(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0048583
(43) 공개일자 2025년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/555 (2024.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/715* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/555 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2025-7008494
(22) 출원일자(국제) 2023년08월18일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년03월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/072512
(87) 국제공개번호 WO 2024/040247
국제공개일자 2024년02월22일
(30) 우선권주장
63/399,040 2022년08월18일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
리제너론 파아마슈티컬스, 인크.
미국 뉴욕 10591-6707 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
바이크, 에바-마리아
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
블로크, 니콜랭
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

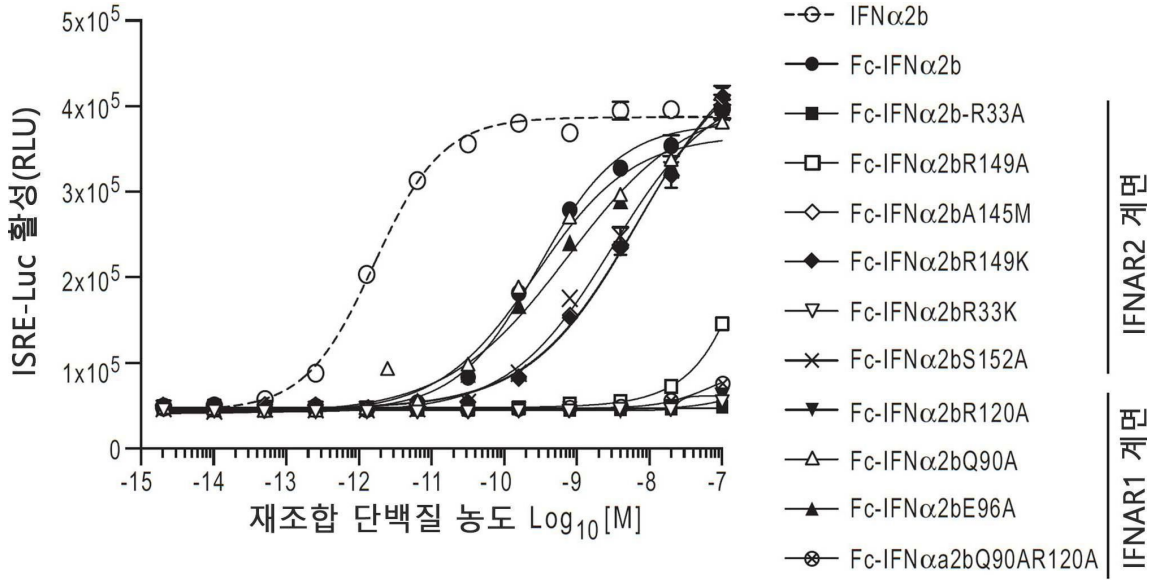
전체 청구항 수 : 총 50 항

(54) 발명의 명칭 **인터페론 전구단백질 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 개시는 프로테아제 활성화 IFN 전구단백질을 제공한다. IFN 전구단백질은 프로테아제 절단성 링커를 통해 Fc 모이어티에 부착되어 수용체에 결합하는 것이 입체적으로 방해받는 IFN 모이어티를 포함한다. 프로테아제가 *예를 들어*, 종양 부위에서 작용하면 프로테아제 절단성 링커가 절단되어 IFN 모이어티가 방출되고 활성화된다. 선택적으로 IFN 전구단백질은, 종양 관련 항원을 인식하고 전구단백질을 종양 부위로 유도하는 표적 모이어티를 더 포함한다. 또한, 본 개시는 IFN 전구단백질을 포함하는 약학적 조성물, 치료용 IFN 전구단백질의 사용 방법과, IFN 전구단백질을 인코딩하는 핵산, IFN 전구단백질을 발현하는 재조합 세포 및 IFN 전구단백질의 생성 방법을 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7156 (2013.01)
C07K 16/2818 (2013.01)
C07K 2317/52 (2013.01)
C07K 2317/522 (2013.01)
C07K 2317/526 (2013.01)
C07K 2319/30 (2013.01)
C07K 2319/50 (2013.01)

(72) 발명자
가르그, 비두르
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
울만, 에리카
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
장, 퉁
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
린, 챠-양
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
우, 쟈시
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내
스미스, 에릭
미국 10591 뉴욕 테리타운 올드 소오 밀 리버 로드 777 리제너론 파아마슈티컬스, 인크. 내

(30) 우선권주장
63/383,804 2022년11월15일 미국(US)
63/481,303 2023년01월24일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

다음으로 구성되는 I형 인터페론(IFN) 전구단백질로서

(a) 제1 폴리펩타이드 사슬에 있어서:

(i) 제1 면역글로불린 불변 도메인;

(ii) 제1 링커;

(iii) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

(iv) 제2 링커; 및

(v) 제1 Fc 도메인을 포함하고;

(b) 제2 폴리펩타이드 사슬에 있어서:

(i) 제2 면역글로불린 불변 도메인;

(ii) 제3 링커;

(iii) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

(iv) 제4 링커; 및

(v) 상기 제1 Fc 도메인과 결합하여 Fc 영역을 형성할 수 있는 제2 Fc 도메인을 포함하고,

상기 제1 링커, 제2 링커, 제3 링커 및 제4 링커 중 적어도 2개는 프로테아제 절단성 링커(PCL)이며, 선택적으로 IFN 단백질의 IFN 모이어티는 Fc 도메인에 의해 IFN 수용체와 결합하는 것을 입체적으로 방해받는, IFN 전구단백질.

청구항 2

제1항에서, 제1 및 제2 IFN 모이어티는 각각 (a) 전장 성숙 인간 IFNα1, IFNα2b, IFNβ, IFNω, IFNε 또는 IFNκ 또는 (b) N-말단 및/또는 C-말단에서 최대 15- 아미노산 절단이 있는 성숙 인간 IFNα1, IFNα2b, IFNβ, IFNω, IFNε 또는 IFNκ와 적어도 약 90 %, 적어도 약 95 % 또는 적어도 약 98 %의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, IFN 전구단백질.

청구항 3

제1항에서, 상기 제1 및 제2 IFN 모이어티는 각각 성숙 인간 IFNα1 또는 IFNα2b에 비해 하나 이상의 감쇄 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는, IFN 전구단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 어느 한 항에서, 상기 제1 및 제2 IFN 모이어티는 각각 L26A, F27A, R33A, R33K, L30A, D35E, H57Y, E58N, Q61S, H57S, E58S, H57A, E58A, Q61A, Q90A, E96A, R120A, L135A, R144A, R144S, R144T, R144Y, R144I, R144L, A145D, A145H, A145K, A145M, A145V, A145Y, R149A, R149K, S152A, R162A 및 E165D 중에서 선택된 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, IFN 전구단백질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 링커, 제2 링커, 제3 링커 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)인, IFN 전구단백질.

청구항 6

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 링커 및 제3 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)이고, 선택적으로 상기 제2 링커 및 제4 링커는 비절단성 링커(NCL)인, IFN 전구단백질.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 링커 및 제4 링커가 프로테아제 절단성 링커(PCL)이고, 선택적으로 상기 제1 링커 및 제3 링커가 비절단성 링커(NCL)인, IFN 전구단백질.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PCL은 표 101에 명시된 임의의 프로테아제에 의해 절단 가능한 기질 서열을 포함하는, IFN 전구단백질.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PCL은 표 102에 명시된 상기 기질 서열 중에서 선택된 하나 이상의 기질 서열을 포함하는, IFN 전구단백질.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PCL은 각각 표 103에 명시된 서열 중에서 선택된 하나 이상의 스페이서 서열을 포함하는, IFN 전구단백질.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PCL은 각각 표 104에 명시된 임의의 PCL 서열의 아미노산 서열 또는 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 변이체를 포함하는, IFN 전구단백질.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제3 링커가 동일하고/하거나 상기 제3 및 제4 링커가 동일한, IFN 전구단백질.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 Fc 도메인 및/또는 상기 제2 Fc 도메인이 힌지 도메인을 포함하는, IFN 전구단백질.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 표적 모이어티와 제2 표적 모이어티를 더 포함하는, IFN 전구단백질.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 제1 표적 모이어티 및 제2 표적 모이어티는 항체 또는 이의 항원 결합 단편인, IFN 전구단백질.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 제1 표적 모이어티 및 제2 표적 모이어티는 Fab 도메인을 포함하는, IFN 전구단백질.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 및 제2 표적 모이어티는 각각 상기 제1 및 제3 링커에 대한 N-말단인, IFN 전구단백질.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 면역글로불린 불변 도메인은 상기 제1 표적 모이어티의 일부이고, 상기 제2 면역글로불린 불변 도메인은 상기 제2 표적 모이어티의 일부인, IFN 전구단백질.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 제1 면역글로불린 불변 도메인이 CH3 도메인 또는 CH1 도메인인, IFN 전구단백질.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 도 1a, 도 2a 또는 도 2d에 도시된 바와 같이 구성된, IFN 전구단백질.

청구항 21

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 도 1b, 도 2b 또는 도 2e에 도시된 바와 같이 구성된, IFN 전구단백질.

청구항 22

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 도 1c, 도 2c 또는 도 2f에 도시된 바와 같이 구성된, IFN 전구단백질.

청구항 23

제14항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 세포외 기질(ECM) 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자, T세포 항원(TCA), 체크포인트 억제제, 종양 관련 항원(TAA), 수지상 세포(DC) 또는 기타 항원 제시 세포(APC) 항원 또는 자연 살해(NK) 세포 항원에 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

청구항 24

제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 (a) 표 106에 명시된 항체의 (i) CDR 또는 (ii) VH 및 VL 서열을 포함하거나 (b) 상기 표적 분자에 결합하기 위해 표 106에 명시된 항체와 경쟁하는, IFN 전구단백질.

청구항 25

제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 신데칸, 헤파라나제, 인테그린, 오스테오폰틴, 링크, 카데린, 라미닌, 라미닌 타입 EGF, 렉틴, 피브로넥틴, 노치, 넥틴(*예*, 넥틴-4), 테나신, 콜라겐(*예*, 콜라겐 타입 X) 및 매트릭신 중에서 선택적으로 선택되는 ECM 항원에 결합하는, IFN 전구단백질.

청구항 26

제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티가 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자에 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 항원은 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C 및 B7-H3 중에서 선택적으로 선택되는 T 세포 공동 자극 단백질인, IFN 전구단백질.

청구항 28

제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티가 체크포인트 억제제에 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제는 PDL1인, IFN 전구단백질.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 체크포인트 억제제는 PD1인, IFN 전구단백질.

청구항 31

제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 AFP, ALK, BAGE 단백질, BIRC5(서바이빈), BIRC7, β-카테닌, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, 탄산 탈수효소 IX, 캐스페이스-8, CALR, CEACAM5(암배아 항원 또는 CEA라고도 함), CCR5, CD19, CD20(MS4A1), CD22, CD30, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, 사이클린-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE 단백질(*예*: GAGE-1 또는 -2), GD2, GD3, GloboH, 글리피칸-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, MAGE 단백질(*예*: MAGE-1, -2, -3, -4, -6 및 -12), MART-1, 메조텔린, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16(CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA(FOLH1), RAGE 단백질, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TGF-β, TMPRSS2, Thompson-nouvelle 항원(Tn), TRP-1, TRP-2, 티로시나제 및 유로플라킨-3 중에서 선택적으로 선택된 종양 관련 항원(TAA)에 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

청구항 32

제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 XCR1, Clec9a, CD1c, CD11c, CD14, PDL1, 대식세포 만노스 수용체(CD206) 및 DEC-205 중에서 선택적으로 선택되는 수지상 세포(DC) 항원에 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

청구항 33

제14항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티가 자연 살해(NK) 세포 항원에 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Fc 영역이 동종이량체인, IFN 전구단백질.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 IFN 전구단백질을 인코딩하는, 핵산 또는 복수의 핵산.

청구항 36

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 IFN 전구단백질 또는 제35항의 핵산을 발현하도록 조작된, 숙주 세포.

청구항 37

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 IFN 전구단백질을 생성하는 방법으로서, 제36항의 숙주 세포를 배양하고 이에 의해 발현된 IFN 전구단백질을 회수하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 38

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 IFN 전구단백질 및 부형제를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 39

암을 치료는 방법으로서, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 IFN 전구단백질 또는 제38항의 약학적 조성물을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 40

제39항에서, 상기 IFN 전구단백질은 표적 분자에 결합할 수 있는 적어도 하나의 표적 모이어티를 포함하는, 방법.

청구항 41

제39항에서, 상기 암은 상기 표적 분자, *예를 들어*, 표 111에 명시된 TAA 및 관련 암의 발현과 연관되는, 방법.

청구항 42

제39항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 IFN 모이어티를 포함하는 활성화된 IFN 전구단백질은 상기 암 조직에 의해 발현되는 상기 IFN 전구단백질에서 하나 이상의 프로테아제 절단성 링커를 절단함으로써 생성되는, 방법.

청구항 43

IFN 전구단백질의 국소 전달 방법으로서, 하나 이상의 프로테아제 절단성 링커를 갖는, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 IFN 전구단백질(또는 IFN 전구단백질과 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 대상체에 투여하는 단계를 포함하고, 상기 각각의 링커는 상기 IFN 전구단백질이 국소적으로 전달될 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함하는, 방법.

청구항 44

암 조직에서 선택적으로 활성화되는 IFN 전구단백질로 암을 치료하는 방법으로서, 하나 이상의 프로테아제 절단성 링커를 갖는, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 IFN 전구단백질(또는 상기 IFN 전구단백질과 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하고, 상기 각각의 링커는 상기 IFN 전구단백질이 표적으로 하는 암 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함하는, 방법.

청구항 45

상기 대상체에게 전신 노출을 줄이거나 및/또는 전신 독성을 감소시킨 IFN 치료를 시행하는 방법으로서, 하나 이상의 프로테아제 절단성 링커를 갖는, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 IFN 전구단백질(또는 상기 IFN 전구단백질과 부형제를 포함하는 약학적 조성물)의 형태로 상기 IFN 치료를 대상체에게 시행하는 단계를 포함하고, 상기 각각의 링커는 IFN 치료가 바람직하거나 및/또는 의도된 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함하는 방법.

청구항 46

암 조직에서 선택적으로 활성화되는 IFN 전구단백질로 암을 치료하는 방법으로서, 하나 이상의 프로테아제 절단성 링커를 갖는, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 IFN 전구단백질(또는 상기 IFN 전구단백질과 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 필요로 하는 대상체에 투여하는 단계를 포함하고, 상기 각각의 링커는 상기 암 조직의 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함하는, 방법.

청구항 47

활성화된 IFN 전구단백질을 암 조직에 표적 전달하는 방법으로서, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 IFN 전구단백질(또는 상기 IFN 전구단백질과 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 IFN 전구단백질은:

(a) 상기 암 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현된 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적 모이어티를 포함하고, 및

(b) 하나 이상의 프로테아제 절단성 링커를 가지고 있으며, 각각은 IFN 요법이 바람직하거나 및/또는 의도된 조직에서 발현되는 하나 이상의 프로테아제를 위한 하나 이상의 기질을 갖는, 방법.

청구항 48

표적 조직에서 국소적으로 면역 반응을 유도하는 방법으로서, 상기 표적 조직에서 발현되는 표적 분자를 결합할 수 있는 하나 이상의 표적 모이어티와 하나 이상의 프로테아제 절단성 링커를 갖는, 제1항 내지 제34항 중 어느 한 항의 IFN 전구단백질(또는 상기 IFN 전구단백질과 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 상기 각각의 링커는 상기 표적 조직에서 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함하는, 방법.

청구항 49

항원에 대한 면역 반응을 강화하는 방법으로서, 상기 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 면역원성 제제를 제1항 내지 제34항 중 어느 한 한의 IFN 전구단백질(또는 상기 IFN 전구단백질과 부형제를 포함하는 약학적 조성물) 또는 그러한 IFN 전구단백질을 인코딩하는 핵산(*예*: 섹션 6.10.1에 설명된 바와 같이)과 함께 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 50

제39항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 투여가 비국소적인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **1. 관련 출원의 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2022년 8월 18일에 제출된 미국 가출원 번호 63/399,040, 2022년 11월 15일에 제출된 미국 가출원 번호 63/383,804 및 2023년 1월 24일에 제출된 미국 가출원 번호 63/481,303의 우선권을 주장하며, 각 내용은 여기에 참조함으로써 그 전체가 본 출원에 통합되어 있다.

[0003] **2. 서열 목록**

[0004] 본 출원은 전자적으로 제출된 서열 목록을 함유하며 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 2023년 8월 15일에 생성된 해당 사본의 이름은 RGN-020WO_SL.xml이며 크기는 361,113바이트이다.

배 경 기 술

[0005] **3. 배경기술**

[0006] I형 인터페론(IFN)은 종양 세포 증식을 직접적으로 억제하는 것으로 알려져 있다. I형 IFN은 혈액 종양(만성 골수성 백혈병, 모발 세포 백혈병, 다발성 골수종, 비호지킨 림프종) 및 고형 종양(흑색종, 신장 암종, 카포시 육종) 등 여러 유형의 암 치료에 유용하다. *예를 들어,* Zitvogel *외*, 2015, Nat Rev Immunol 15:405-414 및 Antonelli *외*, 2015, Cytokine Growth Factor Rev 26:121-131을 참조한다.

[0007] 제1형 IFN 치료의 특별한 장점은 선천성 및 적응성 세포독성 림프구 집단의 자극, 억제 세포 유형의 음성 조절, 증식 억제, 세포 사멸, 분화, 이동 및 세포 표면 항원 발현을 조절하여 종양 세포에 미치는 영향을 포함하여 항종양 면역 반응 생성의 여러 지점에서 개입할 수 있다는 것이다(Parker *외*, 2016, Nature Reviews Cancer 16:131-144).

[0008] 클리닉에서 I형 IFN을 사용하는 데 있어 가장 큰 장애물 중 하나는 이러한 치료와 관련된 심각한 부작용이다. 가장 자주 발생하는 부작용은 독감과 유사한 증상, 혈액학적 독성, 트랜스아미나제 증가, 메스꺼움, 피로 및 정신과적 후유증이다. 이러한 부작용은 치료 효과를 극대화하는 데 필요한 용량에 도달하고 유지하는 데 방해가 되며, 이러한 부작용은 I형 IFN 치료의 임상적 이점을 완전히 상쇄할 수 있다(Lotrich, 2009, Dialogues Clin Neurosci 11:417-425). I형 IFN은 신체의 대부분의 세포와 조직에서 발현되는 IFNAR1/IFNAR2 복합체를 통해 신호를 보낸다. 따라서 종양 반응성 면역 세포(*예:* Diamond *외*, 2011, J Exp Med. 208(10):1989-2003; Cauwels *외*, 2018, Cancer Res. 78(2): 463-474) 또는 종양 미세환경에 활성 I형 IFN을 우선적으로 또는 특이적으로 전달하는 능력은 I형 IFN의 지속적인 임상 사용을 위해 필수적이다. 종양 반응성 면역 세포 및/또는 종양에서 우선적으로 활성을 발휘하는 새로운 형태의 약물을 얻고 정상 IFNAR 발현 세포에 대한 부작용을 줄이기 위해 I형 IFN을 변형하는 전략이 필요하다.

[0009] 따라서 치료 효능과 안전성 프로파일이 개선된 새로운 I형 IFN 치료법이 업계에서 요구되고 있다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0010] **4. 발명의 내용**

[0011] 본 개시는 프로테아제(*예*: 종양 환경에서 발현되는 프로테아제)에 의해 활성화되는 IFN 전구단백질에 관한 것이다.

[0012] IFN 전구단백질은 수용체에 결합하는 것이 입체적으로 방해받는 IFN 모이어티를 포함하며, 프로테아제에 의해 IFN 전구단백질의 링커가 절단되어 IFN 모이어티가 활성화되도록 구성되어 IFN 모이어티의 입체적 방해가 완화된다. IFN 전구단백질은 특정 조직 또는 세포 유형으로 IFN 전구단백질을 지시하는 표적 모이어티를 더 포함할 수 있다.

[0013] 전형적으로, 본 개시의 IFN 전구단백질은 2개의 폴리펩타이드 사슬을 포함하며, 각각은 N-말단에서 C-말단까지, 제1 링커, 인터페론(IFN) 모이어티, 제2 링커 및 Fc 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 링커와 제2 링커는 모두 프로테아제 절단성 링커(PCL)이다. 다른 구현예에서는, 제1 링커와 제2 링커 중 하나만 PCL이고, 다른 하나는 비절단성 링커(NCL)이다. 따라서, 일부 구현예에서, 제1 링커는 PCL이고, 제2 링커는 NCL이다. 다른 구현예에서, 제1 링커는 NCL이고 제2 링커는 PCL이다.

[0014] IFN 전구단백질은, *예를 들어*, 하나 또는 양쪽 Fc 도메인에 대한 N-말단, 표적 모이어티(또는 그 구성 요소, *예를 들어* Fab의 한 사슬)를 더 포함할 수 있다. 표적화 부분은 예를 들어 종양 표면에 존재하는 표적 분자(*예를 들어* 종양 관련 항원) 또는 종양 미세환경의 다른 성분(*예를 들어* 세포외 기질("ECM") 또는 종양 림프구)에 결합할 수 있는 항원 결합 도메인("ABD")을 포함한다.

[0015] 본 개시의 IFN 전구단백질에 사용될 수 있는 예시적인 IFN 모이어티는 섹션 6.3에 설명되어 있다.

[0016] 본 개시의 IFN 전구단백질에 사용될 수 있는 프로테아제 절단성 링커는 섹션 6.4에 설명되어 있다.

[0017] 본 개시의 IFN 전구단백질에 사용할 수 있는 비절단성 링커는 섹션 6.5에 설명되어 있다.

[0018] 본 개시의 IFN 전구단백질에 사용될 수 있는 표적 모이어티는 섹션 6.6에 설명되어 있으며, 표적 모이어티 형식은 섹션 6.7에 공개되어 있다.

[0019] 본 개시의 IFN 전구단백질에 통합될 수 있는 Fc 도메인은 섹션 6.8에 설명되어 있다.

[0020] 본 개시의 예시적인 IFN 전구단백질은 섹션 6.2 및 번호가 지정된 구현예 1 내지 146에 설명되어 있다.

[0021] 본 개시는 또한 본 개시의 IFN 전구단백질을 인코딩하는 핵산을 제공한다. IFN 전구단백질을 인코딩하는 핵산은 단일 핵산(*예*: IFN 전구단백질의 모든 폴리펩타이드 사슬을 인코딩하는 벡터) 또는 복수의 핵산(*예*: IFN 전구단백질의 서로 다른 폴리펩타이드 사슬을 인코딩하는 2개 이상의 벡터)일 수 있다. 본 개시는 또한 본 개시의 핵산 및 IFN 전구단백질을 발현하도록 조작된 숙주 세포 및 세포주를 제공한다. 본 개시는 또한 본 개시의 IFN 전구단백질을 생성하는 방법을 제공한다. 예시적인 핵산, 숙주 세포, 세포주 및 IFN 전구단백질을 생산하는 방법은 제 6.9항 및 구현예 147 내지 149에 설명되어 있다.

[0022] 본 개시는 또한 본 개시의 IFN 전구단백질을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 예시적인 제약 조성물은 섹션 6.10 및 번호가 지정된 구현예 150에 설명되어 있다.

[0023] 본 발명은 IFN 전구단백질 및 본 개시의 약학 조성물을 암 치료와 같은 용도로 사용하는 방법을 추가로 제공한다. 예시적인 방법은 섹션 6.11과 번호가 매겨진 실시 예 151 내지 201에 설명되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] **5. 도면의 간단한 설명**

도 1a-1c는 인터페론 모이어티 옆에 프로테아제 절단성 링커가 있는 본 개시의 세 개의 IFN 전구단백질의 구성을 나타내는 만화이다. **도 1a**는 전체 구성 항체-PCL-IFN-PCL-Fc를 갖는 IFN 전구단백질을 나타낸다. **도 1b**는 Fab-PCL-IFN-PCL-hinge-Fc 구성을 갖는 단일 힌지 IFN 전구단백질을 나타낸다. **도 1c**는 Fab-hinge-PCL-IFN-PCL-hinge-Fc 구성을 갖는 이중 힌지 IFN 전구단백질을 나타낸다. Fab의 형태로 표적 모오이티를 갖는 것으로 표시되지만, Fab의 VH, VL 및 CL 도메인은 비표적 IFN 전구단백질의 경우 선택적이거나 scFv와 같은 다른 표적 모이어티로 대체될 수 있다.

도 2a-2f는 인터페론 모이어티의 한쪽에만 프로테아제 절단성 링커(PCL)가 있고 인터페론 모이어티의 다른 쪽에는 비절단성 링커(NCL)가 있는 본 개시의 6개 IFN 전구단백질의 구성을 나타내는 만화이다. **도 2a**는 전체 구성

항체-NCL-IFN-PCL-Fc를 갖는 IFN 전구단백질을 나타낸다. **도 2b**는 Fab-NCL-IFN-PCL-hinge-Fc 구성을 갖는 단일 힌지 IFN 전구단백질을 나타낸다. **도 2c**는 Fab-hinge-NCL-IFN-PCL-hinge-Fc 구성을 갖는 이중 힌지 IFN 전구단백질을 나타낸다. **도 2d**는 전체 구성 항체-PCL-IFN-NCL-Fc를 갖는 IFN 전구단백질을 나타낸다. **도 2e**는 Fab-PCL-IFN-NCL-hinge-Fc 구성을 갖는 단일 힌지 IFN 전구단백질을 나타낸다. **도 2f**는 Fab-hinge-PCL-IFN-NCL-hinge-Fc 구성을 갖는 이중 힌지 IFN 전구단백질을 나타낸다. Fab의 형태로 표적 모이어티를 갖는 것으로 표시되지만, Fab의 VH, VL 및 CL 도메인은 비표적 IFN 전구단백질의 경우 선택적이거나 scFv와 같은 다른 표적 모이어티로 대체될 수 있다.

도 3은 도 1에 따른 예시적인 표적 IFN 전구단백질과 그 구성 폴리펩타이드 사슬의 표이다. TM은 표적 모이어티, HC는 항체 중쇄, LC는 항체 경쇄, IFN은 인터페론(IFN) 모이어티, ΔN 및 ΔC는 IFN 모이어티의 IFN 서열에서 각각 N- 및 C- 말단 절단(*예*: 섹션 6.3에 설명)을 의미하며 PCL은 프로테아제 절단성 링커(*예*: 섹션 6.4에 설명된 바와 같이), Fc는 Fc 도메인(*예*: 섹션 6.8에 설명된 바와 같이), 힌지는 항체의 힌지 서열을 지칭하고 LongHinge 및 ShortHinge는 면역글로불린 힌지 서열의 전장 또는 절단 버전을 나타낸다(*예*: 섹션 6.8.3에 설명된 바와 같이). 또한, IFN 모이어티에 프로테아제 절단성 링커(PCL)가 측면에 있는 것으로 표시되지만, 각 사슬 1 및 사슬 2의 PCL 중 하나는 *예를 들어* 섹션 6.5에 설명된 대로 비절단성 링커(NCL)로 대체될 수 있다.

도 4a-4c는 본 개시의 IFN 전구단백질 구조에 통합될 수 있는 예시적인 IFN 분자의 크기 배제 초고성능 액체 크로마토그래피(SE-UPLC) 프로파일이다. **도 4a**는 N-말단 Fc 도메인과 C-말단 IFN 모이어티를 가진 IFN 분자, Fc-IFNα1의 SEC 프로파일을 보여준다. **도 4b**는 N-말단 Fc 도메인과 C-말단 IFN 모이어티를 가진 IFN 분자, Fc-IFNα2b의 SEC 프로파일을 보여준다. **도 4c**는 N-말단 IFN 도메인과 C-말단 Fc 도메인을 가진 IFN 분자, IFNα2b-Fc의 SEC 프로파일을 보여준다.

도 5a-5c는 N-말단 또는 C-말단에 Fc 분자에 연결된 예시적인 IFN 분자의시험관 *내* 활성을 나타낸다. **도 5a**의 만화 이미지는 IFN의 N-말단 및 C-말단 Fc 융합을 나타낸다. Fc-IFN은 N-말단 Fc 도메인과 C-말단 IFN 모이어티를 가진 IFN 분자의 전체 표현이고, IFN-Fc는 N-말단 IFN 모이어티와 C-말단 Fc 도메인을 가진 IFN 분자의 전체 표현이다. **도 5b**는 연결되지 않은 IFNα2b와 비교한 예시적인 IFN 분자, Fc-IFNα2b 및 IFNα2b-Fc의 시험관 *내* 활성을 보여주는 그래프이다. **도 5c**는 다른 비연결 IFN과 비교하여 Fc-IFN 분자의 활성을 보여주는 그래프이다.

도 6a-6d는 본 개시의 IFN 전구단백질 구조에 통합될 수 있는 예시적인 돌연변이 IFN 분자의 SE-UPLC 프로파일이다. **도 6a**는 돌연변이 IFN 분자인 Fc-IFNα2bR33A의 SE-UPLC 프로파일을 보여준다. **도 6b**는 돌연변이 IFN 분자인 Fc-IFNα2bR149A의 SE-UPLC 프로파일을 보여준다. **도 6c**는 돌연변이 IFN 분자인 Fc-IFNα2bR120A의 SE-UPLC 프로파일을 보여준다. **도 6d**는 돌연변이 IFN 분자인 Fc-IFNα2bS152A의 SE-UPLC 프로파일을 보여준다.

도 7a-7b는 본 개시의 IFN 전구단백질 구조에 통합될 수 있는 예시적인 돌연변이 IFN 분자의 시험관 *내* 활성을 나타낸 것이다. **도 7a**의 만화 이미지는 야생형(WT) 또는 돌연변이(Mut) Fc-IFN 분자의 전체 구조를 나타낸다. **도 7b**는 IFNAR1 또는 IFNAR2 인터페이스에 영향을 미치는 돌연변이가 있는 Fc-IFNα2b 분자의 *시험관 내* 활성을 보여주는 그래프이다.

도 8a-8c는 예시적인 IFN 전구단백질 구조의 SE-UPLC 프로파일이다. **도 8a**는 단일 힌지 전장 IFN 전구단백질인 aPD1-singleHinge-FLIFN의 SE-UPLC 프로파일을 보여준다. **도 8b**는 이중 힌지 IFN 전구단백질인 aPD1-doubleHingeLong-IFN의 SE-UPLC 프로파일을 보여준다. **도 8c**는 두 개의 Fc 영역이 있는 IFN 전구단백질의 SEC 프로파일을 보여준다.

도 9a-9b는 단일 및 이중 힌지 IFN 전구단백질의 시험관 *내* 효소 분해를 보여준다. **도 9a**는 uPA에 의해 절단된 세 개의 단일 힌지 전구단백질, 두 개의 이중 힌지 IFN 전구단백질 및 양성 대조군을 나타내는 겔 이미지이다. 마찬가지로, **도 9b**는 MMP2 및 MMP9에 의해 절단된 동일한 단일 및 이중 IFN 전구단백질을 보여주는 겔 이미지이다.

도 10a-10b는 예시적인 IFN 전구단백질의 *시험관 내* 활성을 IFNα2b 및 Fc-IFNα2b와 비교하여 나타낸 것이다. **도 10a**는 두 개의 단일 힌지 IFN 전구단백질(전장 및 절단)과 하나의 이중 힌지 IFN 전구단백질의 *시험관 내* 활성을 보여주는 그래프이다. **도 10b**는 도 10a의 동일한 IFN 전구단백질에 MMP 완충액만 첨가했을 때(점선) 또는 MMP 완충액 및 효소 혼합물을 함께 첨가했을 때(점선) 활성이 어떻게 변화하는지를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] **6. 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0026] **6.1. 정의**

[0027] 본 명세서에 사용된 다음 용어는 다음과 같은 의미를 갖는다:

[0028] **ABD 사슬, 표적 모이어티 사슬:** 표적 모이어티와 그 안의 항원 결합 부위(ABD)는 하나의 폴리펩타이드 사슬(*예*: scFv 또는 scFab의 경우)로 존재하거나 둘 이상의 폴리펩타이드 사슬(*예*: Fab 또는 Fv의 경우)의 결합을 통해 형성될 수 있다. 본 명세서에 사용된 용어 "ABD 사슬" 및 "표적 모이어티 사슬"은 단일 폴리펩타이드 사슬에 존재하는 ABD 또는 표적 모이어티의 전부 또는 일부를 의미한다. "ABD 사슬" 또는 "표적 모이어티 사슬"이라는 용어의 사용은 편의 및 설명 목적에 한한 것이며 특정 구성이나 생산 방법을 함축하지 않는다. 또한, IFN 전구단백질을 설명할 때 ABD 또는 표적 모이어티에 대한 언급은 문맥상 달리 명시되지 않는 한 ABD 사슬 또는 표적 모이어티 사슬을 포괄한다. 따라서 Fc 도메인이 타겟팅 모이어티에 작동적으로 연결된 IFN 프로단백질을 설명할 때, Fc 도메인은 펩타이드 결합을 통해 직접 또는 간접적으로(*예를 들어*, 링커를 통해) (1) Fab 또는 Fv의 제1 ABD 또는 표적 모이어티 사슬(Fab 또는 Fv의 다른 성분과 제2의 관련 ABD 또는 표적 모이어티 사슬에) 또는 (2) scFv 또는 scFab을 포함하는 ABD 또는 표적 모이어티 사슬과 공유 결합할 수 있다.

[0029] **약, 대략:** 용어 "약", "대략" 등은 명세서 전반에 걸쳐 숫자 앞에 사용되어 숫자가 반드시 정확하지 않음을 나타낸다(*예를 들어*, 비율, 측정 정확도 및/또는 정밀도의 변화, 타이밍 *등*을 설명하기 위함). "약 X" 또는 "대략 X"(여기서, X는 숫자임)의 개시내용이 또한 "X"의 개시 내용인 것으로 이해되어야 한다. 이와 같이, 예를 들어, 하나의 서열이 또 다른 서열에 대한 "약 X%의 서열 동일성"을 갖는 구현예의 개시 내용은 또한 다른 서열에 대한 "X%의 서열 동일성"을 갖는 구현예의 개시내용이다.

[0030] **활성화한다, 활성화:** 본 개시의 IFN 전구단백질과 관련하여 "활성화", "활성화하다" 등의 용어는 프로테아제-절단성 링커의 프로테아제 매개 효소적 절단으로 인해 입체적으로 차단되는 불변 도메인으로부터 IFN 모이어티가 방출되는 것을 지칭한다.

[0031] **및, 또는:** 달리 표시되지 않는 한, "또는" 접속사는 대안에서의 특징 선택(A 또는 B, 여기서 A의 선택은 B와 상호 배타적임) 및 결합에서의 특징 선택(A 또는 B, 여기서 A 및 B가 둘 다 선택됨)을 모두 포함하는, 불 방식(Boolean)의 논리 연산자로서 올바른 의미로 사용되는 것으로 의도된다. 본문의 일부 위치에서, "및/또는"의 용어는 동일한 목적에 사용되고, 이는 "또는"이 상호 배타적인 대안을 참조하여 사용된다는 것을 암시하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0032] **항체:** 본 명세서에서 사용된 용어 "항체"는 항원에 비공유적으로, 가역적으로 및 특이적으로 결합할 수 있는 면역글로불린 패밀리의 폴리펩타이드(또는 폴리펩타이드의 세트)를 지칭한다. 예를 들어, IgG 유형의 자연적으로 발생하는 "항체"는 이황화 결합에 의해 상호 연결된 적어도 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 사량체이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본 명세서에서는 VH로 약칭함) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, 즉 CH1, CH2, 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본 명세서에서는 VL로 약칭함) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인(본 명세서에서는 CL로 약칭함)으로 구성된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역(FR)이라고 하는 더 보존된 영역이 산재된, 상보성 결정 영역(CDR)이라고 하는 초가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노-말단에서 카복시-말단으로, 다음의 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다. FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호 작용하는 결합 도메인을 포함한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(*예를 들어*, 이펙터 세포) 및 고전적 보체 시스템의 제1 구성요소(C1q)를 포함하여, 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 용어 "항체"는 단일 클론 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 낙타화 항체, 키메라 항체, 이중특이적 또는 다중특이적 항체 및 항-이디오타입(항-id) 항체를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 항체는 임의의 아이소타입/부류(*예를 들어*, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY) 또는 하위부류(*예를 들어*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2)를 가질 수 있다. 경쇄 및 중쇄는 둘 다 구조적 및 기능적 상동성 영역으로 나뉜다. 용어 "불변" 및 "가변"은 기능적으로 사용된다. 이와 관련하여, 경쇄(VL) 및 중쇄(VH) 부분 둘 다의 가변 도메인이 항원 인식 및 특이성을 결정한다는 것이 이해될 것이다. 반대로, 경쇄(CL) 및 중쇄(CH1, CH2 또는 CH3)의 불변 도메인은 분비, 태반 이동성, Fc 수용체 결합, 보체 결합 등과 같은 중요한 생물학적 특성을 부여한다. 관례에 따라 불변 영역 도메인의 넘버링은 항체의 항원 결합 도메인 또는 아미노 말단에서 멀어질수록 증가한다. N-말단은 가변 영역이고 C-말단은 불변 영역이며, CH3 및 CL 도메인은 각각 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 카복시-말단을 나타낸다. 문맥상 달리 지시하지 않는 한, 편의를 위해 항체에 대한 언급은 또한 자연 비발생 항원 결합 도메인 및/또는 자연 비발생 구성을 갖는 항원 결합 도메인을 포함하는 조작된 항체뿐만

아니라 항체 단편도 지칭한다.

[0033] **항원 결합 도메인**: 본 명세서에 사용된 "항원 결합 도메인" 또는 "ABD"라는 용어는 항원에 비공유적으로 가역적으로 그리고 특이적으로 결합하는 능력을 가진 항체 또는 항체 단편(*예*: 표적 모이어티)의 일부를 지칭한다. ABD를 포함할 수 있는 항체 단편의 예로는 단일 사슬 Fv(scFv), Fab 단편(VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 구성된 1가 단편), F(ab)2 단편(힌지 영역에서 이황화 다리로 연결된 두 개의 Fab 단편으로 구성된 2가 단편), VH 및 CH1 도메인으로 구성된 Fd 단편, 항체의 단일 팔의 VL 및 VH 도메인으로 구성된 Fv 단편, VH 도메인으로 구성된 dAb 단편(Ward *외*, 1989, Nature 341:544-546), 및 분리된 상보성 결정 영역(CDR)이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다. 따라서, 용어 "항체 단편"은 항체의 단백질 분해 단편(*예를 들어*, Fab 및 $F(ab)_2$ 단편) 및 항체의 하나 이상의 부분을 포함하는 조작된 단백질(*예를 들어*, scFv)을 모두 포함한다. 항체 단편은 또한 단일 도메인 항체, 맥시바디(maxibody), 미니바디(minibody), 인트라바디(intrabody), 디아바디(diabody), 트리아바디(triabody), 테트라바디(tetrabody), v-NAR 및 비스-scFv 내로 혼입될 수 있다(*예*: Hollinger 및 Hudson, 2005, Nature Biotechnology 23: 1126-1136 참조).

[0034] **연관된**: IFN 전구단백질의 맥락에서 "연관"이라는 용어는 두 개 이상의 폴리펩타이드 사슬 사이의 기능적 관계를 의미한다. 특히, 용어 "회합된"은 2개 이상의 폴리펩타이드가, *예를 들어*, 분자 상호 작용을 통해 비공유적으로 또는 하나 이상의 이황화 다리 또는 화학적 가교를 통해 공유적으로 서로 회합되어, 기능적 IFN 전구단백질을 생성하는 것을 의미한다. 본 개시의 IFN 전구단백질에 존재할 수 있는 연관성의 예로는, Fc 영역(섹션 6.8에 설명된 바와 같이 동이량체 또는 이종이량체)을 형성하기 위한 Fc 도메인 간의 연관성, Fab 또는 Fv에서 VH 및 VL 영역 간의 연관성, Fab에서 CH1 및 CL 간의 연관성이 포함되지만 이에 한정되지 않는다.

[0035] **암**: 용어 "암"은 비정상적인 세포의 제어되지 않는(그리고 종종 빠른) 성장을 특징으로 하는 질환을 지칭한다. 암세포는 국소적으로 또는 혈류와 림프계를 통해 신체의 다른 부위로 퍼질 수 있다. 본원에는 다양한 암의 예시가 기술되어 있으며 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신장암, 간암, 뇌암, 부신암, 신경절암, 담도암, 골암, 자궁내막암, 안암, 나팔관암, 생식기암, 대장암, 수막암, 식도암, 복막암, 뇌하수체암, 음경암, 태반암, 흉막암, 침샘암, 소장암, 위암, 고환암, 흉선암, 갑상선암, 상부 호흡소화암, 요로암, 질암, 외음부암 , 림프종, 백혈병, 폐암 등(*예*: 임의의 전술한 유형의 임의의 TAA-양성 암)을 포함하나 이에 국한되지 않는다.

[0036] **상보성 결정 영역**: 본 명세서에 사용된 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항원 특이성 및 결합 친화성을 부여하는 항체 가변 영역 내의 아미노산의 서열을 지칭한다. 예를 들어, 일반적으로 각각의 중쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(*예를 들어*, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)이 있고, 각각의 경쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)이 있다. 해당 CDR의 정확한 아미노산 서열 경계는 다음에 기술된 것을 포함하여 잘 알려진 여러 체계 중 하나를 사용하여 결정할 수 있다. Kabat *외*, 1991, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 제5판. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD ("Kabat" 번호 지정 체계), Al-Lazikani *외*, 1997, JMB 273:927-948 ("Chothia" 번호 지정 체계) 및 ImMunoGenTics (IMGT) 번호 지정(Lefranc, 1999, The Immunologist 7:132-136; Lefranc *외*, 2003, Dev. Comp. Immunol. 27:55-77("IMGT" 번호 지정 체계). 예를 들어, 고전적 형식의 경우, Kabat에 따르면, 중쇄 가변 도메인(VH)의 CDR 아미노산 잔기는 31-35(CDR-H1), 50-65(CDR-H2), 95-102(CDR-H3), 경쇄 가변 도메인(VL)의 CDR 아미노산 잔기는 24-34(CDR-L1), 50-56(CDR-L2), 89-97(CDR-L3) 번호가 부여된다. Chothia에 따르면, VH의 CDR 아미노산은 26-32(CDR-H1), 52-56(CDR-H2), 95-102(CDR-H3)로 번호가 매겨지고, VL의 아미노산 잔기는 26-32(CDR-L1), 50-52(CDR-L2), 91-96(CDR-L3)으로 번호가 부여된다. Kabat 및 Chothia의 CDR 정의를 결합하면, CDR은 인간 VH의 아미노산 잔기 26-35(CDR-H1), 50-65(CDR-H2), 95-102(CDR-H3)와 인간 VL의 아미노산 잔기 24-34(CDR-L1), 50-56(CDR-L2), 89-97(CDR-L3)로 구성된다. IMGT에 따르면, VH의 CDR 아미노산 잔기는 약 26-35(CDR-H1), 51-57(CDR-H2), 93-102(CDR-H3)로 번호가 부여되고, VL의 CDR 아미노산 잔기는 약 27-32(CDR-L1), 50-52(CDR-L2), 89-97(CDR-L3)("Kabat" 기준 번호)로 번호가 부여된다. IMGT에 따르면, 항체의 CDR 영역은 IMGT/DomainGap Align 프로그램을 사용하여 결정할 수 있다.

[0037] **불변 도메인**: "불변 도메인"이란 용어는 면역글로불린의 CH1, CH2, CH3 또는 CL 도메인을 의미한다.

[0038] "CH1 도메인"이라는 용어는 중쇄 불변 도메인에서 가변 도메인과 힌지를 연결하는 중쇄 불변 영역을 의미한다. 일부 구현예에서, "CH1 도메인"이라는 용어는 아미노산 118 내지 215(EU 번호)에 걸쳐 있는 면역 글로불린 분자의 영역을 지칭한다. "CH1 도메인"이라는 용어는 야생형 CH1 도메인과 그 변이체(*예: 자연적으로 발생하지 않는 CH1 도메인 또는 변형된 CH1 도메인*)를 포함한다. 예를 들어, "CH1 도메인"이란 용어는 야생형 IgG1, IgG2,

IgG3 및 IgG4 CH1 도메인과 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 및/또는 최대 5, 4, 3, 2 또는 1개의 돌연변이(*예*: 치환, 결실 및/또는 추가)를 갖는 그 변이체를 포함한다. 예시적인 CH1 도메인에는 항체의 생물학적 활성을 변경하는 돌연변이(예: ADCC, CDC 또는 반감기)가 있는 CH1 도메인이 포함된다.

[0039] "CH2 도메인"이라는 용어는 중쇄 불변 도메인에서 힌지와 CH3 도메인을 연결하는 중쇄 불변 영역을 의미한다. 일부 구현예에서, "CH2 도메인"이라는 용어는 아미노산 238 내지 340(EU 번호)에 걸쳐 있는 면역 글로불린 분자의 영역을 지칭한다. "CH2 도메인"이라는 용어는 야생형 CH2 도메인과 그 변이체(*예*: 자연적으로 발생하지 않는 CH2 도메인 또는 변형된 CH2 도메인)를 포함한다. 예를 들어, "CH2 도메인"이란 용어는 야생형 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 CH2 도메인과 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 및/또는 최대 5, 4, 3, 2 또는 1개의 돌연변이(*예*: 치환, 결실 및/또는 추가)를 갖는 그 변이체를 포함한다. 예시적인 CH2 도메인에는 ADCC, CDC, 정제, 이량체화 및 반감기와 같이 항체의 생물학적 활성을 변경하는 돌연변이가 있는 CH2 도메인이 포함된다.

[0040] "CH3 도메인"이라는 용어는 중쇄 불변 도메인에서 CH2 도메인의 C-말단에 있는 중쇄 불변 영역을 의미한다. 일부 구현예에서, "CH3 도메인"이라는 용어는 아미노산 341 내지 447(EU 번호)에 걸쳐 있는 면역 글로불린 분자의 영역을 지칭한다. "CH3 도메인"이라는 용어는 야생형 CH3 도메인과 그 변이체(*예*: 자연적으로 발생하지 않는 CH3 도메인 또는 변형된 CH3 도메인)를 포함한다. 예를 들어, "CH3 도메인"이란 용어는 야생형 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 CH3 도메인과 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 및/또는 최대 5, 4, 3, 2 또는 1개의 돌연변이(*예*: 치환, 결실 및/또는 추가)를 갖는 그 변이체를 포함한다. 예시적인 CH3 도메인에는 ADCC, CDC, 정제, 이량체화 및 반감기와 같이 항체의 생물학적 활성을 변경하는 돌연변이가 있는 CH3 도메인이 포함된다.

[0041] "CL 도메인"이라는 용어는 면역글로불린 경쇄의 불변 영역을 의미한다. "CL 도메인"이라는 용어는 야생형 CL 도메인(*예*: 카파 또는 람다 경쇄 불변 영역)과 그 변이체(*예*: 자연적으로 발생하지 않는 CL 도메인 또는 변형된 CL 도메인)를 모두 포괄한다. 예를 들어, "CL 도메인"이라는 용어는 야생형 카파 및 람다 불변 도메인과 1, 2, 3, 4, 5, 1-3, 1-5, 3-5 및/또는 최대 5, 4, 3, 2 또는 1개의 돌연변이(*예*: 치환, 결실 및/또는 추가)를 갖는 그 변이체를 포함한다.

[0042] **이펙터 기능:** "이펙터 기능"이란 용어는 항원 결합 도메인 이외의 항체 도메인을 통한 결합에 의해 매개되는 항체 분자의 활성을 말하며, 일반적으로 이펙터 분자의 결합에 의해 매개된다. 이펙터 기능에는 보체 매개 이펙터 기능이 포함되며, 예를 들어 보체의 C1 성분과 항체의 결합에 의해 매개된다. 보체의 활성화는 세포 병원균의 옵소닌화 및 용해에 중요하다. 보체의 활성화는 또한 염증 반응을 자극하고 자가 면역 과민증에도 관여할 수 있다. 이펙터 기능은 또한 Fc 수용체(FcR)-매개 이펙터 기능을 포함하며, 이는 Fc 수용체(FcR)에 항체의 불변 도메인의 결합 시 촉발될 수 있다. 항체가 세포 표면의 Fc 수용체에 결합하면 항체-코팅 입자의 포식(engulfment) 및 파괴, 면역 복합체의 소거, 킬러 세포에 의한 항체-코팅 표적 세포의 용해(항체-의존성 세포-매개 세포독성 또는 ADCC라고 함), 염증 매개체의 방출, 태반 통과(placental transfer) 및 면역글로불린 생성의 제어를 포함하여 다수의 중요하고 다양한 생물학적 반응이 촉발된다. 항체의 이펙터 기능은 이펙터 분자, 예컨대, Fc 수용체 또는 보체 구성요소에 대한 항체의 친화성을 변경, *예를 들어*, 향상 또는 감소시킴으로써 변경될 수 있다. 결합 친화도는 일반적으로 이펙터 분자 결합 부위를 변화시켜 다양하다. 이 경우 관심 대상 부위를 찾고 적절한 방식으로 적어도 부위의 일부를 변화시키는 것이 적절하다. 또한 이펙터 분자에 대한 항체의 결합 부위의 변화는 전체 결합 친화도를 크게 변경하지 않으나 비생산적인 결합에서와 같이 이펙터 기전을 비효과적으로 만드는 상호작용의 기하학적 구조를 변경할 수 있는 것으로 예상된다. 추가로 이펙터 기능은 또한 이펙터 분자 결합에 직접적으로 관여하지 않지만, 다르게 이펙터 기능의 성능에 관여하는 부위를 변형시킴으로써 변경될 수 있다고 생각된다.

[0043] **에피토프:** 에피토프 또는 항원 결정인자는 본 명세서에 기재된 바와 같이 항체 또는 다른 항원-결합 모이어티에 의해 인식되는 항원의 일부이다. 에피토프는 선형 또는 입체형태일 수 있다.

[0044] **Fab:** 용어 "Fab"는 한 쌍의 폴리펩타이드 사슬을 지칭하며, 제1 폴리펩타이드 사슬은 제1 불변 도메인(본 명세서에서 C1로 지칭함)에(전형적으로 이의 N-말단에) 작동 가능하게 연결된 항체의 가변 중쇄(VH) 도메인을 포함하고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 제1 불변 도메인과 쌍을 형성할 수 있는 제2 불변 도메인(본 명세서에서 C2로 지칭함)에(전형적으로 이의 N-말단에) N-말단에 작동 가능하게 연결된 항체의 가변 경쇄(VL) 도메인을 포함한다. 네이티브 항체에서, VH는 중쇄의 제1 불변 도메인(CH1)의 N-말단에 있고 VL은 경쇄(CL)의 불변 도메인의 N-말단에 있다. 본 개시내용의 Fab는 천연 배향에 따라 배열되거나 올바른 VH 또는 VL 쌍 형성을 용이하게 하는 도메인 치환 또는 교환을 포함할 수 있다. 예를 들어, Fab의 CH1 및 CL 도메인 쌍을 CH3-도메인 쌍으로 대체하여 이종이량체 분자에서 올바른 변형된 Fab-사슬 쌍 형성을 용이하게 하는 것이 가능하다. 또한 CH1이 VL에

부착되고 CL이 VH에 부착되도록(일반적으로 크로스맙(Crossmab)으로 알려진 구성) CH1 및 CL을 역전시키는 것도 가능하다. "Fab"이라는 용어는 단일 사슬 Fab을 포함한다.

[0045] **Fc 도메인 및 Fc 영역**: 용어 "Fc 도메인"은 다른 중쇄의 상응하는 부분과 쌍을 형성하는 중쇄의 부분을 지칭한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 CH2 도메인에 대한 힌지 영역 N-말단을 포함하거나 포함하지 않는 CH2 도메인에 이어서 CH3 도메인을 포함한다. "Fc 영역"이라는 용어는 두 개의 중쇄 Fc 도메인의 연관에 의해 형성된 영역을 의미한다. Fc 영역 내 2개의 Fc 도메인은 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 네이티브 항체에서 Fc 도메인은 전형적으로 동일하지만, 하나 또는 두 Fc 도메인은 *예를 들어*, 놉-인-홀(knob-in-hole) 상호작용을 통한 이종이량체화를 허용하도록 유리하게 변형될 수 있다.

[0046] **Fv**: 용어 "Fv"는 완전한 표적 인식 및 결합 부위를 포함하는 면역글로불린에서 유래할 수 있는 최소 항체 단편을 지칭한다. 이 영역은 긴밀한 비공유 회합으로 하나의 중쇄 가변 도메인과 하나의 경쇄 가변 도메인의 이량체로 이루어진다(VH-VL 이량체). 이러한 구성에서 각각의 가변 도메인의 3개의 CDR이 상호 작용하여 VH-VL 이량체의 표면에서 표적 결합 부위를 한정한다. 종종, 6개의 CDR은 항체에 표적 결합 특이성을 부여한다. 그러나, 일부 경우 심지어 단일 가변 도메인(또한 표적에 특이적인 3개의 CDR만 포함하는 Fv의 절반)도 표적을 인식하고 이에 결합하는 능력을 가질 수 있다. 본원에서 VH-VL 이량체에 대한 언급은 임의의 특정 구성을 전달하려는 의도가 아니다. 단일 폴리펩타이드 사슬(*예*: scFv)에 존재하는 경우, VH는 VL에 대해 N-말단 또는 C-말단이다.

