, 제1 면역글로블린 Fc 단백질 도메인, 및 제1 펩티드 링커를 포함하고; 제2 융합 단백질은 ST2에 결합하는 단백질 도메인, 제2 면역글로블린 Fc 단백질 도메인, 및 제2 펩티드 링커 도메인을 포함한다. 특정 실시양태에서, 각각의 도메인은 아미노 말단(N-말단) 및 카르복시 말단(C-말단)을 보유하고; 제1 융합 단백질은 인간 IL-2 단백질 도메인의 C-말단이 제1 펩티드 링커 도메인의 N-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되고; 제1 IgG Fc 단백질 도메인의 N-말단이 제1 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되도록 구성되고; 제2 융합 단백질은 제2 IgG Fc 단백질 도메인의 C-말단이 제2 펩티드 링커 도메인의 N-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되고; N-말단 of ST2에 결합하는 단백질 도메인의 N-말단이 제2 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 펩티드 결합을 통해 융합되도록 구성된다. 특정 실시양태에서, ST2에 결합하는 단백질 도메인은 인간 IL-33 단백질 도메인이다. 특정 실시양태에서, ST2에 결합하는 단백질 도메인은 ST2에 특이적인 항체, 또는 이의 항원 결합 단편이다. 특정 실시양태에서, 이량체 단백질의 융합 단백질 중 적어도 하나는 적어도 하나의 펩티드 링커 도메인을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간 IL-2 단백질 도메인은 하기로 구성된 군으로부터 선택된 치환을 갖는 인간 IL-2를 포함한다: 서열번호 2의 아미노산 서열에 대해 T3A, N88R, N88G, D20H, C125S, Q126L, 및 Q126F. 특정 실시양태에서, 면역글로블린 Fc 단백질 도메인은 서열번호 4, 서열번호 5, 서열번호 7, 서열번호 8 또는 서열번호 9의 인간 IgG1 Fc 변이체를 포함하는 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 인간 IL-33 단백질 도메인은 서열번호 10에 대해 C208S, C227S, C232S 및 C259S로 구성된 군으로부터 선택된 치환을 갖는 인간 IL-33을 포함한다. 특정 실시양태에서, 펩티드 링커 도메인은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0011] 본 출원에 기재된 이량체 단백질의 특정 실시양태에서, 제1 융합 단백질은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 13의 아미노산 서열을 포함하고; 제1 융합 단백질은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하고; 제1 융합 단백질은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하고; 제1 융합 단백질은 서열번호 17의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 15의 아미노산 서열을 포함하고; 제1 융합 단백질은 서열번호 18의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 12의 아미노산 서열을 포함하고; 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질 각각은 서열번호 19의 아미노산 서열을 포함하고; 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질 각각은 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하고; 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질 각각은 서열번호 22의 아미노산 서열을 포함하고, 이량체 단백질은 서열번호 29의 아미노산 서열을 추가로 포함하고; 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질 각각은 서열번호 23의 아미노산 서열을 포함하고, 이량체 단백질은 서열번호 30의 아미노산 서열을 추가로 포함하고; 제1 융합 단백질은 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하고, 이량체 단백질은 서열번호 29의 아미노산 서열을

추가로 포함하고; 제1 융합 단백질은 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하고, 이량체 단백질은 서열번호 30의 아미노산 서열을 추가로 포함하고; 제1 융합 단백질은 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하고, 이량체 단백질은 서열번호 29의 아미노산 서열을 추가로 포함하고; 제1 융합 단백질은 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 16의 아미노산 서열을 포함하고, 이량체 단백질은 서열번호 30의 아미노산 서열을 추가로 포함하고; 제1 융합 단백질은 서열번호 26의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하고, 이량체 단백질은 서열번호 29의 아미노산 서열을 추가로 포함하고; 제1 융합 단백질은 서열번호 27의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 14의 아미노산 서열을 포함하고, 이량체 단백질은 서열번호 30의 아미노산 서열을 포함하고; 제1 융합 단백질은 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 24의 아미노산 서열을 포함하고, 이량체 단백질은 서열번호 29의 아미노산 서열을 추가로 포함하거나; 또는 제1 융합 단백질은 서열번호 28의 아미노산 서열을 포함하고, 제2 융합 단백질은 서열번호 25의 아미노산 서열을 포함하고, 이량체 단백질은 서열번호 30의 아미노산 서열을 추가로 포함한다.

[0012] 본 출원에 기재된 이량체 단백질의 특정 실시양태에서, IgG Fc 단백질은 시스템인 잔기를 포함하고, 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질은 IgG Fc 단백질 도메인의 시스템인 잔기를 통해 서로 연결된다. 특정 실시양태에서, 이량체 단백질은  $ST2^-$  조절성 T 세포에 비해  $ST2^+$  조절성 T 세포를 선택적으로 표적화한다. 몇몇 실시양태에서, 본 개시는 본 출원에 기재된 융합 단백질 또는 본 출원이 기재된 이량체 단백질을 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 몇몇 실시양태에서, 본 개시는 병태를 치료하기 위한 방법을 제공하는데, 상기 방법은 치료 유효량의 청구범위 제28항의 약학 조성물을 병태의 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 투여는 대상체에서  $ST2^-$  조절성 T 세포의 레벨에 비해 대상체에서  $ST2^+$  조절성 T 세포의 레벨을 더 크게 증가시킨다. 특정 실시양태에서, 상기 투여는 대상체에서  $ST2^-$  조절성 T 세포에 비해 대상체에서  $ST2^-$  조절성 T 세포를 선택적으로 활성화한다. 특정 실시양태에서, 치료 유효량은 약 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 약 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이다.

[0014] 특정 실시양태에서, 상기 병태는 염증성 근육병증이다. 특정 실시양태에서, 염증성 근육병증은 근이영양증, 다발성근염, 피부근육염으로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 상기 병태는 지방 조직의 염증성 병태, 대장의 염증성 병태, 및 폐의 염증성 병태로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 상기 지방 조직은 내장 지방 조직이다. 특정 실시양태에서, 상기 병태는 자가면역 질환이다. 특정 실시양태에서, 상기 자가면역 질환은 이식편대숙주병, 심상성천포창, 전신 홍반성 루푸스, 피부경화증, 궤양성 대장염, 크론병, 건선, 1형 당뇨병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 원형탈모증, 포도막염, 시속척수염, 및 뒤센형 근이영양증으로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 투여는 정맥내 투여이다. 특정 실시양태에서, 투여는 피하 투여이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0015] 몇몇 실시양태에서, 본 개시는 대상체에서  $ST2^-$  조절성 T 세포에 비해  $ST2^+$  조절성 T 세포를 선택적으로 활성화하는 방법을 제공하는데, 상기 방법은 치료 유효량의 청구범위 제28항의 약학 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시양태에서, 투여는 정맥내 투여이다. 특정 실시양태에서, 투여는 피하 투여이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 실시양태에서, 치료 유효량은 약 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 약 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이다. 특정 실시양태에서, 투여는 정맥내 투여이다. 특정 실시양태에서, 투여는 피하 투여이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0016] 몇몇 실시양태에서, 본 개시는 a) 면역글로불린 Fc 도메인에 공유적으로 연결된 IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티; 및 b) 면역글로불린 Fc 도메인에 공유적으로 연결된  $ST2$ 에 결합하는 제2 모이어티를 포함하는 화합물을 제공한다.

[0017] 몇몇 실시양태에서, 본 개시는 a) IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티; 및 b)  $ST2$ 에 결합하는 제2 모이어티를 포함하는 화합물을 제공하는데; 이때, IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티는 대상체에서 IL-2 수용체에 결합하는 모이어티의 야생형 IL-2에 대한 안정성을 증가시키는 야생형 IL-2에 대한 돌연변이를 포함한다.

[0018] 몇몇 실시양태에서, 본 개시는 a) IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티; 및 b)  $ST2$ 에 결합하는 제2 모이어티를 포함하는 화합물을 제공하는데; 이때 IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티는 IL2R  $\alpha\beta\gamma$  수용체에 비해 IL2R  $\alpha\beta\gamma$  수용체에 선택적으로 결합한다.

- [0019] 몇몇 실시양태에서, 본 개시는 a) IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티; 및 b) ST2에 결합하는 제2 모이어티를 포함하는 화합물을 제공하는데; 이때, 수용체에 결합하는 제1 모이어티는 야생형 IL-2에 관해 N88R인 치환에서 야생형 IL-2와 상이하다.
- [0020] 본 출원에 기재된 화합물의 몇몇 실시양태에서, 제1 모이어티는 폴리펩티드를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티는 야생형 IL-2와 적어도 90% 동일성을 보유하는 펩티드 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 대상체에서 IL-2 수용체에 결합하는 모이어티의 야생형 IL-2에 관해 안정성을 증가시키는 돌연변이는 야생형 IL-2에 관해 C125S인 치환이다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티는 야생형 IL-2에 관해 T3A인 치환에서 야생형 IL-2와 상이하다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티는 서열번호 1과 적어도 90% 동일성을 보유한다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티는 서열번호 1을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티는 서열번호 1이다.
- [0021] 몇몇 실시양태에서, ST2에 결합하는 제2 모이어티는 폴리펩티드를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, ST2에 결합하는 제2 모이어티는 야생형 IL-33와 적어도 90% 동일성을 보유하는 펩티드 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, ST2에 결합하는 제2 모이어티는 서열번호 10과 적어도 90% 동일성을 보유하는 펩티드 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, ST2에 결합하는 제2 모이어티는 ST2에 대해 유도된 항체, 또는 이의 항원 결합 단편이다. 몇몇 실시양태에서, ST2에 결합하는 제2 모이어티는 서열번호 10을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, ST2에 결합하는 제2 모이어티는 서열번호 10이다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티 및 ST2에 결합하는 제2 모이어티는 공유적으로 연결된다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티 및 ST2에 결합하는 제2 모이어티는 이황화 결합에 의해 공유적으로 연결된다.
- [0022] 본 출원에 기재된 화합물의 몇몇 실시양태에서, 상기 화합물은 2개의 다량체화 모이어티를 추가로 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 제1 다량체화 모이어티는 IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티에 공유적으로 연결되고, 제2 다량체화 모이어티는 ST2에 결합하는 제2 모이어티에 공유적으로 연결된다. 몇몇 실시양태에서, 2개의 다량체화 모이어티는 서로 공유적으로 연결된다. 몇몇 실시양태에서, 2개의 다량체화 모이어티는 폴리펩티드 서열이다. 몇몇 실시양태에서, 2개의 다량체화 모이어티는 면역글로불린 Fc 도메인이다. 몇몇 실시양태에서, 면역글로불린 Fc 도메인은 상응하는 야생형 면역글로불린 Fc 도메인에 비해 효과기 기능이 부족하다. 몇몇 실시양태에서, 면역글로불린 Fc 도메인은 IgG1 면역글로불린 Fc 도메인이다. 몇몇 실시양태에서, IgG1 면역글로불린 Fc 도메인은 야생형 IgG1 면역글로불린 Fc 도메인에 관해 N297A인 치환에서 야생형 IgG1 면역글로불린 Fc 도메인과 상이하다. 몇몇 실시양태에서, 각각의 면역글로불린 Fc 도메인은 서열번호 7을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 각각의 면역글로불린 Fc 도메인은 서열번호 7이다.
- [0023] 본 출원에 기재된 화합물의 몇몇 실시양태에서, 상기 화합물은 IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티에 공유적으로 연결되고 및 제1 다량체화 모이어티에 공유적으로 연결된 링커 펩티드를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 화합물은 ST2에 결합하는 제2 모이어티에 공유적으로 연결되고 및 제2 다량체화 모이어티에 공유적으로 연결된 링커 펩티드를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 화합물은 IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티에 공유적으로 결합되고 및 제1 다량체화 모이어티에 공유적으로 연결된 제1 링커 펩티드, 및 ST2에 결합하는 제2 모이어티에 공유적으로 연결되고 및 제2 다량체화 모이어티에 공유적으로 연결된 제2 링커 펩티드를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티는 제1 링커 펩티드에 대한 N-말단이고, 제1 다량체화 모이어티는 제1 링커 펩티드에 대한 C-말단이고, ST2에 결합하는 제2 모이어티는 제2 링커 펩티드에 대한 N-말단이고, 제2 다량체화 모이어티는 제2 링커 펩티드에 대한 C-말단이다. 몇몇 실시양태에서, 제1 링커 펩티드 및 제2 링커 펩티드는 각각 6개 내지 20개의 아미노산 잔기이다. 몇몇 실시양태에서, 제1 링커 펩티드 및 제2 링커 펩티드는 각각 12개 내지 17개의 아미노산 잔기이다. 몇몇 실시양태에서, 제1 링커 펩티드 및 제2 링커 펩티드는 각각 독립적으로 세린 또는 글리신인 아미노산 잔기의 각각의 서열이다. 몇몇 실시양태에서, 제1 링커 펩티드 및 제2 링커 펩티드는 각각 15개의 아미노산 잔기이다. 몇몇 실시양태에서, 제1 링커 펩티드 및 제2 링커 펩티드는 각각 GGGGSGGGSGGGGS(서열번호 6)이다. 몇몇 실시양태에서, 상기 화합물은 ST2<sup>-</sup> 조절성 T 세포에 비해 ST2<sup>+</sup> 조절성 T 세포를 선택적으로 표적화한다.
- [0024] 특정 관점에서, 본 개시는 병태를 치료하기 위한 방법에 관한 것인데, 상기 방법은 치료 유효량의 청구범위 제1 항 내지 제40항 중 어느 한 항의 화합물을 치료가 필요한 환자에게 투여하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 투여는 대상체에서 ST2<sup>-</sup> 조절성 T 세포 계수에 비해 ST2<sup>+</sup> 조절성 T 세포 계수를 증가시킨다. 몇몇 실시양태에서, 상기 투여는 ST2<sup>-</sup> 조절성 T 세포에 비해 ST2<sup>+</sup> 조절성 T 세포를 선택적으로 표적화한다. 몇몇 실시양태

에서, 치료 유효량은 약 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 약 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이다. 몇몇 실시양태에서, 병태는 염증성 근육병증이다. 몇몇 실시양태에서, 염증성 근육병증은 근이영양증이다. 몇몇 실시양태에서, 염증성 근육병증은 다발성 근염이다. 몇몇 실시양태에서, 염증성 근육병증은 피부근육염이다. 몇몇 실시양태에서, 병태는 지방 조직의 염증성 병태이다. 몇몇 실시양태에서, 지방 조직은 내장 지방 조직이다. 몇몇 실시양태에서, 병태는 대장의 염증성 병태이다. 몇몇 실시양태에서, 병태는 폐의 염증성 병태이다. 몇몇 실시양태에서, 투여는 정맥내 투여이다. 몇몇 실시양태에서, 투여는 피하 투여이다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0025] **참고문헌 인용**

[0026] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은, 각각의 개별적인 간행물, 특허, 또는 특허 출원이 참고로 인용되도록 구체적으로 및 개별적으로 나타내는 바와 같은 정도로 본 출원에 참고로 인용된다.

**도면의 간단한 설명**

[0027] 도 1은 IL-2R  $\alpha\beta\gamma$  및 ST2를 발현하는 세포의 오버랩을 예시하는 다이어그램을 나타낸다.

도 2는 본 개시의 예시적인 화합물의 모식도를 나타낸다.

도 3A는 IL2R-결합 모이어티, ST2-결합 모이어티, 및 그들 사이의 링커를 보유하는 화합물의 모식도이다.

도 3B는 다량체화 모이어티에 공유적으로 연결된 IL2R-결합 모이어티, 다량체화 모이어티에 공유적으로 연결된 ST2-결합 모이어티, 및 다량체화 모이어티 사이의 공유 결합을 보유하는 예시적인 화합물의 모식도를 나타낸다.

도 3C는 다량체화 모이어티에 공유적으로 연결된 IL2R-결합 모이어티, 다량체화 모이어티에 공유적으로 연결된 링커에 공유적으로 연결된 ST2-결합 모이어티, 및 다량체화 모이어티 사이의 공유 결합을 보유하는 예시적인 화합물의 모식도를 나타낸다.

도 3D는 다량체화 모이어티에 공유적으로 연결된 링커에 공유적으로 연결된 IL2R-결합 모이어티, 다량체화 모이어티에 공유적으로 연결된 ST2-결합 모이어티, 및 다량체화 모이어티 사이의 공유 결합을 보유하는 예시적인 화합물의 모식도를 나타낸다.

도 3E는 다량체화 모이어티에 공유적으로 연결된 링커에 공유적으로 연결된 IL2R-결합 모이어티, 다량체화 모이어티에 공유적으로 연결된 링커에 공유적으로 연결된 ST2-결합 모이어티, 및 다량체화 모이어티 사이의 공유 결합을 보유하는 예시적인 화합물의 모식도를 나타낸다.

도 3F는 a) ST2-결합 모이어티에 공유적으로 연결된 다량체화 모이어티에 공유적으로 연결된 IL2R-결합 모이어티, b) IL2R-결합 모이어티에 공유적으로 연결된 다량체화 모이어티에 공유적으로 연결된 ST2-결합 모이어티, 및 c) 다량체화 모이어티 사이의 공유 결합을 보유하는 예시적인 화합물의 모식도를 나타낸다.

도 4A-4J는 IgG1 Fc 영역을 포함하는 이량체 단백질의 모식도를 나타낸다. 이량체 단백질은 IL-33 변이체 (C208S, C227S, C232S, C259S), 또는 IL-33 변이체 및 IL-2 변이체(N88R, C125S)의 다양한 조합을 포함한다.

도 5A-5E는 gG1 Fc 영역을 포함하는 이량체 단백질의 모식도를 나타낸다. 이량체 단백질은 IL-2 변이체(N88R, C125S) 및 ST2에 결합하는 항원 결합 단편(Fab) (Ab2 또는 Ab4)을 포함한다. 각각의 모식도는 2개의 상이한 이량체 단백질을 나타내는데, 하나는 Fab 영역으로서 Ab2를 함유하고, 다른 하나는 Fab 영역으로서 Ab4를 함유한다. 단백질 명칭에서, "N"은 N-말단을 나타내고, "C"는 C-말단을 나타내며, "v"는 변이체를 나타내며, "B"는 2가를 나타내며, 및 "M"은 1가를 나타낸다.

도 6A는 인간 ST2와 IL-2v/IL-33v 이중 특이성 및 1가 IL-33 분자 사이의 결합을 나타내는 비아코어 센서그램을 나타낸다.

도 6B는 마우스 ST2와 IL-2v/IL-33v 이중 특이성 및 1가 IL-33 분자 사이의 결합을 나타내는 비아코어 센서그램을 나타낸다.

도 7은 인간 IL2R 알파와 IL-2v/IL-33v 이중 특이성 및 1가 IL-33 분자 사이의 결합을 나타내는 비아코어 센서그램을 나타낸다.

도 8A는 인간 ST2와 Ab2/IL-2v 이중 특이성 분자 사이의 결합을 나타내는 비아코어 센서그램을 나타낸다.

도 8B는 인간 ST2와 Ab4/IL-2v 이중 특이성 분자 사이의 결합을 나타내는 비아코어 센서그램을 나타낸다.

도 9A는 인간 IL2R 알파와 Ab2/IL-2v 이중 특이성 분자 사이의 결합을 나타내는 비아코어 센서그램을 나타낸다.

도 9B는 인간 IL2R 알파와 Ab4/IL-2v 이중 특이성 분자 사이의 결합을 나타내는 비아코어 센서그램을 나타낸다.

도 10A는 1가 N88R-Fc, 1가 IL-33-Fc, 또는 이중 특이성 IL2vNM-IL33vCM의 일정 범위의 농도로 자극된 마우스 비장 세포 현탁액 내의 ST2+ 조절성 T 세포에서 pSTAT5 활성을 나타낸다.

도 10B는 1가 N88R-Fc, 1가 IL-33-Fc, 또는 이중 특이성 IL2vNM-IL33vCM의 일정 범위의 농도로 자극된 마우스 비장 세포 현탁액 내의 ST2- 조절성 T 세포에서 pSTAT5 활성을 나타낸다.

도 11A 및 도 11B는 IL33-IL2 이중 특이성 단백질 내의 IL-33 모이어티의 생활성을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 조절성 T 세포(Treg)는 CD4+ 통상의 T 세포(Tconv) 및 CD8+ 세포와 같은 다른 면역 세포의 활성을 억제하는 CD4+CD25+ T 세포의 부류이다. Treg은 면역계 항상성의 중심이고, 외래 항원에 대한 면역 반응을 조절한다. Treg은 인터루킨 2(IL-2)에 의해 강력하게 활성화될 수 있지만, IL-2는 다수의 다른 세포 유형을 활성화하기도 하는데, 이는 심각한 독성을 초래할 수 있다. 특이적인 분자 마커의 발현 및 상이한 면역학적 반응에서 그들의 역할에 의해 규정될 수 있는 Treg의 부분집단이 존재하는 것이 명백해지고 있다. 하나의 Treg 부분집단은 ST2+ Treg 부분집단이다. ST2+ Treg에 대해 규정하는 세포 표면 마커는 ST2, 즉 인터루킨 1 수용체-유사 1 단백질(IL1RL1)로도 공지되고, IL-33 수용체의 서브유닛인 시토킨 수용체의 성분이다. IL-33은 "알라민(alarmin)"으로 분류되고, 급성 면역 반응과 관련된 염증성 시토킨이다. ST2+ Treg은 근육, 내장 지방, 대장, 및 폐와 같은 조직에서 발견되고, 면역조절기능 및 조직 수복 기능을 보유한다.
- [0029] 골격근은 보통 T 세포가 없지만, 급성 근 손상 후, 다수의 ST2+ Treg이 다수의 근 조직 내로 신속히 이동한다. 근 조직 내로 이들 Treg의 동원 및 성장 인자 엠펙레굴린(AREG)의 생성은 근 위성 세포의 활성화 및 조직 수복과 관련된다. Treg 결핍은 손상 후 근육 수복을 악화시키고, IL-2-IL-2R 복합체를 이용하는 근육내 Treg의 팽창은 디스트로핀-결핍성 근이영양증의 동물 모델에서 개선된 결과를 유도한다. AREG를 생성하는 상당한 분율의 Treg은 ST2+이다. 또한, ST2+는 인플루엔자 바이러스 감염 후 염증이 생긴 폐 조직과 관련되어 있고, 감염 후 폐 조직 수복과 관련되어 있다. ST2 수용체를 위한 리간드, 즉 IL-33과 함께 ST2+ Treg의 치료는 AREG 생성 및 조직 수복을 증가시킨다. 따라서, ST2+ Treg의 수 및 ST2+ Treg의 활성을 증강시키는 것은 염증성 근육병증, 염증성 근질환과 같은 자가면역 및 염증성 병태를 치료 또는 예방할 수 있고, 손상 또는 스트레스 후 조직 치유를 개선할 수 있다.
- [0030] 예를 들어, ST2+ Treg의 역할은 근육 염증의 동물 모델에서 확립되어 왔다. 이들 동물 모델 중 하나는 야생형 마우스에서의 급성 근 손상[참조: Burzyn et al., 2013, Cell 155(6):1282-1295]이고, 제2 모델은 *mdx* 마우스 근이영양증 모델, 디스트로핀의 유전적 결핍에 의해 야기된 만성 근육 염증 모델이다[참조: *mdx* 마우스; Villalta et al., 2014, Sci Transl Med 5(258): 258ra142]. 또한, ST2+ Treg의 역할은 염증성 장 질환의 마우스 모델에서 확립되어 왔다[참조: Schiering et al., 2014, Nature 513(7519):564-568].
- [0031] 선택적으로 ST2+ Treg 수를 팽창시키고/거나 ST2+ Treg 활성을 증강시킬 수 있는 화합물 및 방법을 제공함으로써, 본 개시는 염증성 및 퇴행성 질환의 신규한 치료를 가능하게 한다. 예를 들어, 본 개시는 IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티(IL-2R 또는 IL2R) 및 ST2에 결합하는 제2 모이어티를 가진 화합물을 제공한다. IL-2R는 T 세포, NK 세포, 호산구, 및 단핵구를 포함하는, 여러 가지 상이한 면역 세포 유형에서 발현된 이중삼량체성 단백질이다. 이러한 광범위한 발현 패턴은 면역계에 대한 다면발현성 효과 및 IL-2 치료의 높은 전신 독성을 제공하고, IL-2R+ 세포 첼린징을 가능하게 할 수 있다.
- [0032] IL2R는 3가지 상이한 IL-2R 단백질, 즉  $\alpha$ (알파),  $\beta$ (베타), 및  $\gamma$ (감마)의 상이한 조합에 의해 생성된 3가지 형태를 보유한다. 이들 수용체 사슬은 어셈블링되어 3가지 상이한 수용체 형태를 생성한다: 신호를 전달하지 않는 저 친화성 수용체, 즉 IL2R $\alpha$ ; (2) CD4+ 통상의 T 세포(Tconv), NK 세포, 호산구, 및 단핵구에서 광범위하게 발현되는, IL2R $\alpha\beta$  및 IL2R $\alpha\beta\gamma$ 로 구성되는 중간 정도의 친화성 수용체(IL2R $\alpha\beta\gamma$ ); 및 (3) 활성화된 T 세포에서 일시적으로 발현되고 및 Treg 세포에서 구성적으로 발현되는, IL2R $\alpha$ , IL2R $\beta$ , 및 IL2R $\gamma$ 로 구성되는 고 친화성 수용체(IL2R $\alpha\beta\gamma$ ). 통상의 T 세포(Tconv)는 항원에 의해 활성화된 것이고, 면역 공격에 참여한다. 통상의 T 세포는 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 및 기억 T 세포를 포함한다. IL-2내의 돌연변이는 상이한 IL-2R 수용체 형태에 대한 IL-2의 결합 친화성을 변경시킬 수 있다. 따라서, 본 개시는 고 친화성 수용체(IL2R $\alpha\beta\gamma$ )에 선택적으로 결합하는 모이어티를 포함함으로써 Treg, 예를 들어 ST2+ Treg을 선택적으로 활성화하고 및 팽창시

키는 화합물을 제공한다. 예시적인 모이어티는, IL-2 변이체가 중간 정도의 친화성 수용체 및 저 친화성 수용체에 비해 고 친화성 수용체(IL2R $\alpha\beta\gamma$ )에 선택적으로 결합하도록 야생형 IL-2에 대한 결합을 변경시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 IL-2 변이체를 포함하는데, 이로 제한되지 않는다.

[0033] 본 개시의 방법 및 조성물은 IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티 및 ST2에 결합하는 제2 모이어티를 포함하는 화합물에 관한 것인데, 제2 모이어티는 상기 화합물이 ST2+ Treg을 활성화하고 팽창시킬 수 있는 그의 능력을 훨씬 더 선택적이고 강력하게 할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이들 화합물은 IL-2 수용체 또는 이의 특이적인 동형체, 및 ST2를 발현하는 세포를 표적화한다. 예를 들어, IL2R $\beta\gamma$  동형체에 특이적으로 결합하는 화합물은 ST2를 발현하는 Treg 세포에 결합할 수 있다. 도 1은 Treg의 혼잡된 집단 내에서 IL-2R $\alpha\beta\gamma$  및 ST2의 발현 도메인 및 본 개시의 화합물이 결합할 수 있는 중첩 면적의 예를 나타낸다. 몇몇 실시양태에서, 제1 및 제2 모이어티는 예를 들어, 면역글로불린 Fc 도메인에 의해 공유적으로 연결되어 있다. 몇몇 실시양태에서, 또한, 상기 화합물은 IL-2 수용체-결합 모이어티 및 면역글로불린 Fc 도메인을 연결하는 링커 및/또는 ST2-결합 모이어티 및 면역글로불린 Fc 도메인을 연결하는 링커를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 상기 화합물은 면역을 담당하는 백혈구(white blood cell), 예를 들어 백혈구(leukocyte) 또는 림프구의 활성을 조절할 수 있다. 면역글로불린 Fc 도메인은 상기 분자의 생체내 활성을 증가시킬 수 있고, 링커는 모이어티와 Fc 도메인을 공유적으로 연결할 수 있다. IL2 수용체 및 ST2에 결합하는 모이어티를 제공함으로써, 본 출원에 기재된 화합물은 IL2 수용체 및 ST2 둘 다를 발현하는 세포(예를 들어, T 조절성 세포)를 표적화할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, Fc 도메인은 그의 효과기 기능이 결핍되어 있다. 예시적인 화합물은 IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티 및 ST2에 결합하는 제2 모이어티를 포함하는데, 이때 IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티는 링커에 의해 제1 효과기-결핍 Fc 도메인에 공유적으로 연결되고, ST2에 결합하는 제2 모이어티는 링커에 의해 제2 효과기-결핍 Fc 도메인에 공유적으로 연결되는데, 이때 제1 효과기-결핍 Fc 도메인 및 제2 효과기-결핍 Fc 도메인은 이항화 결합에 의해 공유적으로 연결된다. 그러한 화합물의 예는 도 2에 나타낸다. 추가의 예시적인 화합물은 도 3A-3E에 나타내는데, 이들은 링커 및 다량체화 도메인(예를 들어, Fc 도메인일 수 있음)과의 다양한 조합으로 ST2-결합 및 IL2R-결합 모이어티를 포함하는 화합물을 나타낸다. 그러한 화합물의 다른 예는 도 3F에 나타내는데, 이때 IL2 모이어티 및 ST2-결합 모이어티는 각각 IgG Fc 단백질의 N-말단 및 C-말단에 존재한다. 그러한 단백질은 역 배향될 수 있는데, 이때 ST2-결합 모이어티는 N-말단에 존재하고, IL2 모이어티는 C-말단에 존재하며, 및 ST-2 결합 모이어티 및 그들 각각의 Fc 도메인 중 하나 또는 둘 다 사이에, 또는 IL2R 결합 모이어티 및 그들 각각의 Fc 도메인 중 하나 또는 둘 다 사이에 펩티드 링커를 포함할 수 있다. 병태, 예를 들어 염증성 근육병증과 같은 염증성 병태를 치료하기 위한 방법은 치료 유효량의, 본 출원에 기재된 바와 같은 화합물을 치료에 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 예시적인 병태는 근이영양증 및 피부근육염을 포함하나, 이로 제한되지 않는다.

