(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0054842
(43) 공개일자 2025년04월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 47/68 (2017.01) *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 47/65 (2017.01) *C07K 16/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 47/6849 (2017.08)
A61K 47/65 (2017.08)
(21) 출원번호 10-2025-7005502
(22) 출원일자(국제) 2023년07월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2025년02월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/071243
(87) 국제공개번호 WO 2024/026474
국제공개일자 2024년02월01일
(30) 우선권주장
63/393,749 2022년07월29일 미국(US)

(71) 출원인
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
장, 보자이
미국 뉴욕 10591 타리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
키팅, 니콜
미국 뉴욕 10591 타리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 광장리앤고

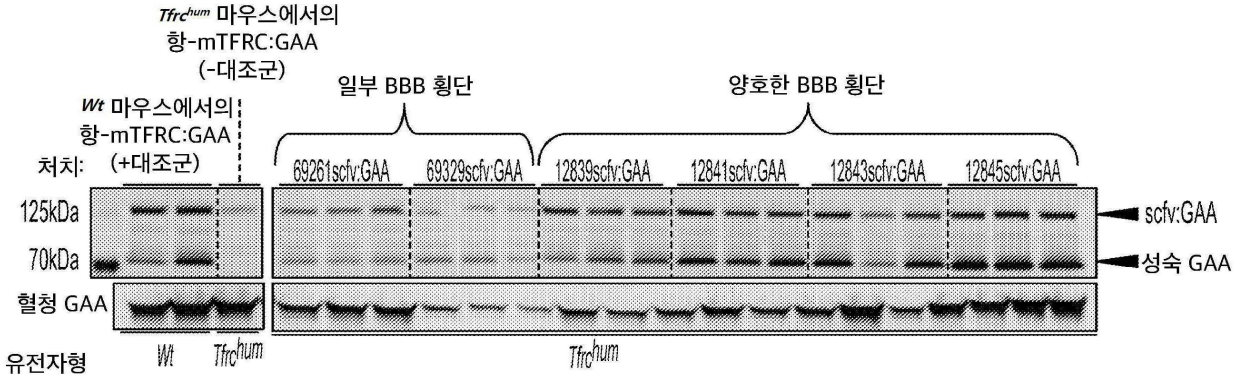
전체 청구항 수 : 총 105 항

(54) 발명의 명칭 **뇌 및 근육으로의 트랜스페린 수용체(TFR)-매개 전달을 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본 발명은 부분적으로, 표적화된 조직(예를 들어, 뇌 또는 근육)에 분자 카고를 전달하기 위한, 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드, 리포좀 또는 지질 나노입자)에 접합된 항-트랜스페린 수용체(예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체) 항원 결합 단백질(예를 들어, scFv, Fab)을 포함하는 단백질-약물 접합체를 제공한다. 다양한 질환 또는 장애, 예컨대 신경 질환 또는 근육 질환을 접합체로 치료하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 47/6807 (2017.08)
C07K 16/2881 (2013.01)
C07K 16/2896 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
C07K 2317/21 (2013.01)
C07K 2317/622 (2013.01)
C07K 2317/76 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2317/94 (2013.01)

(72) 발명자
에임-윌슨, 파스칼린
미국 뉴욕 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
듀간, 존
미국 뉴욕 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
가오, 민
미국 뉴욕 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
밥, 로버트
미국 뉴욕 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
프라가스티스, 마리아
미국 뉴욕 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
시그나, 캐서린
미국 뉴욕 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 트랜스페린 수용체에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하는 단백질-약물 접합체로서, 항원 결합 단백질은 분자 카고(molecular cargo)에 접합되고, 항원 결합 단백질은 약 41 nM의 K_D 또는 더 강한 친화도로 인간 트랜스페린 수용체에 결합하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 항원 결합 단백질이 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 3

제2항에 있어서, 항원 결합 단백질이 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 뮤린 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 1가 Fab', 2가(divalent) Fab2, F(ab)'3 단편, 단일 쇄 가변 단편(scFv), bis-scFv, (scFv)2, 디아바디, 이가(bivalent) 항체, 1-아암(one-armed) 항체, 미니바디, 나노바디, 트리아바디, 테트라바디, 디설파이드 안정화된 Fv 단백질(dsFv), 단일 도메인 항체(sdAb), Ig NAR, 단일 중쇄 항체, 이중특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 이중특이적 T-세포 인게이저(bi-specific T-cell engager; BiTE), 삼중특이적 항체, 또는 이의 화학적으로 변형된 유도체로부터 선택되는, 단백질-약물 접합체.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이 항원 결합 단편 영역(Fab)을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 6

제5항에 있어서, scFv가 N-말단에서 C-말단으로 다음 배향으로 배열된 중쇄 가변 영역(HCVR 또는 V_H) 및 경쇄 가변 영역(LCVR 또는 V_L)을 포함하는, 단백질-약물 접합체: HCVR - LCVR.

청구항 7

제5항에 있어서, scFv가 N-말단에서 C-말단으로 다음 배향으로 배열된 HCVR 및 LCVR을 포함하는, 단백질-약물 접합체: LCVR - HCVR.

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 scFv 가변 영역이 링커에 의해 연결되는, 단백질-약물 접합체.

청구항 9

제8항에 있어서, 링커가 펩티드 링커인, 단백질-약물 접합체.

청구항 10

제9항에 있어서, 펩티드 링커가 $-(GGGGS)_n-$(서열번호 426)을 포함하고; 여기서 n이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10인, 단백질-약물 접합체.

청구항 11

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이 이가 항체를 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 12

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이 1-아암 항체를 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이 약 3 nM의 K_D 또는 더 강한 친화도로 인간 트랜스페린 수용체에 결합하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 14

제13항에 있어서, 항원 결합 단백질이 약 0.45 nM 내지 3 nM의 K_D로 인간 트랜스페린 수용체에 결합하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이

(i) 서열번호 2; 12; 22; 32; 42; 52; 62; 72; 82; 92; 102; 112; 122; 132; 142; 152; 162; 172; 182; 192; 202; 212; 222; 232; 242; 252; 262; 272; 282; 292; 302; 또는 312에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및/또는

(ii) 서열번호 7; 17; 27; 37; 47; 57; 67; 77; 87; 97; 107; 117; 127; 137; 147; 157; 167; 177; 187; 197; 207; 217; 227; 237; 247; 257; 267; 277; 287; 297; 307; 또는 317에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR

을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이

(1) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(2) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(3) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(4) 서열번호 32에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 37 또는 465에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(5) 서열번호 42에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 47에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(6) 서열번호 52에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 57에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(7) 서열번호 62에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함

하는 HCVR; 및 서열번호 67에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(8) 서열번호 72에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 77에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(9) 서열번호 82에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 87에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(10) 서열번호 92에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 97에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(11) 서열번호 102에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 107에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(12) 서열번호 112에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 117에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(13) 서열번호 122에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 127에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(14) 서열번호 132에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 137에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(15) 서열번호 142에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 147에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(16) 서열번호 152에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 157에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(17) 서열번호 162에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 167에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(18) 서열번호 172에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 177에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(19) 서열번호 182에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 187에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(20) 서열번호 192에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 197에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(21) 서열번호 202에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 207에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(22) 서열번호 212에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 217에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(23) 서열번호 222에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 227에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(24) 서열번호 232에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 237에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(25) 서열번호 242에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 247에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(26) 서열번호 252에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 257에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(27) 서열번호 262에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 267에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(28) 서열번호 272에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 277에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(29) 서열번호 282에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 287에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(30) 서열번호 292에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 297에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(31) 서열번호 302에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 307에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; 및/또는

(32) 서열번호 312에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 317에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR

을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이

(a) 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 4에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 5에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 8에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 9에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 10에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(b) 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 14에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 15에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 18에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 19에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 20에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(c) 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 24에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 25에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 28에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 29에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 30에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(d) 서열번호 33에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 34에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 35에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 38에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 39에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 40에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(e) 서열번호 43에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 44에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 45에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 48에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 49에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 50에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(f) 서열번호 53에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 54에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 55에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 58에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 59에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 60에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(g) 서열번호 63에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 64에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 65에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 68에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 69에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 70에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(h) 서열번호 73에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 74에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 75에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 78에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 79에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 80에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(i) 서열번호 83에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 84에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 85에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 88에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 89에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 90에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(j) 서열번호 93에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 94에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 95에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 98에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 99에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 100에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(k) 서열번호 103에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 104에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 105에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 108에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 109에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 110에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(l) 서열번호 113에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 114에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 115에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 118에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 119에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 120에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(m) 서열번호 123에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 124에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 125에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 128에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 129에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 130에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(n) 서열번호 133에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 134에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 135에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 138에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 139에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 140에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(o) 서열번호 143에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 144에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 145에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 148에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 149에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 150에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(p) 서열번호 153에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 154에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 155에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 158에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 159에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 160에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(q) 서열번호 163에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 164에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 165에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 168에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 169에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 170에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(r) 서열번호 173에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 174에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 175에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 178에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 179에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 180에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(s) 서열번호 183에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 184에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 185에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 188에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 189에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 190에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(t) 서열번호 193에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 194에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 195에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 198에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 199에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 200에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(u) 서열번호 203에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 204에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 205에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 208에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 209에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 210에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(v) 서열번호 213에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 214에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 215에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 218에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 219에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 220에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(w) 서열번호 223에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 224에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 225에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 228에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 229에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 230에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(x) 서열번호 233에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 234에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 235에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 238에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 239에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 240에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(y) 서열번호 243에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 244에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 245에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 248에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 249에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 250에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(z) 서열번호 253에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 254에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 255에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 258에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 259에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 260에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(aa) 서열번호 263에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 264에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 265에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 268에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 269에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 270에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(ab) 서열번호 273에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 274에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 275에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 278에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 279에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 280에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(ac) 서열번호 283에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 284에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 285에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 288에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 289에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 290에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(ad) 서열번호 293에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 294에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 295에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 298에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 299에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 300에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(ae) 서열번호 303에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 304에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 305에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 308에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 309에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 310에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR; 및/또는

(af) 서열번호 313에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 314에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 315에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 318에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 319에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 320에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR

을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이

(i) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(ii) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(iii) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(iv) 서열번호 32에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 37에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(v) 서열번호 42에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 47에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(vi) 서열번호 52에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 57에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(vii) 서열번호 62에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 67에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(viii) 서열번호 72에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 77에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(ix) 서열번호 82에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 87에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(x) 서열번호 92에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 97에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xi) 서열번호 102에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 107에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xii) 서열번호 112에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 117에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xiii) 서열번호 122에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 127에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xiv) 서열번호 132에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 137에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xv) 서열번호 142에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 147에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xvi) 서열번호 152에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 157에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xvii) 서열번호 162에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 167에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xviii) 서열번호 172에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 177에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xix) 서열번호 182에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 187에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xx) 서열번호 192에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 197에 제시된 아

미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xxi) 서열번호 202에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 207에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xxii) 서열번호 212에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 217에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xxiii) 서열번호 222에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 227에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xxiv) 서열번호 232에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 237에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xxv) 서열번호 242에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 247에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xxvi) 서열번호 252에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 257에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xxvii) 서열번호 262에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 267에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xxviii) 서열번호 272에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 277에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xxix) 서열번호 282에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 287에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xxx) 서열번호 292에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 297에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(xxxi) 서열번호 302에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 307에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; 및/또는

(xxxii) 서열번호 312에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 317에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR

을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 19

제1항 내지 제4항 및 제11항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이

i. 서열번호 329에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 328에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

ii. 서열번호 331에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 330에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

iii. 서열번호 333에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 332에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

iv. 서열번호 335에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 334에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

v. 서열번호 337에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 336에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

vi. 서열번호 339에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 338에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

vii. 서열번호 341에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 340에 제시

된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

viii. 서열번호 343에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 342에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

ix. 서열번호 345에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 344에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

x. 서열번호 347에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 346에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xi. 서열번호 349에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 348에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xii. 서열번호 351에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 350에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xiii. 서열번호 353에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 352에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xiv. 서열번호 355에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 354에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xv. 서열번호 357에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 356에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xvi. 서열번호 359에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 358에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xvii. 서열번호 361에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 360에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xviii. 서열번호 363에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 362에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xix. 서열번호 365에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 364에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xx. 서열번호 367에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 366에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxi. 서열번호 369에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 368에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxii. 서열번호 371에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 370에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxiii. 서열번호 373에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 372에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxiv. 서열번호 375에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 374에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxv. 서열번호 377에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 376에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxvi. 서열번호 379에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 378에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxvii. 서열번호 381에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 380에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxviii. 서열번호 383에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 382에 제

시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxix. 서열번호 385에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 384에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxx. 서열번호 387에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 386에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxxi. 서열번호 389에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 388에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; 또는

xxxii. 서열번호 391에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 390에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄

를 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 20

제1항 내지 제3항 및 제11항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이

i. 서열번호 543에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 328에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

ii. 서열번호 544에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 330에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

iii. 서열번호 545에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 332에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

iv. 서열번호 546에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 334에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

v. 서열번호 547에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 336에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

vi. 서열번호 548에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 338에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

vii. 서열번호 549에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 340에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

viii. 서열번호 550에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 342에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

ix. 서열번호 551에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 344에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

x. 서열번호 552에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 346에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xi. 서열번호 553에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 348에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xii. 서열번호 554에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 350에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xiii. 서열번호 555에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 352에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xiv. 서열번호 556에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 354에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xv. 서열번호 557에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 356에 제시된 아미

노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xvi. 서열번호 558에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 358에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xvii. 서열번호 559에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 360에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xviii. 서열번호 560에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 362에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xix. 서열번호 561에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 364에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xx. 서열번호 562에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 366에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxi. 서열번호 563에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 368에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxii. 서열번호 564에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 370에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxiii. 서열번호 565에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 372에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxiv. 서열번호 566에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 374에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxv. 서열번호 567에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 376에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxvi. 서열번호 568에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 378에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxvii. 서열번호 569에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 380에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxviii. 서열번호 570에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 382에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxix. 서열번호 571에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 384에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxx. 서열번호 572에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 386에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

xxxi. 서열번호 573에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 388에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; 또는

xxxii. 서열번호 574에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 390에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄

를 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 21

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이

(1) 서열번호 132에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 137에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(2) 서열번호 172에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 177에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(3) 서열번호 222에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 227에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(4) 서열번호 242에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 247에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

(5) 서열번호 262에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 267에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; 또는

(6) 서열번호 272에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 277에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR

을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 22

제1항 내지 제17항 및 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이

(a) 서열번호 133에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 134에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 135에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 138에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 139에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 140에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(b) 서열번호 173에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 174에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 175에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 178에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 179에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 180에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(c) 서열번호 223에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 224에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 225에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 228에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 229에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 230에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(d) 서열번호 243에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 244에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 245에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 248에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 249에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 250에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR;

(e) 서열번호 263에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 264에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 265에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 268에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 269에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 270에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR; 또는

(f) 서열번호 273에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

서열번호 274에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

서열번호 275에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

을 포함하는 HCVR; 및

서열번호 278에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

서열번호 279에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

서열번호 280에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

을 포함하는 LCVR

을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 23

제1항 내지 제18항, 제21항 및 제22항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 서열번호 132에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 137에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(ii) 서열번호 172에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 177에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(iii) 서열번호 222에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 227에 제시된 아

미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(iv) 서열번호 242에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 247에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

(v) 서열번호 262에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 267에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; 또는

(vi) 서열번호 272에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 277에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR

을 포함하는 단백질-약물 접합체.

청구항 24

제1항 내지 제4항 및 제11항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이

(A) 서열번호 355에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 354에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

(B) 서열번호 363에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 362에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

(C) 서열번호 373에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 372에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

(D) 서열번호 377에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 376에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

(E) 서열번호 381에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 380에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; 또는

(F) 서열번호 383에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 382에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄

를 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 25

제1항 내지 제4항 및 제11항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이

(I) 서열번호 556에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 354에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

(II) 서열번호 560에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 362에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

(III) 서열번호 565에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 372에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

(IV) 서열번호 367에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 376에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄;

(V) 서열번호 569에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 380에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; 또는

(VI) 서열번호 570에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 382에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄

를 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이 표 1-1에 제시된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍

을 포함하는 항체와 동일한 인간 트랜스페린 수용체 상의 에피토프에 결합하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 27

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이 인간 트랜스페린 수용체에 대한 결합에 대해, 표 1-1에 제시된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍을 포함하는 항체와 경쟁하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 28

인간 트랜스페린 수용체(hTfR)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하는 단백질-약물 접합체로서, 항원 결합 단백질은 분자 카고에 접합되고 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음으로부터 선택된 hTfR의 하나 이상의 에피토프에 결합하는, 단백질-약물 접합체:

a. 서열 LLNE(서열번호 529)를 포함하는 에피토프 및/또는 서열 TYKEL(서열번호 509)을 포함하는 에피토프;

b. 서열 DSTDFTGT(서열번호 530)를 포함하는 에피토프 및/또는 서열 VKHPVTGQF(서열번호 531)를 포함하는 에피토프 및/또는 서열 IERIPEL(서열번호 532)을 포함하는 에피토프;

c. 서열 LNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 533)을 포함하는 에피토프;

d. 서열 FEDL(서열번호 521)을 포함하는 에피토프;

e. 서열 IVDKNGRL(서열번호 534)을 포함하는 에피토프;

f. 서열 IVDKNGRLVY(서열번호 535)를 포함하는 에피토프;

g. 서열 DQTKF(서열번호 536)를 포함하는 에피토프;

h. 서열 LVENPGGY(서열번호 537)를 포함하는 에피토프 및/또는 서열 PIVNAELSF(서열번호 538)를 포함하는 에피토프 및/또는 서열 PYLGTTMDT(서열번호 539)를 포함하는 에피토프;

i. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDENLAL(서열번호 507)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 IYMDQTKFPIVNAEL(서열번호 508)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 TYKEL(서열번호 509)을 포함하는 에피토프;

j. 서열 KRKLSEKLDSTDFTGTIKL(서열번호 510)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 YTLIEKTMQNVKHPVTGQFL(서열번호 511)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 LIERIPELNKVARAAAE(서열번호 512)를 포함하는 에피토프;

k. 서열 LNENSYVPREAGSQKDENL(서열번호 513)을 포함하는 에피토프;

l. 서열 GTKKDFEDL(서열번호 514)을 포함하는 에피토프;

m. 서열 SVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSK(서열번호 515)를 포함하는 에피토프;

n. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 516)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 DQTKFPIVNAEL(서열번호 517)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 TYKELIERIPELNK(서열번호 518)를 포함하는 에피토프;

o. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 516)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 TYKELIERIPELNK(서열번호 518)를 포함하는 에피토프;

p. 서열 SVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAY(서열번호 519)를 포함하는 에피토프;

q. 서열 IYMDQTKFPIVNAEL(서열번호 508)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 FGNMEGDCPSDWKTDSTCRM(서열번호 520)을 포함하는 에피토프;

r. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDENLAL(서열번호 507)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 LVENPGGYVAYSKAATVTGKL(서열번호 522)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 IYMDQTKFPIVNAELSF(서열번호 523)를 포함하는 에피토프 및/또는 서열 ISRAAAEKL(서열번호 524)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 VTSESKNVKLTVSNVLKE(서열번호 525)를 포함하는 에피토프 및/또는 서열 FCEDTDYPYLGTTMDT(서열번호 526)를 포함하는 에피토프;

s. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDENLAL(서열번호 507) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 IYMDQTKFPIVNAEL(서열번호 508) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 TYKEL(서열번호 509) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

t. 서열 KRKLSEKLDSTDFTGTIKL(서열번호 510) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열

YTLIEKTMQNVKHPVTGQFL(서열번호 511) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 LIERIPELNKVARAAAE(서열번호 512) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

u. 서열 LNENSYVPREAGSQKDENL(서열번호 513) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

v. 서열 GTKKDFEDL(서열번호 514) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

w. 서열 SVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSK(서열번호 515) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

x. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 516) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 DQTKFPIVNAEL(서열번호 517) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 TYKELIERIPELNK(서열번호 518) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

y. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 516) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 TYKELIERIPELNK(서열번호 518) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

z. 서열 SVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAY(서열번호 519) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

aa. 서열 IYMDQTKFPIVNAEL(서열번호 508) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 FGNMEGDCPSDWKTDSTCRM(서열번호 520) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프; 및

bb. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDENLAL(서열번호 507) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 LVENPGGYVAYSKAATVTGKL(서열번호 522) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 IYMDQTKFPIVNAELSF(서열번호 523) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 ISRAAAEKL(서열번호 524) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 VTSESKNVKLTVSNVLKE(서열번호 525) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 FCEDTDYPYLGTTMDT(서열번호 526) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프.

청구항 29

제28항에 있어서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 다음으로부터 선택된 hTfR의 하나 이상의 에피토프에 결합하는, 단백질-약물 접합체:

a. 서열 LLNE(서열번호 529)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 TYKEL(서열번호 509)로 이루어지는 에피토프;

b. 서열 DSTDFTGT(서열번호 530)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 VKHPVTGQF(서열번호 531)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 IERIPEL(서열번호 532)로 이루어지는 에피토프;

c. 서열 LNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 533)으로 이루어지는 에피토프;

d. 서열 FEDL(서열번호 521)로 이루어지는 에피토프;

e. 서열 IVDKNGRL(서열번호 534)로 이루어지는 에피토프;

f. 서열 IVDKNGRLVY(서열번호 535)로 이루어지는 에피토프;

g. 서열 DQTKF(서열번호 536)로 이루어지는 에피토프;

h. 서열 LVENPGGY(서열번호 537)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 PIVNAELSF(서열번호 538)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 PYLGTTMDT(서열번호 539)로 이루어지는 에피토프;

i. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDENLAL(서열번호 507)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 IYMDQTKFPIVNAEL(서열번호 508)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 TYKEL(서열번호 509)로 이루어지는 에피토프;

j. 서열 KRKLSEKLDSTDFTGTIKL(서열번호 510)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 YTLIEKTMQNVKHPVTGQFL(서열번호 511)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 LIERIPELNKVARAAAE(서열번호 512)로 이루어지는 에피토프;

k. 서열 LNENSYVPREAGSQKDENL(서열번호 513)로 이루어지는 에피토프;

l. 서열 GTKKDFEDL(서열번호 514)로 이루어지는 에피토프;

m. 서열 SVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSK(서열번호 515)로 이루어지는 에피토프;

n. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 516)으로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 DQTKFPIVNAEL(서열번호

517)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 TYKELIERIPELNK(서열번호 518)로 이루어지는 에피토프;

o. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 516)으로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 TYKELIERIPELNK(서열번호 518)로 이루어지는 에피토프;

p. 서열 SVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAY(서열번호 519)로 이루어지는 에피토프;

q. 서열 IYMDQTKFPIVNAEL(서열번호 508)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 FGNMEGDCPSDWKTDSTCRM(서열번호 520)으로 이루어지는 에피토프; 및

r. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDENLAL(서열번호 507)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 LVENPGGYVAYSKAATVTGKL(서열번호 522)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 IYMDQTKFPIVNAELSF(서열번호 523)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 ISRAAAEKL(서열번호 524)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 VTSESKNVKLTVSNVLKE(서열번호 525)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 FCEDTDYPYLGTTMDT(서열번호 526)로 이루어지는 에피토프.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 항원 결합 단백질이 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 뮤린 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 1가 Fab', 2가 Fab2, F(ab)'3 단편, 단일 쇄 가변 단편(scFv), bis-scFv, (scFv)2, 디아바디, 이가 항체, 1-아암 항체, 미니바디, 나노바디, 트리아바디, 테트라바디, 디설파이드 안정화된 Fv 단백질(dsFv), 단일 도메인 항체(sdAb), Ig NAR, 단일 중쇄 항체, 이중특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 이중특이적 T-세포 인게이저(BiTE), 삼중특이적 항체, 또는 이의 화학적으로 변형된 유도체로부터 선택되는, 단백질-약물 접합체.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자 카고가

(i) 항원 결합 단백질의 HCVR,

(ii) 항원 결합 단백질의 LCVR,

(iii) 항원 결합 단백질의 중쇄, 및/또는

(iv) 항원 결합 단백질의 경쇄

에 접합되는, 단백질-약물 접합체.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 분자 카고가 글루타민 잔기 및/또는 라이신 잔기를 통해 항원 결합 단백질에 접합되는, 단백질-약물 접합체.

청구항 33

제32항에 있어서, 글루타민 잔기가

(i) 항원 결합 단백질의 중쇄의 N-말단 및/또는 C-말단에 도입되고/되거나,

(ii) 항원 결합 단백질의 경쇄의 N-말단 및/또는 C-말단에 도입되고/되거나,

(iii) 항원 결합 단백질의 CH2 또는 CH3 도메인에 자연적으로 존재하고/하거나,

(iv) 하나 이상의 아미노산을 변형시킴으로써 항원 결합 단백질에 도입되고/되거나,

(v) Q295이거나, N297로부터 Q297로 돌연변이된 것인(N297Q), 단백질-약물 접합체.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, 항원 결합 단백질이 글루타민-함유 태그를 포함하고, 분자 카고가 글루타민-함유 태그의 글루타민 잔기를 통해 항원 결합 단백질에 접합되는, 단백질-약물 접합체.

청구항 35

제34항에 있어서, 글루타민-함유 태그가 LLQGG(서열번호 439), LLQG(서열번호 440), LSLSQG(서열번호 441), gGGLLQGG(서열번호 442), gLLQG(서열번호 443), LLQ(서열번호 444), gSPLAQSHGG(서열번호 445), gLLQGGG(서열번호 446), gLLQGG(서열번호 447), gLLQ(서열번호 448), LLQLLQGA(서열번호 449), LLQGA(서열번호 450), LLQYQGA(서열번호 451), LLQGSG(서열번호 452), LLQYQG(서열번호 453), LLQLLQG(서열번호 454), SLLQG(서열번호 455), LLQLQ(서열번호 456), LLQLLQ(서열번호 457) 및 LLQGR(서열번호 458)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 항원 결합 단백질 및 상기 분자 카고가 링커를 통해 접합되는, 단백질-약물 접합체.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 분자 카고가 폴리뉴클레오티드 분자, 담체 또는 소분자를 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 분자 카고가 폴리뉴클레오티드 분자를 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 39

제38항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 분자가 간섭 핵산 분자, 가이드 RNA, 리보자임, 압타머, 믹스머(mixmer), 멀티머(multimer) 또는 mRNA인, 단백질-약물 접합체.

청구항 40

제39항에 있어서, 간섭 핵산 분자가 siRNA, shRNA, miRNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드 또는 갭머인, 단백질-약물 접합체.

청구항 41

제40항에 있어서, 간섭 핵산이 siRNA인, 단백질-약물 접합체.

청구항 42

제40항에 있어서, siRNA가 *DMPK*, *CNBP*, *디스트로핀*(*Dystrophin*), *DUX4*, *ApoE*, *MAPT*, *APP*, *HTT*, *SOD1*, *C9orf72*, *SNCA*, *LRRK2*, *PRNP*, *SLC5A1*, *SLC16A3*, *HDAC6*, *MMP27*, *MFAP5*, *FAM64A*, *BAIAP3*, *MYH7*, *TPM1*, *RBM20*, *KLHL24*, *MYL2* 또는 *TNNT2* 유전자, 또는 이의 돌연변이체를 억제하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 43

제41항 또는 제42항에 있어서, siRNA가 21개의 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 44

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, siRNA가 23개의 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 45

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, siRNA가 센스 가닥의 5' 단부에서 제1 및 제2 뉴클레오시드간 연결에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 46

제41항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, siRNA가 안티센스 가닥의 3' 및/또는 5' 단부에서 제1 및 제2 뉴

클레오시드간 연결에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 47

제40항에 있어서, 간섭 핵산이 안티센스 올리고뉴클레오티드인, 단백질-약물 접합체.

청구항 48

제39항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 분자가 가이드 RNA인, 단백질-약물 접합체.

청구항 49

제39항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 분자가 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함하는, 단백질-약물 접합체,

청구항 50

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 분자 카고가 담체를 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 51

제50항에 있어서, 분자 카고가 지질 기반 담체를 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 52

제51항에 있어서, 지질 기반 담체가 지질 나노입자(LNP), 리포좀, 리피도이드(lipidoid) 또는 리포플렉스(lipoplex)인, 단백질-약물 접합체.

청구항 53

제52항에 있어서, 지질 기반 담체가 LNP인, 단백질-약물 접합체.

청구항 54

제53항에 있어서, LNP가 폴리뉴클레오티드 분자 및/또는 폴리펩티드 분자를 추가로 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, LNP가 유전자 편집 시스템의 하나 이상의 구성요소를 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 56

제55항에 있어서, LNP가

(a) Cas 뉴클레아제, 또는 Cas 뉴클레아제를 인코딩하는 핵산, 및/또는

(b) 가이드 RNA, 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA

를 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 57

제56항에 있어서, Cas 뉴클레아제가 Cas9 단백질인, 단백질-약물 접합체.

청구항 58

제57항에 있어서, Cas9 단백질이 *스트렙토코쿠스 파이오제네스*(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 단백질, *스타필로코쿠스 아우레우스*(*Staphylococcus aureus*) Cas9 단백질, *캄필로박터 제주니*(*Campylobacter jejuni*) Cas9 단백질, *스트렙토코쿠스 써모필루스*(*Streptococcus thermophilus*) Cas9 단백질 또는 *나이세리아 메닌지티디스*(*Neisseria meningitidis*) Cas9 단백질로부터 유래되는, 단백질-약물 접합체.

청구항 59

제56항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산이 포유류 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화되는, 단백질-약물 접합체.

청구항 60

제59항에 있어서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산이 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화되는, 단백질-약물 접합체.

청구항 61

제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, Cas 뉴클레아제를 인코딩하는 핵산이 mRNA를 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 62

제39항 및 제56항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 가이드 RNA가 단일 가이드 RNA(sgRNA)인, 단백질-약물 접합체.

청구항 63

제55항에 있어서, LNP가 징크 핑거(zinc finger) 뉴클레아제(ZFN) 또는 전사 활성화인자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)를 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 64

제53항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 지질 나노입자가 양이온성 지질, 중성 지질, 헬퍼(helper) 지질 및 스텔스(stealth) 지질을 포함하는, 단백질-약물 접합체.

청구항 65

제64항에 있어서, 중성 지질이 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC)인, 단백질-약물 접합체.

청구항 66

제64항 또는 제65항에 있어서, 헬퍼 지질이 콜레스테롤인, 단백질-약물 접합체.

청구항 67

제64항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 스텔스 지질이 PEG2k-DMG인, 단백질-약물 접합체.

청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이, 분자 카고에 접합하지 않을 때, 이러한 항원 결합 단백질의 부재 하에 발생하는 인간 홀로-트랜스페린(holo-transferrin)에 대한 인간 트랜스페린 수용체 C-말단 단편의 결합의 50% 초과를 차단하지 않는, 단백질-약물 접합체.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 차단이, His6-myc-myc 태그에 융합된 인간 트랜스페린 수용체 세포외 도메인을 상기 항원 결합 단백질에 사전-결합시킨 다음에, 플레이트에 결합된 항-홀로-트랜스페린 항체의 결합에 의해 플레이트의 표면에 고정화된 홀로-트랜스페린과 접촉시키는, 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA) 플레이트 검정에서 측정되는 바와 같은, 단백질-약물 접합체.

청구항 70

제68항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질의 부재 하에 홀로-트랜스페린과 인간 트랜스페린 수용체 세포외 도메인의 결합이 약 300 pM 인간 트랜스페린 수용체 세포외 도메인의 농도에서 측정되는, 단백질-약물 접합체.

청구항 71

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 결합 단백질이 다음 특징 중 하나 이상을 갖는, 단백질-약물 접합체:

a. 표면 플라즈몬 공명 포맷에서, 25℃에서, 원숭이 TfR에 대한 결합에 대한, 약 0 nM(검출 가능한 결합 없음)의 친화도(K_D) 또는 그보다 높은 친화도;

b. 표면 플라즈몬 공명 포맷에서, 25℃에서, 0 내지 278의 [원숭이 TfR에 대한 결합에 대한 K_D / 인간 TfR에 대한 결합에 대한 K_D]의 비;

c. Fab 포맷(IgG1)일 때, 인간 홀로-Tf에 대한 hTfR 결합을 약 3 내지 13% 차단함;

d. scFv(V_K-V_H) 포맷일 때, 인간 홀로-Tf에 대한 hTfR의 결합을 약 6 내지 13% 차단함; 및/또는

e. scFv(V_H-V_L) 포맷일 때, 인간 홀로-Tf에 대한 hTfR의 결합을 약 11 내지 26% 차단함.

청구항 72

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항의 단백질-약물 접합체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물.

청구항 73

추가 치료제와 함께 제1항 내지 제70항 중 어느 한 항의 단백질-약물 접합체 또는 이의 약학 조성물을 포함하는 조성물 또는 키트.

청구항 74

제73항에 있어서, 추가 치료제가 알글루코시다아제 알파(alglucosidase alfa), 리툭시맙, 메토트렉세이트, 정맥내 면역글로불린(IVIG), 아발글루코시다아제 알파(avalglucosidase alfa), 레발부테롤(levalbuterol), 항생제, 코르티손, 프레드니손, 비스포스포네이트 및 팔리비주맙으로부터 선택되는, 조성물 또는 키트.

청구항 75

제73항 또는 제74항에 있어서, 추가 치료제가 베타2-아드레날린 작용제, 스테로이드, 비스포스포네이트, 감염성 질환 치료제, 백신 및 폐렴구균(Pneumococcal) 백신으로부터 선택되는, 조성물 또는 키트.

청구항 76

인간 트랜스페린 수용체 폴리펩티드 또는 이의 단편에 결합된 제1항 내지 제70항 중 어느 한 항의 단백질-약물 접합체를 포함하는 복합체.

청구항 77

(a) 항원 결합 단백질을 분자 카고에 접합시키기에 유리한 조건 하에 항원 결합 단백질을 분자 카고와 접촉시키는 단계; 및

(b) 선택적으로, 단계 (a)에서 생산한 단백질-약물 접합체를 단리하는 단계

를 포함하는, 제1항 내지 제70항 중 어느 한 항의 단백질-약물 접합체를 제조하는 방법.

청구항 78

제77항의 방법의 생성물인 단백질-약물 접합체.

청구항 79

제1항 내지 제70항 및 제78항 중 어느 한 항의 단백질-약물 접합체를 포함하는 용기(vessel) 또는 주사 장치.

청구항 80

단백질-약물 접합체를 대상체의 신체 내로 도입하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제70항 및 제78항 중 어느 한 항의 단백질-약물 접합체를 대상체에게 투여하는 방법.

청구항 81

제80항에 있어서, 상기 단백질-약물 접합체가 비경구로 대상체의 신체 내로 도입되는, 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, 상기 단백질-약물 접합체가 정맥내로 대상체의 신체 내로 도입되는, 방법.

청구항 83

제80항에 있어서, 상기 단백질-약물 접합체가 중추신경계 내로의 척추강내, 뇌실내 또는 실질내 주사를 통해 대상체의 신체 내로 도입되는, 방법.

청구항 84

제1항 내지 제70항 및 제78항 중 어느 한 항의 단백질-약물 접합체의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환 또는 장애의 치료 또는 예방이 필요한 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하거나 예방하는 방법.

청구항 85

제84항에 있어서, 질환 또는 장애가 리소좀 축적 질환 및 장애, 심장 질환 또는 장애, 중추신경계(CNS) 질환 또는 장애, 눈 질환 또는 장애, 뇌 질환 또는 장애, 척수 질환 또는 장애, 말초신경계(PNS) 질환 또는 장애, 근육 질환 또는 장애, 연골 질환 또는 장애, 뼈 성장판 질환 또는 장애, 신장 질환 또는 장애, 또는 혈액 질환 또는 장애인, 방법.

청구항 86

제84항에 있어서, 질환 또는 장애가 신경 질환 또는 장애인, 방법.

청구항 87

제86항에 있어서, 신경 질환 또는 장애가 리소좀 축적 질환, 아밀로이드증, 신경병증, 신경변성 질환, 발작(seizure), 행동 장애, 백질이영양증, 신경정신 질환, 외상성 뇌 손상, 신경발달 질환, 신경근 질환, 안 질환 또는 장애, 바이러스 또는 미생물 감염, 염증, 허혈 및 암인, 방법.

청구항 88

제84항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 장애가 리소좀 축적 질환인, 방법.

청구항 89

제87항에 있어서, 신경변성 질환이 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 근위축성 측색 경화증, 파킨슨병(Parkinson's disease) 또는 프리온 질환인, 방법.

청구항 90

제89항에 있어서, 단백질-약물 접합체의 분자 카고가, *ApoE*, *MAPT*, *APP*, *HTT*, *SOD1*, *C9orf72*, *SNCA*, *LRRK2* 또는 *PRNP* 유전자 또는 이의 돌연변이체를 억제하는 siRNA로 이루어진 군으로부터 선택된 siRNA인, 방법.

청구항 91

제85항에 있어서, 질환 또는 장애가 심장 질환 또는 장애인, 방법.

청구항 92

제91항에 있어서, 심장 질환 또는 장애가 심부전인, 방법.

청구항 93

제92항에 있어서, 단백질-약물 접합체의 분자 카고가 *SLC5A1*, *SLC16A3*, *HDAC6*, *MMP27*, *MFAP5*, *FAM64A*, *BAIAP3*, *MYH7*, *TPM1*, *RBM20*, *KLHL24*, *MYL2* 또는 *TNNT2* 유전자 또는 이의 돌연변이체를 억제하는 siRNA로 이루어진 군으로부터 선택된 siRNA인, 방법.

청구항 94

제85항에 있어서, 질환 또는 장애가 근육 질환 또는 장애인, 방법.

청구항 95

제94항에 있어서, 근육 질환 또는 장애가 근긴장성 이영양증, 듀시엔 근이영양증, 안면견갑상완 근이영양증, 1형 안면견갑상완 근이영양증 또는 근위축증인, 방법.

청구항 96

제95항에 있어서, 단백질-약물 접합체의 분자 카고가 *DMPK*, *CNBP*, *디스트로핀* 또는 *DUX4* 유전자, 또는 이의 돌연변이체를 억제하는 siRNA로 이루어진 군으로부터 선택된 siRNA인, 방법.

청구항 97

제84항 내지 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 추가 치료제와 함께 단백질-약물 접합체를 투여받는, 방법.

청구항 98

제97항에 있어서, 추가 치료제가 알글루코시다아제 알파, 리툭시맙, 메토트렉세이트, 정맥내 면역글로불린(IVIG), 아발글루코시다아제 알파, 레발부테롤, 항생제, 코르티손, 프레드니손, 비스포스포네이트 및 팔리비주맙으로부터 선택되는, 방법.

청구항 99

제97항에 있어서, 추가 치료제가 베타2-아드레날린 작용제, 스테로이드, 비스포스포네이트, 감염성 질환 치료제, 백신 및 폐렴구균 백신으로부터 선택되는, 방법.

청구항 100

분자 카고에 접합된, 인간 트랜스페린 수용체, 이의 항원성 단편 또는 이의 변이체에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 신체 내 조직 또는 세포 유형에 분자 카고를 전달하는 방법.

청구항 101

제100항에 있어서, 분자 카고가 폴리뉴클레오티드 분자, 담체 또는 소분자를 포함하는, 방법.

청구항 102

제100항 또는 제101항에 있어서, 조직이 뇌/척수/CNS; 눈; 골격근; 지방 조직; 혈액/골수; 유방; 폐/기관지; 결장; 자궁; 식도; 심장; 신장; 간; 림프절; 난소; 췌장; 태반; 전립선; 직장; 피부; 말초혈 단핵 세포(PBMC); 소장; 비장; 위; 고환; 말초신경계; 및/또는 뼈/연골/관절인, 방법.

청구항 103

제100항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 유형 및 세포 유형과 연관된 조직이 다음과 같은, 방법:

(1) 뇌/척수/CNS 조직	내피 세포 뉴런(모든 유형) 희소돌기아교세포 (및/또는 전구체) 혈관주위세포 뇌막/연수막 세포 지주막 장벽 세포 말초신경 아교세포 성상세포 아교세포 슈반 세포 뇌실막 세포 미세아교세포;
(2) 눈 조직	간상 광수용체 세포 뮐러 아교세포 양극 세포 원추 광수용체 세포 내피 세포 각막 공막 시신경 동공 조임근;
(3) 골격근 조직	골격근세포 섬유아세포 내피 세포 대식세포 위성 세포;
(4) 지방 조직	지방세포 섬유아세포

	T-세포 대식세포 B-세포 수지상 세포;
(5) 혈액/골수 조직	T-세포 B-세포 대식세포 적혈구 형질 세포 수지상 세포;
(6) 유방 조직	선 세포 T-세포 섬유아세포 대식세포 내피 세포 근상피 세포 지방세포;
(7) 폐/기관지 조직	기저 호흡 세포 호흡 섬모 세포 곤봉체 세포(Club cell) 평활근 세포 이온세포(Ionocyte) 대식세포 폐포 세포(1 및/또는 2 형) T-세포 내피 세포;
(8) 결장 조직	원위 장세포 장 배상 세포 미분화 세포 T-세포 파네스 세포 B-세포 장내분비 세포;
(9) 자궁 조직	선 세포 및 내강 세포 자궁내막 간질 세포 내피 세포 평활근 세포

T-세포
대식세포;

(10) 식도 조직
섬유아세포
편평 상피 세포
내피 세포
평활근 세포
대식세포
형질 세포
T-세포;

(11) 심장 조직
심근세포
내피 세포
섬유아세포
대식세포
T-세포
B-세포
수지상 세포;

(12) 신장 조직
근위 세뇨관 세포
T-세포
대식세포
집합관 세포
B-세포
사구체
섬유아세포;

(13) 간 조직
간세포
B-세포
적혈구;

(14) 림프절 조직
B-세포
T-세포;

(15) 난소 조직
과립막 세포
섬유아세포
평활근 세포
대식세포
T-세포
난포막 세포
섬유아세포;

(16) 췌장 조직	췌관 세포 췌장 내분비 세포 평활근 세포 내피 세포 대식세포 외분비 선 세포 단핵구;
(17) 태반 조직	세포영양막 융모외 영양세포 섬유아세포 호프바우어 세포 내피 세포;
(18) 전립선 조직	전립선 기저 세포 전립선 선 세포 요로상피 세포 내피 세포 섬유아세포 평활근 세포 대식세포 T-세포;
(19) 직장 조직	미분화 세포 장 배상 세포 파네스 세포 원위 장세포 장내분비 세포;
(20) 피부 조직	랑게르한스 세포 섬유아세포 내피 세포 기저 각질형성세포 기저상 각질형성세포(Suprabasal keratinocyte) T-세포 평활근 세포 멜라닌세포;
(21) PBMC 조직	단핵구 T-세포 NK 세포 수지상 세포;

(22) 소장 조직	근위 장세포 미분화 세포 장 배상 세포 파네스 세포;
(23) 비장 조직	B-세포 T-세포 형질 세포 대식세포;
(24) 위 조직	B-세포 T-세포 위 점액 분비 세포 형질 세포 섬유아세포 대식세포;
(25) 고환 조직	라이디히 세포 후기 정세포 정원세포 초기 정세포 대식세포 정모세포 세관주위 세포 세르톨리 세포 내피 세포;
(26) 말초신경계 조직	운동 뉴런 감각 뉴런 슈반 세포 뒤뿌리 신경절;
(27) 뼈/연골/관절 조직	연골세포 연골아세포 간엽 세포 골아세포 파골세포.

청구항 104

제84항 내지 제103항 중 어느 한 항에 있어서,

주사기의 바늘로 대상체의 신체를 찌르는 단계, 및

분자 카고에 접합된, 트랜스페린 수용체, 이의 항원성 단편 또는 이의 변이체에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질을 대상체의 신체 내로 주사하는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 105

제84항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 근위축증 병태, 대사 질환, 근감소증 또는 악액질을 앓고 있는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 교차 참조**

[0002] 본 출원은 2022년 7월 29일자로 출원된 미국 가특허 출원 번호 63/393,749에 대한 우선권을 주장하고, 그 전문이 참고문헌으로서 본원에 원용된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 XML 파일 형식으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 이는 전체적으로 참고로 본원에 원용된다. 2023년 7월 26일에 생성된 상기 XML 사본은, 파일명이 250298000507SEQLIST.XML이고 크기는 547,729 바이트이다.

[0005] **기술분야**

[0006] 본 발명은 분자 카고에 접합된 항원 결합 단백질을 포함하는 단백질-약물 접합체, 뿐만 아니라 이러한 단백질-약물 접합체로 질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 뇌로의 철 전달은 철 결합 단백질 트랜스페린(Tf)의 결합 및 세포내 이동을 통해 달성된다. Tf 수용체(TfR)는 약물을 뇌로 전달하기 위한 일부 연구의 표적이다. 예를 들어, 접근법은 이미징제 및 DNA를 전달하는 데 사용되는 Tf로 장식된 리포좀의 사용(문헌 [Sharma et al., (2013) Cell penetrating peptide tethered bi-ligand liposomes for delivery to brain *in vivo*: biodistribution and transfection. J. Control. Release 167, 1-10.]) 또는 리간드로서 철-모방 펩티드의 사용(문헌 [Staquicini et al., (2011)])을 포함한다.

[0008] 또한, 증가된 항체 친화도와 리소좀 분해 사이의 상관관계가 제안되었고(문헌 [Bien-Ly et al., (2014) Transferrin receptor (TfR) trafficking determines brain uptake of TfR antibody affinity variants. J. Exp. Med. 211, 233-244]), 이는 더 낮은 항체 친화도가 운반되는 복합체의 세포내 분해를 피하는 데 도움이 된다는 아이디어를 뒷받침한다. Bien-Ly 등은, TfR 및 베타-세크레타아제(BACE1)에 대한 이중특이적 항체가 혈액-뇌 장벽(BBB)을 통과하여 뇌 아밀로이드 베타 수준을 효과적으로 감소시키지만, 또한 TfR에 대한 높은 친화도 결합이 뇌 TfR 수준의 용량-의존적 감소를 유발하였음을 발견하였다. 마찬가지로, 문헌 [Moos& Morgan (2001)]은 항-TfR 항체인 OX26, 및 트랜스페린이 래트 BBB를 횡단하는 능력을 비교하여 OX26이 트랜스페린과 달리 뇌에서 재활용되지 않는다는 것을 발견하였는데, 이는 항체가 TfR과 높은 친화도의 항체-항원 상호작용을 나타내고, 이는 쉽게 역전되지 않는 한편, Tf와의 상호작용은 pH 및 Tf의 철 함량에 따라 쉽게 역전되기 때문이다(문헌 [Restricted transport of anti-transferrin receptor antibody (OX26) through the blood-brain barrier in the rat, J Neurochem 2001 Oct;79(1):119-29]).

발명의 내용

[0009] 일 양태에서, 분자 카고에 접합된, 인간 트랜스페린 수용체(TfR) 또는 이의 변이체 또는 항원성 단편에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하는 단백질-약물 접합체가 본원에 제공된다.

[0010] 항원 결합 단백질은 약 41 nM의 K_D 또는 더 강한 친화도, 예를 들어, 약 30 nM 또는 더 강한 친화도, 약 20 nM 또는 더 강한 친화도, 약 10 nM 또는 더 강한 친화도, 약 5 nM 또는 더 강한 친화도, 약 3 nM 또는 더 강한 친화도, 또는 약 1 nM 또는 더 강한 친화도로 인간 트랜스페린 수용체에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 약 3 nM의 K_D 또는 더 강한 친화도로 인간 트랜스페린 수용체에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 약 0.45 nM 내지 3 nM의 K_D로 인간 트랜스페린 수용체에 결합한다. 이러한 결합 친화도는 표면 플라즈몬 공명 검정에서, 예를 들어, 25℃에서 측정될 수 있다

[0011] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 중쇄 가변 영역(HCVR 또는 V_H) 및 경쇄 가변 영역(LCVR 또는 V_L)을 포함할 수 있고, 상기 HCVR 및 LCVR을 갖는 Fab는 약 0.65 nM의 K_D 또는 더 강한 친화도로 인간 트랜스페린 수용체에 결합한다.

[0012] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 항원 결합 단편은 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 뮤린 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 1가 Fab', 2가 Fab2, F(ab)'3 단편, 단일 쇄 가변 단편(scFv), bis-scFv, (scFv)2, 디아바디, 이가 항체, 1-아암 항체, 미니바디, 나노바디, 트리아바디, 테트라바디, 디설파이드 안정화된 Fv 단백질(dsFv), 단일 도메인 항체(sdAb), Ig NAR, 단일 중쇄 항체, 이중특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 이중특이적 T-세포 인게이저(BiTE), 삼중특이적 항체, 또는 이의 화학적으로 변형된 유도체로부터

선택될 수 있다.

[0013] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 항원 결합 단백질은 항원 결합 단편 영역(Fab)인 항원 결합 단편을 포함한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 항원 결합 단백질은 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체 단일 쇄 가변 단편(scFv)은 N-말단에서 C-말단으로 다음 배향으로 배열된 도메인을 포함한다: 중쇄 가변 영역(HCVR) - 경쇄 가변 영역(LCVR). 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체는 N-말단에서 C-말단으로 다음 배향으로 배열된 도메인을 포함하는 단일 쇄 가변 단편(scFv)을 포함한다: 경쇄 가변 영역(LCVR) - 중쇄 가변 영역(HCVR). 일부 실시양태에서, 상기 scFv 가변 영역은 펩티드 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 상기 scFv 가변 영역은 펩티드 링커 $-(GGGGS)_n-$(서열번호 426)에 의해 연결되고; 여기서 n은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10이다. 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 항원 결합 단백질은 약 $1X10^{-7}$ M의 K_D 또는 더 강한 친화도로 인간 트랜스페린 수용체에 결합한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 항원 결합 단백질은 다음을 포함한다: (i) 서열번호 2; 462; 12; 463; 22; 464; 32; 42; 52; 467; 62; 492; 72; 470; 82; 92; 472; 102; 112; 473; 122; 132; 142; 475; 152; 162; 477; 172; 182; 478; 192; 480; 202; 481; 212; 222; 232; 242; 252; 482; 262; 272; 282; 292; 302; 483 또는 312에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및/또는 (ii) 서열번호 7; 17; 27; 37; 465; 47; 466; 57; 468; 67; 469; 77; 471; 87; 97; 107; 117; 474; 127; 137; 147; 476; 157; 167; 177; 187; 479; 197; 207; 217; 227; 237; 247; 257; 267; 277; 287; 297; 307; 527; 317 또는 484에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR.

[0016] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 항원 결합 단백질은 다음을 포함한다: (1) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (2) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (3) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (4) 서열번호 32에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 37에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (5) 서열번호 42에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 47에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (6) 서열번호 52에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 57에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (7) 서열번호 62에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 67에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (8) 서열번호 72에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 77에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (9) 서열번호 82에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 87에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (10) 서열번호 92에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 97에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (11) 서열번호 102에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 107에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (12) 서열번호 112에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 117에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (13) 서열번호 122에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 127에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의

LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (14) 서열번호 132에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 137에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (15) 서열번호 142에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 147에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (16) 서열번호 152에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 157에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (17) 서열번호 162에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 167에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (18) 서열번호 172에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 177에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (19) 서열번호 182에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 187에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (20) 서열번호 192에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 197에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (21) 서열번호 202에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 207에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (22) 서열번호 212에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 217에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (23) 서열번호 222에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 227에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (24) 서열번호 232에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 237에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (25) 서열번호 242에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 247에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (26) 서열번호 252에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 257에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (27) 서열번호 262에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 267에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (28) 서열번호 272에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 277에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (29) 서열번호 282에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 287에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (30) 서열번호 292에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 297에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (31) 서열번호 302에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 307 또는 527에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; 및/또는 (32) 서열번호 312에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 317에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR.

[0017] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 항원 결합 단백질은 다음을 포함한다: (a) 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (b) 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열

(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 18에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 19에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 20에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (c) 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 28에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 29에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 30에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (d) 서열번호 33에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 34에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 38에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 39에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 40에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (e) 서열번호 43에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 44에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 45에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 48에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 49에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 50에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (f) 서열번호 53에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 54에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 55에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 58에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 59에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 60에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (g) 서열번호 63에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 64에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 65에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 68에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 69에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 70에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (h) 서열번호 73에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 74에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 75에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 78에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 79에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 80에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (i) 서열번호 83에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 84에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 85에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 88에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 89에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 90에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (j) 서열번호 93에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 94에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 95에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 98에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 99에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 100에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (k) 서열번호 103에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 104에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 105에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 108에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 109에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 110에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (l) 서열번호 113에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 114에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 115에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 118에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 119에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 120에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (m) 서열번호 123에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 124에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 125에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서

열번호 128에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 129에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 130에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (n) 서열번호 133에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 134에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 135에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 138에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 139에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 140에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (o) 서열번호 143에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 144에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 145에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 148에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 149에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 150에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (p) 서열번호 153에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 154에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 155에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 158에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 159에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 160에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (q) 서열번호 163에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 164에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 165에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 168에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 169에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 170에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (r) 서열번호 173에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 174에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 175에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 178에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 179에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 180에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (s) 서열번호 183에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 184에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 185에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 188에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 189에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 190에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (t) 서열번호 193에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 194에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 195에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 198에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 199에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 200에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (u) 서열번호 203에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 204에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 205에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 208에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 209에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 210에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (v) 서열번호 213에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 214에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 215에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 218에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 219에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 220에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (w) 서열번호 223에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 224에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 225에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 228에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 229에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 230에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (x) 서열번호 233에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 234에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 235에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 238에 제시된 아미노산 서열

(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 239에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 240에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (y) 서열번호 243에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 244에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 245에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 248에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 249에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 250에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (z) 서열번호 253에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 254에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 255에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 258에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 259에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 260에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (aa) 서열번호 263에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 264에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 265에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 268에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 269에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 270에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (ab) 서열번호 273에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 274에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 275에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 278에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 279에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 280에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (ac) 서열번호 283에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 284에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 285에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 288에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 289에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 290에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (ad) 서열번호 293에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 294에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 295에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 298에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 299에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 300에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (ae) 서열번호 303에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 304에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 305에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 308에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 309에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 310에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; 및/또는 (af) 서열번호 313에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 314에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 315에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 318에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 319에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 320에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR.

[0018] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 항원 결합 단백질은 다음을 포함한다: (i) 서열번호 2에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (ii) 서열번호 12에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (iii) 서열번호 22에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (iv) 서열번호 32에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 37에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (v) 서열번호 42에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 47에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (vi) 서열번호 52에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 57에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (vii) 서열번호 62에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 67에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (viii) 서열번호 72에 제시된 아

미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 77에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (ix) 서열번호 82에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 87에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (x) 서열번호 92에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 97에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xi) 서열번호 102에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 107에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xii) 서열번호 112에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 117에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xiii) 서열번호 122에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 127에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xiv) 서열번호 132에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 137에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xv) 서열번호 142에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 147에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xvi) 서열번호 152에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 157에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xvii) 서열번호 162에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 167에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xviii) 서열번호 172에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 177에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xix) 서열번호 182에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 187에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xx) 서열번호 192에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 197에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xxi) 서열번호 202에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 207에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xxii) 서열번호 212에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 217에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xxiii) 서열번호 222에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 227에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xxiv) 서열번호 232에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 237에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xxv) 서열번호 242에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 247에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xxvi) 서열번호 252에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 257에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xxvii) 서열번호 262에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 267에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xxviii) 서열번호 272에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 277에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xxix) 서열번호 282에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 287에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xxx) 서열번호 292에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 297에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (xxxi) 서열번호 302에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 307 또는 527에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; 및/또는 (xxxii) 서열번호 312에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 317에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR.

[0019] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 항원 결합 단백질은 다음을 포함한다: i. 서열번호 329에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 328에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; ii. 서열번호 331에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 330에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; iii. 서열번호 333에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 332에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; iv. 서열번호 335에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 334에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; v. 서열번호 337에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 336에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; vi. 서열번호 339에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 338에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; vii. 서열번호 341에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 340에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; viii. 서열번호 343에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 342에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; ix. 서열번호 345에 제시된 아미

노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 344에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; x. 서열번호 347에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 346에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xi. 서열번호 349에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 348에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xii. 서열번호 351에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 350에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xiii. 서열번호 353에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 352에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xiv. 서열번호 355에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 354에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xv. 서열번호 357에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 356에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xvi. 서열번호 359에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 358에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xvii. 서열번호 361에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 360에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xviii. 서열번호 363에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 362에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xix. 서열번호 365에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 364에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xx. 서열번호 367에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 366에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxi. 서열번호 369에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 368에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxii. 서열번호 371에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 370에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxiii. 서열번호 373에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 372에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxiv. 서열번호 375에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 374에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxv. 서열번호 377에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 376에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxvi. 서열번호 379에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 378에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxvii. 서열번호 381에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 380에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxviii. 서열번호 383에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 382에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxix. 서열번호 385에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 384에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxx. 서열번호 387에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 386에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxxi. 서열번호 389에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 388에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; 또는 xxxii. 서열번호 391에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 390에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄.

[0020] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 항원 결합 단백질은 다음을 포함한다: i. 서열번호 543에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 328에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; ii. 서열번호 544에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 330에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; iii. 서열번호 545에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 332에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; iv. 서열번호 546에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 334에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; v. 서열번호 547에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 336에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; vi. 서열번호 548에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 338에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; vii. 서열번호 549에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 340에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; viii. 서열번호 550에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 342에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; ix. 서열번호 551에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 344에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; x. 서열번호 552에 제시된

아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 346에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xi. 서열번호 553에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 348에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xii. 서열번호 554에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 350에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xiii. 서열번호 555에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 352에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xiv. 서열번호 556에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 354에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xv. 서열번호 557에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 356에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xvi. 서열번호 558에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 358에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xvii. 서열번호 559에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 360에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xviii. 서열번호 560에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 362에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xix. 서열번호 561에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 364에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xx. 서열번호 562에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 366에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxi. 서열번호 563에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 368에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxii. 서열번호 564에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 370에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxiii. 서열번호 565에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 372에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxiv. 서열번호 566에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 374에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxv. 서열번호 567에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 376에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxvi. 서열번호 568에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 378에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxvii. 서열번호 569에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 380에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxviii. 서열번호 570에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 382에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxix. 서열번호 571에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 384에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxx. 서열번호 572에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 386에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; xxxi. 서열번호 573에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 388에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; 또는 xxxii. 서열번호 574에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 390에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄.

[0021] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 항원 결합 단백질은 다음을 포함한다: (1) 서열번호 132에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 137에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (2) 서열번호 172에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 177에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (3) 서열번호 222에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 227에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (4) 서열번호 242에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 247에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; (5) 서열번호 262에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 267에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR; 또는 (6) 서열번호 272에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 277에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR.

[0022] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 항원 결합 단백질은 다음을 포함한다: (a) 서열번호 133에 제시된 아

미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 134에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 135에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 138에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 139에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 140에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (b) 서열번호 173에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 174에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 175에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 178에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 179에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 180에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (c) 서열번호 223에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 224에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 225에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 228에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 229에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 230에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (d) 서열번호 243에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 244에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 245에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 248에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 249에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 250에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; (e) 서열번호 263에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 264에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 265에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 268에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 269에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 270에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR; 또는 (f) 서열번호 273에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1, 서열번호 274에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및 서열번호 275에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 278에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1, 서열번호 279에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및 서열번호 280에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3을 포함하는 LCVR.

[0023] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체는 다음을 포함한다: (i) 서열번호 132에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 137에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (ii) 서열번호 172에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 177에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (iii) 서열번호 222에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 227에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (iv) 서열번호 242에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 247에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; (v) 서열번호 262에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 267에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; 또는 (vi) 서열번호 272에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 277에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR.

[0024] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 항원 결합 단백질은 다음을 포함한다: (A) 서열번호 355에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 354에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; (B) 서열번호 363에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 362에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; (C) 서열번호 373에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 372에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; (D) 서열번호 377에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 376에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; (E) 서열번호 381에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 380에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; 또는 (F) 서열번호 383에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 영역; 및 서열번호 382에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄.

[0025] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 항원 결합 단백질은 다음을 포함한다: (I) 서열번호 556에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 354에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)

을 포함하는 경쇄; (II) 서열번호 560에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 362에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; (III) 서열번호 565에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 372에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; (IV) 서열번호 367에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 376에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; (V) 서열번호 569에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 380에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄; 또는 (VI) 서열번호 570에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄; 및 서열번호 382에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄.

[0026] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 표 1-1에 제시된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍을 포함하는 항체와 동일한 인간 트랜스페린 수용체 상의 에피토프에 결합한다.

[0027] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 인간 트랜스페린 수용체에 대한 결합에 대해, 표 1-1에 제시된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍을 포함하는 항체와 경쟁한다.

[0028] 다른 양태에서, 인간 트랜스페린 수용체(hTfR)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질을 포함하는 단백질-약물 접합체가 본원에 제공되고, 여기서 항원 결합 단백질은 분자 카고에 접합되고 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하고, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음으로부터 선택된 hTfR의 하나 이상의 에피토프에 결합한다:

[0029] a. 서열 LLNE(서열번호 529)를 포함하는 에피토프 및/또는 서열 TYKEL(서열번호 509)을 포함하는 에피토프;

[0030] b. 서열 DSTDFTGT(서열번호 530)를 포함하는 에피토프 및/또는 서열 VKHPVTGQF(서열번호 531)를 포함하는 에피토프 및/또는 서열 IERIPEL(서열번호 532)을 포함하는 에피토프;

[0031] c. 서열 LNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 533)을 포함하는 에피토프;

[0032] d. 서열 FEDL(서열번호 521)을 포함하는 에피토프;

[0033] e. 서열 IVDKNGRL(서열번호 534)을 포함하는 에피토프;

[0034] f. 서열 IVDKNGRLVY(서열번호 535)를 포함하는 에피토프;

[0035] g. 서열 DQTKF(서열번호 536)를 포함하는 에피토프;

[0036] h. 서열 LVENPGGY(서열번호 537)를 포함하는 에피토프 및/또는 서열 PIVNAELSF(서열번호 538)를 포함하는 에피토프 및/또는 서열 PYLGTTMDT(서열번호 539)를 포함하는 에피토프;

[0037] i. 서열 LLENSYVPREAGSQKDENLAL(서열번호 507)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 IYMDQTKFPIVNAEL(서열번호 508)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 TYKEL(서열번호 509)을 포함하는 에피토프;

[0038] j. 서열 KRKLSEKLDSTDFTGTIKL(서열번호 510)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 YTLIEKTMQNVKHPVTGQFL(서열번호 511)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 LIERIPELNKVARAAAE(서열번호 512)를 포함하는 에피토프;

[0039] k. 서열 LNENSYVPREAGSQKDENL(서열번호 513)을 포함하는 에피토프;

[0040] l. 서열 GTKKDFEDL(서열번호 514)을 포함하는 에피토프;

[0041] m. 서열 SVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSK(서열번호 515)를 포함하는 에피토프;

[0042] n. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 516)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 DQTKFPIVNAEL(서열번호 517)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 TYKELIERIPELNK(서열번호 518)를 포함하는 에피토프;

[0043] o. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 516)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 TYKELIERIPELNK(서열번호 518)를 포함하는 에피토프;

[0044] p. 서열 SVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAY(서열번호 519)를 포함하는 에피토프;

[0045] q. 서열 IYMDQTKFPIVNAEL(서열번호 508)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 FGNMEGDCPSDWKTDSTCRM(서열번호 520)을 포함하는 에피토프;

[0046] r. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDENLAL(서열번호 507)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 LVENPGGYVAYSKAATVTGKL(서열번호 522)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 IYMDQTKFPIVNAELSF(서열번호 523)를 포함하는 에피토프 및/또는

서열 ISRAAAEKL(서열번호 524)을 포함하는 에피토프 및/또는 서열 VTSESKNVKLTVSNVLKE(서열번호 525)를 포함하는 에피토프 및/또는 서열 FCEDTDYPYLGTTMDT(서열번호 526)를 포함하는 에피토프;

[0047] s. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDENLAL(서열번호 507) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 IYMDQTKFPIVNAEL(서열번호 508) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 TYKEL(서열번호 509) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

[0048] t. 서열 KRKLSEKLDSTDFTGTIKL(서열번호 510) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 YTLIEKTMQNVKHPVTGQFL(서열번호 511) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 LIERIPELNKVARAAAE(서열번호 512) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

[0049] u. 서열 LNENSYVPREAGSQKDENL(서열번호 513) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

[0050] v. 서열 GTKKDFEDL(서열번호 514) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

[0051] w. 서열 SVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSK(서열번호 515) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

[0052] x. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 516) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 DQTKFPIVNAEL(서열번호 517) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 TYKELIERIPELNK(서열번호 518) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

[0053] y. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 516) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 TYKELIERIPELNK(서열번호 518) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

[0054] z. 서열 SVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAY(서열번호 519) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프;

[0055] aa. 서열 IYMDQTKFPIVNAEL(서열번호 508) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 FGNMEGDCPSDWKTDSTCRM(서열번호 520) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프; 및

[0056] bb. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDENLAL(서열번호 507) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 LVENPGGYVAYSKAATVTGKL(서열번호 522) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 IYMDQTKFPIVNAELSF(서열번호 523) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 ISRAAAEKL(서열번호 524) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 VTSESKNVKLTVSNVLKE(서열번호 525) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프 및/또는 서열 FCEDTDYPYLGTTMDT(서열번호 526) 내에 포함되거나 이와 중첩되는 에피토프.

[0057] 일부 실시양태에서, 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 다음으로부터 선택된 hTfR의 하나 이상의 에피토프에 결합한다:

[0058] a. 서열 LLNE(서열번호 529)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 TYKEL(서열번호 509)로 이루어지는 에피토프;

[0059] b. 서열 DSTDFTGT(서열번호 530)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 VKHPVTGQF(서열번호 531)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 IERIPEL(서열번호 532)로 이루어지는 에피토프;

[0060] c. 서열 LNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 533)으로 이루어지는 에피토프;

[0061] d. 서열 FEDL(서열번호 521)로 이루어지는 에피토프;

[0062] e. 서열 IVDKNGRL(서열번호 534)로 이루어지는 에피토프;

[0063] f. 서열 IVDKNGRLVY(서열번호 535)로 이루어지는 에피토프;

[0064] g. 서열 DQTKF(서열번호 536)로 이루어지는 에피토프;

[0065] h. 서열 LVENPGGY(서열번호 537)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 PIVNAELSF(서열번호 538)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 PYLGTTMDT(서열번호 539)로 이루어지는 에피토프;

[0066] i. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDENLAL(서열번호 507)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 IYMDQTKFPIVNAEL(서열번호 508)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 TYKEL(서열번호 509)로 이루어지는 에피토프;

[0067] j. 서열 KRKLSEKLDSTDFTGTIKL(서열번호 510)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 YTLIEKTMQNVKHPVTGQFL(서열번호 511)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 LIERIPELNKVARAAAE(서열번호 512)로 이루어지는 에피토프;

[0068] k. 서열 LNENSYVPREAGSQKDENL(서열번호 513)로 이루어지는 에피토프;

[0069] l. 서열 GTKKDFEDL(서열번호 514)로 이루어지는 에피토프;

[0070] m. 서열 SVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSK(서열번호 515)로 이루어지는 에피토프;

[0071] n. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 516)으로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 DQTKFPIVNAEL(서열번호 517)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 TYKELIERIPELNK(서열번호 518)로 이루어지는 에피토프;

[0072] o. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 516)으로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 TYKELIERIPELNK(서열번호 518)로 이루어지는 에피토프;

[0073] p. 서열 SVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAY(서열번호 519)로 이루어지는 에피토프;

[0074] q. 서열 IYMDQTKFPIVNAEL(서열번호 508)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 FGNMEGDCPSDWKTDSTCRM(서열번호 520)으로 이루어지는 에피토프; 및

[0075] r. 서열 LLNENSYVPREAGSQKDENLAL(서열번호 507)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 LVENPGGYVAYSKAATVTGKL(서열번호 522)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 IYMDQTKFPIVNAELSF(서열번호 523)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 ISRAAAEKL(서열번호 524)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 VTSESKNVKLTVSNVLKE(서열번호 525)로 이루어지는 에피토프 및/또는 서열 FCEDTDYPYLGTTMDT(서열번호 526)로 이루어지는 에피토프.

[0076] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 인간 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 뮤린 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 1가 Fab', 2가 Fab2, F(ab)'3 단편, 단일 쇄 가변 단편(scFv), bis-scFv, (scFv)2, 디아바디, 미니바디, 나노바디, 트리아바디, 테트라바디, 디설파이드 안정화된 Fv 단백질(dsFv), 단일 도메인 항체(sdAb), Ig NAR, 단일 중쇄 항체, 이중특이적 항체 또는 이의 결합 단편, 이중특이적 T-세포 인게이저(BiTE), 삼중특이적 항체, 또는 이의 화학적으로 변형된 유도체로부터 선택된다.

[0077] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체는 중쇄 가변 영역(HCVR) 및 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하는 scFv, 및 분자 카고를 포함하고, 여기서 상기 분자 카고는 HCVR에 접합된다. 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체는 중쇄 가변 영역(HCVR) 및 경쇄 가변 영역(LCVR)을 포함하는 scFv, 및 분자 카고를 포함하고, 여기서 상기 분자 카고는 LCVR에 접합된다. 일부 실시양태에서, scFv 및 상기 분자 카고는 링커를 통해 접합된다.

[0078] 일부 실시양태에서, 분자 카고는 (i) 항원 결합 단백질의 HCVR, (ii) 항원 결합 단백질의 LCVR, (iii) 항원 결합 단백질의 중쇄, 및/또는 (iv) 항원 결합 단백질의 경쇄에 접합된다.

[0079] 일부 실시양태에서, 분자 카고는 (i) 항원 결합 단백질의 하나 또는 둘 모두의 HCVR, (ii) 항원 결합 단백질의 하나 또는 둘 모두의 LCVR, (iii) 항원 결합 단백질의 하나 또는 둘 모두의 중쇄, 및/또는 (iv) 항원 결합 단백질의 하나 또는 둘 모두의 경쇄에 접합된다.

[0080] 일부 실시양태에서, 분자 카고는 글루타민 잔기 및/또는 라이신 잔기를 통해 항원 결합 단백질에 접합된다.

[0081] 일부 실시양태에서, 글루타민 잔기는 (i) 항원 결합 단백질의 중쇄의 N-말단 및/또는 C-말단에 도입되고/되거나, (ii) 항원 결합 단백질의 경쇄의 N-말단 및/또는 C-말단에 도입되고/되거나, (iii) 항원 결합 단백질의 CH2 또는 CH3 도메인에 자연적으로 존재하고/하거나, (iv) 하나 이상의 아미노산을 변형시킴으로써 항원 결합 단백질에 도입되고/되거나, (v) Q295이거나, N297로부터 Q297로 돌연변이된 것(N297Q)이다. 일 실시양태에서, 글루타민 잔기는 Q295이다.

[0082] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질은 글루타민-함유 태그를 포함하고, 분자 카고는 글루타민-함유 태그의 글루타민 잔기를 통해 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 글루타민-함유 태그는 LLQGG(서열번호 439), LLQG(서열번호 440), LSLSQG(서열번호 441), gGGLLQGG(서열번호 442), gLLQG(서열번호 443), LLQ(서열번호 444), gSPLAQSHGG(서열번호 445), gLLQGGG(서열번호 446), gLLQGG(서열번호 447), gLLQ(서열번호 448), LLQLLQGA(서열번호 449), LLQGA(서열번호 450), LLQYQGA(서열번호 451), LLQGSG(서열번호 452), LLQYQG(서열번호 453), LLQLLQG(서열번호 454), SLLQG(서열번호 455), LLQLQ(서열번호 456), LLQLLQ(서열번호 457) 및 LLQGR(서열번호 458)로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함한다.

[0083] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질 및 분자 카고는 링커를 통해 접합된다. 링커는 절단성 또는 비절단성 링커일 수 있다.

[0084] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체는 폴리뉴클레오티드 분자, 담체 또는 소분자를 포함하는 분자 카고를 포함한다.

[0085] 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 분자는 간섭 핵산 분자, 가이드 RNA, 리보자임, 압타머, 믹스머, 멀티머 또는 mRNA이다. 일부 실시양태에서, 간섭 핵산은 siRNA, shRNA, miRNA, 갭머 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 간섭 핵산은 siRNA이다. 일부 실시양태에서, 간섭 핵산은 안티센스 올리고뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 분자는 가이드 RNA이다. 다양한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

[0086] 일부 실시양태에서, 분자 카고는 *DMPK*, *CNBP*, *디스트로핀*, *DUX4*, *ApoE*, *MAPT*, *APP*, *HTT*, *SOD1*, *C9orf72*, *SNCA*, *LRRK2*, *PRNP*, *SLC5A1*, *SLC16A3*, *HDAC6*, *MMP27*, *MFAP5*, *FAM64A*, *BAIAP3*, *MYH7*, *TPM1*, *RBM20*, *KLHL24*, *MYL2* 또는 *TNNT2* 유전자, 또는 이의 돌연변이체를 억제하는 siRNA이다.

[0087] 일부 실시양태에서, siRNA는 21개의 뉴클레오티드 길이의 센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, siRNA는 23개의 뉴클레오티드 길이의 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, siRNA는 센스 가닥의 5' 단부에서 제1 및 제2 뉴클레오시드간 연결에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, siRNA는 안티센스 가닥의 3' 및/또는 5' 단부에서 제1 및 제2 뉴클레오시드간 연결에 2개의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다.

[0088] 일부 실시양태에서, 분자 카고는 담체, 예컨대 지질 기반 담체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 지질 기반 담체는 지질 나노입자(LNP), 리포좀, 리피도이드 또는 리포플렉스이다. 일부 실시양태에서, 지질 기반 담체는 지질 나노입자(LNP)이다. 일부 실시양태에서, 지질 나노입자(LNP)는 폴리뉴클레오티드 분자 및/또는 폴리펩티드 분자를 추가로 포함한다.

[0089] 일부 실시양태에서, 지질 나노입자(LNP)는 유전자 편집 시스템의 하나 이상의 구성요소를 포함한다. 일부 실시양태에서, 지질 나노입자(LNP)는 (a) Cas 뉴클레아제, 또는 Cas 뉴클레아제를 인코딩하는 핵산, 및/또는 (b) 가이드 RNA, 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 하나 이상의 DNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, Cas 뉴클레아제는 Cas9 단백질이다. 일부 실시양태에서, Cas9 단백질은 *스트렙토코쿠스 파이오제네스*(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 단백질, *스타필로코쿠스 아우레우스*(*Staphylococcus aureus*) Cas9 단백질, *캄필로박터 제주니*(*Campylobacter jejuni*) Cas9 단백질, *스트렙토코쿠스 써모필루스*(*Streptococcus thermophilus*) Cas9 단백질 또는 *나이세리아 메닌지티디스*(*Neisseria meningitidis*) Cas9 단백질로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 포유류 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다. 일부 실시양태에서, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다. 일부 실시양태에서, Cas 뉴클레아제를 인코딩하는 핵산은 Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 가이드 RNA는 단일 가이드 RNA(sgRNA)이다. 일부 실시양태에서, 지질 나노입자(LNP)는 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 또는 전사 활성화인자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)를 포함한다.

[0090] 일부 실시양태에서, 지질 나노입자는 양이온성 지질, 중성 지질, 헬퍼 지질 및 스텔스 지질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중성 지질은 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC)이다. 일부 실시양태에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤이다. 일부 실시양태에서, 스텔스 지질은 PEG2k-DMG이다.

[0091] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질은, 분자 카고에 접합되지 않을 때, 이러한 단일 쇄 가변 단편(scFv), 항체 또는 항원 결합 단편의 부재 하에 발생하는 인간 홀로-트랜스페린에 대한 인간 트랜스페린 수용체 C-말단 단편의 결합의 50% 초과를 차단하지 않는다. 일부 실시양태에서, 상기 차단은, His6-myc-myc 태그에 융합된 인간 트랜스페린 수용체 세포외 도메인을 상기 scFv, 항체 또는 항원 결합 단편에 사전-결합시킨 다음에, 플레이트에 결합된 항-홀로-트랜스페린 항체의 결합에 의해 플레이트의 표면에 고정화된 홀로-트랜스페린과 접촉시키는, 효소 결합 면역흡착 분석(ELISA) 플레이트 검정에서 측정되는 바와 같다.

[0092] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단백질의 부재 하에 홀로-트랜스페린과 인간 트랜스페린 수용체 세포외 도메인의 결합은 약 300 pM 인간 트랜스페린 수용체 세포외 도메인의 농도에서 측정된다.

[0093] 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체는 다음 특징 중 하나 이상을 포함한다: a) 표면 플라즈몬 공명 포맷에서, 25℃에서, 인간 TfR에 대한 결합에 대한, 약 41 nM의 친화도(K_D) 또는 그보다 높은 친화도; b) 표면 플라즈몬 공명 포맷에서, 25℃에서, 원숭이 TfR에 대한 결합에 대한, 약 0 nM(검출 가능한 결

합 없음)의 친화도(K_D) 또는 그보다 높은 친화도; c) 표면 플라즈몬 공명 포맷에서, 25℃에서, 0 내지 278의 [원숭이 TfR에 대한 결합에 대한 K_D / 인간 TfR에 대한 결합에 대한 K_D]의 비; d) Fab 포맷(IgG1)일 때, 인간 홀로-Tf에 대한 hTfR 결합을 약 3 내지 13% 차단함; e) scFv(V_K-V_H) 포맷일 때, 인간 홀로-Tf에 대한 hTfR의 결합을 약 6 내지 13% 차단함; 및/또는 f) scFv(V_H-V_L) 포맷일 때, 인간 홀로-Tf에 대한 hTfR의 결합을 약 11 내지 26% 차단함.

[0094] 다른 양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학 조성물이 본원에 제공된다.

[0095] 다른 양태에서, 추가 치료제와 함께 본원에 기재된 단백질-약물 접합체 또는 이의 약학 조성물을 포함하는 조성물 또는 키트가 본원에 제공된다. 일 실시양태에서, 추가 치료제는 알글루코시다아제 알파, 리툭시맙, 메토트렉세이트, 정맥내 면역글로불린(IVIG), 아발글루코시다아제 알파, 레발부테롤, 항생제, 코르티손, 프레드니손, 비스포스포네이트 및 팔리비주맙으로부터 선택된다. 일 실시양태에서, 추가 치료제는 베타2-아드레날린 작용제, 스테로이드, 비스포스포네이트, 감염성 질환 치료제, 백신 및 폐렴구균 백신으로부터 선택된다.

[0096] 다른 양태에서, 인간 트랜스페린 수용체 폴리펩티드 또는 이의 항원성 단편에 결합된 본원에 기재된 단백질-약물 접합체를 포함하는 복합체가 본원에 제공된다.

[0097] 다른 양태에서, (a) 항원 결합 단백질을 분자 카고에 접합시키기에 유리한 조건 하에 항원 결합 단백질을 분자 카고와 접촉시키는 단계; 및 (b) 선택적으로, 단계 (a)에서 생산한 단백질-약물 접합체를 단리하는 단계를 포함하는, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체를 제조하는 방법이 본원에 제공된다. 다른 양태에서, 이러한 방법의 생성물인 단백질-약물 접합체가 본원에 제공된다.

[0098] 다른 양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체를 포함하는 용기 또는 주사 장치가 본원에 제공된다.

[0099] 다른 양태에서, 단백질-약물 접합체를 대상체의 신체(예를 들어, 뇌 또는 근육) 내로 도입하는 단계를 포함하는, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체를 대상체에게 투여하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체는 비경구로(예를 들어, 정맥내로) 대상체의 신체 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체는 중추신경계 내로의 척추강내, 뇌실내 또는 실질내 주사를 통해 대상체의 신체 내로 도입된다.

[0100] 다른 양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질환 또는 장애의 치료 또는 예방이 필요한 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하거나 예방하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 리소좀 축적 질환 및 장애, 심장 질환 또는 장애, 중추신경계(CNS) 질환 또는 장애, 눈 질환 또는 장애, 뇌 질환 또는 장애, 척수 질환 또는 장애, 말초신경계(PNS) 질환 또는 장애, 근육 질환 또는 장애, 연골 질환 또는 장애, 뼈 성장판 질환 또는 장애, 신장 질환 또는 장애, 또는 혈액 질환 또는 장애이다.

[0101] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 신경 질환 또는 장애이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 리소좀 축적 질환, 아밀로이드증, 신경병증, 신경변성 질환, 발작, 행동 장애, 백질이영양증, 신경정신 질환, 외상성 뇌 손상, 신경발달 질환, 신경근 질환, 안 질환 또는 장애, 바이러스 또는 미생물 감염, 염증, 허혈 및 암이다.

[0102] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 리소좀 축적 질환이다.

[0103] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 신경변성 질환, 예컨대 알츠하이머병, 헌팅턴병, 근위축성 측색 경화증, 파킨슨병 또는 프리온 질환이다. 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 분자 카고는 *ApoE*, *MAPT*, *APP*, *HTT*, *SOD1*, *C9orf72*, *SNCA*, *LRRK2* 또는 *PRNP* 유전자, 또는 이의 돌연변이체를 억제하는 siRNA로 이루어진 군으로부터 선택된 siRNA이다.

[0104] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 심장 질환 또는 장애이다. 일부 실시양태에서, 심장 질환 또는 장애는 심부전이다. 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 분자 카고는 *SLC5A1*, *SLC16A3*, *HDAC6*, *MMP27*, *MFAP5*, *FAM64A*, *BAIAP3*, *MYH7*, *TPM1*, *RBM20*, *KLHL24*, *MYL2* 또는 *TNNT2* 유전자, 또는 이의 돌연변이체를 억제하는 siRNA로 이루어진 군으로부터 선택된 siRNA이다.

[0105] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 근육 질환 또는 장애이다. 일부 실시양태에서, 근육 질환 또는 장애는 근긴장성 이영양증, 듀시엔 근이영양증, 안면견갑상완 근이영양증, 1형 안면견갑상완 근이영양증 또는 근위축증이다. 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 분자 카고는 *DMPK*, *CNBP*, *디스트로핀* 또는 *DUX4* 유전자, 또는 이

의 돌연변이체를 억제하는 siRNA로 이루어진 군으로부터 선택된 siRNA이다.

[0106] 다양한 실시양태에서, 대상체는 추가 치료제와 함께 단백질-약물 접합체를 투여받는다. 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 알글루코시다아제 알파, 리툭시맙, 메토트렉세이트, 정맥내 면역글로불린(IVIG), 아발글루코시다아제 알파, 레발부테롤, 항생제, 코르티손, 프레드니손, 비스포스포네이트 및 팔리비주맙으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 추가 치료제는 베타2-아드레날린 작용제, 스테로이드, 비스포스포네이트, 감염성 질환 치료제, 백신 및 폐렴구균 백신으로부터 선택된다.

[0107] 다른 양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 근긴장성 이영양증, 듀시엔 근이영양증, 안면견갑상완 근이영양증, 1형 안면견갑상완 근이영양증의 치료 또는 예방이 필요한 대상체에서 근긴장성 이영양증, 듀시엔 근이영양증, 안면견갑상완 근이영양증, 1형 안면견갑상완 근이영양증을 치료하거나 예방하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 분자 카고는 *DMPK*, *CNBP*, *디스트로핀* 또는 *DUX4* 유전자, 또는 이의 돌연변이체를 억제하는 간섭 RNA(예를 들어, siRNA)로 이루어진 군으로부터 선택된 간섭 RNA(예를 들어, siRNA)이다.

[0108] 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 단백질-약물 접합체의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 신경변성 질환, 예컨대 알츠하이머병, 헌팅턴병, 근위축성 측색 경화증, 파킨슨병 또는 프리온 질환의 치료 또는 예방이 필요한 대상체에서 신경변성 질환, 예컨대 알츠하이머병, 헌팅턴병, 근위축성 측색 경화증, 파킨슨병 또는 프리온 질환을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 분자 카고는 *ApoE*, *MAPT*, *APP*, *HTT*, *SOD1*, *C9orf72*, *SNCA*, *LRRK2* 또는 *PRNP* 유전자, 또는 이의 돌연변이체를 억제하는 간섭 RNA(예를 들어, siRNA)로 이루어진 군으로부터 선택된 간섭 RNA(예를 들어, siRNA)이다.

[0109] 다른 양태에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 단백질-약물 접합체의 유효량을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 심장 질환 또는 장애, 예컨대 심부전의 치료 또는 예방이 필요한 대상체에서 심장 질환 또는 장애, 예컨대 심부전을 치료하거나 예방하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 단백질-약물 접합체의 분자 카고는 *SLC5A1*, *SLC16A3*, *HDAC6*, *MMP27*, *MFAP5*, *FAM64A*, *BAIAP3*, *MYH7*, *TPM1*, *RBM20*, *KLHL24*, *MYL2* 또는 *TNNT2* 유전자, 또는 이의 돌연변이체를 억제하는 siRNA로 이루어진 군으로부터 선택된 siRNA이다.

[0110] 다른 양태에서, 분자 카고에 접합된, 인간 트랜스페린 수용체, 이의 항원성 단편 또는 이의 변이체에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체의 신체 내 조직 또는 세포 유형에 분자 카고를 전달하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 분자 카고는 폴리뉴클레오티드 분자, 담체 또는 소분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조직은 뇌/척수/CNS; 눈; 골격근; 지방 조직; 혈액/골수; 유방; 폐/기관지; 결장; 자궁; 식도; 심장; 신장; 간; 림프절; 난소; 췌장; 태반; 전립선; 직장; 피부; 말초혈단핵 세포(PBMC); 소장; 비장; 위; 고환; 말초신경계; 및/또는 뼈/연골/관절이다. 일부 실시양태에서, 세포 유형, 및 세포 유형과 연관된 조직은 본원 표 1-4로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 방법은 주사기의 바늘로 대상체의 신체를 찌르는 단계, 및 분자 카고에 접합된, 트랜스페린 수용체, 이의 항원성 단편 또는 이의 변이체에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질을 대상체의 신체 내로 주사하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 근위축증 병태, 대사 질환, 근감소증 또는 악액질을 앓는다.

