(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0169151
(43) 공개일자 2024년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/64 (2017.01) *A61K 38/00* (2006.01)
C07K 14/54 (2024.01) *C07K 16/28* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) *C07K 16/32* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/64 (2017.08)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7032672
(22) 출원일자(국제) 2023년03월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년09월30일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/014302
(87) 국제공개번호 WO 2023/167947
국제공개일자 2023년09월07일
(30) 우선권주장
63/315,529 2022년03월01일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
크로스링크 테라퓨틱스 인코포레이티드
미국 매사추세츠 02139 캠브리지 펄 스트리트 244
(72) 발명자
차파로 로돌포 제이.
미국 매사추세츠 02139 캠브리지 펄 스트리트 244 크로스링크 테라퓨틱스 인코포레이티드 내
세이델 로날드 디. 3세
미국 매사추세츠 02139 캠브리지 펄 스트리트 244 크로스링크 테라퓨틱스 인코포레이티드 내
(74) 대리인
특허법인와이에스장

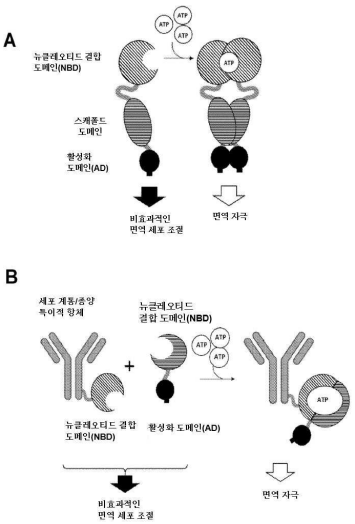
전체 청구항 수 : 총 32 항

(54) 발명의 명칭 **면역 세포 기능을 갖는, 항암제로서의 ATP 의존성 작용제**

(57) 요 약

본 개시는 충분한 수준의 ATP에 노출될 때 면역 세포 기능의 작용제로서 작용하여 이들의 이량체 또는 보다 높은 수준의 복합체(예를 들어, 삼량체, 사량체 등)로의 조립을 유발하는 폴리펩티드 작제물을 제공한다. 상기 작제물의 복합체는 항-종양 면역 반응을 촉진하도록 기능하는 면역 세포(예를 들어, 세포독성 CD8+ T 세포 및/또는 NK 세포)를 자극할 수 있다. 상기 작제물은 ATP의 수준이 상승된 고형 종양의 치료를 위한 항암제/치료제로서 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C07K 14/5418 (2013.01)
C07K 14/5434 (2013.01)
C07K 14/5443 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 16/2866 (2013.01)
C07K 16/2878 (2013.01)
C07K 16/3069 (2013.01)
C07K 16/32 (2013.01)
C07K 2319/80 (2013.01)

(30) 우선권주장
63/330,120 2022년04월12일 미국(US)
63/353,896 2022년06월21일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

폴리펩티드 작제물로서, 뉴클레오티드 결합 도메인(NBD) 아미노산(aa) 서열, 및 선택적으로 링커 펩티드 서열에 의해 연결된 종양 특이적 결합제(TSB) aa 서열을 포함하며; 여기에서 상기 NBD는 하나 이상의 아데노신 삼인산(ATP) 결합 부위를 포함하고, ATP의 존재 하에 동족 비-동일 NBD와 동종이량체화되거나 이종이량체화될 수 있는, 폴리펩티드 작제물.

청구항 2

제1항에 있어서, 스캐폴드 aa 서열을 추가로 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

청구항 3

조성물로서, 제2항의 제1 폴리펩티드 작제물 및 제2 폴리펩티드 작제물을 포함하며, 여기에서 상기 제1 폴리펩티드 작제물은 제1 NBD aa 서열을 포함하고, 상기 제2 폴리펩티드 작제물은 제2 NBD aa 서열을 포함하고, 상기 제1 및 상기 제2 NBD aa 서열은 ATP의 존재 하에서 동종이량체화되거나 이종이량체화되어 동종이량체 또는 이종이량체 복합체를 형성할 수 있는 동족 서열인, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 제1 및 제2 폴리펩티드 작제물은 동종이량체화되는, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물의 TSB 및 제2 폴리펩티드 작제물의 TSB는: PD-L1, 메소텔린, 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 세포독성 T-림프구 연관 단백질 4(CTLA-4), 탄산 무수효소 IX(CAIX), 카드헤린, 암배아 항원(CEA), 세포- 중간엽 상피 전이 인자(c-MET), 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 계열 구성원, 에프린 A형 수용체 3(EphA3), 섬유아세포 활성화 단백질 알파(FAP), 엽산-결합 단백질, 엽산 수용체 알파(FR-알파), Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 2(HER2), Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 3(HER3), 인슐린 유사 성장 인자 1 수용체(IGF-1R), 인테그린 αVβ3. 인테그린 α5β1, 용질 담체 계열 39 구성원 6(Liv1), 흑색종-연관 항원 계열 A 구성원(MAGEA), 흑색종-연관 항원 계열 C 구성원(MAGEC), 뮤신(예를 들어, MUC1), 뉴욕 식도 편평 세포 암종 1 단백질(NY-ESO-1, 암/고환 항원 1A, 암/고환 항원 1B), 암/고환 항원 2(NY-ESO-2, CTAG2), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 핵 인자 카파 B 리간드의 수용체 활성화제(RANKL), 수용체 티로신 키나아제 유사 고아 수용체 1(ROR1), 테나신, TNF 수용체 상과 구성원 10a(TRAILR1), TNF 수용체 상과 구성원 10b(TRAILR2), 및 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR)로 이루어진 군으로부터 선택되는 종양 연관 항원(TAA)에 결합하는, 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 각각의 스캐폴드는 면역글로불린 폴리펩티드 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 각각의 스캐폴드는 IgFc aa 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 각각의 스캐폴드는 독립적으로 선택된 비-이량체화 IgFc를 포함하는, 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 면역글로불린 Fc(IgFc) 폴리펩티드 aa 서열은 항체 관련 효과기 기능을 유도할 수 있거나, IgFc 폴리펩티드 aa 서열은 ADCC, ADCP, 및 CDC로부터 선택되는 적어도 하나의 항체 관련 효과기 기능을 강화시키는 하나 이상의 치환을 포함하는, 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 각각의 NBD는 ATP-결합 카세트(ABC) 수송체의 NBD인, 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, NBD는 TAP1 NBD를 포함하는, 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, TAP1 NBD는 서열번호 10, 87, 또는 88 중 어느 하나의 aa 서열, 또는 이들 서열 중 어느 하나와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 조성물.

청구항 13

제3항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물의 TSB 및 제2 폴리펩티드 작제물의 TSB는 메소틸렌 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택되는 종양 연관 항원(TAA)에 결합하는, 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 폴리펩티드 작제물은, CD3, CD4, CD8, αβTCR, CD2, TCRα 사슬, TCRβ 사슬, δγTCR, TCR γ 사슬, TCR δ 사슬, TRGV9, CD84, CXCR1, CD13, CD33, CD34, 및 CD16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질에 대한 친화도를 갖는 면역 세포 결합 도메인을 추가로 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 폴리펩티드 작제물은, 4-1BBL, CD40L, CD28, IFN-γ, TNF 상과 구성원, TNF, 림프독소 α, 림프독소 αβ, BAFF(CD25), B7 상과 구성원, CD80, CD86, IL-15, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, PD1, 항-CD3, 항-CTLA4, 및 항-CD28로 이루어진 군으로부터 선택되는 활성화 도메인(AD)을 추가로 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

청구항 16

암을 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 작제물 또는 조성물을 환자 또는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 17

암의 치료를 위한, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

청구항 18

암 치료용 의약의 제조를 위한, 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 작제물 또는 조성물의 용도.

청구항 19

제18항에 있어서, 암은 중피종, 흑색종, 육종, 암종, 암육종, 림프종, 또는 생식 세포 종양인, 용도.

청구항 20

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 작제물 또는 조성물 중 하나 이상을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산, 또는 선택적으로 프로모터 또는 유도성 프로모터의 조절 하에서 상기 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 21

제20항의 벡터 또는 핵산을 포함하는 세포.

청구항 22

조성물로서, 선택적으로 링커 펩티드 서열에 의해 연결된, 제1항의 제1 폴리펩티드 작제물 및 하나 이상의 ATP

결합 부위와 면역 세포 결합체(ICE) aa 서열을 포함하는 NBD aa 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드 구조를 포함하며;

여기에서

A) 상기 제1 및 제2 폴리펩티드 작제물은 선택적으로 스캐폴드 aa 서열을 포함하고,

B)

(i) 상기 제1 폴리펩티드 작제물의 NBD aa 서열은 제1 이종이량체화 NBD aa 서열을 구성하고 상기 제2 폴리펩티드 작제물의 NBD aa 서열은 제2 이종이량체화 NBD aa 서열을 구성하고;

(ii) 상기 제1 이종이량체화 NBD aa 서열은 상기 제2 이종이량체화 NBD aa 서열의 동족 결합 파트너이고;

(iii) 상기 제1 폴리펩티드 작제물 및 상기 제2 폴리펩티드 작제물은 ATP의 존재 하에서 상기 제1 이종이량체화 NBD aa 서열 및 상기 제2 이종이량체화 NBD 서열 사이의 상호작용을 통해 서로에 대해 결합하여 상기 제1 및 제2 폴리펩티드 작제물의 이종이량체 또는 고차 복합체를 형성하는, 조성물.

청구항 23

제22항에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물의 TSB는: 메소텔린, 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 세포독성 T-림프구 연관 단백질 4(CTLA-4), 탄산 무수효소 IX(CAIX), 카드헤린, 암배아 항원(CEA), 세포- 중간엽 상피 전이 인자(c-MET), 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 계열 구성원, 에프린 A형 수용체 3(EphA3), 섬유아세포 활성화 단백질 알파(FAP), 엽산-결합 단백질, 엽산 수용체 알파(FR-알파), Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 2(HER2), Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 3(HER3), 인슐린 유사 성장 인자 1 수용체(IGF-1R), 인테그린 αVβ3 인테그린, α5β1, 용질 담체 계열 39 구성원 6(Liv1), 흑색종-연관 항원 계열 A 구성원(MAGEA), 흑색종-연관 항원 계열 C 구성원(MAGEC), 뮤신(예를 들어, MUC1), 뉴욕 식도 편평 세포 암종 1 단백질(NY-ESO-1, 암/고환 항원 1A, 암/고환 항원 1B), 암/고환 항원 2(NY-ESO-2, CTAG2), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 핵 인자 카파 B 리간드의 수용체 활성화제(RANKL), 수용체 티로신 키나아제 유사 고아 수용체 1(ROR1), 테나신, TNF 수용체 상과 구성원 10a(TRAILR1), TNF 수용체 상과 구성원 10b(TRAILR2), 및 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR)로 이루어진 군으로부터 선택되는 종양 연관 항원(TAA)에 결합하고;

상기 제2 폴리펩티드 작제물의 ICE는, CD3, CD4, CD8, αβTCR, CD2, TCRα 사슬, TCRβ 사슬, δγTCR, TCR γ 사슬, TCR δ 사슬, TRGV9, CD84, CXCR1, CD13, CD33, CD34, 및 CD16으로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질에 대해 친화도를 갖는, Fab, Fab', scFv, 앱타머, 또는 나노바디를 포함하는, 조성물.

청구항 24

제22항에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물의 TSB는 메소텔렌 및 EpCAM으로 이루어진 군으로부터 선택되는 TAA에 결합하는, 조성물.

청구항 25

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, ICE는, CD3, CD4, CD8, αβTCR, CD2, TCRα 사슬, TCRβ 사슬, δγTCR, TCR γ 사슬, TCR δ 사슬, TRGV9, CD84, CXCR1, CD13, CD33, CD34, 및 CD16으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질에 대한 친화도를 갖는, 조성물.

청구항 26

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는, 4-1BBL, CD40L, CD28, IFN-γ, TNF 상과 구성원, TNF, 림프독소 α, 림프독소 αβ, BAFF(CD25), B7 상과 구성원, CD80, CD86, IL-15, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, PD1, 항-CD3, 항-CTLA4, 항-CD28로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 활성화 도메인(AD)을 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 27

암을 치료하는 방법으로서, 제22항 내지 제24항 중 임의의 조성물을 환자 또는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 28

암의 치료를 위한, 제22항 내지 제24항 중 어느 한 항의 조성물.

청구항 29

암 치료용 의약의 제조를 위한, 제22항 내지 제24항 중 어느 한 항의 조성물의 용도.

청구항 30

제29항에 있어서, 암은 중피종, 흑색종, 육종, 암종, 암육종, 림프종, 또는 생식 세포 종양인, 용도.

청구항 31

제22항 내지 제24항 중 어느 한 항의 조성물 중 하나 이상을 암호화하는 서열을 포함하는 핵산, 또는 선택적으로 프로모터 또는 유도성 프로모터의 조절 하에서 상기 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 32

제31항의 벡터 또는 핵산을 포함하는 세포.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 출원은 2022년 3월 1일에 출원된 미국 특허 가출원 제63/315,529호, 2022년 4월 12일에 출원된 미국 특허 가출원 제63/330,120호, 및 2022년 6월 21일에 출원된 미국 특허 가출원 제63/353,896호의 이익을 주장한다.

[0002] **서열 목록의 통합**

[0003] 2023년 3월 1일에 생성되고, 37 CFR 1.822 내지 1.824에 따라 제조되고, 본 출원의 출원과 동시에 제출된, 205,746 바이트를 포함하는, 2974-3_PCT_ST26.xml로 명명된 ST.26 XML 포맷의 서열 목록은 그 전체가 본원에 참조로서 통합된다.

배 경 기 술

[0004] 강력한 항암 요법은 이상적인 치료적 투여량보다 훨씬 낮은 투여량에서 나타나는 전신 독성 효과로 인해 여전히 제한적이다. 사이토카인 및 항-T 세포 수용체 항체와 같은 면역 작용제는 전신으로 전달될 경우 특히 독성이며, 잠재적으로 사이토카인 방출 증후군 및 사망과 같은 중증 이상반응을 야기한다. 전신 용량/독성(즉, "치료 지수")에 비해 면역치료제의 종양 내 유효 용량을 증가시키기 위한 전략은 종양내 투여 및 종양 연관 항원("TAA")에 대한 항체에 면역치료제를 연결하여 표적화하는 방법을 포함한다. 그러나, 종양내 전달은 맞춤형이고 침습적이기 때문에, 이에 연관된 수술적 복잡성 및 물류적 복잡성으로 인해 대규모의 환자 개체군에 적용될 수 있는 능력이 제한된다. TAA를 표적화하는 보다 새로운 제제는 면역 작용제가 표적 TAA의 밀도가 충분한 부위에서만 생물학적으로 유효한 농도로 축적되는 조건을 부여하는 것을 시도한다. TAA-표적화 면역 작용제는: 면역치료제에 의해 접근 가능한 세포 표면 상에서 발현되는 고유하고 검증된 TAA의 적은 수; 낮은 TAA 밀도로 인한 낮은 효율; TAA 발현의 손실로 인한 암의 탈출; 진정한 종양 특이적이지 않은 TAA로 인한 표적-내/종양-외 독성; 및 전신 요법 대비 각각의 TAA가 낮은 치료 범위의 상이한 약물을 필요로 한다는 사실을 포함하나 이에 한정되지 않는 심각한 한계를 갖는다.

[0005] 면역 효능작용 및/또는 TAA 결합의 화학량론의 증가 또한 TAA 표적 면역요법의 효능을 강화하는 수단으로 탐구되었다. 예를 들어, 블리나투모맙과 같은 1세대 이중특이적 T 세포 결합체는 1:1의 화학량론을 위해 단일 항-CD3 도메인과 쌍을 이루는 단일 항-TAA 도메인을 포함한다. 그러나, 이중특이적 T 세포 결합체 AFM11의 경우, 2:2의 항-TAA:항-CD3 화학량론이 대신 사용되었다. 해당 포맷은 시험관 내에서 보다 강력한 T 세포 매개 종양 세포 사멸과 연관되었으며, 중요하게는, 종양 세포 사멸에 요구되는 세포독성 효과기 T 세포의 수를 감소시켰다. 그러나, AFM11의 후속 임상 시험은 심각한 독성을 나타냈으며, 이로 인해 해당 연구는 종결되었다. 항체 유사 분자의 Fc 도메인에 대한 개념적으로 유사한 화학량론적 증가는 시험관 내 효능에 있어서의 유사한 증가를 나타냈다. 이러한 화학양론적 변형은 TAA 및 면역 수용체 결합에 있어서의 결합능 강화를 통해 작용할 가능성이 있다. 추가적으로, Fc 수용체 또는 T 세포 수용체와 같은 면역 수용체의 가교결합은 이들 수용체 및

신호 전달 경로를 통해 신호 전달을 증폭시킴으로써 보다 강력한 면역 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 효과기 T 세포 및 항원 밀도 요건을 감소시키는 것을 포함하여, 면역 수용체를 화학량론적으로 강화된 면역치료제와 결합시킴으로써, 보다 강력한 종양-표적화가 잠재적으로 가능해진다. 그러나, 이러한 강화된 면역치료제는 안전성 우려로 인해 임상 적용에 어려움을 겪는다.

[0006] 표적화된 면역요법은 대부분의/모든 종양에 대해 일반화 가능하고, 종양 생존에 중요하며, 정상 조직에 비해 고도로 발현되는 종양 특성을 이용함으로써, 현재의 면역요법에 대한 전술한 장애물을 회피할 수 있다. 종양 미세환경(TME)은 혈관계, 면역 및 지지 세포, 세포외 기질 및 종양 주위의 국소 분자를 포함한다. TME는 다수의 상이한 종양 유형에 걸쳐, 낮은 pH, 높은 세포외 아데노신 삼인산(ATP) 함량, 제한된 산소 수준(저산소증), 누출 혈관구조 및 종양 프로테아제(예를 들어, MMP)의 존재를 포함하는 특징을 공유한다. 이들 특징 중, 세포외 ATP는 대부분의 종양, 아니면 모든 종양에 대해 공통적인 변경되고 필수적인 종양 대사 프로그램의 산물이기 때문에, 이는 신규 부류의 면역치료제 개발에 활용될 수 있는 우수한 후보이다. 세포외 ATP는 또한 정상 조직(약 0.1 μM 미만)에 비해 TME(50~1000 μM)에서 매우 높은 수준으로 관찰된다.

발명의 내용

[0007] 본 개시는 종양에서의 강력한 암 치료제의 조건부(ATP-의존적) 조립을 위한 트리거로서의 종양 ATP의 사용을 가능하게 하는 뉴클레오티드 결합 도메인(NBD)을 포함하는 분자 작제물을 포함하며, 이를 제공한다. NBD-함유 작제물은 TME에서 발견되는 ATP 수준의 존재 하에서 이량체 또는 고차 복합체를 형성한다. NBD-함유 작제물은, 무엇보다도, 다양한 암을 치료하기 위한 치료제로서 사용된다. 해당 작제물을 사용하는 요법은 ATP 유도 복합체화(예를 들어, 이량체화)가 TME 내로 면역 세포를 동원하고/하거나 TME 내에서 면역 세포를 자극하는 제제를 생성할 수 있다는 사실을 활용하도록 설계된다. 자극은, 예를 들어, 작제물의 ATP 유도 복합체화의 결과로서 면역 세포에 제시된 면역조절 단백질 도메인을 다량체화하여, 예를 들어 수용체의 가교 결합을 야기할 수 없는 단일 면역조절 단백질 서열에 비해 면역 세포의 보다 효과적인 자극을 생성함으로써 발생할 수 있다. NBD-함유 작제물의 이량체 또는 다른 고차 복합체는 또한 종양 세포의 표적화된 ADCC(항체 의존성 세포 매개 세포독성) 및/또는 CDC(보체 의존성 세포독성)를 포함하는 다른 메커니즘을 통해 작용할 수 있다. 주변 조직 대비 ATP 수준의 상승이 TME에서 사실상 보편적이기 때문에, 작제물은 다양한 종양 유형을 치료하기 위한 메커니즘을 제공한다. 또한, 이량체 또는 고차 작제물의 조립을 거치지 않은 개별 작제물은 면역 자극을 유발하는 능력이 제한되거나 없기 때문에, 이량체화 또는 복합체 형성을 야기할 수 있는 TME에서의 상승된 ATP 수준은 ATP가 더 낮은 농도인 비-종양 조직에서 보다 낮은 효과를 가지면서 강력한 국소 자극을 유도할 수 있다. 따라서, TME에서 발견되는 ATP 수준의 존재 하에 면역조절 아미노산 서열을 다가 상태로 조립할 수 있는 작제물은 TME에서의 면역 세포 작용 조절 및 선택성 면역 매개 항종양 작용 유발에 사용될 수 있다.

[0008] NBD-함유 작제물은 또한 트랜스- 및 시스- 표적화를 포함하는 여러 다른 이점을 제공한다. NBD-함유 작제물에 의한 Cis-표적화는 (예를 들어, IL-2 또는 CD28과 같은 면역 자극제 작용제를 제공함으로써) 종양 침윤 백혈구의 자극에 영향을 미쳐 항종양 면역 반응을 증폭시킬 수 있다. TAA에 대해 트랜스-표적화될 경우, 해당 작제물은 TAA를 보유하는 종양 세포의 면역 매개 세포 용해를 야기하며, 이는 ATP 수준의 국소 상승으로 인한 작용 이상의 추가적인 종양 특이적 작용을 추가한다. 사용된 표적화 체계(예를 들어, 시스- 또는 트랜스-표적화)에 관계없이, 작제물은, 예를 들어, 각각 가교 결합을 필요로 하는 수용체를 통해 작용하는, CD40L, CD28, IFN-g, IL-12 등으로부터 유래된 다양한 면역조절제 도메인을 사용할 수 있게 한다. 본원에 기술된 NBD-함유 작제물의 다른 장점은, 상대적으로 작은 크기로 인해 종양 조직으로의 침투가 가능하다는 점과, 이들이 이량체 또는 고차 복합체로 조립될 때 크기가 증가하여 TME로부터의 확산이 감소한다는 점을 포함한다.

[0009] 작제물에 대한 설명에 더하여, 본 개시는 또한 이의 제조 방법 및 이의 사용 방법을 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 ATP 결합 부위를 갖는 NBD, 스캐폴드 도메인(스캐폴드 aa 서열), 및 링커 서열에 의해 연결된 면역 세포 활성화 도메인(AD)을 포함하는, 본 개시의 작제물의 다이어그램(A)을 제공한다. 다이어그램(A)의 우측은 또한, 결합 부위가 실질적으로 점유되기에 충분한 ATP 농도(예를 들어, NBD에 결합하는 ATP의 Kd 범위의 농도 또는 이보다 높은 농도)의 존재 하에서의 해당 작제물의 이량체화를 나타낸다. 도 1의 다이어그램(B)는 다음을 제공한다: (i) 종양 특이적 결합제(2가 세포 계통 또는 종양 특이적 항체로서 예시되지만, 이는 scFv 또는 나노바디와 같은 1가 결합제일 수 있음 및 링커에 의해 연결된 이종이량체화 NBD 쌍의 제1 NBD를 포함하는 제1 작제물; 및 (ii) 링커에 의해 연결된 이종이량체화 NBD 쌍의 제2 NBD를 포함하는 제2 작제물. 다이어그램(B)의 우측은 ATP

의 존재 하에서의 NBD 도메인의 이량체화로 인한 제1 및 제2 작제물의 이종이량체의 형성을 나타낸다.

도 2는 NBD 및 AD를 포함하는 일련의 작제물(구조 A 내지 E)을 제공하며, 여기에서 구조 C, D, 및 E의 작제물은 또한 이량체화되지 않을 수 있거나 교차특이적일 수 있는 스캐폴드 서열을 포함한다. 각각의 작제물의 요소는 독립적으로 선택된 선택적인 링커에 의해 연결된다. 해당 도면은 또한 ATP의 존재 하에서의 해당 작제물의 이량체의 형성을 나타낸다.

도 3은 일련의 작제물 쌍(구조 A 내지 O)을 제공한다. A 내지 I에서, 각각의 쌍의 제1 작제물은 하나 이상의 NBD 및 TAA에 결합하는 종양 특이적 결합제를 포함하며, 해당 쌍의 제2 작제물은 NBD 및 AD 및/또는 1가 면역 세포 결합체를 포함한다. J 내지 M에서, 각각의 쌍의 제1 작제물은 하나 이상의 NBD 및 면역 세포 결합체를 포함하고, 해당 쌍의 제2 작제물은 NBD 및 AD를 포함한다. 작제물 쌍 E 내지 I, L, 및 M 각각은 해당 작제물 중 적어도 하나에서 스캐폴드를 갖는다. N 및 O에서, 각각의 쌍의 제1 작제물은 종양 특이적 결합제 및 2개의 NBD를 포함하고, 해당 쌍의 제2 작제물은 NBD 및 AD를 포함한다. O의 작제물은 또한 스캐폴드 서열을 포함한다. 도 3은 또한 ATP의 존재 하에서의 해당 작제물의 이량체의 형성을 나타낸다. 각각의 작제물의 요소는 독립적으로 선택된 선택적인 링커에 의해 연결된다.

도 4a는 2개 이상의 NBD를 포함하고 ATP의 존재 하에서(예를 들어, TME에서) 중합체화되어 복합체를 형성할 수 있는 일련의 작제물(A, C, 및 D 참조), 작제물 쌍(B, E, F, G, 및 I), 또는 (H에서의) 작제물 삼중체을 제공한다. 일부 경우, 작제물 중 하나 이상은 스캐폴드 서열을 포함하고, 각각의 작제물은 독립적으로 선택된 선택적인 링커에 의해 결합될 수 있다. 해당 도면은 또한 각각의 경우에 존재하는 작제물을 포함하는 ATP의 존재 하에서의 복합체의 형성을 나타낸다.

도 4b는 종양 환경에서 발견되는 것과 같은, 상승된 ATP의 존재 하에서 동종이량체를 형성하는 종양 특이적 결합제(예를 들어, 항-메소텔린과 같은 항체)에 결합된 NBD의 예를 나타낸다. (A)에서, 작제물은 단일특이적 또는 이중특이적일 수 있고, 이에 따라 ATP의 존재 하에서 사량체 또는 사량체-유사 복합체를 생성하는 2가 항체를 포함한다. 해당 분자는 Fc 도메인을 포함할 필요는 없으며, 이는 2개의 항원 결합 도메인(예를 들어, VHH 또는 scFV 종양 특이적 항원 결합제)을 가질 수 있고, 여전히 2가로 유지될 수 있다. (B), (C), 및 (D)에서, 동종이량체화 작제물은 NBD 1가 단쇄 항체를 포함한다. (A) 내지 (D)에서의 종양 특이적 결합제는, 예를 들어 항-HER2, 항-메소텔린, 항-EpCAM, 항-CLA-4, 또는 항-PSMA일 수 있다. 스캐폴드 서열이 존재할 경우, 이들은 FcγRI, FcγRII, FcγRIII 수용체 및/또는 C1q 단백질 중 임의의 하나 이상에 결합할 수 있는 면역글로불린 Fc 펩티드(예컨대 IgG1 Fc)일 수 있다. 이들 단백질 중 하나 이상에 결합할 수 있는 복합체는 항체 의존성 기능, 예컨대 항체 의존성 세포 세포독성(ADCC), 항체 의존성 세포 식균작용(ADCP), 및/또는 종양 특이적 결합제 성분(들)이 결합할 수 있는 표적(예를 들어, 항원)을 발현하는 세포에 대해 유도된 보체 의존성 세포독성(CDC)을 야기할 수 있다. 따라서, 이러한 항체 기능은 종양 세포의 제거를 위해 치료적으로 사용될 수 있다.

도 5는 2개의 ATP 분자를 포함하는, 항원 프로세싱 1(TAP1) NBD와 연관된 수송체의 이량체를 나타낸다.

도 6은 다음의 NBD 도메인의 정렬을 나타낸다: 야생형 TAP1(서열번호 9), UniProtKB - O95477로부터의 ABCA1 유전자 산물(서열번호 1), UniProtKB - P08183로부터의 ABCB1 유전자 산물(서열번호 2), UniProtKB - P33527로부터의 ABCC1 유전자 산물(서열번호 3), UniProtKB/Swiss-Prot: P33897로부터의 ABCD1 유전자 산물(서열번호 4), UniProtKB/Swiss-Prot: P61221로부터의 ABCE1 유전자 산물(서열번호 5), UniProtKB - Q8NE71로부터의 ABCF1 유전자 산물(서열번호 6), 및 UniProtKB/Swiss-Prot: P45844로부터의 ABCG2 유전자 산물(서열번호 7). TAP1 aa 서열의 aas 46에서 55까지의 Walker A 영역 서열의 일부, 및 aas 152에서 156까지의 LSGGQ 서열은 밑줄이 그어지고 굵은 글씨로 표시되어 있다. 도 3에 나타낸 TAP1 NBD의 가수분해 산성 아미노산(즉, 위치 177에서의 Asp) 및 Asp(D) 또는 Glu(E) 잔기가 제시되어 있다.

도 7은 UniProtKB - Q03519(서열번호 11)로부터의 인간 TAP2의 서열을 나타낸다.

도 8은 N676G, S677N, Q680R, E682Q, 및/또는 Q683R 치환을 보유하는 TAP1 변이체의 SDS-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(PAGE) 겔을 나타낸다. 좌측으로부터 우측으로, 레인은: 분자량 마커(M), 환원된 샘플(R), 빈 레인, 및 비-환원된 샘플(NR)이다.

도 9는 N676G, S677N, Q680R, E682Q, 및/또는 Q683R 치환 및 해당 서열에 존재하는 시스테인의 세린으로의 치환을 보유하는 TAP1 NBD 변이체 폴리펩티드의 크기 배제 크로마토그램을 나타내며, 여기에서 (i) 1 mM 아데노신 이인산염(ADP)의 존재 하에서는 폴리펩티드의 단량체 형태(명목 Mw 37 kDa)가 생성되고, (ii) 1 mM 아데노신 삼인산염(ATP)의 존재 하에서는 폴리펩티드의 이량체 형태(명목 Mw 57 kDa)가 생성된다.

도 10은 도 9의 크로마토그래피에 따른 동일한 TAP1 NBD 변이체의 질량 광도 측정 평가 결과를 제공한다. 1 mM ATP의 존재 하에서 수득된 결과는 TAP1 NBD 변이체의 이량체화를 나타낸다.

도 11은 (A) ADP 또는 (B) ATP의 존재 하에서의 TAP1에 대한 동적 광 산란(DLS) 크기 측정 결과를 제공한다.

도 12는 ADP 및 ATP의 존재 하에서의 정제된 단백질의 동종이량체화 및 크로마토그래피 분석을 위해 변형된, 서열번호 87의 정제된 TAP1 NBD의 쿠마시 블루 염색 겔을 제공한다.

도 13은 다음으로부터의 SDS-PAGE 겔을 나타낸다: (A) 서열번호 87 및 서열번호 88에 의해 제공된 TAP1 NBD 폴리펩티드의 유도된 발현; 및 (B) 서열번호 88의 폴리펩티드의 정제.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] **A. 정의**

[0012] 본원에서 사용되는 바와 같이, 아미노산(단수로서의 "aa" 또는 복수로서의 "aas")은 포유류 세포 번역에 있어서의 폴리펩티드 및 단백질 내에 혼입된 자연 발생 단백질원성 아미노산을 의미한다. 달리 언급되지 않는 한, 이들은 다음과 같다: L(Leu, 류신), A(Ala, 알라닌), G(Gly, 글리신), S(Ser, 세린), V(Val, 발린), F(Phe, 페닐알라닌), Y(Tyr, 티로신), H(His, 히스티딘), R(Arg, 아르기닌), N(Asn, 아스파라긴), E(Glu, 글루탐산), D(Asp, 아스파라긴), C(Cys, 시스테인), Q(Gln, 글루타민), I(Ile, 이소류신), M(Met, 메티오닌), P(Pro, 프롤린), T(Thr, 트레오닌), K(Lys, 리신), 및 W(Trp, 트립토판). Aa는 또한 포유류 세포에서 발견되는 일부 단백질에서 나타나는 aas 하이드록시프롤린 및 셀레노시스테인을 포함하지만; 이들의 존재가 명시적으로 표시되지 않는 한, 이들을 포함하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0013] 서열의 특정 위치에서의 aa의 치환은, 단일 또는 삼중 문자 코드로 주어진 원래의 aa, 해당 aa의 숫자 위치, 및 단일 또는 삼중 문자 코드로 서열내에 치환되는 aa로 표시된다. 예로서, 프롤린(P)으로 치환된 서열의 위치 12에서의 알라닌(A)은 단일 문자 코드를 사용하는 경우 A12P로, 또는 삼중 문자 코드를 사용하는 경우 Ala12Pro로서 표시된다. 둘 이상의 치환이 동일한 서열에서 나타나는 경우, 이들은 슬래시 "/"로 구분될 수 있다. 따라서, V23A 및 Q41G 치환을 갖는 동일한 서열에서의 전술한 A12P 치환은 서열 A12P/V23A/Q41G로 표시될 수 있다.

[0014] 용어 "폴리펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 상호 교환적으로 사용되며, 달리 언급되지 않는 한, 포유류 세포에서의 번역 동안 단백질에 생합성적으로 통합되는 자연 발생 단백질원성 L-aas인 aas의 중합체 형태를 지칭한다.

[0015] 상이한 서열의 상응하는 잔기를 식별하기 위한 정렬은 미국 국립 생명공학 정보 센터(US National Center for Biotechnology Information, NCBI) BLAST 프로그램(blastp 공개본 BLAST+ 2.9.0, 웹사이트 blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE =Proteins) 또는 유럽 생물정보학 연구소(European Bioinformatics Institute)의 Clustal Omega 프로그램(버전 1.2.4, www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/에서 이용 가능)으로 기본 파라미터를 사용하여 수행될 수 있다. 달리 언급되지 않는 한, Clustal Omega는 상이한 서열에서 상응하는 잔기를 식별하는 데 사용된다.