[0034] IL-2 수용체에 결합하는 모이어티

[0035] 상기한 바와 같이, 본 개시는 IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티 및 ST2에 결합하는 제2 모이어티를 포함하는 화합물을 제공한다. IL-2 수용체에 결합하는 모이어티는 전장, 더 짧거나 또는 더 긴 야생형 IL-2를 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. IL-2 수용체-결합 모이어티는 서열번호 2에 도시한 바와 같은 야생형 IL-2 서열 또는 IL-2의 변이체를 보유할 수 있다:

(APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKA TELKHLQCLEE  
ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINIVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFX  
QSIISTLT)

[0036]

[0037] IL-2 변이체는 야생형 IL-2 아미노산 서열에서 벗어나는 하나 이상의 치환, 결실, 또는 삽입을 함유할 수 있다. 잔기는 IL-2 아미노산 위치가 동반되는 1문자 아미노산 코드에 의해 본 출원에 지정되는데, 예를 들어 K35는 야생형 IL-2 서열의 위치 35에서의 라이신 잔기이다. 치환은 치환하는 1문자 아미노산 코드가 동반되는 IL-2 아미노산 위치가 동반되는 1문자 아미노산 코드에 의해 본 출원에서 지정되는데, 예를 들어 K35A는 서열번호 2의 위치 35에서의 라이신 잔기가 알라닌 잔기로 치환된 것이다.

[0038] 본 출원의 화합물은 야생형 IL-2의 특이성과 유사하거나 또는 유사하지 않은 상이한 IL-2 수용체에 대해 특이성을 나타낼 수 있다. 본 출원의 화합물은 야생형 IL-2와 비교하여 증가된 안정성 또는 생물학적 효과를 나타낼 수 있다. 예를 들어, 돌연변이는 야생형 IL-2와 비교하여 특정 IL-2 수용체에 대해 증가된 특이성을 갖는 화합물을 제공할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 화합물은 예를 들어, 그의 IL-2 결합 모이어티를 통해 IL2R $\beta\gamma$  수용체에 비해 IL2R $\alpha\beta\gamma$  수용체에 특이적으로 결합한다. 몇몇 실시양태에서, 그러한 특이적인 결합은 야생형 IL-2 서열에 비해 IL-2 서열 내의 하나 이상의 돌연변이에 기인한다. 예를 들어, IL-2 N88R은 IL2R $\beta\gamma$  수용체에 비

해 IL2R α β γ 수용체에 대한 결합에 대해 특이적이다. IL-2는 야생형 IL-2와 같이 효과적으로 IL2R α β γ 발현 PHA-활성화된 T 세포의 증식을 자극할 수 있는 반면, IL2R β γ 발현 NK 세포의 증식의 3000배 감소된 자극을 나타낸다. IL2R α β γ 에 대해 증가된 특이성을 나타내는 다른 돌연변이는 치환 D20H, N88I, N88G, Q126L, 및 Q126F을 포함한다.

[0039] 몇몇 실시양태에서, IL-2 수용체-결합 모이어티는 본 개시의 화합물의 안정성을 증강시키는 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, IL-2 C125S돌연변이는 쌍을 이루지 않은 시스테인 잔기의 제거에 의해 안정성을 촉진시킴으로써 IL-2 폴리펩티드의 잘못접힘(misfolding)을 예방한다. 미스폴딩은 단백질 응집을 유도하여 생체 내에서 폴리펩티드의 클리어언스를 증가시킬 수 있다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 폴리펩티드는 글리코실화 부위를 생성하거나 또는 제거하는 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, IL-2 돌연변이 T3A는 O-연결된 글리코실화 부위를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 또한 Y3A 돌연변이를 갖는 IL-2 변이체는 N88R 돌연변이 및/또는 C125S 돌연변이를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 변이체는 서열번호 3에서와 같이 T3A, N88R, 및 C125S 돌연변이를 포함한다.

[0040] 몇몇 실시양태에서, 치환은 위치 3, 20, 88, 125, 및 126 중 하나 이상에서 발생한다. 몇몇 실시양태에서, 치환은 상기 위치 중 1개, 2개, 3개, 4개, 또는 5개에서 발생한다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 변이체는 위치 88 및 125에서 돌연변이, 예를 들어, N88R 및 C125S를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 수용체-결합 모이어티는 서열번호 1에 나타낸 아미노산 서열을 포함한다:

APTSSSTKKTQLQLEHLLDLDQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELKHLCLEEE  
LKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINIVVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFSQ  
SIISTLT

[0041]

[0042] 몇몇 실시양태에서, IL-2 변이체는 서열번호 3에 나타낸 바와 같이 위치 3, 88 및 125에서 돌연변이, 예를 들어, T3A, N88R 및 C125S를 포함한다:

APASSSTKKTQLQLEHLLDLDQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKGYMPKKATELKHLCLEEE  
ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISRINIVVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFS  
QSIISTLT

[0043]

[0044] 몇몇 실시양태에서, IL-2 변이체는 야생형 IL-2 서열과 비교하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 돌연변이(예를 들어, 치환)를 포함한다.

[0045] 본 출원의 화합물은 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 변이체를 포함한다. 본 출원의 화합물은 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 60%-99% 동일한 아미노산 서열, 예를 들어, 야생형 IL-2 아미노산 서열과 80%-99% 동일한 아미노산 서열, 야생형 IL-2 아미노산 서열과 85%-99% 동일한 아미노산 서열, 야생형 IL-2 아미노산 서열과 90%-99% 동일한 아미노산 서열, 또는 야생형 IL-2 아미노산 서열과 95%-99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 변이체를 포함한다. 본 출원의 화합물은 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 N88R 돌연변이를 보유하는 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 변이체를 포함한다. 본 출원의 화합물은 야생형 IL-2 아미노산 서열과 60%-99% 동일한 N88R 돌연변이를 보유하는 아미노산 서열, 예를 들어, 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 80%-99% 동일한 아미노산 서열, 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 85%-99% 동일한 아미노산 서열, 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 90%-99% 동일한 아미노산 서열, 또는 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 95%-99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 변이체를 포함한다.

[0046] 또한, 실시양태는 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도

72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 N88R 및 C125S 돌연변이를 보유하는 아미노산을 포함하고, Treg 세포를 선택적으로 자극하는 IL-2 변이체를 포함한다. 본 출원의 화합물은 야생형 IL-2 아미노산 서열과 60%-99% 동일한 N88R 및 C125S 돌연변이를 보유하는 아미노산 서열, 예를 들어, 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 80%-99% 동일한 아미노산 서열, 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 85%-99% 동일한 아미노산 서열, 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 90%-99% 동일한 아미노산 서열, 또는 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 95%-99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 IL-2 변이체를 포함한다.

[0047] 또한, 화합물은 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)에 대해 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 아미노산 서열을 포함하고, Treg 세포를 선택적으로 자극하는 IL-2 변이체를 포함한다. 또한, 화합물은 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 60%-99% 동일한 아미노산 서열, 예를 들어, 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 80%-99% 동일한 아미노산 서열, 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 85%-99% 동일한 아미노산 서열, 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 90%-99% 동일한 아미노산 서열, 또는 야생형 IL-2 아미노산 서열(서열번호 2)과 95%-99% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, Treg 세포를 선택적으로 자극하는 IL-2 변이체를 포함한다.

[0048] 여러 가지 방법 및 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 NCBI BLAST, Clustal W, MAFFT, Clustal Omega, AlignMe, Praline, 또는 다른 적합한 방법 또는 알고리즘이 2개 이상의 펩티드 또는 핵산 사이의 상동성을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 동일성 퍼센트는 하기 파라미터에 기초한 FastDB에 의해 계산된다: 1의 미스매치 패널티; 1의 갭 패널티; 0.33의 갭 크기 패널티; 및 30의 연결 패널티.

[0049] 유용한 알고리즘의 예는 PILEUP이다. PILEUP는 점진적인 쌍으로 정렬(progressive, pairwise alignment)을 이용하여 일군의 관련된 서열로부터 다수의 서열 정렬을 생성한다. 또한, 상기 알고리즘은 정렬을 생성하기 위해 사용된 클러스터링 관계를 나타내는 트리를 플롯할 수 있다. PILEUP의 비제한적인 예는 3.00의 디폴트 갭 중량, 0.10의 디폴트 갭 길이 중량, 및 가중된 엔드 갭을 포함한다.

[0050] 유용한 알고리즘의 다른 예는 BLAST 알고리즘이다. BLAST 프로그램의 비제한적인 예는 WU-BLAST-2 프로그램이다. WU-BLAST-2는 대부분 설정된 검색 파라미터, 예를 들어 디폴트 값을 사용한다. 조정 가능한 파라미터는 예를 들어 하기 값으로 설정된다: 오버랩 스캔=1, 오버랩 프랙션=0.125, 워드 역치(T)=11. HSP S 및 HSP S2 파라미터는 동적 값이고, 관심 있는 서열이 조사되는 특정 서열의 조성 및 특정 데이터베이스의 조성에 기초하여 프로그램 그 자체에 의해 확립된다. 상기 값들은 감도를 증가시키기 위해 조정될 수 있다.

[0051] 추가의 유용한 알고리즘은 갭트(gapped) BLAST이다. 갭트 BLAST는 BLOSUM-62 치환 스코어; 9로 설정된 역치 T 파라미터; 언갭트 연장을 촉발하는 투-히트(two-hit) 방법, 10+k의 코스트 당 k의 차지 갭 길이; 16을 설정된 Xu, 및 알고리즘의 데이터베이스 검색 단계에 대해 40 및 아웃풋 단계에 대해 67로 설정된 Xg를 이용한다. 갭트 정렬은 예를 들어 약 22 비트에 상응하는 스코어에 의해 촉발된다.

[0052] 추가의 유용한 도구는 클러스탈(Clustal), 즉 다수의 서열 정렬을 위해 통상적으로 사용되는 일련의 컴퓨터 프로그램이다. 클러스탈의 최근 버전은 ClustalW, ClustalX 및 Clustal Omega를 포함한다. 클러스탈 방법을 이용하여 쌍으로 정렬하고, 단백질 서열의 동일성 퍼센트의 계산하기 위한 디폴트 파라미터는 KTUPLE=1, GAP PENALTY=3, WINDOW=5 및 DIAGONALS SAVED=5이다. 핵산의 경우, 이들 파라미터는 KTUPLE=2, GAP PENALTY=5, WINDOW=4 및 DIAGONALS SAVED=4이다.

[0053] 돌연변이는 선택된 부위에 또는 무작위로 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 타겟 코돈 또는 영역에서 무작위 돌연변이 유발은 활성에 대해 스크리닝될 돌연변이체를 제공할 수 있다. 공지된 서열을 보유하는 DNA 내의 미리 결정된 부위에서 치환 돌연변이를 생성하기 위한 기법은 예를 들어, M13 프라이머 돌연변이 유발 및 PCR 돌연변이 유발을 포함한다. 돌연변이체의 스크리닝은, 예를 들어 본 출원에 기재된 분석법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0054] 아미노산 치환은 단일 또는 다수의 잔기의 치환일 수 있다. 삽입은, 예를 들어 약 1개 내지 약 20개의 아미노산

잔기, 또는 그 초과일 수 있다. 결실은, 예를 들어, 약 1개 내지 약 20개의 아미노산 잔기, 또는 그 초과일 수 있다. 치환, 결실, 삽입, 또는 이의 임의의 조합은 샘플 화합물에서 발생할 수 있다.

[0055] ST2에 결합하는 모이어티

[0056] ST2(인터루킨 1 수용체-유사 1)는 막 결합된 시토킨 수용체이고, IL-1 수용체 패밀리의 멤버이다. 인간 ST2는 3개의 Ig-유사 도메인을 갖는 310개 아미노산(aa)의 세포외 도메인(ECD), 21개 aa의 경막 세그먼트, 및 내세포성 TIR 도메인을 갖는 207개 aa의 세포질 도메인으로 구성된다(참조: Tominaga, S. et al., 1992, Biochim. Biophys. Acta 1171:215; 및 Li, H. et al., 2000, Genomics 67:284.). ST2는 IL-33에 결합하고, IL-1 수용체 보조 단백질(1RAcP)과 이종이량체화한다. 몇몇 실시양태에서, 본 개시의 화합물은 ST2에 결합하는 결합 모이어티를 포함한다. ST2에 결합하는 모이어티는 야생형 IL-33의 전장, 더 짧거나, 또는 더 긴 서열을 포함하는 폴리펩티드일 수 있다. ST2-결합 모이어티는 서열번호 10

[0057] (SITGISPITEYLASLSTYNDQSITFALEDESYEIYVEDLKKDEKKDKVLLSYYESQHPSNESGD  
GV D G K M L M V T L S P T K D F W L H A N N K E H S V E L H K C E K P L P D Q A F F V L H N M H S N C V S F E C K T  
D P G V F I G V K D N H L A L I K V D S S E N L C T E N I L F K L S E T)

[0058] 에 나타낸 바와 같은 야생형 IL-33 서열을 포함할 수 있거나, 또는 이는 IL-33의 변이체일 수 있다. IL-33 변이체는 야생형 IL-33 아미노산 서열과는 다른 하나 이상의 치환, 결실, 또는 삽입을 함유할 수 있다. 본 출원에서 잔기는 IL-33 아미노산 위치를 동반하는 1문자 아미노산 코드에 의해 지정된다. 본 출원에서 치환은 치환하는 1문자 아미노산 코드를 동반하는 IL-33 아미노산 위치가 동반되는 1문자 아미노산 코드에 의해 지정된다. 몇몇 실시양태에서, IL-33 서열은 인간 IL-33 서열, 예를 들어 야생형 서열의 잔기 112-170이다.

[0059] 본 출원의 화합물은 ST2에 대한 또는 ST2-1RAcP 수용체 복합체에 대한 친화성을 증가시키거나 또는 감소시킬 수 있다. 몇몇 화합물은 ST2에 대한 증강된 친화성을 보유할 수 있다. 다른 화합물은 1RAcP에 대한 감소된 친화성을 보유할 수 있는데, 이는 IL-33 수용체를 활성화할 수 있는 감소된 능력을 유도한다. 본 출원의 화합물은 야생형 IL-33과 비교하여 증가된 안정성 또는 생물학적 효과를 나타낼 수 있다.

[0060] IL-33 변이체는 IL-33 수용체 서브유닛 ST2 또는 IL1RAcP에 대한 변경된 친화성을 갖도록 생성될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, IL-33 아미노산 서열은 야생형 IL-33 서열에 비해 하기 위치 중 하나 이상에서 돌연변이될 수 있다: E119, Y122, D131, E144, Y146, D149, Y163, H246, N222 및 N226. 몇몇 실시양태에서, 그들 중 하나 이상에서 아미노산 치환은 ST2에 대한 IL-33의 친화성을 조절한다. 몇몇 실시양태에서, IL-33 아미노산 서열은 IL1RAcP와의 접촉을 변경하기 위해 돌연변이될 수 있다: H168, N171, E200, H201, H224, D244, K251 및 E261 (모두 야생형 IL-33 서열에 대한 것임). 몇몇 실시양태에서, 그들 중 하나에서의 아미노산 치환은 IL1RAcP에 대한 IL-33의 친화성을 조절할 수 있고, 따라서 상기 수용체를 활성화할 수 있는 능력을 조절한다.

[0061] 몇몇 실시양태에서, ST2-결합 모이어티는, 예를 들어 야생형 IL-33 아미노산 서열(서열번호 10)과 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 IL-33의 변이체를 포함한다. 본 출원의 화합물은 야생형 IL-33 아미노산 서열(서열번호 10)과 60%-99% 동일한 아미노산 서열, 예를 들어, 야생형 IL-33 아미노산 서열(서열번호 10)과 80%-99% 동일한 아미노산 서열, 야생형 IL-33 아미노산 서열(서열번호 10)과 85%-99% 동일한 아미노산 서열, 야생형 IL-33 아미노산 서열(서열번호 10)과 90%-99% 동일한 아미노산 서열, 야생형 IL-33 아미노산 서열(서열번호 10)과 95%-99% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 IL-33 변이체를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, ST2-결합 모이어티는 야생형 IL-33 아미노산 서열(서열번호 10)과 100% 동일하다.

[0062] ST2-결합 리간드는 ST2에 대한 결합 친화성을 가진 항체 및 항원-결합 항체 단편을 포함할 수 있다. 본 출원에 사용된 바와 같이, "항체"는 특이적인 타겟 항원, 예를 들어 ST2에 결합하는 적어도 하나의 상보성 결정 영역을 포함하는 단백질이다. 항체는 종종 적어도 하나의 면역글로불린 가변부, 예를 들어 면역글로불린 가변 도메인을 제공하는 아미노산 서열 또는 면역글로불린 가변 도메인 서열을 포함한다. 예를 들어, 항체는 중(H)쇄 가변부(본 출원에서 VH로 약칭함), 및 경(L)쇄 가변부(본 출원에서 VL로 약칭함)를 포함할 수 있다. 다른 예에서, 항체는 2개의 중(H)가변부 및 2개의 경(L)쇄 가변부를 포함할 수 있다. 면역글로불린의 경쇄는 카파 타입 또는 람다 타입일 수 있다. 예를 들어, 항체는 모노클로날 항체, 변경된 항체, 키메라 항체, 재성형 항체, 또는 인간

화 항체일 수 있다. 본 출원에 사용된 바와 같이, 용어 "모노클로날 항체"는 특정 에피토프와 면역반응할 수 있는 단지 한 종의 항원 결합 부위를 함유하는 항체 분자의 집단을 의미한다. 항체는 시판되는 공급원으로부터 얻을 수 있거나, 또는 공지된 방법을 이용하여 제조될 수 있다. 항체는 임의의 면역글로불린 타입, 예를 들어, IgG, IgM, IgY, IgA1, IgA2, IgD, 또는 IgE일 수 있다. 한 실시양태에서, 항체는 인간 항체일 수 있다.

[0063] 본 발명에 사용하기에 적합한 항원-결합 항체 단편은 Fab 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, Fd 단편, Fv 단편, dAb 단편, 단일 사슬 Fv, 이량체화된 가변부(V 영역) 단편(디아바디), 이항화-안정화된 V 영역 단편(dsFv), 아피바디, 항체 모방체, 및 페이로드에 대한 특이적인 결합을 보유하는 하나 이상의 단리된 상보성 결정 영역(CDR), 예를 들어 ST2를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 본 출원에서 사용된 바와 같이, "단리된" CDR은 자연 발생하는 항체의 맥락에서는 아닌 CDR이다.

[0064] 폴리클로날 항체는 면역원으로서의 본 발명의 단백질로 적합한 대상체를 면역화함으로써 제조될 수 있다. 면역화된 대상체에서의 항체 역가는 고정화된 폴리펩티드를 이용하는 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA)을 이용하는 것과 같은 표준 기법에 의해 경시적으로 모니터링될 수 있다. 면역화 후 적절한시간에, 예를 들어 특이적인 항체 역가가 가장 높을 때, 항체-생성 세포는 대상체로부터 얻을 수 있고, 문헌[참조: Kohler 및 Milstein (1975) *Nature* 256:495-497]에 최초로 기재된 하이브리도마 기법, 인간 B 세포 하이브리도마 기법[참조: Kozbor *et al.*, 1983, *Immunol. Today* 4:72], EBV-하이브리도마 기법[참조: Cole *et al.*, pp. 77-96 In *Monoclonal Antibody and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 1985] 또는 트리오마 기법과 같은 표준 기법에 의해 모노클로날 항체(mAb)를 제조하기 위해 사용될 수 있다. 하이브리도마를 제조하기 위한 기법은 잘 공지되어 있다(참조: 일반적으로 *Current Protocols in Immunology*, Coligan *et al.* ed., John Wiley & Sons, New York, 1994). 본 발명의 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마 세포는, 예를 들어 표준 ELISA 분석법을 이용하여 관심 있는 폴리펩티드(즉, ST2)에 결합하는 항체에 대해 하이브리도마 배양 상등액을 스크리닝함으로써 검출된다.

[0065] 모노클로날 항체-분비 하이브리도마를 제조하는 대안적인 방법으로, ST2에 대해 유도된 모노클로날 항체는 관심 있는 폴리펩티드를 이용하여 재조합 조합 면역글로불린 라이브러리(예를 들어, 항체 파지 디스플레이 라이브러리)를 스크리닝함으로써 동정 및 단리될 수 있다. 파지 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하기 위한 키트는 시판된다(예를 들어, 파마시아 재조합 파지 항체 시스템, 카탈로그 번호 27-9400-01; 및 스트라타진 *SurfZAP 파지 디스플레이 키트*, 카탈로그 번호 240612). 추가로, 항체 디스플레이 라이브러리를 생성하고 스크리닝하기 위해 특히 사용할 수 있는 방법 및 시약의 예는, 예를 들어 미국 특허 5,223,409; PCT 공개 WO 92/18619; PCT 공개 WO 91/17271; PCT 공개 WO 92/20791; PCT 공개 WO 92/15679; PCT 공개 WO 93/01288; PCT 공개 WO 92/01047; PCT 공개 WO 92/09690; PCT 공개 WO 90/02809; Fuchs *et al.* (1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay *et al.* (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85; Huse *et al.* (1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths *et al.* (1993) *EMBO J.* 12:725-734에서 확인할 수 있다.

[0066] 또한, ST2에 특이적으로 결합하는 재조합 항체도 제조할 수 있다. 재조합 항체는 인간 및 비인간 부분을 둘 다 포함하는 키메라 및 인간화 모노클로날 항체, 단일 사슬 항체 및 다중 특이성 항체를 포함하나, 이들로 제한되지 않는다. 키메라 항체는 상이한 부분이 상이한 동물 종으로부터 유도되는 분자인데, 예를 들어 뮤린 mAb로부터 유도된 가변부 및 인간 면역글로불린 불변부를 포함하는 것이다(참조: 예를 들어, Cabilly *et al.*, 미국 특허 4,816,567; 및 Boss *et al.*, 미국 특허 4,816,397, 본 출원에 그 전체 내용이 참고로 인용됨). 단일 사슬 항체는 항원 결합 부위를 보유하고, 단일 폴리펩티드로 구성된다. 이들은 당해 기술분야에 공지된 기법, 예를 들어 Ladner *et al.* 미국 특허 4,946,778(본 출원에 그 전체 내용이 참고로 인용됨); Bird *et al.*, (1988) *Science* 242:423-426; Whitlow *et al.*, (1991) *Methods in Enzymology* 2:1-9; Whitlow *et al.*, (1991) *Methods in Enzymology* 2:97-105; 및 Huston *et al.*, (1991) *Methods in Enzymology Molecular Design 및 Modeling: Concepts 및 Applications* 203:46-88에 의해 제조될 수 있다.

[0067] 인간화 항체는 비인간 종 유래의 하나 이상의 상보성 결정 영역(CDR) 및 인간 면역글로불린 분자 유래의 프레임워크 영역을 보유하는 비인간 종 유래의 항체 분자이다(참조: 예를 들어, Queen, 미국 특허 5,585,089, 본 출원에 그 전체 내용이 참고로 인용됨). 인간화 모노클로날 항체는 당해 기술분야에 공지된 재조합 DNA 기법, 예를 들어 PCT 공개 WO 87/02671; 유럽 특허 출원 184,187; 유럽 특허 출원 171,496; 유럽 특허 출원 173,494; PCT 공개 WO 86/01533; 미국 특허 4,816,567; 유럽 특허 출원 125,023; Better *et al.* (1988) *Science* 240:1041-1043; Liu *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:3521- 3526; Sun *et al.* (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura *et al.* (1987) *Cancer Res.* 47:999-1005; Wood *et al.* (1985) *Nature* 314:446-449; 및 Shaw *et al.* (1988) *J. Natl. Cancer*

*Inst.* 80:1553-1559); Morrison (1985) *Science* 229:1202-1207; Oi *et al.* (1986) *Bio/Techniques* 4:214; 미국 특허 5,225,539; Jones *et al.* (1986) *Nature* 321:552-525; Verhoeyan *et al.* (1988) *Science* 239:1534; 및 Beidler *et al.* (1988) *J. Immunol.* 141:4053-4060에 기재된 방법을 이용하여 제조될 수 있다.

[0068] 더 구체적으로 인간화 항체는, 예를 들어 내인성 면역글로블린 중쇄 및 경쇄 유전자를 발현할 수 없지만, 인간 중쇄 및 경쇄 유전자를 발현할 수 있는 트랜스제닉 마우스를 이용하여 생성될 수 있다. 트랜스제닉 마우스는 선택된 항원, 예를 들어 ST2를 이용하여 보통의 방식으로 면역화된다. 상기 항원에 대해 유도된 모노클로날 항체는 통상적인 하이브리도마 기술을 이용하여 얻을 수 있다. 트랜스제닉 마우스가 보유하는 인간 면역글로블린 트랜스유전자는 B 세포 분화 중에 재배열되고, 후속적으로 형체 종류 변환 및 체세포 돌연변이를 수행한다. 따라서, 그러한 기법을 이용하여 IgG, IgA 및 IgE 항체를 제조할 수 있다. 인간 항체를 제조하기 위한 이러한 기술의 개요는 문헌[참조: Lonberg 및 Huszar (1995) *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93]을 참조할 수 있다. 인간 항체 및 인간 모노클로날 항체를 제조하기 위한 그러한 기술에 대한 상세한 논의 및 그러한 항체를 제조하기 위한 프로토콜은, 예를 들어 미국 특허 5,625,126; 미국 특허 5,633,425; 미국 특허 5,569,825; 미국 특허 5,661,016; 및 미국 특허 5,545,806를 참조할 수 있다. 또한, 기업들은 상기한 것과 유사한 기술을 이용하여 선택된 항원 (예를 들어, ST2)에 대해 유도된 인간 항체를 제공할 수 있다.

[0069] ST2를 인식하는 완전한 인간 항체는 "유도된 선택(guided selection)"으로 언급되는 기법을 이용하여 생성될 수 있다. 이러한 기법에서, 선택된 비인간 모노클로날 항체, 예를 들어, 뮤린 항체는 동일한 에피토프를 인식하는 완전한 인간 항체의 선택을 유도하기 위해 사용된다(Jespers *et al.*, 1994, *Bio/technology* 12:899-903).

[0070] ST2 항체는 생성(예를 들어, 대상체의 혈액 또는 혈청으로부터) 또는 합성 후 단리될 수 있고, 잘 공지된 기법에 의해 추가로 정제될 수 있다. 예를 들어, IgG 항체는 단백질 A 크로마토그래피를 이용하여 정제될 수 있다. ST2에 특이적인 항체는 선택될 수 있거나, 또는 예를 들어 친화성 크로마토그래피에 의해 (예를 들어, 부분적으로 정제되거나) 또는 정제된다. 예를 들어, 재조합적으로 발현된 및 정제된 (또는 부분적으로 정제된) ST2 단백질이 생성되고, 예를 들어 크로마토그래피 칼럼과 같은 고정 지지체에 공유적으로 또는 비공유적으로 커플링된다. 이어서, 칼럼은 다수의 상이한 에피토프에 대해 유도된 항체를 함유하는 샘플로부터 ST2에 특이적인 항체를 친화성 정제하는데 사용됨으로써 실질적으로 정제된 항체 조성물, 즉 오염 항체가 실질적으로 없는 항체 조성물을 생성할 수 있다.

[0071] ST2에 결합하는 항체는 당해 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, US2017/0002079는 XENO마우스® 기술 (미국 특허 6,114,598; 6,162,963; 6,833,268; 7,049,426; 7,064,244, 본 출원에 전체 내용이 참고로 인용됨; Green *et al.*, 1994, *Nature Genetics* 7:13-21; Mendez *et al.*, 1997, *Nature Genetics* 15:146-156; Green 및 Jakobovitis, 1998, *J. Ex. Med.* 188:483-495, Kellermann 및 Green, 2002, *Current Opinion in Biotechnology*, 13:593-597)을 이용하여 제조된 인간 ST2에 대해 유도된 한 범위의 ST2-결합 항체(예를 들어 Ab1, Ab2, Ab3, Ab4 및 Ab12-Ab36)를 기재한다. 참조: 특허, 본 출원에 전체 내용이 참고로 인용된 US2017/0002079의 실시예 2. 또한, 인간 ST2에 대해 유도된 항-ST2 항체는 W02012/113813(예를 들어, 모노클로날 항체 ra170) 및 미국 특허 7087396 (예를 들어, 모노클로날 항체 2A5, FB9 및 HB12)에 기재되어 있는데, 이들 문헌은 전체 내용이 본 출원에 참고로 인용된다. 예를 들어, 미국 특허 7087396은 실시예 1에 인간 ST2에 대해 유도된 모노클로날 항체의 제조를 기재한다. 또한, ST2-결합 항체는 시판된다(예를 들어, R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, Cat. Nos. MAB523 및 AF523). MAB523는 인간 ST2를 검출하는 모노클로날 마우스 IgG1 항체이다. AF523는 인간 ST2를 검출하는 항원 친화성-정제된 폴리클로날 염소 IgG1이다.

[0072] IL-2R-결합 모이어티 및 ST2-결합 모이어티 사이의 연결

[0073] IL-2R 및 ST2 결합 모이어티는 연결된다. IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티 및 ST2에 결합하는 제2 모이어티는 공유적으로 또는 비공유적으로 연결된다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티 및 ST2에 결합하는 제2 모이어티는 공유적으로 연결된다. 예를 들어, IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티 및 ST2에 결합하는 제2 모이어티는 황화 결합 또는 이황화 결합에 의해 공유적으로 연결될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티 및 ST2에 결합하는 제2 모이어티를 포함하는 화합물은 다량체화 모이어티 또는 2개의 다량체화 모이어티, 예를 들어, Fc 도메인을 포함한다. 예를 들어, 제1 다량체화 모이어티는 IL-2 수용체에 결합하는 제1 모이어티에 공유적으로 연결될 수 있고, 제2 다량체화 모이어티는 ST2에 결합하는 제2 모이어티에 공유적으로 연결될 수 있다. 또한, 2개의 다량체화 모이어티는 서로 공유적으로 연결될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 2개의 다량체화 모이어티는 폴리펩티드 서열이다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 이황화 결합은 IL-2R-결합 모이어티에 공유적으로 연결된 제1 Fc 도메인과 ST2-결합 모이어티에 공유적으로 연결

된 제2 Fc 도메인을 연결할 수 있다.