도면의 간단한 설명

[0111] **도 1a** 내지 **도 1c**는 항-인간 TFRC 항체 클론이 GAA를 $Tfrc^{hum}$ 마우스의 대뇌에 전달한다는 것을 보여주는 웨스턴 블롯(western blot)을 보여준다. 각각의 레인 = 1 마리의 마우스. *Wt* 마우스의 항-마우스 mTfR:GAA가 양성 대조군으로서 사용되었다. $Tfrc^{hum}$ 마우스의 항-마우스 mTfR:GAA가 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 2는 항-hTFRC 항체 클론의 서브세트가 성숙 GAA를 scfv:GAA 포맷으로 뇌 실질에 전달한다는 것(HDD에 의한 전달)을 보여주는 웨스턴 블롯을 보여준다. *Wt* 마우스의 항-마우스 mTfR:GAA가 양성 대조군으로서 사용되었다. $Tfrc^{hum}$ 마우스의 항-마우스 mTfR:GAA가 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 3은 4개의 선택된 항-hTFRC 항체 클론이 성숙 GAA를 scfv:GAA 포맷으로 뇌 실질에 전달한다는 것(AAV8 에피솜 간 데포 유전자 요법)을 보여주는 웨스턴 블롯을 보여준다. *Wt* 마우스의 항-마우스 mTfR:GAA가 양성 대조군으로서 사용되었다. $Tfrc^{hum}$ 마우스의 항-마우스 mTfR:GAA가 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 4는 3개의 선택된 에피솜 AAV8 간 데포 항-hTFRC 항체 클론이 성숙 GAA를 $Gaa^{-/-}/Tfrc^{hum}$ 마우스에서 CNS, 심

장 및 근육에 전달한다는 것을 보여주는 웨스턴 블롯을 보여준다.

도 5는 3개의 선택된 에피솜 AAV8 간 데포 항-hTFRC 항체 클론이 *Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} 마우스의 CNS, 심장 및 근육에서의 글리코겐 축적을 구제한다는 것을 보여준다. *Wt* 미처치 마우스는 양성 대조군이었고, *Gaa*$^{-/-}$ 미처치 마우스는 음성 대조군이었다.

도 6a 내지 **도 6d**는 3개의 선택된 에피솜 AAV8 간 데포 항-hTFRC 항체 클론이 *Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} 마우스에서 뇌 시상(**도 6a**), 뇌 대뇌 피질(**도 6b**), 뇌 해마 CA1(**도 6c**) 및 사두근(**도 6d**)에서의 글리코겐 축적을 구제한다는 것을 보여준다. *Wt* 미처치 마우스는 양성 대조군이었고, *Gaa*$^{-/-}$ 미처치 마우스는 음성 대조군이었다.

도 7a는 항-hTFRC 12847scfv:GAA의 삽입이 성숙 GAA 단백질을 폼페(Pompe) 모델 마우스의 CNS 및 근육에 전달한다는 것을 보여준다. **도 7b**는 항-hTFRC 12847scfv:GAA의 삽입이 폼페 모델 마우스의 CNS 및 근육에서의 글리코겐 축적을 구제한다는 것을 보여준다. 일원 ANOVA *p<0.01; **p<0.001; ***p<0.0001. 미처치 폼페병 모델 마우스 및 야생형 마우스를 대조군으로서 사용하였다. 재조합 AAV8 항-TfR:GAA 에피솜 주형을 주사한 마우스를 양성 대조군으로서 사용하였다. LNP-g666이 없는 재조합 AAV8 항-TfR:GAA 삽입 주형을 주사한 마우스를 음성 대조군으로서 사용하였다.

도 8은 대칭 유닛인 2개의 TfR 분자 상에 겹쳐진 *맘마레나바이러스 마추포엔세*(*Mammarenavirus machupoense*) GP1 단백질(PDB 3KAS), 인간 페리틴(PDB 6GSR), *플라스모듐 비박스*(*Plasmodium vivax*) *Sal-1* PvRBP2b 단백질(PDB 6D04), 인간 HFE 단백질(PDB 1DE4) 및 인간 트랜스페린(PDB 1SUV) 분자의 상호작용을 보여준다. *맘마레나바이러스 마추포엔세* GP1 단백질 및 인간 페리틴의 경우, 도면의 복잡성을 줄여 알아보기 쉬운 그림을 위해 대칭 단위에 하나의 카피만 나타낸다.

도 9는 HDX-MS 실험에서 테스트한 항체에 대한 수소-중수소 교환 질량 분석법(HDX) 보호가 TfR(PDB 1SUV) 내 5개 영역으로 할당될 수 있음을 도시한다.

도 10은 *맘마레나바이러스 마추포엔세* GP1 단백질, 인간 페리틴 및 *플라스모듐 비박스* PvRBP2b 단백질 결합 부위와 중첩되는 TfR 정점(apical) 도메인에서 HDX 보호를 야기하는 항체의 대표인 REGN17513에 의해 보호되는 TfR 영역을 예시한다.

도 11은 **도 11**에 나타낸 다른 TfR 결합 파트너에 의해 공유되지 않는 TfR 정점 도메인에서 HDX 보호가 있는 항체의 대표인 REGN17510에 의해 보호되는 TfR 영역을 예시한다.

도 12는 인간 페리틴 및 *플라스모듐 비박스 Sal-1* PvRBP2b 단백질과 결합 부위를 공유하는 TfR 정점 도메인에서 HDX 보호가 있는 항체의 대표인 REGN17515에 의해 보호되는 TfR 영역을 예시한다.

도 13은 *플라스모듐 비박스 Sal-1* PvRBP2b 단백질과 결합 부위를 공유하는 TfR 프로테아제-유사 도메인에서 HDX 보호가 있는 항체의 대표인 REGN17514에 의해 보호되는 TfR 영역을 예시한다.

도 14는 TfR 프로테아제-유사 도메인에서 HDX 보호가 있는 항체의 대표인 REGN17508에 의해 보호되는 TfR 영역을 예시한다. 이 영역은 **도 14**에 나타낸 다른 TfR 상호작용 분자에 의해 이용되지 않는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0112] 분자 카고에 접합된 항-트랜스페린 수용체(TfR) 항원 결합 단백질이 본원에 제공된다. 이러한 접합체는, 예를 들어, 뇌 및 근육을 포함한 신체의 다양한 조직에 분자 카고를 전달하는 데 유용하다. 예를 들어, 트랜스페린 수용체에 대한 높은 친화도 및 우수한 혈액-뇌 장벽 횡단을 나타내는 항-TfR 단백질-약물 접합체가 제공된다. 놀랍게도, TfR에 대한 높은 결합 친화도를 나타내는 항-TfR scFv는 낮은 친화도 결합제보다 BBB를 더 효율적으로 횡단하였다. 이는 낮은 친화도 항체가 BBB를 더 효과적으로 횡단한, 1가 및 이가 항-TFR 항체에 대한 이전 결과와 대조적이다. 본원에 기재된 접합체는 분자 카고를 뇌 및 근육에 효율적으로 전달하는 능력을 갖고, 따라서 신경 또는 근육 질환 및 장애와 같은 질환 및 장애의 치료에 사용될 수 있다.

[0113] 본 개시내용에 따라, 본 기술분야의 기술 범위 내에서 통상적인 분자 생물학, 미생물학 및 재조합 DNA 기법이 사용될 수 있다. 이러한 기법은 문헌에 자세히 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook, Fritsch& Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (본원에서 "Sambrook, et al., 1989")]; [DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes I and II (D. N. Glover ed. 1985)]; [Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed. 1984)]; [Nucleic

Acid Hybridization (B. D. Hames& S. J. Higgins eds. (1985))]; [Transcription And Translation (B. D. Hames& S. J. Higgins, eds. (1984))]; [Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed. (1986))]; [Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, (1986))]; [B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984)]; [F. M. Ausubel, et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley& Sons, Inc. (1994)]을 참조한다.

[0114] 폴리뉴클레오티드는 DNA 및 RNA를 포함한다. 본 개시내용은 프로모터 또는 다른 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 본원에 기재된 임의의 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0115] 트랜스페린 수용체 1(TfR)은, 주요 철 담체 단백질인 트랜스페린의 결합을 통해 세포로의 철 공급의 제어에 관여하는 막 수용체이다. 트랜스페린 수용체 1은 *TFRC* 유전자로부터 발현된다. 트랜스페린 수용체 1은 본원에서 TFRC로 지칭될 수 있다. 이 수용체는, 철이 리보뉴클레오티드 리덕타아제 활성을 유지하는 데 필수적이고 리보뉴클레오티드를 데옥시리보뉴클레오티드로 전환하는 데 촉매작용하는 유일한 효소이기 때문에, 세포 증식 제어에 핵심 역할을 한다. 바람직하게는 TfR은 인간 TfR(hTfR)이다. 예를 들어, 수탁번호 NP_001121620.1; BAD92491.1; 및 NP_001300894.1.; 및 e!Ensembl entry: ENSG00000072274를 참조한다. 인간 트랜스페린 수용체 1은 비제한적으로 대뇌 피질; 소뇌; 해마; 꼬리핵; 부갑상샘; 부신; 기관지; 폐; 구강 점막; 식도; 위; 십이지장; 소장; 결장; 직장; 간; 담낭; 췌장; 신장; 방광; 고환; 부고환; 전립선; 질; 난소; 난관; 자궁내막; 자궁경부; 태반; 유방; 심근; 평활근; 연조직; 피부; 맹장; 림프절; 편도; 및 골수를 포함하는 여러 조직에서 발현된다. 또한, 본원 표 1-4의 조직 및 세포 유형을 참조한다. 관련 트랜스페린 수용체는 트랜스페린 수용체 2(TfR2)이다. 인간 트랜스페린 수용체 2는 인간 트랜스페린 수용체 1에 대해 약 45% 서열 동일성을 갖는다. 문헌 [Trinder& Baker, Transferrin receptor 2: a new molecule in iron metabolism. Int J Biochem Cell Biol. 2003 Mar;35(3):292-6]. 달리 언급되지 않는 한, 본원에 사용된 바와 같이, 트랜스페린 수용체는 일반적으로 트랜스페린 수용체 1(예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체 1)을 지칭한다.

[0116] 인간 트랜스페린(Tf)은 단백질의 음이온 결합 슈퍼패밀리의 단일 쇄의 80 kDa 멤버이다. 트랜스페린은 전형적으로 19개 쇄내 디설파이드 결합을 함유하는, 19개의 aa 신호 서열 및 679개의 aa 성숙 세그먼트로 나뉘는 698개의 아미노산 전구체이다. N- 및 C-말단 측면 영역(또는 도메인)은 필수 음이온(예를 들어, 바이카보네이트) 및 4개 아미노산(His, Asp 및 2개 Tyr)의 상호작용을 통해 3가 철에 결합한다. 아포트랜스페린(또는 철-미함유)은 초기에 C-말단에서 하나의 철 원자에 결합할 것이고, 이어서 N-말단에 철이 결합하여 홀로트랜스페린(디페릭(diferric) Tf, 홀로-Tf)을 형성한다. 홀로트랜스페린은 이의 C-말단 철 결합 도메인을 통해 세포 표면 상의 TfR과 상호작용할 것이고, 이는 산성화된 엔도솜 내로 내재화된다. 철은 이들 엔도솜 내의 Tf 분자로부터 해리되어, 2가 철로서 시토졸 내로 운반된다. TfR 외에도, 트랜스페린은 쿠불린(cubulin), IGFBP3, 미생물 철 결합 단백질 및 간 특이적 TfR2에 결합하는 것으로 보고되어 있다.

[0117] 혈액-뇌 장벽(BBB)은 뇌의 미소혈관 내에 위치되고, 이는 혈액에서 뇌로의 분자의 통과를 조절한다. 문헌 [Burkhart *et al.*, Accessing targeted nanoparticles to the brain: the vascular route. Curr Med Chem. 2014;21(36):4092-9]. 뇌 모세혈관 내피 세포를 통한 세포경유 통과는 1) 백혈구에 의한 세포 진입; 2) 예를 들어, 글루코오스 수송체 1(GLUT-1)에 의한 글루코오스의 담체-매개 유입, 예를 들어 L형 아미노산 수송체 1(LAT-1)에 의한 아미노산의 담체-매개 유입, 및 예를 들어 유기 음이온 수송 펩티드-B(OATP-B)에 의한 작은 펩티드의 담체-매개 유입; 3) 작은 소수성 분자의 세포간 통과(paracellular passage); 4) 예를 들어 알부민 및 양이온화된 분자의 흡착-매개 트랜스시토시스(transcytosis); 5) CO_2 및 O_2를 포함한 지용성 비극성 용질의 수동 확산; 및 5) 예를 들어 인슐린 수용체에 의한 인슐린의 수용체-매개 트랜스시토시스 및 TfR에 의한 Tf의 수용체-매개 트랜스시토시스를 통해 발생할 수 있다. 문헌 [Johnsen *et al.*, Targeting the transferrin receptor for brain drug delivery, Prog Neurobiol. 2019 Oct;181:101665].

[0118] **항-인간 트랜스페린 수용체 항원 결합 단백질 접합체**

[0119] 항-hTfR 단백질-약물 접합체가 본원에 제공된다. 항-hTfR 단백질-약물 접합체는, (선택적으로 링커에 의해) 분자 카고에 접합된 트랜스페린 수용체, 바람직하게는 인간 트랜스페린 수용체 1(hTfR)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체 또는 항체의 항원 결합 단편, 예컨대 Fab 또는 scFv)에 연결된 선택적 신호 펩티드를 포함한다. 본원에 기재된 항-hTfR 항원 결합 단백질은 혈액-뇌 장벽(BBB)을 효율적으로 횡단하고, 이로써 접합된 분자 카고를 뇌로 전달할 수 있다.

[0120] 예를 들어, 태그, 예컨대 His_6 및/또는 myc를 포함하는, 트랜스페린 수용체에 특이적으로 결합하는 항원 결합

단백질 및 이의 단백질-약물 접합체(예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체(예를 들어, REGN2431) 또는 원숭이 트랜스페린 수용체(예를 들어, REGN2054))는 약 25℃에서, 예를 들어, 표면 플라즈몬 공명 검정에서 약 20 nM의 K_D 또는 그보다 높은 친화도로 결합한다. 이러한 항원 결합 단백질은 "항-TfR"로 지칭될 수 있다.

[0121] 용어 "접합체"는 두 물질이 공유결합으로 또는 비공유결합으로 연결된 바디를 의미한다. 용어 "공유결합으로 연결된"은 적어도 두 개의 분자가 하나 이상의 공유 결합(들)을 통해 함께 연결된다는 특징을 지칭한다. 다양한 실시양태에서, 두 분자는 분자들 사이의 링커로서 작동하는 단일 결합, 예를 들어, 디설파이드 가교 또는 디설파이드 결합에 의해 함께 공유결합으로 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서에서, 두 개 이상의 분자는 다수의 공유결합을 통해 적어도 두 개의 분자를 함께 연결하는 링커로서 작동하는 분자를 통해 공유결합으로 함께 연결될 수 있다. 특정 실시양태에서, 링커는 절단성 링커 또는 비절단성 링커일 수 있다. 접합체에서, 두 물질은 직접 연결될 수 있거나 링커를 통해 연결될 수 있다. 특정 실시양태에서, 두 물질 중 하나는 항원 결합 단백질, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 나머지 하나는 약물(예를 들어, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드, 리포좀 또는 LNP)이다. 특정 실시양태에서, 링커는 절단성 링커일 수 있거나 비절단성 링커일 수 있다.

[0122] 본원에 사용되는 바와 같이, 용어 "항체-약물 접합체" 또는 "ADC"는 항체 또는 이의 항원 결합 단편과 약물(예를 들어, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드, 또는 리포좀 또는 LNP)의 접합체를 의미한다. 항원에 대한 친화도는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 약물(예를 들어, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드, 또는 리포좀 또는 LNP)과 연결함으로써 약물에 부여되며, 이로써 생체내에서 표적 부위로 약물을 전달하는 효율이 증가한다.

[0123] 일 실시양태에서, 면역글로불린 내 각각의 프레임워크 또는 CDR 도메인으로의 아미노산의 할당은 문헌 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat *et al.*; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; 5th ed.; NIH Publ. No. 91-3242 (1991)]; [Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75]; [Kabat *et al.*, (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616]; [Chothia, et al., (1987) J Mol. Biol. 196:901-917] 또는 [Chothia, *et al.*, (1989) Nature 342: 878-883]의 정의에 따른다. 따라서, V_H의 CDR 및 V_L의 CDR을 포함하는 항체 및 항원 결합 단편이 또한 본원에 포함되고, 이러한 V_H 및 V_L은 본원에 제시된 바와 같은 아미노산 서열(예를 들어, 표 1-1의 서열 또는 이의 변이체 참조)을 포함하고, 여기서 CDR은 Kabat 및/또는 Chothia에 따라 정의된 바와 같다.

[0124] 본원에 기재된 단백질-약물 접합체는 인간 트랜스페린 수용체 1에 특이적으로 결합하는 항체를 포함한다. 용어 "항체"는, 본원에 사용된 바와 같이, 디설파이드 결합에 의해 상호-연결된 4개의 폴리펩티드 쇄, 즉 2개의 중쇄(HC) 및 2개의 경쇄(LC)를 포함하는 면역글로불린 분자를 지칭한다. 일 실시양태애서, 각각의 항체 중쇄(HC)는 중쇄 가변 영역("HCVR" 또는 "V_H")(예를 들어, 서열번호 2; 462; 12; 463; 22; 464; 32; 42; 52; 467; 62; 492; 72; 470; 82; 92; 472; 102; 112; 473; 122; 132; 142; 475; 152; 162; 477; 172; 182; 478; 192; 480; 202; 481; 212; 222; 232; 242; 252; 482; 262; 272; 282; 292; 302; 483 및/또는 312 또는 이의 변이체를 포함함) 및 중쇄 불변 영역(예를 들어, 인간 IgG, 인간 IgG1 또는 인간 IgG4)을 포함하고; 각각의 항체 경쇄(LC)는 경쇄 가변 영역("LCVR 또는 "V_L")(예를 들어, 서열번호 7; 17; 27; 37; 465; 47; 466; 57; 468; 67; 469; 77; 471; 87; 97; 107; 117; 474; 127; 137; 147; 476; 157; 167; 177; 187; 479; 197; 207; 217; 227; 237; 247; 257; 267; 277; 287; 297; 307; 527; 317 및/또는 484 또는 이의 변이체) 및 경쇄 불변 영역(예를 들어, 인간 카파 또는 인간 람다)을 포함한다. V_H 및 V_L 영역은, 프레임워크 영역(FR)으로 지칭되는 더 보존된 영역이 사이에 배치된 상보성 결정 영역(CDR)으로 지칭되는 초가변성의 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L은 3개의 CDR 및 4개의 FR을 포함한다. 본원에 기재된 항-TfR 항체는 또한 분자 카고에 접합될 수 있다.

[0125] 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질은 분자 카고에 접합될 수 있는 항체의 항원 결합 단편일 수 있다. 용어 항체의 "항원 결합 부분" 또는 "항원 결합 단편"은, 본원에 사용된 바와 같이, 항원에 결합하지만 전장 항체의 서열 모두를 포함하지는 않는 면역글로불린 분자를 지칭한다(바람직하게는 전장 항체는 IgG이다). 항원 결합 단편의 비제한적인 예는 다음을 포함한다: 항체의 초가변 영역(예를 들어, 단리된 상보성 결정 영역(CDR), 예컨대 CDR3 펩티드) 또는 제한된 FR3-CDR3-FR4 펩티드를 모방하는 아미노산 잔기로 이루어진, (i) Fab 단편; (ii) $F(ab')_2$ 단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단일 쇄 Fv(scFv) 분자; 및 (vi) dAb 단편. 다른 조작된 분자, 예컨대 도메인 특이적 항체, 단일 도메인 항체, 1-아암 항체, 도메인 결실 항체, 키메라 항체, CDR 이식된 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디 및 소형 모듈 면역약제(SMIP)가 또한, 본원에 사용된 바와 같은, 표현 "항원 결합 단편"에 포함된다.

[0126] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체는 분자 카고에 접합된 scFv를 포함할 수 있다. scFv(단일 쇄 가변 단편)는 중쇄(V_H) 및 경쇄(V_L) 도메인의 가변 영역을 갖고(어느 순서로든), 이는 바람직하게는 가요성 링커(예를 들어, 펩티드 링커)에 의해 함께 연결된다. 두 V 영역을 연결하는 데 사용되는 가요성 링커의 길이는 폴리펩티드 쇄의 정확한 접힘을 생성하는 데 중요할 수 있다. 이전에, 펩티드 링커는, 도메인이 접혀 무손상 항원 결합 부위를 형성하는 능력에 영향을 미치지 않으면서, 가변 도메인의 카복시 말단과 다른 도메인의 아미노 말단 사이에 3.5 nm(35 Å)에 걸쳐 이어져야 한다고 추정되었다(문헌 [Huston *et al.*, Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins. Methods in Enzymology. 1991;203:46-88]). 일 실시양태에서, 링커는 가변 도메인을 약 3.5 nm 분리하는 길이의 아미노산 서열을 포함한다. 본 발명의 일 실시양태에서, 항-TfR scFv-약물 접합체는 LCVR-HCVR 또는 HCVR-LCVR을 따르는 바와 같은 가변 영역의 배열을 포함하는 scFv를 포함하고, 여기서 HCVR 및 LCVR은 선택적으로 링커에 의해 연결되고, scFv는 선택적으로 링커에 의해 분자 카고에 연결된다(예를 들어, 예를 들어, LCVR-$(Gly_4Ser)_3$-HCVR-분자 카고; 또는 LCVR-$(Gly_4Ser)_3$-HCVR-분자 카고).

[0127] 일부 실시양태에서, 본원에서 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체는 분자 카고에 접합된 Fab를 포함할 수 있다.

[0128] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체는 분자 카고에 접합된 이가 항체를 포함한다.

[0129] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체는 분자 카고에 접합된 1가 또는 "1-아암" 항체를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 1가 또는 "1-아암" 항체는 단일 가변 도메인을 포함하는 면역글로불린 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 1-아암 항체는 Fab 내에 단일 가변 도메인을 포함할 수 있고, 여기서 Fab는 적어도 하나의 Fc 단편에 연결된다. 특정 실시양태에서, 1-아암 항체는 다음을 포함한다: (i) 중쇄 불변 영역 및 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄, (ii) 경쇄 불변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄, 및 (iii) Fc 단편 또는 절단된 중쇄를 포함하는 폴리펩티드. 특정 실시양태에서, 별도의 폴리펩티드에 포함된 Fc 단편 또는 절단된 중쇄는 항원 결합 도메인에 연결되지 않은 Fc 단편을 지칭하는 "더미(dummy) Fc"이다. 본원에 기재된 1-아암 항체는 본원의 표 1-1에 제시된 임의의 HCVR/LCVR 쌍 또는 CDR 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 전장 중쇄, 전장 경쇄 및 추가 Fc 도메인 폴리펩티드를 포함하는 1-아암 항체는 표준 방법론을 사용하여 구축될 수 있고(예를 들어, 전문이 참고문헌으로서 본원에 원용된 WO2010151792 참조), 여기서 중쇄 불변 영역은 Fc 도메인 폴리펩티드와 적어도 두 개의 아미노산이 상이하다(예를 들어, IMGT 엑손 넘버링 시스템에 따른 H95R 및 Y96F; 또는 EU 넘버링 시스템에 따른 H435R 및 Y436F). 이러한 변형은 1가 항체의 정제에 유용하다(WO2010151792 참조).

[0130] 항체의 항원 결합 단편은, 일 실시양태에서, 적어도 하나의 가변 도메인을 포함할 것이다. 가변 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성의 것일 수 있고, 일반적으로 적어도 하나의 CDR을 포함할 것이고, 이는 하나 이상의 프레임워크 서열에 인접하거나 인프레임에 있다. V_L 도메인과 결합된 V_H 도메인을 갖는 항원 결합 단편에서, V_H 및 V_L 도메인은 임의의 적합한 배열로 서로에 대해 위치할 수 있다. 예를 들어, 가변 영역은 이량체성일 수 있고 V_H - V_H, V_H - V_L 또는 V_L - V_L 이량체를 함유할 수 있다. 대안적으로, 항체의 항원 결합 단편은 단량체성 V_H 또는 V_L 도메인을 함유할 수 있다.

[0131] 특정 실시양태에서, 항체의 항원 결합 단편은 적어도 하나의 불변 도메인에 공유결합으로 연결된 적어도 하나의 가변 도메인을 함유할 수 있다. 본원에 기재된 항체의 항원 결합 단편 내에서 발견될 수 있는 가변 및 불변 도메인의 비제한적 예시적 구성은 다음을 포함한다: (i) V_H-CH1; (ii) V_H-CH2; (iii) V_H-CH3; (iv) V_H-CH1-CH2; (v) V_H-CH1-CH2-CH3; (vi) V_H-CH2-CH3; (vii) V_H-CL; (viii) V_L-CH1; (ix) V_L-CH2; (x) V_L-CH3; (xi) V_L-CH1-CH2; (xii) V_L-CH1-CH2-CH3; (xiii) V_L-CH2-CH3; 및 (xiv) V_L-CL. 위에 나열된 임의의 예시적 구성을 포함하는 가변 및 불변 도메인의 임의의 구성에서, 가변 및 불변 도메인은 서로 직접 연결되거나 전체 또는 부분 힌지 또는 링커 영역에 의해 연결될 수 있다. 힌지 영역은 적어도 2개(예를 들어, 5, 10, 15, 20, 40 또는 60개 이상)의 아미노산으로 이루어질 수 있고, 이는 단일 폴리펩티드 분자에서 인접한 가변 및/또는 불변 도메인 사이에 가요성 또는 반가요성(semi-flexible) 연결을 초래한다. 더욱이, 본원에 기재된 항체의 항원 결합 단편은 서로 및/또는 하나 이상의 단량체성 V_H 또는 V_L 도메인과 비공유결합된(예를 들어, 디설파이드 결합(들)에 의함), 위에 나열된 임의의 가변 및 불변 도메인 구성의 동종이량체 또는 이종이량체(또는 기타 멀티머)를 포함할 수 있다. 본 개시내용은 본원에서 제시된 항체와 같은 항원 결합 단백질의 항원 결합 단편을 포함한다.

[0132] 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체 및 항원 결합 단편)은 단일특이적이거나 다중특이적(예를 들어, 이중특이

적)일 수 있다. 다중특이적 항원 결합 단백질은 본원에 추가로 논의된다. 본 개시내용은 본원에 구체적으로 제시된 항원 결합 단백질의 하나 이상의 가변 도메인을 포함하는 단일특이적 및 다중특이적(예를 들어, 이중특이적) 항원 결합 단편을 포함한다.

[0133] 용어 "특이적으로 결합하다"는, 예를 들어, 25℃ 또는 37℃에서의 실시간 무표지 생물층 간섭계 검정, 예를 들어, Octet® HTX 바이오센서에 의해, 또는 표면 플라즈몬 공명, 예를 들어, BIACORE™에 의해, 또는 용액-친화도 ELISA에 의해 측정 시, 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)이 항원, 예컨대 인간 TfR 단백질, 마우스 TfR 단백질 또는 원숭이 TfR 단백질에 대한, K_D로서 표현되는, 적어도 약 10^{-9} M(예를 들어, 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 또는 1.0 nM)의 결합 친화도를 갖는 것을 지칭한다. 본 개시내용은 TfR 단백질에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질을 포함한다. "항-TfR"은 TfR에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질(또는 다른 분자), 예를 들어 항체 또는 항원 결합 단편을 지칭한다.

[0134] "단리된" 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편), 폴리펩티드, 폴리뉴클레오티드 및 벡터는 이들이 생산되는 세포 또는 세포 배양액의 다른 생물학적 분자를 적어도 부분적으로 미함유한다. 이러한 생물학적 분자는 핵산, 단백질, 다른 항체 또는 항원 결합 단편, 지질, 탄수화물 또는 다른 물질, 예컨대 세포 잔해 및 성장 배지를 포함한다. 단리된 항원 결합 단백질은 추가로 숙주 세포 또는 이의 성장 배지의 생물학적 분자와 같은 발현 시스템 구성요소를 적어도 부분적으로 미함유할 수 있다. 일반적으로, 용어 "단리된"은 이러한 생물학적 분자의 완전한 부재(예를 들어, 미미하거나 중요하지 않은 양의 불순물이 남아 있을 수 있음), 물, 완충액 또는 염의 부재, 또는 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편)을 포함하는 약학 제형의 구성 요소를 의미하는 것이 아니다.

[0135] 본 개시내용은 본원에 기재된 항원 결합 단백질과 동일한 에피토프에 결합하는 항원 결합 단백질, 예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편을 포함한다.

[0136] 항원은, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 결합하는 분자, 예컨대 펩티드(예를 들어, TfR 또는 이의 단편(항원성 단편))이다. 항체가 인식하고 결합하는 항원의 특정 영역을 에피토프라고 칭한다. 이러한 항원에 특이적으로 결합하는 본원에 기재된 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체)은 본 개시내용의 일부이다.

[0137] 용어 "에피토프"는 파라토프로서 공지된 항원 결합 단백질의 특정 항원 결합 부위, 예를 들어, 항체의 가변 영역과 상호작용하는 (예를 들어, TfR 상의) 항원 결정인자를 말한다. 단일 항원은 하나 초과의 에피토프를 가질 수 있다. 따라서, 상이한 항체는 항원 상의 상이한 영역에 결합할 수 있고 상이한 생물학적 효과를 가질 수 있다. 용어 "에피토프"는 또한 B 및/또는 T 세포가 반응하는 항원 상의 부위 및/또는 항체에 의해 결합되는 항원의 영역을 지칭할 수 있다. 에피토프는 구조적 또는 기능적 에피토프로 정의될 수 있다. 기능적 에피토프는 일반적으로 구조적 에피토프의 서브세트이고 상호작용의 친화도에 직접 기여하는 잔기를 갖는다. 에피토프는 선형일 수 있거나, 입체구조일 수 있고, 즉 비선형 아미노산으로 구성될 수 있다. 특정 실시양태에서, 에피토프는 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 기 또는 설포닐 기와 같은 분자의 화학적으로 활성인 표면 기인 결정인자를 포함할 수 있으며, 특정 실시양태에서, 특정 3차원 구조적 특징 및/또는 특정 전하 특징을 가질 수 있다. 본원에 기재된 항원 결합 단백질이 결합하는 에피토프는 TfR의 단편, 예를 들어, 이의 세포외 도메인의 단편에 포함될 수 있다. 이러한 에피토프에 결합하는 본원에 기재된 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체)이 또한 고려된다.

[0138] 항원 결합 단백질, 예를 들어, 항체 또는 단편 또는 폴리펩티드의 에피토프를 결정하는 방법은 알라닌 스캐닝 돌연변이 분석, 펩티드 블롯 분석(문헌 [Reineke (2004) Methods Mol. Biol. 248: 443-63]), 펩티드 절단 분석, 결정학적 연구 및 NMR 분석을 포함한다. 또한, 에피토프 절제, 에피토프 추출 및 항원의 화학적 변형과 같은 방법을 사용할 수 있다(문헌 [Tomer (2000) Prot. Sci. 9: 487-496]). 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체 또는 단편 또는 폴리펩티드)과 상호작용하는 폴리펩티드 내의 아미노산을 식별하는 데 사용될 수 있는 다른 방법은 질량 분석법으로 검출되는 수소/중수소 교환이다. 예를 들어, 문헌 [Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267: 252-259]; [Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73: 256A-265A]을 참조한다.

[0139] 본 개시내용은, 본원에 논의된 바와 같이, TfR 에피토프에 대한 결합에 대해 본원에 기재된 항원 결합 단백질과 경쟁하는 항원 결합 단백질을 포함한다. 용어 "경쟁하다"는, 본원에 사용된 바와 같이, 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)이 항원(예를 들어, TfR)에 결합하고 다른 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)이 항원에 결합하는 것을 억제하거나 차단하는 것을 지칭한다. 달리 명시되지 않는 한, 이 용어는 또한 양방향에서의 두 항원 결합 단백질들, 예를 들어, 항체들 사이의 경쟁, 즉 제1 항체가 항원에 결합하고 제2 항체에 의한 결합을 차단하는 것, 및 그 반대를 포함한다. 따라서, 일 실시양태에서, 경쟁

은 이러한 하나의 방향에서 발생한다. 특정 실시양태에서, 제1 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체) 및 제2 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체)은 동일한 에피토프에 결합할 수 있다. 대안적으로, 제1 및 제2 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체)은, 상이하나, 예를 들어, 중첩되거나 중첩되지 않는 에피토프에 결합할 수 있고, 여기서 하나의 결합은, 예를 들어, 입체 장애를 통해, 제2 항체의 결합을 억제하거나 차단한다. 항원 결합 단백질들(예를 들어, 항체들) 사이의 경쟁은, 당업계에 알려진 방법에 의해, 예를 들어, 실시간 무표지 생물층 간섭계 검정에 의해 측정될 수 있다. 또한, TfR 결합 단백질들(예를 들어, 단클론 항체(mAb)들) 사이의 결합 경쟁은 Octet RED384 바이오센서(Pall ForteBio Corp.)에서 실시간 무표지 생물층 간섭계 검정을 사용하여 결정될 수 있다.

[0140] 전형적으로, 어떤 방식으로든 변형된 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 TfR에 특이적으로 결합하는 능력을 유지하고, 예를 들어, 활성이 몰 기준으로 표현될 때 (부모 항체와 비교 시) 이의 TfR 결합 활성의 적어도 10%를 유지한다. 바람직하게는, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 부모 항체와 비교하여 TfR 결합 친화도의 적어도 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 100% 이상을 유지한다. 또한, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편은 이의 생물학적 활성을 실질적으로 변경하지 않는 보존적 또는 비보존적 아미노산 치환(항체의 "보존적 변이체" 또는 "기능 보존 변이체"라고 지칭됨)을 포함할 수 있는 것으로 의도된다.

[0141] 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질은 분자 카고에 접합될 수 있는 단클론 항체 또는 단클론 항체의 항원 결합 단편일 수 있다. 본 개시내용은 단클론 항-TfR 항원 결합 단백질, 예를 들어, 항체 및 이의 항원 결합 단편, 뿐만 아니라 복수의 단리된 단클론 항원 결합 단백질을 포함하는 단클론 조성물을 포함한다. 용어 "단클론 항체" 또는 "mAb"는, 본원에 사용된 바와 같이, 실질적 동질 항체 집단의 멤버를 지칭하고, 즉 집단을 구성하는 항체 분자는 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 아미노산 서열이 동일하다. 조성물 중 "복수(plurality)"의 이러한 단클론 항체 및 단편은 동일한(즉 위에서 논의한 바와 같이, 미량으로 존재할 수 있는 가능한 자연 발생 돌연변이를 제외한 아미노산 서열이 동일한) 항체 및 단편의 농도가 일반적으로 자연에서 존재하는 농도, 예를 들어, 숙주 유기체, 예컨대 마우스 또는 인간의 혈액에서 존재하는 농도보다 높은 것을 의미한다.

[0142] 일 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질, 예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편(분자 카고에 접합될 수 있음)은, 예를 들어, IgA(예를 들어, IgA1 또는 IgA2), IgD, IgE, IgG(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4) 또는 IgM 유형의 중쇄 불변 도메인을 포함한다. 일 실시양태에서, 항원 결합 단백질, 예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편은, 예를 들어, 카파 또는 람다 유형의 경쇄 불변 도메인을 포함한다. 일 실시양태에서, 본원에 제시된 V_H는 인간 중쇄 불변 도메인(예를 들어, IgG)에 연결되고, 본원에 제시된 V_L은 인간 경쇄 불변 도메인(예를 들어, 카파)에 연결된다. 본 개시내용은, 본원에서 제시된 가변 도메인을 포함하는 항원 결합 단백질을 포함하고, 이는 예를 들어, 본원에서 제시된 바와 같이 중쇄 및/또는 경쇄 불변 도메인에 연결된다.

[0143] 본 개시내용은 분자 카고에 접합될 수 있는 인간 항-TfR 항원 결합 단백질을 포함한다. 용어 "인간" 항원 결합 단백질, 예컨대 항체 또는 항원 결합 단편은, 본원에 사용된 바와 같이, 인간 세포에 있거나 비인간 세포, 예를 들어, 마우스 세포에 이식된 인간 생식세포 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체 및 단편을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,502,018; 6,596,541 또는 5,789,215를 참조한다. 본원에 기재된 항-TfR 인간 mAb는, 예를 들어, CDR, 특히 CDR3에, 인간 생식세포 면역글로불린 서열에 의해 인코딩되지 않은 아미노산 잔기(예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 용어 "인간 항체"는, 본원에 사용된 바와 같이, 다른 포유류 종(예를 들어, 마우스)의 생식세포로부터 유래된 CDR 서열이 인간 FR 서열에 이식된 mAb를 포함하는 것으로 의도되지 않는다. 용어는 비인간 포유동물 또는 비인간 포유동물의 세포에서 재조합적으로 생산된 항체를 포함한다. 용어는 인간 대상체로부터 직접 단리된 천연 항체를 포함하는 것으로 의도되지 않는다. 본 개시내용은 인간 항원 결합 단백질(예를 들어, 본원에 기재된 항체 또는 항원 결합 단편)을 포함한다.

[0144] 본 개시내용은 항-TfR 키메라 항원 결합 단백질, 예를 들어, 항체 및 이의 항원 결합 단편(분자 카고에 접합될 수 있음) 및 이의 사용 방법을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "키메라 항체"는 제1 항체의 가변 도메인 및 제2 항체의 불변 도메인을 갖는 항체이고, 여기서 제1 및 제2 항체는 서로 다른 종으로부터 유래한다. (예를 들어, US4816567; 및 문헌 [Morrison *et al.*, (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855] 참조). 본 개시내용은 본원에 제시된 가변 도메인 및 비인간 불변 도메인을 포함하는 키메라 항체를 포함한다.

[0145] 용어 "재조합" 항-TfR 항원 결합 단백질, 예컨대 항체 또는 이의 항원 결합 단편(분자 카고에 접합될 수 있음)은, 예를 들어, DNA 스플라이싱 및 트랜스유전자 발현을 포함하는 재조합 DNA 기술로 당업계에 알려진 기술 또는 방법에 의해 생성되거나 발현되거나 단리되거나 수득된 이러한 분자를 지칭한다. 용어는 세포 발현 시스템과

같이 비-인간 포유동물(트랜스유전자 비인간 포유동물, 예를 들어, 트랜스유전자 마우스 포함) 또는 세포(예를 들어, CHO 세포)에서 발현되거나 재조합 조합형 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체를 포함한다. 본 개시내용은 본원에서 제시된 바와 같은 재조합 항원 결합 단백질, 예컨대 항체 및 항원 결합 단편을 포함한다.

[0146] 항체의 항원 결합 단편은, 일 실시양태에서, 전장 항체보다 작은 항체를 포함하지만, 예를 들어, 적어도 하나의 가변 도메인을 포함하여 항원, 예를 들어, TfR에 여전히 특이적으로 결합한다. 가변 도메인은 임의의 크기 또는 아미노산 조성의 것일 수 있고, 일반적으로 적어도 하나(예를 들어, 3개)의 CDR(들)을 포함할 것이고, 이는 하나 이상의 프레임워크 서열에 인접하거나 인프레임에 있다. V_L 도메인과 결합된 V_H 도메인을 갖는 항원 결합 단편에서, V_H 및 V_L 도메인은 임의의 적합한 배열로 서로에 대해 위치할 수 있다. 예를 들어, 가변 영역은 이량체성일 수 있고, V_H - V_H, V_H - V_L 또는 V_L - V_L 이량체를 함유할 수 있다. 대안적으로, 항체의 항원 결합 단편은 비공유결합으로 결합된 단량체성 V_H 및/또는 V_L 도메인을 함유할 수 있다.

[0147] 폴리펩티드, 예컨대 면역글로불린 쇄의 "변이체"는, 비교가 BLAST 알고리즘에 의해 수행되는 경우, 본원에 제시된 기준 아미노산 서열(예를 들어, 서열번호 2; 3; 4; 5; 7; 8; 9; 10; 12; 13; 14; 15; 17; 18; 19; 20; 22; 23; 24; 25; 27; 28; 29; 30; 32; 33; 34; 35; 37; 38; 39; 40; 42; 43; 44; 45; 47; 48; 49; 50; 52; 53; 54; 55; 57; 58; 59; 60; 62; 63; 64; 65; 67; 68; 69; 70; 72; 73; 74; 75; 77; 78; 79; 80; 82; 83; 84; 85; 87; 88; 89; 90; 92; 93; 94; 95; 97; 98; 99; 100; 102; 103; 104; 105; 107; 108; 109; 110; 112; 113; 114; 115; 117; 118; 119; 120; 122; 123; 124; 125; 127; 128; 129; 130; 132; 133; 134; 135; 137; 138; 139; 140; 142; 143; 144; 145; 147; 148; 149; 150; 152; 153; 154; 155; 157; 158; 159; 160; 162; 163; 164; 165; 167; 168; 169; 170; 172; 173; 174; 175; 177; 178; 179; 180; 182; 183; 184; 185; 187; 188; 189; 190; 192; 193; 194; 195; 197; 198; 199; 200; 202; 203; 204; 205; 207; 208; 209; 210; 212; 213; 214; 215; 217; 218; 219; 220; 222; 223; 224; 225; 227; 228; 229; 230; 232; 233; 234; 235; 237; 238; 239; 240; 242; 243; 244; 245; 247; 248; 249; 250; 252; 253; 254; 255; 257; 258; 259; 260; 262; 263; 264; 265; 267; 268; 269; 270; 272; 273; 274; 275; 277; 278; 279; 280; 282; 283; 284; 285; 287; 288; 289; 290; 292; 293; 294; 295; 297; 298; 299; 300; 302; 303; 304; 305; 307; 527; 308; 309; 310; 312; 313; 314; 315; 317; 318; 319; 320; 및 328 내지 423 중 임의의 것)과 적어도 약 70 내지 99.9%(예를 들어, 적어도 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.9%) 동일하거나 유사한 아미노산 서열을 포함하고/하거나 이 아미노산 서열을 포함하지만 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개)의 돌연변이(예를 들어, 점 돌연변이, 삽입, 절단 및/또는 결실)를 포함하는 폴리펩티드를 지칭하고, 여기서 알고리즘의 파라미터는 각각의 기준 서열의 전체 길이에 걸쳐 각각의 서열들 사이의 최대 일치를 제공하도록 선택된다(예를 들어, 예상 임계치: 10; 워드 크기: 3; 쿼리 범위에서의 최대 일치: 0; BLOSUM 62 매트릭스; 갭 비용: 존재 11, 연장 1; 조건부 조성 스코어 매트릭스 조정).

[0148] 더욱이, 폴리펩티드의 변이체는, 아미노산 서열이 구체적으로 본원에 제시된 기준 폴리펩티드의 아미노산 서열을 포함할 수 있지만 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개)의 돌연변이, 예를 들어, 하나 이상의 미스센스 돌연변이(예를 들어, 보존적 치환), 넌센스 돌연변이, 결실 또는 삽입이 있는 면역글로불린 쇄와 같은 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용은 서열번호 7, 17, 27, 37, 465, 47, 466, 57, 468, 67, 469, 77, 471, 87, 97, 107, 117, 474, 127, 137, 147, 476, 157, 167, 177, 187, 479, 197, 207, 217, 227, 237, 247, 257, 267, 277, 287, 297, 307, 527, 317, 484에 제시된 아미노산 서열을 포함하지만 이러한 돌연변이 중 하나 이상을 갖는 면역글로불린 경쇄(또는 V_L) 변이체 및/또는 서열번호 2, 462, 12, 463, 22, 464, 32, 42, 52, 467, 62, 492, 72, 470, 82, 92, 472, 102, 112, 473, 122, 132, 142, 475, 152, 162, 477, 172, 182, 478, 192, 480, 202, 481, 212, 222, 232, 242, 252, 482, 262, 272, 282, 292, 302, 483, 312에 제시된 아미노산 서열을 포함하지만 이러한 돌연변이 중 하나 이상을 갖는 면역글로불린 중쇄(또는 V_H) 변이체를 포함하는 TfR-결합 단백질을 포함한다. 일 실시양태에서, TfR-결합 단백질은 CDR 중 하나 이상(예를 들어, 1 또는 2 또는 3개)이 이러한 돌연변이(예를 들어, 보존적 치환) 중 하나 이상을 갖는, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하는 면역글로불린 경쇄 변이체 및/또는 CDR 중 하나 이상(예를 들어, 1 또는 2 또는 3개)이 이러한 돌연변이(예를 들어, 보존적 치환) 중 하나 이상을 갖는, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하는 면역글로불린 중쇄 변이체를 포함한다.

[0149] 다음 참고문헌은 흔히 서열 분석에 사용되는 BLAST 알고리즘과 관련이 있다: 문헌 [BLAST ALGORITHMS: Altschul *et al*. (2005) FEBS J. 272(20): 5101-5109]; [Altschul, S. F., *et al*., (1990) J. Mol. Biol. 215:403-

410]; [Gish, W., *et al.*, (1993) Nature Genet. 3:266-272]; [Madden, T. L., *et al.*, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141]; [Altschul, S. F., *et al.*, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402]; [Zhang, J., *et al.*, (1997) Genome Res. 7:649-656]; [Wootton, J. C., *et al.*, (1993) Comput. Chem. 17:149-163]; [Hancock, J. M. *et al.*, (1994) Comput. Appl. Biosci. 10:67-70]; [ALIGNMENT SCORING SYSTEMS: Dayhoff, M. O., *et al.*, "A model of evolutionary change in proteins." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3. M. O. Dayhoff (ed.), pp. 345-352, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.]; [Schwartz, R. M., *et al.*, "Matrices for detecting distant relationships." in Atlas of Protein Sequence and Structure, (1978) vol. 5, suppl. 3.'' M. O. Dayhoff (ed.), pp. 353-358, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.]; [Altschul, S. F., (1991) J. Mol. Biol. 219:555-565]; [States, D. J., *et al.*, (1991) Methods 3:66-70]; [Henikoff, S., *et al.*, (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919]; [Altschul, S. F., *et al.*, (1993) J. Mol. Evol. 36:290-300]; [ALIGNMENT STATISTICS: Karlin, S., *et al.*, (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268]; [Karlin, S., *et al.*, (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877]; [Dembo, A., *et al.*, (1994) Ann. Prob. 22:2022-2039]; 및 [Altschul, S. F. "Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments." in Theoretical and Computational Methods in Genome Research (S. Suhai, ed.), (1997) pp. 1-14, Plenum, N.Y].

[0150] 예를 들어, 본원에 제시된 면역글로불린 쇄의 "보존적으로 변형된 변이체" 또는 "보존적 치환"은 폴리펩티드의 아미노산이 유사한 특성(예를 들어, 전하, 측쇄 크기, 소수성/친수성, 백본 입체구조 및 강성 등)을 갖는 다른 아미노산으로 하나 이상 치환된 변이체를 지칭한다. 이러한 변화는 항체 또는 단편의 생물학적 활성을 크게 방해하지 않고 빈번하게 이루어질 수 있다. 당업자는 일반적으로 폴리펩티드의 비필수 영역에서 단일 아미노산 치환이 생물학적 활성을 실질적으로 변경하지 않는다는 것을 알고 있다(예를 들어, 문헌 [Watson *et al.* (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)] 참조). 또한, 구조적으로 또는 기능적으로 유사한 아미노산의 치환은 생물학적 활성을 크게 방해할 가능성이 적다. 본 개시내용은 이러한 보존적으로 변형된 변이체 면역글로불린 쇄를 포함하는 TfR-결합 단백질을 포함한다.

[0151] 유사한 화학적 특성을 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 군의 예는 다음을 포함한다: 1) 지방족 측쇄: 글리신, 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신; 2) 지방족-하이드록실 측쇄: 세린 및 트레오닌; 3) 아미드-함유 측쇄: 아스파라긴 및 글루타민; 4) 방향족 측쇄: 페닐알라닌, 티로신 및 트립토판; 5) 염기성 측쇄: 라이신, 아르기닌 및 히스티딘; 6) 산성 측쇄: 아스파르테이트 및 글루타메이트, 및 7) 황-함유 측쇄: 시스테인 및 메티오닌. 대안적으로, 보존적 대체는 문헌 [Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-45]에 개시된 PAM250 로그-가능도 매트릭스에서 양의 값을 갖는 임의의 변화이다.

[0152] 본원에 기재된 항체 및 항원 결합 단편은 본원에 구체적으로 제시된 아미노산 서열(및 이의 변이체)을 포함하는 면역글로불린 쇄, 및 항체 또는 단편에 대한 세포 및 시험관내 번역 후 변형을 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용은 본원에 제시된 중쇄 및/또는 경쇄 아미노산 서열을 포함하는, TfR에 특이적으로 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편, 및 하나 이상의 아스파라긴, 세린 및/또는 트레오닌 잔기가 글리코실화되고/되거나, 하나 이상의 아스파라긴 잔기가 탈아미드화되고/되거나, 하나 이상의 잔기(예를 들어, Met, Trp 및/또는 His)가 산화되고/되거나, N-말단 글루타민이 피로글루타메이트(pyroE)이고/이거나 C-말단 라이신 또는 다른 아미노산이 결여된 항체 및 단편을 포함한다.

[0153] 일 실시양태에서, 항-hTfR 단백질-약물 접합체(예를 들어, scFv, Fab 또는 기타 항체 또는 이의 항원 결합 단편 형태)는 다음 특징 중 하나 이상을 나타낼 수 있다:

[0154] ● 표면 플라즈몬 공명 포맷에서, 25℃에서, 인간 TfR에 대한 결합에 대한, 약 41 nM의 친화도(K_D) 또는 그보다 높은 친화도(예를 들어, 약 1 또는 0.1 nM, 또는 약 0.18 내지 약 1.2 nM, 또는 그보다 높은 친화도);

[0155] ● 표면 플라즈몬 공명 포맷에서, 25℃에서, 원숭이 TfR에 대한 결합에 대한, 약 0 nM(검출 가능한 결합 없음)의 친화도(K_D) 또는 그보다 높은 친화도(예를 들어, 약 20 nM 또는 그보다 높은 친화도);

[0156] ● 표면 플라즈몬 공명 포맷에서, 25℃에서, 0 내지 278(예를 들어, 약 17 또는 18)의 원숭이 TfR에 대한 결합에 대한 K_D / 인간 TfR에 대한 결합에 대한 K_D의 비;

[0157] ● Fab 포맷(IgG1)일 때, 인간 홀로-Tf에 대한 hTfR(예를 들어, Hmm-hTFRC, 예컨대 REGN2431) 결합을 약 3, 5, 10 또는 13% 차단함, 예를 들어, 약 45% 이하 차단;

[0158] ● scFv(V_K-V_H) 포맷일 때, 인간 홀로-Tf에 대한 hTfR(예를 들어, Hmm-hTFRC, 예컨대 REGN2431)의 결합을 약 6, 8, 10 또는 13% 차단함, 예를 들어, 약 45% 이하 차단;

[0159] ● scFv(V_H-V_L) 포맷일 때, 인간 홀로-Tf에 대한 hTfR(예를 들어, Hmm-hTFRC, 예컨대 REGN2431)의 결합을 약 11, 17, 23 또는 26% 차단함, 예를 들어, 약 45% 이하 차단;

[0160] * *Tfrc*^{hum} 또는 *Tfrc*$^{hum/hum}$은 동형접합 녹인(knock-in) 마우스이다.

[0161] 본원에 기재된 접합체의 항-인간 트랜스페린 수용체 항원 결합 단백질의 도메인의 아미노산 서열은 아래 **표 1-1**에 요약되어 있다. 예를 들어, **표 1-1**의 분자의 HCVR 및 LCVR을 포함하거나 이의 CDR을 포함하는, 분자 카고에 접합된 항-인간 트랜스페린 수용체 1 항체 및 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv 및 Fab)이 본원에 포함된다.

표 1-1. 기재된 단백질-약물 접합체의 항체, 항원 결합 단편(예를 들어, Fab 또는 scFv 분자)의 도메인의 서열번호

#	항-hTfR 분자	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
1	31874B	2 또는 462	3	4	5	7	8	9	10
2	31863B	12 또는 463	13	14	15	17	18	19	20
3	69348	22 또는 464	23	24	25	27	28	29	30
4	69340	32	33	34	35	37 또는 465	38	39	40
5	69331	42	43	44	45	47 또는 466	48	49	50
6	69332	52 또는 467	53	54	55	57 또는 468	58	59	60
7	69326	62 또는 492	63	64	65	67 또는 469	68	69	70
8	69329	72 또는 470	73	74	75	77 또는 471	78	79	80
9	69323	82	83	84	85	87	88	89	90
10	69305	92 또는 472	93	94	95	97	98	99	100

[0162]

11	69307	102	103	104	105	107	108	109	110
12	12795B	112 또는 473	113	114	115	117 또는 474	118	119	120
13	12798B	122	123	124	125	127	128	129	130
14	12799B	132	133	134	135	137	138	139	140
15	12801B	142 또는 475	143	144	145	147 또는 476	148	149	150
16	12802B	152	153	154	155	157	158	159	160
17	12808B	162 또는 477	163	164	165	167	168	169	170
18	12812B	172	173	174	175	177	178	179	180
19	12816B	182 또는 478	183	184	185	187 또는 479	188	189	190
20	12833B	192 또는 480	193	194	195	197	198	199	200
21	12834B	202 또는 481	203	204	205	207	208	209	210
22	12835B	212	213	214	215	217	218	219	220
23	12847B	222	223	224	225	227	228	229	230
24	12848B	232	233	234	235	237	238	239	240
25	12843B	242	243	244	245	247	248	249	250
26	12844B	252 또는 482	253	254	255	257	258	259	260
27	12845B	262	263	264	265	267	268	269	270
28	12839B	272	273	274	275	277	278	279	280
29	12841B	282	283	284	285	287	288	289	290
30	12850B	292	293	294	295	297	298	299	300
31	69261	302 또는 483	303	304	305	307 또는 527	308	309	310
32	69263	312	313	314	315	317 또는 484	318	319	320

[0163]

31874B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCGCCTTTAGCAGCTATGCCATGACCTGGGTCCGACAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGTT
ATCAGTGGTACTGGTGGTAGTACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTACAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGGGGA
GCAGCTCGTAGAATGGAATACTTCCAGTACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호
1)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGTGGSTYYADSVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRMEYFQYWGQGTLVTVSS (서열번호 2)

또는

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGTGGSTYYADSVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRMEYFQYWGQGTTVTVSS (서열번호 462)

HCDR1: GFAFSSYA (서열번호 3)

HCDR2: ISGTGGST (서열번호 4)

HCDR3: AKGGAARRMEYFQY (서열번호 5)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCG
AGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAACCTCCTTATCTATGCT
GCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAGTATAACAGTGCCCCTCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA (서열번호 6)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPNLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDVATYYCQKYNSAPLTFGGGTKVEIK (서열번호 7)

LCDR1: QGISNY (서열번호 8)

LCDR2: AAS (서열번호 9)

LCDR3: QKYNSAPLT (서열번호 10)

[0164]

31863B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTAACAGCTATGCCATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCATTT
ATTGGTGGTAGTACTGGTAACACATACTACGCAGGCTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGCGACAATTCC
AAGAAGACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGGGGGA
GCAGCTCGTAGAATGGAATACTTCCAGCACTGGGGCCAGGGCACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호
11)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMTWVRQAPGKGLEWVSFIGGSTGNTYYAGSVKGRFTISSDNS
KKTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRMEYFQHWGQGTLVTVSS (서열번호 12)

또는

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMTWVRQAPGKGLEWVSFIGGSTGNTYYAGSVKGRFTISSDNS
KKTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRMEYFQHWGQGTTVTVSS (서열번호 463)

HCDR1: GFTFNSYA (서열번호 13)

HCDR2: IGGSTGNT (서열번호 14)

HCDR3: AKGGAARRMEYFQH (서열번호 15)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTATAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCG
AGTCAGGGCATTAGCAATTATTTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGTTCCTAAGCTCCTGATCTATGCT
GCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAACCATAACAGTGTCCCTCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA (서열번호 16)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDVATYYCQNHNSVPLTFGGGTKVEIK (서열번호 17)

LCDR1: QGISNY (서열번호 18)

LCDR2: AAS (서열번호 19)

LCDR3: QNHNSVPLT (서열번호 20)

69348

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

[0165]

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCT
GGATTCACCTTCACTACCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCTGTT
ATATGGTATGATGGAAGTAATAAATATTATGGAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGACGACACGGCTGTTTATTACTGTACGAGAACCCAT
GGCTATACCAGGTCGTCGGACGGTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 21)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNSLRVDDTAVYYCTRTHGYTRSSDGFDYWGQGTLVTVSS (서열번호 22)

또는

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNSLRVDDTAVYYCTRTHGYTRSSDGFDYWGQGTMVTVSS (서열번호 464)

HCDR1: GFTFTTYG (서열번호 23)

HCDR2: IWYDGSNK (서열번호 24)

HCDR3: TRTHGYTRSSDGFDY (서열번호 25)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA
AGTCAGAGCATTAGAAATGTTTTAGGCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTCAGCGCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATC
AGCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAGCATAATTTTTACCCGCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA (서열번호 26)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRNVLGWFQQKPGKAPQRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI
SSLQPEDFATYYCLQHNFYPLTFGGGTKVEIK (서열번호 27)

LCDR1: QSIRNV (서열번호 28)

LCDR2: AAS (서열번호 29)

LCDR3: LQHNFYPLT (서열번호 30)

69340

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTGATGATAAAGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGTTCCAGGGAAGGGCCTGGAATGGATCTCAGGT
ATTAGTTGGAATAGTGGTACTATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCATCATCTCCAGAGACAACGCC

[0166]

AAGAACTCCCTGTATCTACAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGCGCAAAAGATGGA
GATACCAGTGGCTGGTACTGGTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
(서열번호 31)

HCVR (V_H) 아미노산 서열
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDKAMHWVRQVPGKGLEWISGISWNSGTIGYADSVKGRFIISRDNA
KNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDGDTSGWYWYGLDVWGQGTTVTVSS (서열번호 32)
HCDR1: GFTFDDKA (서열번호 33)
HCDR2: ISWNSGTI (서열번호 34)
HCDR3: AKDGDTSGWYWYGLDV (서열번호 35)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열
GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCTGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
AGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCCATGAT
GTATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATC
AGCAGTCTAGAGCCTGAAGATTTTGTAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCGACTGGCCCATCACCTTCGGCCAA
GGGACACGACTGGAGATTAAA (서열번호 36)

LCVR (V_L) 아미노산 서열
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIHDVSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI
SSLEPEDFVVYYCQQRSDWPITFGQGTRLEIK (서열번호 37)
또는
DIVMTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIHDVSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI
SSLEPEDFVVYYCQQRSDWPITFGQGTRLEIK (서열번호 465)
LCDR1: QSVSSY (서열번호 38)
LCDR2: DVS (서열번호 39)
LCDR3: QQRSDWPIT (서열번호 40)

69331
HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTATAGCCTCT
GGATTCACCTTCAGTGTCTATGGCATTCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGATGGCAGTA
ATATCACATGATGGAAATATTAAACACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AAGAACACGCTGTATCTTCAAATTAACAGCCTGAGAACTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGATACC
TGGAACTCCCTTGATACTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA (서열번호 41)

[0167]

HCVR (V_H) 아미노산 서열

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCIASGFTFSVYGIHWVRQAPGKGLEWMAVISHDGNIKHYADSVKGRFTISRDNS
KNTLYLQINSLRTEDTAVYYCAKDTWNSLDTFDIWGQGTMVTVSS (서열번호 42)

HCDR1: GFTFSVYG (서열번호 43)

HCDR2: ISHDGNIK (서열번호 44)

HCDR3: AKDTWNSLDTFDI (서열번호 45)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCTGGGCC
AGTCAGGGCATTAGCAGTTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT
GCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATC
AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGCTTAATAGTTACCCTCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA (서열번호 46)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK (서열번호 47)

또는

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIK (서열번호 466)

LCDR1: QGISSY (서열번호 48)

LCDR2: AAS (서열번호 49)

LCDR3: QQLNSYPLT (서열번호 50)

69332

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

CAGGTCACCTTGAGGGAGTCTGGTCCCGCGCTGGTGAAACCCTCACAGACCCTCACACTGACCTGCACCTTCTCT
GGATTCTCACTCAACACTTATGGGATGTTTGTGAGCTGGATCCGTCAGCCTCCAGGGAAGGCCCTAGAGTGGCTT
GCACACATTCATTGGGATGATGATAAATACTACAGCACATCTCTGAAGACCAGGCTCACCATCTCCAAGGACACC
TCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACGTATTATTGTGCACGGGGG
CACAATAATTTGAACTACATCATCCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 51)

[0168] HCVR (V_H) 아미노산 서열

QVTLRESGPALVKPSQTLTLTCTFSGFSLNTYGMFVSWIRQPPGKALEWLAHIHWDDDKYYSTSLKTRLTISKDT
SKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARGHNNLNYIIHWGQGTLVTVSS (서열번호 52)

또는

QVQLVESGPALVKPSQTLTLTCTFSGFSLNTYGMFVSWIRQPPGKALEWLAHIHWDDDKYYSTSLKTRLTISKDT
SKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARGHNNLNYIIHWGQGTLVTVSS (서열번호 467)

HCDR1: GFSLNTYGMF (서열번호 53)

HCDR2: IHWDDDK (서열번호 54)

HCDR3: ARGHNNLNYIIH (서열번호 55)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GCCATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA
AGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT
GCATCCACTTTACAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGCACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTACAAGATTACAATTACCCATTCACTTTCGGCCCT
GGGACCAAAGTGGATATCAAA (서열번호 56)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCLQDYNYPFTFGPGTKVDIK (서열번호 57)

또는

DILMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCLQDYNYPFTFGPGTKVEIK (서열번호 468)

LCDR1: QGIRND (서열번호 58)

LCDR2: AAS (서열번호 59)

LCDR3: LQDYNYPFT (서열번호 60)

69326

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCT
GGATTCATCTTCAGTAGTTATGAAATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATAC
ATTAGTAGTAGTGGTAGTACCATATTCTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGTGTCTGGAGTG
GTCCTTTTTGATGTCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA (서열번호 61)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

[0169]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFIFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIFYADSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGVVLFDVWGQGTMVTVSS (서열번호 62)
또는
QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFIFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIFYADSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGVVLFDVWGQGTMVTVSS (서열번호 492)
HCDR1: GFIFSSYE (서열번호 63)
HCDR2: ISSSGSTI (서열번호 64)
HCDR3: VSGVVLFDV (서열번호 65)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열
GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCGGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
AGTCAGAGTGTTAGCAGCAACTTTGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATAGT
GCATCCTCCAGGGCCACTGGTATCCCAGTCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATC
AGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATATCTGGCCTCGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA (서열번호 66)

LCVR (V_L) 아미노산 서열
EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNFAWYQQKPGQAPRLLIYSASSRATGIPVRFSGSGSGTEFTLTI
SSLQSEDFAVYYCQQYNIWPRTFGQGTKVEIK (서열번호 67)
또는
DIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNFAWYQQKPGQAPRLLIYSASSRATGIPVRFSGSGSGTEFTLTI
SSLQSEDFAVYYCQQYNIWPRTFGQGTKVEIK (서열번호 469)
LCDR1: QSVSSN (서열번호 68)
LCDR2: SAS (서열번호 69)
LCDR3: QQYNIWPRT (서열번호 70)

69329
HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTAGTAACTATTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAC
ATAAAGGAAGATGGAAGTGAGAAAGACTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATGGG
GAGCAGCTCGTCGATTACTACTACTACGTTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
(서열번호 71)

[0170] HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEKDYVDSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYYYYYVMDVWGQGTTVTVSS (서열번호 72)

또는

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEKDYVDSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYYYYYVMDVWGQGTTVTVSS (서열번호 470)

HCDR1: GFTFSNYW (서열번호 73)

HCDR2: IKEDGSEK (서열번호 74)

HCDR3: ARDGEQLVDYYYYYVMDV (서열번호 75)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG
AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAAAAGGCTAACAGTTTCCCGTACACTTTTGGCCAG
GGGACCAAGCTGGAGATCAAA (서열번호 76)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQKANSFPYTFGQGTKLEIK (서열번호 77)

또는

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQKANSFPYTFGQGTKVEIK (서열번호 471)

LCDR1: QGISSW (서열번호 78)

LCDR2: AAS (서열번호 79)

LCDR3: QKANSFPYT (서열번호 80)

69323

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTGATGACTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGT
ATTAGTTGGAATAGTGGTTACATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC
GAGAACTCCCTACATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGCAAGAGGGGGA
TCTACTCTGGTTCGGGGAGTTAAGGGAGGCTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTC
TCCTCA (서열번호 81)

[0171]

HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNA
ENSLHLQMNSLRAEDTALYYCARGGSTLVRGVKGGYYGMDVWGQGTTVTVSS (서열번호 82)

HCDR1: GFTFDDYA (서열번호 83)

HCDR2: ISWNSGYI (서열번호 84)

HCDR3: ARGGSTLVRGVKGGYYGMDV (서열번호 85)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA
AGTCAGAGCATAAGTAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGTAAAGCCCCTAAGGTCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTATTCCGCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA (서열번호 86)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKVLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGGGTKVEIK (서열번호 87)

LCDR1: QSISSY (서열번호 88)

LCDR2: AAS (서열번호 89)

LCDR3: QQSYSIPLT (서열번호 90)

69305

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCT
GGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTT
ATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACATTTCC
AAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGGGTCAACTG
GATCTCTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 91)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDIS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGQLDLFFDYWGQGTLVTVSS (서열번호 92)

또는

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDIS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGQLDLFFDYWGQGTLVTVSS (서열번호 472)

[0172]

HCDR1: GFTFSSYG (서열번호 93)

HCDR2: IWYDGSNK (서열번호 94)

HCDR3: AGQLDLFFDY (서열번호 95)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA
AGTCAGAGCATTGACAGGTATTTAAATTGGTATCGGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATACT
ACATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCCTC
AGCAGTCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAGCAGAGTTACAGTCCCCCGCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA (서열번호 96)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDRYLNWYRQKPGKAPKLLIYTTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTL
SSLQPEDFATYYCQQSYSPPLTFGGGTKVEIK (서열번호 97)

LCDR1: QSIDRY (서열번호 98)

LCDR2: TTS (서열번호 99)

LCDR3: QQSYSPPLT (서열번호 100)

69307

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCCTCT
GGATTCACCTTTAGTAACTATTGGATGACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAC
ATAAAGGAAGATGGAAGTGAGAAAGAGTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAGAATTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGGCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAGAGATGGG
GAGCAGCTCGTCGATTACTATTACTACTACGTTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
(서열번호 101)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEKEYVDSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYYYYYVMDVWGQGTTVTVSS (서열번호 102)

HCDR1: GFTFSNYW (서열번호 103)

HCDR2: IKEDGSEK (서열번호 104)

HCDR3: ARDGEQLVDYYYYYVMDV (서열번호 105)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

[0173]

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG
AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAAAAGGCTGACAGTCTCCCGTACGCTTTTGGCCAG
GGGACCAAGCTGGAGATCAAA (서열번호 106)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQKADSLPYAFGQGTKLEIK (서열번호 107)

LCDR1: QGISSW (서열번호 108)

LCDR2: AAS (서열번호 109)

LCDR3: QKADSLPYA (서열번호 110)

12795B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTCAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAACCTCT
GGATTCACCTTTACCAGCTATGACATGAAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGCTGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGCT
ATTAGTGGTAGTGGTGGTAACACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AGGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTACGAGGTCCCAT
GACTTCGGTGCCTTCGACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호
111)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTSYDMKWVRQAPGLGLEWVSAISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNS
RNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSHDFGAFDYFDYWGQGTLVTVSS (서열번호 112)

또는

EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTSYDMKWVRQAPGLGLEWVSAISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNS
RNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSHDFGAFDYFDYWGQGTMVTVSS (서열번호 473)

HCDR1: GFTFTSYD (서열번호 113)

HCDR2: ISGSGGNT (서열번호 114)

HCDR3: TRSHDFGAFDYFDY (서열번호 115)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA
AGTCAGGGCATTAGAGATCATTTTGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCACAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATC

[0174]

AGCAGCTTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACCTATTACTGTCTACAGTATGATACTTACCCGCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA (서열번호 116)

LCVR (V_L) 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRDHFGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI
SSLQPEDFATYYCLQYDTYPLTFGGGTKVEIK (서열번호 117)

또는
DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRDHFGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI
SSLQPEDFATYYCLQYDTYPLTFGGGTKVEIK (서열번호 474)

LCDR1: QGIRDH (서열번호 118)
LCDR2: AAS (서열번호 119)
LCDR3: LQYDTYPLT (서열번호 120)

12798B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열
GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGACTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGT
ATTAGTTGGAATAGTGCTACCAGAGTCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAGAATTTCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGATCTGAGGACACGGCCTTGTATCACTGTGCAAAAGATATG
GATATCTCGCTAGGGTACTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호
121)

HCVR (V_H) 아미노산 서열
EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSATRVYADSVKGRFTISRDNA
KNFLYLQMNSLRSEDTALYHCAKDMDISLGYYGLDVWGQGTTVTVSS (서열번호 122)
HCDR1: GFTFDDYA (서열번호 123)
HCDR2: ISWNSATR (서열번호 124)
HCDR3: AKDMDISLGYYGLDV (서열번호 125)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열
GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
AGTCAGACTGTTAGCAGCAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGT
TCATCCTCCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATC
AGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAACTGGCCTCCCTACACTTTTGGC
CAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (서열번호 126)

[0175]

LCVR (V_L) 아미노산 서열

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQTVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGSSSRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI
SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPYTFGQGTKLEIK (서열번호 127)

LCDR1: QTVSSN (서열번호 128)

LCDR2: GSS (서열번호 129)

LCDR3: QQYNNWPPYT (서열번호 130)

12799B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

CAGATCACCTTGAAGGAGTCTGGTCCTACGCTGGTGAAACCCACACAGACCCTCACGCTGACCTGCACCTTCTCT
GGGTTCTCACTCAGCACTAGTGGAGTGGGTGTGGTCTGGATCCGTCAGCCCCCCGGAAAGGCCCTGGAGTGGCTT
GCACTCATTTATTGGAATGATCATAAGCGGTACAGCCCATCTCTGGGGAGCAGGCTCACCATCACCAAGGACACC
TCCAAAAACCAGGTGGTCCTTACAATGACCAACATGGACCCTGTGGACACAGCCACATATTACTGTGCACACTAC
AGTGGGAGCTATTCCTACTACTACTATGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
(서열번호 131)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVVWIRQPPGKALEWLALIYWNDHKRYSPSLGSRLTITKDT
SKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAHYSGSYSYYYYGLDVWGQGTTVTVSS (서열번호 132)

HCDR1: GFSLSTSGVG (서열번호 133)

HCDR2: IYWNDHK (서열번호 134)

HCDR3: AHYSGSYSYYYYGLDV (서열번호 135)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG
AGTCAGGGTATTGCCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTGAGCTCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAGGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAATTTACTATTGTCAACAGGCTAACTATTTCCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA (서열번호 136)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIASWLAWYQQKPGKAPELLIYAASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFAIYYCQQANYFPWTFGQGTKVEIK (서열번호 137)

LCDR1: QGIASW (서열번호 138)

[0176]

LCDR2: AAS (서열번호 139)

LCDR3: QQANYFPWT (서열번호 140)

12801B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGCCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTACCTCCTATGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGGTCTCATCT
ATTAGAGGTAGTGGTGGTGGCACATACTCCGCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCC
AGGGACACTCTATATCTGCAAATGAACAGTGTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAGGTCCCAT
GACTACGGTGCCTTCGACTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 141)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMHWVRQAPGKGLEWVSSIRGSGGGTYSADSVKGRFTISRDNS
RDTLYLQMNSVRAEDTAVYYCARSHDYGAFDFFDYWGQGTLVTVSS (서열번호 142)

또는

EVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMHWVRQAPGKGLEWVSSIRGSGGGTYSADSVKGRFTISRDNS
RDTLYLQMNSVRAEDTAVYYCARSHDYGAFDFFDYWGQGTTVTVSS (서열번호 475)

HCDR1: GFTFTSYA (서열번호 143)

HCDR2: IRGSGGGT (서열번호 144)

HCDR3: ARSHDYGAFDFFDY (서열번호 145)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA
AGTCAGGGCATTAGAACTGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATC
AGCAGCCTGCGGCCTGAAGATTTTGCAACTTTTTACTGTCTACAGTATAATAGTTACCCGCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA (서열번호 146)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRTDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI
SSLRPEDFATFYCLQYNSYPLTFGGGTKVEIK (서열번호 147)

또는

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRTDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI
SSLRPEDFATFYCLQYNSYPLTFGGGTKVDIK (서열번호 476)

[0177]

LCDR1: QGIRTD (서열번호 148)

LCDR2: AAS (서열번호 149)

LCDR3: LQYNSYPLT (서열번호 150)

12802B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTCAGTGACTACTTCATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATAC
ATTAGTAGTACTGGTAGTACCATAAATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAATGTC
AAGAATTCACTGTATCTGCAAATGACCAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTACGAGAGATAAC
TGGAACTATGAATACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 151)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYFMSWIRQAPGKGLEWVSYISSTGSTINYADSVKGRFTISRDNV
KNSLYLQMTSLRVEDTAVYYCTRDNWNYEYWGQGTLVTVSS (서열번호 152)

HCDR1: GFTFSDYF (서열번호 153)

HCDR2: ISSTGSTI (서열번호 154)

HCDR3: TRDNWNYEY (서열번호 155)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
AGTCAGAGTGTTAGCATCAACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTTTGTT
GCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATC
AGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAGCAGTATGATATCTGGCCGTACACTTTTGGCCAG
GGGACCAAGCTGGAGATCAAA (서열번호 156)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSINLAWYQQKPGQAPRLLIFVASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI
SSLQSEDFATYYCQQYDIWPYTFGQGTKLEIK (서열번호 157)

LCDR1: QSVSIN (서열번호 158)

LCDR2: VAS (서열번호 159)

LCDR3: QQYDIWPYT (서열번호 160)

12808B

[0178] HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTGTCT
GGTGAATCCATCAGCAGTAATACTTACTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATT
GGGAGTATCGATTATAGTGGGACCACCAATTATAACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACG
TCCAGGAATCACTTCTCCCTGAGGCTGAGGTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAG
TGGGGAAACTACGGCTACTATTACGGTATGGACGTTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
(서열번호 161)

HCVR (V_H) 아미노산 서열
QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGESISSNTYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIDYSGTTNYNPSLKSRVTISVDT
SRNHFSLRLRSVTAADTAVYYCAREWGNYGYYYGMDVWGQGTTVTVSS (서열번호 162)
또는
QVQLVESGPGLVKPSETLSLTCTVSGESISSNTYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIDYSGTTNYNPSLKSRVTISVDT
SRNHFSLRLRSVTAADTAVYYCAREWGNYGYYYGMDVWGQGTTVTVSS (서열번호: 477)
HCDR1: GESISSNTYY (서열번호 163)
HCDR2: IDYSGTT (서열번호 164)
HCDR3: AREWGNYGYYYGMDV (서열번호 165)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCAATTGCCGGGCA
AGTCAGGGCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATTAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATC
AACAACCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCTATCGCATAATAGTTACCCGTGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA (서열번호 166)

LCVR (V_L) 아미노산 서열
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPLRFSGSGSGTEFTLTI
NNLQPEDFATYYCLSHNSYPWTFGQGTKVEIK (서열번호 167)
LCDR1: QGIRND (서열번호 168)
LCDR2: AAS (서열번호 169)
LCDR3: LSHNSYPWT (서열번호: 170)

12812B
HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열
CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAGGGTCTCCTGCAAGGCTTCT
AGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATGGGAGGG
ATCATCCCCATCTTTGGTACAGCAAACTACGCACAGAAGTTCCTGGCCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCC

[0179]

ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGAAG
GGGTGGAACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 171)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASRGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFLARVTITADES
TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKGWNYFDYWGQGTLVTVSS (서열번호 172)

HCDR1: RGTFSSYA (서열번호 173)

HCDR2: IIPIFGTA (서열번호 174)

HCDR3: AREKGWNYFDY (서열번호 175)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCACCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCGGGCG
AGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTACTATTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCTCGGACGTTCGGCCAA
GGGACCAAGGTGGAAATCAAA (서열번호 176)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPPSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVEIK (서열번호 177)

LCDR1: QGISSW (서열번호 178)

LCDR2: AAS (서열번호 179)

LCDR3: QQANSFPRT (서열번호 180)

12816B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAACTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATAC
ATTAGTAGTAGTGGGACTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCC
AAGAAATCACTGTATCTGGAGATGAACAGCCTCAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTACTACTGTGCGAGAGAGGGG
TACGGTAATGACTACTATTACTACGGTATAGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
(서열번호 181)

[0180] HCVR (V_H) 아미노산 서열

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGTTIYYADSVKGRFTISRDNA
KKSLYLEMNSLRAEDTAVYYCAREGYGNDYYYYGIDVWGQGTTVTVSS (서열번호 182)

또는

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGTTIYYADSVKGRFTISRDNA
KKSLYLEMNSLRAEDTAVYYCAREGYGNDYYYYGIDVWGQGTTVTVSS (서열번호 478)

HCDR1: GFTFSDYY (서열번호 183)

HCDR2: ISSSGTTI (서열번호 184)

HCDR3: AREGYGNDYYYYGIDV (서열번호 185)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCT
AGTCAGAGCCTCCTGCATGGTAATGGATACAACTATTTGACTTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAG
CTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGAT
TTTACACTGAAAATAAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCG
TACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (서열번호 186)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHGNGYNYLTWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTD
FTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIK (서열번호 187)

또는

DIQLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHGNGYNYLTWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTD
FTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKVEIK (서열번호 479)

LCDR1: QSLLHGNGYNY (서열번호 188)

LCDR2: LGS (서열번호 189)

LCDR3: MQALQTPYT (서열번호 190)

12833B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTCAGTAGCTTTGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGATATTT
ATATCATATGATGGAAGTGATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCGCCATCTCCAGAGACAGTTCC
AAGAACACGCTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAGAAAAC
GGTATTTTGACTGATTCCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호
191)

[0181]

HCVR (V_H) 아미노산 서열

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVIFISYDGSDKYYADSVKGRFAISRDSS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKENGILTDSYGMDVWGQGTTVTVSS (서열번호 192)

또는

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVIFISYDGSDKYYADSVKGRFAISRDSS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKENGILTDSYGMDVWGQGTTVTVSS (서열번호 480)

HCDR1: GFTFSSFG (서열번호 193)

HCDR2: ISYDGSDK (서열번호 194)

HCDR3: AKENGILTDSYGMDV (서열번호 195)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA
AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (서열번호 196)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (서열번호 197)

LCDR1: QSISSY (서열번호 198)

LCDR2: AAS (서열번호 199)

LCDR3: QQSYSTPPIT (서열번호 200)

12834B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

CAGGTTCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCTGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT
GGTTACACCTTTACCAGCTATGGTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGATGG
ATCAGTGTTTACCATGGTAACACAAACTATGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACCATGACCACAGACACATCC
ACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCTGACGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGG
TATTACGATTTTTGGAGTGGTTATTACCCTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
(서열번호 201)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISVYHGNTNYAQKFQGRVTMTTDTS
TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREGYYDFWSGYYPFDYWGQGTLVTVSS (서열번호 202)

[0182]

또는

EVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISVYHGNTNYAQKFQGRVTMTTDTS

TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREGYYDFWSGYYPFDYWGQGTTVTVSS (서열번호 481)

HCDR1: GYTFTSYG (서열번호 203)

HCDR2: ISVYHGNT (서열번호 204)

HCDR3: AREGYYDFWSGYYPFDY (서열번호 205)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA

AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT

GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC

AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC

CAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (서열번호 206)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI

SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (서열번호 207)

LCDR1: QSISSY (서열번호 208)

LCDR2: AAS (서열번호 209)

LCDR3: QQSYSTPPIT (서열번호 210)

12835B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGATACAACCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGAAGCCTCT

GGATTCACCTTCAGAAATTATGAAATGAATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATAT

ATTAGTAGTAGTGGTAATATGAAAGACTACGCAGAGTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGTC

AAGAATTCACTGCAGCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGACGAG

TTTCCTTACGGAATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 211)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCEASGFTFRNYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGNMKDYAESVKGRFTISRDNV

KNSLQLQMNSLRVEDTAVYYCARDEFPYGMDVWGQGTTVTVSS (서열번호 212)

HCDR1: GFTFRNYE (서열번호 213)

HCDR2: ISSSGNMK (서열번호 214)

HCDR3: ARDEFPYGMDV (서열번호 215)

[0183]

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA
AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (서열번호 216)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (서열번호 217)

LCDR1: QSISSY (서열번호 218)

LCDR2: AAS (서열번호 219)

LCDR3: QQSYSTPPIT (서열번호 220)

12847B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTTCAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTGATGATTATGCCATGAACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGT
ATTAGTTGGAGTAGTGGTAGCATGGACTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAAAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAACTGAGGACACGGCCTTATATTACTGTGCAAAAGCTAGG
GAAGTTGGAGACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호
221)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISWSSGSMDYADSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKAREVGDYYGMDVWGQGTTVTVSS (서열번호 222)

HCDR1: GFTFDDYA (서열번호 223)

HCDR2: ISWSSGSM (서열번호 224)

HCDR3: AKAREVGDYYGMDV (서열번호 225)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA
AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC

[0184]

AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (서열번호 226)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (서열번호 227)

LCDR1: QSISSY (서열번호 228)

LCDR2: AAS (서열번호 229)

LCDR3: QQSYSTPPIT (서열번호 230)

12848B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGACACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTGATAATTTTGGCATGCACTGGGTCCGGCAAGGTCCAGGGAAGGGCCTGGAATGGGTCTCAGGT
CTTACTTGGAATAGTGGTGTCATAGGCTATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGACCTGAGGACACGGCCTTATATTACTGTGCAAAAGATATA
CGGAATTACGGCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 231)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASGFTFDNFGMHWVRQGPGKGLEWVSGLTWNSGVIGYADSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRPEDTALYYCAKDIRNYGPFDYWGQGTLVTVSS (서열번호 232)

HCDR1: GFTFDNFG (서열번호 233)

HCDR2: LTWNSGVI (서열번호 234)

HCDR3: AKDIRNYGPFDY (서열번호 235)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
AGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACC
ATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTTGGACGTTCGGC
CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (서열번호 236)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT
ISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK (서열번호 237)

[0185]

LCDR1: QSVSSSY (서열번호 238)

LCDR2: GAS (서열번호 239)

LCDR3: QQYGSSPWT (서열번호 240)

12843B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTACAGCCTGGAGGGTCCCTAAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTCAATATTTTTGAAATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTCCTAC
ATTAGTAGTCGTGGAACTACCACATACTACGCAGACTCTGTGAGGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGATTAT
GAAGCAACAATCCCTTTTGACTTCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호 : 241)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIFEMNWVRQAPGKGLEWISYISSRGTTTYYADSVRGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYEATIPFDFWGQGTLVTVSS (서열번호 242)

HCDR1: GFTFNIFE (서열번호 243)

HCDR2: ISSRGTTT (서열번호 244)

HCDR3: ARDYEATIPFDF (서열번호 : 245)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA
AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (서열번호 246)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (서열번호 247)

LCDR1: QSISSY (서열번호 248)

LCDR2: AAS (서열번호 249)

LCDR3: QQSYSTPPIT (서열번호 250)

12844B

[0186] HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAAGTGTGGTACGGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGAAGCCTCT
GGATTCACCTTTGATGATTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGATCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCTGGT
ATTAATTGGAATGGTGATAGAACAAATTATGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCATCATTTCCAGAGACAACGCC
AAGAACTCTGTGTATCTACAAATGAACAGTCTGAGAGCGGAGGACTCGGCCTTGTATCACTGTGCGAGAGATCAG
GGACTCGGAGTGGCAGCTACCCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호
251)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLVESGGSVVRPGGSLRLSCEASGFTFDDYGMSWVRQDPGKGLEWVSGINWNGDRTNYADSVKGRFIISRDNA
KNSVYLQMNSLRAEDSALYHCARDQGLGVAATLDYWGQGTLVTVSS (서열번호 252)

또는

EVQLVESGGSVVRPGGSLRLSCEASGFTFDDYGMSWVRQDPGKGLEWVSGINWNGDRTNYADSVKGRFIISRDNA
KNSVYLQMNSLRAEDSALYHCARDQGLGVAATLDYWGQGTMVTVSS (서열번호 482)

HCDR1: GFTFDDYG (서열번호 253)

HCDR2: INWNGDRT (서열번호 254)

HCDR3: ARDQGLGVAATLDY (서열번호 255)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA
AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (서열번호 256)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (서열번호 257)

LCDR1: QSISSY (서열번호 258)

LCDR2: AAS (서열번호 259)

LCDR3: QQSYSTPPIT (서열번호 260)

12845B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCGTCAGTAATTATGAAATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATAC
ATTAGTAGTAGTACCAGTAACATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC

[0187]

GAGAACTCACTGTATCTGCAGATGAACAGCCTGAGAGTCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGTGAGAGATGGG
ATTGTAGTAGTTCCAGTTGGTCGTGGATACTACTATTACGGTTTGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACC
GTCTCCTCA (서열번호 261)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSTSNIYYADSVKGRFTISRDNA
ENSLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGIVVVPVGRGYYYYGLDVWGQGTTVTVSS (서열번호 262)

HCDR1: GFTVSNYE (서열번호 263)

HCDR2: ISSSTSNI (서열번호 264)

HCDR3: VRDGIVVVPVGRGYYYYGLDV (서열번호 265)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA
AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (서열번호 266)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (서열번호 267)

LCDR1: QSISSY (서열번호 268)

LCDR2: AAS (서열번호 269)

LCDR3: QQSYSTPPIT (서열번호 270)

12839B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGAAGGTCCCTGAGACTCTCCTGCGCAGCCTCT
GGATTCCCCTTTAGTAATTATGTCATGTATTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCTCTT
ATTTTTTTTGACGGAAAGAAAAACTATCATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATAACCAGAGACAATTCC
AAAAATATGTTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAGACCTGAGGACGCGGCTGTGTATTACTGTGCGAAAATCCAT
TGTCCTAATGGTGTATGTTACAAGGGGTATTACGGAATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCC
TCA (서열번호 271)

[0188] HCVR (V_H) 아미노산 서열

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSNYVMYWVRQAPGKGLEWVALIFFDGKKNYHADSVKGRFTITRDNS
KNMLYLQMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMDVWGQGTTVTVSS (서열번호 272)

HCDR1: GFPFSNYV (서열번호 273)

HCDR2: IFFDGKKN (서열번호 274)

HCDR3: AKIHCPNGVCYKGYYGMDV (서열번호 275)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA
AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (서열번호 276)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (서열번호 277)

LCDR1: QSISSY (서열번호 278)

LCDR2: AAS (서열번호 279)

LCDR3: QQSYSTPPIT (서열번호 280)