[0016] 서열 동일성 백분율은 정렬된 2개의 아미노산 또는 핵산 서열 간의 동일한 아미노산 또는 뉴클레오티드의 백분율을 지칭한다. 달리 언급되지 않는 한, 서열 동일성 백분율은 BLAST+ 2.9.0 버전을 사용하여, 폴리펩티드에 대해 blastp 정렬, 또는 핵산에 대해 blastn 정렬을 기본 매개변수로 사용하여 결정된다.

[0017] 달리 명시되지 않는 한, 용어 "실질적으로"는 "전체적으로" 및 "전체는 아니지만 전반적으로" 둘 모두를 포함하는 것으로 의도된다. 예를 들어, "실질적으로 ADCC 또는 CDC를 통해 세포 용해를 유도하지 않는" Ig Fc는 세포 용해를 전혀 유도하지 않거나, ADCC 또는 CDC를 통해 세포 용해를 거의 유도하지 않는 Ig Fc를 의미한다.

[0018] **B. 설명**

[0019] 종양 내 미세환경은 비악성 조직과는 여러 면에서 상이하며, 이는 pH, ATP 함량, 제한된 산소 수준(저산소증), 및 종양 프로테아제(예를 들어, MMP) 수준 중 임의의 하나 이상의 차이를 포함한다. 정상(비-종양) 조직에서의 세포외 ATP 수준은 대체적으로 정상 조직에서 0.01~0.1 마이크로몰(μM)의 범위인 반면, 고형 종양에서의 ATP의 세포외 수준은 대체적으로 50~200 μM의 범위이다. 본 개시는 종양 내 세포에 대한 면역 반응의 유발을 위한, 종양 미세환경에서 발견되는 ATP 수준의 용도를 기술하고 제공한다. 보다 구체적으로, 본원에 기술된 몇몇 작제물은 면역 세포 활성화 도메인("AD")(즉, 면역 세포와 결합하여 이를 자극하는 면역조절 분자의 활성화 도메인) 및 종양 미세환경(TME)에서 발견되는 수준에의 ATP의 존재 하에서 상당량의 이량체 또는 다른 고차 복합체를 형성하는 적어도 하나의 NBD를 포함할 수 있다. NBD의 이량체화 또는 고차 복합체 형성은 2개 이상의 면역 세포

AD를 제시하는 복합체를 생성한다. 이량체 또는 고차 복합체로서 제시되는 경우 NK 세포 및 CD8+ T 세포와 같은 면역 세포를 자극할 수 있지만, 단독으로 제시될 경우 그 자체로는 동일한 면역 세포를 동일한 정도로 자극하지 않는 면역 세포 AD를 사용은 TME 내에서 면역 반응의 종양내 자극을 허용한다.

[0020] 본원에 기술된 다른 작제물은 TAA 또는 면역 세포 결합 도메인에 결합하는 종양 특이적 결합 도메인 및 종양 미세환경에서 발견되는 수준의 ATP의 존재 하에서 상당량의 이량체 또는 다른 고차 복합체를 형성하는 적어도 하나의 NBD를 포함할 수 있다. 이러한 작제물은 선택적으로 AD를 포함할 수 있다. NBD의 이량체화 또는 고차 복합체 형성은 TME에서 면역 세포를 동원 및/또는 자극할 수 있는 이량체 또는 고차 복합체를 생성한다. 이러한 작제물의 이량체화 또는 다른 고차 복합체화는 TME의 외부에서는 고차 복합체를 형성하지 않기 때문에, 종양 외부에서의 면역 자극을 제한하면서 면역 반응의 종양내 자극을 허용한다.

[0021] 복합체화되지 않은 작제물의 AD, 종양 특이적 결합 도메인, 및 면역 세포 결합체는 단독으로 제시될 경우 NK 세포 및 CD8+ T 효과기 세포와 같은 세포를 효과적으로 자극하지 않기 때문에, 이러한 작제물은 전신 면역 활성화 및 연관된 독성 효과를 야기하지 않는다. 그러나, 본원에 기술된 작제물은, 복합체 형성을 유도하기에 충분한 ATP가 있는 TME에 국소화된 면역 자극을 제공하기 때문에, 이는 해당 작용이 해당 환경으로 제한되는, 면역 세포 기능의 ATP 의존성 작용제의 형태로 간주될 수 있다. 추가적으로, 이러한 작제물의 복합체 형태(예를 들어, 이량체, 삼량체 등)는 크기 및 분자량의 증가를 수반하기 때문에, TME로부터의 이들의 확산은 추가적으로 감소되며, 이에 따라 TME에 대한 이들의 작용은 제한된다. TME의 외부로 확산되는 이들 이량체 또는 고차 복합체는 주변 비악성 조직의 ATP 수준이 이들의 복합체화를 지원하기에는 너무 낮기 때문에, 비효과적인 개별 단량체로 해리될 것이다. 따라서, 본원에 기술된 작제물의 복합체에 의해 제공되는 면역 자극은 가역적이며, ATP 수준이 복합체화를 유도하기에 충분히 높은 미세환경으로 제한되는 것으로 이해되어야 한다.

[0022] **C. 면역 세포 기능 ATP 의존성 작용제의 구조**

[0023] **1. NBD 및 AD를 포함하는, 면역 세포 기능 ATP 의존성 작용제**

[0024] 본원에 기술된 NBD-함유 분자 작제물은, 가장 간단한 형태로서, 면역 세포(예를 들어, CD8+ T 세포, NK 세포 등)와 결합하여 이를 자극하는 NBD 및 AD를 포함한다. NBD는, ATP에 의해 점유될 경우 작제물의 NBD 사이의 상호작용으로 인해 이중체 또는 고차 복합체(삼중체 등)를 형성하는 작제물의 2개 이상의 분자를 생성하는 하나 이상의 ATP 결합 부위를 포함한다. 이러한 분자 작제물은 선택적으로, 하나 이상의 독립적으로 선택된 스캐폴드 aa 서열 및/또는 하나 이상의 독립적으로 선택된 링커 서열을 포함한다. 예를 들어, 도 1의 구조 A, 및 도 2의 구조 A~D를 참조한다. 일부 경우, 이종이량체를 형성하는 이종간 스캐폴드 서열은, 도 2에서 구조 E로 예시된 바와 같이, 둘 이상의 유형의 AD가 해당 분자 내에 존재할 수 있도록 해당 작제물 내에 혼입될 수 있다. (예를 들어, 동종이량체 또는 이종이량체로서) 합쳐질 경우, NK 세포 및/또는 T 세포와 같은 표적 면역 세포 집단을 자극할 수 있는 AD의 사용은, 종양 미세환경에서의 ATP의 높은 수준으로 인해 종양내 면역 반응을 선택적으로 자극할 수 있는 동시에, 표적 면역 세포(예를 들어, NK 세포 또는 T 세포)의 전신적 활성화 및/또는 비-종양 조직에서의 면역 반응을 회피할 수 있게 한다.

[0025] NBD aa 서열, 스캐폴드 aa 서열 및 AD는 임의의 순서로 조직될 수 있다. 제1 사례에서, 작제물은 (예를 들어, N-말단에서 C-말단으로) NBD aa 서열, 스캐폴드 aa 서열, 및 AD를 포함한다. 제2 사례에서, 작제물은, N-말단에서 C-말단으로, NBD aa 서열, AD, 및 스캐폴드 aa 서열을 포함한다. 제3 사례에서, 작제물은, N-말단에서 C-말단으로, AD, 스캐폴드 aa 서열, 및 NBD aa 서열을 포함한다. 제4 사례에서, 작제물은, N-말단에서 C-말단으로, AD, NBD aa 서열, 및 스캐폴드 aa 서열을 포함한다. 제5 사례에서, 작제물은, N-말단에서 C-말단으로, 스캐폴드 aa 서열, AD, 및 NBD aa 서열을 포함한다. 마지막으로, 제6 사례에서, 작제물은, N-말단에서 C-말단으로, 스캐폴드 aa 서열, NBD aa 서열, 및 AD를 포함한다.

[0026] **2. 종양-특이적 결합제 및/또는 면역 세포 결합체를 포함하는 NBD-함유 작제물**

[0027] 본원에 기술된 NBD-함유 작제물은 NBD 이외에, 하나 이상의 종양-특이적 결합 도메인 및/또는 면역 세포 결합 도메인을 또한 포함할 수 있다. 이하에서 보다 상세히 논의되는 바와 같이, 종양 특이적 결합제로도 지칭되는 종양 특이적 결합 도메인은 종양 세포의 표면 상에서 발현된 TAA에 대한 친화도를 갖는 NBD-함유 작제물의 도메인이다. 또한, 이하에서 보다 상세히 논의되는, 면역 세포 결합체로도 지칭되는 면역 세포 결합 도메인은 면역 세포의 세포 표면 분자(예를 들어, 항원)에 대한 친화도를 갖는 NBD-함유 작제물의 도메인이다. 달리 언급되지 않는 한, 예를 들어, 항체 단편일 수 있는 면역 세포 결합체는 이들이 결합하는 면역 세포의 표적-외 자극(예를 들어, 전신 자극)의 가능성을 피하기 위해 1가이다. 하나 이상의 종양 특이적 결합제 및/또는 면역 세포 결합체

를 포함하는 NBD-함유 작제물은 또한 하나 이상의 AD를 포함할 수 있다. 도 3의 구조 D, E, H, 및 I를 참조한다.

[0028] 종양 특이적 결합제 및 면역 세포 결합체는, 예를 들어 TME 환경에서 발견되는 농도의 ATP의 존재 하에서 이종이량체 또는 다른 고차 복합체(예를 들어, 삼량체)를 형성하는 NBD-함유 작제물 내에 혼입될 수 있다. 이종이량체 형성은 작제물 쌍의 제1 구성원에 제1(첫번째) 이종이량체화 NBD를 혼입하고 해당 작제물 쌍의 제2 구성원에 제2(두번째) 이종이량체화 NBD를 혼입함으로써 유도될 수 있다. NBD의 제1 및 제2 이종이량체화 쌍은 동족 결합 파트너로서 작용한다. 본 개시에 포함된 이러한 NBD-함유 작제물 쌍의 유형을 예시하기 위해, 이러한 NBD-함유 작제물 쌍의 일련의 비제한적인 예가 도 3에 제시된다. 생체 내에서, 이량체화 작제물은 면역 세포 결합체에 의해 결합된 면역 세포를 유도하여 종양 특이적 결합제에 의해 인식되는 표적 종양 세포와 상호작용하고, 표적 종양 세포에 대한 면역 반응을 유발한다. 이러한 작제물은 복합체 형성을 위해 상승된 ATP를 필요로 하며, 이에 따라 면역 세포의 표적-외 결합 및 자극이 제한된 상태에서 TME의 종양 세포에 대한 표적화를 가능하게 한다. 종양 특이적 결합제 및 면역 세포 결합체를 포함하는 쌍을 이룬 작제물은, 동일하거나 상이할 수 있는 하나 이상의 AD의 혼입에 의해 증강될 수 있으며, 표적 면역 세포를 자극하기 위해, 제1 및 제2 NBD-함유 작제물의 상호작용에 의해 야기되는 이량체화를 필요로 할 수 있다.

[0029] 도 3의 항목 A 및 B는 제1 NBD-함유 작제물이 (예를 들어, N-말단에서 C-말단으로, 또는 C-말단에서 N-말단으로) 종양 특이적 결합제에 연결된 하나 이상의 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 NBD-함유 작제물은 (예를 들어, N-말단에서 C-말단으로) 동족 제2 이종이량체화 NBD 및 AD를 포함하는, 한 쌍의 작제물을 각각 제공한다. 작제물의 요소는 독립적으로 선택되는 선택적인 링커 서열에 의해 연결된다. 이러한 작제물은 이종이량체화를 위해 상승된 ATP를 필요로 하며, 이에 따라 표적-외 결합이 제한되고 AD에 의한 면역 세포의 전신 자극을 회피하는 상태에서 TME의 종양 세포에 대한 AD의 표적화를 가능하게 한다. 또한, B에 제시된 작제물의 AD는 동일하거나 상이할 수 있으며, 표적 면역 세포에 대해 기능하기 위해 이량체화를 필요로 할 수 있다. 도 3의 A 또는 B에 나타내지는 않았지만, A 또는 B의 이종이량체화 작제물 중 어느 하나 또는 둘 모두는 또한 스캐폴드 aa 서열을 포함할 수 있다(예를 들어, 도 3의 항목 E 참조).

[0030] 도 3의 항목 A 또는 B에 나타낸 유형의 이종이량체화를 도시하는 예시적인 작제물 쌍은 예를 들어, 다음을 포함할 수 있다: (i) TAA(예를 들어, NY ESO-1, 메소텔린, CEA, PSMA, 또는 MAGE, 예컨대 MAGE-A1, MAGE -A4, MAGE -A9, 또는 MAGE -A11)에 대한 친화도를 갖는 종양 특이적 결합제에 연결된 하나 이상의 TAP1 NBD를 포함하는 제1 NBD-함유 작제물; 및 (ii) ATP의 존재 하에TAP1 NBD의 동족 결합 파트너로서 작용하는 TAP2 NBD 및 IL-2 서열을 포함하는 제2 NBD-함유 작제물. TME에 존재하는 수준의 ATP에 노출될 경우, 이러한 작제물은 이종이량체화되고 TME에 존재하는 T 세포를 자극하도록 작용할 수 있다.

[0031] 도 3의 항목 C 및 D는 제1 NBD-함유 작제물이 (예를 들어, N-말단에서 C-말단으로) 종양 특이적 결합제에 연결된 하나 이상의 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 NBD-함유 작제물은 (예를 들어, N-말단에서 C-말단으로) 동족 제2 이종이량체화 NBD 및 면역 세포 결합체를 포함하는, 작제물의 이종이량체화 쌍을 각각 제공한다. 작제물의 요소는 독립적으로 선택되는 선택적인 링커 서열에 의해 연결된다. 이종이량체화 쌍의 제1 및 제2 작제물 중 어느 하나 또는 둘 모두는 스캐폴드 서열을 포함할 수 있다(예를 들어, 도 3의 F 내지 I 참조). 종양 특이적 결합제 및/또는 면역 세포 결합체를 포함하는 작제물은 항목 D, E, H, 및 I에서와 같이 AD를 추가로 포함할 수 있다. AD가 면역 세포 결합체를 또한 포함하는 작제물에 존재하는 경우, AD는 표적-외 자극을 방지하기 위해, 면역 세포 자극을 위한 이량체 또는 고차 복합체(예를 들어, 4-1BBL과 같은 TNF 계열 구성원)로서 T 세포에 대한 제시를 필요로 하는 것들로부터 선택될 수 있다.

[0032] 도 3의 항목 C로 예시된 한 쌍의 작제물은, 예를 들어 다음을 포함한다: (i) (b) 종양 특이적 결합제에 연결된 (a) TAP1 NBD를 포함하는 제1 NBD-함유 작제물; 및 (ii) (a) ATP의 존재 하에서 TAP1 NBD의 동족 결합 파트너로서 작용하는 TAP2 NBD, 및 (b) 1가 T 세포 결합체(예를 들어, 항-CD3 항체 단편 또는 단쇄 항체 작제물, 예컨대 나노바디 또는 scFv)를 포함하는 제2 NBD-함유 작제물. 종양 특이적 결합제는 종양 세포 표면 상에서 발현된 TAA(예를 들어, NY ESO-1, 메소텔린, CEA, PSMA, 또는 MAGE, 예컨대 MAGE-A1, -A4, -A9, 또는 -A11)에 대해 친화도를 갖는 항체, 항체 단편, 또는 단쇄 항체 작제물, 예컨대 scFv 또는 나노바디일 수 있다.

[0033] 도 3의 항목 A 내지 I는 2개의 분자 작제물의 조합으로서 제시된다. 이러한 조합으로 종양 특이적 결합제를 포함하는 제1 작제물은 AD 및/또는 면역 세포 결합체를 포함하는 제2 작제물과 분리되기 때문에, 둘 이상의 유형의 제1 또는 제2 작제물을 포함하는 집단(혼합물)이 형성될 수 있다. 예를 들어, 도 3의 항목 A 내지 I 중 어느 하나에 도시된 제1 및 제2 작제물의 혼합물이 형성될 수 있으며, 여기에서 해당 혼합물은 상이한 TAA를 표적화

하는 종양 특이적 결합제를 각각 갖는 2개 이상의 제1 작제물을 포함한다. 도 3의 항목 A 또는 B 중 어느 하나에 도시된 제1 및 제2 작제물의 혼합물이 형성될 수 있으며, 여기에서 해당 혼합물은 상이한 면역 세포 수용체에 대해 유도된 하나 이상의 AD를 각각 갖는 2개 이상의 제2 작제물을 포함한다. 유사하게, 도 3의 항목 C 내지 I 중 어느 하나에 도시된 제1 및 제2 작제물의 혼합물이 형성될 수 있으며, 여기에서 혼합물은 상이한 면역 세포 표면 항원에 대해 유도된 상이한 면역 세포 결합체를 각각 갖는 2개 이상의 제2 작제물을 포함한다. 면역 세포 결합체, 종양 특이적 결합제, 또는 AD 중 단지 하나만이 변형되는 집단에 더하여, 제1 및 제2 작제물의 혼합물은 면역 세포 결합체, 종양 특이적 결합제, 및 AD로부터 선택되는 2개 이상의 요소가 변형되는 2개 이상의 제1 작제물 및 2개 이상의 제2 작제물을 포함할 수 있다.

[0034] 도 3의 항목 J 내지 M은 제1 NBD-함유 작제물이 (예를 들어, N-말단에서 C-말단으로) 면역 세포 결합체에 연결된 하나 이상의 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 NBD-함유 작제물은 (예를 들어, N-말단에서 C-말단으로) 동족 제2 이종이량체화 NBD 및 AD를 포함하는, 한 쌍의 작제물을 각각 제공한다. 작제물의 요소는 독립적으로 선택되는 선택적인 링커 서열에 의해 연결된다. 이러한 작제물은 이종이량체화를 위해 상승된 ATP를 필요로 하며, 이에 따라 표적-외 결합이 제한되고 AD에 의한 면역 세포의 전신 자극을 회피하는 상태에서 TME 외부에 대한 임의의 실질적인 활성을 회피하면서 TME의 면역 세포의 활성화를 가능하게 한다. 또한, K 또는 M에 제시된 작제물의 AD는 동일하거나 상이할 수 있으며, 표적 면역 세포에 대해 기능하기 위해 이량체화를 필요로 할 수 있다.

[0035] 도 3의 J 및 K에 나타낸 유형의 이종이량체화 작제물로서 도시된 예시적인 작제물 쌍은 예를 들어, 다음을 포함한다: (i) T 세포 표면 상에 발현된 CD28에 대한 친화도를 갖는 면역 세포 결합체(예를 들어, 항체, 항체 단편, 또는 단쇄 항체 작제물, 예컨대 VHH 또는 나노바디)에 연결된 하나 이상의 TAP1 NBD를 포함하는 제1 NBD-함유 작제물; 및 (ii) ATP의 존재 하에서 TAP1 NBD의 동족 결합 파트너로서 작용하는 TAP2 NBD 및 IL-2 서열을 포함하는 제2 NBD-함유 작제물. 이러한 작제물은 TME에 존재하는 수준의 ATP에 의해 이종이량체로 복합체화될 경우, 해당 환경에 존재하는 T 세포를 자극하도록 작용할 수 있다.

[0036] 작제물의 혼합물을 포함하는 조성물은, 상이한 TAA를 표적화하는 둘 이상의 종양 특이적 결합제를 사용할 경우, 단일 작제물로 인한 단일 요법에서 종양이 탈출하는 것을 방지할 수 있는 치료 응용에서 사용된다. 유사하게, 둘 이상의 면역 세포 결합체 및/또는 AD의 사용은 둘 이상의 유형의 면역 세포를 동원하고 종양 세포에 대해 보다 강력한 면역 반응을 제공할 수 있으며, 이에 의해 단일 작제물을 사용하는 단일 요법의 사용에서 발생하는 면역 반응에 비해 종양에 대해 보다 강력한 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0037] **3. 2개 이상의 NBD를 포함하는 NBD-함유 작제물 및 NBD-함유 분자 작제물의 복합체의 형성**

[0038] 본원에 기술된 NBD-함유 작제물은 작제물이 ATP의 존재 하에서 복합체로 효과적으로 중합체화될 수 있게 하는 2개 이상의 NBD를 포함할 수 있다. 2개 이상의 NBD는, 예를 들어 직렬 쌍으로서 배열될 수 있다. 직렬로 배치될 경우, NBD는 해당 작제물 내에서 서로에 대해 인접하고, 개재 링커 aa 서열 이외의 해당 작제물의 임의의 요소에 의해 분리되지 않는다(예를 들어, 직렬 NBD 사이에는 AD(들), 스캐폴드, 종양 특이적 결합 도메인(들), 또는 면역 세포 결합 도메인(들)이 존재하지 않음). 추가의 NBD는 이들이 직렬로 배치되지 않도록 작제물 내에 위치될 수 있다. 예를 들어, 2개 이상의 NBD를 포함하는 NBD-함유 작제물은 섹션 C.1(NBD 및 AD를 포함하는, 면역 세포 기능을 갖는 ATP 의존성 작용제)에서 전술한 제1 내지 제6 사례의 NBD를 직렬 NBD 쌍으로 대체함으로써 형성될 수 있다. 또한, (예를 들어, 직렬 형태의) 2개 이상의 NBD를 포함하는 NBD-함유 작제물은 면역 세포 결합체 또는 종양 특이적 결합제를 포함하는 작제물로부터 형성될 수 있다.

[0039] 적어도 2개의 NBD를 포함하는 NBD-함유 분자 작제물의 복합체는, ATP가 결합 부위를 점유하기에 충분히 높은 APT 수준을 갖는, TME와 같은 환경에 해당 작제물을 배치함으로써 형성될 수 있다. 이러한 복합체는 도 3의 N 및 O, 그리고 도 4a에 예시되어 있다. 여기에서, 도 4a와 같이, 본 개시의 작제물 내로 2개 이상의 NBD aa 서열이 혼입됨에 따라, 해당 작제물은 ATP 존재 하에서 가역적으로 중합체화되어 복합체를 생성할 수 있다. ATP의 존재 하에서 형성된 복합체는 이량체, 삼량체, 사량체 또는 심지어 고차 구조일 수 있다. 예를 들어, 도 4a를 참조한다. 작제물 내로의 둘 이상의 NBD의 혼입은 해당 효능 및 효율을 최대화할 수 있으며, 다른 특성에도 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 표적 세포의 표면 상에서 발현된 요소에 대해 (예를 들어, 종양 특이적 결합체 또는 AD에 대해) 다가화 되는 복합체는 해당 표적 세포에 대해 증가된 유효 친화도를 나타낼 수 있으며, 보다 큰 복합체는 TME 내에 보다 장기간 체류함으로써 해당 복합체의 생체 내 반감기를 효과적으로 연장시킬 수 있다.

[0040] 복합체는 직렬로 배열된 적어도 2개의 NBD를 포함할 수 있으며, 해당 NBD aa 서열과 AD를 분리하는 최대 하나의

링커 aa 서열(예를 들어, 강성 링커)(도 4a의 구조 A, B, 및 E 참조), 면역 세포 결합체 및/또는 종양 특이적 결합제를 포함할 수 있다. 대안적으로, NBD는 종양 특이적 결합제 또는 면역 세포 결합체에 별도로 부착될 수 있다(도 4a의 구조 C 및 D 참조). 복합체의 형성에 사용되는 NBD-함유 작제물은 동종이량체화 또는 이종이량체화 NBD를 포함할 수 있다. 도 4a에 나타내지는 않았지만, 동일한 작제물 분자에서의 동종이량체화 NBD는 도메인 사이에 생산적인 ATP 결합 계면이 형성될 수 없도록 분자를 구성함으로써 자가-결합으로부터 방지될 수 있다. 이는, 예를 들어 NBD 사이의 거리를 제한하거나 NBD 사이에 강성 펩티드 링커를 사용함으로써 달성될 수 있다.

[0041] 적어도 2개의 NBD 및 AD를 포함하는 NBD-함유 작제물은 도 4a의 구조 A 및 B로 예시된다. 구조 A는, 도 4a의 구조 A에 나타낸 바와 같이, ATP의 존재 하에서 동종이량체화되고 이량체 및/또는 보다 큰 작제물을 형성할 수 있는 NBD를 사용한다. 대조적으로, 구조 B는 ATP의 존재 하에서 이종이량체 또는 중합체를 형성하는 구조를 포함한다. TME에 존재하는 수준의 ATP에 노출될 경우, 작제물은 AD를 제시하는 대형 복합체를 (예를 들어, AD 동종이량체 또는 이종이량체로서) 형성할 수 있다. 이러한 NBD-함유 작제물의 복합체는 TME에서, NK 세포 및/또는 T 세포와 같은 표적 면역 세포를 자극할 수 있다. 복합체에 존재하는 AD는 동일할 수 있거나(예를 들어, 도 4a의 구조 A) 상이할 수 있다(예를 들어, 도 4a의 구조 B). 예를 들어, 복합체에 존재하는 제1 AD 및 제2 AD의 aa 서열은 동일할 수 있으며, 이량체 또는 고차 복합체로 제시될 경우 면역 세포 반응의 활성화를 야기할 수 있다. 대안적으로, 복합체에 존재하는 제1 AD 및 제2 AD는 상이한 분자(예를 들어, 상이한 인터류킨)로부터 유래될 수 있으며, 이들은 함께 제시될 경우 면역 세포 활성화를 유발한다. 복합체에 존재하는 제1 AD 및 제2 AD의 aa 서열이 상이하고(동일하지 않음), 조합될 경우 IL-12, IL-23, 또는 IL-27과 같은 이량체 면역조절제의 활성 단편(이들 각각은 2개의 서브유닛(α 및 β 폴리펩티드 사슬)을 포함함)을 형성할 수 있는 경우 또한 가능하다. 단일 NBD를 각각 포함하는 NBD-함유 작제물은 ATP의 존재 하에서 2개의 상이한(동일하지 않은) AD를 포함하는 복합체로 조립될 수 있다. 대안적으로, 2개의 서브유닛으로 구성된 활성 AD는 ATP의 존재 하에서 단일 NBD를 각각 포함하는 작제물을 사용하여 활성 AD로 조립될 수 있다(예를 들어, 도 2의 구조 A 및 B 참조).

[0042] 전술한 NBD-함유 작제물에 더하여, 본 개시는, 도 4a의 구조 C로 예시된 바와 같은, 적어도 2개의 NBD 및 종양 특이적 결합 aa 서열(종양 특이적 결합제)을 포함하는 NBD-함유 작제물 및/또는 도 4a의 구조 D로 예시된 바와 같은, 면역 세포 결합 aa 서열(면역 세포 결합체)을 포함하는 NBD-함유 작제물을 제공한다. 이러한 분자 작제물은 선택적으로, 하나 이상의 독립적으로 선택된 스캐폴드 aa 서열 및/또는 하나 이상의 독립적으로 선택된 링커 서열을 포함한다. 종양 특이적 결합제는 TAA(예를 들어, HER-2, MAGE-2, MAGE-4, NY-ESO 등)에 결합하는 항체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 면역 세포 결합체는 면역 세포 표면 항원(예를 들어, αβ T 세포 상의 CD3, CD8, 또는 CD4, δγT 세포 상의 TRGV9, NK 세포 상의 CD16 등)에 결합하는 항체를 포함하나 이에 한정되지 않는 분자를 포함한다. 달리 언급되지 않는 한, 면역 세포 결합체는 TME 외부의 면역 세포의 자극을 회피하기 위해 1가이며, 이러한 반응을 실질적으로 제한하거나 방지하도록 변형된 항체 의존성 세포 매개 세포독성(ADCC) 또는 보체 의존성 세포독성(CDC)을 야기할 수 있는 서열을 갖는다.

[0043] 일단 NBD 도메인이 고차 복합체(예를 들어, 이량체)를 형성할 수 있게 하는 ATP 수준의 TME에 존재하게 되면, 적어도 2개의 NBD 및 종양 특이적 결합제 및/또는 면역 세포 결합체를 포함하는 작제물은 면역 자극을 야기할 수 있는 대형 복합체를 형성한다. 적어도 2개의 NBD, IgFc를 포함하는 스캐폴드, 및 종양 특이적 결합제를 포함하는 작제물은 TME에 복합체를 형성할 수 있으며(예를 들어, 도 4a의 구조 C 참조), 이는, 예를 들어 ADCC 또는 CDC를 유도할 수 있다. 적어도 2개의 NBD 및 면역 세포 결합체를 포함하는 작제물은 TME에 복합체를 형성할 수 있으며(예를 들어, 도 4a의 구조 D 참조), 이는, 예를 들어 표면 상에 표적 항원(예를 들어, CD8+ T 세포 상의 CD3 또는 NK 세포 상의 CD16)의 가교 결합을 통해 표적화된 면역 세포의 자극을 유도할 수 있다.

[0044] 적어도 2개의 NBD 및 종양 특이적 결합제를 포함하는 NBD-함유 작제물(예를 들어, 도 4a의 구조 C)와 적어도 2개의 NBD 및 면역 세포 결합체를 포함하는 NBD-함유 작제물(예를 들어, 도 4a의 구조 D)를 조합함으로써, 종양 특이적 결합제 및 면역 세포 결합체 둘 모두를 포함하는 복합체를 생성할 수 있다. 종양 특이적 결합제를 포함하는 제1 이종이량체화 NBD 및 면역 세포 결합체를 포함하는 제2 이종이량체화 NBD를 사용하면, ATP의 존재 하에서 형성된 복합체가 결합제 및 결합체 둘 모두를 함유하는 것을 보장할 수 있으며, 표적 종양 세포에 대한 면역 세포 반응을 자극할 수 있다. 이는, TME에서 대형 복합체를 형성하는, 적어도 2개의 NBD 및 종양 특이적 결합제를 포함하는 작제물 및 적어도 2개의 NBD 및 면역 세포 결합체를 포함하는 작제물의 혼합물로서 예시된다(예를 들어, NBD가 직렬 상태로 표시되는 도 4a의 E 및 F의 구조 참조). 충분한 ATP의 존재 하에서 이러한 구조로부터 생성된 복합체는 종양-특이적 결합제를 통해 면역 세포를 종양 표적에 결합시킬 수 있는 동시에, 해당 시점에서 복합체화되는 단량체 면역 세포 결합체를 통한 세포 표면 상의 수용체의 가교 결합에 의해 면역 세포의 활성화를 유발한다.

[0045] 복합체의 형성에 사용되는 각각의 작제물에 존재하는 종양 특이적 결합제 및/또는 면역 세포 결합체 aa 서열은 서로 동일할 필요는 없다. 따라서, 도 3의 구조 A 내지 I의 복합체, 및 도 4a의 구조 C 내지 I의 복합체는 상이한 TAA에 대해 유도된 둘 이상의 종양 특이적 결합제(예를 들어, 2개 이상의 종양 특이적 결합제), 및 존재하는 경우, 둘 이상의 면역 세포 결합체를 가질 수 있다. 상이한 TAA에 대해 유도되는 2개 이상의 상이한 종양 특이적 결합제를 단일 복합체로 사용하는 것은, 2개 이상의 NBD를 포함하는 작제물로부터 형성된 복합체가 상이한 종양 항원성 표적을 발현하는 종양에 대해 활성이 될 수 있게 할 뿐만 아니라, 종양 항원 발현의 손실에 의해 종양이 해당 요법으로부터 탈출하는 것을 제한할 수 있게 한다. 상이한 면역 세포 결합체를 단일 복합체로 사용하는 것은, 둘 이상의 유형의 면역 세포(예를 들어, CD8+ T 세포 및 NK 세포 둘 모두)로부터의 면역 반응을 자극할 수 있다. 종양 특이적 결합제를 포함하는 작제물을 함유하는 복합체를 포함하는, TME에서 형성되는 복합체 내로의 AD의 혼입 또한 가능하다. 이는, 예를 들어, 도 4a의 H에 예시된 바와 같이, AD 및 NBD(예를 들어, 2개 이상의 NBD)를 포함하는 하나 이상의 작제물을 복합체에 조합하거나, 도 4a의 I에 예시된 바와 같이, AD, NBD(예를 들어, 2개 이상의 NBD), 및 종양 특이적 결합제를 포함하는 하나 이상의 작제물을 복합체에 조합함으로써 수행될 수 있다.

[0046] 종양-특이적 결합제, 면역 세포 결합체, 및 AD는 TME에서 형성된 복합체 내로 진입하는 상이한 작제물에 의해 제공되기 때문에, 해당 복합체의 조성은 (예를 들어, 환자에게 투여하기 전 또는 투여하는 동안) 상이한 작제물을 혼합함으로써 조절될 수 있다. 따라서, 단일 작제물은 상이한 치료 조합에 대해 사용될 수 있다.

[0047] **D. NBD-함유 작제물의 요소**

[0048] **1. NBD 및 ATP와의 상호작용**

[0049] 본원에 기술된 작제물 내로의 혼입을 위한 NBD는 여러 기준에 기초하여 선택될 수 있다. 인간 치료 용도를 위해 의도된 작제물의 경우, NBD는 면역원성을 제한하기 위해 인간 ATP 결합 단백질로부터 우선적으로 유래되며, 충분한 ATP에 노출될 경우 용액 상 이량체화 또는 보다 고차의 복합체 형성을 거치도록 하는 것이 바람직하다. 면역원성인 비-인간 단백질이 사용되는 경우, 면역원성 영역을 변경하여 이의 인간 상동체와 보다 밀접하게 또는 완전히 일치시킴으로써 면역원성 부분은 인간화될 수 있다. 본원에 기술된 작제물에 사용된 이량체 또는 고차 복합체의 용액 상 형성은 표적 TME에서 발견되지만 정상 조직에서는 발견되지 않은 ATP 농도에서 발생한다. 따라서, 본원에 제공된 작제물에 사용하기 위한 NBD는, 예를 들어, 정상 조직의 세포외 공간에서 발견되는 상한 수준(즉, 약 1 μM 이상)보다 약 한자리수(약 10배) 높은 수준 내지 TME에서 발견되는 대략적인 ATP 수준까지의, ATP에 대한 해리 상수를 가질 수 있다. 일부 경우, NBD의 친화도는 약 1 μM 내지 약 200 μM일 것이다. 예를 들어, NBD의 ATP 친화도는 약 1 μM 내지 약 5 μM, 또는 약 5 μM 내지 약 25 μM의 범위일 수 있다. NBD의 ATP 친화도는 약 25 μM 내지 약 50 μM의 범위일 수 있다. 다른 예에서, NBD의 친화도는 약 50 μM 내지 약 100 μM, 또는 약 100 μM 내지 약 200 μM의 범위일 수 있다.