[0074] 면역글로불린 Fc 도메인

[0075] 몇몇 실시양태에서, 다량체화 모이어티는 면역글로불린 Fc 도메인, 예를 들어, 상응하는 야생형 면역글로불린 Fc 도메인에 비해 효과가 기능이 결핍된 면역글로불린 Fc 도메인이다. 면역글로불린 Fc 도메인의 비제한적인 예는 IgG, IgA, IgD, IgM, 및 IgE 면역글로불린 Fc 도메인이다. 몇몇 실시양태에서, 면역글로불린 Fc 도메인은 IgG1 면역글로불린 Fc 도메인이다.

[0076] 면역글로불린 Fc 도메인은 융합 단백질로 통합되는 경우 다수의 치료적 이점을 보유한다. 예를 들어, 면역글로불린 Fc 도메인은 융합 파트너 단백질의 순환 반감기를 증가시킬 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 증가된 순환 반감기는 융합 단백질의 응집을 방지하는 Fc 도메인에 기인함으로써 그의 안정성을 증가시키고, 클리어언스를 둔화시킨다.

[0077] 4개의 인간 IgG 서브클래스는 효과기 기능(CDC, ADCC), 순환 반감기, 및 안정성이 상이하다. IgG1은 Fc 효과기 기능을 보유하고, 가장 풍부한 IgG 서브클래스이다. IgG2는 Fc 효과기 기능이 결핍되어 있지만, 다른 IgG2 분자를 이용하는 면역화 및 힌지 영역에서 이황화 결합의 스크램블링에 기인한 불안정성의 대상이다. IgG3은 Fc 효과기 기능을 보유하고, 길고 강한 힌지 영역을 보유한다. IgG4는 효과 기능이 결핍되어 있고, 다른 서브클래스보다 더 짧은 순환 반감기를 보유한다. IgG4 이량체는 생화학적으로 불안정한데, 그 이유는 상이한 IgG4 분자 사이의 H 사슬의 교환을 유도하는 힌지 영역에 단일 이황화 결합만을 보유하기 때문이다. Fc 서열 변경은 응집을 방지하기 위해서 IgG2 Fc의 힌지 영역에 대해, 또는 이량체를 안정화하기 위해 IgG4 Fc의 힌지 영역에 이루어질 수 있다.

[0078] IgG1의 효과기 기능 결핍 변이체가 생성될 수 있다. 예를 들어, 아미노산 치환은 N-연결된 글리코실화 부위의 위치인 위치 N297에서 이루어질 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 치환은 N297A이다. 이러한 아스파라긴 잔기의 치환은 글리코실화 부위를 제거하고, 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC) 및 보체-의존성 세포독성(CDC) 활성을 현저히 감소시킴으로써 원하지 않는 세포 용해를 방지한다.

[0079] 또한, 여러 가지 다른 효과기 기능 결핍 IgG1 변이체는 통상의 기술자에 의해 인정될 것이다. 그러한 변이체의 한 비제한적인 예는 C1q 및 FcγR 결합 부위에서 아미노산을 돌연변이시킨 IgG1(L234F/L235E/P331S)이다. 이들 (또는 유사한) Fc 변이체는 효과기-결핍 및 안정한 IL-2 선택적 작용제 - Fc 융합 단백질(IL2SA-Fc)을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 또한, Fc 단백질 모이어티의 형태는 이량체보다 오히려 안정한 단량체를 생성하기 위해 엔지니어링될 수 있다. 또한, 이들 변경된 Fc 단백질 모이어티는 본 개시의 IL-2 화합물과 조합될 수 있다. 추가로, IL-2-Fc H 사슬 폴리펩티드를 포함하는 기능적으로 단량체성 이형이량체는 IL-2 선택적 작용제를 이용하는 이중 특이성 항체 기술을 이용하여 어셈블링될 수 있다. 또한, IL-2 Fc 융합 단백질은 IgG 모이어티에서 항원 특이성을 가지거나 또는 가지지 않은 무손상 IgG 항체 분자를 이용하여 제조될 수 있다. 더구나, 힌지 영역의 일부가 결실된 Fc 변이체는 본 출원에 기재된 화합물 및 방법과 함께 사용될 수 있다.

[0080] 몇몇 실시양태에서, 면역글로불린 Fc 모이어티의 서열은 N297A 돌연변이를 포함하는 IgG1 Fc 모이어티, 예를 들어 하기 서열을 포함한다:

```
DKTHTCCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNIHYTQKLSLSLSPG(서열번호: 7; N297A
돌연변이는 굵은 서체 및 밑줄로 나타낸다).
```

[0081]

[0082] 몇몇 실시양태에서, IgG1 Fc 모이어티는 서열번호 7의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유한다.

[0083] 본 개시의 화합물은 2개의 Ig 폴리펩티드가 Fc 도메인을 형성하도록 하는 조건 하에서 생성될 수 있다. 2개의 Ig 폴리펩티드는 상이한 모이어티와 컨주게이트될 수 있다. 몇몇 경우에서, 하나의 Ig 폴리펩티드는 IL-2 모이어티에 컨주게이트되고, 제2 Ig 폴리펩티드는 IL2 수용체 이외의 세포 표면 단백질에 결합하는 모이어티에 결합

된다. 몇몇 실시양태에서, 결합 모이어티에 의해 결합된 세포 표면 단백질은 ST2이다.

[0084] 링커

[0085] Fc 도메인 및 IL2 수용체-결합 모이어티 또는 ST2-결합 모이어티의 연결에서의 연결은 (1) 2개의 단백질 서열의 직접 융합; (2) 개재하는 링커 펩티드를 이용하는 융합; 또는 (3) 비-펩티드 모이어티에 의한 융합일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 링커는 IL2R-결합 모이어티 및 ST2-결합 모이어티를 직접적으로 연결한다. 링커 펩티드는 2개의 단백질 모이어티 사이의 스페이서로서 포함될 수 있다. 링커 펩티드는 성분 단백질 모이어티의 적절한 단백질 접힘, 안정성, 발현, 및 생활성을 촉진할 수 있다. 긴 가요성 링커 펩티드는 글리신, 세린, 또는 트레오닌으로 구성될 수 있는데, 다수의 글리신 잔기는 높은 가요성 형태를 제공한다. 세린 또는 트레오닌 잔기는 펩티드 또는 성분 융합 단백질 모이어티 내에서 소수성 상호작용을 제한하는 극성 표면 부위를 제공한다. 몇몇 실시양태에서, 펩티드 링커는 서열 GGGGS(서열번호 31)의 반복부와 같이 글리신 및 세린이 풍부하다. 몇몇 실시양태에서, 펩티드 링커는 (GGGGS)<sub>n</sub>(서열번호 31)의 서열을 보유하는데, 이때 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10이다. 몇몇 실시양태에서, n은 3인데; 즉, 펩티드 링커는 GGGSGGGSGGGGS(서열번호 6)의 서열을 보유한다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 수용체-결합 모이어티는 링커 펩티드에 대해 N-말단이고, 면역글로불린 Fc 도메인은 링커 펩티드에 대해 C-말단이다. 몇몇 실시양태에서, IL-2 수용체-결합 모이어티는 링커 펩티드에 대해 C-말단이고, 면역글로불린 Fc 도메인은 링커 펩티드에 대해 N-말단이다.

[0086] 몇몇 실시양태에서, 펩티드 링커는 서열번호 6의 아미노산 서열에 대해 적어도 60%, 적어도 61%, 적어도 62%, 적어도 63%, 적어도 64%, 적어도 65%, 적어도 66%, 적어도 67%, 적어도 68%, 적어도 69%, 적어도 70%, 적어도 71%, 적어도 72%, 적어도 73%, 적어도 74%, 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유한다.

[0087] 약학 조성물

[0088] 본 발명의 약학 조성물은 본 출원에 기재된 임의의 화합물을 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 약학 조성물은 본 개시의 화합물과 함께 다른 화학 성분, 예를 들어 담체, 안정화제, 희석제, 분산제, 현탁제, 증점제, 및/또는 부형제를 포함한다. 약학 조성물은 유기체에 대한 본 개시의 화합물의 투여를 용이하게 한다. 약학 조성물은 여러 가지 형태 및 예를 들어, 정맥내, 피하, 근육내, 경구, 비경구, 눈, 피하, 경막, 코, 질, 및 국소 투여를 포함하는 경로에 의해 약학 조성물로서 치료 유효량으로 투여될 수 있다.

[0089] 약학 조성물은 국부 방식으로 투여될 수 있는데, 예를 들어 장기 내로의 직접적인 화합물의 주사에 의해, 경우에 따라 데포 또는 서방형 제제 또는 이식물에 의해 투여될 수 있다. 약학 조성물은 속방형 제제의 형태, 연장 방출 제제의 형태, 또는 간헐 방출 제제의 형태로 제공될 수 있다. 속방형은 즉시 방출을 제공할 수 있다. 연장 방출 제제는 제어된 방출 또는 지속 지연 방출을 제공할 수 있다.

[0090] 경구 투여의 경우, 약학 조성물은 본 개시의 화합물과 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제를 조합하여 제형화할 수 있다. 그러한 담체는 대상체의 의한 경구 소화를 위한 액체, 겔, 시럽, 엘릭시르, 슬러리, 또는 현탁액을 제형화하기 위해 사용될 수 있다. 경구 용해성 제제에 사용된 용매의 비제한적인 예는 물, 에탄올, 이소프로판올, 식염수, 생리 식염수, DMSO, 디메틸포름아미드, 인산칼륨 완충제, 인산염 완충 식염수(PBS), 인산나트륨 완충제, 4-2-히드록시에틸-1-피페라진에탄설폰산 완충제(HEPES), 3-(N-모르폴리노)프로판설폰산 완충제(MOPS), 피페라진-N,N'-비스(2-에탄설폰산) 완충제(PIPES), 및 염수 시트르산나트륨 완충제(SSC)를 포함할 수 있다. 경구 용해성 제제에 사용된 공용매의 비제한적인 예는 수크로오스, 우레아, 크레마포르, DMSO, 및 인산나트륨 완충제를 포함할 수 있다.

[0091] 약학 제제는 정맥내 투여를 위해 제형화될 수 있다. 약학 조성물은 유성 또는 수성 비히클 내의 멸균 현탁액, 용액 또는 에멀션으로서 비경구 주사에 적합한 형태일 수 있고, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화 제제를 함유할 수 있다. 비경구 투여를 위한 약학 제제는 수용성 형태로 본 개시의 화합물의 수용액을 포함한다. 본 개시의 화합물의 현탁액은 유성 주사 현탁액으로서 제조될 수 있다. 적합한 친유성 용매 또는 비히클은 참깨유와 같은 지방유, 에틸 올리에이트 또는 트리글리세라이드와 같은 합성 지방산 에스테르, 또는 리포솜을 포함한다. 또한, 현탁액은 적합한 안정제, 또는 고도로 농축된 용액의 제조가 가능하도록 화합물의 용해도를 증가시키는 제제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들어 무발열원 멸균수로 구성하기 위한 분말 형태일 수 있다.

- [0092] 본 개시의 화합물은 국소 투여될 수 있고, 여러 가지 국소 투여 가능한 조성물, 예를 들어 용액, 현탁액, 로션, 겔, 페이스트, 약제 스틱, 밤, 크림, 및 연고로 제형화될 수 있다. 그러한 약학 조성물은 가요화제, 안정화제, 등장성 증강제, 완충제 및 보존제를 함유할 수 있다.
- [0093] 또한, 본 개시의 화합물은 직장 조성물, 예를 들어 관장, 직장 겔, 직장 폼, 직장 에어로졸, 좌약, 젤리 좌약, 또는 정제 관장으로 제형화될 수 있는데, 이들은 코코아 버터 또는 다른 글리세라이드뿐만 아니라 폴리비닐피롤리돈 및 PEG와 같은 합성 폴리머와 같은 통상적인 좌약 베이스를 함유한다. 좌약 형태의 조성물에서, 경우에 따라 코코아 버터와 함께 지방산 글리세라이드의 혼합물과 같은 저용용 왁스가 용용될 수 있다.
- [0094] 본 출원에 제공된 치료 또는 사용 방법의 실시에서, 치료 유효량의 본 출원에 기재된 화합물은 치료하려는 질환 또는 병태를 보유하는 대상체에게 약학 조성물로 투여된다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 인간과 같은 포유동물이다. 치료 유효량은 질환의 중증도, 대상체의 연령 및 상대적인 건강상태, 사용된 화합물의 역가, 및 다른 요인에 따라 많이 달라질 수 있다. 화합물은 단독으로 사용되거나, 또는 혼합물의 성분으로서 하나 이상의 치료제와 함께 사용될 수 있다.
- [0095] 약학 조성물은 부형제 및 보조제를 포함하는 하나 이상의 생리적으로 허용 가능한 담체를 이용하여 제형화될 수 있는데, 이들은 본 개시의 화합물을 약학적으로 사용될 수 있는 제제로 가공하는 것을 용이하게 한다. 제형화는 선택된 투여의 경로에 따라 변경될 수 있다. 본 출원에 기재된 화합물을 포함하는 약학 조성물은 예를 들어 혼합, 용해, 유화, 캡슐화, 포획, 또는 압축 공정에 의해 제조될 수 있다.
- [0096] 약학 조성물은 적어도 하나의 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 또는 부형제 및 유리 염기로서 본 출원에 기재된 화합물을 포함할 수 있다. 약학 조성물은 가용화제, 안정제, 등장성 증강제, 완충제 및 보존제를 함유할 수 있다.
- [0097] 본 출원에 기재된 화합물을 포함하는 조성물의 제조 방법은, 상기 화합물을 하나 이상의 불활성의 약학적으로 허용 가능한 부형제 또는 담체와 함께 고체, 반고체 또는 액체 조성물로 제형화하는 것을 포함한다. 고체 조성물은, 예를 들어 분말, 정제, 분산 과립, 캡슐, 및 가세를 포함한다. 액체 조성물은, 예를 들어 화합물이 용해된 용액, 화합물을 포함하는 에멀전, 또는 본 출원에 개시된 바와 같은 화합물을 함유하는 리포솜, 미셀, 또는 나노입자를 함유하는 용액을 포함한다. 반고체 조성물은, 예를 들어 겔, 현탁액 및 크림을 포함한다. 조성물은 용액 또는 현탁액, 사용 전에 액체 중의 용액 또는 현탁액에 적합한 고체 형태 또는 에멀전일 수 있다. 또한, 이들 조성물은 소량의 비독성 보조 물질, 예를 들어 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 및 다른 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 함유할 수 있다.
- [0098] 본 발명에 사용하기에 적합한 투여 형태의 비제한적인 예는 액체, 분말, 겔, 나노현탁액, 나노입자, 마이크로겔, 수성 또는 유성 현탁액, 에멀션, 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0099] 본 발명에 사용하기에 적합한 약학적으로 허용 가능한 부형제의 비제한적인 예는 결합제, 붕해제, 부착방지제, 대전방지제, 계면활성제, 향산화제, 코팅제, 착색제, 가소제, 보존제, 현탁제, 유화제, 향미생물제, 구형화제, 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0100] 본 발명의 조성물은, 예를 들어 즉시 방출형 또는 조절 방출형일 수 있다. 즉시 방출형은 화합물이 신속하게 작용하도록 제형화될 수 있다. 즉시 방출 제제의 비제한적인 예는 용이하게 용해될 수 있는 제제를 포함한다. 조절 방출 제제는 활성제의 방출 속도 및 방출 프로필이 생리적 및 번시치료적 요구조건에 합치될 수 있도록 적용되거나, 또는 대안적으로 프로그램된 속도로 활성제가 방출되도록 제형화된 약학 조성물일 수 있다. 조절 방출 제제의 비제한적인 예는 과립, 지연 방출 과립, 하이드로겔(예를 들어, 합성 또는 천연 유래), 다른 겔화제(예를 들어, 겔 형성 식이 섬유), 매트릭스 기반 제제(예를 들어, 분산된 적어도 하나의 활성 성분을 보유하는 폴리머 물질을 포함하는 제제), 매트릭스내 과립, 폴리머 혼합물, 및 과립 덩어리를 포함한다.
- [0101] 몇몇 실시양태에서, 조절 방출 제제는 지연 방출 형태이다. 지연 방출 형태는 연장된 기간 동안 화합물의 작용을 지연시키도록 제형화될 수 있다. 지연 방출 형태는 하나 이상의 화합물의 유효량의 방출을 예를 들어 약 4, 약 8, 약 12, 약 16, 또는 약 24시간 동안 지연하도록 제형화될 수 있다.
- [0102] 조절 방출 제제는 지속 방출 형태일 수 있다. 지속 방출 형태는, 예를 들어 연장된 기간 동안 화합물의 작용을 지속시키도록 제형화될 수 있다. 지속 방출 형태는 본 출원에 기재된 임의의 화합물의 유효량을 약 4, 약 8, 약 12, 약 16, 또는 약 24시간에 걸쳐 제공하도록(예를 들어, 생리적으로 효과적인 혈중 프로필을 제공하도록) 제형화될 수 있다.

- [0103] 약학적으로 허용 가능한 부형제의 비제한적인 예는, 예를 들어 문헌[참조: Remington: The Science 및 Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. 및 Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; 및 Pharmaceutical Dosage Forms 및 Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999), 이들 각각은 그 전체 내용이 본 출원에 참고로 인용됨]에서 확인할 수 있다.
- [0104] 다수의 치료제는 임의의 순서 또는 동시에 투여될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 본 발명의 화합물은 항생제와 조합하여, 항생제 투여 전 또는 후에 투여된다. 동시에 투여되는 경우, 다수의 치료제는 단일의 통합된 형태, 또는 다수의 형태, 예를 들어 다수의 별개의 알약(pill)으로 제공될 수 있다. 제제는 단일 포장 또는 다수의 포장으로 함께 또는 별개로 포장될 수 있다. 치료제 중 하나 또는 모두는 다중 투여로 제공될 수 있다. 동시 투여가 아닌 경우, 다중 투여 사이의시간은 약 1개월 정도까지 변경될 수 있다.
- [0105] 본 출원에 기재된 치료제는 질환 또는 병태의 발생 이전, 중, 또는 이후에 투여될 수 있고, 치료제를 함유하는 조성물을 투여하는 시기는 달라질 수 있다. 예를 들어, 상기 조성물은 예방제로서 사용될 수 있고, 질환 또는 병태의 발생 가능성을 감소시키기 위해 질환 또는 병태에 대한 경향을 가진 대상체에게 연속적으로 투여될 수 있다. 상기 조성물은 징후의 개시 중 또는 가능하면 직후에 투여될 수 있다. 치료제의 투여는 징후의 개시의 최초 48시간 이내에, 징후의 개시의 최초 24시간 이내에, 징후의 개시의 최초 6시간 이내에, 또는 징후의 개시의 최초 6시간 이내에 개시될 수 있다. 초기 투여는 임의의 경로, 예를 들어 본 출원에 기재된 임의의 제제를 이용하여 본 출원에 기재된 임의의 경로에 의한 투여가 실질적일 수 있다. 치료제는 질환 또는 병태의 개시가 검출되거나 의심되고 가능하면 직후에, 및 질환의 치료를 위해 필요한시간 동안, 예를 들어 약 1개월 내지 약 3개월 동안 투여될 수 있다. 치료의 기간은 각 대상체에 대해 달라질 수 있다.
- [0106] 본 출원에 기재된 약학 조성물은 정확한 투여량의 단일 투여에 적합한 단위 투여 형태일 수 있다. 단위 투여 형태에서, 제제는 하나 이상의 적절한 양을 함유하는 단위 투여량으로 분할된다. 단위 투여량은 제제의 분리량을 함유하는 포장의 형태일 수 있다. 비제한적인 예는 포장된 주사액, 바이알, 또는 앰플이다. 수성 현탁 조성물은 단일 투여 제밀봉 불가능한 용기에 포장될 수 있다. 다중 투여 제밀봉 가능한 용기는, 예를 들어 보존제와 함께, 또는 보존제 없이 사용될 수 있다. 주사용 제제는 단위 투여 형태, 예를 들어 앰플, 또는 보존제와 함께 다중 투여 용기에 존재할 수 있다.
- [0107] 본 출원에 제공된 약학 조성물은 다른 요법, 예를 들어 화학요법, 방사선, 수술, 항염증제, 및 선택된 비타민과 함께 투여될 수 있다. 다른 제제는 약학 조성물 이전에, 이후에 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0108] 의도된 투여 모드에 따라, 약학 조성물은, 예를 들어 정확한 투여량의 단일 투여에 적합한 단위 투여 형태로, 예를 들어 정제, 좌약, 알약, 캡슐, 분말, 액체, 현탁액, 로션, 크림, 또는 겔과 같은 고체, 반고체 또는 액체 형태일 수 있다.
- [0109] 고체 조성물의 경우, 비독성 고체 담체는, 예를 들어 약학 등급의 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 나트륨 사카린, 탈크, 셀룰로오스, 글루코오스, 수크로오스, 및 마그네슘 카보네이트를 포함한다.
- [0110] 본 개시에서 사용하기에 적합한 투여 형태의 비제한적인 예는 액체, 엘릭시르, 나노현탁액, 수성 또는 유성 현탁액, 점적액, 시럽, 및 이의 임의의 조합을 포함한다. 본 개시에서 사용하기에 적합한 약학적으로 허용 가능한 부형제의 비제한적인 예는 과립화제, 결합제, 윤활제, 붕해제, 감미제, 활택제, 부착방지제, 대전방지제, 계면활성제, 향산화제, 검, 코팅제, 착색제, 향미제, 코팅제, 가소제, 보존제, 현탁제, 유화제, 식물 셀룰로오스 물질 및 구형화제, 및 이의 임의의 조합을 포함한다.
- [0111] 본 발명의 조성물은 키트로서 포장될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 키트는 조성물의 투여/용도에 대한 설명서를 포함한다. 설명서는 예를 들어 라벨일 수 있다. 설명서는 투여 방법의 조건을 제안할 수 있다. 설명서는 치료법의 수행으로부터 최적의 임상적인 결과를 얻기 위한 최고의 지침을 대상체 및 감독 의사에게 제공한다. 설명서는 라벨일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 라벨은 허가 당국, 예를 들어 미국 식품의약국(FDA), 유럽 의약품청(EMA), 또는 다른 허가 기관에 의해 승인될 수 있다.
- [0112] 질환
- [0113] 본 개시의 화합물은 여러 가지 자가면역 또는 면역 관련 질환 또는 병태에, 예를 들어 그러한 질환 또는 병태를 치료하기 위해 적용될 수 있다. 예를 들어, 본 개시는 병태를 치료하기 위한 방법을 제공하는데, 상기 방법은

치료가 필요한 대상체에게 본 개시의 화합물을 투여하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 치료가 필요한 대상체에게 투여되는 화합물은 IL-2R에 결합하는 제1 모이어티 및 ST2에 결합하는 제2 모이어티를 포함하는데, 이때 제1 모이어티는 링커에 의해 제1 Fc 도메인에 공유적으로 연결되고, 제2 모이어티는 링커에 의해 제2 Fc 도메인에 공유적으로 연결되며, 및 상기 제1 및 제2 Fc 도메인은 공유적으로 연결되며, 및 추가로 상기 제1 및 제2 Fc 도메인은 효과기 기능이 결핍되어 있다.

- [0114] 자가면역 질환은 심장, 신장, 간, 폐, 생식기관, 소화기, 또는 피부와 같은 장기에 영향을 미치는 질환을 포함한다. 자가면역 질환은 내분비, 부신, 흉선, 침샘 및 외분비 샘을 포함하는 샘, 및 체장에 영향을 미치는 질환을 포함한다. 또한, 자가면역 질환은 다선성일 수 있다. 자가면역 질환은 하나 이상의 조직, 예를 들어 결합 조직, 근육, 또는 혈액을 표적화할 수 있다. 자가면역 질환은 신경계 또는 눈, 귀 또는 혈관계를 표적화할 수 있다. 또한, 자가면역 질환은 다수의 장기, 조직 및/또는 시스템에 영향을 미치는 전신성일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 면역 관련 질환 또는 병태는 염증성 질환 또는 병태이다. 몇몇 실시양태에서, 염증성 질환 또는 병태는 염증이 발생된 근육, 내장 지방, 대장, 및/또는 폐 조직과 관련된 것을 포함한다.
- [0115] 특정 실시양태에서, 자가면역 질환은 이식편대숙주병, 심상성 천포창, 전신 홍반성 루푸스, 피부경화증, 궤양성 대장염, 크론병, 건선, 1형 당뇨병, 다발성 경화증, 근위축성 측삭 경화증, 원형 탈모, 포도막염, 시속척수염, 및 뒤렌형 근이영양증으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0116] 몇몇 실시양태에서, 본 개시의 화합물은 근 조직에 영향을 미치는 질환, 예를 들어 염증성 근육병증, 근육 디스트로피, 면역계와 관련된 근육 질환, 및 염증과 관련된 근육 질환을 치료할 수 있다.
- [0117] 염증성 근육병증은 전형적으로 근육의 염증과 관련된 질환 및 관련 징후, 예를 들어 근육 쇠약이다. 근육 쇠약은 진행성일 수 있다. 염증성 근육병증(예를 들어, 피부근육염)과 관련된 징후는 예를 들어, 근육 쇠약(예를 들어, 근위 근육 쇠약), 피부 발진, 보행 또는 서서 있을 후의 피로, 빨리 걷기 또는 추락, 연하 곤란, 발음 곤란, 호흡 곤란, 근육통, 연한 근육, 체중 감소, 저-등급 발열, 염증이 발생된 폐, 빛 민감도, 피부하 또는 근육내 칼슘 축적(석회 침착증), 및 염증성 근육병증의 생물학적 수반 현상을 포함할 수 있다.
- [0118] 염증성 근육병증은 알레르기 반응, 다른 질환, 약물 또는 독소에 대한 노출, 또는 감염성 체제에 대한 노출에 의해 유발될 수 있거나, 또는 특발성(원인불명)일 수 있다. 염증성 근육병증은 급성 염증성 근육병증 또는 만성 염증성 근육병증일 수 있다. 염증성 근육병증은 성인 및 아이들(예를 들어, 청소년 피부근육염) 둘 다에 영향을 미칠 수 있다. 염증성 근육병증은 피부, 폐, 심장, 눈, 및 위장계와 같은 신체의 다른 장기 또는 시스템에 영향을 미치는 징후를 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 염증성 근육병증은 만성 염증성 근육병증 (예를 들어, 피부근육염, 다발성근염, 또는 봉입체 근염)이다.
- [0119] 몇몇 실시양태에서, 염증성 근육병증은 알레르기 반응, 다른 질환(예를 들어, 암 또는 결합 조직 질환), 독소 물질, 약물, 또는 감염성 체제(예를 들어, 바이러스)에 의해 유발될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 염증성 근육병증은 루푸스, 류마티스 관절염, 또는 전신성 경화증과 관련된다. 몇몇 실시양태에서, 염증성 근육병증은 특발성이다. 몇몇 실시양태에서, 염증성 근육병증은 다발성근염, 피부근육염, 봉입체 근염, 및 면역 매개 과사성 근육병증으로 구성된 군으로부터 선택된다. 몇몇 실시양태에서, 염증성 근육병증은 피부근육염이다.
- [0120] 염증성 근육병증(예를 들어, 피부근육염)의 생물학적 수반 현상은, 예를 들어 시토킨(예를 들어, I형 인터페론(예를 들어, IFN- $\alpha$  및/또는 IFN- $\beta$ ), 인터루킨(예를 들어, IL-6, IL-10, IL-15, IL-17 및 IL-18), 및 TNF- $\alpha$ ), TGF- $\beta$ , B-세포 활성화 인자(BAFF), 및 IFN 유도성 유전자(예를 들어, I형 IFN 유도성 유전자)의 과발현의 변경된(예를 들어, 증가된) 레벨을 포함할 수 있다. 염증성 근육병증의 다른 생물학적 수반 현상은, 예를 들어 증가된 적혈구 침강 속도(ESR) 및/또는 크레아틴 키나아제의 증가된 레벨을 포함할 수 있다. 염증성 근육병증의 추가의 생물학적 수반 현상은 자가항체, 예를 들어 항-신테타아제 자가항체(예를 들어, 항-Jo1 항체), 항-신호 인식 입자 항체(항-SRP), 항-Mi-2 항체, 항-p155 항체, 항-PM/Sci 항체, 및 항-RNP 항체를 포함할 수 있다.
- [0121] 근이영양증은 원발성 또는 이차 골격근 관여를 특징으로 하는 일군의 파괴적인 신경근 질환을 나타내는 일군의 다양하고 유전되는 신경근 장애이다. 근이영양증의 예는 뒤센형 근이영양증, 베커 근이영양증, 지대근 근이영양증, 안면견갑 상완형 근이영양증, 후쿠야마형 선천성 근이영양증, 및 메로신-결핍 선천성 근이영양증을 포함하나, 이로 제한되지 않는다. 가장 통상적인 형태의 근이영양증은 뒤센형 근이영양증(DMD)이다. DMD는 디스트로핀을 코딩하는 유전자 내의 돌연변이를 특징으로 하는 X-연관 열성 장애이다. 대부분의 환자는 호흡 부전 및 심부전으로 인해 30세 이전에 사망한다. 베커 근이영양증(가비대 근이영양증으로도 공지됨)은 둘 다 디스트로핀 유전자 내의 돌연변이에 기인한다는 점에서 DMD에 관련된다. DMD를 앓고 있는 유기체는 기능적인 디스트로핀을 생

성하지 않는다. 따라서, DMD는 BMD보다 훨씬 더 심각하다.