12841B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTCCCTAAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTTAGTAACTATTGGATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGGTGGCCAAT
ATAAAAGAAGATGGAGGTAAGAAATTGTATGTGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAGAACTCACTGTTTCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTATTGTGCGAGAGAAGAT
ACAACTTTGGTTGTGGACTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
(서열번호 281)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVANIKEDGGKKLYVDSVKGRFTISRDNA
KNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREDTTLVVDYYYYGMDVWGQGTTVTVSS (서열번호 282)

HCDR1: GFTFSNYW (서열번호 283)

HCDR2: IKEDGGKK (서열번호 284)

HCDR3: AREDTTLVVDYYYYGMDV (서열번호 285)

[0189]

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCA
AGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCT
GCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATC
AGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGC
CAAGGGACACGACTGGAGATTAAA (서열번호 286)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIK (서열번호 : 287)

LCDR1: QSISSY (서열번호 288)

LCDR2: AAS (서열번호 289)

LCDR3: QQSYSTPPIT (서열번호 290)

12850B

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCT
GGAGGCACCTTCAACACCTATGCTATCACCTGGGTGCGACAGGCCCCTGGACAAGGGCTTGAATGGATGGGGGGA
ATCATCCCTATCTCTGGCATAGCAGAGTACGCACAGAAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATCACCACGGATGACTCC
TCGACCACAGCCTACATGGAACTGAACAGTCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGCTGGAAC
TACGCACTCTACTACTTCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCGAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호
291)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNTYAITWVRQAPGQGLEWMGGIIPISGIAEYAQKFQGRVTITTDDS
STTAYMELNSLRSEDTAVYYCASWNYALYYFYGMDVWGRGTTVTVSS (서열번호 292)

HCDR1: GGTFNTYA (서열번호 293)

HCDR2: IIPISGIA (서열번호 294)

HCDR3: ASWNYALYYFYGMDV (서열번호 295)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC
AGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT
GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACC

[0190]

ATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCTTGGACGTTCGGC
CAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA (서열번호 296)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT
ISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK (서열번호 297)

LCDR1: QSVSSSY (서열번호 298)

LCDR2: GAS (서열번호 299)

LCDR3: QQYGSSPWT (서열번호 300)

69261

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCT
GGATTCACCTTCAGTGTCTATTACATGAACTGGATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTTTCATAC
ATTAGTAGTAGTGGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAACGCC
AAGAACTCACTGTATCTCCAAATGAACAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGGGAGAGAAGGG
TATAGTGGGACTTATTCTTATTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
(서열번호 301)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCGREGYSGTYSYYGMDVWGQGTTVTVSS (서열번호 302)

또는

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCGREGYSGTYSYYGMDVWGQGTTVTVSS (서열번호 483)

HCDR1: GFTFSVYY (서열번호 303)

HCDR2: ISSSGSTI (서열번호 304)

HCDR3: GREGYSGTYSYYGMDV (서열번호 305)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCT
AGTCAGAGCCTCCTGCATAGTAATGGATACAACTATTTGGATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAG
TTCCTGATCTATTTGGGTTCTAATCGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGAT
TTTACACTGAAAATCAACAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTCTACAAACTCCG
[0191] TACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (서열번호 306)

LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQFLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTD
FTLKINRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIK (서열번호 307)

또는

DIQLTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQFLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTD
FTLKINRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKVEIK (서열번호 527)

LCDR1: QSLLHSNGYNY (서열번호 308)

LCDR2: LGS (서열번호 309)

LCDR3: MQALQTPYT (서열번호 310)

69263

HCVR (V_H) 뉴클레오티드 서열

GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGTTGGTACAGCCTGGCAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGTCTCT
GGATTCACCTTTGATGATTATGCCATGCACTGGGTCCGGCAAGCTCCAGGGAAGGGCCTGGAGTGGGTCTCAGGT
ATTAGTTGGAATAGTGGTACCAGAGGATATGCGGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCC
AAGAACTCCCTGTATCTGCAAATGAACAGTCTGAGAGGTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGTGTAAAAGATATT
ACGATATCCCCCAACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (서열번호
311)

HCVR (V_H) 아미노산 서열

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAVSGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGTRGYADSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVKDITISPNYYGMDVWGQGTTVTVSS (서열번호 312)

HCDR1: GFTFDDYA (서열번호 313)

HCDR2: ISWNSGTR (서열번호 314)

HCDR3: VKDITISPNYYGMDV (서열번호 315)

LCVR (V_L) 뉴클레오티드 서열

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCG
AGTCAGGACATTAGCCATTATTCAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAACTTCCTAACCTCCTGATCTATGCT
GCATCCACTTTGCAATCAGGGGTCCCATCTCGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCTCTCTCACCACC
AGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCAACTTATTACTGTCAAAAGTATAACAGTGTCCCTCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA (서열번호 316)

[0192] LCVR (V_L) 아미노산 서열

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISHYSAWYQQKPGKLPNLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFSLTT
SSLQPEDVATYYCQKYNSVPLTFGGGTKVEIK (서열번호 317)

또는

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISHYSAWYQQKPGKLPNLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFSLTT
SSLQPEDVATYYCQKYNSVPLTFGGRTKVEIK (서열번호 484)

LCDR1: QDISHY (서열번호 318)

LCDR2: AAS (서열번호 319)

LCDR3: QKYNSVPLT (서열번호 320)

[0193]

[0194] 논의된 바와 같이, 항-hTfR scFv 단백질-약물 접합체(예를 들어, 31874B; 31863B; 69348; 69340; 69331; 69332; 69326; 69329; 69323; 69305; 69307; 12795B; 12798B; 12799B; 12801B; 12802B; 12808B; 12812B; 12816B; 12833B; 12834B; 12835B; 12847B; 12848B; 12843B; 12844B; 12845B; 12839B; 12841B; 12850B; 69261; 또는 69263)는 선택적 신호 펩티드(예를 들어, mROR 신호 서열)를 포함하고, 이는 scFv(예를 들어, 링커에 의해

선택적으로 연결된 V_L 및 V_H 포함)에 연결되고, 선택적 링커에 연결되고, 분자 카고에 연결되고, 여기서, 예를 들어:

[0195] (I)

[0196] 선택적 신호 펩티드는, 예를 들어, *무스 무스쿨루스*(*Mus musculus*) Ror1로부터의 신호 펩티드이고(예를 들어, 아미노산 MHRPRRRGTRPPPLALLAALLLAARGADA(서열번호 528)로 이루어짐);

[0197] (II)

[0198] scFv는 (i) 서열번호 2; 462; 12; 463; 22; 464; 32; 42; 52; 467; 62; 492; 72; 470; 82; 92; 472; 102; 112; 473; 122; 132; 142; 475; 152; 162; 477; 172; 182; 478; 192; 480; 202; 481; 212; 222; 232; 242; 252; 482; 262; 272; 282; 292; 302; 483 또는 312에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역;

[0199] 및/또는

[0200] (ii) 서열번호 7; 17; 27; 37; 465; 47; 466; 57; 468; 67; 469; 77; 471; 87; 97; 107; 117; 474; 127; 137; 147; 476; 157; 167; 177; 187; 479; 197; 207; 217; 227; 237; 247; 257; 267; 277; 287; 297; 307; 527; 317 또는 484에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역

[0201] 을 포함하거나;

[0202] scFv는

[0203] (1) 서열번호 2 또는 462에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0204] (2) 서열번호 12 또는 463에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0205] (3) 서열번호 22 또는 464에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0206] (4) 서열번호 32에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 37 또는 465에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0207] (5) 서열번호 42에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 47 또는 466에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0208] (6) 서열번호 52 또는 467에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 57 또는 468에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0209] (7) 서열번호 62 또는 492에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 67 또는 469에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0210] (8) 서열번호 72 또는 470 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 77 또는 471에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0211] (9) 서열번호 82에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 87에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0212] (10) 서열번호 92 또는 472에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 97에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0213] (11) 서열번호 102에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 107에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0214] (12) 서열번호 112 또는 473에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 117 또는 474에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0215] (13) 서열번호 122에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 127에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0216] (14) 서열번호 132에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 137에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0217] (15) 서열번호 142 또는 475에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 147 또는 476에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0218] (16) 서열번호 152에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 157에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0219] (17) 서열번호 162 또는 477에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 167에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0220] (18) 서열번호 172에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 177에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0221] (19) 서열번호 182 또는 478에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 187 또는 479에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0222] (20) 서열번호 192 또는 480에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 197에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0223] (21) 서열번호 202 또는 481에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 207에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0224] (22) 서열번호 212에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 217에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0225] (23) 서열번호 222에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 227에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0226] (24) 서열번호 232에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 237에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및

LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0227] (25) 서열번호 242에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 247에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0228] (26) 서열번호 252 또는 482에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 257에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0229] (27) 서열번호 262에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 267에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0230] (28) 서열번호 272에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 277에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0231] (29) 서열번호 282에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 287에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0232] (30) 서열번호 292에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 297에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0233] (31) 서열번호 302 또는 483에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 307 또는 527에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR;

[0234] (32) 서열번호 312에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 317 또는 484에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 LCVR

[0235] 을 포함하거나

[0236] scFv는

[0237] (a) 서열번호 3에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0238] 서열번호 4에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0239] 서열번호 5에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0240] 을 포함하는 HCVR; 및

[0241] 서열번호 8에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0242] 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0243] 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0244] 을 포함하는 LCVR;

[0245] (b) 서열번호 13에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0246] 서열번호 14에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0247] 서열번호 15에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0248] 을 포함하는 HCVR; 및

[0249] 서열번호 18에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0250] 서열번호 19에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0251] 서열번호 20에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0252] 을 포함하는 LCVR;

[0253] (c) 서열번호 23에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0254] 서열번호 24에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0255] 서열번호 25에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0256] 을 포함하는 HCVR; 및

[0257] 서열번호 28에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0258] 서열번호 29에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0259] 서열번호 30에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0260] 을 포함하는 LCVR;

[0261] (d) 서열번호 33에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0262] 서열번호 34에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0263] 서열번호 35에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0264] 을 포함하는 HCVR; 및

[0265] 서열번호 38에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0266] 서열번호 39에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0267] 서열번호 40에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0268] 을 포함하는 LCVR;

[0269] (e) 서열번호 43에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0270] 서열번호 44에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0271] 서열번호 45에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0272] 을 포함하는 HCVR; 및

[0273] 서열번호 48에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0274] 서열번호 49에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0275] 서열번호 50에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0276] 을 포함하는 LCVR;

[0277] (f) 서열번호 53에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0278] 서열번호 54에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0279] 서열번호 55에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0280] 을 포함하는 HCVR; 및

[0281] 서열번호 58에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0282] 서열번호 59에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0283] 서열번호 60에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0284] 을 포함하는 LCVR;

[0285] (g) 서열번호 63에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0286] 서열번호 64에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0287] 서열번호 65에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0288] 을 포함하는 HCVR; 및

[0289] 서열번호 68에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0290] 서열번호 69에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0291] 서열번호 70에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0292] 을 포함하는 LCVR;

[0293] (h) 서열번호 73에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0294] 서열번호 74에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0295] 서열번호 75에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0296] 을 포함하는 HCVR; 및

[0297] 서열번호 78에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0298] 서열번호 79에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0299] 서열번호 80에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0300] 을 포함하는 LCVR;

[0301] (i) 서열번호 83에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0302] 서열번호 84에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0303] 서열번호 85에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0304] 을 포함하는 HCVR; 및

[0305] 서열번호 88에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0306] 서열번호 89에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0307] 서열번호 90에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0308] 을 포함하는 LCVR;

[0309] (j) 서열번호 93에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0310] 서열번호 94에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0311] 서열번호 95에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0312] 을 포함하는 HCVR; 및

[0313] 서열번호 98에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0314] 서열번호 99에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0315] 서열번호 100에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0316] 을 포함하는 LCVR;

[0317] (k) 서열번호 103에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0318] 서열번호 104에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0319] 서열번호 105에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0320] 을 포함하는 HCVR; 및

[0321] 서열번호 108에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0322] 서열번호 109에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0323] 서열번호 110에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0324] 을 포함하는 LCVR;

[0325] (l) 서열번호 113에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0326] 서열번호 114에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0327] 서열번호 115에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0328] 을 포함하는 HCVR; 및

[0329] 서열번호 118에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0330] 서열번호 119에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0331] 서열번호 120에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0332] 을 포함하는 LCVR;

[0333] (m) 서열번호 123에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0334] 서열번호 124에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0335] 서열번호 125에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0336] 을 포함하는 HCVR; 및

[0337] 서열번호 128에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0338] 서열번호 129에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0339] 서열번호 130에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0340] 을 포함하는 LCVR;

[0341] (n) 서열번호 133에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0342] 서열번호 134에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0343] 서열번호 135에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0344] 을 포함하는 HCVR; 및

[0345] 서열번호 138에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0346] 서열번호 139에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0347] 서열번호 140에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0348] 을 포함하는 LCVR;

[0349] (o) 서열번호 143에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0350] 서열번호 144에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0351] 서열번호 145에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0352] 을 포함하는 HCVR; 및

[0353] 서열번호 148에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0354] 서열번호 149에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0355] 서열번호 150에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0356] 을 포함하는 LCVR;

[0357] (p) 서열번호 153에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0358] 서열번호 154에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0359] 서열번호 155에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0360] 을 포함하는 HCVR; 및

[0361] 서열번호 158에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0362] 서열번호 159에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0363] 서열번호 160에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0364] 을 포함하는 LCVR;

[0365] (q) 서열번호 163에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0366] 서열번호 164에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0367] 서열번호 165에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0368] 을 포함하는 HCVR; 및

[0369] 서열번호 168에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0370] 서열번호 169에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0371] 서열번호 170에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0372] 을 포함하는 LCVR;

[0373] (r) 서열번호 173에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0374] 서열번호 174에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0375] 서열번호 175에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0376] 을 포함하는 HCVR; 및

[0377] 서열번호 178에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0378] 서열번호 179에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0379] 서열번호 180에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0380] 을 포함하는 LCVR;

[0381] (s) 서열번호 183에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0382] 서열번호 184에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0383] 서열번호 185에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0384] 을 포함하는 HCVR; 및

[0385] 서열번호 188에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0386] 서열번호 189에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0387] 서열번호 190에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0388] 을 포함하는 LCVR;

[0389] (t) 서열번호 193에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0390] 서열번호 194에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0391] 서열번호 195에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0392] 을 포함하는 HCVR; 및

[0393] 서열번호 198에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0394] 서열번호 199에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0395] 서열번호 200에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0396] 을 포함하는 LCVR;

[0397] (u) 서열번호 203에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0398] 서열번호 204에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0399] 서열번호 205에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0400] 을 포함하는 HCVR; 및

[0401] 서열번호 208에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0402] 서열번호 209에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0403] 서열번호 210에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0404] 을 포함하는 LCVR;

[0405] (v) 서열번호 213에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0406] 서열번호 214에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0407] 서열번호 215에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0408] 을 포함하는 HCVR; 및

[0409] 서열번호 218에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0410] 서열번호 219에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0411] 서열번호 220에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0412] 을 포함하는 LCVR;

[0413] (w) 서열번호 223에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0414] 서열번호 224에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0415] 서열번호 225에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0416] 을 포함하는 HCVR; 및

[0417] 서열번호 228에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0418] 서열번호 229에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0419] 서열번호 230에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0420] 을 포함하는 LCVR;

[0421] (x) 서열번호 233에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0422] 서열번호 234에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0423] 서열번호 235에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0424] 을 포함하는 HCVR; 및

[0425] 서열번호 238에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0426] 서열번호 239에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0427] 서열번호 240에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0428] 을 포함하는 LCVR;

[0429] (y) 서열번호 243에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0430] 서열번호 244에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0431] 서열번호 245에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0432] 을 포함하는 HCVR; 및

[0433] 서열번호 248에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0434] 서열번호 249에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0435] 서열번호 250에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0436] 을 포함하는 LCVR;

[0437] (z) 서열번호 253에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0438] 서열번호 254에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0439] 서열번호 255에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0440] 을 포함하는 HCVR; 및

[0441] 서열번호 258에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0442] 서열번호 259에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0443] 서열번호 260에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0444] 을 포함하는 LCVR;

[0445] (aa) 서열번호 263에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0446] 서열번호 264에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0447] 서열번호 265에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0448] 을 포함하는 HCVR; 및

[0449] 서열번호 268에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0450] 서열번호 269에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0451] 서열번호 270에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0452] 을 포함하는 LCVR;

[0453] (ab) 서열번호 273에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0454] 서열번호 274에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0455] 서열번호 275에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0456] 을 포함하는 HCVR; 및

[0457] 서열번호 278에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0458] 서열번호 279에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0459] 서열번호 280에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0460] 을 포함하는 LCVR;

[0461] (ac) 서열번호 283에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0462] 서열번호 284에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0463] 서열번호 285에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0464] 을 포함하는 HCVR; 및

[0465] 서열번호 288에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0466] 서열번호 289에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0467] 서열번호 290에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0468] 을 포함하는 LCVR;

[0469] (ad) 서열번호 293에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0470] 서열번호 294에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0471] 서열번호 295에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0472] 을 포함하는 HCVR; 및

[0473] 서열번호 298에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0474] 서열번호 299에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0475] 서열번호 300에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0476] 을 포함하는 LCVR;

[0477] (ae) 서열번호 303에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0478] 서열번호 304에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0479] 서열번호 305에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0480] 을 포함하는 HCVR; 및

[0481] 서열번호 308에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0482] 서열번호 309에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0483] 서열번호 310에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0484] 을 포함하는 LCVR;

[0485] 및/또는

[0486] (af) 서열번호 313에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR1,

[0487] 서열번호 314에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR2, 및

[0488] 서열번호 315에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCDR3

[0489] 을 포함하는 HCVR; 및

[0490] 서열번호 318에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR1,

[0491] 서열번호 319에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR2, 및

[0492] 서열번호 320에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCDR3

[0493] 을 포함하는 LCVR

[0494] 을 포함하거나;

[0495] scFv는

[0496] (i) 서열번호 2 또는 462에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0497] (ii) 서열번호 12 또는 463에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0498] (iii) 서열번호 22 또는 464에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0499] (iv) 서열번호 32에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 37 또는 465에 제

시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0500] (v) 서열번호 42에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 47 또는 466에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0501] (vi) 서열번호 52 또는 467에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 57 또는 468에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0502] (vii) 서열번호 62 또는 492에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 67 또는 469에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0503] (viii) 서열번호 72 또는 470에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 77 또는 471에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0504] (ix) 서열번호 82에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 87에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0505] (x) 서열번호 92 또는 472에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 97에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0506] (xi) 서열번호 102에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 107에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0507] (xii) 서열번호 112 또는 473에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 117 또는 474에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0508] (xiii) 서열번호 122에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 127에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0509] (xiv) 서열번호 132에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 137에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0510] (xv) 서열번호 142 또는 475에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 147 또는 476에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0511] (xvi) 서열번호 152에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 157에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0512] (xvii) 서열번호 162 또는 477에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 167에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0513] (xviii) 서열번호 172에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 177에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0514] (xix) 서열번호 182 또는 478에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 187 또는 479에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0515] (xx) 서열번호 192 또는 480에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 197에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0516] (xxi) 서열번호 202 또는 481에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 207에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0517] (xxii) 서열번호 212에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 217에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0518] (xxiii) 서열번호 222에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 227에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0519] (xxiv) 서열번호 232에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 237에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0520] (xxv) 서열번호 242에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 247에 제시된 아

미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0521] (xxvi) 서열번호 252 또는 482에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 257에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0522] (xxvii) 서열번호 262에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 267에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0523] (xxviii) 서열번호 272에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 277에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0524] (xxix) 서열번호 282에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 287에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0525] (xxx) 서열번호 292에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 297에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR;

[0526] (xxxi) 서열번호 302 또는 483에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 307 또는 527에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR; 및/또는

[0527] (xxxii) 서열번호 312에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 HCVR; 및 서열번호 317 또는 484에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 LCVR

[0528] 을 포함하고;

[0529] 예를 들어, 여기서 HCVR 및 LCVR은 임의의 배향으로 존재하고(HCVR-LCVR 또는 LCVR-HCVR),

[0530] 선택적으로, 여기서 HCVR 및 LCVR은, 예를 들어, 약 10개의 아미노산 길이의 아미노산 서열을 포함하는 링커, 예를 들어, n이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10인 $(Gly_4Ser)_n$(서열번호 426)에 의해 연결된다.

[0531] 일부 실시양태에서, V_L-$(Gly_4Ser)_3$(서열번호 541)-V_H 포맷의 본원에 기재된 항-hTfR scFv는 **표 1-2**에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 scFv는 포맷 V_H-$(Gly_4Ser)_3$(서열번호 541)-V_L로 존재할 수 있다. 선택적으로, 본원에 기재된 항-hTfR scFv는 N-말단 LLQGSG(서열번호 452) 및/또는 C-말단 HHHHHH(서열번호 501)를 추가로 포함한다.

표 1-2. 기재된 단백질-약물 접합체의 항-hTfR scFv 분자

항체 클론	서열 번호	아미노산 서열 (Vk-3xG4S(서열번호 541)-Vh)
12795B	392	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRDHFGWYQQKPGKAPKRLIYAA SSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQYDTYPLTFGGGTK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTS YDMKWVRQAPGLGLEWVSAISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNSRNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCTRSHDFGAFDYFDYWGQGTLVTVSS
12798B	393	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQTVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGS SSRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPYTFGQG TKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTF DDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSATRVYADSVKGRFTISRDNAKNFL YLQMNSLRSEDTALYHCAKDMDISLGYYGLDVWGQGTTVTVSS
12799B	394	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIASWLAWYQQKPGKAPELLIYAAS SLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAIYYCQQANYFPWTFGQGTK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSQITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTS GVGVVWIRQPPGKALEWLALIYWNDHKRYSPSLGSRLTITKDTSKNQVVLT MTNMDPVDTATYYCAHYSGSYSYYYYGLDVWGQGTTVTVSS
12801B	395	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRTDLGWYQQKPGKAPKRLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLRPEDFATFYCLQYNSYPLTFGGGTKV EIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFTSY AMHWVRQAPGKGLEWVSSIRGSGGGTYSADSVKGRFTISRDNSRDTLYLQ MNSVRAEDTAVYYCARSHDYGAFDFFDYWGQGTLVTVSS

[0532]

항체 클론	서열 번호	아미노산 서열 (Vk-3xG4S(서열번호 541)-Vh)
12802B	396	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSINLAWYQQKPGQAPRLLIFVAS TRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFATYYCQQYDIWPYTFGQGTKL EIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSD YFMSWIRQAPGKGLEWVSYISSTGSTINYADSVKGRFTISRDNVKNSLYLQM TSLRVEDTAVYYCTRDNWNYEYWGQGTLVTVSS
12808B	397	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAA SSLQSGVPLRFSGSGSGTEFTLTINNLQPEDFATYYCLSHNSYPWTFGQGT KVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGESISS NTYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIDYSGTTNYNPSLKSRVTISVDTSRNHFSLR LRSVTAADTAVYYCAREWGNYGYYYGMDVWGQGTTVTVSS
12812B	398	DIQMTQSPPSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASRGTFS SYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFLARVTITADESTSTAYME LSSLRSEDTAVYYCAREKGWNYFDYWGQGTLVTVSS
12816B	399	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHGNGYNYLTWYLQKPGQSPQL LIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTF GQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAAS GFTFSDYYMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGTTIYYADSVKGRFTISRDNAKK SLYLEMNSLRAEDTAVYYCAREGYGNDYYYYGIDVWGQGTTVTVSS
12833B	400	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTR LEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SFGMHWVRQAPGKGLEWVIFISYDGSDKYYADSVKGRFAISRDSSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKENGILTDSYGMDVWGQGTTVTVSS
12834B	401	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTR LEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT SYGISWVRQAPGQGLEWMGWISVYHGNTNYAQKFQGRVTMTTDTSTSTA YMELRSLRSDDTAVYYCAREGYYDFWSGYYPFDYWGQGTLVTVSS
12835B	402	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTR LEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCEASGFTFRN YEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGNMKDYAESVKGRFTISRDNVKNSLQL QMNSLRVEDTAVYYCARDEFPYGMDVWGQGTTVTVSS

[0533]

항체 클론	서열 번호	아미노산 서열 (Vk-3xG4S(서열번호 541)-Vh)
12839B	403	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTR LEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFS NYVMYWVRQAPGKGLEWVALIFFDGKKNYHADSVKGRFTITRDNSKNMLYL QMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMDVWGQGTTVTVSS
12841B	404	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTR LEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYWMNWVRQAPGKGLEWVANIKEDGGKKLYVDSVKGRFTISRDNAKNSLF LQMNSLRAEDTAVYYCAREDTTLVVDYYYYGMDVWGQGTTVTVSS
12843B	405	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTR LEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNI FEMNWVRQAPGKGLEWISYISSRGTTTYYADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARDYEATIPFDFWGQGTLVTVSS
12844B	406	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTR LEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGSVVRPGGSLRLSCEASGFTFD DYGMSWVRQDPGKGLEWVSGINWNGDRTNYADSVKGRFIISRDNAKNSVY LQMNSLRAEDSALYHCARDQGLGVAATLDYWGQGTLVTVSS
12845B	407	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTR LEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVS NYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSTSNIYYADSVKGRFTISRDNAENSLYL QMNSLRVEDTAVYYCVRDGIVVVPVGRGYYYYGLDVWGQGTTVTVSS
12847B	408	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTR LEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFD DYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISWSSGSMDYADSVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRTEDTALYYCAKAREVGDYYGMDVWGQGTTVTVSS
12848B	409	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGT KVEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASGFTFD NFGMHWVRQGPGKGLEWVSGLTWNSGVIGYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRPEDTALYYCAKDIRNYGPFDYWGQGTLVTVSS

[0534]

항체 클론	서열 번호	아미노산 서열(Vk-3xG4S(서열번호 541)-Vh)
12850B	410	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGA SSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGT KVEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTF NTYAITWVRQAPGQGLEWMGGIIPISGIAEYAQKFQGRVTITTDDSSTTAYM ELNSLRSEDTAVYYCASWNYALYYFYGMDVWGRGTTVTVSS
31863B	411	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAAST LQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQNHNSVPLTFGGGTKV EIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNS YAMTWVRQAPGKGLEWVSFIGGSTGNTYYAGSVKGRFTISSDNSKKTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRMEYFQHWGQGTLVTVSS
31874B	412	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPNLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYCQKYNSAPLTFGGGTK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFS SYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGTGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRMEYFQYWGQGTLVTVSS
69261	413	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQF LIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKINRVEAEDVGVYYCMQALQTPYT FGQGTKLEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAA SGFTFSVYYMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCGREGYSGTYSYYGMDVWGQGTTVTVSS
69263	414	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISHYSAWYQQKPGKLPNLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFSLTTSSLQPEDVATYYCQKYNSVPLTFGGGTK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAVSGFTFD DYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGTRGYADSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRGEDTALYYCVKDITISPNYYGMDVWGQGTTVTVSS
69305	415	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDRYLNWYRQKPGKAPKLLIYTTS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTLSSLQPEDFATYYCQQSYSPPLTFGGGTK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDISKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAGQLDLFFDYWGQGTLVTVSS
69307	416	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQKADSLPYAFGQGTK LEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSN YWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEKEYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYL QMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYYYYYVMDVWGQGTTVTVSS

[0535]

항체 클론	서열 번호	아미노산 서열(Vk-3xG4S(서열번호 541)-Vh)
69323	417	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKVLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGGGTKV EIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDD YAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNAENSLHL QMNSLRAEDTALYYCARGGSTLVRGVKGGYYGMDVWGQGTTVTVSS
69326	418	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNFAWYQQKPGQAPRLLIYSA SSRATGIPVRFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNIWPRTFGQGTK VEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFIFSS YEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIFYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCVSGVVLFDVWGQGTMVTVSS
69329	419	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQKANSFPYTFGQGTK LEIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS NYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEKDYVDSVKGRFTISRDNAKNSLY LQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYYYYYVMDVWGQGTTVTVSS
69331	420	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKV EIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCIASGFTFSVY GIHWVRQAPGKGLEWMAVISHDGNIKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQIN SLRTEDTAVYYCAKDTWNSLDTFDIWGQGTMVTVSS
69332	421	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDYNYPFTFGPGTKV DIKGGGGSGGGGSGGGGSQVTLRESGPALVKPSQTLTLTCTFSGFSLNTY GMFVSWIRQPPGKALEWLAHIHWDDDKYYSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLT MTNMDPVDTATYYCARGHNNLNYIIHWGQGTLVTVSS
69340	422	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIHDVS NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFVVYYCQQRSDWPITFGQGTRL EIKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDD KAMHWVRQVPGKGLEWISGISWNSGTIGYADSVKGRFIISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTALYYCAKDGDTSGWYWYGLDVWGQGTTVTVSS
69348	423	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRNVLGWFQQKPGKAPQRLIYAAS SLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCLQHNFYPLTFGGGTKV EIKGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTT YGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRVDDTAVYYCTRTHGYTRSSDGFDYWGQGTLVTVSS

[0536]

[0537] 선택적으로 분자 카고에 접합된, 인간 트랜스페린 수용체에 특이적으로 결합하는 Fab 단편(항-TfR Fab-약물 접합체)이 본원에 제공된다. Fab 단편은 전형적으로 하나의 완전한 경쇄, 즉 V_L 및 불변 경쇄 도메인, 예를 들어,

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 424))

카파(예를 들어, 및 V_H 및 IgG1 CH1 부분(예를 들어,

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH (서열번호 425))

또는 IgG4 CH1(예를

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPLLQGSG (서열번호 459), 또는
ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS
LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP (서열번호 493))

들어 의 하나의 중쇄를 함유한다. Fab 단편 항체는, 전체 IgG 항체의 파파인 소화로 힌지 영역을 포함하는 전체 Fc 단편을 제거하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 Fab 단백질은

[0538] (1) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 2 또는 462에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0539] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 7에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0540] (2) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 12 또는 463에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0541] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 17에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0542] (3) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 22 또는 464에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0543] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 27에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0544] (4) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 32에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0545] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 37 또는 465에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0546] (5) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 42에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0547] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 47 또는 466에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0548] (6) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 52 또는 467에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0549] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 57 또는 468에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0550] (7) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 62 또는 492에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0551] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 67 또는 469에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0552] (8) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 72 또는 470에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0553] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 77 또는 471에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0554] (9) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 82에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0555] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 87에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0556] (10) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 92 또는 472에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0557] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 97에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0558] (11) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 102에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0559] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 107에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0560] (12) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 112 또는 473에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0561] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 117 또는 474에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0562] (13) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 122에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0563] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 127에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0564] (14) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 132에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0565] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 137에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0566] (15) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 142 또는 475에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0567] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 147 또는 476에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0568] (16) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 152에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0569] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 157에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0570] (17) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 162 또는 477에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0571] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 167에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0572] (18) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 172에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0573] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 177에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0574] (19) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 182 또는 478에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0575] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 187 또는 479에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0576] (20) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 192 또는 480에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0577] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 197에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0578] (21) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 202 또는 481에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0579] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 207에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0580] (22) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 212에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0581] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 217에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0582] (23) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 222에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0583] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 227에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0584] (24) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 232에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0585] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 237에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0586] (25) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 242에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0587] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 247에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0588] (26) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 252 또는 482에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0589] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 257에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0590] (27) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 262에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0591] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 267에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0592] (28) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 272에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0593] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 277에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0594] (29) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 282에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0595] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 287에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0596] (30) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 292에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0597] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 297에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR);

[0598] (31) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 302 또는 483에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0599] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 307 또는 527에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR); 및/또는

[0600] (32) CH1 도메인에 연결된 - 서열번호 312에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(HCVR), 또는 이러한 HCVR의 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역, 및

[0601] CL 도메인에 연결된 - 서열번호 317 또는 484에 제시된 아미노산 서열, 또는 이러한 LCVR의 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역(LCVR)

[0602] 을 포함할 수 있고,

[0603] 예를 들어, 여기서 CH1은 IgG1 또는 IgG4로부터 유래되고;

[0604] 예를 들어, 여기서 CH1은 서열번호 425, 459 또는 493이다.

[0605] 본원에 기재된 항-hTfR 단백질-약물 접합체의 항-hTfR Fab의 중쇄 및 경쇄는 아래에 제시된다.

(1) 31874B

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPNLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDVATYYCQKYNSAPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 328)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGTGGSTYYADSVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRMEYFQYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTH (서열번호 329)

(2) 31863B

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDVATYYCQNHNSVPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 330)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMTWVRQAPGKGLEWVSFIGGSTGNTYYAGSVKGRFTISSDNS
KKTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRMEYFQHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV

[0606]

KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTH (서열번호 331)

(3) 69348

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIRNVLGWFQQKPGKAPQRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI
SSLQPEDFATYYCLQHNFYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
NO: 332)

Fab 중쇄

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYGDSVKGRFTISRDNS
KNTLYLQMNSLRVDDTAVYYCTRTHGYTRSSDGFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTH (서열번호 333)

(4) 69340

Fab 경쇄

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIHDVSNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI
SSLEPEDFVVYYCQQRSDWPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
334)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDKAMHWVRQVPGKGLEWISGISWNSGTIGYADSVKGRFIISRDNA
KNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDGDTSGWYWYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTH (서열번호 335)

(5) 69331

Fab 경쇄

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQLNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
336)

Fab 중쇄

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCIASGFTFSVYGIHWVRQAPGKGLEWMAVISHDGNIKHYADSVKGRFTISRDNS
KNTLYLQINSLRTEDTAVYYCAKDTWNSLDTFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK

[0607]

DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
TH (서열번호 337)

(6) 69332

Fab 경쇄

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCLQDYNYPFTFGPGTKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
338)

Fab 중쇄

QVTLRESGPALVKPSQTLTLTCTFSGFSLNTYGMFVSWIRQPPGKALEWLAHIHWDDDKYYSTSLKTRLTISKDT
SKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARGHNNLNYIIHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK
TH (서열번호 339)

(7) 69326

Fab 경쇄

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNFAWYQQKPGQAPRLLIYSASSRATGIPVRFSGSGSGTEFTLTI
SSLQSEDFAVYYCQQYNIWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
340)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFIFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIFYADSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGVVLFDVWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
(서열번호 341)

(8) 69329

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQKANSFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
342)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEKDYVDSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYYYYYVMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL

[0608]

GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTH (서열번호 343)

(9) 69323

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKVLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSIPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
344)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYIGYADSVKGRFTISRDNA
ENSLHLQMNSLRAEDTALYYCARGGSTLVRGVKGGYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV
EPKSCDKTH (서열번호 345)

(10) 69305

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIDRYLNWYRQKPGKAPKLLIYTTSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTL
SSLQPEDFATYYCQQSYSPPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
346)

Fab 중쇄

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDIS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGQLDLFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYF
PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
(서열번호 347)

(11) 69307

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQKADSLPYAFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
348)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEKEYVDSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYYYYYVMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL

[0609]

GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTH (서열번호 349)

(12) 12795B

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRDHFGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI
SSLQPEDFATYYCLQYDTYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
350)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTSYDMKWVRQAPGLGLEWVSAISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDNS
RNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSHDFGAFDYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTH (서열번호 351)

(13) 12798B

Fab 경쇄

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQTVSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGSSSRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI
SSLQSEDFAVYYCQQYNNWPPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
352)

Fab 중쇄

EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSATRVYADSVKGRFTISRDNA
KNFLYLQMNSLRSEDTALYHCAKDMDISLGYYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTH (서열번호 353);
EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSATRVYADSVKGRFTISRDNA
KNFLYLQMNSLRSEDTALYHCAKDMDISLGYYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG
PPLLQGSG (서열번호 485); 또는
EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSATRVYADSVKGRFTISRDNA
KNFLYLQMNSLRSEDTALYHCAKDMDISLGYYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG
PP (서열번호 494)

(14) 12799B

Fab 경쇄

[0610]

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGIASWLAWYQQKPGKAPELLIYAASSLQGGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFAIYYCQQANYFPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 354)

Fab 중쇄

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVVWIRQPPGKALEWLALIYWNDHKRYSPSLGSRLTITKDT
SKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAHYSGSYSYYYYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTH (서열번호 355);

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVVWIRQPPGKALEWLALIYWNDHKRYSPSLGSRLTITKDT
SKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAHYSGSYSYYYYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK
YGPPLLQGSG (서열번호 486); 또는

QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVVWIRQPPGKALEWLALIYWNDHKRYSPSLGSRLTITKDT
SKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAHYSGSYSYYYYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK
YGPP (서열번호 495)

(15) 12801B

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRTDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTI
SSLRPEDFATFYCLQYNSYPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호 356)

Fab 중쇄

EVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMHWVRQAPGKGLEWVSSIRGSGGGTYSADSVKGRFTISRDNS
RDTLYLQMNSVRAEDTAVYYCARSHDYGAFDFFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTH (서열번호 357)

(16) 12802B

Fab 경쇄

EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSINLAWYQQKPGQAPRLLIFVASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTI
SSLQSEDFATYYCQQYDIWPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호

[0611]

358)

Fab 중쇄

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYFMSWIRQAPGKGLEWVSYISSTGSTINYADSVKGRFTISRDNV
KNSLYLQMTSLRVEDTAVYYCTRDNWNYEYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

(서열번호 359)

(17) 12808B

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTINCRASQGIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAASSLQSGVPLRFSGSGSGTEFTLTI
NNLQPEDFATYYCLSHNSYPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
360)

Fab 중쇄

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGESISSNTYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIDYSGTTNYNPSLKSRVTISVDT
SRNHFSLRLRSVTAADTAVYYCAREWGNYGYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTH (서열번호 361)

(18) 12812B

Fab 경쇄

DIQMTQSPPSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQANSFPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
362)

Fab 중쇄

QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASRGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANYAQKFLARVTITADES
TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKGWNYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

(서열번호 363)

(19) 12816B

Fab 경쇄

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHGNGYNYLTWYLQKPGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTD
FTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0612]

(서열번호 364)

Fab 중쇄

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGTTIYYADSVKGRFTISRDNA
KKSLYLEMNSLRAEDTAVYYCAREGYGNDYYYYGIDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTH (서열번호 365)

(20) 12833B

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
366)

Fab 중쇄

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVIFISYDGSDKYYADSVKGRFAISRDSS
KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKENGILTDSYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTH (서열번호 367)

(21) 12834B

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
368)

Fab 중쇄

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISVYHGNTNYAQKFQGRVTMTTDTS
TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREGYYDFWSGYYPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK
SCDKTH (서열번호 369)

(22) 12835B

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호

[0613]

370)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCEASGFTFRNYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGNMKDYAESVKGRFTISRDNV
KNSLQLQMNSLRVEDTAVYYCARDEFPYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH

(서열번호 371)

(23) 12847B

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
372)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISWSSGSMDYADSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKAREVGDYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTH (서열번호 373);
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISWSSGSMDYADSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKAREVGDYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
PLLQGSG (서열번호 487); 또는
EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISWSSGSMDYADSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKAREVGDYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
P (서열번호 496)

(24) 12848B

Fab 경쇄

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT
ISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
374)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASGFTFDNFGMHWVRQGPGKGLEWVSGLTWNSGVIGYADSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRPEDTALYYCAKDIRNYGPFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD

[0614]

YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
H (서열번호 375)

(25) 12843B

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
376)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIFEMNWVRQAPGKGLEWISYISSRGTTTYYADSVRGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYEATIPFDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
H (서열번호 377);

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIFEMNWVRQAPGKGLEWISYISSRGTTTYYADSVRGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYEATIPFDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPL
LQGSG

(서열번호 488); 또는

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIFEMNWVRQAPGKGLEWISYISSRGTTTYYADSVRGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYEATIPFDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPP

(서열번호 497)

(26) 12844B

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
378)

Fab 중쇄

EVQLVESGGSVVRPGGSLRLSCEASGFTFDDYGMSWVRQDPGKGLEWVSGINWNGDRTNYADSVKGRFIISRDNA
KNSVYLQMNSLRAEDSALYHCARDQGLGVAATLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD
KTH (서열번호 379)

[0615]

(27) 12845B

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
380)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSTSNIYYADSVKGRFTISRDNA
ENSLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGIVVVPVGRGYYYYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK
VEPKSCDKTH (서열번호 381);

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSTSNIYYADSVKGRFTISRDNA
ENSLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGIVVVPVGRGYYYYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKR
VESKYGPPLLQGSG

(서열번호 489); 또는

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSTSNIYYADSVKGRFTISRDNA
ENSLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGIVVVPVGRGYYYYGLDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKR
VESKYGPP

(서열번호 498)

(28) 12839B

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
382)

Fab 중쇄

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSNYVMYWVRQAPGKGLEWVALIFFDGKKNYHADSVKGRFTITRDNS
KNMLYLQMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTH (서열번호 383);

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSNYVMYWVRQAPGKGLEWVALIFFDGKKNYHADSVKGRFTITRDNS
KNMLYLQMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVE
SKYGPPLLQGSG

[0616]

(서열번호 490)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSNYVMYWVRQAPGKGLEWVALIFFDGKKNYHADSVKGRFTITRDNS
KNMLYLQMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVE
SKYGPP

(서열번호 499)

(29) 12841B

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTI
SSLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
384)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVANIKEDGGKKLYVDSVKGRFTISRDNA
KNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREDTTLVVDYYYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL
GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP
KSCDKTH (서열번호 385)

(30) 12850B

Fab 경쇄

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT
ISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
386)

Fab 중쇄

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNTYAITWVRQAPGQGLEWMGGIIPISGIAEYAQKFQGRVTITTDDS
STTAYMELNSLRSEDTAVYYCASWNYALYYFYGMDVWGRGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTH (서열번호 387)

(31) 69261

Fab 경쇄

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQFLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTD
FTLKINRVEAEDVGVYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK
VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0617]

(서열번호 388)

Fab 중쇄

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCGREGYSGTYSYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTH (서열번호 389)

(32) 69263

Fab 경쇄

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDISHYSAWYQQKPGKLPNLLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFSLTT
SSLQPEDVATYYCQKYNSVPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV
DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (서열번호
390)

Fab 중쇄

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAVSGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGTRGYADSVKGRFTISRDNA
KNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVKDITISPNYYGMDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTH (서열번호 391)

[0618]

[0619] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-hTfR 단백질은 표 1-3에 제공된 임의의 예시적 hIgG1 중쇄 서열을 포함할 수 있다.

표 1-3. hIgG1 중쇄 서열

항-hTfR: 분자	HC 전장 hIgG1 서열
31874B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGTGGSTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRMEYFQYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 543)
31863B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNSYAMTWVRQAPGKGLEWVSFIGGSTGNTY YAGSVKGRFTISSDNSKKTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGGAARRMEYFQHWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 544)

[0620]

항-hTfR: 분자	HC 전장 hIgG1 서열
69348	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFTTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNK YYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRVDDTAVYYCTRTHGYTRSSDGFDYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 545)
69340	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDKAMHWVRQVPGKGLEWISGISWNSGTIG YADSVKGRFIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKDGDTSGWYWYGLDVWGQGTT VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 546)
69331	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCIASGFTFSVYGIHWVRQAPGKGLEWMAVISHDGNIKHY ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQINSLRTEDTAVYYCAKDTWNSLDTFDIWGQGTMVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 547)
69332	QVTLRESGPALVKPSQTLTLTCTFSGFSLNTYGMFVSWIRQPPGKALEWLAHIHWDDDKY YSTSLKTRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARGHNNLNYIIHWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 548)
69326	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFIFSSYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIFY ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCVSGVVLFDVWGQGTMVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 549)
69329	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEK DYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYYYYYVMDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호550)

[0621]

항-hTfR: 분자	HC 전장 hIgG1 서열
69323	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGYI GYADSVKGRFTISRDNAENSLHLQMNSLRAEDTALYYCARGGSTLVRGVKGGYYGMDVW GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 551)
69305	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSNK YYADSVKGRFTISRDISKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGQLDLFFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 552)
69307	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTFSNYWMTWVRQAPGKGLEWVANIKEDGSEK EYVDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTAVYYCARDGEQLVDYYYYYVMDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 553)
12795B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCATSGFTFTSYDMKWVRQAPGLGLEWVSAISGSGGNTY YADSVKGRFTISRDNSRNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRSHDFGAFDYFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 554)
12798B	EVQLVESGGDLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSATR VYADSVKGRFTISRDNAKNFLYLQMNSLRSEDTALYHCAKDMDISLGYYGLDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 555)
12799B	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGVGVVWIRQPPGKALEWLALIYWNDHKRY SPSLGSRLTITKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCAHYSGSYSYYYYGLDVWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 556)

[0622]

항-hTfR: 분자	HC 전장 hIgG1 서열
12801B	EVQLLESGGALVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMHWVRQAPGKGLEWVSSIRGSGGGTY SADSVKGRFTISRDNSRDTLYLQMNSVRAEDTAVYYCARSHDYGAFDFFDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 557)
12802B	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYFMSWIRQAPGKGLEWVSYISSTGSTINY ADSVKGRFTISRDNVKNSLYLQMTSLRVEDTAVYYCTRDNWNYEYWGQGTLVTVSSAST KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 558)
12808B	QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGESISSNTYYWGWIRQPPGKGLEWIGSIDYSGTTNY NPSLKSRVTISVDTSRNHFSLRLRSVTAADTAVYYCAREWGNYGYYYGMDVWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 559)
12812B	QVQLVQSGAEVKKPGSSVRVSCKASRGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPIFGTANY AQKFLARVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREKGWNYFDYWGQGTLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 560)
12816B	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGTTIYY ADSVKGRFTISRDNAKKSLYLEMNSLRAEDTAVYYCAREGYGNDYYYYGIDVWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 561)
12833B	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVIFISYDGSDKY YADSVKGRFAISRDSSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKENGILTDSYGMDVWGQGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 562)

[0623]

항-hTfR: 분자	HC 전장 hIgG1 서열
12834B	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISVYHGNT NYAQKFQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAREGYYDFWSGYYPFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 563)
12835B	EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCEASGFTFRNYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSGNMKD YAESVKGRFTISRDNVKNSLQLQMNSLRVEDTAVYYCARDEFPYGMDVWGQGTTVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 564)
12847B	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMNWVRQAPGKGLEWVSGISWSSGSM DYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRTEDTALYYCAKAREVGDYYGMDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 565)
12848B	EVQLVESGGGLVQPGRSLTLSCAASGFTFDNFGMHWVRQGPGKGLEWVSGLTWNSGVI GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRPEDTALYYCAKDIRNYGPFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 566)
12843B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNIFEMNWVRQAPGKGLEWISYISSRGTTTYY ADSVRGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYEATIPFDFWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 567)
12844B	EVQLVESGGSVVRPGGSLRLSCEASGFTFDDYGMSWVRQDPGKGLEWVSGINWNGDRT NYADSVKGRFIISRDNAKNSVYLQMNSLRAEDSALYHCARDQGLGVAATLDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 568)

[0624]

항-hTfR: 분자	HC 전장 hIgG1 서열
12845B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSNYEMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSTSNIY YADSVKGRFTISRDNAENSLYLQMNSLRVEDTAVYYCVRDGIVVVPVGRGYYYYGLDVWG QGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호569)
12839B	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSNYVMYWVRQAPGKGLEWVALIFFDGKKNY HADSVKGRFTITRDNSKNMLYLQMNSLRPEDAAVYYCAKIHCPNGVCYKGYYGMDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호570)
12841B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYWMNWVRQAPGKGLEWVANIKEDGGKK LYVDSVKGRFTISRDNAKNSLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREDTTLVVDYYYYGMDVWGQ GTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 571)
12850B	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNTYAITWVRQAPGQGLEWMGGIIPISGIAEY AQKFQGRVTITTDDSSTTAYMELNSLRSEDTAVYYCASWNYALYYFYGMDVWGRGTTVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호572)
69261	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSVYYMNWIRQAPGKGLEWVSYISSSGSTIYY ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCGREGYSGTYSYYGMDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호573)
69263	EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAVSGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGTR GYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRGEDTALYYCVKDITISPNYYGMDVWGQGTTV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호574)

[0625]

[0626] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-TfR 단백질은 다음의 아미노산 서열, 또는 이의 변이체를 포함하는 IgG1 중쇄 불변 도메인을 포함할 수 있다:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK
LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 575)

[0627]

[0628] "31874B"; "31863B"; "69348"; "69340"; "69331"; "69332"; "69326"; "69329"; "69323"; "69305"; "69307"; "12795B"; "12798B"; "12799B"; "12801B"; "12802B"; "12808B"; "12812B"; "12816B"; "12833B"; "12834B"; "12835B"; "12847B"; "12848B"; "12843B"; "12844B"; "12845B"; "12839B"; "12841B"; "12850B"; "69261"; 및 "69263"은, 서열번호 7; 17; 27; 37; 465; 47; 466; 57; 468; 67; 469; 77; 471; 87; 97; 107; 117; 474; 127; 137; 147; 476; 157; 167; 177; 187; 479; 197; 207; 217; 227; 237; 247; 257; 267; 277; 287; 297; 307; 527; 317 또는 484에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 경쇄 가변 영역, 및 서열번호 2; 462; 12; 463; 22; 464; 32; 42; 52; 467; 62; 492; 72; 470; 82; 92; 472; 102; 112; 473; 122; 132;

142; 475; 152; 162; 477; 172; 182; 478; 192; 480; 202; 481; 212; 222; 232; 242; 252; 482; 262; 272; 282; 292; 302; 483 또는 312에 제시된 아미노산 서열(또는 이의 변이체)을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하며, scFv의 경우, 각각, 예를 들어, 펩티드 링커(예를 들어, $(G_4S)_3$(서열번호 541))에 의해 함께 융합될 수 있거나(임의의 순서로); V_H의 CDR(CDR-H1(또는 이의 변이체), CDR-H2(또는 이의 변이체) 및 CDR-H3(또는 이의 변이체))을 포함하는 V_H 및/또는 V_L의 CDR(CDR-L1(또는 이의 변이체), CDR-L2(또는 이의 변이체) 및 CDR-L3(또는 이의 변이체))을 포함하는 V_L을 포함하며, scFv의 경우, V_L에 융합된 V_H 또는 V_H에 융합된 V_L이, 예를 들어, 링커에 의해, 분자 카고에 접합될 수 있는, 항-TfR 단백질-약물 접합체, 예를 들어, 항-TfR scFv 또는 항-TfR Fab를 지칭한다.

[0629] 융합된 폴리펩티드와 관련하여 용어 "융합된" 또는 "테더링된(tethered)"은 직접적으로 또는 간접적으로(예를 들어, 링커 또는 다른 폴리펩티드를 통해) 결합된 폴리펩티드를 지칭한다.

[0630] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질은 인간화된 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 뮤린 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 키메라 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 단클론 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 1가 Fab', 2가 Fab2, F(ab)'3 단편, 단일 쇄 가변 단편(scFv), bis-scFv, (scFv)2, 디아바디, 이가 항체, 1-아암 항체, 미니바디, 나노바디, 트리아바디, 테트라바디, 디설파이드 안정화된 Fv 단백질(dsFv), 단일 도메인 항체(sdAb), Ig NAR, 낙타과 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이중특이적 항체 또는 이의 결합 단편(예를 들어, bisscFv 또는 이중특이적 T-세포 인게이저(BiTE)), 삼중특이적 항체(예를 들어, F(ab)'3 단편 또는 트리아바디), 또는 이의 화학적으로 변형된 유도체를 포함한다.

[0631] 용어 "인간화된 항체"는, 본원에 사용된 바와 같이, 다른 포유류 종, 예컨대 마우스의 생식세포로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 이식되었거나, 그렇지 않으면 인간에서 자연적으로 생성되는 항체 변이체와의 유사성을 증가시키도록 변형된 항체를 포함한다.

[0632] 일부 경우에, 항-TfR 항원 결합 단백질은 프레임워크 영역, 예를 들어, CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인, 힌지 영역 또는 이의 조합에 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 돌연변이는 항체를 안정화하고/하거나 반감기를 증가시키기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 돌연변이는 Fc 수용체 상호작용을 조절하거나, Fc 이펙터 기능, 예컨대 FcγR, 항체-의존적 세포-매개 세포독성(ADCC) 또는 보체-의존적 세포독성(CDC)을 감소시키나 제거하기 위한 것이다. 추가 실시양태에서, 하나 이상의 돌연변이는 글리코실화를 조절하기 위한 것이다.

[0633] 일부 실시양태에서, 1 또는 2개 이상의 돌연변이(예를 들어, 아미노산 치환)가 본원에 기내된 항체의 Fc 영역(예를 들어, CH2 도메인(인간 IgG1의 잔기 231 내지 340) 및/또는 CH3 도메인(인간 IgG1의 잔기 341 내지 447) 및/또는 힌지 영역, 이때 넘버링은 Kabat 넘버링 시스템(예를 들어, Kabat의 EU 인덱스)에 따름)에 도입되어 항체의 하나 이상의 기능적 특성, 예컨대 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원-의존적 세포 세포독성을 변경한다. 일부 실시양태에서, 1 또는 2개 이상의 돌연변이(예를 들어, 아미노산 치환)는 Fc 영역(CH1 도메인)의 힌지 영역에 도입되어, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,677,425에 기재된 바와 같이, 힌지 영역의 시스테인 잔기의 수가 변경(예를 들어, 증가 또는 감소)된다. CH1 도메인의 힌지 영역의 시스테인 잔기의 수는, 예를 들어, 경쇄 및 중쇄의 조립을 용이하게 하거나 항체의 안정성을 변경(예를 들어, 증가 또는 감소)하거나 링커 접합을 용이하게 하기 위해 변경될 수 있다.

[0634] 일부 실시양태에서, 1 또는 2개 이상의 아미노산 돌연변이(즉 치환, 삽입 또는 결실)가 IgG 불변 도메인 또는 이의 FcRn-결합 단편(바람직하게는 Fc 또는 힌지-Fc 도메인 단편)에 도입되어 생체내 항체의 반감기를 변경(예를 들어, 감소 또는 증가)한다. 예를 들어, 생체내 항체의 반감기를 변경(예를 들어, 감소 또는 증가)하는 돌연변이의 예에 대해, PCT 공개 번호 WO 02/060919; WO 98/23289; 및 WO 97/34631; 및 미국 특허 번호 5,869,046, 6,121,022, 6,277,375 및 6,165,745를 참조한다. 일부 실시양태에서, Fc 영역은 잔기 위치 L234, L235 또는 이의 조합에서 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 L234 및 L235를 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 L234A 및 L235A를 포함한다.

[0635] 본원에 기재된 항-TfR 항체 및 항원 결합 단편은 번역 후 변형될 수 있고, 예를 들어, 글리코실화될 수 있다.

[0636] 예를 들어, 본원에 기재된 항체 및 항원 결합 단편은 글리코실화(예를 들어, N-글리코실화 및/또는 O-글리코실화)되거나 비글리코실화될 수 있다. 전형적으로, 항체 및 항원 결합 단편은 IgG Fc 도메인의 보존된 잔기 N297에서 글리코실화된다. 일부 항체 및 단편은 가변 영역에 하나 이상의 추가 글리코실화 부위를 포함한다. 일 실

시양태에서, 글리코실화 부위는 다음 맥락에 있다: $FN_{297}S$ 또는 $YN_{297}S$.

[0637] 일 실시양태에서, 상기 글리코실화는 각각의 연결과 함께 IgG 상에서 발견되는 3개의 상이한 N-글리칸 유형인 고 만노오스형, 복합형 및/또는 하이브리드형 중 하나 이상이다. 복합형 및 하이브리드형은, 최내측 N-아세틸글루코사민에 푸코오스 잔기가 추가되는 코어 푸코실화가 있거나 코어 푸코실화 없이 존재한다.

[0638] 일부 경우에, 항-TfR 항원 결합 단백질은 비글리코실화된 항체, 즉 트랜스글루타민화 반응을 방해할 수 있는 글리코실화 서열을 포함하지 않는 항체, 예를 들어, EU 넘버링 시스템에 따른 하나 이상의 중쇄 상의 N297(또는 서열번호 575의 아미노산 서열을 참조로 위치 N180)에 사카라이드 기를 갖지 않는 항체이다. 특정 실시양태에서, 항체 중쇄는 N297 돌연변이(또는 서열번호 575의 아미노산 서열을 참조로 위치 N180)를 갖는다. 특정 실시양태에서, 항체 중쇄는 N297Q 또는 N297D 돌연변이(또는 서열번호 575의 아미노산 서열을 참조로 N180Q 또는 N180D 돌연변이)를 갖는다. 위치 297에서 발견되는 N-연결 글리칸은 인간 및 설치류에서 발견되는 모든 IgG에 공통적인 코어 구조로 발견될 수 있다. 이러한 앞서 기재된 돌연변이를 포함하는 항체는, 글리코실화 서열을 제거하거나 비활성화하기 위한 부위 지향 돌연변이유발, 또는 임의의 간섭 글리코실화 부위 또는 임의의 다른 간섭 구조와 떨어진 부위에 글루타민 잔기를 삽입하기 위한 부위 지향 돌연변이유발에 의해 제조될 수 있다. 이러한 항체는 또한 천연 또는 인공 공급원으로부터 단리될 수 있다. 비글리코실화된 항체는 또한 글리코실화의 결여를 초래하는, T299 또는 S298P, 기타 돌연변이 또는 돌연변이의 조합을 포함하는 항체를 포함한다.

[0639] 일부 경우에, 항원 결합 단백질은 탈글리코실화된 항체, 즉 트랜스글루타미나아제-매개 접합을 용이하게 하기 위해 사카라이드 기가 제거된 항체이다. 사카라이드는 비제한적으로 N-연결 올리고사카라이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 탈글리코실화는 잔기 N180(서열번호 575의 아미노산 서열을 참조)에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 탈글리코실화는 EU 넘버링 시스템에 따른 잔기 N297 쇄에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 사카라이드 기의 제거는 비제한적으로 PNGase를 통하는 것을 포함하여 효소적으로 수행된다.

[0640] 일 실시양태에서, 본원에 기재된 항체 또는 단편은 비푸코실화된다.

[0641] 본원에 기재된 항체 및 항원 결합 단편은 또한, 예를 들어, 다음을 포함하는 다른 방식으로 번역 후 변형될 수 있다: N-말단에서 Glu 또는 Gln 고리화; N-말단 양전하 손실; C-말단에서 Lys 변이체; 탈아미드화(Asn에서 Asp로); 이성질체화(Asp에서 isoAsp로); 탈아미드화(Gln에서 Glu로); 산화(Cys, His, Met, Tyr, Trp); 및/또는 디설파이드 결합 이질성(셔플링, 티오에테르 및 트리설파이드 형성).

[0642] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체는 항체 중쇄 서열에 본래 존재할 수 있는 Q295를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 중쇄는 Q295를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항체 중쇄는 Q295 및 아미노산 치환 N297D를 포함할 수 있다.

[0643] 본 개시내용의 특정 실시양태에 따라, 예를 들어, 중성 pH와 비교하여 산성 pH에서 FcRn 수용체에 대한 항체 결합을 향상시키거나 감소시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 항-TfR 항체 및 항원 결합 단편이 제공된다. 예를 들어, 본 개시내용은 Fc 도메인의 CH2 또는 CH3 영역에 돌연변이를 포함하는 항-TfR 항체를 포함하고, 여기서 돌연변이(들)는 산성 환경에서(예를 들어, pH가 약 5.5 내지 약 6.0 범위인 엔도솜에서) FcRn에 대한 Fc 도메인의 친화도를 증가시킨다. 이러한 돌연변이는 동물에게 투여되었을 때 항체의 혈청 반감기의 증가를 초래할 수 있다.

[0644] 이러한 Fc 변형의 비제한적 예는, 예를 들어, 다음을 포함한다:

[0645] 다음 위치에서의 변형:

[0646] ● 250(예를 들어, E 또는 Q);

[0647] ● 250 및 428(예를 들어, L 또는 F);

[0648] ● 252(예를 들어, L/Y/F/W 또는 T),

[0649] ● 254(예를 들어, S 또는 T), 및/또는

[0650] ● 256(예를 들어, S/R/Q/E/D 또는 T);

[0651] 및/또는 다음 위치에서의 변형:

[0652] ● 428 및/또는 433(예를 들어, H/L/R/S/P/Q 또는 K), 및/또는

[0653] ● 434(예를 들어, A, W, H, F 또는 Y);

[0654] 및/또는 다음 위치에서의 변형:

[0655] ● 250 및/또는 428;

[0656] 및/또는 다음 위치에서의 변형:

[0657] ● 307 또는 308(예를 들어, 308F, V308F), 및/또는 434.

[0658] 일 실시양태에서, 변형은 다음을 포함한다:

[0659] ● 428L(예를 들어, M428L) 및 434S(예를 들어, N434S) 변형;

[0660] ● 428L, 259I(예를 들어, V259I) 및 308F(예를 들어, V308F) 변형;

[0661] ● 433K(예를 들어, H433K) 및 434(예를 들어, 434Y) 변형;

[0662] ● 252, 254 및 256(예를 들어, 252Y, 254T 및 256E) 변형;

[0663] ● 250Q 및 428L 변형(예를 들어, T250Q 및 M428L); 및/또는

[0664] ● 307 및/또는 308 변형(예를 들어, 308F 또는 308P).

[0665] 예를 들어, 본 개시내용은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 돌연변이의 하나 이상의 쌍 또는 군을 포함하는 Fc 도메인을 포함하는 항-TfR 항체를 포함한다:

[0666] ● 250Q 및 248L(예를 들어, T250Q 및 M248L);

[0667] ● 252Y, 254T 및 256E(예를 들어, M252Y, S254T 및 T256E);

[0668] ● 257I 및 311I(예를 들어, P257I 및 Q311I);

[0669] ● 257I 및 434H(예를 들어, P257I 및 N434H);

[0670] ● 376V 및 434H(예를 들어, D376V 및 N434H);

[0671] ● 307A, 380A 및 434A(예를 들어, T307A, E380A 및 N434A);

[0672] ● 428L 및 434S(예를 들어, M428L 및 N434S); 및

[0673] ● 433K 및 434F(예를 들어, H433K 및 N434F).

[0674] 또 다른 실시양태에서, 변형은 265A(예를 들어, D265A) 및/또는 297A(예를 들어, N297A) 변형을 포함한다.

[0675] 일 실시양태에서, 중쇄 불변 도메인은 S228P 및/또는 S108P 돌연변이를 포함하는 감마4이다. 문헌 [Angal *et al.*, A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody, Mol Immunol. 1993 Jan;30(1):105-108]을 참조한다.

[0676] 앞서 언급한 Fc 도메인 돌연변이의 모든 가능한 조합, 및 본원에 개시된 항체 가변 도메인 내의 다른 돌연변이는 본 개시내용의 범위 내에서 고려된다.

[0677] 본원에 기재된 항-TfR 항체는 감소된 이펙터 기능을 갖는 변형된 Fc 도메인을 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "감소된 이펙터 기능을 갖는 변형된 Fc 도메인"은, 변형된 Fc를 포함하는 분자가, Fc 부분의 야생형 자연 발생 버전을 포함하는 비교 분자에 비해, 세포 사멸(예를 들어, ADCC 및/또는 CDC), 보체 활성화, 식세포작용 및 옵소닌화(opsonization)로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나의 효과의 심각성 또는 정도의 감소를 나타내도록, 야생형 자연 발생 Fc 도메인에 비해 변형, 돌연변이, 절단 등이 이루어진 면역글로불린의 임의의 Fc 부분을 의미한다. 특정 실시양태에서, "감소된 이펙터 기능을 갖는 변형된 Fc 도메인"은 Fc 수용체(예를 들어, FcγR)에 대한 결합이 감소되거나 약화된 Fc 도메인이다.

[0678] 특정 실시양태에서, 변형된 Fc 도메인은 힌지 영역에 치환을 포함하는 변이체 IgG1 Fc 또는 변이체 IgG4 Fc이다. 예를 들어, 본 개시내용의 맥락에서 사용하기 위한 변형된 Fc는 IgG1 Fc 힌지 영역의 적어도 하나의 아미노산이 IgG2 Fc 힌지 영역으로부터의 상응하는 아미노산으로 대체된 변이체 IgG1 Fc를 포함할 수 있다. 대안적으로, 본 개시내용의 맥락에서 사용하기 위한 변형된 Fc는 IgG4 Fc 힌지 영역의 적어도 하나의 아미노산이 IgG2 Fc 힌지 영역으로부터의 상응하는 아미노산으로 대체된 변이체 IgG4 Fc를 포함할 수 있다. 본 개시내용의

맥락에서 사용될 수 있는 비제한적인 예시적인 변형된 Fc 영역, 뿐만 아니라 본원에 제시된 변형된 Fc 영역의 임의의 기능적으로 동등한 변이체는, 미국 특허 출원 공개 번호 2014/0243504에 제시되어 있고, 그 개시내용은 본원에 참조로 전체적으로 원용된다.

[0679] 본 개시내용은 또한 본원에서 제시된 HCVR 및 키메라 중쇄 불변(CH) 영역을 포함하는 항원 결합 단백질, 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하고, 여기서 키메라 CH 영역은 하나 초과의 면역글로불린 아이소타입의 CH 영역으로부터 유래된 세그먼트를 포함한다. 예를 들어, 본 개시내용의 항체는 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 분자로부터 유래된 CH3 도메인의 일부 또는 전부와 조합된, 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 분자로부터 유래된 CH2 도메인의 일부 또는 전부를 포함하는 키메라 CH 영역을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에 따라, 본 개시내용의 항체는 키메라 힌지 영역을 갖는 키메라 CH 영역을 포함한다. 예를 들어, 키메라 힌지는 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 힌지 영역으로부터 유래된 "하부 힌지" 서열(EU 넘버링에 따른 위치 228 내지 236으로부터의 아미노산 잔기)과 조합된, 인간 IgG1, 인간 IgG2 또는 인간 IgG4 힌지 영역으로부터 유래된 "상부 힌지" 아미노산 서열(EU 넘버링에 따른 위치 216 내지 227로부터의 아미노산 잔기)을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에 따라, 키메라 힌지 영역은 인간 IgG1 또는 인간 IgG4 상부 힌지로부터 유래된 아미노산 잔기 및 인간 IgG2 하부 힌지로부터 유래된 아미노산 잔기를 포함한다. 본원에 기재된 바와 같은 키메라 CH 영역을 포함하는 항체는 특정 실시양태에서, 항체의 치료적 또는 약동학적 특성에 부정적인 영향을 미치지 않고 변형된 Fc 이펙터 기능을 나타낼 수 있다. (예를 들어, WO2014/022540 참조).

[0680] 본 개시내용의 맥락에서 사용될 수 있는 다른 변형된 Fc 도메인 및 Fc 변형은 US2014/0171623; US 8,697,396; US2014/0134162; WO2014/043361에 제시된 바와 같은 임의의 변형을 포함하고, 이의 개시내용은 전문이 참고문헌으로서 본원에 원용된다. 본원에 기재된 바와 같은 변형된 Fc 도메인을 포함하는 항체 또는 다른 항원 결합 융합 단백질을 구축하는 방법은 당업계에 알려져 있다.

[0681] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-TfR 항체 및 항원 결합 단편은 별도의 TfR 결합 부위를 생성하는 CH2 및/또는 CH3 영역에 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 Fc 도메인을 포함한다.

[0682] 일 실시양태에서, CH2 영역은 다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 돌연변이 또는 이의 조합을 포함한다: a) 위치 47이 Glu, Gly, Gln, Ser, Ala, Asn, Tyr 또는 Trp이고; 위치 49가 Ile, Val, Asp, Glu, Thr, Ala 또는 Tyr이고; 위치 56이 Asp, Pro, Met, Leu, Ala, Asn 또는 Phe이고; 위치 58이 Arg, Ser, Ala 또는 Gly이고; 위치 59가 Tyr, Trp, Arg 또는 Val이고; 위치 60이 Glu이고; 위치 61이 Trp 또는 Tyr이고; 위치 62가 Gln, Tyr, His, Ile, Phe, Val 또는 Asp이고; 위치 63이 Leu, Trp, Arg, Asn, Tyr 또는 Val임; b) 위치 39가 Pro, Phe, Ala, Met 또는 Asp이고; 위치 40이 Gln, Pro, Arg, Lys, Ala, Ile, Leu, Glu, Asp 또는 Tyr이고; 위치 41이 Thr, Ser, Gly, Met, Val, Phe, Trp 또는 Leu이고; 위치 42가 Pro, Val, Ala, Thr 또는 Asp이고; 위치 43이 Pro, Val 또는 Phe이고; 위치 44가 Trp, Gln, Thr 또는 Glu이고; 위치 68이 Glu, Val, Thr, Leu 또는 Trp이고; 위치 70이 Tyr, His, Val 또는 Asp이고; 위치 71이 Thr, His, Gln, Arg, Asn 또는 Val이고; 위치 72가 Tyr, Asn, Asp, Ser 또는 Pro임; c) 위치 41이 Val 또는 Asp이고; 위치 42가 Pro, Met 또는 Asp이고; 위치 43이 Pro 또는 Trp이고; 위치 44가 Arg, Trp, Glu 또는 Thr이고; 위치 45가 Met, Tyr 또는 Trp이고; 위치 65가 Leu 또는 Trp이고; 위치 66이 Thr, Val, Ile 또는 Lys이고; 위치 67이 Ser, Lys, Ala 또는 Leu이고; 위치 69가 His, Leu 또는 Pro이고; 위치 73이 Val 또는 Trp임; 또는 d) 위치 45가 Trp, Val, Ile 또는 Ala이고; 위치 47이 Trp 또는 Gly이고; 위치 49가 Tyr, Arg 또는 Glu이고; 위치 95가 Ser, Arg 또는 Gln이고; 위치 97이 Val, Ser 또는 Phe이고; 위치 99가 Ile, Ser 또는 Trp이고; 위치 102가 Trp, Thr, Ser, Arg 또는 Asp이고; 위치 103이 Trp이고; 위치 104가 Ser, Lys, Arg 또는 Val임; 여기서, 치환 및 위치는 다음의 아미노산 4 내지 113을 참조하여 결정된다:

PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK (서열번호 540).

[0683]

[0684] 일 실시양태에서, CH3 영역은 다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 돌연변이 또는 이의 조합을 포함한다: 위치 153이 Trp, Leu 또는 Glu이고; 위치 157이 Tyr 또는 Phe이고; 위치159가 Thr이고; 위치 160이 Glu이고; 위치 161이 Trp이고; 위치 162가 Ser, Ala, Val 또는 Asn이고; 위치 163이 Ser 또는 Asn이고; 위치 186이 Thr 또는 Ser이고; 위치 188이 Glu 또는 Ser이고; 위치 189가 Glu이고; 위치 194가 Phe임; 또는 b) 위치 118이 Phe 또는 Ile이고; 위치 119가 Asp, Glu, Gly, Ala 또는 Lys이고; 위치 120이 Tyr, Met, Leu, Ile 또는 Asp이고;

위치 122가 Thr 또는 Ala이고; 위치 210이 Gly이고; 위치 211이 Phe이고; 위치 212가 His, Tyr, Ser 또는 Phe이고; 위치 213이 Asp임; 여기서 치환 및 위치는 서열번호 540의 아미노산 114 내지 220을 참조하여 결정된다.

[0685] 일부 실시양태에서, CH3 영역은 다음으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이 또는 이의 조합을 포함한다: EU 넘버링에 따른, 위치 384가 Leu, Tyr, Met 또는 Val이고; 위치 386이 Leu, Thr, His 또는 Pro이고; 위치 387이 Val, Pro 또는 산성 아미노산이고; 위치 388이 Trp이고; 위치 389가 Val, Ser 또는 Ala이고; 위치 413이 Glu, Ala, Ser, Leu, Thr 또는 Pro이고; 위치 416이 Thr 또는 산성 아미노산이고; 위치 421이 Trp, Tyr, His 또는 Phe임. 일 실시양태에서, CH3 영역은 다음으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산 돌연변이 또는 이의 조합을 포함한다: EU 넘버링에 따른, 위치 380이 Trp, Leu 또는 Glu이고; 위치 384가 Tyr 또는 Phe이고; 위치 386이 Thr이고; 위치 387이 Glu이고; 위치 388이 Trp이고; 위치 389가 Ser, Ala, Val 또는 Asn이고; 위치 390이 Ser 또는 Asn이고; 위치 413이 Thr 또는 Ser이고; 위치 415가 Glu 또는 Ser이고; 위치 416이 Glu이고; 위치 421이 Phe임.

[0686] 일부 실시양태에서, CH3 영역은 다음으로부터 선택된 하나 이상의 돌연변이 또는 이의 조합을 포함한다: a) 위치 382의 Phe, 위치 383의 Tyr, 위치 384의 Asp, 위치 385의 Asp, 위치 386의 Ser, 위치 387의 Lys, 위치 388의 Leu, 위치 389의 Thr, 위치 419의 Pro, 위치 420의 Arg , 위치 421의 Gly, 위치 422의 Leu, 위치 424의 Ala, 위치 426의 Glu, 위치 438의 Tyr, 위치 440의 Leu, 위치 442의 Gly, 및 위치 443의 Glu; b) 위치 382의 Phe, 위치 383의 Tyr, 위치 384의 Gly, 위치 385의 N, 위치 386의 Ala, 위치 387의 Lys, 위치 389의 Thr, 위치 422의 Leu, 위치 424의 Ala, 위치 426의 Glu, 위치 438의 Tyr, 위치 440의 Leu; c) 위치 382의 Phe, 위치 383의 Tyr, 위치 384의 Glu, 위치 385의 Ala, 위치 387의 Lys , 위치 388의 Leu, 위치 422의 Leu, 위치 424의 Ala, 위치 426의 Glu, 위치 438의 Tyr, 위치 440의 Leu; d) 위치 382의 Phe, 위치 384의 Glu, 위치 386의 Ser, 위치 387의 Lys, 위치 389의 Thr, 위치 422의 Leu, 위치 424의 Ala, 위치 426의 Glu, 위치 438의 Tyr, 위치 440의 Leu; e) 위치 382의 Phe, 위치 384의 Gly, 위치 385의 Ala, 위치 387의 Lys, 위치 389의 Ser, 위치 422의 Leu, 위치 424의 Ala, 위치 426의 Glu, 위치 438의 Tyr, 위치 440의 Leu; f) 위치 382의 Phe, 위치 384의 Gly, 위치 385의 Ala, 위치 387의 Lys, 위치 388의 Leu, 위치 389의 Thr, 위치 422의 Leu, 위치 424의 Ala, 위치 426의 Glu, 위치 438의 Tyr, 위치 440의 Leu; 여기서 위치는 넘버링에 따라 결정된다.

[0687] 본원에 기재된 항원 결합 단백질에 비천연 TfR 결합 부위를 도입할 수 있는 CH2 및/또는 CH3 영역에서의 추가 돌연변이는, 전문이 참고문헌으로서 본원에 원용된 미국 특허 출원 공개 번호 2020/0223935, 2020/0369746, 2021/0130485, 2022/0017634; 및 PCT 출원 공개 번호 WO2023/279099, WO2023/114499 및 WO2023/114510에 기재된 것을 포함한다.

[0688] 또한, 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체, 예를 들어, 항-TfR scFv-약물 접합체 또는 항-TfR Fab-약물 접합체, 예를 들어, 31874B; 31863B; 69348; 69340; 69331; 69332; 69326; 69329; 69323; 69305; 69307; 12795B; 12798B; 12799B; 12801B; 12802B; 12808B; 12812B; 12816B; 12833B; 12834B; 12835B; 12847B; 12848B; 12843B; 12844B; 12845B; 12839B; 12841B; 12850B; 69261; 및 69263을 포함하는 용기(예를 들어, 캡 또는 크로마토그래피 컬럼, 중공 구멍 바늘 또는 주사기 실린더가 있는 플라스틱 또는 유리 바이알)가 본원에 제공된다.

[0689] 또한, 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체, 예를 들어, 항-TfR scFv 약물 접합체 또는 항-TfR Fab 약물 접합체, 예를 들어, 31874B; 31863B; 69348; 69340; 69331; 69332; 69326; 69329; 69323; 69305; 69307; 12795B; 12798B; 12799B; 12801B; 12802B; 12808B; 12812B; 12816B; 12833B; 12834B; 12835B; 12847B; 12848B; 12843B; 12844B; 12845B; 12839B; 12841B; 12850B; 69261; 또는 69263, 또는 이의 약학 조성물을 포함하는 주사 장치가 본원에 제공된다. 주사 장치는 키트로 포장될 수 있다. 주사 장치는 비경구 경로를 통해, 예를 들어 근육내로, 피하로 또는 정맥내로 대상체의 신체 내로 물질을 도입하는 장치이다. 예를 들어, 주사 장치는 주사기(예를 들어, 자동 주사기와 같이 약학 조성물로 미리 충전됨)일 수 있으며, 이는, 예를 들어, 주사할 유체(예를 들어, 단백질-약물 접합체 또는 이의 약학 조성물을 포함함)를 보관하기 위한 실린더 또는 배럴, 유체의 주사를 위해 피부 및/또는 혈관 또는 기타 조직을 찌르기 위한 바늘; 및 유체를 실린더에서 밀어내고 바늘 구멍을 통해 대상체의 신체로 밀어넣기 위한 플런저를 포함한다.

[0690] 단백질-약물 접합체를 대상체(예를 들어, 인간)의 신체 내로, 예를 들어, 비경구로(예를 들어, 정맥내로) 도입하는 단계를 포함하는, 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체, 예를 들어, 항-TfR scFv-약물 접합체 또는 항-TfR Fab-약물 접합체, 예를 들어, 31874B; 31863B; 69348; 69340; 69331; 69332; 69326; 69329; 69323; 69305; 69307; 12795B; 12798B; 12799B; 12801B; 12802B; 12808B; 12812B; 12816B; 12833B; 12834B; 12835B;

12847B; 12848B; 12843B; 12844B; 12845B; 12839B; 12841B; 12850B; 69261; 또는 69263을 대상체에게 투여하는 방법이 본원에 추가로 제공된다. 예를 들어, 방법은 주사기의 바늘로 대상체의 신체를 찌르는 단계, 및 항원 결합 단백질을 대상체의 신체 내로, 예를 들어, 대상체의 정맥, 동맥, 종양, 근육 조직 또는 피하 조직 내로 주사하는 단계를 포함한다.

[0691] 단백질-약물 접합체를 대상체(예를 들어, 인간)의 신체 내로, 예를 들어, 비경구로(예를 들어, 정맥내로) 도입하는 단계를 포함하는, 대상체 내 표적화된 조직(예를 들어, 아래 **표 1-4**에 제시된 바와 같은 임의의 조직 또는 세포 유형, 또는 상응하는 조직 내에 있거나 이와 연관된 세포 유형; 또는 뇌, 대뇌 피질; 소뇌; 해마; 꼬리핵; 부갑상샘; 부신; 기관지; 폐; 구강 점막; 식도; 위; 십이지장; 소장; 결장; 직장; 간; 담낭; 췌장; 신장; 방광; 고환; 부고환; 전립선; 질; 난소; 난관; 자궁내막; 자궁경부; 태반; 유방; 근육(예를 들어, 심근; 골격근, 평활근 및/또는 이의 내피 혈관); 연조직; 피부; 맹장; 림프절; 편도; 및/또는 골수)으로 분자 카고를 전달하는 방법이 본원에 추가로 제공되고, 여기서 분자 카고는, 예를 들어, 본원에 기재된 항원 결합 단백질, 예를 들어, 본원에 기재된 항-TfR scFv 항-TfR Fab, 예를 들어, 31874B; 31863B; 69348; 69340; 69331; 69332; 69326; 69329; 69323; 69305; 69307; 12795B; 12798B; 12799B; 12801B; 12802B; 12808B; 12812B; 12816B; 12833B; 12834B; 12835B; 12847B; 12848B; 12843B; 12844B; 12845B; 12839B; 12841B; 12850B; 69261; 또는 69263에 접합된다. 예를 들어, 방법은 주사기의 바늘로 대상체의 신체를 찌르는 단계, 및 단백질-약물 접합체를 대상체의 신체 내로, 예를 들어, 대상체의 정맥, 동맥, 종양, 근육 조직 또는 피하 조직 내로 주사하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 단백질-약물 접합체는 중추신경계 내로의 척추강내, 뇌실내 또는 실질내 주사를 통해 대상체 내로 도입될 수 있다.

표 1-4. 기재된 항-**TfR** 항원 결합 단백질을 사용한 분자 카고의 전달에 대해 표적화될 수 있는 조직 및 세포 유형.

표적 조직	세포 유형
뇌/척수/CNS	내피 세포
	뉴런(모든 유형)
	희소돌기아교세포 (및 전구체)
	혈관주위세포
	뇌막/연수막 세포
	지주막 장벽 세포
	말초신경 아교세포
	성상세포
	아교세포
	슈반 세포
	뇌실막 세포
	미세아교세포
눈	간상 광수용체 세포
	뮐러 아교세포
	양극 세포
	원추 광수용체 세포
	내피 세포
	각막
	공막
	시신경
	동공 조임근
골격근	골격근세포
	섬유아세포
	내피 세포
	대식세포
	위성 세포
지방 조직	지방세포
	섬유아세포
	T-세포
	대식세포
	B-세포
	수지상 세포

[0692]

[0693]

혈액/골수	T-세포
	B-세포
	대식세포
	적혈구
	형질 세포
	수지상 세포
유방	선 세포
	T-세포
	섬유아세포
	대식세포
	내피 세포
	근상피 세포
	지방세포
폐/기관지	기저 호흡 세포
	호흡 섬모 세포
	곤봉체 세포
	평활근 세포
	이온세포
	대식세포
	폐포 세포(1 & 2 형)
	T-세포
	내피 세포
결장	원위 장세포
	장 배상 세포
	미분화 세포
	T-세포
	파네스 세포
	B-세포
	장내분비 세포
자궁	선 세포 및 내강 세포
	자궁내막 간질 세포
	내피 세포
	평활근 세포
	T-세포
	대식세포
식도	섬유아세포
	편평 상피 세포
	내피 세포
	평활근 세포
	대식세포

	형질 세포
	T-세포
심장	심근세포
	내피 세포
	섬유아세포
	대식세포
	T-세포
	B-세포
	수지상 세포
신장	근위 세뇨관 세포
	T-세포
	대식세포
	집합관 세포
	B-세포
	사구체
	섬유아세포
간	간세포
	B-세포
	적혈구
림프절	B-세포
	T-세포
난소	과립막 세포
	섬유아세포
	평활근 세포
	대식세포
	T-세포
	난포막 세포
	섬유아세포
췌장	췌관 세포
	췌장 내분비 세포
	평활근 세포
	내피 세포
	대식세포
	외분비 선 세포
	단핵구
태반	세포영양막
	융모외 영양세포
	섬유아세포
	호프바우어 세포
	내피 세포

[0694]

전립선	전립선 기저 세포
	전립선 선 세포
	요로상피 세포
	내피 세포
	섬유아세포
	평활근 세포
	대식세포
	T-세포
직장	미분화 세포
	장 배상 세포
	파네스 세포
	원위 장세포
	장내분비 세포
피부	랑게르한스 세포
	섬유아세포
	내피 세포
	기저 각질형성세포
	기저상 각질형성세포
	T-세포
	평활근 세포
	멜라닌세포
PBMC	단핵구
	T-세포
	NK 세포
	수지상 세포
소장	근위 장세포
	미분화 세포
	장 배상 세포
	파네스 세포
비장	B-세포
	T-세포
	형질 세포
	대식세포
위	B-세포
	T-세포
	위 점액 분비 세포
	형질 세포
	섬유아세포
	대식세포
고환	라이디히 세포

[0695]

	후기 정세포
	정원세포
	초기 정세포
	대식세포
	정모세포
	세관주위 세포
	세르톨리 세포
	내피 세포
말초신경계	운동 뉴런
	감각 뉴런
	슈반 세포
	뒤뿌리 신경절
뼈/연골/관절	연골세포
	연골아세포
	간엽 세포
	골아세포
	파골세포

[0696]

[0697] **분자 카고**

[0698] 일부 양태에서, 본 개시내용은 세포 또는 조직에 접합된 분자 카고를 전달하기 위한 방법 및 조성물을 포함한다. 특정 양태에서, 본원에 개시된 트랜스페린 수용체(TfR)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단백질, 예를 들어, scFv, 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 분자 카고에 접합(예를 들어, 공유결합으로 접합)될 수 있다.

[0699] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "분자 카고"는 생물학적 결과에 영향을 주기 위해 작동하는 분자를 지칭한다. 비-제한적인 예로서, 분자 카고는 DNA 서열의 전사를 조절하거나, 단백질의 발현을 조절하거나, 단백질의 활성을 조절하거나, 내인성 유전자(또는 이의 단편)를 삭제 또는 파괴하거나, 외인성 유전자(또는 이의 단편)를 삽입하거나, 내인성 유전자(또는 이의 단편)를 외인성 유전자(또는 이의 단편)로 대체하기 위해 작동할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 분자 카고는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 분자 카고는, 선택적으로 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 및/또는 단백질 분자를 포함하는 본원에 기재된 지질 나노입자, 리포좀, 또는 비-지질 나노입자를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 분자 카고는 소분자를 포함할 수 있다.

[0700] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 항-TfR 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 예를 들어 질환(예를 들어, 신경 질환 또는 근육 질환)을 진단 및/또는 치료하기 위해 TfR1을 발현하는 세포 또는 조직(예를 들어, 뇌 또는 근육)에 접합된 분자 카고를 전달하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 접합된 분자 카고는, 예를 들어, 클라트린-매개된 내포작용을 통해 내포될 수 있는 트랜스페린 수용체에 대한 결합을 통해, 예를 들어 내피 세포에 의해 흡수될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-TfR 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 예를 들어, 표적 조직(예를 들어, 뇌, 척수, 근육, 비장, 심장, 또는 폐) 또는 표적 세포(예를 들어, 뇌 세포, 또는 근육세포) 내로 분자 카고를 전달하는 데 우수한 활성을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항체 또는 이의 항원-결합 단편은 하나 이상의 뇌 세포, 예컨대 뉴런(예를 들어, 운동 뉴런, 감각 뉴런), 성상세포, 아교세포(예를 들어, 희소돌기아교세포, 미세아교세포), 및/또는 뇌 및/또는 척수에서의 다른 세포 내로 분자 카고를 전달하는 데 효과적일 수 있다.