[0050] 일부 단백질의 NBD는 충분한 수준의 ATP의 존재 하에서 동종이량체를 형성하는 한편, 다른 것은 충분한 수준의 ATP의 존재 하에서 이종이량체를 형성한다. 동종이량체화 NBD 및 이종이량체화 NBD 둘 모두는 본원에 기술된 폴리펩티드 작제물의 다양한 양태에 사용될 수 있다. 충분한 수준의 ATP가 존재할 때 NBD가 용액 중 동종이량체를 형성하도록 하는 것이 바람직한 경우, 이량체 사이의 계면에서의 aa 잔기는 2개의 NBD 분자 사이의 계면 형성을 방해하는 aa 잔기를 제거하거나 치환하도록 변형될 수 있다. 대안적으로, 2개의 NBD 분자 사이의 상호작용에 기여하지 않는 aas를 동종이량체 형성을 초래하는 상호작용에 기여하는 aas로 치환하는 것이 가능하다.

[0051] **a) NBD로서의 ATP 결합 카세트**

[0052] 다수의 단백질은 본원에 기술된 작제물의 NBD로서 사용하기에 적합한 NBD를 포함한다. 이들 단백질 중, ATP 결합 카세트(ABC) 수송체는 풍부한 수송체 계열로서 높은 보존성을 가지며, 이에 따라 면역원성이 낮을 가능성이 있기 때문에 적합한 후보로 간주된다. ABC 수송체는 세포질 내로의 또는 세포질 밖으로의 기질의 수송을 용이하게 하기 위해 ATP 가수분해로부터의 에너지를 이용하는 다양한 기능을 갖는 막 단백질의 방대한 상과이다. 예를 들어, Locher의 문헌[*Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*, 364(1514): 239-245 (2009)] 및 여기에 인용된 참고문헌을 참조한다. 인간 게놈은 48개 또는 49개의 구별되는 ABC 수송체를 암호화한다(전술한 문헌 참조). ABC 수송체는 7개의 구별되는 계열 구성원, 즉 ABC1, MDR/TAP, MRP, ALD, OABP, GCN20, 및 White로 구분된다. TAP1을 포함하는 각 계열의 대표적인 구성원은 도 6에 정렬되어 있다. ATP-결합 카세트 계열의 NBD는 보존되며 2개의 하위 도메인을 포함한다(전술한 문헌 참조). 이 중 첫번째는 RecA 단백질과 유사하고 P-루프(Walker-A 모티프)를 함유한다. "나선형 하위 도메인"으로 지칭되는 두번째 도메인은 LSGGQ 모티프를 포함한다(전술한 문헌 참조). 이러한 수송체의 NBD는 헤드-투-테일 배향으로 이량체로서 조립되어, 이들의 계면에 샌드위칭된 2개의 ATP

결합 및 가수분해 부위를 형성한다(도 5 참조). 이러한 배향에서, 2개의 도메인 각각에서의 LSGGQ 모티프는 ATP-샌드위치 계면에서 대향하는 Walker-A 서열에 인접한다. 이러한 계면은, 예를 들어 Loo 등의 문헌(2002) [*J Biol Chem.*, 277(44): 41303-41306], 및 Smith 등의 문헌(2002) [*Mol Cell.*, 10(1): 139-149, 도 3a]에 기술되어 있다. 뉴클레오티드(ATP)가 결합 부위에 존재하지 않는 경우, 도메인 계면에는 갭이 존재하게 되지만; ATP가 결합되는 경우, NBD는 ATP를 이량체화하고 가수분해한 다음 이를 해리할 수 있다(예를 들어, 전술한 Locher의 문헌 (2009) 참조). 안정화된 이량체는 NBD 도메인 서열을 ATP 가수분해 결핍 또는 실질적으로 ATP 가수분해 결핍으로 만드는 aa 치환을 포함시킴으로써 형성될 수 있다(예를 들어, Vakkasoglu 등의 문헌(2107) [*PLoS ONE*, 12(5): e0178238], doi. org/10.1371/journal. pone.0178238에서 사용 가능). 예를 들어, NBD 단백질에서 발견되는 가수분해성 Asp 또는 Glu 잔기는 Asn 또는 Gln 잔기로 치환될 수 있다(예를 들어, 도 3 참조).

[0053] 충분한 ATP가 존재할 때 ABC 단백질의 NBD가 용액 중 동종이량체를 형성하도록 하는 것이 바람직한 경우, 이량체 사이의 계면에서의 잔기는 계면 형성을 방해하는 aa 잔기를 제거하거나 치환하도록, 또는 계면 상호작용에 기여하지 않는 aas를 상호작용에 기여할 수 있는 aas와 치환하도록 변형될 수 있다. 예로서, 랫트 TAP1의 NBD는 용액 중에서 동종이량체화되고, ATP의 존재 하에서 용액 상 동종이량체화를 야기하기 위한 ATP-샌드위치 계면의 형성을 위한 모델로서 사용될 수 있는 것으로 알려져 있다(예를 들어, Vakkasoglu 등의 문헌(2107) [*PLoS ONE*, 12(5): e0178238]. https://doi. org/10.1371/journal.pone. 0178238 참조). 동종이량체화를 거치는 것으로 알려진 서열, 예를 들어, 랫트 TAP1 NBD와 NBD aa 서열의 정렬은 표적 서열에서의 변경을 가이드하는 데 사용될 수 있다. 정렬은 미국 국립 생명공학 정보 센터(US National Center for Biotechnology Information, NCBI) BLAST 프로그램(blastp 공개본 BLAST+ 2.9.0, 웹사이트 blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE=Proteins) 또는 유럽 생물정보학 연구소(European Bioinformatics Institute)의 Clustal Omega 프로그램(버전 1.2.4, www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/에서 이용 가능)으로 기본 파라미터를 사용하여 수행될 수 있다. 달리 언급되지 않는 한, Clustal Omega가 사용된다.

[0054] ABC 함유 단백질의 NBD aa 서열은 ABCA1 유전자, UniProtKB - O95477(서열번호 1)에 의해 암호화된 인지질 수송 ATPase(ABC 또는 ABCA1 수송체)의 NBD 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. NBD는 서열번호 1과 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0055] NBD aa 서열은 ABCB1 유전자, UniProtKB - P08183(서열번호 2)에 의해 암호화된 다약제 내성 단백질 1(MDR/TAP)의 NBD 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. NBD는 서열번호 2와 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0056] NBD aa 서열은 ABCC1 유전자, UniProtKB - P33527(서열번호 3)에 의해 암호화된 다약제 내성-연관 단백질(MRP, 다약제 내성-연관 단백질 1)의 NBD 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. NBD는 서열번호 3과 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0057] NBD aa 서열은 ABCD1 유전자, UniProtKB/Swiss-Prot: P33897(서열번호 4)에 의해 암호화된 ATP-결합 카세트 상과 D 구성원 1 단백질(ALD, 아드레노백질이영양증 단백질(Adrenoleukodystrophy Protein))의 NBD 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. NBD는 서열번호 4와 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0058] NBD aa 서열은 ABCE1 유전자, UniProtKB/Swiss-Prot: P61221(서열번호 5)에 의해 암호화된 ATP-결합 카세트 상과 E 구성원 1 단백질(OABP, 2'-5'-올리고아데닐레이트 결합 단백질)의 NBD 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. NBD는 서열번호 5와 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0059] NBD aa 서열은 ABCF1 유전자, UniProtKB - Q8NE71(서열번호 6)에 의해 암호화된 ATP-결합 카세트 상과 F 구성원 1 단백질(GCN20, TNF알파-유도성 ATP-결합 단백질)의 NBD 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. NBD는 서열번호 6과 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0060] NBD aa 서열은 ABCG2 유전자, UniProtKB/Swiss-Prot: P45844(서열번호 7)에 의해 암호화된 ATP-결합 카세트 상과 G 구성원 1 단백질(White, 초파리(Drosophila) White의 상동체)의 NBD 도메인의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. NBD는 서열번호 7과 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0061] **(1) NBD로서의 TAP1 및 TAP2 ATP 결합 카세트**

[0062] TAP1 및 TAP2 단백질은 ATP 결합 및 이종이량체화를 내부 세포막을 가로지르는 펩티드 전위와 커플링시키는 수송체로서 작용하는 동족 결합 파트너이다. TAP1 및 TAP2는 본원에 제공된 작제물에 사용하기 위한 NBD의 공급원을 제시하는 ABC 수송체 상과의 구성원이다. 랫트 TAP1 NBD는 ATP의 존재 하에서 동종이량체화를 거치는 것으로

알려져 있다. 인간 TAP1의 NBD는 ATP의 존재 하에서 동종이량체화를 거치지 않지만, 이전에 정의된 치환을 사용하여 동종이량체화를 거치도록 유도될 수 있다. 예를 들어, Vakkasoglu 등의 문헌(2017) ["D-helix influences dimerization of the ATP-binding cassette (ABC) transporter associated with antigen processing 1 (TAP1) nucleotide-binding domain," *PLoS ONE*, 12(5): e0178238]; 웹사이트 doi.org/10.1371/journal. pone.0178238을 참조한다. TAP1 동종이량체화를 유도하는 치환은, 서열번호 8에서 굵은 글씨체로 표시되고 이탤릭체로 표시된, N676, S677, Q680, E682, 및 Q683 중 하나 이상(예를 들어, 각각)에서의 치환을 포함한다. 예를 들어, 동종이량체화를 유도하는 TAP1 치환은 N676G, S677N, Q680R, E682Q, 및 Q683R 치환 중 하나 이상(예를 들어, 이들 모두)을 포함할 수 있다. NBD로서 사용되는 TAP1 및 TAP2 단백질의 일부(예를 들어, 도메인)은 또한 해당 서열에 존재하는 하나 이상의 시스테인의 (예를 들어, 세린 잔기로의) 치환을 포함하며, 이에 따라 비기능성 폴딩 또는 바람직하지 않은 분자간 이황화 결합 형성을 야기하는 바람직하지 않은 이황화 결합 형성을 방지할 수 있다. TAP1 및 TAP2 NBD는 또한, 예를 들어 이들 NBD를 포함하는 작제물의 정제를 위해, 해당 도메인의 C-말단에 His 태그를 포함할 수 있다.

[0063] 인간 TAP1로부터의 NBD aa 서열(서열번호 9)은, 예를 들어, 아래의 NCBI 참조 서열: NP_000584.3(서열번호 8), 또는 UniProtKB - Q03518-2의 NBD aa 서열(aas 492~748)과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다:

```
  1 MASSRCPAPR GCRCLPGASL AWLGTVLLLL ADWVLLRTAL PRIFSLLVPT ALPLLRVWAV
 61 GLSRWAVLWL GACGVLRATV GSKSENAGAQ GWLAALKPLA AALGLALPGL ALFRELISWG
121 APGSADSTRL LHWGSHPTAF VVSYAAALPA AALWHKLGSL WVPGGQGGSG NPVRRLLGCL
181 GSETRRLSLF LVLVVLSSLG EMAIPFFTGR LTDWILQDGS ADTFTRNLTL MSILTIASAV
241 LEFVGDGIYN NTMGHVHSHL QGEVFGAVLR QETEFFQQNQ TGNIMSRVTE DTSTLSDSLS
301 ENLSLFLWYL VRGLCLLGIM LWGSVSLTMV TLITLPLLFL LPKKVGKWYQ LLEVQVRESL
361 AKSSQVAIEA LSAMPTVRSF ANEEGEAQKF REKLQEIKTL NQKEAVAYAV NSWTTSISGM
421 LLKVGILYIG GQLVTSGAVS SGNLVTFVLY QMQFTQAVEV LLSIYPRVQK AVGSSEKIFE
481 YLDRTPRCPP SGLLTPLHLE GLVQFQDVSF AYPNRPDVLV LQGLTFTLRP GEVTALVGPN
541 GSGKSTVAAL LQNLYQPTGG QLLLDGKPLP QYEHRYLHRQ VAAVGQEPQV FGRSLQENIA
601 YGLTQKPTME EITAAAVKSG AHSFISGLPQ GYDTEVDEAG SQLSGGQRQA VALARALIRK
661 PCVLILDDAT SALDA***NS***QL***Q*** V***EQ***LLYESPE RYSRSVLLIT QHLSLVEQAD HILFLEGGAI
721 REGGTHQQLM EKKGCYWAMV QAPADAPE  (참조 서열: NP_000584.2, 서열번호 8);
```

[0064]

[0065] NCBI 및 UniProt 서열 둘 모두에 공통인 TAP1 NBD 도메인은 다음과 같다:

```
  1 GLLTPLHLEG LVQFQDVSFA YPNRPDVLVL QGLTFTLRPG EVTALVGPN GSGKSTVAALL
 61 QNLYQPTGGQ LLLDGKPLPQ YEHRYLHRQV AAVGQEPQVF GRSLQENIA YGLTQKPTMEE
121 ITAAAVKSGA HSFISGLPQG YDTEVDEAGS QLSGGQRQAV ALARALIRKP CVLILDDATS
181 ALDA***NS***QL***Q***V ***EQ***LLYESPER YSRSVLLITQ HLSLVEQADH ILFLEGGAIR EGGTHQQLME
241 KKGCYWAMVQ APADAPE (서열번호 9).
```

[0066]

[0067] 동종이량체화와 연관된, 서열번호 8의 잔기 N676, S677, Q680, E682, 및 Q683은 서열번호 9에서 N185, S186, Q189, E191, 및 Q192로서 제시되며, 이는 굵은 글씨체 및 이탤릭체로 표시되어 있다. 인간 TAP1로부터의 NBD aa 서열은, 예를 들어, 서열번호 9로 제공되는, NCBI 참조 서열: NP_000584.2(aas 492~748)에 제시된 aa 서열의 NBD의 적어도 230개의 연속 aas와 97% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0068] 인간 TAP1로부터의 NBD aa 서열은, 예를 들어, 서열번호 8의 C662(예를 들어, C662S) 및 C735(예를 들어, C735S)에 상응하는 aa 잔기에서의 치환을 포함할 수 있다. 인간 TAP1로부터의 NBD aa 서열은 또한, 예를 들어, 서열번호 8의 N676, S677, Q680, E682, 및 Q683(예를 들어, N676G, S677N, Q680R, E682Q, 및/또는 Q683R) 중 하나 이상에 상응하는 aas에서의 치환을 포함할 수 있으며, 이는 아래의 서열번호 10에 굵은 글씨체 및 이탤릭체로 표시되어 있다. 인간 TAP1로부터의 NBD aa 서열은 또한, 예를 들어 서열번호 8의 D668에 상응하는 Asp에서의 치환을 포함할 수 있으며, 이는 NBD ATP 가수분해 결핍을 야기한다. 따라서, TAP1의 NBD 폴리펩티드 aa 서열은, 예를 들어, 서열번호 10의 aa 서열을 포함하거나, 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖

는 aa 서열을 포함할 수 있다:

```
  1 GLLTPLHLEG LVQFQDVSFA YPNRPDVLVL QGLTFTLRPG EVTALVGPNG SGKSTVAALL
 61 QNLYQPTGGQ LLLDGKPLPQ YEHRYLHRQV AAVGQEPQVF GRSLQENIAY GLTQKPTMEE
121 ITAAAVKSGA HSFISGLPQG YDTEVDEAGS QLSGGQRQAV ALARALIRKP SVLILDNATS
181 GNQLRV QRLLYESPER YSRSVLLITQ HLSLVEQADH ILFLEGGAIR EGGTHQQLME
241 KKGSYWAMVQ APADAPE (서열번호 10).
```

[0069]

[0070] 대안적으로, NBD aa 서열은 서열번호 10에 제공된 서열의 적어도 230개 또는 240개의 연속 aas와 97% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0071] 인간 TAP1로부터의 NBD aa 서열은, 예를 들어, 서열번호 8의 C662(예를 들어, C662S) 및 C735(예를 들어, C735S)에서의 상응하는 치환을 포함할 수 있다. 인간 TAP1로부터의 NBD aa 서열은 또한, 예를 들어, 서열번호 8의 N676, S677, Q680, E682, 및 Q683(예를 들어, N676G, S677N, Q680R, E682Q, 및/또는 Q683R) 중 하나 이상에서의 상응하는 치환을 포함할 수 있으며, 이는 아래의 서열번호 87에 굵은 글씨체 및 이탤릭체로 표시되어 있다. 추가적으로, 인간 TAP1로부터의 NBD aa 서열은 서열번호 8의 D668에 상응하는 Asp에서의 치환을 포함할 수 있으며, 이는 NBD ATP 가수분해 결핍을 야기한다. 따라서, TAP1의 NBD 폴리펩티드 aa 서열은, 예를 들어, 서열번호 87의 aa 서열을 포함하거나, 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다:

```
  1 MPPSGLLTPL HLEGLVQFQD VSFAYPNRPD VLVLQGLTFT LRPGEVTALV GPNGSGKSTV
 61 AALLQNLYQP TGGQLLLDGK PLPQYEHRYL HRQVAAVGQE PQVFGRSLQE NIAYGLTQKP
121 TMEEITAAAV KSGAHSFISG LPQGYDTEVD EAGSQLSGGQ RQAVALARAL IRKPSVLILD
181 NATSALDAGN QLRVQRLLYE SPERYSRSVL LITQHLSLVE QADHILFLEG GAIREGGTHQ
241 QLMEKKGSYW AMVQAPADAP E  (서열번호 87).
```

[0072]

[0073] 대안적으로, NBD aa 서열은 서열번호 87에 제공된 서열의 적어도 250개 또는 260개의 연속 aas와 97% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0074] 인간 TAP1로부터의 NBD aa 서열은, 예를 들어, 서열번호 8의 C662(예를 들어, C662S) 및 C735(예를 들어, C735S)에서의 상응하는 치환을 포함할 수 있다. 인간 TAP1로부터의 NBD aa 서열은 또한, 예를 들어, 서열번호 8의 N676, S677, Q680, E682, 및 Q683(예를 들어, N676G, S677N, Q680R, E682Q, 및/또는 Q683R) 중 하나 이상에서의 상응하는 치환을 포함할 수 있으며, 이는 아래의 서열번호 88에 굵은 글씨체 및 이탤릭체로 표시되어 있다. 추가적으로, 인간 TAP1로부터의 NBD aa 서열은 서열번호 8의 D668에 상응하는 aa에서의 치환(예를 들어, D668N 치환)을 포함할 수 있으며, 이는 NBD ATP 가수분해 결핍을 야기한다. 따라서, TAP1의 NBD 폴리펩티드 aa 서열은, 예를 들어, 서열번호 88의 aa 서열을 포함하거나, 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다:

```
  1 METEFFQQNQ TGGGGSGLQT VRSFGGGGGS GGSGLLTPLH LEGLVQFQDV SFAYPNRPDV
 61 LVLQGLTFTL RPGEVTALVG PNGSGKSTVA ALLQNLYQPT GGQLLLDGKP LPQYEHRYLH
121 RQVAAVGQEP QVFGRSLQEN IAYGLTQKPT MEEITAAAVK SGAHSFISGL PQGYDTEVDE
181 AGSQLSGGQR QAVALARALI RKPSVLILDN ATSALDAGNQ LRVQRLLYES PERYSRSVLL
241 ITQHLSLVEQ ADHILFLEGG AIREGGTHQQ LMEKKGSYWA MVQAPADAPE (서열번호 88).
```

[0075]

[0076] 대안적으로, NBD aa 서열은 서열번호 88에 제공된 서열의 적어도 300개 또는 310개의 연속 aas와 97% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 가질 수 있다. 서열번호 88에 제공된 NBD는, TAP1 NBD 서열 이외에, TAP1로부터의 커플링 나선 1(CH1, aas 2~11) 및 TAP2로부터의 커플링 나선 2(CH2, aas 17~25), 그리고 해당 서열 상의 "캡"을 함께 구성하는 연관된 GS 링커(aas 12~16 및 25~30)를 포함한다. TAP1 NBD 작제물은 실시예 3에 도시된 바와 같이 생물학적 발현 시스템에서 실질적으로 보다 높은 수준으로 발현한다.

[0077] 일부 경우, 동종이량체화되지 않고, 오히려 동족 NBD와 이종이량체화되는 TAP 단백질로부터의 NBD는, 본 개시의 작제물 쌍(예를 들어, 도 2의 B 및 D, 그리고 도 3 참조) 또는 작제물의 복합체(예를 들어, 도 4a 참조)의 제조에 사용된다. 예를 들어, 인간 TAP1 NBD 및 인간 TAP2 NBD를 보유하는 한 쌍의 작제물이 제조될 수 있다. TAP1

및 TAP2 NBD를 포함하는 한 쌍의 작제물은 충분한 ATP의 존재 하에서 TAP1 및 TAP2의 상호작용을 통해 이종이량체를 형성하게 된다. 이종이량체화될 수 있는 NBD, 예컨대 TAP1 및 TAP2의 사용은, 활성화 서열의 다양한 특이적 조합이 면역 세포 자극을 위해 결합될 수 있게 한다. 예로서, IL-12A(p35), 선택적인 링커 aa 서열, 및 TAP1을 포함하는 작제물은 충분한 ATP의 존재 하에서 IL-12B(p40), 선택적인 링커 aa 서열, 및 TAP2를 포함하는 작제물과 이종이량체화됨으로써 활성 IL-12AB 이종이량체를 제시하는 작제물 쌍을 형성할 수 있다. 이러한 작제물은 또한 원하는 경우 Ig Fc aa 서열과 같은 스캐폴드 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0078] 도 7은 인간 TAP2의 서열을 제공한다. 일부 경우, 본 개시의 작제물의 NBD는 인간 TAP2로부터의 NBD로부터의 aa 서열, 또는 인간 TAP2 NBD와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, NBD는 UniProtKB - Q03519(TAP2_인간)의 NBD aa 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다:

```
  1 MRLPDLRPWT SLLLVDAALL WLLQGPLGTL LPQGLPGLWL EGTLRLGGLW GLLKLRGLLG
 61 FVGTLLLPLC LATPLTVSLR ALVAGASRAP PARVASAPWS WLLVGYGAAG LSWSLWAVLS
121 PPGAQEKEQD QVNNKVLMWR LLKLSRPDLP LLVAAFFFLV LAVLGETLIP HYSGRVIDIL
181 GGDFDPHAFA SAIFFMCLFS FGSSLSAGCR GGCFTYTMSR INLRIREQLF SSLLRQDLGF
241 FQETKTGELN SRLSSDTTLM SNWLPLNANV LLRSLVKVVG LYGFMLSISP RLTLLSLLHM
301 PFTIAAEKVY NTRHQEVLRE IQDAVARAGQ VVREAVGGLQ TVRSFGAEEH EVCRYKEALE
361 QCRQLYWRRD LERALYLLVR RVLHLGVQML MLSCGLQQMQ DGELTQGSLL SFMIYQESVG
421 SYVQTLVYIY GDMLSNVGAA EKVFSYMDRQ PNLPSPGTLA PTTLQGVVKF QDVSFAYPNR
481 PDRPVLKGLT FTLRPGEVTA LVGPNGSGKS TVAALLQNLY QPTGGQVLLD EKPISQYEHC
541 YLHSQVVSVG QEPVLFSGSV RNNIAYGLQS CEDDKVMAAA QAAHADDFIQ EMEHGIYTDV
601 GEKGSQLAAG QKQRLAIARA LVRDPRVLIL DEATSALDVQ CEQALQDWNS RGDRTVLVIA
661 HRLQTVQRAH QILVLQEGKL QKLAQL (서열번호 11).
```

[0079]

[0080] NBD는, 예를 들어 인간 TAP2 aa 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다:

```
GTLAPTTLQG VVKFQDVSFA YPNRPDRPVL KGLTFTLRPG EVTALVGPNG SGKSTVAALL
QNLYQPTGGQ VLLDEKPISQ YEHCYLHSQV VSVGQEPVLF SGSVRNNIAY GLQSCEDDKV
MAAAQAAHAD DFIQEMEHGI YTDVGEKGSQ LAAGQKQRLA IARALVRDPR VLILDEATSA
LDVQCEQALQ DWNSRGDRTV LVIAHRLQTV QRAHQILVLQ EGKLQK (서열번호 12).
```

[0081]

[0082] NBD는 또한 서열번호 12와 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0083] TAP1의 D668N 치환에 상응하는 촉매 산성 aa 잔기를 제거하여 ATP 가수분해 결핍을 유발하는 돌연변이가 TAP2 NBD aa 서열 내에 혼입될 수 있다.

[0084] **(2) NBD로서의 CFTR ATP 결합 카세트**

[0085] 일부 경우, 본 개시의 작제물의 NBD는 인간 낭성 섬유증 막관통 전도도 조절자(CFTR)로부터의 NBD로부터의 aa 서열, 또는 인간 CFTR과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, NBD는 UniProtKB - - P13569(서열번호 13)의 NBD aa 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다:

[0086]

```
   1 MQRSPLEKAS VVSKLFFSWT RPILRKGYRQ RLELSDIYQI PSVDSADNLS
  51 EKLEREWDRE LASKKNPKLI NALRRCFFWR FMFYGIFLYL GEVTKAVQPL
 101 LLGRIIASYD PDNKEERSIA IYLGIGLCLL FIVRTLLLHP AIFGLHHIGM
 151 QMRIAMFSLI YKKTLKLSSR VLDKISIGQL VSLLSNNLNK FDEGLALAHF
 201 VWIAPLQVAL LMGLIWELLQ ASAFCGLGFL IVLALFQAGL GRMMMKYRDQ
 251 RAGKISERLV ITSEMIENIQ SVKAYCWEEA MEKMIENLRQ TELKLTRKAA
 301 YVRYFNSSAF FFSGFFVVFL SVLPYALIKG IILRKIFTTI SFCIVLRMAV
 351 TRQFPWAVQT WYDSLGAINK IQDFLQKQEY KTLEYNLTTT EVVMENVTAF
 401 WEEGFGELFE KAKQNNNNRK TSNGDDSLFF SNFSLLGTPV LKDINFKIER

 451 GQLLAVAGST GAGKTSLLMV IMGELEPSEG KIKHSGRISF CSQFSWIMPG
 501 TIKENIIFGV SYDEYRYRSV IKACQLEEDI SKFAEKDNIV LGEGGITLSG
 551 GQRARISLAR AVYKDADLYL LDSPFGYLDV LTEKEIFESC VCKLMANKTR
 601 ILVTSKMEHL KKADKILILH EGSSYFYGTF SELQNLQPDF SSKLMGCDSF
 651 DQFSAERRNS ILTETLHRFS LEGDAPVSWT ETKKQSFKQT GEFGEKRKNS
 701 ILNPINSIRK FSIVQKTPLQ MNGIEEDSDE PLERRLSLVP DSEQGEAILP
 751 RISVISTGPT LQARRRQSVL NLMTHSVNQG QNIHRKTTAS TRKVSLAPQA
 801 NLTELDIYSR RLSQETGLEI SEEINEEDLK ECFFDDMESI PAVTTWNTYL
 851 RYITVHKSLI FVLIWCLVIF LAEVAASLVV LWLLGNTPLQ DKGNSTHSRN
 901 NSYAVIITST SSYYVFYIYV GVADTLLAMG FFRGLPLVHT LITVSKILHH
 951 KMLHSVLQAP MSTLNTLKAG GILNRFSKDI AILDDLLPLT IFDFIQLLLI
1001 VIGAIAVVAV LQPYIFVATV PVIVAFIMLR AYFLQTSQQL KQLESEGRSP
1051 IFTHLVTSLK GLWTLRAFGR QPYFETLFHK ALNLHTANWF LYLSTLRWFQ
1101 MRIEMIFVIF FIAVTFISIL TTGEGEGRVG IILTLAMNIM STLQWAVNSS
1151 IDVDSLMRSV SRVFKFIDMP TEGKPTKSTK PYKNGQLSKV MIIENSHVKK
1201 DDIWPSGGQM TVKDLTAKYT EGGNAILENI SFSISPGQRV GLLGRTGSGK
1251 STLLSAFLRL LNTEGEIQID GVSWDSITLQ QWRKAFGVIP QKVFIFSGTF
1301 RKNLDPYEQW SDQEIWKVAD EVGLRSVIEQ FPGKLDFVLV DGGCVLSHGH
1351 KQLMCLARSV LSKAKILLLD EPSAHLDPVT YQIIRRTLKQ AFADCTVILC
1401 EHRIEAMLEC QQFLVIEENK VRQYDSIQKL LNERSLFRQA ISPSDRVKLF
1451 PHRNSSKCKS KPQIAALKEE TEEEVQDTRL
```

[0087]

[0088] NBD는, 예를 들어 인간 CFTR 서열과 80% 초과 또는 85% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다: VLKDINFKIERGQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGELEPSEGK IKHSGRISFCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDEYRYRSVIKACQLEEDISKFAEKDNIVLGEGGITLSGGQRARISLARAVYKDADLYLLDSPFGYLDVLTE KEIFESCVCKLMANKTRILVTSKMEHLKKADKILILHEGSSYFYGTFSELQNLQPDF (서열번호 14). 대안적으로, NBD는, 예를 들어 서열번호 14와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 AA 서열을 포함할 수 있다. NBD는 또한 서열번호 14와 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 AA 서열을 포함할 수 있다.

[0089] NBD는, 예를 들어, Atwell 등의 문헌(2010) [Protein Engineering, Design & Selection, 23(5) 375-384]에 기술된 인간 CFTR aa 서열 Ser-NBD1[387-646(D405-436)]과 80% 초과 또는 85% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있으며: SXTTTEVVMENVTAFWEEGGTPVLKDINFKIERGQLLAVAGSTGAGKTSLLMVIMGELEPSEGKIKHSGRIS

[0090] FCSQFSWIMPGTIKENIIFGVSYDEYRYRSVIKACQLEEDISKFAEKDNIVLGEGGITLSGGQRARISLARAVYKDADLYLLDSPFGYLDVLTEKEIFESCV CKLMANKTRILVTSKMEHLKKADKILILHEGSSYFYGTFSELQNLQPDFSSKLMX (서열번호 15), 여기에서 위치 2에의 X는 부재 또는 L일 수 있으며; 위치 229의 X는 부재 또는 G이다. 대안적으로, NBD는 예를 들어, 서열번호 15와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. NBD는 또한 서열번호 15와 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. NBD는 예를 들어, 서열번호 16의 aas 1~216과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있으며, 여기에서 위치 2의 X는 부재 또는 L일 수

있다.

[0091] **2. 스캐폴드**

[0092] 스캐폴드 aa 서열은 구조 조직화의 수단으로서 본원에 기술된 ATP-의존성 작용제 작제물에 혼입되어 생체 내에서 해당 분자의 반감기를 증가시킬 수 있으며, ADCC, ADCP, 및/또는 CDC를 유도할 수 있는 경우, 이러한 효과기 기능에 대한 기반으로서 작용할 수 있다. 스캐폴드는 이량체 및 고차 복합체(예를 들어, 삼량체)를 형성할 수 있거나, 비-이량체성(비-이량체화)일 수 있다(이 경우, 이들은 이량체 또는 고차 복합체를 형성하지 않음). 본원에 기술된 작제물 내에 혼입된 스캐폴드는, 예를 들어 면역글로불린(Ig) aa 서열 또는 비-면역글로불린 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0093] 일부 구현예에서, 스캐폴드 폴리펩티드 서열은 이량체화 또는 다량체화 서열로서 기능하는 면역글로불린 중쇄 불변 영역(CH2-CH3) 폴리펩티드 서열을 포함한다. 스캐폴드가 면역글로불린(Ig) aa 서열을 포함하는 경우, 이는 면역글로불린 중쇄 불변 영역(CH2-CH3) 폴리펩티드 aa 서열(예를 들어, IgFc aa 서열)을 포함할 수 있다. 스캐폴드 aa 서열은 예를 들어, 이량체화를 방지하도록 변형된 Ig CH2 및/또는 CH3 aa 서열을 포함할 수 있다. Ig 중쇄 이량체를 안정화시키는 사슬간 이황화 결합에 관여하는 임의의 하나 이상의 시스테인은, 해당 Ig 중쇄 서열이 동종이량체화되어 사슬간 이황화 결합을 형성할 수 없도록, (예를 들어, 알라닌 또는 세린으로) 치환될 수 있다. 스캐폴드 폴리펩티드는 다음의 야생형(wt) 호모 사피엔스 IgG1 Fc 폴리펩티드 서열(서열번호 56)을 포함할 수 있다:

```
  1 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 61 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
121 GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
181 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK;
```

[0094]

[0095] 이량체화를 방지하기 위해 임의로 변형됨. 대안적으로, 스캐폴드는, 예를 들어 서열번호 56과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 스캐폴드는 또한 서열번호 56과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0096] 스캐폴드 폴리펩티드는 LALA 치환(L234A, L235A 치환, 각각 굵은 글씨체 및 이탤릭체로 표시된 aas 14 및 15)을 포함하는, 서열번호 57의 호모 사피엔스 IgG1 Fc aa 서열을 포함할 수 있다:

```
  1 DKTHTCPPCP APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 61 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
121 GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
181 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG;
```

[0097]

[0098] 이량체화를 방지하기 위해 임의로 변형됨. 대안적으로, 스캐폴드는, 예를 들어 서열번호 57과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 스캐폴드는 또한 서열번호 57과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0099] 비-이량체화 스캐폴드는 인간 단쇄 Fc(scFc) 이량체로서 제조될 수 있다. 예를 들어, Zhou 등의 문헌 [Biomaterials 117:24-31 (2017)]을 참조한다. 이러한 scFc 이량체는 IgG1에 기초할 수 있으며, 다음의 서열을 가질 수 있다:

```
  1 DKTHTCPPCP APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
 61 GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK
121 GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS
181 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGGGGG SGGGGSGGGG
241 SGGGGSGGGG SGGGGSDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV
301 DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS
361 NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN
421 GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS
481 PG (서열번호 102).
```

[0100]

[0101] 대안적으로, 스캐폴드는, 예를 들어 서열번호 102와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 스캐폴드는 또한 서열번호 102와 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 서열번호 102의 스캐폴드 작제물은 ADCC, ADCP, 및 CDC의 유도에 적합하지만, 이하에서 논의되는 "LALA"를 포함하는 치환이 도입되면 이러한 효과기 기능을 유도하는 scFc의 능력을 선택적으로 변경시킬 수 있다.