[0122] 대상체

[0123] 본 개시의 화합물은 척추동물과 같은, 필요한 대상체에게 투여된다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 마우스, 래트, 토기, 개, 고양이, 말, 양, 소, 원숭이, 시노몰구스 원숭이, 또는 인간이다. 대상체는, 예를 들어 노인, 성인, 청소년, 미성년, 아동, 걸음마를 배우는 아기 및 영아일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 염증성 근육병증의 동물 모델이다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 염증성 근육병증을 보유하는 인간, 또는 염증성 근육병증이 발병할 위험이 있는 인간이다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 염증성 근육병증의 가족력을 보유한다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 염증성 근육병증과 관련된 유전자를 보유한다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 염증성 근육병증과 관련된 바이오마커에 대해 양성이다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 염증성 근육병증으로 진단된다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 염증성 근육병증과 관련된 하나 이상의 예후 또는 징후, 예를 들어 본 출원에 기재된 하나 이상의 징후를 보유한다.

[0124] 몇몇 실시양태에서, 대상체는 근이영양증의 동물 모델이다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 근이영양증을 보유하는 인간, 또는 근이영양증이 발병할 위험이 있는 인간이다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 근이영양증의 가족력을 보유한다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 근이영양증과 관련된 유전자를 보유한다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 근이영양증과 관련된 바이오마커에 대해 양성이다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 근이영양증으로 진단된다. 몇몇 실시양태에서, 대상체는 근이영양증과 관련된 하나 이상의 예후 또는 징후, 예를 들어 본 출원에 기재된 하나 이상의 징후를 보유한다.

[0125] 투여량

[0126] 본 출원에 기재된 약학 조성물은 정확한 투여량의 단일 투여에 적합한 단위 투여 형태일 수 있다. 단위 투여 형태에서, 제제는 하나 이상의 화합물의 적절한 양을 함유하는 단위 투여량으로 분할된다. 단위 투여량은 제제의 별개의 양을 함유하는 패키지 형태일 수 있다. 비제한적인 예는 바이알 또는 앰플 내의 액체이다. 수성 현탁 조성물은 단일 투여하는 재밀봉 불가능한 용기 내에 포장될 수 있다. 다중 투여 재밀봉 가능한 용기는, 예를 들어 보존제와 함께 사용될 수 있다. 비경구 주사용 제제는 단위 투여 형태, 예를 들어 앰플, 또는 보존제와 함께 다중 투여 용기 내의 단위 투여 형태로 제시될 수 있다.

[0127] 본 출원에 기재된 화합물은 투여량당 약 0.5 µg 내지 약 7000 µg, 약 1 µg 내지 약 1000 µg, 약 1 µg 내지 약 250 µg, 약 1 µg 내지 약 25 µg, 약 5 µg 내지 약 50 µg, 약 0.5 µg 내지 약 15 µg, 또는 약 0.5 µg 내지 약 10 µg의 범위로 조성물 내에 존재할 수 있다.

[0128] 본 출원에 기재된 화합물은 약 0.5 µg, 약 1 µg, 약 2 µg, 약 3 µg, 약 4 µg, 약 5 µg, 약 6 µg, 약 7 µg, 약 8 µg, 약 9 µg, 약 10 µg, 약 11 µg, 약 12 µg, 약 13 µg, 약 14 µg, 약 15 µg, 약 16 µg, 약 17 µg, 약 18 µg, 약 19 µg, 약 20 µg, 약 21 µg, 약 22 µg, 약 23 µg, 약 24 µg, 약 25 µg, 약 26 µg, 약 27 µg, 약 28 µg, 약 29 µg, 약 30 µg, 약 31 µg, 약 32 µg, 약 33 µg, 약 34 µg, 약 35 µg, 약 36 µg, 약 37 µg, 약 38 µg, 약 39 µg, 약 40 µg, 약 41 µg, 약 42 µg, 약 43 µg, 약 44 µg, 약 45 µg, 약 46 µg, 약 47 µg, 약 48 µg, 약 49 µg, 약 50 µg, 약 55 µg, 약 60 µg, 약 65 µg, 약 70 µg, 약 75 µg, 약 80 µg, 약 85 µg, 약 90 µg, 약 95 µg, 약 100 µg, 약 125 µg, 약 150 µg, 약 175 µg, 약 200 µg, 약 250 µg, 약 300 µg, 약 350 µg, 약 400 µg, 약 450 µg, 약 500 µg, 약 550 µg, 약 600 µg, 약 650 µg, 약 700 µg, 약 750 µg, 약 800 µg, 약 850 µg, 약 900 µg, 약 950 µg, 약 1000 µg, 약 1050 µg, 약 1100 µg, 약 1150 µg, 약 1200 µg, 약 1250 µg, 약 1300 µg, 약 1350 µg, 약 1400 µg, 약 1450 µg, 약 1500 µg, 약 1550 µg, 약 1600 µg, 약 1650 µg, 약 1700 µg, 약 1750 µg, 약 1800 µg, 약 1850 µg, 약 1900 µg, 약 1950 µg, 약 2000 µg, 약 2500 µg, 약 3000 µg, 약 3500 µg, 약 4000 µg, 약 4500 µg, 약 5000 µg, 약 5500 µg, 약 6000 µg, 약 6500 µg, 약 7000 µg, 약 7500 µg, 약 8000 µg, 약 9000 µg, 약 10,000 µg (10 mg), 약 11 mg, 약 12 mg, 약 13 mg, 약 14 mg, 약 15 mg, 약 16 mg, 약 17 mg, 약 18 mg, 약 19 mg, 약 20 mg, 약 21 mg, 약 22 mg, 약 23 mg, 약 24 mg, 약 25 mg, 약 26 mg, 약 27 mg, 약 28 mg, 약 29 mg, 약 30 mg, 약 31 mg, 약 32 mg, 약 33 mg, 약 34 mg, 약 35 mg, 약 36 mg, 약 37 mg, 약 38 mg, 약 39 mg, 또는 약 40 mg의 양으로 조성물 내에 존재할 수 있다. 이들 값 중 임의의 값은 조성물 내의 화합물의 양을 위한 범위를 규정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물은 약 0.5 µg 내지 약 40 mg, 약 500 µg 내지 약 10 mg, 또는 약 50 µg 내지 약 5 mg의 범위로 조성물 내에 존재할 수 있다.

- [0129] 몇몇 실시양태에서, 투여량은 대상체의 중량으로 나눈 약물의 양, 예를 들어 대상체 체중 1 kg 당 약물의 마이크로그램 또는 밀리그램으로 표현할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 상기 화합물은 약 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 2  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 11  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 12  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 13  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 14  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 17  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 18  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 19  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 35  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 45  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 55  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 60  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 65  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 70  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 75  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 85  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 90  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 95  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 125  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 175  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 350  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 450  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 550  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 650  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 700  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 800  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 850  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 900  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 950  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1050  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1350  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1400  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1450  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1550  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1600  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1650  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1700  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1750  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1800  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1850  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1900  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 1950  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 2000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 2500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 3000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 3500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 4000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 4500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 또는 약 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 투여량으로 투여된다. 이들 값 중 임의의 값은 화합물의 투여량을 위한 범위를 규정하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 화합물은 약 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 약 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 약 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 약 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 약 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 약 50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 약 15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 약 35  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 또는 약 0.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 약 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  범위의 투여량으로 투여된다.
- [0130] 개시된 화합물은 원하는 임의의 간격으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 상기 화합물은 주 1회, 주 2회, 주 3회, 주 4회, 주 6회, 주 7회, 주 8회, 주 9회, 주 10회 투여될 수 있다. 일일 투여 사이의 간격은 임의의 시간 간격, 예를 들어 매시간, 2시간 마다, 3시간 마다, 4시간 마다, 5시간 마다, 6시간 마다, 7시간 마다, 8시간 마다, 9시간 마다, 10시간 마다, 11시간 마다, 또는 12시간 마다 투여될 수 있다. 상기 화합물은 매주 1회, 2주 마다 1회, 3주 마다 1회, 4주 마다 1회, 5주 마다 1회, 6주 마다 1회, 7주 마다 1회, 또는 8주 마다 1회 투여될 수 있다. 상기 화합물의 투여는 화합물을 투여하는 사람 또는 화합물을 투여받는 대상체의 편의를 도모하기 위해 불규칙한 투여량 스케줄을 보유할 수 있다. 이와 같이, 상기 화합물은, 예를 들어 하루 1회, 하루 2회, 또는 하루 3회 투여될 수 있다.
- [0131] 투여된 양은 각각의 투여에서 동일한 양일 수 있거나, 또는 투여량은 다를 수 있다. 예를 들어, 제1량은 아침에 투여될 수 있고, 제2량은 저녁에 투여될 수 있다. 대상체는 높은 제1 투여량을 투여량 및 더 낮은 후속 투여량을 투여받을 수 있다. 투여량은 징후 또는 질환의 마커의 개선, 또는 유해 반응의 발생에 따라 상향 조정하거나 하향 조정될 수 있다.
- [0132] 약학적으로 허용 가능한 담체의 비제한적인 예는 염수, 링커 용액 및 텍스트로오스 용액을 포함한다. 액체 담체는 용액, 현탁액, 및 에멀전을 제조하는데 사용될 수 있다. 본 출원에 기재된 화합물은 물, 유기 용매, 또는 이들 둘의 혼합물, 또는 약학적으로 허용 가능한 오일 또는 지방과 같은 약학적으로 허용 가능한 액체 담체 중에 용해 또는 현탁될 수 있다. 액체 담체는 가용화제, 유화제, 완충제, 보존제, 감미제, 향미제, 현탁제, 증점제, 색소, 점도 조절제, 안정화제, 및 삼투조절제와 같은 다른 적합한 약학적 첨가제를 함유할 수 있다. 비경구 투여를 위한 액체 담체의 예는 물, 알코올(모노히드릭 알코올 및 폴리히드릭 알코올 포함) 및 이의 유도체, 및 오일(예를 들어, 분류 코코넛 오일 및 아라키스 오일)을 포함한다. 비경구 투여의 경우, 상기 담체는 에틸 올리에이트 또는 이소프로필 미리스테이트와 같은 오일 에스테르일 수 있다. 멸균 액체 담체는 비경구 투여를 위한 멸균 액체 형태 조성물에 사용된다. 상기 용액의 pH는 약 5 내지 약 8, 예를 들어, 약 7 내지 약 7.5일 수 있다.
- [0133] 몇몇 실시양태에서, 본 개시의 분자를 이용하는 치료는 야생형 IL-2 폴리펩티드를 이용하는 치료보다 더 잘 인된다. 몇몇 실시양태에서, 치료 유효량의 본 발명의 분자를 이용하는 치료는 IL2(C125S)를 이용하는 치료에 비해 설사 발생을 거의 유발하지 않는다. 몇몇 실시양태에서, 치료 유효량의 본 발명의 분자를 이용하는 치료는 모세혈관 누출 증후군을 유발하지 않는다. 몇몇 실시양태에서, 치료 유효량의 본 발명의 분자를 이용하는 치료는 감소된 호중구 활성화 또는 증가된 감염의 위험을 유발하지 않는다.
- [0134] 본 개시의 화합물은 IL-2 수용체에 대해 높은, 중간 정도, 또는 낮은 친화성을 보유한다. 본 개시의 화합물은 ST2에 대해 높은, 중간 정도, 또는 낮은 친화성을 보유한다. IL2R 및 ST2에 대해 중간 정도 또는 낮은 친화성을 보유하는 화합물은 개별적으로 수용체 둘 다가 세포 상에 존재하는 경우 높은 아비디티(avidity)를 보유할 수 있다. 본 개시의 화합물은 개별적으로 ST2 또는 IL2R에 대한 결합에 대해, 예를 들어 약 1 pmol 내지 약 1 mmol, 약 10 pmol 내지 약 1 mmol, 약 100 pmol 내지 약 1 mmol, 약 1  $\mu\text{mol}$  내지 약 1 mmol, 약 10  $\mu\text{mol}$  내

지 약 1 mmol, 약 1  $\mu$ mol 내지 약 100  $\mu$ mol, 약 1  $\mu$ mol 내지 약 500  $\mu$ mol, 약 200  $\mu$ mol 내지 약 800  $\mu$ mol, 약 10  $\mu$ mol 내지 약 100  $\mu$ mole, 또는 약 500  $\mu$ mole 내지 약 1 mmol의 해리 상수(Kd)를 보유한다. 본 개시의 화합물은, ST2 및 IL-2R 둘 다에 대해 결합하는 경우, 더 낮은 겉보기 Kd, 예를 들어, 개별적인 Kd의 95% 미만, 90% 미만, 85% 미만, 80% 미만, 75% 미만, 70% 미만, 65% 미만, 60% 미만, 55% 미만, 50% 미만, 45% 미만, 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 또는 1% 미만을 보유한다.

[0135] 약물동력학

[0136] 투여량은 원하는 약물동력학(PK) 또는 약력학 프로파일, 예를 들어 본 출원에 기재한 바와 같이, 원하는 또는 유효한 혈중 프로파일을 획득하기 위해 조절될 수 있다.

[0137] 약물동력학 및 약력학 데이터는 다양한 실험 기법에 의해 얻을 수 있다. 적합한 특정 조성물을 나타내는 약물동력학 및 약력학 프로파일 성분은 인간 대상체에서 약물 대사의 변이에 기인하여 달라질 수 있다. 약물동력학 및 약력학 프로파일은 대상체 군의 평균 파라미터의 결정에 기초할 수 있다. 대상체군은 대표적인 평균을 결정하기에 적합한 임의의 이상적인 수의 대상체, 예를 들어 5명의 대상체, 10명의 대상체, 15명의 대상체, 20명의 대상체, 25명의 대상체, 30명의 대상체, 35명의 대상체, 또는 이를 초과하는 대상체를 포함한다. 상기 평균은, 예를 들어 각각의 측정된 파라미터에 대해 모든 대상체의 측정치의 평균을 계산함으로써 결정된다. 투여량은 원하는 약물동력학 또는 약력학 프로파일, 예를 들어 본 출원에 기재한 바와 같이, 원하는 또는 유효한 혈중 프로파일을 획득하기 위해 조절될 수 있다.

[0138] 약물동력학 파라미터는 본 발명의 조성물을 기재하기에 적합한 파라미터일 수 있다. 예를 들어, 약물동력학 프로파일은 투여 후 임의의시간, 예를 들어, 약 0(zero)분, 약 1분, 약 2분, 약 3분, 약 4분, 약 5분, 약 6분, 약 7분, 약 8분, 약 9분, 약 10분, 약 11분, 약 12분, 약 13분, 약 14분, 약 15분, 약 16분, 약 17분, 약 18분, 약 19분, 약 20분, 약 21분, 약 22분, 약 23분, 약 24분, 약 25분, 약 26분, 약 27분, 약 28분, 약 29분, 약 30분, 약 31분, 약 32분, 약 33분, 약 34분, 약 35분, 약 36분, 약 37분, 약 38분, 약 39분, 약 40분, 약 41분, 약 42분, 약 43분, 약 44분, 약 45분, 약 46분, 약 47분, 약 48분, 약 49분, 약 50분, 약 51분, 약 52분, 약 53분, 약 54분, 약 55분, 약 56분, 약 57분, 약 58분, 약 59분, 약 60분, 약 0(zero)시간, 약 0.5시간, 약 1시간, 약 1.5시간, 약 2시간, 약 2.5시간, 약 3시간, 약 3.5시간, 약 4시간, 약 4.5시간, 약 5시간, 약 5.5시간, 약 6시간, 약 6.5시간, 약 7시간, 약 7.5시간, 약 8시간, 약 8.5시간, 약 9시간, 약 9.5시간, 약 10시간, 약 10.5시간, 약 11시간, 약 11.5시간, 약 12시간, 약 12.5시간, 약 13시간, 약 13.5시간, 약 14시간, 약 14.5시간, 약 15시간, 약 15.5시간, 약 16시간, 약 16.5시간, 약 17시간, 약 17.5시간, 약 18시간, 약 18.5시간, 약 19시간, 약 19.5시간, 약 20시간, 약 20.5시간, 약 21시간, 약 21.5시간, 약 22시간, 약 22.5시간, 약 23시간, 약 23.5시간, 약 24시간, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 또는 약 14일에 얻을 수 있다.

[0139] 약력학 파라미터는 화합물을 기재하기에 적합한 임의의 파라미터일 수 있다.  $C_{max}$ 는 예를 들어 적어도 약 1 ng/mL; 적어도 약 5 ng/mL; 적어도 약 10 ng/mL; 적어도 약 15 ng/mL; 적어도 약 20 ng/mL; 적어도 약 25 ng/mL; 적어도 약 50 ng/mL; 적어도 약 75 ng/mL; 적어도 약 100 ng/mL; 적어도 약 200 ng/mL; 적어도 약 300 ng/mL; 적어도 약 400 ng/mL; 적어도 약 500 ng/mL; 적어도 약 600 ng/mL; 적어도 약 700 ng/mL; 적어도 약 800 ng/mL; 적어도 약 900 ng/mL; 적어도 약 1000 ng/mL; 적어도 약 1250 ng/mL; 적어도 약 1500 ng/mL; 적어도 약 1750 ng/mL; 적어도 약 2000 ng/mL; 적어도 약 2500 ng/mL일 수 있거나; 또는 본 출원에 기재된 화합물의 약력학 프로파일을 기재하기에 적합한 임의의 다른  $C_{max}$ 일 수 있다.  $C_{max}$ 는, 예를 들어, 50  $\mu$ g/kg으로 정맥내 주사에 의해 투여되는 경우, 예를 들어, 혈중 약 5 내지 약 10,000 ng/mL, 약 50 내지 약 10,000 ng/mL, 약 500 내지 약 10,000 ng/mL, 약 5000 내지 약 10,000 ng/mL, 약 1000 내지 약 5,000 ng/mL, 약 1000 내지 약 3,000 ng/mL, 약 5,000 내지 약 8,000 ng/mL 또는 약 500 내지 약 1000 ng/mL일 수 있다.  $C_{max}$ 는, 예를 들어, 50  $\mu$ g/kg으로 피하 주사에 의해 투여되는 경우, 예를 들어, 혈중 약 5 내지 약 50 ng/mL, 약 50 내지 약 500 ng/mL, 약 100 내지 약 250 ng/mL, 약 1000 내지 약 5000 ng/mL, 약 1000 내지 약 2000 ng/mL, 약 2000 내지 약 5000 ng/mL, 약 5000 내지 약 10000 ng/mL 또는 약 5000 내지 약 7000 ng/mL 일 수 있다.  $C_{max}$ 는 투여되는 화합물의 투여량에 의존할 수 있다. 투여된 투여량은 50  $\mu$ g/kg, 100  $\mu$ g/kg, 200  $\mu$ g/kg, 250  $\mu$ g/kg, 300  $\mu$ g/kg, 400  $\mu$ g/kg, 500  $\mu$ g/kg, 600  $\mu$ g/kg, 700  $\mu$ g/kg, 800  $\mu$ g/kg, 900  $\mu$ g/kg, 또는 1000  $\mu$ g/kg일 수 있다.

[0140] 본 출원에 기재된 화합물의  $T_{max}$ 는 예를 들어, 약 0.5시간 이하, 약 1시간 이하, 약 1.5시간 이하, 약 2시간 이하, 약 2.5시간 이하, 약 3시간 이하, 약 3.5시간 이하, 약 4시간 이하, 약 4.5시간 이하, 약 5시간 이하, 약 5.5시간 이하, 약 6시간 이하, 약 6.5시간 이하, 약 7시간 이하, 약 7.5시간 이하, 약 8시간 이하, 약 8.5시간 이하, 약 9시간 이하, 약 9.5시간 이하, 약 10시간 이하, 약 10.5시간 이하, 약 11시간 이하, 약 11.5시간 이하, 약 12시간 이하, 약 12.5시간 이하, 약 13시간 이하, 약 13.5시간 이하, 약 14시간 이하, 약 14.5시간 이하, 약 15시간 이하, 약 15.5시간 이하, 약 16시간 이하, 약 16.5시간 이하, 약 17시간 이하, 약 17.5시간 이하, 약 18시간 이하, 약 18.5시간 이하, 약 19시간 이하, 약 19.5시간 이하, 약 20시간 이하일 수 있거나, 또는 본 출원에 기재된 화합물의 약력학 프로필을 기재하기에 적합한 임의의 다른  $T_{max}$ 일 수 있다.  $T_{max}$ 는 예를 들어, 약 0.1시간 내지 약 24시간; 약 0.1시간 내지 약 0.5시간; 약 0.5시간 내지 약 1시간; 약 1시간 내지 약 1.5시간; 약 1.5시간 내지 약 2시간; 약 2시간 내지 약 2.5시간; 약 2.5시간 내지 약 3시간; 약 3시간 내지 약 3.5시간; 약 3.5시간 내지 약 4시간; 약 4시간 내지 약 4.5시간; 약 4.5시간 내지 약 5시간; 약 5시간 내지 약 5.5시간; 약 5.5시간 내지 약 6시간; 약 6시간 내지 약 6.5시간; 약 6.5시간 내지 약 7시간; 약 7시간 내지 약 7.5시간; 약 7.5시간 내지 약 8시간; 약 8시간 내지 약 8.5시간; 약 8.5시간 내지 약 9시간; 약 9시간 내지 약 9.5시간; 약 9.5시간 내지 약 10시간; 약 10시간 내지 약 10.5시간; 약 10.5시간 내지 약 11시간; 약 11시간 내지 약 11.5시간; 약 11.5시간 내지 약 12시간; 약 12시간 내지 약 12.5시간; 약 12.5시간 내지 약 13시간; 약 13시간 내지 약 13.5시간; 약 13.5시간 내지 약 14시간; 약 14시간 내지 약 14.5시간; 약 14.5시간 내지 약 15시간; 약 15시간 내지 약 15.5시간; 약 15.5시간 내지 약 16시간; 약 16시간 내지 약 16.5시간; 약 16.5시간 내지 약 17시간; 약 17시간 내지 약 17.5시간; 약 17.5시간 내지 약 18시간; 약 18시간 내지 약 18.5시간; 약 18.5시간 내지 약 19시간; 약 19시간 내지 약 19.5시간; 약 19.5시간 내지 약 20시간; 약 20시간 내지 약 20.5시간; 약 20.5시간 내지 약 21시간; 약 21시간 내지 약 21.5시간; 약 21.5시간 내지 약 22시간; 약 22시간 내지 약 22.5시간; 약 22.5시간 내지 약 23시간; 약 23시간 내지 약 23.5시간; 또는 약 23.5시간 내지 약 24시간일 수 있다.

[0141] 본 출원에 기재된 화합물의  $AUC_{(0-inf)}$ ( $AUC_{(0-\infty)}$ 로도 칭함) 또는  $AUC_{(last)}$ 는 예를 들어, 적어도 약 1 ng · hr/mL, 적어도 약 5 ng · hr/mL, 적어도 약 10 ng · hr/mL, 적어도 약 20 ng · hr/mL, 적어도 약 30 ng · hr/mL, 적어도 약 40 ng · hr/mL, 적어도 약 50 ng · hr/mL, 적어도 약 100 ng · hr/mL, 적어도 약 150 ng · hr/mL, 적어도 약 200 ng · hr/mL, 적어도 약 250 ng · hr/mL, 적어도 약 300 ng · hr/mL, 적어도 약 350 ng · hr/mL, 적어도 약 400 ng · hr/mL, 적어도 약 450 ng · hr/mL, 적어도 약 500 ng · hr/mL, 적어도 약 600 ng · hr/mL, 적어도 약 700 ng · hr/mL, 적어도 약 800 ng · hr/mL, 적어도 약 900 ng · hr/mL, 적어도 약 1000 ng · hr/mL, 적어도 약 1250 ng · hr/mL, 적어도 약 1500 ng · hr/mL, 적어도 약 1750 ng · hr/mL, 적어도 약 2000 ng · hr/mL, 적어도 약 2500 ng · hr/mL, 적어도 약 3000 ng · hr/mL, 적어도 약 3500 ng · hr/mL, 적어도 약 4000 ng · hr/mL, 적어도 약 5000 ng · hr/mL, 적어도 약 6000 ng · hr/mL, 적어도 약 7000 ng · hr/mL, 적어도 약 8000 ng · hr/mL, 적어도 약 9000 ng · hr/mL, 적어도 약 10,000 ng · hr/mL, 적어도 약 11,000 ng · hr/mL, 적어도 약 12,000 ng · hr/mL, 적어도 약 13,000 ng · hr/mL, 적어도 약 14,000 ng · hr/mL, 적어도 약 15,000 ng · hr/mL, 적어도 약 16,000 ng · hr/mL, 적어도 약 17,000 ng · hr/mL, 적어도 약 18,000 ng · hr/mL, 적어도 약 19,000 ng · hr/mL, 적어도 약 20,000 ng · hr/mL일 수 있거나, 또는 본 출원에 기재된 화합물의 약력학 프로필을 기재하기에 적합한 임의의 다른  $AUC_{(0-inf)}$ 일 수 있다. 화합물의  $AUC_{(0-inf)}$ 는 예를 들어, 약 1 ng · hr/mL 내지 약 10,000 ng · hr/mL; 약 1 ng · hr/mL 내지 약 10 ng · hr/mL; 약 10 ng · hr/mL 내지 약 25 ng · hr/mL; 약 25 ng · hr/mL 내지 약 50 ng · hr/mL; 약 50 ng · hr/mL 내지 약 100 ng · hr/mL; 약 100 ng · hr/mL 내지 약 200 ng · hr/mL; 약 200 ng · hr/mL 내지 약 300 ng · hr/mL; 약 300 ng · hr/mL 내지 약 400 ng · hr/mL; 약 400 ng · hr/mL 내지 약 500 ng · hr/mL; 약 500 ng · hr/mL 내지 약 600 ng · hr/mL; 약 600 ng · hr/mL 내지 약 700 ng · hr/mL; 약 700 ng · hr/mL 내지 약 800 ng · hr/mL; 약 800 ng · hr/mL 내지 약 900 ng · hr/mL; 약 900 ng · hr/mL 내지 약 1,000 ng · hr/mL; 약 1,000 ng · hr/mL 내지 약 1,250 ng · hr/mL; 약 1,250 ng · hr/mL 내지 약 1,500 ng · hr/mL; 약 1,500 ng · hr/mL 내지 약 1,750 ng · hr/mL; 약 1,750 ng · hr/mL 내지 약 2,000 ng · hr/mL; 약 2,000 ng · hr/mL 내지 약 2,500 ng · hr/mL; 약 2,500 ng · hr/mL 내지 약 3,000 ng · hr/mL; 약 3,000 ng · hr/mL 내지 약 3,500 ng · hr/mL; 약 3,500 ng · hr/mL 내지 약 4,000 ng · hr/mL; 약 4,000 ng · hr/mL 내지 약 4,500 ng · hr/mL; 약 4,500 ng · hr/mL 내지 약 5,000 ng · hr/mL; 약 5,000 ng · hr/mL 내지 약 5,500 ng · hr/mL; 약 5,500 ng · hr/mL 내지 약 6,000 ng · hr/mL; 약 6,000 ng · hr/mL 내지 약 6,500 ng · hr/mL; 약 6,500 ng · hr/mL 내지 약 7,000 ng · hr/mL; 약 7,000 ng · hr/mL 내지 약 7,500 ng · hr/mL; 약 7,500 ng · hr/mL 내지 약 8,000 ng · hr/mL; 약 8,000 ng · hr/mL 내지 약 8,500 ng · hr/mL; 약 8,500 ng · hr/mL 내지 약 9,000 ng · hr/mL; 약 9,000 ng · hr/mL 내지 약 9,500

ng · hr/mL; 약 9,500 ng · hr/mL 내지 약 10,000 ng · hr/mL; 약 10,000 ng · hr/mL 내지 약 10,500 ng · hr/mL; 약 10,500 ng · hr/mL 내지 약 11,000 ng · hr/mL; 약 11,000 ng · hr/mL 내지 약 11,500 ng · hr/mL; 약 11,500 ng · hr/mL 내지 약 12,000 ng · hr/mL; 약 12,000 ng · hr/mL 내지 약 12,500 ng · hr/mL; 약 12,500 ng · hr/mL 내지 약 13,000 ng · hr/mL; 약 13,000 ng · hr/mL 내지 약 13,500 ng · hr/mL; 약 13,500 ng · hr/mL 내지 약 14,000 ng · hr/mL; 약 14,000 ng · hr/mL 내지 약 14,500 ng · hr/mL; 약 14,500 ng · hr/mL 내지 약 15,000 ng · hr/mL; 약 15,000 ng · hr/mL 내지 약 15,500 ng · hr/mL; 약 15,500 ng · hr/mL 내지 약 16,000 ng · hr/mL; 약 16,000 ng · hr/mL 내지 약 16,500 ng · hr/mL; 약 16,500 ng · hr/mL 내지 약 17,000 ng · hr/mL; 약 17,000 ng · hr/mL 내지 약 17,500 ng · hr/mL; 약 17,500 ng · hr/mL 내지 약 18,000 ng · hr/mL; 약 18,000 ng · hr/mL 내지 약 18,500 ng · hr/mL; 약 18,500 ng · hr/mL 내지 약 19,000 ng · hr/mL; 약 19,000 ng · hr/mL 내지 약 19,500 ng · hr/mL; 또는 약 19,500 ng · hr/mL 내지 약 20,000 ng · hr/mL일 수 있다. 예를 들어, 화합물의 AUC<sub>(0-inf)</sub>는, 50 μg/kg으로 정맥내 투여되는 경우, 약 8500 ng · hr/mL 또는 50 μg/kg으로 피하 투여되는 경우, 약 4000 ng · hr/mL일 수 있다.