[0701] 일부 실시양태에서, 분자 카고는 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한다. 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산"은, 종래의 RNA, DNA, 혼합된 RNA-DNA, 및 이의 유사체인 중합체를 포함하는, 백본을 따라 함께 연결된 질소 헤테로사이클릭 염기 또는 염기 유사체를 갖는 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드 유사체를 포함하는 멀티머 화합물을 지칭하도록 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 핵산 "백본"은 당-포스포디에스테르 연결, 펩티드-핵산 결합("펩티드 핵산" 또는 PNA; PCT 번호 WO 95/32305), 포스포로티오에이트 연결, 메틸포스포네이트 연결, 또는 이들의 조합 중 하나 이상을 포함하는 다양한 연결로 만들어질 수 있다. 핵산의 당 모이어티는 선택적 치환, 예를 들어, 메톡시 또는 2' 할라이드 치환을 갖는 리보오스(ribose), 데옥시리보오스, 또는 유사한 화합물일 수 있다. 일부 실시양태에서, 길이가 최대 약 30개 뉴클레오티드인 폴리뉴클레오티드는 본원에서 "올리고뉴클레오티드"로서 지칭될 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 형태에 따라 다양한 상이한 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 길이가 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개 또는 초과인 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 길이가 8 내지 30개인 뉴클레오티드, 길이가 10 내지 15개인 뉴클레오티드, 길이가 10 내지 20개인 뉴클레오티드, 길이가 15 내지 25개인 뉴클레오티드, 길이가 21 내지 23개인 뉴클레오티드이다.

[0702] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고는 담체, 예컨대 리포좀 또는 지질 나노입자(LNP)를 포함할 수 있다. 지질 입자, 예를 들어, 본원에 개시된 리포좀 또는 지질 나노입자는, 관심 표적 부위(예를 들어, 세포, 조직, 기관 등)에 치료 핵산(예를 들어, gRNA)을 전달하는 데 사용될 수 있는 지질 제형을 포함할 수 있다. 이론에 구애되지 않고, 담체는, 예를 들어, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드 및/또는 본원에 개시된 단백질의 전달을 위한 수단으로서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 담체(예를 들어, 리포좀 또는 LNP)는 핵산(예를 들어, DNA 또는 RNA), 단백질(예를 들어, RNA-유도된 DNA 결합제), 또는 이들의 조합의 전달을 위해 유용할 수 있다. 비-제한적인 예로서, 담체(예를 들어, 리포좀 또는 LNP)는 유전자 편집 시스템, 예를 들어, CRISPR/Cas 시스템 또는 본원에 기재된 추가적인 유전자 편집 시스템의 다양한 구성요소를 전달하기 위해 사용될 수 있다.

[0703] 일부 실시양태에서, 분자 카고는 소분자를 포함한다. 소분자(SM)는 낮은 분자량(전형적으로, 최대 약 1 kDa)을 가질 수 있기 때문에 세포에 쉽게 들어갈 수 있다. 일단 세포 안에 들어가면, 이는 다른 분자, 예컨대 단백질에 영향을 줄 수 있고, 예를 들어, 암세포가 사멸하도록 유발할 수 있다. 이는 항체와 같은 많은 거대 분자량 분자와는 상이하다. 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합될 수 있는 소분자의 예는 항-TfR:SM 접합체를 형성한다. 게다가, 항암 SM은 항-TfR-매개 전달을 통해 전달될 수 있다. 이러한 항암 SM은, 예를 들어, 세포독성제, 알킬화제

(예를 들어, 백금 함유 약물), 대사방지제(5-플루오도유라실), 토포이소머라아제(예를 들어, 토포테칸), 안트라사이클린(예를 들어, 독소루비신), 및 식물 알칼로이드(예를 들어, 빈블라스틴)를 포함할 수 있다. 다른 소분자 카고는 미글루스타트를 포함할 수 있다.

[0704] 예시적인 분자 카고는 본원에서 더 상세히 설명되지만, 본원에서 제공된 예시적인 분자 카고는 제한되도록 의도되지 않는다는 것을 이해해야 한다.

[0705] 폴리뉴클레오티드 분자

[0706] 본원에서 기재된 단백질-약물 접합체 내의 분자 카고로서 유용한 폴리뉴클레오티드 분자의 비-제한적인 예는, 비제한적으로, 간섭 핵산(예를 들어, shRNA, siRNA, 마이크로RNA, 안티센스 올리고뉴클레오티드), 갭머, 믹스머, 리보자임, 포스포로디아미다이트 모르폴리노, 펩티드 핵산, 압타머, 및 가이드 핵산(예를 들어, Cas9 가이드 RNA), mRNA 등을 포함한다. 다양한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다.

[0707] 일부 실시양태에서, 분자 카고는 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 분자 카고는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 또는 적어도 10개의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한다.

[0708] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 분자는 DNA이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 분자는 RNA이다.

[0709] 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 간섭 핵산 또는 가이드 RNA)는 길이가 8 내지 15개, 8 내지 30개, 8 내지 40개, 또는 10 내지 50개, 또는 5 내지 50개, 또는 5 내지 40개 범위의 뉴클레오티드일 수 있는 표적 핵산에 대한 상보성의 영역을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적 핵산에 대한 폴리뉴클레오티드의 상보성의 영역은 길이가 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개 또는 50개인 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상보성의 영역은 표적 핵산의 적어도 10개의 연속 뉴클레오티드와 상보적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 표적 핵산의 연속 뉴클레오티드의 부분과 비교하여 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개의 염기 미스매치를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 15개의 염기에 걸쳐 최대 3개의 미스매치, 또는 10개의 염기에 걸쳐 최대 4개의 미스매치를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나의 표적 서열에 대해 상보적이다(예를 들어, 적어도 80%, 적어도 85% 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%). 다양한 실시양태에서, 이러한 표적 서열은 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드에 100% 상보적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 중 어느 하나에서 티민 염기(T') 중 어느 하나 이상은 우라실 염기(U')일 수 있고/있거나, U' 중 어느 하나 이상은 T'일 수 있다. 본원에 기재된 표적 서열은 gRNA의 가이드 서열에 대해 상보성을 갖는 표적 유전자에서의 핵산의 서열을 포함할 수 있다. 표적 서열 및 가이드 서열의 상호작용은 표적 서열 내에서, RNA-유도된 DNA-결합제(예를 들어, Cas 단백질)를 결합하고, 잠재적으로 닉(nick) 또는 절단을 지시한다(약제의 활성에 따름).

[0710] 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 변형될 수 있고, 예를 들어, 변형된 뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오시드간 연결, 및/또는 변형된 당 모이어티, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드는 하기 특성 중 하나 이상을 가질 수 있다: 비변형된 폴리뉴클레오티드와 비교하여 개선된 세포 흡수를 갖거나; 세포에 대해 독성이 없거나 포유동물이 면역 자극적이지 않거나; 패턴 인식 수용체를 회피하거나; 대안적인 스플라이싱을 매개하지 않거나; 뉴클레아제 내성이 있거나; 세포에서 내부적으로 개선된 엔도솜 출구를 갖거나; TLR 자극을 최소화함. 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드의 다양한 변형된 화학 물질 또는 포맷 중 임의의 것이 함께 조합될 수 있다. 비-제한적인 예로서, 동일한 폴리뉴클레오티드 내에 1종, 2종, 3종, 4종, 5종, 6종, 7종, 8종 또는 초과의 상이한 유형의 변형을 포함할 수 있다.

[0711] 다양한 실시양태에서, 변형(들)이 혼입되는 뉴클레오티드가 천연 올리고리보뉴클레오티드 또는 올리고데옥시뉴클레오티드 분자보다 뉴클레아제 소화에 대해 더 저항성이 되게 하는 특정 뉴클레오티드 변형(들)이 사용될 수 있고; 이러한 변형된 폴리뉴클레오티드는 비변형된 폴리뉴클레오티드보다 더 긴 시간 동안 온전하게 생존한다. 예시적인 변형된 폴리뉴클레오티드는 변형된 백본, 예를 들어, 변형된 뉴클레오시드간 연결, 예컨대, 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로티오에이트 단쇄 알킬 또는 사이클로알킬 당 간 연결, 헤테로사이클릭

당 간 연결 또는 단쇄 헤테로원자를 포함하는 것들을 포함한다. 이와 같이, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 변형, 예를 들어, 뉴클레오티드 변형의 혼입을 통해 핵용해성 분해에 대항하여 안정화될 수 있다.

[0712] 다양한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 길이가 최대 50개인 뉴클레오티드일 수 있고, 여기서 폴리뉴클레오티드 중 2 내지 10개, 2 내지 15개, 2 내지 16개, 2 내지 17개, 2 내지 18개, 2 내지 19개, 2 내지 20개, 2 내지 25개, 2 내지 30개, 2 내지 40개, 또는 2 내지 45개의 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 길이가 8 내지 30개인 뉴클레오티드일 수 있으며, 여기서 폴리뉴클레오티드 중 2 내지 10개, 2 내지 15개, 2 내지 16개, 2 내지 17개, 2 내지 18개, 2 내지 19개, 2 내지 20개, 2 내지 25개, 2 내지 30개의 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 길이가 8 내지 15개인 뉴클레오티드일 수 있고, 여기서, 폴리뉴클레오티드 중 2 내지 4개, 2 내지 5개, 2 내지 6개, 2 내지 7개, 2 내지 8개, 2 내지 9개, 2 내지 10개, 2 내지 11개, 2 내지 12개, 2 내지 13개, 2 내지 14개의 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 변형된 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 또는 15개의 뉴클레오티드를 제외한 모든 뉴클레오티드를 가질 수 있다.

[0713] 다양한 실시양태에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 당의 2' 위치에서 변형된, 적어도 하나의 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드에서 모든 뉴클레오시드는 2'-변형된 뉴클레오시드이다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 2'-변형된 뉴클레오시드를 포함한다.

[0714] 다양한 실시양태에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드 하나 이상의 비-바이사이클릭 2'-변형된 뉴클레오시드, 예를 들어, 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE)2'-O-메틸(2'-O-Me), 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-데옥시, 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA) 변형된 뉴클레오시드, 2'-플루오로(2'-F), 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 또는 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP)일 수 있다.

[0715] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 2'-4' 바이사이클릭 뉴클레오시드를 포함할 수 있고, 여기서 리보오스 고리는 예를 들어, 고리 내의 2개의 원자를 연결하는 가교 모이어티(예를 들어, 에틸렌(ENA) 가교, 메틸렌(LNA) 가교, 또는 (S)-구속 에틸(cEt) 가교를 통해 2'-O 원자를 4'-C 원자에 연결함)를 포함할 수 있다. ENA의 비제한적인 예는 PCT 공개 번호 WO 2005/042777; 문헌[Morita et al., Nucleic Acid Res., Suppl 1:241-242, 2001]; [Koizumi, Curr. Opin. Mol. Ther., 8:144-149, 2006, Surono et al., Hum. Gene Ther., 15:749-757, 2004]; 및 [Horie et al., Nucleic Acids Symp. Ser (Oxf), 49:171-172, 2005]에 개시되어 있고; 이의 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. LNA의 비-제한적인 예는 PCT 특허 출원 공개 번호 WO2008/043753에 개시되어 있고, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. cEt의 비-제한적인 예는 미국 특허 번호 7,569,686, 7,101,993, 및 7,399,845에 개시되어 있고, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0716] 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 미국 특허 번호 8,022,193; 7,569,686; 7,399,845; 7,741,457; 7,335,765; 7,816,333; 8,957,201; 7,314,923에 개시된 변형된 뉴클레오시드를 포함하며, 이들 각각의 전체 내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로 원용된다.

[0717] 다양한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는, 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드를 갖지 않는 폴리뉴클레오티드와 비교하여, 1℃ 내지 10℃의 범위에서 폴리뉴클레오티드의 Tm의 증가를 야기하는 적어도 하나의 변형된 뉴클레오시드를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는, 변형된 뉴클레오시드를 갖지 않는 폴리뉴클레오티드와 비교하여, 2℃, 3℃, 4℃, 5℃, 6℃, 7℃, 8℃, 9℃, 10℃, 15℃, 20℃, 25℃, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃ 또는 초과의 범위에서 폴리뉴클레오티드의 Tm의 총 증가를 야기하는 복수의 변형된 뉴클레오시드를 가질 수 있다.

[0718] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 상이한 종류의 뉴클레오시드의 혼합을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오시드 또는 리보뉴클레오시드 및 2'-O-Me 변형된 뉴클레오시드의 혼합을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 2'-4' 바이사이클릭 뉴클레오시드 및 2'-MOE, 2'-플루오로, 또는 2'-O-Me 변형된 뉴클레오시드의 혼합을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 비-바이사이클릭 2'-변형된 뉴클레오시드(예를 들어, 2'-MOE, 2'-플루오로, 또는 2'-O-Me) 및 2'-4' 바이사이클릭 뉴클레오시드(예를 들어, LNA, ENA, cEt)의 혼합을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 2'-데옥시리보뉴클레오시드 또는 리보뉴클레오시드 및 2'-플루오로 변형된 뉴클레오시드의 혼합을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 2'-플루오로 변형된 뉴클레오시드 및 2'-O-Me 변형된 뉴클레오시드의 혼합을 포함할 수 있다.

[0719] 다양한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 상이한 유형의 교번하는 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 교번하는 데옥시리보뉴클레오시드 또는 리보뉴클레오시드 및 2'-O-Me 변형된 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 교번하는 2'-데옥시리보뉴클레오시드 또는 리보뉴클레오시드 및 2'-플루오로 변형된 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 교번하는 2'-플루오로 변형된 뉴클레오시드 및 2'-O-Me 변형된 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 교번하는 2'-4' 바이사이클릭 뉴클레오시드 및 2'-MOE, 2'-플루오로, 또는 2'-O-Me 변형된 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 교번하는 비-바이사이클릭 2'-변형된 뉴클레오시드(예를 들어, 2'-MOE, 2'-플루오로, 또는 2'-O-Me) 및 2'-4' 바이사이클릭 뉴클레오시드(예를 들어, LNA, ENA, cEt)를 포함할 수 있다.

[0720] 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 무염기성 잔기, 5-비닐포스포네이트 변형, 및/또는 하나 이상의 역 무염기성 잔기를 포함할 수 있다.

[0721] 다양한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 또는 다른 변형된 뉴클레오시드간 연결을 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 적어도 2개의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함한다. 다양한 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 모든 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함한다. 비-제한적인 예로서, 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 단부에서의 제1, 제2, 및/또는 (예를 들어, 및) 제3 뉴클레오시드간 연결에서 변형된 뉴클레오시드간 연결을 포함한다.

[0722] 인-함유 연결의 비-제한적인 예는 아미노알킬포스포트리에스테르 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 포스포로디티오에이트, 3'알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하는 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 포스피네이트, 3'-아미노 포스포라미데이트 및 아미노알킬포스포라미데이트를 포함하는 포스포라미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노포스포라미데이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 정상 3'-5' 연결을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결된 유사체, 및 뉴클레오시드 단위의 인접한 쌍이 3'-5' 내지 5'-3' 또는 2'-5' 내지 5'-2'에 연결되는 역 극성을 갖는 것들을 포함하고; 미국 특허 번호 5,625,050; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,550,111; 5,177,196; 5,587,361; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,519,126; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,536,821; 5,541,306; 5,563,253; 5,571,799; 및 3,687,808을 참고한다.

[0723] 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 헤테로원자 백본, 예를 들어, 또는 펩티드 핵산(PNA) 백본(여기서, 올리고뉴클레오티드의 포스포디에스테르 백본은 폴리아미드 백본으로 대체되고, 뉴클레오티드는 폴리아미드 백본의 아자 질소 원자에 직접 또는 간접적으로 결합됨, 문헌[Nielsen et al., Science 1991, 254, 1497] 참고), 모르폴리노 백본(Summerton 및 Weller의 미국 특허 번호 5,034,506 참고); 아미드 백본(문헌[De Mesmaeker et al. Ace. Chem. Res. 1995, 28:366-374] 참고); 또는 MMI 또는 메틸렌(메틸이미노) 백본을 가질 수 있다.

[0724] 질소성 염기는 종래의 염기(A, G, C, T, U), 이의 유사체(예를 들어, 변형된 우리딘, 예컨대 5-메톡시우리딘, 슈도우리딘, 또는 N1-메틸슈도우리딘, 또는 기타); 이노신; 퓨린 또는 피리미딘의 유도체(예를 들어, N4-메틸 데옥시구아노신, 데아자- 또는 아자-퓨린, 데아자- 또는 아자-피리미딘, 5 또는 6 위치에서 치환기를 갖는 피리미딘 염기(예를 들어, 5-메틸시토신), 2, 6, 또는 8 위치에서 치환기를 갖는 퓨린 염기, 2-아미노-6-메틸아미노 퓨린, 6-O-메틸구아닌, 4-티오-피리미딘, 4-아미노-피리미딘, 4-디메틸하이드라진-피리미딘, 및 4-O-알킬-피리미딘; 미국 특허 번호 5,378,825 및 PCT 공개 번호 WO 93/13121)일 수 있다. 일반적인 논의를 위해 문헌[Adams et al, The Biochemistry of the Nucleic Acids 5-36, 11th ed., 1992]을 참고한다. 핵산은 하나 이상의 "무염기성" 잔기를 포함할 수 있으며, 여기서 백본은 중합체의 위치(들)에 대한 질소성 염기를 포함하지 않는다(미국 특허 번호 5,585,481). 핵산은 종래의 RNA 또는 DNA 당, 염기 및 연결만을 포함할 수 있거나, 종래의 구성요소 및 치환(예를 들어, 2' 메톡시 치환기를 갖는 종래의 뉴클레오시드, 또는 종래의 뉴클레오티드 및 하나 이상의 뉴클레오티드 유사체 둘 다를 함유하는 중합체) 둘 다를 포함할 수 있다. 핵산은 RNA 모방 당(mimicking sugar) 입체구조 내에 잠금된 바이사이클릭 푸라노스 단위를 갖는 하나 이상의 LNA 뉴클레오티드 단량체를 함유하는 유사체인 "잠금 핵산"(LNA)을 포함하며, 이는 상보적 RNA 및 DNA 서열에 대한 하이브리드화 친화도를 향상시킨다(문헌[Vester and Wengel, 2004, Biochemistry 43(42): 13233-41]). RNA 및 DNA는 상이한 당 모이어티를 갖고, RNA에서 우라실 또는 이의 유사체 및 DNA에서 티민 또는 이의 유사체의 존재에 의해 상이할 수 있다.

[0725] *간섭 핵산*

[0726] 일부 실시양태에서, 접합된 분자 카고는 표적 세포에서 하나 이상의 유전자의 발현을 변형(예를 들어, 유전자 발현 및/또는 번역을 억제하거나, RNA 스플라이싱을 조절하거나 엑손 스키핑을 유도)시킬 수 있는 폴리뉴클레오티드 분자(들)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 분자는 예를 들어, RNA(예를 들어, mRNA)를 표적화하는 간섭 핵산 분자, 예를 들어, siRNA, shRNA, miRNA, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)일 수 있다.

[0727] 특정 실시양태에서, 표적화된 유전자의 생성물(예를 들어, mRNA 생성물)의 활성 또는 발현을 선택적으로 표적화 및 억제하는 간섭 핵산 분자는 본원에서 기재된 조성물 및 방법에서 사용된다. 간섭 핵산 분자는 적어도 하나의 표적화된 유전자의 생성물(예를 들어, mRNA 생성물)의 활성 또는 발현을 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 억제할 수 있다. 본원에 개시된 약제는 적어도 표적화된 유전자의 생성물(예를 들어, mRNA 생성물)에 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 상보성인 핵염기 서열을 포함할 수 있다. 이론에 구애되지 않고, 핵산의 "상보성"은 핵산의 하나의 가닥에서 뉴클레오티드 서열이, 이의 핵염기 그룹의 배향 때문에, 반대 핵산 가닥 상의 다른 서열과 수소 결합을 형성하는 것을 의미할 수 있다. DNA에서의 상보적 염기는 전형적으로 A와 T 및 C와 G이다. RNA에서, 이들은 전형적으로 C와 G 및 U와 A이다. 상보성은 완전하거나 실질적/충분할 수 있다. 2개의 핵산 사이의 완전한 상보성은 2개의 핵산이 이중체 내의 모든 염기가 왓슨-크릭(Watson-Crick) 페어링에 의해 상보적 염기에 결합하는 이중체를 형성할 수 있음을 의미한다. "실질적으로" 또는 "충분히" 상보적이라는 것은 하나의 가닥 내의 서열이 반대 가닥 내의 서열에 완전히 및/또는 완벽히 상보적이지 않지만, 두 가닥 상의 염기 사이에서 충분한 결합이 발생하여 하이브리드화 조건의 세트(예를 들어, 염 농도 및 온도)에서 안정한 하이브리드 복합체를 형성하는 것을 의미한다. 이러한 조건은 서열 및 표준 수학적 계산을 사용하여 하이브리드화된 가닥의 Tm(용융 온도)을 예측함으로써, 또는 일상적인 방법에 의한 Tm의 경험적 결정에 의해 예측될 수 있다. Tm은 2개의 핵산 가닥 사이에 형성된 하이브리드화 복합체의 집단이 50% 변성되는(즉, 이중-가닥 핵산 분자의 집단이 단일 가닥으로 반분 해리됨) 온도를 포함한다. Tm 미만의 온도에서, 하이브리드화 복합체의 형성이 선호되는 반면, Tm 초과의 온도에서는, 하이브리드화 복합체 내의 가닥의 용융 또는 분리가 선호된다. Tm은 예를 들어, Tm=81.5+0.41(% G+C)을 사용하여 수성 1 M NaCl 용액 중 공지된 G+C 함량을 갖는 핵산에 대해 추정될 수 있지만, 다른 공지된 Tm 계산은 핵산 구조적 특성을 고려한다.

[0728] 간섭 핵산은 사이클릭 서브유닛의 서열을 포함할 수 있되, 각각은 염기 페어링 모이어티를 왓슨-크릭 염기 페어링에 의해 핵산(전형적으로 RNA)에서 표적 서열에 하이브리드화하게 허용하여, 표적 서열 내에 핵산:올리고머 헤테로이중체를 형성하게 하는, 서브유닛 간 연결에 의해 연결된 염기 페어링 모이어티를 갖는다.

[0729] 전형적으로, 표적 mRNA 서열의 보체의 적어도 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개 또는 23개의 뉴클레오티드는 표적 전사체의 억제를 매개하기에 충분하다. 완벽한 상보성은 필요하지 않다. 일부 실시양태에서, 간섭 핵산 분자는 단일-가닥 RNA이다. 일부 실시양태에서, 간섭 핵산 분자는 이중-가닥 RNA이다. 이중-가닥 RNA 분자는 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥 중 어느 하나에 1-3개의 뉴클레오티드 3' 및/또는 5' 오버행을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 RNA 분자는 2개의 뉴클레오티드 3' 오버행을 갖는다. 일부 실시양태에서, 2개의 RNA 가닥은 헤어핀 구조를 통해 연결되어, shRNA 분자를 형성한다. shRNA 분자는 마이크로RNA 분자로부터 유래된 헤어핀을 함유할 수 있다.

[0730] 본원에 기재된 간섭 핵산 분자는 RNA 염기, 비-RNA 염기 또는 RNA 염기 및 비-RNA 염기의 혼합물을 함유할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 간섭 핵산 분자는 주로 RNA 염기 또는 변형된 RNA 염기로 구성될 수 있지만, 또한 DNA 염기, 변형된 DNA 염기, 및/또는 비-자연 발생 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 용어 "리보뉴클레오티드" 또는 "뉴클레오티드"는 또한, 변형된 RNA 또는 뉴클레오티드 대리체의 경우에서, 변형된 뉴클레오티드, 또는 하나 이상의 위치에서의 대리체 대체 모이어티를 지칭한다.

[0731] 일부 실시양태에서, 간섭 핵산 분자는 짧은 간섭 RNA 또는 침묵 RNA로도 알려진 작은 간섭 RNA(siRNA)이다. siRNA는 전형적으로 세포 내의 RNA 간섭(RNAi) 경로를 통한 분해를 위해 핵산(예를 들어, mRNA)을 표적화하는 전형적으로 약 20-25개의 염기 페어링 길이의 이중-가닥 RNA 분자의 클래스이다. 이러한 siRNA 분자는 전형적으로 표적 영역에 대해 충분히 상동성인 영역을 포함하고, 뉴클레오티드의 측면에서 충분한 길이를 가지므로, siRNA 분자는 표적 핵산을 하향-조절한다. siRNA 분자 및 표적 사이에 완벽한 상보성이 있을 필요는 없지만, 대응성은 예컨대 표적 RNA의 RNAi 절단에 의해 siRNA 분자가 서열-특이적 침묵을 지시할 수 있게 하기에 충분해야

한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 분자의 전체 이중-가닥 특성을 유지하기 위해 안티센스 가닥과 충분하게 상보적이면 된다.

[0732] siRNA 분자의 특이성은 이의 표적 RNA에 대한 분자의 안티센스 가닥의 결합을 통해 측정될 수 있다. 유효 siRNA 분자는, 예를 들어 인터페론 반응에 의한 세포 내 비-특이적 RNA 간섭 경로의 자극을 방지하기 위해, 종종 길이가 30 내지 35개의 염기 페어링 미만이지만, 더 긴 siRNA가 또한 효과적일 수 있다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자는 길이가 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 또는 30개인 염기 페어링이다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자는 길이가 약 35 내지 약 70개 초과인 염기 페어링이다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 길이가 70개 초과인 염기 페어링이다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 길이가 8 내지 40개인 염기 페어링, 길이가 10 내지 20개인 염기 페어링, 길이가 10 내지 30개인 염기 페어링, 길이가 15 내지 20개인 염기 페어링, 길이가 19 내지 23개인 염기 페어링, 길이가 21 내지 24개인 염기 페어링이다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자의 센스 및 안티센스 가닥은 각각 독립적으로, 길이가 약 19 내지 약 24개인 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자의 센스 가닥은 길이가 23개인 뉴클레오티드이고, 안티센스 가닥은 길이가 21개인 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자의 센스 가닥 및 안티센스 가닥 둘 다는 길이가 21개인 뉴클레오티드이다.

[0733] 적절한 표적 RNA 서열의 선택 후에, 표적 서열, 즉, 안티센스 서열의 일부 또는 전부에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 siRNA 분자는, 적합한 방법(예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2004/0077574 및 2008/0081791 및 PCT 공개 번호 WO 2004/016735 참고)을 사용하여 설계되고 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 단일-가닥(즉, 안티센스 가닥만을 포함하는 ssRNA 분자) 또는 이중 가닥(즉, dsRNA를 형성하기 위해 하이브리드화하는 안티센스 가닥 및 상보적 센스 가닥을 포함하는 dsRNA 분자)일 수 있다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자는 자가-상보적 센스 및/또는 안티센스 가닥을 포함하는, 이중체, 비대칭 이중체, 헤어핀 또는 비대칭 헤어핀 2차 구조를 포함할 수 있다.

[0734] 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 안티센스 가닥은 길이가 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 또는 30개인 뉴클레오티드이다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 안티센스 가닥은 길이가 약 35 내지 약 70개인 뉴클레오티드이다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 안티센스 가닥은 길이가 70개 초과인 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 길이가 8 내지 40개인 뉴클레오티드, 길이가 10 내지 20개인 뉴클레오티드, 길이가 10 내지 30개인 뉴클레오티드, 길이가 15 내지 20개인 뉴클레오티드, 길이가 19 내지 23개인 뉴클레오티드, 또는 길이가 21 내지 24개인 뉴클레오티드이다.

[0735] 일부 실시양태에서, siRNA 분자의 센스 가닥은 길이가 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 또는 30개인 뉴클레오티드이다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 센스 가닥은 길이가 약 30 내지 약 70개인 뉴클레오티드이다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 센스 가닥은 길이가 70개 초과인 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 길이가 8 내지 40개인 뉴클레오티드, 길이가 10 내지 20개인 뉴클레오티드, 길이가 10 내지 30개인 뉴클레오티드, 길이가 15 내지 20개인 뉴클레오티드, 길이가 19 내지 23개인 뉴클레오티드, 길이가 21 내지 24개인 뉴클레오티드이다.

[0736] 다양한 실시양태에서, siRNA 분자는 표적 mRNA에서 표적 영역에 상보성의 영역을 포함하는 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 상보성의 영역은 표적 mRNA에서 표적 영역에 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 상보적이다. 일부 실시양태에서, 표적 영역은 표적 mRNA에서 연속적인 뉴클레오티드의 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 특이적으로 하이브리드화가능하거나 표적 RNA 서열에 대해 특이적이도록 상보성의 영역이 이의 표적의 것과 100% 상보적일 필요가 없을 수 있다.

[0737] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 siRNA 분자는 표적 RNA 서열에 대한 상보성의 영역을 포함하는 안티센스 가닥을 포함할 수 있고, 상보성의 영역은 길이가 8 내지 20개, 8 내지 35개, 8 내지 45개, 또는 10 내지 50개, 또는 5 내지 55개, 또는 5 내지 40개의 범위의 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 상보성의 영역은 길이가 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 40개, 41개, 42개, 43개, 44개, 45개, 46개, 47개, 48개, 49개, 또는 50개인 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태

에서, 상보성의 영역은 표적 RNA 서열의 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 적어도 24개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 35개 이상의 연속적인 뉴클레오티드와 상보적이다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 표적 RNA 서열의 연속 뉴클레오티드 부분과 비교하여 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 이하의 염기 미스매치를 함유하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 표적 서열과 15개 염기에 걸쳐 최대 3개의 미스매치, 또는 10개의 염기에 걸쳐 최대 4개의 미스매치를 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 표적 서열과 15-22개 염기에 걸쳐 최대 0개, 1개, 2개, 또는 3개의 미스매치를 갖는 뉴클레오티드 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 표적 서열과 15-22개 염기에 걸쳐 0개, 1개 또는 2개의 미스매치를 갖는 뉴클레오티드 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 표적 서열과 15-22개 염기에 걸쳐 0 또는 1개의 미스매치를 갖는 뉴클레오티드 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 표적 서열과 15-22개 염기에 걸쳐 0개의 미스매치를 갖는 뉴클레오티드 서열을 갖는 안티센스 가닥을 포함한다.

[0738] 다양한 실시양태에서, siRNA 분자는 본원에 개시된 안티센스 올리고뉴클레오티드의 표적 RNA 서열에 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 본원에 제공된 안티센스 올리고뉴클레오티드 중 임의의 것과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100% 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 본원에 제공된 안티센스 올리고뉴클레오티드 중 임의의 것과 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개, 적어도 11개, 적어도 12개, 적어도 13개, 적어도 14개, 적어도 15개, 적어도 16개, 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 적어도 20개, 적어도 21개, 적어도 22개, 적어도 23개, 적어도 24개, 적어도 25개, 적어도 30개, 적어도 35개 또는 초과의 연속적인 뉴클레오티드를 포함하는 안티센스 가닥을 포함한다.

[0739] 일부 실시양태에서, 이중-가닥 siRNA는 상이한 길이 또는 동일한 길이인 센스 및 안티-센스 RNA 가닥을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중-가닥 siRNA 분자는 또한 스템-루프 구조 내의 단일 올리고뉴클레오티드로부터 생성될 수 있다. 스템-루프 구조를 갖는 siRNA 분자의 자가-상보적 센스 및 안티센스 영역은 핵산 기반 또는 비-핵산-기반 링커의 수단에 의해 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 스템-루프 구조를 갖는 siRNA는 2개 이상의 루프 구조를 갖는 원형 단일-가닥 RNA 및 자가-상보적 센스 및 안티센스 가닥을 포함하는 스템을 포함한다. 일부 실시양태에서, 원형 RNA는 RNAi를 매개할 수 있는 활성 siRNA 분자를 생성하기 위해 *생체내* 또는 *시험관내* 가공될 수 있다. 소형 헤어핀 RNA(shRNA) 분자는 따라서, 본원에서 또한 고려된다. 이러한 분자는 역 보체(센스) 서열과 함께 특정 안티센스 서열을 포함할 수 있고, 이는 일부 예에서 스페이서 또는 루프 서열에 의해 분리될 수 있다. 본원에 기재된 역 보체는 기준 서열의 보체 서열인 서열을 포함할 수 있고, 여기서 보체 서열을 역 배향으로 작성된다. 코돈 사용 중복성으로 인해, 역 보체는 동일한 폴리펩티드를 인코딩하는 기준 서열로부터 분기될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "역 보체"는 또한, 기준 서열의 역 보체 서열과 예를 들어, 적어도 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 서열을 포함한다. 스페이서 또는 루프의 절단은 단일-가닥 RNA 분자 및 이의 역 보체를 제공할 수 있어서, 이들은 어닐링되어 dsRNA 분자를 형성할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 추가적인 선택적 가공 단계는 하나 또는 양측의 가닥의 3' 단부 및/또는 5' 단부로부터 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 초과의 뉴클레오티드의 제거 또는 첨가를 야기할 수 있다. 스페이서는 안티센스 및 센스 서열이 어닐링되고 스페이서의 절단 전에 이중 가닥 구조 또는 스템을 형성할 수 있도록 허용하는 적절한 길이일 수 있다. 특정 실시양태에서, 이후의 선택적인 가공 단계는 하나 또는 양측의 가닥의 3' 단부 및/또는 5' 단부로부터 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 초과의 뉴클레오티드의 제거 또는 첨가를 야기할 수 있다. 일부 실시양태에서, 스페이서 서열은 예를 들어, 이중-가닥 핵산으로 어닐링될 때 shRNA를 포함할 수 있는 2개의 상보적 뉴클레오티드 서열 영역 사이에 위치될 수 있는 관련되지 않은 뉴클레오티드 서열일 수 있다.

[0740] siRNA 분자의 길이는 설계되는 siRNA 분자의 유형에 따라 약 10개로부터 약 120개의 뉴클레오티드까지 달라질 수 있다. 일반적으로, 이들 뉴클레오티드 중 약 10 내지 약 55개는 RNA 표적 서열과 상보적일 수 있다. 예를 들어, siRNA가 이중-가닥 siRNA 또는 단일-가닥 siRNA일 때, 길이는 약 10개로부터 약 55개의 뉴클레오티드까지 달라질 수 있는 반면, siRNA가 shRNA 또는 원형 분자일 때, 길이는 약 30개의 뉴클레오티드로부터 약 110개의 뉴클레오티드까지 달라질 수 있다.

[0741] 다양한 실시양태에서, siRNA 분자는 분자의 하나의 단부에 3' 오버행을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다

른 단부는 둔단부(blunt-ended)일 수 있거나 오버행(예를 들어, 5' 및/또는 3')을 포함할 수 있다. siRNA 분자가 분자의 양쪽 단부에 오버행을 포함할 때, 오버행의 길이는 상이하거나 동일할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 siRNA 분자는 분자의 양쪽 단부 위에 약 1 내지 약 3개의 뉴클레오티드의 3' 오버행을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 센스 가닥 및 안티센스 가닥 둘 다에 약 1 내지 약 3개의 뉴클레오티드의 3' 오버행을 포함한다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 안티센스 가닥 상에 약 1 내지 약 3개의 뉴클레오티드의 3' 오버행을 포함한다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 센스 가닥 상에 약 1 내지 약 3개의 뉴클레오티드의 3' 오버행을 포함할 수 있다.

[0742] 다양한 실시양태에서, siRNA 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개 또는 초과)를 포함한다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자의 센스 가닥 및/또는 안티센스 가닥의 모든 뉴클레오티드가 변형된다. 특정 실시양태에서, siRNA 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드 및/또는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 siRNA 분자 센스 가닥의 5' 단부에서의 제1 및 제2 뉴클레오시드간 연결에서 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 siRNA 분자 안티센스 가닥의 5' 및 3' 단부에서의 제1 및 제2 뉴클레오시드간 연결에서 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 siRNA 분자 센스 가닥의 5' 단부에서의 제1 및 제2 뉴클레오시드간 연결 및 siRNA 분자 안티센스 가닥의 5' 및 3' 단부에서의 제1 및 제2 뉴클레오시드간 연결에서 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다.

[0743] 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 변형된 당 모이어티(예를 들어, 2' 변형된 뉴클레오티드)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 하나 이상의 2' 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어, 2'-데옥시, 2'-플루오로(2'-F), 2'-O-메틸(2'-O-Me), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE), 또는 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA)를 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 각각의 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드(예를 들어, 2'-변형된 뉴클레오티드)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 하나 이상의 포스포로디아미데이트 모르폴리노를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자의 각각의 뉴클레오티드는 포스포로디아미데이트 모르폴리노로 이루어진다.

[0744] 다양한 실시양태에서, siRNA 분자는 포스포로티오에이트 또는 다른 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자는, 예를 들어, 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 2개 이상의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 모든 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 siRNA 분자의 5' 또는 3' 단부에서의 제1, 제2, 및/또는 제3 뉴클레오시드간 연결에서 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 siRNA 분자의 5' 및/또는 3' 단부의 제1 및 제2 뉴클레오시드간 연결에서 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 siRNA 분자 센스 가닥의 5' 단부에서의 제1 및 제2 뉴클레오시드간 연결에서 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는 siRNA 분자 안티센스 가닥의 5' 및 3' 단부에서의 제1 및 제2 뉴클레오시드간 연결에서 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는, siRNA 분자 센스 가닥의 5' 단부에서의 제1 및 제2 뉴클레오시드간 연결에서, 및 siRNA 분자 안티센스 가닥의 5' 및 3' 단부에서의 제1 및 제2 뉴클레오시드간 연결에서 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자는, siRNA 분자 센스 가닥의 5' 및 3' 단부에서의 제1 뉴클레오시드간 연결에서, siRNA 분자 안티센스 가닥의 5' 단부에서의 제1, 제2, 및 제3 뉴클레오시드간 연결에서, 및 siRNA 분자 안티센스 가닥의 3' 단부에서의 제1 뉴클레오시드간 연결에서, 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다.

[0745] 다양한 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드간 연결은 인-함유 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 또는 조성물에서 사용될 수 있는 인-함유 연결은, 비제한적으로, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 아미노알킬포스포트리에스테르, 포스포트리에스테르, 3'알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하는 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 3'-아미노 포스포라미데이트 및 아미노알킬포스포라미데이트를 포함하는 포스포라미데이트, 포스피네이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노포스포라미데이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 정상 3'-5' 연결을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결된 유사체, 및 역 극성을 갖는 것들을 포함하며, 여기서 뉴클레오시드 단위의 인접한 쌍은 3'-5'에서 5'-3'로 또는 2'-5'에서 5'-2'로 연결되고; 미국 특허 번호 5,625,050; 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,177,196;

5,455,233; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,519,126; 5,453,496; 5,466,677; 5,476,925; 5,536,821; 5,023,243; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 및 5,188,897을 참조한다.

[0746] 본원에 개시된 siRNA 분자의 임의의 다양한 변형된 포맷 또는 화학물질은 함께 조합될 수 있다. 예를 들어, 비제한적으로, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 이상의 상이한 유형의 변형이 동일한 siRNA 분자 내에 포함될 수 있다.

[0747] 다양한 실시양태에서, 안티센스 가닥은 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개 또는 초과)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드 및/또는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드간 연결(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 변형된 당 모이어티(예를 들어, 2' 변형된 뉴클레오티드)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 하나 이상의 2' 변형된 뉴클레오티드, 예를 들어, 2'-데옥시, 2'-플루오로(2'-F), 2'-O-메틸(2'-O-Me), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE), 또는 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA)를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 안티센스 가닥의 각각의 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드(예를 들어, 2'-변형된 뉴클레오티드)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 하나 이상의 포스포로디아미데이트 모르폴리노를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)로 이루어진다.

[0748] 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 포스포로티오에이트 또는 다른 변형된 뉴클레오티드간 연결을 함유한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 2개 이상의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 모든 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 안티센스 가닥의 5' 또는 3' 단부에서의 제1, 제2, 및/또는 제3 뉴클레오티드에서 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 안티센스 가닥의 5' 및 3' 단부에서의 제1 및 제2 뉴클레오티드 위치(예를 들어 제1 및 제2 사이 및 제2 및 제3 뉴클레오티드 사이)에서 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다.

[0749] 다양한 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드간 연결은 안티센스 가닥의 인-함유 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에서 기재된 방법 및 조성물에 사용될 수 있는 인-함유 연결은, 비제한적으로, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 아미노알킬포스포트리에스테르, 포스포트리에스테르, 3'알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하는 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 3'-아미노 포스포라미데이트 및 아미노알킬포스포라미데이트를 포함하는 포스포라미데이트, 포스피네이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노포스포라미데이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 정상 3'-5' 연결을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결된 유사체, 및 역 극성을 갖는 것들을 포함하고, 여기서 뉴클레오시드 단위의 인접한 쌍은 3'-5'에서 5'-3'로 또는 2'-5'에서 5'-2'로 연결되고; 미국 특허 번호 5,625,050; 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,177,196; 5,455,233; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,519,126; 5,453,496; 5,466,677; 5,476,925; 5,536,821; 5,023,243; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 및 5,188,897을 참조한다.

[0750] 본원에 개시된 안티센스 가닥의 임의의 변형된 포맷 또는 화학물질은 함께 조합될 수 있다. 예를 들어, 비제한적으로, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 이상의 상이한 유형의 변형이 동일한 안티센스 가닥 내에 포함될 수 있다.

[0751] 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개 또는 초과)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드 및/또는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드간 연결(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 변형된 당 모이어티(예를 들어, 2' 변형된 뉴클레오티드)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 하나 이상의 2' 변형된 뉴클레오시드, 예를 들어, 2'-데옥시, 2'-플루오로(2'-F), 2'-O-메틸(2'-O-Me), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE), 또는 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA)를 포함한다. 다양한 실시양태에서, 안티센스 가닥의 각각의 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드(예를 들어, 2'-변형된 뉴클레오티드)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티

센스 가닥은 하나 이상의 포스포로디아미데이트 모르폴리노를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)로 이루어진다.

[0752] 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 포스포로티오에이트 또는 다른 변형된 뉴클레오티드간 연결을 함유한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 2개 이상의 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결(들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 모든 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 센스 가닥의 5' 또는 3' 단부에서의 제1, 제2, 및/또는 제3 뉴클레오티드 위치에서 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 센스 가닥의 5' 단부에서의 제1 및 제2 뉴클레오티드 위치(예를 들어, 제1 및 제2 사이 및 제2 및 제3 뉴클레오티드 사이)에서 변형된 뉴클레오티드간 연결을 포함할 수 있다.

[0753] 다양한 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드간 연결은 센스 가닥의 인-함유 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있는 인-함유 연결은, 비제한적으로, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 아미노알킬포스포트리에스테르, 포스포트리에스테르, 3'알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하는 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 3'-아미노 포스포라미데이트 및 아미노알킬포스포라미데이트를 포함하는 포스포라미데이트, 포스피네이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노포스포라미데이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 정상 3'-5' 연결을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결된 유사체, 및 역 극성을 갖는 것들을 포함하고, 여기서 뉴클레오시드 단위의 인접한 쌍은 3'-5'에서 5'-3'로 또는 2'-5'에서 5'-2'로 연결되고; 미국 특허 번호 5,625,050; 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,177,196; 5,455,233; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,519,126; 5,453,496; 5,466,677; 5,476,925; 5,536,821; 5,023,243; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 및 5,188,897을 참고한다.

[0754] 본원에 기재된 센스 가닥의 임의의 변형된 화학물질 또는 포맷은 함께 조합될 수 있다. 예를 들어, 비제한적으로, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 또는 10개 이상의 상이한 유형의 변형이 동일한 센스 가닥 내에 포함될 수 있다.

[0755] 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 안티센스 및/또는 센스 가닥은, 예를 들어, RNA-유도된 침묵 복합체(RISC) 로딩을 향상 또는 감소시킬 수 있는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자의 안티센스 가닥은 RISC 로딩을 향상시킬 수 있는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 센스 가닥은 RISC 로딩을 감소시키고/시키거나 비-표적 효과(off-target effect)를 감소시킬 수 있는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 안티센스 가닥은 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE) 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어 절단성 부위에서 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE) 기의 첨가는, 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 원용되는 문헌[Song et al., (2017) Mol Ther Nucleic Acids 9:242-250]에 개시된 바와 같이, 변형된 가닥의 배향된 RNA-유도된 침묵 복합체(RISC) 로딩을 용이하게 함으로써 siRNA의 침묵 활성 및/또는 특이성을 개선할 수 있다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 안티센스 가닥은 2'-O-Me-포스포로디티오에이트 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 2'-O-Me-포스포로디티오에이트 변형은, 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 원용되는 문헌[Wu et al., (2014) Nat Commun 5:3459]에 개시된 바와 같이 RISC 로딩을 증가시킬 수 있다.

[0756] 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 센스 가닥은 5'-니트로인돌 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 5'-니트로인돌 변형은, 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 원용되는 문헌[Zang et al., (2012) Chembiochem 13(13): 1940-1945]에 개시된 바와 같이, 센스 가닥의 RNAi 효능을 감소시키고/시키거나 비-표적 효과를 감소시킬 수 있다. 다양한 실시양태에서, 센스 가닥은 2'-O-메틸(2'-O-Me) 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 2'-O-Me 변형은, 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 원용되는 문헌[Zheng et al., FASEB (2013) 27(10): 4017-4026]에 개시된 바와 같이, 센스 가닥의 RISC 로딩 및/또는 비-표적 효과를 감소시킬 수 있다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 센스 가닥은 모르폴리노, 2'-MOE 및/또는 2'-O-Me 잔기로 완전히 치환될 수 있고, 예를 들어, 그 전체가 본원에 참고로 원용되는 문헌[Kole et al., (2012) Nature reviews. Drug Discovery 11(2): 125- 140]에 개시된 바와 같이 RISC에 의해 인식되지 않을 수 있다.

[0757] 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 센스 가닥은 5'-모르폴리노 변형을 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 5'-모르폴리노 변형은 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 원용되는 문헌[Kumar et al., (2019) Chem Commun (Camb) 55(35):5139-5142]에 개시된 바와 같이 센스 가닥의 RISC 로딩을 감소시키고/시키거나 RNAi 활성 및/또

는 안티센스 가닥 선택을 개선할 수 있다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 센스 가닥은, 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 원용되는, 문헌[Elman et al., (2005) Nucleic Acids Res. 33(1): 439-447]에 개시된 바와 같이, 예를 들어, 센스 가닥의 RISC 로딩을 감소시키고 RISC 내로의 안티센스 가닥 혼입을 촉진할 수 있는, 잠금 핵산(LNA)이라고 하는 합성 RNA-유사 고 친화도 뉴클레오티드 유사체로 변형될 수 있다. 다양한 실시양태에서, siRNA 분자의 센스 가닥은 5' 비잠금 핵산(UNA) 변형을 포함할 수 있다. 다양한 실시양태에서, 5' 비잠금 핵산(UNA) 변형은, 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 원용되는 문헌[Snead et al., (2013) Mol Ther Nucleic Acids 2(7):e103]에 개시된 바와 같이, 센스 가닥의 RISC 로딩을 감소시키고/시키거나 안티센스 가닥의 침묵 능력을 개선시킬 수 있다.

[0758] 일부 실시양태에서, siRNA 분자의 안티센스 가닥은 2'-MOE 변형을 포함할 수 있고/있거나 센스 가닥은 2'-O-Me 변형을 포함할 수 있다(예를 들어, 문헌[Song et al., (2017) Mol Ther Nucleic Acids 9:242-250] 참고). 일부 실시양태에서, 적어도 1개(예를 들어, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 5개, 적어도 8개, 적어도 9개, 적어도 10개 또는 초과의) siRNA 분자는, 예를 들어, 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질에 공유결합으로 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 siRNA 분자의 센스 가닥의 5' 단부에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 siRNA 분자의 센스 가닥의 3' 단부에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 siRNA 분자의 센스 가닥에 내부적으로 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 siRNA 분자의 안티센스 가닥의 5' 단부에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 siRNA 분자의 안티센스 가닥의 3' 단부에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 siRNA 분자의 안티센스 가닥에 내부적으로 접합될 수 있다.

[0759] 또한, siRNA 분자는 변형되거나 뉴클레오시드 대리체를 포함할 수 있다. siRNA 분자의 단일 가닥 영역은 변형되거나 뉴클레오시드 대리체를 포함할 수 있고, 예를 들어, 헤어핀 구조의 비페어링된 영역 또는 영역들, 예를 들어 2개의 상보적 영역을 연결하는 영역은, 변형 또는 뉴클레오시드 대리체를 가질 수 있다. 예를 들어, 엑소뉴클레아제에 대해 siRNA 분자의 하나 이상의 3'- 또는 5'-말단을 안정화하거나 RISC 내로 진입하기 위해 안티센스 siRNA 약제를 유리하도록 변형시키는 것이 또한 유용하다. 변형은, C3(또는 C6, C7, C12) 아미노 링커, 티올 링커, 카복실 링커, 비-뉴클레오티드 스페이서(예를 들어, C3-C12(예를 들어, C3, C6, C9, C12), 무염기성, 트리에틸렌 글리콜, 헥사에틸렌 글리콜), 포스포라미다이트로서 존재하고 또 다른 DMT-보호된 하이드록실 기를 갖는 비오틴 또는 플루오레세인 시약을 포함할 수 있고, 이는 RNA 합성 동안 다중 커플링을 가능하게 한다.

[0760] 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 길이가 23개인 뉴클레오티드이고, 안티센스 가닥은 길이가 21개인 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 길이가 23개인 뉴클레오티드이고, 안티센스 가닥은 길이가 21개인 뉴클레오티드이며, 여기서 센스 가닥의 3' 및 5' 말단 뉴클레오티드 위치는 역 무염기성 잔기이다. 센스 가닥 3' 및 5' 말단 역 무염기성 잔기는 오버행일 수 있다. 역 무염기성 잔기는 3'-3' 포스포디에스테르 연결을 통해 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자의 안티센스 가닥은 3' 및/또는 5' 단부에서 1-2개의 포스포로티오에이트 연결을 함유한다. 일부 실시양태에서, 안티센스 가닥은 5'-말단에서 2 또는 3개의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결 및 3'-말단에서 1개의 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결을 함유한다. siRNA 분자는 센스 가닥의 5' 또는 3' 단부에서의 표적화 모이어티에 연결될 수 있다.

[0761] 일부 실시양태에서, 센스 가닥은 길이가 21개인 뉴클레오티드이고, 안티센스 가닥은 길이가 23개인 뉴클레오티드이며, 여기서 안티센스 가닥은 2개의 핵염기 3' 오버행을 함유한다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자의 안티센스 가닥은 3' 및 5' 단부에서 1-3개의 포스포로티오에이트 연결을 함유하고, siRNA 분자의 센스 가닥은 5' 단부에서 1-2개의 포스포로티오에이트 연결을 함유한다. 일부 실시양태에서, siRNA 분자의 안티센스 가닥은 5' 단부에서 2-3개의 포스포로티오에이트 연결 및 3'에서 2개의 포스포로티오에이트 연결을 함유하고, siRNA 분자의 센스 가닥은 5' 단부에서 2개의 포스포로티오에이트 연결을 함유한다. siRNA 분자는 센스 가닥의 5' 또는 3' 단부에서 표적화 모이어티에 연결될 수 있다.

[0762] 일부 실시양태에서, 간섭 핵산 분자는 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)이다. 본원에 기재된 "작은 헤어핀 RNA" 또는 "짧은 헤어핀 RNA" 또는 "shRNA"는 RNA 간섭을 통해 유전자 발현을 침묵시키는 데 사용될 수 있는 타이트한 헤어핀 회전을 만드는 짧은 RNA 서열을 포함할 수 있다. 본원에 제공된 shRNA는 화학적으로 합성되거나 DNA 플라스미드 내의 전사 카세트로부터 전사될 수 있다. shRNA 헤어핀 구조는 세포 기계에 의해 siRNA로 절단될 수 있고, 이는 이어서 RNA-유도된 침묵 복합체(RISC)에 결합된다.

[0763] shRNA의 비-제한적인 예는 센스 및 안티센스 영역이 핵산-기반 또는 비-핵산-기반 링커에 의해 연결된, 단일-가

닥 분자로부터 조립된 이중-가닥 폴리뉴클레오티드 분자; 자가-상보적 센스 및 안티센스 영역을 갖는 헤어핀 2차 구조를 갖는 이중-가닥 폴리뉴클레오티드 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, shRNA의 센스 및 안티센스 가닥은 약 1 내지 약 25개의 뉴클레오티드, 약 2 내지 약 20개의 뉴클레오티드, 약 4 내지 약 15개의 뉴클레오티드, 약 5 내지 약 12개의 뉴클레오티드, 또는 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개 또는 초과의 뉴클레오티드를 포함하는 루프 구조에 의해 연결된다.

[0764] shRNA와 관련된 추가적인 실시양태 뿐만 아니라, 이러한 shRNA를 설계 및 합성하는 방법이 미국 특허 공개 번호 2011/0071208에 기재되어 있고, 이의 개시내용은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0765] 일부 실시양태에서, 간섭 핵산 분자는 마이크로RNA(miRNA)이다. miRNA는 유기체에서 자연적으로 생성된 작은 RNA의 거대 그룹을 나타내며, 이들 중 일부는 표적 유전자의 발현을 조절한다. miRNA는 길이가 약 18 내지 약 25개의 뉴클레오티드인 짧은 헤어핀 RNA로서, RNA 침묵 및 유전자 발현의 번역후 조절에 기능한다. 전형적으로, miRNA는 핵에서 대략 70개의 뉴클레오티드 pre-miRNA로 가공되는 거대 RNA 전구체(pri-miRNA로 지칭됨)로부터 생성되며, 이는 불완전한 스템-루프 구조로 접힌다. 이들 pre-miRNA는 세포질 내에서 전형적으로, 길이가 18-25개인 뉴클레오티드의 성숙 miRNA가 RNase III 효소인, 다이서(Dicer)에 의해 pre-miRNA 헤어핀의 한 측면으로부터 절단되는 추가적인 가공 단계를 거친다. miRNA는 단백질로 번역되지 않지만, 대신 특이적 메신저 RNA에 결합하여, 이로써 번역을 차단한다. 일부 실시양태에서, miRNA는 이들의 표적과 부정확하게 염기-페어링하여 번역을 억제한다.

[0766] 본원에 기재된 miRNA는 pri-miRNA, pre-miRNA, 성숙 miRNA 또는 성숙 miRNA의 생물학적 활성을 보유하는 이의 변이체의 단편을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, miRNA의 크기 범위는 21개의 뉴클레오티드 내지 170개의 뉴클레오티드일 수 있다. 하나의 실시양태에서, miRNA의 크기 범위는 길이가 70 내지 170개인 뉴클레오티드이다. 또 다른 실시양태에서, 길이가 21 내지 25개인 뉴클레오티드의 성숙 miRNA가 사용될 수 있다.

[0767] 특정 실시양태에서, 간섭 핵산 분자는 안티센스 올리고뉴클레오티드(ASO)이다. ASO는 표적 RNA의 RNase H 엔도뉴클레아제 절단을 유도함으로써, 리보좀 활성의 입체 장애에 의해, 5' 캡 형성을 억제함으로써, 또는 스플라이싱을 변경함으로써 표적을 하향 조절할 수 있다. ASO는, 비제한적으로, 갭머 또는 모르폴리노일 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 전형적으로 pre-mRNA 분자, 이종 핵 RNA(hnRNA) 또는 mRNA 분자에서 표적 뉴클레오티드 서열에 실질적으로 상보적인 짧은 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 안티센스 서열의 상보성(또는 실질적 상보성)의 정도는 안티센스 서열을 포함하는 분자가 생리학적 조건 하에서 RNA 분자에서 표적 뉴클레오티드 서열과 안정한 이중 가닥 하이브리드를 형성할 수 있도록 하는 것이 바람직하다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 종종 합성이고 화학적으로 변형된다.

[0768] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 표적 서열에 100% 상보적일 수 있거나, 미스매치를 포함하여, 예를 들어, 올리고뉴클레오티드 및 표적 서열 사이에 형성된 헤테로이중체가 *생체내에서* 발생할 수 있는 세포 뉴클레아제 및 다른 분해 모드의 작용을 견디기에 충분히 안정적인 한, 질환-연관 돌연변이를 함유하는 대립유전자의 선택적 표적화를 개선할 수 있다. 따라서, 특정 올리고뉴클레오티드는 올리고뉴클레오티드 및 표적 서열 사이에, 약 또는 적어도 약 70% 서열 상보성, 예를 들어, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 상보성을 가질 수 있다. 뉴클레아제에 의한 절단에 덜 민감한 올리고뉴클레오티드 백본이 본원에 논의된다. 미스매치는, 존재하는 경우, 전형적으로 중간에서보다 하이브리드 이중체의 단부 영역을 향해 덜 불안정하다. 허용된 미스매치의 수는, 이중체 안정성의 잘 이해되는 원리에 따라 올리고뉴클레오티드의 길이, 이중체 내의 G:C 염기 페어링의 비율, 및 이중체에서 미스매치(들)의 위치에 의존할 것이다.

[0769] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 간섭 핵산 분자는 갭머이다. "갭머"는 하나 이상의 뉴클레오시드를 갖는 외부 영역 사이에 위치된 RNase H 절단을 지지하는, 복수의 뉴클레오시드를 갖는 내부 영역을 포함하는 올리고뉴클레오티드이며, 여기서 내부 영역을 포함하는 뉴클레오시드는 외부 영역을 포함하는 뉴클레오시드 또는 뉴클레오시드들로부터 화학적으로 구별된다. 내부 영역은 "갭"으로서 지칭될 수 있고, 외부 영역은 "윙"으로서 지칭될 수 있다. 갭머는 각각 2-6개의 뉴클레오티드를 갖는 5' 및 3' 윙, 및 7-12개의 뉴클레오티드를 갖는 갭을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭머는 3-10-3 구성 또는 5-10-5 구성을 가질 수 있다.

[0770] 갭머는 공통적으로 식 5'-X-Y-Z-3'를 가지며, X 및 Z는 갭 영역 Y 주위의 측면 영역이다. 일부 실시양태에서, 식 5'-X-Y-Z-3'의 측면 영역 X는 또한 X 영역, 측면 서열 X, 5' 윙 영역 X, 또는 5' 윙 세그먼트로 불린다. 일

부 실시양태에서, 식 5'-X-Y-Z-3'의 측면 영역 Z는 또한 Z 영역, 측면 서열 Z, 3' 윙 영역 Z, 또는 3' 윙 세그먼트로 불린다. 일부 실시양태에서, 식 5'-X-Y-Z-3'의 갭 영역 Y는 또한 Y 영역, Y 세그먼트, 갭-세그먼트 Y, 갭 세그먼트, 또는 갭 영역으로 불린다. 일부 실시양태에서, 갭 영역 Y 내의 각각의 뉴클레오시드는 2'-데옥시리보뉴클레오시드이고, 5' 윙 영역 X 또는 3' 윙 영역 Z 둘 다는 어떠한 2'-데옥시리보뉴클레오시드도 포함하지 않는다.

[0771] 일부 실시양태에서, 갭머 폴리뉴클레오티드의 갭 영역은 DNA 뉴클레오티드, 예컨대 C4'-치환된 뉴클레오티드, 어사이클릭 뉴클레오티드, 및 아라비노-구성된 뉴클레오티드 외에도 효율적인 RNase H 작용에 대해 허용가능한 것으로 공지된 변형된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭 영역은 하나 이상의 비변형된 뉴클레오시드간을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 또는 둘 다의 측면 영역은 각각 독립적으로, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 적어도 5 개 이상의 뉴클레오티드 사이에 하나 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결(예를 들어, 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 또는 다른 연결)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 갭 세그먼트에서 각각의 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 갭 영역 및 2개의 측면 영역은, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 또는 적어도 5개 이상의 뉴클레오티드 사이에 각각 독립적으로 변형된 뉴클레오시드간 연결(예를 들어, 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 또는 다른 연결)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 5' 또는 3' 윙 영역에서 각각의 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 갭머에서 각각의 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 연결을 포함한다.

[0772] 일부 실시양태에서, Y 영역은 뉴클레오티드의 인접 구간, 예를 들어, 비제한적으로 RNase H를 포함하는 RNase를 모집할 수 있는, 5개 이상의 DNA 뉴클레오티드의 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭머는 RNase가 표적 핵산을 절단하기 위해 모집되도록 표적 핵산에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, Y 영역은 고-친화도 변형된 뉴클레오시드, 예를 들어, 1-10개의 고-친화도 변형된 뉴클레오시드를 포함하는 영역 X 및 Z에 의해 5' 및 3' 둘 다의 측면에 있을 수 있다. 예시적인 고 친화도 변형된 뉴클레오시드는, 비제한적으로, 2'-4' 바이사이클릭 뉴클레오시드(예를 들어, LNA, cEt, ENA) 및 2'-변형된 뉴클레오시드(예를 들어, 2'-MOE, 2'O-Me, 2'-F)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 측면 서열 X 및 Z는 길이가 1-30개인 뉴클레오티드, 1-20개인 뉴클레오티드, 1-10개인 뉴클레오티드, 또는 1-5개인 뉴클레오티드일 수 있다. 측면 서열 X 및 Z는 유사한 길이 또는 비유사한 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 측면 서열 X 및 Z는 각각 길이가 5개인 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 측면 서열 X 및 Z는 각각 길이가 3개인 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 갭-세그먼트 Y는 길이가 5-30개인 뉴클레오티드, 5-20개인 뉴클레오티드, 또는 5-10개인 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭 세그먼트는 길이가 10개인 뉴클레오티드이다.

[0773] 갭머는 적절한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 갭머의 제조는, 예를 들어, 미국 특허 번호 10,260,069; 10,017,764; 9,695,418; 9,428,534; 9,428,534; 9,045,754; 8,580,756; 8,580,756; 7,750,131; 7,683,036; 7,569,686; 7,432,250; 7,399,845; 7,101,993; 7,015,315; 5,898,031; 5,700,922; 5,652,356; 5,652,355; 5,623,065; 5,565,350; 5,491,133; 5,403,711; 5,366,878; 5,256,775; 5,220,007; 5,149,797; 및 5,013,830; 미국 특허 공개 번호 US2010/0197762, US2005/0074801, US2009/0221685, US2009/0286969, 및 US2011/0112170; PCT 공개 번호 WO2005/023825, WO2004/069991, WO2008/049085 및 WO2009/090182에 기재되어 있고, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0774] 일부 실시양태에서, 갭머는 길이가 10-50개인 뉴클레오시드이다. 예를 들어, 갭머는 길이가 10-50개, 10-45개, 10-40개, 10-35개, 10-30개, 10-25개, 10-20개, 10-15개, 15-40개, 15-35개, 15-30개, 15-25개, 15-20개, 20-40개, 20-35개, 20-30개, 20-25개, 25-40개, 25-35개, 25-30개, 30-40개, 30-35개, 또는 35-40개인 뉴클레오시드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭머는 길이가 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개, 31개, 32개, 33개, 34개, 35개, 36개, 37개, 38개, 39개, 또는 40개인 뉴클레오시드이다. 일부 실시양태에서, 갭머는 길이가 약 16 내지 약 20개인 뉴클레오시드이다. 일부 실시양태에서, 갭머는 길이가 16개인 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 갭머는 길이가 20개인 뉴클레오티드이다.

[0775] 일부 실시양태에서, 갭머의 5' 윙 영역 및 3' 윙 영역은 독립적으로 1-20개의 뉴클레오시드(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 또는 20개의 뉴클레오시드) 길이이다. 예를 들어, 갭머의 5' 윙 영역 및 3' 윙 영역은 독립적으로 1-20개, 1-15개, 1-10개, 1-7개, 1-5개, 1-3개, 1-2개, 2-5개, 2-7개, 3-5개, 3-7개, 5-20개, 5-15개, 5-10개, 10-20개, 10-15개, 또는 15-20개의 길이인 뉴클레오시드이다. 일부 실시양태에서, 갭머의 5' 윙 영역 및 3' 윙 영역은 동일

한 길이이다. 일부 실시양태에서, 갭머의 5' 윙 영역 및 3' 윙 영역은 상이한 길이이다. 일부 실시양태에서, 5' 윙 영역은 갭머의 3' 윙 영역보다 더 길다. 일부 실시양태에서, 5' 윙 영역은 갭머의 3' 윙 영역보다 더 짧다.

[0776] 일부 실시양태에서, 갭머의 갭 영역은 길이가 5-20개인 뉴클레오시드이다. 예를 들어, 갭 영역 Y는 길이가 5-20개, 5-15개, 5-10개, 10-20개, 10-15개, 또는 15-20개인 뉴클레오시드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭 영역은 길이가 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 또는 20개인 뉴클레오시드이다. 일부 실시양태에서, 갭 영역 Y에서 하나 이상의 뉴클레오시드는 2'-데옥시리보뉴클레오시드이다. 일부 실시양태에서, 갭 영역에서 모든 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오시드이다. 일부 실시양태에서, 갭 영역에서 하나 이상의 뉴클레오시드는 변형된 뉴클레오시드(예를 들어, 2' 변형된 뉴클레오시드, 예컨대 본원에 기재된 것들)이다. 일부 실시양태에서, 갭 영역 Y에서 하나 이상의 시토신은 5-메틸-시토신이다. 일부 실시양태에서, 갭 영역 Y에서 모든 시토신은 5-메틸-시토신이다. 일부 실시양태에서, 갭머에서 모든 시토신은 5-메틸-시토신이다.

[0777] 일부 실시양태에서, 갭머의 5' 윙 영역 또는 3' 윙 영역에서 하나 이상의 뉴클레오시드는 변형된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 2'-변형된 뉴클레오시드, 예를 들어, 2'-4' 바이사이클릭 뉴클레오시드 또는 비-바이사이클릭 2'-변형된 뉴클레오시드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 뉴클레오시드는 2'-4' 바이사이클릭 뉴클레오시드(예를 들어, LNA, cEt, 또는 ENA) 또는 비-바이사이클릭 2'-변형된 뉴클레오시드(예를 들어, 2'-플루오로(2'-F), 2'-O-메틸(2'-O-Me), 2'-O-디메틸아미노에틸(2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필(2'-O-DMAP), 2'-O-메톡시에틸(2'-MOE), 2'-O-아미노프로필(2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸(2'-O-DMAEOE), 또는 2'-O-N-메틸아세트아미도(2'-O-NMA))일 수 있다. 일부 실시양태에서, 윙 영역에서 모든 뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 윙 영역에서 모든 뉴클레오티드는 2'-MOE, LNA 또는 cET 뉴클레오티드이다.

[0778] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 갭머는 각각의 X, Y, 및 Z 영역에서 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 X, Y, 및 Z 영역은 독립적으로 포스포디에스테르 연결 및 포스포로티오에이트 연결의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 갭 영역 Y에서 각각의 뉴클레오시드간 연결은 포스포로티오에이트 연결일 수 있고, 5' 윙 영역 X는 포스포로티오에이트 연결 및 포스포디에스테르 연결의 조합을 포함하고, 3' 윙 영역 Z는 포스포로티오에이트 연결 및 포스포디에스테르 연결의 조합을 포함한다.

[0779] 일부 실시양태에서, 갭머의 갭 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이고, 윙 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 2'-MOE 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 갭머의 갭 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이고, 윙 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 2'-MOE 뉴클레오티드이고, 갭머에서 모든 시토신은 5-메틸-시토신이다. 일부 실시양태에서, 갭머의 갭 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이고, 윙 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 2'-MOE 뉴클레오티드이고, 갭머에서의 모든 시토신은 5-메틸-시토신이고 모든 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이다.

[0780] 일부 실시양태에서, 갭머의 갭 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이고, 윙 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 LNA 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 갭머의 갭 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이고, 윙 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 LNA 뉴클레오티드이고, 갭머에서 모든 시토신은 5-메틸-시토신이다. 일부 실시양태에서, 갭머의 갭 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이고, 윙 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 LNA 뉴클레오티드이고, 갭머에서 모든 시토신은 5-메틸-시토신이고, 모든 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이다. 일부 실시양태에서, 갭머의 갭 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이고, 윙 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 cET 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 갭머의 갭 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이고, 윙 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 cET 뉴클레오티드이고, 갭머에서 모든 시토신은 5-메틸-시토신이다. 일부 실시양태에서, 갭머의 갭 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드이고, 윙 영역에서 각각의 뉴클레오티드는 cET 뉴클레오티드이고, 갭머에서 모든 시토신은 5-메틸-시토신이고, 모든 뉴클레오티드간 연결은 포스포로티오에이트 연결이다.

[0781] 간섭 핵산은 다양한 올리고뉴클레오티드 화학물질을 이용할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 화학물질의 예는, 비제한적으로, 펩티드 핵산(PNA), 잠금 핵산(LNA), 포스포로티오에이트, 2'-O-Me-변형된 올리고뉴클레오티드, 및 모르폴리노 화학물질, 예컨대 이들 중 임의의 것의 조합을 포함한다. 일반적으로, PNA 및 LNA 화학물질은 2'-O-Me 올리고뉴클레오티드에 비해 이의 비교적 높은 표적 결합 강도 때문에 더 짧은 표적화 서열을 활용할 수

있다. 포스포로티오에이트 및 2'-O-Me-변형된 화학물질은 종종 조합하여 포스포로티오에이트 백본을 갖는 2'-O-Me-변형된 올리고뉴클레오티드를 생성한다. 예를 들어, 그 전체가 본원에 참조로 원용된 PCT 공개 번호 WO/2013/112053 및 WO/2009/008725를 참고한다.

[0782] 펩티드 핵산(PNA)은 피리미딘 또는 퓨린 염기가 부착된 N-(2-아미노에틸) 글라이신 단위로 이루어진, 백본이 데옥시리보오스 백본과 구조적으로 동형인 DNA의 유사체이다. 천연 피리미딘과 퓨린 염기를 함유하는 PNA는 왓슨-크릭 염기 페어링 규칙에 따라 상보적 올리고뉴클레오티드에 하이브리드화하고, 염기 페어링 인식에 있어서 DNA를 모방한다(문헌[Egolm, Buchardt et al. 1993]). PNA의 백본은 포스포디에스테르 결합보다 펩티드 결합에 의해 형성되어, 이들이 안티센스 적용에 잘 적합하게 한다. 백본은 하전되지 않고, 정상 열 안정성보다 더 큰 PNA/DNA 또는 PNA/RNA 이중체를 야기한다. PNA는 뉴클레아제 또는 프로테아제로 인식되지 않는다.

[0783] 자연 구조로의 라디칼 구조 변화에도 불구하고, PNA는 나선 형태로 DNA 또는 RNA에 서열-특이적 결합이 가능할 수 있다. PNA의 특성은 상보적 DNA 또는 RNA에 대한 높은 결합 친화도, 단일-염기 미스매치에 의해 유발된 불안정화 효과, 뉴클레아제 및 프로테아제에 대한 내성, 염 농도에 독립적인 DNA 또는 RNA와의 하이브리드화 및 호모퓨린 DNA와의 삼중체 형성을 포함한다. PANAGENE™은 자사의 독점 Bts PNA 단량체(Bts; 벤조티아졸-2-설포닐기) 및 독점 올리고머화 공정을 개발하였다. Bts PNA 단량체를 사용하는 PNA 올리고머화는 탈보호, 커플링 및 캡핑의 반복적인 사이클로 구성된다. PNA는 당업계에 공지된 임의의 기법을 사용하여 합성적으로 생성될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,539,082; 5,714,331; 및 5,719,262, 6,969,766, 7,211,668, 7,022,851, 7,125,994, 7,145,006 및 7,179,896을 참고한다. 또한, PNA의 제조를 위한 미국 특허 번호 5,539,082; 5,714,331; 및 5,719,262를 참고한다. PNA 화합물의 추가적인 교시는 문헌[Nielsen et al., Science, 254:1497-1500, 1991]에서 확인될 수 있다. 각각의 전술한 것은 그 전체가 참조로 원용된다.

[0784] 본원에서 기재된 간섭 핵산은 또한 "잠금 핵산(locked nucleic)" 서브유닛(LNA)을 함유할 수 있다. "LNA"는 가교된 핵산(BNA)이라고 하는 변형의 클래스의 멤버이다. BNA는 C30-엔도(북부) 당 퍼커(pucker)에서 리보오스 고리의 입체구조를 잠그는 공유 연결에 의해 특징화된다. LNA의 경우, 가교는 2'-O와 4'-C 위치 사이의 메틸렌으로 구성된다. LNA는 백본 사전구성 및 염기 적층을 강화하여 하이브리드화 및 열 안정성을 증가시킨다.

[0785] LNA의 구조는, 예를 들어, 문헌[Wengel, et al., Chemical Communications (1998) 455]; [Tetrahedron (1998) 54:3607], 및 [Accounts of Chem. Research (1999) 32:301)]; [Obika, et al., Tetrahedron Letters (1997) 38:8735; (1998) 39:5401], 및 [Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16:9230]에서 발견될 수 있다. 본원에 제공된 화합물은 하나 이상의 LNA를 혼입할 수 있고; 일부 경우에, 화합물은 전체적으로 LNA로 구성될 수 있다. 개별 LNA 뉴클레오시드 서브유닛의 합성 및 올리고뉴클레오티드로의 이들의 혼입을 위한 방법은, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,572,582, 7,569,575, 7,084,125, 7,060,809, 7,053,207, 7,034,133, 6,794,499, 및 6,670,461에 기재되어 있고, 각각은 그 전체가 참조로 원용된다. 전형적인 서브유닛간 링커는 포스포디에스테르 및 포스포로티오에이트 모이어티를 포함한다. 대안적으로, 비-인 함유 링커가 이용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 각각의 LNA 서브유닛이 DNA 서브유닛에 의해 분리되는 LNA 함유 화합물을 포함한다. 특정 화합물은 서브유닛 간 링커가 포스포로티오에이트인 교번하는 LNA 및 DNA 서브유닛으로 구성된다.

[0786] "포스포로티오에이트"(또는 S-올리고)는 비가교 산소 중 하나가 황에 의해 대체되는 정상 DNA의 변이체이다. 뉴클레오티드간 결합의 황화는 5' 내지 3' 및 3' 내지 5' DNA POL 1 엑소뉴클레아제, 뉴클레아제 SI 및 PI, RNases, 혈청 뉴클레아제 및 뱀독 포스포디에스테라제를 포함하는 엔도- 및 엑소뉴클라아제의 작용을 감소시킨다. 포스포로티오에이트는 2개의 주요한 경로: 수소 포스포네이트 상의 이황화탄소 중 황 원소의 용액의 작용에 의해, 또는 포스파이트 트리에스테르를 테트라에틸티우람 디설파이드(TETD) 또는 3H-1, 2-벤소디티올-3-온 1, 1-디옥사이드(BDTD)로 황화시키는 방법에 의해 제조된다(예를 들어, 문헌[Iyer et al., J. Org. Chem. 55, 4693-4699, 1990]를 참조함). 후자의 방법은 대부분의 유기 용매에서 황 원소의 불용성 및 이황화탄소의 독성의 문제를 회피한다. TETD 및 BDTD 방법은 또한 더 높은 순도의 포스포로티오에이트를 생산한다.

[0787] "2' O-Me 올리고뉴클레오티드" 분자는 리보오스 분자의 2'-OH 잔기에서 메틸 기를 운반한다. 2'-O-Me-RNA는 DNA와 동일한(또는 유사한) 거동을 나타내지만, 뉴클레아제 분해로부터 보호된다. 2'-O-Me-RNA는 또한 추가의 안정화를 위해 포스포티오에이트 올리고뉴클레오티드(PTO)와 조합될 수 있다. 2'-O-Me 올리고뉴클레오티드(포스포디에스테르 또는 포스포티오에이트)는 당업계의 통상적인 기법에 따라 합성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Yoo et al., Nucleic Acids Res. 32:2008-16, 2004] 참고).

[0788] 간섭 핵산 분자는, 예를 들어, 화학적 합성, *시험관내* 전사, 또는 RNase III 또는 다이서에 의한 긴 dsRNA의 분해에 의해 제조될 수 있다. 이들은 형질주입, 전기천공법, 또는 당업계에 공지된 다른 방법에 의해 세포 내로

도입될 수 있다. 문헌[Hannon, GJ, 2002, Nature 418: 244-251]; [Bernstein E et al., 2002, RNA 7: 1509-1521]; [Hutvagner G et al., Curr. Opin. Genetics& Development 12: 225-232]; [Brummelkamp, 2002, Science 296: 550-553]; [Lee NS, et al. 2002. Nature Biotechnol. 20:500-505]; [Miyagishi M, and Taira K. 2002. Nature Biotechnol. 20:497-500]; [Paddison PJ, et al., 2002. Genes& Dev. 16:948-958]; [Paul CP, et al., 2002. Nature Biotechnol. 20:505-508]; [Sui G et al., 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(6):5515-5520]; [Yu J-Y et al., 2002. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(9):6047-6052]을 참고한다. 전술한 것은 각각 그 전체가 참조로 원용된다.

[0789] *가이드 RNA*

[0790] 일부 실시양태에서, 접합된 분자 카고는 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA를 포함한다. "가이드 RNA" 또는 "gRNA"는 Cas 단백질(예를 들어, Cas9 단백질)에 결합하고 표적 DNA 내의 특정한 위치로 Cas 단백질을 표적화하는 RNA 분자이다. 가이드 RNA는 2개의 세그먼트: "DNA-표적화 세그먼트"(또한 "가이드 서열"이라고도 함) 및 "단백질-결합 세그먼트"를 포함할 수 있다. "세그먼트"는 분자의 섹션 또는 영역, 예컨대 RNA에서 뉴클레오티드의 인접 구간을 포함한다. Cas9에 대한 것들과 같은 일부 gRNA는, 2개의 별도의 RNA 분자: "활성화인자-RNA"(예를 들어, tracrRNA) 및 "표적체-RNA"(예를 들어, CRISPR RNA 또는 crRNA)를 포함할 수 있다. 다른 gRNA는 단일 RNA 분자(단일 RNA 폴리뉴클레오티드)이고, 이는 "단일-분자 gRNA", 또는 "단일-가이드 RNA", 또는 "sgRNA"로 불릴 수 있다. 예를 들어, WO 2013/176772, WO 2014/065596, WO 2014/089290, WO 2014/093622, WO 2014/099750, WO 2013/142578, 및 WO 2014/131833을 참조하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 가이드 RNA는 CRISPR RNA(crRNA) 또는 crRNA 및 트랜스-활성화 CRISPR RNA(tracrRNA)의 조합을 지칭할 수 있다. crRNA 및 tracrRNA는 단일 RNA 분자(단일 가이드 RNA 또는 sgRNA)로서 또는 2개의 별도의 RNA 분자(이중 가이드 RNA 또는 dgRNA)로서 연관될 수 있다. Cas9의 경우, 예를 들어, 단일-가이드 RNA는 tracrRNA에 융합된 crRNA를 포함할 수 있다(예를 들어, 링커를 통함). Cpf1 및 CasΦ의 경우, 예를 들어, 표적 서열에 결합하는 것을 달성하기 위해 crRNA만이 필요하다. 용어 "가이드 RNA" 및 "gRNA"는 이중-분자(즉, 모듈) gRNA 및 단일-분자 gRNA 둘 다를 포함한다. 본원에 개시된 방법 및 조성물의 일부에서, gRNA는 *S. 파이오제네스* Cas9 gRNA 또는 이의 등가물이다. 본원에 개시된 방법 및 조성물 중 일부에서, gRNA는 *S. 아우레우스* Cas9 gRNA 또는 이의 등가물이다.

[0791] 예시적인 2-분자 gRNA는 crRNA-유사("CRISPR RNA" 또는 "표적체-RNA" 또는 "crRNA" 또는 "crRNA 반복") 분자 및 상응하는 tracrRNA-유사("트랜스-활성화 CRISPR RNA" 또는 "활성화인자-RNA" 또는 "tracrRNA") 분자를 포함한다. crRNA는 gRNA의 DNA-표적화 세그먼트(단일-가닥) 및 gRNA의 단백질-결합 세그먼트의 dsRNA 이중체의 절반을 형성하는 뉴클레오티드의 구간 둘 다를 포함한다. DNA-표적화 세그먼트의 하류(3')에 위치한 crRNA 꼬리의 예(예를 들어, *S. 파이오제네스* Cas9와 함께 사용하는 경우)는

[0792] GUUUUAGAGCUAUGCU (서열번호 321) 또는
GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (서열번호 322)

[0793] 를 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진다. 본원에 개시된 임의의 DNA-표적화 세그먼트는 서열번호 321 또는 322의 5' 단부에 연결되어 crRNA를 형성할 수 있다.

[0794] 상응하는 tracrRNA(활성화인자-RNA)는 gRNA의 단백질-결합 세그먼트의 dsRNA 이중체의 다른 절반을 형성하는 뉴클레오티드의 구간을 포함한다. crRNA의 뉴클레오티드의 구간은 tracrRNA의 뉴클레오티드의 구간과 상보적이고 이와 하이브리드화하여 gRNA의 단백질-결합 도메인의 dsRNA 이중체를 형성한다. 이와 같이, 각각의 crRNA는 상응하는 tracrRNA를 가진다고 할 수 있다. tracrRNA 서열의 예(예를 들어, *S. 파이오제네스* Cas9와 사용하는 경우)는,

[0795] AGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG
AGUCGGUGCUUU (서열번호 323),
AAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGC
ACCGAGUCGGUGCUUUU (서열번호 324), 또는
GUUGGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA
CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (서열번호 325)

[0796] 를 포함하거나, 이들로 기본적으로 이루어지거나, 이들 중 어느 하나로 이루어진다.

[0797] crRNA 및 tracrRNA 둘 다가 필요한 시스템에서, crRNA 및 상응하는 tracrRNA는 하이브리드화하여 gRNA를 형성한다. crRNA 만이 필요한 시스템에서, crRNA는 gRNA일 수 있다. crRNA는 표적 DNA의 상보적 가닥에 하이브리드화하는 단일 가닥 DNA-표적화 세그먼트를 추가적으로 제공한다. 세포 내에 변형에 사용되는 경우, 주어진 crRNA 또는 tracrRNA 분자의 정확한 서열은 RNA 분자가 사용될 종에 특이적이도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Mali et al. (2013) *Science* 339(6121):823-826]; [Jinek et al. (2012) *Science* 337(6096):816-821]; [Hwang et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(3):227-229]; [Jiang et al. (2013) *Nat. Biotechnol.* 31(3):233-239]; 및 [Cong et al. (2013) *Science* 339(6121):819-823]을 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0798] 주어진 gRNA의 DNA-표적화 세그먼트(crRNA)는 하기 더 상세히 기재된 바와 같이, 표적 DNA의 상보적 가닥 상의 서열에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. gRNA의 DNA-표적화 세그먼트는 하이브리드화(즉, 염기 페어링)를 통해 서열-특이적 방식으로 표적 DNA와 상호작용한다. 이와 같이, DNA-표적화 세그먼트의 뉴클레오티드 서열은 다양할 수 있고, gRNA 및 표적 DNA가 상호작용할 표적 DNA 내에서의 위치를 결정한다. 대상체 gRNA의 DNA-표적화 세그먼트는 표적 DNA 내에서 임의의 소망하는 서열에 하이브리드화되도록 변형될 수 있다. 자연 발생 crRNA는 CRISPR/Cas 시스템 및 유기체에 따라 다르지만, 종종 21 내지 46개 사이의 길이인 뉴클레오티드의 2개의 직접 반복(DR)이 측면에 있는, 길이가 21 내지 72개 사이인 뉴클레오티드의 표적화 세그먼트를 함유한다 (예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 WO 2014/131833을 참고). *S. 파이오제네스*의 경우, DR은 36개 뉴클레오티드 길이이고, 표적화 세그먼트는 30개 뉴클레오티드 길이이다. 3' 위치된 DR은 상응하는 tracrRNA에 상보적이고 이와 하이브리드화하며, 이는 결국 Cas 단백질에 결합한다.

[0799] DNA-표적화 세그먼트는, 예를 들어, 적어도 약 12개, 적어도 약 15개, 적어도 약 17개, 적어도 약 18개, 적어도 약 19개, 적어도 약 20개, 적어도 약 25개, 적어도 약 30개, 적어도 약 35개, 또는 적어도 약 40개의 뉴클레오티드의 길이를 가질 수 있다. 이러한 DNA-표적화 세그먼트는, 예를 들어, 약 12 내지 약 100개, 약 12 내지 약 80개, 약 12 내지 약 50개, 약 12 내지 약 40개, 약 12 내지 약 30개, 약 12 내지 약 25개, 또는 약 12 내지 약 20개의 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, DNA 표적화 세그먼트는 약 15 내지 약 25개의 뉴클레오티드(예를 들어, 약 17 내지 약 20개의 뉴클레오티드, 또는 약 17개, 18개, 19개, 또는 20개의 뉴클레오티드)일 수 있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 US 2016/0024523을 참고한다. *S. 파이오제네스*로부터의 Cas9의 경우, 전형적인 DNA-표적화 세그먼트는 길이가 16 내지 20개 사이인 뉴클레오티드 또는 길이가 17 내지 20개 사이인 뉴클레오티드이다. *S. 아우레우스*로부터의 Cas9의 경우, 전형적인 DNA-표적화 세그먼트는 길이가 21 내지 23개 사이인 뉴클레오티드이다. Cpf1의 경우, 전형적인 DNA-표적화 세그먼트는 길이가 적어도 16개인 뉴클레오티드 또는 길이가 적어도 18개인 뉴클레오티드이다.

[0800] 하나의 예에서, DNA-표적화 세그먼트는 길이가 약 20개인 뉴클레오티드일 수 있다. 하지만, 더 짧고 더 긴 서열이 또한 표적화 세그먼트를 위해 사용될 수 있다(예를 들어, 길이가 15-25개인 뉴클레오티드, 예컨대 길이가 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 또는 25개인 뉴클레오티드). DNA-표적화 세그먼트 및 상응하는 가이드 RNA 표적 서열 사이의 동일성의 정도(또는 DNA-표적화 세그먼트 및 가이드 RNA 표적 서열의 다른 가닥 사이의 상보성의 정도)는, 예를 들어, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 또는 100%일 수 있다. DNA-표적화 세그먼트 및 상응하는 가이드 RNA 표적 서열은 하나 이상의 미스매치를 함유할 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA의 DNA-표적화 세그먼트 및 상응하는 가이드 RNA 표적 서열은 1-4개, 1-3개, 1-2개, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 미스매치를 함유할 수 있다(예를 들어, 가이드 RNA 표적 서열의 총 길이는 적어도 17개, 적어도 18개, 적어도 19개, 또는 적어도 20개 이상의 뉴클레오티드). 예를 들어, 가이드 RNA의 DNA-표적화 세그먼트 및 상응하는 가이드 RNA 표적 서열은 1-4개, 1-3개, 1-2개, 1개, 2개, 3개, 또는 4개의 미스매치를 함유할 수 있고, 여기서 가이드 RNA 표적 서열의 총 길이는 20개의 뉴클레오티드이다.