[0102] 스캐폴드 폴리펩티드는 서열번호 58의 wt 호모 사피엔스 IgG2 Fc 폴리펩티드를 포함할 수 있다(GenBank AAN76044 아미노산 99~325 참조):

```
  1 STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG
 61 LYSLSSVVTV PSSNFGTQTY TCNVDHKPSN TKVDKTVERK CCVECPPCPA PPVAGPSVFL
121 FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPE VQFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQFNSTFRV
181 VSVLTVVHQD WLNGKEYKCK VSNKGLPAPI EKTISKTKGQ PREPQVYTLP PSREEMTKNQ
241 VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYK TTPPMLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV
301 FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGK;
```

[0103]

[0104] 이량체화를 방지하기 위해 임의로 변형됨. 대안적으로, 스캐폴드는, 예를 들어 서열번호 58과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 스캐폴드는 또한 서열번호 58과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0105] 스캐폴드 폴리펩티드는 서열번호 59의 wt 호모 사피엔스 IgG3 Fc 폴리펩티드를 포함할 수 있다(예를 들어, GenBank AAW65947 아미노산 19~246 참조):

```
  1 HKPSNTKVDK RVELKTPLGD TTHTCPPCPA PELLGGPSVF LFPPKPKDIL MISRTPEVTC
 61 VVVDVSHEDP EVKFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQYNSTYR VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC
121 KVSNKALPAP IEKTISKAKG QPREPQVYTL PPSRDELTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW
181 ESNGQPENNY KTTPPVLDSD GSFFLYSKLT VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL
241 SLSPGK;
```

[0106]

[0107] 이량체화를 방지하기 위해 임의로 변형됨. 대안적으로, 스캐폴드는, 예를 들어 서열번호 59와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 스캐폴드는 또한 서열번호 59와 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0108] 스캐폴드 폴리펩티드는 서열번호 60의 wt 호모 사피엔스 IgG4 Fc 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

```
  1 PPCPSCPAPE FLGGPSVFLF PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSQEDPEV QFNWYVDGVE
 61 VHNAKTKPRE EQFNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPSSIE KTISKAKGQP
121 REPQVYTLPP SQEEMTKNQV SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSDGS
181 FFLYSRLTVD KSRWQEGNVF SCSVMHEALH NHYTQKSLSL SPG;
```

[0109]

[0110] 이량체화를 방지하기 위해 임의로 변형됨. 대안적으로, 스캐폴드는, 예를 들어 서열번호 60과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 스캐폴드는 또한 서열번호 60과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0111] 예를 들어, ADCC 및 ADCP를 유도하는 항체의 IgG 부류의 상호작용은 수용체의 Fcɣ 계열(FcɣR)의 구성원과 결합하는 Fc 영역에 의해 발생한다. 인간 단백질 계열은 FcɣRI(CD64), FcɣRII(이소형 FcɣRIIa, FcɣRIIb, 및 FcɣRIIc를 포함하는 CD32), 및 FcɣRIII(이소형 FcɣRɣIIIa 및 FcɣRIIIb를 포함하는 CD16)으로 구성된다. 예를 들어, Lazar 등의 문헌(2006) [PNAS:103 (11), 4005-4010]을 참조한다.

[0112] 하나 이상의 항체 관련 효과기 기능(예를 들어, ADCC, ADCP, 및/또는 CDC 반응)을 향상시킬 수 있는 변이체는 다음과 같다: 인간 IgG1에서의, 개별 치환 S239D 및 I332E; 및 S239D/I332E 및 S239D/I332E/A330L에서의 이중 및 삼중 치환. 인간 IgG1 Fc 서열(서열번호 56)에서의 S239D, I332E, 및 A330L에 상응하는 치환은 S19D, I112E, 및 A110L이다. 일 구현예에서, 치환은 이중 및 삼중 돌연변이체, 즉 S239D/I332E 또는 S239D/I332E/A330L이다. Lazar 등의 문헌(2006)을 참조한다.

[0113] IgG1 항체에서 하나 이상의 항체 관련 효과기 기능을 향상시키는 다른 치환은 다음을 포함하나 이에 한정되지는 않는다:Ser298Ala/Glu333Ala/Lys334Ala; Ser239Asp/Ala330Leu/Ile332Glu; Ser239Asp/Ile332Glu; Gly236Ala/Ser239Asp/Ala330Leu/Ile332Glu ; Gly236Ala; Ser239Asp/Ile332Glu/Gly236Ala; Leu234Tyr/Gly236Trp/Ser298Ala; Phe243Leu/Arg292Pro/Tyr300Leu/Val305Ile/Pro396Leu; Lys326Trp/Glu333Ser; Lys326Ala/Glu333Ser; Lys326Met/Glu333Ser; Cys221Asp/Asp222Cys; Ser267Glu/His268Phe/Ser324Thr; His268Phe/Ser324Thr; 및 Glu345Arg. Saunders KO의 문헌(2019) [Front. Immunol. 10:1296.doi: 10.3389/fimmu.2019.01296]을 참조한다. 서열번호 56의 IgG1 Fc 서열에서의 상응하는 위치는 표시된 위치로부터 220을 빼서 구할 수 있다. 일 구현예에서, 적어도 ADCC는 치환에 의해 강화된다. 일 구현예에서, 적어도 ADCP는 치환에 의해 강화된다. 일 구현예에서, 적어도 CDC는 치환에 의해 강화된다. 일 구현예에서, 적어도 보체 고정은 치환에 의해 강화된다.

[0114] IgG1 항체의 하나 이상의 항체 관련 효과기 기능(예를 들어, ADCC, ADCP, 및/또는 CDC 반응)을 실질적으로 감소시킬 수 있는 변이체는 다음을 포함하나 이에 한정되지는 않는다: Leu235Glu; Leu234Ala/Leu235Ala(LALA); Ser228Pro/Leu235Glu; Leu234Ala/Leu235Ala/Pro329Gly; Pro331Ser/Leu234Glu/Leu235Phe; Asp265Ala; Gly237Ala; Glu318Ala; Glu233Pro; 및 Gly236Arg/Leu328Arg. 전술한 바와 같이, 서열번호 56으로서 제공된 IgG1 Fc 서열에서의 이들 치환의 상응하는 위치는 표시된 위치로부터 220을 차감함으로써 구할 수 있다. 일 구현예에서, 스캐폴드 서열은 LALA 치환을 갖는 IgG1 Fc 서열을 포함한다(예를 들어, 서열번호 57 참조). 일 구현예에서, 적어도 ADCC는 치환에 의해 실질적으로 감소된다. 일 구현예에서, 적어도 ADCP는 치환에 의해 실질적으로 감소된다. 일 구현예에서, 적어도 CDC는 치환에 의해 실질적으로 감소된다. 일 구현예에서, 적어도 보체 고정은 치환에 의해 실질적으로 감소된다. 예를 들어, Saunders의 문헌(2019) 및 해당 문헌의 인용 문헌을 참조한다. 일 구현예에서, IgG1 Fc 치환은 S239D/I332E/A330L일 수 있으며, 이는 CDC 기능을 실질적으로 변경하지 않고 ADCC를 강화시킨다(Lazar 등의 문헌(2006) 참조).

[0115] 하나 이상의 항체 관련 효과기 기능을 실질적으로 감소시킬 수 있는 IgG1, IgG2, 및 IgG4 항체 서열의 다른 변이체는 다음을 포함하나 이에 한정되지는 않는다: His268Gln/Val309Leu/Ala330Ser/Pro331Ser(IgG2m4); Val234Ala/Gly237Ala/Pro238Ser/His268Ala/Val309Leu/Ala330Ser/Pro331Ser(IgG2σ); Leu234Ala/L235Ala/Gly237Ala/P238Ser/His268Ala/Ala330Ser/Pro331Ser(IgG1σ); 및 S228P/Phe234Ala/Leu235Ala(IgG4PAA). 예를 들어, Saunders의 문헌(2019) 및 해당 문헌의 인용 문헌을 참조한다.

[0116] 대안적인 비-이량체화 스캐폴드 도메인은 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: XTENyl화, 페길화(PEGyl화), 지질화(웹사이트("www:) 상의 pubs.acs.org/doi/10.1021/acsmedchemlett.8b00226 참조), 인간 혈청 알부민(HSA) 융합체(웹사이드 nature.com/articles/s42003-021-01790-2 참조), 그리고 항-HSA 펩티드(웹사이드 pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.molpharmaceut.2c00106 참조), 항체 및 항체 단편(예를 들어, ScFvs, FAB, 등) 및 VHH 도메인(웹사이트 semanticscholar.org/paper/Serum-albumin%E2%80%90binding-VHHs-with-variable-pH-enable-Faassen-Ryan/d34256a0d39a0ab92db9195210fa0fc7430758b6 참조)을 포함하나 이에 한정되지 않는 항HSA 결합 도메인.

[0117] **3. 링커**

[0118] 본 개시의 작제물은 선택적으로 임의의 2개의 요소 사이에 위치된 링커를 갖는다. 링커는 NBD aa 서열, 스캐폴드 aa 서열, 및 AD 중 임의의 2개 사이에 위치될 수 있다. 링커는 일반적으로 길이가 4 내지 50 aas(예를 들어, 4 내지 25 aas 또는 25 내지 50 aas)인 aa 서열로 구성되며, 무엇보다도 이들의 강성을 기준으로 선택될 수 있다. 링커는 각각 독립적으로 선택된다.

[0119] 일부 경우, 링커는 글리신, 세린, 및/또는 알라닌 잔기로 이루어진 가요성 aa 서열이다. 다른 경우, 링커는 글리신 및 세린으로 이루어진 aa 서열이다. 예를 들어, 서열 GGGS(서열번호 16) 또는 서열 GGGGS(서열번호 26)는 링커$(GGGS)_{1\sim10}$(서열번호 16~25) 또는 $(GGGGS)_{1\sim10}$(서열번호 26~35)에서 1~10회 나타나거나 반복될 수 있다. 링커가 GGGS 또는 GGGGS 서열을 포함하는 일부 경우, 이들 서열은 1~5회 또는 5~10회 나타날 수 있다.

[0120] 강성 링커는 작제물의 도메인 사이의(예를 들어, 동일한 작제물의 NBD 사이의) 바람직하지 않은 상호작용을 감소시키거나 실질적으로 제거하기 위해, 도메인 사이의 실질적으로 고정된 거리 또는 공간적 분리를 유지하는 것이 바람직한 경우에 사용될 수 있다. 예를 들어, 강성 링커의 사용을 통해, 단일 분자에 존재하는 한 쌍의 NBD가 자가-결합되는 것이 방지될 수 있다. 예시적인 강성 펩티드 또는 폴리펩티드 링커는 서열 X(EAAAK)n X를 포

함하는 링커를 포함하며, 여기에서 EAAAK는 링커에서 1 내지 20회(즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20회, 서열번호 36~55) 나타날 수 있으며, X는 부재 또는 알라닌이다. 링커가 X(EAAAK)n X 서열을 포함하는 일부 경우, n은 1~5 또는 5~10일 수 있다. 링커가 X(EAAAK)n X 서열을 포함하는 일부 경우, n은 11~15 또는 16~20일 수 있다. 대안적으로, 강성 펩티드 링커는 4 내지 40개 아미노산 길이(예를 들어, 4~20개 또는 20~40개 아미노산)를 갖는 (Lys-Pro), (Glu-Pro), (Thr-Pro-Arg), 및 (Ala-Pro)의 반복부를 포함할 수 있다. 다른 강성 링커는 2~10회 또는 10~20회의 디펩티드 서열 KP 또는 EP의 반복부를 포함하는 링커를 포함한다.

[0121] **4. 면역 세포 결합 도메인**

[0122] 면역 세포 결합 도메인(면역 세포 결합체, "ICE", 또는 "ICEs"(복수일 경우)로도 지칭됨)은 면역 세포 표면 분자에 결합할 수 있는 NBD-함유 작제물의 도메인이다. 면역 세포 결합체는 일반적으로 항체 관련 분자/aa 서열(예를 들어, 항체의 항원 결합 단편, Fab, Fab', 단쇄 항체, scFv, 펩티드 앱타머, 또는 나노바디)이다. 달리 언급되지 않는 한, 면역 세포 결합체는 개별 분자의 세포 표적(예를 들어, 면역 세포 표면 항원)과의 교차결합 및 면역 세포의 표적-외 자극을 방지하기 위해 1가인 것으로 이해된다. 개별 면역 세포 결합체는 일반적으로 작용제로서 작용할 수 없고 이들이 결합하는 면역 세포를 자극할 수 없지만; 면역 세포 결합체를 보유하는 다수의 작제물이 복합체 내에서 국소화되는 경우(예를 들어, 도 4a의 D 또는 E 참조), 또는 종양 세포의 표면 상에 고정되는 경우(예를 들어, 도 3의 C에서와 같은 작제물을 사용함), 면역 세포 결합체는 면역 세포 자극/활성화의 작용제로서 기능할 수 있다.

[0123] 면역 세포 결합체는 TME 내에서 나타나거나 이로 동원될 수 있는 다수의 상이한 면역 세포로 유도될 수 있다. 이러한 면역 세포 및 이들의 상응하는 면역 세포 결합체의 표적은 표 1에 제시된 것들을 포함한다.

[표 1] 일부 면역 세포 및 이들의 상응하는 면역 세포 결합체

면역 세포	면역 세포 결합체 표적/면역 세포 결합체 (예를 들어, 표적에 대해 유도된 항체 또는 항체 관련 분자‡)
CD4+ T 세포	CD3/항-CD3γ 또는 항-CD3ε; αβTCR/항-TCRα 사슬 또는 항-TCRβ 사슬; CD4/항-CD4
CD4+ T regs	CD25;
CD8+ T 세포	CD3/항-CD3γ 또는 항-CD3ε; αβTCR/항-TCRα 사슬 또는 항-TCRβ 사슬 CD8/항-CD8
δγ T 세포	δγ TCR/항-TCRδ 사슬 또는 항-TCRγ 사슬(예를 들어, TRGV9/항-TRGV9
NK 세포	CD16/항-CD16
MDSC(골수 유래 억제 세포)	CD84/항-CD84; CXCR1/항-CXCR1; DR5/항-DR5; CD13/항-CD13; CD33/항-CD33; CD34/항-CD34; CD16/항-CD16

‡ 항체 관련 분자는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않음: 항체의 항원 결합 단편, Fab, Fab', 및 단쇄 항체를 포함하는 폴리펩티드, scFv, 펩티드 앱타머, 또는 나노바디 aa 서열.

[0124]

[0125] 표 1에 열거된 것들과 같은 면역 세포 결합체가 TAA에 대해 유도된 종양 특이적 결합제를 포함하는 제2 NBD-함유 작제물과 짝을 이루거나 복합체를 형성할 수 있는 제1 NBD-함유 폴리펩티드 작제물 내에 혼입되는 경우, 종양 세포의 세포 용해를 유도하는 종양 세포의 트랜스-표적화가 관찰될 수 있다(예를 들어, 도 3의 C, D, 및 F~H, 및 또한 도 4a의 복합체 E, F, H, 및 I 참조). 이러한 작제물 및 복합체 내로의 CD3, TCR, 및/또는 CD16을 포함하나 이에 한정되지 않는 면역 세포 표면 단백질에 대해 유도된 항체 관련 분자/aa 서열의 혼입은 강력한 세포 용해 작용을 생성할 수 있다. 둘 이상의 유형의 면역 세포와 상호작용하는 면역 세포 결합체가 사용될 경우, 세포 용해 활성은 강화될 수 있다. 일부 예시적인 항-CD3 면역 세포 결합체가 아래에 제공된다.

[0126] 면역 세포 결합체 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는 UCHT-1 단클론 항체에 기초한 scFv, 항-인간 CD3일 수 있다:

[0127] AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVTTYADSVKGRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSS (서열번호 61). 면역 세포 결합체는 또한 서열번호 61과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 또한, 면역 세포 결합체는 서열번호 61과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0128] 면역 세포 결합체 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는 UCHT-1 단클론 항체에 기초한 scFv, 항-인간 CD3일 수 있다:

[0129] AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGT KVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVD KSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSS (서열번호 62). 면역 세포 결합체는 또한 서열번호 62와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 또한, 면역 세포 결합체는 서열번호 62와 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0130] 면역 세포 결합체 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는 항-인간 CD3 VHH일 수 있다: QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSANTMGWYRQAPGKQRELVAGMNTSGSTVYGDSVKGRFTISRDNAKNIAYLQMNSLIPEDTAVYYCTLVQRGP NYWGQGTQVTVSS (서열번호 63). 면역 세포 결합체는 또한 서열번호 63과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 또한, 면역 세포 결합체는 서열번호 63과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0131] 면역 세포 결합체 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는 L2K 항체에 기초한 항-인간 CD3 scFv(vH-vL)일 수 있다:

[0132] DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDD HYCLDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDY SLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK (서열번호 64). 면역 세포 결합체는 또한 서열번호 64와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 또한, 면역 세포 결합체는 서열번호 64와 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0133] 면역 세포 결합체 폴리펩티드는 서열번호 65에 제시된 서열을 갖는 L2K 항체에 기초한 항-인간 CD3 scFv(vH-vL)일 수 있으며, 이는 Q43C에서의 시스테인 치환과 G99C(도시된 바와 같은 G233C) 사이의 이황화 결합을 포함한다:

[0134] DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGCGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDD HYCLDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDY SLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGCGTKVEIK (서열번호 65). 면역 세포 결합체는 또한 서열번호 65와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 또한, 면역 세포 결합체는 서열번호 65와 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0135] 면역 세포 결합체 폴리펩티드는 서열번호 66에 제시된 서열을 갖는 L2K 항체에 기초한 항-인간 CD3 scFv (vH-vL)일 수 있으며, 이는 Q43C에서의 시스테인 치환과 G100C(도시된 바와 같은 G234C) 사이의 이황화 결합을 포함한다:

[0136] DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGCGLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDD HYCLDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDY SLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGCTKVEIK (서열번호 66). 면역 세포 결합체는 또한 서열번호 66과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 또한, 면역 세포 결합체는 서열번호 66과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0137] 면역 세포 결합체 폴리펩티드는 서열번호 67에 제시된 서열을 갖는 L2K 항체에 기초한 항-인간 CD3 scFv(vH-vL)일 수 있으며, 이는 G44C에서의 시스테인 치환과 G99C(도시된 바와 같은 G233C) 사이의 이황화 결합을 포함한다:

[0138] DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQCLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDD HYCLDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTDY SLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGCGTKVEIK (서열번호 67). 면역 세포 결합체는 또한 서열번호 67과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 또한, 면역 세포 결합체는 서열번호 67과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0139] 면역 세포 결합체 폴리펩티드는 서열번호 68에 제시된 서열을 갖는 L2K 항체에 기초한 항-인간 CD3 scFv (vH-vL)일 수 있으며, 이는 G44C에서의 시스테인 치환과 G100C(도시된 바와 같은 G234C) 사이의 이황화 결합을 포함한다:

```
  1 DVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT RYTMHWVRQA PGQCLEWIGY INPSRGYTNY
 61 ADSVKGRFTI TTDKSTSTAY MELSSLRSED TATYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTVTVSSG
121 GGGSGGGGSG GGGSDIVLTQ SPATLSLSPG ERATLSCRAS QSVSYMNWYQ QKPGKAPKRW
181 IYDTSKVASG VPARFSGSGS GTDYSLTINS LEAEDAATYY CQQWSSNPLT FGGCTKVEIK
```

[0140] (서열번호 68). 면역 세포 결합체는 또한 서열번호 68과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 또한, 면역 세포 결합체는 서열번호 68과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0141] 서열번호 61~62 및 64~68에서의 반복부를 함유하는 GGGS(서열번호 16) 및/또는 GGGGS(서열번호 26)는 도메인 사이의 링커 서열이다.

[0142] **5. 면역 세포 활성화 도메인(활성화 도메인)**

[0143] 본 개시의 작제물 내로 혼입될 수 있는 활성화 도메인("ADs" 또는 "AD"(단수일 경우))은 이량체 또는 고차 복합체로서 제시될 경우 항-종양 세포 면역 반응을 자극할 수 있지만, 단독으로 제시될 경우 면역 세포를 자극하는 능력이 제한된 다양한 분자 또는 분자의 단편(예를 들어, 사이토카인의 단편)을 포함한다. 최대 활성을 위해 수용체 가교 결합을 필요로 하는 일부 면역 세포 작용제는 CD40L, CD28, IFN-g, 및 IL-12를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 항종양 세포 면역 반응은, 예를 들어, AD를 포함하는 작제물에 의한 NK 세포 또는 T 세포(예를 들어, CD8+ T 세포)의 자극으로부터 생성될 수 있으며, 이는 과립 의존성 및 과립 독립적 반응을 포함할 수 있다.

[0144] AD는, 예를 들어 TNF, 림프독소 α, 림프독소 αβ, 및 BAFF(CD25)와 같은 TNF 상과 구성원의 aa 서열을 포함할 수 있다. AD는 또한, 예를 들어 CD80 및 CD86과 같은 B7 상과 구성원의 aa 서열을 포함할 수 있다. AD는 또한, 예를 들어, IL-15, IL-12, IL-2, 또는 IL-7의 전부 또는 일부(예를 들어, 세포외 도메인의 전부 또는 일부)의 aa 서열을 포함할 수 있다. AD는, 예를 들어 IL-12의 aa 서열의 전부 또는 일부(예를 들어, 인간 IL-12의 하나 또는 둘 모두의 서브유닛)를 포함할 수 있다.

[0145] 예로서, TME에서 발견되는 ATP 수준의 존재 하에서 동종이량체화하거나(예를 들어, 도 2의 A 및 C 참조) 동종이량체 복합체를 형성하는(예를 들어, 도 4a의 A 참조) 작제물에 사용될 수 있는 일부 AD의 예는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는 면역조절 aa 서열을 포함한다: IL-15, IL-12, 또는 IL-7. 항-PD1, 항-PDL1, 항-CD40, 항-CD40L, 항-CD137/4-1BB, 항-TGFβ, 항-IL-10, 또는 항-IL10R 결합 활성을 갖는 항체 관련 서열(예를 들어, 단쇄 scFV 또는 나노바디 서열) 또한 사용될 수 있다.

[0146] 전술한 것 이외에, CpG 반복부 또는 하나 이상의 IMT504 서열을 갖는 핵산을 포함하는 핵산이 AD로서 사용될 수 있으며, 이는 동종이량체화 또는 이종이량체화 NBD-함유 작제물 내에 혼입될 수 있다.

[0147] AD는, 예를 들어, CD80 폴리펩티드 aa 서열을 포함할 수 있다:

```
  1 VIHVTKEVKE VATLSCGHNV SVEELAQTRI YWQKEKKMVL TMMSGDMNIW PEYKNRTIFD
 61 ITNNLSIVIL ALRPSDEGTY ECVVLKYEKD AFKREHLAEV TLSVKADFPT PSISDFEIPT
121 SNIRRIICST SGGFPEPHLS WLENGEELNA INTTVSQDPE TELYAVSSKL DFNMTTNHSF
181 MCLIKYGHLR VNQTFNWNTT K (서열번호 99).
```

[0148]

[0149] 대안적으로, AD는 서열번호 99와 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. AD는 또한, 서열번호 99의 적어도 170개 또는 180개의 연속 aas와 적어도 96% 또는 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0150] AD는, 예를 들어, CD86(IgV-IgC 도메인)을 포함하는 CD86 폴리펩티드 aa 서열을 포함할 수 있다:

```
  1 LKIQAYFNET ADLPCQFANS QNQSLSELVV FWQDQENLVL NEVYLGKEKF DSVHSKYMNR
 61 TSFDSDSWTL RLHNLQIKDK GLYQCIIHHK KPTGMIRIHQ MNSELSVLAN FSQPEIVPIS
121 NITENVYINL TCSSIHGYPE PKKMSVLLRT KNSTIEYDGI MQKSQDNVTE LYDVSISLSV
181 SFPDVTSNMT IFCILETDKT RLLSSPFSIE LEDPQPPPDH IP, (서열번호 100);
```

[0151]

[0152] 또는 CD86 IgV 도메인:

[0153]
```
  1 LKIQAYFNET ADLPCQFANS QNQSLSELVV FWQDQENLVL NEVYLGKEKF DSVHSKYMGR
 61 TSFDSDSWTL RLHNLQIKDK GLYQCIIHHK KPTGMIRIHQ MNSELSVLA, (서열번호 101).
```

[0154] 대안적으로, AD는 서열번호 100 또는 101과 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. AD는 또한, 서열번호 100 또는 101의 적어도 100개 또는 110개의 연속 aas와 적어도 96% 또는 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0155] AD는, 예를 들어, 작용제로서 IL-12에 결합하는 aa 서열(예를 들어, IL-12 또는 항-CD28 scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함할 수 있다. AD는, 예를 들어, 다음의 서열을 포함하는 단쇄 IL-12를 포함할 수 있다:

[0156]
```
  1 IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF
 61 GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC
121 WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA
181 EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW
241 STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW
301 ASVPCSGGGG SGGGGSGGGG SRNLPVATPD PGMFPCLHHS QNLLRAVSNM LQKARQTLEF
361 YPCTSEEIDH EDITKDKTST VEACLPLELT KNESCLNSRE TSFITNGSCL ASRKTSFMMA
421 LCLSSIYEDL KMYQVEFKTM NAKLLMDPKR QIFLDQNMLA VIDELMQALN FNSETVPQKS
481 SLEEPDFYKT KIKLCILLHA FRIRAVTIDR VMSYLNAS (서열번호 90),
```

[0157] 이는 p40 서브유닛의 단편, GGGGS의 링커 반복부, 및 P35 서브유닛의 단편을 포함함. 대안적으로, AD는 서열번호 90과 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. AD는 또한, 서열번호 90의 적어도 480개 또는 500개의 연속 aas와 적어도 96% 또는 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0158] 전술한 바와 같이, 본 개시의 작제물은 ATP의 존재 하에서 이종이량체화되는 NBD를 포함할 수 있다. 따라서, 이종이량체화 NBD를 포함하는 제1 작제물과 제2 작제물 간의 복합체는 AD의 조립에 사용될 수 있다(예를 들어, 도 2의 B 및 D 참조). 예를 들어, IL-12 AD는 다음을 사용하여 ATP의 존재 하에서 형성될 수 있다:

[0159] (i) 다음의 서열을 포함하는, (제1 면역조절 도메인으로서) p40 서브유닛을 포함하는 제1 작제물:

[0160]
```
  1 IWELKKDVYV VELDWYPDAP GEMVVLTCDT PEEDGITWTL DQSSEVLGSG KTLTIQVKEF
 61 GDAGQYTCHK GGEVLSHSLL LLHKKEDGIW STDILKDQKE PKNKTFLRCE AKNYSGRFTC
121 WWLTTISTDL TFSVKSSRGS SDPQGVTCGA ATLSAERVRG DNKEYEYSVE CQEDSACPAA
181 EESLPIEVMV DAVHKLKYEN YTSSFFIRDI IKPDPPKNLQ LKPLKNSRQV EVSWEYPDTW
241 STPHSYFSLT FCVQVQGKSK REKKDRVFTD KTSATVICRK NASISVRAQD RYYSSSWSEW
301 ASVPCS, (서열번호 91)
```

[0161] 또는 서열번호 91과 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열; 및

[0162] (ii) 다음의 서열을 포함하는, (제2 면역조절 도메인으로서) p35 서브유닛을 포함하는 제2 작제물:

[0163]
```
  1 RNLPVATPDP GMFPCLHHSQ NLLRAVSNML QKARQTLEFY PCTSEEIDHE DITKDKTSTV
061 EACLPLELTK NESCLNSRET SFITNGSCLA SRKTSFMMAL CLSSIYEDLK MYQVEFKTMN
121 AKLLMDPKRQ IFLDQNMLAV IDELMQALNF NSETVPQKSS LEEPDFYKTK IKLCILLHAF
181 RIRAVTIDRV MSYLNAS (서열번호 92),
```

[0164] 또는 서열번호 92와 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열.

[0165] AD는, 예를 들어, PD1에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-PD1 scFv 또는 나노바디 aa 서열), 또는 PDL1에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-PDL1 scFv 또는 나노바디 aa 서열)의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다.

[0166] AD는, 예를 들어, CD40에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-CD40 scFv 또는 나노바디 aa 서열 또는 CD40L aa 서

열), 또는 CD40L에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-CD40L scFv 또는 나노바디 aa 서열, 또는 CD40 aa 서열)을 포함할 수 있다. AD로서 사용될 수 있는 폴리펩티드는 다음의 CD40L aa 서열을 포함할 수 있다:

```
  1 GDQNPQIAAH VISEASSKTT SVLQWAEKGY YTMSNNLVTL ENGKQLTVKR QGLYYIYAQV
 61  TFCSNREASS QAPFIASLCL KSPGRFERIL LRAANTHSSA KPCGQQSIHL GGVFELQPGA
121 SVFVNVTDPS QVSHGTGFTS FGLLKL (서열번호 96),
```

[0167]

[0168] 또는 서열번호 96과 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열. 대안적으로, AD로서 사용될 수 있는 폴리펩티드는 링커 서열(예를 들어, GGGGS 반복부를 포함하는 링커 서열)에 의해 분리된 다음의 CD40L aa 서열의 삼량체를 포함한다:

```
  1 GDQNPQIAAH VISEASSKTT SVLQWAEKGY YTMSNNLVTL ENGKQLTVKR QGLYYIYAQV
 61 TFCSNREASS QAPFIASLCL KSPGRFERIL LRAANTHSSA KPCGQQSIHL GGVFELQPGA
121 SVFVNVTDPS QVSHGTGFTS FGLLKLGGGG SGGGGSGGGG SGDQNPQIAA HVISEASSKT
181 TSVLQWAEKG YYTMSNNLVT LENGKQLTVK RQGLYYIYAQ VTFCSNREAS SQAPFIASLC
241 LKSPGRFERI LLRAANTHSS AKPCGQQSIH LGGVFELQPG ASVFVNVTDP SQVSHGTGFT
301 SFGLLKLGGG GSGGGGSGGG GSGDQNPQIA AHVISEASSK TTSVLQWAEK GYYTMSNNLV
361 TLENGKQLTV KRQGLYYIYA QVTFCSNREA SSQAPFIASL CLKSPGRFER ILLRAANTHS
421 SAKPCGQQSI HLGGVFELQP GASVFVNVTD PSQVSHGTGF TSFGLLKL (서열번호 95),
```

[0169]

[0170] 또는 서열번호 95와 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열.

[0171] AD는, 예를 들어, CD137/4-1BB에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-CD137 scFv 또는 나노바디 aa 서열, 또는 CD137L/4-1BBL aa 서열), 또는 TGFβ에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-TGFβ scFv 또는 나노바디 aa 서열, 또는 TGFBRII aa 서열)을 포함할 수 있다. AD로서 사용될 수 있는 폴리펩티드는 다음의 4-1BBL aa 서열을 포함할 수 있다:

```
  1 ACPWAVSGAR ASPGSAASPR LREGPELSPD DPAGLLDLRQ GMFAQLVAQN VLLIDGPLSW
 61 YSDPGLAGVS LTGGLSYKED TKELVVAKAG VYYVFFQLEL RRVVAGEGSG SVSLALHLQP
121 LRSAAGAAAL ALTVDLPPAS SEARNSAFGF QGRLLHLSAG QRLGVHLHTE ARARHAWQLT
181 QGATVLGLFR VTPEIPAGLP SPRSE (서열번호 94),
```

[0172]

[0173] 또는 서열번호 94와 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열. 대안적으로, AD로서 사용될 수 있는 폴리펩티드는 링커 서열(예를 들어, GGGGS 반복부를 포함하는 링커 서열)에 의해 분리된 다음의 4-1BBL aa 서열의 삼량체를 포함한다:

```
  1 ACPWAVSGAR ASPGSAASPR LREGPELSPD DPAGLLDLRQ GMFAQLVAQN VLLIDGPLSW
 61 YSDPGLAGVS LTGGLSYKED TKELVVAKAG VYYVFFQLEL RRVVAGEGSG SVSLALHLQP
121 LRSAAGAAAL ALTVDLPPAS SEARNSAFGF QGRLLHLSAG QRLGVHLHTE ARARHAWQLT
181 QGATVLGLFR VTPEIPAGLP SPRSEGGGGS GGGGSGGGGS ACPWAVSGAR ASPGSAASPR
241 LREGPELSPD DPAGLLDLRQ GMFAQLVAQN VLLIDGPLSW YSDPGLAGVS LTGGLSYKED
301 TKELVVAKAG VYYVFFQLEL RRVVAGEGSG SVSLALHLQP LRSAAGAAAL ALTVDLPPAS
361 SEARNSAFGF QGRLLHLSAG QRLGVHLHTE ARARHAWQLT QGATVLGLFR VTPEIPAGLP
421 SPRSEGGGGS GGGGSGGGGS ACPWAVSGAR ASPGSAASPR LREGPELSPD DPAGLLDLRQ
481 GMFAQLVAQN VLLIDGPLSW YSDPGLAGVS LTGGLSYKED TKELVVAKAG VYYVFFQLEL
541 RRVVAGEGSG SVSLALHLQP LRSAAGAAAL ALTVDLPPAS SEARNSAFGF QGRLLHLSAG
601 QRLGVHLHTE ARARHAWQLT QGATVLGLFR VTPEIPAGL PSPRSE (서열번호 93),
```

[0174]

[0175] 또는 서열번호 93과 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열.

[0176] AD는, 예를 들어, IL-10에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-IL-10 scFv 또는 나노바디 aa 서열), 또는 IL-10R에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-IL-10R scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함할 수 있다.