[0047] **반쪽 항체**: 용어 "반쪽 항체"는 적어도 하나의 Fc 도메인을 포함하고, *예를 들어* 이황화 다리 또는 분자 상호작용을 통해 Fc를 포함하는 또 다른 분자와 결합할 수 있는 분자를 의미한다. 반쪽 항체는 하나의 폴리펩타이드 사슬 또는 하나 초과의 폴리펩타이드 사슬(*예*: Fab의 2개의 폴리펩타이드 사슬)로 구성될 수 있다. 반쪽 항체의 예는 항체(*예*: IgG 항체)의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 분자이다. 반쪽 항체의 또 다른 예시는 VL 도메인 및 CL 도메인을 포함하는 제1 폴리펩타이드 및 VH 도메인, CH1 도메인, 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제2 폴리펩타이드를 포함하는 분자이고, 여기서 상기 VL 및 VH 도메인은 ABD를 형성한다. 반쪽 항체의 또 다른 예시는 scFv 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 폴리펩타이드이다.

[0048] 본 개시의 IFN 전구단백질은 일반적으로 프로테아제 절단성 링커가 측면에 있는 IFN 모이어티를 포함하는 두 개의 반쪽 항체로 구성되며, 각각은 C-말단 프로테아제 절단성 링커에 대한 Fc 도메인 C-말단 및 N-말단 프로테아제 절단성 링커에 대한 불변 도메인 N-말단으로 구성된다. IFN 전구단백질의 반쪽 항체 중 하나 또는 양쪽 모두 표적 모이어티를 추가로 구성할 수 있다.

[0049] 용어 "반쪽 항체"는 설명 목적으로만 사용되며 특정 구성이나 생성 방법을 의미하지 않는다. 반쪽 항체를 "제1" 반쪽 항체, "제2" 반쪽 항체, "왼쪽" 반쪽 항체, "오른쪽" 반쪽 항체 등으로 기재하는 것은 단지 편의와 설명 목적을 위한 것이다.

[0050] **숙주 세포 또는 재조합 숙주 세포**: 용어 "숙주 세포" 또는 "재조합 숙주 세포"는, *예를 들어*, 이종 핵산의 도입을 통해 유전자 조작된 세포를 지칭한다. 그러한 용어는 특정 대상 세포뿐만 아니라 그러한 세포의 자손도 지칭하는 것으로 의도됨이 이해되어야 한다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 후속 세대에서 특정 변형이 발생할 수 있기 때문에, 그러한 자손은 실제로 모세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본 명세서에 사용된 용어 "숙주 세포"의 범주 내에 여전히 포함된다. 숙주 세포는, *예를 들어*, 염색체외 이종 발현 벡터에서 일시적으로, 또는 *예를 들어*, 숙주 세포 게놈으로의 이종 핵산의 통합을 통해 안정적으로 이종 핵산을 운반할 수 있다. 본 개시의 IFN 전구단백질을 발현하기 위한 목적으로, 숙주 세포는 바람직하게는 포유류 기원 또는 포유류와 유사한 특성을 갖는 세포주, 예를 들어 원숭이 신장 세포(COS, *예*: COS-1, COS-7), HEK293), 베이비 햄스터 신장(BHK, *예*: BHK21), 중국 햄스터 난소(CHO), NSO, PerC6, BSC-1, 인간 간세포암 세포(*예*: Hep G2), SP2/0, HeLa, Madin-Darby 소 신장(MDBK), 골수종 및 림프종 세포, 또는 이의 유도체 및/또는 조작된 변이체이다. 조작된 변이체는, *예를 들어*, 원래 세포주보다 더 높은 밀도로 성장하는 유도체 및/또는 글리칸 프로파일 변형 유도체 및/또는 부위-특이적 통합 부위 유도체를 포함한다.

[0051] **인터페론**: 본 명세서에 사용된 "인터페론"이라는 용어는 전체 길이의 인터페론 또는 변형된 인터페론(예: 절단 및/또는 돌연변이 인터페론)을 지칭한다. 일부 구현예에서, 변형된 인터페론은 대응하는 야생형 인터페론에 비해 감쇄된다(*예를 들어*, 섹션 8.2.4에 기술된 바와 같이 시험관 *내* 루시퍼라제 리포터 분석에서 50 % 미만, 40 % 미만, 30 % 미만, 20 % 미만 또는 10 % 미만, 1 % 미만, 0.1 % 미만 또는 0.05 % 미만의 활성을 유지함). 일부 구현예에서, 변형된 인터페론은 전술한 값 중 임의의 두 값(*예*: 0.05 %-50 %, 0.1 %-20 %, 0.1 %-10 %, 0.05 %-5 %, 1 %-20 % 등)에 의해 경계되는 범위로 감쇄된다. 다른 구현예에서, 변형된 인터페론은 해당 야생형 인터페론의 생물학적 활성을 실질적으로 유지한다(*예*: 섹션 8.2.4에 설명된 대로 시험관 *내* 루시퍼라제 리포터

분석에서 최소 50 %의 활성을 유지). 인터페론에는 I형 인터페론(*예*: 인터페론-α 및 인터페론-β)과 II형 인터페론(*예*: 인터페론-γ)이 있다.

[0052] **링커**: 본 명세서에 사용된 용어 "링커"는 프로테아제-절단성 링커 또는 비절단성 링커를 지칭한다.

[0053] **비절단성 링커**: 본 명세서에 사용된 비절단성 링커는 아미노산 서열에 특정 서열 모티프, *예를 들어*, 섹션 6.4.2에 기재된 바와 같은 기질을 인식하고 절단하는 프로테아제, *예를 들어*, 섹션 6.4.1에 기재된 바와 같은 프로테아제에 대한 기질 서열이 결여된 펩타이드를 지칭한다.

[0054] **작동 가능하게 연결된**: 용어 "작동 가능하게 연결된"은 2개 이상의 펩타이드 또는 폴리펩타이드 도메인 또는 핵산(*예*: DNA) 절편 간의 기능적 관계를 지칭한다. 융합 단백질 또는 다른 폴리펩타이드의 맥락에서, 용어 "작동 가능하게 연결된"은 2개 이상의 아미노산 절편이 연결되어 기능성 폴리펩타이드를 생성함을 의미한다. 예를 들어, 본 개시의 IFN 전구단백질의 맥락에서, 개별 구성 요소(*예*: Fc 도메인 및 IFN 모이어티)는 직접 또는 펩타이드 링커 서열을 통해 작동 가능하게 연결될 수 있다. 본 개시의 IFN 전구단백질의 반쪽 항체와 같은 융합 단백질을 인코딩하는 핵산의 맥락에서, "작동 가능하게 연결된다"는 것은 두 핵산이 코딩하는 아미노산 서열이 프레임 내에 유지되도록 두 핵산이 결합되는 것을 의미한다. 전사 조절의 맥락에서, 해당 용어는 전사 조절 서열과 전사된 서열의 기능적 관계를 지칭한다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서 서열은, 적절한 숙주 세포 또는 다른 발현 시스템에서 코딩 서열의 전사를 자극하거나 조절한다면 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다.

[0055] **폴리펩타이드, 펩타이드 및 단백질**: 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 본 명세서에서 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하는 것으로 호환 가능하게 사용된다.

[0056] **전구단백질**: "전구단백질"은 비활성이며 프로테아제에 의한 단백질 분해에 의해 활성화될 수 있는 단백질 전구체이다. 따라서 전구단백질은 "프로테아제 활성화 가능"하다.

[0057] **프로테아제**: 본 명세서에 사용된 “프로테아제”라는 용어는 펩타이드 결합의 가수분해를 촉매하는 효소를 의미한다. 일반적으로, 본 개시에 유용한 프로테아제, *예를 들어*, 섹션 6.4.1에 기재된 프로테아제는 특정 서열 모티프, *예를 들어*, 섹션 6.4.2에 기재된 바와 같은 기질을 인식하고 절단한다. 바람직하게는, 프로테아제는 정상 조직에 비해 암 조직에서 더 높은 수준으로 발현된다.

[0058] **프로테아제 절단성 링커**: 본 명세서에 사용된 용어 "프로테아제-절단성 링커" 또는 "PCL"은 아미노산 서열이 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상(*예*: 2개, 3개 이상)의 기질 서열을 포함하는 펩타이드를 의미한다. 예시적인 프로테아제-절단성 링커는 섹션 6.4에서 설명되어 있으며 예시적인 프로테아제-절단성 링커 서열은 섹션 6.4.4에 개시되어 있다.

[0059] **인식하다**: 본 명세서에 사용된 "인식하다"라는 용어는 항체 또는 항체 단편(*예*: 표적 모이어티)이 해당 에피토프를 찾아 상호작용(*예*: 결합)하는 것을 의미한다.

[0060] **단일 사슬 Fab 또는 scFab**: 본 명세서에 사용된 용어 "단일 사슬 Fab" 또는 "scFab"는 VH 도메인, CH1 도메인, VL 도메인, CL 도메인 및 링커를 포함하는 ABD를 지칭한다. 일부 구현예에서, 전술한 도메인 및 링커는 N-말단에서 C-말단 방향으로 다음 중 하나의 순서로 배열된다: (a) VH-CH1-링커-VL-CL, (b) VL-CL-링커-VH-CH1, (c) VH-CL-링커-VL-CH1 또는 (d) VL-CH1-링커-VH-CL. 링커는 적합하게는 적어도 30개의 아미노산, 바람직하게는 32개 내지 50개의 아미노산의 비절단성 링커이다. 단일 사슬 Fab 단편은 전형적으로 CL 도메인과 CH1 도메인 사이의 천연 이황화 결합을 통해 안정화된다. 추가적으로, 이러한 단일 사슬 Fab 분자는 (*예를 들어*, Kabat 넘버링에 따른 VH 도메인의 위치 44 및 VL 도메인의 위치 100에) 시스테인 잔기의 삽입을 통해 사슬 간 이황화 결합을 생성함으로써 추가로 안정화될 수 있다.

[0061] **단일 사슬 Fv 또는 scFv**: 본 명세서에 사용된 용어 "단일 사슬 Fv" 또는 "scFv"는 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 ABD를 지칭하며, 여기서 이들 도메인은 단일 폴리펩타이드 사슬에 존재한다. 바람직하게는, Fv 폴리펩타이드는 scFv가 항원 결합을 위해 원하는 구조를 형성할 수 있게 하는 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함한다. scFv에 대한 검토는 문헌 Pluckthun, The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 제113권, Rosenburg 및 Moore 편집 (1994), Springer-Verlag, New York, pp. 269-315를 참조한다. VH 및 VL은 N-말단에서 C-말단 순서로 VH-VL 또는 VL-VH로 배열되며, 전형적으로 링커, 예를 들어, 표 105에서 제시되는 링커에 의해 분리된다.

[0062] **스페이서**: 본 명세서에 사용된 "스페이서"라는 용어는 프로테아제에 대한 기질이 아닌, 기질을 포함하는 링커에 통합되는 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 지칭한다. 스페이서는 기질을 분자에 있는 다른 도메인, 예를 들어,

ABD로부터 분리하기 위해 사용될 수 있다. 일부 양태에서, 스페이서에 있는 잔기는 아미노펩티다제 및/또는 엑소펩티다제 작용을 최소화하여 N-말단 아미노산의 절단을 방지한다.

[0063] **특이적으로(또는 선택적으로) 결합한다:** 항원 또는 에피토프에 "특이적으로(또는 선택적으로) 결합한다"는 용어는 단백질 및 다른 분자의 이종 집단에서 동족 항원 또는 에피토프의 존재를 결정하는 결합 반응을 지칭한다. 결합 반응은 항체 또는 항체 단편에 의해 매개될 수 있지만 그럴 필요는 없다. 용어 "특이적 결합"은 종간 반응성을 배제하지 않는다. 예를 들어, 한 종의 항원에 "특이적으로 결합"하는 항원 결합 도메인(*예*: 항체의 항원 결합 단편)은 하나 이상의 다른 종의 항원에도 "특이적으로 결합"할 수 있다. 따라서, 이러한 종간 반응성은 그 자체로 "특이적" 결합제로서 항원 결합 도메인의 분류를 변경하지 않는다. 특정 구현예에서, 인간 항원에 특이적으로 결합하는 본 개시내용의 항원 결합 도메인은 하나 이상의 비인간 포유류 종, *예를 들어*, 영장류 종(*마카카 파시큘리스*, *마카카 물라타* 및 *마카카 네메스트리나 중* 하나 이상을 포함하나 이에 국한되지 않음) 또는 설치류 종, *예를 들어*, *무스 무스쿨루스*와 종간 반응성을 갖는다.

[0064] **대상체:** 용어 "대상체"는 인간 및 비인간 동물을 포함한다. 비인간 동물은 모든 척추동물, *예*: 포유동물 및 비포유동물, 예컨대, 비인간 영장류, 양, 개, 소, 닭, 양서류, 및 파충류를 포함한다. 바람직한 구현예에서, 대상체는 인간이다.

[0065] **기질:** 용어 "기질"은 프로테아제가 작용하고 프로테아제가 펩타이드 결합을 절단할 펩타이드 서열을 지칭한다.

[0066] **표적 분자:** 본 명세서에서 사용되는 "표적 분자"라는 용어는 세포 표면 또는 세포 외 기질에서 발현되는 임의의 생물학적 분자(*예*: 단백질, 탄수화물, 지질 또는 이들의 조합)를 지칭하며, 이는 개시된 IFN 전구단백질의 표적 모이어티에 특이적으로 결합할 수 있다.

[0067] **표적 모이어티:** 본 명세서에서 사용되는 "표적 모이어티"라는 용어는 종양 세포 또는 종양 미세 환경의 림프구와 같이 본 개시의 IFN 전구단백질이 국한될 부위에서 세포 표면 또는 세포 외 기질 분자에 결합할 수 있는 임의의 분자 또는 결합 부분(*예*: 면역글로불린 또는 항원 결합 단편)을 지칭한다. 일부 구현예에서, 표적 모이어티는 TAA에 결합한다. 다른 구현예에서, 표적 모이어티는 TCA에 결합한다. 표적 모이어티는 IFN 전구단백질을 특정 부위에 국한시키는 것 외에도 기능적 활성을 가질 수 있다. 예를 들어, PD1과 같은 체크포인트 억제제에 결합하는 표적 모이어티는 항종양 활성을 나타내거나, 예를 들어 PD1 신호를 억제하여 IFN에 의한 항종양 활성을 향상할 수 있다.

[0068] **T-세포 항원, TCA:** "T세포 항원" 또는 "TCA"라는 용어는 T 림프구 표면에서 발현되는 분자(일반적으로 단백질, 탄수화물, 지질 또는 이들의 일부 조합)를 의미하며 약리학 약제를 특정 부위에 우선적으로 표적화하는 데 유용하다. 일부 구현예에서, 부위는 암 조직이고/이거나 T 세포 항원은 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자 또는 T-림프구상에서 발현되는 면역관문 억제제이다.

[0069] **종양:** 용어 "종양"은 본 명세서에서 용어 "암"과 호환 가능하게 사용되며, *예를 들어*, 두 용어 모두 고형 및 액상, *예를 들어*, 미만성 또는 순환성 종양을 포함한다. 본 명세서에 사용된 용어 "암" 또는 "종양"은 전악성 및 악성 암 및 종양을 포함한다.

[0070] **종양 관련 항원, TAA:** "종양 관련 항원" 또는 "TAA"라는 용어는 암세포 표면에서 전체 또는 단편(*예*: MHC/펩타이드)으로 발현되는 분자(일반적으로 단백질, 탄수화물, 지질 또는 이들의 일부 조합)를 의미하며 약리학 약제를 암세포에 우선적으로 표적화하는 데 유용한 분자를 지칭한다. 일부 구현예에서, TAA는 정상 세포와 암 세포 둘 다에 의해 발현되는 마커, *예를 들어*, 계통 마커이다. 일부 구현예에서, TAA는 정상 세포와 비교하여 암 세포에서 과발현되는, 예를 들어, 정상 세포와 비교하여 1배 과발현, 2배 과발현, 3배 과발현 또는 그 이상인 세포 표면 분자이다. 일부 구현예에서, TAA는 암 세포에서 부적절하게 합성되는 세포 표면 분자, 예를 들어, 정상 세포에서 발현되는 분자와 비교하여 결실, 추가 또는 돌연변이를 포함하는 분자이다. 일부 구현예에서, TAA는 암 세포의 세포 표면에서만 완전히 또는 단편(*예*: MHC/펩타이드)으로 전적으로 발현되고, 정상 세포의 표면에서는 합성되거나 발현되지 않을 것이다. 따라서, 용어 "TAA"는, 때때로 당업계에서 종양 특이적 항원("TSA")으로 공지된, 암 세포에 특이적인 항원을 포함한다.

[0071] **치료하다, 치료, 치료하는:** 본 명세서에서 사용되는 "치료하다", "치료" 및 "치료하다"라는 용어는 장애의 진행, 중증도 및/또는 기간의 감소 또는 개선, 또는 본 발명의 하나 이상의 IFN 수용체 작용제(예를 들어, 활성화 후 IFN 수용체를 작용할 수 있는 IFN 전구단백질)의 투여로 인한 장애의 하나 이상의 증상(바람직하게는 하나 이상의 식별 가능한 증상)의 개선을 지칭한다. 일부 구현예에서, 장애는 증식성 장애이며 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"이라는 용어는 종양의 성장과 같은 증식성 장애의 적어도 하나의 측정 가능한 물리적 파라

미터의 개선을 의미하며, 이는 환자가 반드시 식별할 수 있는 것은 아니다. 다른 구현예에서, "치료하다", "치료" 및 "치료하는"이라는 용어는 물리적으로, *예를 들어* 식별 가능한 증상의 안정화, 생리적으로, *예를 들어* 물리적 파라미터의 안정화 또는 둘 다에 의해 증식성 장애의 진행을 억제하는 것을 지칭한다. 다른 구현예에서 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는"은 종양 크기 또는 암세포 수의 감소 또는 안정화를 지칭한다.

[0072] **범용 경쇄, UCL**: 본 명세서에서 사용된 용어 "범용 경쇄" 또는 "ULC"는 하나 초과의 중쇄 가변 영역(VL)과 쌍을 형성할 수 있는 경쇄 가변 영역(VL)을 지칭한다. 표적 모이어티의 맥락에서, 용어 "보편적 경쇄" 또는 "ULC"는 표적 모이어티의 중쇄 영역과 쌍을 이룰 수 있고 또한 다른 중쇄 영역과 쌍을 이룰 수 있는 경쇄 폴리펩타이드를 지칭한다. ULC는 또한 불변 도메인, *예를 들어*, 항체의 CL 도메인을 포함할 수 있다. 범용 경쇄는 또한 "공통 경쇄"로도 알려져 있다.

[0073] **VH**: 용어 "VH"는 Fv, scFv, dsFv 또는 Fab의 중쇄를 포함하여 항체의 면역글로불린 중쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0074] **VL**: 용어 "VL"은 Fv, scFv, dsFv 또는 Fab의 경쇄를 포함하여 면역글로불린 경쇄의 가변 영역을 지칭한다.

[0075] ### 6.2. IFN 전구단백질

[0076] 본 개시는 측면 불변 도메인의 입체 장애에 의해 감쇄되는 IFN 모이어티를 포함하는 IFN 전구단백질에 관한 것이다. IFN 전구단백질은 종양 환경에서 과발현되는 프로테아제와 같은 프로테아제를 만나면 프로테아제 절단성 링커가 절단되고 IFN이 방출되도록 구성된다. 이는 항체의 불변/FC 도메인 사이에 프로테아제 절단성 링커(PCL)가 측면에 있는 IFN 모이어티를 통합하여 이루어진다. 따라서 이러한 단백질을 "내부" IFN 구조라고 부르기도 한다. 예를 들어, 활성화 후 IFN 수용체에 작용할 수 있는 IFN 전구단백질은 본 문서에서 "IFN 수용체 작용제"로 지칭하기도 한다.

[0077] 일반적으로, IFN 전구단백질은 두 개의 반쪽 항체로 구성되며, Fc 영역(일반적으로, 힌지 서열로 구성)을 형성하기 위해 결합하는 한 쌍의 Fc 도메인, 절단 가능하거나 절단 불가능할 수 있는 링커인 N-말단, IFN 모이어티, 절단 가능하거나 절단 불가능한 추가 링커로 구성된다. 일부 구현예에서, 각 반쪽 항체는 두 개의 프로테아제 절단성 링커로 구성되며, IFN 모이어티에 측면에 있다. 각 반쪽 항체에 두 개의 프로테아제 절단성 링커가 있는 예시적인 IFN 전구단백질이 도 1a-1c에 나와 있다. 다른 구현예에서, 각 반쪽 항체는 IFN 모이어티의 한쪽면에 단일 프로테아제 절단성 링커를 포함하고, IFN 모이어티의 다른 쪽 링커는 비절단성 링커로 구성된다. 각 반쪽 항체에 두 개의 프로테아제 절단성 링커가 있는 예시적인 IFN 전구단백질이 도 2a-2f에 나와 있다. 프로테아제 절단성 링커의 N-말단에는 항체 불변 도메인이 있는데, 이는 Fc 도메인을 포함하는 전체 불변 도메인이 결합하여 다른 Fc 영역을 형성하거나 불변 도메인의 일부*(예: CH1 도메인)*만을 포함한다.

[0078] 본 개시의 IFN 전구단백질의 예시적인 구성은 도 1a-1c 및 도 2a-2f에 도시되어 있다. 예시된 바와 같이, IFN 모이어티와 주변 링커는 C-단자에서만 힌지 도메인("단일 힌지", *예를 들어*, 도 1a, 도 1b, 도 2a, 도 2b, 도 2d 및 도 2e에서와 같이) 또는 N- 및 C-단자 모두("이중 힌지", *예를 들어*, 도 1c, 도 2c 및 도 2f에서와 같이)를 포함할 수 있다.

[0079] 일반적으로 IFN 전구단백질은,

[0080] a) 제1 폴리펩타이드 사슬에 있어서:

[0081] i) 제1 면역글로불린 불변 도메인;

[0082] ii) 제1 링커;

[0083] iii) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0084] iv) 제2 링커 및

[0085] v) 제1 Fc 도메인을 포함하고; 및

[0086] b) 제2 폴리펩타이드 사슬에 있어서:

[0087] i) 제2 면역글로불린 불변 도메인;

[0088] ii) 제3 링커;

[0089] iii) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0090] iv) 제4 링커; 및

[0091] v) 상기 제1 Fc 도메인과 결합하여 Fc 영역을 형성할 수 있는 제2 Fc 도메인을 포함한다.

[0092] 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커는 모두 프로테아제 절단성 링커이다. 다른 구현예에서는, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커 중 2개만 프로테아제 절단성 링커이다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 제1 및 제3 링커는 프로테아제 절단성 링커이고, 제2 및 제4 링커는 비절단성 링커이다. 다른 구현예에서, 제1 및 제3 링커는 비절단성 링커이고, 제2 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커이다.

[0093] 바람직하게는, IFN 전구단백질의 IFN 모이어티는 Fc 도메인 및/또는 불변 도메인에 의해 IFN 수용체와 결합하는 것을 입체적으로 방해받는다.

[0094] 도 1a에 예시적인 IFN 전구단백질이 도시되어 있으며, 여기서 표적 모이어티(VH-CH1과 VL-CL이 짝을 이룬 Fab 도메인으로 표시됨)는 선택 사항이다. 도 1a의 IFN 전구단백질은 제1 폴리펩타이드 사슬, 제2 폴리펩타이드 사슬, 선택적 제3 폴리펩타이드 사슬 및 선택적 제4 폴리펩타이드 사슬을 포함하며, 여기서, 제1 폴리펩타이드 사슬은 제1 폴리펩타이드 사슬을 포함한다.

[0095] a) 제1 폴리펩타이드 사슬은 다음으로 구성된다.

[0096] i) 제1 VH1 도메인(선택 사항);

[0097] ii) 제1 CH1 도메인;

[0098] iii) 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제1 Fc 도메인(CH3 도메인은 제1 면역글로불린 불변 도메인);

[0099] iv) 제1 프로테아제 절단성 링커(PCL);

[0100] v) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0101] vi) 제2 프로테아제 절단성 링커(PCL); 그리고

[0102] vii) 제2 Fc 도메인;

[0103] b) 제2 폴리펩타이드 사슬은 다음으로 구성된다.

[0104] i) 제2 VH1 도메인(선택 사항);

[0105] ii) 제2 CH1 도메인;

[0106] iii) 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제3 Fc 도메인(CH3 도메인은 두 번째 면역글로불린 불변 도메인);

[0107] iv) 제3 프로테아제 절단성 링커(PCL);

[0108] v) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0109] vi) 제4 프로테아제 절단성 링커(PCL); 그리고

[0110] vii) 제4 Fc 도메인;

[0111] c) 선택적 제3 폴리펩타이드 사슬은 다음으로 구성된다.

[0112] i) 제1 VL 도메인;

[0113] ii) 제1 CL 도메인; 및

[0114] d) 제4 폴리펩타이드 사슬은 다음으로 구성된다.

[0115] i) 제2 VL 도메인; 및

[0116] ii) 제2 CL 도메인;

[0117] 제1 폴리펩타이드 사슬은 제2 폴리펩타이드 사슬과 결합함으로써 제1 Fc 도메인과 제3 Fc 도메인이 결합하여 Fc 영역을 형성하고, 제2 Fc 도메인과 제4 Fc 도메인은 다른 Fc 영역을 형성한다.

[0118] 존재하는 경우, 제3 폴리펩타이드 사슬은 제1 폴리펩타이드 사슬과 결합함으로써 제1 VH, CH1, VL 및 CL이 제1

표적 모이어티를 형성하고, 제4 폴리펩타이드 사슬은 제2 폴리펩타이드 사슬 폴리펩타이드와 결합함으로써 제2 VH, CH1, VL 및 CL이 제2 표적 모이어티를 형성한다. 또는, 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에 scFv를 포함할 수 있다.

[0119] 따라서, 제1 폴리펩타이드 사슬(제3 폴리펩타이드 사슬이 존재할 경우, 이것과 함께)은 첫 번째 반쪽 항체를 나타내고, 제2 폴리펩타이드 사슬(제4 폴리펩타이드 사슬이 존재할 경우, 이것과 함께)은 두 번째 반쪽 항체를 나타낸다.

[0120] 또 다른 예시적인 IFN 전구단백질은 도 1b에 도시되어 있으며, 여기서 표적 모이어티(VH-CH1과 VL-CL이 짝을 이룬 Fab 도메인으로 표시됨)는 선택 사항이다. 도 1b의 IFN 전구단백질은 제1 폴리펩타이드 사슬, 제2 폴리펩타이드 사슬, 선택적 제3 폴리펩타이드 사슬 및 선택적 제4 폴리펩타이드 사슬을 포함하며, 여기서, 제1 폴리펩타이드 사슬은 제1 폴리펩타이드 사슬을 포함한다.

[0121] a) 제1 폴리펩타이드 사슬은 다음으로 구성된다.

[0122] i) 제1 VH1 도메인(선택 사항);

[0123] ii) 제1 CH1 도메인;

[0124] iii) 제1 프로테아제 절단성 링커(PCL);

[0125] iv) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0126] v) 제2 프로테아제 절단성 링커(PCL); 그리고

[0127] vi) 제1 Fc 도메인;

[0128] b) 제2 폴리펩타이드 사슬은 다음으로 구성된다.

[0129] i) 제2 VH1 도메인(선택 사항);

[0130] ii) 제2 CH1 도메인;

[0131] iii) 제3 프로테아제 절단성 링커(PCL);

[0132] iv) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0133] v) 제4 프로테아제 절단성 링커(PCL); 그리고

[0134] vi) 제2 Fc 도메인;

[0135] c) 선택적 제3 폴리펩타이드 사슬은 다음으로 구성된다.

[0136] i) 제1 VL 도메인;

[0137] ii) 제1 CL 도메인; 및

[0138] d) 제4 폴리펩타이드 사슬은 다음으로 구성된다.

[0139] i) 제2 VL 도메인; 및

[0140] ii) 제2 CL 도메인;

[0141] 제1 폴리펩타이드 사슬은 제2 폴리펩타이드 사슬과 연결되어 제1 Fc 도메인과 제2 Fc 도메인이 Fc 영역을 형성한다.

[0142] 존재하는 경우, 제3 폴리펩타이드 사슬은 제1 폴리펩타이드 사슬과 결합함으로써 제1 VH, CH1, VL 및 CL이 제1 표적 모이어티를 형성하고, 제4 폴리펩타이드 사슬은 제2 폴리펩타이드 사슬 폴리펩타이드와 결합함으로써 제2 VH, CH1, VL 및 CL이 제2 표적 모이어티를 형성한다. 또는, 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에 scFv를 포함할 수 있다.

[0143] 따라서, 제1 폴리펩타이드 사슬(제3 폴리펩타이드 사슬이 존재할 경우, 이것과 함께)은 첫 번째 반쪽 항체를 나타내고, 제2 폴리펩타이드 사슬(제4 폴리펩타이드 사슬이 존재할 경우, 이것과 함께)은 두 번째 반쪽 항체를 나타낸다.

[0144] 도 1b의 IFN 전구단백질의 변이체는 도 1c에 도시되어 있다. 도 1c의 IFN 전구단백질은 제1 CH1 도메인과 제1

프로테아제 절단성 링커 사이의 제1 힌지 도메인 및 제2 CH1 도메인과 제3 프로테아제 절단성 링커 사이의 제2 힌지 도메인을 더 포함한다.

[0145] 또 다른 예시적인 IFN 전구단백질은 도 2a에 도시되어 있으며, 여기서 표적 모이어티(VH-CH1과 VL-CL이 짝을 이룬 Fab 도메인으로 표시됨)는 선택 사항이다. 도 2a의 IFN 전구단백질은 제1 폴리펩타이드 사슬, 제2 폴리펩타이드 사슬, 선택적 제3 폴리펩타이드 사슬 및 선택적 제4 폴리펩타이드 사슬을 포함하며, 여기서:

[0146] a) 제1 폴리펩타이드 사슬은:

[0147] i) 제1 VH1 도메인(선택 사항);

[0148] ii) 제1 CH1 도메인;

[0149] iii) 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제1 Fc 도메인(CH3 도메인은 제1 면역글로불린 불변 도메인);

[0150] iv) 제1 비절단성 링커(NCL);

[0151] v) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0152] vi) 제1 프로테아제 절단성 링커(PCL); 및

[0153] vii) 제2 Fc 도메인을 포함하고,

[0154] b) 제2 폴리펩타이드 사슬은:

[0155] i) 제2 VH1 도메인(선택 사항);

[0156] ii) 제2 CH1 도메인;

[0157] iii) 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제3 Fc 도메인(CH3 도메인은 두 번째 면역글로불린 불변 도메인);

[0158] iv) 제2 비절단성 링커(NCL);

[0159] v) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0160] vi) 제2 프로테아제 절단성 링커(PCL); 및

[0161] vii) 제4 Fc 도메인을 포함하고,

[0162] c) 선택적 제3 폴리펩타이드 사슬은:

[0163] i) 제1 VL 도메인;

[0164] ii) 제1 CL 도메인을 포함하고, 그리고

[0165] d) 제4 폴리펩타이드 사슬은:

[0166] i) 제2 VL 도메인; 및

[0167] ii) 제2 CL 도메인;

[0168] 제1 폴리펩타이드 사슬은 제2 폴리펩타이드 사슬과 결합함으로써 제1 Fc 도메인과 제3 Fc 도메인이 결합하여 Fc 영역을 형성하고, 제2 Fc 도메인과 제4 Fc 도메인은 다른 Fc 영역을 형성한다.

[0169] 존재하는 경우, 제3 폴리펩타이드 사슬은 제1 폴리펩타이드 사슬과 결합함으로써 제1 VH, CH1, VL 및 CL이 제1 표적 모이어티를 형성하고, 제4 폴리펩타이드 사슬은 제2 폴리펩타이드 사슬 폴리펩타이드와 결합함으로써 제2 VH, CH1, VL 및 CL이 제2 표적 모이어티를 형성한다. 또는, 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에 scFv를 포함할 수 있다.

[0170] 따라서, 제1 폴리펩타이드 사슬(제3 폴리펩타이드 사슬이 존재할 경우, 이것과 함께)은 첫 번째 반쪽 항체를 나타내고, 제2 폴리펩타이드 사슬(제4 폴리펩타이드 사슬이 존재할 경우, 이것과 함께)은 두 번째 반쪽 항체를 나타낸다.

[0171] 또 다른 예시적인 IFN 전구단백질은 도 2b에 도시되어 있으며, 여기서 표적 모이어티(VH-CH1과 VL-CL이 짝을 이

룬 Fab 도메인으로 표시됨)는 선택 사항이다. 도 2b의 IFN 전구단백질은 제1 폴리펩타이드 사슬, 제2 폴리펩타이드 사슬, 선택적 제3 폴리펩타이드 사슬 및 선택적 제4 폴리펩타이드 사슬을 포함하며, 여기서:

[0172] a) 제1 폴리펩타이드 사슬은 다음으로 구성된다.

[0173] i) 제1 VH1 도메인(선택 사항);

[0174] ii) 제1 CH1 도메인;

[0175] iii) 제1 비절단성 링커(NCL);

[0176] iv) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0177] v) 제1 프로테아제 절단성 링커(PCL); 및

[0178] vi) 제1 Fc 도메인;

[0179] b) 제2 폴리펩타이드 사슬은 다음으로 구성된다.

[0180] i) 제2 VH1 도메인(선택 사항);

[0181] ii) 제2 CH1 도메인;

[0182] iii) 제2 비절단성 링커(NCL);

[0183] iv) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0184] v) 제2 프로테아제 절단성 링커(PCL); 및

[0185] vi) 제2 Fc 도메인을 포함하고,

[0186] c) 선택적 제3 폴리펩타이드 사슬은:

[0187] i) 제1 VL 도메인;

[0188] ii) 제1 CL 도메인을 포함하고, 그리고

[0189] d) 제4 폴리펩타이드 사슬은:

[0190] i) 제2 VL 도메인; 및

[0191] ii) 제2 CL 도메인을 포함하고,

[0192] 여기서 제1 폴리펩타이드 사슬은 제2 폴리펩타이드 사슬과 연결되어 제1 Fc 도메인과 제2 Fc 도메인이 Fc 영역을 형성한다.

[0193] 존재하는 경우, 제3 폴리펩타이드 사슬은 제1 폴리펩타이드 사슬과 결합함으로써 제1 VH, CH1, VL 및 CL이 제1 표적 모이어티를 형성하고, 제4 폴리펩타이드 사슬은 제2 폴리펩타이드 사슬 폴리펩타이드와 결합함으로써 제2 VH, CH1, VL 및 CL이 제2 표적 모이어티를 형성한다. 또는, 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에 scFv를 포함할 수 있다.

[0194] 따라서, 제1 폴리펩타이드 사슬(제3 폴리펩타이드 사슬이 존재할 경우, 이것과 함께)은 첫 번째 반쪽 항체를 나타내고, 제2 폴리펩타이드 사슬(제4 폴리펩타이드 사슬이 존재할 경우, 이것과 함께)은 두 번째 반쪽 항체를 나타낸다.

[0195] 도 2b의 IFN 전구단백질의 변이체는 도 2c에 도시되어 있다. 도 2c의 IFN 전구단백질은 제1 CH1 도메인과 제1 프로테아제 비절단성 링커 사이의 제1 힌지 도메인 및 제2 CH1 도메인과 제2 프로테아제 비절단성 링커 사이의 제2 힌지 도메인을 더 포함한다.

[0196] 또 다른 예시적인 IFN 전구단백질은 도 2d에 표시되어 있으며, 표적 모이어티(VH-CH1과 VL-CL이 짝을 이룬 Fab 도메인으로 표시됨)는 선택 사항이다. 도 2d의 IFN 전구단백질은 제1 폴리펩타이드 사슬, 제2 폴리펩타이드 사슬, 선택적 제3 폴리펩타이드 사슬 및 선택적 제4 폴리펩타이드 사슬을 포함하며, 여기서, 제1 폴리펩타이드 사슬은 제1 폴리펩타이드 사슬을 포함한다.

[0197] a) 제1 폴리펩타이드 사슬은:

[0198] i) 제1 VH1 도메인(선택 사항);

[0199] ii) 제1 CH1 도메인;

[0200] iii) 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제1 Fc 도메인(CH3 도메인은 제1 면역글로불린 불변 도메인);

[0201] iv) 제1 프로테아제 절단성 링커(PCL);

[0202] v) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0203] vi) 제1 프로테아제 비절단성 링커(NCL); 및

[0204] vii) 제2 Fc 도메인을 포함하고,

[0205] b) 제2 폴리펩타이드 사슬은:

[0206] i) 제2 VH1 도메인(선택 사항);

[0207] ii) 제2 CH1 도메인;

[0208] iii) 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제3 Fc 도메인(CH3 도메인은 두 번째 면역글로불린 불변 도메인);

[0209] iv) 제2 프로테아제 절단성 링커(PCL);

[0210] v) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0211] vi) 제2 프로테아제 비절단성 링커(NCL); 및

[0212] vii) 제4 Fc 도메인을 포함하고,

[0213] c) 선택적 제3 폴리펩타이드 사슬은:

[0214] i) 제1 VL 도메인;

[0215] ii) 제1 CL 도메인을 포함하고,

[0216] d) 제4 폴리펩타이드 사슬은:

[0217] i) 제2 VL 도메인; 및

[0218] ii) 제2 CL 도메인을 포함하고,

[0219] 제1 폴리펩타이드 사슬은 제2 폴리펩타이드 사슬과 결합함으로써 제1 Fc 도메인과 제3 Fc 도메인이 결합하여 Fc 영역을 형성하고, 제2 Fc 도메인과 제4 Fc 도메인은 다른 Fc 영역을 형성한다.

[0220] 존재하는 경우, 제3 폴리펩타이드 사슬은 제1 폴리펩타이드 사슬과 결합함으로써 제1 VH, CH1, VL 및 CL이 제1 표적 모이어티를 형성하고, 제4 폴리펩타이드 사슬은 제2 폴리펩타이드 사슬 폴리펩타이드와 결합함으로써 제2 VH, CH1, VL 및 CL이 제2 표적 모이어티를 형성한다. 또는, 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에 scFv를 포함할 수 있다.

[0221] 따라서, 제1 폴리펩타이드 사슬(제3 폴리펩타이드 사슬이 존재할 경우, 이것과 함께)은 첫 번째 반쪽 항체를 나타내고, 제2 폴리펩타이드 사슬(제4 폴리펩타이드 사슬이 존재할 경우, 이것과 함께)은 두 번째 반쪽 항체를 나타낸다.

[0222] 또 다른 예시적인 IFN 전구단백질은 도 2e에 표시되어 있으며, 표적 모이어티(VH-CH1과 VL-CL이 짝을 이룬 Fab 도메인으로 표시됨)는 선택 사항이다. 도 2e의 IFN 전구단백질은 제1 폴리펩타이드 사슬, 제2 폴리펩타이드 사슬, 선택적 제3 폴리펩타이드 사슬 및 선택적 제4 폴리펩타이드 사슬을 포함하며, 여기서, 제1 폴리펩타이드 사슬은 제1 폴리펩타이드 사슬을 포함한다.

[0223] a) 제1 폴리펩타이드 사슬은:

[0224] i) 제1 VH1 도메인(선택 사항);

[0225] ii) 제1 CH1 도메인;

[0226] iii) 제1 프로테아제 절단성 링커(PCL);

[0227] iv) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0228] v) 제1 프로테아제 비절단성 링커(NCL); 및

[0229] vi) 제1 Fc 도메인;

[0230] b) 제2 폴리펩타이드 사슬은:

[0231] i) 제2 VH1 도메인(선택 사항);

[0232] ii) 제2 CH1 도메인;

[0233] iii) 제2 프로테아제 절단성 링커(PCL);

[0234] iv) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0235] v) 제2 프로테아제 비절단성 링커(NCL); 및

[0236] vi) 제2 Fc 도메인을 포함하고,

[0237] c) 선택적 제3 폴리펩타이드 사슬은:

[0238] i) 제1 VL 도메인;

[0239] ii) 제1 CL 도메인을 포함하고, 그리고

[0240] d) 제4 폴리펩타이드 사슬은:

[0241] i) 제2 VL 도메인; 및

[0242] ii) 제2 CL 도메인을 포함하고,

[0243] 여기서 제1 폴리펩타이드 사슬은 제2 폴리펩타이드 사슬과 연결되어 제1 Fc 도메인과 제2 Fc 도메인이 Fc 영역을 형성한다.

[0244] 존재하는 경우, 제3 폴리펩타이드 사슬은 제1 폴리펩타이드 사슬과 결합함으로써 제1 VH, CH1, VL 및 CL이 제1 표적 모이어티를 형성하고, 제4 폴리펩타이드 사슬은 제2 폴리펩타이드 사슬과 결합함으로써 제2 VH, CH1, VL 및 CL이 제2 표적 모이어티를 형성한다. 또는, 제1 및 제2 폴리펩타이드 사슬은 N-말단에 scFv를 포함할 수 있다.

[0245] 따라서, 제1 폴리펩타이드 사슬(제3 폴리펩타이드 사슬이 존재할 경우, 이것과 함께)은 첫 번째 반쪽 항체를 나타내고, 제2 폴리펩타이드 사슬(제4 폴리펩타이드 사슬이 존재할 경우, 이것과 함께)은 두 번째 반쪽 항체를 나타낸다.

[0246] 도 2e의 IFN 전구단백질의 변이체는 도 2f에 도시되어 있다. 도 2e의 IFN 전구단백질은 제1 CH1 도메인과 제1 프로테아제 절단성 링커 사이의 제1 힌지 도메인 및 제2 CH1 도메인과 제2 프로테아제 절단성 링커 사이의 제2 힌지 도메인을 더 포함한다.

[0247] 일반적으로 IFN 전구단백질의 Fc 도메인은 도 1a 내지 1c에 도시되어 있고, 도 2a 내지 2f에는 힌지 도메인이 포함된다.

[0248] 따라서 IFN 전구단백질은 일반적으로 2~4개의 프로테아제 절단성 링커를 포함한다. IFN 전구단백질의 모든 프로테아제 절단성 링커를 4개의 프로테아제 절단성 링커로 절단하면 IFN 모이어티를 포함하고 C-말단 Fc 모이어티, N-말단 불변 도메인, 표적 모이어티가 없는 활성화된 IFN 전구단백질이 방출된다(존재하는 경우). IFN 전구단백질의 모든 프로테아제 절단성 링커를 두 개의 프로테아제 절단성 링커로 절단하면 입체적으로 차단되는 부분 중 하나가 제거되고 표적 모이어티(항체-IFN) 또는 Fc 도메인(IFN-Fc)으로 구성된 IFN 분자가 생성된다.

[0249] 일부 구현예에서, 이러한 구성은 종양 환경에서 발현되는 TAA 또는 ECM 표적 분자에 결합하는 표적화 부분을 포함하는 IFN 전구단백질에 대해 유리하게 활용된다. 이론에 얽매이려는 의도는 없지만, 발명자들은 이러한 구성에서 표적화 부분이 IFN 전구단백질을 종양 환경으로 표적화하고, 여기서 프로테아제가 프로테아제-절단성 링커를 절단하여 IFN 부분 및 링커 서열을 포함하는 IFN 단백질이 방출을 초래한다고 믿는다. 이렇게 국소적으로 활성화된 IFN 단백질은 암세포에 대한 면역 반응을 유도한다.

[0250] 힌지 및 링커 서열의 서열과 길이도 다양할 수 있으며, IFN 모이어티의 서열(전체 길이 또는 N- 및/C- 말단 잘린 IFN 서열을 포함)도 다양할 수 있다. 예시적인 IFN 모이어티는 섹션 6.3에 설명되어 있으며, 아래 섹션 6.3.1 및 6.3.2에 설명된 IFNα 및 IFNβ 기반 모이어티를 포함한다. 예시적인 프로테아제 절단성 링커 서열은 섹션 6.4에 제시되어 있다. 예시적인 비절단성 링커 및 힌지 서열은 각각 섹션 6.5 및 6.8.3에 공개되어 있다. 예시적인 표적 모이어티는 섹션 6.6에 공개되어 있다.

[0251] **6.3. IFN 모이어티**

[0252] IFN에는 크게 두 가지 클래스가 있다: I형(IFN-α 아형, IFN-β 등) 및 II형(IFN-γ). 추가 IFN(IFN 유사 사이토카인, IFN-λ 아형)도 확인되었다.

[0253] 본 개시의 IFN 모이어티는 임의의 야생형 또는 변형(*예*: 절단 및/또는 돌연변이) IFN 또는 IFN 유사 사이토카인 서열을 포함할 수 있지만, 바람직하게는 I형 IFN 모이어티이다. I형 IFN은 모든 핵 형성 세포에서 유비쿼터스하게 발현되는 IFNAR1과 IFNAR2로 구성된 이종이량체 세포막 수용체 IFNAR과 결합한다. 리간드 결합은 고친화성 수용체 서브유닛 IFNAR2에 의해 시작된다(Piehler *외*, 2012, Immunological Reviews, doi.org/10.1111/imr.12001). 따라서 I형 IFN은 신체의 거의 모든 세포에 작용할 수 있다. 16개의 I형 인터페론 아형이 확인되었으며, IFNAR2에 대한 친화성 및 활성에 있어 고유한 변동성이 다양하다.

[0254] 일부 구현예에서, I형 IFN 모이어티는 인터페론-α(IFNα) 모이어티이다. 다른 구현예에서, I형 IFN 모이어티는 인터페론-β(IFNβ) 모이어티이다.

[0255] 다른 구현예에서, I형 IFN 모이어티는 인터페론-ω(IFNω), 인터페론-ε(IFNε) 또는 인터페론-κ(IFNκ) 모이어티이다.

[0256] I형 IFN 모이어티는 치환, 결실 또는 삽입과 같은 하나 이상의 돌연변이에 의해 야생형 IFN 서열과 다른 서열을 포함할 수 있다. 수용체 결합을 감소시켜 IFN 활성을 감쇄시키는 치환체를 적절히 사용할 수 있다. N- 또는 C-말단 결실(또는 절단)이 있는 아미노산도 사용할 수 있다(*예*: 성숙한 I형 IFN의 N- 또는 C-말단에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 아미노산이 절단된 아미노산). 본 발명자들은 이론에 얽매이지 않고, 말단 절단이 IFN 모이어티에 추가적인 입체적 제약을 가하고 IFN 전구단백질에서 프로테아제 절단성 링커가 절단될 때까지 IFN 활성을 감소시킨다고 믿는다.

[0257] 예시적인 I형 IFN 모이어티에 대한 자세한 내용은 아래에서 확인할 수 있다.

[0258] **6.3.1. 인터페론-α 모이어티**

[0259] IFNα 유전자는 9번 염색체에 있는 알파 인터페론 유전자 클러스터의 일원이다. 인코딩된 사이토카인은 강력한 항바이러스, 항증식 및 면역 조절 특성을 가진 선천성 면역 반응의 핵심 부분으로 바이러스 감염에 반응하여 생성되는 I형 인터페론 계열의 일원이다. IFNα는 단백질 계열을 말하며, 인간 IFNα의 아형은 최소 15가지로 알려져 있다. 확인된 주요 아형은 IFNα1, IFNα2, IFNα8, IFNα10, IFNα14 및 IFNα21이다.

[0260] IFNα1 유전자에는 두 가지 대립 유전자 변이체가 있다. IFNα1a and IFNα1b. 인간 IFNα1a의 아미노산 서열은 아래에 밑줄이 그어진 신호 펩타이드와 함께 재현된 UniProtKB 접근 번호 P01562를 할당받았다.

[0261] MASPFALLMV LVVLSCKSSC SLGCDLPETH SLDNRRTLML LAQMSRISPS

[0262] SCLMDRHDFG FPQEEFDGNQ FQKAPAISVL HELIQQIFNL FTTKDSSAAW

[0263] DEDLLDKFCT ELYQQLNDLE ACVMQEERVG ETPLMNADSI LAVKKYFRRI

[0264] TLYLTEKKYS PCAWEVVRAE IMRSLSLSTN LQERLRRKE (SEQ ID NO: 1)

[0265] 인간 IFNα1b 유전자는 코딩 영역에서 하나의 염기 변화로 인해 아미노산 서열에 단일 변화(성숙 단백질에서 Ala114 대신 Val114, 전장 폴리펩타이드에서 Ala137 대신 Val137에 해당)가 발생하여 IFNα1a 대립유전자 변이체와 차이가 있다.

[0266] IFNα2 대립유전자에는 IFNα2a, IFNα2b 및 IFNα2c의 세 가지 대립 유전자 변이체가 있다. 대립유전자 IFNα2b가 우세한 대립유전자이고, 대립유전자 IFNα2a는 덜 우세하며 IFNα2c는 부차적인 대립 유전자 변이체일 뿐이다. 인간 IFNα2의 아미노산 서열에는 UniProtKB 가입 번호 P01563이 지정되어 있다. 아래는 신호 펩타이드에 밑줄이 그어진 IFNα2b 대립 유전자의 서열을 재현한 것이다.

[0267] MALTFALLVA LLVLSCKSSC SVGCDLPQTH SLGSRRTLML LAQMRRISLF

[0268] SCLKDRHDFG FPQEEFGNQF QKAETIPVLH EMIQQIFNLF STKDSSAAWD

[0269] ETLLDKFYTE LYQQLNDLEA CVIQGVGVTE TPLMKEDSIL AVRKYFQRIT

[0270] LYLKEKKYSP CAWEVVRAEI MRSFSLSTNL QESLRSKE (SEQ ID NO: 2)

[0271] IFNα2b는 성숙 단백질의 23번 위치에 아르기닌(R)이 있는 반면, IFNα2a는 라이신(K)이 있다. 따라서, 일부 구현예에서, IFNα2 모이어티는 성숙 단백질의 위치 23에 대응하는 위치에 아르기닌을 갖는다. 다른 구현예에서, IFNα2 모이어티는 성숙 단백질의 위치 23에 해당하는 위치에 라이신을 갖는다.

[0272] 다양한 양태에서, IFNα 모이어티는 성숙 IFNα1a, IFNα1b 및/또는 IFNα2b, IFNα2a 또는 IFNα2c의 아미노산 서열 또는 N- 및/또는 C-말단에서 최대 15개의 아미노산이 절단된 이의 단편과 적어도 약 90 %, 적어도 약 91 %, 적어도 약 92 %, 적어도 약 93 %, 적어도 약 94 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 96 %, 적어도 약 97 %, 적어도 약 98 %, 적어도 약 99 % 또는 100 %의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다(*예*: 성숙 IFNα1a, IFNα1b 및/또는 IFNα2b, IFNα2a 또는 IFNα2c의 N 및/또는 C 말단에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15 아미노산이 절단된 경우).

[0273] 일부 구현예에서, IFNα 모이어티는 하나 이상의 아미노산 치환(*예*: IFNAR 결합 및/또는 작용 작용을 변경하는 치환체)을 갖는다. 예시적인 치환체는 WO 2013/107791, 미국 특허 번호 8,258,263, WO2007/000769A2, WO2008/124086, WO2010/030671, WO2018/144999A1 및 WO2015/007520, WO2013/059885, WO2020156467A1, WO2021/126929A1에 나와 있다. 일부 구현예에서, IFNα 모이어티는 다음과 같이 구성된다.

[0274] a) L15A, A19W, R22A, R23A, L26A, F27A, L30A, L30V, K31A, D32A, R33K 또는 R33A 또는 R33Q, H34A, D35A, Q40A, H57Y, E58N, Q61S, F64A, N65A, T69A, L80A, D82E, Y85A, T86I, Y89A, D114R 또는 D114A, L117A, R120A 또는 R120E 또는 R120K, K121E, R125A, K133A, K134A, R144A, A145G 또는 A145M, M148A, R149A, R149K, S152A, L153A, N156A 중에서 선택한 하나 이상의 치환체; 및/또는

[0275] b) WO2007000769A2에 기술된 아미노산 57-89 및 159-165에서 하나 이상의 치환체; 및/또는

[0276] c) 9, 17, 47, 65, 66, 117, 123, 128, 147 및 157에서 하나 이상의 아미노산이 WO2021126929A1에 기술된 알라닌, 글리신 또는 트레오닌으로 치환되는 경우.

[0277] 앞서 설명한 치환체의 아미노산 위치는 성숙 IFNα2b를 기준으로 제공된다.

[0278] 다른 구현예에서, IFNα 모이어티는 표 1에 명시된 하나 이상의 아미노산 치환체를 포함한다. 표 1은 IFNα2의 염기서열 내 아미노산 위치를 기준으로 확인된 IFNα 치환체를 나타낸다.