[0801] TracrRNA는 임의의 형태(예를 들어, 전장 tracrRNA 또는 활성 부분 tracrRNA)일 수 있고, 길이가 다양할 수 있다. 이들은 주요 전사체나 가공된 형태를 포함할 수 있다. 예를 들어, tracrRNA(단일-가이드 RNA의 부분으로서 또는 2-분자 gRNA의 부분으로서 별도의 분자로서)는, 야생형 tracrRNA 서열(예를 들어, 야생형 tracrRNA 서열의 약 20개, 26개, 32개, 45개, 48개, 54개, 63개, 67개, 85개 또는 초과의 뉴클레오티드)의 전부 또는 일부를 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 또는 이들로 이루어질 수 있다. *S. 파이오제네스*로부터의 야생형 tracrRNA 서열의 예는 171-뉴클레오티드, 89-뉴클레오티드, 75-뉴클레오티드, 및 65-뉴클레오티드 버전을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Deltcheva et al. (2011) *Nature* 471(7340):602-607]; WO 2014/093661을 참조하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 단일-가이드 RNA(sgRNA) 내의 tracrRNA의 예는 sgRNA의 +48, +54, +67 및 +85 버전 내에서 발견된 tracrRNA 세그먼트를 포함하며, 여기서 "+n"은 야생형

tracrRNA의 최대 +n 뉴클레오티드가 sgRNA에 포함되는 것을 표시한다. 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 US 8,697,359를 참고한다.

[0802] 가이드 RNA의 DNA-표적화 세그먼트 및 표적 DNA의 상보적 가닥 사이의 상보성 퍼센트는 적어도 60%(예를 들어, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%)일 수 있다. DNA-표적화 세그먼트 및 표적 DNA의 상보적 가닥 사이의 상보성 퍼센트는 약 20개의 인접 뉴클레오티드에 걸쳐 적어도 60%일 수 있다. 예로서, DNA-표적화 세그먼트 및 표적 DNA의 상보적 가닥 사이의 상보성 퍼센트는 표적 DNA의 상보적 가닥의 5' 단부에서 14개의 인접 뉴클레오티드에 걸쳐 100%일 수 있고, 나머지에 걸쳐 0% 만큼 낮을 수 있다. 그러한 경우에, DNA-표적화 세그먼트는 길이가 14개인 뉴클레오티드인 것으로 간주될 수 있다. 또 다른 예로서, DNA-표적화 세그먼트 및 표적 DNA의 상보적 가닥 사이의 상보성 퍼센트는 표적 DNA의 상보적 가닥의 5' 단부에서 7개의 인접 뉴클레오티드에 걸쳐 100%일 수 있고, 나머지에 걸쳐 0% 만큼 낮을 수 있다. 그러한 경우에, DNA-표적화 세그먼트는 길이가 7개인 뉴클레오티드인 것으로 간주될 수 있다. 일부 가이드 RNA에서, DNA-표적화 세그먼트 내의 적어도 17개의 뉴클레오티드는 표적 DNA의 상보적 가닥에 상보적이다. 예를 들어, DNA-표적화 세그먼트는 길이가 20개인 뉴클레오티드일 수 있고, 표적 DNA의 상보적 가닥과의 1개, 2개, 또는 3개의 미스매치를 포함할 수 있다. 하나의 예에서, 미스매치는 프로토스페이서 인접 모티프(PAM) 서열에 상응하는 상보적 가닥(즉, PAM 서열의 역 보체)의 영역에 인접하지 않는다(예를 들어, 미스매치는 가이드 RNA의 DNA-표적화 세그먼트의 5' 단부에 있거나, 미스매치는 PAM 서열의 상응하는 상보적 가닥의 영역으로부터 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 또는 19개의 염기 쌍으로 떨어져 있다).

[0803] gRNA의 단백질-결합 세그먼트는 서로 상보적인 뉴클레오티드의 2개의 구간을 포함할 수 있다. 단백질-결합 세그먼트의 상보적 뉴클레오티드는 하이브리드화하여 이중-가닥 RNA 이중체(dsRNA)를 형성한다. 대상 gRNA의 단백질-결합 세그먼트는 Cas 단백질과 상호작용하고, gRNA는 DNA-표적화 세그먼트를 통해 표적 DNA 내의 특정한 뉴클레오티드 서열로 결합된 Cas 단백질을 지향시킨다.

[0804] 단일-가이드 RNA는 DNA-표적화 세그먼트 및 스캐폴드 서열(즉, 가이드 RNA의 단백질-결합 또는 Cas-결합 서열)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 가이드 RNA는 3' 스캐폴드 서열에 연결된 5' DNA-표적화 세그먼트를 가질 수 있다. 예시적인 스캐폴드 서열(예를 들어, *S. 파이오제네스* Cas9와 함께 사용하는 경우)은,

GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA
AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU (버전 1; 서열번호 427);
GUUGGAACCAUUCAAAACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAA
CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (버전 2; 서열번호 325);
GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA
AAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (버전 3; 서열번호 429); 및
GUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUU
AUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC (버전 4; 서열번호 430);
GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA
AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU (버전 5; 서열번호 431);
GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAA
AAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (버전 6; 서열번호 432);
GUUUAAGAGCUAUGCUGGAAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUU
AUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU (버전 7; 서열번호
433); 또는
GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGG
CACCGAGUCGGUGC (버전 8; 서열번호 434)

[0805]

[0806] 를 포함하거나, 이들로 본질적으로 이루어지거나, 이들로 이루어진다. 일부 가이드 sgRNA에서, 버전 6의 4개의 말단 U 잔기는 존재하지 않는다. 일부 sgRNA에서, 버전 6의 4개의 말단 U 잔기 중 1개, 2개, 또는 3개만 존재한다. 본원에 개시된 가이드 RNA 표적 서열 중 임의의 것을 표적화하는 가이드 RNA는, 예를 들어, 가이드 RNA의 3' 단부 상의 예시적인 가이드 RNA 스캐폴드 서열 중 임의의 것에 융합된 가이드 RNA의 5' 단부 상의 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 즉, 본원에 개시된 DNA-표적화 세그먼트 중 임의의 것은 상기 스캐폴드 서열 중

어느 하나의 5' 단부에 연결되어 단일 가이드 RNA(키메라 가이드 RNA)를 형성할 수 있다.

[0807] 가이드 RNA는 추가적인 바람직한 특징(예를 들어, 변형된 또는 조절된 안정성; 세포하(subcellular) 표적화; 형광 표지를 이용한 추적; 단백질 또는 단백질 복합체에 대한 결합 부위 등)을 제공하는 변형 또는 서열을 포함할 수 있다. 즉, 가이드 RNA는, 표준 A, G, C, 및 U 잔기 대신에 또는 이에 추가하여 사용되는, 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 또는 하나 이상의 비-자연 및/또는 자연 발생 구성요소 또는 구성을 포함할 수 있다. 이러한 변형의 예는, 예를 들어, 5' 캡(예를 들어, 7-메틸구아닐레이트 캡(m7G)); 3' 폴리아데닐화된 꼬리(즉, 3' 폴리(A) 꼬리); 리보스위치 서열(예를 들어, 단백질 및/또는 단백질 복합체에 의해 조절된 안정성 및/또는 조절된 접근성을 허용하기 위함); 안정성 제어 서열; dsRNA 이중체(즉, 헤어핀)를 형성하는 서열; 세포하 위치(예를 들어, 핵, 미토콘드리아, 클로로플라스트 등)에 RNA를 표적화하는 변형 또는 서열; 추적을 제공하는 변형 또는 서열(예를 들어, 형광 분자에 대한 직접 접합, 형광 검출을 용이하게 하는 모이어티에 대한 접합, 형광 검출을 허용하는 서열 등); 단백질(예를 들어, 전사 활성화인자, 전사 억제제, DNA 메틸트랜스퍼라아제, DNA 디메틸라아제, 히스톤 아세틸트랜스퍼라아제, 히스톤 데아세틸라아제 등을 포함하는, DNA에 작용하는 단백질)을 위한 결합 부위를 제공하는 변형 또는 서열; 및 이들의 조합을 포함한다. 변형의 다른 예는 조작된 스템 루프 이중체 구조, 조작된 벌지(bulge) 영역, 스템 루프 이중체 구조의 조작된 헤어핀 3', 또는 이의 임의의 조합을 포함한다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 US 2015/0376586을 참고한다. 벌지는 crRNA-유사 영역 및 최소 tracrRNA-유사 영역으로 이루어진 이중체 내의 뉴클레오티드의 비페어링된 영역일 수 있다. 벌지는, 이중체의 한 측면에서, 비페어링된 5'-XXXY-3', 및 이중체의 다른 측면 위의 비페어링된 뉴클레오티드 영역을 포함할 수 있으며, 여기서 X는 임의의 퓨린이고 Y는 반대 가닥 상의 뉴클레오티드와 워블 쌍을 형성할 수 있는 뉴클레오티드일 수 있다.

[0808] 일부 경우에서, MS2-p65-HSF1과 페어링된 dCas9-VP64 융합 단백질을 포함하는 전사 활성화 시스템에 사용하기 위한 가이드 RNA가 사용될 수 있다. 이러한 시스템에서 가이드 RNA는 sgRNA 테트라루프 및 이량체화된 MS2 박테리오파지 코트 단백질에 결합하도록 설계된 스템-루프 2에 첨부된 압타머 서열로 설계될 수 있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌[Konermann et al. (2015) *Nature* 517(7536):583-588]를 참고한다.

[0809] 가이드 RNA는, 예를 들어, (1) 포스포디에스테르 백본 연결에서 비연결 포스페이트 산소 중, 및/또는 연결 포스페이트 산소 중 하나 이상의 하나 또는 둘 다의 변경 또는 대체(예시적인 백본 변형); (2) 리보오스 당의 구성 성분의 변경 또는 대체, 예컨대 리보오스 당에서의 2' 하이드록실의 변경 또는 대체(예시적인 당 변형); (3) 포스페이트 모이어티의 데포스포 링커로의 대체(예를 들어, 대량 대체)(예시적인 백본 변형); (4) 비-표준 핵염기를 포함하는 자연 발생 핵염기의 변형 또는 대체(예시적인 염기 변형); (5) 리보오스-포스페이트 백본의 대체 또는 변형(예시적인 백본 변형); (6) 올리고뉴클레오티드의 3' 단부 또는 5' 단부의 변형(예를 들어, 말단 포스페이트 기의 제거, 변형, 또는 대체, 또는 모이어티, 캡, 또는 링커의 접합(이러한 3' 또는 5' 캡 변형은 당 및/또는 백본 변형을 포함할 수 있음)); 및 (7) 당의 변형 또는 대체(예시적인 당 변형) 중 하나 이상을 포함하는, 변형된 뉴클레오시드 및 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 다른 가능한 가이드 RNA 변형은 우라실 또는 폴리-우라실 구역(tract)의 변형 또는 대체를 포함한다. 예를 들어, WO 2015/048577 및 US 2016/0237455를 참조하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 유사한 변형은 Cas-인코딩 핵산, 예컨대 Cas mRNA에 대해 이루어질 수 있다. 예를 들어, Cas mRNA는 동의어 코돈을 사용하여 우리딘의 고갈에 의해 변형될 수 있다.

[0810] 상기 열거된 것들과 같은 화학적인 변형은 2개, 3개, 4개 또는 초과의 변형을 가질 수 있는 잔기(뉴클레오시드 및 뉴클레오티드)를 포함하는 변형된 gRNA 및/또는 mRNA를 제공하도록 조합될 수 있다. 예를 들어, 변형된 잔기는 변형된 당 및 변형된 핵염기를 가질 수 있다. 하나의 예에서, gRNA의 모든 염기는 변형된다(예를 들어, 모든 염기는 변형된 포스페이트 기, 예컨대 포스포로티오에이트 기를 가짐). 예를 들어, gRNA의 포스페이트 기 중 전부 또는 실질적으로 전부는 포스포로티오에이트 기로 대체될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 변형된 gRNA는 5' 단부에서 또는 그 근처에서 적어도 하나의 변형된 잔기를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 변형된 gRNA는 3' 단부에서 또는 그 근처에서 적어도 하나의 변형된 잔기를 포함할 수 있다.

[0811] 일부의 gRNA는 1개, 2개, 3개 또는 초과의 변형된 잔기를 포함한다. 예를 들어, 변형된 gRNA 내의 위치의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%는 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드일 수 있다.

[0812] 비변형된 핵산은 분해되기 쉬울 수 있다. 외인성 핵산은 또한 선천적 면역 반응을 유도할 수 있다. 변형은 안정성을 도입하고 면역원성을 감소시키는 것을 도울 수 있다. 본원에 기재된 일부의 gRNA는 세포내 또는 혈청-기반 뉴클레아제에 대한 안정성을 도입하기 위해 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 본원에 기재된 일부의 변형된 gRNA는 세포의 집단에 도입될 때 감소된 선천적 면역 반응을 나타낼 수 있다.

[0813] 본원에 개시된 gRNA는 변형된 잔기의 포스페이트 기가 하나 이상의 산소를 상이한 치환기로 대체함으로써 변형될 수 있는 백본 변형을 포함할 수 있다. 변형은 비변형된 포스페이트 모이어티를 본원에 기재된 변형된 포스페이트 기로 대량 대체하는 것을 포함할 수 있다. 포스페이트 백본의 백본 변형은 또한, 비하전된 링커 또는 비대칭적 전하 분포를 갖는 하전된 링커를 야기하는 변경을 포함할 수 있다.

[0814] 변형된 포스페이트 기의 예는, 포스포로티오에이트, 포스포로셀레네이트, 보라노 포스페이트, 보라노 포스페이트 에스테르, 수소 포스포네이트, 포스포로아미데이트, 알킬 또는 아릴 포스포네이트 및 포스포트리에스테르를 포함한다. 비변형된 포스페이트 기에서 인 원자는 비키랄(achiral)이다. 하지만, 비-가교 산소 중 하나를 상기 원자 또는 원자의 기 중 하나로 대체하는 것은 인 원자 키랄을 제공할 수 있다. 입체발생 인 원자는 "R" 배위(Rp) 또는 "S" 배위(Sp)를 가질 수 있다. 백본은 또한 가교 산소(즉, 뉴클레오시드에 포스페이트를 연결하는 산소)를, 질소(가교된 포스포로아미데이트), 황(가교된 포스포로티오에이트) 및 탄소(가교된 메틸렌포스포네이트)로 대체함으로써 변형될 수 있다. 대체는 연결 산소 중 어느 하나에서 또는 연결 산소의 둘 다에서 발생할 수 있다.

[0815] 포스페이트 기는 특정 백본 변형에서 비-인 함유 커넥터로 대체될 수 있다. 일부 실시양태에서, 하전된 포스페이트 기는 중성 모이어티에 의해 대체될 수 있다. 포스페이트 기를 대체할 수 있는 모이어티의 예는, 비제한적으로, 예를 들어, 메틸 포스포네이트, 하이드록실아미노, 실록산, 카보네이트, 카복시메틸, 카바메이트, 아미드, 티오에테르, 에틸렌 옥사이드 링커, 설포네이트, 설폰아미드, 티오포름아세탈, 포름아세탈, 옥심, 메틸렌이미노, 메틸렌메틸이미노, 메틸렌하이드라조, 메틸렌디메틸하이드라조 및 메틸렌옥시메틸이미노를 포함할 수 있다.

[0816] 포스페이트 링커 및 리보오스 당이 뉴클레아제 내성 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 대리체로 대체되는, 핵산을 모방할 수 있는 스캐폴드가 또한 구성될 수 있다. 이러한 변형은 백본 및 당 변형을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵염기는 대리체 백본에 의해 테더링될 수 있다. 예는, 비제한적으로, 모르폴리노, 사이클로부틸, 피롤리딘 및 펩티드 핵산(PNA) 뉴클레오시드 대리체를 포함할 수 있다.

[0817] 변형된 뉴클레오시드 및 변형된 뉴클레오티드는 당 기에 대한 하나 이상의 변형(당 변형)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 2' 하이드록실 기(OH)는 변형될 수 있다(예를 들어, 다수의 상이한 옥시 또는 데옥시 치환기로 대체됨). 2' 하이드록실 기에 대한 변형은 2'-알콕사이드 이온을 형성하기 위해 하이드록실이 더 이상 탈양성자화될 수 없기 때문에 핵산의 안정성을 향상시킬 수 있다.

[0818] 2' 하이드록실 기 변형의 예는 알콕시 또는 아릴옥시(OR, 여기서 "R"은, 예를 들어, 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴 또는 당일 수 있음); 폴리에틸렌글리콜(PEG), $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$(여기서 R은, 예를 들어 H 또는 선택적으로 치환된 알킬일 수 있고, n은 0 내지 20(예를 들어, 0 내지 4, 0 내지 8, 0 내지 10, 0 내지 16, 1 내지 4, 1 내지 8, 1 내지 10개, 1개 내지 16, 1 내지 20, 2 내지 4, 2 내지 8, 2 내지 10, 2 내지 16, 2 내지 20, 4 내지 8, 4 내지 10, 4 내지 16, 및 4 내지 20)의 정수일 수 있음)을 포함할 수 있다. 2' 하이드록실 기 변형은 2'-O-Me일 수 있다. 마찬가지로, 2' 하이드록실 기 변형은, 2' 하이드록실 기를 플루오라이드로 대체하는 2'-플루오로 변형일 수 있다. 2' 하이드록실 기 변형은 잠금 핵산(LNA)을 포함할 수 있고, 여기서 2' 하이드록실은 예를 들어 C_{1-6} 알킬렌 또는 C_{1-6} 헤테로알킬렌 가교에 의해, 동일한 리보오스 당의 4' 탄소에 연결될 수 있고, 여기서 예시적인 가교는 메틸렌, 프로필렌, 에테르, 또는 아미노 가교; O-아미노(여기서, 아미노는, 예를 들어 NH_2; 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴아미노, 헤테로아릴아미노, 또는 디헤테로아릴아미노, 에틸렌디아민, 또는 폴리아미노일 수 있음) 및 아미노알콕시, $O(CH_2)_n$-아미노(여기서, 아미노는, 예를 들어, NH_2; 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴아미노, 헤테로아릴아미노, 또는 디헤테로아릴아미노, 에틸렌디아민, 또는 폴리아미노일 수 있음)를 포함할 수 있다. 2' 하이드록실 기 변형은 리보오스 고리에 C2'-C3' 결합이 결여된 비잠금 핵산(UNA)을 포함할 수 있다. 2' 하이드록실 기 변형은 메톡시에틸 기(MOE), ($OCH_2CH_2OCH_3$, 예를 들어, PEG 유도체)를 포함할 수 있다.

[0819] 데옥시 2' 변형은 수소(즉, 예를 들어, 부분 dsRNA의 오버행 부분에서의 데옥시리보오스 당); 할로(예를 들어, 브로모, 클로로, 플루오로, 또는 아이오도); 아미노(여기서, 아미노는, 예를 들어, NH2; 알킬아미노, 디알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 디아릴아미노, 헤테로아릴아미노, 디헤테로아릴아미노, 또는 아미노산일 수 있음); $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2$-아미노(여기서, 아미노는, 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같을 수 있음), -NHC(O)R(여기서, R은, 예를 들어, 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴 또는 당일 수 있음), 시아노; 머캅토; 알킬-티오-알킬; 티오알콕시; 및 예를 들어, 본원에 기재된 아미노로 선택적으로 치환될 수 있는 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 알케닐 및 알키닐을 포함할 수 있다.

[0820] 당 변형은, 리보오스 내의 상응하는 탄소의 것과는 반대의 입체화학적 배위를 갖는 하나 이상의 탄소를 또한 함유할 수 있는 당 기를 포함할 수 있다. 따라서, 변형된 핵산은 당으로서 예를 들어, 아라비노오스(arabinose)를 함유하는 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 변형된 핵산은 또한 무염기성 당을 포함할 수 있다. 이들 무염기성 당은 또한, 구성 당 원자 중 하나 이상에서 추가로 변형될 수 있다. 변형된 핵산은 또한, L 형태(예를 들어, L-뉴클레오시드)인 하나 이상의 당을 포함할 수 있다.

[0821] 변형된 핵산 내로 혼입될 수 있는 본원에 기재된 변형된 뉴클레오시드 및 변형된 뉴클레오티드는, 핵염기로도 불리는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 핵염기의 예는, 비제한적으로, 아데닌(A), 구아닌(G), 시토신(C), 및 우라실(U)을 포함한다. 이들 핵염기는 변형된 핵산 내로 혼입될 수 있는 변형된 잔기를 제공하도록 변형되거나 전체적으로 대체될 수 있다. 뉴클레오티드의 핵염기는 퓨린, 피리미딘, 퓨린 유사체, 또는 피리미딘 유사체로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵염기는, 예를 들어, 염기의 자연-발생 및 합성 유도체를 포함할 수 있다.

[0822] 이중 가이드 RNA에서, 각각의 crRNA 및 tracrRNA는 변형을 함유할 수 있다. 이러한 변형은 crRNA 및/또는 tracrRNA의 단부의 하나 또는 둘 다에 있을 수 있다. sgRNA에서, sgRNA의 단부 중 하나 또는 둘 다에서 하나 이상의 잔기는 화학적으로 변형될 수 있고/있거나, 내부 뉴클레오시드는 변형될 수 있고/있거나, 전체 sgRNA는 화학적으로 변형될 수 있다. 일부 gRNA는 5' 단부 변형을 포함한다. 일부 gRNA는 3' 단부 변형을 포함한다.

[0823] 본원에 개시된 가이드 RNA는, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 WO 2018/107028 A1에 개시된 변형 패턴 중 하나를 포함할 수 있다. 본원에서 개시된 가이드 RNA는 또한, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 US 2017/0114334에 개시된 구조/변형 패턴 중 하나를 포함할 수 있다. 본원에 개시된 가이드 RNA는 또한, WO 2017/136794, WO 2017/004279, US 2018/0187186, 또는 US 2019/0048338에 개시된 구조/변형 패턴 중 하나를 포함할 수 있으며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0824] 하나의 예로서, 가이드 RNA의 5' 또는 3' 단부에서의 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 연결(예를 들어, 염기는 포스포로티오에이트 기인 변형된 포스페이트 기를 가질 수 있음)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA는 가이드 RNA의 5' 또는 3' 단부에서 2개, 3개, 또는 4개의 말단 뉴클레오티드 사이에 포스포로티오에이트 연결을 포함할 수 있다. 다른 예로서, 가이드 RNA의 5' 및/또는 3' 단부에서의 뉴클레오티드는 2'-O-메틸 변형을 가질 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA는 가이드 RNA의 5' 및/또는 3' 단부(예를 들어, 5' 단부)에서의 2개, 3개, 또는 4개의 말단 뉴클레오티드에서 2'-O-메틸 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, WO 2017/173054 A1 및 문헌[Finn et al. (2018) *Cell Rep.* 22(9):2227-2235]을 참조하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 다른 가능한 변형이 본원의 다른 곳에서 더 상세히 기재된다. 구체적인 예에서, 가이드 RNA는 처음 3개의 5' 및 3' 말단 RNA 잔기에서 2'-O-메틸 유사체 및 3' 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결을 포함한다. 이러한 화학적 변형은, 예를 들어, 엑소뉴클레아제로부터의 더 큰 안정성 및 보호를 가이드 RNA에 제공할 수 있어서, 이들이 비변형된 가이드 RNA 보다 더 오랫동안 세포 내에서 지속되게 할 수 있다. 이러한 화학적 변형은 또한, 예를 들어, RNA를 능동적으로 분해하거나 세포 사멸을 초래하는 면역 캐스케이드를 촉발할 수 있는 선천적인 세포내 면역 반응으로부터 보호할 수 있다.

[0825] 하나의 예로서, 본원에 기재된 임의의 가이드 RNA는 적어도 하나의 변형을 포함할 수 있다. 하나의 예에서, 적어도 하나의 변형은 2'-O-메틸(2'-O-Me) 변형된 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 사이의 포스포로티오에이트(PS) 결합, 2'-플루오로(2'-F) 변형된 뉴클레오티드, 또는 이들의 조합을 포함한다. 예를 들어, 적어도 하나의 변형은 2'-O-메틸(2'-O-Me) 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 적어도 하나의 변형은 뉴클레오티드 사이의 포스포로티오에이트(PS) 결합을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 적어도 하나의 변형은 2'-플루오로(2'-F) 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 하나의 예에서, 본원에 기재된 가이드 RNA는 뉴클레오티드 사이의 하나 이상의 2'-O-메틸(2'-O-Me) 변형된 뉴클레오티드 및 하나 이상의 포스포로티오에이트(PS) 결합을 포함한다.

[0826] 변형은 가이드 RNA 내 어느 곳에서든지 발생할 수 있다. 하나의 예로서, 가이드 RNA는 가이드 RNA의 5' 단부에서 처음 5개 뉴클레오티드 중 하나 이상에서의 변형을 포함하고, 가이드 RNA는 가이드 RNA의 3' 단부의 마지막 5개 뉴클레오티드 중 하나 이상에서의 변형, 또는 이들의 조합을 포함한다. 예를 들어, 가이드 RNA는 가이드 RNA의 처음 4개의 뉴클레오티드 사이의 포스포로티오에이트 결합, 가이드 RNA의 마지막 4개의 뉴클레오티드 사이의 포스포로티오에이트 결합, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 가이드 RNA는 가이드 RNA의 5' 단부에서 첫번째 3개의 뉴클레오티드에서의 2'-O-Me 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 가이드 RNA의 3' 단부에서 마지막 3개의 뉴클레오티드에서의 2'-O-Me 변형된 뉴클레오티드, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다.

[0827] 하나의 예에서, 변형된 gRNA는 하기 서열

[0828] mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUm
AmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA
mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
(서열번호 435)

[0829] 을 포함할 수 있고, 여기서 "N"은 임의의 자연 또는 비-자연 뉴클레오티드일 수 있다. N 잔기의 총합은 본원에 기재된 DNA-표적화 세그먼트를 포함할 수 있다. 용어 "mA," "mC," "mU," 및 "mG"는 2'-O-Me로 변형된 뉴클레오티드(각각 A, C, U, 및 G)를 나타낸다. 기호 "*"는 포스포로티오에이트 변형을 나타낸다. 특정 실시양태에서, A, C, G, U, 및 N은 독립적으로 리보오스 당, 즉, 2'-OH를 나타낸다. 변형된 서열의 맥락에서의 특정 실시양태에서, A, C, G, U, 및 N은 리보오스 당, 즉, 2'-OH를 나타낸다. 포스포로티오에이트 연결 또는 결합은 포스포디에스테르 연결, 예를 들어 뉴클레오티드 염기 사이의 결합에서 황이 하나의 비가교 포스페이트 산소로 치환되는 결합을 지칭한다. 포스포로티오에이트가 올리고뉴클레오티드를 생성하기 위해 사용되는 경우, 변형된 올리고뉴클레오티드는 또한 S-올리고로서 지칭될 수 있다. 용어 A^*, C^*, U^*, 또는 G^*는 포스포로티오에이트 결합을 갖는 다음(예를 들어, 3') 뉴클레오티드에 연결되는 뉴클레오티드를 나타낸다. 용어 "mA^*," "mC^*," "mU^*," 및 "mG^*"는 2'-O-Me로 치환되고 포스포로티오에이트 결합을 갖는 다음(예를 들어, 3') 뉴클레오티드에 연결되는 뉴클레오티드(각각 A, C, U, 및 G)를 나타낸다.

[0830] 뉴클레오티드 당 고리에 영향을 미치는 것으로 나타난 또 다른 화학적 변형은 할로겐 치환이다. 예를 들어, 뉴클레오티드 당 고리에서의 2'-플루오로(2'-F) 치환은 올리고뉴클레오티드 결합 친화도 및 뉴클레아제 안정성을 증가시킬 수 있다. 무염기성 뉴클레오티드는 질소성 염기가 결여된 것들을 지칭한다. 역 염기는 역전된 정상 5'에서 3'로의 연결(즉, 5'에서 5'로의 연결 또는 3'에서 3'로의 연결)인 연결을 갖는 것들을 지칭한다.

[0831] 무염기성 뉴클레오티드는 역 연결로 부착될 수 있다. 예를 들어, 무염기성 뉴클레오티드는 5'에서 5'로의 연결을 통해 말단 5' 뉴클레오티드에 부착될 수 있거나, 무염기성 뉴클레오티드는 3'에서 3'로의 연결을 통해 말단 3' 뉴클레오티드에 부착될 수 있다. 말단 5' 또는 3' 뉴클레오티드에서의 역 무염기성 뉴클레오티드는 또한 역 무염기성 단부 캡으로 불릴 수 있다.

[0832] 하나의 예에서, 5' 말단에서의 처음 3개, 4개, 또는 5개의 뉴클레오티드 중 하나 이상, 및 3' 말단에서의 마지막 3개, 4개, 또는 5개의 뉴클레오티드 중 하나 이상이 변형된다. 변형은, 예를 들어, 2'-O-Me, 2'-F, 역 무염기성 뉴클레오티드, 포스포로티오에이트 결합, 또는 안정성 및/또는 성능을 증가시키는 것으로 잘 알려진 다른 뉴클레오티드 변형일 수 있다.

[0833] 또 다른 예에서, 5' 말단에서의 처음 4개의 뉴클레오티드, 및 3' 말단에서의 마지막 4개의 뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 결합으로 연결될 수 있다.

[0834] 또 다른 예에서, 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드, 및 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드는 2'-O-메틸(2'-O-Me) 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드, 및 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드는 2'-플루오로(2'-F) 변형된 뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 예에서, 5' 말단에서의 처음 3개의 뉴클레오티드, 및 3' 말단에서의 마지막 3개의 뉴클레오티드는 역 무염기성 뉴클레오티드를 포함한다.

[0835] 가이드 RNA는 임의의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, gRNA는 본원에 개시된 항-TfR 항원 결합 단백질, 예컨대 scFv 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에, 2개의 분자(분리된 crRNA 및 tracrRNA) 또는 하나의 분자

(sgRNA)로서의 RNA의 형태, 및 선택적으로 Cas 단백질과의 복합체의 형태로 접합될 수 있다.

[0836] gRNA는 gRNA를 인코딩하는 DNA의 형태로 본원에 개시된 항-TfR 항원 결합 단백질, 예컨대 scFv 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 접합될 수 있다. gRNA를 인코딩하는 DNA는 단일 RNA 분자(sgRNA) 및 별도의 RNA 분자(예를 들어, 별도의 crRNA 및 tracrRNA)를 인코딩할 수 있다. 후자의 경우, gRNA를 인코딩하는 DNA는, crRNA 및 tracrRNA를 각각 인코딩하는 하나의 DNA 분자로서 또는 별도의 DNA 분자로서 제공될 수 있다.

[0837] 다중 gRNA는 본원에 개시된 항-TfR 항원 결합 단백질, 예컨대 scFv 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 접합될 수 있다. gRNA는 동일하거나 상이한 gRNA일 수 있거나, 동일한 유전자 또는 상이한 유전자를 표적화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 또는 초과의 가이드 RNA는 본원에 개시된 항-TfR 항원 결합 단백질, 예컨대 scFv 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 접합된다.

[0838] 대안적으로, RNA 또는 DNA의 형태의 gRNA는, 본원에 개시된 항-TfR 항원 결합 단백질, 예컨대 scFv 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 접합되는 담체(예를 들어, 리포좀 또는 LNP) 내로 혼입될 수 있다. 담체는 Cas 단백질, 예컨대 Cas9 단백질, 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산(예를 들어, mRNA)을 추가로 포함할 수 있다. 담체, 예컨대 리포좀 또는 지질 나노입자는 하기에 추가로 상세히 기재된다.

[0839] 다중 gRNA는 본원에 개시된 항-TfR 항원 결합 단백질, 예컨대 scFv 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 접합되는 담체(예를 들어, 리포좀 또는 LNP) 내로 혼입될 수 있다. gRNA는 동일하거나 상이한 gRNA일 수 있거나, 동일한 유전자 또는 상이한 유전자를 표적화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개 이상의 가이드 RNA는 본원에 개시된 항-TfR 항원 결합 단백질, 예컨대 scFv 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편에 접합되는 담체(예를 들어, 리포좀 또는 LNP) 내로 혼입된다.

[0840] gRNA가 DNA의 형태로 제공되는 경우, 표적 세포로 전달된 후의 gRNA는 세포 내에서 일시적으로, 조건적으로 또는 구성적으로 발현될 수 있다. gRNA를 인코딩하는 DNA는 세포의 게놈에 안정적으로 통합되고, 세포 내에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 대안적으로, gRNA를 인코딩하는 DNA는 발현 구축물 내의 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, gRNA를 인코딩하는 DNA는 이종 핵산, 예컨대 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터에 있을 수 있다. 대안적으로, 이는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함하는 벡터와 별도의 벡터 또는 플라스미드 내에 있을 수 있다. 이러한 발현 구축물에서 사용될 수 있는 프로모터는, 예를 들어, 진핵 세포, 인간 세포, 비-인간 세포, 포유동물 세포, 비-인간 포유동물 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 다능성 세포, 배아 줄기(ES) 세포, 성체 줄기 세포, 발달적으로 제한된 전구 세포, 유도된 다능성 줄기(iPS) 세포, 또는 단일-세포 단계 배아 중 하나 이상에서 활성인 프로모터를 포함한다. 이러한 프로모터는, 예를 들어, 조건부 프로모터, 유도성 프로모터, 구성적 프로모터, 또는 조직-특이적 프로모터일 수 있다. 이러한 프로모터는 또한, 예를 들어, 이방향성 프로모터일 수 있다. 적절한 프로모터의 구체적인 예는 RNA 폴리머라아제 III 프로모터, 예컨대 인간 U6 프로모터, 래트 U6 폴리머라아제 III 프로모터, 또는 마우스 U6 폴리머라아제 III 프로모터를 포함한다.

[0841] 대안적으로, gRNA는 다양한 다른 방법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, gRNA는, 예를 들어, T7 RNA 폴리머라아제(예를 들어, 각각이 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 WO 2014/089290 및 WO 2014/065596 참고)를 사용하는 *시험관내* 전사에 의해 제조될 수 있다. 가이드 RNA는 또한 화학적인 합성에 의해 제조된 합성 생산된 분자일 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA는 처음 3개의 5' 및 3' 말단 RNA 잔기에서 2'-O-메틸 유사체 및 3' 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 연결을 포함하도록 화학적으로 합성될 수 있다.

[0842] 가이드 RNA(또는 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산)는 하나 이상의 가이드 RNA(예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개 또는 초과의 가이드 RNA) 및 가이드 RNA의 안정성을 증가시키는(예를 들어, 개시 핵산 또는 단백질의 0.5 중량% 미만과 같은 임계치 미만으로 분해 생성물이 남아있는 주어진 저장의 조건(예를 들어, -20℃, 4℃, 또는 주변 온도) 하에 기간을 연장시키거나; 생체내 안정성을 증가시키는) 담체를 포함하는 조성물에 있을 수 있다. 이러한 담체의 비-제한적인 예는 폴리(락트산)(PLA) 미소구체, 폴리(D,L-락트-코글리콜산)(PLGA) 미소구체, 리포좀, 미셀, 역 미셀, 지질 코클리에이트(cochleate), 및 지질 미세관을 포함한다. 이러한 조성은 Cas 단백질, 예컨대 Cas9 단백질, 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산을 추가로 포함할 수 있다.

[0843] 가이드 RNA를 위한 표적 DNA는 결합을 위한 충분한 조건이 존재한다면, gRNA의 DNA-표적화 세그먼트가 결합할 DNA에 존재하는 핵산 서열을 포함한다. 적절한 DNA/RNA 결합 조건은 세포에서 정상적으로 존재하는 생리학적 조건을 포함한다. 다른 적절한 DNA/RNA 결합 조건(예를 들어, 무세포 시스템에서의 조건)은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 본원에서 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 원용된, 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory

Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., Harbor Laboratory Press 2001)] 참고). gRNA에 상보적이고 이와 하이브리드화하는 표적 DNA의 가닥은 "상보적 가닥"으로 불리고, "상보적 가닥"에 상보적인 표적 DNA의 가닥(및 따라서 Cas 단백질 또는 gRNA에 상보적이지 않음)은 "비상보적 가닥" 또는 "주형 가닥"으로 불릴 수 있다.

[0844] 표적 DNA는 가이드 RNA가 하이브리드화하는 상보적 가닥 상의 서열, 및 비-상보적 가닥(예를 들어, 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)에 인접함) 상의 상응하는 서열 둘 다를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "가이드 RNA 표적 서열"은 가이드 RNA가 상보적 가닥 상에서 하이브리드화하는 서열(즉, 이의 역 보체)에 상응하는 비-상보적 가닥 상의 서열을 구체적으로 지칭한다. 즉, 가이드 RNA 표적 서열은 PAM에 인접한 비-상보적 가닥(예를 들어, Cas9의 경우에 PAM의 상류 또는 5') 상의 서열을 지칭한다. 가이드 RNA 표적 서열은 가이드 RNA의 DNA-표적화 세그먼트와 동등하지만, 우라실 대신에 티민을 갖는다. 하나의 예로서, SpCas9 효소에 대한 가이드 RNA 표적 서열은 비-상보적 가닥 상의 5'-NGG-3' PAM의 상류 서열을 지칭할 수 있다. 가이드 RNA는 표적 DNA의 상보적 가닥에 상보성을 갖도록 설계되고, 여기서 가이드 RNA의 DNA-표적화 세그먼트 및 표적 DNA의 상보적 가닥 사이의 하이브리드화는 CRISPR 복합체의 형성을 촉진한다. 하이브리드화를 유발하고 CRISPR 복합체의 형성을 촉진하기에 충분한 상보성이 있는 한, 완전 상보성이 반드시 필요한 것은 아니다. 가이드 RNA가 본원에서 가이드 RNA 표적 서열을 표적화하는 것으로서 언급된다면, 이는 가이드 RNA가 비-상보적 가닥 상의 가이드 RNA 표적 서열의 역 보체인 표적 DNA의 상보적 가닥 서열에 하이브리드화된다는 것을 의미한다.

[0845] 표적 DNA 또는 가이드 RNA 표적 서열은 임의의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있고, 예를 들어 세포의 핵 또는 세포질 내에 또는 세포의 소기관, 예컨대 미토콘드리아 또는 클로로플라스트 내에 위치될 수 있다. 표적 DNA 또는 가이드 RNA 표적 서열은 세포에 내인성이거나 외인성인 임의의 핵산 서열일 수 있다. 가이드 RNA 표적 서열은 유전자 생성물(예를 들어, 단백질) 또는 비-코딩 서열(예를 들어, 조절 서열)을 코딩하는 서열일 수 있거나, 둘 다를 포함할 수 있다.

[0846] DNA-결합 단백질을 위한 표적 서열(예를 들어, 가이드 RNA 표적 서열)은 표적화된 유전자의 발현을 변경하는 데 적절한 표적화된 유전자 내의 어느 곳에도 있을 수 있다. 하나의 예로서, 표적 서열은 조절 요소, 예컨대 인핸서 또는 프로모터 내에 있을 수 있거나, 조절 요소에 근접할 수 있다. 예를 들어, 표적 서열은 개시 코돈의 약 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 100개, 200개, 300개, 400개, 500개, 또는 1,000개의 뉴클레오티드 내에 있을 수 있다.

[0847] Cas 단백질에 의한 표적 DNA의 부위-특이적 결합 및 절단은 (i) 가이드 RNA 및 표적 DNA의 상보적 가닥 사이의 염기 페어링 상보성 및 (ii) 표적 DNA의 비-상보적 가닥 내의 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)라고 불리는 짧은 모티프 둘 다에 의해 결정된 위치에서 발생할 수 있다. PAM은 가이드 RNA 표적 서열의 측면에 있을 수 있다. 선택적으로, 가이드 RNA 표적 서열은 PAM(예를 들어, Cas9에 대해)에 의해 3' 단부 상에 측면에 있을 수 있다. 대안적으로, 가이드 RNA 표적 서열은 PAM(예를 들어, Cpf1에 대해)에 의해 5' 단부 상에 측면에 있을 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질의 절단 부위는 PAM 서열의 상류 또는 하류(예를 들어, 가이드 RNA 표적 서열 내)에 약 1 내지 약 10개 또는 약 2 내지 약 5개의 염기 페어링(예를 들어, 3개의 염기 페어링)일 수 있다. SpCas9의 경우에서, PAM 서열(즉, 비-상보적 가닥 상)은 5'-NiGG-3'일 수 있으며, 여기서 Ni는 임의의 DNA 뉴클레오티드이고, 여기서 PAM은 표적 DNA의 비-상보적 가닥 상의 가이드 RNA 표적 서열의 3' 바로 옆이다. 이와 같이, 상보적 가닥 상의 PAM에 상응하는 서열(즉, 역 보체)은 5'-CCN2-3'일 것이며, 여기서 N2는 임의의 DNA 뉴클레오티드이고, 즉시 가이드 RNA의 DNA-표적화 세그먼트가 표적 DNA의 상보적 가닥 상에서 하이브리드화되는 서열의 5' 바로 옆이다. 일부의 이러한 경우에, Ni 및 N2는 상보적일 수 있고, Ni-N2 염기 페어링은 임의의 염기 페어링(예를 들어, Ni=C 및 N2=G; Ni=G 및 N2=C; Ni=A 및 N2=T; 또는 Ni=T, 및 N2=A)일 수 있다. *S. 아우레우스*로부터의 Cas9의 경우에서, PAM은 NNGRRT(서열번호 503) 또는 NNGRR(서열번호 504)일 수 있고, 여기서 N은 A, G, C, 또는 T일 수 있고, R은 G 또는 A일 수 있다. *C. 제주니*로부터의 Cas9의 경우에서, PAM은, 예를 들어, NNNNACAC(서열번호 505) 또는 NNNNRYAC(서열번호 506)일 수 있으며, 여기서 N은 A, G, C, 또는 T일 수 있고, R은 G 또는 A일 수 있다. 일부 경우에서(예를 들어, FnCpf1의 경우), PAM 서열은 5' 단부의 상류에 있을 수 있고, 서열 5'-TTN-3을 가질 수 있다. DpbCasX의 경우에서, PAM은 서열 5'-TTCN-3'을 가질 수 있다. CasΦ의 경우에서, PAM은 서열 5'-TBN-3'를 가질 수 있으며, 여기서 B는 G, T, 또는 C이다.

[0848] 가이드 RNA 표적 서열의 예는 SpCas9 단백질에 의해 인식되는 NGG 모티프 바로 직전의 20-뉴클레오티드 DNA 서열이다. 5' 단부의 구아닌은 세포에서 RNA 폴리머라아제에 의한 전사를 용이하게 할 수 있다. 가이드 RNA 표적 서열과 PAM의 다른 예는 시험관내에서 T7 폴리머라아제에 의한 효율적인 전사를 용이하게 하기 위해 5' 단부에서 2개의 구아닌 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 WO 2014/065596을 참고한다. 다른 가이드 RNA 표적 서열과 PAM은, 5' G 또는 GG 및 3' GG 또는 NGG를 포함

하는 길이가 4-22개인 뉴클레오티드를 가질 수 있다. 또 다른 가이드 RNA 표적 서열과 PAM은 길이가 14 내지 20개인 뉴클레오티드를 가질 수 있다.

[0849] 표적 DNA에 하이브리드화된 CRISPR 복합체의 형성은, 가이드 RNA 표적 서열(즉, 표적 DNA의 비-상보적 가닥 상의 가이드 RNA 표적 서열, 및 가이드 RNA가 하이브리드화되는 상보적 가닥 상의 역 보체)에 상응하는 영역 내 또는 그 근처의 표적 DNA의 하나 또는 양측의 가닥의 절단을 야기할 수 있다. 예를 들어, 절단 부위는 가이드 RNA 표적 서열 내에(예를 들어, PAM 서열에 대해 정의된 위치에서) 있을 수 있다. "절단 부위"는 Cas 단백질이 단일-가닥 절단 또는 이중-가닥 절단을 생성하는 표적 DNA의 위치를 포함한다. 절단 부위는 단 하나의 가닥(예를 들어, 니카아제가 사용될 때) 또는 이중-가닥 DNA의 양쪽 가닥 상에 있을 수 있다. 절단 부위는 양측의 가닥 상에서 동일한 위치에 있을 수 있거나(둔단부; 예를 들어, Cas9를 생성함) 또는 각각의 가닥 상의 상이한 위치에 있을 수 있다(엇갈린 단부(즉, 오버행); 예를 들어 Cpf1을 생성함). 엇갈린 단부는, 예를 들어 2개의 Cas 단백질을 사용함으로써 생성될 수 있고, 이들 각각은 상이한 가닥 상의 상이한 절단 부위에서 단일-가닥 절단을 생성함으로써, 이중-가닥 절단을 생성할 수 있다. 예를 들어, 제1 니카아제는 이중-가닥 DNA(dsDNA)의 제1 가닥 상에 단일-가닥 절단을 생성할 수 있고, 제2 니카아제는 오버행 서열이 생성되도록 dsDNA의 제2 가닥 상의 단일-가닥 절단을 생성할 수 있다. 일부 경우에서, 제1 가닥 상의 니카아제의 가이드 RNA 표적 서열 또는 절단 부위는 제2 가닥 상의 니카아제의 가이드 RNA 표적 서열 또는 절단 부위로부터 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 40개, 50개, 75개, 100개, 250개, 500개, 또는 1,000개의 염기 페어링에 의해 분리된다.

[0850] *다른 유형의 폴리뉴클레오티드 분자*

[0851] 일부 실시양태에서, 분자 카고, 예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자는 리보자임(리보핵산 효소)을 포함할 수 있다. 이론에 구애되지 않고, 리보자임은 단백질 효소의 작용과 유사한 특정 생화학적 반응을 수행할 수 있는 분자, 일반적으로 RNA 분자이다. 리보자임은 촉매작용 활성, 예컨대, 비제한적으로, 이들이 하이브리화된 RNA 분자, 예를 들어, RNA-함유 기질, IncRNA, mRNA, 및 리보자임에서 특이적 포스포디에스테르 연결에서 절단하는 능력을 갖는 분자를 포함한다.

[0852] 리보자임은 여러 물리적 구조 중 하나를 취할 수 있으며, 이러한 구조 하나를 "해머헤드"라고 한다. 해머헤드 리보자임은, 예를 들어, 9개의 보존된 염기를 포함하는 촉매작용 코어, 촉매작용 코어의 표적 RNA 측면 영역에 상보적인 2개의 영역, 이중-가닥 스템 및 루프 구조(스템-루프 II)를 포함할 수 있다. 측면 영역은 특히, 이중-가닥 스템 I 및 III을 형성함으로써 표적 RNA에 리보자임의 결합을 허용할 수 있다. 절단은 3', 5'-포스페이트 디에스테르로부터 2', 3'-사이클릭 포스페이트 디에스테르로의 트랜스에스테르화 반응에 의해 특정한 리보뉴클레오티드 삼중물에 인접한 트랜스(리보자임을 함유하는 것 외의 RNA 기재의 절단)에서 또는 시스(해머헤드 모티프를 함유하는 동일한 RNA 분자의 절단)에서 발생할 수 있다. 특정 실시양태에서, 이러한 촉매작용 활성은 리보자임의 촉매작용 영역 내에 특이적인, 고도로 보존된 서열의 존재를 필요로 할 수 있다.

[0853] 리보자임 구조에서의 변형은 분자의 비-코어 부분을 비-뉴클레오티드 분자로 대체 또는 치환하는 것을 포함할 수 있다. 비-제한적인 예로서, 문헌[Ma et al. (Biochem. (1993) 32:1751-1758; Nucleic Res. (1993) 21:2585-2589)]은 TAR 리보자임 헤어핀의 6개의 뉴클레오티드 루프를 비-뉴클레오티드, 에틸렌 글리콜-관련 링커로 대체하였다. 문헌[Thomson et al. (Nucleic Acids Res. (1993) 21:5600-5603)]은 루프 II를 길이가 13개, 17개, 및 19개 원자인 선형 비-뉴클레오티드 링커로 대체하였다. 문헌[Benseler et al. (J. Am. Chem. Soc. (1993) 115:8483-8484)]은, 스템 II의 2개의 염기 페어링, 및 루프 II의 뉴클레오티드의 모든 4개의 염기 페어링이 비스(프로판디올) 포스페이트, 헥사에틸렌 글리콜, 비스(트리에틸렌 글리콜) 포스페이트, 프로판디올, 또는 트리스(프로판디올)비스포스페이트 기반의 비-뉴클레오시드 링커로 대체될 수 있는 해머헤드-유사 분자를 기재한다.

[0854] 리보자임 폴리뉴클레오티드는 당업계에 공지된 다양한 적절한 방법 중 임의의 것을 사용하여 생성될 수 있거나(예를 들어, 미국 특허 번호 5,436,143 및 5,650,502; 및 PCT 공개 번호 WO94/13688; WO91/18624, WO92/01806; 및 WO 92/07065를 참조함) 상업적 공급원(예를 들어, US Biochemicals)로부터 획득될 수 있고, 이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 리보자임 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 세포 내에서 뉴클레아제에 의한 분해에 대한 올리고뉴클레오티드의 저항성을 증가시키기 위해, 뉴클레오티드 유사체를 혼입할 수 있다. 리보자임은 임의의 공지된 방식으로, 예를 들어, Applied Biosystems, Inc. 또는 Milligen에 의해 생산된 상업적으로 이용가능한 합성기를 사용하여 합성될 수 있다. 리보자임 RNA 서열은 통상적으로, 예를 들어, RNA 폴리머라아제, 예컨대 T7 또는 Sp6을 사용하여 합성될 수 있다. 리보자임은 또한 적절한 수단에 의해 재조합 벡터에서 생성될 수 있다.

[0855] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드 분자의 뉴크레오티드간 인 원자는 키랄일 수 있고, 폴리뉴클레오티드의 특성은 키랄 인 원자의 배위에 기초하여 조정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 입체제어된 방식으로 P-키랄 올리고뉴클레오티드 유사체를 합성하기 위해 적합한 방법이 사용될 수 있다(예를 들어, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 원용되는 문헌[Oka N, Wada T, Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms. Chem Soc Rev. 2011 Dec;40(12):5829-43]에 기재된 바와 같음). 일부 실시양태에서, 포스포로티오에이트-함유 올리고뉴클레오티드는 실질적으로 모든 Rp 또는 실질적으로 모든 Sp 포스포로티오에이트 당간 연결에 의해 함께 연결될 수 있는 뉴클레오시드 단위를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 실질적 키랄 순수 당간 연결을 포함하는 이러한 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오티드는, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,587,261에 개시된 바와 같은 화학적 합성 또는 효소적 접근을 통해 제조될 수 있고, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 일부 실시양태에서, 기재된 키랄 제어된 폴리뉴클레오티드 분자는 표적 핵산의 선택적 절단 패턴을 제공할 수 있다. 비-제한적인 예로서, 키랄 제어된 폴리뉴클레오티드 분자는, 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2017/0037399에 개시된 바와 같이 핵산의 상보적 서열 내에서 단일 부위 절단을 제공할 수 있으며, 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0856] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자는 모르폴리노-기반 화합물일 수 있다. 일부 실시양태에서, 모르폴리노-기반 올리고머 화합물은 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머(PMO)이다(예를 들어, 문헌[Iverson, Curr. Opin. Mol. Ther., 3:235-238, 2001]; 및 [Wang et al., J. Gene Med., 12:354-364, 2010]에 기재된 바와 같고, 이의 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 원용됨). 모르폴리노-기반 올리고머 화합물은 또한, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,034,506, 및 문헌[Genesis, volume 30, issue 3, 2001]; [Heasman, J., Dev. Biol., 2002, 243, 209-214]; [Dwaine A. Braasch and David R. Corey, Biochemistry, 2002, 41(14), 4503-4510)]; [Nasevicius et al., Nat. Genet., 2000, 26, 216-220]; [Lacerra et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2000, 97, 9591-9596]에 기재되어 있고, 이의 개시내용은 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0857] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자는 압타머를 포함할 수 있다. 압타머는 표적, 예를 들어, 세포 내에서 단백질 또는 핵산에 특이적으로 결합하는 임의의 핵산을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 압타머는 DNA 압타머 또는 RNA 압타머이다. 일부 실시양태에서, 핵산 압타머는 단일-가닥 RNA(ssDNA 또는 ssRNA) 또는 DNA를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 단일-가닥 핵산 압타머는 루프(들) 및/또는 나선(들) 구조를 형성할 수 있다. 핵산 압타머를 형성하는 핵산은 자연 발생 뉴클레오티드, 하나 이상의 뉴클레오티드 사이에 삽입된 탄화수소 또는 PEG 링커를 갖는 변형된 뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드, 하나 이상의 뉴클레오티드 사이에 삽입된 탄화수소 링커(예를 들어, 알킬렌) 또는 폴리에테르 링커(예를 들어, PEG 링커)를 갖는 자연 발생 뉴클레오티드, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다. 압타머 및 압타머를 제조하는 방법은, 예를 들어, 미국 특허 번호 8,318,438, 5,650,275; 5,683,867; 5,670,637; 5,696,249; 5,789,157; 5,843,653; 5,270,163; 5,567,588, 5,864,026; 5,989,823; 6,569,630; 및 PCT 공개 번호 WO 99/31275, 문헌[Lorsch and Szostak, 1996]; [Jayasena, 1999]에 기재되어 있고; 각각은 본원에 참조로 원용된다.

[0858] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자는 믹스머이거나 믹스머 서열 패턴을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 믹스머는 자연 및 비-자연 발생 뉴클레오시드 또는 공통적으로 교번하는 패턴의 비-자연 발생 뉴클레오시드의 2개의 상이한 유형 둘 다를 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 믹스머는 비변형된 폴리뉴클레오티드보다 더 높은 결합 친화도를 가질 수 있고, 특히 표적 분자에 특이적으로 결합하기 위해, 예를 들어, 표적 분자 상에 결합 부위를 차단하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 믹스머는 표적 분자에 RNase를 모집하지 않을 수 있고, 따라서 표적 분자의 절단을 촉진하지 않는다. 예를 들어, RNase H를 모집할 수 없는 이러한 폴리뉴클레오티드가 기재되었으며, 예를 들어, WO2007/112753 또는 WO2007/112754를 참조한다.

[0859] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 믹스머는 자연 발생 뉴클레오시드 및 뉴클레오시드 유사체의 반복 패턴, 또는, 예를 들어, 한 유형의 뉴클레오시드 유사체 및 제2 유형의 뉴클레오시드 유사체를 포함할 수 있다. 그러나, 믹스머는 반복 패턴을 포함할 필요가 없고, 대신에 뉴클레오시드 및 변형된 자연 발생 뉴클레오시드의 임의의 배열, 또는 변형된 뉴클레오시드 중 하나의 유형 및 변형된 뉴클레오시드의 제2 유형의 임의의 배열을 포함할 수 있다. 이러한 반복 패턴은, 예를 들어 매 2번째 또는 매 3번째 뉴클레오시드를 변형된 뉴클레오시드, 예를 들어, LNA로서 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 잔여 뉴클레오시드는 자연 발생 뉴클레오시드, 예를 들어, DNA일 수 있거나, 2' 치환된 뉴클레오시드 유사체, 예를 들어, 2' 플루오로 유사체 또는 2'-MOE일 수 있거나, 또는 본원에 개시된 임의의 다른 일부의 변형된 뉴클레오시드(들)일 수 있다. 변형된 뉴클레오시드의 반복 패턴, 예컨대 LNA 단위가, 고정된 위치에서(예를 들어, 5' 및/또는 3' 말단에서) 변형된 뉴클레오시드와 조합될 수 있다는 것이 이해된다.

[0860] 일부 실시양태에서, 믹스머는 6개 초과, 5개 초과, 4개 초과, 3개 초과, 또는 2개 초과의 연속적인 자연 발생 뉴클레오시드(예를 들어, DNA 뉴클레오시드)의 영역을 포함하지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 믹스머는 적어도 2개의 연속 변형된 뉴클레오시드, 예를 들어, 적어도 2개의 연속 LNA를 포함하는 영역을 적어도 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 믹스머는 적어도 3개의 연속 변형된 뉴클레오시드 단위, 예를 들어, 적어도 3개의 연속 LNA로 이루어진 영역을 적어도 포함할 수 있다.

[0861] 일부 실시양태에서, 믹스머는 8개 초과, 7개 초과, 6개 초과, 5개 초과, 4개 초과, 3개 초과, 또는 2개 초과의 연속 뉴클레오시드 유사체, 예를 들어, LNA의 영역을 포함하지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, LNA 단위는 비제한적으로, 본원에 지칭되는 것들을 포함하는 다른 뉴클레오시드 유사체로 대체될 수 있다.

[0862] 일부 실시양태에서, 믹스머는 예컨대, 비제한적으로, LNA 뉴클레오시드 및 2'-O-Me 뉴클레오시드 내의 친화도 향상 변형된 뉴클레오시드의 혼합물을 포함하도록 설계될 수 있다. 일부 실시양태에서, 믹스머는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개 또는 초과의 뉴클레오시드 사이에 변형된 뉴클레오시드간 연결(예를 들어, 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 연결 또는 다른 연결)을 포함할 수 있다.

[0863] 일부 실시양태에서, 믹스머는 하나 이상의 모르폴리노 뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 믹스머는 하나 이상의 다른 뉴클레오시드(예를 들어, DNA, RNA 뉴클레오시드) 또는 변형된 뉴클레오시드(예를 들어, 2'-O-Me 뉴클레오시드, LNA)와 (예를 들어, 교번하는 방식으로) 혼합된 모르폴리노 뉴클레오시드를 포함할 수 있다.

[0864] 일부 실시양태에서, 믹스머는, 예를 들어, 문헌[Chen S. et al., Molecules 2016, 21, 1582, Touznik A., et al., Scientific Reports, volume 7, Article number: 3672 (2017)]에 기재된 바와 같이 스플라이스 교정 또는 엑손 스키핑에 유용할 수 있고, 각각의 내용은 본원에 참조로 원용된다.

[0865] 믹스머는 임의의 적절한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 믹스머의 제조는, 예를 들어, 미국 특허 번호 7687617, 및 미국 특허 출원 공개 번호 US2012/0322851, US2009/0209748, US2009/0298916, US2006/0128646, 및 US2011/0077288에 기재되어 있다. 멀티머의 추가적인 예는, 예를 들어, 미국 특허 번호 5,693,773, 미국 특허 출원 공개 번호 2015/0247141; 2015/0315588; US 2011/0158937에 기재되어 있고; 이의 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0866] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 분자 카고를 포함하는 폴리뉴클레오티드 분자는 예를 들어, 링커에 의해 연결된 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자의 멀티머(예를 들어, 콘카테머)를 포함할 수 있다. 멀티머 내의 폴리뉴클레오티드는 동일하거나 상이할 수 있다(예를 들어, 동일한 유전자 상의 상이한 지점, 상이한 유전자 또는 이의 생성물을 표적화함).

[0867] 일부 실시양태에서, 멀티머는 절단성 링커에 의해 함께 결합된 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 멀티머는 예를 들어, 비-절단성 링커에 의해 함께 연결된 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 멀티머는 함께 연결된 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개 또는 초과의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 멀티머는 함께 연결된 2 내지 5개, 2 내지 10개, 4 내지 20개 또는 5 내지 30개의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함할 수 있다.

[0868] 일부 실시양태에서, 멀티머는, 예를 들어, 단부에서 단부로(end-to-end) 선형 배열로 연결된 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 멀티머는 폴리뉴클레오티드-기반 링커(예를 들어, 무염기성 링커, 폴리-dT 링커)를 통해 단부에서 단부로 연결된 2개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 멀티머는 또 다른 폴리뉴클레오티드의 3' 단부에 연결된 하나의 폴리뉴클레오티드의 3' 단부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 멀티머는 또 다른 폴리뉴클레오티드의 3' 단부에 연결된 하나의 폴리뉴클레오티드의 5' 단부를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 멀티머는 또 다른 폴리뉴클레오티드의 5' 단부에 연결된 하나의 폴리뉴클레오티드의 5' 단부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 멀티머는 분지 링커에 의해 함께 연결된 다수의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 분지형 구조를 포함할 수 있다.

[0869] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 폴리뉴클레오티드 분자는 스플라이싱을 표적화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 엑손 스키핑을 유도하고 유전자 내에서 판독 프레임을 회복시킴으로써 스플라이싱을 표적화할 수 있다. 예를 들어, 비제한적으로, 올리고뉴클레오티드는 프레임시프트 돌연변이를 인코딩하는 엑손 및/또는 조기 종결 코돈을 인코딩하는 엑손의 스키핑을 유도할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, 스플라이스 부위의 스플라이세오좀 인식을 차단함으로써 엑손 스키핑을 유도할 수 있다. 일부 실시

양태에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드 분자는 스플라이스 부위 억제 서열을 표적화함으로써 엑손의 포함을 유도할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 특정 엑손의 포함을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 엑손 스키핑은 기준 단백질과 비교하여 절단되었지만 기능적인 단백질을 야기한다.

[0870] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자는 메신저 RNA(mRNA)일 수 있다. mRNA는 폴리펩티드로 번역될 수 있는 개방 판독 프레임을 포함한다(즉, 리보솜 및 아미노-아실화 tRNA에 의한 번역을 위한 기재로서 작용할 수 있음). mRNA는 리보오스 잔기 또는 이의 유사체를 포함하는 포스페이트-당 백본, 예를 들어, 2'-메톡시 리보오스 잔기를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, mRNA 포스페이트-당 백본의 당은 리보오스 잔기, 2'-메톡시 리보오스 잔기, 또는 이들의 조합으로 본질적으로 이루어진다. mRNA의 염기는 변형된 염기, 예컨대 슈도우리딘, N-1-메틸-슈도우리딘, 또는 다른 자연 발생 또는 비-자연 발생 염기일 수 있다.

[0871] 리포좀, 지질 나노입자 및 기타 담체

[0872] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 접합된 분자 카고는 담체, 예를 들어, 지질-기반 담체, 예컨대 지질 나노입자(LNP), 리포좀, 리피도이드, 또는 리포플렉스, 중합체 나노입자, 무기 나노입자, 펩티드 담체, 나노입자 모방체, 또는 나노튜브를 포함한다.

[0873] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 접합된 분자 카고는 리포좀 또는 LNP를 포함한다. 리포좀 및 LNP는 하나 이상의 지질 이중층을 포함하는 소포이다. 일부 실시양태에서, 리포좀 또는 LNP는 수성 구획에 의해 분리된 2개 이상의 동심 이중층을 포함한다. 지질 이중층은 작용화되고/되거나 서로 가교 결합될 수 있다. 지질 이중층은 하나 이상의 단백질, 다당류 또는 다른 분자를 포함할 수 있다.

[0874] 지질 제형은 이의 세포 흡수를 개선하면서 분해로부터 생물학적 분자를 보호할 수 있다. 리포좀 또는 LNP는 분자간 힘에 의해 서로 물리적으로 연관된 복수의 지질 분자를 포함하는 입자이다. 이들은 미소구체(단층 및 다중층 소포, 예를 들어, 리포좀을 포함함), 에멀젼 내 분산상, 미셀, 또는 현탁액 내 내부상을 포함한다. 이러한 리포좀 또는 LNP는 전달을 위해 하나 이상의 핵산 또는 단백질을 캡슐화하는 데 사용될 수 있다. 양이온 지질을 함유하는 제형은 폴리음이온, 예컨대 핵산을 전달하는 데 유용하다. 포함될 수 있는 다른 지질은 중성 지질(즉, 비하전된 또는 양쪽성 지질), 음이온성 지질, 형질주입을 향상시키는 헬퍼 지질, 및 나노입자가 *생체내에서* 존재할 수 있는 시간의 길이를 증가시키는 스텔스 지질이다. 적절한 양이온성 지질, 중성 지질, 음이온성 지질, 헬퍼 지질, 및 스텔스 지질의 예는 WO 2016/010840 A1 및 WO 2017/173054 A1에서 발견될 수 있으며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 예시적인 지질 나노입자는 양이온성 지질 및 하나 이상의 다른 구성요소를 포함할 수 있다. 하나의 예에서, 다른 구성요소는 헬퍼 지질, 예컨대 콜레스테롤을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 다른 구성요소는 헬퍼 지질, 예컨대 콜레스테롤 및 중성 지질, 예컨대 디스테아로일포스파티딜클로린(DSPC)을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 다른 구성요소는 헬퍼 지질, 예컨대 콜레스테롤, 선택적인 중성 지질, 예컨대 DSPC, 및 스텔스 지질, 예컨대 S010, S024, S027, S031, 또는 S033을 포함할 수 있다.

[0875] 리포좀은 수성 코어를 캡슐화하기 위해 수성 환경에서 이중층을 형성할 수 있는 양친매성 지질이다. 폴리펩티드(예를 들어, Cas 단백질) 또는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 가이드 RNA)는 수성 코어 내로 원용될 수 있다. 이들 지질은 음이온성, 양이온성 또는 양쪽성 친수성 헤드 기를 가질 수 있다. 리포좀은 단일 지질 또는 지질의 혼합물로부터 형성될 수 있다. 혼합물은 (1) 음이온성 지질의 혼합물; (2) 양이온성 지질의 혼합물; (3) 양쪽성 지질의 혼합물; (4) 음이온성 지질 및 양이온성 지질의 혼합물; (5) 음이온성 지질 및 양쪽성 지질의 혼합물; (6) 양쪽성 지질 및 양이온성 지질의 혼합물; 또는 (7) 음이온성 지질, 양이온성 지질 및 양쪽성 지질의 혼합물을 포함할 수 있다. 유사하게, 혼합물은 포화 및 불포화 지질 둘 다를 포함할 수 있다. 예시적인 인지질은, 비제한적으로, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린 및 포스파티딜글리세롤을 포함한다. 양이온성 지질은, 비제한적으로, 1,2-디스테아릴옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(DSDMA), 디올레오일 트리메틸암모늄 프로판(DOTAP), 1,2-디올레일옥시-N,N디메틸-3-아미노프로판(DODMA), 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(DLinDMA), 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판(DLenDMA)을 포함한다. 양쪽성 지질은, 비제한적으로, 아실 양쪽성 지질 및 에테르 양쪽성 지질을 포함한다. 유용한 양쪽성 지질의 예는 도데실포스포콜린, DPPC, 및 DOPC를 포함한다.

[0876] 리포좀 또는 LNP는, (i) 캡슐화 및 엔도솜 탈출을 위한 지질; (ii) 안정화를 위한 중성 지질; (iii) 안정화를 위한 헬퍼 지질; 및 (iv) 스텔스 지질 중 하나 이상 또는 전부를 함유할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Finn et al. (2018) *Cell Rep.* 22 (9):2227-2235] 및 WO 2017/173054 A1을 참조하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0877] 일부 예에서, 리포좀 또는 LNP는 양이온성 지질을 포함한다. 일부 예에서, 리포좀 또는 LNP는, 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트)로도 불리는, (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트 또는 또 다른 이온화가능 지질을 포함한다. 예를 들어, WO 2019/067992, WO 2017/173054, WO 2015/095340, 및 WO 2014/136086을 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 일부 예에서, LNP는 약 4.5, 약 5.0, 약 5.5, 약 6.0, 또는 약 6.5의 양이온성 지질 아민 대 RNA 포스페이트의 몰 비(N:P)를 포함한다. 일부 예에서, LNP 지질의 맥락에서 용어 양이온성 및 이온화가능은 상호교환가능하다(예를 들어, 여기서 이온화가능 지질은 pH에 따라 양이온성임).

[0878] 캡슐화 및 엔도솜 탈출을 위한 지질은 양이온성 지질일 수 있다. 지질은 또한 생물분해성 지질, 예컨대 생물분해성 이온화가능 지질일 수 있다. 적절한 지질의 하나의 예는 지질 A 또는 LP01이고, 이는 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트로도 불리는, (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트이다. 예를 들어, 문헌[Finn et al. (2018) *Cell Rep.* 22 (9):2227-2235] 및 WO 2017/173054 A1을 참조하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 적절한 지질의 또 다른 예는 지질 B이며, 이는 ((5-((디메틸아미노)메틸)-1,3-페닐렌)비스(옥시))비스(옥탄-8,1-디일)비스(데카노에이트)로도 불리는, ((5-((디메틸아미노)메틸)-1,3-페닐렌)비스(옥시))비스(옥탄-8,1-디일)비스(데카노에이트)이다. 적절한 지질의 또 다른 예는 지질 C이며, 이는 2-((4-(((3-(디메틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)헥사데카노일)옥시)프로판-1,3-디일(9Z,9'Z,12Z,12'Z)-비스(옥타데카-9,12-디에노에이트)이다. 적절한 지질의 또 다른 예는 지질 D이며, 이는 3-(((3-(디메틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)-13-(옥타노일옥시)트리데실 3-옥틸운데카노에이트이다. 다른 적절한 지질은 헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일 4-(디메틸아미노)부타노에이트([(6*Z*,9*Z*,28*Z*,31*Z*)-헵타트리아콘타-6,9,28,31-테트라엔-19-일] 4-(디메틸아미노)부타노에이트 또는 Dlin-MC3-DMA (MC3))로도 공지됨)를 포함한다.

[0879] 추가적인 적절한 양이온성 지질은, 비제한적으로, 1,2-디리놀레일옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DLinDMA), 1,2-디리놀레닐옥시-N,N-디메틸아미노프로판(DLenDMA), 디옥타데실디메틸암모늄(DODMA), 디스테아릴디메틸암모늄(DSDMA), N,N-디올레일-N,N-디메틸암모늄 클로라이드(DODAC); N-(2,3-디올레일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTMA); N,N-디스테아릴-N,N-디메틸암모늄 브로마이드(DDAB); N-(2,3-디올레오일옥시)프로필)-N,N,N-트리메틸암모늄 클로라이드(DOTAP); 3-(N(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일)콜레스테롤(DC-Chol), 및 N-(1,2-디미리스틸옥시프로프-3-일)-N,N-디메틸-N-하이드록시에틸 암모늄 브로마이드(DMRIE)를 포함한다. 예를 들어, 생리학적 pH 미만에서 양성 전하를 갖는 양이온성 지질은, 비제한적으로, DODAP, DODMA, 및 DMDMA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 양이온성 지질은 C18 알킬 사슬, 헤드 기와 알킬 쇄 사이의 에테르 연결, 및 0 내지 3개의 이중 결합을 포함한다. 이러한 지질은, 예를 들어, DSDMA, DLinDMA, DLenDMA, 및 DODMA를 포함한다. 양이온성 지질은 에테르 연결 및 pH 적정가능 헤드 기를 포함할 수 있다. 이러한 지질은, 예를 들어, DODMA를 포함한다. 추가적인 양이온성 지질은, 본원에 참조로 원용된 미국 특허 번호 7,745,651; 5,208,036; 5,264,618; 5,279,833; 5,283,185; 5,753,613; 및 5,785,992에 기재된 바와 같다.

[0880] 일부 실시양태에서, 양이온성 지질은 양성자화가능 3차 아민 헤드 기를 포함할 수 있다. 이러한 지질은 본원에서 이온화가능 지질로 지칭된다. 이온화가능 지질은 이온화가능 아민 헤드 기를 포함하고 전형적으로 약 7 미만의 pKa를 포함하는 지질 종을 지칭한다. 산성 pH를 갖는 환경에서, 이온화가능 아민 헤드 기는 이온화가능 지질이 음전하 분자(예를 들어, 핵산, 예컨대 본원에 기재된 재조합 폴리뉴클레오티드)와 우선적으로 상호작용하여 리포좀 또는 LNP 조립 및 캡슐화를 용이하게 하도록 양성자화된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 이온화가능 지질은 리포좀 또는 LNP 내로 핵산의 로딩을 증가시킬 수 있다. pH가 약 7 보다 큰 환경에서(예를 들어, 7.4의 생리학적 pH), 이온화가능 지질은 중성 전하를 포함한다. 이온화가능 지질을 포함하는 입자가 엔도솜의 낮은 pH 환경(예를 들어, pH<7)으로 흡수될 때, 이온화가능 지질은 다시 양성자화되고 음이온성 엔도솜 막과 연합되어, 입자에 의해 캡슐화된 내용물의 방출을 촉진시킨다.

[0881] 일부 실시양태에서, 리포좀 또는 LNP는 하나 이상의 비-양이온성 헬퍼 지질을 포함할 수 있다. 예시적인 헬퍼 지질은 (1,2-디라우로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민)(DLPE), 1,2-디피타노일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DiPPE), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DPPC), 1,2-디올레일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DOPE), 1,2-디팔미토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DPPE), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DMPE), (1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포-(1'-rac-글리세롤)(DOPG), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민(DSPE), 세라마이드, 스핑고미엘린, 및

콜레스테롤을 포함한다.

[0882] 본원에 기재된 리포좀 또는 LNP에서 사용하기에 적절한 일부 이러한 지질은 *생체내에서* 생물분해성을 갖는다. 생물분해성 지질의 예는, 비제한적으로, 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트)로도 불리는, (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-20 (디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트 또는 또 다른 이온화가능 지질을 포함한다. 예를 들어, PCT 공개 번호 WO2017/173054, WO2015/095340, 및 WO2014/136086을 참고한다. 일부 실시양태에서, 리포좀 또는 LNP 지질의 맥락에서 용어 양이온성 및 이온화가능은 상호교환가능하며, 예를 들어, 이온화가능 지질은 pH에 따라 양이온성이다.

[0883] 이러한 지질은 이들이 들어있는 매질의 pH에 따라 이온화가능할 수 있다. 예를 들어, 약산성 매질에서, 지질은 양성자화될 수 있고 따라서 양전하를 가질 수 있다. 반대로, 예를 들어, pH가 대략 7.35인 혈액과 같은 약염기 매질에서, 지질은 양성자화되지 않고, 따라서 전하를 갖지 않을 수 있다. 일부 실시양태에서, 지질은 적어도 약 9, 9.5, 또는 10의 pH에서 양성자화될 수 있다. 전하를 가질 수 있는 이러한 지질의 능력은 이의 고유 pKa와 관련된다. 예를 들어, 지질은 독립적으로, 약 5.8 내지 약 6.2 범위의 pKa를 가질 수 있다.

[0884] 중성 지질은 리포좀 또는 LNP의 가공을 안정화하고 개선하는 기능을 한다. 적절한 중성 지질의 예는 다양한 중성, 비하전된 또는 양쪽성 지질을 포함한다. 본 개시내용에 사용하기에 적절한 중성 인지질의 예는, 비제한적으로, 5-헵타데실벤젠-1,3-디올(레조르시놀), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디스테아로일포스파티딜클로린 또는 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DSPC), 포스포콜린(DOPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 포스파티딜콜린(PLPC), 1,2-디아라키도노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DAPC), 포스파티딜에탄올아민(PE), 에그 포스파티딜콜린(EPC), 디라우릴로일포스파티딜콜린(DLPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 1-미리스토일-2-팔미토일 포스파티딜콜린(MPPC), 1-팔미토일-2-미리스토일 포스파티딜콜린(PMPC), 1-팔미토일-2-스테아로일 포스파티딜콜린(PSPC), 1,2-디아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DBPC), 1-스테아로일-2-팔미토일 포스파티딜콜린(SPPC), 1,2-디에이코세노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DEPC), 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린(POPC), 리소포스파티딜 콜린, 디올레오일 포스파티딜에탄올아민(DOPE), 디리놀레오일포스파티딜콜린 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(DSPE), 디미리스토일 포스파티딜에탄올아민(DMPE), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민(DPPE), 팔미토일올레오일 포스파티딜에탄올아민(POPE), 리소포스파티딜에탄올아민, 1-스테아로일-2-올레오일-sn-글리세로-3-포스포콜린(SOPC), 및 이들의 조합을 포함한다. 예를 들어, 중성 포스포지질은 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC) 및 디미리스토일 포스파티딜 에탄올아민(DMPE)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0885] 헬퍼 지질은 형질주입을 향상시키는 지질을 포함한다. 헬퍼 지질이 형질주입을 향상시키는 메커니즘은 입자 안정성을 향상시키는 것을 포함할 수 있다. 특정 경우에서, 헬퍼 지질은 막 동원성(membrane fusogenicity)을 향상시킬 수 있다. 헬퍼 지질은 스테로이드, 스테롤, 및 알킬 레조르시놀을 포함한다. 적절한 헬퍼 지질의 예는 콜레스테롤, 5-헵타데실레조르시놀, 및 콜레스테롤 헤미석시네이트를 포함한다. 하나의 예에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤 또는 콜레스테롤 헤미석시네이트일 수 있다.

[0886] 스텔스 지질은 나노입자가 생체내에 존재할 수 있는 시간의 길이를 변경하는 지질을 포함한다. 스텔스 지질은 예를 들어, 입자 응집을 감소시키고 입자 크기를 제어함으로써 제형 공정을 보조할 수 있다. 스텔스 지질은 리포좀 또는 LNP의 약동학적 특성을 조절할 수 있다. 적절한 스텔스 지질은 지질 모이어티에 연결된 친수성 헤드 기를 갖는 지질을 포함한다.

[0887] 스텔스 지질의 친수성 헤드 기는, 예를 들어, PEG에 기초한 중합체(때때로 폴리(에틸렌 옥사이드)로도 지칭됨), 폴리(옥사졸린), 폴리(비닐 알코올), 폴리(글리세롤), 폴리(N-비닐피롤리돈), 폴리아미노산, 및 폴리 N-(2-하이드록시프로필)메타크릴아미드로부터 선택된 중합체 모이어티를 포함할 수 있다. 용어 PEG는 임의의 폴리에틸렌 글리콜 또는 다른 폴리알킬렌 에테르 중합체를 의미한다. 특정 리포좀 또는 LNP 제형에서, PEG는, 약 2,000 달톤의 평균 분자량을 갖는 PEG 2000으로도 지칭되는 PEG-2K이다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 WO 2017/173054 A1을 참조한다.

[0888] 스텔스 지질의 지질 모이어티는, 예를 들어, 약 C4 내지 약 C40 포화 또는 불포화 탄소 원자를 독립적으로 포함하는 알킬 쇄 길이를 갖는 디알킬글리세롤 또는 디알킬글리카마이드 기를 포함하는 것들을 포함하는 디아실글리세롤 또는 디아실글리카마이드로부터 유래될 수 있고, 여기서 쇄는 하나 이상의 작용기, 예컨대, 예를 들어, 아미드 또는 에스테르를 포함할 수 있다. 디알킬글리세롤 또는 디알킬글리카마이드 기는 하나 이상의 치환된 알킬 기를 추가로 포함할 수 있다.

[0889] 하나의 예로서, 스텔스 지질은 PEG-디라우로일글리세롤, PEG-디미리스토일글리세롤(PEG-DMG), PEG-디팔미토일글리세롤, PEG-디스테아로일글리세롤(PEG-DSPE), PEG-디라우릴글리카마이드, PEG-디미리스틸글리카마이드, PEG-디팔미토일글리카마이드, 및 PEG-디스테아로일글리카마이드, PEG-콜레스테롤(1-[8'-(콜레스트-5-엔-3[베타]-옥시)카복사미도-3',6'-디옥사옥타닐]카바모일-[오메가]-메틸-폴리(에틸렌 글리콜), PEG-DMB(3,4-디테트라데콕시벤질-[오메가]-메틸-폴리(에틸렌 글리콜)에테르), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](PEG2k-DMG), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](PEG2k-DSPE), 1,2-디스테아로일-sn-글리세롤, 메톡시폴리 에틸렌 글리콜(PEG2k-DSG), 폴리(에틸렌 글리콜)-2000-디메타크릴레이트(PEG2k-DMA), 및 1,2-디스테아릴옥시프로필-3-아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](PEG2k-DSA)로부터 선택될 수 있다. 하나의 특정 예에서, 스텔스 지질은 PEG2k-DMG일 수 있다.

[0890] 일부 실시양태에서, 리포좀 또는 LNP는 하나 이상의 C6-C20 알킬을 포함하는 지질에 공유결합으로 부착된 최대 5kDa의 길이의 폴리(에틸렌)글리콜 쇄를 포함하는 하나 이상의 PEG-변형된 지질을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 리포좀 또는 LNP는 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-폴리(에틸렌 글리콜)(DSPE-PEG), 또는 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[아미노(폴리에틸렌 글리콜)](DSPE-PEG-아민)을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, PEG-변형된 지질은 지질 나노입자에서 총 지질 함량의 약 0.1% 내지 약 1%를 포함한다. 일부 실시양태에서, PEG-변형된 지질은 리포좀 또는 지질 나노입자에서의 총 지질 함량의 약 0.1%, 약 0.2% 약 0.3%, 약 0.4%, 약 0.5%, 약 0.6%, 약 0.7%, 약 0.8%, 약 0.9%, 또는 약 1.0%를 포함한다.

[0891] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 리포좀 또는 LNP는 지질 입자의 응집을 억제하는 접합된 지질을 포함할 수 있다. 이러한 지질 접합체는, 비제한적으로, PEG-지질 접합체 예컨대, 디알킬옥시프로필에 커플링된 PEG(예를 들어, PEG-DAA 접합체), 디아실글리세롤에 커플링된 PEG(예를 들어, PEG-DAG 접합체), 콜레스테롤에 커플링된 PEG, 포스파티딜에탄올아민에 커플링된 PEG, 및 세라마이드에 접합된 PEG(예를 들어, 미국 특허 번호 5,885,613 참고), 양이온성 PEG 지질, 폴리옥사졸린(POZ)-지질 접합체(예를 들어, POZ-DAA 접합체), 폴리아미드 올리고머(예를 들어, ATTA-지질 접합체), 및 이들의 혼합물을 포함한다. POZ-지질 접합체의 추가적인 예는 PCT 공개 번호 WO 2010/006282에 기재된다. PEG 또는 POZ는 지질에 직접 접합될 수 있거나 링커를 모이어티를 통해 지질에 연결될 수 있다. 예를 들어, 비-에스테르 함유 링커 모이어티 및 에스테르-함유 링커 모이어티를 포함하는, PEG 또는 POZ를 지질에 커플링시키기에 적합한 임의의 링커 모이어티가 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 비-에스테르 함유 링커 모이어티, 예컨대 아미드 또는 카바메이트가 사용된다.

[0892] 리포좀 또는 LNP는 제형에서 구성요소 지질의 상이한 각각의 몰비를 포함할 수 있다. CCD 지질의 몰%는, 예를 들어, 약 30 몰% 내지 약 60 몰%일 수 있다. 헬퍼 지질의 몰%는, 예를 들어, 약 30 몰% 내지 약 60 몰%일 수 있다. 중성 지질의 몰%는, 예를 들어, 약 1 몰% 내지 약 20 몰%일 수 있다. 스텔스 지질의 몰%는, 예를 들어, 약 1 몰% 내지 약 10 몰%일 수 있다.

[0893] 리포좀 또는 LNP는 생물분해성 지질의 양전하 아민 기(N)와 캡슐화되는 핵산의 음전하 포스페이트 기(P) 사이의 상이한 비율을 가질 수 있다. 이는 식 N/P에 의해 수학적으로 표현될 수 있다. 예를 들어, N/P 비율은 약 0.5 내지 약 100일 수 있다. N/P 비율은 또한 약 4 내지 약 6일 수 있다.

[0894] 일부 실시양태에서, 리포좀 또는 LNP는 뉴클레아제 약제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템, ZFN, 또는 TALEN)를 포함할 수 있거나, 폴리뉴클레오티드 분자(예를 들어, 가이드 RNA)를 포함할 수 있거나, 관심 폴리펩티드(예를 들어, 다중도메인 치료 단백질)를 인코딩하는 핵산 구축물을 포함할 수 있거나, 뉴클레아제 약제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템) 및 관심 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산 구축물(예를 들어, 유전자 편집에서 사용하기 위한 공여체 주형) 둘 다를 포함할 수 있다. CRISPR/Cas 시스템과 관련하여, 리포좀 또는 LNP는 임의의 형태의 Cas 단백질(예를 들어, 단백질, DNA, 또는 mRNA)을 포함할 수 있고/있거나 임의의 형태의 가이드 RNA(들)(예를 들어, DNA 또는 RNA)를 포함할 수 있다. 하나의 예에서, 리포좀 또는 LNP는 mRNA(예를 들어, 본원에 기재된 변형된 RNA)의 형태로 Cas 단백질을 포함하고, RNA(예를 들어, 본원에 개시된 변형된 가이드 RNA)의 형태로 가이드 RNA(들)를 포함한다. 또 다른 예로서, 리포좀 또는 LNP는 단백질의 형태로 Cas 단백질 및 RNA의 형태로 가이드 RNA(들)를 포함할 수 있다. 하나의 예에서, 가이드 RNA 및 Cas 단백질은 각각 동일한 LNP에서 LNP-매개 전달을 통해 RNA의 형태로 도입된다. 본원의 다른 곳에 더 상세히 논의되는 바와 같이, RNA 중 하나 이상이 변형될 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA는 5' 단부 및/또는 3' 단부에서 하나 이상의 안정화 단부 변형을 포함하도록 변형될 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어, 5' 단부 및/또는 3' 단부에서의 하나 이상의 포스포로티오에이트 연결, 및/또는 5' 단부 및/또는 3' 단부에서의 하나 이상의 2'-O-메틸 변형을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, Cas mRNA 변형은 슈도우리딘을 이용한 치환(예를 들어, 슈도우리딘으로 완전히 치환됨), 5' 캡, 및 폴리아데닐

화를 포함할 수 있다. 다른 변형이 본원의 다른 곳에서 개시된 바와 같이 또한 고려된다. 이러한 방법을 통한 전달은 일시적 Cas 발현 및/또는 가이드 RNA의 일시적 존재를 야기할 수 있고, 생물분해성 지질은 클리어런스(clearance)를 개선하고, 내성을 개선하고, 면역원성을 감소시킨다.

[0895] 특정 리포좀 또는 LNP에서, 카고는 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 특정 리포좀 또는 LNP에서, 카고는 Cas9와 같은 Cas 뉴클레아제를 인코딩하는 mRNA, 및 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산을 포함할 수 있다. 특정 리포좀 또는 LNP에서, 카고는 본원에 다른 곳에 기재된 바와 같이 관심 폴리펩티드(예를 들어, 다중도메인 치료 단백질)를 인코딩하는 핵산 구축물을 포함할 수 있다. 특정 리포좀 또는 LNP에서, 카고는 Cas9와 같은 Cas 뉴클레아제를 인코딩하는 mRNA, 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산, 및 관심 폴리펩티드(예를 들어, 다중도메인 치료 단백질)를 인코딩하는 핵산 구축물을 포함할 수 있다. 일부 리포좀 또는 LNP에서, 지질 구성요소는 아민 지질, 예컨대 생물분해성, 이온화가능 지질을 포함한다. 일부 예에서, 지질 구성요소는 생물분해성, 이온화가능 지질, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG-DMG를 포함한다. 예를 들어, Cas9 mRNA 및 gRNA는, 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 (9Z, 12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트)로도 불리는 이온화가능 지질 ((9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG를 포함하는 지질 제형을 활용하는 세포 및 동물에 전달될 수 있다.

[0896] 일부 리포좀 또는 LNP에서, 카고는 Cas mRNA(예를 들어, Cas9 mRNA) 및 gRNA를 포함할 수 있다. Cas mRNA 및 gRNA는 상이한 비율일 수 있다. 예를 들어, LNP 제형은 약 25:1 내지 약 1:25 범위의 Cas mRNA 대 gRNA 핵산의 비율을 포함할 수 있다. 대안적으로, 리포좀 또는 LNP 제형은 약 2:1 내지 약 1:2의 Cas mRNA 대 gRNA 핵산의 비율을 포함할 수 있다. 특정한 예에서, Cas mRNA 대 gRNA의 비율은 약 2:1일 수 있다.