[0177] AD는 예를 들어, CD3에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-CD3 scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함할 수 있다.

[0178] AD는 예를 들어, CTLA-4에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-CTLA-4 scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함할 수 있다.

[0179] AD는 예를 들어, CD28에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-CD28 scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함할 수 있다. AD로서 사용될 수 있는 항-CD28 scFv는 다음의 서열을 포함할 수 있다:

```
  1 DIELTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVE YYVTSLMQWY QQKPGQPPKL LIFAASNVES
 61 GVPARFSGSG SGTNFSLNIH PVDEDDVAMY FCQQSRKVPY TFGGGTKLEI KRGGGGSGGG
121 GSGGGGSQVK LQQSGPGLVT PSQSLSITCT VSGFSLSDYG VHWVRQSPGQ GLEWLGVIWA
181 GGGTNYNSAL MSRKSISKDN SKSQVFLKMN SLQADDTAVY YCARDKGYSY YYSMDYWGQG
241 TTVTVSS (서열번호 89).
```

[0180]

[0181] 대안적으로, AD는 서열번호 89와 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. AD는 또한, 서열번호 89의 적어도 220개 또는 230개의 연속 aas와 적어도 96% 또는 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0182] AD는, 예를 들어, 인터페론-γ(IFN-γ) 폴리펩티드 서열, 또는 IFN-γ 수용체에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-IFN-γ 수용체 scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함할 수 있다. IFN-γ AD로서 사용될 수 있는 scIFN-γ 폴리펩티드는 다음의 서열을 포함할 수 있다:

```
  1 MQDPYVKEAE NLKKYFNAGH SDVADNGTLF LGILKNWKEE SDRKIMQSQI VSFYFKLFKN
 61 FKDDQSIQKS VETIKEDMNV KFFNSNKKKR DDFEKLTNYS VTDLNVQRKA IDELIQVMAE
121 FSTEEQQEGP YVKEAENLKK YFNAGHSDVA DNGTLFLGIL KNWKEESDRK IMQSQIVSFY
181 FKLFKNFKDD QSIQKSVETI KEDMNVKFFN SNKKKRDDFE KLTNYSVTDL NVQRKAIHEL
241 IQVMAELSPA AKTGKRKRSQ MLFRG (서열번호 97).
```

[0183]

[0184] 대안적으로, AD는 서열번호 97과 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. AD는 또한, 서열번호 97의 적어도 220개 또는 230개의 연속 aas와 적어도 96% 또는 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0185] AD는 예를 들어, CD16에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-CD16 scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함할 수 있다. AD로서 사용될 수 있는 항-CD16 VHH 폴리펩티드는 다음 중 하나를 포함할 수 있다:

```
  1 EVQLVESGGG LVQPGESLTL SCVVAGSIFS FAMSWYRQAP GKERELVARI GSDDRVTYAD
 61 SVKGRFTISR DNIKRTAGLQ MNSLKPEDTA VYYCNAQTDL RDWTVREYWG QGTQVTVSS
(서열번호 98); 또는
  1 EVQLVESGGE LVQPGGSLRL SCAASGLTFS SYNMGWFRRA PGKEREFVAS ITWSGRDTFY
 61 ADSVKGRFTI SRDNAKNTVY LQMSSLKPED TAVYYCAANP WPVAAPRSGT YWGQGTQVTV
121 SS (서열번호 103).
```

[0186]

[0187] 대안적으로, AD는 서열번호 98 또는 103과 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. AD는 또한, 서열번호 98 또는 103의 적어도 100개 또는 110개의 연속 aas와 적어도 96% 또는 적어도 98%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.

[0188] AD는 aa 서열로 구성될 필요는 없으며, 예를 들어 핵산 서열로 구성될 수 있다. 핵산 AD의 비제한적인 예는, 선택적으로 1, 2 또는 3개의 뉴클레오티드 치환, 결실, 또는 삽입을 갖는, CpG 반복부(예를 들어, CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 서열) 또는 IMT504(TCATCATTTTGTCATTTTGTCATT(서열번호 69, 예를 들어, Insula 등의 문헌(2007) [Stem Cells, 25:1047-1054] 참조)를 포함하는 핵산 서열을 포함한다.

[0189] **6. 종양 특이적 결합 도메인**

[0190] 본원에 기술된 작제물의 종양 특이적 결합 도메인(종양 특이적 결합제, 또는 "TSB"로도 지칭됨)은 종양 세포 표면 상에서 발현된 표적 분자에 결합함으로써 작제물을 종양 세포에 유도하는 표적화 서열로서 기능하는 폴리펩티드 aa 서열이다. 표적 분자는, 세포 표면 발현이 하나 이상의 암 세포 유형으로 제한되거나 실질적으로 제한

되는 종양 연관 항원("TAA")(본원에서 암 연관 항원 또는 "CAA"로도 지칭됨)일 수 있다. 발현이 종양 세포로 제한되거나 실질적으로 제한되는 분자 이외에, 종양 세포의 표면 상에 존재하는 다른 분자가 표적화될 수 있으며, 이는 종양 세포에서 상향 조절될 수 있는, 정상(형질전환되지 않은) 세포에서 발현된 세포 단백질을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 정상 및 다수의 종양 세포(예를 들어, 형질전환된 종양 세포) 상에서 발현되는 관문 단백질(예를 들어, T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제제 또는 "VISTA", T 세포 면역글로불린 및 뮤신 도메인 3 또는 "Tim-3", 및 프로그래밍된 사멸 리간드 1 또는 "PD-L1") 또한 TSB에 대한 표적 분자로서 작용할 수 있다. 면역 회피 또는 탈출의 수단으로서 종양 세포에 의해 종종 상향 조절되는 관문 단백질의 표적화는 종양 세포의 표면 상에서 풍부하게 발현될 수 있는 표적을 제공하는 동시에 TSB에 의한 관문 억제를 제공한다. 형질전환된 종양 세포 상에서의 발현에 실질적으로 제한되지 않는 단백질은 종양 세포 상에서 발현될 경우 TSB의 표적으로 간주된다. 이들은 TSB의 표적으로 간주되며, 이는 TSB에 의해 유도된 임의의 면역 반응은 ATP 수준이 충분히 높아 TSB의 AD 또는 면역 세포 결합체에 대한 결합 또는 복합화를 허용하고 이러한 요소에 커플링된 NBD를 통해 TSB에 의해 지시된 모든 면역 반응이 TME로 제한되기 때문이다(예를 들어, 도 3, 도 4a 및 4b 참조). TSB는, 예를 들어, 폴리펩티드 및 다른 분자, 예컨대 항체의 항원 결합 단편, Fab, Fab', 및 단쇄 항체를 포함하는 폴리펩티드, scFv, 펩티드 앱타머, 또는 나노바디 aa 서열을 포함한다.

[0191] TSB에 의해 표적화될 수 있는 고형 종양과 연관된 일부 TAA는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: 탄산 무수효소 IX(CAIX), 카드헤린, 암배아 항원(CEA), 세포- 중간엽 상피 전이 인자(c-MET), 세포독성 T-림프구 연관 단백질 4(CTLA-4), 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 계열 구성원, 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 에프린 A형 수용체 3(EphA3), 섬유아세포 활성화 단백질 알파(FAP), 엽산-결합 단백질, 엽산 수용체 알파(FR-알파), Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 2(HER2), Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 3(HER3), 인슐린 유사 성장 인자 1 수용체(IGF-1R), 인테그린 αVβ3, 인테그린 α5β1, 용질 담체 계열 39 구성원 6(Liv1), 흑색종-연관 항원 계열 A 구성원(MAGEA), 흑색종-연관 항원 계열 C 구성원(MAGEC), 메소텔린, 뮤신(예를 들어, MUC1), 뉴욕 식도 편평 세포 암종 1 단백질(NY-ESO-1, 암/고환 항원 1A, 암/고환 항원 1B), 암/고환 항원 2(NY-ESO-2, CTAG2), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 핵 인자 카파 B 리간드의 수용체 활성화제(RANKL), 수용체 티로신 키나아제 유사 고아 수용체 1(ROR1), 테나신, TNF 수용체 상과 구성원 10a(TRAILR1), TNF 수용체 상과 구성원 10b(TRAILR2), 및 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR).

[0192] TSB에 의해 표적화될 수 있는 고형 종양과 연관된 일부 TAA는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: 암/고환 항원 1A, 암/고환 항원 1B, 또는 암/고환 항원 2(NY-ESO-2, CTAG2),

[0193] TSB에 의해 표적화될 수 있는 고형 종양과 연관된 일부 TAA는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: MAGEA-1, MAGEA-4, 또는 MAGEA-9.

[0194] TSB에 의해 표적화될 수 있는 고형 종양과 연관된 일부 TAA는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: MAGEC-1, MAGEC-2, 또는 MAGEC-3.

[0195] TSB의 표적으로서 기능할 수 있는 일부 관문 단백질은 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: VISTA, TIM-3, PD-L1, CTLA-4, 및 LAG-3.

[0196] TSB 폴리펩티드는 쥣과 유래 SS1 항체와 관련된 항-인간 메소텔린 scFv 폴리펩티드일 수 있으며, 또한 다음의 서열을 갖는 아마툭시맙에 사용된다: QVQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLITPYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSEDSAVYFCARGGYD GRGFDYWGSGTPVTVSS*GXGGSGGGGSGGGGS*DIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSY SLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTFGSGTKVEIK, 여기에서 X는 V 또는 G임(서열번호 70). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0197] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, 단클론 항체 YP218과 관련된 항-인간 메소텔린 scFv(vH-vL) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0198] QEQLVESGGGLVQPGASLTLTCTASGIDFSRYYMCWVRQAPGKGLEGIACIYIGGSGSTYYASWAKGRFTISKASSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGTNL NYIFRLWGPGTLVTVSS*GXGGSGGGGSGGGGS*DVVMTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASQRISSYLSWYQQKPGQRPKLLIFGASTLASGVPSRFKGSGSGTE YTLTISDLECADAATYYCQSYAYFDSNNWHAFGGGTEVVV, 여기에서 X는 V 또는 G임(서열번호 71). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0199] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, 단클론 항체 YP218과 관련된 항-인간 메소텔린 scFv(vL-vH) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0200] DVVMTQTPASVSEPVGGTVTIKCQASQRISSYLSWYQQKPGQRPKLLIFGASTLASGVPSRFKGSGSGTEYTLTISDLECADAATYYCQSYAYFDSNNWHAFGGGTEVVV***GXGGSGGGGSGGGGS***QEQLVESGGGLVQPGASLTLTCTASGIDFSRYYMCWVRQAPGKGLEGIACIYIGGSGSTYYASWAKGRFTISKASSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGTNLNYIFRLWGPGTLVTVSS, 여기에서 X는 V 또는 G임(서열번호 72). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0201] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, 단클론 항체 15B6과 관련된 항-인간 메소텔린 scFv(vH-vL) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0202] EVQLQQSGPVLVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVRQSNGKSLEWIGRINPYTGVPSYKHNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARELGGYWGQGTTLTVSS***GXGGSGGGGSGGGGS***QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTGNYPNWVQEKPDHLFTGLIAGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWFSSHWVFGGGTKLTVLG. 여기에서 X는 V 또는 G임(서열번호 73). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0203] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, 단클론 항체 15B6과 관련된 항-인간 메소텔린 scFv(vL-vH) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0204] PDHLFTGLIAGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWFSSHWVFGGGTKLTVL***GGXGGSGGGGSGGGGS***EVQLQQSGPVLVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVRQSNGKSLEWIGRINPYTGVPSYKHNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARELGGYWGQGTTLTVSS, 여기에서 X는 V 또는 G임(서열번호 74). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0205] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, vL과 vH 위치, G102C와 K43C(도시된 바와 같은 K168C) 사이에 이황화 결합을 갖는 단클론 항체 15B6과 관련된 항-인간 메소텔린 scFv(vL-vH) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0206] QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTGNYPNWVQEKPDHLFTGLIAGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWFSSHWVFGCGTKLTVLG***GGGGSGGGGSGGGGS***EVQLQQSGPVLVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVRQSNGCSLEWIGRINPYTGVPSYKHNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARELGGYWGQGTTLTVSS (서열번호 75). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0207] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, vL과 vH 위치, G102C와 S44C(도시된 바와 같은 S169C) 사이에 이황화 결합을 갖는 단클론 항체 15B6과 관련된 항-인간 메소텔린 scFv(vL-vH) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0208] QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTGNYPNWVQEKPDHLFTGLIAGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWFSSHWVFGCGTKLTVLG***GGGGSGGGGSGGGGS***EVQLQQSGPVLVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVRQSNGKCLEWIGRINPYTGVPSYKHNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARELGGYWGQGTTLTVSS (서열번호 76). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0209] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, vL과 vH 위치, G103C와 K43C(도시된 바와 같은 K168C) 사이에 이황화 결합을 갖는 단클론 항체 15B6과 관련된 항-인간 메소텔린 scFv(vL-vH) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0210] QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTGNYPNWVQEKPDHLFTGLIAGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWFSSHWVFGGCTKLTVLG***GGGGSGGGGSGGGGS***EVQLQQSGPVLVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVRQSNGCSLEWIGRINPYTGVPSYKHNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARELGGYWGQGTTLTVSS (서열번호 77). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0211] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, vL과 vH 위치, G103C와 S44C(도시된 바와 같은 S169C) 사이에 이황화 결합을 갖는 단클론 항체 15B6과 관련된 항-인간 메소텔린 scFv(vL-vH) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0212] QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTGNYPNWVQEKPDHLFTGLIAGTNNRAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWFSSHWVFGG

CTKLTVLG***GGGGSGGGGSGGGGS***EVQLQQSGPVLVKPGASVKISCKASGYSFTGYYMHWVRQSNGKCLEWIGRINPYTGVPSYKHNFKDKASLTVDKSSSTAYMELHSLTSEDSAVYYCARELGGYWGQGTTLTVSS (서열번호 78). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0213] TSB 결합제 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, 단클론 항체 SD1과 관련된 항-인간 메소텔린(VHH) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0214] QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASDFDFAAYEMSWVRQAPGQGLEWVAIISHDGIDKYYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNTLRAEDTATYYCLRLGAVGQGTLVTVSSS (서열번호 79). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0215] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, 단클론 항체 MT201 및 아데카투무맙과 관련된 항-인간 EpCAM scFv(vH-vL) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0216] EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDMGWGSGWRPYYYYGMDVWGQGTTVTVSS***GXGGSGGGGSGGGGS***ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDSATYYCQQSYDIPYTFGQGTKLEIKRTV, 여기에서 X는 V 또는 G임(서열번호 80). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0217] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, 단클론 항체 MT201 및 아데카투무맙과 관련된 항-인간 EpCAM scFv(vL-vH) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0218] ELQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRTSQSISSYLNWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDSATYYCQQSYDIPYTFGQGTKLEIKRTV***GXGGSGGGGSGGGGS***EVQLLESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDMGWGSGWRPYYYYGMDVWGQGTTVTVSS, 여기에서 X는 V 또는 G임(서열번호 81). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0219] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, 이필리무맙과 관련된 항-인간 CTLA-4 scFv(vL-vH) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0220] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKR***GGGGSGGGGSGGGGS***QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSS (서열번호 82). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0221] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, vL과 vH 위치, Q101C와 K43C(도시된 바와 같은 K167C) 사이에 이황화 결합을 갖는 이필리무맙과 관련된 항-인간 CTLA-4 scFv(vL-vH) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0222] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGCGTKVEIKR***GGGGSGGGGSGGGGS***QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGCGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSS (서열번호 83). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0223] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, vL과 vH 위치, Q101C와 G44C(도시된 바와 같은 G167C) 사이에 이황화 결합을 갖는 이필리무맙과 관련된 항-인간 CTLA-4 scFv(vL-vH) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0224] IVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIEPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGCGTKVEIKR***GGGGSGGGGSGGGGS***QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKCLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSS (서열번호 84). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0225] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, vL과 vH 위치, G102C와 K43C(도시된 바와 같은 K167C) 사이에 이황화 결합을 갖는 이필리무맙과 관련된 항-인간 CTLA-4 scFv(vL-vH) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0226] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQC TKVEIKR***GGGGSGGGGSGGGGS***QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGCGLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSS (서열번호 85). 종양 특이적 결합제 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, 종양 특이적 결합제 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0227] TSB 폴리펩티드는 다음의 서열을 갖는, vL과 vH 위치, G102C와 G44C(도시된 바와 같은 G168C) 사이에 이황화 결합을 갖는 이필리무맙과 관련된 항-인간 CTLA-4 scFv(vL-vH) 폴리펩티드를 포함할 수 있다:

[0228] EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVGSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQC TKVEIKR***GGGGSGGGGSGGGGS***QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYTMHWVRQAPGKCLEWVTFISYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAIYYCARTGWLGPFDYWGQGTLVTVSS (서열번호 86). TSB 폴리펩티드는 또한 해당 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다. 대안적으로, TSB 폴리펩티드는 해당 서열과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함할 수 있다.

[0229] 서열번호 70~86에서의 링커 서열은 굵은 글씨체 및 이탤릭체로 표시되어 있다.

[0230] **E. 제조 방법**

[0231] 본 개시는 포유류 세포(CHO 세포), 효모 세포(예를 들어, 피카 파스토리스(pica pastoris)), 소도프테라(sodoptera) 세포, 또는 박테리아 세포(예를 들어, 대장균 세포)에서 작제물을 암호화하는 핵산의 전사 및 번역에 의한 본원에 개시된 작제물의 제조를 포함하며 이를 제공한다. 작제물의 일부는 또한, 예컨대 위에서 논의된 바와 같은 세포 발현, 화학적 합성 등에 의해 별도로 제조될 수 있으며, 이에 이어서 하나 이상의 화학적 또는 효소적 공정을 사용하여 함께 접합될 수 있다. 실제로, 효소 수단, 자가 촉매 단백질 스플라이싱, 또는 화학적 가교 결합(예를 들어, 이종이작용성 가교 결합기를 사용함)은, 예를 들어, AD를 NBD에, TSB를 NBD에, 그리고/또는 NBD를 면역 세포 결합체에 커플링(예를 들어, 공유 부착)하는 데 사용될 수 있다. 커플링될 성분이 모두 aa 서열로 구성되는 경우, 효소 수단 및 자가 촉매 단백질 스플라이싱은 해당 커플링 반응의 화학량론 및 구조 둘 모두를 허용하며, 잠재적 이차 커플링 반응을 실질적으로 회피하는 커플링 옵션을 나타낸다. 예를 들어, 분류효소 및 분할 인테인은 NBD를 포함하는 서열을 AD, TSB 결합제, 또는 면역 세포 결합체에 첨부하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, Bhagawati 등의 문헌[*Proc Natl Acad Sci U S A*, 116(44):22164-22172 (2019)]을 참조한다. 대안적으로, 화농연쇄구균(Streptococcus pyogenes) 유래의 FbaB 단백질의 CnaB2 도메인을 사용할 수 있는 효소 촉매화 SpyTag/SpyCatcher 시스템이 AD를 NBD를 포함하는 폴리펩티드에 접합하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, Reddington 및 Howarth의 문헌[*Curr. Opin in Chem. Biol.*, 29: 94-99 (2015)]을 참조한다.

[0232] 본원에 기술된 작제물의 성분을 커플링시키기 위한 순수 효소 및 화학적 접합 방법 이외에, 단백질-단백질 상호작용의 특이성을 화학적 접합과 조합하는 친화도 유도 방법이 사용될 수도 있다. 친화도 유도 화학적 접합은 효율적이고 용이하며 특이적인 화학적 접합 반응을 제공한다. 이러한 방법 중 하나인, PEptide-DIrected Photo-cross-linking(PEDIP)은 Park 등의 문헌(2018) [Bioconjug Chem., 29:3240-3244]에 기술되어 있으며, 해당 방법은 폴리펩티드를 항체 중쇄 불변 영역에 커플링시키는 것으로 입증되었다. 또한, Kishomoto 등의 문헌(2019) [Bioconjug Chem., 30(3):697-702]을 참조한다.

[0233] AD가 생물학적 시스템에서 번역될 수 있는 aa 서열이 아닌 경우(예를 들어, AD가 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드와 같은 핵산인 경우), 이는 예를 들어, 이작용성 가교제(예를 들어, 동종이작용성 또는 이종이작용성 가교제)를 사용하여 분자의 다른 부분에 커플링될 수 있다.

[0234] 작제물은 당업계에 공지된 다양한 방법을 사용하여 정제될 수 있다. 예를 들어, 작제물이 스캐폴드로서 IgFc 영역을 포함하는 경우, 이는 단백질 A 또는 단백질 G 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 작제물은, 뉴클레오티드 친화도 크로마토그래피, 또는 Cibacron Blue F3GA, Procion Blue HB, 또는 Reactive blue 2를 친화도 리간드로서 사용하는 염료-리간드 친화도 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 생성물의 정제를 위해, 크기 배제 크로마토그래피가 단독으로 또는 친화도 크로마토그래피와 조합되어 사용될 수 있다.

[0235] **F. 제형 및 치료 방법**

[0236] 본원에 개시된 NBD-함유 작제물 및 복합체(예를 들어, 도 2~4 참조)는 약학적으로 허용 가능한 성분을 포함하는

조성물로 제형화될 수 있다.

[0237] 조성물은 비경구 및/또는 다른 형태의 투여용으로 제조될 수 있다. 작제물 또는 작제물을 포함하는 조성물은 정맥내, 근육내, 피하, 종양내, 또는 림프구내와 같은 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있다. 작제물은 또한 작제물과 상승적으로 또는 비-상승적으로 작용하는 하나 이상의 다른 제제와 함께 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 개시의 작제물(예를 들어, IL-12 활성화 도메인을 포함하는 작제물)은 면역 관문 억제제, 예컨대 펨브롤리주맙(Keytruda®, PD-1 표적화), 아벨루맙(Bavencio®, PD-L1 표적화), 또는 이필리무맙(Yervoy®, CTLA-4 표적화)과 함께 투여될 수 있다.

[0238] 정상 조직 대비 상승된 수준의 ATP를 함유하는 임의의 고형 종양은 본 개시의 작제물을 사용하여 치료될 수 있다. 치료 가능한 종양은 중피종, 흑색종, 육종, 암종, 암육종, 림프종, 및 생식 세포 종양을 포함한다. 대표적인 암종은 대장 암종, 유방 암종, 신경내분비 종양, 폐 암종, 및 위 암종을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, 종양은 폐, 간, 피부, 위장관, 췌장, 뇌, 또는 생식 조직(예를 들어, 난소 육종) 종양일 수 있다.

[0239] **VI. 양태**

[0240] 1. 폴리펩티드 작제물로서, 뉴클레오티드 결합 도메인(NBD) 아미노산(aa) 서열, 및 선택적으로 링커 펩티드 서열에 의해 연결된 활성화 도메인(AD) aa 서열을 포함하며: 여기에서 상기 NBD는 하나 이상의 아데노신 삼인산(ATP) 결합 부위를 포함하고, ATP의 존재 하에 동족 비-동일 NBD(예를 들어, 이종이량체화될 수 있는 TAP1 또는 TAP2의 NBD)와 동종이량체화되거나 이종이량체화될 수 있는, 폴리펩티드 작제물.

[0241] 2. 양태 1에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, (i) NBD, 선택적인 링커, 및 AD aa 서열, 또는 (ii) AD, 선택적인 링커, 및 NBD aa 서열로서 구성되는, 폴리펩티드 작제물.

[0242] 3. 양태 1 또는 2에 있어서, 독립적으로 선택된 링커 aa 서열에 의해 선택적으로 연결된, NBD aa 서열, 스캐폴드 aa 서열, 및 AD 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0243] 4. 양태 3에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, NBD, 스캐폴드, 및 AD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0244] 5. 양태 3에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, NBD, AD, 및 스캐폴드 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0245] 6. 양태 3에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, AD, 스캐폴드, 및 NBD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0246] 7. 양태 3에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, AD, NBD, 및 스캐폴드 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0247] 8. 양태 3에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, 스캐폴드, AD, 및 NBD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0248] 9. 양태 3에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, 스캐폴드, NBD 및 AD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0249] 10. 양태 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 독립적으로 선택된 2개 이상의(예를 들어, 3개 이상의) AD aa 서열을 포함하되, 상기 AD aa 서열은 선택적으로 직렬로 배치되는, 폴리펩티드 작제물.

[0250] 11. 양태 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 독립적으로 선택된 2개 이상의(예를 들어, 3개 이상의) NBD aa 서열을 포함하고, 선택적으로 직렬로 배치되는(ATP의 존재 하에서 동일한 분자 내의 2개의 NBD가 상호작용하여 복합체를 형성할 수 없도록 제한되는), 폴리펩티드 작제물.

[0251] 12. 양태 11에 있어서, ATP의 존재 하에서 2개 이상의 NBD aa 서열 사이의 상호작용을 실질적으로 방지하는 강성 링커를 추가로 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0252] 13. 양태 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 각각의 NBD aa 서열은 ATP의 존재 하에서 동종이량체화될 수 있는(예를 들어, 동일한 동종이량체화 aa 서열을 포함하는), 폴리펩티드 작제물.

[0253] 14. 양태 13에 있어서, 작제물은 NBD(예를 들어, 단일 NBD) aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물. 예를 들어, 도 2의 A, C, 및 E 참조.

[0254] 15. 양태 11 또는 12에 있어서, ATP의 존재 하에서 작제물의 이량체 또는 고차 복합체를 형성하기 위해 동종이량체화될 수 있는 2개 이상의 NBD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물. 예를 들어, 도 4a의 A 참조.

[0255] 16. 양태 13 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 각각의 NBD aa 서열은 동일하거나 실질적으로 동일한 동종이량체화 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0256] 17. 양태 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 각각의 NBD aa 서열은 ATP의 존재 하에서 동족 NBD와 이종이량체화될 수 있는, 폴리펩티드 작제물.

[0257] 18. 양태 17에 있어서, 작제물은 NBD(예를 들어, 단일 NBD) aa 서열(예를 들어, 도 2의 B 및 D의 각각의 구조 참조), 또는 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) NBD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0258] 19. 조성물로서, 양태 13 내지 18 중 어느 하나의 제1 폴리펩티드 작제물 및 제2 폴리펩티드 작제물을 포함하며, 여기에서 상기 제1 폴리펩티드 작제물은 제1 NBD aa 서열을 포함하고, 상기 제2 폴리펩티드 작제물은 제2 NBD aa 서열을 포함하고, 상기 제1 및 제2 NBD aa 서열은 ATP의 존재 하에서 동종이량체화되거나 이종이량체화되어 동종이량체 또는 이종이량체 복합체를 형성할 수 있는 동족 서열인, 조성물. 예를 들어, 도 2의 B 및 D 참조.

[0259] 20. 조성물로서, 양태 19의 제1 폴리펩티드 작제물 및 제2 폴리펩티드 작제물을 포함하며, 여기에서 상기 제1 폴리펩티드 작제물은 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) 제1 NBD aa 서열을 포함하고, 상기 제2 폴리펩티드 작제물은 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) 제2 NBD aa 서열을 포함하고, 상기 제1 및 제2 NBD aa 서열은 ATP의 존재 하에서 동종이량체화되거나 이종이량체화되어 동종이량체, 이종이량체, 또는 고차 복합체를 형성할 수 있는 동족 서열인, 조성물. 예를 들어, 각각의 작제물이 NBD(예를 들어, 단일 NBD) aa 서열을 포함하는 도 2의 B 및 D, 및 제1 및 제2 작제물 중 적어도 하나는(예를 들어, 둘 모두) 2개 이상의 NBD aa 서열을 포함하는 도 4a의 B 참조.

[0260] 21. 폴리펩티드 작제물로서, 뉴클레오티드 결합 도메인(NBD) 아미노산(aa) 서열, 및 선택적으로 링커 펩티드 서열에 의해 연결된 종양 특이적 결합제(TSB) aa 서열을 포함하며, 여기에서: 상기 NBD는 하나 이상의 아데노신 삼인산(ATP) 결합 부위를 포함하고, ATP의 존재 하에 동족 비-동일 NBD(예를 들어, 이종이량체화될 수 있는 TAP1 또는 TAP2의 NBD)와 동종이량체화 또는 이종이량체화될 수 있고; 상기 폴리펩티드 작제물은 선택적으로 하나 이상의 AD를 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0261] 22. 양태 21에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, (i) NBD, 선택적인 링커, 및 TSB aa 서열, 또는 (ii) TSB, 선택적인 링커, 및 NBD aa 서열로서 구성되는, 폴리펩티드 작제물.

[0262] 23. 양태 21 또는 22에 있어서, 독립적으로 선택된 링커 aa 서열에 의해 선택적으로 연결된, NBD aa 서열, 스캐폴드 aa 서열, 및 TSB 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0263] 24. 양태 23에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, NBD, 스캐폴드, 및 TSB aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0264] 25. 양태 23에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, NBD, TSB, 및 스캐폴드 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0265] 26. 양태 23에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, TSB, 스캐폴드, 및 NBD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0266] 27. 양태 23에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, TSB, NBD, 및 스캐폴드 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0267] 28. 양태 23에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, 스캐폴드, TSB, 및 NBD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0268] 29. 양태 23에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, 스캐폴드, NBD 및 TSB aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0269] 30. 양태 21 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 독립적으로 선택된 2개 이상의(예를 들어, 3개 이상의) TSB aa 서열을 포함하되, 상기 TSB aa 서열은 선택적으로 직렬로 배치되는, 폴리펩티드 작제물.

[0270] 31. 양태 21 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 독립적으로 선택된 2개 이상의(예를 들어, 3개 이상의) NBD aa 서

열을 포함하고, 선택적으로 직렬로 배치되는(ATP의 존재 하에서 동일한 분자 내의 2개의 NBD가 상호작용하여 복합체를 형성할 수 없도록 제한되는), 폴리펩티드 작제물.

[0271] 32. 양태 31에 있어서, ATP의 존재 하에서 2개 이상의 NBD aa 서열 사이의 상호작용을 실질적으로 방지하는 강성 링커를 추가로 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0272] 33. 양태 21 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 각각의 NBD aa 서열은 ATP의 존재 하에서 동종이량체화될 수 있는(예를 들어, 동일한 동종이량체화 aa 서열을 포함하는), 폴리펩티드 작제물.

[0273] 34. 양태 33에 있어서, 작제물은 NBD(예를 들어, 단일 NBD) aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물. 예를 들어, 도 4b의 A~D 참조.

[0274] 35. 양태 31 또는 32에 있어서, ATP의 존재 하에서 작제물의 이량체 또는 고차 복합체를 형성하기 위해 동종이량체화될 수 있는 2개 이상의 NBD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물. 예를 들어, 도 4a의 C 참조.

[0275] 36. 양태 35에 있어서, 각각의 NBD aa 서열은 동일하거나 실질적으로 동일한 동종이량체화 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0276] 37. 양태 21 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 각각의 NBD aa 서열은 ATP의 존재 하에서 동족 NBD와 이종이량체화될 수 있는, 폴리펩티드 작제물.

[0277] 38. 양태 37에 있어서, 작제물은 NBD(예를 들어, 단일 NBD) aa 서열, 또는 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) NBD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0278] 39. 조성물로서, 양태 33 내지 38 중 어느 하나의 제1 폴리펩티드 작제물 및 제2 폴리펩티드 작제물을 포함하며, 여기에서 상기 제1 폴리펩티드 작제물은 제1 NBD aa 서열을 포함하고, 상기 제2 폴리펩티드 작제물은 제2 NBD aa 서열을 포함하고, 상기 제1 및 상기 제2 NBD aa 서열은 ATP의 존재 하에서 동종이량체화되거나 이종이량체화되어 동종이량체 또는 이종이량체 복합체를 형성할 수 있는 동족 서열인, 조성물.

[0279] 40. 조성물로서, 양태 39의 제1 폴리펩티드 작제물 및 제2 폴리펩티드 작제물을 포함하며, 여기에서 상기 제1 폴리펩티드 작제물은 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) 제1 NBD aa 서열을 포함하고, 상기 제2 폴리펩티드 작제물은 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) 제2 NBD aa 서열을 포함하고, 상기 제1 및 제2 NBD aa 서열은 ATP의 존재 하에서 동종이량체화되거나 이종이량체화되어 동종이량체 또는 이종이량체, 또는 고차 복합체를 형성할 수 있는 동족 서열인, 조성물.

[0280] 41. 양태 39 또는 양태 40에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물의 TSB 및 제2 폴리펩티드 작제물의 TSB는 단일 종양 연관 항원(TAA) 또는 상이한(비-동일한) TAA를 인식하는, 조성물.

[0281] 42. 폴리펩티드 작제물로서, 뉴클레오티드 결합 도메인(NBD) 아미노산(aa) 서열, 및 선택적으로 링커 펩티드 서열에 의해 연결된 면역 세포 결합체(ICE) aa 서열을 포함하며, 여기에서: 상기 NBD는 하나 이상의 아데노신 삼인산(ATP) 결합 부위를 포함하고, ATP의 존재 하에 동족 비-동일 NBD(예를 들어, 이종이량체화될 수 있는 TAP1 또는 TAP2의 NBD)와 동종이량체화 또는 이종이량체화될 수 있고; 상기 폴리펩티드 작제물은 선택적으로 하나 이상의 AD를 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0282] 43. 양태 42에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, (i) NBD, 선택적인 링커, 및 ICE aa 서열, 또는 (ii) ICE, 선택적인 링커, 및 NBD aa 서열로서 구성되는, 폴리펩티드 작제물.

[0283] 44. 양태 42 또는 43에 있어서, 독립적으로 선택된 링커 aa 서열에 의해 선택적으로 연결된, NBD aa 서열, 스캐폴드 aa 서열, 및 ICE 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0284] 45. 양태 43에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, NBD, 스캐폴드, 및 ICE aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0285] 46. 양태 43에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, NBD, ICE, 및 스캐폴드 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0286] 47. 양태 43에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, ICE, 스캐폴드, 및 NBD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0287] 48. 양태 43에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, ICE, NBD, 및 스캐폴드 aa 서열을 포함하는, 폴

리펩티드 작제물.