[0142] 본 출원에 기재된 화합물의 혈장 농도는 예를 들어, 적어도 약 1 ng/mL, 적어도 약 5 ng/mL, 적어도 약 10 ng/mL, 적어도 약 15 ng/mL, 적어도 약 20 ng/mL, 적어도 약 25 ng/mL, 적어도 약 50 ng/mL, 적어도 약 75 ng/mL, 적어도 약 100 ng/mL, 적어도 약 150 ng/mL, 적어도 약 200 ng/mL, 적어도 약 300 ng/mL, 적어도 약 400 ng/mL, 적어도 약 500 ng/mL, 적어도 약 600 ng/mL, 적어도 약 700 ng/mL, 적어도 약 800 ng/mL, 적어도 약 900 ng/mL, 적어도 약 1000 ng/mL, 적어도 약 1200 ng/mL, 또는 본 출원에 기재된 화합물의 임의의 다른 혈장 농도일 수 있다. 혈장 농도는 예를 들어, 약 1 ng/mL 내지 약 2,000 ng/mL; 약 1 ng/mL 내지 약 5 ng/mL; 약 5 ng/mL 내지 약 10 ng/mL; 약 10 ng/mL 내지 약 25 ng/mL; 약 25 ng/mL 내지 약 50 ng/mL; 약 50 ng/mL 내지 약 75 ng/mL; 약 75 ng/mL 내지 약 100 ng/mL; 약 100 ng/mL 내지 약 150 ng/mL; 약 150 ng/mL 내지 약 200 ng/mL; 약 200 ng/mL 내지 약 250 ng/mL; 약 250 ng/mL 내지 약 300 ng/mL; 약 300 ng/mL 내지 약 350 ng/mL; 약 350 ng/mL 내지 약 400 ng/mL; 약 400 ng/mL 내지 약 450 ng/mL; 약 450 ng/mL 내지 약 500 ng/mL; 약 500 ng/mL 내지 약 600 ng/mL; 약 600 ng/mL 내지 약 700 ng/mL; 약 700 ng/mL 내지 약 800 ng/mL; 약 800 ng/mL 내지 약 900 ng/mL; 약 900 ng/mL 내지 약 1,000 ng/mL; 약 1,000 ng/mL 내지 약 1,100 ng/mL; 약 1,100 ng/mL 내지 약 1,200 ng/mL; 약 1,200 ng/mL 내지 약 1,300 ng/mL; 약 1,300 ng/mL 내지 약 1,400 ng/mL; 약 1,400 ng/mL 내지 약 1,500 ng/mL; 약 1,500 ng/mL 내지 약 1,600 ng/mL; 약 1,600 ng/mL 내지 약 1,700 ng/mL; 약 1,700 ng/mL 내지 약 1,800 ng/mL; 약 1,800 ng/mL 내지 약 1,900 ng/mL; 또는 약 1,900 ng/mL 내지 약 2,000 ng/mL일 수 있다.

[0143] 약력학 파라미터는 본 개시의 조성물을 나타내기 위해 적합한 임의의 파라미터일 수 있다. 예를 들어, 약력학 프로파일은, 예를 들어 약 24시간, 약 48시간, 약 72시간, 또는 1주 동안 증가된 Treg 세포 계수를 나타낼 수 있다.

[0144] 본 발명의 방법으로 투여된 화합물에 대해 계산될 수 있는 약력학 및 약물동력학 파라미터의 비제한적인 예는

a) 투여량  $D$ 로서 나타낼 수 있는, 투여된 약물의 양; b)  $\tau$ 로서 나타낼 수 있는, 투여 간격; c) 분배의 부피  $V_d$ , 이때  $V_d = D/C_0$ 로 나타낼 수 있는, 약물이 분배되는 겉보기 부피; d) 농도  $C_0$  또는  $C_{ss}$ , 이때  $C_0$  또는  $C_{ss} = D/V_d$ 로 나타낼 수 있고 및 복수의 샘플에 대해 평균 혈장 농도로서 나타낼 수 있는, 주어진 혈장 부피 중의 약물의 양; e) 약물의 반감기  $t_{1/2}$ , 이때  $t_{1/2} = \ln(2)/k_e$ ; f) 약물이 신체로부터 제거되는 속도  $k_e$ , 이때  $k_e = \ln(2)/t_{1/2} = CL/V_d$ ; g) 식  $K_{in}$ , 이때  $K_{in} = C_{ss} \cdot CL$ 의 평형에 필요한 주입 속도; h) AUC<sub>0-∞</sub>, 이때  $\int_0^{\infty} C dt$ 로서 나타낼 수 있

거나, 또는 정상 상태에서, AUC<sub>τ, ss</sub>, 이때  $\int_t^{t+\tau} C dt$ 로서 나타낼 수 있는 단일 투여량의 투여 후 농도-시간 곡선의 적분값; i) CL (클리어런스), 이때  $CL = V_d \cdot k_e = D/AUC$ 로서 나타낼 수 있는, 단위시간당 약물의 제거된 혈

장의 부피; j)  $f$ , 이때  $f = \frac{AUC_{po, Div}}{AUC_{iv, Dpo}}$ 로서 나타낼 수 있는, 약물의 전신적으로 이용 가능한 분획; k) 투여 후 약물의 최고 혈장 농도  $C_{max}$ ; l)  $C_{max}$ 에 도달하기 위해 약물에 의해 소요된 시간,  $t_{max}$ ; m) 차회 투여량이 투여되기

이전에 약물이 도달하는 최저 농도  $C_{min}$ ; 및 n)  $\%PTF = 100 \cdot \frac{(C_{max, ss} - C_{min, ss})}{C_{av, ss}}$ , 이때  $C_{av, ss} = \frac{AUC_{\tau, ss}}{\tau}$ 로서 나타낼 수 있는, 정상 상태에서 하나의 투여 간격 내의 피크 트로프 변동을 포함한다.

[0145] 본 개시의 화합물은, 대상체에게 투여되는 경우, 높은 안정성을 보유할 수 있다. 투여된 화합물은 약 6시간 초과, 약 7시간 초과, 약 8시간 초과, 약 9시간 초과, 약 10시간 초과, 약 11시간 초과, 약 12시간 초과, 약 13시간 초과, 약 14시간 초과, 약 15시간 초과, 약 16시간 초과, 약 17시간 초과, 약 18시간 초과, 약 19시간 초과, 약 20시간 초과, 약 21시간 초과, 약 22시간 초과, 약 23시간 초과, 약 24시간 초과, 약 25시간 초과, 약 26시간 초과, 약 27시간 초과, 약 28시간 초과, 약 29시간 초과, 약 30시간 초과, 약 31시간 초과, 약 32시간 초과, 약 33시간 초과, 약 34시간 초과, 약 35시간 초과, 약 36시간 초과, 약 37시간 초과, 약 38시간 초과, 약 39시간 초과, 약 40시간 초과, 약 41시간 초과, 약 42시간 초과, 약 43시간 초과, 약 44시간 초과, 약 45시간 초과, 약 46시간 초과, 약 47시간 초과, 약 48시간 초과, 약 49시간 초과, 약 50시간 초과, 약 51시간 초과, 약 52시간 초과, 약 53시간 초과, 약 54시간 초과, 약 55시간 초과, 약 56시간 초과, 약 57시간 초과, 약 58시간 초과, 약 59시간 초과, 약 60시간 초과, 약 61시간 초과, 약 62시간 초과, 약 63시간 초과, 또는 약 64시간 초과와 생리적 반감기를 보유할 수 있다.

[0146] 본 개시의 화합물의 반감기는 투여된 투여량에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 화합물의 반감기는, 50 µg/kg의 투여량으로 투여되는 경우에는, 동일한 화합물을 100 µg/kg 또는 250 µg/kg의 투여량으로 투여되는 경우의 반감기보다 더 짧아질 수 있다. 화합물의 반감기는 사용된 투여 경로에 따라 달라질 수 있다. 화합물의 반감기는, 화합물이 정맥내 투여되는 것보다는 오히려 피하 투여되는 경우에 더 길어질 수 있다. 예를 들어 피하로 전달된 화합물의 반감기는 약 15시간 내지 약 25시간일 수 있지만, 정맥 내로 전달된 화합물의 반감기는 약 5시간 내지 약 15시간일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 50 µg/kg으로 정맥내 투여되는 경우 화합물의 반감기는 약 6시간 내지 약 14시간, 약 7시간 내지 약 13시간, 약 8시간 내지 약 12시간, 또는 약 9시간 내지 약 11시간일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 50 µg/kg으로 정맥내 투여되는 경우 화합물의 반감기는 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 13시간, 약 14시간, 또는 약 15시간일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 50 µg/kg으로 피하 투여되는 경우 화합물의 반감기는 약 15시간 내지 약 27시간, 약 16시간 내지 약 26시간, 약 17시간 내지 약 25시간, 약 18시간 내지 약 24시간, 약 19시간 내지 약 23시간, 또는 약 20시간 내지 약 22시간일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 50 µg/kg으로 피하 투여되는 경우 화합물의 반감기는 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 13시간, 약 14시간, 약 15시간, 약 16시간, 약 17시간, 약 18시간, 약 19시간, 약 21시간, 약 22시간, 약 23시간, 약 24시간, 약 25시간, 약 26시간, 약 27시간, 약 28시간, 약 29시간, 또는 약 30시간일 수 있다. 혈액으로부터 화합물의 클리어런스는 피하로 전달된 화합물의 경우보다 정맥내로 전달된 화합물의 경우 더 빠를 수 있다.

[0147] 이량체 단백질의 생성: 이형이량체 및 동형이량체

[0148] 몇몇 실시양태에서, 본 개시의 화합물은 이형이량체, 예를 들어, 제1 융합 단백질의 부분인 IL2R-결합 모이어티 (예를 들어, IL-2 또는 IL-2 변이체) 및 제2 융합 단백질의 부분인 ST2-결합 모이어티 (예를 들어 IL-33, IL-33 변이체, ST2에 결합하는 항체, 또는 이의 항원 결합 단편)를 포함하는 이형이량체이다. 몇몇 실시양태에서, 제1 및 제2 융합 단백질 각각은 IgG Fc 도메인, 예를 들어 IgG1 Fc 도메인 또는 이의 변이체를 포함한다. 이형이량체는 2개의 구성적 재조합 단백질을 개별적으로 발현시키고, 이를 정제하고, 이들을 시험관 내에서 조합하여 이황화-연결된 이형이량체를 형성함으로써 제조될 수 있다. 또한, 이형이량체 Fc 융합 단백질은 "늑 인투 홀 (knobs into holes)" 어프로치를 이용하여 2개의 구성적 cDNA 구성체로 형질감염된 단일 세포에서 제조될 수 있다. 이러한 전략에 의해, 돌연변이는 동형이량체의 형성을 방해하지만, 이형이량체의 형성을 촉진하는 상보적 계면을 형성하는 2개의 Fc 폴리펩티드 사이의 CH2-CH3 계면 내로 도입된다. 이러한 방식에서, 이형이량체 Fc 융합 단백질은 재조합 단백질을 발현하는 세포 내에서 형성될 수 있고, 이량체 단백질로서 분비될 수 있다. 다음은 인간 IgG1 백그라운드 상에서 그러한 Fc 구성체의 2가지 예이다. 돌연변이된 잔기 T366Y 및 Y407T는 굵고 밑줄 친 서체로 나타내고, N297A 잔기는 밑줄로 나타낸다.

(A) IgG1 Fc (N297A; T366Y):  
 DKTIHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKARKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLVCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTIPPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열번호: 8)

[0149]

(B) IgG1 Fc (N297A; Y407T):  
 DKTHICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
 EVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQ  
 PREPQVYVLPISRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKITPPVLDSDGSF  
 FLTISKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열번호: 9)

[0150]

[0151]

2개의 상이한 결합 모이어티, 예를 들어 IL-2 및 IL-33은 이형이량체 단백질을 구성하기 위해 각각 Fc 서열 (A) 및 (B)에 첨부될 수 있다.

[0152]

몇몇 실시양태에서, 제1 융합 단백질은 돌연변이 T350V, L351Y, F405A 및 Y407V(예를 들어, 서열번호 4)를 포함하는 IgG1 Fc 도메인을 포함하고; 제2 융합 단백질은 돌연변이 T350V, T366L, K392L 및 T394W(예를 들어, 서열번호 5)를 포함한다. 그러한 돌연변이는 적절한 쌍 형성 및 안정성을 개선시키는 것으로 보고되어 왔다(Von Kreudenstein et al., 2013, mAbs 5: 646-654; WO 2014082179 A1). 예시적인 인간 IgG1 Fc 도메인 서열은 하기에 나타내고, 이는 밑줄 친 서체로 나타낸 N297A 돌연변이, 및 굵고 밑줄 친 서체로 나타낸 T350V, L351Y, F405A, Y407V, T350V, T366L, K392L 및 T394W 돌연변이를 보유한다.

(A) IgG1 Fc (N297A, T350V, L351Y, F405A 및 Y407V)

DKTHICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
 EVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQ  
 PREPQVYVYPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKITPPVLDSDGSF  
 AAVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열번호: 4)

[0153]

(B) IgG1 Fc (N297A, T350V, T366L, K392L 및 T394W)

DKTHICPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDILMISRPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG  
 EVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQ  
 PREPQVYVYLPISRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYLTVPPVLDSDGS  
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (서열번호: 5)

[0154]

[0155]

예시적인 이형이량체는 도 4A, 4B, 4C, 4D 및 4E에 나타낸다.

[0156]

몇몇 실시양태에서, 본 개시의 화합물은 동형이량체, 예를 들어 2개의 동일한 융합 단백질을 포함하고, 각각이 IL2R-결합 모이어티(예를 들어, IL-2 또는 IL-2 변이체) 및 ST2-결합 모이어티(예를 들어, IL-33, IL-33 변이체, ST2에 결합하는 항체, 또는 이의 항원 결합 단편)를 포함하는 동형이량체이다. 몇몇 실시양태에서, 2개의 동일한 융합 단백질의 각각은 IgG Fc 도메인, 예를 들어 IgG1 Fc 도메인 또는 이의 변이체를 포함한다. 특정 실시양태에서, IgG1 Fc 도메인은 N297A 돌연변이를 포함하는 인간 IgG1 Fc 도메인(예를 들어, 서열번호 7)이다. 예시적인 동형이량체는 1F 및 1G에 나타낸다.

[0157]

IL2R-결합 모이어티(예를 들어, IL-2 또는 IL-2 변이체) 및 ST2-결합 모이어티(예를 들어, IL-33, IL-33 변이체, ST2에 결합하는 항체, 또는 이의 항원 결합 단편)는 직접 또는 캡티드 링커(예를 들어, G<sub>4</sub>S 링커)를 통해 IgG Fc 도메인의 N-말단 또는 C-말단에 부착될 수 있다. IL2R-결합 모이어티 및 ST2-결합 모이어티의 여러 가지 조합이 사용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 IgG Fc 도메인의 N-말단에 IL2R-결합 모이어티를 포함하는 제1 융합 단백질, 및 IgG Fc 도메인의 C-말단에 ST2-결합 모이어티를 포함하는 제2 융합 단백질을 포함한다(참조: 예를 들어, 도 4A). 몇몇 실시양태에서, 제1 융합 단백질은 IgG Fc 도메인의 N-말단에 IL2R-결합 모이어티를 포함하고, 제2 융합 단백질은 IgG Fc 도메인의 N-말단에 ST2-결합 모이어티를 포함한다(참조: 예를 들어, 도 4B 및 5D). 몇몇 실시양태에서, 제1 융합 단백질은 IgG Fc 도메인의 C-말단에 IL2R-결합 모이어티를 포함하고, 제2 융합 단백질은 IgG Fc 도메인의 N-말단에 ST2-결합 모이어티를 포함한다(참조: 예를 들어, 도 4C 및 5C). 몇몇 실시양태에서, 제1 융합 단백질은 IgG Fc 도메인의 C-말단에 IL2R-결합 모이어티를 포함하고, 제2 융합 단백질은 IgG Fc 도메인의 C-말단에 ST2-결합 모이어티를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 제1 융합 단백질은 IgG Fc 도메인의 N-말단에 ST2-결합 모이어티 및 IgG Fc 도메인의 C-말단에 IL2R-결합 모이어티를 포함하고, 제2 융합 단백질은 IgG Fc 도메인의 N-말단에 ST2-결합 모이어티를 포함한다(참조: 예를 들어, 도 4D 및 5B). 몇몇 실시양태에서, 제1 융합 단백질은 IgG Fc 도메인의 N-말단에 ST2-결합 모이어티 및 IgG Fc 도메인의 C-말단에 IL2R-결합 모이어티를 포함하고, 제2 융합 단백질은 IgG Fc 도메인의 N-말단에 IL2R-결합 모이어티를 포함한다(참조: 예를 들어, 도 4E). 몇몇 실시양태에서, 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질 둘 다는 IgG Fc 도메인의 N-말단에 ST2-결합 모이어티 및 IgG Fc 도메인의 C-말단에 IL2R-결합 모이어티를 포함한다(참조: 예를 들어, 도 4F 및 도 5A). 몇몇 실시양태에서, 제1 융합 단백질 및 제2 융합 단백질 둘 다는 IgG Fc 도메인의 N-말단에 IL2R-결합 모이어티 및 IgG Fc 도메인의 C-말단에 ST2-결합 모이어티를 포함한다(참조: 예를 들어, 도

4G). 몇몇 실시양태에서, 제1 융합 단백질은 IgG Fc 도메인의 C-말단에 IL2R-결합 모이어티를 포함하고, 제2 융합 단백질은 IgG Fc 도메인의 N-말단에 ST2-결합 모이어티 및 IgG Fc 도메인의 C-말단에 IL2R-결합 모이어티를 포함한다(참조: 예를 들어, 도 5E).

- [0158] 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 적어도 하나의 IL2R-결합 모이어티(예를 들어, IL-2 또는 IL-2 변이체) 및 적어도 하나의 ST2-결합 모이어티(예를 들어, IL-33, IL-33 변이체, ST2에 결합하는 항체, 또는 이의 항원 결합 단편)를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 단지 하나의 IL2R-결합 모이어티를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 단지 하나의 ST2-결합 모이어티를 포함한다.
- [0159] 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 적어도 2개의 IL2R-결합 모이어티를 포함한다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 제1 및 제2 융합 단백질 각각은 적어도 하나의 IL2R-결합 모이어티를 함유한다. 예를 들어, 도 4E, 4F 및 4G를 참조. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 적어도 2개의 ST2-결합 모이어티를 포함한다. 예를 들어, 몇몇 실시양태에서, 제1 및 제2 융합 단백질 각각은 적어도 하나의 ST2-결합 모이어티를 함유한다. 예를 들어, 도 4D, 4F, 및 4G를 참조.
- [0160] 본 출원에 기재된 임의의 실시양태에서, IL2R-결합 모이어티 및 ST2-결합 모이어티는 펩티드 링커(예를 들어 a G<sub>4</sub>S 링커)에 의해 IgG Fc 도메인에 부착될 수 있다. 이량체 단백질은 1, 2, 3, 4개 또는 그 이상의 펩티드 링커를 함유할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 적어도 1, 2, 3 또는 4개의 펩티드 링커를 포함한다.
- [0161] 몇몇 실시양태에서, IL2R-결합 모이어티 및/또는 ST2-결합 모이어티는 펩티드 결합을 통해, 즉 결합 모이어티와 IgG Fc 도메인 사이에 펩티드 링커의 첨가 없이 직접적으로 IgG Fc 도메인에 융합된다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 펩티드 링커를 포함하지 않는다.
- [0162] 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질의 제1 융합 단백질은, IL-2 결합 모이어티(예를 들어, 인간 IL-2 단백질 도메인 또는 이의 변이체)의 C-말단이 펩티드 결합을 통해 제1 펩티드 링커 도메인의 N-말단에 융합되고; IgG Fc 단백질 도메인의 N-말단이 펩티드 결합을 통해 제1 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 융합되도록 구성된다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질의 제2 융합 단백질은, 제2 IgG Fc 단백질 도메인의 C-말단이 펩티드 결합을 통해 제2 펩티드 링커 도메인의 N-말단에 융합되고; ST2에 결합하는 단백질 도메인의 N-말단이 펩티드 결합을 통해 제2 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 융합되도록 구성된다. 예를 들어, 도 4A를 참조. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질의 제2 융합 단백질은, ST2 결합 모이어티의 C-말단이 펩티드 결합을 통해 제2 펩티드 링커 도메인의 N-말단에 융합되고; 제2 IgG Fc 단백질 도메인의 N-말단이 펩티드 결합을 통해 제2 펩티드 링커 도메인의 C-말단에 융합되도록 구성된다. 예를 들어, 도 4B를 참조.
- [0163] 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 12의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 13의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 14의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 15의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 16의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 17의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 18의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 19의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 20의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 21의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 22의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질

질은 서열번호 23의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 24의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 25의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 26의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 27의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 28의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 29의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 이량체 단백질은 서열번호 30의 아미노산 서열에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 보유하는 융합 단백질을 포함한다.

서열목록내 서열의 설명

서열번호:	설명
1	N88R 및 C125S 돌연변이를 포함하는 인간 IL-2
2	야생형 인간 IL-2
3	T3A, N88R, 및 C125S 돌연변이를 포함하는 인간 IL-2
4	인간 IgG1 Fc(N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)
5	인간 IgG1 Fc(N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)
6	펩티드 링커 GGGGSGGGGSGGGGS (G4S) <sub>3</sub>
7	인간 IgG1 Fc 모이어티 (N297A)
8	인간 IgG1 Fc (T366Y)
9	인간 IgG1 Fc (Y407T)
10	야생형 인간 IL-33 의 잔기 112-170
11	C208S, C227S, C232S 및 C259S 돌연변이를 포함하는 인간 IL-33 의 잔기 112-170
12	IL-2(N88R, C125S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc(N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V) 융합 단백질 도 4A
13	IgG1 Fc (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S) 융합 단백질 도 4A

[0164]

14.	IL-2(N88R, C125)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W) 융합 단백질 도 4B
15	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V) 융합 단백질 도 4B
16	IgG1 Fc (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-2(N88R, C125) 융합 단백질 도 4C
17	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-2(N88R, C125) 융합 단백질 도 4D
18	IL-2(N88R, C125)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S) 융합 단백질 도 4E
19	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-2(N88R, C125) 융합 단백질 도 4F

[0165]

20	IL-2(N88R, C125) 융합 단백질/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S) 융합 단백질 도 4G
21	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A) 융합 단백질 도 4J
22	Ab2 중(heavy)IL2vC
23	Ab4 중 IL2vC
24	Ab2 중 IL2vC(W)
25	Ab4 중 IL2vC(W)
26	Ab2 중(V)
27	Ab4 중(V)
28	IL2vCFc(V)
29	Ab2 카파
30	Ab4 카파
31	GGGGG 펩티드 링커

[0166]

[0167]

**실시예**

[0168]

**실시예 1. 이중 특이성 분자를 표적화하는 IL2R 및 ST2의 구성**

[0169]

ST2(IL-33 수용체), 및 IL-2 고 친화성 수용체를 표적화하는 이중 특이성 분자를 구성하였다. 모든 구성된 분자는 하기 표 1 및 표 2에 목록화된다. 그들의 모식도는 도 4 및 5에 나타낸다.

[0170]

표 1 및 도 4의 이중 특이성 분자는 Fc 융합 단백질이고, IL-2 고 친화성 수용체 작용제(즉, IL-2 변이체) 및 IL-33 변이체인 수용체 표적화 모이어티로 구성된다. 각각의 분자는 N 또는 C 말단에 1가 또는 2가 수용체 표적화 모이어티를 함유한다. 펩티드 링커, (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>는 인간 IgG1 Fc 도메인과 수용체 표적화 모이어티를 연결한다. Fc 도메인은 감소된 FcγR 및 C1q 결합에 대해 치환 N297A를 포함하고, 따라서 Fc 효과기 기능을 감소시킨다. IL-33 모이어티는 IL-33 단백질의 생활성 형태인, 인간 IL-33의 Ser112-Thr270 단편을 포함한다. 또한, IL-33 모이어티는 치환 C208S, C227S, C232S 및 C259S를 함유한다. 시스테인의 세린으로의 치환은 산화에 의해 IL-33의 불활성화를 방지하는 것으로 보고되어 왔다(Cohen et al., 2015, Nature Commun 6: 8327; W02016/156440). 이러한 변이체는 HEK293 세포에서 활성 IL-33 변이체 함유 단백질의 생성을 용이하게 하기 위해 선택되었다. IL-2 수용체 작용제는 야생형 인간 IL-2 서열(서열번호 2)에 비해 치환 N88R 및 C125S를 함유하는 133개의 아미노산 인간 IL-2 변이체이다.

[0171]

표 2 및 도 5의 이중 특이성 분자는 인간 IL-2 변이체(N88R, C125S) 및 항-ST2 항체의 항원-결합 단편(Fab)으로 구성된다. 개념 증명으로서, 2개의 항-ST2 mAb, 즉 Ab2 및 Ab4는 공개된 특허 출원(US2017/0002079 A1)으로부터 선택되었다. 각각의 이중 특이성 분자는 항-ST2 항원 결합 단편에 대해 1가 또는 2가이고, 펩티드 링커, 즉 (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>을 통해 N 또는 C 말단에서 IL-2 수용체 작용제에 공유적으로 연결된다.

[0172]

이형이량체 Fc 단백질의 생성은 잠재적인 동형이량체 오염에 기인하여 챌린징될 수 있다. 본 실시예에서 모든 이형이량체 분자는 원하지 않는 동형이량체 쌍 형성을 감소시키기 위해 Fc 도메인 상에 돌연변이를 보유한다. 돌연변이는 하나의 사슬 상의 T350V, L351Y, F405A & Y407V; 및 다른 사슬 상의 T350V, T366L, K392L & T394W

를 보유한다. 그러한 돌연변이는 적합한 쌍 형성 및 안정성을 개선시키는 것으로 보고되어 왔다(Von Kreudenstein et al., 2013, mAbs 5: 646-654; WO 2014082179 A1).

**표 1**

인간 IgG1 Fc 영역 및 인간 IL-33 변이체(C208S, C227S, C232S, C259S), 또는 인간 IL-2 변이체(N88R, C125S)와 인간 IL-33 변이체의 조합을 포함하는 이량체 단백질. 단백질의 다이어그램은 도 4A-4J에 제공된다. 이량체 단백질 명칭에서, "N"은 Fc 도메인에 대한 N-말단 융합을 나타내고, "C"는 C-말단 융합을 나타내며, "M"은 1 가를 나타내며, "B"는 2가를 나타내며, 및 "v"는 변이체를 나타낸다.

이량체 단백질 (도)	융합 단백질	서열번호:
IL2vNM-IL33vCM (4A)	IL-2(N88R, C125S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	12
	IgG1 Fc (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)	13
IL2vNM-IL33vNM (4B)	IL-2(N88R, C125S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)	14
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	15
IL33vNM-IL2vCM (4C)	IgG1 Fc (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-2(N88R, C125S)	16
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	15
IL33vNB-IL2vCM (4D)	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-2(N88R, C125S)	17
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	15

[0173]

IL2vNB-IL33vCM (4E)	IL-2(N88R, C125)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)	18
	IL-2(N88R, C125)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	12
IL33vNB-IL2vCB (4F)	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-2(N88R, C125)	19
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-2(N88R, C125)	19
IL2vNB-IL33vCB (4G)	IL-2(N88R, C125)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)	20
	IL-2(N88R, C125)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)	20
IL33vNM (4H)	IgG1 Fc (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)	5
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	15
IL33vCM (4I)	IgG1 Fc (N297A, T350V, T366L, K392L, T394W)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)	13
	IgG1 Fc (N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V)	4
IL33vNB (4J)	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A)	21
	IL-33 (C208S, C227S, C232S, C259S)/(G4S) <sub>3</sub> 링커/IgG1 Fc (N297A)	21

[0174]

표 2

Fc 영역, 항-ST2 항체의 항원-결합 단편, 및 IL-2 변이체(N88R, C125S)를 포함하는 이량체 단백질. 단백질의 다이어그램은 도 5A-5E에 제공된다.

도	이량체 단백질	중쇄 1 (융합 단백질)	중쇄 2 (융합 단백질)	경쇄
5A	Ab2-IL2vCB	Ab2Heavy-IL2vC (서열번호: 22)	(중쇄 1과 동일, 동형이량체)	Ab2카파 (서열번호: 29)
	Ab4-IL2vCB	Ab4Heavy-IL2vC (서열번호: 23)	(중쇄 1과 동일, 동형이량체)	Ab4카파 (서열번호: 30)
5B	Ab2-IL2vCM	Ab2Heavy(V) (서열번호: 26)	Ab2HeavyIL2vC(W) (서열번호: 24)	Ab2카파 (서열번호: 29)
	Ab4-IL2vCM	Ab4Heavy(V) (서열번호: 27)	Ab4HeavyIL2vC(W) (서열번호: 25)	Ab4카파 (서열번호: 30)
5C	Ab2M-IL2vCM	Ab2Heavy(V) (서열번호: 26)	IL2vCFc(W) (서열번호: 16)	Ab2카파 (서열번호: 29)
	Ab4M-IL2vCM	Ab4Heavy(V) (서열번호: 27)	IL2vCFc(W) (서열번호: 16)	Ab4카파 (서열번호: 30)
5D	Ab2M-IL2vNM	Ab2Heavy(V) (서열번호: 26)	IL2vNFC(W) (서열번호: 14)	Ab2카파 (서열번호: 29)
	Ab4M-IL2vNM	Ab4Heavy(V) (서열번호: 27)	IL2vNFC(W) (서열번호: 14)	Ab4카파 (서열번호: 30)
5E	Ab2M-IL2vCB	IL2vCFc(V) (서열번호: 28)	Ab2중IL2vC(W) (서열번호: 24)	Ab2카파 (서열번호: 29)
	Ab4M-IL2vCB	IL2vCFc(V) (서열번호: 28)	Ab4HeavyIL2C(W) (서열번호: 25)	Ab4카파 (서열번호: 30)

[0175]

[0176]

모든 분자들은 일시적으로 형질감염된 HEK293 세포에서 생성되고, 단백질 A 친화성 크로마토그래피, 이어서 크기 배제 크로마토그래피에 의해 정제되었다. IL2vNM-IL33vCM(도 4A)에 비해 현저히 감소된 단백질 발현 수준으로 인해, 하기 분자들은 결합 특성화에 포함되지 않았다: IL33vNM-IL2vCM(도 4C), IL33vNB-IL2vCM(도 4D), IL2vNB-IL33vCM(도 4E), IL33vNB-IL2vCB(도 4F), 및 IL2vNB-IL33vCB(도 4G).