[0897] 일부 리포좀 또는 LNP에서, 카고는 관심 폴리펩티드(예를 들어, 다중도메인 치료 단백질)를 인코딩하는 핵산 구축물 및 gRNA를 포함할 수 있다. 관심 폴리펩티드(예를 들어, 다중도메인 치료 단백질)를 인코딩하는 핵산 구축물 및 gRNA는 상이한 비율일 수 있다. 예를 들어, 리포좀 또는 LNP 제형은 약 25:1 내지 약 1:25 범위의 핵산 구축물 대 gRNA 핵산의 비율을 포함할 수 있다.

[0898] 적절한 LNP의 구체적인 예는 약 4.5의 질소-대-포스페이트(N/P) 비율을 가지고, 약 45:44:9:2 몰비(약 45:약 44:약 9:약 2)로 생물분해성 양이온성 지질, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG를 함유한다. 생물분해성 양이온성 지질은 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트로도 불리는 (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트일 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Finn et al. (2018) *Cell Rep.* 22 (9):2227-2235]을 참조하며, 그 전체는 모든 목적을 위해 본원에서 참조로 원용된다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:1(약 1:약 1)의 중량 비일 수 있다. 적절한 LNP의 또 다른 구체적 예는 약 50:38.5:10:1.5 몰비(약 50:약 38.5:약 10:약 1.5)의 Dlin-MC3-DMA(MC3), 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG-DMG를 함유한다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:2 중량 비(약 1:약 2)일 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:1 중량 비(약 1:약 1)일 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 2:1 중량 비(약 2:약 1)일 수 있다.

[0899] 적절한 LNP의 또 다른 구체적 예는 약 6의 질소-대-포스페이트(N/P) 비율을 갖고, 약 50:38:9:3 몰비(약 50:약 38:약 9:약 3)로 생물분해성 양이온성 지질, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG를 함유한다. 생물분해성 양이온성 지질은 지질 A(3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트로도 불리는 (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트)일 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:2 중량 비(약 1:약 2)일 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:1 중량 비(약 1:약 1)일 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 2:1(약 2:약 1) 중량 비일 수 있다.

[0900] 적절한 LNP의 또 다른 구체적 예는 약 3의 질소-대-포스페이트(N/P) 비율을 갖고, 약 50:10:38.5:1.5 비율(약 50:약 10:약 38.5:약 1.5) 또는 약 47:10:42:1 비율(약 47:약 10:약 42:약 1)로 양이온성 지질, 구조적 지질, 콜레스테롤(예를 들어, 콜레스테롤(양)(Avanti 700000)), 및 PEG2k-DMG(예를 들어, PEG-DMG 2000(NOF America-SUNBRIGHT® GM-020(DMG-PEG))를 함유한다. 구조적 지질은, 예를 들어, DSPC(예를 들어, DSPC(Avanti 850365)), SOPC, DOPC, 또는 DOPE일 수 있다. 양이온성/이온화가능 지질은, 예를 들어, Dlin-MC3-DMA(예를 들어, Dlin-MC3-DMA (Biofine International))일 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:2 중량 비(약 1:약 2)일

수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:1 중량 비(약 1:약 1)일 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 2:1 중량 비(약 2:약 1)일 수 있다.

[0901] 적절한 LNP의 또 다른 구체적 예는 약 45:9:44:2 비율(약 45:약 9:약 44:약 2)로 Dlin-MC3-DMA, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG 지질을 함유한다. 적절한 LNP의 또 다른 구체적 예는 약 50:10:39:1 비율(약 50:약 10:약 39:약 1)로 Dlin-MC3-DMA, DOPE, 콜레스테롤, 및 PEG 지질 또는 PEG DMG를 함유한다. 적절한 LNP의 또 다른 구체적 예는 약 55:10:32.5:2.5 비율(약 55:약 10:약 32.5:약 2.5)로 Dlin-MC3-DMA, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG2k-DMG를 가진다. 적절한 LNP의 또 다른 구체적 예는 약 50:10:38.5:1.5 비율(약 50:약 10:약 38.5:약 1.5)로 Dlin-MC3-DMA, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG-DMG를 가진다. 적절한 LNP의 또 다른 구체적 예는 약 50:10:38.5:1.5 비율(약 50:약 10:약 38.5:약 1.5)로 Dlin-MC3-DMA, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG-DMG를 가진다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:2 중량 비(약 1:약 2)일 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 1:1 중량 비(약 1:약 1)일 수 있다. Cas9 mRNA는 가이드 RNA에 대해 약 2:1 중량 비(약 2:약 1)일 수 있다.

[0902] 적절한 LNP의 다른 예는, 예를 들어, WO 2019/067992, WO 2020/082042, US 2020/0270617, WO 2020/082041, US 2020/0268906, WO 2020/082046(예를 들어, 85-86 페이지를 참고), 및 US 2020/0289628에서 확인될 수 있고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0903] 동적 광 산란("DLS")은 다분산 지수("PDI") 및 리포좀 및 LNP의 크기를 특징화하도록 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, PDI는 약 0.005 내지 약 0.75의 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, PDI는 약 0.01 내지 약 0.5의 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, PDI는 약 0.02 내지 약 0.4의 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, PDI는 약 0.03 내지 약 0.35의 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서, PDI는 약 0.1 내지 약 0.35의 범위일 수 있다.

[0904] 본원에 개시된 LNP는 약 1 내지 약 250 nm의 크기를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, LNP는 약 10 내지 약 200 nm의 크기를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, LNP는 약 20 내지 약 150 nm의 크기를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, LNP는 약 50 내지 약 150 nm의 크기를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, LNP는 약 50 내지 약 100 nm의 크기를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, LNP는 약 50 내지 약 120 nm의 크기를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, LNP는 약 75 내지 약 150 nm의 크기를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, LNP는 약 30 내지 약 200 nm의 크기를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 완전히 형성된 나노입자의 평균 사이즈(직경)는 Malvern Zetasizer 상에서 동적 광 산란에 의해 측정된다(예를 들어, 나노입자 샘플은 계수율이 대략 200-400 kcts이도록 포스페이트 완충 용액(PBS) 중에 희석되고, 데이터는 강도 측정의 가중-평균으로서 제시될 수 있음).

[0905] 일부 실시양태에서, 리포좀 또는 LNP는 약 50% 내지 약 100% 범위의 평균 캡슐화 효율로 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 리포좀 또는 LNP는 약 50% 내지 약 70% 범위의 평균 캡슐화 효율로 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 리포좀 또는 LNP는 약 70% 내지 약 90% 범위의 평균 캡슐화 효율로 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 리포좀 또는 LNP는 약 90% 내지 약 100% 범위의 평균 캡슐화 효율로 형성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 리포좀 또는 LNP는 약 75% 내지 약 95% 범위의 평균 캡슐화 효율로 형성될 수 있다.

[0906] 리포좀 및 LNP 외에도, 본원에 개시된 항-TfR 항원 결합 단백질, 예컨대 scFv 또는 항체 또는 이의 항원-결합 단편은, 핵산 및/단백질 분자의 전달을 위해 다른 담체에 접합될 수 있다. 다른 적절한 담체의 예는, 비제한적으로, 리포이드 및 리포플렉스, 입자 또는 중합체 나노입자, 무기 나노입자, 펩티드 담체, 나노입자 모방체, 나노튜브, 접합체, 면역 자극 복합체(ISCOM), 바이러스-유사 입자(VLP), 자가-조립 단백질, 또는 에멀션 전달 시스템, 예컨대 양이온성 서브마이크론 수중유 에멀션을 포함한다.

[0907] 중합체 마이크로입자 또는 나노입자는 또한 폴리펩티드(예를 들어, Cas 단백질) 또는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 가이드 RNA)를 캡슐화 또는 흡착하는 데 사용될 수 있다. 입자는 실질적으로 비-독성 및 생물분해성일 수 있다. 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 가이드 RNA)를 전달하는 데 유용한 입자는 최적의 크기 및 제타 전위를 가질 수 있다. 예를 들어, 마이크로입자는 0.02 μm 내지 8 μm 범위의 직경을 가질 수 있다. 조성물이 상이한 직경을 갖는 마이크로- 또는 나노입자의 집단을 갖는 경우에, 이들의 입자 중 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%는 0.03-7 μm의 범위의 직경을 가진다. 입자는 또한, 입자에 대해 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 가이드 RNA)의 최대 흡착을 제공하기 위해 40-100 mV의 제타 전위를 가질 수 있다.

[0908] 비독성 및 생물분해성 중합체는, 비제한적으로, 폴리(무하이드록시산), 폴리하이드록시 부티르산, 폴리락톤(폴리카프로락톤을 포함함), 폴리디옥사논, 폴리발레로락톤, 폴리오쏘에스테르, 폴리무수물, 폴리시아노아크릴레이트, 티로신-유래된 폴리카보네이트, 폴리비닐-피롤리디논 또는 폴리에스테르-아미드, 하나 이상의 자연 중합체, 예컨대 다당류, 예를 들어 풀룰란, 알기네이트, 이눌린, 및 키토산, 및 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시양태

에서, 입자는 폴리(무하이드록시산), 예컨대 폴리(락타이드)(PLA), 폴리(g-글루탐산)(g-PGA), 폴리(에틸렌 글리콜)(PEG), 폴리스티렌, 락타이드 및 글리콜라이드의 공중합체, 예컨대 폴리(D,L-락타이드-코-글리콜라이드)(PLG), 및 D,L-락타이드 및 카프로락톤의 공중합체로부터 형성된다. 유용한 PLG 중합체는, 예를 들어, 20:80 내지 80:20의 범위, 예를 들어, 25:75, 40:60, 45:55, 55:45, 60:40, 75:25의 락타이드/글리콜라이드 몰비를 갖는 것들을 포함할 수 있다. 유용한 PLG 중합체는, 예를 들어, 5,000-200,000 Da, 예를 들어, 10,000-100,000, 20,000-70,000, 40,000-50,000 Da의 분자량을 갖는 것들을 포함한다.

[0909] 중합체 나노입자는 또한 유연한 메쉬 크기, 다가 접합을 위한 넓은 표면적, 높은 수분 함량, 및 항원에 대한 높은 로딩 용량을 포함하는 유리한 특성을 갖는 하이드로겔 나노입자, 친수성 3차원 중합체 네트워크를 형성할 수 있다. 중합체, 예컨대 폴리(L-락트산)(PLA), PLGA, PEG, 및 다당류는 하이드로겔 나노입자를 형성하기에 적합하다.

[0910] 예를 들어, 무기 나노입자는 칼슘 포스페이트 나노입자, 실리콘 나노입자 또는 금 나노입자일 수 있다. 무기 나노입자는 전형적으로 강성 구조를 갖고, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드가 캡슐화되는 쉘, 또는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드가 공유결합으로 부착될 수 있는 코어를 포함한다. 코어는 하나 이상의 원자, 예컨대 금(Au), 은(Ag), 구리(Cu) 원자, Au/Ag, Au/Cu, Au/Ag/Cu, Au/Pt, Au/Pd 또는 Au/Ag/Cu/Pd 또는 칼슘 포스페이트(CaP)를 포함할 수 있다.

[0911] 본 개시내용의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드와 복합체화하는 데 적절한 다른 분자는 양이온성 분자, 예컨대, 폴리아미도아민, 수지상 폴리라이신, 폴리에틸렌 이리닌 또는 폴리프로필렌 이민, 폴리라이신, 키토산, DNA-젤라틴 코아세르베이트, DEAE 덱스트란, 덴드리머, 또는 폴리에틸렌이민(PEI)을 포함한다.

[0912] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 나노입자에 접합될 수 있다. 본 개시내용의 항원 및/또는 항체와의 접합을 위해 사용될 수 있는 나노입자는, 비제한적으로, 키토산-쉘 나노입자, 탄소 나노튜브, 페길화된 리포좀, 폴리(d,l-락타이드-코-글리콜라이드)/몬모릴로나이트(PLGA/MMT) 나노입자, 폴리(락타이드-코-글리콜라이드)(PLGA) 나노입자, 폴리-(말산)-기반 나노입자, 및 다른 무기 나노입자(예를 들어, 마그네슘-알루미늄 층상 이중 하이드록사이드와 디석신이미딜 카보네이트(DSC)로 만들어진 나노입자, 및 TiO_2 나노입자)를 포함한다. 나노입자는 개발되고, 바이러스-감염 세포를 표적화하기 위한 조성물에 포함된 항원 및/또는 항체에 접합될 수 있다.

[0913] 수중유 에멀션은 또한 대상체에 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)를 전달하는 데 사용될 수 있다. 에멀션을 제조하는 데 유용한 오일의 예는 동물성(예를 들어, 어류) 오일 또는 식물성 오일(예를 들어, 견과류, 곡물 및 종자)을 포함한다. 오일은 생물분해성 및 생체적합성일 수 있다. 예시적인 오일은, 비제한적으로, 토코페롤 및 스쿠알렌, 분지형 불포화 테르페노이드(terpenoid)인 상어 간 오일(shark liver oil) 및 이들의 조합을 포함한다. 테르페노이드는 5-탄소 이소프렌 단위로 생화학적으로 합성된 분지쇄 오일이다.

[0914] 에멀션의 수성 구성요소는 물일 수 있거나, 추가적인 구성요소가 첨가된 물일 수 있다. 예를 들어, 이는 완충액을 형성하기 위한 염, 예를 들어, 시트레이트 또는 포스페이트 염, 예컨대 나트륨 염을 포함할 수 있다. 예시적인 완충액은 보레이트 완충액, 시트레이트 완충액, 히스티딘 완충액, 포스페이트 완충액, Tris 완충액, 또는 석시네이트 완충액을 포함한다.

[0915] 일부 실시양태에서, 수중유 에멀션은 하나 이상의 양이온성 분자를 포함한다. 예를 들어, 양이온성 지질은 음전하 폴리뉴클레오티드(예를 들어, mRNA)가 부착될 수 있는 양전하 액적 표면을 제공하기 위해 에멀션에 포함될 수 있다. 예시적인 양이온성 지질은, 비제한적으로 1,2-디올레오일옥시-3-(트리메틸암모니오)프로판(DOTAP), 1,2-디미리스토일-3-트리메틸-암모늄프로판(DMTAP), 3'-[N-(N',N'-디메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤(DC 콜레스테롤), 디메틸디옥타데실-암모늄(DDA, 예를 들어, 브로마이드), 디팔미토일(C16:0)트리메틸 암모늄 프로판(DPTAP), 디스테아로일트리메틸암모늄 프로판(DSTAP)을 포함한다. 다른 유용한 양이온성 지질은 벤즈알코늄 클로라이드(BAK), 벤제토늄 클로라이드, 콜레스테롤 헤미석시네이트 콜린 에스테르, 리포폴리아민(예를 들어, 디옥타데실아미도글리실스퍼민(DOGS), 디팔미토일 포스파티딜에탄올-아미도스퍼민(DPPES)), 세트라미드, 세틸피리디늄 클로라이드(CPC), 세틸 트리메틸암모늄 클로라이드(CTAC), 콜레스테롤의 양이온성 유도체(예를 들어, 콜레스테릴-3.베타.-옥시석신아미도에틸렌트리메틸암모늄 염, 콜레스테릴-3.베타.-옥시석신아미도에틸렌-디메틸아민, 콜레스테릴-3.베타.-카복시아미도에틸렌트리메틸암모늄 염, 및 콜레스테릴-3.베타.-카복시아미도에틸렌디메틸아민), N,N',N'-폴리옥시에틸렌 (10)-N-탈로우-1,3-디아미노프로판, 도데실트리메틸암모늄 브로마이드, 헥사데실트리메틸-암모늄 브로마이드, 혼합된 알킬-트리메틸-암모늄 브로마이드, 벤질디메틸도데실암모늄 클로라이드, 벤질디메틸헥사데실-암모늄 클로라이드, 벤질트리메틸암모늄 메톡사이드, 세틸디메틸에틸암모늄

브로마이드, 디메틸디옥타데실 암모늄 브로마이드(DDAB), 메틸벤제토늄 클로라이드, 데카메토늄 클로라이드, 메틸 혼합된 트리알킬 암모늄 클로라이드, 메틸 트리옥틸암모늄 클로라이드), N,N-디메틸-N-[2 (2-메틸-4-(1,1,3,3테트라메틸부틸)-페녹시]-에톡시)에틸]-벤젠메타-나미늄 클로라이드(DEBDA), 콜레스테릴(4'-트리메틸암모니오) 부타노에이트), N-알킬 피리디늄 염(예를 들어, 세틸피리디늄 브로마이드 및 세틸피리디늄 클로라이드), N-알킬피페리디늄 염, 이양이온성 볼라폼 전해질(C12Me6; C12BU6), 디알킬글리세틸포스포릴콜린, 리소레시틴, L-알파.디올레오일포스파티딜에탄올아민, 리포폴리-L(또는 D)-라이신(LPLL, LPDL), N-글루타릴포스파티딜에탄올아민에 접합된 폴리(L (또는 D)-라이신, 디알킬디메틸암모늄 염, [1-(2,3-디올레일옥시)-프로필]-N,N,N,트리메틸암모늄 클로라이드, 1,2-디아실-3-(트리메틸암모니오) 프로판(아실 기는 디미리스토일, 디팔미토일, 디스테아로일, 또는 디올레오일일 수 있음), 1,2-디아실-3(디메틸암모니오)프로판(아실 기는 디미리스토일, 디팔미토일, 디스테아로일, 또는 디올레일일 수 있음), 1,2-디올레오일-3-(4'-트리메틸-암모니오)부타노일-sn-글리세롤, 1,2-디올레오일 3-석시닐-sn-글리세롤 콜린 에스테르, 디도데실 글루타메이트 에스테르와 펜던트 아미노 기(C GluPhCnN), 및 디테트라데실 글루타메이트 에스테르와 펜던트 아미노 기(C14GluCnN+)를 포함한다.

[0916] 일부 실시양태에서, 오일 및 양이온성 지질 외에도, 에멀전은 또한 비-이온성 계면활성제 및/또는 양쪽성 계면활성제를 포함할 수 있다. 유용한 계면활성제의 예는, 비제한적으로, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 계면활성제, 예를 들어, 폴리소르베이트 20 및 폴리소르베이트 80; 에틸렌 옥사이드, 프로필렌 옥사이드, 및/또는 부틸렌 옥사이드의 공중합체, 선형 블록 공중합체; 인지질, 예를 들어, 포스파티딜콜린; 라우릴, 세틸, 스테아릴 및 올레일 알코올로부터 유래된 폴리옥시에틸렌 지방 에테르; 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에테르; 옥톡시놀; (옥틸페녹시)폴리에톡시에탄올; 및 소르비탄 에스테르를 포함한다.

[0917] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드 복합체, 예컨대, 비제한적으로, 나노입자(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 자가-조립된 나노입자, 중합체-기반 자가-조립된 나노입자, 무기 나노입자, 지질 나노입자, 반도체/금속 나노입자), 겔 및 하이드로겔, 양이온 및 음이온을 갖는 폴리뉴클레오티드 복합체, 마이크로입자, 및 이들의 임의의 조합 내로 혼입될 수 있다. 폴리뉴클레오티드 복합체는, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 또는 나노입자/하이드로겔/마이크로입자에 대한 연결을 통해 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합될 수 있다.

[0918] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 자가-조립된 나노입자로서 제형화될 수 있다. 비-제한적인 예로서, 폴리뉴클레오티드는 폴리뉴클레오티드를 위한 전달 시스템에서 사용될 수 있는 나노입자를 만들기 위해 사용될 수 있다(예를 들어, PCT 공개 번호 WO2012/125987 참고). 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 자가-조립된 나노입자는 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드의 코어 및 중합체 쉘을 포함할 수 있다. 중합체 쉘은 본원에 기재된 중합체 중 임의의 것일 수 있고, 당업계에 공지되어 있다. 추가적인 실시양태에서, 중합체 쉘은 코어 내의 폴리뉴클레오티드를 보호하는 데 사용될 수 있다.

[0919] 일부 실시양태에서, 자가-조립된 나노입자는 마이크로스폰지로 자가-조립되기 전에 결정질 "주름진" 시트로 형성되는 폴리뉴클레오티드 헤어핀의 긴 중합체로 형성된 마이크로스폰지일 수 있다. 이들 마이크로스폰지는 효율적인 담체로서 기능할 수 있고 세포로 카고를 전달할 수 있는 마이크로입자와 같은 조밀하게-패킹된 스폰지이다. 마이크로스폰지는 직경이 1 μm 내지 300 nm일 수 있다. 마이크로스폰지는 더 큰 마이크로스폰지를 형성하기 위해 당업계에 공지된 다른 약제와 복합체화될 수 있다. 비-제한적인 예로서, 마이크로스폰지는, 약제, 예컨대 합성고분자 폴리에틸렌이민(PEI)과 복합체화되어서 외부 층을 형성하여 세포 섭취를 촉진시킬 수 있다. 이 복합체는 높은 온도(150℃)에서 안정하게 유지될 수 있는 250-nm 직경 입자를 형성할 수 있다(문헌 [Grabow and Jaegar, Nature Materials 2012, 11:269-269]). 추가적으로, 이들 마이크로스폰지는 리보뉴클레아제에 의한 분해로부터 특별한 정도의 보호를 나타낼 수 있다. 실시양태에서, 중합체-기반 자가-조립된 나노입자, 예컨대, 비제한적으로, 마이크로스폰지는 완전 프로그래밍 가능한 나노입자일 수 있다. 나노입자의 기하학적 구조, 크기 및 화학양론은 카고, 예컨대, 비제한적으로, 폴리뉴클레오티드의 전달을 위한 최적의 나노입자를 생성하도록 정밀하게 제어될 수 있다.

[0920] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 무기 나노입자로 제형화될 수 있다(미국 특허 번호 8,257,745를 참조함) 무기 나노입자는, 비제한적으로, 물 팽윤성있는 점토 물질을 포함할 수 있다. 비-제한적인 예로서, 무기 나노입자는 단순 실리케이트로부터 제조된 합성 스멕타이트 점토를 포함할 수 있다(미국 특허 번호 5,585,108 및 8,257,745를 참조함).

[0921] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 반도체 또는 금속 물질을 포함하는 물-분산성 나노입자로 제형화되거나(그 전체가 본원에 참조로 원용되는 미국 특허 출원 공개 번호 2012/0228565) 자성 나노입자로

형성될 수 있다(미국 특허 출원 공개 번호 2012/0265001 및 2012/0283503). 물-분산성 나노입자는 소수성 나노입자 또는 친수성 나노입자일 수 있다.

[0922] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 대상체 내로 주입될 때 겔을 형성할 수 있는 당업계에 공지된 임의의 하이드로겔 내로 캡슐화될 수 있다. 하이드로겔은 친수성인 중합체 쇄의 네트워크이고, 때때로 물이 분산매인 콜로이드 겔로서 발견된다. 하이드로겔은 고흡수성(99% 초과의 물을 함유할 수 있음)의 자연 또는 합성 중합체이다. 하이드로겔은 또한, 이의 상당한 수분 함량으로 인해 자연 조직과 매우 유사한 유연성의 정도를 갖는다. 본원에 기재된 하이드로겔은 생체적합성, 생물분해성 및/또는 다공성인 지질 나노입자를 캡슐화하는 데 사용될 수 있다.

[0923] 비-제한적인 예로서, 하이드로겔은 압타머-작용화된 하이드로겔일 수 있다. 압타머-작용화된 하이드로겔은 폴리뉴클레오티드 하이브리드화를 사용하여 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 방출하도록 프로그래밍될 수 있다. (문헌[Battig *et al.*, J. Am. Chem. Society. 2012 134:12410-12413]). 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자 내에 캡슐화될 수 있고, 이어서 지질 나노입자는 하이드로겔 내로 캡슐화될 수 있다.

[0924] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 피브린 겔, 피브린 하이드로겔 또는 피브린 글루 내로 캡슐화될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 피브린 겔, 피브린 하이드로겔 또는 피브린 글루 내로 캡슐화되기 전에, 지질 나노입자로 제형화되거나 지질 나노입자가 신속하게 제거될 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 피브린 겔, 하이드로겔 또는 피브린 글루 내로 캡슐화되기 전에 리포플렉스로서 제형화될 수 있다. 피브린 겔, 하이드로겔 및 글루는 칼슘이 풍부한 피브리노겐 용액 및 트롬빈 용액인 2개의 구성요소를 포함한다(예를 들어, 문헌[Spicer and Mikos, Journal of Controlled Release 2010. 148: 49-55]; [Kidd *et al.* Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85] 참고). 피브린 겔, 하이드로겔 및/또는 글루의 구성요소의 농도는, 겔, 하이드로겔 및/또는 글루의 특성, 네트워크 메쉬 사이즈, 및/또는 분해 특성을 변화시키도록, 예컨대, 비제한적으로 피브린 겔, 하이드로겔 및/또는 글루의 방출 특성을 변화시키도록 변경될 수 있다(예를 들어, 문헌[Spicer and Mikos, Journal of Controlled Release 2010. 148: 49-55]; [Kidd *et al.* Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85]; [Catelas *et al.* Tissue Engineering 2008. 14:119-128] 참고). 이 특징은 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드를 전달하는 데 사용될 때 유리할 수 있다. (예를 들어, 문헌[Kidd *et al.* Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85]; [Catelas *et al.* Tissue Engineering 2008. 14:119-128] 참고).

[0925] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 양이온 또는 음이온을 포함할 수 있다. 하나의 실시양태에서, 제형은 금속 양이온, 예컨대, 비제한적으로, Zn^{2+}, Ca^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+} 및 이들의 조합을 포함한다. 비-제한적인 예로서, 제형은 중합체, 및 금속 음이온과 복합체화된 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다(미국 특허 번호 6,265,389 및 6,555,525를 참조함).

[0926] 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 나노입자 및/또는 마이크로입자로 제형화될 수 있다. 이들 나노입자 및/또는 마이크로입자는 임의의 크기 형상 및 화학물질로 성형될 수 있다. 예로서, 나노입자 및/또는 마이크로입자는 LIQUIDA TECHNOLOGIES(Morrisville, N.C.)에 의한 PRINT® 기술을 사용하여 제조될 수 있다 (예를 들어, 국제 특허 공개 번호 WO2007/024323 참고).

[0927] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 Keystone Nano(State College, Pa.)에 의한 나노자켓(NanoJaket) 및 나노리포좀(NanoLiposome)으로 제형화될 수 있다. 나노자켓은 칼슘, 포스페이트를 포함하는 신체에서 자연적으로 발견되는 화합물로 만들어지고, 또한 소량의 실리케이트를 포함할 수 있다. 나노자켓은 5 내지 50 nm의 크기 범위일 수 있고, 친수성 및 소수성 화합물, 예컨대, 비제한적으로, 폴리뉴클레오티드, 1차 구축물 및/또는 폴리뉴클레오티드를 전달하는 데 사용될 수 있다. 나노리포좀은 지질, 예컨대, 비제한적으로, 신체에서 자연적으로 발생하는 지질로 만들어진다. 나노리포좀은 60-80 nm의 크기 범위일 수 있고, 친수성 및 소수성 화합물, 예컨대, 비제한적으로, 폴리뉴클레오티드, 1차 구축물 및/또는 폴리뉴클레오티드를 전달하는 데 사용될 수 있다. 하나의 양태에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 나노리포좀, 예컨대, 비제한적으로, 세라마이드 나노리포좀(Ceramide NanoLiposome)으로 제형화된다.

[0928] 유전자 편집 시스템

[0929] 다양한 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고는 유전자 편집 시스템 또는 이러한 시스템의 구성요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, CRISPR(Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats)/Cas 시스템; 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 시스템; 전사 활성화인자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 시스템, 또는 메가뉴클레아제,

제한 엔도뉴클레아제, 또는 재조합효소를 사용하는 시스템을 포함하는, 다양한 공지된 유전자 편집 시스템이 본원에 기재된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 일반적으로, 이들 유전자 편집 시스템은 표적 DNA 서열에서 이중 가닥 절단(DSB) 또는 닉(예를 들어, 단일 가닥 절단, 또는 SSB)을 유도함으로써 세포 내에 게놈을 변형시키는 데 사용된다. 절단 또는 닉은 특정한 뉴클레아제, 예컨대 조작된 ZFN, TALEN의 사용을 통해, 또는 조작된 가이드 RNA(gRNA)와 함께 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 표적 DNA 서열의 특이적 절단 또는 닉을 안내함으로써 발생할 수 있다. 또한, 표적화된 뉴클레아제가 개발되었고, 추가의 뉴클레아제가, 예를 들어, 아르고나우트(Argonaute) 시스템(예를 들어, 'TtAgo'로 공지된, *T. 써모필루스*로부터, 문헌[Swarts et al (2014) Nature 507(7491): 258-261] 참고)에 기초하여 개발되고 있으며, 이는 게놈 편집 및 유전자 요법에 사용하기 위한 가능성을 가질 수도 있다.

[0930] DNA의 결실은 표적 유전자를 녹아웃(knock-out) 또는 파괴하기 위해 유전자 편집 시스템을 사용하여 수행될 수 있다. 녹아웃은 유전자 녹다운(knock-down)일 수 있거나, 당업계에 공지된 기법에 의한 돌연변이, 예컨대 점 돌연변이, 삽입, 결실, 프레임시프트, 또는 미스센스 돌연변이에 의해 유전자가 녹아웃될 수 있다. 대안적으로, 외인성 유전자의 녹인(knock-in) 또는 결함 유전자의 교정 유전자로의 대체는 또한 유전자 편집 시스템으로 달성될 수 있다. 이러한 경우에서, 게놈 유전자좌 내로 삽입될 이종 유전자를 운반하는 공여체 주형은 유전자 편집 시스템과 함께 제공된다. 공여체 주형은 전형적으로 유전자 편집 시스템에 의해 표적화되는 게놈 유전자좌에 상응하는 상동성 암을 포함할 것이다.

[0931] 유전자 편집 시스템 또는 이의 구성요소(들)(예를 들어, Cas 단백질, 가이드 RNA)을 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체에 혼입시키는 다양한 방법이 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 편집 시스템 또는 이의 구성요소(들)(예를 들어, Cas 단백질 또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산(예를 들어, mRNA 또는 DNA), 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA)는 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합되는 리포좀 또는 LNP와 같은 기재된 담체에 로딩된다. 일부 실시양태에서, 가이드 RNA 또는 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA는 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 유전자 편집 뉴클레아제(예를 들어, Cas 단백질, ZFN, TALEN) 또는 유전자 편집 뉴클레아제를 인코딩하는 하나 이상의 핵산(예를 들어, mRNA 또는 DNA)은 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 가이드 RNA(또는 가이드 DNA를 인코딩하는 DNA) 및 Cas 단백질(또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산(예를 들어, mRNA 또는 DNA)) 둘 다는 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 가이드 RNA(또는 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA)는 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합되고, Cas 단백질(또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산(예를 들어, mRNA 또는 DNA))은 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합되는 리포좀 또는 LNP와 같은 기재된 담체에 로딩된다. 일부 실시양태에서, Cas 단백질(또는 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산(예를 들어, mRNA 또는 DNA))은 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합되고, 가이드 RNA(또는 가이드 RNA를 인코딩하는 DNA)는, 기재된 담체, 예컨대 리포좀 또는 LNP에 로딩되며, 이는 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다.

[0932] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 분자 카고는 CRISPR/Cas 시스템 또는 이러한 시스템의 구성요소를 포함할 수 있다. CRISPR/Cas 시스템은 Cas 유전자의 발현에 관련되거나, 이의 활성을 지시하는 전사체 및 기타 요소를 포함한다. CRISPR/Cas 시스템은, 예를 들어, I형, II형, 또는 III형 시스템일 수 있다. 대안적으로, CRISPR/Cas 시스템은 V형 시스템(예를 들어, 아형 V-A 또는 아형 V-B)일 수 있다. 본원에 개시된 방법 및 조성물은 핵산의 부위-지향 절단을 위해 CRISPR 복합체(Cas 단백질과 복합체화된 가이드 RNA(gRNA)를 포함함)를 활용함으로써 CRISPR/Cas 시스템을 이용할 수 있다.

[0933] Cas 단백질은 일반적으로 가이드 RNA와 상호작용할 수 있는 적어도 하나의 RNA 인식 또는 결합 도메인을 포함한다. Cas 단백질은 또한 뉴클레아제 도메인(예를 들어, DNase 도메인 또는 RNase 도메인), DNA-결합 도메인, 헬리카아제 도메인, 단백질-단백질 상호작용 도메인, 이량체화 도메인, 및 다른 도메인을 포함할 수 있다. 일부 이러한 도메인(예를 들어, DNase 도메인)은 천연 Cas 단백질로부터 유래될 수 있다. 다른 이러한 도메인은 변형된 Cas 단백질을 만들기 위해 첨가될 수 있다. 뉴클레아제 도메인은 핵산 분자의 공유 결합의 파괴를 포함하는 핵산 절단을 위한 촉매작용 활성을 소유한다. 절단은 둔단부 또는 엇갈린 단부를 생성할 수 있고, 이는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 예를 들어, 야생형 Cas9 단백질은 전형적으로 둔단 절단 생성물을 생성할 것이다. 대안적으로, 야생형 Cpf1 단백질(예를 들어, FnCpf1)은 5-뉴클레오티드 5' 오버행을 갖는 절단 생성물을 야기할 수 있되, 절단은 비-표적화된 가닥 상의 PAM 서열로부터의 18번째 염기 페어링 후에 및 표적화된 가닥 상의 23번째 염기 후에 발생한다. Cas 단백질은 표적 게놈 유전자좌에서 이중-가닥 절단(예를 들어, 둔단부를 갖는 이중-가닥 절단)을 생성하기 위해 완전 절단 활성을 가질 수 있거나, 이는 표적 게놈 유전자좌에서 단

일-가닥 절단을 생성하는 니카아제일 수 있다.

[0934] Cas 단백질의 예는 Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e(CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas9(Csn1 또는 Csx12), Cas10, Cas10d, CasF, CasG, CasH, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1(CasA), Cse2(CasB), Cse3(CasE), Cse4(CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, 및 Cu1966, 및 이의 동족체 또는 변형된 버전을 포함한다.

[0935] 예시적인 Cas 단백질은 Cas9 단백질 또는 Cas9 단백질로부터 유래된 단백질이다. Cas9 단백질은 II형 CRISPR/Cas 시스템으로부터 유래되고 전형적으로 보존된 아키텍처와 함께 4개의 키 모티프를 공유한다. 모티프 1, 2, 및 4는 RuvC-유사 모티프이고, 모티프 3은 HNH 모티프이다. 예시적인 Cas9 단백질은 *스트렙토코쿠스 파이오제네스*, *스트렙토코쿠스 써모필루스*, *스트렙토코쿠스 속*, *스타필로코쿠스 아우레우스*, *노카디옵시스 다손빌레이(Nocardiopsis dassonvillei)*, *스트렙토마이세스 프리스티나에스피랄리스(Streptomyces pristinaespiralis)*, *스트렙토마이세스 비리도크로모제네스(Streptomyces viridochromogenes)*, *스트렙토마이세스 비리도크로모제네스*, *스트렙토스포랑기움 로세움(Streptosporangium roseum)*, *스트렙토스포랑기움 로세움*, *알리사이클로바실러스 아시도칼다리우스(Alicyclobacillus acidocaldarius)*, *바실러스 슈도마이코이데스(Bacillus pseudomycoides)*, *바실러스 셀레니티레두센스(Bacillus selenitireducens)*, *엑시구오박테리움 시비리쿰(Exiguobacterium sibiricum)*, *락토바실러스 델브루에키(Lactobacillus delbrueckii)*, *락토바실러스 살리바리우스(Lactobacillus salivarius)*, *마이크로실라 마리나(Microscilla marina)*, *버크홀데리알레스 박테리움(Burkholderiales bacterium)*, *폴라로모나스 나프탈레니보란스(Polaromonas naphthalenivorans)*, *폴라로모나스 속(Polaromonas sp.)*, *크로코스파에라 왓소니(Crocosphaera watsonii)*, *시아노테세 속(Cyanothece sp.)*, *마이크로시스티스 에루기노사(Microcystis aeruginosa)*, *시네코코쿠스 속(Synechococcus sp.)*, *아세토할로비움 아라바티쿰(Acetohalobium arabaticum)*, *암모니펙스 데겐시(Ammonifex degensii)*, *칼디셀룰로시럽토르 베치(Caldicelulosiruptor becscii)*, *칸디다투스 데술포루디스(Candidatus Desulforudis)*, *클로스티리디움 보툴리눔(Clostridium botulinum)*, *클로스트리디움 디피실레(Clostridium difficile)*, *피네골디아 마그나(Finegoldia magna)*, *나트라네로비우스 써모필루스(Natranaerobius thermophilus)*, *펠로토마쿨룸 써모프로피오니쿰(Pelotomaculum thermopropionicum)*, *아시디티오바실러스 칼두스(Acidithiobacillus caldus)*, *아시디티오바실러스 페로옥시단스(Acidithiobacillus ferrooxidans)*, *알로크로마티움 비노숨(Allochromatium vinosum)*, *마리노박터 속(Marinobacter sp.)*, *니트로소코쿠스 할로필루스(Nitrosococcus halophilus)*, *니트로소코쿠스 왓소니(Nitrosococcus watsoni)*, *슈도알테로모나스 할로플랑크티스(Pseudoalteromonas haloplanktis)*, *크테도노박터 라세미페르(Ktedonobacter racemifer)*, *메타노할로븀 에베스티가툼(Methanohalobium evestigatum)*, *아나바에나 바리아빌리스(Anabaena variabilis)*, *노듈라리아 스푸미게나(Nodularia spumigena)*, *노스톡 속(Nostoc sp.)*, *아르트로스피라 막시마(Arthrospira maxima)*, *아르트로스피라 플라텐시스(Arthrospira platensis)*, *아르트로스피라 속(Arthrospira sp.)*, *링비아 속(Lyngbya sp.)*, *마이크로콜레우스 크토노플라스테스(Microcoleus chthonoplastes)*, *오실레이토리아 속(Oscillatoria sp.)*, *페트로토가 모빌리스(Petrotoga mobilis)*, *써모시포 아프리카누스(Thermosipho africanus)*, *아카리오클로리스 마리나(Acaryochloris marina)*, *네이세리아 메닝기티디스(Neisseria meningitidis)*, 또는 *캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni)*로부터 유래한다. Cas9 패밀리 멤버의 추가적인 예는 WO 2014/131833에 기재되어 있고, 이는 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. *S. 파이오제네스*로부터의 Cas9(SpCas9)(예를 들어, 할당된 UniProt 수탁 번호 Q99ZW2)는 예시적인 Cas9 단백질이다. 더 작은 Cas9 단백질(예를 들어, 가이드 RNA 코딩 서열 및 Cas9 및 가이드 RNA를 위한 조절 요소와 조합될 때, 코딩 서열이 최대 AAV 패키징 용량과 양립할 수 있는 Cas9 단백질, 예컨대 SaCas9 및 CjCas9 및 Nme2Cas9)은 다른 예시적인 Cas9 단백질이다. 예를 들어, *S. 아우레우스*로부터의 Cas9(SaCas9)(예를 들어, 할당된 UniProt 수탁 번호 J7RUA5)는 또 다른 예시적인 Cas9 단백질이다. 마찬가지로, *캄필로박터 제주니*로부터의 Cas9(CjCas9)(예를 들어, 할당된 UniProt 수탁 번호 Q0P897)는 또 다른 예시적인 Cas9 단백질이다. 예를 들어 문헌[Kim et al. (2017) *Nat. Commun.* 8:14500]을 참조하고, 이는 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. SaCas9는 SpCas9보다 더 작고, CjCas9는 SaCas9 및 SpCas9 둘 다보다 작다. *네이세리아 메닝기티디스*로부터의 Cas9(Nme2Cas9)는 또 다른 예시적인 Cas9 단백질이다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌[Edraki et al. (2019) *Mol. Cell* 73(4):714-726]을 참고한다. *스트렙토코쿠스 써모필루스*로부터의 Cas9 단백질(예를 들어, CRISPR1 유전자좌로부터 인코딩된 *스트렙토코쿠스 써모필루스* LMD-9 Cas9(St1Cas9) 또는 CRISPR3 유전자좌로부터의 *스트렙토코쿠스 써모필루스* Cas9(St3Cas9))은 다른 예시적인 Cas9 단백질이다. 대체의 PAM(E1369R/E1449H/R1556A 치환)을 인식하는 *프란시셀라 노비시다(Francisella novicida)*로부터의 Cas9(FnCas9) 또는 RHA *프란시셀라 노비시다* Cas9 변이체는 다른 예시적인 Cas9 단백질이다.

이들 및 다른 예시적인 Cas9 단백질은 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌 [Cebrian-Serrano and Davies (2017) Mamm. *Genome* 28(7):247-261]에서 검토된다. Cas9 코딩 서열, Cas9 mRNA, 및 Cas9 단백질 서열의 예는 WO 2013/176772, WO 2014/065596, WO 2016/106121, WO 2019/067910, WO 2020/082042, US 2020/0270617, WO 2020/082041, US 2020/0268906, WO 2020/082046, 및 US 2020/0289628에서 제공되고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. ORF 및 Cas9 아미노산 서열의 구체적인 예는 WO 2019/067910의 문단 [0449]에서 표 30에 제공되고, Cas9 mRNA 및 ORF의 구체적인 예는 WO 2019/067910의 문단 [0214]-[0234]에 제공된다. 또한 WO 2020/082046 A2(84-85 페이지) 및 WO 2020/069296의 표 24를 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0936] Cas 단백질의 또 다른 예는 Cpf1(*프레보텔라(Prevotella)* 및 *프란시셀라* 1로부터의 CRISPR) 단백질이다. Cpf1은 Cas9의 특징적인 아르기닌-풍부 클러스터에 대한 대응물과 함께 Cas9의 상응하는 도메인에 상동성인 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인을 함유하는 거대 단백질(약 1300 아미노산)이다. 하지만, Cpf1은 Cas9 단백질에 존재하는 HNH 뉴클레아제 도메인이 결여되고, RuvC-유사 도메인은, HNH 도메인을 포함하는 긴 삽입물을 함유하는 Cas9과 대조적으로, Cpf1 서열에 인접해있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌 [Zetsche et al. (2015) *Cell* 163(3):759-771]을 참고한다. 예시적인 Cpf1 단백질은 *프란시셀라 툴라렌시스 (Francisella tularensis) 1, 프란시셀라 툴라렌시스 아종 노비시다, 프레보텔라 알벤시스(Prevotella albensis), 라크노스피라세아 박테리움(Lachnospiraceae bacterium) MC2017 1, 부티리비브리오 프로테오클라스티쿠스(Butyrivibrio proteoclasticus), 프레그리니박테리아 박테리움(Peregrinibacteria bacterium) GW2011_GWA2_33_10, 파쿠박테리아 박테리움(Parcubacteria bacterium) GW2011_GWC2_44_17, 스미텔라 속 (Smithella sp.) SCADC, 아시드아미노코쿠스 속(Acidaminococcus sp.) BV3L6, 라크노스피라세아 박테리움 (Lachnospiraceae bacterium) MA2020, 칸디다투스 메타노플라스마 테르미툼(Candidatus Methanoplasma termitum), 유박테리움 엘리겐스(Eubacterium eligens), 모락셀라 보보쿨리(Moraxella bovoculi) 237, 렙토스피라 이나다이(Leptospira inadai), 라크노스피라세아 박테리움(Lachnospiraceae bacterium) ND2006, 포르피로모나스 크레비오리카니스(Porphyromonas crevioricanis) 3, 프레보텔라 디시엔(Prevotella disiens)*, 및 *포르피로모나스 마카카에(Porphyromonas macacae)*로부터 유래된다. *프란시셀라 노비시다* U112로부터의 Cpf1(FnCpf1; 할당된 UniProt 수탁 번호 A0Q7Q2)은 예시적인 Cpf1 단백질이다.

[0937] Cas 단백질의 또 다른 예는 CasX(Cas12e)이다. CasX는 DNA에서 엇갈린 이중-가닥 절단을 생성하는 RNA-가이드된 DNA 엔도뉴클레아제이다. CasX는 크기가 1000 미만인 아미노산이다. 예시적인 CasX 단백질은 *델타프로테오박테리아(Deltaproteobacteria)*(DpbCasX 또는 DpbCas12e) 및 *플랑토마이세테스(Planctomycetes)*(PlmCasX 또는 PlmCas12e)로부터 유래된다. Cpf1과 같이, CasX는 DNA 절단을 위한 단일 RuvC 활성 부위를 사용한다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌[Liu et al. (2019) *Nature* 566(7743):218-223]을 참고한다.

[0938] Cas 단백질의 또 다른 예는 CasΦ(CasPhi 또는 Cas12j)이며, 이는 박테리오파지에서 고유하게 발견된다. CasΦ는 크기가 1000 미만의 아미노산이다(예를 들어, 700-800 아미노산). CasΦ 절단은 엇갈린 5' 오버행을 생성한다. CasΦ에서의 단일 RuvC 활성 부위는 crRNA 가공 및 DNA 컷팅이 가능하다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌[Pausch et al. (2020) *Science* 369(6501):333-337]을 참고한다.

[0939] Cas 단백질은 야생형 단백질(즉, 자연에서 발생하는 것들), 변형된 Cas 단백질(즉, Cas 단백질 변이체), 또는 야생형 또는 변형된 Cas 단백질의 단편일 수 있다. Cas 단백질은 또한 야생형 또는 변형된 Cas 단백질의 촉매작용 활성에 대한 활성 변이체 또는 단편일 수 있다. 촉매작용 활성에 대한 활성 변이체 또는 단편은 야생형 또는 변형된 Cas 단백질 또는 이의 부분에 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 초과의 서열 동일성을 포함할 수 있으며, 여기서 활성 변이체는 소망하는 절단 부위에서의 컷팅할 능력을 보유하고, 따라서 닉-유도 또는 이중-가닥-절단-유도 활성을 보유한다. 닉-유도 또는 이중-가닥-절단-유도 활성을 위한 검정이 공지되어 있고, 일반적으로 절단 부위를 함유하는 DNA 기재 상의 Cas 단백질의 전체 활성 및 특이성을 측정한다.

[0940] 변형된 Cas 단백질의 하나의 예는 변형된 SpCas9-HF1 단백질이고, 이는 비-특이적 DNA 접촉을 감소시키도록 설계된 변경(N497A/R661A/Q695A/Q926A)을 보유하는 *스트렙토코쿠스 파이오제네스* Cas9의 높은-충실도 변이체이다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌[Kleinstiver et al. (2016) *Nature* 529(7587):490-495]을 참고한다. 변형된 Cas 단백질의 또 다른 예는 비-표적 효과를 감소시키도록 설계된 변형된 eSpCas9 변이체(K848A/K1003A/R1060A)이다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌[Slaymaker et al. (2016) *Science* 351(6268):84-88]을 참고한다. 다른 SpCas9 변이체는 K855A 및

K810A/K1003A/R1060A를 포함한다. 이들 및 다른 변형된 Cas 단백질은, 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌[Cebrian-Serrano and Davies (2017) *Mamm. Genome* 28(7):247-261]에서 검토된다. 변형된 Cas9 단백질의 또 다른 예는 xCas9이며, 이는 PAM 서열의 확장된 범위를 인식할 수 있는 SpCas9 변이체이다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌[Hu et al. (2018) *Nature* 556:57-63]을 참고한다.

[0941] Cas 단백질은 핵산 결합 친화도, 핵산 결합 특이성, 및 효소적 활성 중 하나 이상을 증가시키거나 감소시키도록 변형될 수 있다. Cas 단백질은 또한 단백질의 임의의 다른 활성 또는 특성, 예컨대 안정성을 변화시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질의 하나 이상의 뉴클레아제 도메인은 변형, 결실, 또는 불활성화될 수 있거나, Cas 단백질은 단백질의 기능을 위해 필수적이지 않은 도메인을 제거하거나 Cas 단백질의 활성 또는 특성을 최적화하도록(예를 들어, 향상시키거나 감소시키도록) 절단될 수 있다.

[0942] Cas 단백질은 적어도 하나의 뉴클레아제 도메인, 예컨대 DNase 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 야생형 Cpf1 단백질은 일반적으로, 아마도 이량체 구성으로 표적 DNA의 양측의 가닥을 절단하는 RuvC-유사 도메인을 포함한다. 마찬가지로, CasX 및 CasΦ는 일반적으로 표적 DNA의 양측의 가닥을 절단하는 단일 RuvC-유사 도메인을 포함한다. Cas 단백질은 또한 적어도 2개의 뉴클레아제 도메인, 예컨대 DNase 도메인을 포함할 수 있다. 예를 들어, 야생형 Cas9 단백질은 일반적으로 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인 및 HNH-유사 뉴클레아제 도메인을 포함한다. RuvC 및 HNH 도메인은 각각 이중-가닥 DNA의 상이한 가닥을 컷팅하여 DNA에서 이중-가닥 절단을 만들 수 있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용되는 문헌[Jinek et al. (2012) *Science* 337(6096):816-821]을 참고한다.

[0943] 뉴클레아제 도메인의 하나 이상 또는 전부는 결실되거나 돌연변이되어서 이들은 더이상 기능적이지 않거나 감소된 뉴클레아제 활성을 갖지 않는다. 예를 들어, 뉴클레아제 도메인 중 하나가 Cas9 단백질에서 결실되거나 돌연변이되는 경우, 생성된 Cas9 단백질은 니카아제로 언급될 수 있고, 이중 가닥 표적 DNA 내에서 단일 가닥 절단을 생성할 수 있지만 이중 가닥 절단은 생성할 수 없다(즉, 이는 상보적 가닥 또는 비-상보적 가닥을 절단할 수 있지만, 둘 다는 안됨). 뉴클레아제 도메인 둘 다가 결실되거나 돌연변이되는 경우, 생성된 Cas 단백질(예를 들어, Cas9)은 이중-가닥 DNA의 양측의 가닥을 절단하는 감소된 능력을 가질 것이다(예를 들어, 뉴클레아제-널(null) 또는 뉴클레아제-불활성 Cas 단백질, 또는 촉매작용으로 사멸된 Cas 단백질(dCas)). 뉴클레아제 도메인 중 어느 것도 Cas9 단백질에서 결실되거나 돌연변이되지 않는 경우, Cas9 단백질은 이중-가닥-절단-유도 활성을 보유할 것이다. Cas9를 니카아제로 전환하는 돌연변이의 예는 *S. 파이오제네스*로부터의 Cas9의 RuvC 도메인에서의 D10A(Cas9의 위치 10에서 아스파르테이트에서 알라닌으로) 돌연변이이다. 마찬가지로, *S. 파이오제네스*로부터의 Cas9의 HNH 도메인에서, H939A(아미노산 위치 839에서 히스티딘에서 알라닌으로), H840A(아미노산 위치 840에서 히스티딘에서 알라닌으로), 또는 N863A(아미노산 위치 N863에서 아스파라긴에서 알라닌으로)는 Cas9를 니카아제로 전환할 수 있다. Cas9를 니카아제로 전환하는 돌연변이의 다른 예는 *S. 써모필루스*로부터의 Cas9로에 대한 상응하는 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 각각이 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌[Sapranauskas et al. (2011) *Genome Res.* 39(21):9275-9282] 및 WO 2013/141680을 참고한다. 이러한 돌연변이는 방법, 예컨대 부위-지향 돌연변이유발, PCR-매개된 돌연변이유발, 또는 총 유전자 합성을 사용하여 생성될 수 있다. 니카아제를 생성하는 다른 돌연변이의 예는, 예를 들어, WO 2013/176772 및 WO 2013/142578에서 찾을 수 있으며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 모든 뉴클레아제 도메인이 Cas 단백질에서 결실되거나 돌연변이되면(예를 들어, 뉴클레아제 도메인 둘 다 Cas9 단백질에서 결실되거나 돌연변이됨), 생성되는 Cas 단백질(예를 들어, Cas9)은 이중-가닥 DNA의 양측의 가닥을 절단하기 위한 감소된 능력을 가질 것이다(예를 들어, 뉴클레아제-널 또는 뉴클레아제-불활성 Cas 단백질). 하나의 구체적 예는 D10A/H840A *S. 파이오제네스* Cas9 이중 돌연변이체 또는 *S. 파이오제네스* Cas9와 최적으로 정렬될 때 또 다른 종으로부터의 Cas9에서의 상응하는 이중 돌연변이체이다. 또 다른 구체적 예는 D10A/N863A *S. 파이오제네스* Cas9 이중 돌연변이체 또는 *S. 파이오제네스* Cas9와 최적으로 정렬될 때 또 다른 종으로부터 Cas9에서의 상응하는 이중 돌연변이체이다.

[0944] xCas9의 촉매작용 도메인 내의 불활성화 돌연변이의 예는 SpCas9에 대해 상기 기재된 것들과 동일하다. *스타필로코쿠스 아우레우스* Cas9 단백질의 촉매작용 도메인에서 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지된다. 예를 들어, *스타필로코쿠스 아우레우스* Cas9 효소(SaCas9)는 위치 N580에서의 치환(예를 들어, N580A 치환) 또는 위치 D10에서의 치환(예를 들어, D10A 치환)을 포함하여 Cas 니카아제를 생성할 수 있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용되는 WO 2016/106236을 참고한다. Nme2Cas9의 촉매작용 도메인 내의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지된다(예를 들어, D16A 또는 H588A). St1Cas9의 촉매작용 도메인 내의 불활성화 돌연변

이의 예가 또한 공지된다(예를 들어, D9A, D598A, H599A, 또는 N622A). St3Cas9의 촉매작용 도메인 내의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지된다(예를 들어, D10A 또는 N870A). CjCas9의 촉매작용 도메인 내의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지된다(예를 들어, D8A 또는 H559A의 조합). FnCas9 및 RHA FnCas9의 촉매작용 도메인 내의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지된다(예를 들어, N995A).

[0945] Cpf1 단백질의 촉매작용 도메인 내의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지된다. *프란시셀라 노비시다* U112(FnCpf1), *아시드아미노코쿠스 속* BV3L6(AsCpf1), *라크노스피라세아 박테리움* ND2006(LbCpf1), 및 *모락셀라 보보쿨리* 237(MbCpf1 Cpf1)로부터의 Cpf1 단백질을 참조하여, 이러한 돌연변이는 AsCpf1의 위치 908, 993, 또는 1263 또는 Cpf1 오솔로그에서의 상응하는 위치, 또는 LbCpf1의 위치 832, 925, 947, 또는 1180 또는 Cpf1 오솔로그에서의 상응하는 위치에서의 돌연변이를 포함할 수 있다. 이러한 돌연변이는, 예를 들어 AsCpf1의 돌연변이 D908A, E993A, 및 D1263A 또는 Cpf1 오솔로그에서의 상응하는 돌연변이, 또는 LbCpf1의 D832A, E925A, D947A, 및 D1180A 또는 Cpf1 오솔로그에서의 상응하는 돌연변이 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 US 2016/0208243을 참고한다.

[0946] CasX 단백질의 촉매작용 도메인 내의 불활성화 돌연변이의 예가 또한 공지된다. *델타프로테오박테리아*로부터의 CasX 단백질을 참조하면, D672A, E769A, 및 D935A(개별적으로 또는 조합하여) 또는 다른 CasX 오솔로그에서의 상응하는 위치는 불활성화이다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌[Liu et al. (2019) *Nature* 566(7743):218-223]을 참고한다.

[0947] CasΦ 단백질의 촉매작용 도메인에서의 불활성화 돌연변이의 예가 공지된다. 예를 들어, D371A 및 D394A는, 단독으로 또는 조합하여, 불활성화 돌연변이이다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌[Pausch et al. (2020) *Science* 369(6501):333-337]을 참고한다.

[0948] Cas 단백질은 또한 융합 단백질로서 이종 폴리펩티드에 작동가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, Cas 뉴클레아제는 절단 도메인, 후생유전적 변형 도메인, 전사 활성화 도메인, 또는 전사 억제자 도메인에 융합될 수 있다. 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 WO 2014/089290을 참고한다. 전사 활성화 도메인의 예는 헤르페스 단순 바이러스 VP 16 활성화 도메인, VP64(이는 VP 16의 사량체 유도체임), NFKB p65 활성화 도메인, p53 활성화 도메인 1 및 2, CREB(cAMP 반응 요소 결합 단백질) 활성화 도메인, E2A 활성화 도메인, 및 NFAT(활성화된 T-세포의 핵 인자) 활성화 도메인을 포함한다. 다른 예는 Oct1, Oct-2A, SP1, AP-2, CTF1, P300, CBP, PCAF, SRC1, PvALF, ERF-2, OsGAI, HALF-1, C1, API, ARF-5, ARF-6, ARF-7, ARF-8, CPRF1, CPRF4, MYC-RP/GP, TRAB1PC4, 및 HSF1로부터의 활성화 도메인을 포함한다. 예를 들어, US 2016/0237456, EP3045537, 및 WO 2011/146121을 참조하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0949] 일부 경우에서, MS2-p65-HSF1과 페어링된 dCas9-VP64 융합 단백질을 포함하는 전사 활성화 시스템이 사용될 수 있다. 이러한 시스템에서 가이드 RNA는 이량체화된 MS2 박테리오파지 코트 단백질에 결합하도록 설계된 sgRNA 테트라루프 및 스템-루프 2에 첨부된 압타머 서열로 설계될 수 있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌[Konermann et al. (2015) Nature 517(7536):583-588]을 참고한다.

[0950] 전사 억제자 도메인의 예는 유도성 cAMP 조기 억제자(ICER) 도메인, 크루펠-연관 박스 A(Kruppel-associated box A)(KRAB-A) 억제자 도메인, YY 1 글리신 풍부 억제자 도메인, Spl-유사 억제자, E(spl) 억제자, IKB 억제자, 및 MeCP2를 포함한다. 다른 예는 A/B, KOX, TGF-베타-유도성 조기 유전자(TIEG), v-erbA, SID, SID4X, MBD2, MBD3, DNMT1, DNMG3A, DNMT3B, Rb, ROM2로부터의 전사억제 억제자 도메인을 포함하고, 예를 들어, EP3045537 및 WO 2011/146121을 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 원용된다. Cas 뉴클레아제는 또한 증가 또는 감소된 안정성을 제공하는 이종 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 융합된 도메인 또는 이종 폴리펩티드는 N-말단, C-말단에서, 또는 Cas 뉴클레아제 내에 내부적으로 위치될 수 있다.

[0951] 하나의 예로서, Cas 단백질은 세포하 국소화를 제공하는 하나 이상의 이종 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 이러한 이종 폴리펩티드는, 예를 들어, 하나 이상의 핵 국소화 신호(NLS), 예컨대 핵으로의 표적화를 위해 단일분절 SV40 NLS 및/또는 이분절 알파-임포틴 NLS, 미토콘드리아에 대한 표적화를 위한 미토콘드리아 국소화 신호, ER 체류 신호 등을 포함할 수 있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌[Lange et al. (2007) *J. Biol. Chem.* 282(8):5101-5105]을 참고한다. 이러한 세포하 국소화 신호는 N-말단, C-말단, 또는 Cas 단백질 내에 어느 곳에든 위치될 수 있다. NLS는 염기성 아미노산의 구간을 포함할 수 있고, 단일분절 서열 또는 이분절 서열일 수 있다. 선택적으로, Cas 단백질은 N-말단에서의 NLS(예를 들어, 알파-임포틴 NLS 또는 단일분절 NLS) 및 C-말단에서의 NLS(예를 들어, SV40 NLS 또는 이분절 NLS)를 포함하는 2개 이상의 NLS를 포함할 수 있다. Cas 단백질은 또한 N-말단에서의 2개 이상의 NLS 및/또는 C-말단에서의 2개 이상의 NLS를 포함할

수 있다.

[0952] Cas 단백질은, 예를 들어, 1-10개의 NLS와 융합될 수 있다(예를 들어, 1-5개의 NLS와 융합되거나 1개의 NLS와 융합됨). 하나의 NLS가 사용되는 경우, NLS는 Cas 단백질 서열의 N-말단 또는 C-말단에서 연결될 수 있다. 이는 또한 Cas 단백질 서열 내에 삽입될 수 있다. 대안적으로, Cas 단백질은 하나 초과의 NLS와 융합될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 2개, 3개, 4개, 또는 5개의 NLS와 융합될 수 있다. 구체적 예에서, Cas 단백질은 2개의 NLS와 융합될 수 있다. 특정 환경에서, 2개의 NLS는 동일하거나(예를 들어, 2개의 SV40 NLS) 또는 상이할 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 카복시 말단에서 연결된 2개의 SV40 NLS 서열에 융합될 수 있다. 대안적으로, Cas 단백질은 2개의 NLS에 융합될 수 있고, 하나는 N-말단에 하나는 C-말단에 연결될 수 있다. 다른 예에서, Cas 단백질은 3개의 NLS로 또는 NLS 없이 융합될 수 있다. NLS는 단일분절 서열, 예컨대, 예를 들어, SV40 NLS, PKKKRKV(서열번호 436) 또는 PKKKRRV(서열번호 437)일 수 있다. NLS는 이분절 서열, 예컨대 뉴클레오플라스민의 NLS, KRPAATKKAGQAKKKK(서열번호 428)일 수 있다. 구체적 예에서, 단일 PKKKRKV(서열번호 436) NLS는 Cas 단백질의 C-말단에서 연결될 수 있다. 하나 이상의 링커는 융합 부위에서 선택적으로 포함된다.

[0953] Cas 단백질은 또한 세포-투과 도메인 또는 단백질 형질도입 도메인에 작동가능하게 연결될 수 있다. 예를 들어, 세포-투과 도메인은 HIV-1 TAT 단백질, 인간 헤르페스 B 바이러스로부터의 TLM 세포-투과 모티프, MPG, Pep-1, VP22, 헤르페스 단순 바이러스로부터의 세포 투과 펩티드, 또는 폴리아르기닌 펩티드 서열로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, WO 2014/089290 및 WO 2013/176772를 참조하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 세포-투과 도메인은 N-말단, C-말단, 또는 Cas 단백질 내 어느 곳에서 위치될 수 있다.

[0954] Cas 단백질은 또한 추적 또는 정제의 용이성을 위한 이종 폴리펩티드, 예컨대 형광 단백질, 정제 태그, 또는 에피토프 태그에 작동가능하게 연결될 수 있다. 형광 단백질의 예는 녹색 형광 단백질(예를 들어, GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, eGFP, 에메랄드(Emerald), 아자미 그린(Azami Green), 단량체 아자미 그린, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), 황색 형광 단백질(예를 들어, YFP, eYFP, 시트린(Citrine), 비너스(Venus), YPet, PhiYFP, ZsYellow1), 청색 형광 단백질(예를 들어, eBFP, eBFP2, 아주라이트(Azurite), mKalama1, GFPuv, 사파이어, T-사파이어), 청록색 형광 단백질(예를 들어, eCFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, 미도리시-시안(Midorishi-Cyan), 적색 형광 단백질(예를 들어, mKate, mKate2, mPlum, DsRed 단량체, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-단량체, HcRed-탄뎀, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred), 오렌지 형광 단백질(예를 들어, mOrange, mKO, 쿠사비라-오렌지(Kusabira-Orange), 단량체 쿠사비라-오렌지, mTangerine, tdTomato), 및 임의의 다른 적절한 형광 단백질을 포함한다. 태그의 예는 글루타티온-S-트랜스퍼라아제(GST), 키틴 결합 단백질(CBP), 말토오스 결합 단백질, 티오레독신(TRX), 폴리(NANP), 탄뎀 친화도 정제(TAP) 태그, myc, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, 헤마글루티닌(HA), nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 히스티딘(His), 비오틴 카복실 담체 단백질(BCCP), 및 칼모둘린을 포함한다.

[0955] Cas 단백질은 또한 표지된 핵산에 테더링될 수 있다. 이러한 테더링(즉, 물리적 연결)은 공유결합 상호작용 또는 비공유결합 상호작용을 통해 달성될 수 있고, 테더링은 직접적일 수 있거나(예를 들어, 단백질 상의 시스테인 또는 라이신 잔기의 변형 또는 인테인 변형에 의해 달성될 수 있는 직접 융합 또는 화학적 접합을 통함), 하나 이상의 개재 링커 또는 어댑터 분자, 예컨대 스트렙타비딘 또는 압타머를 통해 달성될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Pierce et al. (2005) *Mini Rev. Med. Chem.* 5(1):41-55]; [Duckworth et al. (2007) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 46(46):8819-8822]; [Schaeffer and Dixon (2009) *Australian J. Chem.* 62(10):1328-1332]; [Goodman et al. (2009) *Chembiochem.* 10(9):1551-1557]; 및 [Khatwani et al. (2012) *Bioorg. Med. Chem.* 20(14):4532-4539]을 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 단백질-핵산 접합체를 합성하기 위한 비공유결합 전략은 비오틴-스트렙타비딘 및 니켈-히스티딘 방법을 포함한다. 공유결합 단백질-핵산 접합체는 매우 다양한 화학물질을 사용하여 적합하게 작용화된 핵산 및 단백질을 연결함으로써 합성될 수 있다. 이들 화학물질의 일부는 단백질 표면 상의 아미노산 잔기(예를 들어, 라이신 아민 또는 시스테인 티올)로의 올리고뉴클레오티드의 직접 부착을 수반하는 한편, 다른 추가의 복합체 방식은 단백질의 번역 후 변형 또는 촉매작용 또는 반응성 단백질 도메인의 관여를 필요로 한다. 핵산으로의 단백질의 공유결합 부착을 위한 방법은, 예를 들어, 단백질 라이신 또는 시스테인 잔기로의 올리고뉴클레오티드의 화학적 가교결합, 발현된 단백질-결찰, 화학효소적 방법, 및 포토압타머의 사용을 포함할 수 있다. 표지된 핵산은 C-말단, N-말단, 또는 Cas 단백질 내의 내부 영역에 테더링될 수 있다. 하나의 예에서, 표지된 핵산은 Cas 단백질의 C-말단 또는 N-말단에 테더링된다. 마찬가지로, Cas 단백질은 5' 단부, 3' 단부, 또는 표지된 핵산 내의 내부 영역에 테더링될 수 있다. 즉, 표지된 핵산은 임의의 배향 및 극성으로 테더링될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 표지된 핵산의 5' 단부 또는 3' 단부에 테더링될 수 있다.

[0956] Cas 단백질은 임의의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 단백질, 예컨대 gRNA와 복합체화된 Cas 단백질의 형태로 제공될 수 있다. 대안적으로, Cas 단백질은 Cas 단백질을 인코딩하는 핵산, 예컨대 RNA(예를 들어, 메신저 RNA(mRNA)) 또는 DNA의 형태로 제공될 수 있다. 선택적으로, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 특정 세포 또는 기관에서 단백질로의 효율적인 번역을 위해 코돈 체적화될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은, 자연 발생 폴리뉴클레오티드 서열과 비교하여, 박테리아 세포, 효모 세포, 인간 세포, 비-인간 세포, 포유동물 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 또는 임의의 다른 관심 숙주 세포에서의 사용의 더 높은 빈도를 갖는 코돈을 치환하도록 변형될 수 있다. 코돈 사용 표는, 예를 들어, "Codon Usage Database"에서 쉽게 이용가능하다. 이들 표는 다수의 방법에서 적응될 수 있다. 모든 목적을 위해 그 전문이 참고로 본원에 원용되는 문헌[Nakamura et al. (2000) Nucleic Acids Research 28:292]을 참조한다. 특정 숙주에서의 발현을 위한 특정 서열의 코돈 최적화를 위한 컴퓨터 알고리즘이 또한 이용가능하다(예를 들어, Gene Forge 참고). 코돈-최적화된 Cas9 코딩 서열, Cas9 mRNA, 및 Cas9 단백질 서열의 예는 WO2013/176772, WO2014/065596, WO2016/106121, 및 WO2019/067910에 기재된 것들을 포함하며, 이들은 본원에 참조로 원용된다. 특히, WO2019/067910의 문단 [0449]에서의 표의 Cas9 코딩 서열 및 Cas9 아미노산 서열, 및 WO2019/067910의 문단 [0214]-[0234]의 Cas9 mRNA 및 코딩 서열은 본원에 참조로 원용된다. Cas 단백질을 인코딩하는 핵산이 세포 내로 도입될 때, Cas 단백질은 세포 내에서 일시적으로, 조건적으로, 또는 구성적으로 발현된다.

[0957] Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 세포의 게놈에서 안정적으로 통합될 수 있고 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 대안적으로, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 발현 구축물 내의 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 발현 구축물은 유전자 또는 다른 관심 핵산 서열(예를 들어, Cas 유전자)의 직접 발현이 가능하고, 표적 세포에 이러한 관심 핵산 서열을 전달할 수 있는, 임의의 핵산 구축물을 포함한다. 예를 들어, Cas 단백질을 인코딩하는 핵산은 gRNA를 인코딩하는 DNA를 포함하는 벡터 내에 있을 수 있다. 대안적으로, 이는 gRNA를 인코딩하는 DNA를 포함하는 벡터와 별도의 벡터 또는 플라스미드 내에 있을 수 있다. 발현 구축물에서 사용될 수 있는 프로모터는, 예를 들어, 진핵 세포, 인간 세포, 비-인간 세포, 포유동물 세포, 비-인간 포유동물 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 다능성 세포, 배아 줄기(ES) 세포, 성체 줄기 세포, 발달적으로 제한된 전구 세포, 유도된 다능성 줄기(iPS) 세포, 또는 하나의-세포 단계 배아 중 하나 이상에서 활성인 프로모터를 포함한다. 이러한 프로모터는, 예를 들어, 조건부 프로모터, 유도성 프로모터, 구성적 프로모터, 또는 조직-특이적 프로모터일 수 있다. 선택적으로, 프로모터는 한 방향에서 Cas 단백질 및 다른 방향에서 가이드 RNA 둘 다의 발현을 구동하는 이방향 프로모터일 수 있다. 이러한 이방향성 프로모터는 (1) 3개의 외부 제어 요소: 원위 서열 요소(DSE), 근위 서열 요소(PSE), 및 TATA 박스를 함유하는 완전한, 종래의, 일방향성 Pol III 프로모터; 및 (2) 역 방향에서 DSE의 5' 말단에 융합된 PSE 및 TATA 박스를 포함하는 제2 염기성 Pol III 프로모터로 이루어질 수 있다. 예를 들어, H1 프로모터에서, DSE는 PSE 및 TATA 박스에 인접하고, 프로모터는 U6 프로모터로부터 유래된 PSE 및 TATA 박스를 부가함으로써 역방향으로의 전사가 제어되는 하이브리드 프로모터를 생성함으로써 이방향성이 될 수 있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 US 2016/0074535를 참고한다. Cas 단백질 및 가이드 RNA를 인코딩하는 유전자를 발현하기 위한 이방향성 프로모터의 사용은 동시에 압축 발현 카세트의 생성을 가능하게 하여 전달을 용이하게 한다. 바람직한 실시양태에서, 프로모터는 인간에 사용하기 위해 규제 당국에 의해 승인된다. 특정 실시양태에서, 프로모터는 간 세포에서의 발현을 구동한다.

[0958] 상이한 프로모터는 Cas 발현 또는 Cas9 발현을 구동하는 데 사용될 수 있다. 일부 방법에서, 작은 프로모터가 사용되어 Cas 또는 Cas9 코딩 서열이 AAV 구축물 내로 맞춰질 수 있다. 예를 들어, Cas 또는 Cas9 및 하나 이상의 gRNA(예를 들어, 1개의 gRNA 또는 2개의 gRNA 또는 3개의 gRNA 또는 4개의 gRNA)는 LNP-매개된 전달을 통해 전달될 수 있다(예를 들어, RNA의 형태로). U6 프로모터 또는 작은 tRNA Gln과 같이 gRNA의 발현을 구동하는 데 상이한 프로모터가 사용될 수 있다. 마찬가지로, 상이한 프로모터가 Cas9 발현을 구동하기 위해 사용될 수 있다.

[0959] mRNA로서 제공된 Cas 단백질은 개선된 안정성 및/또는 면역원성 특성을 위해 변형될 수 있다. 변형은 mRNA 내에서 하나 이상의 뉴클레오시드로 만들어질 수 있다. mRNA 핵염기에 대한 화학적 변형의 예는 슈도우리딘, 1-메틸-슈도우리딘, 및 5-메틸-시티딘을 포함한다. Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA가 또한 캡핑될 수 있다. 캡은, 예를 들어 캡 1 구조일 수 있고, 여기서 +1 리보뉴클레오티드는 리보오스의 2'O 위치에서 메틸화된다. 캡핑은, 예를 들어, *생체내에서* 우수한 활성을 줄 수 있고(예를 들어, 자연 캡을 모방함으로써), 숙주의 선천적 면역 시스템의 자극을 줄이는 자연 구조를 야기할 수 있다(예를 들어, 선천적 면역 시스템에서의 패턴 인식 수용체의 활성화를 감소시킬 수 있음). Cas 단백질을 인코딩하는 mRNA는 또한 폴리아데닐화될 수 있다. Cas 단백질을 인코딩

하는 mRNA는 또한 (폴리(A) 꼬리를 포함하도록) 슈도우리딘을 포함하도록 변형될 수 있다(예를 들어, 슈도우리딘으로 완전히 치환될 수 있음). 또 다른 예로서, N1-메틸 슈도우리딘을 함유하는 캡핑되고 폴리아데닐화된 Cas mRNA가 사용될 수 있다. 또 다른 예로서, 슈도우리딘으로 완전히 치환된 Cas mRNA가 사용될 수 있다(즉, 모든 표준 우라실 잔기는, 슈도우리딘, 우리딘 이성질체로 대체되고, 여기서 우라실은 질소-탄소보다는 탄소-탄소 결합으로 부착됨). 마찬가지로, Cas mRNA는 동일어 코돈을 사용하여 우리딘의 고갈에 의해 변형될 수 있다. 예를 들어, 슈도우리딘으로 완전히 치환된 캡핑되고 폴리아데닐화된 Cas mRNA가 사용될 수 있다.

[0960] Cas mRNA는 적어도 하나, 복수, 또는 모든 우리딘 위치에서 변형된 우리딘을 포함할 수 있다. 변형된 우리딘은 5 위치에서 (예를 들어, 할로겐, 메틸, 또는 에틸로) 변형된 우리딘일 수 있다. 변형된 우리딘은 1 위치에서 (예를 들어, 할로겐, 메틸, 또는 에틸로) 변형된 슈도우리딘일 수 있다. 변형된 우리딘은, 예를 들어, 슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 5-메톡시우리딘, 5-아이오도우리딘, 또는 이들의 조합일 수 있다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 5-메톡시우리딘이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 5-아이오도우리딘이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 N1-메틸-슈도우리딘이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘 및 N1-메틸-슈도우리딘의 조합이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘 및 5-메톡시우리딘의 조합이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 N1-메틸 슈도우리딘 및 5-메톡시우리딘의 조합이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 5-아이오도우리딘 및 N1-메틸-슈도우리딘의 조합이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘 및 5-아이오도우리딘의 조합이다. 일부 예에서, 변형된 우리딘은 5-아이오도우리딘 및 5-메톡시우리딘의 조합이다.

[0961] 본원에 개시된 Cas mRNA는 또한 5' 캡, 예컨대 Cap0, Cap1, 또는 Cap2를 포함할 수 있다. 5' 캡은 일반적으로 5'-트리포스페이트를 통해 mRNA의 5'에서 3' 쇄의 제1 뉴클레오티드(즉, 제1 캡-근접 뉴클레오티드)의 5' 위치에 연결된 7-메틸구아닌 리보뉴클레오티드일 수 있다(이는 예를 들어, ARCA에 대해 추가로 변형될 수 있음). Cap0에서, mRNA의 제1 및 제2 캡-근접 뉴클레오티드의 리보오스는 둘 다 2'-하이드록실을 포함한다. Cap1에서, mRNA의 제1 및 제2 전사된 뉴클레오티드의 리보오스는 각각 2'-메톡시 및 2'-하이드록실을 포함한다. Cap2에서, mRNA의 제1 및 제2 캡-근접 뉴클레오티드의 리보오스는 둘 다 2'-메톡시를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Katibah et al. (2014) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111(33):12025-30] 및 [Abbas et al. (2017) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114(11):E2106-E2115]을 참조하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 포유동물 mRNA, 예컨대 인간 mRNA를 포함하는 대부분의 내인성의 더 높은 진핵생물 mRNA는, Cap1 또는 Cap2를 포함한다. Cap1 및 Cap2와 상이한 Cap0 및 다른 캡 구조는, 선천적 면역 시스템, 예컨대 IFIT-1 및 IFIT-5의 구성요소에 의한 비-자가로서의 인식 때문에, 포유류, 예컨대 인간에서 면역원성일 수 있고, 이는 I형 인터페론을 포함하는 상승된 사이토카인 수준을 야기할 수 있다. 선천적 면역 시스템, 예컨대 IFIT-1 및 IFIT-5의 구성요소는 또한, Cap1 또는 Cap2 외의 캡과 mRNA의 결합을 위해 eIF4E와 경쟁할 수 있으며, 이는 mRNA의 번역을 잠재적으로 억제한다.

[0962] 캡이 공동-전사로 포함될 수 있다. 예를 들어, ARCA(항-역 캡 유사체; Thermo Fisher Scientific 카탈로그 번호 AM8045)는 시험관내에서 개시시 전사체 내로 혼입될 수 있는 구아닌 리보뉴클레오티드의 5' 위치에 연결된 7-메틸구아닌 3'-메톡시-5'-트리포스페이트를 포함하는 캡 유사체이다. ARCA는 제1 캡-근접 뉴클레오티드의 2' 위치가 하이드록실인 Cap0 캡을 야기한다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌 [Stepinski et al. (2001) *RNA* 7:1486-1495]을 참고한다.

[0963] CleanCap™ AG(m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies 카탈로그 번호 N-7113) 또는 CleanCap™ GG(m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies 카탈로그 번호 N-7133)가 Cap1 구조를 공동-전사로 제공하는 데 사용될 수 있다. CleanCap™ AG 및 CleanCap™ GG의 3'-O-메틸화된 버전은 또한 각각 카탈로그 번호 N-7413 및 N-7433으로서 TriLink Biotechnologies로부터 이용가능하다.

[0964] 대안적으로, 캡이 RNA 후-전사로 첨가될 수 있다. 예를 들어, 백시니아(Vaccinia) 캡핑 효소는 상업적으로 이용가능하고(New England Biolabs 카탈로그 번호 M2080S), 이의 D1 서브유닛에 의해 제공된 RNA 트리포스파타아제 및 구아닐릴트랜스퍼라아제 활성, 및 이의 D12 서브유닛에 의해 제공된 구아닌 메틸트랜스퍼라제를 가진다. 이와 같이, 이는 RNA에 7-메틸구아닌을 첨가할 수 있어서, S-아데노실 메티오닌 및 GTP의 존재 하에서 Cap0을 제공할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Guo and Moss (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:4023-4027] 및 [Mao and Shuman (1994) *J. Biol. Chem.* 269:24472-24479]을 참조하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0965] Cas mRNA는 폴리-아데닐화된(폴리-A 또는 폴리(A) 또는 폴리-아데닌) 꼬리를 추가로 포함할 수 있다. 폴리-A

꼬리는, 예를 들어, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 60개, 적어도 70개, 적어도 80개, 적어도 90개, 또는 적어도 100개의 아데닌, 및 선택적으로 최대 300개의 아데닌을 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리-A 꼬리는 95개, 96개, 97개, 98개, 99개, 또는 100개의 아데닌 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0966] 일부 실시양태에서, CRISPR/Cas 시스템은 숙주 게놈 내의 바람직한 유전자좌에서 삽입의 부위를 생성하는 데 사용될 수 있고, 여기서 본원에 개시된 구축물이 하나 이상의 관심 폴리펩티드를 발현하도록 삽입될 수 있다. 삽입을 위한 숙주 게놈의 임의의 바람직한 유전자좌를 표적화하는 적절한 가이드 RNA를 설계하는 방법이 당업계에 잘 알려져 있다. 트랜스유전자를 포함하는 구축물은 이의 삽입 부위, 예를 들어, "세이프-하버(Safe-harbor)" 유전자좌 내로 이종 트랜스유전자의 삽입과 관련하여 이종일 수 있다. 트랜스유전자를 포함하는 구축물은 이의 삽입 부위, 예를 들어, 이의 내인성 유전자좌 내로 야생형 트랜스유전자의 삽입과 관련하여 비-이종일 수 있다.

[0967] 세이프 하버 유전자좌는 트랜스유전자 또는 다른 외인성 핵산 삽입물이 세포 거동 또는 표현형을 과도하게 변경하지 않고(즉, 숙주 세포 상의 임의의 해로운 영향 없이) 모든 관심 조직에서 안정하고 신뢰성있게 발현될 수 있는 염색체 유전자좌를 포함한다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌 [Sadelain et al. (2012) *Nat. Rev. Cancer* 12:51-58]을 참고한다. 예를 들어, 세이프 하버 유전자좌는 삽입된 유전자 서열의 발현이 이웃 유전자로부터 임의의 판독-통과 발현에 의해 교란되지 않는 것일 수 있다. 예를 들어, 세이프 하버 유전자좌는 외인성 DNA가 내인성 유전자 구조 또는 발현에 악영향을 미치지 않고 예측가능한 방식으로 통합 및 기능할 수 있는 염색체 유전자좌를 포함할 수 있다. 세이프 하버 유전자좌는, 예컨대, 예를 들어, 비-필수적이거나, 불필요하거나, 노출 표현형 결과 없이 붕괴될 수 있는 유전자 내의 유전자좌와 같은 유전자내 영역 또는 유전자외 영역을 포함할 수 있다.

[0968] 이러한 세이프 하버 유전자좌는 모든 조직에서 개방 염색질 구성을 제공할 수 있고, 배아 발달 동안 및 성인에게서 편재적으로 발현될 수 있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌 [Zambrowicz et al. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:3789-3794]을 참고한다. 또한, 세이프 하버 유전자좌는 높은 효율로 표적화될 수 있고, 세이프 하버 유전자좌는 노출 표현형 없이 붕괴될 수 있다. 세이프 하버 유전자좌의 예는 *ALB*, *CCR5*, *HPRT*, *AAVS1*(*PPP1 R12C*), *Rosa*(예를 들어, *Rosa26*), AngptiS, ApoC3, ASGR2, FIX(F9), G6PC, Gys2, HGD, Lp(a), Pcsk9, SERPINA1, TF, 및 TTR을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861; 8,586,526; 및 미국 특허 공개 번호 2003/0232410; 2005/0208489; 2005/0026157; 2006/0063231; 2008/0159996; 2010/00218264; 2012/0017290; 2011/0265198; 2013/0137104; 2013/0122591; 2013/0177983; 2013/0177960; 및 2013/0122591을 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 표적 게놈 유전자좌의 다른 예는 *ALB* 유전자좌, EESYR 유전자좌, SARS 유전자좌, 인간 염색체 1 또는 이의 비-인간 포유동물 오솔로그의 위치 188,083,272, 인간 염색체 10 또는 이의 비-인간 포유동물 오솔로그의 위치 3,046,320, 인간 염색체 17 또는 이의 비-인간 포유동물 오솔로그의 위치 67,328,980, 염색체 상의 아데노-연관 바이러스 부위 1(AAVS1), 인간 염색체 19 또는 이의 비-인간 포유동물 오솔로그 상의 AAV 바이러스의 통합의 자연 발생 지점, 케모카인 수용체 5(CCR5) 유전자, HIV-1 공동수용체를 인코딩하는 케모카인 수용체 유전자, 또는 마우스 Rosa26 유전자좌 또는 이의 비-뮤린 포유동물 오솔로그를 포함한다.

[0969] 일부 실시양태에서, 이종 유전자는 세이프 하버 유전자좌 내로 삽입되고, 세이프 하버 유전자좌의 내인성 신호 서열을 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이종 유전자는 그 자신의 신호 서열을 포함할 수 있고, 세이프 하버 유전자좌 내로 삽입될 수 있고, 세이프 하버 유전자좌의 내인성 신호 서열을 추가로 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자는 그 자신의 신호 서열 및 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 포함할 수 있고, 세이프 하버 유전자좌 내로 삽입될 수 있고, 세이프 하버 유전자좌의 내인성 신호 서열을 추가로 사용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자는 그 자신의 신호 서열 및 IRES를 포함할 수 있고, 세이프 하버 유전자좌 내로 삽입될 수 있고, 세이프 하버 유전자좌의 내인성 신호 서열을 사용하지 않는다. 일부 실시양태에서, 유전자는 세이프 하버 유전자좌 내로 삽입될 수 있고, IRES를 포함할 수 있고, 임의의 신호 서열을 사용하지 않는다.

[0970] 일부 방법에서, 2개 이상의 뉴클레아제 약제가 사용될 수 있다. 예를 들어, 2개 이상의 뉴클레아제 약제가 사용될 수 있되, 각각은 개시 코돈을 포함하거나 이에 근접한 뉴클레아제 표적 서열을 표적화할 수 있다. 또 다른 예로서, 2개의 뉴클레아제 약제가 사용될 수 있고, 하나는 개시 코돈을 포함하거나 이에 근접한 뉴클레아제 표적 서열을 표적화하고, 하나는 종결 코돈을 포함하거나 이에 근접한 뉴클레아제 표적 서열을 표적화할 수 있고, 여기서 뉴클레아제 약제에 의한 절단은 2개의 뉴클레아제 표적 서열 사이에서 코딩 영역의 결실을 야기할 수 있다. 또 다른 예로서, 3개 이상의 뉴클레아제 약제가 사용될 수 있고, 하나 이상의(예를 들어, 2개의) 표적화 뉴클레아제 표적 서열은 개시 코돈을 포함하거나 이에 근접하고, 하나 이상의(예를 들어, 2개의) 표적화 뉴클레아

제 표적 서열은 종결 코돈을 포함하거나 이에 근접하며, 여기서 뉴클레아제 약제에 의한 절단은 개시 코돈을 포함하거나 이에 근접한 뉴클레아제 표적 서열 및 종결 코돈을 포함하거나 이에 근접한 뉴클레아제 표적 서열 사이의 코딩 영역의 결실을 야기할 수 있다.

[0971] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물 및 방법에서 사용된 CRISPR/Cas 시스템은 비-자연 발생일 수 있다.

[0972] 일부 실시양태에서, Cas 단백질(예를 들어, Cas9)은 gRNA와 복합체화되어 리보뉴클레오단백질 복합체(RNP)를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 리포좀 또는 LNP)는 Cas 단백질(예를 들어, Cas9) 및 gRNA를 포함하는 리보뉴클레오단백질 복합체(RNP)를 포함한다.