[0288] 49. 양태 43에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, 스캐폴드, ICE, 및 NBD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0289] 50. 양태 43에 있어서, 작제물은, N-말단에서 C-말단 방향으로, 스캐폴드, NBD 및 ICE aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0290] 51. 양태 42 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 독립적으로 선택된 2개 이상의(예를 들어, 3개 이상의) ICE aa 서열을 포함하되, 상기 ICE aa 서열은 선택적으로 직렬로 배치되는, 폴리펩티드 작제물.

[0291] 52. 양태 42 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 독립적으로 선택된 2개 이상의(예를 들어, 3개 이상의) NBD aa 서열을 포함하고, 선택적으로 직렬로 배치되는(ATP의 존재 하에서 동일한 분자 내의 2개의 NBD가 상호작용하여 복합체를 형성할 수 없도록 제한되는), 폴리펩티드 작제물.

[0292] 53. 양태 52에 있어서, ATP의 존재 하에서 2개 이상의 NBD aa 서열 사이의 상호작용을 실질적으로 방지하는 강성 링커를 추가로 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0293] 54. 양태 42 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 각각의 NBD aa 서열은 ATP의 존재 하에서 동종이량체화될 수 있는(예를 들어, 동일한 동종이량체화 aa 서열을 포함하는), 폴리펩티드 작제물.

[0294] 55. 양태 54에 있어서, 작제물은 NBD(예를 들어, 단일 NBD) aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물. 예를 들어, 도 4a의 D 참조.

[0295] 56. 양태 53 또는 54에 있어서, ATP의 존재 하에서 작제물의 이량체 또는 고차 복합체를 형성하기 위해 동종이량체화될 수 있는 2개 이상의 NBD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0296] 57. 양태 42 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 각각의 NBD aa 서열은 ATP의 존재 하에서 동족 NBD와 이종이량체화될 수 있는, 폴리펩티드 작제물.

[0297] 58. 양태 57에 있어서, 작제물은 NBD(예를 들어, 단일 NBD) aa 서열, 또는 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) NBD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0298] 59. 조성물로서, 양태 58의 제1 폴리펩티드 작제물 및 제2 폴리펩티드 작제물을 포함하며, 여기에서 상기 작제물은 제1 NBD aa 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드 작제물은 제2 NBD aa 서열을 포함하고, 상기 제1 및 상기 제2 NBD aa 서열은 ATP의 존재 하에서 이종이량체화되어 이종이량체 복합체를 형성할 수 있는 동족 서열인, 조성물.

[0299] 60. 조성물로서, 양태 59의 제1 폴리펩티드 작제물 및 제2 폴리펩티드 작제물을 포함하며, 여기에서 상기 제1 폴리펩티드 작제물은 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) 제1 NBD aa 서열을 포함하고, 상기 제2 폴리펩티드 작제물은 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) 제2 NBD aa 서열을 포함하고, 상기 제1 및 제2 NBD aa 서열은 ATP의 존재 하에서 이종이량체화되어 이종이량체, 또는 고차 복합체를 형성할 수 있는 동족 서열인, 조성물.

[0300] 61. 양태 59 또는 양태 60에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물의 ICE 및 제2 폴리펩티드 작제물의 ICE는 단일 면역 세포 표면 분자 또는 상이한 (비-동일한) 면역 세포 표면 분자를 인식하는, 조성물.

[0301] 62. 양태 1 내지 18 중 어느 하나의 제1 폴리펩티드 작제물, 및 양태 42 내지 58 중 어느 하나의 제2 폴리펩티드 작제물을 포함하는 조성물로서:

[0302] (i) 상기 제1 폴리펩티드 작제물은 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) 제1 이종이량체화 NBD aa 서열을 포함하며, 제2 폴리펩티드 작제물은 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) 제2 이종이량체화 NBD aa 서열을 포함하고;

[0303] (ii) 상기 하나 이상의 제1 이종이량체화 NBD aa 서열 각각은 상기 하나 이상의 제2 이종이량체화 NBD aa 서열의 동족 결합 파트너이고;

[0304] (iii) 상기 제1 폴리펩티드 작제물 및 상기 제2 폴리펩티드 작제물은 ATP의 존재 하에서 상기 하나 이상의 제1 이종이량체화 NBD aa 서열 중 적어도 하나, 그리고 상기 하나 이상의 제2 이종이량체화 NBD 서열 중 적어도 하나 사이의 상호작용을 통해 서로에 대해 결합하여 상기 제1 및 제2 폴리펩티드 작제물의 이종이량체 또는 고차 복합체를 형성하는, 조성물.

[0305] 63. 양태 62에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물은 단일 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 폴리펩티드 작제물은 단일 이종이량체화 NBD를 포함하는, 조성물. 예를 들어, 도 3의 참조.

[0306] 64. 양태 62에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물은 2개 이상의 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 폴리펩티드 작제물은 단일 이종이량체화 NBD를 포함하는, 조성물. 예를 들어, NBD가 직렬인 도 3의 K 참조.

[0307] 65. 양태 62에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물은 단일 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 폴리펩티드 작제물은 2개 이상의 제2 이종이량체화 NBD를 포함하는, 조성물.

[0308] 66. 양태 62에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물은 2개 이상의 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 폴리펩티드 작제물은 2개 이상의 제2 이종이량체화 NBD를 포함하는, 조성물.

[0309] 67. 양태 62 내지 66 중 어느 하나에 있어서, 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 작제물은 스캐폴드 서열을 포함하는, 조성물.

[0310] 68. 양태 21 내지 38 중 어느 하나의 제1 폴리펩티드 작제물, 및 양태 1 내지 18 중 어느 하나의 제2 폴리펩티드 작제물을 포함하는 조성물로서:

[0311] (i) 상기 제1 폴리펩티드 작제물은 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) 제1 이종이량체화 NBD aa 서열을 포함하며, 제2 폴리펩티드 작제물은 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) 제2 이종이량체화 NBD aa 서열을 포함하고;

[0312] (ii) 상기 하나 이상의 제1 이종이량체화 NBD aa 서열 각각은 상기 하나 이상의 제2 이종이량체화 NBD aa 서열의 동족 결합 파트너이고;

[0313] (iii) 상기 제1 폴리펩티드 작제물 및 상기 제2 폴리펩티드 작제물은 ATP의 존재 하에서 상기 하나 이상의 제1 이종이량체화 NBD aa 서열 중 적어도 하나, 그리고 상기 하나 이상의 제2 이종이량체화 NBD 서열 중 적어도 하나 사이의 상호작용을 통해 서로에 대해 결합하여 상기 제1 및 제2 폴리펩티드 작제물의 이종이량체 또는 고차 복합체를 형성하는, 조성물.

[0314] 69. 양태 68에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물은 단일 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 폴리펩티드 작제물은 단일 이종이량체화 NBD를 포함하는, 조성물. 예를 들어, 도 3의 A 및 E 참조.

[0315] 70. 양태 68에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물은 2개 이상의 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 폴리펩티드 작제물은 단일 이종이량체화 NBD를 포함하는, 조성물. 예를 들어, 도 3에서의, NBD가 직렬인 B, 그리고 NBD가 직렬이 아닌 N 및 O 참조.

[0316] 71. 양태 68에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물은 단일 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 폴리펩티드 작제물은 2개 이상의 제2 이종이량체화 NBD를 포함하는, 조성물.

[0317] 72. 양태 68에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물은 2개 이상의 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 폴리펩티드 작제물은 2개 이상의 제2 이종이량체화 NBD를 포함하는, 조성물. 예를 들어, 도 4a의 G 참조.

[0318] 73. 양태 62 내지 66 중 어느 하나에 있어서, 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 작제물은 스캐폴드 서열을 포함하는, 조성물.

[0319] 74. 양태 21 내지 38 중 어느 하나의 제1 폴리펩티드 작제물, 및 양태 42 내지 58 중 어느 하나의 제2 폴리펩티드 작제물을 포함하는 조성물로서:

[0320] (i) 상기 제1 폴리펩티드 작제물은 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) 제1 이종이량체화 NBD aa 서열을 포함하며, 제2 폴리펩티드 작제물은 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) 제2 이종이량체화 NBD aa 서열을 포함하고;

[0321] (ii) 상기 하나 이상의 제1 이종이량체화 NBD aa 서열 각각은 상기 하나 이상의 제2 이종이량체화 NBD aa 서열의 동족 결합 파트너이고;

[0322] (iii) 상기 제1 폴리펩티드 작제물 및 상기 제2 폴리펩티드 작제물은 ATP의 존재 하에서 상기 하나 이상의 제1 이종이량체화 NBD aa 서열 중 적어도 하나, 그리고 상기 하나 이상의 제2 이종이량체화 NBD 서열 중 적어도 하나 사이의 상호작용을 통해 서로에 대해 결합하여 상기 제1 및 제2 폴리펩티드 작제물의 이종이량체 또는 고차 복합체를 형성하는, 조성물.

[0323] 75. 양태 74에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물은 단일 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 복합체는 단일 이종이량체화 NBD를 포함하는, 조성물. 예를 들어, 도 3의 C, F, 및 G 참조.

[0324] 76. 양태 74에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물은 2개 이상의 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 복합체는 단일 이종이량체화 NBD를 포함하는, 조성물. 예를 들어, 도 3에서의, NBD가 직렬인 M, F, G, 및 L, 그리고 NBD가 직렬이 아닌 N 및 O 참조.

[0325] 77. 양태 74에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물은 단일 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 복합체는 2개 이상의 제2 이종이량체화 NBD를 포함하는, 조성물.

[0326] 78. 양태 74에 있어서, 제1 폴리펩티드 작제물은 2개 이상의 제1 이종이량체화 NBD를 포함하고, 제2 복합체는 2개 이상의 제2 이종이량체화 NBD를 포함하는, 조성물. 예를 들어, 도 4a의 E 참조.

[0327] 79. 양태 62 내지 67 및 74 내지 78 중 어느 하나에 있어서, AD를 추가로 포함하는, 조성물. 예를 들어, 도 3의 D 및 도 4a의 I 참조.

[0328] 80. 양태 1 내지 18, 21 내지 38, 및 42 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 작제물은 스캐폴드를 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0329] 81. 양태 19 또는 20, 39 내지 41, 및 59 내지 61 중 어느 하나에 있어서, 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 작제물은 독립적으로 선택된 스캐폴드를 포함하는, 조성물.

[0330] 82. 양태 62 내지 79 중 어느 하나에 있어서, 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 작제물은 독립적으로 선택된 스캐폴드를 포함하는, 조성물.

[0331] 83. 양태 80 내지 82 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 스캐폴드(예를 들어, 존재하는 각각의 스캐폴드)는 면역글로불린 폴리펩티드 aa 서열을 포함하지 않는(예를 들어, 면역글로불린 Fc, CH_1, CH_2, 또는 CH_3 도메인을 포함하지 않는), 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0332] 84. 양태 80 내지 82 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 스캐폴드(예를 들어, 존재하는 각각의 스캐폴드)는 면역글로불린 폴리펩티드 aa 서열(예를 들어, IgFc, CH_2, 또는 CH_3 aa 서열)을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0333] 85. 양태 84에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) 스캐폴드는 독립적으로 선택된 서열번호 56 또는 57의 IgG1 IgFc의 면역글로불린 폴리펩티드 aa 서열, 또는 서열번호 56 또는 57과 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0334] 86. 양태 84에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) 스캐폴드는 독립적으로 선택된 비-이량체화 IgFc 폴리펩티드 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0335] 87. 양태 86에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) 스캐폴드는 서열번호 102의 IgFc 폴리펩티드 aa 서열, 또는 서열번호 102와 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0336] 88. 양태 84에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) 스캐폴드는 서열번호 58 내지 60 중 어느 하나의 IgG2, IgG3, 또는 IgG4 IgFc의 독립적으로 선택된 면역글로불린 폴리펩티드 aa 서열, 또는 서열번호 58 내지 60 중 어느 하나와 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0337] 89. 양태 85 내지 88 중 어느 하나에 있어서, 면역글로불린 Fc(IgFc) 폴리펩티드 aa 서열은 항체 관련 효과기 기능(예를 들어, ADCC, ADCP, 및/또는 CDC)을 유도할 수 있거나, IgFc 폴리펩티드 서열은 ADCC, ADCP, 및 CDC로부터 선택되는 적어도 하나의(예를 들어, 모든) 항체 관련 효과기 기능을 강화(예를 들어, 실질적으로 강화)시키는 하나 이상의 치환을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물. 기능 변화는 하나 이상의 치환이 결여된 폴리펩티드 작제물과 비교하여 평가될 수 있음.

[0338] 90. 양태 85 내지 88 중 어느 하나에 있어서, 면역글로불린 Fc 폴리펩티드 aa 서열은 ADCC, ADCP, 및 CDC로부터 선택되는 적어도 하나의(예를 들어, 모든) 항체 관련 효과기 기능을 감소(예를 들어, 실질적으로 감소)시키는 하나 이상의 치환(예를 들어, LALA 치환)을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물. 기능 변화는 하나 이상의 치환이 결여된 폴리펩티드 작제물과 비교하여 평가될 수 있음.

[0339] 91. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의 AD가 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 다음의 폴리펩티드의 전부 또는 일부의 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물: CD40L, CD28, IFN-γ, TNF 상과 구성원, TNF, 림프독소 α, 림프독소 αβ, BAFF(CD25), B7 상과 구성원, CD80, CD86, IL-15, IL-2, IL-7, IL-10, IL-12, PD1, 항-CD3, 항-CTLA4, 항-CD28.

[0340] 92. 양태 91에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 IL-15, IL-12, 또는 IL-7과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성(예를 들어, IL-15, IL-12, 또는 IL-7과 97% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0341] 93. 양태 91에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 (i) 서열번호 90의 단쇄 IL-12, 또는 (ii) 서열번호 91의 IL-12 p40 서브유닛 및/또는 서열번호 92의 p35 서브유닛, 또는 이들 IL-12 서열 중 어느 하나와 95% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0342] 94. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의 AD가 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 PD1에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-PD1 scFv 또는 PD1의 작용제로서 작용할 수 있는 나노바디 aa 서열) 또는 PDL1에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-PDL1 scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0343] 95. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의 AD가 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 CD40에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-CD40 scFv 또는 CD40 신호전달의 작용제로서 작용할 수 있는 나노바디 aa 서열) 또는 CD40L에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-CD40L scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0344] 96. 양태 95에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 서열번호 96의 CD40L aa 서열, 서열번호 95의 CD40L 삼량체 aa 서열, 또는 서열번호 95 또는 96과 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 95 또는 96과 97% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0345] 97. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의 AD가 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 CD137/4-1BB에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-CD137 scFv 또는 나노바디 aa 서열) 또는 TGFβ에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-TGFβ scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0346] 98. 양태 97에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 서열번호 94의 4-1BBL 서열, 서열번호 93의 4-1BBL 삼량체 aa 서열, 또는 서열번호 93 또는 94와 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 93 또는 94와 97% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0347] 99. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의 AD가 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 IL-10에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-IL-10 scFv 또는 나노바디 aa 서열) 또는 IL-10 수용체("IL-10R")에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-IL-10R scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0348] 100. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의 AD가 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 CTLA-4에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-CTLA-4 scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0349] 101. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의 AD가 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 CD3에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-CD3 scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0350] 102. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의 AD가 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 CD28에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-CD28 scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0351] 103. 양태 102에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 서열번호 89의 항-CD28 scFv 서열, 또는 서열번호 89와 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 89와 96% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0352] 104. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의 AD가 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 IFN-γ 수용체에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-IFN-γ 수용체 scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0353] 105. 양태 104에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 서열번호 97의 scIFN-γ 폴리펩티드, 또는 서열번호 97과 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 97과 96% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0354] 106. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의 AD가 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 CD16에 결합하는 aa 서열(예를 들어, 항-CD16 scFv 또는 나노바디 aa 서열)을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0355] 107. 양태 106에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 서열번호 98 또는 103의 항-CD16 VHH 폴리펩티드, 또는 서열번호 98 또는 103과 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 98 또는 103과 96% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0356] 108. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의 AD가 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 서열번호 99의 CD80 aa 서열, 또는 서열번호 99와 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 99와 96% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0357] 109. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의 AD가 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 서열번호 100 또는 101 중 하나의 CD86 aa 서열, 또는 서열번호 100 또는 101 중 하나와 적어도 90% 또는 적어도 95%의 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 100 또는 101 중 하나와 96% 초과 또는 99% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0358] 110. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의 AD가 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 CpG 반복부(예를 들어, CpG 올리고데옥시뉴클레오티드 서열)를 갖는 핵산을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0359] 111. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의 AD가 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) AD는 선택적으로 1, 2 또는 3개의 뉴클레오티드 치환, 결실 또는 삽입을 갖는 서열 TCATCATTTTGTCATTTTGTCATT(서열번호 69)를 포함하는 핵산을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0360] 112. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 하나 이상의(예를 들어, 2개 이상의) TSB가 작제물 또는 조성물 내에 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의, 또는 각각의) TSB는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 TAA에 대한 친화도을 나타도록 독립적으로 선택되는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물: 탄산 무수효소 IX(CAIX), 카드헤린, 암배아 항원(CEA), 세포- 중간엽 상피 전이 인자(c-MET), 세포독성 T-림프구 연관 단백질 4(CTLA-4), 표피 성장 인자 수용체(EGFR) 계열 구성원, 상피 세포 부착 분자(EpCAM), 에프린 A형 수용체 3(EphA3), 섬유아세포 활성화 단백질 알파(FAP), 엽산-결합 단백질, 엽산 수용체 알파(FR-알파), Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 2(HER2), Erb-B2 수용체 티로신 키나아제 3(HER3), 인슐린 유사 성장 인자 1 수용체(IGF-1R), 인테그린 αVβ3, 인테그린 α5β1, 용질 담체 계열 39 구성원 6(Liv1), 흑색종-연관 항원 계열 A 구성원(MAGEA), 흑색종-연관 항원 계열 C 구성원(MAGEC), 메소텔린, 뮤신(예를 들어, MUC1), 뉴욕 식도 편평 세포 암종 1 단백질(NY-ESO-1, 암/고환 항원 1A, 암/고환 항원 1B), 암/고환 항원 2(NY-ESO-2, CTAG2), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 핵 인자 카파 B 리간드의 수용체 활성화제(RANKL), 수용체 티로신 키나아제 유사 고아 수용체 1(ROR1), 테나신, TNF 수용체 상과 구성원 10a(TRAILR1), TNF 수용체 상과 구성원 10b(TRAILR2), 및 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR).

[0361] 113. 양태 112에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의 또는 각각의) TSB는 서열번호 70의 항-인간 메소텔린 scFv 또는 서열번호 70과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 70과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0362] 114. 양태 112 또는 113에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의 또는 각각의) TSB는 서열번호 71의 항-인간 메소텔린 scFv(vH-vL) 또는 서열번호 71과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 71과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0363] 115. 양태 112 내지 114 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의 또는 각각의) TSB는

서열번호 72의 항-인간 메소텔린 scFv(vL-vH) 또는 서열번호 72와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 72와 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0364] 116. 양태 112 내지 115 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의 또는 각각의) TSB는 서열번호 73의 항-인간 메소텔린 scFv(vH-vL) 또는 서열번호 73과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 73과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0365] 117. 양태 112 내지 116 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의 또는 각각의) TSB는 서열번호 74~78 중 어느 하나의 항-인간 메소텔린 scFv(vL-vH) 또는 서열번호 74~78 중 어느 하나와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0366] 118. 양태 117에 있어서, 항-인간 메소텔린 scFv(vL-vH)는 서열번호 74~78 중 어느 하나와 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0367] 119. 양태 112 내지 118 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의 또는 각각의) TSB는 서열번호 79의 항-인간 메소텔린 VHH(나노바디) 또는 서열번호 79와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 79와 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0368] 120. 양태 112 내지 119 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의 또는 각각의) TSB는 서열번호 80의 항-인간 EpCAM scFv(vH-vL) 또는 서열번호 80과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 80과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0369] 121. 양태 112 내지 120 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의 또는 각각의) TSB는 서열번호 81의 항-인간 EpCAM scFv(vL-vH) 또는 서열번호 81과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 81과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성)을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0370] 122. 양태 112 내지 121 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의 또는 각각의) TSB는 서열번호 82~86 중 어느 하나의 항-인간 CTLA-4 scFv(vL-vH) 또는 서열번호 82~86 중 어느 하나와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0371] 123. 양태 122에 있어서, 항-인간 CTLA-4 scFv(vL-vH)는 서열번호 82~86 중 어느 하나와 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0372] 124. 양태 1 내지 111 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 TSB가 작제물 또는 조성물에 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의, 또는 각각의) TSB는 관문 단백질에 대한 친화도를 나타내는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0373] 125. 양태 124에 있어서, 관문 단백질은, T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제제(VISTA), T 세포 면역글로불린 및 뮤신-도메인 함유-3(TIM-3), PD-L1, CTLA-4, 및 림프구-활성화 유전자 3(LAG-3)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0374] 126. 양태 1 내지 양태 125 중 어느 하나에 있어서, 하나 이상의 면역 세포 결합체(ICE)가 작제물 또는 조성물에 존재할 경우, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의, 또는 각각의) 독립적으로 선택된 ICE aa 서열은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질에 대한 친화도(예를 들어, 이에 대한 결합)를 갖는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물: CD3, CD4, CD8, αβTCR, CD2, TCRα 사슬, TCRβ 사슬, δγ TCR, TCR γ 사슬, TCR δ 사슬, TRGV9, CD84, CXCR1, CD13, CD33, CD34, 및 CD16.

[0375] 127. 양태 126에 있어서, 적어도 하나의 ICE aa 서열(예를 들어, 적어도 2개, 또는 각각의 ICE 서열)은, 항체, 항체의 항원 결합 단편(들), Fab, Fab', scFv, 앱타머, 및 나노바디 aa 서열로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0376] 128. 양태 126 또는 127에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의 또는 각각의) ICE는, scFv, 서열번호 61 또는 62의 서열을 포함하는 항-인간 CD3, 또는 서열번호 61 또는 62와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동

일성을 갖는 서열(예를 들어, 서열번호 61 또는 62와 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열)을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 복합체.

[0377] 129. 양태 126 내지 128 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의, 또는 각각의) ICE는, 서열번호 63의 서열을 포함하는 항-인간 CD3 VHH, 또는 서열번호 63과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 서열(예를 들어, 서열번호 63과 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열)을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0378] 130. 양태 126 내지 129 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 적어도 2개의, 또는 각각의) ICE는 서열번호 64~68 중 어느 하나의 서열을 포함하는 항-인간 CD3 scFv(vH-vL), 또는 서열번호 64~68 중 어느 하나와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 서열(예를 들어, 서열번호 64~68 중 어느 하나와 96% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열)을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0379] 131. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 각각의 NBD는 ATP-결합 카세트(ABC) 수송체의 NBD인, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0380] 132. 양태 131에 있어서, ABC 수송체는 ABC1, MDR/TAP, MRP, ALD, OABP, GCN20, 또는 White ABC 수송체 계열의 구성원인, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0381] 133. 양태 131에 있어서, ABC 수송체 NBD는, ABCA1(서열번호 1), ABCB1(서열번호 2), ABCC1(서열번호 3), ABCD1(서열번호 4), ABCE1(서열번호 5), ABCF1(서열번호 6), ABCG2(서열번호 7), 및 TAP1(서열번호 9)로부터 선택되는 aa 서열, 또는 이들 서열 중 어느 하나와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0382] 134. 양태 133에 있어서, NBD는 서열번호 1~7 및 9의 aa 서열 중 어느 하나와 97% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0383] 135. 양태 131에 있어서, NBD는 TAP2 aa 서열, 서열번호 11의 TAP2 aa 서열, 또는 서열번호 11의 aa 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0384] 136. 양태 135에 있어서, NBD는 서열번호 11의 aa 서열과 97% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0385] 137. 양태 131에 있어서, NBD는 TAP1 NBD aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0386] 138. 양태 137에 있어서, NBD는 서열번호 9의 aa 서열, 또는 서열번호 9의 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0387] 139. 양태 138에 있어서, NBD는 서열번호 9의 aa 서열과 97% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0388] 140. 양태 131에 있어서, NBD는 서열번호 10, 87, 또는 88 중 어느 하나의 TAP1 aa 서열, 또는 이들 서열 중 어느 하나와 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0389] 141. 양태 140에 있어서, NBD는 서열번호 10, 87, 또는 88의 TAP1 aa 서열과 97% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0390] 142. 양태 140에 있어서, NBD는 서열번호 88의 TAP1 aa 서열, 또는 서열번호 88의 TAP1 aa 서열과 90% 초과 또는 95% 초과의 서열 동일성을 갖는 TAP1 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0391] 143. 양태 142에 있어서, NBD는 서열번호 88의 TAP1 aa 서열과 97% 초과 또는 98% 초과의 서열 동일성을 갖는 TAP1 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0392] 144. 양태 131 내지 143 중 어느 하나에 있어서, NBD는 비-동종이량체화 NBD를 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0393] 145. 양태 144에 있어서, NBD는 aas N185, S186, Q189, E191, 및 Q192 중 적어도 하나(예를 들어, 적어도 2개 또는 적어도 3개)에 대한 치환을 포함하는, 폴리펩티드 작제물.

[0394] 146. 양태 131 내지 145 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) NBD는 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) NBD를 실질적으로 ATP 가수분해 결핍시키는 치환을 갖는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0395] 147. 양태 146에 있어서, 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) NBD는 서열번호 8에서와 같이 넘버링된 D668 치환(예를 들어, D668N), 또는 적어도 하나의(예를 들어, 각각의) NBD를 실질적으로 ATP 가수분해 결핍시키는 상응하는 치환(예를 들어, 서열번호 9, 10, 87, 또는 88 중 어느 하나)을 갖는 TAP1 NBD를 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0396] 148. 임의의 선행하는 양태에 있어서, 선택적으로 NBD aa 서열, 스캐폴드 aa 서열, 및 AD aa 서열 중 어느 하나 사이에 위치되는, 하나 이상의 독립적으로 선택된 링커(예를 들어, 가요성 또는 강성 링커)를 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0397] 149. 양태 148에 있어서, 하나 이상의 독립적으로 선택된 링커는 서열번호 16~35 중 어느 하나로부터 독립적으로 선택되는 aa 서열을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0398] 150. 양태 148 또는 149에 있어서, 하나 이상의 독립적으로 선택된 강성 링커 aa 서열을 추가로 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0399] 151. 양태 150에 있어서, 하나 이상의 독립적으로 선택된 강성 링커 aa 서열은/들은 서열번호 36~55 중 어느 하나로부터 독립적으로 선택되는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0400] 152. 양태 1 내지 151 중 어느 하나에 따른, 2개 이상의 작제물, 또는 제1 폴리펩티드 작제물 및 제2 폴리펩티드 작제물(예를 들어, 조성물), 및 ATP의 적어도 하나의 분자(예를 들어, 적어도 2개의 분자)를 포함하는 작제물의 이량체 또는 고차 복합체.

[0401] 153. 양태 152에 있어서, 복합체 내의 각각의 작제물은 동일한, 이량체 또는 다른 고차 복합체.

[0402] 154. 양태 153에 있어서, 이량체 또는 다른 고차 복합체는 동종이량체인, 이량체 또는 다른 고차 복합체.

[0403] 155. 양태 152에 있어서, 복합체 내의 각각의 작제물은 동일하지 않은, 이량체 또는 고차 복합체.

[0404] 156. 양태 155에 있어서, 이량체 또는 다른 고차 복합체는 이종이량체인, 이량체 또는 다른 고차 복합체.

[0405] 157. 양태 152 내지 156 중 어느 하나의 작제물의 이량체 또는 고차 복합체 중 적어도 하나 또는 적어도 2개를 포함하는 작제물의 집단(예를 들어, 조성물로서의, 작제물의 군 또는 집합체).

[0406] 158. 양태 157에 있어서, 작제물의 이량체 또는 고차 복합체 중 적어도 하나 또는 적어도 2개는 ADCC, ADCP, 및/또는 CDC에 영향을 미치는 면역글로불린 불변 영역을 포함하는, 집단.

[0407] 159. 양태 157에 있어서, 작제물의 이량체 또는 고차 복합체 중 적어도 하나 또는 적어도 2개는 독립적으로 선택된 AD를 포함하는, 집단.

[0408] 160. 양태 157 또는 159에 있어서, 작제물의 이량체 또는 고차 복합체 중 적어도 하나 또는 적어도 2개는 독립적으로 선택된 ICE를 포함하는, 집단.

[0409] 161. 양태 157 내지 160 중 어느 하나에 있어서, 작제물의 이량체 또는 고차 복합체 중 적어도 하나 또는 적어도 2개는 독립적으로 선택된 TSB를 포함하는, 집단.

[0410] 162. 양태 1 내지 151 중 어느 하나에 있어서, 도 2, 도 3, 도 4a, 또는 도 4b 중 어느 하나에 제시된 구조를 갖는, 폴리펩티드 작제물.

[0411] 163. 양태 1 내지 151 중 어느 하나에 있어서, 도 2, 도 3, 도 4a, 또는 도 4b 중 어느 하나에 제시된 구조를 갖는, 작제물의 쌍.

[0412] 164. 양태 152 내지 156 중 어느 하나에 있어서, 도 2 또는 도 3 중 어느 하나에 제시된 구조를 갖는, 이량체 또는 고차 복합체.

[0413] 165. 양태 152 내지 156 중 어느 하나에 있어서, 도 4a 또는 도 4b 중 어느 하나에 제시된 구조를 갖는, 이량체 또는 고차 복합체.

[0414] 166. 양태 152 내지 156 중 어느 하나에 있어서, 도 2, 도 3, 도 4a, 또는 도 4b 중 어느 하나에 제시된 구조를 갖는, 이량체 또는 고차 복합체.

[0415] 167. 양태 152 내지 156 중 어느 하나에 있어서, TAP1 또는 TAP2 NBD aa 서열의 동종이량체, 또는 TAP1 및 TAP2 NBD aa 서열의 이종이량체를 포함하는, 이량체 또는 고차 복합체.

[0416] 168. CD4+ T 세포, δγ T 세포, NK 세포, 골수 유래 억제제 세포, 및/또는 CD8+ T 세포를 자극하는 방법으로서, NBD에 결합하기에 충분한 ATP의 존재 하에서, 상기 세포를 양태 1 내지 151 중 어느 하나의 작제물 또는 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

[0417] 169. 양태 168에 있어서, 시험관 내에서, 또는 포유동물 또는 비포유동물 동물의 신체 외부에서 수행되는, 방법.

[0418] 170. 양태 169에 있어서, 세포 또는 조직에서 수행되는, 방법.

[0419] 171. 양태 168에 있어서, 생체 내 또는 포유동물의 신체 내에서 수행되는, 방법.

[0420] 172. 암을 치료하는 방법으로서, 양태 1 내지 151 중 어느 하나의 작제물 또는 조성물을 환자 또는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0421] 173. 양태 169 내지 172 중 어느 하나에 있어서, 포유동물은 인간인, 방법.

[0422] 174. 암 치료용 의약의 제조를 위한, 양태 1 내지 151 중 어느 하나의 작제물 또는 조성물의 용도.

[0423] 175. 양태 172 내지 174 중 어느 하나에 있어서, 암은 고형 종양을 포함하는, 방법 또는 용도.

[0424] 176. 암의 치료를 위한, 양태 1 내지 151 중 어느 하나의 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0425] 177. 양태 176에 있어서, 암은 고형 종양을 포함하는, 폴리펩티드 작제물 또는 조성물.

[0426] 178. 양태 172 내지 176 중 어느 하나에 있어서, 암은 중피종, 흑색종, 육종, 암종, 암육종, 림프종, 또는 생식세포 종양인, 방법, 용도, 작제물, 또는 조성물.

[0427] 179. 양태 1 내지 151 중 어느 하나의 하나 이상의 작제물을 암호화하거나, 조성물의 하나 이상의 작제물을 암호화하는 서열을 포함하는, 핵산.

[0428] 180. 벡터로서, 선택적으로 프로모터(예를 들어, 구성 프로모터) 또는 유도성 프로모터의 조절 하에, 양태 179의 핵산을 포함하는 벡터.

[0429] 181. 양태 179 또는 180의 벡터 또는 핵산을 포함하는 세포.

[0430] 182. 양태 181에 있어서, 세포는 포유류 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 박테리아 세포인, 세포.

[0431] **VII. 실시예**

[0432] **실시예 1**

[0433] 용액 중 동종이량체화하는 TAP1 NBD의 기능성을 시험하기 위해, (i) N676, S677, Q680, E682, 및 Q683(예를 들어, N676G, S677N, Q680R, E682Q, 및 Q683R) 치환, (ii) 서열에 존재하는 시스테인의 세린으로의 치환(서열번호 10), 및 (iii) 정제를 위한 C-말단 His 태그를 포함하는 인간 TAP1 NBD를 대장균에서 발현시키고 후속하여 정제하였다. 분자량 마커 및 정제된 단백질의 샘플에 대해 도 8에 나타낸 바와 같이 환원 및 비-환원 조건 하에서 SDS-PAGE 겔 분석을 수행하였다(레인: M- 분자량 마커, R- 환원 단백질 샘플, NR 비-환원 단백질 샘플).

[0434] 정제된 TAP1 NBD의 샘플을 1 mM ADP 또는 1 mM ATP에 노출시키고 크기 배제 크로마토그래피를 수행하였다. 도 9에 나타낸 결과는, ADP의 존재 시 단백질 크로마토그래피의 유효 분자량은 37 kDa인 한편, ATP의 존재 시 단백질 크로마토그래피의 유효 분자량은 57 kDa임을 나타낸다. 해당 결과는 TAP1 단백질이 ATP의 존재 하에서 이량체화됨을 나타낸다. 분자량을 결정하기 위해, 질량 광분석 및 동적 광 산란(DLS)을 사용하여 이량체화를 확인하였다. 질량 광분석법은 크로마토그래피 결과와 일치하게, 1 mM ATP의 존재 하에서 62 kDa의 유효 분자량을 제공하였다(도 10 참조). 1 mM ADP(도 11의 A) 또는 1 mM ATP(도 11의 B)의 존재 하에서의, 20 mM Tris(pH 8.0), 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10% 글리세롤 중 DLS는, ADP의 존재 하에서 5.517의 크기 및 ATP의 존재 하에서 8.057의 크기를 나타냈으며, 이는 1 mM ATP의 존재 하에서의 단백질의 이량체화와 재차 일치한다. 아래 표는 DLS 결과를 제공한다.