[0177]

**실시예 2. IL33-IL2v 이중 특이성 분자의 결합 특성 규명**

[0178]

IL2Ra(Lake Pharma, Inc.) 및 ST2(Sino Biological)의 외세포성 도메인(ECD)에 대한 이중 특이성 단백질의 결합은 비아코어 T200 기기(GE)를 이용하는 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 평가되었다. 항-His 태그 항체(GenScript)는 NHS-EDS 커플링에 의해 CM4 칩(GE) 상에 고정화되었고, 결합 반응은 25°C에서 HBS-EP+완충체(GE) 중에서 수행되었다. His-태깅된 ST2 ECD 단백질은 항-His 태그 항체 코팅된 칩에 의해 포획되었다.

[0179]

ST2 결합의 경우, 히스티딘-태깅된 인간 또는 마우스 ST2 ECD 단백질은 리간드로서 칩 상에 포획되었다. 이중 특이성 분자는 60초 동안 50 μl/분의 유속으로 분석물로서 주입되었고, 인간 ST2에 대해 200초 동안 및 마우스 ST2에 대해 120초 동안 해리되도록 하였다. 이중 특이성 분자는 여러 가지 농도로 제조되었다(인간 ST2 상호작용을 위해 3배 희석에 의해 0.12 nM - 10 nM; 및 마우스 ST2 상호작용을 위해 3배 희석에 의해 2.5 nM - 200 nM). 칩 표면은 10 mM 글리신 pH 1.7을 이용하여 재생되었다. 회합 및 해리 신호는 동적 상수( $k_a$  &  $k_d$ )를 산출하기 위해 및 해리 상수( $K_d$ )를 계산하기 위해 비아코어 평가 소프트웨어 버전 2.0을 이용하여 1:1 결합으로 조정되었다.

[0180]

센서그램은 도 6A 및 6B에 나타냈고; 동적 상수 및 해리 상수는 표 3에 요약된다. IL2vNM-IL33vCM 및 IL2vNM-IL33vNM은 0.17 - 0.3 nM 범위의  $K_d$  값으로 인간 ST2에 결합하였는데, 이는 이전에 보고된 wt IL-33 및 ST2 상

호작용의 값( $K_d = 0.4 - 0.7 \text{ nM}$ )보다 약간 낮은 값이었다(Lingel et al., 2009, Structure 17(10): 1398-1410; Liu et al., 2013, PNAS 110(37): 14918-14923). 이들 단백질은 마우스 ST2에 결합하지만, 감소된 친화성으로 결합한다. 모든 이중 특이성 분자 및 1가 IL-33 분자는 인간 ST2에 대해 상당한 친화성을 나타냈다. 그러나, IL2vNM-IL33vCM은 IL2vNM-IL33NM보다 마우스 ST2에 대해 더 높은 친화성(> 10배)을 나타냈다. 또한, IL33vCM은 IL33vNM보다 마우스 ST2에 대해 더 높은 친화성을 나타냈다. 이는, C 말단 IL-33 배향이 N 말단 IL-33에 비해 마우스 ST2에 대해 더 높은 친화성을 보유함을 나타낸다.

[0181] 또한, IL2vNM-IL33vNM 샘플은 SDS-PAGE에 의해 검출 가능한 IL2v 동형이량체 오염을 함유하였지만, 동형이량체는 IL2vNM-IL33vCM 샘플에서 검출할 수 없었다. 결론적으로, C 말단 IL-33 이중 특이성 단백질, 즉 IL2vNM-IL33vCM은 마우스 ST2에 대해 더 높은 친화성을 나타냈고, 더 균질한 이형이량체 단백질로서 발견되었다. 따라서, 이는 실시예 4에서 마우스 T 세포를 이용하는 생활성 분석을 위해 선택되었다.

표 3

인간 및 마우스 ST2 ECD 단백질에 대한 결합의 분석.

분석물	ST2	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_d$ (M)
IL2vNM-IL33vCM	인간	5.15E6	8.69E-4	1.69E-10
	마우스	3.61E6	0.0492	1.36E-8
IL2vNM-IL33vNM	인간	3.41E6	0.0010	3.02E-10
	마우스	1.17E6	0.1395	1.19E-7
IL33vNM	인간	4.35E6	0.0012	2.74E-10
	마우스	2.33E6	0.1163	4.99E-8
IL33vCM	인간	6.11E6	0.0011	1.74E-10
	마우스	3.85E6	0.0452	1.18E-8

[0182]

표 4

ST2 ECD 및 IL2Ra ECD 둘 다에 대한 단백질의 동시 결합

ST2 포획된 리간드	분석물	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_d$ (M)
IL2vNM-IL33vCM	IL2R	4.72E6	0.1236	2.62E-8
IL2vNM-IL33vNM	알파			
IL2vNM-IL33vNM	IL2R	5.04E6	0.1575	3.25E-8
IL33vNM	알파			

[0183]

[0184] 이중 특이성 분자가 ST2 및 IL-2R 알파 둘 다에 동시에 결합하는지 여부를 테스트하기 위해, 이중 특이성 분자는 칩 상에 고정화된 히스티딘 태깅된 인간 ST2에 의해 포획되었다. 후속적으로, 인간 IL2R 알파는 50초 동안 50  $\mu$ l/분의 유속으로 분석물로서 주입되었고, 60초 동안 해리되도록 하였다. IL2R 알파는 여러 가지 농도로 제조되었다(3배 희석에 의해 2.5 nM - 200 nM). 칩 표면은 10 mM 글리신 pH 1.7을 이용하여 재생되었다. 회합 및 해리 신호는 동적 상수( $k_a$  &  $k_d$ )를 산출하기 위해 및 해리 상수( $K_d$ )를 계산하기 위해 비아코어 평가 소프트웨어 버전 2.0을 이용하여 1:1 결합으로 조정되었다.

[0185] 센서그램은 도 7에 나타냈고, 동적 상수 및 해리 상수는 상기 표 4에 요약된다. IL2vNM-IL33vCM 및 IL2vNM-IL33vNM은 이전에 보고된 값에 상응하는  $K_d$  값(26 -32 nM)으로 인간 IL2R알파에 결합하였다(Landgraf BE, et al., 1992, J Biol Chem. 267(26):18511-9; Myszk DG, et al., 1996, Protein Sci. 5(12):2468-78; Shanafelt AB, et al., 2000, Nat Biotechnol. (11):1197-202). 이들 데이터는, IL-2v 모이어티가 IL2Ra 결합을 유지하고; 이중 특이성 분자가 ST2 및 IL2Ra 둘 다에 동시에 결합할 수 있다는 것을 나타내는데, 그 이유는 이들이 ST2 단백질에 결합하면서 IL2Ra에 결합하는 것은 나타냈기 때문이다.

[0186] 실시예 3. 항-ST2/IL2v 이중 특이성 분자의 결합 특성 규명

[0187] 인간 ST2 및 IL2Ra에 대한 항-ST2/IL2v 이중 특이성 단백질의 결합은 실시예 2에 기재된 것과 유사한 방식으로 표면 플라즈몬 공명(SPR)에 의해 평가되었다.

[0188] ST2 결합의 경우, 히스티딘 태깅된 인간 ST2 ECD 단백질은 리간드로서 칩 상에 포획된다. 항-ST2 mAb(Ab2)의 Fab 및 IL-2v로 구성되는 Ab2-IL2v 이중 특이성 분자는 400초 동안 50  $\mu$ l/분의 유속으로 분석물로서 주입되었고, 600초 동안 해리되도록 하였다. Ab2-IL2v 이중 특이성 분자는 여러 가지 농도로 제조되었다(3배 희석에 의해 0.012 nM - 1 nM). 항-ST2 mAb의 Fab, 즉 Ab4 및 IL-2v로 구성되는 Ab4-IL2v 이중 특이성 분자는 200초 동안 50  $\mu$ l/분의 유속으로 분석물로서 주입되었고, 400초 동안 해리되도록 하였다. Ab4-IL2v 이중 특이성 분자는 여러 가지 농도로 제조되었다(3배 희석에 의해 0.062 nM - 5 nM). 칩 표면은 10 mM 글리신 pH 1.7을 이용하여 재생되었다. 1가 항-ST2 이중 특이성 분자의 회합 및 해리 신호는 동적 상수( $k_a$  &  $k_d$ )를 산출하기 위해 및 해리 상수( $K_d$ )를 계산하기 위해 비아코어 평가 소프트웨어 버전 2.0을 이용하여 1:1 결합으로 조정되었다.

[0189] 센서그램은 도 8A 및 8B에 나타냈고, 동적 상수 및 해리 상수는 하기 표 5에 요약된다. 모든 이중 특이성 분자는 ST2 단백질에 대해 명백한 결합을 나타냈다. 1가 Ab2-IL2v 이중 특이성 분자의  $K_d$  값은 보고된 값, 즉 특허 US2017/0002079 A1의 34 pM에 비해 94 pM 내지 137 pM 범위였다. 1가 Ab4-IL2v 이중 특이성 분자의  $K_d$  값은 보고된 값, 즉 특허 US2017/0002079 A1의 301 pM에 비해 289 pM 내지 378 pM 범위였다.

표 5

인간 ST2 ECD 단백질에 대한 결합의 분석

분석물	리간드	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_d$ (M)
Ab2M-IL2vCM	인간 ST2	3.28E6	3.47E-4	1.06E-10
Ab2M-IL2vNM	인간 ST2	3.34E6	3.17E-4	9.43E-11
Ab2M-IL2vCB	인간 ST2	2.50E6	3.44E-4	1.37E-10
Ab4M-IL2vCM	인간 ST2	5.57E6	0.0020	3.68E-10
Ab4M-IL2vNM	인간 ST2	5.44E6	0.0021	3.78E-10
Ab4M-IL2vCB	인간 ST2	6.16E6	0.0018	2.89E-10

[0190]

[0191] 이중 특이성 분자가 ST2 IL2Ra 둘 다에 동시에 결합하는지 여부를 테스트하기 위해, 이중 특이성 분자는 칩 상에 고정화된 히스티딘 태깅된 인간 ST2에 의해 포획되었다. 후속적으로, IL2R 알파는 50초 동안 50  $\mu$ l/분의 유속으로 분석물로서 주입되었고, 60초 동안 해리되도록 하였다. IL2Ra는 여러 가지 농도로 제조되었다(3배 희석에 의해 2.5 nM - 200 nM). 칩 표면은 10 mM 글리신 pH 1.7을 이용하여 재생되었다. 회합 및 해리 신호는 동적 상수( $k_a$  &  $k_d$ )를 산출하기 위해 및 해리 상수( $K_d$ )를 계산하기 위해 비아코어 평가 소프트웨어 버전 2.0을 이용하여 1:1 결합으로 조정되었다.

[0192] 센서그램은 도 9A 및 9B에 나타냈고, 동적 상수 및 해리 상수는 하기 표 6에 요약된다. 이들은 모두 이전에 보고된 값에 상응하는  $K_d$  값(25 - 43 nM)으로 인간 IL2R알파에 결합하였다. 이는, IL-2v 모이어티가 IL2Ra 결합을 유지하고; 이중 특이성 분자가 ST2 및 IL2Ra 둘 다에 동시에 결합할 수 있다는 것을 나타내는데, 그 이유는 이들이 ST2 단백질에 결합하면서 IL2Ra에 결합하는 것을 나타냈기 때문이다.

표 6

ST2 ECD 및 IL2Ra ECD 둘 다에 대한 단백질의 동시 결합

분석물	ST2-결합된	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_d$ (M)
	리간드			
인간 IL2R 알파	Ab2M-IL2vCM	6.73E6	0.1819	2.70E-8
인간 IL2R 알파	Ab2M-IL2vNM	6.26E6	0.1550	2.48E-8
인간 IL2R 알파	Ab2M-IL2vCB	5.78E6	0.1885	3.26E-8
인간 IL2R 알파	Ab4M-IL2vCM	9.84E6	0.2513	2.55E-8
인간 IL2R 알파	Ab4M-IL2vNM	7.14E6	0.1788	2.51E-8
인간 IL2R 알파	Ab4M-IL2vCB	5.27E6	0.2002	3.80E-8
인간 IL2R 알파	Ab2-IL2vCB	4.59E6	0.1633	3.56E-8
인간 IL2R 알파	Ab2-IL2vCM	5.13E6	0.1677	3.27E-8
인간 IL2R 알파	Ab4-IL2vCB	4.55E6	0.1944	4.27E-8
인간 IL2R 알파	Ab4-IL2vCM	6.26E6	0.2568	4.10E-8

[0193]

[0194] **실시예 4. 마우스 ST2+ Treg에 대한 IL2vNM-IL33vCM의 활성화**

[0195] IL-2에 의한 T 세포의 활성화는 세포 내에서 인산화된 STAT5(pSTAT5)의 레벨을 측정함으로써 평가될 수 있다. pSTAT5는 항-pSTAT5 항체로 세포를 염색하고, 이어서 유동 세포 분석법에 의해 여러 가지 림프구 부분집단 분리해 냄으로써 측정되었다.

[0196] ST2+ Treg은 몇 가지 인간 조직에서 높은 레벨로 확인되지만, 매우 낮은 빈도, 즉 <0.01%로 혈액 중에서 확인된다. 인간 도너로부터 조직을 얻기 어렵기 때문에, IL2vNM-IL33vCM의 효과는 최초로 마우스 비장 유래의 ST2+ Treg에서 평가되었는데, 혈액 내에서 확인되는 것(0.1-1.0%의 Treg)보다 더 많은, 즉 더 높은 레벨의 ST2+ Treg(5-10%의 Treg)을 보유하는 것으로 확인되었다. 비장은 C57Bl/6J 마우스로부터 분리되었고, 단일 세포 현탁액은 다양한 농도의 IL2vNM (1가 IL-2 변이체 Fc 융합), IL33vCM(1가 IL-33 변이체 Fc 융합) 또는 이중 특이성 IL2vNM-IL33vCM(도 10)으로 자극되었다. IL-2에 의한 Treg 활성화는 유동 세포 분석법에 의해 내세포성 인산화된 STAT5(pSTAT5)의 레벨을 결정함으로써 측정될 수 있다. IL33vCM은 단지 높고 비생리적인 농도(10-100 nM, 도 8B)에서 미미한 수준의 pSTAT5를 유도하였다. 대조적으로, IL2vNM은 ST2+ Treg(도 8A)에 대해 2.4 nM의 EC50 및 ST2- Treg(도 8B)에 대해 0.86 nM의 EC50으로, 훨씬 더 적은 농도에서 pSTAT5를 유도하였다. IL2vNM-IL33vCM 이중 특이성 단백질은 ST2+에서 pSTAT5 유도를 증강시켰는데, IL33vCM 또는 IL2vNM 단백질 단독(도 8A)을 이용하여 확인된 레벨을 상회하였지만, ST2- Treg(도 8B)에서는 확인되지 않았다. 본 분석에서 IL2vNM-IL33vCM에 대한 EC50은 0.26 nM이었고, 이는 IL2vNM의 EC50보다 대략 10배 더 낮았다. 결론적으로, IL2vNM-IL33vCM은 ST2- Treg에서보다 ST2+ Treg에서 더 많은 pSTAT5를 유도하였는데, 이는 이중 특이성 분자는 우선적으로 ST2+ Treg을 활성화하는 것을 입증하는 것이다.

[0197] **실시예 5: Fc 영역에 대해 C-말단의 IL-33 모이어티는 더 활성적이다.**

[0198] ST2에 결합하는 IL-33 및 IL1RAcP 복합체는 어댑터 MyD88를 통해 신호전달을 활성화한다. IL-33 신호전달 및 하류 효과의 메커니즘은 상이한 세포 유형에서 다르다. 따라서, 신호전달 수용체 세포주는 IL-33 모이어티를 함유하는 단백질의 생활성을 측정하기 위해 선택되었다. 리포터 세포주 HEK-Blue-IL-33<sup>TM</sup>(InVivoGen Inc)은, IL-33 활성화의 민감성 판독치인 인간 IL-33 수용체를 과발현하는 HEK293-기반 세포주이다. 표 1에 목록화된 IL-33-함유 분자의 활성화는 제조사의 프로토콜에 따라 HEK-Blue-IL-33<sup>TM</sup> 세포에서 IL-33 신호전달을 자극할 수 있는 그들의 능력에 대해 테스트되었다.

[0199] IL-33v 1가 분자와 비교하여, IL-33vCM의 EC50은 IL-33vNM의 EC50보다 3배 더 크다(0.053 pM에 비해 0.16 pM, 표 7, 도 11A). IL-33vNM 분자의 N-말단에 추가의 IL-33 모이어티를 추가하는 것은 EC50을 증가시키지 않았다 (IL-33vNM에 대한 0.053 pM과 비교하여 IL-33vNB에 대한 0.059 pM). 웹티드 링커에 의해 Fc 도메인의 N-말단에 융합된 IL-2v 및 IL-33v 둘 다를 가진 이중 특이성 분자(IL2vNM-IL33vNM)는 1가 IL-33vNM에 비해 확연히 더 낮은 IL-33 활성을 보유하였는데(0.053 pM과 비교하여 0.128 pM, 도 11), 이는 Fc 도메인의 N-말단 모이어티 둘 다의 존재에 기인하는 활성의 상실을 제안한다. 그러나, Fc 도메인의 N-말단 IL-2 및 Fc 도메인의 C-말단 IL-33을 갖는 이중 특이성 분자(IL2vNM-IL33vCM)는 Fc 도메인의 N-말단 IL-33을 가진 임의의 분자보다 더 양호한 활성을 보유하고(표 7, 0.03 pM, 도 11B), 및 Fc 도메인의 C-말단 1가 IL-33(IL-33vCM)과 비교하여 활성화에서 단지 2배 감소되었다.

[0200] 실시예 2의 동적 분석과 일치되게, 이들 분석은, Fc 도메인의 C-말단 IL-33을 가진 IL2vNM-IL33vCM은 IL2vNM-IL33vNM에 비해 뛰어난 IL-33 생활성 활성을 보유하였음을 입증하였다. 따라서, IL2vNM-IL33vCM 분자는 실시예 4에서 기재한 바와 같이, 마우스 조절성 T 세포를 이용하는 추가의 분석을 위해 선택되었다.

**표 7**

IL-33 생활성 분석의 EC50	
단백질	EC50 [pM]
IL-33vNM	0.053
IL-33vCM	0.016
IL-33vNB	0.059
IL2vNM-IL33vNM	0.128
IL2vNM-IL33vCM	0.03

[0201]

[0202] **실시예 6. 정상 마우스에서 IL2/IL-33 이중 특이성 분자의 활성화(예방)**

[0203] 정상 마우스에서 Treg 집단에 대한 그들의 활성을 측정하기 위해, BALB/c 마우스에게 IL2vNM, IL33vCM, 또는 이중 특이성 IL2vNM-IL33vCM 단백질(예를 들어, 도 4A) 0.001, 0.01, 또는 0.1 mg/kg의 단일 투여량으로 정맥내 투여될 것이다. 비장 및 간은 치료 후 2일, 4일, 6일 또는 8일에 수확될 것이고, ST2+ Treg의 수 및 백분율(CD4 세포의 분율로서)이 결정될 것이다. 또한, ST2+ 및 ST2- Treg 부분집단의 증식 지수는 Ki67에 대한 항체를 이용하는 세포의 내세포성 염색에 의해 결정될 것이다.

[0204] 이중 특이성 IL2vNM-IL33vCM이 IL2vNM 및 IL33vCM 단백질보다 ST2+ Treg에 대해 더 큰 선택성을 보여주는 경우, ST2- Treg보다 ST2+ Treg의 더 큰 팽창은 IL2vNM 및 IL33vCM과 비교하여 이중 특이성 단백질을 이용하는 치료 시에 관찰될 것이다. 백분율 Ki67+ 세포에 의해 반영되는 바와 같이, 증식 지수의 증가는 또한 IL2vNM 또는 IL33vCM과 비교하여 이중 특이성 단백질을 이용하는 치료에 기인할 것이다. Treg에 대한 상기 단백질의 효과는 투여된 단백질의 약물동력학과 상관될 수 있다. 투여 후 채취한 혈액 샘플은 투여된 분자의 약물동력학을 결정하기 위해 정량 면역분석에 의해 평가될 것이다.

[0205] **실시예 7. 근육 염증의 모델에서 활성화(예방)**

[0206] ST2+ Treg의 역할은 근육 염증의 동물 모델에서 확립되어 왔다. 이들 동물 모델 중 하나는 야생형 마우스에서 급성 근육 손상이고(Burzyn et al., 2013, Cell 155(6): 1282-1295), 및 제2 모델은 *mdx* 마우스 근이영양증 모델, 즉 디스트로핀의 유전적 결함에 의해 유발되는 만성 근육 염증의 모델이다(*mdx* 마우스; Villa et al., 2014, Sci Transl Med 5(258): 258ra142).

[0207] 급성 근육 손상은 Burzyn et al.(상기함)에 의해 기재된 바와 같이, C57B1/6J 마우스의 뒷다리 근육 내로 카디오톡신의 주사에 의해 마우스 내에서 개시될 것이다. 0.1 mg/kg의 IL-2-IL-33 이중 특이성 분자를 이용하는 치료(예를 들어, 도 4A 및 4B)는 손상 일에 개시될 것이고, 7일에 재개될 것이다. 마우스는 1일, 4일, 7일 및 14일에 희생될 것이고, 근육 내의 Treg, T<sub>H</sub>17 및 다른 침윤성 면역 세포의 수는 유동 세포 분석법에 의해 결정될 것이다. Treg에 의한 암피레굴린(AREG) 생성은 근육 수복의 결정적 매개자이고(Burzyn et al., cited above), 및 AREG+ Treg의 빈도, 및 증식 지수(Ki67+ Treg)는 내세포성 유동 세포 분석법에 의해 결정될 것이다. 또한, 혈청내 크레아틴 키나아제 레벨 및 근육 섬유 형상과 같은, 근육 손상 및 수복의 측정치도 평가될 것이다.

[0208] 마우스 *mdx* 근이영양증 모델의 경우, *mdx* 마우스의 치료는 2주령에 개시될 것이다. 마우스는 0.1 mg/kg의 테스트 단백질을 이용하여 매주 치료될 것이고, 6주령에 희생될 것이다. 증식하는 Treg (Ki67+) 및 AREG+ Treg의 수 및 빈도는 나이가 동일한 비치료 대조군과 비교하여 치료된 마우스의 근육에서 측정될 것이다.

[0209] ST2+ Treg의 성공적인 활성화는 근육 내에서 Treg의 수치적인 증가, Ki67+ Treg의 더 높은 비율, 또는 AREG+ Treg의 더 높은 비율로 귀결될 것이다. 추가로, 마우스는 T<sub>H</sub>17 세포의 감소, 감소된 혈청 크레아틴 키나아제, 및 개선된 근육 형상을 나타낼 수 있다.

[0210] **실시예 8. 염증성 장 질환의 모델에서 활성화(예방)**

[0211] ST2+ Treg에 대한 역할은 염증성 장 질환의 마우스 모델에서 확립되어 왔다(Schiering et al., 2014, Nature 513(7519):564-568). 대장 조직에서 ST2+ Treg에 대한 테스트 단백질의 효과는 염증성 장 질환의 급성 모델에서 테스트될 것이다. C57B1/6J 마우스에게는 음용수 중의 3% 텍스트란 나트륨 설페이드(DSS)가 7일 동안 공급될 것이다. 마우스는 DSS 치료의 1일 및 4일에 0.1 또는 0.4 mg/kg의 IL-2/IL-33 이중 특이성 분자(예를 들어, 도 4A 및 4B)를 이용하여 IV, IP, 또는 SC로 치료될 것인데, DSS 치료는 1일에 시작될 것이다. DSS 치료 7일 후, 마우스는 희생될 것이고, 비장, 대장 및 장관막림프절(MLN)을 수거하였다. 대장 색전은 질환 중증도 및 대장염 스코어에 대해 조직학에 의해 분석될 것이다. ST2+ Treg 집단은 비장, 대장 및 MLN에서 측정될 것이다.

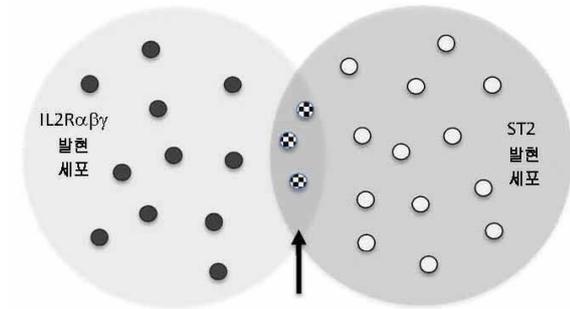
[0212] 성공적인 치료는 대조군과 비교하여 치료된 마우스에서 Treg 감소된 체중 감소, 개선된 질환 스코어 또는 조직학으로 귀결될 수 있었다. 질환 개선은 치료된 마우스의 MLN 및 대장에서 ST2+ Treg을 증식하는 Ki67+(Ki67+ proliferating ST2+ Treg)의 특이적인 증가를 수반할 수 있다.

[0213] 본 출원에서 본 발명의 바람직한 실시양태를 나타내고 기재하였지만, 그러한 실시양태가 단지 예시를 목적으로 제공된 것임은 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 당해 기술분야의 통상의 기술자는 본 발명을 벗어나지 않으면서 다수의 변경, 변화 및 치환을 수행할 수 있을 것이다. 본 출원에 기재된 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 발명을 실시하기 위해 사용될 수 있다. 후술하는 특허청구범위는 발명의 범위를 규정하고,

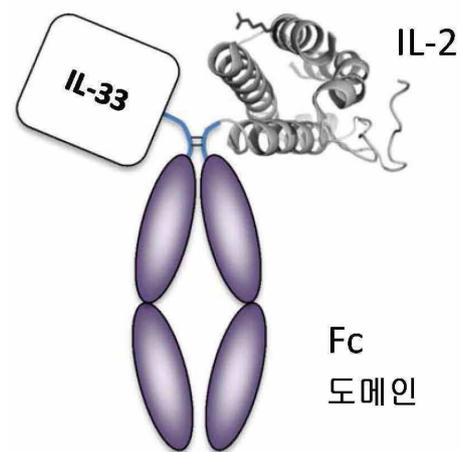
특허청구범위 내의 방법과 구조 및 그들의 균등물에 의해 커버되는 것으로 의도된다.