[0973] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 리포좀 및 LNP)는 CRISPR/Cas 시스템 외의 유전자 편집 시스템으로부터의 하나 이상의 구성요소를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자 카고는 뉴클레아제, 예컨대 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN) 또는 TALEN이며, 이는 표적 유전자에서 결합 및 변형에 효과적이다.

[0974] 소망하는 표적 서열 또는 소망하는 표적 서열에 결합하는 임의의 DNA-결합 단백질 내로 닉 또는 이중-가닥 절단을 유도하는 임의의 뉴클레아제 분자 카고는 본원의 개시된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다. 소망하는 표적 서열에서 뉴클레아제 분자 카고가 닉 또는 이중-가닥 절단을 유도하는 한, 자연 발생 또는 천연 뉴클레아제 분자 카고가 이용될 수 있다. 마찬가지로, 자연 발생 또는 천연 DNA-결합 단백질은, DNA-결합 단백질이 소망하는 표적 서열에 결합하는 한 이용될 수 있다. 대안적으로, 변형된 또는 조작된 뉴클레아제 분자 카고 또는 DNA-결합 단백질이 이용될 수 있다. "조작된 뉴클레아제 분자 카고 또는 DNA-결합 단백질"은 소망하는 표적 서열을 특이적으로 인식하기 위해 이의 천연 형태로부터 조작된(변형된 또는 유도된) 뉴클레아제 분자 카고 또는 DNA-결합 단백질을 포함한다. 따라서, 조작된 뉴클레아제 분자 카고 또는 DNA-결합 단백질은 천연, 자연 발생 뉴클레아제 분자 카고 또는 DNA-결합 단백질로부터 유도될 수 있거나 이는 인위적으로 생성 또는 합성될 수 있다. 조작된 뉴클레아제 분자 카고 또는 DNA-결합 단백질은 표적 서열을 인식할 수 있고, 예를 들어, 여기서 표적 서열은 천연(비-조작된 또는 비-변형된) 뉴클레아제 분자 카고 또는 DNA-결합 단백질에 의해 인식된 서열이 아니다. 뉴클레아제 분자 카고 또는 DNA-결합 단백질의 변형은 핵산 절단 분자 카고 내의 하나의 뉴클레오티드 또는 단백질 절단 분자 카고 내의 하나의 아미노산 만큼 적을 수 있다. 표적 서열 또는 다른 DNA에서 닉 또는 이중-가닥 절단을 생성하는 것은 표적 서열 또는 다른 DNA를 "컷팅" 또는 "절단"하는 것으로 지칭될 수 있다.

[0975] 뉴클레아제 분자 카고 또는 DNA-결합 단백질의 활성 변이체 및 단편(즉, 조작된 뉴클레아제 분자 카고 또는 DNA-결합 단백질)이 또한 제공된다. 이러한 활성 변이체는 천연 뉴클레아제 분자 카고 또는 DNA-결합 단백질과 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 초과의 서열 동일성을 포함할 수 있으며, 여기서 활성 변이체는 소망하는 표적 서열에서 컷팅하는 능력을 보유하고, 따라서 닉 또는 이중-가닥-절단 유도 활성을 보유하거나 소망하는 표적 서열에 결합하는 능력을 보유한다. 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 뉴클레아제 분자 카고는 천연 엔도뉴클레아제 서열로부터 변형될 수 있고, 천연 뉴클레아제 분자 카고에 의해 인식되지 않은 표적 서열에서의 닉 또는 이중-가닥 절단을 인식하고 유도하도록 설계될 수 있다. 따라서, 일부 조작된 뉴클레아제는 상응하는 천연 뉴클레아제 분자 카고 표적 서열과 상이한 표적 서열에서 닉 또는 이중-가닥 절단을 유도하는 특이성을 갖는다. 닉 또는 이중-가닥-절단-유도 활성에 대한 검정이 공지되고, 일반적으로 표적 서열을 함유하는 DNA 기재 상에 엔도뉴클레아제의 전체 활성 및 특이성을 측정한다. 표적 서열은 세포에 대해 내인성(또는 천연)일 수 있거나, 표적 서열은 세포에 대해 외인성일 수 있다. 세포에 대해 외인성인 표적 서열은 세포의 게놈에서 자연적으로 발생하지 않는다. 표적 서열은 또한 표적 유전자좌에서 위치하기를 원하는 관심 폴리뉴클레오티드에 대해 외인성일 수 있다. 일부 경우에서, 표적 서열은 숙주 세포의 게놈에서 단 1회 존재한다.

[0976] 예시화된 표적 서열의 활성 변이체 및 단편이 또한 제공된다. 이러한 활성 변이체는 주어진 표적 서열에 대해 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 초과의 서열 동일성을 포함할 수 있고, 여기서 활성 변이체는 생물학적 활성을 보유하고, 따라서 서열-특이적 방식으로 뉴클레아제 분자 카고에 의해 인식되고 절단될 수 있다. 뉴클레아제 분자 카고에 의한 표적 서열의 이중-가닥 절단을 측정하기 위한 검정은 공지되어 있다(예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 문헌 [Frendewey et al. (2010) Methods in Enzymology 476:295-307]의 TAQMAN® qPCR 분석).

[0977] 표적 서열의 길이는 다양할 수 있고, 예를 들어, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 쌍에 대해 약 30-36 bp(각각의 ZFN에 대해 약 15-18 bp), 전사 활성화인자-유사 이펙터(TALE) 단백질 또는 전사 활성화인자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)에 대해 약 36 bp, 또는 CRISPR/Cas9 가이드 RNA에 대해 약 20 bp인 표적 서열을 포함할 수 있다.

[0978] DNA-결합 단백질 또는 뉴클레아제 분자 카고의 표적 서열은 표적 게놈 유전자좌 내 또는 그 근방의 어디에서든 위치될 수 있다. 표적 서열은 유전자의 코딩 영역 내에, 또는 유전자의 발현에 영향을 미치는 조절 영역 내에 위치될 수 있다. DNA-결합 단백질 또는 뉴클레아제 분자 카고의 표적 서열은 인트론, 엑손, 프로모터, 인핸서, 조절 영역, 또는 임의의 비-단백질 코딩 영역에 위치될 수 있다.

[0979] 본원에 개시된 다양한 방법 및 조성물에 이용될 수 있는 DNA-결합 단백질의 하나의 유형은 전사 활성화인자-유사 이펙터(TALE)이다. TALE는, 예를 들어, 후성적 변형 도메인, 전사 활성화 도메인, 또는 전사 억제자 도메인에 융합되거나 연결될 수 있다. 이러한 도메인의 예는 하기 Cas 단백질에 대해 기재되고, 또한 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 WO 2011/145121에서 발견될 수 있다. 이에 상응하여, 본원에 개시된 다양한 방법 및 조성물에 사용될 수 있는 뉴클레아제 분자 카고의 하나의 유형은 전사 활성화인자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)이다. TAL 이펙터 뉴클레아제는 원핵생물 또는 진핵생물 유기체의 게놈에서 특정 표적 서열에서 이중-가닥 절단을 만드는 데 사용될 수 있는 서열-특이적 뉴클레아제의 클래스이다. TAL 이펙터 뉴클레아제는 천연 또는 조작된 전사 활성화인자-유사(TAL) 이펙터, 또는 이의 기능적 부분을, FokI과 같은 엔도뉴클레아제의 촉매 도메인에 융합시킴으로써 생성된다. 고유한 모듈 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인은 잠재적으로 임의의 주어진 DNA 인식 특이성을 갖는 단백질의 설계를 가능하게 한다. 따라서, TAL 이펙터 뉴클레아제의 DNA 결합 도메인은 특정 DNA 표적 부위를 인식하도록 조작될 수 있고, 따라서, 소망하는 표적 서열에서 이중-가닥 절단을 만드는 데 사용될 수 있다. WO 2010/079430; 문헌[Morbitzer et al. (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107(50:21617-21622]; [Scholze& Boch (2010) Virulence 1:428-432]; [Christian et al. (2010) Genetics 186:757-761]; [Li et al. (2011) Nucleic Acids Res. 39(1):359-372]; 및 [Miller et al. (2011) Nature Biotechnology 29: 143-148]을 참조하고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0980] FokI 엔도뉴클레아제의 단부로부터의 비-특이적 DNA 절단 도메인은 효모 검정에서 활성인 하이브리드 뉴클레아제를 구축하는 데 사용될 수 있다. 이들 재분자 카고는 또한 식물 세포에서 및 동물 세포에서도 활성이다. FokI 도메인은 이량체로서 기능하며, 적절한 배향 및 간격을 갖는 표적 게놈 내의 부위에 대해 고유한 DNA 결합 도메인을 갖는 2개의 구축물을 필요로 한다. TALEN DNA 결합 도메인과 FokI 절단 도메인 사이의 아미노산 잔기의 수 및 2개의 개별적인 TALEN 결합 지점 사이의 염기의 수는 높은 수준의 활성을 달성하기 위한 매개변수이다. TALEN DNA 결합 도메인과 FokI 절단 도메인 사이의 아미노산 잔기의 수는 복수의 TAL 이펙터 반복 서열 및 FokI 엔도뉴클레아제 도메인 사이의 스페이서(스페이서 서열과는 별개임)의 도입에 의해 변형될 수 있다. 스페이서 서열은 12 내지 30개의 뉴클레오티드일 수 있다.

[0981] 아미노산 서열과 TALEN 결합 도메인의 DNA 인식 사이의 관계는 설계가능한 단백질을 허용한다. 이 경우에서, 인공 유전자 합성은 TALE 결합 도메인에서 발견된 반복 서열의 부적절한 어닐링으로 인해 문제가 된다. 이에 대한 하나의 해결책은 2-단계 PCR에서 조립; 올리고뉴클레오티드 조립, 이어서 전체 유전자 증폭에 적절한 올리고뉴클레오티드를 계산하기 위해 공개적으로 이용가능한 소프트웨어 프로그램(DNAWorks)을 사용하는 것이다. 조작된 TALE 구축물을 생성하기 위한 다수의 모듈 조립 방식이 또한 보고되었다. 방법 둘 다는 징크 핑거 DNA 인식 도메인을 생성하기 위한 모듈 조립 방법과 개념적으로 유사한 DNA 결합 도메인을 조작하는 체계적인 접근법을 제공한다.

[0982] TALEN 유전자가 조립되면, 이들은 플라스미드 내로 삽입되며; 이어서 플라스미드는 유전자 생성물이 발현되고 핵에 들어가 게놈에 접근하는 표적 세포를 형질주입시키는 데 사용된다. TALEN은 이중-가닥 절단(DSB)을 유도하여 게놈을 편집하는 데 사용될 수 있고, 세포는 복구 메커니즘에 대해 반응한다.

[0983] 적절한 TAL 뉴클레아제의 예, 및 적절한 TAL 뉴클레아제를 제조하는 방법은, 예를 들어, US 2011/0239315 A1, US 2011/0269234 A1, US 2011/0145940 A1, US 2003/0232410 A1, US 2005/0208489 A1, US 2005/0026157 A1, US 2005/0064474 A1, US 2006/0188987 A1, 및 US 2006/0063231 A1에 기재되어 있고, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다. 일부 실시양태에서, TAL 이펙터 뉴클레아제는 예를 들어, 관심 게놈 유전자좌에서, 표적 핵산 서열 내에 또는 그 근처에서 컷팅되도록 조작되고, 여기서 표적 핵산 서열은 변형될 서열에 또는 그 근처에 있다.

[0984] 일부 TALEN에서, TALEN의 각각의 단량체는 2개의 초가변 잔기를 통해 단일 염기 페어링을 인식하는 33-35개의 TAL 반복을 포함한다. 일부 TALEN에서, 뉴클레아제 분자 카고는 독립적인 뉴클레아제, 예컨대 FokI 엔도뉴클레아제에 작동가능하게 연결된 TAL-반복-기반 DNA 결합 도메인을 포함하는 키메라 단백질이다. 예를 들어, 뉴클레아제 분자 카고는 제1 TAL-반복-기반 DNA 결합 도메인 및 제2 TAL-반복-기반 DNA 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 여기서 제1 및 제2 TAL-반복-기반 DNA 결합 도메인 각각은 FokI 뉴클레아제에 작동가능하게 연결되고, 여기

서 제1 및 제2 TAL-반복-기반 DNA 결합 도메인은 다양한 길이(12-20 bp)의 스페이서 서열에 의해 분리된 표적 DNA 서열의 각 가닥에서 2개의 인접 표적 DNA 서열을 인식하고, FokI 뉴클레아제 서브유닛이 이량체화하여 표적 서열에서 이중 가닥 절단을 만드는 활성 뉴클레아제를 생성한다.

[0985] 전사 활성화인자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)는 DNA 절단 도메인에 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인을 융합시킴으로써 생성된 인공 제한 효소이다. 이들 재분자 카고는 효율적이고, 프로그래밍 가능하며, 특이적인 DNA 절단을 가능하게 하고, 인시튜 게놈 편집을 위한 강력한 도구를 나타낸다. 전사 활성화인자-유사 이펙터(TALE)는 사실상 임의의 DNA 서열과 결합하도록 신속하게 조작될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이 용어 TALEN은 광범위하고, 또 다른 TALEN으로부터의 도움 없이 이중 가닥 DNA를 절단할 수 있는 단량체 TALEN을 포함한다. 용어 TALEN은 또한 동일한 부위에서 DNA를 절단하기 위해 함께 작동하도록 조작되는 한 쌍의 TALEN의 멤버 중 하나 또는 둘 다를 지칭하는 데 사용된다. 함께 작용하는 TALEN은 좌-TALEN 및 우-TALEN로서 지칭될 수 있으며, 이는 DNA의 손잡이성(handedness)을 참조한다. 미국 특허 번호 8,586,363; 8,450,471; 8,440,431; 8,440,432; 및 8,697,853을 참조하며, 이들 모두는 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0986] DNA-결합 단백질의 또 다른 예는 징크 핑거 단백질이다. 이러한 징크 핑거 단백질은, 예를 들어, 후성적 변형 도메인, 전사 활성화 도메인, 또는 전사억제자 도메인에 연결되거나 융합될 수 있다. 이러한 도메인의 예는 하기 Cas 단백질에 대해 기재되고, 또한 예를 들어, 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된 WO 2011/145121에서 확인될 수 있다. 이에 상응하여, 본원에 개시된 다양한 방법 및 조성물에서 이용될 수 있는 뉴클레아제 분자 카고의 또 다른 예는 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN)이다. 일부 ZFN에서, ZFN의 각각의 단량체는 3개 이상의 징크 핑거-기반 DNA 결합 도메인을 포함하고, 여기서 각각의 징크 핑거-기반 DNA 결합 도메인은 3 bp 서브사이트에 결합한다. 다른 ZFN에서, ZFN은 독립적인 뉴클레아제, 예컨대 FokI 엔도뉴클레아제에 작동가능하게 연결된 징크 핑거-기반 DNA 결합 도메인을 포함하는 키메라 단백질이다. 예를 들어, 뉴클레아제 분자 카고는 제1 ZFN 및 제2 ZFN을 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 제1 ZFN 및 제2 ZFN는 FokI 뉴클레아제 서브유닛에 작동가능하게 연결되고, 제1 및 제2 ZFN는 약 5-7 bp 스페이서에 의해 분리된 표적 DNA 서열의 각각의 가닥에서 2개의 인접 표적 DNA 서열을 인식하고, FokI 뉴클레아제 서브유닛은 이량체화되어 이중 가닥 절단을 만드는 활성 뉴클레아제를 생성한다. 예를 들어, US 2006/0246567; US 2008/0182332; US 2002/0081614; US 2003/0021776; WO 2002/057308 A2; US 2013/0123484; US 2010/0291048; WO 2011/017293 A2; 및 문헌[Gaj et al. (2013) Trends in Biotechnology 31(7):397-405]을 참조하며, 이들 각각은 모든 목적을 위해 그 전체가 본원에 참조로 원용된다.

[0987] **항원 결합 단백질에 대한 분자 카고의 접합**

[0988] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고, 예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP는 관심 부위(예를 들어, 뇌 또는 근육)로의 전달을 위해 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 적어도 하나의 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다.

[0989] 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 폴리뉴클레오티드 분자의 5' 말단, 폴리뉴클레오티드 분자의 3' 말단, 폴리뉴클레오티드 분자의 내부 부위 또는 이들의 임의의 조합에 접합된다.

[0990] 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 적어도 하나의 분자 카고(예를 들어, 적어도 하나의 폴리뉴클레오티드 분자, 및/또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 본원에 기재된 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 30개 또는 초과의 분자 카고(예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 30개 이상의 폴리뉴클레오티드 분자, 및/또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다.

[0991] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체는 하나의 siRNA 분자에 접합된 항-TfR 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체는 두 개의 siRNA 분자에 접합된 항-TfR 항체를 포함한다.

[0992] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체는 하나의 siRNA 분자에 접합된 항-TfR scFv를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체는 두 개의 siRNA 분자에 접합된 항-TfR scFv를 포함한다.

[0993] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체는 하나의 siRNA 분자에 접합된 항-TfR Fab를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체는 두 개의 siRNA 분자에 접합된 항-TfR Fab를 포함한다.

[0994] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체는 하나의 siRNA 분자에 접합된 항-TfR 1-아암(one-armed) 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체는 두 개의 siRNA 분자에 접합된 항-TfR 1-아암 항체를 포함한다.

[0995] 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 비특이적으로 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 비-부위 특이적 방식으로 라이신 잔기 또는 시스테인 잔기를 통해 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 비-부위 특이적 방식으로 라이신 잔기(예를 들어, 항-TfR 항원 결합 단백질에 존재하는 라이신 잔기)를 통해 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다. 일부 경우에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 비-부위 특이적 방식으로 시스테인 잔기(예를 들어, 항-TfR 항원 결합 단백질에 존재하는 시스테인 잔기)를 통해 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다.

[0996] 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 부위 특이적 방식으로 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 부위 특이적 방식을 통해, N-말단에서 라이신 잔기, 시스테인 잔기, C-말단에서 비천연 아미노산 또는 효소 변형 또는 효소 촉매작용 잔기를 통해 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 부위 특이적 방식을 통해 라이신 잔기(예를 들어, 항-TfR 항원 결합 단백질에 존재하는 라이신 잔기)를 통해 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 부위 특이적 방식을 통해 시스테인 잔기(예를 들어, 항-TfR 항원 결합 단백질에 존재하는 시스테인 잔기)를 통해 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 부위 특이적 방식을 통해 N-말단에서 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 부위 특이적 방식을 통해 C-말단에서 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 부위 특이적 방식을 통해 비천연 아미노산을 통해 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 부위 특이적 방식을 통해 효소 변형 또는 효소 촉매작용 잔기를 통해 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다.

[0997] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 및/또는 리포좀 또는 LNP)가 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 24, 30, 36개 이상의 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 및/또는 리포좀 또는 LNP)가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 1개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 2개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 3개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 4개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 5개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 6개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 7개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 8개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 9개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 10개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 11개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 12개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 13개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 14개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 15개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 16개의 분자 카고가 하나의 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 경우에, 하나 이상의 분자 카고가 동일하다. 다른 경우에, 하나 이상의 분자 카고가 상이하다.

[0998] 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된 분자 카고의 수는 비율을 형성한다. 일부 실시양태에서, 비율은 DAR(약물 대 항체) 비율로 지칭되며, 여기서 본원에서 지칭되는 바와 같은 약물은 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 24, 30, 36 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 1 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 2 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고

대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 3 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 4 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 5 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 6 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 7 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 8 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 9 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 10 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 11 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 12 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 16 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 20 이상이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 24 이상이다.

[0999] 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 20, 24, 30 또는 36이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 1이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 2이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 3이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 4이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 5이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 6이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 7이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 8이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 9이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 10이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 11이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 12이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 13이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 14이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 15이다. 일부 실시양태에서, 분자 카고 대 항-TfR 항원 결합 단백질의 DAR 비율은 약 16이다.

[1000] 일부 실시양태에서, 결합 모이어티를 이용한 리포좀 또는 LNP 기능화는 흡착 현상, 공유성 결합(covalent-nature binding) 또는 어댑터 분자 또는 링커의 사용에 의한 결합을 통해 수행된다.

[1001] *흡착*

[1002] 이 현상은 물리적 흡착과 이온 결합을 포함하는 비공유 고정화 전략이다. 물리적 흡착은 수소 결합, 정전기, 소수성 및 반데르발스(Van der Waals) 인력과 같은 약한 상호작용을 통해 발생하는 반면, 이온 결합은 항-TfR 항원 결합 단백질, 및 리포좀 또는 LNP 표면의 반대 전하 사이에서 발생한다. 그러나 공유 결합과 같은 다른 방법론과 비교할 때, 흡착은 안정성을 더 적게 제공한다. 반면에 상호작용이 비-공유적이라는 사실은 종양 조직에서 카고의 보다 쉬운 방출을 허용할 수 있다.

[1003] *공유 전략*

[1004] 공유 결합은 LNP의 사전 활성화를 필요로 한다. 일부 실시양태에서, 공유 전략은 이하에서 상세히 논의되는 바와 같이 카보디이미드 화학, 말레이미드 화학 또는 "클릭 화학(click chemistry)"을 통해 발생한다.

[1005] 접합 화학

[1006] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)는 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)는 항-TfR 항원 결합 단백질에 직접 접합된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)는 항-TfR 항원 결합 단백질과 분자 카고를 공유적으로 연결하는 링커를 통해 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, scFv, Fab 또는 1-아암 항체)이다.

[1007] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)는 화학적 결찰 과정에 의해 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)는 천연 결찰(native

ligation)에 의해 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 접합은 다음의 문헌에 기재된 바와 같다: 문헌 [Dawson, et al. "Synthesis of proteins by native chemical ligation," Science 1994, 266, 776-779]; [Dawson, et al. "Modulation of Reactivity in Native Chemical Ligation through the Use of Thiol Additives," J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 4325-4329]; [Hackeng, et al. "Protein synthesis by native chemical ligation: Expanded scope by using straightforward methodology.," Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96, 10068-10073]; 또는 [Wu, et al. "Building complex glycopeptides: Development of a cysteine-free native chemical ligation protocol," Angew. Chem. Int. Ed. 2006, 45, 4116-4125]. 일부 실시양태에서, 접합은 미국 특허 번호 8,936,910에 기재된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)는 천연 결찰 화학을 통해 부위 특이적으로 또는 비-특이적으로 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다.

[1008] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)는 "흔적 없는(traceless)" 커플링 기술(Philochem)을 활용한 부위-지향 방법에 의해 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, "흔적 없는" 커플링 기술은, 이후에 알데하이드 기를 함유하는 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)와 접합되는, 항-TfR 항원 결합 단백질의 N-말단 1,2-아미노티올 기를 활용한다(문헌 [Casi et al., "Site-specific traceless coupling of potent cytotoxic drugs to recombinant antibodies for pharmacodelivery," JACS 134(13): 5887-5892 (2012)] 참고).

[1009] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)는 항-TfR 항원 결합 단백질 내로 혼입된 비천연 아미노산을 활용한 부위-지향 방법에 의해 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 비천연 아미노산은 p-아세틸페닐알라닌(pAcPhe)을 포함한다. 일부 실시양태에서, pAcPhe의 케토 기는 알콕시-아민 유도된 접합 모이어티에 선택적으로 커플링되어 옥심 결합을 형성한다(문헌 [Axup et al., "Synthesis of site-specific antibody-drug conjugates using unnatural amino acids,"PNAS 109(40): 16101-16106 (2012)] 참고).

[1010] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)는 효소 촉매작용 과정을 활용한 부위-지향 방법에 의해 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 부위-지향 방법은 SMARTagTM 기술(Catalent, Inc.)을 활용한다. 일부 실시양태에서, SMARTagTM 기술은 알데하이드 태그의 존재 하의 산화 과정을 통해 포르밀글리신 생성 효소(FGE)에 의해 시스테인으로부터 포르밀글리신(FGly) 잔기를 생성한 후 하이드라지노-픽테트-스펭글러(hydrazino-Pictet-Spengler, HIPS) 결찰을 통해 본원에 기재된 알킬하이드레인-기능화된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 FGly를 접합하는 것을 포함한다(문헌 [Wu et al., "Site-specific chemical modification of recombinant proteins produced in mammalian cells by using the genetically encoded aldehyde tag," PNAS 106(9): 3000-3005 (2009)]; [Agarwal, et al., "A Pictet-Spengler ligation for protein chemical modification," PNAS 110(1): 46-51 (2013)] 참고).

[1011] 일부 실시양태에서, 효소 촉매작용 과정은 트랜스글루타미나아제(TG), 예를 들어 미생물 트랜스글루타미나아제(mTG)를 포함한다. 일부 경우에, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)는 미생물 트랜스글루타미나아제 촉매작용 과정을 활용하여 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, mTG는 인식 서열 내의 글루타민의 아미드 측쇄와 본원에 기재된 기능화된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)의 1차 아민 사이의 공유 결합의 형성에 촉매작용한다. 일부 실시양태에서, mTG는 스트렙토미세스 모바렌시스(Streptomyces mobarensis)로부터 생산된다(문헌 [Strop et al., "Location matters: site of conjugation modulates stability and pharmacokinetics of antibody drug conjugates," Chemistry and Biology 20(2) 161-167 (2013)] 참고).

[1012] 일부 실시양태에서, 수용체 글루타민 잔기를 포함하는 아미노산 서열은 TG에 의한 인식을 위해 적절한 조건 하에 폴리펩티드 서열에 혼입(예를 들어, 부가(appended))된다. 이 서열은 아미노산 서열 내의 아미노산 측쇄와 반응 파트너 사이의 반응을 통해 TG에 의한 가교 결합을 초래한다. 인식 태그는 TG 인식 태그를 포함하는 폴리펩티드에 자연적으로 존재하지 않는 펩티드 서열일 수 있다. 일부 실시양태에서, TG 인식 태그는 적어도 하나의 Gln을 포함한다. 일부 실시양태에서, TGase 인식 태그는 아미노산 서열 XXQX(서열번호 438)를 포함하고, 여기서 X는 임의의 아미노산(예를 들어, 통상적인 아미노산 Leu, Ala, Gly, Ser, Val, Phe, Tyr, His, Arg, Asn, Glu, Asp, Cys, Gln, Ile, Met, Pro, Thr, Lys 또는 Trp 또는 비통상적인 아미노산)이다. 일부 실시양태에서, 아실공여체 글루타민 함유 태그는 LLQGG(서열번호 439), LLQG(서열번호 440), LSLSQG(서열번호 441), gGGLLQGG(서

열번호 442), gLLQG(서열번호 443), LLQ(서열번호 444), gSPLAQSHGG(서열번호 445), gLLQGGG(서열번호 446), gLLQGG(서열번호 447), gLLQ(서열번호 448), LLQLLQGA(서열번호 449), LLQGA(서열번호 450), LLQYQGA(서열번호 451), LLQGSG(서열번호 452), LLQYQG(서열번호 453), LLQLLQG(서열번호 454), SLLQG(서열번호 455), LLQLQ(서열번호 456), LLQLLQ(서열번호 457) 및 LLQGR(서열번호 458)로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 포함한다. 예를 들어, PCT 공개 번호 WO2012/059882를 참고하라. 일부 실시양태에서, 아실 공여체 글루타민 함유 태그는 항원 결합 단백질의 N-말단에 존재한다. 일부 실시양태에서, 아실 공여체 글루타민 함유 태그는 항원 결합 단백질의 C-말단에 존재한다. 일부 실시양태에서, 아실 공여체 글루타민 함유 태그는 항원 결합 단백질의 N-말단과 C-말단 둘 모두에 존재한다.

[1013] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)는, 서열-특이적 트랜스펩티다아제를 활용하는, PCT 공개 번호 WO2014/140317에 기재된 바와 같은 방법에 의해 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)는 미국 특허 공개 번호 2015/0105539 및 2015/0105540에 기재된 바와 같은 방법에 의해 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다.

[1014] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)는 아지드-알킨 사이클로부가(Azide-Alkyne Cycloaddition, CuAAC) 클릭 화학을 활용하여 항-TfR 항원 결합 단백질에 접합된다. 아지드 및 알킨은 활성화된 알킨과 아지드의 반응을 이용하여 촉매 없는 [3+2] 사이클로부가를 거칠 수 있다. 이러한 촉매 없는 [3+2] 사이클로부가를 본원에 기재된 방법에서 사용하여 항-TfR 항원 결합 단백질과 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)를 접합할 수 있다. 알킨은, 전자 흡인기(electron-withdrawing group)를 이러한 알킨 고리에 부가하는, 단지 예로서 8원 고리 구조 또는 9원 고리 구조와 같은 고리 스트레인(ring strain)에 의해 활성화될 수 있거나, 알킨은 단지 예로서 Au(I) 또는 Au(III)와 같은 루이스 산의 첨가에 의해 활성화될 수 있다.

[1015] 고리 스트레인에 의해 활성화된 알킨은 "구리 없는" [3+2] 사이클로부가에 설명되어 있고 거기서 사용되었다. 예를 들어, 문헌 [Agard et al., J. Am. Chem. Soc., 126 (46):15046-15047 (2004)]에 기재된 사이클로옥틴 및 디플루오로사이클로옥틴, PCT 국제 공개 번호 WO 2009/067663 A1(2009)(Boons et al.)에 기재된 디벤조사이클로옥틴, 문헌 [Debets et al., Chem. Comm., 46:97-99 (2010)]에 기재된 아자-디벤조사이클로옥틴, 및 문헌 [Dommerholt et al., Angew. Chem. 122:9612-9615 (2010)]에 기재된 사이클로노닌. 일부 실시양태에서, 테트라진(Tzn)-활성화된 항-TfR 항원-결합 단백질은 본원에 기재된 트랜스-사이클로옥텐(TCO)-활성화된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 가교 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, TCO-활성화된 항-TfR 항원-결합 단백질은 본원에 기재된 Tzn-활성화된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 가교 결합될 수 있다.

[1016] 링커

[1017] 본원에 기재된 복합체는 일반적으로 결합제를 분자 카고(예를 들어, 폴리뉴클레오티드 분자, 리포좀 또는 LNP)에 연결하는 링커를 포함한다. 링커는 적어도 하나의 공유 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 결합제를 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP에 연결하는, 단일 결합, 예를 들어 디설파이드 결합 또는 디설파이드 가교일 수 있다. 그러나 일부 실시양태에서, 링커는 결합제를 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP에 다중 공유 결합을 통해 연결할 수 있다. 링커는 일반적으로 시험관내 및 생체내에서 안정하며, 특정 세포 환경에서 안정할 수 있다. 또한, 일반적으로 링커는 결합제 또는 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP의 기능적 특성에 부정적인 영향을 미치지 않는다. 링커 합성의 예 및 방법은 당업계에 알려져 있다(예를 들어, 문헌 [Kline, T. et al. "Methods to Make Homogenous Antibody Drug Conjugates." Pharmaceutical Research, 2015, 32:11, 3480-3493]; [Jain, N. et al. "Current ADC Linker Chemistry" Pharm Res. 2015, 32:11, 3526-3540]; [McCombs, J. R. and Owen, S. C., "Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry" AAPS J. 2015, 17:2, 339-351] 참고).

[1018] 링커에 대한 전구체는 전형적으로 결합제 및 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP 양쪽 모두에 대한 부착을 허용하는 두 가지 상이한 반응성 종을 함유할 것이다. 일부 실시양태에서, 두 가지 상이한 반응성 종은 친핵체(nucleophile) 및/또는 친전자체(electrophile)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 결합제의 라이신 잔기 또는 시스테인 잔기에 대한 접합을 통해 결합제에 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커는 말레이미드 함유 링커를 통해 근육 표적화제의 시스테인 잔기에 연결되며, 여기서 선택적으로 말레이미드 함유 링커는 말레이미도카프로일 또는 말레이미도메틸 사이클로헥산-1-카복실레이트 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 3-아

릴프로피오니트릴 작용기를 통해 티올 기능화된 분자 카고 또는 근육 표적화제의 시스테인 잔기에 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커는 아미드 결합, 하이드라지드, 트리아졸, 티오에테르 또는 디설파이드 결합을 통해 결합제 및/또는 폴리뉴클레오티드 분자 또는 LNP에 연결된다.

[1019] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 링커는 절단성 링커 또는 비절단성 링커이다. 일부 실시양태에서, 링커는 절단성 링커이다. 다른 실시양태에서, 링커는 비절단성 링커이다.

[1020] 절단성 링커

[1021] 절단성 링커는 프로테아제-민감성 링커, pH-민감성 링커 또는 글루타티온-민감성 링커일 수 있다. 이러한 링커는 일반적으로 세포 내에서만 절단 가능하며 세포외 환경에서 바람직하게 안정적이다.

[1022] 프로테아제-민감성 링커는 프로테아제 효소 활성에 의해 절단 가능하다. 이러한 링커는 전형적으로 펩티드 서열을 포함하며, 길이가 2-10개 아미노산, 약 2-5개 아미노산, 약 5-10개 아미노산, 약 10개 아미노산, 약 5개 아미노산, 약 3개 아미노산 또는 약 2개 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 펩티드 서열은 자연-발생 아미노산, 예를 들어 시스테인, 알라닌, 또는 비자연-발생 또는 변형된 아미노산을 포함할 수 있다. 비자연-발생 아미노산은 3-아미노산, 호모-아미노산, 프롤린 유도체, 3-치환 알라닌 유도체, 선형 코어 아미노산, N-메틸 아미노산 및 당업계에 알려진 다른 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로테아제-민감성 링커는 발린-시트룰린 또는 알라닌-시트룰린 디펩티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로테아제-민감성 링커는 리소좀 프로테아제, 예를 들어 카텝신 B 및/또는 엔도솜 프로테아제에 의해 절단될 수 있다.

[1023] pH-민감성 링커는 높거나 낮은 pH 환경에서 쉽게 분해되는 공유 결합이다. 일부 실시양태에서, pH-민감성 링커는 4 내지 6 범위의 pH에서 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, pH-민감성 링커는 하이드라존 또는 사이클릭 아세탈을 포함한다. 일부 실시양태에서, pH-민감성 링커는 엔도솜 또는 리소좀 내에서 절단된다.

[1024] 일부 실시양태에서, 글루타티온-민감성 링커는 디설파이드 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 글루타티온-민감성 링커는 세포 내부의 글루타티온 종과의 디설파이드 교환 반응에 의해 절단된다. 일부 실시양태에서, 디설파이드 모이어티는 적어도 하나의 아미노산, 예를 들어 시스테인 잔기를 추가로 포함한다.

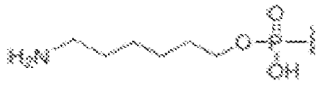
[1025] 비절단성 링커

[1026] 일부 실시양태에서, 비절단성 링커가 사용될 수 있다. 일반적으로, 비절단성 링커는 세포 또는 생리적 환경에서 쉽게 분해될 수 없다. 일부 실시양태에서, 비절단성 링커는 선택적으로 치환된 알킬 기를 포함하며, 여기서 치환은 할로겐, 하이드록실 기, 산소 종 및 기타 통상적인 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 선택적으로 치환된 알킬, 선택적으로 치환된 알킬렌, 선택적으로 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 적어도 하나의 비천연 아미노산을 포함하는 펩티드 서열, 절단된 글리칸, 효소적으로 분해될 수 없는 당 또는 당류, 아지드, 알킨아지드, LPXT 서열을 포함하는 펩티드 서열, 티오에테르, 비오틴, 비페닐, 폴리에틸렌 글리콜 또는 동등한 화합물의 반복 단위, 산 에스테르, 산 아미드, 설파미드 및/또는 알콕시-아민 링커를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 소르타아제-매개 결찰은 LPXT 서열을 포함하는 근육 표적화제를 (G) 서열을 포함하는 분자 카고에 공유 결합하는 데 활용될 것이다(예를 들어, 문헌 [Proft T. Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilization. Biotechnol Lett. 2010, 32(1):1-10] 참고).

[1027] 일부 실시양태에서, 링커는 치환된 알킬렌, 선택적으로 치환된 알케닐렌, 선택적으로 치환된 알키닐렌, 선택적으로 치환된 사이클로알킬렌, 선택적으로 치환된 사이클로알케닐렌, 선택적으로 치환된 아릴렌, N, O 및 S로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자를 추가로 포함하는 선택적으로 치환된 헤테로아릴렌; N, O 및 S로부터 선택된 적어도 하나의 헤테로원자를 추가로 포함하는 선택적으로 치환된 헤테로사이클릴렌; 이미노, 선택적으로 치환된 질소 종, 선택적으로 치환된 산소 종, 선택적으로 치환된 황 종 또는 폴리(알킬렌 옥사이드), 예를 들어 폴리에틸렌 옥사이드 또는 폴리프로필렌 옥사이드를 포함할 수 있다.

[1028] 일부 경우에, 링커는 비-중합체 링커이다. 비-중합체 링커는 중합 과정에 의해 생성된 단량체의 반복 단위를 함유하지 않는 링커를 지칭한다. 예시적인 비-중합체 링커는, 비제한적으로 C1-C30 알킬 기(예를 들어, C5, C4, C3, C2 또는 C1 알킬 기), 동종이작용성(homobifunctional) 가교 링커, 이종이작용성 가교 링커, 펩티드 링커, 흔적이 없는 링커, 자가-희생적 링커, 말레이미드계 링커 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 경우에, 비-중합체 링커는 C1-C30 알킬 기(예를 들어, C5, C4, C3, C2 또는 C1 알킬 기), 동종이작용성 가교 링커, 이종이작용성 가교 링커, 펩티드 링커, 흔적이 없는 링커, 자가-희생적 링커, 말레이미드계 링커 또는 이들의 조합을 포함한다. 추가 경우에, 비-중합체 링커는 동일한 유형의 링커를 두 개 초과로 포함하지 않는데, 예를 들어, 두 개

초과의 동종이작용성 가교 링커 또는 두 개 초과의 펩티드 링커를 포함하지 않는다. 추가 경우에, 비-중합체 링커는 선택적으로 하나 이상의 반응성 작용기를 포함한다. 일 실시양태에서, 링커는 구조



를 갖는다. 일부 경우에서, 비-중합체 링커는 폴리알킬렌 옥사이드(예를 들어, PEG)를 포함하지 않는다. 일부 경우에서, 비-중합체 링커는 PEG를 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 링커는 동종이작용성 링커를 포함한다. 예시적인 동종이작용성 링커는, 비제한적으로 유기아지드, 유기알킨, 로만트 시약(Lomant's reagent) 디티오비스(석신이미딜프로피오네이트) DSP, 3'3'-디티오비스(설포석신이미딜 프로피오네이트(DTSSP), 디석신이미딜 수베레이트(DSS), 비스(설포석신이미딜)수베레이트(BS), 디석신이미딜 타르트레이트(DST), 디설포석신이미딜 타르트레이트(설포 DST), 에틸렌 글리코비스(석신이미딜석시네이트)(EGS), 디석신이미딜 글루타레이트(DSG), N,N'-디석신이미딜 카보네이트(DSC), 디메틸 아디피미데이트(DMA), 디메틸 피멜리미데이트(DMP), 디메틸 수베리미데이트(DMS), 디메틸-3,3'-디티오비스프로피온이미데이트(DTBP), 1,4-디-3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미도)부탄(DPDPB), 비스말레이미도헥산(BMH), 아릴 할라이드 함유 화합물(DFDNB), 예컨대 1,5-디플루오로-2,4-디니트로벤젠 또는 1,3-디플루오로-4,6-디니트로벤젠, 4,4'-디플루오로-3,3'-디니트로페닐 설폰(DFDNPS), 비스-113-(4-아지도살리실아미도)에틸]디설파이드(BASED), 포름알데하이드, 글루타르알데하이드, 1,4-부탄디올 디글리시딜 에테르, 아디프산 디하이드라지드, 카보하이드라지드, o-톨루이딘, 3,3'-디메틸벤지딘, 벤지딘, a,a'-p-디아미노디페닐, 디아이오도-p-크실렌 설폰산, N,N'-에틸렌-비스(아이오도아세트아미드), 또는 N,N'-헥사메틸렌-비스(아이오도아세트아미드)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 이종이작용성 링커를 포함한다. 예시적인 이종이작용성 링커는, 비제한적으로 아민 반응성 및 설프하이드릴 가교제, 예컨대 N-석신이미딜 3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(sPDP), 장쇄 N-석신이미딜 3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(LC-sPDP), 수용성 장쇄 N-석신이미딜 3-(2-피리딜디티오) 프로피오네이트(설포-LCsPDP), 석신이미딜옥시카보닐-a-메틸-a-(2-피리딜디티오) 톨루엔(sMPT), 설포석신이미딜 1-6-[a-메틸-a-(2-피리딜디티오)톨루아미도]헥사노에이트(설포-LC-sMPT), 석신이미딜 1-4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실레이트(sMCC), 설포석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(설포-sMCC), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시석신이미드 에스테르(MBs), m-말레이미도벤조일-N-하이드록시설포석신이미드 에스테르(설포-MB s), N-석신이미딜(4-아이오도아세틸)아미노벤조에이트(sIAB), 설포석신이미딜(4-아이오도아세틸)아미노벤조에이트(설포-sIAB), 석신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트(sMPB), 설포석신이미딜-4-(p-말레이미도페닐)부티레이트(설포-sMPB), N-(y-말레이미도부티릴옥시)석신이미드 에스테르(GMBs), N-(y-말레이미도부티릴옥시)설포석신이미드 에스테르(설포-GMB), 석신이미딜 6-((아이오도아세틸)아미노)헥사노에이트(sIAX), 석신이미딜 6-[6-(((아이오도아세틸)아미노)헥사노일)아미노]헥사노에이트(sIAXX), 석신이미딜 4-(((아이오도아세틸)아미노)메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(sIAC), 석신이미딜 6-((((4-아이오도아세틸)아미노)메틸)사이클로헥산-1-카보닐)아미노)헥사노에이트(sIACX), p-니트로페닐 아이오도아세테이트(NPIA), 카보닐 반응성 및 설프하이드릴 반응성 가교제, 예컨대 4-(4-N-말레이미도페닐)부티르산 하이드라지드(MPBH), 4-(N-말레이미도메틸) 사이클로헥산-1-카복실-하이드라지드-8(M2C2H), 3-(2-피리딜디티오)프로피오닐 하이드라지드(PDPH), 아민 반응성 및 광반응성 가교제, 예컨대 N-하이드록시석신이미딜-4-아지도살리실산(NHs-AsA), N-하이드록시설포석신이미딜-4-아지도살리실산(설포-NHs-AsA), 설포석신이미딜-(4-아지도살리실아미도)헥사노에이트(설포-NHs-LC-AsA), 설포석신이미딜-2-(p-아지도살리실아미도)에틸1,3'-디티오프로피오네이트(sAsD), N-하이드록시석신이미딜-4-아지도벤조에이트(HsAB), N-하이드록시설포석신이미딜-4-아지도벤조에이트(설포-HsAB), N-석신이미딜-6-(4'-아지도2'-니트로페닐아미노)헥사노에이트(sANPAH), 설포 석신이미딜-6-(4'-아지도-2'-니트로페닐아미노)헥사노에이트(설포-sANPAH), N-5-아지도-2-니트로벤조일옥시석신이미드(ANB-NOs), 설포석신이미딜-2-(m-아지도-o-니트로벤즈아미도)-에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(sAND), N-석신이미딜-4(4-아지도페닐)1,3'-디티오프로피오네이트(sADP), N-설포석신이미딜(4-아지도페닐)-1,3'-디티오프로피오네이트(설포-sADP), 설포석신이미딜 4-(p-아지도페닐) 부티레이트(설포-sAPB), 설포석신이미딜 2-(7-아지도-4-메틸쿠마린-3-아세트아미드)에틸-1,3'-디티오프로피오네이트(sAED), 설포석신이미딜 7-아지도-4-메틸쿠마인-3-아세테이트(설포-sAMCA), p-니트로페닐 디아조피루베이트(pNPDP), p-니트로페닐-2-디아조-3,3,3-트리플루오로프로피오네이트(PNP-DTP), 설프하이드릴 반응성 및 광반응성 가교제, 예컨대 1-(p-아지도살리실아미도)-4-(아이오도아세트아미도) 부탄(AsIB), N-[4-(p-아지도살리실아미도)부틸]-3'-(2'-피리딜디티오)프로피온아미드(APDP), 벤조페논-4-아이오도아세트아미드, 벤조페논-4-말레이미드 카보닐 반응성 및 광반응성 가교제, 예컨대 p-아지도벤조일 하이드라지드(ABH), 카복실레이트 반응성 및 광반응성 가교제, 예컨대 4-(p-아지도살리실아미도) 부틸아민(AsBA), 및 아르기닌 반응성 및 광반응성 가교제, 예컨대 p-아지도페닐 글리옥살(APG)을 포함한다.

[1029] 일부 실시양태에서, 링커는 반응성 작용기를 포함한다. 일부 경우에, 반응성 작용기는 항-TfR 항원 결합 단백질

에 존재하는 친전자성 기에 반응성인 친핵성 기를 포함한다. 예시적인 친전자성 기는 카보닐 기, 예컨대 알데하이드, 케톤, 카복실산, 에스테르, 아미드, 에논, 아실 할라이드 또는 산 무수물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 반응성 작용기는 알데하이드이다. 예시적인 친핵성 기는 하이드라지드, 옥심, 아미노, 하이드라진, 티오세미카바존, 하이드라진 카복실레이트 및 아릴하이드라지드를 포함한다.

[1030] 일부 실시양태에서, 링커는 말레이미드 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 말레이미드 기는 말레이미드 스페이서로도 지칭된다. 일부 실시양태에서, 말레이미드 기는 카프로산을 추가로 포함하고, 이는 말레이미도카프로일(mc)을 형성한다. 일부 경우에, 링커는 말레이미도카프로일(mc)을 포함한다. 일부 경우에, 링커는 말레이미도카프로일(mc)이다. 다른 실시양태에서, 말레이미드 기는 말레이미도메틸 기, 예컨대 앞서 기재된 석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(sMCC) 또는 설포석신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)사이클로헥산-1-카복실레이트(설포-sMCC)를 포함한다.

[1031] 일부 실시양태에서, 말레이미드 기는 자가-안정화 말레이미드이다. 일부 실시양태에서, 자가-안정화 말레이미드는 디아미노프로피온산(DPR)을 활용해 말레이미드에 인접한 염기성 아미노 기를 통합하여 티오석신이미드 고리 가수분해의 분자 내 촉매작용을 제공하고, 이로써 레트로-마이클(retro-Michael) 반응을 통해 말레이미드가 제거 반응을 거치지 않도록 한다. 일부 실시양태에서, 자가-안정화 말레이미드는 문헌 [Lyon, et al., "Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates," Nat. Biotechnol. 32(10):1059-1062 (2014)]에 기재된 말레이미드 기이다. 일부 실시양태에서, 링커는 자가-안정화 말레이미드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 자가-안정화 말레이미드이다.

[1032] 일부 실시양태에서, 링커는 예를 들어 유기아지드 모이어티의 일부로서 적어도 하나의 아지드 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 예를 들어 유기알킨 모이어티의 일부로서 적어도 하나의 알킨 모이어티를 포함한다. 일 실시양태에서, 알킨은 활성화된 알킨이다. 일부 실시양태에서, 링커는 트리졸(예를 들어, 아지드와 알킨의 1,3-사이클로부가 반응을 통해 형성됨)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 디엘스-알더(Diels-Alder) 부가물을 포함한다.

[1033] 일부 실시양태에서, 링커는 펩티드 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 모이어티는 적어도 2, 3, 4, 5 또는 6개 이상의 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 모이어티는 최대 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8개의 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 모이어티는 약 2, 약 3, 약 4, 약 5 또는 약 6개의 아미노산 잔기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 펩티드 모이어티는 (예를 들어, 효소적으로 또는 화학적으로) 절단성 펩티드 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 모이어티는 비절단성 펩티드 모이어티이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 모이어티는 Val-Cit(발린-시트룰린), Gly-Gly-Phe-Gly, Phe-Lys, Val-Lys, Gly-Phe-Lys, Phe-Phe-Lys, Ala-Lys, Val-Arg, Phe-Cit, Phe-Arg, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Ala-Leu-Ala-Leu, 또는 Gly-Phe-Leu-Gly를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 펩티드 모이어티, 예컨대 Val-Cit(발린-시트룰린), Gly-Gly-Phe-Gly, Phe-Lys, Val-Lys, Gly-Phe-Lys, Phe-Phe-Lys, Ala-Lys, Val-Arg, Phe-Cit, Phe-Arg, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp-Cit, Phe-Ala, Ala-Leu-Ala-Leu, 또는 Gly-Phe-Leu-Gly를 포함한다. 일부 경우에, 링커는 Val-Cit를 포함한다. 일부 경우에, 링커는 Val-Cit이다.

[1034] 일부 실시양태에서, 링커는 벤조산 기 또는 이의 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 벤조산 기 또는 이의 유도체는 파라아미노벤조산(PABA)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 벤조산 기 또는 이의 유도체는 감마-아미노부티르산(GABA)을 포함한다.

[1035] 일부 실시양태에서, 링커는 말레이미드 기, 펩티드 모이어티 및/또는 벤조산 기 중 하나 이상을 임의의 조합으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 말레이미드 기, 펩티드 모이어티 및/또는 벤조산 기의 조합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 말레이미드 기는 말레이미도카프로일(mc)이다. 일부 실시양태에서, 펩티드 기는 val-cit이다. 일부 실시양태에서, 벤조산 기는 PABA이다. 일부 실시양태에서, 링커는 mc-val-cit 기를 포함한다. 일부 경우에, 링커는 val-cit-PABA 기를 포함한다. 추가 경우에, 링커는 mc-val-cit-PABA 기를 포함한다.

[1036] 일부 실시양태에서, 링커는 자가-희생적 링커 또는 자가-제거 링커이다. 일부 경우에, 링커는 자가-희생적 링커이다. 다른 경우에, 링커는 자가-제거 링커(예를 들어, 고리화 자가-제거 링커)이다. 일부 실시양태에서, 링커는 미국 특허 번호 9,089,614 또는 PCT 공개 번호 WO 2015/038426에 기재된 링커를 포함한다.

[1037] 일부 실시양태에서, 링커는 수지상 유형 링커이다. 일부 실시양태에서, 수지상 유형 링커는 분지형, 다작용성 링커 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 수지상 유형 링커는 항-TfR 항원 결합 단백질에 대한 폴리뉴클레오티드 B의 몰비를 증가시키는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 수지상 유형 링커는 PAMAM 덴드리머를 포함

한다. 일부 실시양태에서, 수지상 유형 링커는 트리아졸을 포함한다. 일부 실시양태에서, 트리아졸은 PEG 연결에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커는 WO 2022/015656에 기재된 바와 같다.

[1038] 일부 실시양태에서, 링커는 흔적 없는 링커이거나 절단 후에 항-TfR 항원 결합 단백질 또는 폴리뉴클레오티드 B에 링커 모이어티(예를 들어, 원자 또는 링커 기)를 남기지 않는 링커이다. 예시적인 흔적 없는 링커는 비제한적으로 게르마늄 링커, 실리슘 링커, 황 링커, 셀레늄 링커, 질소 링커, 인 링커, 붕소 링커, 크롬 링커 또는 페닐하이드라지드 링커를 포함한다. 일부 경우에, 링커는 문헌 [Hejesen, et al., "A traceless aryl-triazene linker for DNA-directed chemistry," Org Biomol Chem 11(15): 2493-2497 (2013)]에 기재된 바와 같은 흔적 없는 아릴-트리아젠 링커이다. 일부 실시양태에서, 링커는 문헌 [Blaney, et al., "Traceless solid-phase organic synthesis," Chem. Rev. 102: 2607-2024 (2002)]에 기재된 흔적 없는 링커이다. 일부 실시양태에서, 링커는 미국 특허 번호 6,821,783에 기재된 바와 같은 흔적 없는 링커이다.

[1039] 일부 실시양태에서, 링커는 미국 특허 번호 6,884,869; 7,498,298; 8,288,352; 8,609,105; 또는 8,697,688; 미국 특허 공개 번호 US2014/0127239; US2013/028919; US2014/286970; US2013/0309256; US2015/037360; 및 US2014/0294851; 또는 국제 출원 공개 번호 WO2015/057699; WO2014/080251; WO2014/197854; WO2014/145090; WO2014/177042, WO2022/015656에 기재된 링커이다.

[1040] 일부 실시양태에서, 링커는 결합이고, 즉, 링커가 부재하다. 일부 경우에, 링커는 비-중합체 링커이다. 일부 경우에, 링커는 중합체 링커이다.

[1041] 일부 실시양태에서, 링커는 알킬 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 C1-C30 알킬 기, 또는 C1-C24 알킬 기, 또는 C1-C20 알킬 기, 또는 C1-C16 알킬 기, 또는 C1-C12 알킬 기, 또는 C1-C10 알킬 기, 또는 C1-C8 알킬 기, 또는 C1-C6 알킬 기, 또는 C1-C4 알킬 기를 포함한다. 일부 경우에, 링커는 예를 들어 C3, C4, C3, C2 또는 C1 알킬 기와 같은 C1-C6 알킬 기이다. 일부 경우에, C1-C6 알킬 기는 비치환된 C1-C6 알킬 기이다. 링커의 맥락에서 사용되는 바와 같이, 알킬은 최대 6개의 탄소 원자를 함유하는 포화된 직쇄 또는 분지형 탄화수소 라디칼을 의미한다. 일부 실시양태에서, 링커는 앞서 기재된 동종이작용성 링커 또는 이종이작용성 링커를 포함한다.

[1042] 일부 경우에, 링커는 올리고머 또는 중합체 링커이다. 일부 실시양태에서, 링커는 분지형 또는 비분지형 단량체 및/또는 2차원 또는 3차원으로 가교 결합된 단량체의 네트워크로 구성된 천연 또는 합성 올리고머 또는 중합체이다. 일부 실시양태에서, 링커는 폴리사카라이드, 리그닌, 고무 또는 폴리알킬렌 옥사이드(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜)를 포함한다.

[1043] 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 중합체 링커는 비제한적으로 알파-, 오메가-디하이드록실폴리에틸렌글리콜, 생분해성 락톤계 중합체, 예를 들어 폴리아크릴산, 폴리락티드산(PLA), 폴리(글리콜산)(PGA), 폴리프로필렌, 폴리스티렌, 폴리올레핀, 폴리아미드, 폴리시아노아크릴레이트, 폴리이미드, 폴리에틸렌 테레프탈레이트(폴리(에틸렌 테레프탈레이트), PET, PETG 또는 PETE로도 알려짐), 폴리테트라메틸렌 글리콜(PTG) 또는 폴리우레탄뿐만 아니라 이들의 혼합물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 폴리알킬렌 옥사이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 PEG를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 폴리에틸렌 이미드(PEI) 또는 하이드록시 에틸 전분(HES)을 포함한다.

[1044] 일부 실시양태에서, 링커는 별개의 에틸렌 옥사이드 단위를 포함하는 폴리알킬렌 옥사이드(예를 들어, PEG)를 포함한다. 일부 경우에, 링커는 약 2 내지 약 48개의 에틸렌 옥사이드 단위를 포함한다. 일부 경우에, 중합체 모이어티 C는 약 2, 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 24, 약 30, 약 36, 약 42, 또는 약 48개의 에틸렌 옥사이드 단위를 포함한다.

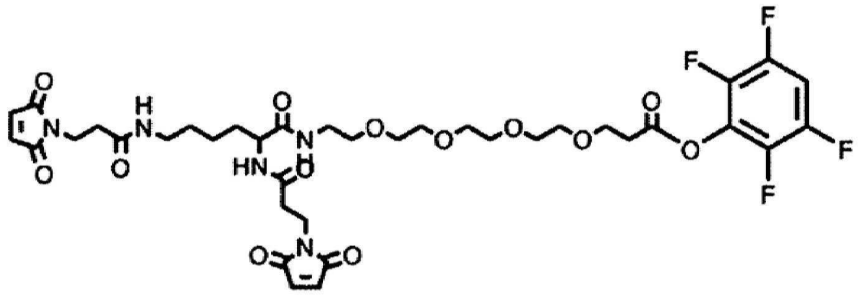
[1045] 일부 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질은 미국 특허 출원 공개 번호 US2002/0132990, US2004/0023902, US2007/012152 및 US2010/0209440에 개시된 바와 같이 프로타민 링커를 사용하여 본원에 기재된 분자 카고(예를 들어, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드 분자, 또는 리포좀 또는 LNP)에 접합된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체에서 사용하기 위해 포함된 프로타민 링커는 US 2010/0209440에 개시된 서열을 포함한다.

[1046] 산 절단성 링커는 또한 본원에 기재된 단백질-약물 접합체에서 사용될 수 있으며, 비제한적으로 비스말레이미드 오톡시 프로판, 아디프산 디하이드라지드 링커(예를 들어, 문헌 [Fattom et al., Infection& Immun. 60:584-589, 1992] 참고) 및 세포내 트랜스페린 순환 경로로의 진입을 허용하기에 충분한 트랜스페린 부분을 함유하는

산 불안정성 트랜스페린 접합체(예를 들어, 문헌 [Welhoner et al., J. Biol. Chem. 266:4309 4314, 1991] 참고)를 포함한다. 산 절단성 링커를 통해 연결된 접합체는 엔도솜과 같은 산성 세포내 구획에서 우선적으로 절단되어야 한다.

[1047] 또한, 광절단성 링커가 본원에 기재된 단백질-약물 접합체에서 사용될 수 있다. 광절단성 링커는 광에 노출 시 절단되어(예를 들어, 문헌 [Goldmacher et al., Bioconj. Chem. 3:104-107, 1992] 참고) 광에 노출 시 표적 작용제를 방출한다. (문헌 [Hazum et al., Proc. Eur. Pept. Symp., 16th, Brunfeldt, K (Ed), pp. 105 110, 1981]; 시스테인에 대한 광절단성 보호 기로서의 니트로벤질 기; 문헌 [Yen et al., Makromol. Chem 190:69 82, 1989]; 하이드록시프로필메타크릴아미드 공중합체, 글리신 공중합체, 플루오레세인 공중합체 및 메틸로다민 공중합체를 포함하는 수용성 광절단성 공중합체; 및 문헌 [Senter et al., Photochem. Photobiol. 42:231 237, 1985]; 광절단성 연결을 생성하는 니트로벤질옥시 카보닐 클로라이드 가교 결합 시약), 관련 부분은 본원에 참고로 원용된다. 이러한 링커는 피부과 또는 안과 병태를 치료하는 데 특히 유용하다. 또한, 재발협착증(restenosis)의 예방 또는 치료에 있어서 혈관형성술(angioplasty) 중 광섬유를 사용하여 광에 노출될 수 있는 혈관과 같은 다른 조직은 광절단성 링커의 사용로부터 이익을 얻을 수 있다. 접합체의 투여 후, 신체 부위는 광에 노출되며, 이는 접합체로부터 표적화된 모이어티의 방출로 이어진다. 열-민감성 링커도 유사한 적용성을 가질 것이다.

[1048] 일 실시양태에서, 링커는 다음의 구조를 갖는다:



[1049] .

[1050] **폴리뉴클레오티드 및 제조 방법**

[1051] 또한, 선택적으로 프로모터 또는 다른 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결되는, 항-TfR 단백질-약물 접합체, 예를 들어 항-TfR scFv-약물 접합체 또는 항-TfR Fab-약물 접합체(예를 들어, 31874B; 31863B; 69348; 69340; 69331; 69332; 69326; 69329; 69323; 69305; 69307; 12795B; 12798B; 12799B; 12801B; 12802B; 12808B; 12812B; 12816B; 12833B; 12834B; 12835B; 12847B; 12848B; 12843B; 12844B; 12845B; 12839B; 12841B; 12850B; 69261; 또는 69263) 또는 이의 폴리펩티드 부분(들)을 인코딩하는 임의의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, DNA 또는 RNA)가 본원에 제공된다. 이러한 폴리뉴클레오티드에 의해 인코딩된 폴리펩티드 또한 본원에 제공된다.

[1052] 본원에 제시된 항-hTfR 단백질-약물 접합체의 HCVR 및 LCVR의 뉴클레오티드 서열은 아래 **표 1-5**에 요약되어 있다. **표 1-5**에 제시된 HCVR 및/또는 LCVR 중 하나 이상을 포함하는, 항-hTfR 단백질-약물 접합체 또는 이의 폴리펩티드 부분(들)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 또한 본원에 제공된다.

[1053] **표 1-5. 기재된 단백질-약물 접합체에서 항체, 항원 결합 단편(예를 들어, Fab 또는 scFv 분자) 내 도메인을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열**

항-hTfR 분자	HCVR	LCVR
31874B	1	6
31863B	11	16
69348	21	26
69340	31	36
69331	41	46
69332	51	56
69326	61	66
69329	71	76
69323	81	86
69305	91	96
69307	101	106
12795B	111	116
12798B	121	126
12799B	131	136
12801B	141	146
12802B	151	156
12808B	161	166
12812B	171	176
12816B	181	186
12833B	191	196
12834B	201	206
12835B	211	216
12847B	221	226
12848B	231	236
12843B	241	246
12844B	251	256
12845B	261	266
12839B	271	276
12841B	281	286
12850B	291	296
69261	301	306
69263	311	316

[1054]

[1055] 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 표 1-2에 나열된 LCVR 핵산 서열 중 임의의 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는, 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.

[1056] 예를 들어, 다음을 포함하는, 항-hTfR 단백질-약물 접합체 또는 이의 폴리펩티드 부분(들)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공된다:

[1057] ● 서열번호 1에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 6에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1058] ● 서열번호 11에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 16에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1059] ● 서열번호 21에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 26에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1060] ● 서열번호 31에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 36에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1061] ● 서열번호 41에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 46에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1062] ● 서열번호 51에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 56에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1063] ● 서열번호 61에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 66에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1064] ● 서열번호 71에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 76에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1065] ● 서열번호 81에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 86에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1066] ● 서열번호 91에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 96에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1067] ● 서열번호 101에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 106에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1068] ● 서열번호 111에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 116에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1069] ● 서열번호 121에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 126에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1070] ● 서열번호 131에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 136에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1071] ● 서열번호 141에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 146에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1072] ● 서열번호 151에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 156에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1073] ● 서열번호 161에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 166에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1074] ● 서열번호 171에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 176에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1075] ● 서열번호 181에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 186에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1076] ● 서열번호 191에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 196에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1077] ● 서열번호 201에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 206에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1078] ● 서열번호 211에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 216에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1079] ● 서열번호 221에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 226에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1080] ● 서열번호 231에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 236에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1081] ● 서열번호 241에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 246에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1082] ● 서열번호 251에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 256에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1083] ● 서열번호 261에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 266에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1084] ● 서열번호 271에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 276에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1085] ● 서열번호 281에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 286에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1086] ● 서열번호 291에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 296에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1087] ● 서열번호 301에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 306에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드; 또는

[1088] ● 서열번호 311에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 HCVR, 및 서열번호 316에 제시된 뉴클레오티드 서열을 포함하는 LCVR을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드;

[1089] 상기에서, HCVR 및 LCVR은, 두 순서 중 어느 하나로 있다.

[1090] 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 표 1-2에 나열된 HCDR1 핵산 서열 중 임의의 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.

[1091] 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 표 1-2에 나열된 HCDR2 핵산 서열 중 임의의 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.

[1092] 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 표 1-2에 나열된 HCDR3 핵산 서열 중 임의의 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.

[1093] 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 표 1-2에 나열된 LCDR1 핵산 서열 중 임의의 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.

[1094] 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 표 1-2에 나열된 LCDR2 핵산 서열 중 임의의 것으로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 이와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.

[1095] 일반적으로, "프로모터" 또는 "프로모터 서열"은 (예를 들어, 직접 또는 다른 프로모터 결합 단백질 또는 물질을 통해) 세포 내의 RNA 중합효소에 결합할 수 있으면서, 코딩 서열의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절 영역이다. 프로모터는, 인핸서 및 억제자 서열을 포함한 다른 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있고/있거나, 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드와 작동 가능하게 연결될 수 있다. 유전자 발현을 제어하는 데 사용될 수 있는 프로모터는, 비제한적으로, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터(미국 특허 번호 5,385,839 및 5,168,062), SV40 초기 프로모터 영역(Benoist, et al., (1981) Nature 290:304-310), 라우스(Rous) 육종 바이러스의 3' 긴 말단 반복에 포함된 프로모터(Yamamoto, et al., (1980) Cell 22:787-797), 헤르페스 티미딘 키나아제 프로모터(Wagner et al., (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1441-1445), 메탈로티오네인 유전자의 조절 서열(Brinster et al., (1982) Nature 296:39-42); 원핵생물 발현 벡터, 예컨대 베타-락타마아제 프로모터(VIIIa-Komaroff et al., (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:3727-3731) 또는 *tac* 프로모터(DeBoer et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:21-25; 또한 "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American (1980) 242:74-94 참고); 및 효모 또는 기타 균류 유래의 프로모터 요소, 예컨대 *Gal4* 프로모터, ADC(알코올 탈수소효소) 프로모터, PGK(포스포글리세롤 키나아제) 프로모터 또는 알칼리성 포스파타아제 프로모터를 포함한다.

[1096] 폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 세포 또는 다른 발현 시스템에서, 서열이, RNA, 바람직하게는 나중에 RNA 스플라이싱될 수 있고(인트론을 함유하는 경우), 선택적으로 코딩 서열에 의해 인코딩된 단백질로 번역될 수 있는, mRNA 내로, 코딩 서열의 RNA 중합효소 매개 전사를 지시할 때, 프로모터 또는 다른 발현 제어 서

열에 "작동 가능하게 연결"된다.

[1097] 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 서열이 본원에 구체적으로 제시된 것들의 변이체인 폴리펩티드 쇄를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 "변이체"는, BLAST 알고리즘으로 비교를 수행할 때, 본원에 제시된 참조 뉴클레오티드 서열(예를 들어, **표 1-5**의 뉴클레오티드 서열 참고)과 적어도 약 70-99.9%(예를 들어, 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99.5, 99.9%) 동일한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 지칭하고; 상기 알고리즘의 매개변수는 각각의 참조 서열의 전체 길이에 걸쳐 각각의 서열 간의 가장 큰 일치를 제공하도록 선택된다(예를 들어, 예상 임계값: 10; 단어 크기: 28; 쿼리 범위의 최대 일치: 0; 일치/불일치 점수: 1, -2; 갭 코스트: 선형). 실시양태에서, 본원에 구체적으로 제시된 뉴클레오티드 서열의 변이체는 하나 이상의 뉴클레오티드의 하나 이상(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12)의 점 돌연변이, 삽입(예를 들어, 프레임 내 삽입) 또는 결실(예를 들어, 프레임 내 결실)을 포함한다. 이러한 돌연변이는 실시양태에서 미스센스 또는 넌센스 돌연변이일 수 있다.

[1098] 포유류 세포를 포함한 진핵 및 원핵 숙주 세포는 항-TfR 단백질-약물 접합체의 폴리펩티드 부분(들)(예를 들어, 항원 결합 단백질)의 발현을 위한 숙주로서 사용될 수 있다. 이러한 숙주 세포는 당업계에서 잘 알려져 있으며, 많은 숙주 세포를 American Type Culture Collection(ATCC)로부터 입수할 수 있다. 이러한 숙주 세포는 특히 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, NSO, SP2 세포, HeLa 세포, 아기 햄스터 신장(BHK) 세포, 원숭이 신장 세포(COS), 인간 간세포암 세포(예를 들어, Hep G2), A549 세포, 3T3 세포, HEK-293 세포 및 다수의 다른 세포주를 포함한다. 포유류 숙주 세포는 인간, 마우스, 래트, 개, 원숭이, 돼지, 염소, 소, 말 및 햄스터 세포를 포함한다. 사용될 수 있는 다른 세포주는 곤충 세포주(예를 들어, *스포도프테라 프루기페르다*(*Spodoptera frugiperda*) 또는 *트리코플러시아 니*(*Trichoplusia ni*)), 양서류 세포, 박테리아 세포, 식물 세포 및 균류 세포이다. 균류 세포는, 예를 들어 *피키아*(*Pichia*), *피키아 파스토리스*(*Pichia pastoris*), *피키아 핀란디카*(*Pichia finlandica*), *피키아 트레할로필라*(*Pichia trehalophila*), *피키아 코클라마에*(*Pichia koclamae*), *피키아 멤브라나에파시엔스*(*Pichia membranaefaciens*), *피키아 미누타*(*Pichia minuta*)(*오가타에아 미누타*(*Ogataea minuta*), *피키아 린드네리*(*Pichia lindneri*)), *피키아 오푼티아에*(*Pichia opuntiae*), *피키아 테르모톨레란스*(*Pichia thermotolerans*), *피키아 살리크타리아*(*Pichia salictaria*), *피키아 구에르쿠움*(*Pichia guercuum*), *피키아 피즈페리*(*Pichia pijperi*), *피키아 스티프티스*(*Pichia stiptis*), *피키아* 메탄올리카(*Pichia* methanolica), *피키아 종*(*Pichia* sp.), *사카로미세스 세레비시아에*(*Saccharomyces cerevisiae*), *사카로미세스 종*(*Saccharomyces* sp.), *한세눌라 폴리모르파*(*Hansenula polymorpha*), *클루이베로미세스 종*(*Kluyveromyces* sp.), *클루이베로미세스 락티스*(*Kluyveromyces lactis*), *칸디다 알비칸스*(*Candida albicans*), *아스페르길루스 니둘란스*(*Aspergillus nidulans*), *아스페르길루스 니게르*(Aspergillus niger), *아스페르길루스 오리자에*(*Aspergillus oryzae*), *트리코더마 리에세이*(*Trichoderma reesei*), *크리소스포리움 루크노웬스*(*Chrysosporium lucknowense*), *푸사리움 종*(*Fusarium* sp.), *푸사리움 그라미네움*(*Fusarium gramineum*), *푸사리움 베네나툼*(*Fusarium venenatum*), *피스코미트렐라 파텐스*(*Physcomitrella patens*) 및 *뉴로스포라 크라사*(*Neurospora crassa*)를 포함하는 효모 또는 사상균 세포를 포함한다. 또한, 31874B; 31863B; 69348; 69340; 69331; 69332; 69326; 69329; 69323; 69305; 69307; 12795B; 12798B; 12799B; 12801B; 12802B; 12808B; 12812B; 12816B; 12833B; 12834B; 12835B; 12847B; 12848B; 12843B; 12844B; 12845B; 12839B; 12841B; 12850B; 69261; 또는 69263과 같은 항-TfR 단백질-약물 접합체를 포함하는 단리된 숙주 세포(예를 들어, CHO 세포 또는 상기 제시된 임의의 유형의 숙주 세포)가 본원에 제공된다.

[1099] 또한, 본원에 기재된 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편)에 의해 결합된 TfR 또는 이의 항원성 단편 또는 융합체를 발현하는 세포가 본원에 제공되며, 예를 들어, 여기서 세포는 대상체의 신체 내에 있거나 시험관내에 있다. 더욱이, 본 개시내용은 또한, 본원에 논의된 바와 같이, TfR 폴리펩티드 또는 이의 항원성 단편 또는 이의 융합체, 및/또는 항-TfR 항체 또는 단편에 특이적으로 결합하는 2차 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 검출 가능하게 표지된 2차 항체)과 복합체를 이루는, TfR 결합 단백질, 예를 들어 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 복합체를 제공한다. 실시양태에서, 복합체는 시험관내에 있거나(예를 들어, 고체 기질에 고정됨) 대상체의 신체 내에 있다.

[1100] 실시양태에서, myc 태그는 아미노산 서열 EQKLISEEDLGG(서열번호 500)를 갖고, His_6 또는 헥사히스 또는 헥사히스티딘 태그는 아미노산 서열 HHHHHH(서열번호 501)를 갖고, mmh 태그는 아미노산 서열 EQKLISEEDLGGEQKLISEEDLHHHHHH(서열번호 461)을 갖고, 마우스 Fc 태그는 다음의 아미노산 서열을 갖는다:

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQI
SWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPI
ERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELN
YKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (서열 번호 502).

[1101] 또한, 본원에 논의된 바와 같이 트랜스페린 수용체 폴리펩티드 또는 이의 항원성 단편 또는 이의 융합체, 및/또는 항-TfR 단백질-약물 접합체에 특이적으로 결합하는 2차 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어, 검출 가능하게 표지된 2차 항체)과 복합체를 이루는, 항-TfR 단백질-약물 접합체를 포함하는 복합체가 본원에 제공된다. 실시양태에서, 복합체는 시험관내에 있거나(예를 들어, 고체 기질에 고정됨), 대상체의 신체 내에 있다.

[1102] 본원에 개시된 단백질-약물 접합체에서 항-TfR 항원 결합 단백질은 *E. coli*/T7 발현 시스템에서 재조합적으로 생산될 수 있다. 이 실시양태에서, 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질(예를 들어, 31874B; 31863B; 69348; 69340; 69331; 69332; 69326; 69329; 69323; 69305; 69307; 12795B; 12798B; 12799B; 12801B; 12802B; 12808B; 12812B; 12816B; 12833B; 12834B; 12835B; 12847B; 12848B; 12843B; 12844B; 12845B; 12839B; 12841B; 12850B; 69261; 또는 69263)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드는 pET 기반 플라스미드에 삽입되고 *E. coli*/T7 시스템에서 발현될 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포(예를 들어, BL21 또는 BL21DE3과 같은 *E. coli*와 같은 박테리아 숙주 세포)에서 항-TfR 항원 결합 단백질을 발현하는 방법은 T7 프로모터에 작동 가능하게 연결된 항-TfR 항원 결합 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드도 포함하는 세포에서 T7 RNA 중합효소를 발현하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 실시양태에서, *E. coli*와 같은 박테리아 숙주 세포는 *lac* 프로모터에 작동 가능하게 연결된 T7 RNA 중합효소 유전자를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고, 중합효소와 쇄의 발현은 IPTG(이소프로필-베타-D-티오갈락토피라노시드)와 함께 숙주 세포를 항온처리하여 유도된다. 미국 특허 번호 4,952,496 및 5,693,489 또는 문헌 [Studier& Moffatt, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, J. Mol. Biol. 1986 May 5;189(1): 113-30]을 참고한다.

[1103] 재조합 항체를 생산하기 위한 여러 방법이 있으며, 이는 당업계에 알려져 있다. 항체의 재조합 생산 방법의 하나의 예는 미국 특허 번호 4,816,567에 개시되어 있다.

[1104] 형질전환은 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하는 임의의 알려진 방법에 의해 이루어질 수 있다. 이종 폴리뉴클레오티드를 포유류 세포에 도입하는 방법은 당업계에서 잘 알려져 있으며, 덱스트란 매개 형질주입, 칼슘 포스페이트 침전, 폴리브렌 매개 형질주입, 원형질체(protoplast) 융합, 전기천공, 리포좀 내 폴리뉴클레오티드(들)의 캡슐화, 핵 내로 DNA의 직접 미세주입 및 바이오리스틱 주입을 포함한다. 또한, 폴리뉴클레오티드는 바이러스 벡터에 의해 포유류 세포에 도입될 수 있다. 세포를 형질전환하는 방법은 당업계에서 잘 알려져 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,399,216; 4,912,040; 4,740,461 및 4,959,455를 참고한다. 따라서, 본원에 기재된 항-TfR 항원 결합 단백질을 제조하기 위한 재조합 방법은 (i) 항-TfR 항원 결합 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하는 단계로서, 예를 들어, 여기서 폴리뉴클레오티드가 벡터에 존재하고/하거나; 숙주 세포 염색체에 통합되고/되거나 프로모터에 작동 가능하게 연결되는, 단계; (ii) 폴리뉴클레오티드의 발현에 유리한 조건 하에서 숙주 세포(예를 들어, CHO 또는 *피키아* 또는 *피키아 파스토리스*)를 배양하는 단계, 및 (iii) 선택적으로, 숙주 세포 및/또는 숙주 세포가 성장하는 배지로부터 항-TfR 항원 결합 단백질을 단리하는 단계를 포함할 수 있다. 하나 초과의 면역글로불린 쇄를 포함하는 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편), 예를 들어 두 개의 면역글로불린 중쇄와 두 개의 면역글로불린 경쇄를 포함하는 항체를 제조하는 경우, 단일 숙주 세포에서 쇄의 공동-발현은, 예를 들어 세포 내 또는 세포 표면 위 또는 이러한 쇄가 분비되는 경우 세포 외부에서 쇄의 연합을 초래하여 항원 결합 단백질(예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편)을 형성한다. 본원에 기재된 방법은 면역글로불린 중쇄만 또는 면역글로불린 경쇄만 또는 둘 모두(예를 들어, 성숙한 단편 및/또는 이의 가변 도메인을 포함하는 본원에 논의된 임의의 것)가 세포에서 발현되는 것을 포함한다. 이러한 단일 쇄는 예를 들어 이러한 쇄를 포함하는 항체 또는 항원 결합 단편의 발현에서 중간체로서 유용하다. 예를 들어, 본원에 제시된 생산 방법, 및 선택적으로 본원에 제시된 정제 방법의 산물인 항-TfR 항원 결합 단백질도 본원에 포함된다.

[1105] 실시양태에서, 항-TfR 항원 결합 단백질을 제조하는 방법은 예를 들어 컬럼 크로마토그래피, 침전 및/또는 여과에 의해 항-TfR 항원 결합 단백질을 정제하는 방법을 포함한다. 논의된 바와 같이, 이러한 방법의 산물 또한 본원에 제공된다.

[1106] 인간 항체의 제조

[1107] 본원에 기재된 항-TfR 항체 및 항원 결합 단편은 완전 인간 항체 및 단편일 수 있다. 완전 인간 단클론 항체를 포함한 단클론 항체를 생성하는 방법은 당업계에 알려져 있다. 임의의 이러한 알려진 방법은 본원에 기재된 방법에서 TfR에 특이적으로 결합하는 인간 항체를 제조하는 데 사용될 수 있다.

[1108] 예를 들어, VELOCIMMUNE™ 기술 또는 완전 인간 단클론 항체를 생성하기 위한 임의의 다른 유사한 알려진 방법을 사용하여, 인간 가변 영역과 마우스 불변 영역을 갖는 TfR에 대한 높은 친화도 키메라 항체가 처음에 단리된다. 이하의 실험 섹션에서와 같이, 항체는 친화도, 리간드 차단 활성, 선택성, 에피토프 등을 포함한 바람직한 특성에 대해 특성화되고 선택된다. 필요한 경우, 마우스 불변 영역은 소망하는 인간 불변 영역, 예를 들어 야생형 또는 변형된 IgG1 또는 IgG4로 대체되어 완전 인간 항-TfR 항체를 생성한다. 선택되는 불변 영역은 특정 용도에 따라 달라질 있지만, 높은 친화도 항원 결합 및 표적 특이성 특성은 가변 영역에 있다. 특정 예에서, 완전 인간 항-TfR 항체는 항원 양성 B 세포로부터 직접 단리된다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,596,541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®을 참고한다.

[1109] **치료 및 투여**

[1110] 예를 들어, 분자 카고를 대상체의 신체에 전달하기 위해, 예를 들어, 대상체의 신체(예를 들어, 뇌 또는 근육)의 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위해 사용될 수 있는 항-TfR 단백질-약물 접합체(예를 들어, 31874B; 31863B; 69348; 69340; 69331; 69332; 69326; 69329; 69323; 69305; 69307; 12795B; 12798B; 12799B; 12801B; 12802B; 12808B; 12812B; 12816B; 12833B; 12834B; 12835B; 12847B; 12848B; 12843B; 12844B; 12845B; 12839B; 12841B; 12850B; 69261; 또는 69263)가 본원에 제공된다.

[1111] 하나의 양태에서, 단백질-약물 접합체와 함께 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제를 포함하는 약학 조성물이 본원에 제공된다. 본원에 기재된 조성물과 관련하여 사용되는 "약학적으로 허용 가능한"이라는 문구는 생리학적으로 허용 가능하고 포유동물(예를 들어, 인간)에게 투여될 때 전형적으로 유해 반응을 일으키지 않는 상기 조성물의 분자 본체 및 기타 성분을 지칭한다. 바람직하게는, "약학적으로 허용 가능한"이라는 용어는 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되었거나 포유동물, 보다 특히 인간에서의 용도로 미국 약전 또는 기타 일반적으로 인정된 약전에 나열된 것을 의미한다.

[1112] 본원에 기재된 약학 조성물은 (환자에게 투여하는 소망하는 방법에 따라) 임의의 적합한 형태일 수 있다. 적합한 조성물 및 투여 방법은 당업자에게 알려져 있으며, 예를 들어 문헌 [Johnson et al., Blood. 2009; 114(3):535-46]을 참고한다.

[1113] 약학 조성물은 본원에 기재된 단백질-약물 접합체를 유리 형태 또는 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 "약학적으로 허용 가능한 염"이라는 용어는 개시된 단백질-약물 접합체의 유도체를 지칭하고, 여기서 단백질-약물 접합체는 작용제의 산 또는 염기 염을 제조함으로써 변형된다. 예를 들어, 산 염은 유리 염기로부터 제조되며(전형적으로, 여기서 약물의 중성 형태는 중성 $-NH_2$ 기를 가짐), 이는 적합한 산과의 반응을 포함한다. 산 염을 제조하는 데 적합한 산은, 유기산, 예를 들어, 아세트산, 벤조산, 시트르산, 프로피온산, 글리콜산, 트리플루오로아세트산, 피루브산, 옥살산, 말산, 말론산, 말레산, 석신산, 푸마르산, 타르타르산, 신남산, 만델산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 살리실산 등, 뿐만 아니라 무기산, 예를 들어, 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산, 인산 등, 둘 모두를 포함한다. 반대로, 단백질-약물 접합체에 존재할 수 있는 산성 모이어티의 염기성 염의 제조는 수산화소듐, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘, 트리메틸아민 등과 같은 약학적으로 허용 가능한 염기를 사용하여 제조된다.

[1114] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체는 약 1 μg/mL 내지 50 mg/mL, 예를 들어, 약 0.1 mg/mL 내지 10 mg/mL, 약 0.2 mg/mL 내지 5 mg/mL, 약 0.5 mg/mL 내지 8 mg/mL, 약 0.8 mg/mL 내지 12 mg/mL, 약 1 mg/mL 내지 15 mg/mL, 약 2 mg/mL 내지 20 mg/mL, 또는 약 5 mg/mL 내지 25 mg/mL, 또는 약 0.1 mg/mL, 0.2 mg/mL, 0.3 mg/mL, 0.4 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.6 mg/mL, 0.7 mg/mL, 0.8 mg/mL, 0.9 mg/mL, 1 mg/mL, 1.25 mg/mL, 1.5 mg/mL, 1.75 mg/mL, 2 mg/mL, 2.25 mg/mL, 2.5 mg/mL, 2.75 mg/mL, 3 mg/mL, 3.25 mg/mL, 3.5 mg/mL, 3.75 mg/mL, 4 mg/mL, 5 mg/mL, 6 mg/mL, 7 mg/mL, 8 mg/mL, 9 mg/mL, 10 mg/mL, 11 mg/mL, 12 mg/mL, 13 mg/mL, 14 mg/mL, 15 mg/mL 또는 20 mg/mL의 농도로 용액 중에 존재할 수 있다.

[1115] 약학 조성물은 비경구(피하, 근육내 또는 정맥내 포함), 중추신경계에 대한 척추강내, 뇌실내, 실질내 주사, 장관(구강 또는 직장 포함), 흡입 또는 비강내 경로와 같이 임의의 적절한 경로에 의한 투여에 맞게 조정될 수 있

다.

[1116] 이러한 조성물은, 예를 들어 멸균 조건 하에서 활성 성분을 담체(들) 또는 부형제(들)와 혼합함으로써 약학 분야에 알려진 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다.

[1117] 또한, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체를 포함하는 약학 투여 형태가 본원에 개시된다.

[1118] 본원에 개시된 단백질-약물 접합체를 기반으로 한 약학 조성물은 하나 이상의 생리학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제를 사용하여 임의의 통상적인 방식으로 제형화될 수 있다. 단백질-약물 접합체는 예를 들어 주사, 흡입 또는 인설레이션(insulation)(입 또는 코를 통해) 또는 경구, 협측, 비경구 또는 직장 투여 또는 장기 또는 조직에 직접 투여에 의한 투여용으로 제형화될 수 있다.

[1119] 약학 조성물은 전신, 국소 또는 국부 투여를 포함한 다양한 투여 방식용으로 제형화될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa]에서 기술 및 제형을 찾을 수 있다. 전신 투여의 경우, 근육내, 정맥내, 복강내 및 피하를 포함한 주사가 바람직하다. 주사용 경우, 약학 조성물은 액체 용액, 바람직하게는 행크 용액(Hank's solution) 또는 링거 용액(Ringer's solution)과 같은 생리학적으로 호환 가능한 완충액에서 제형화될 수 있다. 또한, 약학 조성물은 고체 형태로 제형화되어 사용 직전에 재용해 또는 현탁될 수 있다. 약학 조성물의 동결건조된 형태도 적합하다.

[1120] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 약학 조성물은 동결건조될 수 있다. 비제한적인 예로서, 수득한 동결건조물(lyophilizate)은 수화 용매를 첨가함으로써 수화 조성물로 재구성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 수화 조성물은 환자에게 직접 비경구로(예를 들어, 정맥내 주사로) 투여될 수 있다. 따라서, 추가 실시양태는 수화 용매를 이용한 동결건조물의 재구성을 통해 수득할 수 있는 수화 약학 조성물이다.

[1121] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 약학 조성물은 동결건조된 제형을 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 동결건조 제형은 본원에 기재된 단백질-약물 접합체, 만니톨 및/또는 TWEEN 80®을 포함할 수 있다. 또 다른 비제한적인 예로서, 동결건조 제형은 본원에 개시된 단백질-약물 접합체, 만니톨 및 폴록사머 188을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 재구성된 액체 조성물을 포함하는 동결건조 제형을 포함할 수 있다.

[1122] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 약학 조성물은 이전에 알려진 조성물에 비해 동결건조물의 가용성 및/또는 습윤성(moistening)이 향상된 제형을 제공할 수 있다. 비제한적인 예로서, 동결건조물의 향상된 가용성 및/또는 습윤성은 적절한 부형제 조성물을 사용하여 달성될 수 있다. 이러한 방식으로, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체를 포함하는 본원에 기재된 약학 조성물은, (예를 들어, -20℃, +5℃ 또는 +25℃에서) 원하는 저장 안정성을 나타내도록 개발될 수 있으며, 쉽게 재용해될 수 있어서, 동결건조물이 초음파 균질화기를 사용하거나 사용하지 않고 수초에서 2분 이상까지, 완충액 또는 기타 부형제의 사용을 통해 완전히 용해될 수 있다. 또한, 조성물은 본원에 개시된 임의의 적절한 전달 경로, 예를 들어 비경구(피하, 근육내 또는 정맥내 포함), 장관(구강 또는 직장 포함), 흡입 또는 비강 경로를 통해 치료가 필요한 환자에게 쉽게 제공될 수 있다. 비제한적인 예로서, 생성된 용액의 pH 값은 pH 2.7과 pH 9 사이일 수 있다.