샘플 명칭	다분산성 지수(PI)	부피 기준 크기 분포(nm)
ADP 완충액 중 NBD1	0.3356	5.157
ATP 완충액 중 NBD1	0.6278	8.057

[0435]

[0436] **실시예 2.**

[0437] SpyTag3, TEV 프로테아제, 및 C-말단에 부착된 His 태그를 포함하는 펩티드를 갖는 서열번호 87의 TAP1 NBD를 대장균에서 발현시키고, 세포를 펠릿화하고 분석 시까지 동결시켰다. TAP1 NBD 단편을 세포 용해에 이어서 HisTrap 컬럼 상의 크로마토그래피로 정제하였다. 분석을 위해, 세포 펠릿을 해동하고, 100 μg/ml 리소자임, 2 프로테아제 억제제 정제(Thermo Pierce A32965), 및 12.5 U/ml로 첨가된 Universal Nuclease(Thermo Pierce 88702)가 보충된 200 ml 용해 완충액(20 mM Tris-Cl pH 8.0, 500 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10% 글리세롤, 2 mM ATP)으로 재현탁하였다. 세포를 4℃에서 30분 동안 교반하면서 인큐베이션한 다음, 80% 강도의 초음파 처리로 총 4분의 활성 시간 동안 용해시켰다(사이클당 얼음 상에서 5초 가동, 15초 휴지). 이어서, 용해물을 4℃에서 12,000 x g로 1시간 동안 원심분리하여 정화한 다음, 0.22 μm로 여과하고, 연동 펌프로 밤새 재순환하면서 0.5 ml/분의 속도로 1 ml HisTrap HP 컬럼(Cytiva) 상에 로딩하였다. 다음 날, 컬럼을 관류로 전환시키고, 1 ml/분으로의 완전한 용해물 로딩 후, 컬럼을 7 mM β-메르캅토에탄올 및 20 mM 이미다졸이 보충된 10 컬럼 부피(CV)의 용해 완충액으로 세척하였다. 이어서, 컬럼을 AKTAxpress FPLC로 옮기고, 결합된 단백질을 결합 완충액(20 mM Tris-Cl pH 8.0, 200 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10% 글리세롤, 2 mM ATP, 0.5 mM PMSF) 중에서 40 CV에 걸쳐 0 내지 500 mM의 이미다졸 구배로 용리하였다. 컬럼 분획을 SDS-PAGE로 평가하고, 표적 단백질을 함유하는 분획을 풀링하고 10 ml로 농축시킨 후(10 kDa MWCO), 표적 완충액(20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10% 글리세롤, 1 mM ATP)에서 평형화된 Superdex 200 16/600 컬럼 상에 3회 주입(주입 당 약 3.3 ml)으로 로딩하였다. 용리 피크 분획을 SDS-PAGE로 평가하고, 표적 단백질 함유 분획을 풀링하고 10 mg/ml로 농축시킨 후(10 kDa 분자량 컷오프), 분취하고(500 μl/튜브), 4℃에서 보관하였다.

[0438] 정제된 단백질을 분자량 샘플과 함께 SDS-PAGE를 거친다. 도 12는 쿠마시 블루 염색 겔을 제공하며, 여기에서 가장 왼쪽의 레인은 분자량 샘플을 나타내고, 가장 오른쪽의 레인은 정제된 단백질을 나타낸다.

[0439] 정제된 단백질(각각 1 mg)의 샘플에 대해 제조사 지침에 따라 PD-10 컬럼(Cytiva 17085101) 상에서 완충액 교환하였다. 완충액 교환을 위해, PD-10 탈염 컬럼을 1 mM ATP 또는 1 mM ADP를 함유하는 표적 완충액(20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl2, 10% 글리세롤)으로 평형화시켰다. 1 mg(100 μl의 10 mg/ml 스톡)의 단백질을 2.4 ml의 표적 완충액과 함께 각 컬럼에 첨가하고, 컬럼을 50-ml 원뿔형 튜브에서 1000 x g로 2분 동안 원심분리하고, 용리액을 수집하였다. 이어서, 완충액이 교환된 단백질을 0.5 ml(약 60 μM)로 농축시키고, Superdex S200 Increase 컬럼(Cytiva) 상에 로딩하고, ATP 또는 ADP를 함유하는 적절한 완충액으로 평형화시키고 0.5 ml/분으로 용리하였다. ATP 함유 샘플은 약 65 kDa의 분자량에 상응하는 15.75 ml의 부피로 용리된 한편, ADP 샘플은 약 38 kDa에 상응하는 16.81 ml로 용리되었다. 도 12는 해당 크로마토그래피 분석의 트레이스를 제공한다.

[0440] ADP 및 ATP의 존재 하에서의 크기 배제 크로마토그래피에 의한 분자량을 결정하기 위해, 정제된 단백질 샘플(각각 1 mg)을 제조사 지침에 따라 PD-10 컬럼(Cytiva 17085101) 상에서 완충액 교환하였다. 요약하면, PD-10 탈염 컬럼을 1 mM ATP 또는 ADP를 함유하는 표적 완충액(20 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 10% 글리세롤)으로 평형화시켰다. 1 mg(100 μl의 10 mg/ml 스톡)의 단백질을 2.4 ml의 표적 완충액과 함께 각 컬럼에 첨가하고, 컬럼을 50-ml 원뿔형 튜브에서 1000 x g로 2분 동안 원심분리하고, 용리액을 수집하였다. 이어서, 완충액이 교환된 단백질을 0.5 ml(약 60 μM)로 농축시키고, Superdex S200 Increase 컬럼(Cytiva) 상에 로딩하고, ATP 또는 ADP를 함유하는 적절한 완충액에서 약0.5 ml/분으로 평형화시켰다. ATP 함유 샘플은 약 65 kDa의 분자량에 상응하는 15.75 ml의 부피로 용리된 한편, ADP 샘플은 약 38 kDa에 상응하는 16.81 ml로 용리되었다.

[0441] **실시예 3.**

[0442] NBD 폴리펩티드의 유도되지 않은 발현 및 유도된 발현의 평가를 위해, SpyTag3, TEV 프로테아제 부위, 및 C-말단에 태그된 His를 포함하는 펩티드를 갖는 서열번호 87 또는 서열번호 88의 NBD의 이소프로필-베타-D-티오갈락토시드(IPTG) 유도가능 발현을 허용하는 벡터로 대장균 BL21(DE3)의 샘플을 형질전환시켰다. 유도되지 않은 분

획 및 유도된 분획의 분석을 위해, 각각의 배양물에 대한 600 nm에서의 광학 밀도(OD)를 유도 시점인 0.4 OD까지 모니터링하고, 1 OD-ml에 해당하는 분취액(예를 들어, 0.4 OD의 2.5 ml)을 취했다. 분취액 중 세포를 6800 x g로 3분 동안 펠릿화하고, 펠릿을 300 μl의 1x PBS에 재현탁한 다음, 재현탁된 물질을 -80C에서 동결시켰다. 80 μM IPTG로 유도한 후, 세포를 성장시키고 유도 후 최종 수확 동안 1 OD-ml에 해당하는 의 유사한 샘플(예를 들어, 0.25 ml의 4 OD)을 수집하였다. 유도 분석을 위해, 냉동된 샘플을 해동하고, 모든 샘플 내의 세포를 동일한 부피의 2x 용해 완충액(0.2% Triton X-100, 100 μg/ml 리소자임 및 Pierce로부터의 2x 농도의 Universal Nuclease를 포함하는 1x PBS)과 혼합하여 용해시켰다. 샘플을 4℃에서 30분 동안 로커 상에서 인큐베이션한 다음, 용해물을 21,000 x g에서 10분 동안 회전시켜 부스러기를 펠릿화하였다. 상청액의 샘플(30 μl)을 10 μl의 4x SDS-PAGE 로딩 완충액과 혼합하고, 70℃에서 약 5분 동안 가열한 다음, SDS-PAGE 겔 상에 로딩하였다. 도 13a의 SDS-PAGE 겔(A)은 해당 결과를 나타낸다.

[0443] 크기 배제 크로마토그래피에 의한 발현 수준 및 분자량을 결정하기 위해, 서열번호 87 및 88의 NBD 폴리펩티드의 샘플을 대장균에서 발현시키고, SDS-PAGE 및 크로마토그래피 분석을 위해 실시예 2에서와 같이 정제하였다. 서열번호 87의 NBD에 비해 서열번호 88의 "캡핑된" NBD에 대해 약 두 자리수 더 높은(90배) 크로마토그래피 분자량 측정 및 단백질 수율의 결과가 다음 표에 제공된다.

TAP1 폴리펩티드	배양물로부터의 수율	1 mM ADP 완충액 중 MW	1 mM ATP 완충액 중 MW
서열번호 87	100 μg/리터	38 kDa	65 kDa
서열번호 88	9 mg/리터	38.1 kDa	78 kDa

[0444]

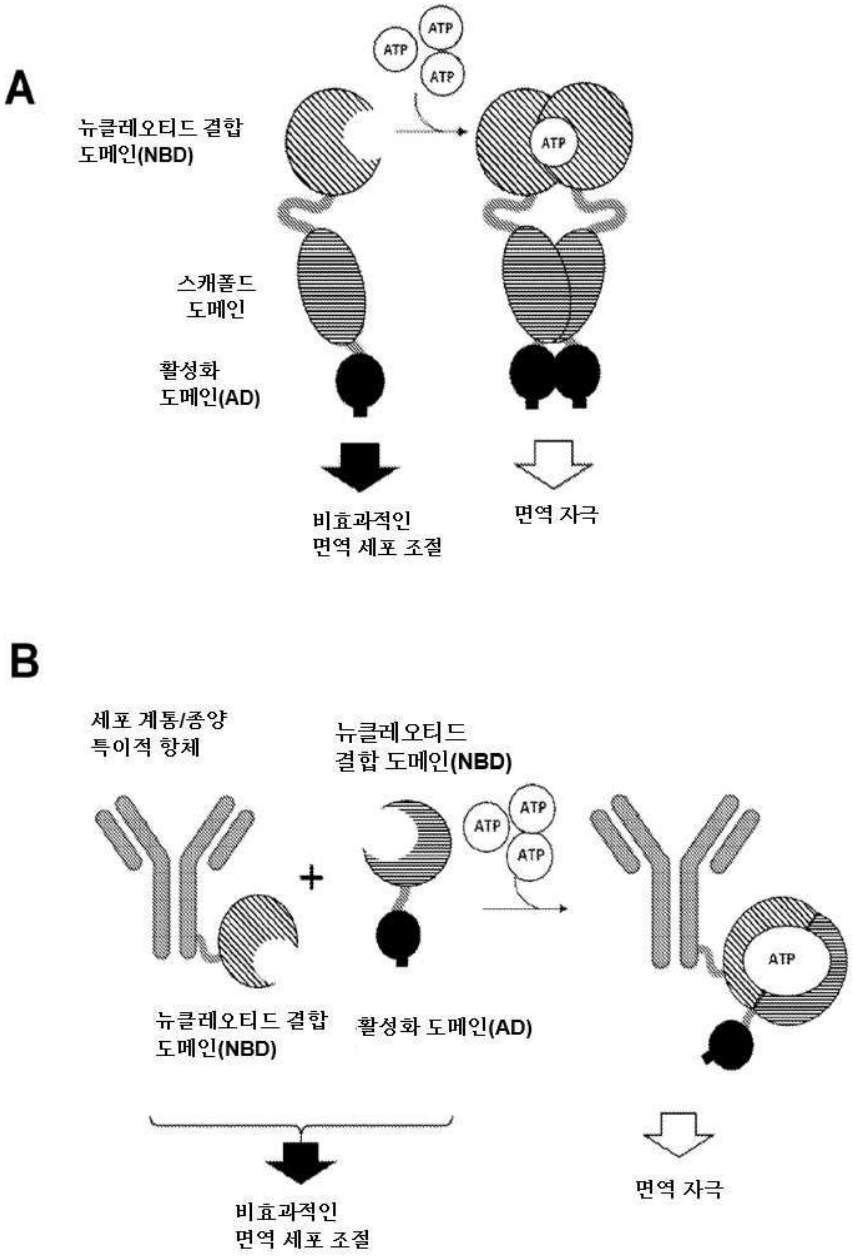
[0445] 도 13은 유도된 발현 및 유도되지 않은 발현의 SDS PAGE 분석(A, 도 13a) 및 정제된 단백질의 분석(B, 도 13b)을 제공한다. 도 13에 제공된 환원 SDS-PAGE 겔 이미지의 레인은 다음과 같다.

겔 (A) 유도된 발현 대 유도되지 않은 발현		겔 (B) 서열번호 88 의 정제된 NBD 폴리펩티드의 평가	
레인	샘플	레인	샘플
1	분자량 마커	1	분자량 마커
2	유도 전 서열번호 87 의 NBD 폴리펩티드의 발현	2	추가 정제된 NBD 폴리펩티드
3	유도 후 서열번호 87 의 NBD 폴리펩티드의 발현(흰색 박스 및 화살표 참조)	3	추가 정제된 NBD 폴리펩티드
4	유도 전 서열번호 88 의 NBD 폴리펩티드의 발현	4	서열번호 88 의 정제된 NBD 폴리펩티드
5	유도 후 서열번호 88 의 NBD 폴리펩티드의 발현(흰색 박스 참조)		

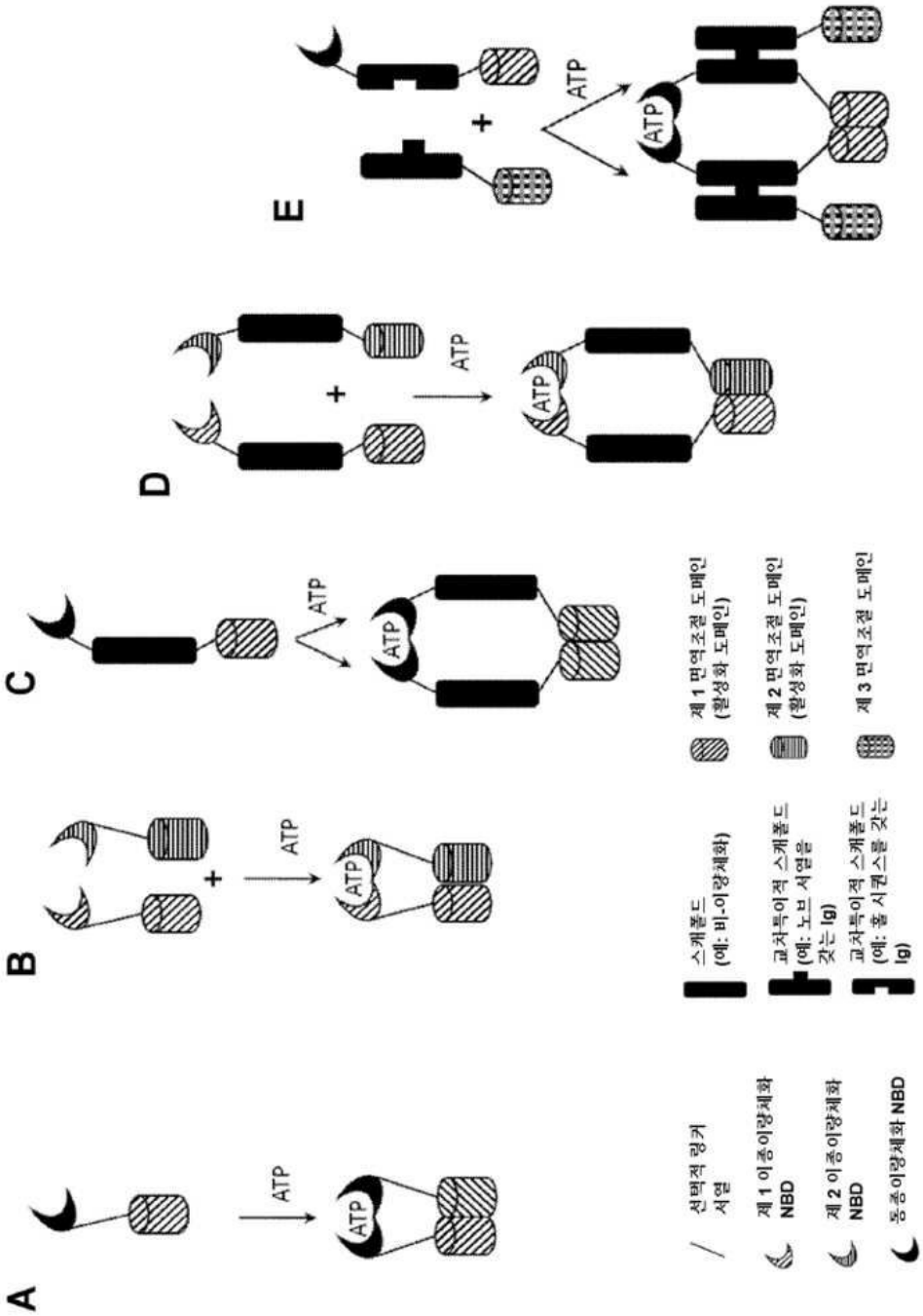
[0446]

도면

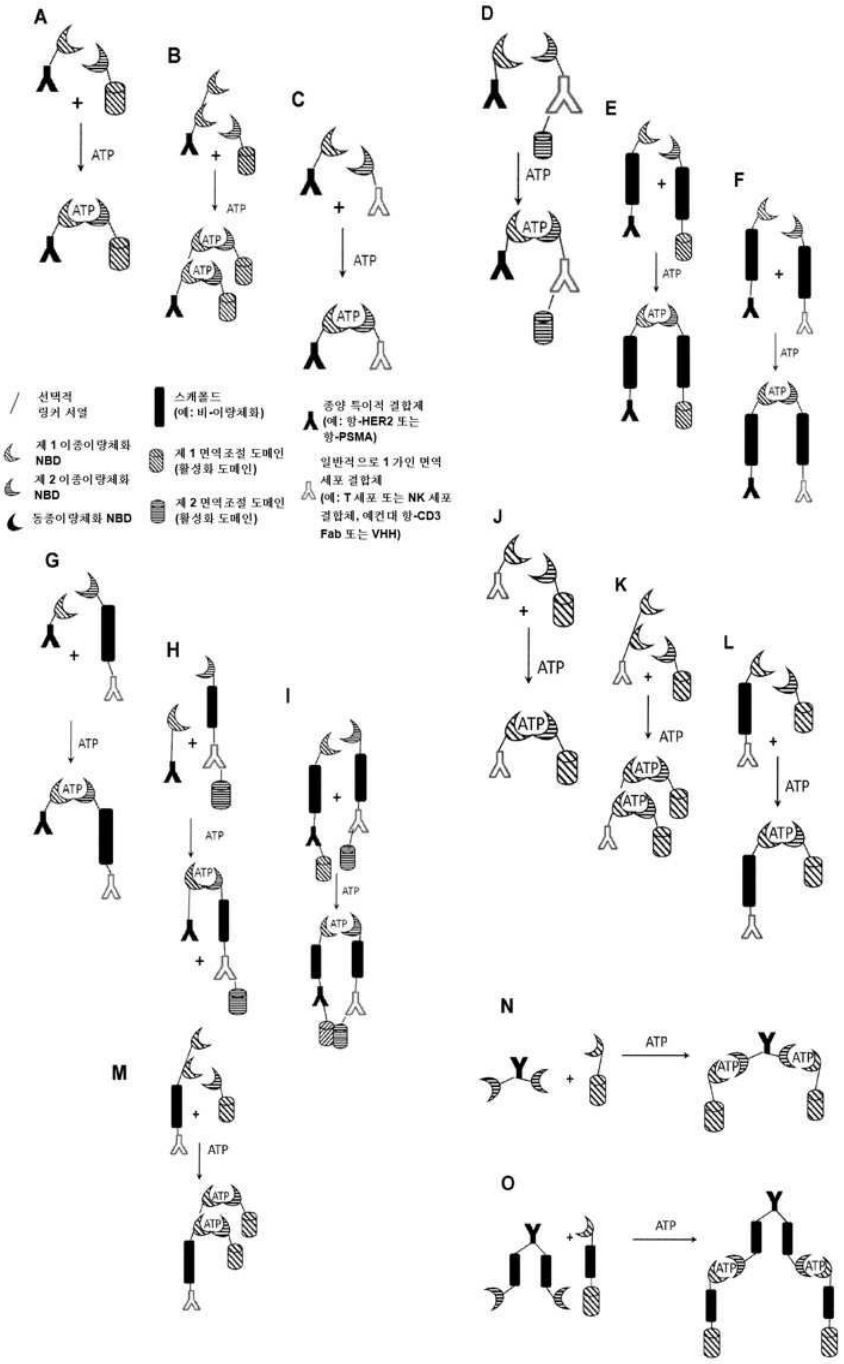
도면1


A
ATP
ATP
ATP
ATP
뉴클레오티드 결합
도메인(NBD)
스캐폴드
도메인
활성화
도메인(AD)
비효과적인
면역 세포 조절
면역 자극
B
세포 계통/종양
특이적 항체
뉴클레오티드
결합 도메인(NBD)
ATP
ATP
ATP
뉴클레오티드 결합
도메인(NBD)
활성화 도메인(AD)
비효과적인
면역 세포 조절
면역 자극

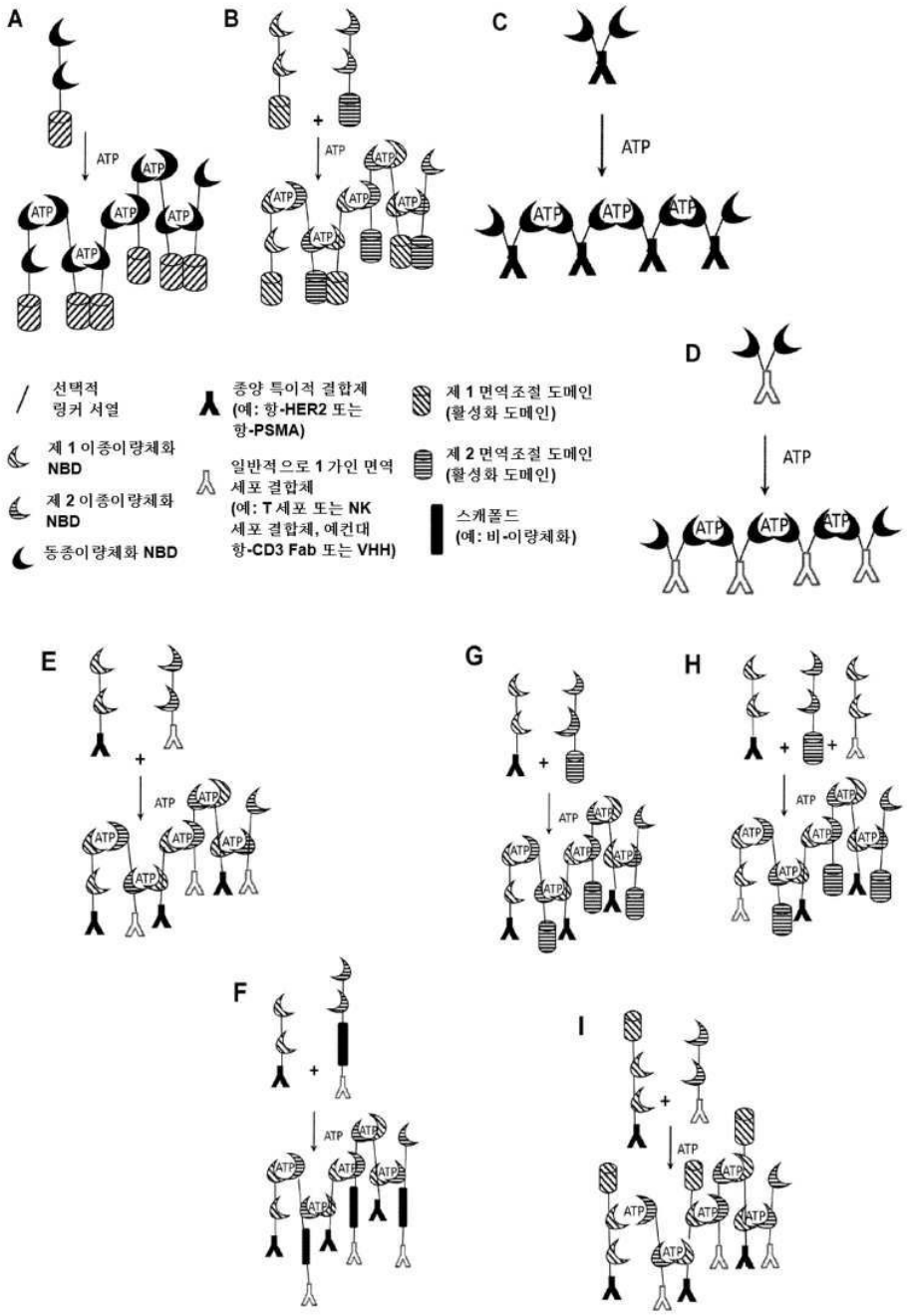
도면2


A
ATP
ATP
B
ATP
ATP
C
ATP
ATP
D
ATP
ATP
E
ATP
ATP
선택적 링커 서열
제 1 이종이량체화 NBD
제 2 이종이량체화 NBD
동종이량체화 NBD
스캐폴드 (예: 비-이량체화)
교차특이적 스캐폴드 (예: 노브 서열을 갖는 Ig)
교차특이적 스캐폴드 (예: 홀 서열을 갖는 Ig)
제 1 면역조절 도메인 (활성화 도메인)
제 2 면역조절 도메인 (활성화 도메인)
제 3 면역조절 도메인

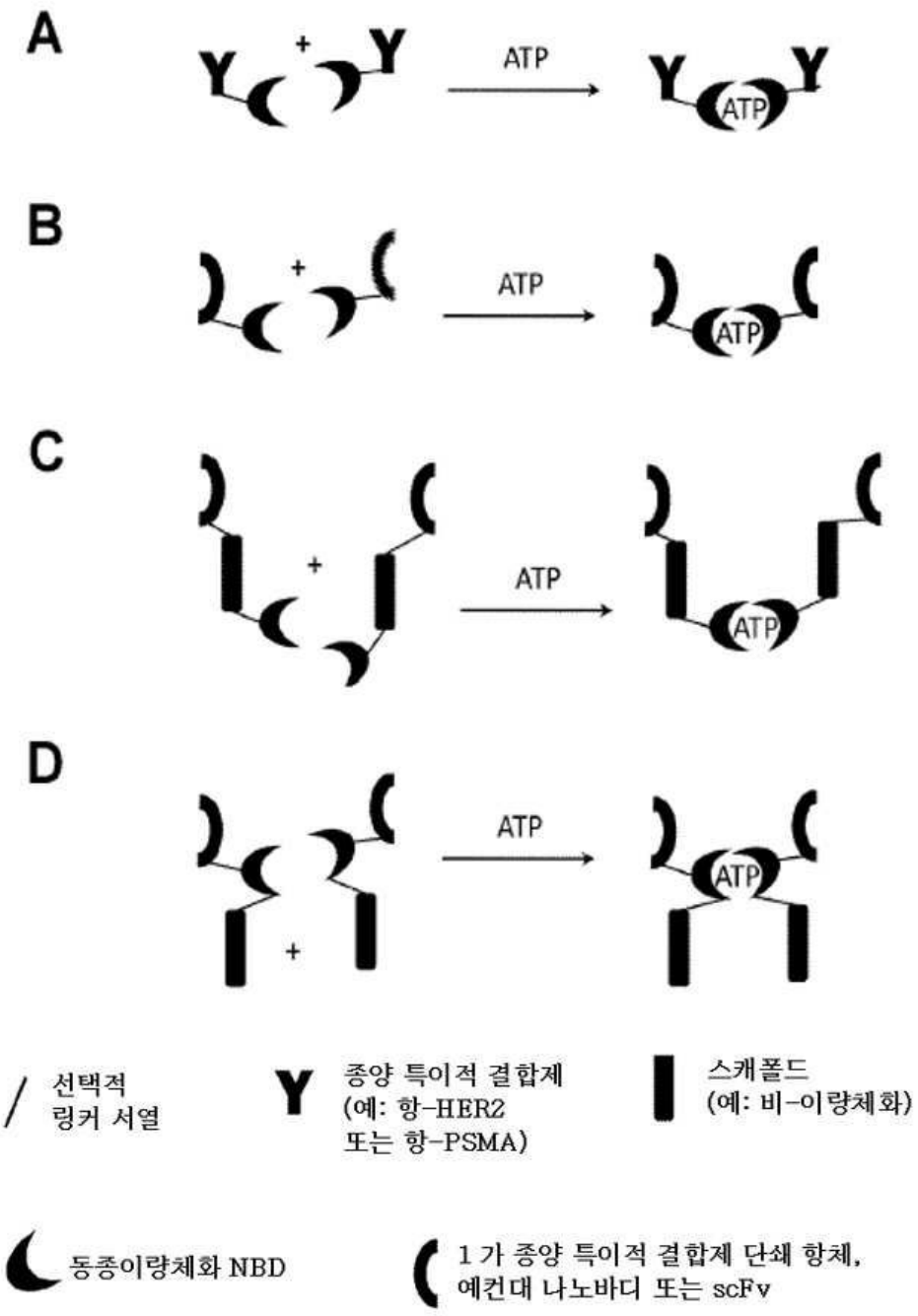
도면3


A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
N
O
ATP
선택적
링커 서열
제 1 이종이량체화
NBD
제 2 이종이량체화
NBD
동종이량체화 NBD
스캐폴드
(예: 비-이량체화)
제 1 면역조절 도메인
(활성화 도메인)
제 2 면역조절 도메인
(활성화 도메인)
종양 특이적 결합제
(예: 항-HER2 또는
항-PSMA)
일반적으로 1 가인 면역
세포 결합제
(예: T 세포 또는 NK 세포
결합제, 예컨대 항-CD3
Fab 또는 VHH)

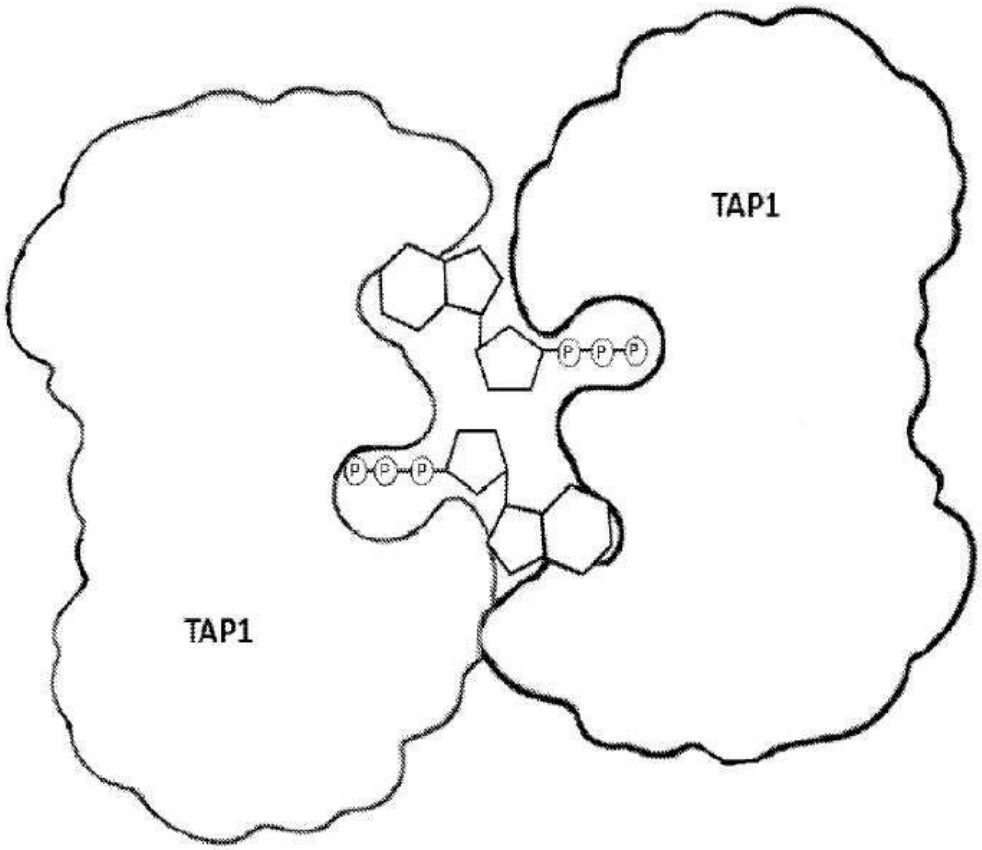
도면4a


A
B
C
D
E
F
G
H
I
ATP
선택적 링커 서열
제 1 이종이량체화 NBD
제 2 이종이량체화 NBD
동종이량체화 NBD
종양 특이적 결합제 (예: 항-HER2 또는 항-PSMA)
일반적으로 1 가인 면역 세포 결합체 (예: T 세포 또는 NK 세포 결합체, 예컨대 항-CD3 Fab 또는 VHH)
제 1 면역조절 도메인 (활성화 도메인)
제 2 면역조절 도메인 (활성화 도메인)
스캐폴드 (예: 비-이량체화)