표 1

[0279]

표 1
예시적인 IFNα 돌연변이(성숙 IFNα2의 서열 참조)

IFNα 서열 돌연변이	치환체의 소스/영향
L15A	WO2018014068A9
R22A	WO2018014068A9
R23A	WO2018014068A9
S25A	WO2018014068A9
L26A	Thomas *외*, 2011, Cell, 146(4):621-632
F27A	Thomas *외*, 2011, Cell, 146(4):621-632
L30A	Thomas *외*, 2011, Cell, 146(4):621-632
L30V	WO2018014068A9
K31A	WO2018014068A9
D32A	WO2018014068A9
R33K	WO2018014068A9
R33Q	WO2018014068A9
R33A	WO2013059885A2
H34A	WO2018014068A9
D35E	WO2016201337A1
Q40A	WO2018014068A9

H57A	Thomas 외, 2011, Cell, 146(4):621-632
H57S	WO2013134138A1
E58A	Thomas 외, 2011, Cell, 146(4):621-632
Q61A	WO2016201337A1
Q90A	Piehler 외, 2012, Immunological Reviews, doi.org/10.1111/imr.12001
E96A	Piehler 외, 2012, Immunological Reviews, doi.org/10.1111/imr.12001
D114R	WO2018014068A9
L117A	WO2018014068A9
R120A	WO2018014068A9
R120E	WO2018014068A9
Q124R	WO2022015711A1
R125A	WO2018014068A9
R125E	WO2018014068A9
K131A	WO2018014068A9
E132A	WO2018014068A9
K133A	WO2018014068A9
K134A	WO2018014068A9
L135A	WO2013134138A1
R144A	WO2022015711A1
R144D	WO2018014068A9
R144E	WO2018014068A9
R144G	WO2018014068A9
R144H	WO2018014068A9
R144I	WO2018014068A9
R144K	WO2018014068A9
R144L	WO2013059885A2
R144N	WO2018014068A9
R144Q	WO2018014068A9
R144S	WO2013059885A2
R144T	WO2013059885A2
R144V	WO2018014068A9
R144Y	WO2013059885A2
A145D	WO2013059885A2
A145E	WO2018014068A9
A145G	WO2018014068A9, WO2022015711A1
A145H	WO2013059885A2
A145I	WO2018014068A9
A145K	WO2013059885A2
A145L	WO2018014068A9
A145M	WO2018014068A9
A145N	WO2018014068A9
A145Q	WO2018014068A9
A145S	WO2018014068A9
A145T	WO2018014068A9
A145V	WO2018014068A9
A145Y	WO2013059885A2
M148A	WO2018014068A9
R149A	WO2022015711A1, Piehler 외, 2012, Immunological Reviews, doi.org/10.1111/imr.12001
R149K	Piehler 외, 2012, Immunological Reviews, doi.org/10.1111/imr.12001
S152A	Piehler 외, 2012, Immunological Reviews, doi.org/10.1111/imr.12001, WO2022015711A1
L153A	WO2018014068A9
N156A	WO2018014068A9
R162A	WO2016201337A1
E165D	WO2016201337A1

L30A, H57Y, E58N, Q61S	WO2018014068A9
R33A, H57Y, E58N, Q61S	WO2013059885A2
H57S, E58S, Q61S	부위 1에서 IFNα-IFNAR1 결합 친화력 변경
H57Y, E58N, Q61S	WO2007000769A2
N65A, L80A, Y85A, Y89A	WO2018014068A9
N65A, L80A, Y85A, Y89A, D114A	WO2018014068A9
N65A, L80A, Y85A, Y89A, L174A	WO2018014068A9
N65A, L80A, Y85A, Y89A, R120A	WO2018014068A9
Y85A, Y89A, D114A	WO2018014068A9
Q90A, R120A	Piehler *외*, 2012, Immunological Reviews, doi.org/10.1111/imr.12001
D114A, R120A	WO2018014068A9
L117A, R120A	WO2018014068A9
L117A, R120A, K121A	WO2018014068A9
R120A, K121A	WO2018014068A9
R120E, K121E	WO2018014068A9
R144A, H57Y, E58N, Q61S	WO2013059885A2
M148A, H57Y, E58N, Q61S	WO2018014068A9
R149A, R162A	WO2013134138A1
L153A, H57Y, E58N, Q61S	WO2018014068A9
잔기 L161-E165 삭제	WO2018014068A9

[0280] 일부 구현예에서, IFNα 모이어티는 아미노산 치환체 R33A 또는 R33K, Q90A, E96A, R120A, A145M, R149A 또는 R149K, S152A 또는 상기 둘 이상의 임의의 조합(*예*: Q90A + R120A 또는 A145M + R149K)을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0281] 본 발명의 IFN 전구단백질에 활용될 수 있는 예시적인 IFNα 모이어티의 서열은 아래 표 2에 제시되어 있다:

표 2

[0282]

표 2
예시적인 IFNα 모이어티

구조체	서열	SEQ ID NO:
IFNα1a	CDLPETHSLDNRRTLMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAPAISVLHELIQQIFNLFTTKDSSAAWDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNADSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE	
IFNα1b	CDLPETHSLDNRRTLMLLAQMSRISPSSCLMDRHDFGFPQEEFDGNQFQKAPAISVLHELIQQIFNLFTTKDSSAAWDEDLLDKFCTELYQQLNDLEACVMQEERVGETPLMNVDSILAVKKYFRRITLYLTEKKYSPCAWEVVRAEIMRSLSLSTNLQERLRRKE	3
IFNα2a	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRKISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE	4
IFNα2b	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE	5
IFNα2b (R33A)	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDAHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE	6
IFNα2b (R33K)	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDKHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE	7
IFNα2b (Q90A)	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYAQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE	8
IFNα2b (E96A)	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLAACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE	9
IFNα2b (R120A)	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVAKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE	10

IFNα2b (A145M)	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAA WDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRMEIMRS FSLSTNLQESLRSKE	11
IFNα2b (R149A)	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAA WDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMAS FSLSTNLQESLRSKE	12
IFNα2b (R149K)	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAA WDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMKS FSLSTNLQESLRSKE	13
IFNα2b (S152A)	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAA WDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRS FALSTNLQESLRSKE	14
ΔN-IFN-ΔC	THSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETL LDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLST NLQ	15
IFN-ΔC	CDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAA WDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRS FSLSTNLQ	16

[0283] 6.3.2. 인터페론 1-β 모이어티

[0284] 인터페론 1-β(IFN1β 또는 IFN 1-β)는 생물학적 및 화학적 자극에 반응하여 면역계에서 자연적으로 생성되는 사이토카인이다. IFN1β는 섬유아세포에서 대량으로 생성되는 분자량 약 22 kDa의 글리코실레이트 분비 단량체로, 섬유아세포 인터페론으로도 알려져 있다. IFN1β는 IFNAR1 및 IFNAR2 이량체로 구성된 IFNAR 수용체와 결합하여 JAK/STAT 경로 및 기타 경로를 통해 신호를 유도한다. IFN1β는 또한 IFNAR1과 단독으로 결합하여 기능하고 Jak-STAT 경로와 독립적으로 신호를 보낼 수 있다(*예*: Stanifer *외*, 2019, Int. J Mol. Sci. 20(6):1445 참조).

[0285] IFN1β는 5개의 α-나선으로 지정된 A(YNLLGFLQRSSNFQCQKLL (SEQ ID NO: 18)), B (KEDAALTIYEMLQNIFAIF(SEQ ID NO: 19)), C (ETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKL(SEQ ID NO: 20)), D (SSLHLKRYYGRILHYLKA(SEQ ID NO: 21)), 및 E (HCAWTIVRVEILRNFYFINRLT(SEQ ID NO: 22))로 지정된 5개의 α-나선이 포함되어 있다. 5개의 α-나선은 AB, BC, CD 및 DE 루프로 지정된 2-28개의 잔기로 이루어진 고리로 상호 연결된다. AB 루프의 A 나선과 DE 루프의 E 나선은 IFN1β와 IFNAR 수용체의 결합에 관여하는 것으로 보고되었다.

[0286] 두 가지 유형의 IFN1β가 설명되었다. 인터페론 1-β1(IFN1β1) 및 인터페론 1-β3(IFN1β3).

[0287] 인간 IFNβ 전구체의 아미노산 서열은 GenBank에 등재되어 있으며, 가입 번호는 AAA36040.1이고 아래에 재현되어 있다(신호 펩타이드에 밑줄이 그어져 있음).

[0288] MTNKCLLQIA LLLCFSTTAL SMSYNLLGFL QRSSNFQCQK LLWQLNGRLE

[0289] YCLKDRMNFD IPEEIKQLQQ FQKEDAALTI YEMLQNIFAI FRQDSSSTGW

[0290] NETIVENLLA NVYHQINHLK TVLEEKLEKE DFTRGKLMSS LHLKRYYGRI

[0291] LHYLKAKEYS HCAWTIVRVE ILRNFYFINR LTGYLRN (SEQ ID NO: 23)

[0292] 다양한 양태에서, IFNβ 모이어티는 성숙 IFN1β1 또는 N- 및/또는 C-말단에서 최대 15개 아미노산이 절단된 이의 단편의 아미노산 서열과 적어도 약 90 %, 적어도 약 91 %, 적어도 약 92 %, 적어도 약 93 %, 적어도 약 94 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 96 %, 적어도 약 97 %, 적어도 약 98 %, 적어도 약 99 % 또는 100 %의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다(*예*: IFN1β1의 N- 및/또는 C-말단에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 아미노산의 절단).

[0293] 다양한 구현예에서, IFNβ 모이어티는 IFN1β1과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환 및/또는 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, 치환은 C17S(성숙 IFN1β1과 관련하여)이고 결실은 US 2009/0025106 A1로서 IFN-ΔI에 기술된 C- 말단 절단 중 하나이다. IFNA2, IFNA3, IFNA4, IFNA5, IFNA6, IFN-Δ7, IFN-Δδ, IFNA9, 및 IFN-ΔI O.

[0294] 6.3.3. 기타 I형 인터페론

[0295] 특정 양태에서 I형 IFN 모이어티는 IFNα 또는 IFNβ 모이어티가 아닌 인터페론-ω(IFNω), 인터페론-ε(IFNε)

또는 인터페론-κ(IFNκ) 모이어티와 같은 다른 모이어티이다.

[0296] 인간 IFNω는 UniProt 가입 번호, P05000으로 식별되며 IFNω1 대립유전자는 아래 설명된 아미노산 서열을 가지며 신호 서열은 밑줄이 그어져 있다.

[0297] MALLFPLLAALVMTSYSPVGSLGCDLPQNHGLLSRNTLVLLHQMRRISPFLCLKDRRDF

[0298] RFPQEMVKGSQLQKAHVMSVLHEMLQQIFSLFHTERSSAAWNMTLLDQLHTGLHQQL

[0299] QHLETCLLQVVGEGESAGAISSPALTLRRYFQGIRVYLKEKKYSDCAWEVVRMEIMKSL

[0300] FLSTNMQERLRSKDRDLGSS (SEQ ID NO: 24)

[0301] 다양한 양태에서, IFNω 모이어티는 성숙 IFN1ω1 또는 N- 및/또는 C-말단에서 최대 15개 아미노산이 절단된 이의 단편의 아미노산 서열과 적어도 약 90 %, 적어도 약 91 %, 적어도 약 92 %, 적어도 약 93 %, 적어도 약 94 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 96 %, 적어도 약 97 %, 적어도 약 98 %, 적어도 약 99 % 또는 100 %의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다(*예*: IFN1ω1의 N- 및/또는 C-말단에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 아미노산의 절단).

[0302] 인간 IFNε는 UniProt 가입 번호, Q86WN2로 식별되며 아래에 설명된 아미노산 서열을 가지고 있으며 신호 서열은 밑줄이 그어져 있다.

[0303] MIIKHFFGTVLVLLASTTIFSLDLKLIIFQQRQVNQESLKLLNKLQTLSIQQCLPHRKNFLLP

[0304] QKSLSPQQYQKGHTLAILHEMLQQIFSLFRANISLDGWEENHTEKFLIQLHQQLEYLEAL

[0305] MGLEAEKLSGTLGSDNLRLQVKMYFRRIHDYLENQDYSTCAWAIVQVEISRCLFFVFSL

[0306] TEKLSKQGRPLNDMKQELTTEFRSPR (SEQ ID NO: 25)

[0307] 다양한 측면에서, IFNε 모이어티는 성숙한 IFN1ε의 아미노산 서열과 적어도 약 90 %, 적어도 약 91 %, 적어도 약 92 %, 적어도 약 93 %, 적어도 약 94 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 96 %, 적어도 약 97 %, 적어도 약 98 %, 적어도 약 99 % 또는 100 % 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 또는 그 N- 및/또는 C- 말단에서 최대 15 아미노산이 절단된 그 단편*(예를 들어*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 아미노산이 IFN1ε의 N- 및/또는 C- 말단에서 절단된 것).

[0308] 인간 IFNκ는 UniProt 가입 번호로 식별된다. Q9POW0으로 식별되며 아래에 설명된 아미노산 서열을 가지고 있으며 신호 서열은 밑줄이 그어져 있다.

[0309] MSTKPDMIQKCLWLEILMGIFIAGTLSLDCNLLNVHLRRVTWQNLRHLSSMSNSFPVEC

[0310] LRENIAFELPQEFLQYTQPMKRDIKKAFYEMSLQAFNIFSQHTFKYWKERHLKQIQIGLD

[0311] QQAEYLNQCLEEDKNENEDMKEMKENEMKPSEARVPQLSSLELRRYFHRIDNFLKEKK

[0312] YSDCAWEIVRVEIRRCLYYFYKFTALFRRK (SEQ ID NO: 26)

[0313] 다양한 측면에서, IFNκ 모이어티는 성숙한 IFN1κ의 아미노산 서열과 적어도 약 90 %, 적어도 약 91 %, 적어도 약 92 %, 적어도 약 93 %, 적어도 약 94 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 96 %, 적어도 약 97 %, 적어도 약 98 %, 적어도 약 99 % 또는 100 % 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열 또는 그 N- 및/또는 C- 말단에서 최대 15 아미노산이 절단된 그 단편*(예를 들어*,, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개의 아미노산이 IFN1κ의 N- 및/또는 C- 말단에서 절단된 것).

[0314] **6.4. 프로테아제-절단성 링커**

[0315] 본 개시내용의 IFN 전구단백질은 일반적으로 하기 넘버링된 구현예에서 제1, 제2, 제3 및 제4 링커로 지칭되는 4개의 링커를 포함하며, 제1 및 제2 링커는 하나의 폴리펩타이드 사슬에 있고 제3 및 제4 링커는 다른 폴리펩타이드 사슬에 있다. 링커 중 2~4개는 프로테아제로 절단 가능한 링커이다. 일부 구현예에서, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커는 모두 프로테아제 절단성 링커이다. 다른 구현예에서는, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커 중 2개만 프로테아제 절단성 링커이다. 예를 들어, 특정 구현예에서, 제1 및 제3 링커는 프로테아제 절단성 링커이고, 제2 및 제4 링커는 비절단성 링커이다. 다른 구현예에서, 제1 및 제3 링커는 비절단성 링커이고, 제2 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커이다.

[0316] 프로테아제 절단성 링커는 8개 아미노산에서 100개 이상의 아미노산까지 다양하다. 다양한 구현예에서, 프로테아제 절단성 링커는 8 아미노산에서 15 아미노산, 10 아미노산에서 20 아미노산, 20 아미노산에서 80 아미노산의 범위이며, 특정 양태에서 비절단성 펩타이드 링커는 20 아미노산에서 60 아미노산, 20 아미노산에서 40 아미노산, 30 아미노산에서 50 아미노산, 20 아미노산에서 80 아미노산 또는 30 아미노산에서 70 아미노산의 길이를 갖는다.

[0317] 프로테아제-절단성 링커는 하나 이상의 프로테아제, 예를 들어 섹션 6.4.1에서 제시되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질 서열을 포함한다. 하나 이상의 기질 서열, *예를 들어*, 섹션 6.4.2에 제시된 기질 서열 중 하나 이상에는 전형적으로(그러나 반드시 그렇지는 않음) 하나 이상의 스페이서 서열, *예를 들어*, 섹션 6.4.3에 기재된 바와 같은 스페이서 서열이 측접되어 있다. 각각의 프로테아제-절단성 링커는 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 기질 서열을 포함할 수 있다. 스페이서 서열은 인접, 중첩하거나, 또는 스페이서 서열에 의해 분리될 수 있다. 바람직하게는, 프로테아제-절단성 링커의 C- 및 N-말단은 스페이서 서열을 포함한다.

[0318] 4개의 프로테아제 절단성 링커를 포함하는 IFN 전구단백질의 다양한 측면에서, 제1 및 제3 프로테아제 절단성 링커는 동일한 프로테아제에 의해 절단 가능하거나 및/또는 제2 및 제4 프로테아제 절단성 링커는 동일한 프로테아제에 의해 절단 가능하다. 일부 구현예에서, 프로테아제는 표 101에 제시된 프로테아제이다.

[0319] 4개의 프로테아제 절단성 링커를 포함하는 IFN 전구단백질의 추가 양상에서, 제1 및 제3 프로테아제 절단성 링커는 동일한 기질 서열을 구성하고 및/또는 제2 및 제4 프로테아제 절단성 링커는 동일한 기질 서열을 구성한다. 일부 구현예에서, 기질 서열은 표 102에 기재되어 있으며, 다른 구현예에서, 제1 및 제3 프로테아제 절단성 링커는 또한 동일한 스페이서 서열을 포함 및/또는 제2 및 제4 프로테아제 절단성 링커는 또한 동일한 스페이서 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서 서열은 표 103에 제시되어 있다.

[0320] 추가적인 양상에서, 4개의 프로테아제 절단 가능한 링커를 포함하는 IFN 전구단백질에서, 제1 및 제3 링커는 동일한 링커 서열을 구성하고 및/또는 제2 및 제4 링커는 동일한 링커 서열을 구성한다. 일부 구현예에서, 링커 서열은 표 104에 제시되어 있다.

[0321] 4개의 프로테아제 절단성 링커를 포함하는 IFN 전구단백질의 일부 구현예에서, 제1 및 제3 프로테아제 절단성 링커는 제2 및 제4 프로테아제 절단성 링커와 동일하다.

[0322] 다른 구현예에서, 제1 및 제3 프로테아제 절단성 링커는 제2 및 제4 프로테아제 절단성 링커와 상이하다.

[0323] 전술한 양태 및 구현예에서, 상이한 링커는 동일한 프로테아제, 상이한 프로테아제에 의해 절단될 수 있거나, 링커가 다수의 기질 서열을 포함하는 경우, 상이한 링커는 다수의 프로테아제에 의해 절단될 수 있으며, 그 중 하나 이상은 공통적이고 하나 이상은 상이한 프로테아제에 의해 절단될 수 있다.

[0324] 예시적인 프로테아제 절단성 링커 서열은 섹션 6.4.4에 제시되어 있다.

[0325] **6.4.1. 프로테아제**

[0326] 프로테아제-절단성 링커에 혼입될 수 있는 예시적인 프로테아제 기질 서열은 하기 표 101에 제시되어 있다.

표 101

[0327]

표 101 기질 절단용 예시적인 프로테아제		
ADAMS, ADAMTS, 예:	카스파제, 예:	MMP24
ADAM8	카스파제1	MMP26
ADAM9	카스파제2	MMP27
ADAM10	카스파제3	
ADAM12	카스파제4	
ADAM15	카스파제5	
ADAM17/TACE	카스파제6	
ADAMDEC1	카스파제7	
ADAMTS1	카스파제8	시스테인 프로테아제, 예:
ADAMTS4	카스파제9	크루지페인
ADAMTS5	카스파제10	레구메인
	카스파제14	오투베인-2
아스파테이트 프로테아제, 예:		
BACE	시스테인 카텝신, 예:	KLK, 예:
레닌	카텝신 B	KLK4
	카텝신 C	KLK5
아스파르트 캡신, 예:	카텝신 K	KLK6
카텝신 D	카텝신 L	KLK7
카텝신 E	카텝신 S	KLK8
	카텝신 V/L2	KLK10

[0328]

NS3/4A	카텝신 X/Z/P	KLK11
PACE4		KLK13
플라스민	MMP, 예:	KLK14
PSA	MMP1	
tPA	MMP2	메탈로 프로테아제, 예:
트롬빈	MMP3	메프린
트립타제		네프릴리신
uPA	MMP7	PSMA
	MMP8	BMP-1
II형 막관통	MMP9	
세린 프로테아제(TTSP), 예:	MMP10	
DESC1	MMP11	세린 프로테아제, 예:
DPP-4	MMP12	활성화 단백질 C
FAP	MMP13	카텝신 A

표 101

기질 절단용 예시적인 프로테아제

헵신	MMP14	카텝신 G
매트립타제-2	MMP15	키마제
MT/SP1/매트립타제	MMP16	응고 인자 프로테아제
	MMP17	(예: FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa)
TMPRSS2	MMP19	인간 호중구 엘라스타제
TMPRSS3	MMP20	락토페린
TMPRSS4	MMP23	

[0329]

[0330] 특정 구현예에서, 프로테아제는 매트릭스 메탈로프로테아제(MMP)-2, MMP-9, 레구메인 아스파라기닐 엔도펩티다제, 트롬빈, 섬유아세포 활성화 프로테아제(FAP), MMP-1, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-12, MMP-13, MMP-14, 막 유형 1 매트릭스 메탈로프로테아제(MT1-MMP), 플라스민, 막관통 프로테아제, 세린(TMPRSS-3/4), 카텝신 A, 카텝신 B, 카텝신 D, 카텝신 E, 카텝신 F, 카텝신 H, 카텝신 K, 카텝신 L, 카텝신 L2, 카텝신 O, 카텝신 S, 카스파제1, 카스파제2, 카스파제3, 카스파제4, 카스파제5, 카스파제6, 카스파제7, 카스파제8, 카스파제9, 카스파제10, 카스파제11, 카스파제12, 카스파제13, 카스파제14, 인간 호중구 엘라스타제, 우로키나제/우로키나제-유형 플라스미노겐 활성화제(uPA), 디스인테그린 및 메탈로프로테아제(ADAM)10, ADAM12, ADAM17, 트롬보스폰딘 모이어티가 있는 ADAM(ADAMTS), ADAMTS5, 베타 세크레타제(BACE), 그란자임 A, 그란자임 B, 구아니디노벤조아타제, 헵신, 매트립타제, 매트립타제2, 메프린, 네프릴리신, 전립선-특이적 막 항원(PSMA), 종양 괴사 인자-전환 효소(TACE), 칼리크레인-관련 펩티다제(KLK)3, KLK5, KLK7, KLK11, C형 간염 바이러스의 NS3/4 프로테아제(HCV-NS3/4), 조직 플라스미노겐 활성화제(tPA), 칼페인, 칼페인 2, 글루타메이트 카복시펩티다제 II, 혈장 칼크레인, AMSH-유사 프로테아제, AMSH, γ-세크레타제 구성요소, 항플라스민 절단 효소(APCE), 데사이신 1, 아폽토시스-관련 시스테인 펩티다제 또는 N-아세틸화 알파-연결 산성 다이펩티다제-유사 1이다.

[0331] 6.4.2. 기질

[0332] 종양 프로테아제에 의해 절단 가능하고 프로테아제 절단성 링커에 통합될 수 있는 예시적인 기질 서열은 하기 표 102에 제시되어 있다.

표 102

[0333]

표 102

프로테아제-절단성 링커를 위한 기질 서열

기질 서열	설계	프로테아제 절단	SEQ ID NO:
$(DE)_8RPLALWRS(DR)_8$	SU1	MMP7	27
AARGPAIH	SU2		28
AAYHLVSQ	SU3	콜라게나제	29
AGLGISST	SU4	콜라게나제	30
AGLGVVER	SU5	콜라게나제	31
ALAL	SU6	리소좀 효소	32
ALFFSSPP	SU7		33
ALFKSSFP	SU8		34
ALLLALL	SU9	TOP	35
AQFVLTEG	SU10	콜라게나제	36
AQNLLGMV	SU11		37
AVGLLAPP	SU12	세린 프로테아제	38
DAFK	SU13	우로키나제 플라스미노겐 활성제(uPA)	39
DEVD	SU14	카스파제-3	40
DEVDP	SU15	카스파제-3	41
DPRSFL	SU16	트롬빈	42
DVAQFVLT	SU17	콜라게나제	43
DVLK	SU18	플라스민	44
DWLYWPGI	SU19		45

EDDDDKA	SU20	엔테로키나제	46
EP(Cit)G(Hof)YL	SU21	MMP2, MMP9, MMP14	47
EPQALAMS	SU22	콜라게나제	48
ESLPVVAV	SU23	콜라게나제	49
ESPAYYTA	SU24	MMP	50
F(Pip)RS	SU25	트롬빈	
FK	SU26	리소좀 효소	
FPRPLGITGL	SU27		51
FRLLDWQW	SU28		52
GFLG	SU29	리소좀 효소	53
GGAANLVRGG	SU30	MMP11	54
GGGRR	SU31	우로키나제 플라스미노겐 활성제(uPA)	55
GGPRGLPG	SU32	카텝신 K	56
GGQPSGMWGW	SU33		57
GGSIDGR	SU34	인자 Xa	58
GGWHTGRN	SU35		59
GIAGQ	SU36	콜라게나제	60
GKAFRR	SU37	칼리크레인 2	61
GPAGLYAQ	SU38		62
GPAGMKGL	SU39		63
GPEGLRVG	SU40	콜라게나제	64
GPLGIAGI	SU41	콜라게나제	65
GPLGVRG	SU42		66
GPQGIAGQ	SU43	콜라게나제	67
GPQGLLGA	SU44	콜라게나제	68
GPRSFG	SU45		69
GPRSFGL	SU46		70
GPSHLVLT	SU47		71
GVSQNYPIVG	SU48	HIV 프로테아제	72
GVVQASCRLA	SU49	CMV 프로테아제	73
GWEHDG	SU50	인터루킨 1β 전환 효소	74
HSSKLQ	SU51	전립선 특이 항원	75
HSSKLQEDA	SU52	전립선 특이 항원	76
HSSKLQL	SU53	전립선 특이 항원	77
HTGRSGAL	SU54		78
IDGR	SU55	인자 Xa	79
IEGR	SU56	인자 Xa	80
ILPRSPAF	SU57		81
IPVSLRSG	SU58	MMP	82
ISSGL	SU59	MMP	83
ISSGLL	SU60	MMP	84
ISSGLLS	SU61	MMP	85
ISSGLLSS	SU62	MMP	86
ISSGLSS	SU63	MMP	87
KGSGDVEG	SU64	카스파제-3	88
KQEQNPGST	SU65	FAP	89
KRALGLPG	SU66	MMP7	90
LAAPLGLL	SU67		91
LAPLGLQRR	SU68		92
LAQKLKSS	SU69		93
LAQRLRSS	SU70		94
LEATA	SU71	MMP9	95
LKAAPRWA	SU72		96
LLAPSHRA	SU73		97
LPGGLSPW	SU74		98
LSGRSANI	SU75	세린 프로테아제	99
LSGRSANP	SU76	세린 프로테아제	100

LSGRSDDH	SU77	세린 프로테아제	101
LSGRSDIH	SU78	세린 프로테아제	102
LSGRSDNH	SU79	세린 프로테아제	103
LSGRSDNI	SU80	세린 프로테아제	104
LSGRSDNP	SU81	세린 프로테아제	105
LSGRSDQG	SU82	세린 프로테아제	106
LSGRSDQH	SU83	세린 프로테아제	107
LSGRSDTH	SU84	세린 프로테아제	108
LSGRSDYH	SU85	세린 프로테아제	109
LSGRSGNH	SU86	세린 프로테아제	110
LVLASSSFGY	SU87	단순 포진 바이러스 프로테아제	111
MDAFLESS	SU88	콜라게나제	112
MGLFSEAG	SU89		113
MIAPVAYR	SU90		114
MVLGRSLL	SU91		115
NLL	SU92	카텝신 B	
NTLSGRSENHSG	SU93		116
NTLSGRSGNHGS	SU94		117
PAGLWLDP	SU95		118
PGGPAGIG	SU96		119
PIC(Et)FF	SU97	카텝신 D	120
PLGC(me)AG	SU98	MMP	121
PLGL	SU99		122
PLGLAG	SU100	MMP	123
PLGLAX	SU101	MMP	124
PLGLWA	SU102	MMP	125
PLGLWSQ	SU103	MMP	126
PLTGRSGG	SU104		127
PMAKK	SU105		128
PPRSFL	SU106	트롬빈	129
PR(S/T)(L/I)(S/T)	SU107	MMP9	
PRFRIIGG	SU108	플라스민	130
PVGYTSSL	SU109		131
PVQPIGPQ	SU110	콜라게나제	132
QALAMSAI	SU111	콜라게나제	133
QGRAITFI	SU112		134
QNQALRMA	SU113		135
RGPA	SU114		136
RGPAFNPM	SU115		137
RGPATPIM	SU116		138
RKSSIIIRMRDVVL	SU117	플라스민	139
RLQLKAC	SU118	MMP	140
RLQLKL	SU119	MMP	141
RMHLRSLG	SU120		142
RPSPMWAY	SU121		143
RQARVVNG	SU122	매트립타제	144
SAGFSLPA	SU123		145
SAPAVESE	SU124	콜라게나제	146
SARGPSRW	SU125		147
SGEPAYYTA	SU126		148
SGGPLGVR	SU127		149
SGRIGFLRTA	SU128	MMP14	150
SGRSA	SU129	우로키나제 플라스미노겐 활성제(uPA)	151
SGRSANPRG	SU130		152
SMLRSMPL	SU131		153
SPLPLRVP	SU132		154
SPLTGRSG	SU133		155

SPRSIMLA	SU134		156
SSRGPAYL	SU135		157
SSRHRRALD	SU136	플라스민	158
SSSFDKGKYKKGDDA	SU137	플라스민	159
SSSFDKGKYKRGDDA	SU138	플라스민	160
STFPFGMF	SU139		161
TARGPSFK	SU140		162
TGRGPSWV	SU141		163
TSGRSANP	SU142		164
TSTSGRSANPRG	SU143		165
VAGRSMRP	SU144		166
VAQFVLTE	SU145	콜라게나제	167
VHMPLGFLGP	SU146		168
VPLSLYSG	SU147	MMP9	169
VVPEGRRS	SU148		170
WATPRPMR	SU149		171
YGAGLGVV	SU150	콜라게나제	172
HPVGLLAR	SU151		173

[0334] **6.4.3. 스페이서**

[0335] 프로테아제-절단성 링커에 혼입될 수 있는 예시적인 스페이서 서열은 하기 표 103에 제시되어 있다. 표 103에 제시된 스페이서 서열에 추가적으로, 섹션 6.5에 기재된 비절단성 링커 서열, *예를 들어*, 표 105에 제시된 비절단성 링커 서열 중 임의의 것, 또는 이들의 일부가 스페이서 서열로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 스페이서 서열은 프로테아제 절단성 링커에서 완전히 결여되어 있다.

표 103

[0336]

표 103
프로테아제-절단성 링커의 스페이서 서열

스페이서 서열	설계	SEQ ID NO:
$(GGGGS)_n$	SP1	174
$(GGGS)_n$	SP2	175
$(GGS)_n$	SP3	176
$(GS)_n$	SP4	177
$(GSGGS)_n$	SP5	178
GGGGSGGGGS	SP6	179
GGGGSGGGGSGGGGS	SP7	180
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	SP8	181
GGGKSGGGKSGGGKS	SP9	182
GGGKSGGKGSGKGGS	SP10	183
GGGS	SP11	184
GGGSG	SP12	185
GGKGSGGKGSGGKGS	SP13	186
GGSGGGGSGGGGS	SP14	187
GGSGGS	SP15	188
GGSGGSGGSGS	SP16	189
GSGGG	SP17	190
GSGSG	SP18	191
GSS	SP19	
GSSG	SP20	192
GSSGGSGGSG	SP21	193
GSSGGSGGSGG	SP22	194
GSSGGSGGSGGS	SP23	195
GSSGGSGGSGGSG	SP24	196

GSSGGSGGSGGSGGGS	SP25	197
GSSGGSGGSGS	SP26	198
GSSGT	SP27	199
GSSSG	SP28	200
QGQSGQ	SP29	201
QGQSGQG	SP30	202
QGQSGS	SP31	203
QSGQ	SP32	204
QSGQG	SP33	205
QSGS	SP34	206
SGQ	SP35	
SGQG	SP36	207
SGS	SP37	
$(G)_n$	SP38	208

[0337] 일부 구현예에서, 위의 표 103에 사용된 바와 같이, n은 1 내지 10의 정수, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다.

[0338] **6.4.4. 예시적인 프로테아제-절단성 링커**

[0339] 하나 이상의 기질 서열뿐만 아니라 스페이서 서열을 포함하는 예시적인 프로테아제-절단성 링커는 하기 표 104에 제시되어 있다.

표 104

[0340]

표 104
프로테아제-절단성 링커 서열

링커 서열	설계	프로테아제 절단	SEQ ID NO:
GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS	PCL1		209
GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS	PCL2		209
GGSGGSIPVSLRSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS	PCL3		210
GGSGGSVPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS	PCL4		211
GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS	PCL5		212
GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGSGRSAGGSGRSA	PCL6		213
AVGLLAPPGGLSGRSANI	PCL7	ADAM17_2, FAPa_1, CTSL1_1	214
AVGLLAPPGGLSGRSANP	PCL8	FAPa_1, ADAM17_2, CTSL1_1	215
AVGLLAPPGGLSGRSDDH	PCL9	MMP14_1, MMP14_1, MMP14_1	216
AVGLLAPPGGLSGRSDIH	PCL10	MMP14_1, MMP14_1, MMP14_1	217
AVGLLAPPGGLSGRSDNH	PCL11	MMP14_1, MMP14_1	218
AVGLLAPPGGLSGRSDNI	PCL12	MMP14_1, CTSL1_1, ADAM17_2	219
AVGLLAPPGGLSGRSDNP	PCL13	CTSL1_1, ADAM17_2, FAPa_1	220
AVGLLAPPGGLSGRSDQH	PCL14		221
AVGLLAPPGGLSGRSDTH	PCL15	FAPa_1, CTSL1_1, ADAM17_2	222
AVGLLAPPGGLSGRSDYH	PCL16		223
AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG	PCL17		224
AVGLLAPPSGRSANPRG	PCL18		225
AVGLLAPPTSGRSANPRG	PCL19		226
GGALFKSSFPGPAGLYAQPLAQKLKSSGGK	PCL20	CTSL1_1, MMP14_1, ADAM17_2	227
GGGGSGGGGSGGGGSFVGGTGGGGSGGGGSGGS	PCL21		228
GGGGSGGGGSGGGGSISSGLLSGRSDNHGGSGGS	PCL22		229
GGGGSGGGGSGGGGSVPLSLYSGGGSGGSGGSGS	PCL23		230
GGGGSGGGGSGPLGLWSQGGGGSGGGGSGGGGSGG	PCL24		231
GGGGSGGGGSKKAAPGGGGSGGGGSGGGGSGGS	PCL25		232
GGGGSGGGGSKKAAPVNGGGGGSGGGGSGGGGS	PCL26		233
GGGGSGGGGSPMAKKGGGGSGGGGSGGGGSGGS	PCL27		234
GGGGSGGGGSPMAKKVNGGGGGSGGGGSGGGGS	PCL28		235
GGGGSGGGGSQARAKGGGGSGGGGSGGGGSGGS	PCL29		236

GGGGSGGGGSQARAKVNGGGGGSGGGGSGGGGS	PCL30		237
GGGGSGGGGSRQARVVNGGGGGSGGGGSGGGGS	PCL31		238
GGGGSGGGGSRQARVVNGGGGGSVPLSLYSGGGGGSGGGGS	PCL32		239
GGGGSGGGGSRQARVVNSVPLSLYSGGGGGSGGGGS	PCL33		240
GGGGSGGGGSVHMPLGFLGPGGGGSGGGGSGGS	PCL34		241
GGGGSVHMPLGFLGPGRSRGSFPGGGGS	PCL35		242
GGGGSVHMPLGFLGPPMAKKGGGGSGGGGSGGS	PCL36		243
GGGGSVHMPLGFLGPRQARVVNGGGGSGGGGS	PCL37		244
GGGGSVHMPLGFLGPRQARVVNGGGGSGGGGSGG	PCL38		245
GGPLAQKLKSSALFKSSFPGPAGLYAQGGR	PCL39	ADAM17_2, CTSL1_1, MMP14_1	246
GLSGRSDNHGGAVGLLAPP	PCL40		247
GLSGRSDNHGGVHMPLGFLGP	PCL41		248
ISSGLLSGRSANI	PCL42	MMP, 세린 프로테아제	249
ISSGLLSGRSANP	PCL43	MMP, 세린 프로테아제	250
ISSGLLSGRSANPRG	PCL44	MMP, 세린 프로테아제	251
ISSGLLSGRSDDH	PCL45	MMP, 세린 프로테아제	252
ISSGLLSGRSDIH	PCL46	MMP, 세린 프로테아제	253
ISSGLLSGRSDNH	PCL47	MMP, 세린 프로테아제	254
ISSGLLSGRSDNI	PCL48	CTSL1_1, MMP14_1	255
ISSGLLSGRSDNP	PCL49	MMP, 세린 프로테아제	256
ISSGLLSGRSDQH	PCL50	MMP, 세린 프로테아제	257
ISSGLLSGRSDTH	PCL51	MMP, 세린 프로테아제	258
ISSGLLSGRSDYH	PCL52	MMP, 세린 프로테아제	259
ISSGLLSGRSGNH	PCL53	MMP, 세린 프로테아제	260
ISSGLLSSGGSGGSLSGRSDNH	PCL54		261
ISSGLLSSGGSGGSLSGRSGNH	PCL55		262
KGGPGGPAGIGPLAQRLRSSALFKSSFPGR	PCL56	FAPa_1, ADAM17_1, CTSL1_1	263
KSGPGGPAGIGALFFSSPPLAQKLKSSGGR	PCL57	FAPa_1, CTSL1_2, ADAM17_2	264
LSGRSDNHGGAVGLLAPP	PCL58		265
LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS	PCL59		266
LSGRSDNHGGSGGSQNQALRMA	PCL60		267
LSGRSDNHGGVHMPLGFLGP	PCL61		268
LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS	PCL62		269
LSGRSGNHGGSGGSQNQALRMA	PCL63		270
QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH	PCL64		271
QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH	PCL65		272
RGGALFKSSFPLAQKLKSSGPAGLYAQGGK	PCL66	CTSL1_1, ADAM17_2, MMP14_1	273
RGGGPAGLYAQPLAQKLKSSALFKSSFPGG	PCL67	MMP14_1, ADAM17_2, CTSL1_1	274
SGGFPRSGGSFNPRTFGSKRKRRGSRGGGG	PCL68	트롬빈, 인자 Xa, 헵신	275
SGPLAQKLKSSGPAGLYAQALFKSSFPGSK	PCL69	ADAM17_2, MMP14_1, CTSL1_1	276
TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP	PCL70		277
TSTSGRSANPRGGGVHMPLGFLGP	PCL71		278
VHMPLGFLGPGGLSGRSDNH	PCL72		279
VHMPLGFLGPGGTSTSGRSANPRG	PCL73		280
SGRSAGGGSGRSAGGGSGRSA	PCL74	uPA	281
HPVGLLARGGGHPVGLLARGGGSGRSAGGGSGRSA	PCL75	MPA(MMP-2 및 uPA)	282
GPLGVRGK	PCL76	MMP-2	283
HPVGLLAR	PCL77	MMP-2	173
GPQGIAGQ	PCL78	MMP-2, MMP-9, 및 일부 MT1-MMP	67
VPMSMRGG	PCL79	MMP-9 및 MMP-2	284
IPVSLRSG	PCL80	MMP-2 및 일부 MMP-9 또는 MMP-7	82
RPFSMIMG	PCL81	MMP-9 및 MMP-7, 일부 MMP-3	285
VPLSLTMG	PCL82	MMP-7, 일부 MMP-9, MMP-2, MPT-1-MMP	286
VPLSLYSG	PCL83	MMP-2, MMP-9, MMP-7	169

IPESLRAG	PCL84	MMP-2, MMP-7, MMP-9, 일부 MPT-1-MMP	287
VPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNH	PCL85		288
GGGISSGLLSGRSDNHGGGS	PCL86		289
GGGHPVGLLARGGGS	PCL87		290
GGGSGGGSGGGGISSGLLSGRSDNHGGGSGGGSGGS	PCL88		291
GGGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS	PCL89		292
GGGSGGSIPVSLRSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS	PCL90		293
GGGSGGSVPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS	PCL91		294
GGGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS	PCL92		295
GGGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGSGRSAGGSGRS	PCL93		296
GISSGLLSGRSDNHG	PCL94		297
GGGSISSGLLSGRSDNHGGGS	PCL95		298

[0341] 특정 양태에서, 프로테아제-절단성 링커는 표 104에 제시되는 서열과 비교하여 최대 5개, 최대 4개, 최대 3개, 최대 2개 또는 최대 1개의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 프로테아제-절단성 링커는 표 104에서 제시되는 서열과 비교하여 1개 내지 5개의 아미노산 치환을 갖는 표 104의 임의의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 구성된다.

[0342] **6.5. 비절단성 링커**

[0343] 특정 양상에서, 본 개시내용은 IFN 전구단백질의 2개 이상의 구성요소가 펩타이드 링커에 의해 서로 연결된 IFN 전구단백질을 제공한다. 예를 들어, 링커는 Fc 도메인과 표적화 부분 또는 표적화 부분 내의 다른 도메인(*예:* scFv의 VH 및 VL 도메인)을 연결하는데 사용될 수 있으며 이에 국한되지 않는다.

[0344] 바람직하게는, 절단으로 인해 IFN이 활성화되는 프로테아제 절단성 링커를 제외한 IFN 전구단백질의 모든 링커는 비절단성 링커(NCL)이다.

[0345] 비절단성 링커는 2개의 아미노산 내지 60개 이상의 아미노산 범위일 수 있고, 특정 양태에서 비절단성 펩타이드 링커는 3개의 아미노산 내지 50개의 아미노산, 4 내지 30개의 아미노산, 5 내지 25개의 아미노산, 10 내지 25개의 아미노산, 10개의 아미노산 내지 60개의 아미노산, 12개의 아미노산 내지 20개의 아미노산, 20개의 아미노산 내지 50개의 아미노산 또는 25개의 아미노산 내지 35개의 아미노산 길이 범위이다.

[0346] 특정 양태에서, 비절단성 링커는 길이가 적어도 5개 아미노산, 적어도 6개 아미노산 또는 적어도 7개 아미노산이고, 선택적으로 길이가 최대 30개 아미노산, 최대 40개 아미노산, 최대 50개 아미노산 또는 최대 60개 아미노산이다.

[0347] 전술한 일부 구현예에서, 비절단성 링커는 길이가 5 아미노산 내지 50 아미노산 범위, *예를 들어*, 길이가 5 내지 50, 5 내지 45, 5 내지 40, 5 내지 35, 5 내지 30, 5 내지 25 또는 5 내지 20 아미노산 범위이다. 전술한 바와 같은 다른 구현예에서, 비절단성 링커는 길이가 6 아미노산 내지 50 아미노산 범위, *예를 들어*, 길이가 6 내지 50, 6 내지 45, 6 내지 40, 6 내지 35, 6 내지 30, 6 내지 25 또는 6 내지 20 아미노산 범위이다. 전술한 바와 같은 다른 구현예에서, 비절단성 링커는 길이가 7 아미노산 내지 50 아미노산 범위, *예를 들어*, 길이가 7 내지 50, 7 내지 45, 7 내지 40, 7 내지 35, 7 내지 30, 7 내지 25 또는 7 내지 20 아미노산 범위이다.

[0348] 특히 하전된(*예*: 하전된 친수성 링커) 및/또는 유연한 비절단성 링커가 선호된다.

[0349] 본 개시내용의 IFN 전구단백질에 사용될 수 있는 가요성 비절단성 링커의 예는 문헌[Chen *외*, 2013, Adv Drug Deliv Rev. 65(10): 1357-1369 및 Klein *외*, 2014, Protein Engineering, Design & Selection 27(10): 325-330]에 개시된 것을 포함한다. 특히 유용한 유연한 비절단성 링커는 글리신과 세린의 반복부이거나 이를 포함하며, *예를 들어*, G_nS(SEQ ID NO:299) 또는 SG_n(SEQ ID NO:300)의 모너머 또는 멀티머이며, 여기서, n은 1 내지 10의 정수, *예를 들어* 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 일 구현예에서, 비절단성 링커는 G_4S 반복의 단량체 또는 멀티머(SEQ ID NO: 301), *예를 들어*, $(GGGGS)_n$(SEQ ID NO: 301)이거나 이를 포함한다.

[0350] 폴리글리신 비절단성 링커는 적합하게는 본 개시내용의 IFN 전구단백질에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 펩타이드 비절단성 링커는 2개의 연속 글리신(2Gly), 3개의 연속 글리신(3Gly), 4개의 연속 글리신(4Gly(SEQ ID NO: 302)), 5개의 연속 글리신(5Gly (SEQ ID NO: 303)), 6개의 연속 글리신(6Gly (SEQ ID NO: 304)), 7개의 연

속 글리신(7Gly (SEQ ID NO: 305)), 8개의 연속 글리신(8Gly (SEQ ID NO: 306)) 또는 9개의 연속 글리신(9Gly (SEQ ID NO: 307))을 포함한다.

[0351] 예시적인 비절단성 링커 서열은 아래 표 105에서 제시되어 있다.

표 105

[0352]

표 105
비절단성 링커 서열

링커 서열	설계	SEQ ID NO:
GGGGSLALGPGGGGGSLALGPGGGGGSLALGPGGS	NCL1	308
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	NCL2	309
$(GGGGS)_n$, 선택적으로 n=1-10, *예*: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10	NCL3	174
$(GGGS)_n$, 선택적으로 n=1-10, *예*: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10	NCL4	175
$(GGS)_n$, 선택적으로 n=1-10, *예*: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10	NCL5	176
$(GS)_n$, 선택적으로 n=1-10, *예*: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10	NCL6	177
$(GSGGS)_n$, 선택적으로 n=1-10, *예*: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10	NCL7	178
ADAAP	NCL8	310
ADAAPTVSIFP	NCL9	311
ADAAPTVSIFPP	NCL10	312
AKTTAP	NCL11	313
AKTTAPSVYPLAP	NCL12	314
AKTTPKLEEGEFSEARV	NCL13	315
AKTTPKLGG	NCL14	316
AKTTPP	NCL15	317
AKTTPPSVTPLAP	NCL16	318
ASTKGP	NCL17	319
ASTKGPSVFPLAPASTKGPSVFPLAP	NCL18	320
EGKSSGSGSESKST	NCL19	321
GEGESGEGESGEGES	NCL20	322
GEGESGEGESGEGESGEGES	NCL21	323
GEGGSGEGGSGEGGS	NCL22	324
GENKVEYAPALMALS	NCL23	325
GGEGSGGEGSGGEGS	NCL24	326
GGGESGGEGSGEGGS	NCL25	327
GGGESGGGESGGGES	NCL26	328
GGGGSGGGGS	NCL27	179
GGGGSGGGGSGGGGS	NCL28	180
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS	NCL29	181
GGGKSGGGKSGGGKS	NCL30	182
GGGKSGGKGSGKGGS	NCL31	183
GGGS	NCL32	184
GGGSG	NCL33	185
GGKGSGGKGSGGKGS	NCL34	186
GGSG	NCL35	329
GGSGG	NCL36	330
GGSGGGGSG	NCL37	331
GGSGGGGSGGGGS	NCL38	187
GHEAAAVMQVQYPAS	NCL39	332
GKGGSGKGGSGKGGS	NCL40	333
GKGKSGKGKSGKGKS	NCL41	334
GKGKSGKGKSGKGKSGKGKS	NCL42	335
GKPGSGKPGSGKPGS	NCL43	336
GKPGSGKPGSGKPGSGKPSGS	NCL44	337
GPAKELTPLKEAKVS	NCL45	338
GSAGSAAGSGEF	NCL46	339
GSGGG	NCL47	190

GSGSG	NCL48	191
GSS	NCL49	
GSSG	NCL50	192
GSSGGSGGSG	NCL51	193
GSSGGSGGSGG	NCL52	194
GSSGGSGGSGGS	NCL53	195
GSSGGSGGSGGSG	NCL54	196
GSSGGSGGSGGSGGGS	NCL55	197
GSSGGSGGSGS	NCL56	198
GSSGT	NCL57	199
GSSSG	NCL58	200
GSTSGSGKPGSGEGSTKG	NCL59	340
GTAAAGAGAAGGAAAGAAG	NCL60	341
GTSGSSGSGSGGSGSGGGG	NCL61	342
IRPRAIGGSKPRVA	NCL62	343
KESGSVSSEQLAQFRSLD	NCL63	344
KTTPKLEEGEFSEAR	NCL64	345
PRGASKSGSASQTGSAPGS	NCL65	346
QPKAAP	NCL66	347
QPKAAPSVTLFPP	NCL67	348
RADAAAA$(G4S)_4$	NCL68	349
RADAAAAGGPGS	NCL69	350
RADAAP	NCL70	351
RADAAPTVS	NCL71	352
SAKTTP	NCL72	353
SAKTTPKLEEGEFSEARV	NCL73	354
SAKTTPKLGG	NCL74	355
STAGDTHLGGEDFD	NCL75	356
TVAAP	NCL76	357
TVAAPSVFIFPP	NCL77	358
TVAAPSVFIFPPTVAAPSVFIFPP	NCL78	359
AGSGNSSGSGGSGGSGNSSGSGGSPVPSTPPTPSPSTPPTPSPSAS	NCL79	360
GGGGSAS	NCL80	361
GGGGSGGGGSAS	NCL81	362
GGGGSGGGGSGGGGSAS	NCL82	363
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAS	NCL83	364
GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAS	NCL84	365
AGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAS	NCL85	366
AGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAS	NCL86	367
AGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSAS	NCL87	368

[0353] 특정 양태에서, 본 개시의 IFN 프로단백질은 N-에서 C-말단 방향으로 표적 모이어티(또는 표적 모이어티 사슬), 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인(*예를 들어*, 도 1a에 도시된 바와 같음)을 포함하는 폴리펩타이드 사슬 또는 표적 모이어티(또는 표적 모이어티 사슬), 힌지 도메인, 이어서 프로테아제 절단성 링커(*예를 들어*, 도 1c에 도시된 바와 같음)를 포함하는 폴리펩타이드 사슬을 포함할 수 있다. 따라서 힌지 도메인은 일종의 링커라고 할 수 있다. 예시적인 힌지 도메인은 섹션 6.8.3에 제시되어 있다.

[0354] **6.6. 표적 모이어티**

[0355] 본 발명의 IFN 전구단백질에 표적 모이어티를 통합함으로써 전신 노출을 수반하는 감소와 함께 종양 미세환경에 고농도의 IFN을 전달할 수 있어 비표적 IFN 분자로 얻은 것보다 부작용을 줄일 수 있다.

[0356] 특정 위치 또는 조직에 존재하거나 IFN 전구단백질을 구동할 수 있는 모든 유형의 표적 분자가 본 개시의 IFN 전구단백질에 의해 표적이 될 수 있을 것으로 예상된다. 일부 구현예에서, IFN 전구단백질은 종양 조직에 대한 국소 면역 반응을 유도하여 암을 치료하기 위한 것이다(*예*: 종양 조직에 대한 국소 면역 반응 유도). 따라서, 표적 분자는 임의의 국소 종양 및 연관된 표적 분자일 수 있다. 본 개시의 IFN 전구단백질의 표적 모이어티에 의해 인식되는 표적 분자는 일반적으로 활성화된 T 세포의 표면, 종양 세포의 표면, 수지상 또는 기타 항원 제

시 세포의 표면, 자연 살해(NK) 세포의 표면, 바이러스 감염 세포의 표면, 기타 질병 세포의 표면, 혈청 내 유리, 세포 외 기질(ECM) 또는 표적 부위에 존재하는 면역 세포(*예*: 종양 반응성 림프구)에서 발견되는 것이 일반적이다.

[0357] 다양한 구현예에서, 표적 분자는 세포외 기질("ECM") 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자, T 세포 항원("TCA"), 관문 억제제 또는 종양 관련 항원("TAA"), 수지상 세포(DC) 또는 기타 항원 제시 세포(APC) 항원 또는 자연 살해(NK) 세포 항원이다. 통상의 기술자는 표적 분자의 전술한 범주가 상호 배타적이지 않으며 따라서 주어진 표적 분자가 표적 분자의 전술한 범주 중 하나 이상에 속할 수 있음을 인식할 것이다. 예를 들어, 일부 분자는 TAA와 ECM 단백질로 간주될 수 있고 다른 분자는 TCA와 면역관문 억제제로 간주될 수 있다.

[0358] 표적화될 수 있는 예시적인 암 유형은 급성 림프모구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 담관암, B세포 백혈병, B세포 림프종, 담관암, 골암, 뇌암, 유방암, 삼중 음성 유방암, 자궁경부암, 버킷 림프종, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 결장직장암, 자궁내막암, 식도암, 담낭암, 위암, 위장관암, 신경교종, 모세포 백혈병, 두경부암, 호지킨 림프종, 간암, 폐암, 수질성 갑상선암, 흑색종, 다발성 골수종, 난소암, 비호지킨 림프종, 췌장암, 전립선암, 폐관암, 신장암, 육종, 피부암, 고환암, 요로상피암 및 다른 요로 방광암을 포함한다. 그러나, 통상의 기술자라면 종양 미세환경과 연관된 TAA와 다른 표적 분자가 사실상 모든 유형의 암에 알려져 있다는 것을 인식할 것이다.

[0359] ECM 항원의 비제한적인 예로는 신데칸, 헤파라나제, 인테그린, 오스테오폰틴, 링크, 카데린, 라미닌, 라미닌 타입 EGF, 렉틴, 피브로넥틴, 노치, 넥틴(*예*: 넥틴-4), 테나신, 콜라겐(*예*: 콜라겐 타입 X) 및 매트릭신 등이 있다.

[0360] 다른 표적 분자는 종양이나 바이러스 림프구의 세포 표면 분자, 예를 들어 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, 림프구 기능 연관 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C 및 B7-H3와 같은 T 세포 공동 자극 단백질이 있다.

[0361] 특정 구현예에서, 표적 분자는 체크포인트 억제제(예: CTLA-4, PD1, PDL1, PDL2, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2 등)이다. 특정 구현예에서, 표적 분자는 PD1이다. 다른 구현예에서, 표적 분자는 LAG3이다. 다른 구현예에서, 표적 분자는 PDL1이다.

[0362] 특정 구현예에서, 표적 분자는 수지상 세포 또는 다른 항원 제시 세포(예: XCR1, Clec9a, CD1c, CD11c, CD14, PDL1, 대식세포 만노스 수용체(CD206) 및 DEC-205)의 표면에 있다.

[0363] 다른 구현예에서, 표적 분자는 CD335, CD38, CD2, NKG2D, NKp44, NKp30, CD16, LFA-1, CD27, KIR, NKH1A 및 NKp46과 같은 자연 살해(NK) 세포의 표면에 있다.