도면

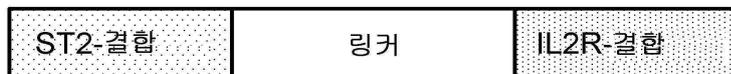
도면1



도면2



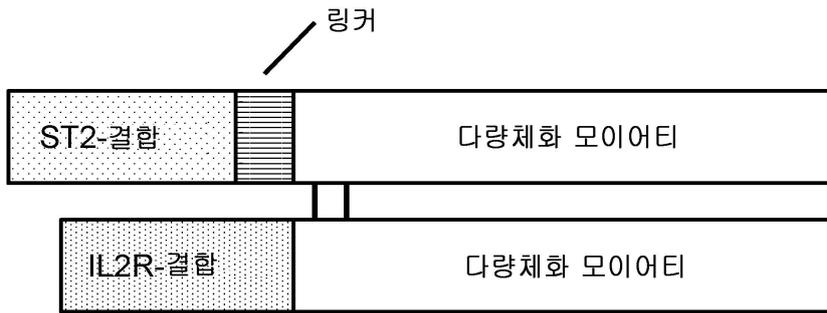
도면3a



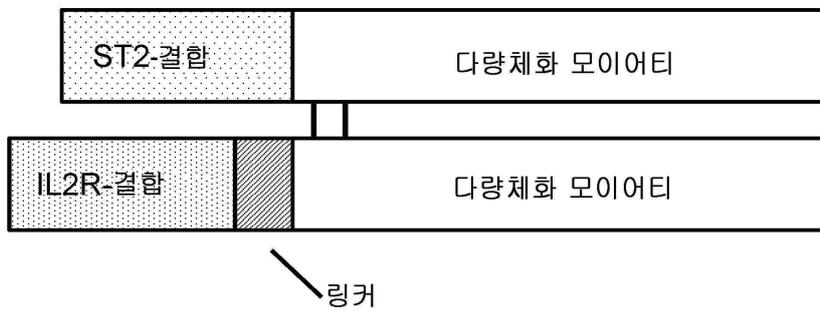
도면3b



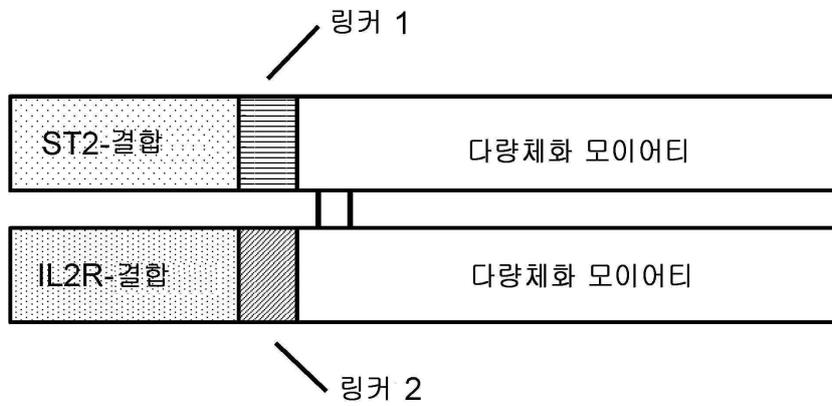
도면3c



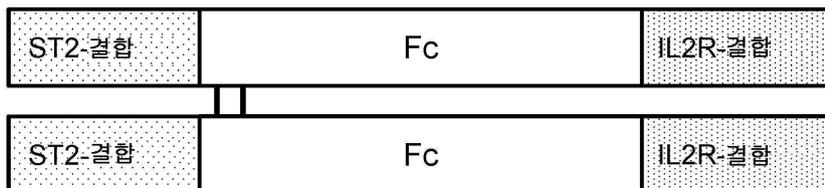
도면3d



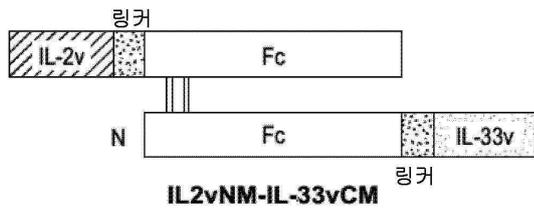
도면3e



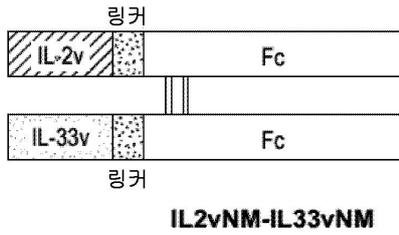
도면3f



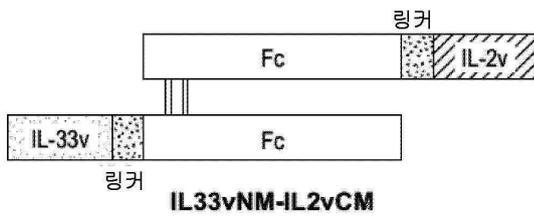
도면4a



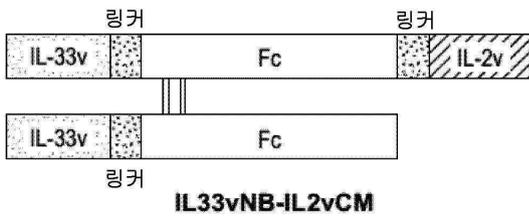
도면4b



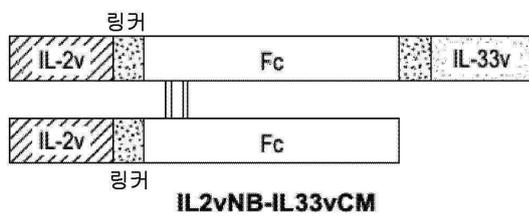
도면4c



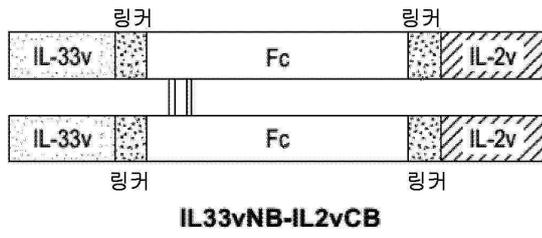
도면4d



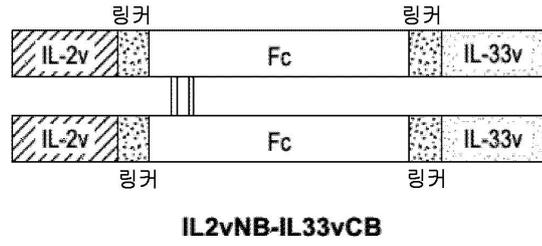
도면4e



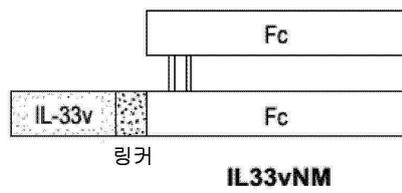
도면4f



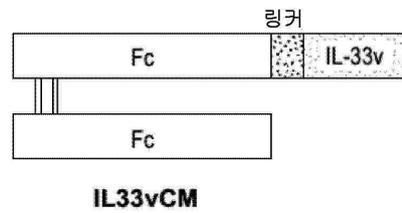
도면4g



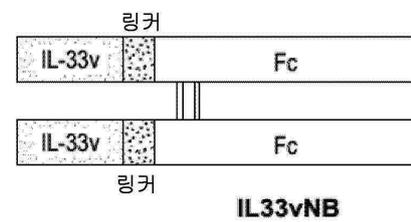
도면4h



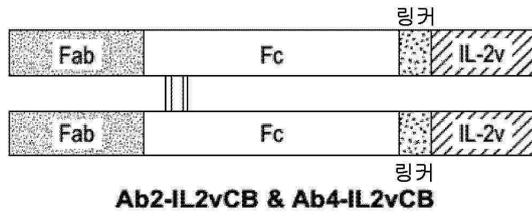
도면4i



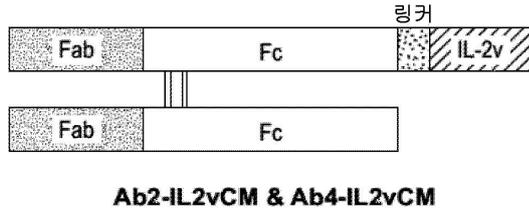
도면4j



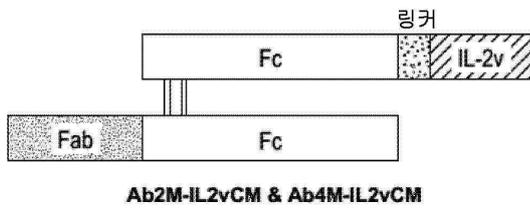
도면5a



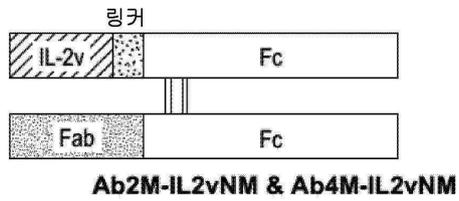
도면5b



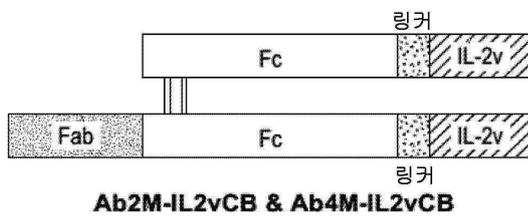
도면5c



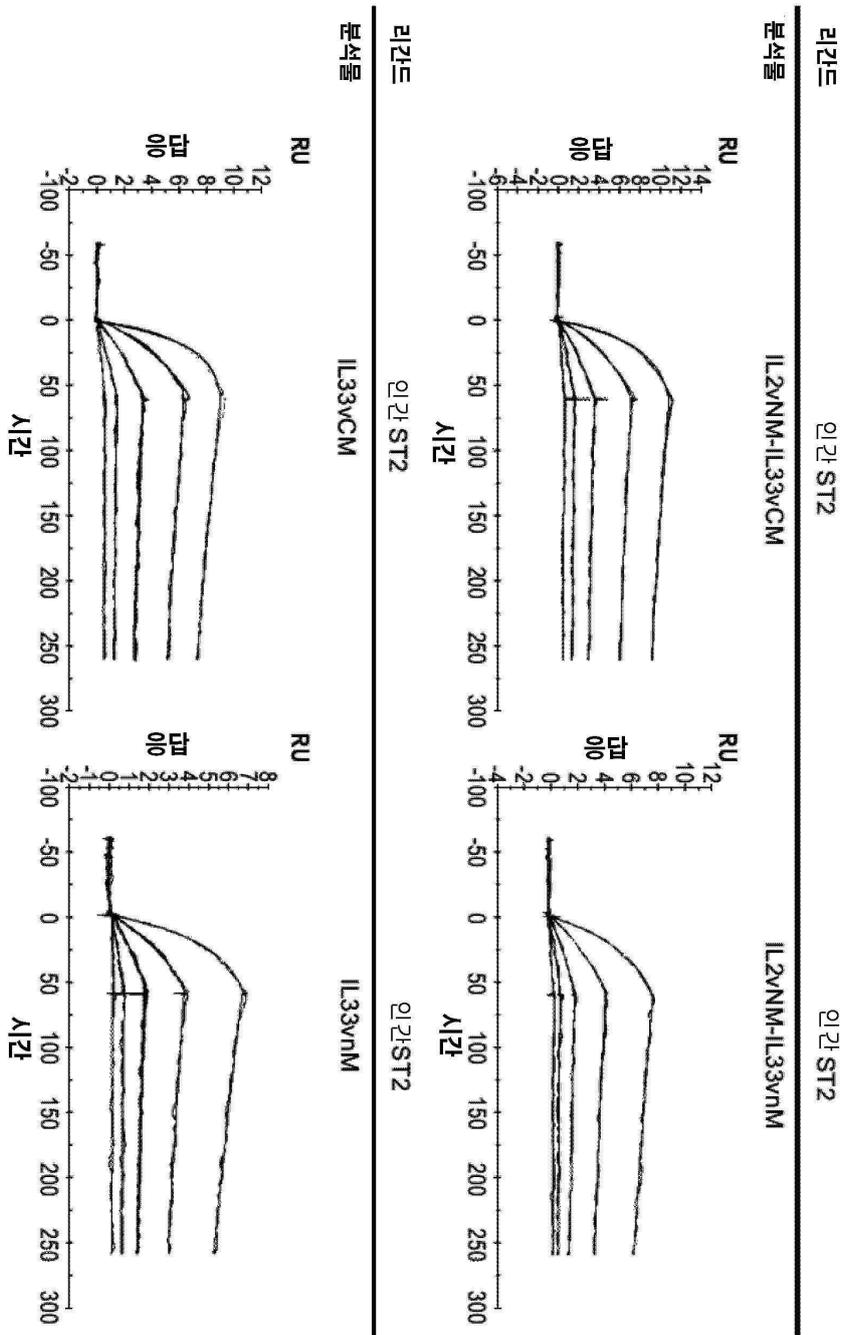
도면5d



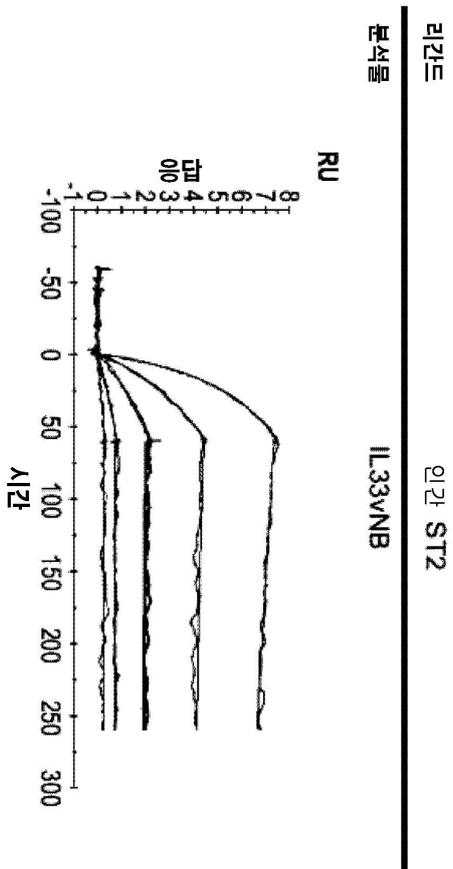
도면5e



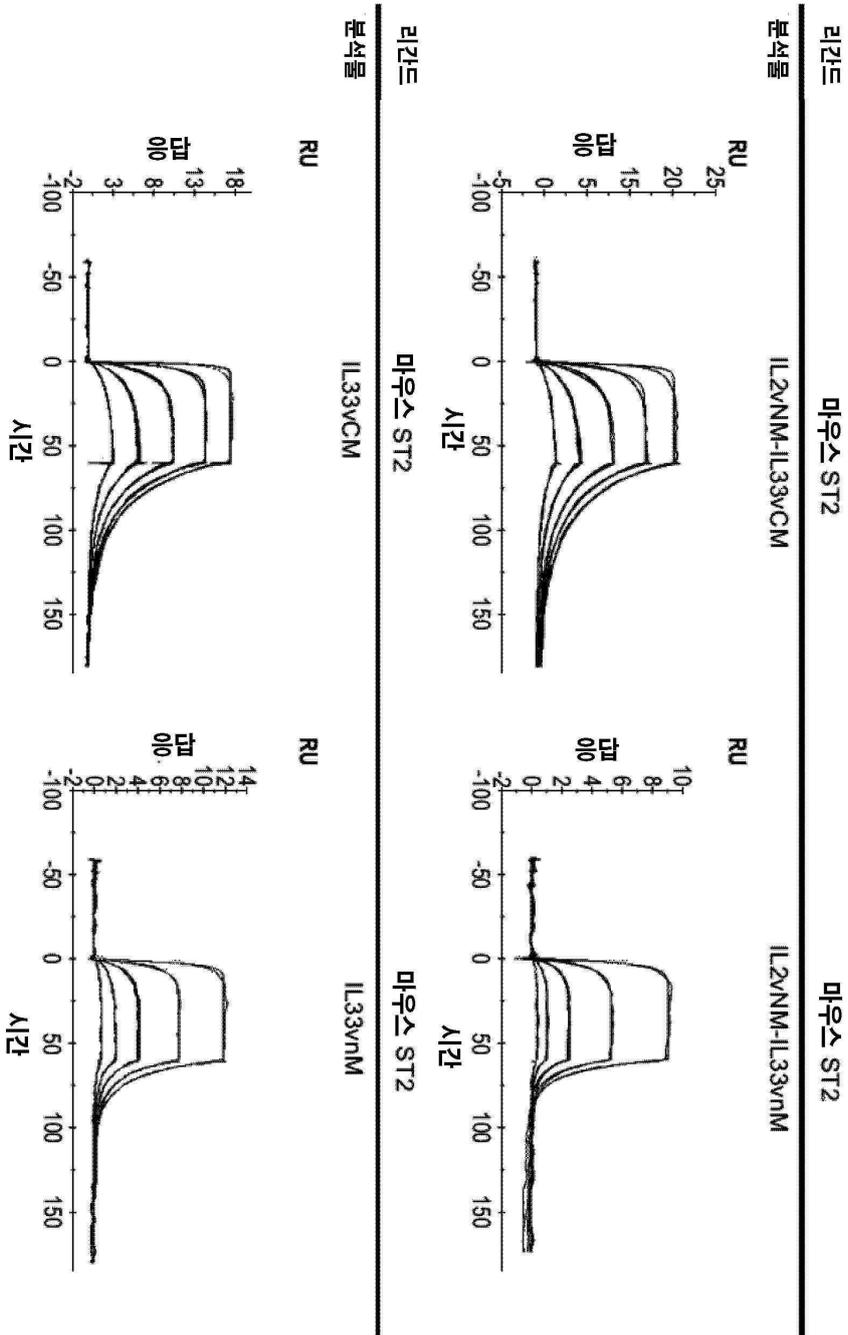
도면6aa



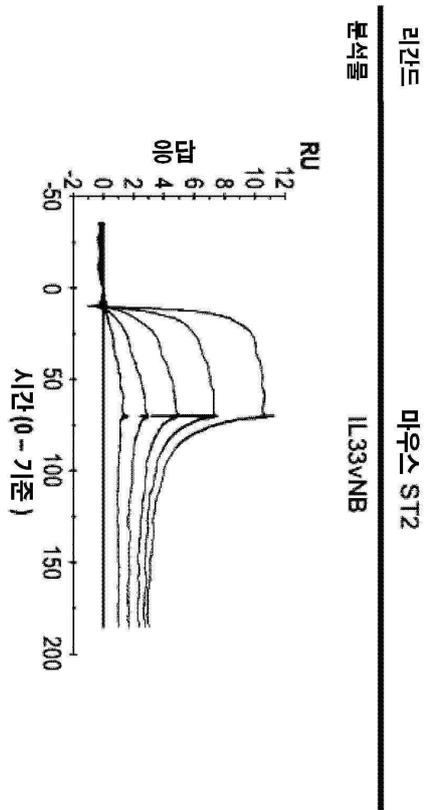
도면6ab



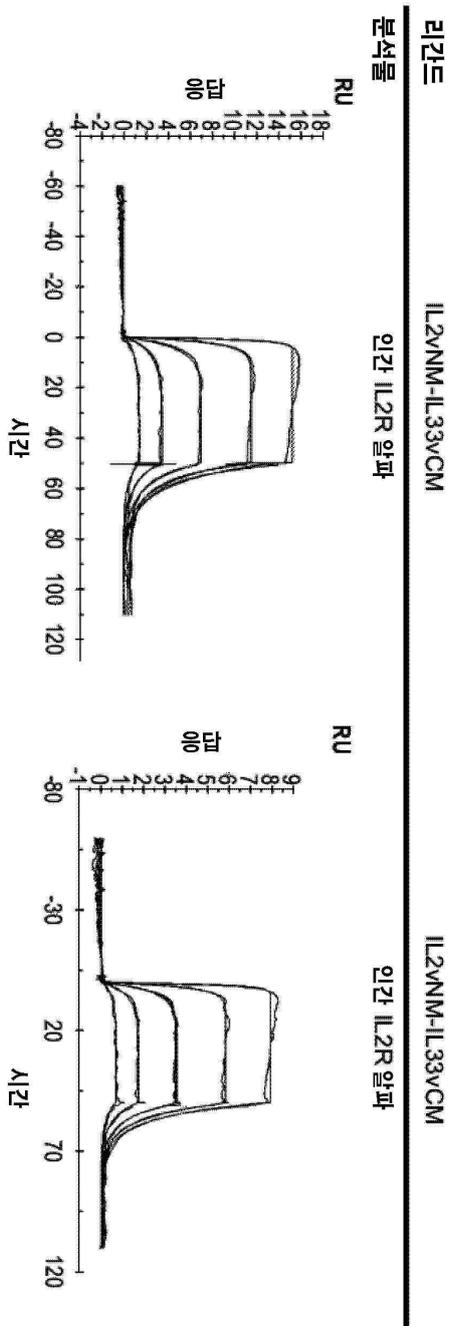
도면6ba



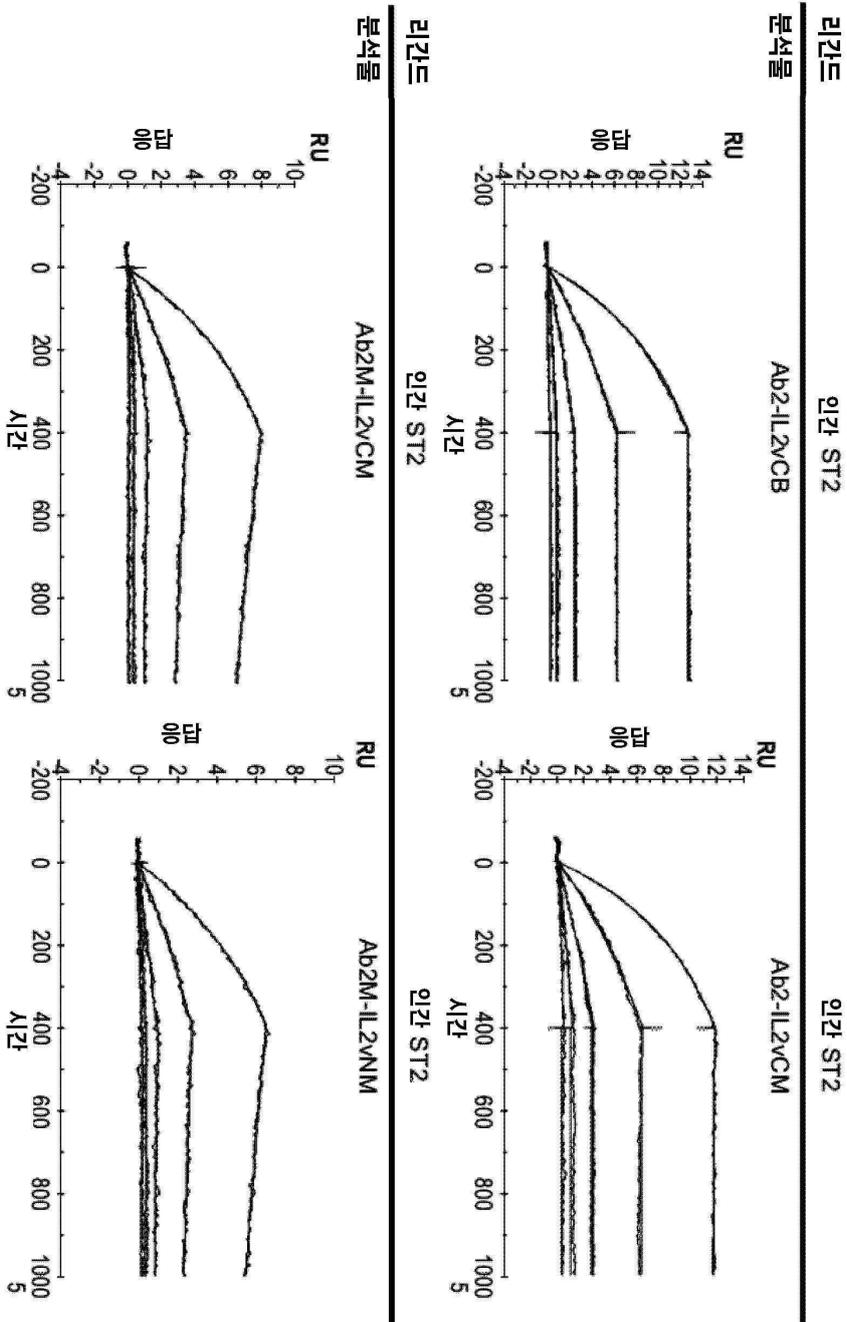
도면6bb



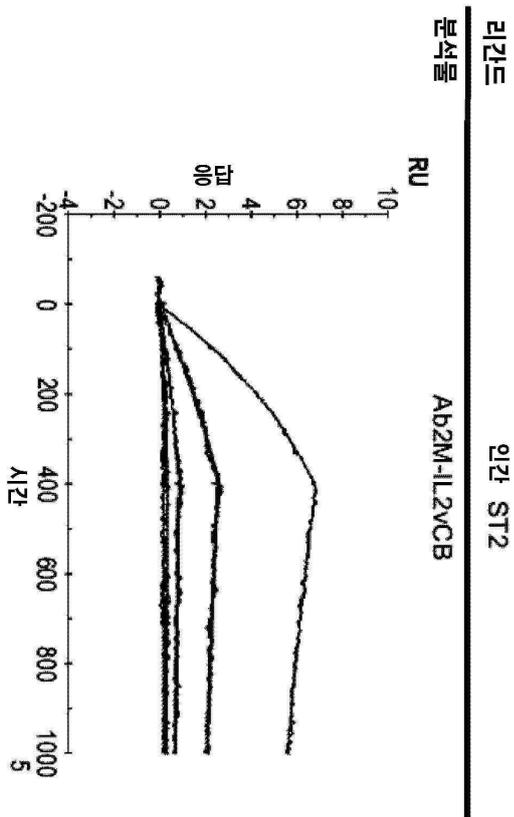
도면7



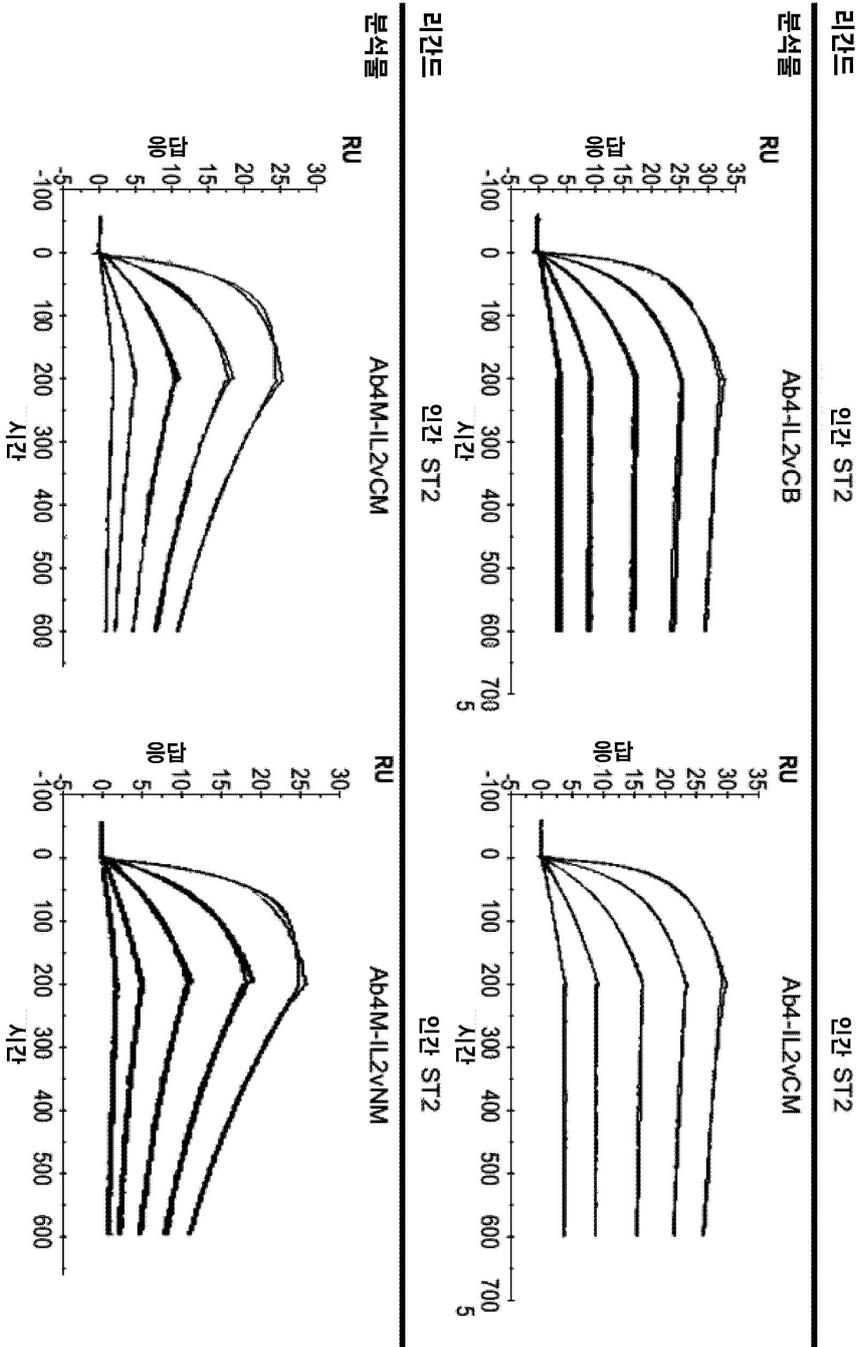
도면8aa



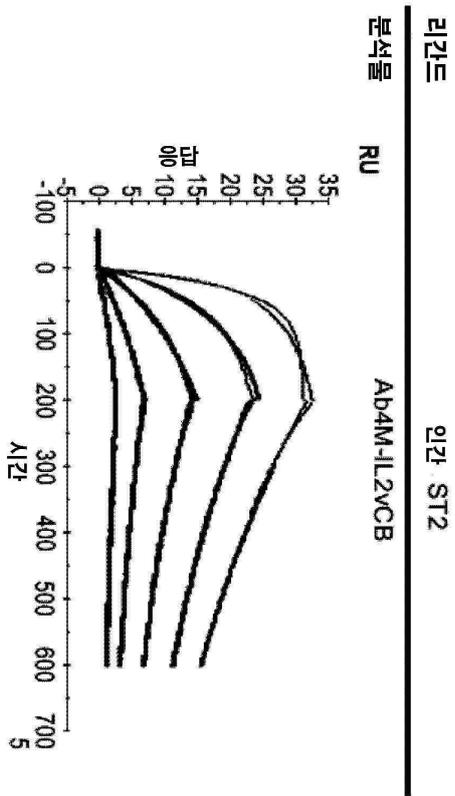
도면8ab



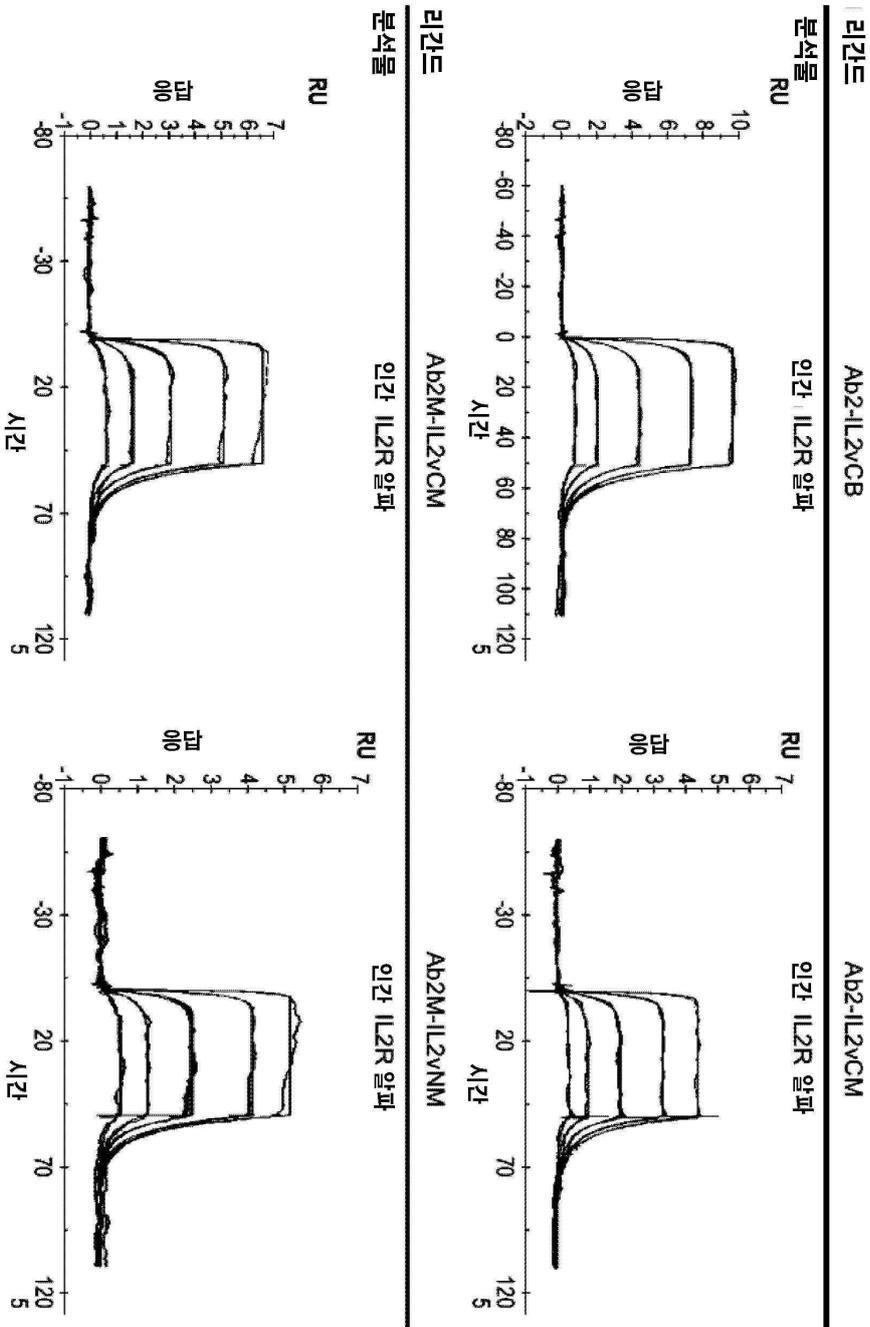
도면8ba



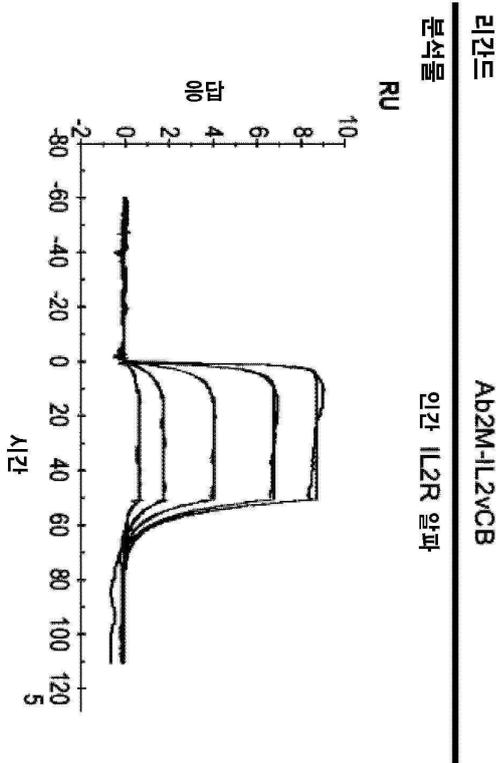
도면8bb



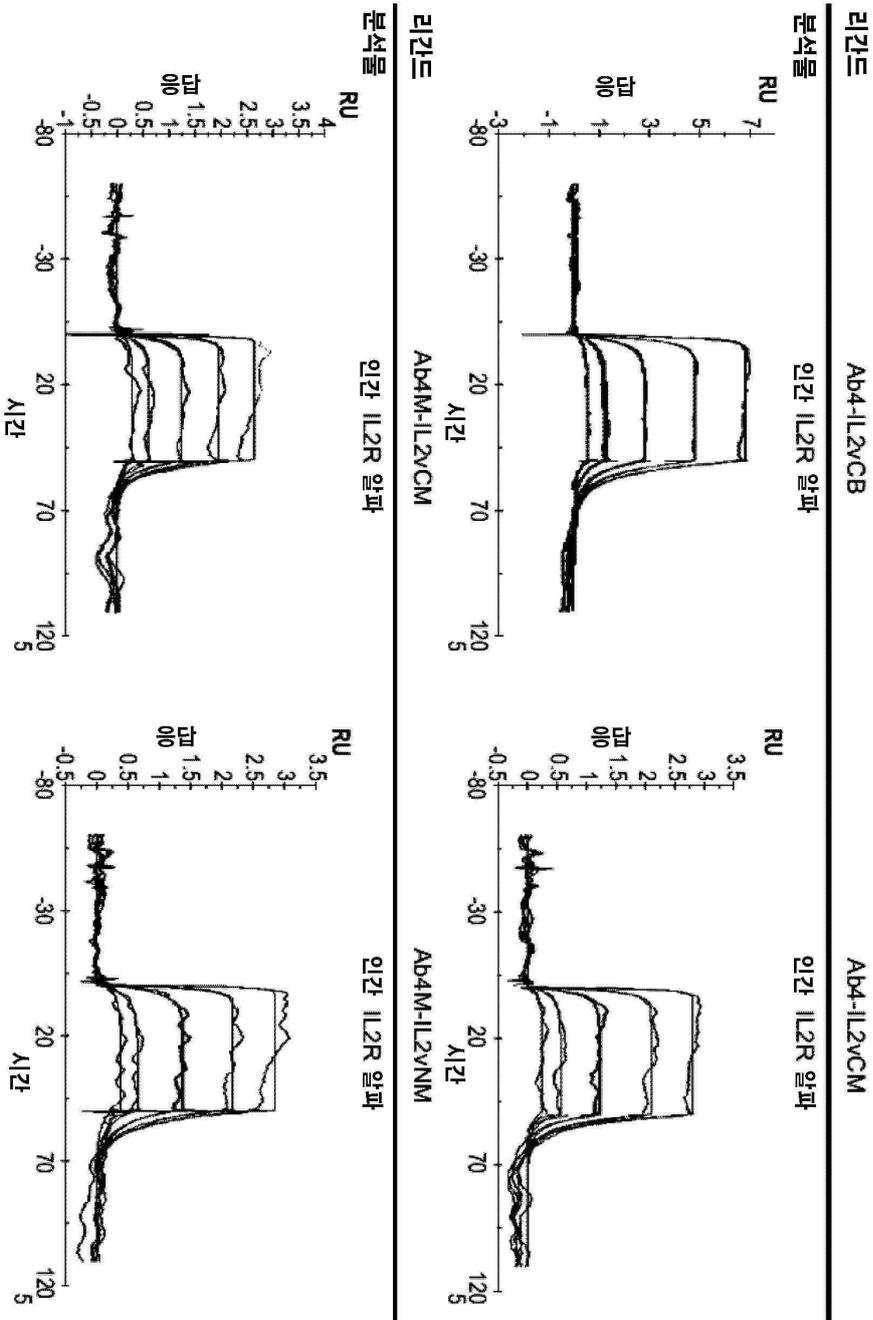
도면9aa



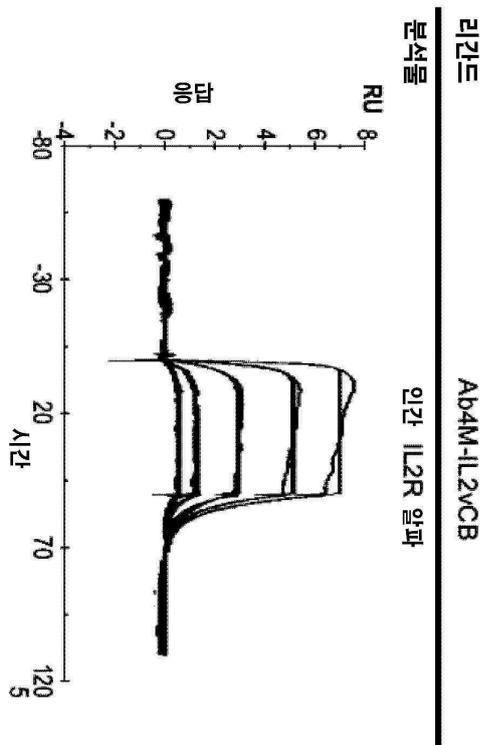
도면9ab



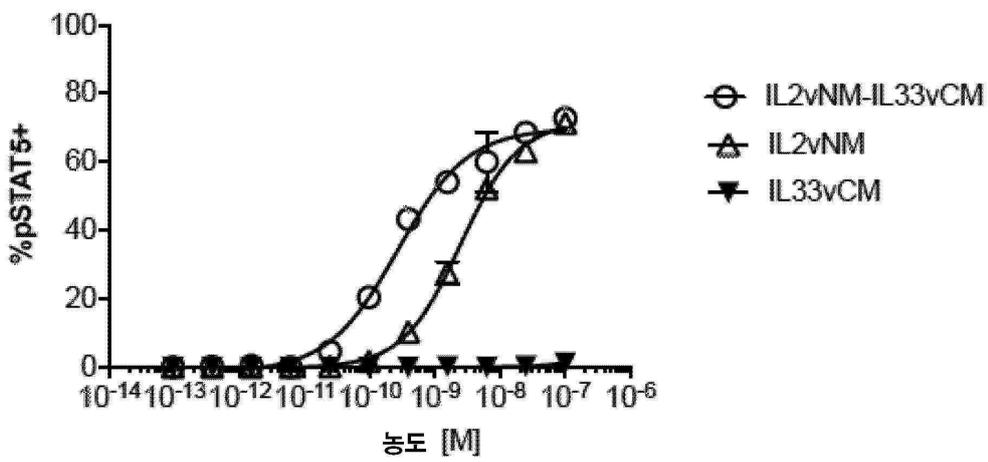
도면9ba



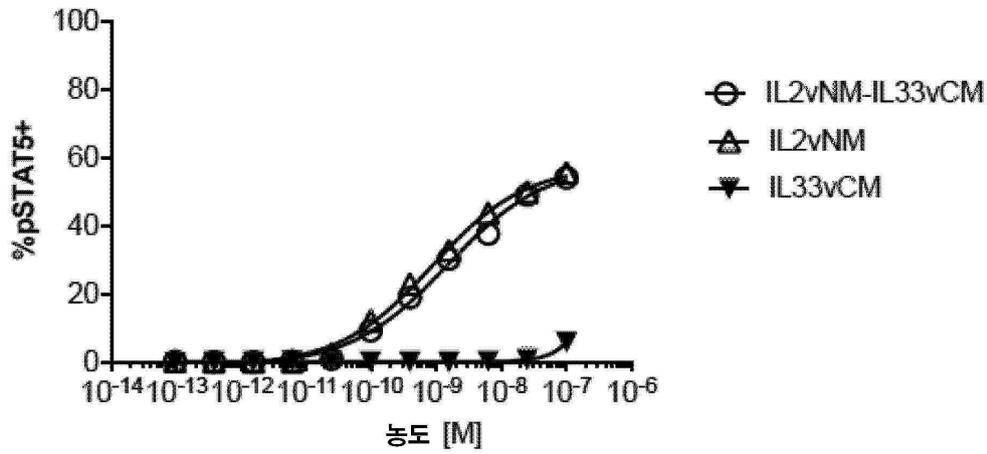
도면9bb



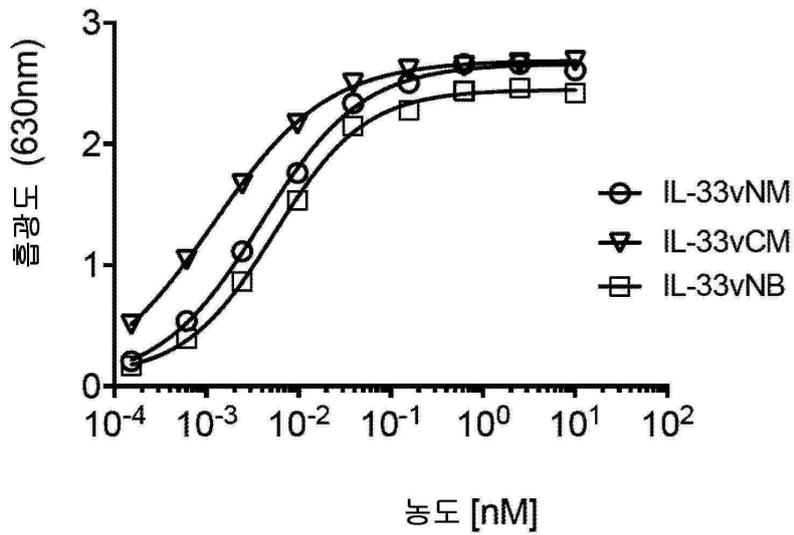
도면10a



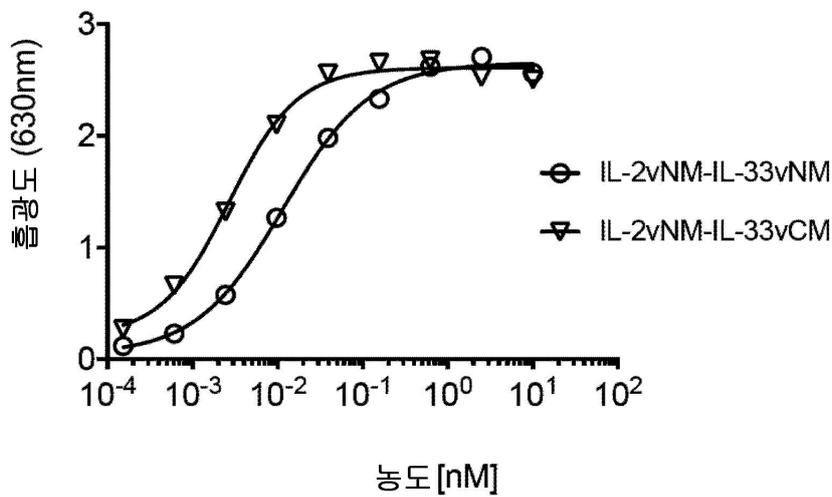
도면10b



도면11a



도면11b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Delinia, Inc.

<120> Multivalent regulatory T cell modulators

<130> 127754-00520

<140> PCT/US2017/066163

<141> 2017-12-13

<150> 62/433,533

<151> 2016-12-27

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 133

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2 N88R C125S mutant

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125  
 Ile Ser Thr Leu Thr  
 130  
 <210> 2  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 2

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys  
 20 25 30  
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys  
 35 40 45  
 Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys  
 50 55 60

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

Ile Ser Thr Leu Thr  
 130  
 <210> 3  
 <211> 133  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> IL2 T3A, N88R, C125S mutant  
 <400> 3

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

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

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile  
                   115                    120                    125  
 Ile Ser Thr Leu Thr  
                   130

<210> 4  
 <211> 226  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> IgG1 Fc N297A, T350V, L351Y, F405A, Y407V mutant  
 <400> 4

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
                   20                    25                    30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
                   35                    40                    45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
                   50                    55                    60



Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35 40 45  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125  
 Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140  
 Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Leu Thr Trp Pro Pro  
 165 170 175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Pro Gly  
 225  
 <210> 6  
 <211> 15  
 <212>  
 > PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Peptide linker

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1                    5                    10                    15

<210> 7

<211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 Fc 297A mutant

<400> 7

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1                    5                    10                    15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

20                    25                    30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35                    40                    45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50                    55                    60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr  
 65                    70                    75                    80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

85                    90                    95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100                    105                    110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115                    120                    125

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130                    135                    140

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

145                    150                    155                    160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165                    170                    175

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val



145                    150                    155                    160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

                         165                    170                    175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val

                         180                    185                    190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

                         195                    200                    205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

                         210                    215                    220  
 Pro Gly

225

<210> 9

<211> 226

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1 Fc Y407T mutant

<400> 9

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1                    5                    10                    15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
                          20                    25                    30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
                          35                    40                    45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

                         50                    55                    60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr

65                    70                    75                    80  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

                         85                    90                    95  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

                         100                    105                    110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 165 170 175  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Thr Ser Lys Leu Thr Val  
 180 185 190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 195 200 205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Pro Gly  
 225  
 <210> 10  
 <211> 159  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 10  
 Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr  
 20 25 30  
 Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val  
 35 40 45  
 Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp  
 50 55 60  
 Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp  
 65 70 75 80



Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser  
 130 135 140

Glu Asn Leu Ser Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr  
 145 150 155

<210> 12

<211> 374

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2vN Fc chain

<400> 12

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys  
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys  
 35 40 45

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

50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu  
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu  
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala  
 100 105 110

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

115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 145 150 155 160

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 165 170 175

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

180 185 190

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp

195 200 205

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr

210 215 220

Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

225 230 235 240

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

245 250 255

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

260 265 270

Glu Pro Gln Val Tyr Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys

275 280 285

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

290 295 300

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

305 310 315 320

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Ala Leu Val Ser

325 330 335

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser

340 345 350

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

355 360 365

Leu Ser Leu Ser Pro Gly

370

<210> 13

<211> 400

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-33 Fc fusion protein

<400> 13

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
                   20                    25                    30  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
                   35                    40                    45  
  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
                   50                    55                    60  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr  
 65                    70                    75                    80  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
                   85                    90                    95  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
                   100                    105                    110  
  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
                   115                    120                    125  
 Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
                   130                    135                    140  
 Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145                    150                    155                    160  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Leu Thr Trp Pro Pro  
                   165                    170                    175  
  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
                   180                    185                    190  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
                   195                    200                    205  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
                   210                    215                    220  
 Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 225                    230                    235                    240

Ser Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu  
 245 250 255  
 Ser Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser  
 260 265 270  
 Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys  
 275 280 285  
 Val Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly  
 290 295 300

Asp Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys  
 305 310 315 320  
 Asp Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His  
 325 330 335  
 Lys Ser Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn  
 340 345 350  
 Met His Ser Asn Ser Val Ser Phe Glu Ser Lys Thr Asp Pro Gly Val  
 355 360 365

Phe Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser  
 370 375 380  
 Ser Glu Asn Leu Ser Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr  
 385 390 395 400

<210> 14

<211> 374

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-2 Fc fusion protein

<400> 14

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys  
 20 25 30  
 Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys  
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys  
 50 55 60  
 Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu  
 65 70 75 80  
  
 Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu  
 85 90 95  
 Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala  
 100 105 110  
 Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile  
 115 120 125  
 Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140  
  
 Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
 145 150 155 160  
 Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 165 170 175  
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 180 185 190  
 Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 195 200 205  
  
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
 210 215 220  
 Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 225 230 235 240  
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
 245 250 255  
 Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 260 265 270  
  
 Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
 275 280 285  
 Asn Gln Val Ser Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp





Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 385 390 395 400

<210> 16

<211> 374

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2 Fc fusion protein

<400> 16

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 1 5 10 15

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 20 25 30

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 35 40 45

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 50 55 60

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr  
 65 70 75 80

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 85 90 95

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 100 105 110

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 115 120 125

Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 130 135 140

Leu Leu Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 145 150 155 160

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Leu Thr Trp Pro Pro



<220><223> IL33 Fc IL2 fusion protein

<400> 17

Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser  
1                    5                    10                    15

Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr  
                  20                    25                    30

Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val  
                  35                    40                    45

Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp  
                  50                    55                    60

Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp  
65                    70                    75                    80

Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys  
                  85                    90                    95

Ser Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Met  
                  100                    105                    110

His Ser Asn Ser Val Ser Phe Glu Ser Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe  
                  115                    120                    125

Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser  
                  130                    135                    140

Glu Asn Leu Ser Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr Gly  
145                    150                    155                    160

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys  
                  165                    170                    175

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
                  180                    185                    190

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
                  195                    200                    205

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
                  210                    215                    220

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn



Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg  
 485 490 495

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys  
 500 505 510

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr  
 515 520 525

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile  
 530 535 540

Ser Thr Leu Thr  
 545

<210> 18

<211> 548

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

IL2 Fc IL33 fusion protein

<400> 18

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys  
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys  
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys  
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu  
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu  
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala  
 100 105 110

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



Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 370 375 380

Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr  
 385 390 395 400

Leu Ala Ser Leu Ser Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu  
 405 410 415

Glu Asp Glu Ser Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu  
 420 425 430

Lys Lys Asp Lys Val Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser  
 435 440 445

Asn Glu Ser Gly Asp Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu  
 450 455 460

Ser Pro Thr Lys Asp Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser  
 465 470 475 480

Val Glu Leu His Lys Ser Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe  
 485 490 495

Val Leu His Asn Met His Ser Asn Ser Val Ser Phe Glu Ser Lys Thr  
 500 505 510

Asp Pro Gly Val Phe Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile  
 515 520 525

Lys Val Asp Ser Ser Glu Asn Leu Ser Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys  
 530 535 540

Leu Ser Glu Thr  
 545

<210> 19

<211> 548

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL33 Fc IL2 fusion protein

<400> 19

Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser

1                    5                    10                    15  
 Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr  
                          20                    25                    30  
 Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val  
                          35                    40                    45  
 Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser Asn Glu Ser Gly Asp  
                          50                    55                    60  
 Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu Ser Pro Thr Lys Asp  
 65                    70                    75                    80  
  
 Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser Val Glu Leu His Lys  
                          85                    90                    95  
 Ser Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe Val Leu His Asn Met  
                          100                    105                    110  
 His Ser Asn Ser Val Ser Phe Glu Ser Lys Thr Asp Pro Gly Val Phe  
                          115                    120                    125  
 Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile Lys Val Asp Ser Ser  
                          130                    135                    140  
  
 Glu Asn Leu Ser Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys Leu Ser Glu Thr Gly  
 145                    150                    155                    160  
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys  
                          165                    170                    175  
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro  