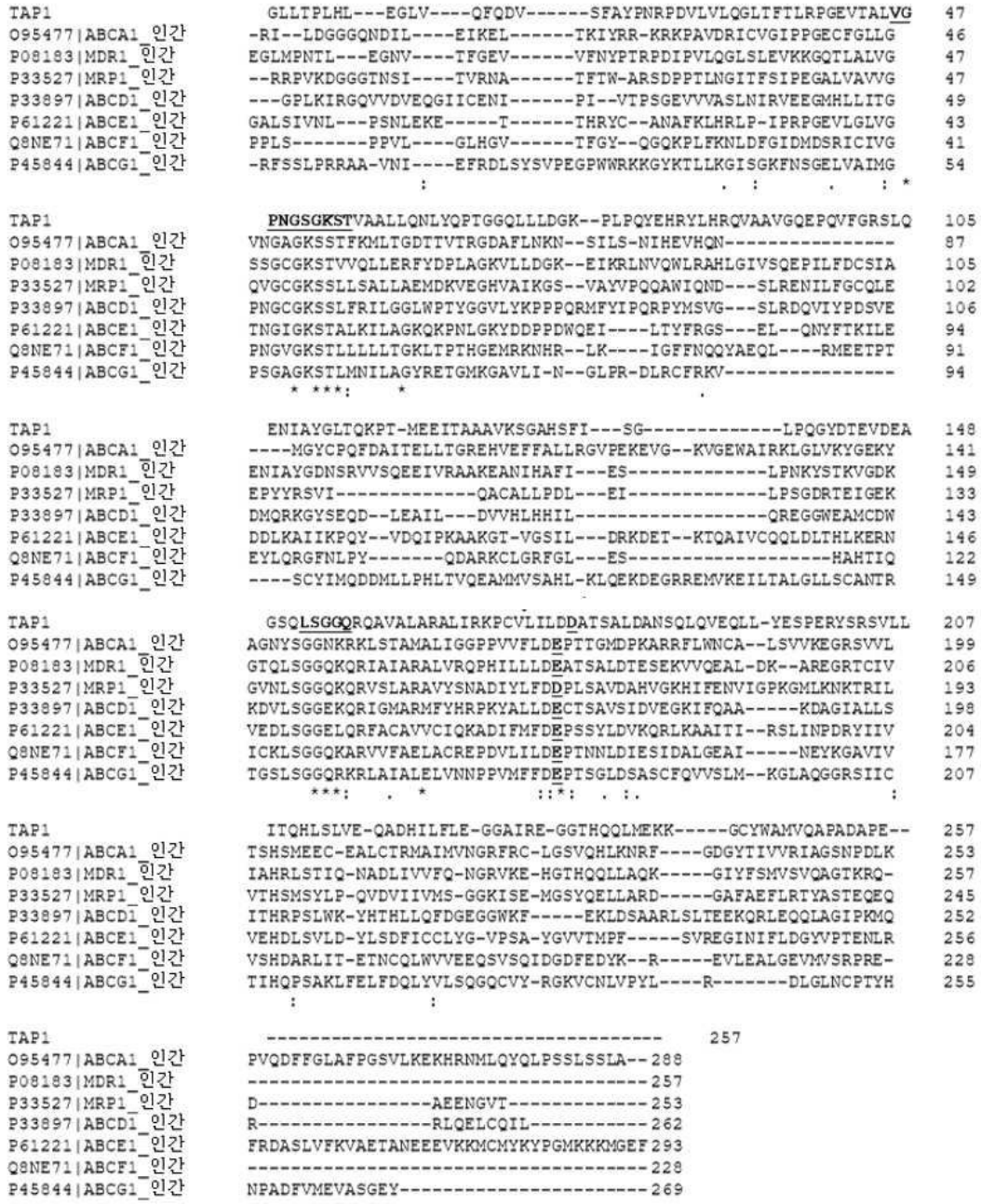
도면4b


A
ATP
ATP
B
ATP
ATP
C
ATP
ATP
D
ATP
ATP
선택적
링커 서열
Y
종양 특이적 결합제
(예: 항-HER2
또는 항-PSMA)
스캐폴드
(예: 비-이량체화)
동종이량체화 NBD
1 가 종양 특이적 결합제 단쇄 항체,
예컨대 나노바디 또는 scFv

도면5



도면6

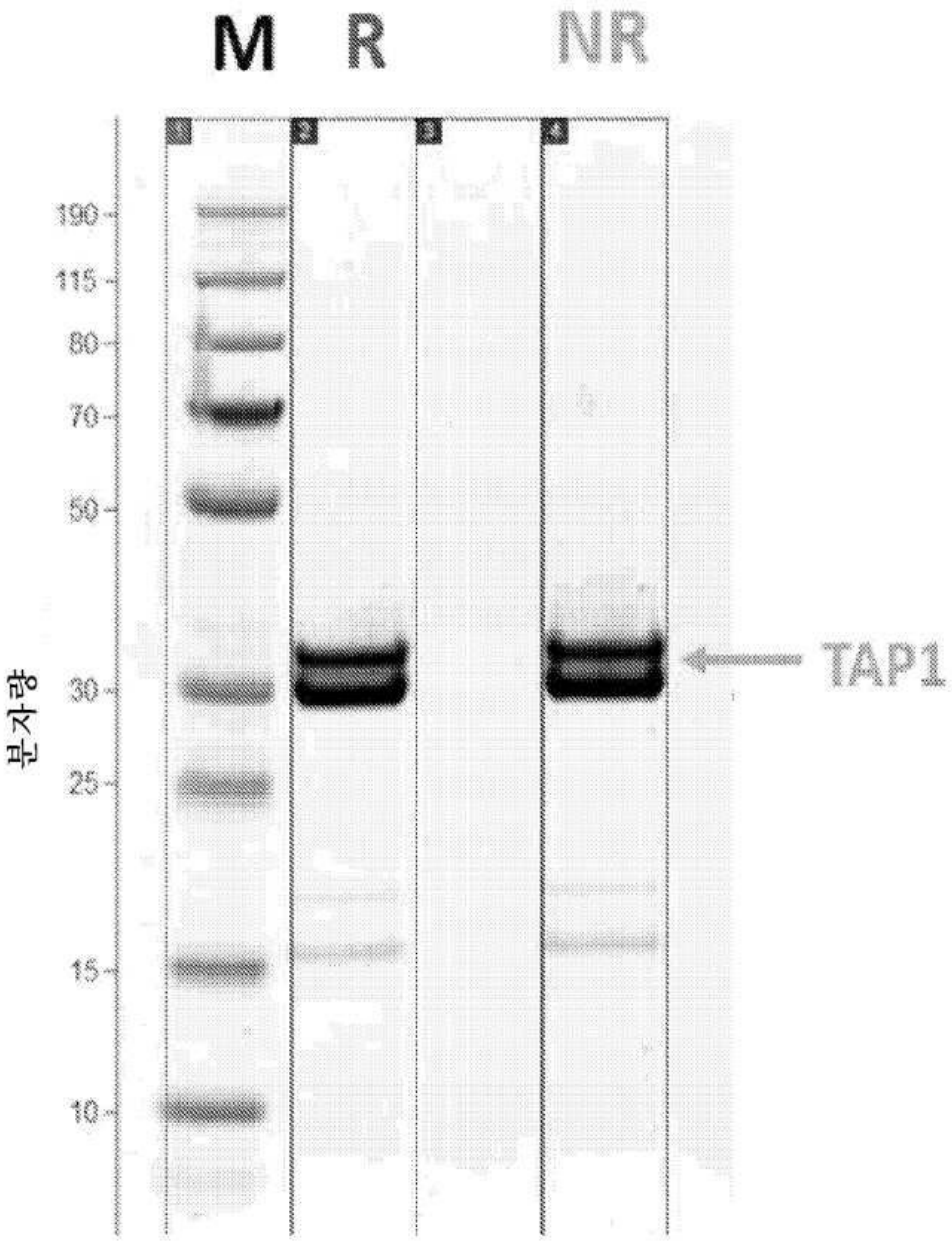

TAP1 GLLTPLHL---EGLV----QFQDV------SFAYPNRPDVLVLQGLTFTLRPGEVTALVG 47
O95477|ABCA1_인간 -RI--LDGGGQNDIL----EIKEL------TKIYRR-KRKPAVDRICVGIPPGECFGLLG 46
P08183|MDR1_인간 EGLMPNTL---EGNV----TFGEV------VFNYPTRPDIPVLQGLSLEVKKGQTLALVG 47
P33527|MRP1_인간 --RRPVKDGGGTNSI----TVRNA------TFTW-ARSDPPTLNGITFSIPEGALVAVVG 47
P33897|ABCD1_인간 ---GPLKIRGQVVDVEQGIICENI------PI--VTPSGEVVVASLNIRVEEGMHLLITG 49
P61221|ABCE1_인간 GALSIVNL---PSNLEKE-----T------THRYC--ANAFKLHRLP-IPRPGEVLGLVG 43
Q8NE71|ABCF1_인간 PPLS-------PPVL----GLHGV------TFGY--QGQKPLFKNLDFGIDMDSRICIVG 41
P45844|ABCG1_인간 -RFSSLPRRAA-VNI----EFRDLSYSVPEGPWWRKKGYKTLLKGISGKFNSGELVAIMG 54
TAP1 PNGSGKSTVAALLQNLYQPTGGQLLLDGK--PLPQYEHRYLHRQVAAVGQEPQVFGRSLQ 105
O95477|ABCA1_인간 VNGAGKSSTFKMLTGDTIVTRGDAFLNKN--SILS-NIHEVHQN---------- 87
P08183|MDR1_인간 SSGCGKSTVVQLLERFYDPLAGKVLLDGK--EIKRLNVQWLRAHLGIVSQEPILFDCSIA 105
P33527|MRP1_인간 QVGCGKSSLLSALLAEMDKVEGHVAIKGS--VAYVPQQAWIQND---SLRENILFGCQLE 102
P33897|ABCD1_인간 PNGCGKSSLFRILGGLWPTYGGVLYKPPPQRMFYIPQRPYMSVG---SLRDQVIYPDSVE 106
P61221|ABCE1_인간 TNGIGKSTALKILAGKQKPNLGKYDDPPDWQEI----LTYFRGS---EL--QNYFTKILE 94
Q8NE71|ABCF1_인간 PNGVGKSTLLLLLTGKLIPTHGEMRKNHR--LK----IGFFNQQYAEQL----RMEETPT 91
P45844|ABCG1_인간 PSGAGKSTLMNILAGYRETGMKGAVLI-N--GLPR-DLRCFRKV---------- 94
TAP1 ENIAYGLTQKPT-MEEITAAAVKSGAHSFI---SG----------LPQGYDTEVDEA 148
O95477|ABCA1_인간 ----MGYCPQFDAITELLTGREHVEFFALLRGVPEKEVG--KVGEWAIRKLGLVKYGEKY 141
P08183|MDR1_인간 ENIAYGDNSRVVSQEEIVRAAKEANIHAFI---ES----------LPNKYSTKVGDK 149
P33527|MRP1_인간 EPYYRSVI----------QACALLPDL---EI----------LPSGDRTEIGEK 133
P33897|ABCD1_인간 DMQRKGYSEQD--LEAIL---DVVHLHHIL----------QREGGWEAMCDW 143
P61221|ABCE1_인간 DDLKAIIKPQY--VDQIPKAAKGT-VGSIL---DRKDET--KTQAIVCQQLDLTHLKERN 146
Q8NE71|ABCF1_인간 EYLQRGFNLPY-------QDARKCLGRFGL---ES----------HAHTIQ 122
P45844|ABCG1_인간 ----SCYIMQDDMLLPHLTVQEAMMVSAHL-KLQEKDEGRREMVKEILTALGLLSCANTR 149
TAP1 GSQLSGGQRQAVALARALIRKPCVLILDDATSALDANSQLQVEQLL-YESPERYSRSVLL 207
O95477|ABCA1_인간 AGNYSGGNKRKLSTAMALIGGPPVVFLDEPTTGMDPKARRFLWNCA--LSVVKEGRSVVL 199
P08183|MDR1_인간 GTQLSGGQKQRIAIARALVRQPHILLLDEATSALDTESEKVVQEAL-DK--AREGRTCIV 206
P33527|MRP1_인간 GVNLSGGQKQRVSLARAVYSNADIYLFDDPLSAVDAHVGKHIFENVIGPKGMLKNKTRIL 193
P33897|ABCD1_인간 KDVLSGGEKQRIGMARMFYHRPKYALLDECTSAVSIDVEGKIFQAA-----KDAGIALLS 198
P61221|ABCE1_인간 VEDLSGGELQRFACAVVCIQKADIFMFDEPSSYLDVKQRLKAAITI--RSLINPDRYIIV 204
Q8NE71|ABCF1_인간 ICKLSGGQKARVVFAELACREPDVLILDEPTNNLDIESIDALGEAI-----NEYKGAVIV 177
P45844|ABCG1_인간 TGSLSGGQRKRLAIALELVNNPPVMFFDEPTSGLDSASCFQVVSLM--KGLAQGGRSIIC 207
TAP1 ITQHLSLVE-QADHILFLE-GGAIRE-GGTHQQLMEKK-----GCYWAMVQAPADAPE-- 257
O95477|ABCA1_인간 TSHSMEEC-EALCTRMAIMVNGRFRC-LGSVQHLKNRF----GDGYTIVVRIAGSNPDLK 253
P08183|MDR1_인간 IAHRLSTIQ-NADLIVVFQ-NGRVKE-HGTHQQLLAQK-----GIYFSMVSVQAGTKRQ- 257
P33527|MRP1_인간 VTHSMSYLP-QVDVIIVMS-GGKISE-MGSYQELLARD-----GAFAEFLRTYASTEQEQ 245
P33897|ABCD1_인간 ITHRPSLWK-YHTHLLQFDGEGGWKF-----EKLDSAARLSLTEEKQRLEQQLAGIPKMQ 252
P61221|ABCE1_인간 VEHDLSVLD-YLSDFICCLYG-VPSA-YGVVTMPF-----SVREGINIFLDGYVPTENLR 256
Q8NE71|ABCF1_인간 VSHDARLIT-ETNCQLWVVEEQSVSQIDGDFEDYK--R-----EVLEALGEVMVSRPRE- 228
P45844|ABCG1_인간 TIHQPSAKLFELFDQLYVLSQGQCVY-RGKVCNLVPYL----R-------DLGLNCPTYH 255
TAP1 ---------- 257
O95477|ABCA1_인간 PVQDFFGLAFPGSVLKEKHRNMLQYQLPSSLSSLA--288
P08183|MDR1_인간 ----------257
P33527|MRP1_인간 D----------AEENGVT----------253
P33897|ABCD1_인간 R----------RLQELCQIL----------262
P61221|ABCE1_인간 FRDASLVFKVAETANEEEVKKMCMYKYPGMKKKMGEF293
Q8NE71|ABCF1_인간 ----------228
P45844|ABCG1_인간 NPADFVMEVASGEY----------269

도면7

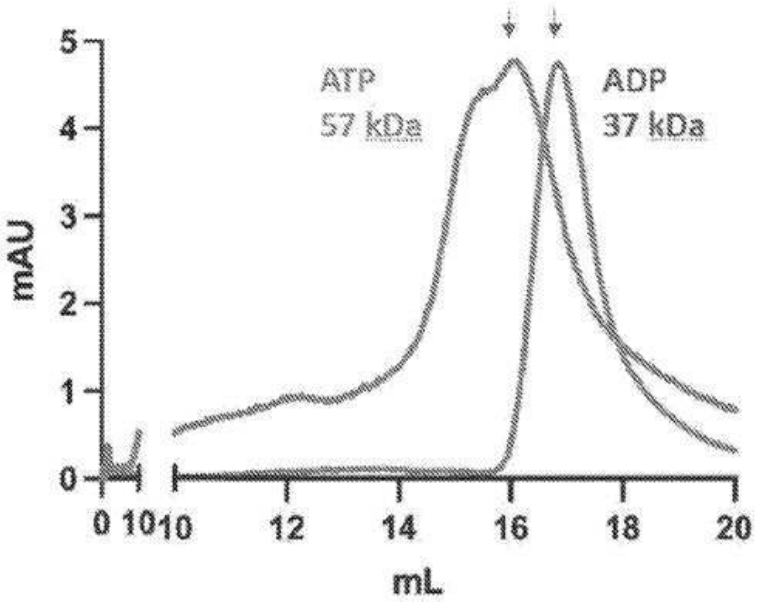
UniProtKB - Q03519 (TAP2_인간)

```
        10         20         30         40         50
MRLPDLRPWT SLLLVDAALL WLLQGPLGTL LPQGLPGLWL EGTLRLGGLW
        60         70         80         90        100
GLLKLRGLLG FVGTLLLPLC LATPLTVSLR ALVAGASRAP PARVASAPWS
       110        120        130        140        150
WLLVGYGAAG LSWSLWAVLS PPGAQEKEQD QVNNKVLMWR LLKLSRPDLP
       160        170        180        190        200
LLVAAFFFLV LAVLGETLIP HYSGRVIDIL GGDFDPHAFA SAIFFMCLFS
       210        220        230        240        250
FGSSLSAGCR GGCFTYTMSR INLRIREQLF SSLLRQDLGF FQETKTGELN
       260        270        280        290        300
SRLSSDTTLM SNWLPLNANV LLRSLVKVVG LYGFMLSISP RLTLLSLLHM
       310        320        330        340        350
PFTIAAEKVY NTRHQEVLRE IQDAVARAGQ VVREAVGGLQ TVRSFGAEEH
       360        370        380        390        400
EVCRYKEALE QCRQLYWRRD LERALYLLVR RVLHLGVQML MLSCGLQQMQ
       410        420        430        440        450
DGELTQGSLL SFMIYQESVG SYVQTLVYIY GDMLSNVGAA EKVFSYMDRQ
       460        470        480        490        500
PNLPSPGTLA PTTLQGVVKF QDVSFAYPNR PDRPVLKGLT FTLRPGEVTA
       510        520        530        540        550
LVGPNGSGKS TVAALLQNLY QPTGGQVLLD EKPISQYEHC YLHSQVVSVG
       560        570        580        590        600
QEPVLFSGSV RNNIAYGLQS CEDDKVMAAA QAAHADDFIQ EMEHGIYTDV
       610        620        630        640        650
GEKGSQLAAG QKQRLAIARA LVRDPRVLIL DEATSALDVQ CEQALQDWNS
       660        670        680
RGDRTVLVIA HRLQTVQRAH QILVLQEGKL QKLAQL
```

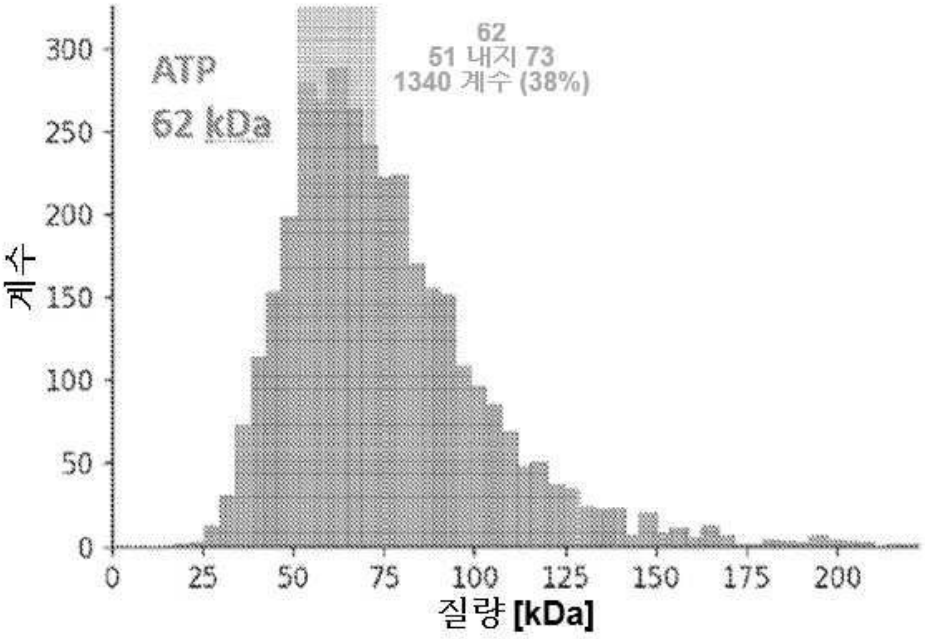
도면8



도면9

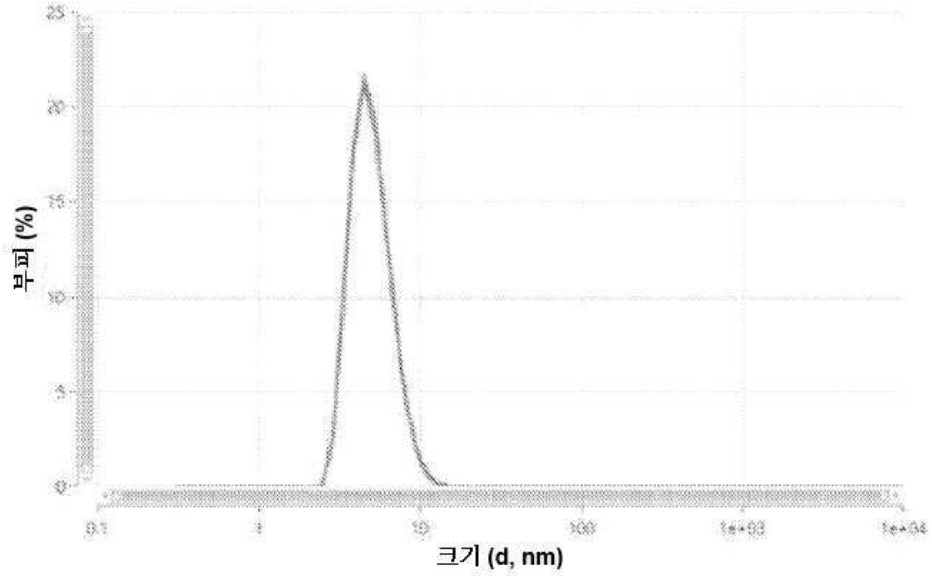

ATP
57 kDa
ADP
37 kDa
mAU
mL
0
1
2
3
4
5
0 10
10
12
14
16
18
20

도면10

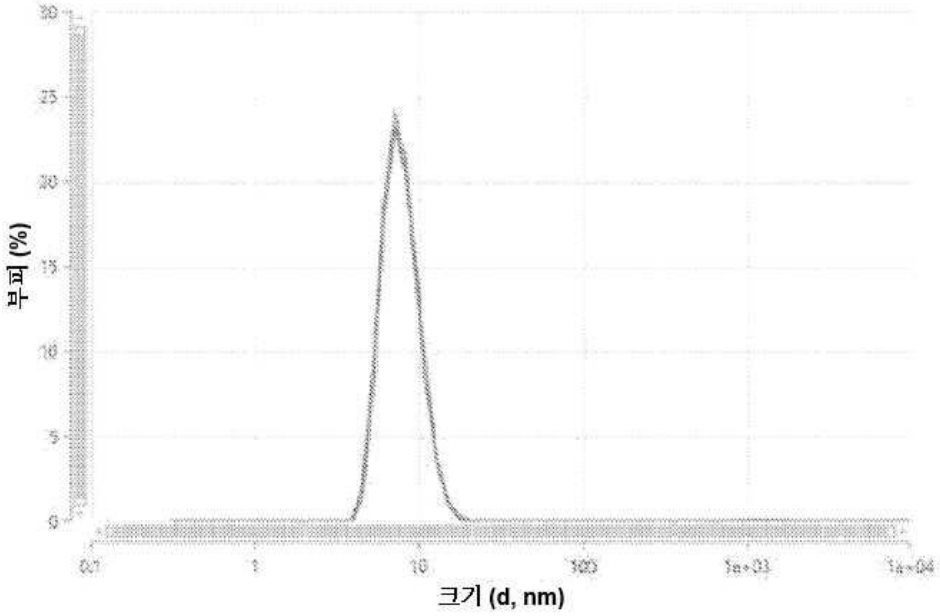

ATP
62 kDa
62
51 내지 73
1340 계수 (38%)
계수
질량 [kDa]
0
50
100
150
200
250
300
0
25
50
75
100
125
150
175
200

도면11

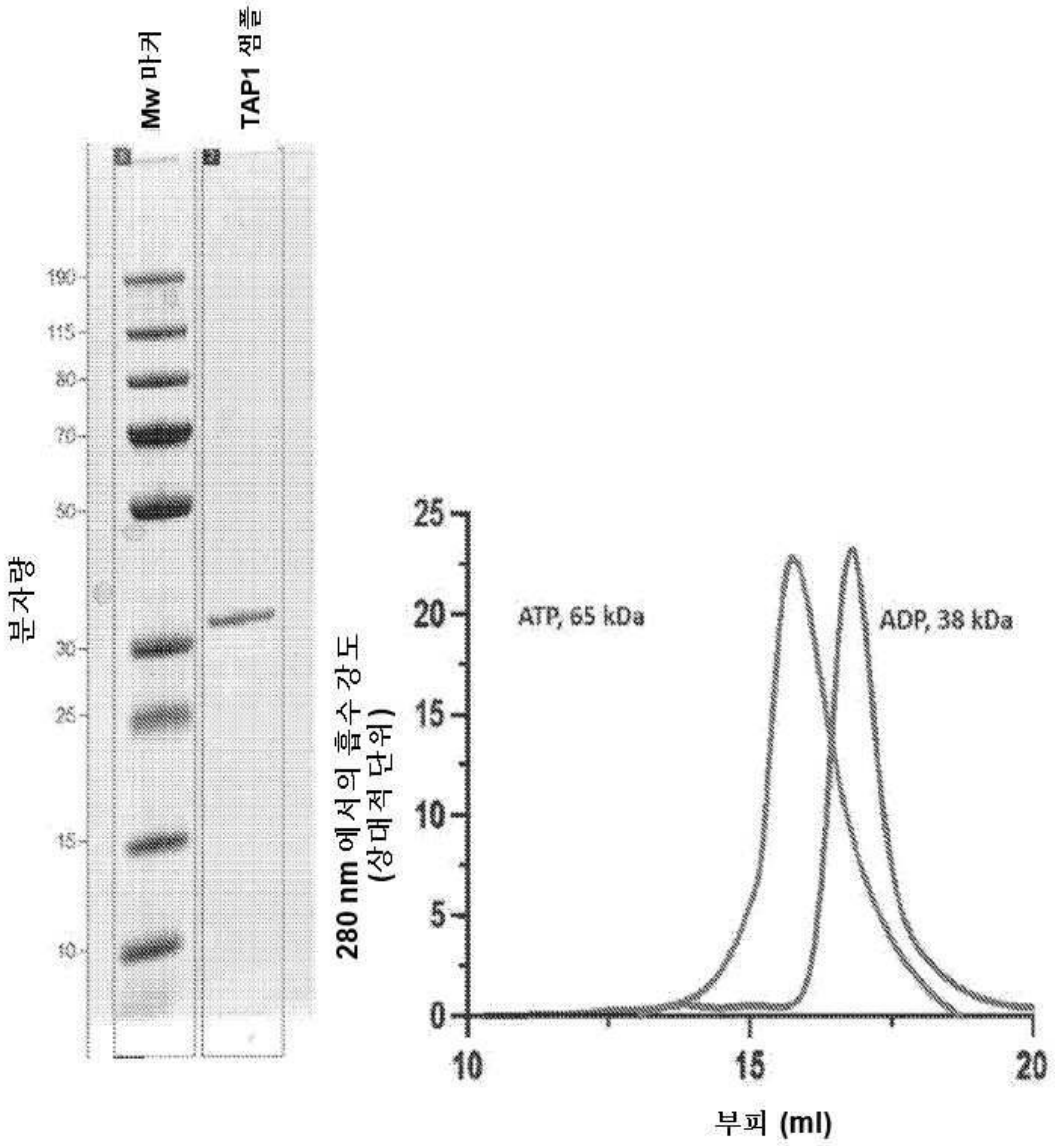
A



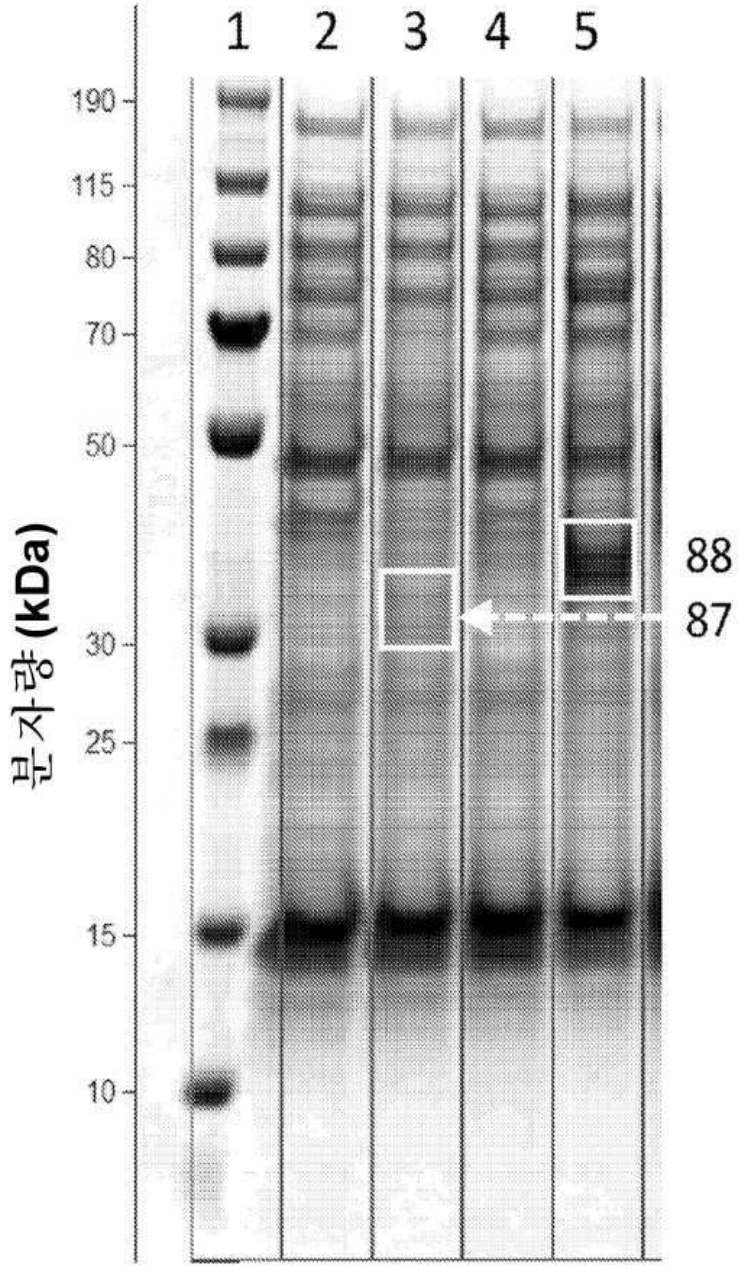
B



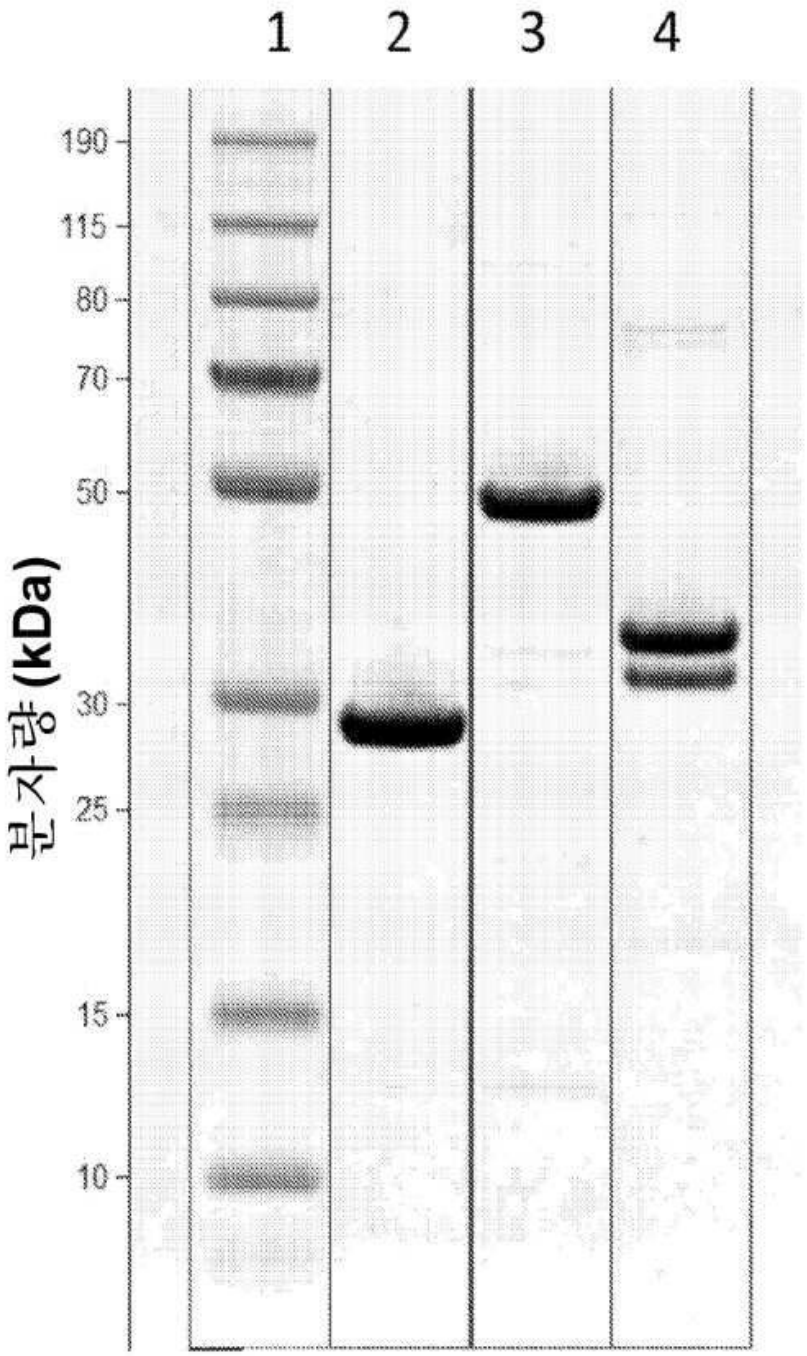
도면12


Mw 마커
TAP1 샘플
분자량
190
115
80
70
50
30
25
15
10
280 nm 에서의 흡수 강도
(상대적 단위)
25
20
15
10
5
0
ATP, 65 kDa
ADP, 38 kDa
10
15
20
부피 (ml)

도면13a



도면13b



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.