[0364] 항체 및 항원 결합 부분은 일반적으로 특정 항원 결정 인자에 결합하여 IFN 전구단백질을 표적 부위, 예를 들어 항원 결정 인자를 보유한 특정 유형의 종양 세포 또는 종양 기질로 유도할 수 있다. 특정 구현예에서, 표적 모이어티는 종양 관련 항원(TAA)을 인식한다. 바람직하게는, TAA는 인간 TAA이다. 항원은 정상 세포상에 존재할 수도 있고 존재하지 않을 수도 있다. 특정 구현예에서, TAA는 정상 세포와 비교하여 종양 세포에서 우선적으로 발현되거나 상향조절된다. 다른 구현예에서, TAA는 계통 마커이다. 대표적인 TAA로는 섬유아세포 활성화 단백질(FAP), 테나신-C의 A1 도메인(TNC A1), 테나신-C의 A2 도메인(TNC A2), 피브로넥틴의 추가 도메인 B(EDB), 흑색종 관련 콘드로이틴 황산 프로테오글리칸(MCSP), MART-1/Melan-A, gp100, 디펩티딜 펩티다제 IV(DPPIV), 아데노신 데아미나제 결합 단백질(ADAbp), 사이클로필린 b, 대장 관련 항원(CRC)-C017-1A/GA733, 암 태아 항원(CEA) 및 면역원성 에피토프 CAP-1 및 CAP-2, etv6, aml1, 전립선 특이 항원(PSA) 및 면역원성 에피토프 PSA-1, PSA-2 및 PSA-3, 전립선 특이 막 항원(PSMA), T-세포 수용체/CD3-제타 사슬, 종양 항원의 MAGE 계열(*예*: MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A12, MAGE-Xp2(MAGE-B2), MAGE-Xp3(MAGE-B3), MAGE-Xp4(MAGE-B4), MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE-C4, MAGE-C5), GAGE-종양 항원 계열(*예*: GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE-7, GAGE-8, GAGE-9), BAGE, RAGE, LAGE-1, NAG, GnT-V, MUM-1, CDK4, 티로시나아제, p53, MUC 계열, HER2/neu, p21ras, RCAS1, α-태아단백, E-카드헤린, α-카테닌, β-카테닌 및 γ-카테닌, p120ctn, gp100 Pmel117, PRAME, NY-ESO-1, cdc27, 선종성 폴립증 콜리 단백질(APC), 포드린, 코넥신 37, Ig-이디오타입, p15, gp75, GM2 및 GD2 강글리오시드, 인간 유두종 바이러스 단백질과 같은 바이러스 생성물, 종양 항원의 Smad 계열, Imp-1, P1A, EBV-인코딩 핵 항원(EBNA)-1, 뇌 글리코겐 인산화효소, SSX-1, SSX-2(HOM-MEL-40), SSX-1, SSX-4, SSX-5, SCP-

1 및 CT-7, c-erbB-2, Her2, EGFR, IGF-1R, CD2(T-세포 표면 항원), CD3(TCR과 관련된 이종멀티머), CD22(B-세포 수용체), CD23(저친화도 IgE 수용체), CD30(사이토카인 수용체), CD33(골수세포 표면 항원), CD40(종양괴사 인자 수용체), IL-6R-(IL6 수용체), CD20, MCSP, PDGFβR(β-혈소판 유래 성장 인자 수용체), ErbB2 상피 세포 접착 분자(EpCAM), EGFR 변이체 III(EGFRvIII), CD19, 디시알로강글리오사이드 GD2, 소관 상피 점액, gp36, TAG-72, 신경교종 관련 항원, β-인간 융모막 성선자극호르몬, 알파태아단백(AFP), 렉틴 반응성 AFP, 티로글로불린, MN-CA IX, 인간 텔로머라제 역전사효소, RU1, RU2(AS), 장 카르복실 에스테라제, 돌연변이 hsp70-2, M-CSF, 프로스타제, 프로스타제 특이 항원(PSA), PAP, LAGA-1a, p53, 프로스타인, PSMA, 생존 및 텔로머라제, 전립선 암 종양 항원-1 (PCTA-1), ELF2M, 호중구 엘라스타아제, 에프린 B2, 인슐린 성장 인자(IGF1)-I, IGF-II, IGFI 수용체, 5T4, ROR1, Nkp30, NKG2D, 종양 기질 항원, 피브로넥틴의 추가 도메인 A(EDA) 및 추가 도메인 B(EDB) 및 테나신-C(TnC A1)의 A1 도메인이 있다.

[0365] 적합한 표적 모이어티 형식은 섹션 6.7에서 설명되어 있다. 표적 모이어티는 바람직하게는 항원 결합 모이어티, 예를 들어 항체 또는 항체의 항원 결합 부분, *예를 들어* 섹션 6.7.2에 설명된 바와 같은 scFv 또는 섹션 6.7.1에 설명된 Fab인 것이 바람직하다.

[0366] 일부 구현예에서, 표적 모이어티는 표적 모이어티의 기초가 될 수 있는 예시적인 항체 또는 항체 서열에 대한 언급과 함께 아래 표 106에서 제시되는 예시적인 표적 분자를 표적화한다.

표 106

[0367]

표 106
예시적 표적 분자

표적	**항체명 및/또는 결합 서열**
1-92-LFA-3	Amevive™ (알레파셉트)
5T4	GEN1044
액티빈 수용체 II형	비마그루맙 VH: 미국 특허 번호 8,388,968 B2의 SEQ ID NO:107, 109 VL: 미국 특허 번호 8,388,968 B2의 SEQ ID NO:93, 95
B7-H3	오브린다타맙(MGD009)
B7-H3 (CD276)	에노블리투주맙(MGA271)
B7-H3 (CD276)	MGC018
B7-H3 (CD276)	MGA012
B7-H3 (CD276)	8H9
B7-H3 (CD276)	VH: 미국 2021/0171641 A1의 SEQ ID NO:21, 26 또는 31의 중쇄의 VH 서열. VL: 미국 2021/0171641 A1의 SEQ ID NO:20, 22 또는 30의 경쇄의 VL 서열.
B7-H3 (CD276)	VH: 미국 2019/0002563 A1의 SEQ ID NO:21, 29 또는 37의 중쇄의 VH 서열. VL: 미국 2019/0002563 A1의 SEQ ID NO:17, 25 또는 33의 경쇄의 VL 서열.
B7-H3 (CD276)	VH: 미국 특허 번호 10,640,563의 SEQ ID NO:146, 147 또는 148의 중쇄의 VH 서열. VL: 미국 특허 번호 10,640,563의 SEQ ID NO:143, 144 또는 145의 경쇄의 VL 서열.
BAFF/B 림프구 자극제	Benlysta™(벨리무맙)
BAFF/B 림프구 자극제	VH: 미국 특허 번호 7,138,501의 SEQ ID NO:327의 아미노산 1-123 VL: 미국 특허 번호 7,138,501의 SEQ ID NO:327의 아미노산 139-249.
BAFF/B 림프구 자극제	VH: 미국 특허 번호 7,605,236의 SEQ ID NO:1321의 아미노산 1-126; VL: 미국 특허 번호 7,605,236의 SEQ ID NO:1049의 아미노산 143-251.
BAFF/B 림프구 자극제	벨리무맙
BCMA	VH: SEQ ID NO:126의 중쇄 VL 서열, US 2021/0206865 A1 VL: SEQ ID NO:129 또는 SEQ ID NO:132의 경쇄 VL 서열, 미국 2021/0206865 A1
CA125	이고부맙(Igobumab)
CA125	OvaRex™(오레고부맙)
카드헤린	항체는 미국 공개 번호 US 2006/0039915.

N-카드헤린	미국 공개 번호 US 2010/0278821의 SEQ ID NO:10, 17 또는 18의 아미노산 서열에 결합하는 항체
CD11a	Raptiva™(에팔리주맙) Werther *외*, 1996, The Journal of Immunology 157(11)의 서열: 4986-4995.
CD19	Blincyto™(블리나투모맙)
CD19	SGN-CD19A
CD20	Bexxar™(토시투모맙) VH: SEQ ID No:124의 중쇄의 VH 서열, US 2017/0002060 A1 VL: SEQ ID No:125의 경쇄의 VL 서열, US 2017/0002060 A1
CD20	Zevalin™(이브리투모맙 튜세탄) VH: SEQ ID NO:9, 미국 특허 번호 5,736,137 VL: SEQ ID NO:6, 미국 특허 번호 5,736,137
CD20	Rituxan™(리툭시맙) VH: SEQ ID NO:9, 미국 특허 번호 5,736,137 VL: SEQ ID NO:6, 미국 특허 번호 5,736,137
CD20	Ocrevus™(오크렐리주맙)
CD20	오카라투주맙
CD20	Arzerra™(오파투무맙) VH: SEQ ID NO:2, 미국 특허 번호 8,529,902 VL: SEQ ID NO:4, 미국 특허 번호 8,529,902
CD20	Gazyva™(오비누투주맙)
CD20	VH: SEQ ID NO:4, US 2021/0206870 A1 SEQ ID NO:6의 VL, US 2021/0206870 A1
CD20	엡코리타맙
CD22	벨리무맙
CD22	에프라투주맙
CD22	Besponsa™(이노투주맙 오조가마이신)
CD22	Lumoxiti™(목세투무맙 파수독스)
CD22	피나투주맙 베도틴
CD25	Zenapax™(다클리주맙) VH: SEQ ID NO:9, 미국 특허 번호 7,060,269 VL: SEQ ID NO:10, 미국 특허 번호 7,060,269
CD30	Adcetris™(브렌툭시맙 베도틴) VH: SEQ ID NO:2, 미국 특허 번호 7,090,843 VL: SEQ ID NO:10, 미국 특허 번호 7,090,843
CD33	Myelotarg™(젬투주맙) Man Sung *외*, 1993, Molecular immunology 30:1361-1367의 서열
CD33	린투주맙
CD38	Darzalex™(다라투무맙)
CD38	IB4, HB7 CS/2, 클론 90 및 NIM-R5는 PCT 공개 WO2015/009726A2 및 여기에 인용된 참조 문헌에 개시되어 있다.
CD40	루카투무맙
CD40	다세투주맙
CD40L	Hu5c8(루플리주맙)
CD44v6	비바투주맙 메르탄신(vibatuzumab mertansine)
CD52	Campath™(알렘투주맙) VH: SEQ ID NO:1, 미국 특허 공개 US 2017/0002060 A1 VL: SEQ ID NO:2, 미국 특허 공개 US 2017/0002060 A1
CD70	Blenrep™(보르세투주맙 마포도틴)
CD123	플로테투주맙
CD206	SEQ ID NO:2의 VH a 및 SEQ ID NO:4의 VL을 갖는 항-CD206 항체, WO2003/040169A2
CD221	Tepezza™(테프로투무맙)
CEA	Hybri-Ceaker®(알투모맙 펜테테이트)
CEA	Scintimun™(베실레소맙)
CEA	CEA-CIDE™(라베주투맙)
CEA	CEA-Scan™(아르시투모맙)

CEA	hMN-15 SEQ ID NO:4-6의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열, 미국 특허 번호 8,771,690 B2 SEQ ID NO:1-3의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열, 미국 특허 번호 8,771,690 B2
CEA	임상 시험 NCT02324257의 RO6958688/RG7802의 CEA 결합 부분
CEA	시비사타맙
CEA	임상 시험 NCT01284231 및 NCT02291614의 MEDI-565/MT110/AMG211의 CEA 결합 부분 VH: SEQ ID NO:49 또는 51, PCT 공개 번호 WO 2013/012414 A1 VL: SEQ ID NO:48, PCT 공개 번호 WO 2013/012414 A1
CEA	라베투주맙
CEA	아테졸리주맙
CEA	시비사타맙
CEA	MEDI-565(AMG211, MT111)
CEA	RO6958688
CEA	VH: WO2022/048883A1에 기재된 SEQ ID NO:9 VL: WO2022/048883A1에 기재된 SEQ ID NO:10
CLDN18.2	AMG910
Clec9a	SEQ ID NO:43 및 48의 VH 및 VL 아미노산을 갖는 항-Clec9a 항체, PCT 공개 번호 WO2009/026660A1
Clec9a	SEQ ID NO:38의 VH a 및 SEQ ID NO:37 또는 SEQ ID NO:43의 VL을 갖는 항-Clec9a 항체, PCT 공개 번호 WO2022/073062A1 SEQ ID NO:8의 VH a 및 SEQ ID NO:7의 VL 아미노산을 갖는 항-Clec9a 항체, PCT 공개 번호 WO2022/073062A1
콜라겐 알파-4 사슬	TRC093 (MT293)
콜라겐	Liang *외*, 2016, Sci. Rep. 5, 18205; doi: 10.1038/srep18205 (2016)에 기술된 콜라겐 결합 항체 단편
콜라겐 유형 I	세툭시맙(에르비툭스)
콜라겐 유형 X	SEQ ID NO: 1 또는 2의 아미노산 서열, PCT 공개 번호 WO 2019/020797
콜라겐 유형 X	SEQ ID NO:1의 아미노산 서열, PCT 공개 번호 WO 2014/180992
콜라겐 유형 X	문헌[I. Girkontaite 외, "Immunolocalization of type X collagen in normal fetal and adult osteoarthritic cartilage with monoclonal antibodies," Matrix Biol 15, 231-238 (1996)]에서 설명된 항체 X34.
콜라겐 유형 X	ThermoFisher Scientific의 카탈로그 번호 PA5-115039 또는 PA5-116871 또는 PA5-97603 또는 PA5-49198하에서 판매되는 X53 또는 1H8 또는 ARC0659 또는 JF0961 콜라겐 X 다중클론 항체
콜라겐 유형 X	RDI로부터 카탈로그 번호 제RDI-COLL10abr호로 판매되는 항체.
보체 C5	Soliris™(에쿨리주맙) VH: 미국 특허 번호 6,355,245의 SEQ ID No:1-122의 아미노산 VL: 미국 특허 번호 6,355,245의 SEQ ID NO:3-110의 아미노산
CTLA-4	Yervoy™(이필리무맙) VH: WO 2001/014424 A2의 SEQ ID NO:17 VL: WO 2001/014424 A2의 SEQ ID NO:7
CTLA-4	(트레멜리무맙)
CTLA-4	Orencia™(아바타셉트)
DEC-205	SEQ ID NO:4/10, 16/22, 28/34, 40/46, 52/58, 76/82의 VH/VL 쌍을 갖는 항-DEC-205 항체, PCT 공개 WO2009/061996A2
DLL3	AMG757
EGFR	Erbitux™(세툭시맙) VH: SEQ ID NO:11, 미국 특허 번호 6,217,866 VL: SEQ ID NO: 13, 미국 특허 번호 6,217,866
EGFR	Vectibix™(파니투무맙) VH: SEQ ID NO:37, 미국 특허 번호 6,235,883 VL: SEQ ID NO:38, 미국 특허 번호 6,235,883

EGFR	잘루투무맙 VH: SEQ ID NO:64, WO 2018/140831 A2 VL: SEQ ID NO:69, WO 2018/140831 A2
EGFR	마파투무맙
EGFR	마투주맙
EGFR	니모투주맙 VH: SEQ ID NO:51 WO 2018/140831 A2 VL: SEQ ID NO:56, WO 2018/140831 A2
EGFR	ICR62
EGFR	mAb 528
EGFR	CH806
EGFRv3	AMG596
EGFRv3	AMG404
EGFR/CD64	MDX-447
EpCAM	Panorex™(에드레콜로맙) VH: SEQ ID NO:129, WO 2018/140831 A2 VL: SEQ ID NO:134, WO 2018/140831 A2
EpCAM	아데카투무맙 VH: SEQ ID NO:142, WO 2018/140831 A2 VL: SEQ ID NO:147, WO 2018/140831 A2
EpCAM	투코투주맙 셀모류킨
EpCAM	시타주투맙 보가톡스
EpCAM	EP1629013 B1 VH: SEQ ID NO: 80, 84, 88, 92 또는 96 VL: SEQ ID NO: 82, 86, 90, 94 또는 98
EpCAM	G8.8 HC: SEQ ID NO:4, 미국 특허 공개 번호 US 2020/0317806 A1 HL: SEQ ID NO:3, 미국 특허 공개 번호 US 2020/0317806 A1
EpCAM	VH: SEQ ID NO:17-22, WO 2021/211510 A2 VL: SEQ ID NO:15-16, WO 2021/211510 A2
EpCAM	Removab™(카투막소맙)
EpCAM	Vicineum™(오포르투주맙 모나톡스)
EpCAM	M701
RSV의 F 단백질	Synagic™(팔리비주맙)
GD2	3F8
당단백질 수용체 IIb/IIIa	ReoPro™(압식시맙)
gpA33	MGD007
GPC3	ERY974
GUCY2C	PF-07062119
헤파라나제	HP130, HP 239, HP 108.264, HP 115.140, HP 152.197, HP 110.662, HP 144.141, HP 108.371, HP 135.108, HP 151.316, HP 117.372, HP 37/33, HP3/17, HP 201 또는 HP 102 또는 SEQ ID NO:1-11의 아미노산 서열 중에서 선택된 항체, 미국 특허 공개 US 2004/0170631.
Her2	Herceptin™(트라스투주맙)
Her2	알데스류킨(프로류킨)
Her2	사르그라무스팀(류신)
Her2	M802
Her2	루니모타맙(BTRC4017A, R07227780)
Her2	ISB1302
Her2-neu	Perjeta™(퍼투주맙) VH: SEQ ID NO:16, WO 2013/096812 A1 VL: SEQ ID NO:15, WO 2013/096812 A1
Her2-neu	Rexomun™(에르투막소맙)
IgE	Xolair™(오말리주맙)
IGFIR	(피지투무맙)

IL1β	Ilaris™(카나키누맙) VH: SEQ ID NO:1, 미국 특허 번호 7,446,175 VL: SEQ ID NO:2 미국 특허 번호 7,446,175
IL12/IFN3	Stelara™(우스테키누맙)
IL1Ra	Antril™, Kineret™(안킨라)
IFNR	Simulect™(바실릭시맙) VH: SEQ ID NO:3, 미국 특허 번호 6,383,487 VL: SEQ ID NO:6, 미국 특허 번호 6,383,487
IL6	클라자키주맙
IL6 수용체	Actemra™(토실리주맙) VH: SEQ ID NO:31, 미국 특허 번호 7,479,543 VL: SEQ ID NO:29, 미국 특허 번호 7,479,543
IL12/IFN3 p40 서브유닛	Stelara™(우스테키누맙) VH: SEQ ID NO:7, 미국 특허 번호 6,902,734 VL: SEQ ID NO:8, 미국 특허 번호 6,902,734
인테그린 α4	Tysabri™(나탈리주맙) VH: SEQ ID NO:11-13, 미국 특허 번호 5,840,299 VL: SEQ ID NO:7-8, 미국 특허 번호 5,840,299
인테그린 α4 β7	Entyvio™(베돌리주맙) HC: SEQ ID NO:2, 미국 특허 공개 US 2012/0282249 LC: SEQ ID NO:4, 미국 특허 공개 US 2012/0282249
인테그린 α5 β1	VH: SEQ ID NO:2, 유럽 특허 번호 1 755 659 VL: SEQ ID NO:4, 유럽 특허 번호 1 755 659
인테그린 β1	VH: SEQ ID NO:2, 6, 8, 10, 12, 14, 29-43 또는 91-100, 미국 특허 공개 US 2022/0089744 VL: SEQ ID NO:4, 16, 18, 20, 22, 44-57 또는 107-116, 미국 특허 공개 US 2022/0089744
KIR	SEQ ID NO:5의 VH 및 SEQ ID NO:3의 VL을 갖는 항-KIR 항체, PCT 공개 WO2014/066532A1
KIR	SEQ ID NO:1의 VH 및 SEQ ID No:2의 VL을 갖는 항-KIR 항체, PCT 공개 WO2012/160448A2 SEQ ID NO:3의 VH 및 SEQ ID NO:4의 VL을 갖는 항-KIR 항체, PCT 공개 WO2012/160448A2
LAG3	렐라트리맙(BMS-98016)
LAG3	Sym022
LAG3	HLX26
LAG3	TSR-033
LAG3	ABL501
LAG3	INCAGN02385
LAG3	피안리맙(REGN3767)
LAG3	RO7247669
LAG3	EMB-02
LAG3	FS118
LAG3	GSK2831781
LAG3	IBI323
LAG3	IBI110
LAG3	LAG525
LAG3	XmAb®22841
LAG3	LBL-007
LAG3	VH: SEQ ID NO:1, 8, 10 또는 12, 미국 특허 번호 9,902,772 VL: SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11, 13 또는 14, 미국 특허 번호 9,902,772
LAG3	VH: SEQ ID NO:182, 미국 특허 공보 US 2021/0095026. VL: SEQ ID NO:88, 미국 특허 공보 US 2021/0095026.
LAG3	SEQ ID NO:23/24, ¾ 및 11/12의 VH/VL 아미노산 서열을 갖는 항체, US2022/0056126A1
라미닌	Sigma Aldrich의 Lam-89
메소텔린	아마툭시맙

메소텔린	HPN536
MUC1	클리바투주맙 테트락세탄
MUC1	Pankomab™(가티포투주맙)
MUC1	펨투무맙
MUC1	칸투주맙 라브탄신
MUC16 (CA125)	US 2018/0118848A1에서 다음 SEQ ID NO 쌍 중 어느 하나의 아미노산 서열을 갖는 VH 및 VL 서열을 갖는 항-MUC16 항체: 18/26; 82/858; 98/170
MUC17	AMG199
넥틴-4	엔포투맙(ASP7465, ASG-22CE, ASG-22ME) VH: SEQ ID NO:3, 미국 PCT 공보 WO 2021/151984 VL: SEQ ID NO:4, 미국 PCT 공보 WO 2021/151984
넥틴-4	SBT290
넥틴-4	VH: SEQ ID NO:1, 미국 특허 번호 11,274,160 VL: SEQ ID NO:2, 미국 특허 번호 11,274,160
NGF	(타네주맙)
NKH1A	미국 특허 번호 4,772,552A에 기술된 ATCC에 기탁되고 가입 번호 HB8564가 지정된 단일 클론 항체
NKP46	SEQ ID NO:4, 6, 8의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3 서열과 SEQ ID NO:12, 14, 16의 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 서열을 갖는 항-NKP46 항체, 미국 PCT 공보 WO2018/047154A1
오스테오폰틴	HC: SEQ ID NO:22, 미국 PCT 공보 WO 2021/030209 LC: SEQ ID NO:24, 미국 PCT 공보 WO 2021/030209
PD1	MDX-1106/BMS-936558(니볼루맙)은 WHO 약물 정보, 27권 제1호, 68-69페이지(2013)에 기술된 구조를 가진 인간 IgG4 mAb이며, 중쇄 및 경쇄 서열은 미국 공보 번호 US20190270812A1의 도 7에 개시되어 있다. HC: SEQ ID NO:23, 미국 공보 번호 US20190270812A1 LC: SEQ ID NO:24, 미국 공보 번호 US20190270812A1
PD1	MK-3475(펨브롤리주맙)는 WHO 약물 정보, 27권 2호, 161-162쪽(2013)에 기술된 구조를 가진 인간화 IgG4 mAb이며, 중쇄 및 경쇄 서열은 미국 공개 번호 US20190270812A1의 도 6에 개시되어 있다. HC: SEQ ID NO:21, 미국 공개 번호 US20190270812A1 LC: SEQ ID NO:22, 미국 공개 번호 US20190270812A1
PD1	REGN2810(미국 공개 번호 20150203579에서 H4H7798N로 개시됨) HC: SEQ ID NO:330, 미국 공개 번호 20150203579 LC: SEQ ID NO:331, 미국 공보 번호 20150203579
PD1	미국 특허 번호 11,034,765 B2의 다음 SEQ ID NO에 해당하는 CDR H1-H3 및 CDR L1-L3 서열을 갖는 항-PD1 항체: a) SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 및 23, 각각; b) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 및 29, 각각; c) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34, 및 35, 각각; d) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 및 41, 각각; e) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 및 47, 각각; f) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52, 및 53, 각각; g) SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 및 59, 각각; 그리고 h) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64, 및 65, 각각
PD1	항-PD1 항체는 PCT 공보 WO2015112800A1의 표 1-3에 개시되어 있고, 다음 SEQ ID NO의 VH/VL 쌍을 갖는 항-PD1 항체를 포함하되 이에 국한되지 않는다. SEQ ID NO:2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 1 14/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/202, 218/202, 226/202, 234/202, 242/202, 250/202, 258/202, 266/202, 274/202, 282/202, 290/202, 298/186, 306/186 및 314/186, 미국 PCT 공보 WO2015112800A1

PD1	미국 특허 번호 10,294,299 B2에서 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는 것으로 개시된 항-PD1 항체: SEQ ID NO:164/178 SEQ ID NO:165/179 SEQ ID NO:166/180 SEQ ID NO:167/181 SEQ ID NO:168/182 SEQ ID NO:169/183 SEQ ID NO:170/184 SEQ ID NO:171/185 SEQ ID NO:172/186 SEQ ID NO:173/187 SEQ ID NO:174/188 SEQ ID NO:175/189 SEQ ID NO:176/190 SEQ ID NO:177/190
PD1	MEDI-0680 (AMP-514)
PD1	PDR001(스파르탈리주맙), 중쇄 및 경쇄 서열이 BAP049-Clone-E로 개시되어 있는 인간화 IgG4 mAb, 미국 특허 번호: 9683048 B2 HC: SEQ ID NO: 91, 미국 특허 번호: 9,683,048 LC: SEQ ID NO: 72, 미국 특허 번호: 9,683,048
PD1	BGB-108
PD1	WO2008/156712에 기술된 h409A11 HC: SEQ ID NO:31, PCT 공보 WO2008/156712 LC: SEQ ID NO:36, PCT 공보 WO2008/156712
PD1	WO2008/156712에 기술된 h409A16 HC: SEQ ID NO:31, PCT 공보 WO2008/156712 LC: SEQ ID NO:37, PCT 공보 WO2008/156712
PD1	WO2008/156712에 기술된 h409A17 HC: SEQ ID NO:31, PCT 공보 WO2008/156712 LC: SEQ ID NO:38, PCT 공보 WO2008/156712
PD1	미국 특허 번호 7,488,802에 기술된 항-PD1 항체로, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는다. SEQ ID NO:2/4 SEQ ID NO:6/8 SEQ ID NO:10/12 SEQ ID NO:14/16 SEQ ID NO:47/49
PD1	미국 특허 번호 7,521,051에 기술된 항-PD1 항체로 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는다. SEQ ID NO:2/4 SEQ ID NO:6/8 SEQ ID NO:10/12 SEQ ID NO:14/16 SEQ ID NO:47/49
PD1	미국 특허 번호 8,000,8449에 기술된 항-PD1 항체로중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는다. SEQ ID NO:1/8 SEQ ID NO:2/9 SEQ ID NO:3/10 SEQ ID NO:4/11 SEQ ID NO:5/12 SEQ ID NO:6/13 SEQ ID NO:7/14

PD1	미국 특허 번호 8,354,509에 기술된 항PD1 항체로, 중쇄 및 경쇄 전장 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는다. SEQ ID NO:31/36 SEQ ID NO:31/37 SEQ ID NO:31/38
PD1	미국 특허 번호 8,168,757에 기술된 항-PD1 항체로, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는다. SEQ ID NO:4/5 SEQ ID NO:12/13 SEQ ID NO:18/19 SEQ ID NO:40/41 SEQ ID NO:47/48 SEQ ID NO:26/27 SEQ ID NO:34/35 SEQ ID NO:55/56 SEQ ID NO:67/68
PD1	PCT 공개 번호 WO2004/004771에 기술된 항-PD1 항체
PD1	PCT 공개 번호 WO2004/056875에 기술된 항-PD1 항체로, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는다. SEQ ID NO:2/4 SEQ ID NO:6/8 SEQ ID NO:10/12 SEQ ID NO:14/16 SEQ ID NO:47/49
PD1	PCT 공개 번호 WO2004/072286에 기술된 항-PD1 항체
PD1	VH: SEQ ID NO:25, 26, 27, 28 또는 29, 미국 공보 번호 US2011/0271358 VL: SEQ ID NO:30, 31, 32 또는 33 미국 특허 번호 US2011/0271358
PD1	SHR-1210(캠렐리주맙)은 PCT 공보 번호 WO 2015/085847에 기술되어 있고, 다음과 같은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다. HC: SEQ ID NO: 9 LC: SEQ ID NO: 10
PDL1	더발루맙(MEDI4736) HC: SEQ ID NO:26, PC 출원번호 WO2020225552 LC: SEQ ID NO:27, PCT 출원번호 WO2020225552
PDL1	아테졸리주맙(Tecentriq, MPDL3280A, RG7446) HC: SEQ ID NO:20, 미국 특허 번호 8,217,149 LC: SEQ ID NO:21, 미국 특허 번호 8,217,149
PDL1	MDX 1105(BMS-936559)
PDL1	미국 특허 번호 7,943,743에 기술된 항-PD-L1 항체로, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는다. SEQ ID NO: 1/11 SEQ ID NO: 2/12 SEQ ID NO: 3/13 SEQ ID NO: 4/14 SEQ ID NO: 5/15 SEQ ID NO: 6/16 SEQ ID NO: 7/17 SEQ ID NO: 8/18 SEQ ID NO: 9/19 SEQ ID NO: 10/20
PDL1	아벨루맙, 미국 특허 번호 9,624,298, 다음과 같은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다. HC: SEQ ID NO: 24 LC: SEQ ID NO: 25
PDL1	ZKAB001(소카졸리맙)
PDL1	TQB2450(APL-502 또는 CBT-502)

PDL1	HLX20 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열: SEQ ID NO: 52, 56, 77, PCT 공보 번호 2018/080812 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열: SEQ ID NO: 65, 42, 71, PCT 공보 번호 2018/080812
PDL1	KN035(엔바폴리맙)는 미국 특허 제11,225,522호에서 Hu56V2로 기술된 나노바디로, VHH를 갖는다. SEQ ID NO: 34
PDL1	LY3434172
PDL1	LY3300054(로다폴리맙), PCT 공보 번호 WO 2017/034916, 다음과 같은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다. HC: SEQ ID NO: 10 L: SEQ ID NO: 11
PDL1	LDP(레사벨리맙, ADG104), 중국 특허 번호 114225023, 다음과 같은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다. HC: SEQ ID NO: 10 LC: SEQ ID NO: 9
PDL1	EMB-09
PDL1	ABL501
PDL1	INBRX-105
PDL1	STI-3031(IMC-001), 미국 특허 번호 10,118,963, 다음과 같은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다. HC: SEQ ID NO: 1 LC: SEQ ID NO: 2
PDL1	BGB-A333(가리불리맙), 미국 특허 번호 11,512,132, 다음과 같은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다. HC: SEQ ID NO: 22 LC: SEQ ID NO: 23
PDL1	HLX301
PDL1	Y101D
PDL1	ES101
PDL1	IBI322
PDL1	VH: SEQ ID NO:46, 48, 50 또는 52, 미국 특허 번호 11,168,144 VL: SEQ ID NO:58, 137 또는 12, 미국 특허 번호 11, 168,144
PDL1	VH: SEQ ID NO:23, 124, 126, 127, 128, 130, 140 또는 145, 미국 특허 번호 11,208,486 VL: SEQ ID NO:24 또는 125, 미국 특허 번호 11,208,486
포스파티딜세린	(바비툭시맙)
PSCA	GEM3PSCA
PSMA	huJ591
PSMA	WO 2017/023761A1에서 VH 및 VL 서열이 다음 SEQ ID NO 쌍 중 하나의 아미노산 서열을 갖는 항-PSMA 항체 2/1642; 10/1642; 18/1642; 26/1642; 34/1642; 42/1642; 50/1642; 58/1642; 66/1642; 74/1642; 82/1642; 90/1642; 98/1642; 106/1642; 1 14/1642; 122/130; 및 138/146

PSMA	다음과 같은 항체: WO2003034903A2에 기술된 PSMA 3.7, PSMA 3.8, PSMA 3.9, PSMA 3.11, PSMA 5.4, PSMA 7.1, PSMA 7.3, PSMA 10.3, PSMA 1.8.3, PSMA A3.1.3, PSMA A3.3.1, Abgenix 4.248.2, Abgenix 4.360.3, Abgenix 4.7.1, Abgenix 4.4.1, Abgenix 4.177.3, Abgenix 4.16.1, Abgenix 4.22.3, Abgenix 4.28.3, Abgenix 4.40.2, Abgenix 4.48.3, Abgenix 4.49.1, Abgenix 4.209.3, Abgemx 4.219.3, Abgenix 4.288.1, Abgenix 4.333.1, Abgemx 4.54.1, Abgenix 4.153.1, Abgenix 4.232.3, Abgenix 4.292.3, Abgenix 4.304.1, Abgenix 4.78.1 및 Abgenix 4.152.1 다음과 같은 하이브리드종 세포주: WO 2003/034903A2에 기술된 PSMA 3.8, PSMA 3.9 (PTA- 3258), PSMA 3.11 (PTA-3269), PSMA 5.4 (PTA-3268), PSMA 7.1 (PTA-3292), PSMA 7.3 (PTA-3293), PSMA 10.3 (PTA-3247) , PSMA 1.8.3 (PTA-3906), PSMA A3.1.3 (PTA- 3904), PSMA A3.3.1 (PTA-3905), Abgenix 4.248.2 (PTA-4427), Abgenix 4.360.3 (PTA- 4428), Abgenix 4.7.1 (PTA-4429), Abgenix 4.4.1 (PTA-4556), Abgenix 4.177.3 (PTA-4557), Abgenix 4.16.1 (PTA-4357), Abgenix 4.22.3 (PTA-4358), Abgenix 4.28.3 (PTA-4359), Abgenix 4.40.2 (PTA-4360), Abgenix 4.48.3 (PTA-4361), Abgenix 4.49.1 (PTA-4362), Abgenix 4.209.3 (PTA-4365), Abgenix 4.219.3 (PTA-4366), Abgenix 4.288.1 (PTA-4367), Abgenix 4.333.1 (PTA-4368), Abgenix 4.54.1 (PTA-4363), Abgenix 4.153.1 (PTA-4388), Abgenix 4.232.3 (PTA-4389), Abgenix 4.292.3 (PTA-4390), Abgenix 4.304.1 (PTA-4391), Abgenix 4.78.1 (PTA-4652), 및 Abgemx 4.152.1(PTA-4653) VH SEQ ID NO:2-7, WO 2003/034903A2 VL SEQ ID NO: 8-13, WO 2003/034903A2
PMSA	VH: SEQ ID NO: 225, 239, 253, 267, 281, 295, 309, 323, 337, 351, 365, 379, 393, 407, 421, 435, 449, 463, 477, 491, 505, 519, 533, 547, 561, 575, 589, 603 또는 617, WO 2011/121110A1 VL SEQ ID NO: 230, 244, 258, 272, 286, 300, 314, 328, 342, 356, 370, 384, 398, 412, 426, 440, 454, 468, 482, 496, 510, 524, 538, 552, 566, 580, 594, 608 또는 622, WO 2011/121110A1 VH 및 VL SEQ ID NO: 235, 249, 263, 277, 291, 305, 319, 333, 347, 361, 375, 389, 403, 417, 431, 445, 459, 473, 487, 501, 515, 529, 543, 557, 571, 585, 599, 613 또는 627, WO 2011/121110A1
PMSA	미국 2022/0119525 A1 SEQ ID NO:229-312 중 하나에 해당하는 VL 아미노산 서열 및 미국 2022/0119525 A1 SEQ ID NO: 217에 해당하는 VH를 갖는 항-PMSA 항체
PMSA	ES414
PMSA	BAY2010112(파소툭시주맙)
PMSA	CCW702
PMSA	JNJ-63898081
PMSA	CC-1
PMSA	아카파타맙
PSMA	HPN424
RAAG12	RAV12
RANKL	Prolia™(데노수맙) VH: SEQ ID NO:51, 미국 특허 공개 2017/0002060 VL: SEQ ID NO:52, 미국 특허 공개 2017/0002060
SLAMF7	Empliciti™(엘로투주맙)
SSTR2	XmAb®18087
STEAP1	VHCDR1 SEQ ID NO: 14, 33, 182, 184 또는 185, US20210179731A1 VHCDR2 SEQ ID NO: 15, 21, 34, 182, 184 또는 185, US20210179731A1 VHCDR3 SEQ ID NO: 16 및 35, US20210179731A1 VH SEQ ID NO: 182 또는 184, US20210179731A1 VLCDR1 SEQ ID NO: 11 또는 30, US20210179731A1 VLCDR2 SEQ ID NO: 12 또는 31, US20210179731A1 VLCDR3 SEQ ID NO: 13 또는 32, US20210179731A1 VL SEQ ID NO: 183 또는 186, US20210179731A1
STEAP1	AMG509

STEAP2	다음 SEQ ID NO에서 선택된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 갖는 항-STEAP 2 항체: (1) 4-6-8-12-14-16; (2) 20-22-24-28-30-32; (3) 36-38-40-44-46-48; (4) 52-54-56-60-62-64; (5) 68-70-72-60-62-64; (6) 76-78-80-60-62-64; (7) 84-86-88-60-62-64; (8) 92-94-96-60-62-64; (9) 100-102-104-60-62-64; (10) 108-110-112-116-118-120; (11) 124-126-128-132-134-136; (12) 140-142-144-148-150-152; (13) 156-158-160-164-166-168; (14) 172-174-176-180-182-184; (15) 188-190-192-196-198-200; (16) 204-206-208-212-214-216; (17) 220-222-224-228-230-232; (18) 236-238-240-244-246-248; (19) 252-254-256-260-262-264; (20) 268-270-272-276-278-280; (21) 284-286-288-292-294-296; (22) 300-302-304-308-310-312; (23) 316-318-320-324-326-328; (24) 332-334-336-340-342-344; (25) 348-350-352-356-358-360; (26) 364-366-368-372-374-376; 및 (27) 380-382-384-388-390-392, 미국 특허 번호 10,772,972 B2 다음을 포함하는 항-STEAP 2 항체: (a) 다음 SEQ ID NO 중 하나에 해당하는 아미노산을 갖는 VH, SEQ ID NO:2, 18, 34, 50, 66, 74, 82, 90, 98, 106, 122, 138, 154, 170, 186, 202, 218, 234, 250, 266, 282, 298, 314, 330, 346, 362 및 378, 미국 특허 번호 10,772,972 B2; 그리고 (b) 다음 SEQ ID NO 중 하나에 해당하는 아미노산 서열을 갖는 VL, SEQ ID NO: 10; 26; 42; 58; 114; 130; 146; 162; 178; 194; 210; 226, 242; 258; 274; 290; 306; 322; 338; 354; 370; 및 386, 미국 특허 번호 10,772,972 B2 미국 특허 번호 10,772,972 B2의 다음 SEQ ID NO 쌍 중 하나에 해당하는 아미노산 서열을 포함하는 VH/VL 쌍을 갖는 항-STEAP 2 항체: 2/10; 18/26; 34/42; 50/58; 66/58; 74/58; 82/58; 90/58; 98/58; 106/114; 122/130; 138/146; 154/162; 170/178; 186/194; 202/210; 218/226; 234/242; 250/258; 266/274; 282/290; 298/306; 314/322; 330/338; 346/354; 362/370; 및 378/386
신데칸-1(CD 138)	B-B4 항체, Wijdenes 외 (1996) Br. J. Haematol., 94: 318-323
신데칸-4	SEQ ID NO:1의 아미노산 93 및 121의 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO:2의 아미노산 92 및 122의 아미노산 서열, 유럽 특허 공보 EP 2 603 236
TGFβ	GC1008
TNFR	Enbrel™(에타너셉트)
TNFα	Remicade™(인플릭시맙) VH: SEQ ID NO:2, 국제 특허 출원 WO201/3087911 A1 VH: SEQ ID NO:3, 국제 특허 출원 WO2013/ A1087911
TNFα	Humira™(아달리무맙) VH: SEQ ID NO:4, 미국 특허 번호 6,258,562 VL: SEQ ID NO:3, 미국 특허 번호 6,258,562
TNFα	Cimzia™(세르톨리주맙 페골) VH: SEQ ID NO:14, 미국 특허 번호 7,012,135 VL: SEQ ID NO:9, 미국 특허 번호 7,012,135
TNFα	Simponi™(골리무맙) VH: SEQ ID NO:7, 미국 특허 번호. 7,250,165 VL: SEQ ID NO:8, 미국 특허 번호 7,250,165
VEGF	Avastin™(베바시주맙) VH: SEQ ID NO:9, 미국 특허 번호 7,060,269 VL: SEQ ID NO:10, 미국 특허 번호 7,060,269
VEGF	Lucentis™(라니비주맙) VH: SEQ ID NO:4, 미국 특허 번호 9,914,770 VL: SEQ ID NO:2, 미국 특허 번호 9,914,770

XCR1	미국 특허 번호 9,371,389 B2에 공개된 항-XCR1 항체로, 다음을 포함한다. - 2H6, 5G7, 11H2, HK1L2 및 HK5L5 지정 항체 - SEQ ID NO:53-55의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열을 갖는 항체 및 SEQ ID 번호:56-58의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 갖는 항체 - SEQ ID NO:41-43의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열을 갖는 항체 및 SEQ ID 번호:44-46의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 갖는 항체

[0368] 일부 양태에서, 표적 모이어티는 표적 분자에 결합하기 위해 표 106에서 제시되는 항체와 경쟁한다. 다른 양태에서, 표적 모이어티는 표 106에 기재된 항체의 CDR 서열을 갖는 CDR을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 모이어티는 표 106에 명시된 항체의 6개의 CDR 서열 모두를 포함한다. 다른 구현예에서, 표적 모이어티는 표 106에 명시된 항체의 적어도 중쇄 CDR 서열(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) 및 범용 경쇄의 경쇄 CDR 서열을 더 포함한다. 추가 양태에서, 표적 모이어티는 표 106에서 명시된 항체의 VH의 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 모이어티는 표 106에서 명시된 항체의 VL의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 표적 모이어티는 범용 경쇄 VL 서열을 더 포함한다.

[0369] 일부 구현예에서, 표적 분자는 PDL1이다. 아래의 표 107은 예를 들어, 본 개시의 인터페론 전구단백질에 사용하기 위해 표적 모이어티에 통합될 수 있는 표적 모이어티의 기반이 될 수 있는 예시적인 항-PDL1 항체 및/또는 항체 서열을 제공한다.

표 107

[0370]

표 107
예시적인 PDL1 항체 및/또는 결합 서열

표적	**항체명 및/또는 결합 서열**
PDL1	더발루맙(MEDI4736) HC: SEQ ID NO: 26, PCT 출원 번호 WO2020225552 LC: SEQ ID NO: 27, PCT 출원 번호 WO2020225552
PDL1	아테졸리주맙(Tecentriq, MPDL3280A, RG7446) HC: SEQ ID NO: 20, 미국 특허 번호 8,217,149 LC: SEQ ID NO: 21, 미국 특허 번호 8,217,149
PDL1	MDX 1105(BMS-936559)
PDL1	미국 특허 번호 7,943,743에 기술된 항-PD-L1 항체로, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는다. SEQ ID NO: 1/11 SEQ ID NO: 2/12 SEQ ID NO: 3/13 SEQ ID NO: 4/14 SEQ ID NO: 5/15 SEQ ID NO: 6/16 SEQ ID NO: 7/17 SEQ ID NO: 8/18 SEQ ID NO: 9/19 SEQ ID NO: 10/20
PDL1	아벨루맙, 미국 특허 번호 9,624,298, 다음과 같은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다. HC: SEQ ID NO: 24 LC: SEQ ID NO: 25
PDL1	ZKAB001(소카졸리맙)
PDL1	TQB2450(APL-502 또는 CBT-502)
PDL1	HLX20 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열, SEQ ID NO: 52, 56, 77, PCT 공보 번호 2018/080812 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열, SEQ ID NO: 65, 42, 71, PCT 공보 번호 2018/080812
PDL1	KN035(엔바폴리맙)는 미국 특허 제11,225,522호에서 Hu56V2로 기술된 나노바디로, VHH를 갖는다. SEQ ID NO: 34

PDL1	LY3434172
PDL1	LY3300054(로다폴리맙), PCT 공보 번호 WO 2017/034916, 다음과 같은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다. HC: SEQ ID NO: 10 L: SEQ ID NO: 11
PDL1	LDP(레사벨리맙, ADG104), 중국 특허 번호 114225023, 다음과 같은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다. HC: SEQ ID NO: 10 LC: SEQ ID NO: 9
PDL1	EMB-09
PDL1	ABL501
PDL1	INBRX-105
PDL1	STI-3031(IMC-001), 미국 특허 번호 10,118,963, 다음과 같은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다. HC: SEQ ID NO: 1 LC: SEQ ID NO: 2
PDL1	BGB-A333(가리불리맙), 미국 특허 번호 11,512,132, 다음과 같은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다. HC: SEQ ID NO: 22 LC: SEQ ID NO: 23
PDL1	HLX301
PDL1	Y101D
PDL1	ES101
PDL1	IBI322
PDL1	VH: SEQ ID NO:46, 48, 50 또는 52, 미국 특허 번호 11,168,144 VL: SEQ ID NO:58, 137 또는 12, 미국 특허 번호 11, 168,144
PDL1	VH: SEQ ID NO:23, 124, 126, 127, 128, 130, 140 또는 145, 미국 특허 번호 11,208,486 VL: SEQ ID NO:24 또는 125, 미국 특허 번호 11,208,486

[0371] 일부 양태에서, 표적 모이어티는 표 107에 명시된 항-PD1 항체와 PD1에 결합하기 위해 경쟁한다. 다른 양태에서, 표적 모이어티는 표 107에 명시된 항-PD1 항체의 CDR 서열을 갖는 CDR을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 모이어티는 표 107에 명시된 항-PD1 항체의 6개의 CDR 서열 모두를 포함한다. 다른 구현예에서, 표적 모이어티는 적어도 표 107에 명시된 항-PD1 항체의 중쇄 CDR 서열(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) 및 보편적 경쇄의 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 다른 양태에서, 표적 모이어티는 표 107에 기재된 항-PD1 항체의 VH의 아미노산 서열을 갖는 VH를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 모이어티는 표 107에 명시된 항-PD1 항체의 VL의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 더 포함한다. 다른 구현예에서, 표적 모이어티는 범용 경쇄 VL 서열을 더 포함한다.

[0372] 일부 구현예에서, 표적 분자는 PD1이다. 아래의 표 108은 예를 들어, 본 개시의 인터페론 전구단백질에 사용하기 위해 표적 모이어티에 통합될 수 있는 표적 모이어티의 기반이 될 수 있는 예시적인 항-PD1 항체 및/또는 항체 서열을 제공한다.

표 108

[0373]

표 108
예시적인 PD1 항체 및/또는 결합 서열

표적	**항체명 및/또는 결합 서열**
PD1	MDX-1106/BMS-936558(니볼루맙)은 WHO 약물 정보, 27권 제1호, 68-69페이지(2013)에 기술된 구조를 가진 인간 IgG4 mAb이며, 중쇄 및 경쇄 서열은 미국 공보 번호 20190270812A1의 도 7에 개시되어 있다. HC: SEQ ID NO: 미국 공보 번호 US20190270812A1 LC: SEQ ID NO: 24, 미국 공보 번호 US20190270812A1
PD1	MK-3475(펨브롤리주맙)는 WHO 약물 정보, 27권 2호, 161-162쪽(2013)에 기술된 구조를 가진 인간화 IgG4 mAb이며, 중쇄 및 경쇄 서열은 미국 공개 번호 US20190270812A1의 도 6에 개시되어 있다. HC: SEQ ID NO: 21, 미국 공보 번호 US20190270812A1 LC: SEQ ID NO: 22, 미국 공보 번호 US20190270812A1

PD1	REGN2810(미국 공개 번호 20150203579에서 H4H7798N로 개시됨) HC: SEQ ID NO: 330, 미국 공보 번호. 20150203579 LC: SEQ ID NO: 331, 미국 공보 번호. 20150203579
PD1	미국 특허 번호 11,034,765 B2의 다음 SEQ ID NO에 해당하는 CDR H1-H3 및 CDR L1-L3 서열을 갖는 항-PD1 항체: a) SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22, 및 23, 각각; b) SEQ ID NO: 24, 25, 26, 27, 28, 및 29, 각각; c) SEQ ID NO: 30, 31, 32, 33, 34, 및 35, 각각; d) SEQ ID NO: 36, 37, 38, 39, 40, 및 41, 각각; e) SEQ ID NO: 42, 43, 44, 45, 46, 및 47, 각각; f) SEQ ID NO: 48, 49, 50, 51, 52, 및 53, 각각; g) SEQ ID NO: 54, 55, 56, 57, 58, 및 59, 각각; 그리고 h) SEQ ID NO: 60, 61, 62, 63, 64, 및 65, 각각
PD1	항-PD1 항체는 PCT 공보 WO2015112800A1의 표 1-3에 개시되어 있고, 다음 SEQ ID NO의 VH/VL 쌍을 갖는 항-PD1 항체를 포함하되 이에 국한되지 않는다. SEQ ID NO:2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 1 14/122, 130/138, 146/154, 162/170, 178/186, 194/202, 210/202, 218/202, 226/202, 234/202, 242/202, 250/202, 258/202, 266/202, 274/202, 282/202, 290/202, 298/186, 306/186 및 314/186, 미국 공보 WO2015112800A1
PD1	미국 특허 번호 10,294,299 B2에서 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는 것으로 개시된 항-PD1 항체: SEQ ID NO:164/178 SEQ ID NO:165/179 SEQ ID NO:166/180 SEQ ID NO:167/181 SEQ ID NO:168/182 SEQ ID NO:169/183 SEQ ID NO:170/184 SEQ ID NO:171/185 SEQ ID NO:172/186 SEQ ID NO:173/187 SEQ ID NO:174/188 SEQ ID NO:175/189 SEQ ID NO:176/190 SEQ ID NO:177/190
PD1	MEDI-0680 (AMP-514)
PD1	PDR001(스파르탈리주맙), 중쇄 및 경쇄 서열이 BAP049-Clone-E로 개시되어 있는 인간화 IgG4 mAb, 미국 특허 번호 9683048 B2 HC: SEQ ID NO: 91, 미국 특허 번호 9,683,048 LC: SEQ ID NO: 72, 미국 특허 번호 9,683,048
PD1	BGB-108
PD1	WO2008/156712에 기술된 h409A11 HC: SEQ ID NO: 31, PCT 공보 WO2008/156712 LC: SEQ ID NO: 36, PCT 공보 WO2008/156712
PD1	WO2008/156712에 기술된 h409A16 HC: SEQ ID NO: 31, PCT 공보 WO2008/156712 LC: SEQ ID NO: 37, PCT 공보 WO2008/156712
PD1	WO2008/156712에 기술된 h409A17 HC: SEQ ID NO: 31, PCT 공보 WO2008/156712 LC: SEQ ID NO: 38, PCT 공보 WO2008/156712
PD1	미국 특허 번호 7,488,802에 기술된 항-PD1 항체로, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는다. SEQ ID NO:2/4 SEQ ID NO:6/8 SEQ ID NO:10/12 SEQ ID NO:14/16 SEQ ID NO:47/49

PD1	미국 특허 번호 7,521,051에 기술된 항-PD1 항체로 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는다. SEQ ID NO:2/4 SEQ ID NO:6/8 SEQ ID NO:10/12 SEQ ID NO:14/16 SEQ ID NO:47/49
PD1	미국 특허 번호 8008449에 기술된 항-PD1 항체로 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는다. SEQ ID NO:1/8 SEQ ID NO:2/9 SEQ ID NO:3/10 SEQ ID NO:4/11 SEQ ID NO:5/12 SEQ ID NO:6/13 SEQ ID NO:7/14
PD1	미국 특허 번호 8,354,509에 기술된 항PD1 항체로, 중쇄 및 경쇄 전장 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는다. SEQ ID NO:31/36 SEQ ID NO:31/37 SEQ ID NO:31/38
PD1	미국 특허 번호 8,168,757에 기술된 항-PD1 항체로, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는다. SEQ ID NO:4/5 SEQ ID NO:12/13 SEQ ID NO:18/19 SEQ ID NO:40/41 SEQ ID NO:47/48 SEQ ID NO:26/27 SEQ ID NO:34/35 SEQ ID NO:55/56 SEQ ID NO:67/68
PD1	PCT 공보 번호 WO2004/004771에 기술된 항-PD1 항체
PD1	PCT 공보 번호 WO2004/056875에 기술된 항-PD1 항체로, 중쇄 및 경쇄 가변 도메인에 대해 다음과 같은 SEQ ID NO 쌍을 갖는다. SEQ ID NO:2/4 SEQ ID NO:6/8 SEQ ID NO:10/12 SEQ ID NO:14/16 SEQ ID NO:47/49
PD1	PCT 공보 번호 WO2004/072286에 기술된 항-PD1 항체
PD1	VH: SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 또는 29, 미국 공보 US2011/0271358 VL: SEQ ID NO: 30, 31, 32, 또는 33, 미국 공보 US2011/0271358
PD1	SHR-1210(캠렐리주맙)은 PCT 공보 번호 WO 2015/085847에 기술되어 있고, 다음과 같은 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 갖는다. HC: SEQ ID NO: 9 LC: SEQ ID NO: 10

[0374] 일부 양태에서, 표적 모이어티는 표 108에 명시된 항-PD1 항체와 PD1에 결합하기 위해 경쟁한다. 다른 양태에서, 표적 모이어티는 표 108에 명시된 항-PD1 항체의 CDR 서열을 갖는 CDR을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 모이어티는 표 108에 명시된 항-PD1 항체의 6개의 CDR 서열 모두를 포함한다. 다른 구현예에서, 표적 모이어티는 적어도 표 108에 명시된 항-PD1 항체의 중쇄 CDR 서열(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) 및 보편적 경쇄의 경쇄 CDR 서열을 포함한다. 다른 양태에서, 표적 모이어티는 표 108에 기재된 항-PD1 항체의 VH의 아미노산 서열을 갖는 VH를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 모이어티는 표 108에 명시된 항-PD1 항체의 VL의 아미노산 서열을

포함하는 VL을 더 포함한다. 다른 구현예에서, 표적 모이어티는 범용 경쇄 VL 서열을 더 포함한다.