                          180                    185                    190  
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser  
                          195                    200                    205  
  
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp  
                          210                    215                    220  
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn  
 225                    230                    235                    240  
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val  
                          245                    250                    255

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu  
 260 265 270

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys  
 275 280 285

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 290 295 300

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 305 310 315 320

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 325 330 335

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 340 345 350

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 355 360 365

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 385 390 395 400

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala  
 405 410 415

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu  
 420 425 430

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn  
 435 440 445

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys  
 450 455 460

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro  
 465 470 475 480

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg  
 485 490 495

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

500 505 510  
 Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr  
 515 520 525

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile  
 530 535 540

Ser Thr Leu Thr  
 545

<210> 20

<211> 548

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL2 Fc IL33 fusion protein

<400> 20

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys  
 20 25 30

Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys  
 35 40 45

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys  
 50 55 60

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu  
 65 70 75 80

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu  
 85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala  
 100 105 110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile  
 115 120 125

Ile Ser Thr Leu Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro



Leu Ala Ser Leu Ser Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu  
 405 410 415

Glu Asp Glu Ser Tyr Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu  
 420 425 430

Lys Lys Asp Lys Val Leu Leu Ser Tyr Tyr Glu Ser Gln His Pro Ser  
 435 440 445

Asn Glu Ser Gly Asp Gly Val Asp Gly Lys Met Leu Met Val Thr Leu  
 450 455 460

Ser Pro Thr Lys Asp Phe Trp Leu His Ala Asn Asn Lys Glu His Ser  
 465 470 475 480

Val Glu Leu His Lys Ser Glu Lys Pro Leu Pro Asp Gln Ala Phe Phe  
 485 490 495

Val Leu His Asn Met His Ser Asn Ser Val Ser Phe Glu Ser Lys Thr  
 500 505 510

Asp Pro Gly Val Phe Ile Gly Val Lys Asp Asn His Leu Ala Leu Ile  
 515 520 525

Lys Val Asp Ser Ser Glu Asn Leu Ser Thr Glu Asn Ile Leu Phe Lys  
 530 535 540

Leu Ser Glu Thr

545

<210> 21

<211> 400

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL33 Fc fusion protein

<400> 21

Ser Ile Thr Gly Ile Ser Pro Ile Thr Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Ser  
 1 5 10 15

Thr Tyr Asn Asp Gln Ser Ile Thr Phe Ala Leu Glu Asp Glu Ser Tyr  
 20 25 30

Glu Ile Tyr Val Glu Asp Leu Lys Lys Asp Glu Lys Lys Asp Lys Val



Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr  
 290 295 300

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr  
 305 310 315 320

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu  
 325 330 335

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
 340 345 350

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys  
 355 360 365

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
 370 375 380

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 385 390 395 400

<210> 22

<211> 598

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab2HeavyIL2vC

<400> 22

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Arg Phe Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys



Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 340 345 350  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 355 360 365  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 370 375 380  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 385 390 395 400  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 405 410 415  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 420 425 430  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 435 440 445  
 Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
 450 455 460  
 Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu  
 465 470 475 480  
 His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr  
 485 490 495  
 Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro  
 500 505 510  
 Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu  
 515 520 525  
 Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His  
 530 535 540  
 Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu  
 545 550 555 560  
 Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr  
 565 570 575  
 Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser



Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
 180 185 190  
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
 195 200 205  
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
 210 215 220  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 225 230 235 240  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 245 250 255  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 260 265 270  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 275 280 285  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 290 295 300  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 305 310 315 320  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 325 330 335  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 340 345 350  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 355 360 365  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 370 375 380  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 385 390 395 400  
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 405 410 415  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu

420 425 430  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly

435 440 445  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr

450 455 460  
 Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu  
 465 470 475 480

Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys  
 485 490 495  
 Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr

500 505 510  
 Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu

515 520 525  
 Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg

530 535 540  
 Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser  
 545 550 555 560

Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val

565 570 575  
 Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr

580 585 590  
 Leu Thr

<210> 24

<211> 598

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab2HeavyIL2vC(W)

<400> 24

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Arg Phe Ser Pro Ser Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg His Gly Thr Ser Ser Asp Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 115 120 125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 130 135 140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 145 150 155 160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 165 170 175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 180 185 190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 195 200 205  
 Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 210 215 220  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 225 230 235 240  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 245 250 255  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His



Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu  
 515 520 525  
 Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His  
 530 535 540  
 Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu  
 545 550 555 560  
 Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr  
 565 570 575  
 Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser  
 580 585 590  
 Ile Ile Ser Thr Leu Thr  
 595

<210> 25

<211> 594

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab4HeavyIL2vC(W)

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Val Ser Gly Phe Ile Leu Thr Glu Leu  
 20 25 30  
 Ser Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Lys Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Thr Trp Trp Asp Phe His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
 115 120 125  
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
 130 135 140  
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
 165 170 175  
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser  
 180 185 190  
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
 195 200 205  
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
 210 215 220  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 225 230 235 240  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 245 250 255  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 260 265 270  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 275 280 285  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 290 295 300  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 305 310 315 320  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 325 330 335  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro  
 340 345 350  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Leu Cys Leu

355 360 365  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

370 375 380  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Leu Thr Trp Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 405 410 415

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly

435 440 445  
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Thr

450 455 460  
 Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu

465 470 475 480  
 Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys

485 490 495  
 Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr

500 505 510  
 Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu

515 520 525  
 Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg

530 535 540  
 Asp Leu Ile Ser Arg Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser

545 550 555 560  
 Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val

565 570 575  
 Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile Ser Thr

580 585 590  
 Leu Thr

<210> 26

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab2Heavy(V)

<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 1                    5                    10                    15  
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr  
                   20                    25                    30  
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
                   35                    40                    45  
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Arg Phe Ser Pro Ser Phe  
                   50                    55                    60  
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Thr Thr Ala Tyr  
 65                    70                    75                    80  
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
                   85                    90                    95  
 Ala Arg His Gly Thr Ser Ser Asp Tyr Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly  
                   100                    105                    110  
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
                   115                    120                    125  
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
                   130                    135                    140  
 Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
                   145                    150                    155                    160  
 Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
                   165                    170                    175  
 Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
                   180                    185                    190  
 Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
                   195                    200                    205

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys

210 215 220

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly

225 230 235 240

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His

260 265 270

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val

275 280 285

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr

290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly

305 310 315 320

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile

325 330 335

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val

340 345 350

Tyr Val Tyr Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser

355 360 365

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

370 375 380

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

385 390 395 400

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val

405 410 415

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met

420 425 430

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser

435 440 445

Pro Gly

450

<210> 27

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab4Heavy(V)

<400> 27

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1                    5                    10                    15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Glu Val Ser Gly Phe Ile Leu Thr Glu Leu

                  20                    25                    30  
 Ser Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met

                  35                    40                    45  
 Gly Gly Phe Asp Pro Glu Asp Gly Lys Thr Ile Tyr Ala Gln Lys Phe

                  50                    55                    60  
 Gln Gly Arg Val Thr Leu Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr

65                    70                    75                    80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

                  85                    90                    95  
 Ala Thr Trp Trp Asp Phe His Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu

                  100                    105                    110  
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu

                  115                    120                    125  
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys

                  130                    135                    140  
 Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser

145                    150                    155                    160  
 Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

                  165                    170                    175  
 Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser

                  180                    185                    190

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn  
 195 200 205  
 Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His  
 210 215 220  
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 225 230 235 240  
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 245 250 255  
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 260 265 270  
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 275 280 285  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 290 295 300  
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 305 310 315 320  
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 325 330 335  
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Val Tyr Pro  
 340 345 350  
 Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu  
 355 360 365  
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
 370 375 380  
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
 385 390 395 400  
 Asp Gly Ser Phe Ala Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 405 410 415  
 Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 420 425 430  
 His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly



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

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

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

<210> 29

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ab2Kappa

<400> 29

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
                   20                  25                  30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                  40                  45  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                  55                  60  
  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                  70                  75                  80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Asp Asn Phe Pro Leu  
                   85                  90                  95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
                   100                  105                  110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
                   115                  120                  125  
  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
                   130                  135                  140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145                  150                  155                  160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
                   165                  170                  175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
                   180                  185                  190  
  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
                   195                  200                  205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                   210  
 <210> 30  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Ab4Kappa  
 <400> 30

Asp Phe Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
                   20                    25                    30  
  
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro  
                   35                    40                    45  
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro  
                   50                    55                    60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ser  
                   85                    90                    95  
  
 Ile Gln Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   100                    105                    110  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
                   115                    120                    125  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
                   130                    135                    140  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 145                    150                    155                    160  
  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
                   165                    170                    175  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
                   180                    185                    190  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
                   195                    200                    205  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
                   210                    215

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Linker

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser

1

5