[0375] 표적 분자가 체크포인트 억제제인 경우, 일부 구현예에서, 체크포인트 억제제 표적 모이어티는 리간드-수용체 결합을 차단하지 않거나 잘 차단하지 못한다. 비차단 또는 저차단 항-PD1 항체의 예로는 PCT 공보 WO2015/112800A1의 SEQ ID NO: 2/10, 미국 특허 제11,034,765 B2의 SEQ ID NO: 16/17, 그리고 미국 특허 제10,294,299 B2의 SEQ ID NO: 164/178, 165/179, 166/180, 167/181, 168/182, 169/183, 170/184, 171/185, 172/186, 173/187, 174/188, 175/189, 176/190, 177/190을 포함하는 항체들이 있다. 비차단 또는 저차단 항-LAG3 항체의 예로는 미국 공보 US2022/0056126A1의 SEQ ID NO: 23/24, 3/4 및 11/12의 VH/VL 아미노산 서열을 갖는 항체들이 있다.

[0376] IFN 전구단백질이 표적으로 삼을 수 있는 추가 표적 분자는 아래 표 1에 공개되어 있으며, 특히 표 1의 Hafeez *외*, 2020, Molecules 25:4764, doi:10.3390/molecules25204764에서 확인할 수 있다. Hafeez *외*의 표 1은 여기에 전체 내용을 참조하여 통합되어 있다.

[0377] **6.7. 표적 모이어티 형식**

[0378] 특정 양태에서, 본 개시의 IFN 전구단백질의 표적 모이어티는 항원 결정 인자에 대한 특이적 결합을 유지하는 임의의 유형의 항체 또는 그 단편일 수 있다. 일 구현예에서, 표적 모이어티는 면역글로불린 분자 또는 이의 단편, 특히 IgG 클래스 면역글로불린 분자, 보다 구체적으로는 IgG_1 또는 IgG_4 면역글로불린 분자이다. 항체 단편은 VH(또는 V_H) 단편, VL(또는 V_L) 단편, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, scFv 단편, Fv 단편, 미니바디, 디아바디, 트리아바디, 및 테트라바디를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0379] **6.7.1. Fab**

[0380] Fab 도메인은 전통적으로 파파인과 같은 효소를 사용하여 면역글로불린 분자의 단백질 분해 절단에 의해 생성되었다. Fab 도메인은 임의의 적합한 종 유래의 불변 도메인 및 가변 영역 서열을 포함할 수 있으며, 따라서 뮤린, 키메라, 인간 또는 인간화된 것일 수 있다.

[0381] Fab 도메인은 전형적으로 VL 도메인에 부착된 CL 도메인과 쌍을 형성하는 VH 도메인에 부착된 CH1 도메인을 포함한다. 야생형 면역글로불린에서, VH 도메인은 VL 도메인과 쌍을 형성하여 Fv 영역을 구성하고, CH1 도메인은 CL 도메인과 쌍을 형성하여 결합 부위를 추가로 안정화시킨다. 2개의 불변 도메인 사이의 이황화 결합은 Fab 도메인을 추가로 안정화시킬 수 있다. 표적 모이어티가 Fab인 경우, 예를 들어 도 1b 및 1c에 도시된 바와 같이 Fab의 CH1은 IFN 모이어티에 대한 불편 도메인 N-말단을 나타낼 수 있다.

[0382] 본 개시의 IFN 전구단백질의 경우, 특히 표적 모이어티의 경쇄가 일반적이거나 보편적인 경쇄가 아닌 경우, 동일한 표적 모이어티에 속한 Fab 도메인의 올바른 결합을 허용하고 다른 표적 모이어티에 속한 Fab 도메인의 비정상적인 쌍을 최소화하기 위해 Fab 이합체화 전략을 사용하는 것이 유리하다. 예를 들어, 아래 표 109에서 나타낸 Fab 이종이량체화 전략을 사용할 수 있다:

표 109

[0383] **표 109**
Fab 이종이량체화 전략

전략	VH	CH1	VL	CL	참조
CrossMabCH1-CL	WT	CL 도메인	WT	CH1 도메인	Schaefer *외*, 2011, Cancer Cell 2011; 20:472-86; PMID:22014573.
직교 Fab VHVRD1CH1CRD2 - VLVRD1CλCRD2	39K, 62E	H172A, F174G	1R, 38D, (36F)	L135Y, S176W	Lewis *외*, 2014, Nat Biotechnol 32:191-8
직교 Fab VHVRD2CH1wt - VLVRD2CλwT	39Y	WT	38R	WT	Lewis *외*, 2014, Nat Biotechnol 32:191-8
TCR CαCβ	39K	TCR Cα	38D	TCR Cβ	Wu *외*, 2015, Mabs 7:364-76
CR3	WT	T192E	WT	N137K, S114A	Golay *외*, 2016, J Immunol 196:3199-211

MUT4	WT	L143Q, S188V	WT	V133T, S176V	Golay *외*, 2016, J Immunol 196:3199-211
DuetMab	WT	F126C	WT	S121C	Mazor *외*, 2015, Mabs 7 :377-89 ; Mazor *외*, 2015, Mabs 7 :461-669.
교환된 도메인	WT	CH3 + 놉 또는 홀 돌연변이	WT	CH3 + 홀 또는 놉 돌연변이	Wozniak-Knopp *외*, 2018, PLoSONE13(4):e0195442

[0384] 따라서, 특정 구현예에서, Fab의 두 폴리펩타이드 사이의 올바른 결합은 *예를 들어*, WO 2009/080251에 기술된 바와 같이, Fab의 VL 및 VH 도메인을 서로 교환하거나 CH1 및 CL 도메인을 서로 교환함으로써 촉진된다.

[0385] 올바른 Fab 쌍 형성은 또한 Fab의 CH1 도메인에 하나 이상의 아미노산 변형 및 CL 도메인에 하나 이상의 아미노산 변형을 도입하고/하거나 VH 도메인에 하나 이상의 아미노산 변형 및 VL 도메인에 하나 이상의 아미노산 변형을 도입함으로써 촉진될 수 있다. 변형되는 아미노산은 전형적으로 Fab 구성요소가 다른 Fab의 구성요소보다 서로 우선적으로 쌍을 형성하도록, VH:VL 및 CH1:CL 계면의 일부이다.

[0386] 일 구현예에서, 하나 이상의 아미노산 변형은 잔기의 Kabat 번호 지정에 의해 표시된 바와 같이 가변(VH, VL) 및 불변(CH1, CL) 도메인의 보존된 프레임워크 잔기로 제한된다. 문헌[Almagro, 2008, Frontiers In Bioscience 13:1619-1633]은 Kabat, Chothia 및 IMGT 번호 지정 체계에 기초하여 프레임워크 잔기의 정의를 제공한다.

[0387] 일 구현예에서, VH 및 CH1 및/또는 VL 및 CL 도메인에 도입된 변형은 서로 상보적이다. 중쇄 및 경쇄 계면에서의 상보성은 입체 및 소수성 접촉, 정전기/전하 상호 작용 또는 다양한 상호 작용의 조합에 기초하여 달성될 수 있다. 단백질 표면 사이의 상보성은 문헌에서 자물쇠와 열쇠 맞춤, 높과 홀, 돌기와 공동, 기증자와 수용체 등의 용어로 광범위하게 설명되며, 이는 모두 상호 작용하는 두 표면 사이의 구조적, 화학적 일치의 특성을 의미한다.

[0388] 일 구현예에서, 하나 이상의 도입된 변형은 Fab 구성 요소의 계면에 새로운 수소 결합을 도입한다. 일 구현예에서, 하나 이상의 도입된 변형은 Fab 구성 요소의 계면에 새로운 염 다리를 도입한다. 예시적인 치환은 WO 2014/150973 및 WO 2014/082179에 기재되어 있으며, 이들의 내용은 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0389] 일부 구현예에서, Fab 도메인은 CH1 도메인에서 192E 치환과 CL 도메인에서 114A 및 137K 치환으로 구성되며, 이는 CH1 및 CL 도메인 사이에 염-다리를 도입한다(*예*: Golay *외*, 2016, J Immunol 196:3199-211 참조).

[0390] 일부 구현예에서, Fab 도메인은 CH1 도메인에서 143Q 및 188V 치환과 CL 도메인에서 113T 및 176V 치환으로 구성되며, 이는 CH1 및 CL 도메인 사이의 소수성 및 극성 접촉 영역을 교환하는 역할을 한다(*예*: Golay *외*, 2016, J Immunol 196:3199-211 참조).

[0391] 일부 구현예에서, Fab 도메인은 Fab 도메인의 올바른 조립을 촉진하는 직교 Fab 계면을 도입하기 위해 VH, CH1, VL, CL 도메인의 일부 또는 전체에 변형을 포함할 수 있다(Lewis *외*, 2014 Nature Biotechnology 32:191-198). 일 구현예에서, 39K, 62E 변형은 VH 도메인에 도입되고, H172A, F174G 변형은 CH1 도메인에 도입되며, 1 R, 38D, (36F) 변형은 VL 도메인에 도입되고, L135Y, S176W 변형은 CL 도메인에 도입된다. 다른 구현예에서, 39Y 변형은 VH 도메인에 도입되고 38R 변형은 VL 도메인에 도입된다.

[0392] Fab 도메인은 또한 천연 CH1:CL 이황화 결합을 조작된 이황화 결합으로 대체하도록 변형되어, 이를 통해 Fab 구성요소 쌍 형성의 효율을 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 조작된 이황화 결합은 CH1 도메인에 126C 및 CL 도메인에 121 C를 도입함으로써 도입될 수 있다(*예*: 문헌[Mazor *외*, 2015, Mabs 7:377-89] 참조).

[0393] Fab 도메인은 또한 CH1 도메인 및 CL 도메인을 올바른 조립을 촉진하는 대안적인 도메인으로 대체함으로써 변형될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Wu *외*, 2015, Mabs 7:364-76]은 CH1 도메인을 T 세포 수용체의 불변 도메인으로 치환하고 CL 도메인을 T 세포 수용체의 b 도메인으로 치환하며, VL 도메인에 38D 변형 및 VH 도메인에 39K 변형을 도입함으로써 이들 도메인 대체가 VL과 VH 도메인 간의 추가적인 전하-전하 상호 작용과 쌍을 형성하는 것을 기재한다.

[0394] 올바른 VH-VL 쌍형성을 촉진하기 위해 Fab 이종이량체화 전략을 사용하는 것 대신에, 또는 이에 부가적으로, 공통 경쇄(또한 범용 경쇄로 지칭됨)의 VL이 본 개시내용의 IFN 전구단백질의 각각의 고유한 ABD에 사용될 수 있다. 다양한 구현예에서, 본 명세서에 기재된 바와 같이 공통 경쇄를 이용하는 것은 원래의 동족 VL을 이용하는

것과 비교하여 IFN 전구단백질의 부적절한 종의 수를 감소시킨다. 다양한 구현예에서, ABD의 VL 도메인은 공통 경쇄를 포함하는 단일특이적 항체로부터 확인된다. 다양한 구현예에서, IFN 전구단백질의 ABD의 VH 영역은 제한된 인간 경쇄 레퍼토리 또는 단일 인간 경쇄를 발현하도록 이전에 조작된 마우스 B 세포 *내에서* 생체 내에서 재배열된 인간 중쇄 가변 유전자 절편으로 구성되며, 관심 항원에 대한 노출에 반응하여, 하나 또는 2개의 가능한 인간 VL 중 하나와 인지되는 복수의 인간 VH를 포함하는 항체 레퍼토리를 생성하고, 여기서 관심 항원에 특이적인 항체 레퍼토리는 인간 경쇄와 인지되는 복수의 인간 VH를 생성하는 것을 특징으로 한다. 공통 경쇄는 재 배열된 인간 Vκ1-39Jκ5 서열 또는 재 배열된 인간 Vκ3-20Jκ1 서열에서 파생된 것으로, 신체적 돌연변이(*예*: 친화성 성숙) 버전이 포함된다. 예를 들어, 미국 특허 번호 10,412,940을 참조한다.

[0395] 6.7.2. scFv

[0396] 단일 사슬 Fv 또는 "scFv" 항체 단편은 단일 폴리펩타이드 사슬에 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하고, 단일 사슬 폴리펩타이드로 발현될 수 있으며, 유래된 온전한 항체의 특이성을 유지한다. 일반적으로, scFv 폴리펩타이드는 scFv가 표적 결합을 위한 원하는 구조를 형성하게 하는 VH 도메인과 VL 도메인 사이의 폴리펩타이드 링커를 추가로 포함한다. scFv의 VH 및 VL 사슬을 연결하는 데 적합한 링커의 예는 섹션 6.5에서 식별된 비절단성 링커이다.

[0397] 명시되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 scFv는, *예를 들어*, 폴리펩타이드의 N-말단 및 C-말단에 대해 어느 순서로든 VL 및 VH 가변 영역을 가질 수 있으며, scFv는 VL-링커-VH를 포함할 수 있거나 VH-링커-VL을 포함할 수 있다.

[0398] scFv는 임의의 적합한 종, 예컨대, 뮤린, 인간 또는 인간화 VH 및 VL 서열 유래의 VH 및 VL 서열을 포함할 수 있다.

[0399] scFv-인코딩 핵산을 생성하기 위해, VH 및 VL-인코딩 DNA 단편은 링커를 인코딩하는 다른 단편, *예를 들어* 섹션 6.5(일반적으로 아미노산 글리신 및 세린을 포함하는 서열의 반복, 예를 들어 아미노산 서열 (Gly4~Ser)3(SEQ ID NO: 182)에 기술된 링커 중 하나를 인코딩하는 다른 단편에 작동 가능하게 연결된다. 이렇게 하면 VH 및 VL 서열은 VL 및 VH 영역이 유연한 링커에 의해 연결된 연속된 단일 사슬 단백질로 발현될 수 있다(*예*: Bird *외*, 1988, Science 242:423-426; Huston *외*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty *외*, 1990, Nature 348:552-554 참조).

[0400] 6.8. Fc 영역

[0401] 본 개시내용의 IFN 전구단백질은 전형적으로 회합하여 Fc 영역을 형성하는 한 쌍의 Fc 도메인을 포함한다. 천연 항체에서, Fc 영역은 N-말단에 힌지 영역을 포함하여 불변 도메인을 형성한다. 본 개시내용 전반에 걸쳐, Fc 도메인에 대한 언급은 달리 명시되지 않는 한 N-말단에 힌지 도메인이 있는 Fc 도메인을 포괄한다.

[0402] Fc 도메인은 ABD 또는 이의 성분에 작동 가능하게 연결된 임의의 적합한 종으로부터 유래될 수 있다. 일 구현예에서, Fc 도메인은 인간 Fc 도메인에서 유래된다. 바람직한 구현예에서, 표적 모이어티 또는 이의 성분은 IgG Fc 분자에 융합된다. 표적 모이어티 또는 성분은 IgG Fc 도메인의 N-말단이나 C-말단 또는 둘 모두에 융합될 수 있다.

[0403] Fc 도메인은 IgA(하위클래스 IgA1 및 IgA2 포함), IgD, IgE, IgG(하위클래스 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4 포함) 및 IgM을 포함하는 임의의 적합한 항체 클래스로부터 유래될 수 있다. 일 구현예에서, Fc 도메인은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4에서 유래된다. 일 구현예에서, Fc 도메인은 IgG1에서 유래된다. 일 구현예에서, Fc 도메인은 IgG4에서 유래된다. IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4 유래의 Fc 도메인의 예시적인 서열은 하기 표 110에 제공되어 있다.

표 110

[0404]

표 110
Fc 서열

Fc	서열	SEQ ID NO
hIgG1 Fc (UniprotKB P01857-1의 아미노산 99-330)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK	392

hIgG2 Fc (UniprotKB P01859-1의 아미노산 99-326)	ERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	393
hIgG3 Fc(UniprotKB P01860-1의 아미노산 99-377)	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK	394
hIgG4 Fc(UniprotKB P01861-1의 아미노산 99-327)	ESKYGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK	395

[0405] 일부 양태에서, Fc 도메인은 적어도 약 90 %, 적어도 약 91 %, 적어도 약 92 %, 적어도 약 93 %, 적어도 약 94 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 96 %, 적어도 약 97 %, 적어도 약 98 %, 적어도 약 99 % 또는 100 % 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 SEQ ID NO:410에 포함하여 구성된다. Fc 도메인이 SEQ ID NO:410에 대한 서열 동일성이 90 % 이상이고 서열 동일성이 100 % 미만인 경우 (*예*: SEQ ID NO:410과 90 %~99 %의 서열 동일성), Fc 도메인은 또한 본 명세서에 기술된 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 이펙터 기능을 감소시키는 하나 이상의 치환(*예를 들어*, 섹션 6.8.1에 기술된 바와 같이) 및/또는 Fc 헤테로이중화를 촉진하는 하나 이상의 치환(*예를 들어*, 섹션 6.8.2에 기술된 바와 같이)을 포함할 수도 있다.

[0406] 일부 양태에서, Fc 도메인은 적어도 약 90 %, 적어도 약 91 %, 적어도 약 92 %, 적어도 약 93 %, 적어도 약 94 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 96 %, 적어도 약 97 %, 적어도 약 98 %, 적어도 약 99 % 또는 100 % 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 SEQ ID NO:411에 포함하여 구성된다. Fc 도메인이 SEQ ID NO:411에 대한 서열 동일성이 90 % 이상이고 서열 동일성이 100 % 미만인 경우 (*예*: SEQ ID NO:411과 90 %~99 %의 서열 동일성), Fc 도메인은 또한 본 명세서에 기술된 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 이펙터 기능을 감소시키는 하나 이상의 치환(*예를 들어*, 섹션 6.8.1에 기술된 바와 같이) 및/또는 Fc 헤테로이중화를 촉진하는 하나 이상의 치환(*예를 들어*, 섹션 6.8.2에 기술된 바와 같이)을 포함할 수도 있다.

[0407] 일부 양태에서, Fc 도메인은 적어도 약 90 %, 적어도 약 91 %, 적어도 약 92 %, 적어도 약 93 %, 적어도 약 94 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 96 %, 적어도 약 97 %, 적어도 약 98 %, 적어도 약 99 % 또는 100 % 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 SEQ ID NO:412에 포함하여 구성된다. Fc 도메인이 SEQ ID NO:412에 대한 서열 동일성이 90 % 이상이고 서열 동일성이 100 % 미만인 경우 (*예*: SEQ ID NO:412와 90 %~99 %의 서열 동일성), Fc 도메인은 또한 본 명세서에 기술된 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 이펙터 기능을 감소시키는 하나 이상의 치환(*예를 들어*, 섹션 6.8.1에 기술된 바와 같이) 및/또는 Fc 헤테로이중화를 촉진하는 하나 이상의 치환(*예를 들어*, 섹션 6.8.2에 기술된 바와 같이)을 포함할 수도 있다.

[0408] 일부 양태에서, Fc 도메인은 적어도 약 90 %, 적어도 약 91 %, 적어도 약 92 %, 적어도 약 93 %, 적어도 약 94 %, 적어도 약 95 %, 적어도 약 96 %, 적어도 약 97 %, 적어도 약 98 %, 적어도 약 99 % 또는 100 % 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 SEQ ID NO:413에 포함하여 구성된다. Fc 도메인이 SEQ ID NO:413에 대한 서열 동일성이 90 % 이상이고 서열 동일성이 100 % 미만인 경우 (*예*: SEQ ID NO:413과 90 %~99 %의 서열 동일성), Fc 도메인은 또한 본 명세서에 기술된 하나 이상의 아미노산 치환, 예를 들어 이펙터 기능을 감소시키는 하나 이상의 치환(*예를 들어*, 섹션 6.8.1에 기술된 바와 같이) 및/또는 Fc 헤테로이중화를 촉진하는 하나 이상의 치환(*예를 들어*, 섹션 6.8.2에 기술된 바와 같이)을 포함할 수도 있다.

[0409] Fc 영역 내 2개의 Fc 도메인은 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 네이티브 항체에서, Fc 도메인은 일반적으로 동일하지만, 다중 특이적 결합 분자, *예를 들어* 본 개시의 IFN 전구단백질 및 이들의 활성화에 의해 생성되는 MBM을 생산하기 위한 목적으로, Fc 도메인은 아래 6.8.2항에 설명된 바와 같이 이종이합체화를 허용하기 위해 유리하게 상이할 수 있다.

[0410] 천연 항체에서, IgA, IgD 및 IgG의 중쇄 Fc 도메인은 2개의 중쇄 불변 도메인(CH2 및 CH3)으로 구성되고 IgE 및 IgM의 중쇄 Fc 도메인은 3개의 중쇄 불변 도메인(CH2, CH3 및 CH4)으로 구성된다. 이들은 이량체화되어 Fc 영역을 생성한다.

[0411] 본 개시내용의 IFN 전구단백질에서, Fc 영역 및/또는 그 내부의 Fc 도메인은 항체의 하나 이상의 상이한 부류, 예를 들어, 1, 2 또는 3개의 상이한 부류 유래의 중쇄 불변 도메인을 포함할 수 있다.

[0412] 일 구현예에서, Fc 영역은 IgG1에서 유래된 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0413] 하나의 구현예에서 Fc 영역은 IgG2로부터 유래된 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0414] 하나의 구현예에서 Fc 영역은 IgG3으로부터 유래된 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0415] 하나의 구현예에서 Fc 영역은 IgG4로부터 유래된 CH2 및 CH3 도메인을 포함한다.

[0416] 하나의 구현예에서 Fc 영역은 IgM으로부터의 CH4 도메인을 포함한다. IgM CH4 도메인은 전형적으로 CH3 도메인의 C-말단에 위치한다.

[0417] 일 구현예에서, Fc 영역은 IgG로부터 유래된 CH2 및 CH3 도메인 및 IgM으로부터 유래된 CH4 도메인을 포함한다.

[0418] 본 개시내용의 IFN 전구단백질에 대한 Fc 영역을 생성하는 데 사용하기 위한 중쇄 불변 도메인은 상기 기재된 자연적으로 발생하는 불변 도메인의 변이체를 포함할 수 있음이 이해될 것이다. 그러한 변이체는 야생형 불변 도메인과 비교하여 하나 이상의 아미노산 변이를 포함할 수 있다. 일 실시예에서, 본 개시의 Fc 영역은 야생형 불변 도메인과 서열이 다른 적어도 하나의 불변 도메인을 포함한다. 변이체 불변 도메인이 야생형 불변 도메인보다 더 길거나 더 짧을 수 있다고 이해될 것이다. 바람직하게는 변이체 불변 도메인은 야생형 불변 도메인과 적어도 60 % 동일하거나 유사하다. 또 다른 예에서, 변이체 불변 도메인은 적어도 70 % 동일하거나 유사하다. 또 다른 예에서, 변이체 불변 도메인은 적어도 80 % 동일하거나 유사하다. 또 다른 예에서, 변이체 불변 도메인은 적어도 90 % 동일하거나 유사하다. 또 다른 예에서 변이체 불변 도메인은 적어도 95 % 동일하거나 유사하다.

[0419] IgM 및 IgA는 공통 H2L2 항체 단위의 공유 멀티머로서 인간에서 발생한다. IgM은 J-사슬에 통합되었을 때 오량체로, 또는 J-사슬이 결여되었을 때 육량체로 발생한다. IgA는 단량체 및 이량체 형태로 발생한다. IgM 및 IgA의 중쇄는 테일피스(tailpiece)로 알려진 C-말단 불변 도메인으로 18개의 아미노산 연장부를 갖는다. 테일피스는 중합체의 중쇄 사이에 이황화 결합을 형성하는 시스테인 잔기를 포함하며, 중합에서 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 테일피스는 또한 글리코실화 부위를 포함한다. 특정 구현예에서, 본 개시내용의 IFN 전구단백질은 테일피스를 포함하지 않는다.

[0420] 본 개시내용의 IFN 전구단백질에 통합된 Fc 도메인은 단백질의 기능적 특성, 예를 들어, Fc-수용체, 예컨대, FcRn 또는 백혈구 수용체에 대한 결합, 보체에 대한 결합, 변형된 이황화 결합 구조, 또는 변경된 글리코실화 패턴을 변경시키는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 이펙터 기능을 변경시키는 예시적인 Fc 변형은 섹션 6.8.1에 기재되어 있다.

[0421] Fc 도메인은 또한, 예를 들어, 동일한 Fc 도메인에 비해 동일하지 않은 Fc 도메인의 쌍을 우선적으로 형성하는 이종이량체화를 가능하게 함으로써 비대칭 IFN 전구단백질의 제조성을 개선시키는 변형을 포함하도록 변경될 수 있다. 이종이량체화는 상이한 폴리펩타이드 구성요소가 서열이 상이한 Fc 도메인을 포함하는 Fc 영역에 의해 서로 연결된 IFN 전구단백질의 생성을 허용한다. 이종이량체화 전략의 예는 섹션 6.8.2에 예시되어 있다.

[0422] 상기 언급된 변형 중 임의의 것은 임의의 적합한 방식으로 조합되어 원하는 기능적 특성을 달성하고/하거나 다른 변형과 조합되어 IFN 전구단백질의 특성을 변경시킬 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0423] **6.8.1. 변경된 이펙터 기능을 갖는 Fc 도메인**

[0424] 일부 구현예에서, Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 결합 및/또는 이펙터 기능을 감소시키는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0425] 특정 구현예에서, Fc 수용체는 Fcɣ 수용체이다. 일 구현예에서, Fc 수용체는 인간 Fc 수용체이다. 일 구현예에서, Fc 수용체는 활성화 Fc 수용체이다. 구체적인 구현예에서, Fc 수용체는 활성화 인간 Fcɣ 수용체, 더 구체적으로 인간 FcɣRIIIa, FcɣRI 또는 FcɣRIIA, 가장 구체적으로 인간 FcɣRIIIa이다. 일 구현예에서, 이펙터 기능은 보체 의존성 세포독성(CDC), 항체-의존성 세포-매개 세포독성(ADCC), 항체-의존성 세포 식세포작용(ADCP), 및 사이토카인 분비의 군으로부터 선택되는 하나 이상이다. 특정 구현예에서, 이펙터 기능은 ADCC이다.

[0426] 일 구현예에서, Fc 도메인(*예를 들어*, IFN 전구단백질 반쪽 항체의 Fc 도메인) 또는 Fc 영역(*예를 들어*, Fc 영역을 형성하기 위해 결합할 수 있는 IFN 전구단백질의 하나 또는 양쪽 Fc 도메인)은 E233, L234, L235, N297, P331 및 P329(Kabat EU 색인에 따른 번호) 그룹 중에서 선택된 위치에서 아미노산 치환을 구성한다. 보다 구체적인 구현예에서, Fc 도메인 또는 Fc 영역은 L234, L235 및 P329(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)의 군으로부터 선택되는 위치에 아미노산 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, Fc 도메인 또는 Fc 영역은 아미노산 치환 L234A 및 L235A(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)를 포함한다. 그러한 일 구현예에서, Fc 도메인 또는 영역은 Igd Fc

도메인 또는 영역, 특히 인간 Igd Fc 도메인 또는 영역이다. 일 구현예에서, Fc 도메인 또는 Fc 영역은 위치 P329에 아미노산 치환을 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 아미노산 치환은 P329A 또는 P329G, 특히 P329G(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)이다. 일 구현예에서, Fc 도메인 또는 Fc 영역은 위치 P329에 아미노산 치환 및 E233, L234, L235, N297 및 P331(Kabat EU 색인에 따른 번호)로부터 선택되는 위치에 추가 아미노산 치환을 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 추가 아미노산 치환은 E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D 또는 P331S이다. 특정 구현예에서, Fc 도메인 또는 Fc 영역은 위치 P329, L234 및 L235(Kabat EU 인덱스에 따른 넘버링)에 아미노산 치환을 포함한다. 보다 특정한 구현예에서, Fc 도메인은 아미노산 돌연변이 L234A, L235A 및 P329G("P329G LALA", "PGLALA" 또는 "LALAPG")를 포함한다.

[0427] 전형적으로, 동일한 하나 이상의 아미노산 치환이 Fc 영역의 2개 Fc 도메인 각각에 존재한다. 따라서, 특정 구현예에서, Fc 영역의 각 Fc 도메인은 아미노산 치환 L234A, L235A 및 P329G(카바트 EU 인덱스 넘버링)를 포함한다. Fc 영역의 각 제1 및 제2 Fc 도메인에서, 위치 234의 류신 잔기는 알라닌 잔기(L234A), 위치 235의 류신 잔기는 알라닌 잔기(L235A) 및 위치 329의 프롤린 잔기는 글리신 잔기(P329G)로 대체된다(Kabat EU 색인에 따른 번호).

[0428] 일 구현예에서, Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인, 특히 인간 IgG1 Fc 도메인이다. 일부 구현예에서, IgG1 Fc 도메인은 D265A, N297A 돌연변이(EU 번호)를 포함하여 이펙터 기능을 감소시킨 변이체 IgG1이다.

[0429] 또 다른 구현예에서, Fc 도메인은 Fc 수용체에 대한 결합이 감소된 IgG4 Fc 도메인이다. Fc 수용체에 대한 결합이 감소된 예시적인 IgG4 Fc 도메인은 하기 표 111로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Fc 도메인은 하기에 나타낸 서열의 굵은 글씨 부분만 포함한다.

표 111

[0430]

표 111

Fc 도메인	서열	SEQ ID NO:
SEQ ID NO:1, WO2014/121087	Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	369
SEQ ID NO:2, WO2014/121087	Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	370

SEQ ID NO:30, WO2014/121087	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val **Glu Pro Lys Ser Cys Asp** **Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val** **Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys** **Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys** **Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln** **Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala** **Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr** **Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp** **Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys** **Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala** **Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro** **Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu** **Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala** **Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr** **Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe** **Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp** **Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu** **Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu** **Ser Pro Gly Lys**	371
SEQ ID NO:31, WO2014/121087	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val **Glu Ser Lys Tyr Gly Pro** **Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro** **Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu** **Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val** **Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp** **Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys** **Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val** **Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly** **Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro** **Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln** **Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln** **Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu** **Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp** **Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr** **Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr** **Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly** **Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His** **Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly** **Lys**	372

WO2014/121087의 SEQ ID NO:37	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val **Glu Pro Lys Ser Cys Asp** **Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val** **Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys** **Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys** **Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln** **Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala** **Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr** **Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp** **Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys** **Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala** **Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro** **Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu** **Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala** **Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr** **Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe** **Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp** **Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu** **Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu** **Ser Pro Gly Lys**	373
WO2014/121087의 SEQ ID NO:38	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val **Glu Ser Lys Tyr Gly Pro** **Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro** **Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu** **Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val** **Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp** **Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys** **Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val** **Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly** **Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro** **Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln** **Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln** **Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu** **Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp** **Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr** **Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr** **Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly** **Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His** **Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly** **Lys**	374

[0431] 특정 구현예에서, 감소된 이펙터 기능을 갖는 IgG4는 아미노산 서열을 갖는 WO2014/121087의 SEQ ID NO:31의 굵은체 부분(본 명세서에서 때때로 IgG4s 또는 hIgG4s로 지칭)을 포함하며, 아미노산 서열을 갖는다. ESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 396).

[0432] 이종이량체 Fc 영역에 대해, 상기에 기술된 변이체 IgG4 Fc 서열의 조합, 예를 들어, WO2014/121087호의 SEQ ID NO:30의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인(또는 이의 볼드체 부분) 및 WO2014/121087호의 SEQ ID NO:37의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인(또는 이의 볼드체 부분)을 포함하는 Fc 영역 또는 WO2014/121087호의 SEQ ID NO:31의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인(또는 이의 볼드체 부분) 및 WO2014/121087호의 SEQ ID NO:38의 아미노산 서열을 포함하는 Fc 도메인(또는 이의 볼드체 부분)을 포함하는 Fc 영역을 혼입하는 것이

가능하다.

[0433] **6.8.2. Fc 이종이량체화 변이체**

[0434] 특정 IFN 전구단백질은 네이티브 면역글로불린과 달리 동일하지 않은 N-말단 또는 C-말단 영역에 작동 가능하게 연결된 두 개의 Fc 도메인 사이의 이량체화를 수반한다. Fc 영역을 형성하는 2개의 Fc 도메인의 불충분한 이종이량체화는 원하는 이종이량체 분자의 수율을 증가시키는 데 장애물일 될 수 있고 정제에 대한 난제를 나타낸다. 본 개시의 IFN 전구단백질에 존재할 수 있는 Fc 도메인의 이량체화를 향상하기 위해 당업자가 이용할 수 있는 다양한 접근법이 사용될 수 있고, 예를 들어, EP 1870459A1, 미국 특허 번호 5,582,996, 미국 특허 번호 5,731,168, 미국 특허 번호 5,910,573, 미국 특허 번호 5,932,448, 미국 특허 번호 6,833,441, 미국 특허 번호 7,183,076, 미국 특허 출원 공개 번호 2006204493A1, 및 PCT 공개 번호 WO 2009/089004A1에 기술되어 있다.

[0435] 일부 구현예에서, 본 개시는 Fc 이종이량체, 즉 이종의 비동일 Fc 도메인을 포함하는 Fc 영역을 포함하는 IFN 전구단백질을 제공한다. 일반적으로, Fc 이종이량체의 각각의 Fc 도메인은 항체의 CH3 도메인을 포함한다. CH3 도메인은 임의의 동종형, 종류 또는 하위종류 및 바람직하게는 이전의 섹션에 기재된 것과 같은 IgG(IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4) 종류의 항체의 불변 영역으로부터 유래된다.

[0436] CH3 도메인에서 2개의 상이한 중쇄의 이종이량체화는 원하는 IFN 전구단백질을 생성하는 반면, 동일한 중쇄의 동종이량체화는 원하는 IFN 전구단백질의 수율을 감소시킬 것이다. 따라서, 바람직한 구현예에서, 회합하여 본 개시내용의 IFN 전구단백질을 형성하는 폴리펩타이드는 비변형 Fc 도메인에 비해 이종이량체 회합을 선호하는 변형이 있는 CH3 도메인을 포함할 것이다.

[0437] 구체적인 구현예에서, Fc 이종이량체의 형성을 촉진하는 상기 변형은 Fc 도메인 중 하나에 "놉" 변형을 포함하고 다른 Fc 도메인에 "홀" 변형을 포함하는, 소위 "놉-인투-홀" 또는 "놉-인-홀" 변형이다. 노브-인-홀 기술은 미국 특허 번호 5,731,168, 미국 특허 번호 7,695,936, Ridgway *외*, 1996, Prot Eng 9:617-621 및 Carter, 2001, Immunol Meth 248:7-15에 기술되어 있다. 일반적으로, 방법은 제1 폴리펩타이드의 계면에 있는 돌기("놉") 및 제2 폴리펩타이드의 계면에서 상응하는 공동("홀")을 도입하여, 돌기가 이종이량체 형성을 촉진하고 동종이량체 형성을 방해하기 위해 공동에 위치될 수 있도록 하는 것을 수반한다. 돌기는 제1 폴리펩타이드의 계면에서 작은 아미노산 측쇄를 더 큰 측쇄(*예*: 티로신 또는 트립토판)로 대체하여 구성된다. 큰 아미노산 측쇄를 작은 아미노산 측쇄(*예*: 알라닌 또는 트레오닌)로 대체함으로써 돌기와 동일하거나 유사한 크기의 보상 공동이 제2 폴리펩타이드의 계면에 만들어진다.

[0438] 따라서 일부 구현예에서, Fc 도메인의 제1 서브유닛의 CH3 도메인에 있는 아미노산 잔기는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되어, 이를 통해 제2 서브유닛의 CH3 도메인 내 공동에 위치할 수 있는 제1 서브유닛의 CH3 도메인 내 돌기를 생성하고, Fc 도메인의 제2 서브유닛의 CH3 도메인에 있는 아미노산 잔기는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 아미노산 잔기로 대체되어, 이를 통해 제1 서브유닛의 CH3 도메인 내 돌기가 위치할 수 있는 제2 서브유닛의 CH3 도메인 내 공동을 생성한다. 바람직하게는 더 큰 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 아르기닌(R), 페닐알라닌(F), 타이로신(Y), 및 트립토판(W)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 바람직하게는 더 작은 측쇄 부피를 갖는 상기 아미노산 잔기는 알라닌(A), 세린(S), 트레오닌(T), 및 발린(V)으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 돌기와 공동은 부위 특이적 돌연변이 유발 또는 펩타이드 합성과 같이 폴리펩타이드를 코딩하는 핵산을 변경하여 만들 수 있다. 예시적인 치환은 Y470T이다.

[0439] 그러한 구체적인 구현예에서, 제1 Fc 도메인에서 위치 366의 트레오닌 잔기는 트립토판 잔기로 대체되고(T366W), Fc 도메인에서 위치 407의 타이로신 잔기는 발린 잔기로 대체되며(Y407V) 선택적으로 위치 366의 트레오닌 잔기는 세린 잔기로 대체되고(T366S) 위치 368의 류신 잔기는 알라닌 잔기로 대체된다(L368A)(Kabat EU 색인에 따른 번호). 추가 구현예에서, 제1 Fc 도메인에서 추가적으로 위치 354의 세린 잔기는 시스테인 잔기로 대체되거나(S354C) 위치 356의 글루탐산 잔기는 시스테인 잔기로 대체되고(E356C)(특히 위치 354의 세린 잔기는 시스테인 잔기로 대체됨), 제2 Fc 도메인에서 추가적으로 위치 349의 타이로신 잔기는 시스테인 잔기로 대체된다(Y349C)(Kabat EU 색인에 따른 번호). 특정 구현예에서, 제1 Fc 도메인은 아미노산 치환 S354C 및 T366W를 포함하고, 제2 Fc 도메인은 아미노산 치환 Y349C, T366S, L368A 및 Y407V를 포함한다(Kabat EU 색인에 따른 번호).

[0440] 일부 구현예에서, 정전기 조향(*예를 들어*, Gunasekaran *외*, 2010, J Biol Chem 285(25)에 기술된 바와 같이)은, Fc 영역의 제1 및 제2 Fc 도메인의 결합을 촉진하는 데 사용될 수 있다.

[0441] 이종이량체화를 촉진시키도록 변형된 Fc 도메인의 사용에 대한 대안으로, 또는 이에 부가적으로, Fc 도메인은 Fc 이종이량체의 선택을 가능하게 하는 정제 전략을 가능하게 하도록 변형될 수 있다. 그러한 일 구현예에서, 하나의 폴리펩타이드는 단백질 A에 대한 결합을 폐지하는 변형된 Fc 도메인을 포함하여, 따라서 이종이량체 단백질을 생성하는 정제 방법을 가능하게 한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,586,713을 참조한다. 이에 따라, IFN 전구단백질은 제1 CH3 도메인 및 제2 Ig CH3 도메인을 포함하며, 여기서 제1 및 제2 Ig CH3 도메인은 적어도 하나의 아미노산만큼 서로 상이하고, 적어도 하나의 아미노산 차이는 아미노산 차이가 없는 상응하는 IFN 전구단백질과 비교하여 단백질 A에 대한 IFN 전구단백질의 결합을 감소시킨다. 일 구현예에서, 제1 CH3 도메인은 단백질 A와 결합하고, 제2 CH3 도메인은 단백질 A 결합을 감소시키거나 없애는 돌연변이/변형(예: H95R 변형(IMGT 엑손 번호 기준, EU 번호 기준 H435R))을 포함한다. 제2 CH3은 Y96F 변형(IMGT에 의함; EU에 의하면 Y436F)을 더 포함할 수 있다. 이러한 부류의 변형은 본 명세서에서 "별" 돌연변이로 지칭된다.

[0442] 일부 구현예에서, Fc는 이종이량체화를 촉진하기 위한 하나 이상의 돌연변이(*예*: 놉 및 홀 돌연변이)뿐만 아니라 정제를 촉진하기 위한 별 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0443] **6.8.3. 힌지 도메인**

[0444] 본 개시의 IFN 전구단백질은 N-말단에 힌지 도메인을 포함하는 Fc 도메인을 포함할 수 있다. 힌지 영역은 천연 또는 변형된 힌지 영역일 수 있다. 힌지 영역은 전형적으로 Fc 영역의 N-말단에서 발견된다. 문맥이 달리 지시하지 않는 한, 용어 "힌지 도메인"은 단일 또는 단량체 폴리펩타이드 사슬의 맥락에서 단량체 힌지 도메인이고 이량체 폴리펩타이드(*예를 들어*, 2개 Fc 도메인의 회합에 의해 형성된 동종이량체 또는 이종이량체 IFN 전구단백질)의 맥락에서 별도의 폴리펩타이드 사슬에 2개의 회합된 힌지 서열을 포함할 수 있는 자연적으로 또는 비자연적으로 발생하는 힌지 서열을 지칭한다. 때로는 2개의 회합된 힌지 서열을 "힌지 영역"이라고 한다. IFN 전구단백질의 특정 구현예에서, 힌지 영역의 추가 반복체가 폴리펩타이드 서열에 통합될 수 있다.

[0445] 천연 힌지 영역은 자연적으로 발생하는 항체에서 Fab와 Fc 도메인 사이에서 정상적으로 발견되는 힌지 영역이다. 변형된 힌지 영역은 천연 힌지 영역과 길이 및/또는 조성이 상이한 임의의 힌지이다. 그러한 힌지는 다른 종, 예컨대, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 상어, 돼지, 햄스터, 낙타, 라마 또는 염소 힌지 영역 유래의 힌지 영역을 포함할 수 있다. 다른 변형된 힌지 영역은 중쇄 Fc 도메인 또는 Fc 영역과 상이한 부류 또는 하위부류의 항체에서 유래된 완전한 힌지 영역을 포함할 수 있다. 대안적으로, 변형된 힌지 영역은 자연 힌지 또는 반복 단위의 부분을 포함할 수 있으며, 여기서 반복부의 각각의 단위는 자연 힌지 영역에서 유래된다. 추가의 대안에서, 자연 힌지 영역은 하나 이상의 시스테인 또는 다른 잔기를 중성 잔기, 예컨대, 세린 또는 알라닌으로 전환하거나, 적합하게 배치된 잔기를 시스테인 잔기로 전환함으로써 변경될 수 있다. 그러한 수단에 의해, 힌지 영역의 시스테인 잔기의 수는 증가되거나 감소될 수 있다. 다른 변형된 힌지 영역은 전적으로 합성될 수 있으며, 원하는 특성, 예컨대, 길이, 시스테인 조성 및 가용성을 갖도록 설계될 수 있다.

[0446] 다수의 변형된 힌지 영역은 예를 들어 미국 특허 번호 5,677,425, WO 99/15549, WO 2005/003170, WO 2005/003169, WO 2005/003170, WO 98/25971 및 WO 2005/003171에 이미 설명되어 있고 이들은 인용방식에 의해 본원에 원용된다.

[0447] 일 구현예에서, 본 개시내용의 IFN 전구단백질은 하나 또는 2개의 Fc 도메인이 N-말단에 온전한 힌지 도메인을 갖는 Fc 영역을 포함한다.

[0448] 다양한 구현예에서, 힌지 영역 내의 위치 233-236은 G, G, G 및 비어 있거나, G, G, 비어 있고 비어 있거나, G, 비어 있고 비어 있거나, 비어 있고 비어 있거나, 모두 비어 있고 위치가 EU 번호로 번호가 지정되어 있을 수 있다.

[0449] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 IFN 전구단백질은 동일한 아이소타입(*예*: 인간 IgG1 또는 인간 IgG4)의 야생형 힌지 영역에 비해 Fcɣ 수용체에 대한 결합 친화성을 감소시키는 변형된 힌지 영역을 포함한다.

[0450] 일 구현예에서, 본 개시의 IFN 전구단백질은 각 Fc 도메인이 그 N-말단에 온전한 힌지 도메인을 갖는 Fc 영역을 포함하며, 여기서 각 Fc 도메인 및 힌지 도메인은 IgG4로부터 유래되고 각 힌지 도메인은 변형된 서열 CPPC(SEQ ID NO: 375)를 포함한다. 인간 IgG4의 핵심 힌지 영역은 서열 CPSC(SEQ ID NO: 376)를 포함하고 있는 반면, 인간 IgG1의 핵심 힌지 영역은 서열 CPPC(SEQ ID NO: 375)를 포함한다. IgG4 서열에 존재하는 세린 잔기는 이 영역에 가요성 증가를 야기하고, 따라서 일부 분자는 IgG 분자의 다른 중쇄를 가교하여 사슬간 이황화물을 형성하는 대신 동일한 단백질 사슬 내에 이황화 결합(사슬 내 이황화물)을 형성한다. (Angel *외*, 1993, Mol Immunol 30(1):105-108). 세린 잔기를 프롤린으로 변경하여 IgG1과 동일한 핵심 서열을 제공하면 IgG4 힌지 영역에서 사

슬 간 이황화물이 완전히 형성되어 정제된 제품의 이질성을 줄일 수 있다. 이러한 변경된 아이소타입은 IgG4P라고 한다.

[0451] 본 개시의 IFN 전구단백질에 통합된 힌지 서열은 전장 ("긴") 또는 절단된 ("짧은") 서열일 수 있다. 전장 힌지 서열의 예는 ESKYGPPCPPCPAPPVA(SEQ ID NO: 377)이다. 잘린 힌지 서열의 예는 ESKYGPPCPPC(SEQ ID NO: 378)이다. ESKYGPPCPPC(SEQ ID NO: 378)는 전장 힌지 서열 ESKYGPPCPAPPCA(SEQ ID NO: 379)에 비해 아미노산 6개가 잘려 있다. 다양한 양태에서, 절단된 힌지는 전장 힌지 서열, *예를 들어*, 본 개시에 개시된 전장 힌지 서열과 비교하여 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개 아미노산의 C-말단 결실을 가질 수 있다. 이론에 얽매이지 않고, 잘린 힌지 서열은 IFN 모이어티에 향상된 입체적 제약을 부여할 수 있다고 믿어진다. 각 반쪽 항체에서 2개의 힌지 도메인을 포함하는 IFN 전구단백질(*예를 들어*, 도 1c, 2c 및 2f에 도시된 구성을 갖는 IFN 전구단백질)에서, 2개의 힌지 도메인은 모두 전장, 절단 또는 이들의 조합일 수 있다. 따라서 N-단자 힌지 도메인을 잘라내거나, C-말단 힌지 도메인을 잘라내거나, N-말단 및 C-말단 힌지 도메인을 모두 잘라낼 수 있다.

[0452] **6.8.3.1. 키메라 힌지 서열**

[0453] 힌지 도메인은 키메라 힌지 도메인일 수 있다.

[0454] 예를 들어, 키메라 힌지는 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 힌지 영역에서 유래된 "상부 힌지" 서열을, 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 힌지 영역에서 유래된 "하부 힌지" 서열과 조합하여 포함할 수 있다.

[0455] 특정 구현예에서, 키메라 힌지 영역은 아미노산 서열 EPKSCDKTHTCPPCPAPPVA(SEQ ID NO: 380)를 포함하거나(이전에는 WO2014/121087의 SEQ ID NO:8로 공개되었으며 본 문서 전체에 참조로 통합됨) 또는 ESKYGPPCPPCPAPPVA(SEQ ID NO: 377)(이전에는WO2014/121087의 SEQ ID NO:9로 공개됨)를 포함한다. 이러한 키메라 힌지 서열은 (예를 들어, 섹션 6.8.1에 설명된 바와 같이 이펙터 기능을 감소시키기 위해 CH2 및/또는 CH3 도메인에서 추가로 변형될 수 있는 인간 또는 쥐 Fc 도메인과 같은 IgG4 Fc 도메인에 통합함으로써) IgG4 CH2 영역에 적합하게 연결될 수 있다.

[0456] **6.8.3.2. 이펙터 기능이 감소된 힌지 서열**

[0457] 추가 구현예에서, 힌지 영역은, 예를 들어, WO2016161010A2에 기재된 바와 같이 이펙터 기능을 감소시키도록 변형될 수 있으며, 이는 본 명세서에 전문이 참조에 의해 원용된다. 다양한 구현예에서, 변형된 힌지 영역의 위치(233-236)는 G, G, G 및 비어 있는 위치; G, G, 비어 있는 위치 및 비어 있는 위치; G, 비어 있는 위치 및 비어 있는 위치; 또는 모두 비어 있는 위치로서, EU 번호로 번호가 지정되어 있다 (WO2016161010A2의 도 1에 도시된 바와 같이). 이들 절편은 GGG-, GG--, G--- 또는 ----로 표시될 수 있으며, 여기서 "-"는 비점유 위치를 표시한다.

[0458] 위치 236은 표준 인간 IgG2에서는 비점유이지만 다른 표준 인간 IgG 아이소타입에서는 점유되어 있다. 233-235번 위치는 네 가지 인간 동위체형 모두에서 G 이외의 잔기가 차지하고 있다 (WO2016161010A2의 도 1에 도시된 바와 같이).

[0459] 위치 233 내지 236 내의 힌지 변형은 P로 점유된 위치 228과 조합될 수 있다. 위치 228은 인간 IgG1 및 IgG2에서 P로 자연적으로 점유되지만 인간 IgG4에서는 S로 점유되고 인간 IgG3에서는 R로 점유된다. IgG4 항체의 S228P 돌연변이는 IgG4 항체를 안정화하고 외인성 및 내인성 항체 간의 중쇄 경쇄 쌍 형성의 교환을 감소시키는 데 유리하다. 바람직하게는 위치 226-229는 각각 C, P, P 및 C에 의해 점유된다.

[0460] 예시적인 힌지 영역은 때때로 중간(또는 코어) 및 하부 힌지로 지칭되는 잔기 226 내지 236을 가지며, 이들은 GGG-(233-236), GG--(233-236), G---(233-236) 및 G 없음(233-236)으로 지정된 변형된 힌지 서열로 점유된다. 선택적으로, 힌지 도메인 아미노산 서열은 CPPCPAPGGG-GPSVF(SEQ ID NO: 381)(이전에 WO2016161010A2의 SEQ ID NO:1로 공개됨), CPPCPAPGG--GPSVF(SEQ ID NO:382)(이전에 WO2016161010A2의 SEQ ID NO:2로 공개됨), CPPCPAPG---GPSVF(SEQ ID NO:383)(이전에 WO2016161010A2의 SEQ ID NO:3으로 공개됨) 또는 CPPCPAP----GPSVF(SEQ ID NO:384)(이전에 WO2016161010A2의 SEQ ID NO:4로 공개됨)를 포함한다.

[0461] 위에서 설명한 변형된 힌지 영역은 일반적으로 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 중쇄 불변 영역에 통합될 수 있으며, 지정된 영역에 측면에 추가 힌지 절편(*예*: 상부 힌지)를 가질 수 있다. 그러한 추가적인 불변 영역 절편은 전형적으로 동일한 아이소타입, 바람직하게는 인간 아이소타입을 갖지만, 상이한 아이소타입의 하이브리드일 수 있다. 이러한 추가 인간 불변 영역 절편의 동종형은 바람직하게는 인간 IgG4이지만, 또한 도메인이 상이한 아이소타입을 갖는 인간 IgG1, IgG2 또는 IgG3 또는 이의 하이브리드일 수 있다. 인간 IgG1, IgG2 및 IgG4의 예시적

인 서열이 WO2016161010A2의 도 2 내지 도 4에 나와 있다.

[0462] 특정 구현예에서, 변형된 힌지 서열은 (예를 들어, 섹션 6.8.1에 설명된 바와 같이 이펙터 기능을 감소시키기 위해 CH2 및/또는 CH3 도메인에서 추가로 변형될 수 있는 인간 또는 쥐 Fc 도메인과 같은 IgG4 Fc 도메인에 통합함으로써) IgG4 CH2 영역에 연결될 수 있다.

[0463] **6.9. 핵산 및 숙주 세포**

[0464] 다른 양태에서, 본 개시는 본 개시의 IFN 전구단백질을 인코딩하는 핵산을 제공한다. 일부 구현예에서, IFN 전구단백질은 단일 핵산으로 인코딩된다. 다른 구현예에서, IFN 전구단백질은 복수의(*예*: 2개, 3개, 4개 이상) 핵산에 의해 인코딩될 수 있다.

[0465] 단일 핵산은 단일 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 IFN 전구단백질, 2개 이상의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 IFN 전구단백질 또는 2개 이상의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 IFN 전구단백질의 일부를 인코딩할 수 있다(예: 단일 핵산은 3개, 4개 이상의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 IFN 전구단백질의 2개 폴리펩타이드 사슬 또는 4개 이상의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 IFN 전구단백질의 3개 폴리펩타이드 사슬을 인코딩할 수 있음). 발현을 별도로 제어하기 위해, 두 개 이상의 폴리펩타이드 사슬을 인코딩하는 오픈 리딩 프레임은 별도의 전사 조절 요소(*예*: 프로모터 및/또는 인헨서)의 제어를 받을 수 있다. 두 개 이상의 폴리펩타이드를 코딩하는 개방형 리딩 프레임은 동일한 전사 조절 요소에 의해 제어되고 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 서열에 의해 분리되어 별도의 폴리펩타이드로 번역될 수 있다.

[0466] 일부 구현예에서, 2개 이상의 폴리펩타이드 사슬을 포함하는 IFN 전구단백질은 2개 이상의 핵산에 의해 인코딩된다. IFN 전구단백질을 인코딩하는 핵산의 수는 IFN 전구단백질의 폴리펩타이드 사슬 수와 같거나 적을 수 있다(예: 단일 핵산으로 두 개 이상의 폴리펩타이드 사슬이 암호화되는 경우).

[0467] 본 개시의 핵산은 DNA 또는 RNA(*예*: mRNA)일 수 있다.

[0468] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 핵산을 포함하는 숙주 세포 및 벡터를 제공한다. 핵산은, 본 명세서의 하기에 더 상세히 기재된 바와 같이, 동일한 숙주 세포 또는 별도의 숙주 세포에 존재하는 단일 벡터 또는 별도의 벡터에 존재할 수 있다.

[0469] **6.9.1. 벡터**

[0470] 본 개시는 IFN 전구단백질 또는 본 명세서에 설명된 IFN 전구단백질의 성분을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터, 예를 들어 IFN 전구단백질의 반쪽 항체의 폴리펩타이드 사슬 중 하나 또는 두 개를 제공한다. 벡터는 바이러스, 플라스미드, 코스미드, 람다 파지 또는 효모 인공 염색체(YAC)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0471] 수많은 벡터 시스템이 이용될 수 있다. 예를 들어, 한 부류의 벡터는, 예를 들어, 소유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 벡시니아 바이러스, 바큘로바이러스, 레트로바이러스(라우스 육종 바이러스, MMTV 또는 MOMLV) 또는 SV40 바이러스와 같은 동물 바이러스에서 유래된 DNA 요소를 이용한다. 또 다른 부류의 벡터는 RNA 바이러스, 예컨대, 셈리키 포레스트(Semliki Forest) 바이러스, 동부 말 뇌염 바이러스 및 플라비바이러스에서 유래된 RNA 요소를 이용한다.

[0472] 추가적으로, DNA를 염색체에 안정적으로 통합한 세포는 형질감염된 숙주 세포의 선택을 가능하게 하는 하나 이상의 마커를 도입함으로써 선택될 수 있다. 예를 들어, 마커는 보조 영양 숙주에 대한 프로트로피, 살균제 내성(*예*: 항생제) 또는 구리 등의 중금속에 대한 내성 등을 제공할 수 있다. 선택 가능한 마커 유전자는 발현할 DNA 서열에 직접 연결하거나 공동 형질 전환을 통해 동일한 세포에 도입할 수 있다. 추가적인 요소는 또한 mRNA의 최적 합성을 위해 필요할 수 있다. 이러한 요소는 스플라이스 신호뿐만 아니라, 전사 프로모터, 인헨서 및 종결 신호를 포함할 수 있다.

[0473] 발현 벡터 또는 DNA 서열을 포함하는 구조체가 발현을 위해 제조되면, 발현 벡터는 적절한 숙주 세포 내로 형질감염 또는 도입될 수 있다. 예를 들어, 원형질체 융합, 인산칼슘 침전, 전기천공, 레트로바이러스 형질도입, 바이러스 형질감염, 유전자 총, 지질-기반 형질감염 또는 다른 통상적인 기법과 같은 다양한 기법이 이를 달성하기 위해 이용될 수 있다. 생성된 형질감염 세포를 배양하고 발현된 폴리펩타이드를 회수하는 방법 및 조건은 당업자에게 알려져 있으며, 본 설명에 기반하여 이용된 특정 발현 벡터 및 포유동물 숙주 세포에 따라 다양하거나 최적화될 수 있다.

[0474] 6.9.2. 세포

[0475] 본 개시는 또한 본 개시의 핵산을 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0476] 일 구현예에서, 숙주 세포는 본 명세서에 기재된 하나 이상의 핵산을 포함하도록 유전자 조작된다.

[0477] 일 구현예에서, 숙주 세포는 발현 카세트를 사용함으로써 유전자 조작된다. 어구 "발현 카세트"는 그러한 서열과 호환 가능한 숙주에서 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 그러한 카세트는 프로모터, 인트론이 있거나 없는 오픈 리딩 프레임, 및 종결 신호를 포함할 수 있다. 예를 들어, 유도성 프로모터와 같은 발현에 영향을 미치는 데 필요하거나 도움이 되는 추가적인 요인도 또한 사용될 수 있다.

[0478] 본 개시내용은 또한 본 명세서에 기재된 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0479] 세포는 진핵 세포, 박테리아 세포, 곤충 세포, 또는 인간 세포일 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 적합한 진핵 세포로는 Vero 세포, HeLa 세포, COS 세포, CHO 세포, HEK293 세포, BHK 세포 및 MDCKII 세포가 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 적합한 곤충 세포로는 Sf9 세포가 포함되지만 이에 제한되지 않는다.

[0480] 6.10. 약학 조성물

[0481] 본 개시의 IFN 전구단백질은 IFN 전구단백질과 하나 이상의 운반체, 부형제 및/또는 희석제를 포함하는 조성물의 형태일 수 있다. 조성물은 특정 용도, 예컨대, 수의학적 용도 또는 인간에서의 약제학적 용도용으로 제형화될 수 있다. 조성물의 형태(*예*: 건조 분말, 액체 제제 등) 및 사용되는 부형제, 희석제 및/또는 운반체는 IFN 전구단백질의 의도된 용도와 치료 용도의 경우 투여 방식에 따라 달라진다.

[0482] 치료학적 사용을 위해, 상기 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 멸균의 약학 조성물의 일부로서 공급될 수 있다. 이러한 조성물은 (환자에게 투여하는 원하는 방법에 따라) 임의의 적합한 형태일 수 있다. 약학 조성물은 경구, 경피, 피하, 비강내, 정맥내, 근육내, 종양내, 척추강내, 국소 또는 국재와 같은 다양한 경로에 의해 환자에게 투여될 수 있다. 주어진 경우에 가장 적합한 투여 경로는 특정 IFN 전구단백질, 대상체, 질병의 성격과 중증도, 대상체의 신체 상태에 따라 달라진다. 통상적으로, 약학 조성물은 정맥내로 또는 피하로 투여될 것이다.

[0483] 약학 조성물은 투여량당 개시된 IFN 전구단백질의 소정량을 포함하는 단위 투여량 형태로 편리하게 제공될 수 있다. 단위 용량에 포함된 IFN 전구단백질의 양은 당업자에게 잘 알려진 기타 요인뿐만 아니라 치료 중인 질병에 따라 달라진다. 이러한 단위 투여량은 1회 투여에 적합한 양의 IFN 전구단백질이 포함된 동결 건조 분말 형태이거나 액체 형태일 수 있다. 건조 분말 단위 투약 형태는 주사기, 적합한 양의 희석제 및/또는 투여에 유용한 다른 구성요소와 함께 키트로 포장될 수 있다. 액체 형태의 단위 투약은 단일 투여에 적합한 양의 IFN 전구단백질로 미리 채워진 주사기의 형태로 편리하게 공급될 수 있다.

[0484] 제약 조성물은 또한 여러 투여에 적합한 양의 IFN 전구단백질이 포함된 대량으로 공급될 수 있다.

[0485] 제약 조성물은 원하는 순도를 갖는 IFN 전구단백질을 선택적인 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 안정제(모두 본원에서 "담체"로 지칭), *즉* 완충제, 안정제, 방부제, 등온화제, 비이온성 세제, 항산화제 및 기타 첨가제와 혼합하여 동결 건조된 제형 또는 수용액으로 보관하기 위해 제조할 수 있다. 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 제16판 (Osol, 편집 1980)] 참조. 그러한 첨가제는 이용되는 투약량 및 농도에서 수용자에게 무독성이어야 한다.

[0486] 완충제는 생리학적 조건에 근접하는 범위의 pH를 유지하는 데 도움이 된다. 이는 매우 다양한 농도로 존재할 수 있지만, 전형적으로 약 2 mM 내지 약 50 mM 범위의 농도로 존재할 것이다. 본 개시와 함께 사용하기에 적합한 완충제에는 유기산과 무기산 및 그 염, 예를 들어 시트르산 완충액(*예*: 시트르산 일나트륨-시트르산 이나트륨 혼합물, 시트르산-시트르산 삼나트륨 혼합물, 시트르산-시트르산 일나트륨 혼합물 *등*), 석신산염 완충액(*예*: 석신산-석신산 일나트륨 혼합물, 석신산-수산화나트륨 혼합물, 석신산-석신산 이나트륨 혼합물 *등*), 타르트레이트 완충액(*예*: 타르타르산-타르타르산 나트륨 혼합물, 타르타르산-타르타르산 칼륨 혼합물, 타르타르산-수산화나트륨 혼합물 *등*), 푸마르산염 완충액(*예*: 푸마르산-푸마르산 일나트륨 혼합물, 푸마르산-푸마르산 이나트륨 혼합물, 푸마르산 일나트륨-푸마르산 이나트륨 혼합물 *등*), 글루콘산염 완충액(*예*: 글루콘산-글리코산 나트륨 혼합물, 글루콘산-수산화 나트륨 혼합물, 글루콘산-글리코산 칼륨 혼합물 *등*), 옥살산염 완충액(*예*: 옥살산-옥살산 나트륨 혼합물, 옥살산-수산화 나트륨 혼합물, 옥살산-옥살산 칼륨 혼합물 *등*), 락테이트 완충액(*예*: 락트산-락테이트 나트륨 혼합물, 락트산-수산화 나트륨 혼합물, 락트산-락테이트 칼륨 혼합물 *등*) 및 아세트산염 완충액(*예*: 아세트산-아세트산 나트륨 혼합물, 아세트산-수산화 나트륨 혼합물 *등*)이 포함된다. 추가적으로, 포스페이

트 완충액, 히스티딘 완충액 및 트라이메틸아민 염, 예컨대, 트리스(Tris)가 사용될 수 있다.

[0487] 미생물 성장을 지연시키기 위해 방부제를 첨가할 수 있으며 약 0.2 %-1 %(w/v) 범위의 양을 첨가할 수 있다. 본 개시와 함께 사용하기에 적합한 보존제는 페놀, 벤질 알코올, 메타 크레졸, 메틸 파라벤, 프로필 파라벤, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드, 벤잘코늄 할라이드(*예*: 염화물, 브로마이드 및 요오드화물), 헥사메토늄 염화물 및 메틸 또는 프로필 파라벤, 카테콜, 레소르시놀, 사이클로헥산올 및 3펜탄올과 같은 알킬 파라벤이 포함된다. 때때로 "안정화제"로 알려진 등장화제는 본 개시내용의 액체 조성물의 등장성을 보장하기 위해 첨가될 수 있으며, 다가 당 알코올, 예를 들어, 3가 이상의 당 알코올, 예컨대, 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 자일리톨, 솔비톨 및 만니톨을 포함한다. 안정화제는 증량제에서 치료제를 용해하거나 변성 또는 용기 벽에의 부착을 방지하는 데 도움이 되는 첨가제에 이르기까지 기능 범위가 다양할 수 있는 광범위한 부형제 카테고리를 지칭한다. 전형적인 안정화제는 다가 당 알코올(상기 열거됨); 아미노산, 예컨대, 아르기닌, 라이신, 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 알라닌, 오르니틴, L-류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등, 유기 당 또는 당 알코올, 예컨대, 이노시톨과 같은 사이클리톨을 포함하여, 락토스, 트레할로스, 스타키오스, 만니톨, 솔비톨, 자일리톨, 리비톨, 미오이노시톨, 갈락티톨, 글리세롤 등; 폴리에틸렌 글라이콜; 아미노산 중합체; 황 포함 환원제, 예컨대, 요소, 글루타티온, 티옥트산, 소듐 티오글리콜레이트, 티오글리세롤, a-모노티오글리세롤 및 소듐 티오설페이트; 저분자량 폴리펩타이드(*예를 들어*, 10개 이하 잔기의 펩타이드); 단백질, 예컨대, 인간 혈청 알부민, 소혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대, 폴리비닐피롤리돈 단당류, 예컨대, 자일로스, 만노스, 프럭토스, 글루코스; 이당류, 예컨대, 락토스, 말토스, 수크로스 및 트레할로스; 및 삼당류, 예컨대, 라피노스; 및 다당류, 예컨대, 덱스트란일 수 있다. 안정제는 IFN 전구단백질 중량당 0.5 ~ 10 중량% 범위의 양으로 존재할 수 있다.

[0488] 비이온성 계면활성제 또는 세제("습윤제"라고도 함)를 첨가하여 당단백질의 용해를 돕고 교반으로 인한 응집으로부터 당단백질을 보호하여 단백질의 변성 없이 제형이 전단 표면 응력에 노출될 수 있도록 할 수 있다. 적합한 비이온성 계면활성제로는 폴리소르베이트(20, 80 등), 폴리옥사머(184, 188 등) 및 플루론 폴리올이 있다. 비이온성 계면활성제는 약 0.05 mg/mL 내지 약 1.0 mg/mL, 예를 들어, 약 0.07 mg/mL 내지 약 0.2 mg/mL의 범위로 존재할 수 있다.

[0489] 기타 부형제에는 증점제(*예*: 전분), 킬레이트제(*예*: EDTA), 항산화제(*예*: 아스코르브산, 메티오닌, 비타민 E) 및 계면활성제가 포함된다.

[0490] 본 개시의 IFN 전구단백질은 예를 들어 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제 또는 운반체를 포함하는 IFN 전구단백질을 포함하는 약학 조성물로서 제형화될 수 있다. 본 개시의 IFN 전구단백질을 포함하는 제약 또는 멸균 조성물을 제조하기 위해, IFN 전구단백질 제제는 하나 이상의 약학적으로 허용되는 부형제 또는 담체와 결합될 수 있다.

[0491] 예를 들어, IFN 전구단백질의 제형은 동결 건조 분말, 슬러리, 수용액, 로션 또는 현탁액의 형태로 IFN 전구단백질과 생리적으로 허용되는 운반체, 부형제 또는 안정제를 혼합하여 제조할 수 있다(*예를 들어*, Hardman *외*, 2001, Goodman 및 Gilman, The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro, 2000, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, *외* (편집),1993, 의약품 제형: General Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *외* (편집), 1990, 의약품 제형: 정제, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *외* (편집), 1990, 의약품 제형: 분산 시스템, Marcel Dekker, NY; Weiner 및 Kotkoskie, 2000, 부형제 독성 및 안전성, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. 참조).

[0492] 특정 대상체에 대한 유효량은 치료되는 병태, 대상의 전반적인 건강, 방법 경로 및 투여 용량, 부작용의 중증도와 같은 요인에 따라 달라질 수 있다(*예를 들어*, Maynard *외* (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK 참조).

[0493] 본 개시내용의 조성물은 당해 기술분야에서 알려진 다양한 방법 중 하나 이상을 사용하여 하나 이상의 투여 경로를 통해 투여될 수 있다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 투여 경로 및/또는 방식은 원하는 결과에 따라 달라질 것이다. IFN 전구단백질의 투여 경로로는 정맥, 근육, 피내, 복강 내, 피하, 척추 또는 기타 일반적인 투여 경로(예: 주사 또는 주입)가 있다. 일반적인 투여는 보통 주사에 의한 장 및 국소 투여 이외의 투여 방식을 나타내고, 정맥내, 근육내, 동맥내, 척추강내, 피막내, 안와내, 심장내, 피내, 복강내, 기관내, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사 및 주입을 제한 없이 포함한다. 대안적으로, 본 개시

내용의 조성물은 국소, 표피 또는 점막 투여 경로, 예를 들어 비강내, 경구, 질내, 직장, 설하 또는 국소 투여와 같은 비일반적인 경로를 통해 투여될 수 있다. 일 구현예에서, IFN 전구단백질은 주입을 통해 투여된다. 다른 구현예에서, 본 개시의 IFN 전구단백질은 피하로 투여된다.

[0494] **6.10.1. IFN 전구단백질 인코딩 핵산 전달용 약학적 조성물**

[0495] 본 개시의 IFN 전구단백질(예컨대, IFN 수용체 작용제)은 유전자 치료에 유용한 임의의 방법, 예를 들어, 적절한 프로모터의 제어 하에 mRNA로서 또는 IFN 전구단백질(예컨대, IFN 수용체 작용제)을 인코딩하는 바이러스 벡터를 통해 전달될 수 있다.

[0496] 대표적인 바이러스 벡터로는 재조합 아데노바이러스와 아데노 관련 바이러스 벡터(rAAV)가 있다. rAAV 벡터는 결함이 있는 비병원성 파보 바이러스 아데노 관련 2형 바이러스를 기반으로 한다. 대부분의 이러한 벡터는 형질전환 유전자 발현 카세트 측면에 AAV 역단말 반복만을 보유한 플라스미드에서 유래된다. 효율적인 유전자 전달과 형질전환 세포의 게놈에 통합되어 안정적인 형질전환 유전자 전달이 이 벡터 시스템의 핵심 기능이다. IL27 형질전환 유전자 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV8.2, AAV9 및 AAV rh10과 같은 유사형 AAV와 AAV2/8, AAV2/5 및 AAV2/6을 전달하는 데 유용한 AAV 혈청형이다.

[0497] AAV는 여러 가지 공정을 통해 임상 규모로 제조될 수 있다. 사용할 수 있는 시스템의 예로는 (1) 포유류 세포의 플라스미드 DNA 감염, (2) 안정 포유류 세포주의 광고 감염, (3) 포유류 세포의 재조합 단순포진 바이러스(rHSV) 감염, (4) 곤충 세포(Sf9 세포)의 재조합 바큘로바이러스 감염(Penaud-Budloo 외, 2018, Mol Ther Methods Clin Dev. 8: 166-180에서 검토)이 있다.

[0498] 복제가 결여된 재조합 아데노바이러스 벡터(Ad)는 높은 역가로 생산될 수 있으며 다양한 세포 유형을 쉽게 감염시킬 수 있다. 대부분의 아데노바이러스 벡터는 형질전환 유전자가 Ad E1a, E1b 및/또는 E3 유전자를 대체하도록 설계되며, 이후 복제 결함이 있는 벡터가 인간 293 세포에서 전파되어 삭제된 유전자 기능을 형질전환으로 공급한다. Ad 벡터는 간, 신장, 근육에서 발견되는 분열하지 않는 분화 세포를 포함하여 생체 내 여러 유형의 조직을 전달할 수 있다. 기존 Ad 벡터는 수용 용량이 크다.

[0499] 패키징 세포는 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성하는 데 사용된다. 이러한 세포는 아데노바이러스를 패키징하는 293 세포 및 레트로바이러스를 패키징하는 w2 세포 또는 PA317 세포를 포함한다. 유전자 치료법에서 사용되는 바이러스 벡터는 보통 바이러스 입자 내로 핵산 벡터를 패키징하는 생산체 세포주에 의해 생성된다. 벡터는 전형적으로 패키징 및 숙주 내로의 후속 통합(적용 가능한 경우)을 위해 요구되는 최소 바이러스 서열을 포함하며, 다른 바이러스 서열은 발현될 단백질을 인코딩하는 발현 카세트에 의해 대체된다. 누락된 바이러스 기능은 패키징 세포주에 의해 트랜스로 공급된다. 예를 들어, 유전자 치료법에서 사용되는 AAV 벡터는 전형적으로 패키징 및 숙주 게놈 내로의 통합을 위해 요구되는 AAV 게놈으로부터의 역방위 말단 반복부(ITR) 서열만을 보유한다. 바이러스 DNA는 세포주에서 패키징되며, 이는 다른 AAV 유전자, 즉 rep 및 cap을 인코딩하지만, ITR 서열은 없는 헬퍼 플라스미드를 함유한다. 세포주는 또한 헬퍼로서 아데노바이러스로 감염된다. 헬퍼 바이러스는 헬퍼 플라스미드로부터 AAV 벡터의 복제 및 AAV 유전자의 발현을 촉진시킨다. 헬퍼 플라스미드는 ITR 서열의 부재로 인해 유의한 양으로 패키징되지 않는다. 아데노바이러스로의 오염은, 예를 들어 아데노바이러스가 AAV보다 더 민감한 열 처리에 의해 감소될 수 있다.

[0500] 핵산 분자(예: mRNA) 또는 바이러스는 제약 조성물에서 유일한 약리 활성 성분으로 제형화하거나 치료하는 특정 질환에 대한 다른 활성 제제와 결합할 수 있다. 임의적으로, 다른 의약제, 약제학적 제제, 담체, 보조제, 희석제가 본원에 제공된 조성물에 포함될 수 있다. 예를 들어, 습윤제, 유화제 및 활택제, 예컨대 황산 라우릴 나트륨 및 스테아르산마그네슘뿐만 아니라 착색제, 방출제, 코팅제, 감미료, 향료 및 향수 제제, 보존제, 황산화제, 킬레이트화제 및 불활성 가스 중 임의의 하나 이상은 또한 상기 조성물에 존재할 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 예시적인 다른 제제 및 부형제는 예를 들어, 수용성 산화방지제, 예컨대 아스코르브산, 시스테인 하이드로클로라이드, 나트륨 비술페이트, 나트륨 메타비술파이트, 나트륨 술파이트; 오일 용해성 산화방지제, 예컨대 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 하이드록시아니솔(BHA), 부틸화 하이드록시톨루엔(BHT), 레시틴, 프로필 갈레이트, α-토코페롤; 및 금속 킬레이트제, 예컨대 시트르산, 에틸렌디아민 테트라아세트산(EDTA), 소르비톨, 타르타르산 및 인산을 포함한다.

[0501] **6.11. 치료 적응증 및 사용방법**

[0502] 본 개시는 본 개시의 IFN 전구단백질의 사용 방법 및 응용 방법을 제공한다.

[0503] 본 개시의 IFN 전구단백질(예: IFN 수용체 작용제)은 다양한 응용 분야에서 면역 반응을 자극하는 데 사용될 수

있다.

[0504] 특정 양태에서, 본 개시는 암을 치료하는 방법을 제공하며, 이는 본 명세서에 기술된 바와 같이 IFN 전구단백질 또는 약학적 조성물을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, IFN 모이어티를 포함하는 활성화된 IFN 전구단백질은 암 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 의해 IFN 전구단백질에서 하나 이상의 프로테아제 절단성 링커를 절단함으로써 생성된다. 따라서 IFN 전구단백질은 암 조직에서 선택적으로 활성화된다.

[0505] 일부 구현예에서, 본 개시는 암 조직에서 선택적으로 활성화되는 IFN 전구단백질로 암을 치료하는 방법을 제공하는데, 이는 본 명세서에 기술된 바와 같이 IFN 전구단백질 또는 약학 조성물을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 IFN 전구단백질은 하나 이상의 프로테아제 절단성 링커를 가지며, 각각의 링커는 IFN 전구단백질이 표적으로 하는 암 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물이다. 따라서, IFN 모이어티를 포함하는 활성화된 IFN 전구단백질은 암 조직에서 하나 이상의 프로테아제에 의해 IFN 전구단백질의 하나 이상의 프로테아제 절단성 링커가 절단됨으로써 생성된다.

[0506] 본 개시는 또한 IFN 전구단백질의 국소적 전달 방법을 제공하는데, 본 개시에 기술된 바와 같이 IFN 전구단백질 또는 약학 조성물을 대상체에 투여하는 것을 포함하며, 여기서 IFN 전구단백질은 하나 이상의 프로테아제 절단성 링커를 가지며, 각각의 링커는 IFN 전구단백질이 국소적으로 전달되어야 하는 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대해 하나 이상의 기질을 포함하는 것을 특징으로 하는 IFN 전구단백질의 국소적 전달 방법을 제공한다. 본 명세서에서 사용되는 "국소 전달"이라는 용어는 국소 투여를 필요로 하는 것이 아니라 IFN 전구단백질의 활성 성분이 의도된 부위에서 활성화된 프로테아제에 의해 관심 부위에서 활성화되는 것을 의미하며, 선택적으로 조직에 의해 발현되는 표적 분자를 인식하는 표적 모이어티와 함께 관심 부위로 표적화되는 것을 의미한다.

[0507] 본 개시는 또한 전신 노출을 감소 및/또는 감소된 전신 독성을 갖는 IFN 치료를 대상체에게 시행하는 방법을 제공하며, 본 개시에 기술된 바와 같이 IFN 전구단백질 또는 약학적 조성물의 형태로 IFN 요법을 대상체에게 투여하는 것을 포함하며, 여기서 IFN 전구단백질은 하나 이상의 프로테아제 절단성 링커를 가지고, 각각의 링커는 IFN 치료가 바람직하거나 의도되는 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함하는 것을 포함한다.

[0508] 따라서, 전술한 방법은 IFN 치료를 목적으로 하는 위치에서 IFN 전구단백질을 우선적으로 활성화함으로써 표적 외 부작용을 줄인 IFN 치료를 가능하게 한다.

[0509] 전술한 방법의 일부 구현예에서, IFN 전구단백질은 또한 표적화되고, 치료를 위한 위치(*예*: 조직)에서 발현되는 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적화 모이어티를 포함한다.

[0510] 따라서 본 개시내용은 치료를 위한 부위, *예를 들어*, 암 조직에 활성화된 IFN 단백질을 표적화 전달하는 방법을 제공하며, 이는 대상체에게 본원에서 설명한 바와 같은 IFN 전구단백질 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 IFN은 치료를 위해 의도된 부위 또는 조직(*예*: 암 조직)에 의해 발현되는 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적화 모이어티를 포함하고, 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖고, 각각은 IFN 요법이 바람직하고/하거나 의도된 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함한다.

[0511] 본 개시내용은 표적 조직에서 면역 반응을 국소적으로 유도하는 방법을 추가로 제공하며, 이는 대상체에게 표적 조직에서 발현되는 표적 분자를 결합할 수 있는 하나 이상의 표적화 모이어티와 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 본원에서 설명된 바와 같은 IFN 전구단백질 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 각각은 표적 조직에서 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함한다. 이후, IFN 모이어티를 포함하는 활성화된 IFN 전구단백질은 표적 조직에서 하나 이상의 프로테아제에 의한 IFN 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커의 절단에 의해 생성된다. 그 결과로 활성화된 IFN 단백질은 표적 조직에서 적어도 하나의 세포 유형에 대한 면역 반응을 유도할 수 있다.

[0512] 일부 구현예에서, 투여는 조직에 국소가 아니다. 예를 들어, 표적 조직이 암 조직인 경우, 투여는 전신 또는 피하 투여일 수 있다.

[0513] 본 개시의 IFN 전구단백질은 표적 분자(종양 세포 또는 종양 미세환경, *예를 들어*, 세포외 기질 또는 종양 림프구)를 발현하는 임의의 증식성 장애(*예*: 암)의 치료에 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 암은 급성 림프모구성 백혈병(ALL), 급성 골수성 백혈병(AML), 부신피질 암종, 항문암, 충수암, 성상세포종, 기저 세포 암종, 뇌

종양, 담관암, 방광암, 골암, 유방암, 기관지 종양, 버킷 림프종, 원인 불명의 원발성 암종, 심장 종양, 자궁경부암, 척색종, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 만성 골수성 백혈병(CML), 만성 골수증식성 신생물, 결장암, 결장직장암, 두개인두종, 피부 T 세포 림프종, 관 암종, 배아 종양, 자궁내막암, 상의세포종, 식도암, 유착신경모세포종, 섬유성 조직구종, 유잉육종, 안구암, 생식 세포 종양, 담낭암, 위암, 위장관 유암종 종양, 위장관 기질 종양, 임신성 융모성 질환, 신경교종, 두경부암, 모발 세포 백혈병, 간세포암, 조직구증가증, 호지킨 림프종, 하인두암, 안구내 흑색종, 섬세포종양, 카포시육종, 신장암, 랑게르한스세포 조직구증가증, 후두암, 백혈병, 구순암 및 구강암, 간암, 상피내 소엽 암종, 폐암, 림프종, 거대글로불린혈증, 악성 섬유성 조직구종, 흑색종, 메르켈 세포 암종, 중피종, NUT 유전자 관련 잠복 원발성 정중선암종을 동반한 전이성 편평경부암, 구강암, 다발성 내분비샘 신생물 증후군 다발성 골수종, 균상 식육종, 골수이형성 증후군, 골수이형성/골수증식성 신생물, 비강 및 부비동암, 비인두암, 신경모세포종, 비호지킨 림프종, 비소세포폐암, 구인두암, 골육종, 난소암, 췌장암, 유두종증, 부신경절종, 부갑상선암, 음경암, 인두암, 크롬친화세포종, 뇌하수체 종양, 흉막폐 모세포종, 원발성 중추신경계 림프종, 전립선암, 직장암, 신세포암, 신우 및 요관암, 망막모세포종, 횡문근 종양, 침샘암, 세자리 증후군, 피부암, 소 세포 폐암, 소장암, 연조직 육종, 척수 종양, 위암, T-세포 림프종, 기형 종양, 고환암, 인후암, 흉선종 및 흉선 암종, 갑상선암, 요도암, 자궁암, 질암, 외음부암 또는 윌름스 종양이다.

[0514] 아래 표 112는 특정 표적 분자를 표적으로 하는 IFN 전구단백질이 사용될 수 있는 예시적인 적응증을 나타낸다.

표 112

[0515]

표 112
표적 분자 적응증의 예

표적	예시적인 적응증
ADRB3	유잉 육종
ALK	NSCLC, ALCL, IMT, 신경모세포종
B7H3	흑색종, 골육종, 백혈병, 유방암, 전립선암, 난소암, 췌장암, 결장직장암
BCMA	다발성 골수종, 백혈병(*예를 들어*, 급성 림프모구성 백혈병("ALL"), 급성 골수성 백혈병("AML"), 만성 림프구성 백혈병("CLL"), 만성 골수성 백혈병("CML") 및 모양 세포성 백혈병("HCL")); 림프종(*예를 들어*, 미만성 거대 B-세포 림프종("DLBCL")을 포함하여, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종)
카드헤린 17	위암, 췌장암, 및 결장직장 선암
CAIX	투명 세포 신세포 암종, 저산소성 고형 종양, 두경부 편평 암종
CD123	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL); 다발성 골수종. 바람직한 구현예에서, 적응증은 AML이다.
CD171	신경모세포종, 부신경절종
CD179a	B 세포 악성 종양
CD19	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL); 다발성 골수종.
CD20	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL); 다발성 골수종.
CD22	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL); 다발성 골수종; 폐암
CD24	난소암, 유방암, 전립선암, 방광암, 신장암, 비소세포 암종
CD30	역형성 거대 세포 림프종, 배아 암종, 호지킨 림프종
CD32b	B 세포 악성 종양, 위암, 췌장암, 식도암, 교모세포종, 유방암, 결장직장암
CD33	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL); 다발성 골수종. 바람직한 구현예에서, 적응증은 AML이다.
CD38	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL); 다발성 골수종
CD44v6	결장암, 두경부 소세포 암종
CD97	B 세포 악성 종양, 위암, 췌장암, 식도암, 교모세포종, 유방암, 결장직장암
CEA (CEACAM5)	결장직장 암종, 위 암종, 췌장 암종, 폐암, 유방암, 갑상선 수질 암종
CLDN6	난소암, 유방암, 폐암
CLL-1	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL); 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL); 다발성 골수종. 바람직한 구현예에서, 적응증은 AML이다.
CS1 (SLAMF7)	다발성 골수종
EGFR	폐의 편평 세포 암종, 항문암, 교모세포종, 두경부의 상피 종양, 결장암

EGFRvIII	교모세포종
EPCAM	위장관 암종, 결장직장암
EphA2	카포시 육종, 교모세포종, 고형 종양, 신경교종
에프린 B2	갑상선암, 유방암, 악성 흑색종
ERBB2 (Her2/neu)	유방암, 난소암, 위암, 폐 선암, 비소세포 폐암, 자궁암, 자궁 장액성 내막 암종, 침샘관 암종
FAP	췌장암, 결장직장암, 전이, 상피암, 연부조직 육종
FCRL5	다발성 골수종
FLT3	백혈병(*예를 들어*, ALL, CLL, AML, CML, HCL), 림프종(*예를 들어*, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, *예를 들어*, DLBCL), 다발성 골수종
엽산 수용체 알파	난소암, 유방암, 신장암, 폐암, 결장직장암, 뇌암
엽산 수용체 베타	난소암
푸코실 GM1	AML, 골수종
GD2	악성 흑색종, 신경모세포종
GD3	흑색종
GloboH	난소암, 위암, 전립선암, 폐암, 유방암, 및 췌장암
gp100	흑색종
GPNMB	유방암, 두경부암
GPR20	GIST
GPR64	유잉 육종, 전립선 육종, 신장 육종 및 폐 육종
GPRC5D	다발성 골수종
HAVCR1	신장암
HER2	위식도 접합부의 HER-2 (+) 선암, HER-2 양성 위 선암, 유방의 HER2 양성 암종
HER3	결장암 및 위암
HMWMAA	흑색종, 교모세포종, 유방암
IGF-I 수용체	유방암, 전립선암, 폐암
IL11Rα	유두상 갑상선암, 골육종, 결장직장 선암, 림프구성 백혈병
IL13Rα2	신세포 암종, 전립선암, 신경교종, 두경부암, 성상세포종
KIT	골수성 백혈병, 카포시 육종, 적백혈병, 위장관 기질 종양
KLRG2	유방암, 폐암 및 난소암.
LewisY	편평세포 폐 암종, 폐 선암, 난소 암종, 및 결장직장 선암
LMP2	전립선암, 호지킨 림프종, 비인두 암종
LRP6	유방암
LY6K	유방암, 폐암, 난소암, 및 자궁경부암
LYPD8	결장직장암 및 위암
메소텔린	중피종, 췌장암, 난소암, 위암, 폐암, 자궁내막암
MUC1	유방암 및 난소암, 폐암, 위암, 췌장암, 전립선암
NCAM	흑색종, 윌름스 종양, 소세포 폐암, 신경모세포종, 골수종, 부신경절종, 췌장 선방세포암종, 골수성 백혈병
NY-BR-1	유방암
o-아세틸 GD2	신경모세포종, 흑색종
OR51E2	전립선암
PANX3	골육종
PLAC1	간세포 암종
폴리시알산	소세포 폐암
PDGFR-베타	골수단핵구 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병
PRSS21	결장암, 고환암, 난소암
PSCA	전립선암, 위암 및 방광암
PSMA	전립선암
ROR1	전이성 암, 만성 림프구성 백혈병, 폐, 유방, 난소, 결장, 췌장, 육종의 고형 종양
SLC34A2	방광암
SLC39A6	유방암, 식도암
SLITRK6	유방암, 요로상피암, 폐암
SSEA-4	유방암, 암 줄기 세포, 상피 난소암
STEAP1	전립선암
STEAP2	전립선암(거세-저항성 전립선암을 포함함), 방광암, 자궁경부암, 폐암, 결장암, 신장암, 유방암, 췌장암, 위암, 자궁암, 난소암, 바람직하게는 전립선암
TACSTD2	암종(*예*: 비소세포 폐암)
TAG72	난소암, 유방암, 결장암, 폐암, 췌장암, 위암

TEM1/CD248	결장직장암
TEM7R	결장직장암
Tn	결장직장암, 유방암, 자궁경부암, 폐암, 위암
TSHR	갑상선암, 다발성 골수종
타이로시나제	전립선암, 흑색종
UPK2	방광암
VEGFR2	난소암 및 췌장암, 신세포 암종, 결장직장암, 갑상선 수질 암종

[0516] 추가 표적 분자 및 해당 적응증은 *예를 들어*, 문헌[Hafeez *외*, 2020, Molecules 25:4764, doi:10.3390/molecules25204764], 특히 표 1에서 개시되어 있다. 표 1은 본원에 전문이 인용방식에 의해 원용된다.

[0517] 추가 구현예에서, IFN 전구단백질(예: IFN 수용체 작용제)은 다른 약제에 의해 유도된 면역 반응을 향상하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 개시의 IFN 전구단백질(예: IFN 수용체 작용제)은 면역원성 제제와 함께 보조 요법으로서 투여된다. 일부 구현예에서, 면역원성 제제는 보조 백신 또는 비보조 백신이다. 따라서 IFN 전구단백질(예: IFN 수용체 작용제)은 백신에 의해 유도된 항원 특이적 면역 반응을 강화할 수 있다. 다양한 구현예에서, 백신은 예방 또는 치료용 암 백신 또는 감염원(*예*: 바이러스, 박테리아 또는 기생충)에 대한 예방 또는 치료용 백신이다.

[0518] **7. 번호가 지정된 구현예**

[0519] 다양한 구체적 구현예가 예시되고 설명되었지만, 본 개시의 정신과 범위를 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 본 개시는 아래에 명시된 번호가 지정된 구현예에 의해 예시된다.

[0520] 이어지는 번호가 매겨진 구현예에서, 표적 모이어티는 바람직하게는 포유류 표적 분자에 결합하고, IFN 모이어티는 바람직하게는 포유류 IFN으로부터 유래되고, Fc 도메인은 바람직하게는 포유류 항체로부터 유래되며, 대상은 바람직하게는 포유류인 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게, 포유동물은 인간이다.

[0521] 1. I형 인터페론(IFN) 단백질로서

[0522] (a) 제1 폴리펩타이드 사슬에 있어서:

[0523] (i) 제1 면역글로불린 불변 도메인;

[0524] (ii) 제1 링커;

[0525] (iii) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0526] (iv) 제2 링커; 및

[0527] (v) 제1 Fc 도메인;

[0528] (b) 제2 폴리펩타이드 사슬에 있어서:

[0529] (i) 제2 면역글로불린 불변 도메인;

[0530] (ii) 제3 링커;

[0531] (iii) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0532] (iv) 제4 링커; 및

[0533] (v) 제1 Fc 도메인과 결합하여 Fc 영역을 형성할 수 있는 제2 Fc 도메인을 포함하고,

[0534] 제1 링커, 제2 링커, 제3 링커 및 제4 링커 중 적어도 2개는 프로테아제 절단성 링커(PCL)이며, 선택적으로 IFN 전구단백질의 IFN 모이어티는 Fc 도메인에 의해 IFN 수용체에 결합하는 것을 입체적으로 방해받는, IFN 전구단백질.

[0535] 2. 구현예 1에서, 제1 및 제2 IFN 모이어티는 각각 (a) 전장 성숙 인간 IFNα1, IFNα2b, IFNβ, IFNω, IFNε 또는 IFNκ 또는 (b) N-말단 및/또는 C-말단에서 최대 15- 아미노산 절단이 있는 성숙 인간 IFNα1, IFNα2b, IFNβ, IFNω, IFNε 또는 IFNκ와 적어도 약 90 % 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, IFN 전구단백질.

[0536] 3. 구현예 1에서, 제1 및 제2 IFN 모이어티는 각각 (a) 전장 성숙 인간 IFNα1, IFNα2b, IFNβ, IFNω, IFNε 또는 IFNκ 또는 (b) N-말단 및/또는 C-말단에서 최대 15- 아미노산 절단을 갖는 성숙 인간 IFNα1, IFNα2b, IFNβ, IFNω, IFNε 또는 IFNκ와 약 95 % 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0537] 4. 구현예 1에서, 제1 및 제2 IFN 모이어티는 각각 (a) 전장 성숙 인간 IFNα1, IFNα2b, IFNβ, IFNω, IFNε 또는 IFNκ 또는 (b) N-말단 및/또는 C-말단에서 최대 15- 아미노산 절단을 갖는 성숙 인간 IFNα1, IFNα2b, IFNβ, IFNω, IFNε 또는 IFNκ와 약 98 % 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0538] 5. 구현예 1 내지 구현예 4 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 및 제2 IFN 모이어티는 각각 성숙 인간 IFNα1 또는 IFNα2b에 비해 하나 이상의 감쇄 돌연변이를 갖는 아미노산 서열을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0539] 6. 구현예 1 내지 구현예 5 중 어느 한 구현예에 있어서, L26A, F27A, R33A, R33K, L30A, D35E, H57Y, E58N, Q61S, H57S, E58S, H57A, E58A, Q61A, Q90A, E96A, R120A, L135A, R144A, R144S, R144T, R144Y, R144I, R144L, A145D, A145H, A145K, A145M, A145V, A145Y, R149A, R149K, S152A, R162A 및 E165D 중에서 선택된 하나 이상의 돌연변이를 갖는, IFN 전구단백질.

[0540] 7. 구현예 1 내지 구현예 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 치환체 R33A를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0541] 8. 구현예 1 내지 구현예 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 치환체 R33K를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0542] 9. 구현예 1 내지 구현예 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 치환체 Q90A를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0543] 10. 구현예 1 내지 구현예 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 치환체 E96A를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0544] 11. 구현예 1 내지 구현예 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 치환체 R120A를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0545] 12. 구현예 1 내지 구현예 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 치환체 A145M를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0546] 13. 구현예 1 내지 구현예 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 치환체 R149A를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0547] 14. 구현예 1 내지 구현예 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 치환체 R149K를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0548] 15. 구현예 1 내지 구현예 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 치환체 S152A를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0549] 16. 구현예 1 내지 구현예 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 치환체 R33A, H57Y, E58N 및 Q61S를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0550] 17. 구현예 1 내지 구현예 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 치환체 H57Y, E58N, Q61S 및 R144A를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0551] 18. 구현예 1 내지 구현예 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 치환체 Q90A 및 R120A를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0552] 19. 구현예 1 내지 구현예 6 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 치환체 A145M 및 R149K를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0553] 20. 구현예 1 내지 구현예 19 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 링커, 제2 링커, 제3 링커 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)인, IFN 전구단백질.

[0554] 21. 구현예 1 내지 구현예 19 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 링커 및 제3 링커는 프로테아제 절단성 링

커(PCL)이고, 선택적으로 상기 제2 링커 및 제4 링커는 비절단성 링커(NCL)인, IFN 전구단백질.

[0555] 22. 구현예 1 내지 구현예 19 중 어느 한 구현예에 있어서, 제2 링커 및 제4 링커가 프로테아제 절단성 링커(PCL)이고, 선택적으로 제1 링커 및 제3 링커는 비절단성 링커(NCL)인, IFN 전구단백질.

[0556] 23. 구현예 1 내지 구현예 22 중 어느 한 구현예에 있어서, PCL은 각각 표 101에 명시된 임의의 프로테아제에 의해 절단 가능한 기질 서열을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0557] 24. 구현예 1 내지 구현예 23 중 어느 한 구현예에 있어서, PCL은 표 102에 명시된 기질 서열 중에서 선택된 하나 이상의 기질 서열을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0558] 25. 구현예 1 내지 구현예 24 중 어느 한 구현예에 있어서, PCL은 각각 표 103에 명시된 기질 서열 중에서 선택된 하나 이상의 스페이서 서열을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0559] 26. 구현예 1 내지 구현예 25 중 어느 한 구현예에 있어서, PCL은 각각 표 104에 명시된 PCL 서열 중 임의의 아미노산 서열 또는 최대 5개의 아미노산 치환을 갖는 변이체(*예*: 1개 아미노산 치환, 2개 아미노산 치환, 3개 아미노산 치환, 4개 아미노산 치환 또는 5개 아미노산 치환을 갖는 변이체)를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0560] 27. 구현예 1 내지 구현예 26 중 어느 한 구현예에 있어서, 2개 또는 4개의 PCL을 포함하거나 아미노산 서열 ISSGLLSGRSDNH로 구성되는, IFN 전구단백질.

[0561] 28. 구현예 1 내지 구현예 26 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 서열 GGGISSGLLSGRSDNHGGGISSGLLSGRSDNHGGS를 포함하거나 이로 구성되는 2개 또는 4개의 PCL을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0562] 29. 구현예 1 내지 구현예 26 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 서열 GGSGGSIPVSLRSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS를 포함하거나 이로 구성되는 2개 또는 4개의 PCL을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0563] 30. 구현예 1 내지 구현예 26 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 서열 GGSGGSVPLSLYSGGGISSGLLSGRSDNHGGSGGS를 포함하거나 이로 구성되는 2개 또는 4개의 PCL을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0564] 31. 구현예 1 내지 구현예 26 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 서열 GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGGHPVGLLARGS를 포함하거나 이로 구성되는 2개 또는 4개의 PCL을 포함하는, IFN 전구단백질

[0565] 32. 구현예 1 내지 구현예 26 중 어느 한 구현예에 있어서, 아미노산 서열 GGSHPVGLLARGGGHPVGLLARGGSGRSAGGSGRSA를 포함하거나 이로 구성되는 2개 또는 4개의 PCL을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0566] 33. 구현예 1 내지 구현예 32 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 및 제3 링커가 동일하고/하거나 상기 제3 및 제4 링커가 동일한, IFN 전구단백질.

[0567] 34. 구현예 33에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커가 동일한, IFN 전구단백질.

[0568] 35. 구현예 1 내지 구현예 33 중 어느 한 구현예에 있어서, (i) 제1 및 제3 링커가 비절단성 링커이거나 (ii) 제2 및 제4 링커가 비절단성 링커인, IFN 전구단백질.

[0569] 36. 구현예 35에 있어서, 비절단성 링커가 표 105에 명시된 임의의 NCL 서열을 포함하거나 이로 구성되는, IFN 전구단백질.

[0570] 37. 구현예 1 내지 구현예 33 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 Fc 도메인 및/또는 제2 Fc 도메인이 힌지 도메인을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0571] 38. 구현예 1 내지 구현예 37 중 어느 한 구현예에 있어서, 하나 이상의 표적 분자에 결합하는 하나 이상의 표적화 모이어티를 더 포함하는, IFN 전구단백질.

[0572] 39. 구현예 38에 있어서, 제1 표적 모이어티와 제2 표적 모이어티를 포함하는, IFN 전구단백질

[0573] 40. 구현예 39에 있어서, 제1 표적 모이어티 및 제2 표적 모이어티는 항체 또는 이들의 항원 결합 단편인, IFN 전구단백질.

[0574] 41. 구현예 40에 있어서, 제1 표적 모이어티 및 제2 표적 모이어티는 Fab인, IFN 전구단백질.

[0575] 42. 구현예 40 또는 구현예 41에 있어서, 제1 표적 모이어티 및 제2 표적 모이어티는 Fab 도메인을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0576] 43. 구현예 42에 있어서, 제1 표적 모이어티 및 제2 표적 모이어티는 힌지 서열을 더 포함하는, IFN 전구단백질.

[0577] 44. 구현예 43에 있어서, 제1 표적 모이어티 및 제2 표적 모이어티는 각각 CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 Fc 도메인을 더 포함하는, IFN 전구단백질.

[0578] 45. 구현예 44에 있어서, 제1 표적 모이어티의 Fc 도메인과 제2 표적 모이어티의 Fc 도메인은 서로 연관되어 있는, IFN 전구단백질.

[0579] 46. 구현예 39 내지 45 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 및 제2 표적 모이어티는 각각 제1 및 제3 링커에 대한 N-말단인, IFN 전구단백질.

[0580] 47. 구현예 38 내지 구현예 46 중 어느 한 구현예에 있어서, 제 1 면역 글로불린 불변 도메인이 제 1 표적 모이어티의 일부이고 제 2 면역 글로불린 불변 도메인이 제 2 표적 모이어티의 일부인, IFN 전구단백질.

[0581] 48. 구현예 40에 있어서, 제1 면역 글로불린 불변 도메인은 CH3 도메인인, IFN 전구단백질.

[0582] 49. 구현예 40에 있어서, 제1 면역 글로불린 불변 도메인은 CH1 도메인인, IFN 전구단백질.

[0583] 50. 구현예 1 내지 49 중 어느 한 구현예에 있어서, 도 1a, 도 2a 또는 도 2d에 도시된 바와 같이 구성된, IFN 전구단백질.

[0584] 51. 구현예 50에 있어서, 제 1 폴리펩타이드 사슬, 제 2 폴리펩타이드 사슬, 제 3 폴리펩타이드 사슬 및 제 4 폴리펩타이드 사슬을 포함하는, IFN 전구단백질:

[0585] (a) 제1 폴리펩타이드 사슬은:

[0586] (i) 제1 VH1 도메인;

[0587] (ii) 제1 CH1 도메인;

[0588] (iii) 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제3 Fc 도메인(CH3 도메인은 제2 면역글로불린 불변 도메인);

[0589] (iv) 제1 링커;

[0590] (v) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0591] (vi) 제2 링커; 및

[0592] (vii) 제1 Fc 도메인;

[0593] (b) 제2 폴리펩타이드 사슬은:

[0594] (i) 제2 VH1 도메인;

[0595] (ii) 제2 CH1 도메인;

[0596] (iii) 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제4 Fc 도메인(CH3 도메인은 제2 면역글로불린 불변 도메인);

[0597] (iv) 제3 링커;

[0598] (v) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0599] (vi) 제4 링커; 및

[0600] (vii) 제3 Fc 도메인을 포함하고,

[0601] (c) 제3 폴리펩타이드 사슬은:

[0602] (i) 제1 VL 도메인;

[0603] (ii) 제1 CL 도메인을 포함하고,

[0604] (d) 제4 폴리펩타이드 사슬은;

[0605] (i) 제2 VL 도메인; 및

[0606] (ii) 제2 CL 도메인을 포함하고,

[0607] 제1 폴리펩타이드 사슬은 제3 폴리펩타이드 사슬과 연관되어 상기 제1 VH, CH1, VL 및 CL이 제1 표적 모이어티를 형성하고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 제4 폴리펩타이드 사슬과 연관되어 제2 VH, CH1, VL 및 CL이 제2 표적 모이어티를 형성하는, IFN 전구단백질.

[0608] 52. 구현예 51에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)인, IFN 전구단백질.

[0609] 53. 구현예 51에 있어서, 제1 및 제3 링커는 비절단성 링커(NCL)이고, 제2 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)인, IFN 전구단백질.

[0610] 54. 구현예 51에 있어서, 제1 및 제3 링커가 프로테아제 절단성 링커(PCL)이고 제2 및 제4 링커는 비절단성 링커(NCL)인, IFN 전구단백질.

[0611] 55. 구현예 1 내지 49 중 어느 한 구현예에 있어서, 도 1b, 도 2b 또는 도 2e에 도시된 바와 같이 구성된, IFN 전구단백질.

[0612] 56. 구현예 55에 있어서,

[0613] (a) 제1 폴리펩타이드 사슬은:

[0614] (i) 제1 VH1 도메인;

[0615] (ii) 제1 CH1 도메인;

[0616] (iii) 제1 링커;

[0617] (iv) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0618] (v) 제2 링커; 및

[0619] (vi) 제1 Fc 도메인;

[0620] (b) 제2 폴리펩타이드 사슬은:

[0621] (i) 제2 VH1 도메인;

[0622] (ii) 제2 CH1 도메인;

[0623] (iii) 제3 링커;

[0624] (iv) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0625] (v) 제4 링커; 및

[0626] (vi) 제2 Fc 도메인;

[0627] (c) 제3 폴리펩타이드 사슬은:

[0628] (i) 제1 VL 도메인; 및

[0629] (ii) 제2 CL 도메인을 포함하고, 및

[0630] (d) 제4 폴리펩타이드 사슬은:

[0631] (i) 제2 VL 도메인;

[0632] (ii) 제2 CL 도메인을 포함하고,

[0633] 제1 폴리펩타이드 사슬은 제3 폴리펩타이드 사슬과 연관되어 상기 제1 VH, CH1, VL 및 CL이 제1 표적 모이어티를 형성하고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 제4 폴리펩타이드 사슬과 연관되어 제2 VH, CH1, VL 및 CL이 제2 표적 모이어티를 형성하는, IFN 전구단백질.

[0634] 57. 구현예 56에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)인, IFN 전구단백질.

[0635] 58. 구현예 56에 있어서, 제1 및 제3 링커는 비절단성 링커(NCL)이고, 제2 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)인, IFN 전구단백질.

[0636] 59. 구현예 56에 있어서, 제1 및 제3 링커가 프로테아제 절단성 링커(PCL)이고 제2 및 제4 링커는 비절단성 링커(NCL)인, IFN 전구단백질.

[0637] 60. 구현예 1 내지 49 중 어느 한 구현예에 있어서, 도 1c, 도 2c 또는 도 2f에 도시된 바와 같이 구성된, IFN 전구단백질.

[0638] 61. 구현예 60에 있어서, 제1 폴리펩타이드 사슬, 제2 폴리펩타이드 사슬, 제 3 폴리펩타이드 사슬 및 제4 폴리펩타이드 사슬을 포함하는, IFN 전구단백질:

[0639] (a) 제1 폴리펩타이드 사슬은:

[0640] (i) 제1 VH1 도메인;

[0641] (ii) 제1 CH1 도메인;

[0642] (iii) 제1 힌지 도메인;

[0643] (iv) 제1 링커;

[0644] (v) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0645] (vi) 제2 링커; 및

[0646] (vii) 제1 Fc 도메인;

[0647] (b) 제2 폴리펩타이드 사슬은:

[0648] (i) 제2 VH1 도메인;

[0649] (ii) 제2 CH1 도메인;

[0650] (iii) 제2 힌지 도메인;

[0651] (iv) 제3 링커;

[0652] (v) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0653] (vi) 제4 링커; 및

[0654] (vii) 제2 Fc 도메인;

[0655] (c) 제3 폴리펩타이드 사슬은:

[0656] (i) 제1 VL 도메인;

[0657] (ii) 제1 CL 도메인을 포함하고, 및

[0658] (d) 제4 폴리펩타이드 사슬은:

[0659] (i) 제2 VL 도메인; 및

[0660] (ii) 제2 CL 도메인을 포함하고,

[0661] 제1 폴리펩타이드 사슬은 제3 폴리펩타이드 사슬과 연관되어 상기 제1 VH, CH1, VL 및 CL이 제1 표적 모이어티를 형성하고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 제4 폴리펩타이드 사슬과 연관되어 제2 VH, CH1, VL 및 CL이 제2 표적 모이어티를 형성하는, IFN 전구단백질.

[0662] 62. 구현예 61에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)인, IFN 전구단백질.

[0663] 63. 구현예 61에 있어서, 제1 및 제3 링커는 비절단성 링커(NCL)이고, 제2 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)인, IFN 전구단백질.

[0664] 64. 구현예 61에 있어서, 제1 및 제3 링커가 프로테아제 절단성 링커(PCL)이고 제2 및 제4 링커는 비절단성

링커(NCL)인, IFN 전구단백질.

[0665] 65. 구현예 38 내지 구현예 61 중 어느 한 구현예에 있어서, 상기 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 세포외 기질(ECM) 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자, T세포 항원(TCA), 체크포인트 억제제, 종양 관련 항원(TAA), 수지상 세포(DC) 또는 기타 항원 제시 세포(APC) 항원 또는 자연 살해(NK) 세포 항원과 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

[0666] 66. 구현예 38 내지 구현예 65 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 섹션 6.7에서 확인된 표적 분자에 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

[0667] 67. 구현예 38 내지 구현예 66 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 (a)표 106에 제시된 항체의 (i) CDR 또는(ii) VH 및 VL서열을 포함하거나 (b) 표 106에 명시된 항체와 표적 분자에 결합하기 위해 경쟁하는, IFN 전구단백질.

[0668] 68. 구현예 38 내지 구현예 66 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 신데칸, 헤파라나제, 인테그린, 오스테오폰틴, 링크, 카데린, 라미닌, 라미닌 타입 EGF, 렉틴, 피브로넥틴, 노치, 넥틴(*예*: 넥틴-4), 테나신, 콜라겐(*예*: 콜라겐 타입 X) 및 매트릭신 중에서 선택적으로 선택되는 ECM 항원과 결합하는, IFN 전구단백질.

[0669] 69. 구현예 68에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 넥틴(*예*: 넥틴 4)에 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

[0670] 70. 구현예 68에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 콜라겐(*예*: 콜라겐 X)에 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

[0671] 71. 구현예 38 내지 구현예 66 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티가 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자에 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

[0672] 72. 구현예 71에 있어서, 항원은 T세포 공동 자극 단백질인, IFN 전구단백질.

[0673] 73. 구현예 72에 있어서, T 세포 공동자극 단백질이 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C 또는 B7-H3인, IFN 전구단백질.

[0674] 74. 구현예 73에 있어서, T 세포 공동 자극 단백질은 B7-H3인, IFN 전구단백질.

[0675] 75. 구현예 38 내지 구현예 66 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티가 체크포인트 억제제에 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

[0676] 76. 구현예 75에 있어서, 체크포인트 억제제는 CTLA-4, PD1, PDL1, PDL2, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1 또는 CHK2인, IFN 전구단백질.

[0677] 77. 구현예 76에 있어서, 체크포인트 억제제는 PDL1인, IFN 전구단백질.

[0678] 78. 구현예 76에 있어서, 체크포인트 억제제는 PD1인, IFN 전구단백질.

[0679] 79. 구현예 76에 있어서, 체크포인트 억제제는 LAG3인, IFN 전구단백질.

[0680] 80. 구현예 38 내지 구현예 66 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 종양 관련 항원(TAA)에 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

[0681] 81. 구현예 80에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 AFP, ALK, BAGE 단백질, BIRC5(서바이빈), BIRC7, β-카테닌, bcr-abl, BRCA1, BORIS, CA9, 탄산무수화효소 IX, 캐스페이스-8, CALR, CEACAM5(암종배아항원 또는 CEA로도 알려짐), CCR5, CD19, CD20(MS4A1), CD22, CD30, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, 사이클린-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE 단백질(*예*: GAGE-1 또는 -2), GD2, GD3, GloboH, 글리피칸-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, MAGE 단백질(*예*: MAGE-1, -2, -3, -4, -6, 및 -12), MART-1, 메소텔린, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16(CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA(FOLH1), RAGE 단백질, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TGF-β, TMPRSS2, Thompson-nouvelle 항원(Tn), TRP-1, TRP-2, 타이로시나제 및 유로플라킨-3에 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

[0682] 82. 구현예 81에 있어서, TAA는 EGFR인, IFN 전구단백질.

[0683] 83. 구현예 81에 있어서, TAA는 HER2인, IFN 전구단백질.

[0684] 84. 구현예 81에 있어서, TAA는 EPCAM인, IFN 전구단백질.

[0685] 85. 구현예 81에 있어서, TAA는 CEACAM5인, IFN 전구단백질.

[0686] 86. 구현예 81에 있어서, TAA는 CD20인, IFN 전구단백질.

[0687] 87. 구현예 38 내지 구현예 68 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 수지상 세포(DC) 항원에 결합할 수 있는 IFN 전구단백질로서, XCR1, Clec9a, CD1c, CD11c, CD14, PDL1, 대식세포 만노스 수용체(CD206) 및 DEC-205 중에서 선택적으로 선택되는, IFN 전구단백질.

[0688] 88. 구현예 87에 있어서, 수지상 세포 항원은 XCR1인, IFN 전구단백질.

[0689] 89. 구현예 87에 있어서, 수지상 세포 항원은 Clec9a인, IFN 전구단백질.

[0690] 90. 구현예 87에 있어서, 수지상 세포 항원은 DEC-205인, IFN 전구단백질.

[0691] 91. 구현예 38 내지 구현예 68 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티가 자연 살해(NK) 세포 항원에 결합할 수 있는, IFN 전구단백질.

[0692] 92. 구현예 1 내지 37 중 어느 하나에 있어서, IFN 전구단백질은 하나 이상의 표적 분자에 결합하는 하나 이상의 표적화 모이어티를 추가로 포함한다.

[0693] 93. 구현예 92에 있어서, 각각 표적 분자에 결합하기 위한 수단을 포함하는 제1 표적 모이어티 및 제2 표적 모이어티를 포함하는, IFN 전구단백질.

[0694] 94. 구현예 93에 있어서, 제1 표적 모이어티 및 제2 표적 모이어티는 항체 또는 이들의 항원 결합 단편인, IFN 전구단백질.

[0695] 95. 구현예 94에 있어서, 제1 표적 모이어티 및 제2 표적 모이어티는 Fab인, IFN 전구단백질.

[0696] 96. 구현예 94에 있어서, 제1 표적 모이어티 및 제2 표적 모이어티는 Fab 도메인을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0697] 97. 구현예 92 내지 구현예 96 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 표적 모이어티 및 제2 표적 모이어티는 힌지 서열을 더 포함하는, IFN 전구단백질.

[0698] 98. 구현예 97에 있어서, 제1 표적 모이어티 및 제2 표적 모이어티는 각각 CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 Fc 도메인을 더 포함하는, IFN 전구단백질.

[0699] 99. 구현예 98에 있어서, 제1 표적 모이어티의 Fc 도메인과 제2 표적 모이어티의 Fc 도메인은 서로 연관되어 있는, IFN 전구단백질.

[0700] 100. 구현예 92 내지 구현예 99 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 및 제2 표적 모이어티는 각각 제1 및 제3 링커에 대한 N-말단인, IFN 전구단백질.

[0701] 101. 구현예 92 내지 구현예 100 중 어느 한 구현예에 있어서,제1 면역글로불린 불변 도메인은 제1 표적 모이어티의 일부이고, 제2 면역글로불린 불변 도메인은 제2 표적 모이어티의 일부인, IFN 전구단백질.

[0702] 102. 구현예 101에 있어서, 제1 면역 글로불린 불변 도메인은 CH3 도메인인, IFN 전구단백질.

[0703] 103. 구현예 101에 있어서, 제1 면역 글로불린 불변 도메인은 CH1 도메인인, IFN 전구단백질.

[0704] 104. 구현예 92 내지103 중 어느 한 구현예에 있어서, 도 1a, 도 2a 또는 도 2d에 도시된 바와 같이 구성된, IFN 전구단백질.

[0705] 105. 구현예 104에 있어서, 제 1 폴리펩타이드 사슬, 제 2 폴리펩타이드 사슬, 제 3 폴리펩타이드 사슬 및 제 4 폴리펩타이드 사슬을 포함하는, IFN 전구단백질:

[0706] (a) 제1 폴리펩타이드 사슬은:

[0707] (i) 제1 VH1 도메인;

[0708] (ii) 제1 CH1 도메인;

[0709] (iii) 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제3 Fc 도메인(CH3 도메인은 제2 면역글로불린 불변 도메인);

[0710] (iv) 제1 링커;

[0711] (v) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0712] (vi) 제2 링커; 및

[0713] (vii) 제1 Fc 도메인;

[0714] (b) 제2 폴리펩타이드 사슬은:

[0715] (i) 제2 VH1 도메인;

[0716] (ii) 제2 CH1 도메인;

[0717] (iii) 힌지 도메인, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 포함하는 제4 Fc 도메인(CH3 도메인은 제2 면역글로불린 불변 도메인);

[0718] (iv) 제3 링커;

[0719] (v) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0720] (vi) 제4 링커; 및

[0721] (vii) 제3 Fc 도메인을 포함하고,

[0722] (c) 제3 폴리펩타이드 사슬은:

[0723] (i) 제1 VL 도메인;

[0724] (ii) 제1 CL 도메인을 포함하고,

[0725] (d) 제4 폴리펩타이드 사슬은:

[0726] (i) 제2 VL 도메인; 및

[0727] (ii) 제2 CL 도메인을 포함하고,

[0728] 제1 폴리펩타이드 사슬은 제3 폴리펩타이드 사슬과 연관되어 상기 제1 VH, CH1, VL 및 CL이 제1 표적 모이어티를 형성하고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 제4 폴리펩타이드 사슬과 연관되어 제2 VH, CH1, VL 및 CL이 제2 표적 모이어티를 형성하는, IFN 전구단백질.

[0729] 106. 구현예 105에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)인, IFN 전구단백질.

[0730] 107. 구현예 105에 있어서, 제1 및 제3 링커는 비절단성 링커(NCL)이고, 제2 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)인, IFN 전구단백질.

[0731] 108. 구현예 105에 있어서, 제1 및 제 3 링커가 프로테아제 절단성 링커(PCL)이고 제2 및 제4 링커가 비 절단성 링커(NCL)인, IFN 전구단백질.

[0732] 109. 구현예 92 내지103 중 어느 한 구현예에 있어서, 도 1b, 도 2b 또는 도 2e에 도시된 바와 같이 구성된, IFN 전구단백질.

[0733] 110. 구현예 109 에 있어서,

[0734] (a) 제1 폴리펩타이드 사슬은:

[0735] (i) 제1 VH1 도메인;

[0736] (ii) 제1 CH1 도메인;

[0737] (iii) 제1 링커;

[0738] (iv) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0739] (v) 제2 링커; 및

[0740] (vi) 제1 Fc 도메인;

[0741] (b) 제2 폴리펩타이드 사슬은:

[0742] (i) 제2 VH1 도메인;

[0743] (ii) 제2 CH1 도메인;

[0744] (iii) 제3 링커;

[0745] (iv) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0746] (v) 제4 링커; 및

[0747] (vi) 제2 Fc 도메인;

[0748] (c) 제3 폴리펩타이드 사슬은:

[0749] (i) 제1 VL 도메인;

[0750] (ii) 제2 CL 도메인을 포함하고, 및

[0751] (d) 제4 폴리펩타이드 사슬은:

[0752] (i) 제2 VL 도메인;

[0753] (ii) 제2 CL 도메인을 포함하고,

[0754] 제1 폴리펩타이드 사슬은 제3 폴리펩타이드 사슬과 연관되어 상기 제1 VH, CH1, VL 및 CL이 제1 표적 모이어티를 형성하고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 제4 폴리펩타이드 사슬과 연관되어 제2 VH, CH1, VL 및 CL이 제2 표적 모이어티를 형성하는, IFN 전구단백질.

[0755] 111. 구현예 110에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)인, IFN 전구단백질.

[0756] 112. 구현예 110에 있어서, 제1 및 제3 링커는 비절단성 링커(NCL)이고, 제2 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)인, IFN 전구단백질.

[0757] 113. 구현예 110에 있어서, 제1 및 제3 링커가 프로테아제 절단성 링커(PCL)이고 제2 및 제4 링커가 비절단성 링커(NCL)인, IFN 전구단백질.

[0758] 114. 구현예 92 내지103 중 어느 한 구현예에 있어서, 도 1c, 도 2c 또는 도 2f에 도시된 바와 같이 구성된, IFN 전구단백질.

[0759] 115. 구현예 114에 있어서, 제1 폴리펩타이드 사슬, 제2 폴리펩타이드 사슬, 제3 폴리펩타이드 사슬 및 제4 폴리펩타이드 사슬을 포함하는, IFN 전구단백질:

[0760] (a) 제1 폴리펩타이드 사슬은:

[0761] (i) 제1 VH1 도메인;

[0762] (ii) 제1 CH1 도메인;

[0763] (iii) 제1 힌지 도메인;

[0764] (iv) 제1 링커;

[0765] (v) 제1 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0766] (vi) 제2 링커; 및

[0767] (vii) 제1 Fc 도메인;

[0768] (b) 제2 폴리펩타이드 사슬은:

[0769] (i) 제2 VH1 도메인;

[0770] (ii) 제2 CH1 도메인;

[0771] (iii) 제2 힌지 도메인;

[0772] (iv) 제3 링커;

[0773] (v) 제2 I형 인터페론(IFN) 모이어티;

[0774] (vi) 제4 링커; 및

[0775] (vii) 제2 Fc 도메인;

[0776] (c) 제3 폴리펩타이드 사슬은:

[0777] (i) 제1 VL 도메인;

[0778] (ii) 제1 CL 도메인을 포함하고, 및

[0779] (d) 제4 폴리펩타이드 사슬은:

[0780] (i) 제2 VL 도메인; 및

[0781] (ii) 제2 CL 도메인을 포함하고,

[0782] 제1 폴리펩타이드 사슬은 제3 폴리펩타이드 사슬과 연관되어 상기 제1 VH, CH1, VL 및 CL이 제1 표적 모이어티를 형성하고, 제2 폴리펩타이드 사슬은 제4 폴리펩타이드 사슬과 연관되어 제2 VH, CH1, VL 및 CL이 제2 표적 모이어티를 형성하는, IFN 전구단백질.

[0783] 116. 구현예 115에 있어서, 제1, 제2, 제3 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)인, IFN 전구단백질.

[0784] 117. 구현예 115에 있어서, 제1 및 제3 링커는 비절단성 링커(NCL)이고, 제2 및 제4 링커는 프로테아제 절단성 링커(PCL)인, IFN 전구단백질.

[0785] 118. 구현예 115에 있어서, 제1 및 제3 링커가 프로테아제 절단성 링커(PCL)이고 제2 및 제4 링커가 비 절단성 링커(NCL)인, IFN 전구단백질.

[0786] 119. 구현예 92 내지 119 중 어느 하나에 있어서, 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분은 세포외 기질(ECM) 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스성 림프구의 세포 표면 분자, T 세포 항원(TCA), 관문 억제제 또는 종양 관련 항원(TAA), 수지상 세포(DC) 또는 기타 항원 제시 세포(APC) 항원, 또는 자연 살해(NK) 세포 항원에 결합할 수 있는 IFN 전구단백질.

[0787] 120. 구현예 92 내지 구현예 119 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 섹션 6.6에서 확인된 표적 분자와 결합하기 위한 수단을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0788] 121. 구현예 92 내지 119 중 어느 하나에 있어서, IFN 전구단백질의 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분이 신데칸, 헤파라나제, 인테그린, 오스테오폰틴, 링크, 카데린, 라미닌, 라미닌 유형 EGF, 렉틴, 피브로넥틴, 노치, 넥틴(*예*: 넥틴-4), 테나신, 콜라겐(*예*: 콜라겐 유형 X) 및 매트릭신으로부터 선택적으로 선택되는 ECM 항원에 결합할 수 있다.

[0789] 122. 구현예 121에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 넥틴(*예*: 넥틴 4)에 결합하기 위한 수단을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0790] 123. 구현예 121에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 콜라겐(*예*: 콜라겐 X)에 결합하기 위한 수단을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0791] 124. 구현예 92 내지 119 중 어느 하나에 있어서, IFN 전구단백질의 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분은 종양 또는 바이러스성 림프구의 세포 표면 분자에 결합할 수 있다.

[0792] 125. 구현예 124에 있어서, 세포 표면 분자는 T세포 공동 자극 단백질인, IFN 전구단백질.

[0793] 126. 구현예 125에 있어서, T 세포 공동자극 단백질이 CD27, CD28, 4-1BB(CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS, 림프구 기능 관련 항원-1(LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C 또는 B7-H3인 IFN 전구단백질.

[0794] 127. 구현예 126에 있어서, T 세포 공동 자극 단백질은 B7-H3인, IFN 전구단백질.

[0795] 128. 구현예 92 내지 119 중 어느 하나에 있어서, IFN 전구단백질의 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분은 면역관문 억제제에 결합할 수 있다.

[0796] 129. 구현예 128에 있어서, IFN 전구단백질의 면역관문 억제제는 CTLA-4, PD1, PDL1, PDL2, B7-H3, B7-H4, BTLA, HVEM, TIM3, GAL9, LAG3, VISTA, KIR, 2B4, CD160, CGEN-15049, CHK1, 또는 CHK2이다.

[0797] 130. 구현예 129에 있어서, 체크포인트 억제제는 PDL1인, IFN 전구단백질.

[0798] 131. 구현예 129에 있어서, 체크포인트 억제제는 PD1인, IFN 전구단백질.

[0799] 132. 구현예 129에 있어서, 체크포인트 억제제는 LAG3인, IFN 전구단백질.

[0800] 133. 구현예 92 내지 119 중 어느 하나에 있어서, IFN 전구단백질의 제1 표적화 부분 및/또는 제2 표적화 부분은 종양 관련 항원(TAA)에 결합할 수 있다.

[0801] 134. 구현예 133에 있어서, TAA는 AFP, ALK, BAGE 단백질, BIRC5(서비빈), BIRC7, β-카테닌, brc-abl, BRCA1, BORIS, CA9, 탄산 탈수효소 IX, 카스파제-8, CALR, CEACAM5(또한 암배아 항원 또는 CEA로도 알려짐), CCR5, CD19, CD20(MS4A1), CD22, CD30, CD40, CDK4, CEA, CTLA4, 사이클린-B1, CYP1B1, EGFR, EGFRvIII, ErbB2/Her2, ErbB3, ErbB4, ETV6-AML, EpCAM, EphA2, Fra-1, FOLR1, GAGE 단백질(*예*: GAGE-1 또는 -2), GD2, GD3, GloboH, 글리피칸-3, GM3, gp100, Her2, HLA/B-raf, HLA/k-ras, HLA/MAGE-A3, hTERT, LMP2, MAGE 단백질(*예*: MAGE-1, -2, -3, -4, -6 및 -12), MART-1, 메소텔린, ML-IAP, Muc1, Muc2, Muc3, Muc4, Muc5, Muc16(CA-125), MUM1, NA17, NY-BR1, NY-BR62, NY-BR85, NY-ESO1, OX40, p15, p53, PAP, PAX3, PAX5, PCTA-1, PLAC1, PRLR, PRAME, PSMA(FOLH1), RAGE 단백질, Ras, RGS5, Rho, SART-1, SART-3, STEAP1, STEAP2, TAG-72, TGF-β TMPRSS2, Thompson-nouvelle 항원(Tn), TRP-1, TRP-2, 타이로시나제 또는 유로플라킨-3인, IFN 전구단백질.

[0802] 135. 구현예 134에 있어서, TAA는 EGFR인, IFN 전구단백질.

[0803] 136. 구현예 134에 있어서, TAA는 HER2인, IFN 전구단백질.

[0804] 137. 구현예 134에 있어서, TAA는 EPCAM인, IFN 전구단백질.

[0805] 138. 구현예 134에 있어서, TAA는 CEACAM5인, IFN 전구단백질.

[0806] 139. 구현예 134에 있어서, TAA는 CD20인, IFN 전구단백질.

[0807] 140. 구현예 92 내지 구현예 119 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티는 수지상 세포(DC) 항원에 결합하기 위한 수단을 포함하며, 상기 수단은 XCR1, Clec9a, CD1c, CD11c, CD14, PDL1, 대식세포 만노스 수용체(CD206) 및 DEC-205 중에서 선택적으로 선택되는, IFN 전구단백질.

[0808] 141. 구현예 140에 있어서, 수지상 세포 항원은 XCR1인, IFN 전구단백질.

[0809] 142. 구현예 140에 있어서, 수지상 세포 항원은 Clec9a인, IFN 전구단백질.

[0810] 143. 구현예 140에 있어서, 수지상 세포 항원은 DEC-205인, IFN 전구단백질.

[0811] 144. 구현예 92 내지 구현예 119 중 어느 한 구현예에 있어서, 제1 표적 모이어티 및/또는 제2 표적 모이어티가 자연 살해(NK) 세포 항원에 결합하기 위한 수단을 포함하는, IFN 전구단백질.

[0812] 145. 구현예 1 내지 144 중 어느 하나에 있어서, IFN 전구단백질의 Fc 영역은 동종이량체이다.

[0813] 146. 구현예 1 내지 144 중 어느 하나에 있어서, IFN 전구단백질의 Fc 영역은 이종이량체이다.

[0814] 147. 구현예 1 내지 146 중 어느 한 구현예의 IL2 전구단백질을 인코딩하는 핵산 또는 복수의 핵산.

[0815] 148. 구현예 1 내지 146 중 어느 한 구현예의 IFN 전구단백질 또는 구현예 147의 핵산(들)을 발현하도록 조작된 숙주 세포.

[0816] 149. 구현예 1 내지 146 중 어느 한 구현예의 IFN 전구단백질을 생성하는 방법으로서, 구현예 148의 숙주 세포를 배양하고 이에 의해 발현된 IFN 전구단백질을 회수하는 단계를 포함하는 방법.

[0817] 150. 구현예 1 내지 146 중 어느 한 구현예의 IFN 전구단백질 및 부형제를 포함하는 약학적 조성물.

[0818] 151. 암을 치료하는 방법으로서, 구현예 1 내지 구현예 146 중 어느 한 구현예의 IFN 전구단백질 또는 구현예 150의 약학적 조성물을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0819] 152. 구현예 151에 있어서, IFN 전구단백질은 표적 분자에 결합할 수 있는 적어도 하나의 표적 모이어티를 포함하는, 방법.

[0820] 153. 구현예 151에 있어서, IFN 전구단백질은 표적 분자와 결합하기 위한 적어도 하나의 수단을 포함하는, 방법.

[0821] 154. 구현예 150 내지 구현예 153 중 어느 한 구현예에 있어서, 암은 표적 분자, *예를 들어*, 표 112에 명시된 TAA 및 관련 암의 발현과 연관되는, 방법.

[0822] 155. 구현예 150 내지 154 중 어느 하나에 있어서, 암 조직 내의 하나 이상의 프로테아제에 의해 IFN 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커가 절단되어 IFN 부분을 포함하는 활성화된 IFN 단백질이 생성되는 방법.

[0823] 156. 구현예 155에 있어서, IFN 단백질이 암 조직에서 선택적으로 활성화되는 방법.

[0824] 157. IFN 단백질의 국소 전달 방법으로서, 대상체에게 상기 IFN 단백질이 국소 전달될 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 각각 포함하는 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 구현예 1 내지 146 중 어느 한 구현예에 따른 IFN 전구단백질(또는 상기 IFN 전구단백질 및 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0825] 158. 구현예 157에 있어서, IFN 전구단백질이 조직에 의해 발현된 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적화 부분을 포함하는 방법.

[0826] 159. 구현예 158에 있어서, 상기 IFN 전구단백질은 상기 조직에 의해 발현된 표적 분자를 각각 인식하는 2개의 표적화 모이어티를 포함하는 방법.

[0827] 160. 구현예 157에 있어서, IFN 전구단백질은 조직에 의해 발현되는 표적 분자와 결합하기 위한 하나 이상의 수단을 포함하는 방법.

[0828] 161. 구현예 160에 있어서, IFN 전구단백질은 조직에 의해 발현되는 표적 분자와 결합하기 위한 두 가지 수단을 포함하는, 방법.

[0829] 162. 구현예 157 내지 161 중 어느 하나에 있어서, 조직이 암 조직인 방법.

[0830] 163. 구현예 162에 있어서, 조직의 의해 발현되는 표적 분자는 세포외기질(ECM) 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자, T세포 항원(TCA), 체크포인트 억제제, 종양 관련 항원(TAA), 수지상세포(DC) 또는 기타 항원 제시 세포(APC) 항원 또는 자연 살해(NK) 세포 항원인, 방법.

[0831] 164. 구현예 157 내지 163 중 어느 하나에 있어서, 표적 조직 내의 하나 이상의 프로테아제에 의해 IFN 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커가 절단되어 IFN 부분을 포함하는 활성화된 IFN 단백질이 생성되는 방법.

[0832] 165. 암 조직에서 선택적으로 활성화되는 IFN 단백질로 암을 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 상기 IFN 단백질이 존재하는 암 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 각각 포함하는 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 구현예 1 내지 146 중 어느 한 구현예에 따른 IFN 전구단백질(또는 상기 IFN 전구단백질 및 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0833] 166. 구현예 165에 있어서, IFN 전구단백질이 암 조직에 의해 발현된 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적화 부분을 포함하는 방법.

[0834] 167. 구현예 166에 있어서, 상기 IFN 전구단백질은 상기 암 조직에 의해 발현된 표적 분자를 각각 인식하는 2개의 표적화 모이어티를 포함하는 방법.

[0835] 168. 구현예165에 있어서, IFN 전구단백질은 암 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현되는 표적 분자와 결합하기 위한 하나 이상의 수단을 포함하는, 방법.

[0836] 169. 구현예 168에 있어서, IFN 전구단백질은 암 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현되는 표적 분자와 결합하기 위한 두 가지 수단을 포함하는, 방법.

[0837] 170. 구현예 165 내지 구현예 169에 있어서, 암 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현되는 표적 분자는 세포 외 기질(ECM) 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자, T세포 항원

(TCA), 체크포인트 억제제, 종양 관련 항원(TAA), 수지상 세포(DC) 또는 기타 항원 제시 세포(APC) 항원 또는 자연 살해(NK) 세포 항원인, 방법.

[0838] 171. 구현예 165 내지 170 중 어느 하나에 있어서, 암 조직 내의 하나 이상의 프로테아제에 의해 IFN 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커가 절단되어 IFN 부분을 포함하는 활성화된 IFN 단백질이 생성되는 방법.

[0839] 172. 상기 대상체에게 감소된 전신 노출 및/또는 감소된 전신 독성을 갖는 IFN 요법을 투여하는 방법으로서, 상기 대상체에게 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 구현예 1 내지 146 중 어느 한 구현예에 따른 IFN 전구단백질(또는 상기 IL2 전구단백질 및 부형제를 포함하는 약학적 조성물)의 형태로 상기 IFN 요법을 투여하는 단계를 포함하며, 각각은 IFN 요법이 바람직하고/하거나 의도된 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함하는 방법.

[0840] 173. 구현예 172에 있어서, IFN 전구단백질이 조직에 의해 발현된 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적화 부분을 포함하는 방법.

[0841] 174. 구현예 173에 있어서, 상기 IFN 전구단백질은 상기 조직에 의해 발현된 표적 분자를 각각 인식하는 2개의 표적화 모이어티를 포함하는 방법.

[0842] 175. 구현예 172에 있어서, IFN 전구단백질은 조직에 의해 발현되는 표적 분자와 결합하기 위한 하나 이상의 수단을 포함하는, 방법.

[0843] 176. 구현예 175에 있어서, IFN 전구단백질은 조직에 의해 발현되는 표적 분자와 결합하기 위한 두 가지 수단을 포함하는, 방법.

[0844] 177. 구현예 172 내지 176 중 어느 한 구현예에 있어서, 조직이 암 조직 또는 관련 면역 세포인, 방법.

[0845] 178. 구현예 177에 있어서, 조직에 의해 발현되는 표적 분자는 세포외기질(ECM) 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자, T세포 항원(TCA), 체크포인트 억제제, 종양 관련 항원(TAA), 수지상세포(DC) 또는 기타 항원 제시 세포(APC) 항원 또는 자연 살해(NK) 세포 항원인, 방법.

[0846] 179. 구현예 172 내지 178 중 어느 하나에 있어서, 표적 조직 내의 하나 이상의 프로테아제에 의해 IFN 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커가 절단되어 IFN 부분을 포함하는 활성화된 IFN 단백질이 생성되는 방법.

[0847] 180. 암 조직에서 선택적으로 활성화되는 IFN 단백질로 암을 치료하는 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 상기 암 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 각각 포함하는 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 구현예 1 내지 146 중 어느 한 구현예에 따른 IFN 전구단백질(또는 상기 IFN 전구단백질 및 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

[0848] 181. 구현예 180에 있어서, IFN 전구단백질은 암 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현되는 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적 모이어티를 포함하는, 방법.

[0849] 182. 구현예 181에 있어서, 상기 IFN 전구단백질은 상기 암 조직에 의해 발현된 표적 분자를 각각 인식하는 2개의 표적화 모이어티를 포함하는 방법.

[0850] 183. 구현예 180에 있어서, IFN 전구단백질은 암 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현되는 표적 분자와 결합하기 위한 하나 이상의 수단을 포함하는, 방법.

[0851] 184. 구현예 183에 있어서, IFN 전구단백질은 암 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현되는 표적 분자와 결합하기 위한 두 가지 수단을 포함하는, 방법.

[0852] 185. 구현예 180 내지 구현예 184에 있어서, 암 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현되는 표적 분자는 세포 외 기질(ECM) 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자, T세포 항원(TCA), 체크포인트 억제제, 종양 관련 항원(TAA), 수지상 세포(DC) 또는 기타 항원 제시 세포(APC) 항원 또는 자연 살해(NK) 세포 항원인, 방법.

[0853] 186. 구현예 179 내지 184 중 어느 하나에 있어서, 암 조직 내의 하나 이상의 프로테아제에 의해 IFN 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커가 절단되어 IFN 부분을 포함하는 활성화된 IFN 단백질이 생성되는 방법.

[0854] 187. 활성화된 IFN 단백질을 암 조직에 표적 전달하는 방법으로서, 대상체에게 구현예 1 내지 146 중 어느 한 구현예에 따른 IFN 전구단백질(또는 상기 IFN 전구단백질 및 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 투여하는 단계를 포함하며, 상기 IFN 전구단백질은

[0855] (a) (i) 암 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현되는 표적 분자를 인식하는 하나 이상의 표적 모이어티, 또는 (ii) 암 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현되는 표적 분자와 결합하기 위한 수단을 포함한다. 그리고

[0856] (b) IFN 요법이 바람직하고/하거나 의도되는 조직에 의해 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 각각 포함하는 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 방법.

[0857] 188. 구현예 187에 있어서, IFN 전구단백질은 (i) 암 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현되는 표적 분자를 각각 인식하는 2개의 표적 모이어티, 또는 (ii) 암 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현되는 표적 분자에 결합하기 위한 2개의 수단을 포함하는, 방법.

[0858] 189. 구현예 187 또는 구현예 188에 있어서, 암 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현되는 표적 분자는 세포 외 기질(ECM) 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자, T세포 항원(TCA), 체크포인트 억제제, 종양 관련 항원(TAA), 수지상 세포(DC) 또는 기타 항원 제시 세포(APC) 항원 또는 자연 살해(NK) 세포 항원인, 방법.

[0859] 190. 구현예 187 내지 189 중 어느 하나에 있어서, 암 조직 내의 하나 이상의 프로테아제에 의해 IFN 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커가 절단되어 IFN 부분을 포함하는 활성화된 IFN 단백질이 생성되는 방법.

[0860] 191. 표적 조직에서 면역 반응을 국소적으로 유도하는 방법으로서, 상기 표적 조직에서 발현되는 표적 분자를 결합할 수 있는 하나 이상의 표적화 모이어티와 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커를 갖는 구현예 1 내지 146 중 어느 한 구현예에 따른 IFN 전구단백질(또는 상기 IFN 전구단백질 및 부형제를 포함하는 약학적 조성물)을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 각각은 상기 표적 조직에서 발현되는 하나 이상의 프로테아제에 대한 하나 이상의 기질을 포함하는 방법.

[0861] 192. 구현예 191에 있어서, IFN 전구단백질은 (i) 표적 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현되는 표적 분자를 각각 인식하는 2개의 표적 모이어티, 또는 (ii) 표적 조직 또는 관련 면역 세포에 의해 발현되는 표적 분자에 결합하기 위한 2개의 수단을 포함하는, 방법.

[0862] 193. 구현예 191 또는 구현예 192에 있어서, 표적 조직이 암 조직인 방법.

[0863] 194. 구현예 191 내지 193 중 어느 한 구현예에 있어서, 표적 조직 또는 관련 면역 세포에서 발현되는 표적 분자는 세포 외 기질(ECM) 항원, 종양 반응성 림프구 항원, 종양 또는 바이러스 림프구의 세포 표면 분자, T세포 항원(TCA), 체크포인트 억제제, 종양 관련 항원(TAA), 수지상 세포(DC) 또는 기타 항원 제시 세포(APC) 항원 또는 자연 살해(NK) 세포 항원인, 방법.

[0864] 195. 구현예 190 내지 194 중 어느 하나에 있어서, 표적 조직 내의 하나 이상의 프로테아제에 의해 IFN 전구단백질 내의 하나 이상의 프로테아제-절단성 링커가 절단되어 IFN 부분을 포함하는 활성화된 IFN 단백질이 생성되는 방법.

[0865] 196. 구현예 195에 있어서, IFN 전구단백질은 표적 조직에서 적어도 하나의 세포 유형에 대해 면역 반응을 유도하는, 방법.

[0866] 197. 항원에 대한 면역 반응을 향상하는 방법으로서, 항원에 대한 면역 반응을 유도하는 면역원성 제제를 제1항 내지 제146항 중 어느 하나에 따른 IFN 전구단백질(또는 IFN 수용체 작용제와 부형제를 포함하는 약학적 조성물) 또는 그러한 IFN 전구단백질(예: IFN 수용체 작용제)을 인코딩하는 핵산과 함께 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 방법(*예를 들어*, 섹션 6.10.1에 기술된 바와 같이).

[0867] 198. 구현예 197에 있어서,면역원성 제제와 IFN 전구단백질(예: IFN 수용체 작용제)의 투여는 동시, 분리되지만 동시 또는 순차적으로 이루어지는, 방법.

[0868] 199. 구현예 197 또는 구현예 198 또는 구현예 1에서, 면역원성 제제는 백신이며, 선택적으로 백신은 암 백신 또는 감염원에 대한 백신인, 방법.

[0869] 200. 구현예 151 내지 199 중 어느 하나에 있어서, 투여가 비국소적인 방법.

[0870] 201. 구현예 200에 있어서, 투여가 전신인 방법.

[0871] **8. 예**

[0872] **8.1. 단백질 구성 서열**

[0873] 아래 표 3은 여기에 설명된 연구에 사용된 IFN 전구단백질 및 제어 구조의 서열을 제공한다.

표 3

[0874] **표 3**

구조체	서열
항-PD1-PCL-IFN-PCL-Fc 사슬 1: 항-hPD1-VH-CH1-CH2-CH3-PCL-IFN-PCL-CH2-CH3 사슬 2: 항-hPD1-VH-CH1-CH2-CH3-PCL-IFN-PCL-CH2-CH3 사슬 3: 항-hPD1 경쇄 사슬 4: 항-hPD1 경쇄	사슬 1: QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDES TSTAFMELASLRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKISS GLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFN LFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAW EVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRT PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 385) 사슬 2: Qvqlvqsgaevkrpgssvkvsckvsgvtfrnfaiiwvrqapgqglewmggiipffsaanyaqsfqgrvtitpdes tstafmelaslrsedtavyycaregerghtygfdywgqgtlvtvss ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDF GFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLM KEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHESKYGPPC PPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 385) 사슬 3: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386) 사슬 4: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386)

항-PD1-VH-CH1-PCL-IFN-PCL-Hinge-Fc 사슬 1: 항-PD1-VH-CH1-PCL-IFN-PCL-Hinge-CH2-CH3 사슬 1: 항-PD1-VH-CH1-PCL-IFN-PCL-Hinge-CH2-CH3 사슬 3: 항-hPD1 경쇄 사슬 4: 항-hPD1 경쇄	사슬 1: QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDES TSTAFMELASLRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYIS SGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIF NLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCA WEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 387) 사슬 2: QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDES TSTAFMELASLRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYIS SGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIF NLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCA WEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 387) 사슬 3: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386) 사슬 4: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386)

항-PD1-VH-CH1-PCL-ΔN-IFN-ΔC-PCL-Hinge-Fc 사슬 1: 항-PD1-VH-CH1-PCL-ΔN-IFN-ΔC-PCL-Hinge-CH2-CH3 사슬 2: 항-PD1-VH-CH1-PCL-ΔN-IFN-ΔC-PCL-Hinge-CH2-CH3 사슬 3: 항-hPD1 경쇄 사슬 4: 항-hPD1 경쇄	사슬 1: QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDES TSTAFMELASLRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYIS SGLLSGRSDNHTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFST KDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVR AEIMRSFSLSTNLQISSGLLSGRSDNHGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 388) 사슬 2: QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDES TSTAFMELASLRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYIS SGLLSGRSDNHTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFST KDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVR AEIMRSFSLSTNLQISSGLLSGRSDNHGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 388) 사슬 3: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386) 사슬 4: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386)

항-PD1-VH-CH1-PCL-IFN-ΔC-PCL-Hinge-Fc 사슬 1: 항-PD1-VH-CH1-PCL-IFN-ΔC-PCL-Hinge-CH2-CH3↵ 사슬 2: 항-PD1-VH-CH1-PCL-IFN-ΔC-PCL-Hinge-CH2-CH3↵ 사슬 3: 항-hPD1 경쇄 사슬 4: 항-hPD1 경쇄	사슬 1: QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDES TSTAFMELASLRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYIS SGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIF NLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCA WEVVRAEIMRSFSLSTNLQISSGLLSGRSDNHGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 389) 사슬 2: QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDES TSTAFMELASLRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYIS SGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIF NLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCA WEVVRAEIMRSFSLSTNLQISSGLLSGRSDNHGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 389) 사슬 3: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386) 사슬 4: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386)

항-PD1-VH-CH1-LongHinge-PCL-IFN-PCL-LongHinge-Fc 사슬 1: 항-PD1-VH-CH1-LongHinge-PCL-IFN-PCL-LongHinge-CH2-CH3 사슬 2: 항-PD1-VH-CH1-LongHinge-PCL-IFN-PCL-LongHinge-CH2-CH3 사슬 3: 항-hPD1 경쇄 사슬 4: 항-hPD1 경쇄	사슬 1: QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDESTSTAFMELASLRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 390) 사슬 2: QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDESTSTAFMELASLRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLHEMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKEKKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHESKYGPPCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 390) 사슬 3: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386) 사슬 4: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386)

항-PD1-VH-CH1-ShortHinge-PCL-IFN-PCL-ShortHinge-Fc 사슬 1: 항-PD1-VH-CH1-ShortHinge-PCL-IFN-PCL-ShortHinge-CH2-CH3 사슬 2: 항-PD1-VH-CH1-ShortHinge-PCL-IFN-PCL-ShortHinge-CH2-CH3 사슬 3: 항-hPD1 경쇄 사슬 4: 항-hPD1 경쇄	사슬 1: QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDES TSTAFMELASLRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLH EMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKE KKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 391) 사슬 2: QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCKVSGVTFRNFAIIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFFSAANYAQSFQGRVTITPDES TSTAFMELASLRSEDTAVYYCAREGERGHTYGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCISSGLLSGRSDNHCDLPQTHSLGSRRTLMLLAQMRRISLFSCLKDRHDFGFPQEEFGNQFQKAETIPVLH EMIQQIFNLFSTKDSSAAWDETLLDKFYTELYQQLNDLEACVIQGVGVTETPLMKEDSILAVRKYFQRITLYLKE KKYSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKEISSGLLSGRSDNHCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO: 391) 사슬 3: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386) 사슬 4: DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC* (SEQ ID NO: 386)

[0875] **8.2. 자료 및 방법**

[0876] **8.2.1. I형 IFN 구조체의 제조**

[0877] 항체 및 입체적으로 감쇄된 IFN 융합 단백질을 인코딩하는 구조체는 고수율 단백질 생산에 적합하고 프로모터 서열, polyA 서열, 조절 요소 및 내성 유전자와 같은 표준 요소를 포함하는 표준 포유류 단백질 발현 DNA 벡터(pcDNA3.4 또는 유사)에서 생성되었다. 해당되는 경우, 서열은 코돈 최적화를 거쳤다. 쥐 비활성 티로신-단백질 키나아제 트랜스막 수용체 ROR1(mROR1)의 29개 아미노산 신호 서열을 구조체의 N-말단에 추가하여 분비 신호 역할을 하도록 했다. 모든 IFN 융합 단백질은 세포 내 처리에 의해 절단되어 성숙한 단백질을 생성하는 신호 서열을 포함하는 전단백질로 발현되었다. 이 구조체는 일시적 감염을 통해 Expi293FTM 세포에서 발현되었다(Thermo Fisher Scientific). Expi293F 상등액의 단백질을 HiTrapTM 단백질 G HP 또는 MabSelect SuRe pcc 컬럼(Cytiva)과 함께 ProteinMaker 시스템(Protein BioSolutions, 메릴랜드주 게이더스버그 소재)을 사용하여 정제하였다. 단일 단계 용출 후, 단백질을 중화시키고 5 % 글리세롤이 포함된 인산 완충 식염수(PBS)의 최종 완충액으로 투석한 후 -80 ° C에서 적수하여 보관했다. 샘플을 SE-UPLC로 추가 분석하여 관심 있는 종에 비해 고분자량 또는 저분자량 종의 존재 여부를 확인했다.

[0878] **8.2.2. IFN 구조체의 *시험관 내* 절단**

[0879] 프로테아제 절단성 링커는 단백질 구조체를 uPA 또는 MMP 효소로 배양하여 효소적으로 절단했다. uPA를 사용한 효소 절단의 경우, 8 μg의 단백질 구조체를 200 μL의 uPA 완충액(50 mM Tris pH 8.5, 0.01 %(v/v) Tween20)에 100 ng의 uPA 효소와 함께 37 ° C에서 20시간 동안 배양했다. MMP를 사용한 효소 절단의 경우, 8 μg의 단백질 구조물을 200 μL의 MMP 완충액(50 mM Tris pH 7.5,150 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 0.05 % Brij35)에 각각 200 MMP2 및 MMP9와 함께 37 ° C에서 20시간 동안 배양했다.

[0880] **8.2.3. 리포터 KG-1a 세포의 조작**

[0881] 전골수아세포 대식세포주 KG-1a를 ISRE 기반 루시퍼라제 리포터 구조로 형질전환하고 2 mM L-글루타민/페니실린/스트렙토마이신 + 20 % FBS + 1 μg/mL 푸로마이신을 보충한 Iscove의 수정된 둘베코 배지에서 유지했다. IFNα2b에 대한 높은 반응성을 가진 단일 세포 클론을 확인하여 KG-1a/ISRE-Luc c1.2F5로 이름을 변경하고, 앞서 언급한 대로 분석에 사용했다.

[0882] **8.2.4. 루시퍼라제 분석 설정**

[0883] 2 mM L-글루타민/페니실린/스트렙토마이신 + 10 % 소 태아 혈청(FBS)이 보충된 RPMI1640 배지를 분석 배지로 사용하여 세포 현탁액 및 단백질 희석액을 준비하였다.

[0884] 검정 당일, 세포를 원심분리하여 5 x 10^5 /mL의 밀도로 분석 배지에 현탁시켰다. 재조합 IFNα2b 및/또는 IFN 융합 단백질은 11점 희석 범위(재조합 인터페론의 경우 100 nM 내지 10.2 fM 범위, 융합 단백질의 경우 500 nM 내지 51.2 fM 범위)에 따라 1:5로 희석되었으며, 12번째 지점은 재조합 단백질을 포함하지 않는다. 2.5 x 10^4개의 리포터 세포를 96-웰 흰색 평평한 바닥 플레이트에 추가하고, 순차적으로 희석된 재조합 IFN 또는 IFN 융합 단백질과 함께 배양했다. 37 ° C, 5 % CO_2에서 5시간 동안 배양한 후 100 μL ONE-Glo™(Promega) 시약을 첨가하여 세포를 용해하고 루시퍼라제 활성을 검출했다. 방출된 빛은 다중 라벨 판독기 Envision(PerkinElmer)의 상대 광량 단위(RLU)로 측정되었다.

[0885] **8.3. 예 1: SE-UPLC Fc-결합 인터페론 분자의 프로파일**

[0886] SE-UPLC는 C-말단 또는 N-말단에서 Fc 도메인에 연결된 IFN 분자를 평가하기 위해 수행되었다. SE-UPLC로 분석된 세 가지 예시적인 구조체, Fc-IFNα1(도 4a), Fc-IFNα2b(도 4b), 그리고 IFNα2b-Fc(도 4c)는 각각 고분자량 종의 수준이 달라지는 개별적 주요 피크를 나타낸다. Fc-IFNα1의 주요 피크 퍼센트 영역은 37.43으로 계산된 반면, Fc-IFNα2b와 IFNα2b-Fc의 경우 각각 57.66과 56.4로 계산되어 이보다 더 큰 퍼센트 값을 보였다.

[0887] **8.4. 예 2: 인터페론 분자의 활성**

[0888] 섹션 8.2.3에 설명된 대로 전골수아세포 대식세포주 KG-1a에 인터페론 자극 반응 요소(ISRE) 기반 루시퍼라제 리포터를 통합하고 섹션 8.2.4에 설명된 대로 IFN 수용체 작용제 구조체의 ISRE 유도 능력을 평가하기 위해 사용했다.

[0889] 도 5에 나타난 결과는 인터페론 민감 반응 요소(ISRE)의 *시험관 내* 루시퍼라제 분석에서 IFN 변이체의 재조합 단백질과 Fc 융합이 다양한 정도의 감쇄를 보인다는 것을 보여주었다. 첫 번째 평가는 N-말단 또는 C-말단에서 Fc 분자와 연결된 IFN 분자의 활성에 차이가 있는지 테스트하는 것이었다(도 5a). IFNα2b에 비해 Fc-IFNα2b와 IFNα2b-Fc는 모두 인터페론 신호가 약하게 나타났다. 그러나 감쇄 수준은 두 분자 모두 비슷했다(도 5b). 다음으로, 두 가지 Fc-IFN 구조체인 Fc-IFNα2b와 Fc-IFNα1의 *시험관 내* 활성을 세 가지 IFN 변이체인 IFNα2b, IFNα1, IFNβ의 활성과 비교했다(도 5c). IFN 변이체 중 IFNβ와 IFNα2b에서 가장 높은 수준의 활성이 관찰된 반면, IFNα1의 활성은 상대적으로 더 낮게 관찰되었다. Fc 융합이 있는 재조합 단백질은 IFN 변이체에 비해 감쇄된 수준의 활성을 보였다. 결론적으로, Fc 융합은 유리 인터페론에 비해 인터페론 신호의 감쇄로 이어진다.

[0890] **8.5. 예 3: 돌연변이 IFN 구조체의 SE-UPLC 프로파일**

[0891] SE-UPLC는 C-말단의 Fc 도메인에 연결된 돌연변이 IFN 분자를 평가하기 위해 수행되었다. SE-UPLC로 분석된 네 가지 예시적인 구조체인 Fc-IFNα2bR33A(도 6a), Fc-IFNα2bR149A(도 6b), Fc-IFNα2bR120A(도 6c), 그리고 Fc-IFNα2bS152A(도 6d)는 각각 고분자량 종의 수준이 달라지는 개별적 주요 피크를 나타낸다.

[0892] **8.6. 예 4: 돌연변이 IFN 구조체의 활성**

[0893] ISRE 기반 루시페라아제 리포터 분석은 섹션 8.2.3에 설명된 대로 전골수아세포 대식세포주 KG-1a에 통합되었고 섹션 8.2.4에 설명된 대로 사용하여 돌연변이 IFN 수용체 작용제 구조체의 ISRE 유도 능력을 평가했다.

[0894] IFN 변이체의 활성은 IFNAR에 대한 친화도와 상관관계가 있다. 따라서 IFN-IFNAR 결합에 영향을 미치는 돌연변이는 Fc-IFN 구조체의 활성에 영향을 미칠 수 있다. IFNα2b에 IFNAR1 또는 IFNAR2 계면에 일련의 돌연변이가 도입되었다(도 7a 및 7b). 야생형 Fc-IFNα2b와 비교하여, Fc-IFNα2b의 IFNAR1 또는 IFNAR2 결합을 방해하는 대부분의 돌연변이는 ISRE-루시퍼라제 활성을 감쇄시켰다. 또한 이러한 감쇄의 정도는 다양했는데, 어떤 돌연변이는 약간의 활성 감쇄만 유발하는 반면, 어떤 돌연변이는 매우 높은 수준의 감쇄를 유발했다. 그럼에도 불구하고, 이러한 감쇄 수준의 차이에 대해 IFNAR1 또는 IFNAR2 결합을 방해하는 돌연변이 간에는 최소한의 차이가 있

었다.

[0895] **8.7. 예 5: 예시적인 인터페론 단백질 구조체의 SE-UPLC 프로파일**

[0896] 입체적으로 감쇄된 IFN 융합 단백질을 인코딩하는 구조체를 생성한 후, 섹션 8.2.1에 설명된 대로 샘플에 고분자량 또는 저분자량 종의 존재 여부를 평가하기 위해 SE-UPLC를 수행했다. 도 8은 세 가지 예시적인 IFN 전구단백질 구조체의 프로파일을 보여준다. 일 힌지 IFN 구조체(도 8a), 이중 힌지 IFN 구조체(도 8b), 두 개의 Fc 도메인을 가진 IFN 구조체(도 8c). 단일 및 이중 힌지 구조는 개별적인 메인 피크를 표시한 반면, 두 개의 Fc 도메인이 있는 IFN 구조의 SEC 프로파일은 덜 명확했다. 따라서 후속 분석은 단일 힌지 및 이중 힌지 IFN 구조체로 수행되었으며 두 개의 Fc 도메인이 있는 IFN 구조체는 제외했다.

[0897] **8.8. 예 6: IFN 전구단백질 구조체의 효소적 분해**

[0898] 예시적인 IFN 전구단백질 구조체는 섹션 8.2.2.에 설명된 대로 uPA 및 MMP 효소로 절단되었다 (도 9). 단백질 구조체의 절단은 38~49 kDa 사이에서 나타날 것으로 예상되는 Fc 및 Fab 성분에 해당하는 밴드의 존재로 평가했다. Fc 부분을 검출하는 웨스턴 블롯을 통해 다른 단편들의 신원을 추가로 확인했다.

[0899] uPA에 의한 단일 힌지 및 이중 힌지 IFN 전구단백질 구조의 절단은 예상 밴드보다 더 높은 분자량으로 나타나는 추가 밴드를 SDS-PAGE 이미지에서 생성했으며(도 9a), 이는 시험관 *내에서* uPA에 의한 이러한 구조체의 불완전한 절단이 있음을 나타낸다. 반면, MMP2/9는 단일 힌지 IFN 전구단백질을 완전히 절단했다. 그러나 MMP2/9-절단된 이중 힌지 IFN 전구단백질이 로드된 레인에서는 추가적인 고분자량 밴드가 나타났는데(도 9b), 이는 이중 힌지 구조의 MMP 절단이 불완전하다는 것을 나타낸다.

[0900] **8.9. 예 7: IFN 전구단백질 구조체의 활성**

[0901] 세 가지 IFN 전구단백질의 ISRE-루시페라아제 활성을 IFNα2b 및 Fc-IFNα2b와 비교하여 평가했다. 단일 힌지 전장 IFN과 이중 힌지 IFN 구조는 Fc-IFNα2b에 비해 감쇄 수준이 미미한 것으로 나타났다. 그러나 가장 좋은 감쇄는 단일 힌지 잘린 IFN과 관련이 있었다(도 10a).

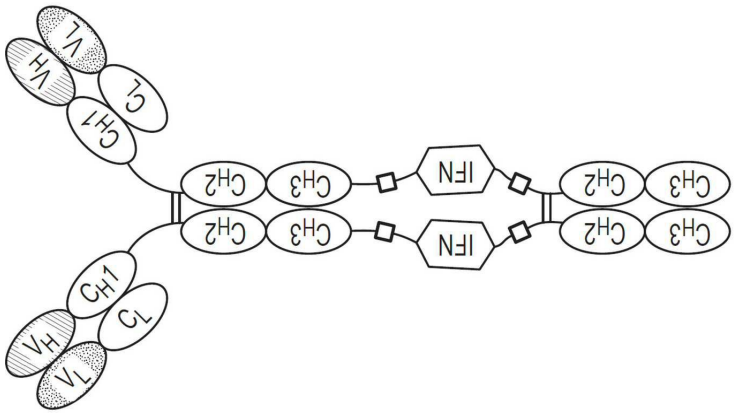
[0902] IFN 전구단백질 구조체의 *시험관 내* 절단이 IFN의 활성을 회복시키는지 평가하기 위해, 먼저 섹션 8.2.2에 설명된 대로 동일한 3개의 IFN 전구단백질 구조체를 MMP 완충액 대조군 또는 MMP2 및 MMP9 효소와 함께 MMP 완충액에서 배양했다. MMP 완충액으로만 배양한 구조체는 도 10a에서 볼 수 있는 비절단 구조체의 활성 감쇄와 유사한 IFN 전구단백질 구조체(도 10b, 점선)의 활성을 감쇄시켰다. MMP 완충액의 존재는 일반적으로 생체 분석 신호의 감소와 관련이 있었다. 그러나 구조체를 동일한 완충액에서 MMP 효소와 함께 배양했을 때, IFN의 방출은 절단되지 않은 구조체에 비해 활성의 증가와 관련이 있었다(도 10b, 점선). 보다 구체적으로, 단일 힌지 전장 IFN과 이중 힌지 IFN 구조체의 활성은 IFNα2b의 활성과 유사했고, 단일 힌지 절단 IFN의 활성은 IFNα2b와 Fc-IFNα2b의 중간 정도였다.

[0903] **9. 참고문헌 인용**

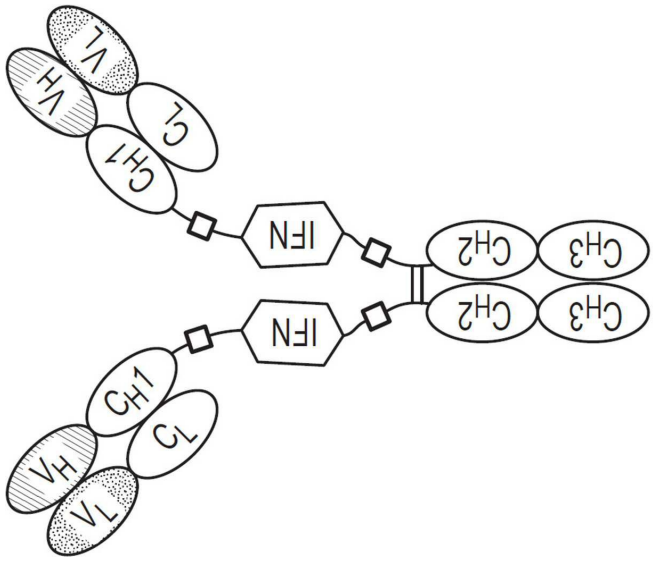
[0904] 본 출원에 인용된 모든 간행물, 특허, 특허 출원 및 기타 문서는 각각의 개별 간행물, 특허, 특허 출원 또는 기타 문서가 모든 목적을 위해 참조에 의해 원용되는 것으로 나타낸 것과 동일한 정도로 본 명세서에 모든 목적을 위해 전문이 참조에 의해 원용된다. 본 명세서에 원용된 하나 이상의 참조문헌의 교시내용과 본 개시내용 간에 불일치가 있는 경우, 본 명세서의 교시내용이 의도된다.

도면

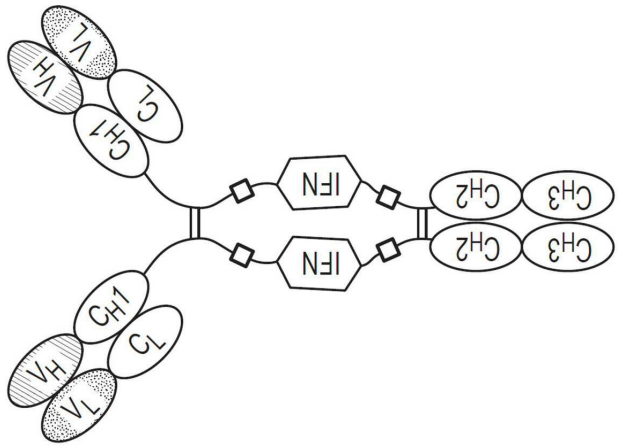
도면1a



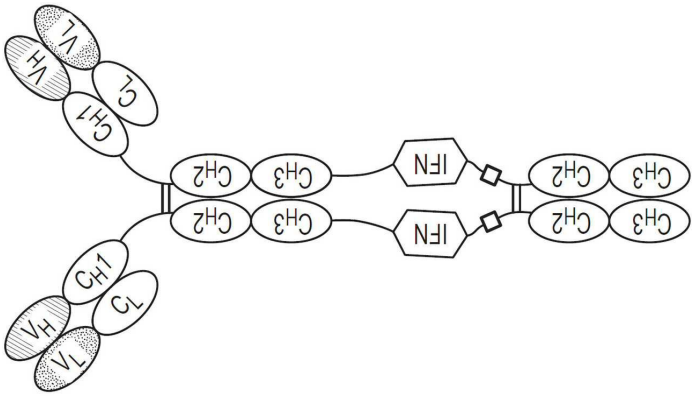
도면1b



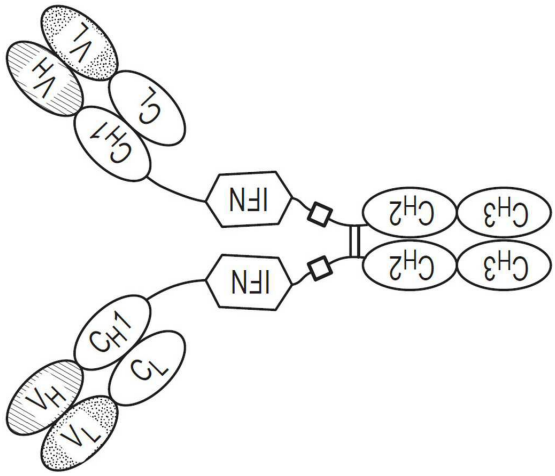
도면1c



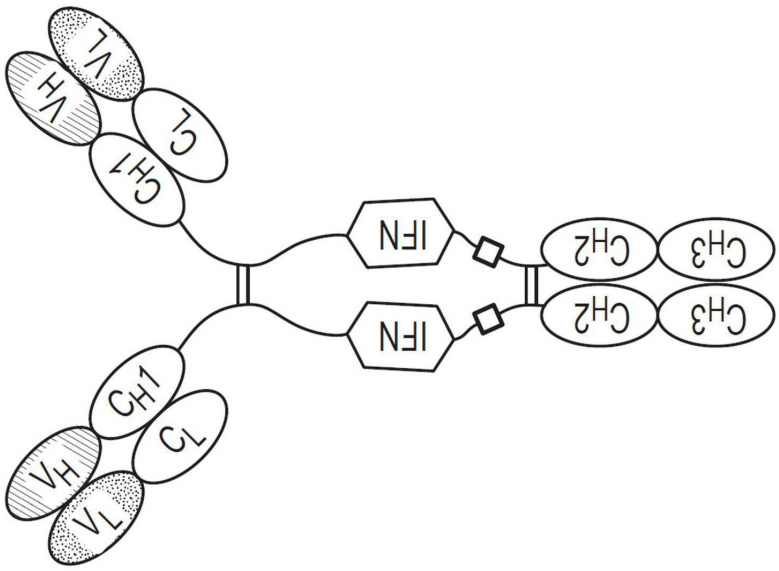
도면2a



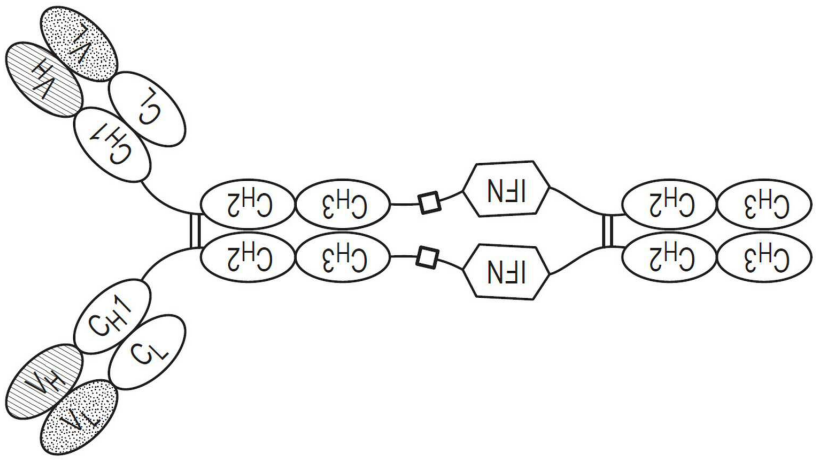
도면2b



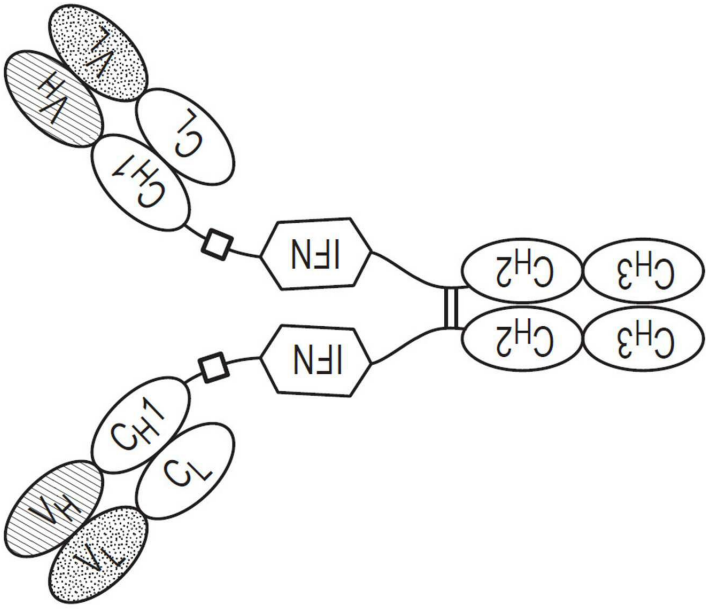
도면2c



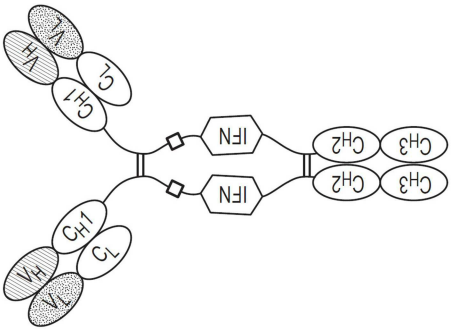
도면2d


VL
VH
CL
CH1
CH2
CH3
IFN
CH2
CH3
IFN
CH2
CH3
CH1
CL
VH
VL

도면2e


VL
VH
CL
CH1
IFN
CH2
CH3
IFN
CH2
CH3
CH1
CL
VH
VL

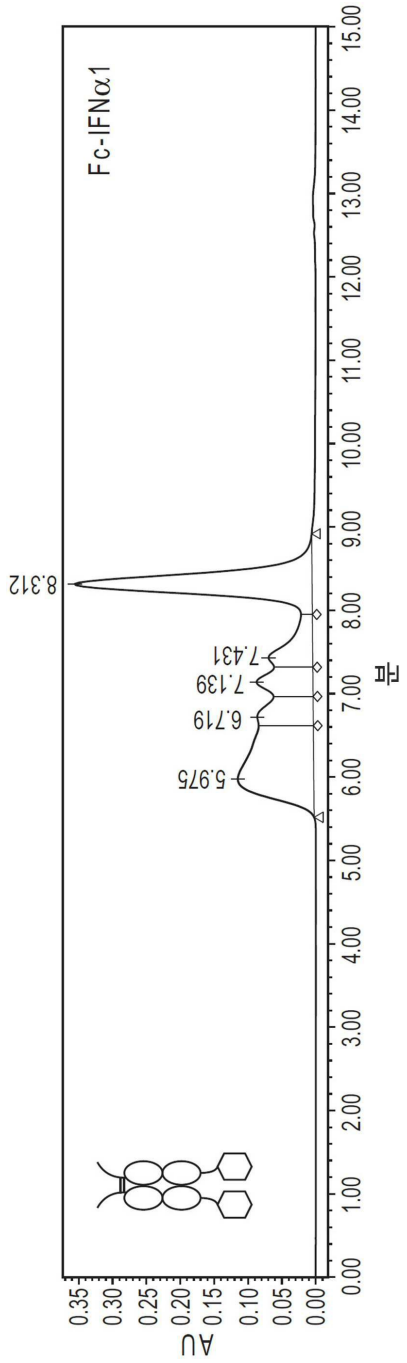
도면2f



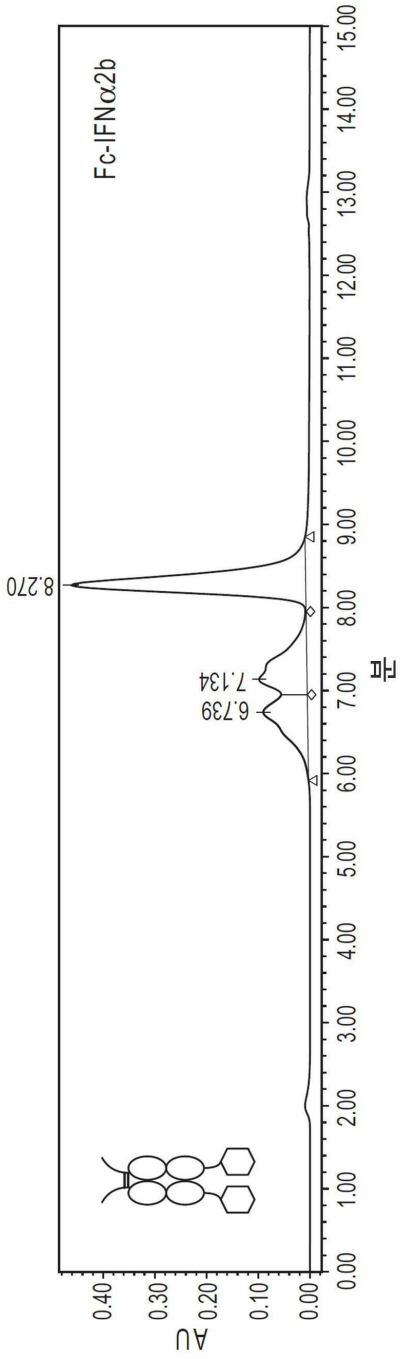
도면3

마스킹된 표적 IFN 모이어티	사슬 1	사슬 2	사슬 3	사슬 4
TM-PCL-IFN-PCL- Fc	TM (HC)-PCL-IFN-PCL- Fc	TM (HC)-PCL-IFN-PCL- Fc	TM (LC)	TM (LC)
TM (VH-CH1)-PCL-IFN-PCL-Hinge-Fc	TM (VH-CH1)-PCL-IFN-PCL-Hinge-Fc	TM (VH-CH1)-PCL-IFN-PCL-Hinge-Fc	TM (LC)	TM (LC)
TM (VH-CH1)-PCL-ΔN-IFN-ΔC-PCL-Hinge-Fc	TM (VH-CH1)-PCL-ΔN-IFN-ΔC-PCL-Hinge-Fc	TM (VH-CH1)-PCL-ΔN-IFN-ΔC-PCL-Hinge-Fc	TM (LC)	TM (LC)
TM (VH-CH1)-PCL-IFN-ΔC-PCL-Hinge-Fc	TM (VH-CH1)-PCL-IFN-ΔC-PCL-Hinge-Fc	TM (VH-CH1)-PCL-IFN-ΔC-PCL-Hinge-Fc	TM (LC)	TM (LC)
TM (VH-CH1)-LongHinge-PCL-IFN-PCL-LongHinge-Fc	TM (VH-CH1)-LongHinge-PCL-IFN-PCL-LongHinge-Fc	TM (VH-CH1)-LongHinge-PCL-IFN-PCL-LongHinge-Fc	TM (LC)	TM (LC)
TM (VH-CH1)-ShortHinge-PCL-IFN-PCL-ShortHinge-Fc	TM (VH-CH1)-ShortHinge-PCL-IFN-PCL-ShortHinge-Fc	TM (VH-CH1)-ShortHinge-PCL-IFN-PCL-ShortHinge-Fc	TM (LC)	TM (LC)

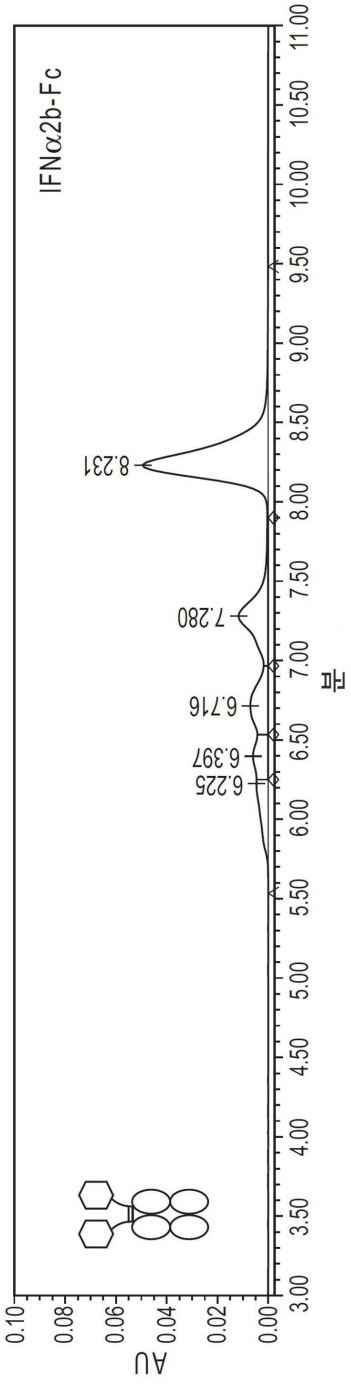
도면4a


Fc-IFNα1
8.312
7.431
7.139
6.719
5.975
AU
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00
분

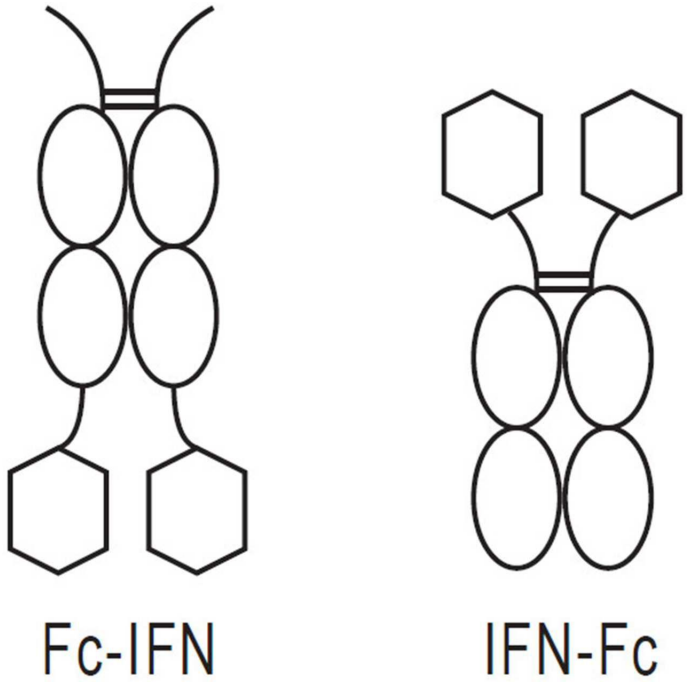
도면4b


Fc-IFNα2b
8.270
7.134
6.739
AU
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
분
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
13.00
14.00
15.00

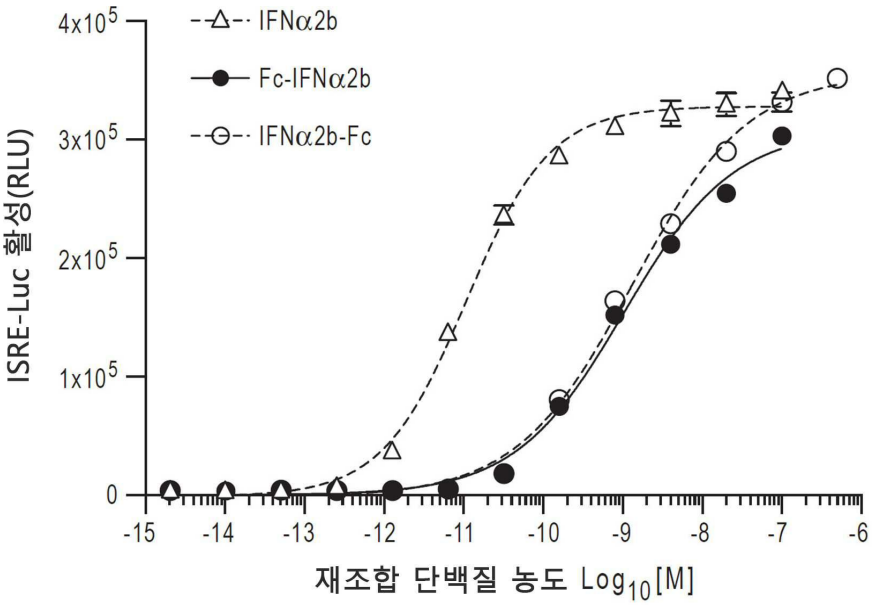
도면4c


IFNα2b-Fc
8.231
7.280
6.716
6.397
6.225
분
AU
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
9.00
9.50
10.00
10.50
11.00

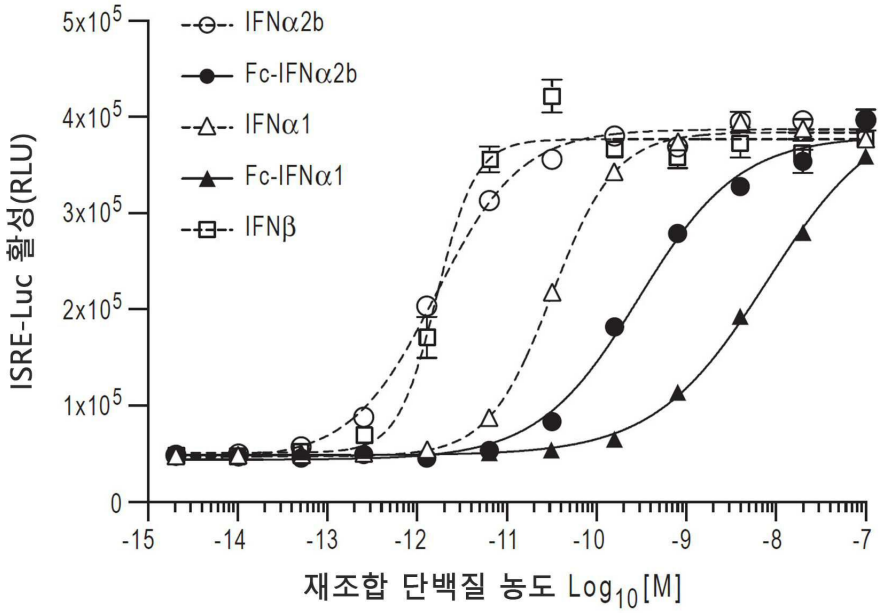
도면5a


Fc-IFN
IFN-Fc

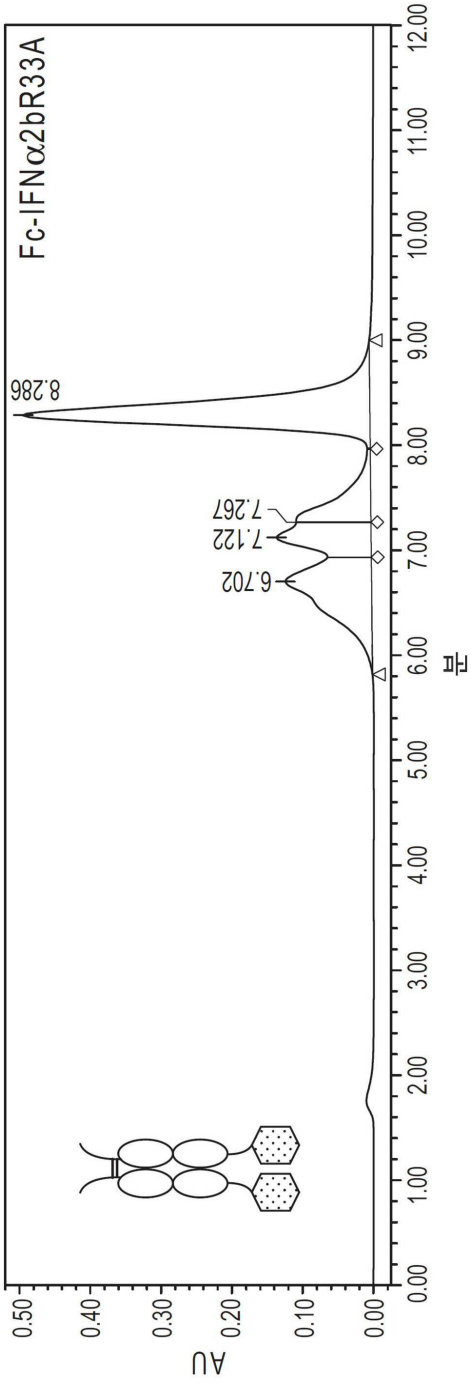
도면5b


IFNα2b
Fc-IFNα2b
IFNα2b-Fc
ISRE-Luc 활성(RLU)
4x10^5
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
-6
재조합 단백질 농도 Log10[M]

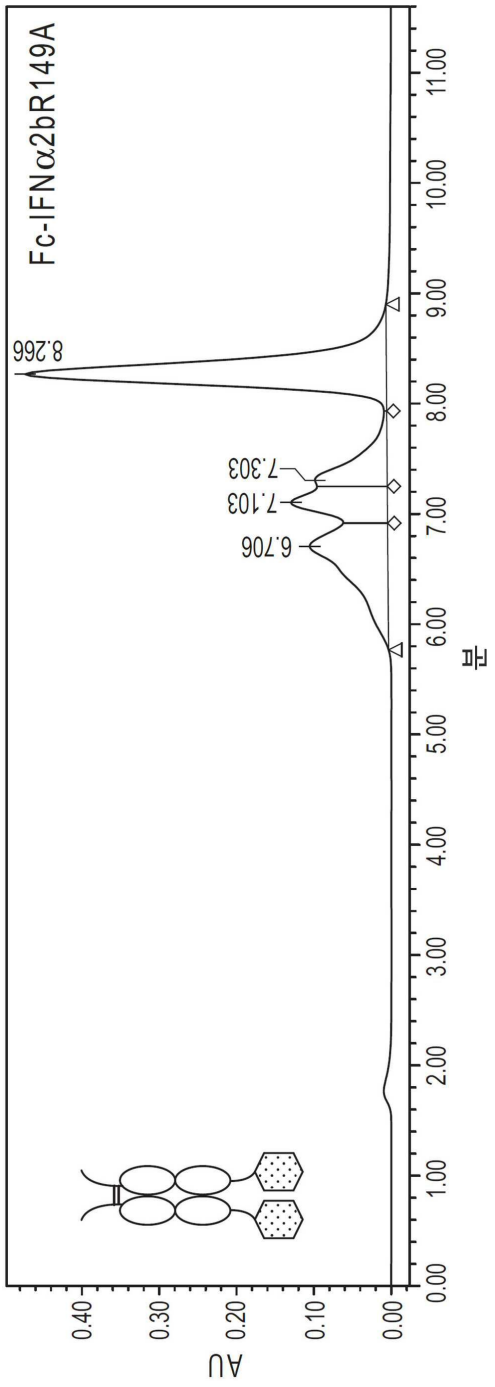
도면5c


5x10^5
4x10^5
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
ISRE-Luc 활성(RLU)
IFNα2b
Fc-IFNα2b
IFNα1
Fc-IFNα1
IFNβ
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
재조합 단백질 농도 Log10[M]

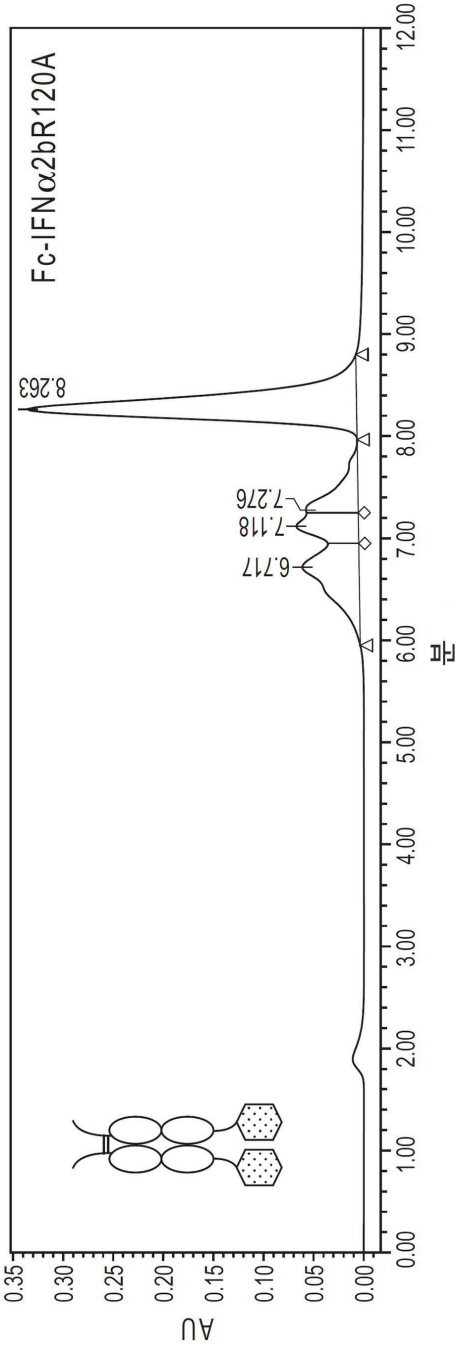
도면6a


Fc-IFNα2bR33A
8.286
7.267
7.122
6.702
AU
0.50
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
분

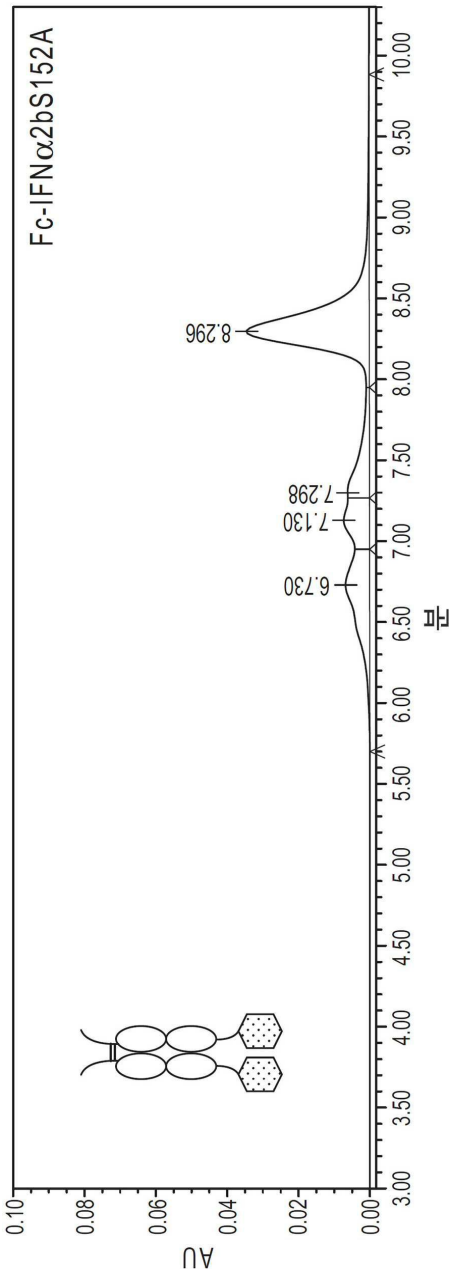
도면6b


Fc-IFNα2bR149A
8.266
7.303
7.103
6.706
AU
0.40
0.30
0.20
0.10
0.00
분
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00

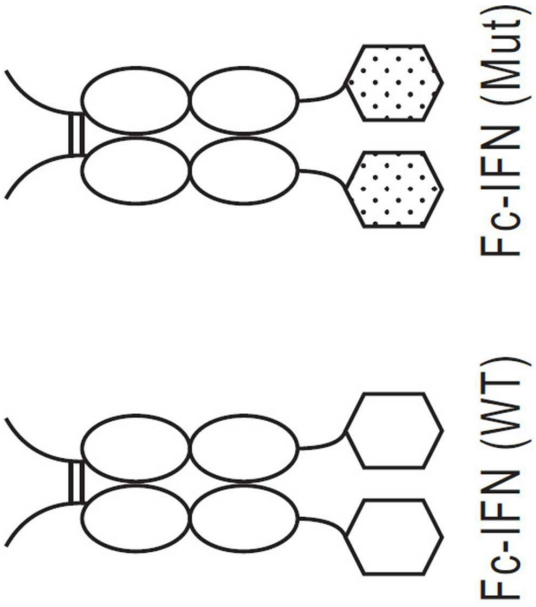
도면6c


Fc-IFNα2bR120A
8.263
7.276
7.118
6.717
AU
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
0.00
1.00
2.00
3.00
4.00
5.00
6.00
7.00
8.00
9.00
10.00
11.00
12.00
분

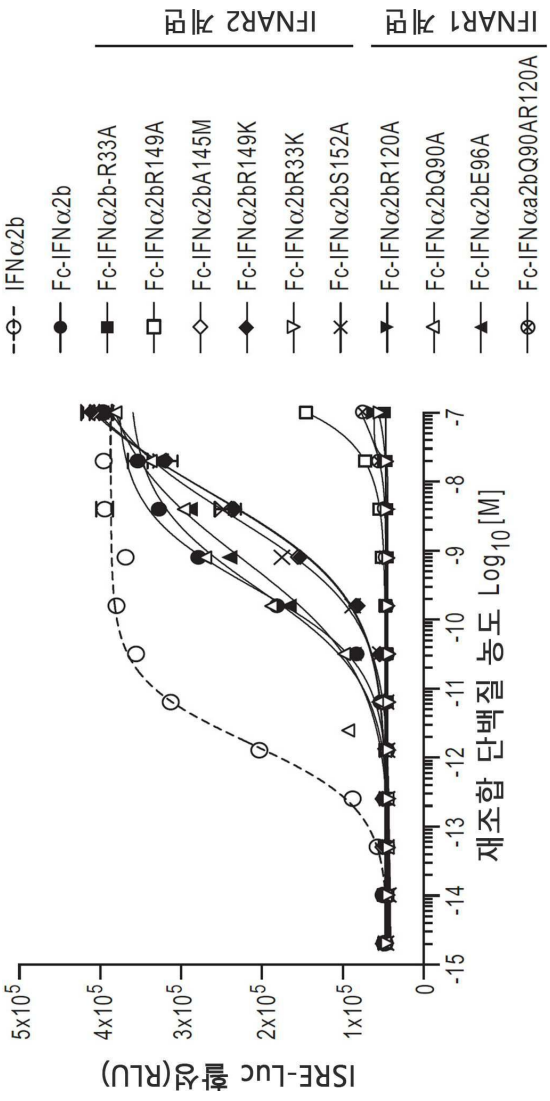
도면6d


Fc-IFNα2bS152A
8.296
7.298
7.130
6.730
AU
분
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
9.00
9.50
10.00

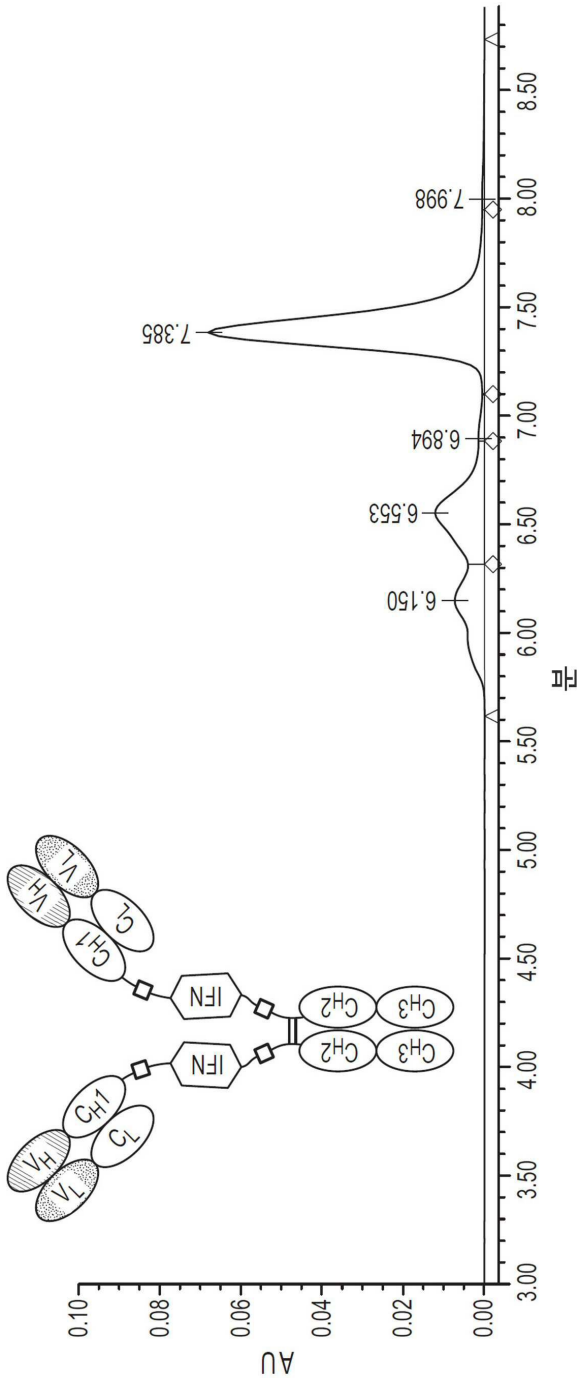
도면7a


Fc-IFN (WT)
Fc-IFN (Mut)

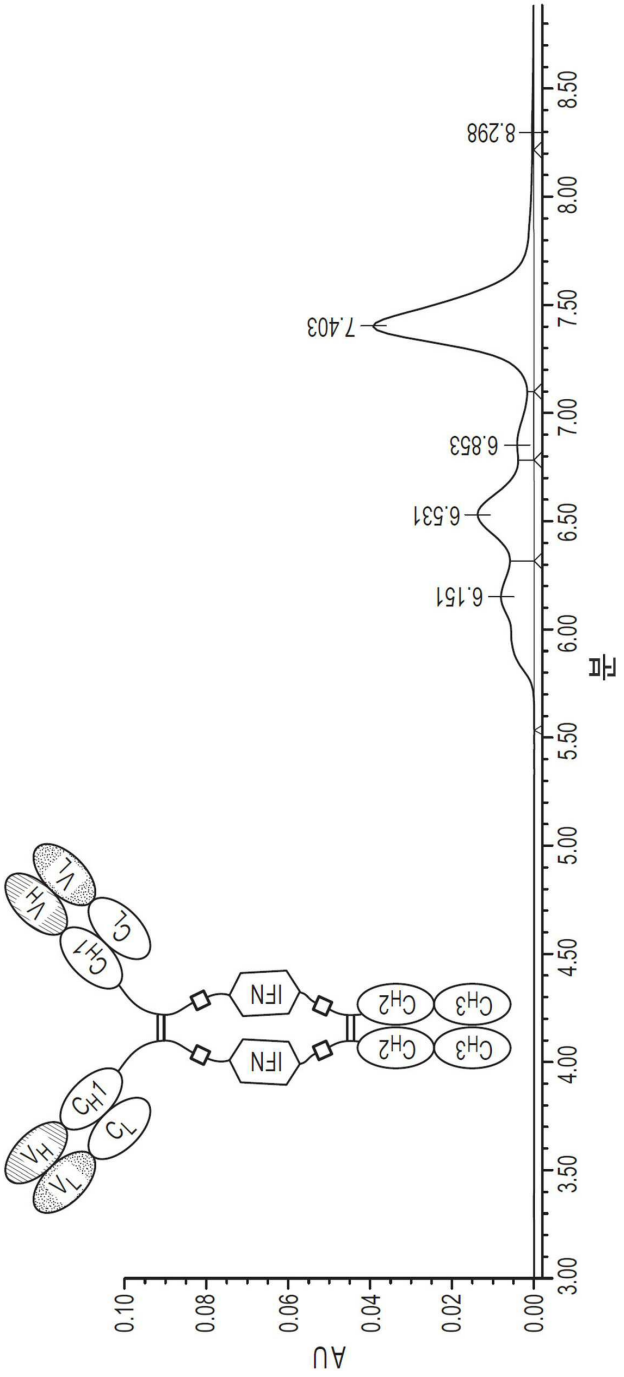
도면7b


ISRE-Luc 활성(RLU)
5x10^5
4x10^5
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
제조합 단백질 농도 Log10[M]
IFNα2b
Fc-IFNα2b
Fc-IFNα2b-R33A
Fc-IFNα2bR149A
Fc-IFNα2bA145M
Fc-IFNα2bR149K
Fc-IFNα2bR33K
Fc-IFNα2bS152A
Fc-IFNα2bR120A
Fc-IFNα2bQ90A
Fc-IFNα2bE96A
Fc-IFNαa2bQ90AR120A
IFNAR2 계면
IFNAR1 계면

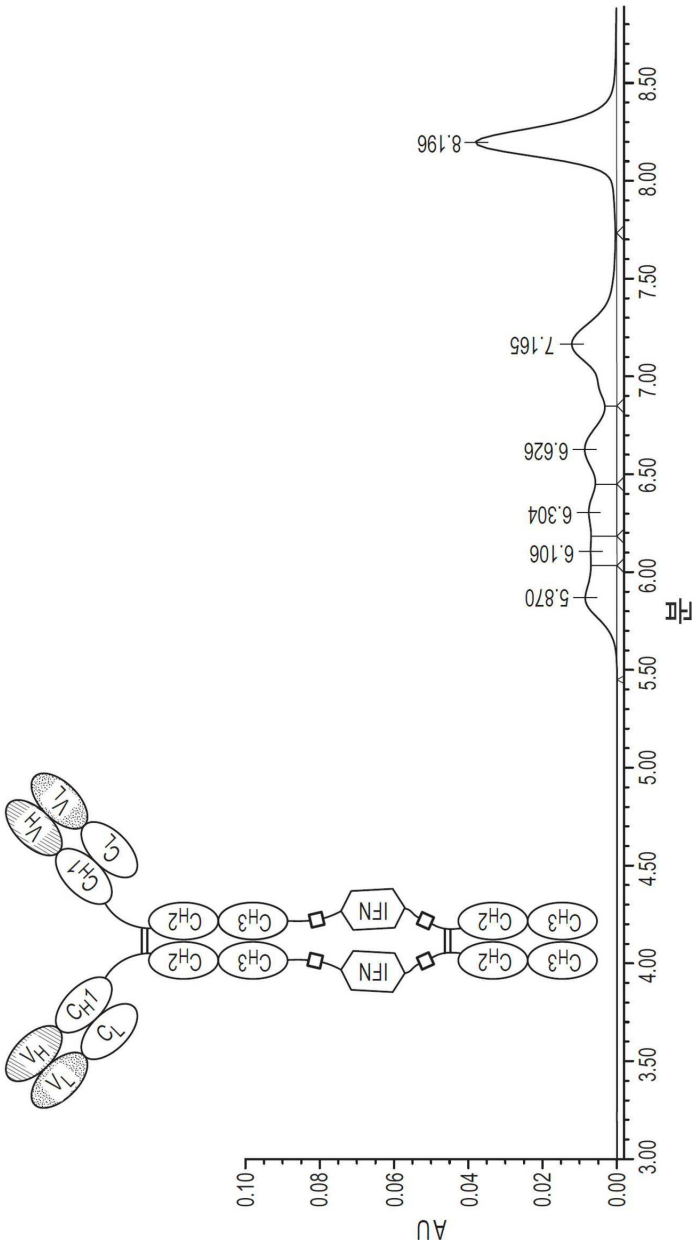
도면8a


7.998
7.385
6.894
6.553
6.150
분
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
AU
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
IFN
IFN
CH2
CH2
CH3
CH3
CH1
CL
VH
VL
VH
VL

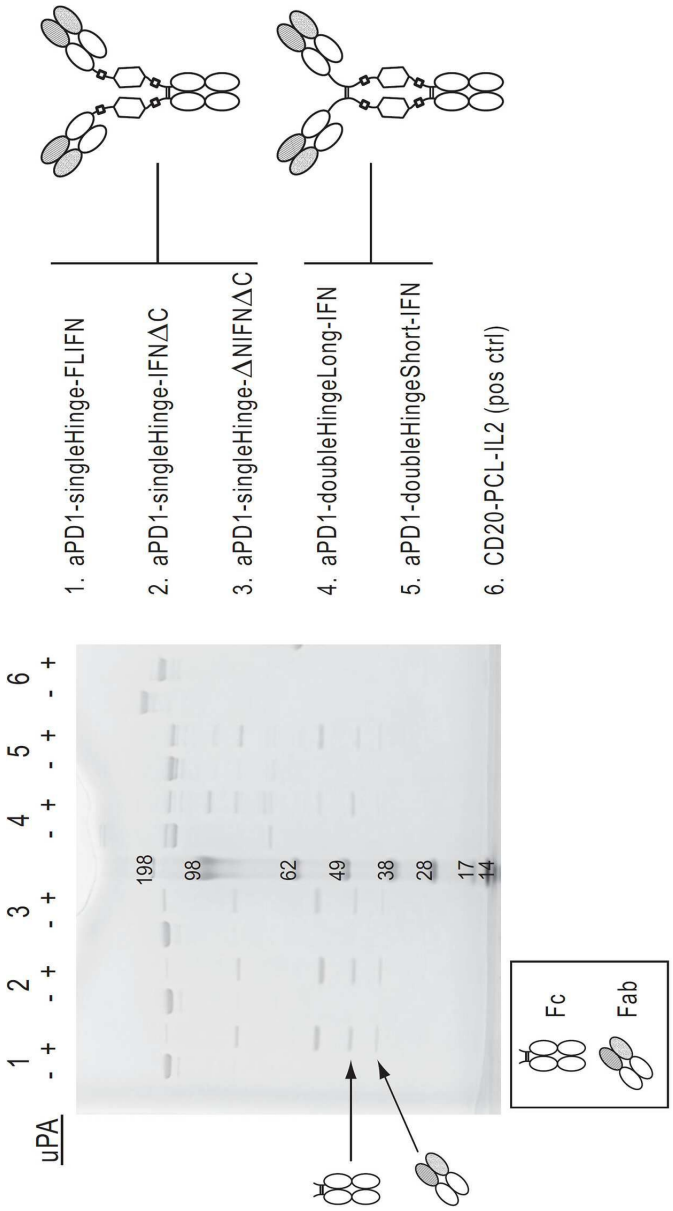
도면8b


8.298
7.403
6.853
6.531
6.151
분
AU
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
IFN
IFN
CH3
CH2
CH3
CH2
CH1
CL
VH
VL
TA
TB
TA
TB

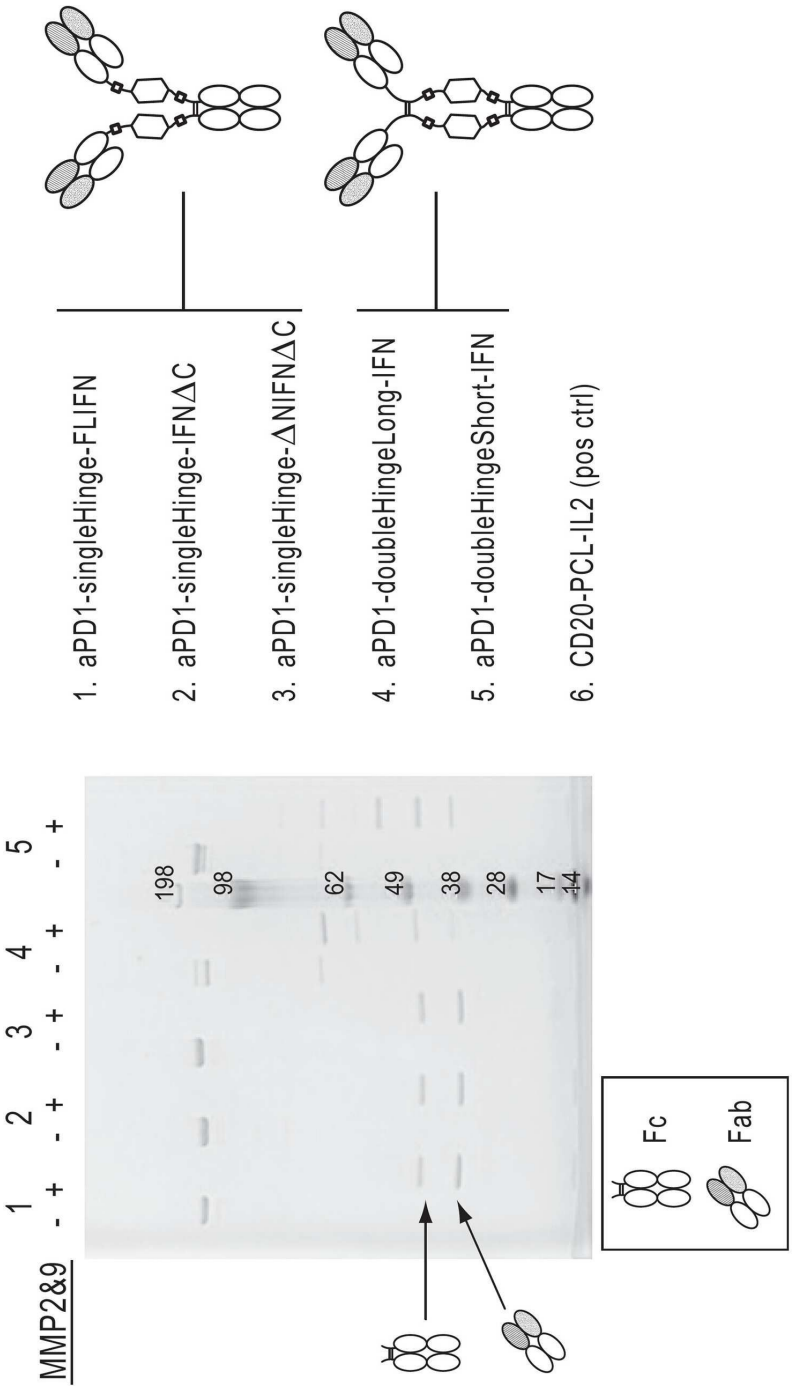
도면8c


8.196
7.165
6.626
6.304
6.106
5.870
분
AU
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
3.00
3.50
4.00
4.50
5.00
5.50
6.00
6.50
7.00
7.50
8.00
8.50
IFN
IFN
CH2
CH3
CH1
CL
VH
VL

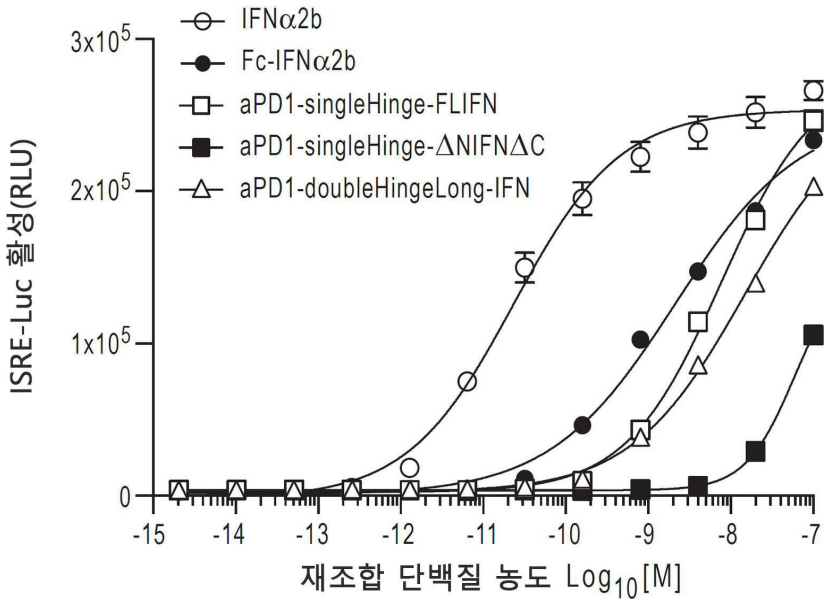
도면9a


1. aPD1-singleHinge-FLIFN
2. aPD1-singleHinge-IFNΔC
3. aPD1-singleHinge-ΔNIFNΔC
4. aPD1-doubleHingeLong-IFN
5. aPD1-doubleHingeShort-IFN
6. CD20-PCL-IL2 (pos ctrl)
uPA
1 2 3 4 5 6
- + - + - + - + - + - +
198
98
62
49
38
28
17
14
Fc
Fab

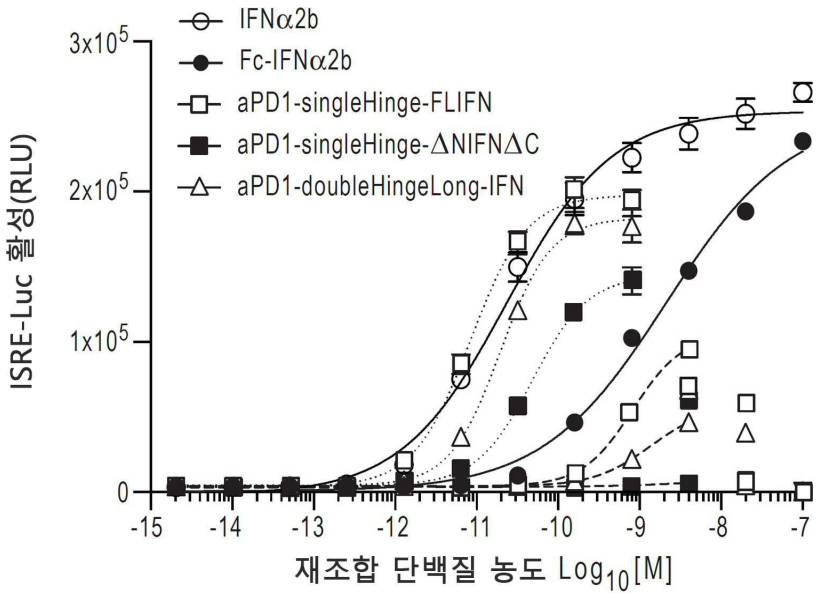
도면9b


1. aPD1-singleHinge-FLIFN
2. aPD1-singleHinge-IFNΔC
3. aPD1-singleHinge-ΔNIFNΔC
4. aPD1-doubleHingeLong-IFN
5. aPD1-doubleHingeShort-IFN
6. CD20-PCL-IL2 (pos ctrl)
MMP2&9
1 2 3 4 5
- + - + - + - + - +
198
98
62
49
38
28
17
14
Fc
Fab

도면10a


IFNα2b
Fc-IFNα2b
aPD1-singleHinge-FLIFN
aPD1-singleHinge-ΔNIFNΔC
aPD1-doubleHingeLong-IFN
ISRE-Luc 활성(RLU)
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
재조합 단백질 농도 Log10[M]

도면10b


IFNα2b
Fc-IFNα2b
aPD1-singleHinge-FLIFN
aPD1-singleHinge-ΔNIFNΔC
aPD1-doubleHingeLong-IFN
ISRE-Luc 활성(RLU)
3x10^5
2x10^5
1x10^5
0
-15
-14
-13
-12
-11
-10
-9
-8
-7
재조합 단백질 농도 Log10[M]

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.