[1123] 경구 투여의 경우, 약학 조성물은 예를 들어 결합제(예를 들어, 프리젤라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로오스); 충전제(예를 들어, 락토오스, 미세결정 셀룰로오스 또는 칼슘 수소 포스페이트); 윤활제(예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 활석 또는 실리카); 붕해제(예를 들어, 감자 전분 또는 소듐 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제(예를 들어, 소듐 라우릴 설페이트)와 같은 약학적으로 허용 가능한 부형제로 통상적인 수단에 의해 제조된 정제 또는 캡슐의 형태를 취할 수 있다. 정제는 또한 당업계에서 잘 알려진 방법으로 코팅될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제는 예를 들어 용액, 시럽 또는 현탁액의 형태를 취할 수 있거나, 이들은 사용 전에 물 또는 다른 적합한 비히클과 함께 구성하기 위한 건조 제품으로서 제공될 수 있다. 이러한 액체 제제는 현탁제(예를 들어, 소르비톨 시럽, 셀룰로오스 유도체 또는 수소화된 식용 지방); 유화제(예를 들어, 레시틴 또는 아카시아); 비수성비수성예를 들어, 아티온 오일, 유성 에스테르, 에틸 알코올 또는 분획 식물성 오일) 및 방부제(예를 들어, 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산)와 같은 약학적으로 허용 가능한 첨가제로 통상적인 수단에 의해 제조될 수 있다. 제제는 또한 적절한 경우 완충염, 향미제, 착색제 및 감미제를 함유할 수 있다.

[1124] 약학 조성물은 주사, 예를 들어 볼러스 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 선택적으로 방부제를 첨가한 단위 투여 형태, 예를 들어 앰풀 또는 다중 투여 용기에 제공될 수 있다. 약학 조성물은 추가로 유성 또는 수성 비히클에서 현탁액, 용액 또는 에멀션으로 제형화될 수 있으며, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 포함한 다른 작용제를 함유할 수 있다.

[1125] 추가적으로, 약학 조성물은 또한 데포 제제(depot preparation)로서 제형화될 수 있다. 이러한 장기 작용 제형은 이식(예를 들어, 피하 또는 근육내) 또는 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 화합물은 적합한 중합체 또는 소수성 물질(예를 들어, 허용 가능한 오일 중 에멀션) 또는 이온 교환 수지를 이용해 제형화되거나, 예를 들어, 난용성(sparingly soluble) 염과 같은 난용성 유도체로서 제형화될 수 있다. 다른 적합한 전달 시스템은 장기간에 걸쳐 약물의 국부적 비침습적 전달 가능성을 제공하는 미소구체를 포함한다. 이 기술은 염증 또는 허혈을 유발하지 않고 관상 동맥 카테터를 통해 장기의 임의의 선택된 부위에 주사될 수 있는 전모세혈관 크기를 갖는 미소구체를 포함할 수 있다. 투여된 치료제는 미소구체로부터 서서히 방출되어 선택된 조직에 존재하는 주변 세포에 의해 흡수된다.

[1126] 전신 투여는 또한 경점막 또는 경피 수단에 의해 이루어질 수 있다. 경점막 또는 경피 투여의 경우, 투과될 장벽에 적합한 침투제가 제형에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 경점막 투여의 경우 담즙산 염 및 푸시드산 유도체를 포함한다. 또한, 세제를 사용하여 투과를 용이하게 할 수 있다. 경점막 투여는 비강 스프레이 또는 좌약을 사용하여 이루어질 수 있다. 국소 투여의 경우, 본원에 기재된 벡터 입자는 당업계에 일반적으로 알려진 바와 같이 연고, 살브(salve), 겔 또는 크림으로 제형화될 수 있다. 세척액은 또한 치유를 가속화하기 위해 부상 또는 염증을 치료하는 데 국부적으로 사용될 수 있다.

[1127] 주사 용도에 적합한 약학 형태는 멸균 수용액 또는 분산액; 참기름, 땅콩 기름 또는 수성 프로필렌 글리콜을 포함한 제형; 멸균 주사 용액 또는 분산액을 즉석에서 제조하기 위한 멸균 분말을 포함할 수 있다. 모든 경우에서, 제형은 멸균이어야 하며 유동적이어야 한다. 이는 제조 조건 및 특정 보관 매개변수(예를 들어, 냉장 및 동결)에서 안정적이어야 하며 박테리아 및 균류와 같은 미생물의 오염 작용에 대해 보호되어야 한다.

[1128] 본원에 기재된 단백질-약물 접합체는 중성 또는 염 형태로 조성물로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염은 산 부가염(단백질의 유리 아미노 기로 형성됨)을 포함하고, 이는 예를 들어 염산 또는 인산과 같은 무기산 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산으로 형성된다. 유리 카복실 기와 함께 형성된 염은 또한 예를 들어 소듐, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 철 수산화물과 같은 무기 염기 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유래될 수 있다.

[1129] 약학적으로 허용 가능한 담체는 또한 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물 및 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산매일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용을 방지하는 것은 당업계에 알려진 다양한 항균 및 항진균제에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에서, 등장화제, 예를 들어 당 또는 염화소듐을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사 조성물의 지속적인 흡수는 조성물에서 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 달성될 수 있다.

[1130] 멸균 주사 용액은, 적절한 용매 중 필요한 양의 활성 화합물 또는 구축물을 앞서 열거된 다양한 기타 성분과 함께 통합시킨 후, 필요에 따라, 멸균 여과하여 제조될 수 있다.

[1131] 제형화 시, 용액은 투여 제형과 호환 가능한 방식으로 치료적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 제형은 앞서 기재된 주사 용액의 유형과 같은 다양한 투여 형태로 쉽게 투여되지만, 서방성 캡슐 또는 미립자 및 미소구체 등도 사용될 수 있다.

[1132] 예를 들어, 수용액으로 비경구 투여하는 경우, 필요에 따라 용액을 적절히 완충하고, 액체 희석제를 충분한 생리 식염수 또는 포도당으로 먼저 등장성으로 만들어야 한다. 이러한 특정 수용액은 정맥내, 종양내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 특히 적합한다. 이러한 맥락에서, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 본 개시내용의 측면에서 당업자에게 알려져 있을 것이다. 예를 들어, 1회 투여량을 1 ml의 등장성 NaCl 용액에 용해시키고, 1000 ml의 대량 피하주입액에 첨가하거나 제안된 주입 부위에 주사할 수 있다.

[1133] 투여를 담당하는 사람은 어떤 경우든 개별 대상체에게 적절한 용량을 결정할 것이다. 예를 들어, 대상체는, 본원에 기재된 단백질-약물 접합체를, 일정 기간 동안 일 또는 주단위로, 또는 개월, 2년 또는 또는 년단위로 투여 받을 수 있다.

[1134] 정맥내, 종양내, 피내 또는 근육내 주사와 같이 비경구 투여용으로 제형화된 화합물 외에도, 약학적으로 허용 가능한 다른 형태는 예를 들어 경구 투여용 정제 또는 기타 고체; 리포좀 제형; 지효성 캡슐; 생분해성 및 현재 사용되는 임의의 기타 형태를 포함한다.

[1135] 비강 또는 흡입용 용액 또는 스프레이, 에어로졸 또는 흡입제를 사용할 수도 있다. 비강 용액은 방울 또는 스프레이로 비강 통로에 투여되도록 설계된 수용액일 수 있다. 비강 용액은 비강 분비물과 여러 면에서 유사하도록 제조될 수 있다. 따라서 수성 비강 용액은 일반적으로 등장성이며 약간 완충되어 pH 5.5 내지 7.5를 유지한다. 또한, 안과용 제제에 사용되는 것과 유사한 항균 방부제, 및 필요한 경우 적절한 약물 안정화제가 제형에 포함될 수 있다. 다양한 상업용 비강 제제가 알려져 있으며, 예를 들어 항생제 및 항히스타민제를 포함할 수 있고, 천식 예방에 사용된다.

[1136] 경구 제형은 예를 들어, 만니톨, 락토오스, 전분, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 사카린, 셀룰로오스, 마그네슘 카보네이트 등의 약학적 등급의 부형제를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 알약, 캡슐, 서방성 제형 또는 분말의 형태를 취한다. 특정 정의된 실시양태에서, 경구 약학 조성물은 불활성 희석제 또는 동화 가능한 식용 담체를 포함할 것이거나, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 봉입될 수 있거나, 정제로 압축될 수 있거나, 식이 음식과 직접 통합될 수 있다. 경구 치료 투여의 경우, 활성 화합물은 부형제와 통합되어 섭취 가능한 정제, 협측 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다.

[1137] 정제, 트로키, 알약, 캡슐 등은 또한 다음을 함유할 수 있다: 결합제, 예컨대 트라가칸트 검, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴; 부형제, 예컨대 디칼슘 포스페이트; 붕해제, 예컨대 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산 등; 윤활제, 예컨대 마그네슘 스테아레이트; 및 감미제, 예컨대 수크로오스, 락토오스 또는 사카린이 첨가될 수 있거나, 향미제, 예컨대 페퍼민트, 윈터그린 오일 또는 체리 향. 단위 투여 형태가 캡슐인 경우, 상기 유형의 물질 외에도 액체 담체를 함유할 수 있다. 다양한 다른 물질이 코팅으로서 존재하거나 그렇지 않으면 단위 투여의 물리적 형태를 변형하기 위해 존재할 수 있다. 예를 들어, 정제, 알약 또는 캡슐은 셸락, 당 또는 둘 모두로 코팅될 수 있다. 엘릭서 시럽은 활성 화합물, 감미제로서 수크로오스, 방부제로서 메틸 및 프로필파라벤, 염료 및 향미제, 예컨대 체리 또는 오렌지 향을 함유할 수 있다.

[1138] 조성물은 대상체에게 정맥내, 종양내, 피내, 동맥내, 복막내, 병변내, 두개내, 관절내, 전립선내, 흉막내, 기관내, 비강내, 유리체내, 질내, 직장내, 국소, 종양내, 근육내, 척추강내, 피하, 결막하, 소낭내(intravesicularlly), 점막, 심장막내, 배꼽내, 안구내, 경구, 국부, 흡입, 주사, 주입, 지속적 주입, 국부 관류, 카테터를 통해, 세척을 통해, 크림 또는 지질 조성물로 투여하는 것을 포함할 수 있다.

[1139] 본원에 개시된 바와 같은 조성물은 또한 보조제, 예컨대 알루미늄 염 및 기타 미네랄 보조제, 텐소액티브제(tensoactive agent), 박테리아 유도체, 비히클 및 사이토카인을 포함할 수 있다. 보조제는 또한 길항적 면역조절 특성을 가질 수 있다. 본원에 개시된 바와 같은 조성물 및 방법은 또한 보조 요법을 포함할 수 있다.

[1140] 본원에 기재된 약학 조성물은, 직접적으로 환자에게 투여될 수 있거나, 영향을 받는 장기에 투여될 수 있거나, 전신적으로 i.d., i.m., s.c., i.p. 및 i.v.로 투여될 수 있거나, 환자 또는 인간 세포주로부터 유래된 세포에 생체외에서 적용한 후 환자에게 투여될 수 있거나, 시험관내에서, 환자로부터 유래된 세포의 하위집단을 선택하는 데 사용한 후 환자에게 재-투여될 수 있다.

[1141] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체는, 비제한적으로, 리소좀 축적 질환 및 장애, 심장 질환 또는 장애, 중추신경계(CNS) 질환 또는 장애, 안 질환 또는 장애, 뇌 질환 또는 장애, 척수 질환 또는 장애, 말초 신경계(PNS) 질환 또는 장애, 근육 질환 또는 장애(예를 들어, 골격근 질환 또는 장애), 연골 질환 또는 장애, 뼈 성장판 질환 또는 장애, 신장 질환 또는 장애, 및 혈액 질환 또는 장애와 같은 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 데 사용된다.

[1142] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체는 신경 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 데 사용된다. 신경 질환 또는 장애의 예는 비제한적으로 리소좀 축적 질환, 아밀로이드증, 신경병증, 신경변성 질환, 백질이영양증, 신경정신 질환, 외상성 뇌 손상, 신경발달 질환 및 신경근 질환, 발작, 행동 장애, 안 질환 또는 장애, 바이러스 또는 미생물 감염, 염증, 허혈 및 암을 포함한다. 신경 장애의 구체적인 예는, 비제한적으로, 신경변성 질환(예를 들어, 루이소체병, 올리브다리뇌소뇌위축증, 다발계통위축증, 회색질척수염 증후군(postpoliomyelitis syndrome), 파킨슨병, 선조체흑질퇴화(striatonigral degeneration), 샤이-드레거 증후군(Shy-Draeger syndrome), 타우병증(예를 들어, 알츠하이머병 및 초핵성마비)), 프리온 질환(예를 들어, 광우병(bovine spongiform encephalopathy), 쿠루병, 크로이츠펠트-야콥 증후군, 게르스트만-슈트라우슬러-샤인커병, 만성 소모성 질환, 치명적 가족성 불면증 및 스크래피), 구근 마비, 운동 뉴런 질환 및 신경계 이종퇴행성 장애(예를 들어, 알렉산더병, 코카인 증후군, 카나반병, 간렌즈핵변성, 헌팅턴병, 할러보르덴-스파츠 증후군, 신경세로이드-지방갈색증, 튜렛 증후군, 멘케스 곱슬머리 증후군(Menkes kinky hair syndrome), 라포라 질환, 레트 증후군, 레쉬-니한 증후군, 및 운베리히트-룬드보그 증후군), 치매(예를 들어, 픽병(Pick's disease) 및 척수소

뇌성 실조증), 암(예를 들어, 신체 다른 부위의 암으로부터 초래된 뇌 전이를 포함하는 중추신경계(CNS) 암)을 포함한다.

[1143] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체는 근육 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 데 사용된다. 신경 질환 또는 장애의 예는 비제한적으로 중심핵 근병증(CNM), 듀시엔 근이영양증(DMD), 안면견갑상완 근이영양증(FSHD), 가족성 비대성 심근병증, 진행성 골화 섬유성형성(FOP), 프리드라이히 운동실조(FRDA), 포함체 근병증 2, 라잉 원위 근병증, 근원섬유 근병증, 선천성 근긴장증(예를 들어, 톰센병), 근긴장성 이영양증 1형, 근긴장성 이영양증 2형, 근세관 근병증, 안구인두 이영양증, 폼페병, 글리코겐 축적 질환, 선천성 이상근긴장증, 및 근위축증을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육 질환 또는 장애는 근위축증이다. 근위축증은 후천성면역결핍증후군(AIDS), 심부전, 암, 만성폐쇄성폐질환 및 신부전을 포함하는 만성 질병 또는 근육 불사용으로 인한 것일 수 있다.

[1144] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체는 근긴장성 이영양증, 듀시엔 근이영양증(DMD), 안면견갑상완 근이영양증(예를 들어, 1형) 또는 근위축증(악액질, 근감소증)인 근육 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 데 사용된다.

[1145] 근긴장성 근이영양증은 골격근(사지와 몸통을 움직이는 근육)뿐만 아니라 평활근(소화계를 제어하는 근육) 및 심장의 심장 근육에 영향을 미치는 다중 시스템 장애이다. 근긴장성 이영양증의 증상은 손을 떼는 데 어려움(근긴장증), 손과 발의 근육이 약화, 삼키기 어려움 및 비정상적인 심장 리듬을 포함할 수 있다. 또한, 비-근육 증상은 학습 장애, 주간 졸음증, 불임 및 조기 백내장을 포함할 수 있다. 이 질환의 두 가지 알려진 형태(근긴장성 이영양증 1형(DM1) 및 근긴장성 이영양증 2형(DM2))가 있다. 둘 모두 유전자의 반복된 영역의 비정상적인 확장에 의해 유발된다. 근긴장성 이영양증 1형에서, 반복 확장은 각 세대마다 확대되어, 종종 영향을 받는 각 세대마다 더 일찍 발병하고 증상의 중증도가 증가한다. 따라서, 근긴장성 이영양증 1형은 이 장애가 있는 가족의 어린이에게 빈번하게 영향을 미친다. DM1에서, 비정상적인 DNA 확장은 DMPK(근긴장성 이영양증 단백질 키나아제) 유전자에 있다. DM2의 근본 원인은 CNBP 유전자라고도 알려진 ZNF9(징크 핑거(zinc finger) 9) 유전자에서 확장된 DNA 섹션이다. 따라서, 본원에 제공된 방법은, 근긴장성 이영양증(DM)을 치료하는 데 효과적인 분자 카고, 예를 들어 돌연변이체 *DMPK* 또는 *CNBP* 유전자를 표적으로 하는 간섭 RNA(예를 들어, siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드)에 접합된 항원 결합 단백질을 투여하여 DM, 예를 들어 DM1 또는 DM2를 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다.

[1146] 듀시엔 근이영양증(DMD)은 근육 세포를 온전하게 유지하는 데 도움이 되는 디스트로핀이라는 단백질의 변경으로 인한 점진적인 근육 퇴화와 약화를 특징으로 하는 유전적 장애이다. 근육 약화는 DMD의 주요 증상이다. DMD 증상 발병은 전형적으로 유아기, 보통 2 내지 3세에 나타난다. 이 질환은 주로 남아에게 영향을 미치지만 드물게 여아에게 영향을 미칠 수 있다. 따라서 본원에 제공된 방법은 DMD를 치료하는 데 효과적인 분자 카고, 예를 들어 돌연변이체 *디스트로핀* 유전자를 표적으로 하는 간섭 RNA(예를 들어, siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드)에 접합된 항원 결합 단백질을 투여함으로써 DMD를 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다.

[1147] 안면견갑상완 근이영양증(FSHD)은 전형적으로 안면 근육, 견갑골의 안정근 또는 발의 배굴근의 약화와 함께 나타난다. 중증도는 매우 다양하다. 약화는 천천히 진행되며 영향을 받는 개체의 약 20%는 결국 휠체어를 필요로 한다. 염색체 4는 D4Z4 반복 단위를 포함한다. FSHD가 있는 개체에서, D4Z4 반복 단위의 수가 감소되며, 이는 DUX4로 하여금 불필요하게 활성화되어 DUX4 단백질을 생성하게 한다. DUX4 단백질은 FSHD가 있는 개체의 근육 세포 내에서 근육 소모, 염증 및 손상에 기여하는 것으로 생각된다. 본원에 제공된 방법은 FSHD를 치료하는 데 효과적인 분자 카고, 예를 들어 돌연변이체 *DUX4* 유전자를 표적으로 하는 간섭 RNA(예를 들어, siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드)에 접합된 항원 결합 단백질을 투여함으로써 FSHD를 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다.

[1148] 또한, 본원에 제공된 방법은 근위축증 병태 또는 대사 질환을 치료하는 데 효과적인 분자 카고, 예를 들어 성장 인자, 신경 영양 인자, 질환 변형(disease modifying) 근육 단백질 및/또는 대사 단백질에 접합된 항원 결합 단백질을 투여함으로써 상기 근위축증 병태 또는 대사 질환(예를 들어, 악액질 또는 근감소증)을 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다.

[1149] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 알츠하이머병, 헌팅턴병, 근위축성 측삭경화증, 파킨슨병 또는 프리온 질환과 같은 신경변성 질환을 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다.

[1150] 일 실시양태에서, 알츠하이머병을 치료하는 데 효과적인 분자 카고, 예를 들어 *ApoE* 유전자(아폴리포단백질 E를

인코딩함), *MAPT* 유전자(미세소관 관련 단백질 타우를 인코딩함) 또는 *APP* 유전자(아밀로이드 전구체 단백질을 인코딩함) 또는 이들의 돌연변이체를 표적으로 하는 간섭 RNA(예를 들어, siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드)에 접합된 항원 결합 단백질을 투여함으로써 알츠하이머병을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에 제공된다.

[1151] 일 실시양태에서, 헌팅턴병을 치료하는 데 효과적인 분자 카고, 예를 들어 *HTT* 유전자(헌팅틴(Huntingtin)을 인코딩함) 또는 이의 돌연변이체를 표적으로 하는 간섭 RNA(예를 들어, siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드)에 접합된 항원 결합 단백질을 투여함으로써 헌팅턴병을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에 제공된다.

[1152] 일 실시양태에서, 근위축성 측삭경화증을 치료하는 데 효과적인 분자 카고, 예를 들어, *SOD1* 유전자(슈퍼옥사이드 디스뮤타아제 1형을 인코딩함) 또는 *C9orf72* 유전자(염색체 9 개방 판독 프레임 72) 또는 이의 돌연변이체를 표적으로 하는 간섭 RNA(예를 들어, siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드)에 접합된 항원 결합 단백질을 투여함으로써 근위축성 측색경화증을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에 제공된다.

[1153] 일 실시양태에서, 파킨슨병을 치료하는 데 효과적인 분자 카고, 예를 들어 *SNCA* 유전자(알파-시누클레인을 인코딩함) 또는 *LRRK2* 유전자(류신이 풍부한 반복 키나아제 2를 인코딩함) 또는 이의 돌연변이체를 표적으로 하는 간섭 RNA(예를 들어, siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드)에 접합된 항원 결합 단백질을 투여함으로써 파킨슨병을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에 제공된다.

[1154] 일 실시양태에서, 프리온 질환을 치료하는 데 효과적인 분자 카고, 예를 들어 *PRNP* 유전자(프리온 단백질을 인코딩함) 또는 이의 돌연변이체를 표적으로 하는 간섭 RNA(예를 들어, siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드)에 접합된 항원 결합 단백질을 투여함으로써 프리온 질환을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에 제공된다.

[1155] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 심부전과 같은 심장 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다. 일 실시양태에서, 프리온 질환을 치료하는 데 효과적인 분자 카고, 예를 들어, *SLC5A1* 유전자(용질 운반체 패밀리 5 멤버 1을 인코딩함), *SLC16A3* 유전자(용질 운반체 패밀리 16 멤버 3을 인코딩함), *HDAC6* 유전자(히스톤 탈아세틸화효소를 인코딩함), *MMP27* 유전자(매트릭스 메탈로펩티다아제 27을 인코딩함), *MFAP5* 유전자(25 kD 미세섬유 관련 당단백질을 인코딩함), *FAM64A* 유전자(서열 유사성 64 멤버 A를 갖는 패밀리를 인코딩하며, RCS1, PIMREG 또는 CATS로도 알려짐), *BAIAP3* 유전자(BAI1 관련 단백질 3을 인코딩함), *MYH7* 유전자(베타-미오신 중쇄를 인코딩함), *TPM1* 유전자(트로포미오신 1을 인코딩함), *RBM20* 유전자(RNA 결합 모티프 단백질 20을 인코딩함), *KLHL24* 유전자(켈치 유사 패밀리 멤버 24를 인코딩함), *MYL2* 유전자(미오신 조절 경쇄 2를 인코딩함), *TNNT2* 유전자(심장 트로포닌 T를 인코딩함) 또는 이의 돌연변이체를 표적으로 하는 간섭 RNA(예를 들어, siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드)에 접합된 항원 결합 단백질을 투여함으로써 심부전을 치료 또는 예방하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 간섭 RNA(예를 들어, siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드)는 *SLC5A1, SLC16A3, HDAC6, MMP27, MFAP5, FAM64A,* 또는 *BAIAP3* 유전자의 녹다운을 매개한다. 일부 실시양태에서, 간섭 RNA(예를 들어, siRNA 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드)는 *MYH7, TPM1, RBM20, KLHL24, MYL2* 또는 *TNNT2* 유전자에서 대립유전자 특이적 mRNA 침묵(우성-음성 돌연변이를 표적으로 함)을 매개한다.

[1156] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체는 리소좀 축적 장애를 치료 또는 예방하는 데 사용된다. "리소좀 축적 질환"(LSD)은 리소좀 기능의 결함으로 초래되는 임의의 장애를 포함한다. 가장 잘 알려진 리소좀 질환은 타이-삭스(Tay-Sachs), 고셰(Gaucher), 및 니만-픽(Niemann-Pick) 질환을 포함한다. 질환의 병인은 때때로 단백질 기능 상실로 인해 리소좀 내 불완전한 분해 산물의 축적 때문이다. 리소좀 축적 질환은 정상적인 기능이 리소좀 내용물을 분해하거나 분해를 조정하는 단백질의 기능 상실 또는 약화 변이에 의해 유발될 수 있다. 리소좀 축적 질환과 관련된 단백질은 효소, 수용체 및 기타 막관통 단백질(예를 들어, NPC1), 번역 후 변형 단백질(예를 들어, 설파타아제), 막 수송 단백질, 및 비-효소적 공동인자 및 기타 가용성 단백질(예를 들어, GM2 갱글리오시드 활성화인자)을 포함한다. 따라서, 리소좀 축적 질환은 결함이 있는 효소 그 자체에 의해 유발되는 그러한 장애보다 더 많이 포함하며 임의의 분자 결함에 의해 유발된 임의의 장애를 포함한다.

[1157] LSD는 스핑고지질증(주로 중추신경계에 영향을 주는 유전성 지질 대사 장애의 이종 그룹), 뮤코다당증(유전성 리소좀 축적 장애의 그룹) 및 글리코겐 축적 질환을 포함한다. 일부 실시양태에서, LSD는 파브리병, 고셰병 I형, 고셰병 II형, 고셰병 III형, 니만-픽 질환 A형, 니만-픽 질환 BGM1-갱글리오시드증 유형, 샌드호프병, 타이-삭스병, GM2-활성화인자 결핍, GM3-갱글리오시드증, 이염색백색질장애, 스핑고지질-활성화인자 결핍, 시예병, 헐러-시예병(Hurler-Sceie disease), 헐러병, 헌터병, 산필리포 A, 산필리포 B, 산필리포 C, 산필리포 D, 모르키오 증후군 A, 모르키오 증후군 B, 마로토-라미병, 슬라이병(Sly disease), MPS IX 및 폼페병 중 어느 하나 이상이다. 따라서, 본원에 기재된 방법은 또한 환자에게 항-TfR 단백질-약물 접합체의 유효량을 투여함으로써 환자에서 이러한 임의의 LSD를 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다.

[1158] 리소좀 축적 질환의 분자적 병변의 특징은 많은 경우에서 질환의 중증도에 영향을 미치며, 즉 완전한 기능 상실은 태아기 또는 신생아기 발병과 관련이 있을 수 있으며 심각한 증상을 수반하며; 부분적 기능 상실은 (상대적으로) 더 경증이면서 늦은 발병 질환과 관련이 있을 수 있다. 결핍된 세포의 대사 결함을 교정해야 하는 데, 활성의 일부만 회복될 필요가 있을 수 있다. 리소좀 축적 질환은 일반적으로 문헌 [Desnick& Schuchman, "Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges," 13 Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 307-35, 2012]에 기재되어 있다.

[1159] 리소좀 축적 질환의 다른 비제한적인 예는 다음을 포함한다: 스핑고지질증; 세라미다아제 결핍증, 예컨대 파버병, 크라베병(예를 들어, 유아 발병 또는 후기 발병); 갈락토시알리도증; 갱글리오시드증, 예컨대 알파-갈락토시다아제(예를 들어, 파브리병 또는 쉰들러병), 베타-갈락토시다아제/GM1 갱글리오시드증(예를 들어, 유아, 청소년 또는 성인/만성), GM2 갱글리오시드증(예를 들어, AB 변이체, 활성화인자 결핍, 샌드호프병(예를 들어, 유아, 청소년 또는 성인 인셋(inset)); 테이-삭스병(예를 들어, 청소년 헥소사미니다아제 A 결핍, 만성 헥소사미니다아제 A 결핍); 글루코세레브로시다아제 결핍, 예컨대 고셰병(예를 들어, I형, II형, III형); 스핑고미엘리나아제 결핍, 예컨대 리소좀 산성 리파아제 결핍(예를 들어, 조기 발병 또는 후기 발병) 및 니만-픽 질환(예를 들어, A형 또는 B형); 황화증(sulfatidosis), 예컨대 이염색백색질장애(예를 들어, 사포신 B 결핍) 및 다중 설파타아제 결핍; 뮤코다당증, 예컨대 I형(예를 들어, MPS I 헐러 증후군, MPS I S 시예 증후군, MPS I H-S 헐러-시예 증후군), II형(헌터 증후군), III형(산필리포 증후군)(예를 들어, MPS III A(A형), MPS III B(B형), MPS III C(C형), MPS III D(D형)), IV형(모르키오)(예를 들어, MPS IVA(A형), MPS IVB(B형)), VI형(마로토-라미 증후군), VII형(슬라이 증후군) 및 IX형(히알루로니다아제 결핍); 뮤코지질증, 예컨대 I형(시알리도증), II형(I-세포 질환), III형(슈도-헐러(pseudo-Hurler) 다발영양장애/포스포트랜스퍼라아제 결핍) 및 IV형(무콜리피딘 1 결핍); 지질증, 예컨대 니만-픽 질환(예를 들어, C형, D형), 신경 세로이드 지방갈색증(예를 들어, 1형 산타부리-할티아병/유아 NCL(CLN1 PPT1), 2형 얀스키-빌쇼스키병/후기 유아 NCL(CLN2/LINCL TPP1), 3형 바텐-스필마이어-보그트병/청소년 NCL(CLN3), 4형 쿠프스병/성인 NCL(CLN4), 5형 핀란드 변종/후기 유아(CLN5), 6형 후기 유아 변종(CLN6), 7형 CLN7, 8형 북부 간질(CLN8), 8형 터키 후기 유아(CLN8), 9형 독일/세르비아 후기 유아(알 수 없음), 10형 선천적 카텝신 D 결핍(CTSD)) 및 윌만병; 당단백질 장애, 예컨대 알파-만노시도증, 베타-만노시도증, 아스파틸글루코사민뇨증 또는 푸코시도증; 리소좀 수송 질환, 예컨대 시스틴증, 피크노디소스토시스, 살라병/시알산 축적 질환 및 유아 유리 시알산 축적 질환; 글리코겐 축적 질환, 예컨대 II형 폼페병, IIb형 다논병; 및 콜레스테릴 에스테르 축적 질환과 같은 기타 유형.

[1160] 리소좀 축적 질환의 증상은 특정 장애 및 발병 연령과 같은 다른 변수에 따라 달라질 수 있으며, 경증 내지 중증일 수 있다. 증상은 발달 지연, 발작, 치매, 운동 장애, 청각 장애 및/또는 실명을 포함할 수 있다. 리소좀 축적 질환이 있는 일부 개체는 간 또는 비장 비대, 폐 및 심장 문제, 및 비정상적으로 성장하는 뼈를 가질 수 있다.

[1161] 리소좀 축적 질환이 있는 환자는 특정 리소좀 축적 질환과 관련된 효소(들)의 수준을 결정하는 검정과 같은 생화학적 검정에 의해 스크리닝될 수 있다. 질환-유발 돌연변이가 알려진 일부 패밀리와 특정 유전적 단리물에서, 돌연변이 분석이 수행될 수 있다. 또한 생화학적 수단으로 진단을 내린 후, 특정 장애에 대한 돌연변이 분석이 수행될 수 있다.

[1162] 따라서, 본원에 제공된 방법은 치료적 유효량의 항-TfR 단백질-약물 접합체(예를 들어, 31874B; 31863B; 69348; 69340; 69331; 69332; 69326; 69329; 69323; 69305; 69307; 12795B; 12798B; 12799B; 12801B; 12802B; 12808B; 12812B; 12816B; 12833B; 12834B; 12835B; 12847B; 12848B; 12843B; 12844B; 12845B; 12839B; 12841B; 12850B; 69261; 또는 69263)를 대상체에 투여함으로써, 앞서 기재된 신경 또는 근육 질환 또는 장애와 같은 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 신경 또는 근육 질환 또는 장애와 같은 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법을 포함한다.

[1163] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체"는 본원에 기재된 신경 또는 근육 질환 또는 장애와 같은 질환 또는 장애의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 포유동물(예를 들어, 래트, 마우스, 고양이, 개, 소, 양, 말, 염소, 토끼), 바람직하게는 인간을 지칭한다. 실시양태에서, 대상체는 본원에 기재된 신경 또는 근육 질환 또는 장애와 같은 질환 또는 장애를 앓고 있는 것으로 진단되었다.

[1164] 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체(예를 들어, 31874B; 31863B; 69348; 69340; 69331; 69332; 69326; 69329; 69323; 69305; 69307; 12795B; 12798B; 12799B; 12801B; 12802B; 12808B; 12812B; 12816B; 12833B; 12834B; 12835B; 12847B; 12848B; 12843B; 12844B; 12845B; 12839B; 12841B; 12850B; 69261; 또는 69263)를

하나 이상의 추가 치료제와 함께 포함하는 조합이 본원에 추가로 개시된다. 항-TfR 단백질-약물 접합체 및 추가 치료제는 단일 조성물 또는 별개의 조성물에 있을 수 있다. 예를 들어, 실시양태에서, 추가 치료제는 알글루코시다아제 알파(예를 들어, 마이오자임 또는 루미자임), 리툭시맙, 메토트렉세이트, 정맥내 면역글로불린(IVIG), 아발글루코시다아제 알파-ngpt(예를 들어, 넥스비아자임), 선택적 베타 작용제(agonist)(예를 들어, 레발부테롤), 항생제, 스테로이드(예를 들어, 코르티손 또는 프레드니손), 비스포스포네이트, 감염성 질환 치료제(예를 들어, 항생제, 백신(예를 들어, 폐렴구균 백신), 팔리비주맙)이다.

[1165] 또한, 항-TfR 단백질-약물 접합체, 예를 들어 12799B, 12839B, 12843B 또는 12847B를 추가 치료제와 함께 투여함으로써 질환 또는 장애의 치료 또는 예방이 필요한 대상체에서 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하는 방법이 제공된다. 항-TfR 단백질-약물 접합체를 하나 이상의 추가 치료제와 함께 포함하는 조성물 또한 본원에 기재된 부분을 형성한다.

[1166] "함께(in association with)"라는 용어는 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체인 구성요소가 메토트렉세이트와 같은 다른 작용제와 함께, 예를 들어 동시 전달을 위한 단일 조성물로 제형화될 수 있거나, 둘 이상의 조성물(예를 들어, 각각의 구성요소를 포함하는 키트)로 별개로 제형화될 수 있음을 나타낸다. 각각의 구성요소는 다른 구성요소가 투여될 때와 상이한 시간에 대상체에게 투여될 수 있고; 예를 들어, 각각의 투여는 주어진 기간 동안 간격을 두고 비-동시에(예를 들어, 별개로 또는 순차적으로) 제공될 수 있다. 더욱이, 별개의 구성요소는 동일하거나 상이한 경로로 대상체에게 투여될 수 있다.

[1167] 본원에 기재된 신경 또는 근육 질환 또는 장애와 같은 질환 또는 장애를 치료 또는 예방하기 위한, 본원에 기재된 항-TfR 단백질-약물 접합체의 유효 투여량 또는 치료적으로 유효한 투여량은, 징후 및/또는 증상의 퇴행 또는 제거를 유도하든, 징후 및/또는 증상의 진행을 억제하든, 치료를 받는 대상체에서 질환 또는 병태의 하나 이상의 징후 및/또는 증상을 완화하기에 충분한 항-TfR 단백질-약물 접합체의 양을 지칭한다.

[1168] 증상은 환자 자신에게 명백한 질환의 표명인 한편, 징후는 의사가 인지하는 질환의 표명이다. 징후 또는 증상을 완전히 또는 부분적으로 줄이는 것을 징후 또는 증상의 완화라 지칭할 수 있다.

[1169] 실시양태에서, 항-TfR 단백질-약물 접합체의 유효 투여량 또는 치료적으로 유효한 투여량은 약 1 mg/체중 kg 및 50 mg/체중 kg이다. 투여량은 투여 받을 대상체의 연령 및 크기, 표적 질환, 병태, 투여 경로 등에 따라 달라질 수 있다. 특정 실시양태에서, 초기 투여에 이어서 대략적으로 초기 투여의 양과 동일하거나, 그보다 적거나 많을 수 있는 양으로 항원 결합 단백질의 두 번째 또는 복수의 후속 투여가 이어질 수 있고, 여기서 후속 투여는 수일 또는 수주로 분리된다.

[1170] 일부 실시양태에서, 항-TfR 단백질-약물 접합체 또는 이의 약학 조성물은 반복 투여 요법에 따라 투여될 수 있으며, 여기서 항-TfR 단백질-약물 접합체는 (예를 들어, 초기 투여량으로) 초회 투여될 수 있고, 그 후에는 대상체 치료의 기간 동안 임의의 양으로, 여러 많은 후속 회차로 재투여될 수 있다. 예를 들어, 항-TfR 단백질-약물 접합체는 대상체 치료의 기간 동안 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회 이상 재투여될 수 있고, 이는 수일, 수주 또는 수년의 여러 많은 기간에 걸쳐 발생할 수 있다.

[1171] 일부 실시양태에서, 항-TfR 단백질-약물 접합체 또는 이의 약학 조성물은 단계적 투여 요법에 따라 투여될 수 있다. 조성물의 단계적 투여는 동일한 조성물의 투여를 여러 투여에 걸쳐 분할(즉, 나누기)하는 것을 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에서, 동일한 조성물의 투여는 대상체 치료의 기간 동안 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회 이상으로 분할되며, 이는 수일, 수주 또는 수년의 여러 많은 기간에 걸쳐 발생할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-TfR 단백질-약물 접합체의 투여에 단계적 투여 요법이 사용되는 경우, 단계적 투여 요법은 항-TfR 단백질-약물 접합체의 각각의 투여와 함께 치료적 트랜스유전자 수준의 점진적인 증가를 초래할 수 있다.

[1172] **실시예**

[1173] 본 발명은 또한 다음의 실시예를 통해 설명되고 입증된다. 그러나, 본 명세서의 어디든 이러한 예 및 다른 예를 사용하는 것은 단지 예시를 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위 및 의미 또는 임의의 예시된 용어를 결코 제한하지 않는다. 마찬가지로, 본 발명은 본원에 기재된 임의의 특정한 바람직한 실시양태로 제한되지 않는다. 실제로, 본 명세서를 읽을 때 당업자에게 본 발명의 많은 수정 및 변형이 자명할 수 있고, 이러한 변형은 사상 또는 범위에서 본 발명으로부터 벗어나지 않고 이루어질 수 있다. 따라서 본 발명은 첨부된 청구항의 용어와 함께 해당 청구항이 권리를 갖는 등가물의 전체 범위에 의해서만 제한되어야 한다.

[1174] **실시예 1: 면역글로불린 분자의 생성, 선택 및 특성화**

[1175] 항-인간 트랜스페린 수용체(hTfR) 항체를 생성하고, hTfR에 결합하는 능력에 대해, 그리고 인간 트랜스페린-hTfR 결합의 강력한 차단이 없는지에 대해 스크리닝하였다.

[1176] *항-hTfR 생성*. VelocImmune 마우스를, Alum:CpG 보조제와 함께, 피하 발바닥 주사를 통해, 면역원으로서, N-말단에서 6-His 태그(인간 6xHis-TfR로서 지칭됨)에 융합된 인간 트랜스페린 수용체 세포외 도메인을 포함하는 재조합 단백질로 면역화하였다. 초기 면역화 주사 이전, 및 추가 접종(boost injection) 후, 마우스를 채혈해 수집하였으며, 면역 혈청을 인간 TfR 특이적 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA)를 사용하여 항체 역가를 결정하였다. 이 검정에서, 연속 희석된 혈청 샘플을 면역원 코팅된 플레이트에 첨가하고, 플레이트 결합 마우스 IgG를 HRP-접합된 항-마우스 IgG 항체를 사용하여 검출하였다. 테스트된 혈청 샘플의 역가는 완충액만 있는 대조군 샘플의 신호의 두 배인 결합 신호를 생성하는 샘플의 외삽 희석 배율로서 정의된다. 최적의 항-TfR 항체 역가를 가진 마우스를 선택하여 안락사 3-5일 전에 최종 추가 접종을 실시한 후, 이 마우스로부터 비장세포를 수확하였고, B 세포 분류 기술(BST)을 사용하여 항체를 단리하였다.

[1177] 단리된 항체의 TfR 특이적 항체를 단리하고 특성화하였다. 214개의 TfR 결합 항체를, 항원 결합 단편 영역(Fab)으로서, 그리고 가변 중쇄 후 가변 경쇄(V_H-V_K) 또는 가변 경쇄 후 가변 중쇄(V_K-V_H)와 상보적 배향으로 단일쇄 가변 단편(scFv)에 클로닝하였다. scFv 또는 Fab를 함유하는 CHO 세포 배양의 조건화 배지를 hTfR 단백질과 hTfR 발현 세포에 결합하는 능력에 대해 테스트하였다.

[1178] **실시예 2: CHO 유래의 32개 항-hTfR 1차 상청액의 결합 운동학**

[1179] 25℃에서 CHO 상청액 유래의 32개의 항-인간 TfR IgG1 단클론 항체와 TfR 시약의 상호작용에 대해 Biacore 결합 운동학 검정을 수행하였다.

[1180] **표 2-1. 테스트된 단클론 항체 클론**

mAb#	AbID#	공급원
1	12795B	1차 상청액
2	12798B	1차 상청액
3	12799B	1차 상청액
4	12801B	1차 상청액
5	12802B	1차 상청액
6	12808B	1차 상청액
7	12812B	1차 상청액
8	12834B	1차 상청액
9	12835B	1차 상청액
10	12839B	1차 상청액
11	12841B	1차 상청액
12	12843B	1차 상청액
13	12844B	1차 상청액
14	12845B	1차 상청액
15	12847B	1차 상청액
16	12848B	1차 상청액
17	12850B	1차 상청액
18	31863B	1차 상청액
19	31874B	1차 상청액
20	12816B	1차 상청액
21	12833B	1차 상청액
22	69261	1차 상청액
23	69263	1차 상청액
24	69305	1차 상청액
25	69307	1차 상청액
26	69323	1차 상청액
27	69326	1차 상청액
28	69329	1차 상청액
29	69331	1차 상청액
30	69332	1차 상청액
31	69340	1차 상청액
32	69348	1차 상청액
33	REGN1945	

[1181]

[1182] 사용된 시약:

[1183] ● REGN2431(hmm.hTfRC; 분자량 79210 g/mol), 이는 다음과 같은 아미노산 서열을 갖는다:

HHHHHHEQKLISEEDLGGEQKLISEEDLCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAARRLYWDDLKRKLSEKL
DSTDFTGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLV
YLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQ
TKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTD
STCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAKSGVGTALLLKLAQMFSD
MVLKDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTM
QNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNK
VARAAAEVAGQFVIKLTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDF
GNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFWGSGSHTLPALLENLKLRKQNNGAFNETLFRNQL
ALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF

[1184] (서열 번호 460).

[1185] ● REGN2054(mf TFRC ecto-mmh; 분자량 78500 g/mol):

[1186] 2 myc 에피토프 서열(EQKLISEEDLGGEQKLISEEDLHHHHHH (서열번호 461)) 사이에 GG 링커(밑줄)를 함유하는 c-말단 myc-myc-헥사히스티딘 태그가 있는 단량체 원숭이(cyno) Tfrc 엑토도메인(아미노산 C89-F760, 수탁번호#: XP_045243212.1).

[1187] 인간 및 파스시쿨라리스 원숭이(fascicularis monkey) TfR 엑토도메인 재조합 단백질과 항-TfR 단클론 항체의 상호작용에 대한 평형 해리 상수(K_D)를 실시간 표면 플라즈몬 공명(SPR) 기반 Biacore S200 바이오센서를 사용하여 결정하였다. 모든 결합 연구를 37℃에서 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA 및 0.05 %v/v 계면활성제 Tween-20, pH 7.4(HBS-EP) 러닝 완충액에서 수행하였다. Biacore CM5 센서 표면을 먼저 단클론 마우스 항-인간 Fc 항체(REGN2567)와 아민 커플링하여 유도체화한 후, CHO 조건화된 배지에서 항-TfR 단클론 항체를 포획하는 단계를 수행하였다. C-말단 myc-myc-헥사히스티딘 태그(hTFR-mmh; REGN2431)로 발현된 인간 TfR 세포외 도메인 또는 C-말단 myc-myc-헥사히스티딘 태그(mfTFR-mmh; REGN2054)로 발현된 원숭이 TfR 세포외 도메인을, HBS-EP 러닝 완충액 중 100 nM 농도로, 50 μL/분의 유속으로 2분 동안 주사하였다. 항-TfR 단클론 항체에 결합된 TfR의 해리를 HBS-EP 러닝 완충액에서 3분 동안 모니터링하였다. 각각의 사이클의 종료 시, 항-TfR 단클론 항체 포획 표면을, 20 mM H_3PO_4의 12초 주사를 이용하여 재생성하였다. 결합 속도(ka)와 해리 속도(kd)를 Scrubber 2.0c 소프트웨어를 사용하여 실시간 결합 센서그램을 질량 이동 제한이 있는 1:1 결합 모델에 맞춰 결정하였다. 해리 평형 상수(K_D)와 해리 반감기($t^1/_2$)를 다음과 같은 운동 속도 상수로부터 계산하였다:

[1188] $$K_D\,(M) = \frac{kd}{ka}, \quad \text{및} \quad t½\,(\text{분}) = \frac{\ln(2)}{60 * kd}$$

[1189] 평형 결합 상수 및 운동 결합 상수는, 인간 TfR 및 원숭이 TfR에 대해 표 2-2와 표 2-3에 각각 요약되어 있다. 25℃에서, 항-TfR 단클론 항체는 표 2-2에 나타낸 바와 같이, 65.6 pM 내지 41 nM 범위의 K_D 값으로 hTfR-mmh에 결합하였다. 항-TfR 단클론 항체는 표 2-3에 나타낸 바와 같이, 1.16 nM 내지 20.5 nM 범위의 K_D 값으로 mfTfR-mmh에 결합하였다.

[1190] 결과는 이하에 제시된다.

[1191] 표 2-2. 25℃ 에서 hTFR-mmh와 항-TfR 단클론 항체(2가 IgG)의 상호작용에 대한 평형 및 운동 결합 매개변수.

분자	mAb 포획 수준 (RU)	100 nM Ag 결합 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	t½ (분)
12795B	3344	883	1.22E+05	<1.00E-05	8.23E-11	>1155#
12798B	4552	1151	1.63E+05	6.33E-05	3.87E-10	182.6
12799B	2388	699	7.76E+04	6.62E-05	8.51E-10	174.5
12801B	4720	598	8.19E+04	4.19E-05	5.13E-10	276.0
12802B	2828	903	1.23E+05	2.92E-05	2.36E-10	395.4
12808B	4336	964	1.19E+05	1.07E-04	8.94E-10	108.5
12812B	2222	11	4.33E+05	1.31E-03	3.02E-09	8.8
12834B	3837	11	6.00E+05	4.39E-03	7.00E-09	2.6
12835B	3276	1146	1.34E+05	4.17E-04	3.11E-09	27.7
12839B	5192	660	1.18E+05	5.33E-05	4.48E-10	216.9
12841B	2895	1151	1.73E+05	1.16E-04	6.70E-10	99.8
12843B	3080	854	9.42E+04	1.68E-04	1.78E-09	68.8
12844B	2869	946	1.31E+05	1.22E-04	9.35E-10	95.0
12845B	2911	1104	1.68E+05	1.99E-04	1.18E-09	57.9
12847B	4425	895	1.05E+05	1.71E-04	1.62E-09	67.6
12848B	4530	823	1.01E+05	4.99E-05	4.94E-10	231.6
12850B	2990	725	8.37E+04	1.76E-05	2.15E-10	656.8
31863B	5490	1083	1.52E+05	<1.00E-05	6.56E-11	>1155#
31874B	5594	904	1.38E+05	1.15E-04	8.36E-10	100.5
12816B	3377	357	5.79E+04	3.36E-04	5.80E-09	34.3
12833B	3972	409	7.20E+04	2.52E-04	3.51E-09	45.9
69261	3546	462	7.00E+04	8.08E-05	1.16E-09	142.9
69263	180	150	1.77E+05	1.15E-03	6.50E-09	10.0
69305	2726	6	NB*	NB*	NB*	NB*
69307	2349	1285	1.90E+05	4.26E-05	2.26E-10	271.1
69323	4506	465	7.34E+04	1.80E-04	2.45E-09	64.1
69326	1709	680	1.15E+05	2.56E-04	2.22E-09	45.1
69329	1573	1100	1.92E+05	1.86E-04	9.70E-10	62.2
69331	4617	87	1.14E+05	4.66E-03	4.10E-08	2.5
69332	3915	9	NB*	NB*	NB*	NB*
69340	3226	999	1.44E+05	6.23E-05	4.29E-10	185.4
69348	2848	680	1.06E+05	1.72E-04	1.62E-09	67.2
REGN1945	4011	6	NB	NB	NB	NB

[1192]

[1193] #는 현재 실험 조건에서 해리가 관찰되지 않았고, 실시간 결합 센서그램을 맞추는 동안 kd 값이 수동으로 1.00E-05 s^{-1}로 고정되었음을 나타낸다. *NB는 현재 실험 조건에서 결합이 관찰되지 않았음을 나타낸다.

[1194] **표 2-3. 25℃에서 mfTfR-mmh와 항-TfR 단클론 항체(2가 IgG)의 상호작용에 대한 평형 및 운동 결합 매개변수.**

분자	mAb 포획 수준 (RU)	100nM Ag 결합 (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	t½ (분)
12795B	3334	364	6.10E+04	7.13E-05	1.16E-09	162.0
12798B	4542	508	7.90E+04	1.29E-03	1.63E-08	9.0
12799B	2384	651	8.64E+04	1.62E-04	1.88E-09	71.2
12801B	4684	159	6.40E+04	6.53E-04	1.02E-08	17.7
12802B	2819	464	7.05E+04	5.29E-04	7.51E-09	21.8
12808B	4329	626	7.85E+04	4.54E-04	5.78E-09	25.5
12812B	2220	1	NB*	NB*	NB*	NB*
12834B	3820	5	NB*	NB*	NB*	NB*
12835B	3262	254	9.51E+04	1.68E-03	1.77E-08	6.9
12839B	5170	11	NB*	NB*	NB*	NB*
12841B	2888	4	NB*	NB*	NB*	NB*
12843B	3072	399	7.90E+04	1.18E-03	1.50E-08	9.8
12844B	2857	437	7.59E+04	7.35E-04	9.68E-09	15.7
12845B	2906	13	NB*	NB*	NB*	NB*
12847B	4420	702	9.92E+04	3.33E-04	3.36E-09	34.7
12848B	4524	261	5.29E+04	9.62E-04	1.82E-08	12.0
12850B	2985	87	1.01E+05	1.57E-03	1.55E-08	7.3
31863B	5480	145	1.63E+05	2.98E-03	1.83E-08	3.9
31874B	5557	26	6.91E+05	9.96E-03	1.44E-08	1.2
12816B	3376	315	6.52E+04	4.85E-04	7.44E-09	23.8
12833B	3966	346	6.92E+04	4.86E-04	7.02E-09	23.8
69261	3537	331	6.83E+04	4.03E-04	5.90E-09	28.7
69263	181	77	1.97E+05	3.78E-03	1.92E-08	3.1
69305	2725	-7	NB*	NB*	NB*	NB*
69307	2344	3	NB*	NB*	NB*	NB*
69323	4500	24	5.58E+05	1.06E-02	1.90E-08	1.1
69326	1707	9	NB*	NB*	NB*	NB*
69329	1571	8	NB*	NB*	NB*	NB*
69331	4611	26	4.89E+05	1.00E-02	2.05E-08	1.2
69332	3897	1	NB*	NB*	NB*	NB*
69340	3219	634	8.92E+04	7.23E-04	8.11E-09	16.0
69348	2851	433	9.60E+04	4.61E-04	4.80E-09	25.1
REGN1945	4009	4	NB	NB	NB	NB

[1195]

[1196] *NB는 현재 실험 조건에서 결합이 관찰되지 않았음을 나타낸다.

[1197] **실시예 3: ELISA에 의한 인간 홀로-트랜스페린에 대한 인간 TfRC 단량체 결합을 차단하는 항-TfR 항체**

[1198] ELISA 기반 차단 검정을 개발하여 항-트랜스페린 수용체(TfR) 항체가 인간 트랜스페린 수용체와 인간 홀로-트랜스페린 리간드의 결합을 차단하는 능력을 결정하였다.

[1199] 표 3-1. 시약

시약	공급원
인간 트랜스페린 다클론 염소 IgG 항체	R&D Systems
인간 홀로-트랜스페린 단백질	R&D Systems
His-myc-myc-hTFRC 엑토	Regeneron
HRP 접합 c-Myc 다클론 토끼 IgG 항체	Novus Biologicals
1X PBS	Irvine Scientific
1X PBST (PBS 중 0.05% tween-20)	Sigma
BSA: 소혈청 유래의 알부민 용액, 30%	Sigma
3-3', 5-5'-테트라메틸벤지딘 (TMB) 기질 A	BD Biosciences
3-3', 5-5'-테트라메틸벤지딘 (TMB) 기질 B	BD Biosciences
2N 황산	VWR
Reacti-Bind 96-웰 플레이트 모서리 노치	ThermoFisher Scientific
VWR 96-웰 Deep Well Plates 0.5 ML	VWR
Aquamax Plate Washer 2000	Molecular Devices
VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader	PerkinElmer

[1200]

[1201] 실험에 사용된 인간 트랜스페린 수용체 재조합 단백질인 hTFRC는 N-말단 6-히스티딘-myc-myc 태그(Hmm.hTfrc(REGN2431): 2개의 myc 에피토프 서열(HHHHHHEQKLISEEDLGGEQKLISEEDL)(서열번호 460의 아미노산 1-28) 사이에 GG 링커(밑줄)를 함유하는 N-말단 헥사히스티딘-myc-myc-태그가 있는 단량체 인간 Tfrc 엑토도메인(아미노산 C89-F760, 수탁번호#: NP_001121620.1))으로 발현된 hTfR 세포외 도메인(아미노산 C89-F760)으로 구성된다. 인간 혈장으로부터 단리된 인간 홀로-트랜스페린 리간드 단백질(홀로-Tf)은 R&D Systems로부터 구입하였다.

[1202] 차단 검정에서, 항-인간 트랜스페린 염소 IgG 다클론 항체(항-hTf pAb)를, 4℃에서 밤새 96웰 마이크로티터 플레이트 상의 PBS 중 2 마이크로그램/mL의 농도로 수동적으로 흡수하였다. 그 후 비특이적 결합 부위를 실온에서 1시간 동안 PBS 중 0.5%(w/v) BSA 용액을 사용하여 차단하였다. 동일한 플레이트에 인간 홀로-Tf를 실온에서 2시간 동안 PBS + 0.5% BSA 중 1 마이크로그램/mL의 농도로 첨가하였다. 별도의 96웰 마이크로티터 플레이트 세트에서, 300 pM Hmm-hTFRC 용액을 2배 희석으로 TFRC 항체 상청액과 혼합시켰다. 1시간 항온처리 후 혼합물을 인간 홀로-Tf 마이크로티터 플레이트로 옮겼다. 실온에서 1시간 더 항온처리한 후, 플레이트를 세척하고, 플레이트 결합 Hmm-hTFRC를 호스래디시 퍼옥시다아제(HRP) 접합 토끼 항-Myc 다클론 항체로 검출하였다. 플레이트를 제조업체의 권장 절차에 따라 TMB 기질 용액을 사용하여 현상하였고, 450 nm에서 흡광도를 VictorTM Multilabel Plate Reader에서 측정하였다.

[1203] 테스트된 항-TfR 항체에 대한 차단 퍼센트를 아래와 같은 공식을 사용하여 계산하였다:

$$\text{차단\%} = 100 - \left[\frac{(\text{테스트 항체 - Hmm-hTFRC가 없는 완충액 단독})}{(\text{Hmm-hTFRC 단독 - Hmm-hTFRC가 없는 완충액 단독})}\right] \times 100$$

[1204]

[1205] Hmm-hTFRC와 인간 홀로-Tf의 결합을 50% 이상 차단한 항체를 차단제로서 분류하였다.

[1206] 인간 TFRC가 인간 홀로-Tf에 결합하는 것을 차단하는 항-TfR 항체의 능력을 ELISA 기반 차단 검정을 사용하여 평가하였다. 이 검정에서, 고정 농도의 Hmm-hTFRC를 플레이트 고정화 인간 홀로-Tf 단백질에 결합하기 전에 항-TfR 항체 함유 상청액과 사전 항온처리하였고, 플레이트 결합 Hmm-hTFRC를 HRP-접합된 c-Myc 특이적 토끼 다클론 항체로 검출하였다.

[1207] 32개의 항-TfR 항체를, 항원 결합 단편 영역(Fab)으로서, 그리고 가변 중쇄 후 가변 경쇄(V_H-V_K) 또는 가변 경쇄 후 가변 중쇄(V_K-V_H)와 상보적 배향으로 단일 쇄 가변 단편(scFv)에 클로닝하였다. 96개의 항-TfR 항체 상청액 모두 인간 TFRC가 인간 홀로-Tf에 결합하는 것을 차단하는 능력에 대해 테스트하였다. 94개의 항-TfR 항체 상청액은 차단 활성이 없거나 차단 백분율이 0% 내지 45% 범위인 낮은 차단 활성을 나타내었고, 이러한 항체(Fab 또는 scFv 포맷)를 비-차단제로서 분류하였다(**표 3-2**). 오직 두 개의 Fab 상청액만이 50% 초과의 차단 활성을 가졌고, 이때 차단% 값은 각각 64% 및 78%였다.

[1208] **표 3-2. 고정화된 인간 홀로-Tf에 대한 인간 TFRC 결합을 차단하는 항-TfR scFv 및 Fab 상청액 능력 요약**

	인간 홀로-Tf 에 대한 Hmm-hTFRC 결합의 차단, 차단%		
AbPID	Fab 포맷	scFv (V_K-V_H) 포맷	scFv (V_H-V_K) 포맷
12795B	44	23	45
12798B	10	10	0
12799B	5	10	26
12801B	45	27	37
12802B	15	17	11
12808B	16	18	19
12812B	14	12	19
12816B	14	14	16
12833B	64	40	22
12834B	-2	11	-3
12835B	78	37	45
12839B	13	6	23
12841B	29	1	10
12843B	10	8	17
12844B	20	10	12
12845B	11	3	18
12847B	3	13	11
12848B	13	9	19
12850B	18	8	10
31863B	24	7	13
31874B	16	-1	14
69261	11	16	19
69263	14	4	14
69305	3	5	3
69307	12	12	9
69323	12	17	7
69326	-2	12	18
69329	8	19	25
69331	9	13	7
69332	18	22	6
69340	3	13	6
69348	40	16	0

[1209]

[1210] **실시예 4. 항-hTfR scFv 분자의 혈액-뇌 장벽 횡단 평가**

[1211] 항-인간 트랜스페린 수용체(hTfR) 항체를 생성하여 hTfR에 결합하는 능력에 대해, 그리고 인간 트랜스페린-hTfR 결합의 강력한 차단이 없는지에 대해 스크리닝하였다. 이 초기 분석을 기반으로, 32개의 가변 서열을 선택하였

다. 융합 단백질에 사용되는 항-hTfR 항체, 항원 결합 단편(예를 들어, Fab) 또는 scFv 분자의 도메인은 표 1-1에 기재된 바와 같이 구성된다. 32개의 항-hTfR scFv에 대한 서열은 표 1-2에 개시되어 있다.

[1212] 항-hTfR scFv는 인간 산성 알파-글루코시다아제(GAA)의 성숙 펩티드에 융합된다. 산성 알파-글루코시다아제는 글리코겐, 말토오스 및 이소말토오스의 D-글루코오스 단위 사이의 알파-1,4 연결을 가수분해한다. 융합 단백질에 사용된 인간 알파-글루코시다아제의 성숙 펩티드에 대한 아미노산 서열은 다음을 포함한다:

AHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEQCEARGCCYIPAKQGLQGAQ
MGQPWCFFPPSYPSYKLENLSSSEMGYTATLTRTTPTFFPKDILTLRLDVMMETENRL
HFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVAPL
FFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPFY
LALEDGGSAHGVFLLNSNAMDVVLQPSPALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYLD
VVGYPFMPPYWGLGFHLCRWGYSSTAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSRR
DFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPYDEGLRRGVFITN
ETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIR
GSEDGCPNNELENPPYVPGVVGGTLQAATICASSHQFLSTHYNLHNLYGLTEAIASHRA
LVKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGA
DVCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNSLLSLPQEPYSFSEPAQQAMRKALTL
RYALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGK
AEVTGYFPLGTWYDLQTVPVEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLR
AGYIIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTKGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIF
LARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDI
[1213] CVSLLMGEQFLVSWC (서열 번호 491).

[1214] 시험관내 결합에 대해 스크리닝된 항-인간 TFRC 항체를 검증하기 위해, $Tfrc^{hum/hum}$ 녹-인(knock-in) 마우스에서 생체내 마우스 연구를 수행하여 혈액-뇌-장벽(BBB) 횡단을 평가하였다. 웨스턴 블롯에 의해 검출된 뇌 균질액에서 성숙 hGAA 단백질을 가진 11개의 클론을 31개 항체의 첫 번째 스크리닝으로부터 선택하였다.

[1215] **유체역학적 전달(HDD)에 의한 GAA 융합.** 인간 TFRC 녹-인 마우스에 간 특이적 마우스 *TTR* 프로모터 하에 항-hTFRCscfv:2xG4S(서열번호 542):hGAA 포맷으로 다양한 항-hTFRC 항체를 발현하는 DNA 플라스미드를 주사하였다. 마우스 체중의 10%로 희석한 0.9% 멸균 생리 식염수(0.1 mL/체중 g) 중 50 μg의 DNA를 마우스에 주사하였다. 주사 48시간 후, CO_2 질식으로 희생된 직후 마우스로부터 조직을 절개하고, 액체 질소에서 급속 동결하고, -80℃에서 보관하였다.

[1216] 조직 용해물을 프로테아제 억제제(1861282, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)가 있는 RIPA 완충액에서 용해에 의해 제조하였다. 조직 용해물을 비드 균질화기(FastPrep5, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)로 균질화하였다. 세포 또는 조직 용해물을 Novex 시스템(LifeTech Thermo, XP04200BOX, LC2675, LC3675, LC2676)을 사용하여 SDS-PAGE 겔 위에 흘려보냈다. 겔을 저형광 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 막(IPFL07810, LI-COR, Lincoln, NE, USA)으로 옮기고, Revert 700 Total Protein Stain(TPS; 926-11010 LI-COR, Lincoln, NE, USA)으로 염색한 후, 0.1% Tween 20을 함유한 Tris 완충 생리 식염수에서 Odyssey 차단 완충액(927-500000, LI-COR, Lincoln, NE, USA)으로 차단하고, GAA(ab137068, Abcam, Cambridge, MA, USA) 또는 항-GAPDH(ab9484, Abcam, Cambridge, MA, USA)에 대한 항체 및 적절한 2차 항체(926-32213 또는 925-68070, LI-COR, Lincoln, NE, USA)로 염색하였다. 블롯을 LI-COR Odyssey CLx로 이미지화하였다.

[1217] 단백질 밴드 강도를 LI-COR Image Studio 소프트웨어에서 정량화하였다. 각 샘플에 대한 성숙 77 kDa GAA 밴드의 정량화를 먼저 레인(lane)의 TPS 신호로 정규화한 후 혈청 중 GAA 수준(각각 로딩 대조군 및 간 발현 대조군)으로 정규화하여 결정하였다. 그 후, 값을 양성 대조군인 *Wt* 마우스의 항-마우스 TFRCscfv:hGAA 및 음성 대조군인 $Tfrc^{hum/hum}$ 마우스의 항-mTFRCscfv:hGAA와 비교하였다(**도 1a-1c, 표 4-1**).

[1218] **표 4-1. 항-hTFRCscfv:hGAA 플라스미드로 HDD 처치한 마우스 유래의 뇌 균질액에서 성숙 hGAA 단백질의 정량화.**

처치군	유전자 형	뇌에서 성숙 hGAA 단백질 (양성 대조군에 대해 정규화됨)
항 -mTFRCscfv:hGAA (양성 대조군)	*Wt*	1.00±0.43*
항 -mTFRCscfv:hGAA (음성 대조군)	$Tfrc^{hum/hum}$	0.02±0.03
69261scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.67±0.50
69307scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.08±0.19
69323scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.91±0.46
69329scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.65±0.13
69340scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.55±0.58
69348scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.50±0.05
12795scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.27±0.20
12798scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.72±0.42
12799scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.05±0.51*
12801scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.49±0.18
12802scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.29±0.27
12839scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.29±0.27**
12841scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.72±0.06***
12843scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.79±0.85***
12845scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	3.08±0.92***
12847scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.24±0.30
12848scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.59±0.16
12850scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.47±0.05

[1219]

[1220] 데이터를 임의의 단위로서 웨스턴 블롯으로부터 정량화하였다(**도 1a-1c**). 모든 값은 평균 ±SD, 군당 n=3-6이다. 음성 대조군인 $Tfrc^{hum/hum}$ 마우스에서의 항-mTFRCscfv:hGAA에 대한 일원 ANOVA(One Way ANOVA); *p<0.05; **p<0.005; ***p<0.0001.

[1221] **항-hTFRCscfv:hGAA 플라스미드의 HDD 후 뇌 샘플의 모세혈관 고갈.** 표 4-1로부터 선택된 항-hTFRCscfv:hGAA를 $Tfrc^{hum}$ 마우스에서 2차 스크리닝에서 테스트하여 hGAA가 뇌 실질에 존재하는지 여부, 그리고 BBB 내피 세포에 포집되지 않았는지 여부를 결정하였다. 4개의 scFv(12799, 12839, 12843 및 12847)를 사이노몰거스 TFRC에 대한 높은 친화도뿐만 아니라 웨스턴 블롯에서 실질 분획의 성숙 hGAA에 기반한 이러한 스크리닝으로부터 선택하였다.

[1222] 동물을 앞서 상세히 설명한 바와 같이 HDD 처치하였다. 주사 48시간 후, 마우스를 CO_2 질식으로 희생시킨 직후 30 mL의 0.9% 생리 식염수로 관류하였다. 브레그마 및 -2 mm 브레그마 사이에서 대뇌의 2 mm 관상(coronal) 슬라이스를 채취하고, 얼음 상의 700 µL 생리 완충액(10 mM HEPES, 4 mM KCl, 2.8 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$, 1 mM NaH_2PO_4, 0.9% 생리 식염수 중 10 mM D-포도당 pH 7.4)에 놓았다. 뇌 슬라이스를 유리 다운스 균질화기를 사용하여 얼음 위에서 부드럽게 균질화하였다. 생리 완충액 중 26% 덱스트란(MW 70,000 Da)의 등가량을 첨가하고(최종 13%의 덱스트란), 10회 더 스트로크하여 균질화하였다. 실질(상청액)과 내피(펠릿) 분획을 4℃에서 15분 동안 5,400 g로 원심분리하여 분리하였다. 앞서 상세히 설명한 바와 같이 분획에 대해 항-hGAA 웨스턴 블롯을 수행하였다(**도 2, 표 4-2**). 또한 블롯을 항-CD31 내피 마커(Abcam ab182982)로 조사하였다.

[1223] **표 4-2: 항-hTFRCscfv:hGAA 플라스미드로 HDD 처치한 마우스의 뇌 실질 분획과 BBB 내피 분획에서 성숙 hGAA 단백질의 정량화.**

처치군	유전자형	뇌 실질에서 성숙 hGAA 단백질 (양성 대조군으로 정규화됨)	뇌 내피에서 성숙 hGAA 단백질 (양성 대조군으로 정규화됨)	mfTFRC에 대한 친화도 (hTFRC 결합의 %)
항 - mTFRCscfv:hGAA (양성 대조군)	*Wt*	1.00	5.82	ND
항 - mTFRCscfv:hGAA (음성 대조군)	$Tfrc^{hum/hum}$	0.00	0.01	ND
69307scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.24	10.73	0%
69323scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.62	4.18	7%
12798scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.91	8.37	34%
12799scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.44	3.99	126%
12839scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.05	0.84	78%
12841scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.78	4.23	8%
12843scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.13	12.99	75%
12845scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	2.04	13.06	25%
12847scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.60	4.96	102%
12848scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.17	1.24	29%
12850scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.22	2.25	13%

[1224]

[1225] hGAA 단백질을 임의의 단위로서 웨스턴 블롯으로부터 정량화하였다(**도 2**). 군당 n=1. 사이노몰거스 마카쿠 TFRC에 대한 친화도 루미넥스 데이터를 hTFRC에 대한 결합의 퍼센트로서 계산하였다: (*mfTFRC 결합* ÷ *hTFRC 결합*) x 100.

[1226] **표 4-3: 항-hTFRCscfv:hGAA 플라스미드로 HDD 처치한 마우스의 사두근에서 hGAA 단백질의 정량화.**

처치군	유전자형	사두근에서 hGAA 단백질 (양성 대조군에 대해 정규화됨)
생리 식염수(비히클)	$Tfrc^{hum/hum}$	0.38±0.25
항 -mTFRCscfv:hGAA (양성 대조군)	*Wt*	1.07±0.27
항 -mTFRCscfv:hGAA (음성 대조군)	$Tfrc^{hum/hum}$	0.56±0.17
69307scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.58±0.18
69323scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.10±0.19
12798scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.33±0.56
12799scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.67±0.18
12839scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.80±0.18
12841scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.15±0.12
12843scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.78±0.43
12845scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.70±1.33
12847scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	7.74±9.42
12848scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.82±0.18
12850scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.76±0.34

[1227]

[1228] 데이터를 임의의 단위로서 웨스턴 블롯으로부터 정량화하였다(**도 2**). 모든 값은 평균 ±SD, 군당 n=2-4이다.

[1229] **간-데포(liver-depot) AAV8 항-hTFRCscfv:hGAA 처치 후 마우스 뇌 샘플의 모세혈관 고갈.** 더 장기적인 치료 모델에서 HDD 스크리닝 결과를 확인하기 위해, 처치된 $Tfrc^{hum}$ 마우스를 *TTR* 프로모터 하에 에피솜 간 데포 AAV8 항-hTFRCscfv:GAA로서 전달된 선택된 항-hTFRCscfv:GAA로 테스트하였다. 4개의 항-hTFRCscfv:GAA 모두 AAV8로서 전달될 때 성숙 hGAA를 뇌 실질로 전달한 것으로 밝혀졌다.

[1230] *AAV 생산 및 생체내 형질도입.* 재조합 AAV8(AAV2/8)을 HEK293 세포에서 생산하였다. 세포를, 아데노바이러스 헬퍼 유전자, AAV8 rep 및 cap 유전자를 인코딩하는 3개의 플라스미드, 및 AAV2 역위 말단 반복(ITR)이 측면에 있는 트랜스유전자를 함유하는 재조합 AAV 게놈으로 형질주입시켰다. 5일째에, 세포 및 배지를 수집하고, 원심분리하고, AAV 정제를 위해 가공하였다. 세포 펠릿을 동결-해동으로 용해하고, 원심분리로 제거하였다. 가공된 세포 용해물과 배지를 아이오딕사놀 구배 컬럼 위에 깔아 놓고 초원심분리기에서 원심분리하였다. 바이러스 분획을 40% 및 60%의 아이오딕사놀 용액 사이의 계면으로부터 제거하고 탈염 컬럼으로 1xPBS로 교환하였다. AAV vg를 ddPCR로 정량화하였다. AAV를 주사 직전 PBS + 0.001% F-68 Pluronic에서 희석하였다. $Tfrc^{hum}$ 마우스에 3e12 vg/체중 kg을 ~100 μL 용량으로 투여하였다. 마우스를 주사 4주 후에 희생시키고 모세혈관 고갈 및 웨스턴 블롯을 앞서 기재한 바와 같이 수행하였다(**도 3, 표 4-4**).

[1231] **표 4-4: 간 데포 AAV8 항-hTFRCscfv:hGAA로 처치한 마우스의 뇌 실질 분획 및 BBB 내피 분획에서 성숙 hGAA 단**

백질의 정량화.

처치군	유전자형	뇌 실질에서 성숙 hGAA 단백질 (양성 대조군으로 정규화됨)	뇌 내피에서 성숙 hGAA 단백질 (양성 대조군으로 정규화됨)
항 -mTFRCscfv:hGAA (양성 대조군)	*Wt*	1.00	1.00
항 -mTFRCscfv:hGAA (음성 대조군)	$Tfrc^{hum/hum}$	0.02	0.01
12799scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.94	0.94
12839scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.49	0.62
12843scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	0.61	0.63
12847scfv:hGAA	$Tfrc^{hum/hum}$	1.90	1.33

[1232]

[1233] 데이터를 임의의 단위로 웨스턴 블롯에서 정량화하였다(**도 3**). 군당 n=1.

[1234] **AAV8 에피솜 간 데포 항-hTFRCscfv:GAA를 이용한 $Gaa^{-/-}/Tfrc^{hum}$ 마우스에서의 글리코겐 축적 표현형의 구제.** 앞선 실험의 항-hTFRCscfv:GAA 중 세 개를 폼페병 모델 마우스에서 테스트하여 hTFRCscfv:GAA가 글리코겐 축적 표현형을 구제하는지 여부를 결정하였다. 3개(12839, 12843, 12847) 모두 글리코겐을 *Wt* 수준으로 정상화하는 것으로 밝혀졌다.

[1235] AAV 생산 및 생체내 형질도입을 상기한 바와 같이 수행하였다. $Gaa^{-/-}/Tfrc^{hum}$ 마우스에 2e12 vg/kg AAV8을 투여하였다. 주사 4주 후에 조직을 수확하여 상기한 바와 같이 급속 동결하였다. hGAA 웨스턴 블롯을 상기한 바와 같이 수행하였다(**도 4, 표 4-5**).

[1236] *글리코겐 정량화*(**표 4-6, 도 5**). 조직을 CO_2 질식으로 희생시킨 직후 마우스로부터 절개하여 액체 질소에서 급속 동결하고 -80℃에서 보관하였다. 조직을 글리코겐 측정을 위한 증류수 또는 단백질 분석용 RIPA 완충액 중 스테인리스 스틸 비드를 갖춘 벤치탑 균질화기에서 용해시켰다. 글리코겐 분석 용해물을 끓이고 원심분리하여 잔해를 제거하였다. 글리코겐 측정을 제조업체의 지침에 따른 상업용 키트(K646, BioVision, Milpitas, CA, USA)를 사용하여 형광측정법으로 수행하였다.

[1237] **표 4-5: 간 데포 AAV8 항-hTFRCscfv:hGAA로 처치된 $Gaa^{-/-}/Tfrc^{hum}$ 마우스의 조직에서의 hGAA 단백질의 정량화.**

처치군	*n*	혈청 *	간 *	대뇌 **	소뇌 **	척수 **	심장 * *	사두근 **
$Gaa^{-/-}$ 미처치	1	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.02	0.01
$Gaa^{-/-}$ 12839scfv:hGAA	3	2.42± 2.41	1.63± 0.96	0.14± 0.12	0.13± 0.12	0.19± 0.19	0.53± 0.52	0.14± 0.16
$Gaa^{-/-}$ 12843scfv:hGAA	3	2.07± 1.35	2.23± 0.08	0.17± 0.07	0.11± 0.05	0.17± 0.09	0.49± 0.31	0.18± 0.06
$Gaa^{-/-}$ 12847scfv:hGAA	3	1.56± 0.71	1.40± 0.13	0.25± 0.04	0.21± 0.09	0.42± 0.19	0.58± 0.17	0.19± 0.08

[1238]

[1239] 데이터를 임의의 단위로서 웨스턴 블롯으로부터 정량화하였다(**도 4**). 모든 값은 평균 ±SD, 군당 n=1-3이다. * 총 hGAA 단백질; **성숙 hGAA 단백질.

[1240] **표 4-6: 간 데포 AAV8 항-hTFRCscfv:hGAA로 처치된 $Gaa^{-/-}/Tfrc^{hum}$ 마우스의 조직에서의 글리코겐의 정량화.**

처치군	대뇌	소뇌	척수	심장	사두근
Wt 미처치	0.06±0.04*	0.01±0.04*	0.05±0.05*	0.08±0.02*	0.34±0.19*
Gaa-/- 미처치	2.34±0.58	2.51±0.38	3.08±0.23	25.30±6.06	13.05±0.98
Gaa-/- 12839scfv:hGAA	0.11±0.03*	0.46±0.08*	0.08±0.10*	0.68±0.68*	2.15±2.52*
Gaa-/- 12843scfv:hGAA	0.09±0.02*	0.09±0.08*	0.13±0.13*	0.09±0.01*	1.22±1.39*
Gaa-/- 12847scfv:hGAA	0.05±0.01*	0.02±0.03*	0.20±0.33*	0.11±0.11*	0.80±0.79*

[1241]

[1242] 모든 값은 글리코겐 μg/조직 mg, 평균 ±SD, 군당 n=3-4이다. 일원 ANOVA *p<0.0001 대 $Gaa^{-/-}$ 미처치군.

[1243] **AAV8 에피솜 간 데포 항-hTFRCscfv:GAA를 이용한 $Gaa^{-/-}/Tfrc^{hum}$ 마우스의 뇌 및 근육에서 글리코겐 축적의 구제.** 선택된 세 가지 항-hTFRCscfv:GAA(12799, 12843 및 12847)를 폼페병 모델 마우스에서 테스트하여 hTFRCscfv:GAA가 글리코겐 축적 표현형을 구제하는지 여부를 결정하였다. 본 실험에서, 뇌와 근육 절편에서 조직검사(histology)를 수행하여 조직 중 글리코겐을 시각화하였다. 선택된 3개의 항-hTFRCscfv:GAA 모두 뇌와 근

육에서 글리코겐 염색을 감소시킨 것으로 밝혀졌다. 이러한 데이터에 기반한 추가 분석을 위해 12847scfv:GAA를 선택하였다.

[1244] AAV 생산 및 생체내 형질도입을 상기한 바와 같이 수행하였다. 3개월령 *Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} 마우스에 4e11 vg/kg AAV8을 투여하였다. 주사 4주 후에 조직을 동결하여 상기한 바와 같이 글리코겐 분석하였다(**표 4-7**). 조직검사를 위해, 동물에 생리 식염수(0.9% NaCl)를 관류한 후, 조직을 10% 표준 완충 포르말린에서 밤새 드롭-픽스(drop-fixed)하였다. 조직을 PBS로 3x 세척한 후 포매할 때까지 PBS/0.01% 소듐 아지드에 보관하였다. 조직을 파라핀에 포매하고, 뇌(관상, -2 mm 브레그마) 및 사두근(섬유 횡단면)으로부터 5 um의 절편을 잘라내었다. 절편을 표준 프로토콜을 사용하여 과아이오딘산-쉬프(Periodic Acid-Schiff) 및 헤마톡실린으로 염색하였다(**도 6a-6d**).

[1245] **표 4-7: 간 데포 AAV8 항-hTFRCscfv:hGAA로 처치된 *Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} 마우스의 조직에서의 글리코겐의 정량화.**

[1246]

처치군	소뇌	사두근
Wt 미처치	0.02±0.03*	0.55±0.10*
Gaa-/- 미처치	1.91±0.26	12.19±3.02
Gaa-/- 12799scfv:hGAA	0.10±0.06*	1.34±0.9*
Gaa-/- 12843scfv:hGAA	0.09±0.06*	1.09±1.27*
Gaa-/- 12847scfv:hGAA	0.07±0.06*	0.72±0.64*

[1247] 모든 값은 글리코겐 μg/조직 mg, 평균 ±SD, 군당 n=5-8이다. 일원 ANOVA *p<0.0001 대 *Gaa*$^{-/-}$ 미처치군.

[1248] ***Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} 마우스에 항-hTFRC 12847scfv:GAA의 삽입.** 선택된 항-hTFRC 12847scfv:GAA를 폼페병 모델 마우스에서 알부민 삽입에 의해 테스트하여 에피솜 AAV8 간 데포 발현으로 결과를 반복 재현할 수 있는지 여부를 결정하였다. 12847scfv:GAA의 알부민 삽입은 성숙 hGAA 단백질을 뇌와 근육에 전달하였고, *Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} 마우스에서 글리코겐 축적 표현형을 구제하였다. 이러한 데이터는 최적화되지 않은 천연 12847scfv:GAA 서열로 생성되었다.

[1249] 12847scfv:GAA를 *Gaa*$^{-/-}$/*Cd63*^{hum} 마우스에서 근육-표적화 항-hCD63scfv:GAA와 비교하였다. 이 특정 실험에서, 항-hCD63scfv:GAA의 발현은 평소보다 낮았고, 근육에 많은 GAA 단백질을 전달하지도 않고 평소처럼 글리코겐을 정상화하지도 않았다. 이는 항-hCD63scfv:GAA가 근육에서 12847scfv:GAA보다 덜 효과적인 것으로 여겨지게 할 수 있으나, 대부분의 실험에서 이들은 근육에서 비슷한 것으로 밝혀졌다.

[1250] *AAV 생산.* 프로모터 없는 AAV 게놈 플라스미드를 12847scfv:GAA 서열과 3' 단부에 마우스 알부민 엑손 1 스플라이스 수용체 부위를 사용하여 생성하였다. 재조합 AAV8(AAV2/8)을 HEK293 세포에서 생산하였다. 세포를 아데노바이러스 헬퍼 유전자, AAV8 rep 및 cap 유전자를 인코딩하는 3개의 플라스미드와 AAV2 역위 말단 반복(ITR)이 측면에 있는 트랜스유전자를 함유하는 재조합 AAV 게놈으로 형질주입시켰다. 5일째에 세포와 배지를 수집하고, 원심분리하고, AAV 정제를 위해 가공하였다. 세포 펠릿을 동결-해동으로 용해하고, 원심분리에 의해 제거하였다. 가공된 세포 용해물과 배지를 아이오딕사놀 구배 컬럼 위에 깔아 놓고 초원심분리기에서 원심분리하였다. 바이러스 분획을 40% 및 60%의 아이오딕사놀 용액 사이의 계면으로부터 제거하고 탈염 컬럼으로 1xPBS로 교환하였다. AAV vg를 ddPCR로 정량화하였다.

[1251] 알부민 유전자좌 내로 생체내 CRISPR/Cas9 삽입. 3개월령의 *Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} 마우스에 꼬리 정맥 주사를 통해 3e12 vg/kg AAV8 12847scfv:GAA와 3 mg/kg LNP gRNA/Cas9 mRNA를 PBS + 0.001% F-68 Pluronic에 희석하여 투여하였다. 마우스를 주사 3주 후에 희생시켰다. 음성 대조군 마우스는 LNP 없이 AAV8 삽입을 받았다. 양성 대조군 마우스에 *TTR* 프로모터 하에 4e11 vg/kg 에피솜 간 데포 AAV8 12847scfv:GAA를 투여하였다(표현형 구조 데이터는 이전에 나타냄). CO_2 질식으로 희생시킨 직후 마우스로부터 조직을 절개하고, 액체 질소에 급속 동결시키고 -80 ℃에 보관하였다. CO_2 질식 직후 심장 천자를 통해 마우스로부터 혈액을 수집하고 혈청 분리 튜브(BD Biosciences, 365967)를 사용하여 혈청을 분리하였다.

[1252] **표 4-8. 처치군 및 대조군.**

처치군	유전자형	기능
Wt 미처치	*Tfrc*^{hum}	표준 미처치 마우스 대조군
Gaa$^{-/-}$ 미처치	*Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum}	미처치 폼페병 마우스
Gaa$^{-/-}$ 삽입 AAV 단독	*Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum}	삽입에 대한 음성 대조군(Cas9/gRNA 전달되지 않음)
Gaa$^{-/-}$ 에피솜 AAV8 TTR 12847scfv:hGAA	*Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum}	양성 대조군, 이전에 나타낸 글리코겐 축적 표현형의 구제
Gaa$^{-/-}$ 삽입 12847scfv:hGAA	*Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum}	실험용 삽입군
Gaa$^{-/-}$ 미처치	*Gaa*$^{-/-}$/*Cd63*^{hum}	미처치 폼페병 마우스(CD63 인간화됨)
Gaa$^{-/-}$ 삽입 항-CD63scfv:hGAA	*Gaa*$^{-/-}$/*Cd63*^{hum}	BBB-횡단에 대한 음성 대조군(근육을 표적화함)

[1253]

[1254] *웨스턴 블롯(**표 4-9, 도 7a**)*. 조직 용해물을 프로테아제 억제제(1861282, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)가 있는 RIPA 완충액에서 용해에 의해 제조하였다. 조직 용해물을 비드 균질화기(FastPrep5, MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA)로 균질화하였다. 세포 또는 조직 용해물을 Novex 시스템(LifeTech Thermo, XP04200BOX, LC2675, LC3675, LC2676)을 사용하여 SDS-PAGE 겔에 흘려보냈다. 겔을 저형광 폴리비닐리덴 플루오라이드(PVDF) 막(IPFL07810, LI-COR, Lincoln, NE, USA)으로 옮기고, Revert 700 Total Protein Stain(TPS; 926-11010 LI-COR, Lincoln, NE, USA)으로 염색한 후, 0.1% Tween 20을 함유한 Tris 완충 생리 식염수에서 Odyssey 차단 완충액(927-500000, LI-COR, Lincoln, NE, USA)으로 차단하고, GAA(ab137068, Abcam, Cambridge, MA, USA) 또는 항-GAPDH(ab9484, Abcam, Cambridge, MA, USA)에 대한 항체 및 적절한 2차 항체(926-32213 또는 925-68070, LI-COR, Lincoln, NE, USA)로 염색하였다. 블롯을 LI-COR Odyssey CLx로 이미지화하였다.

[1255] 단백질 밴드 강도를 LI-COR Image Studio 소프트웨어에서 정량화하였다. 각각의 샘플에 대한 성숙 77 kDa GAA 밴드의 정량화를 레인의 TPS 신호(로딩 제어)로 정규화함으로써 결정하였다.

[1256] *글리코겐 정량화(**표 4-10, 도 7b**)*. CO_2 질식으로 희생시킨 직후 마우스로부터 조직을 절개하고, 액체 질소에 급속 동결하고, -80℃에 보관하였다. 조직을 글리코겐 측정을 위한 증류수 또는 단백질 분석용 RIPA 완충액 중 스테인리스 스틸 비드를 갖춘 벤치탑 균질화기에서 용해시켰다. 글리코겐 분석 용해물을 끓여서 원심분리하여 잔해를 제거하였다. 글리코겐 측정을 제조업체의 지침에 따른 상업용 키트(K646, BioVision, Milpitas, CA, USA)를 사용하여 형광측정법으로 수행하였다.

[1257] **표 4-9. 삽입 항-hTFRC 12847scfv:hGAA로 처치된 *Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} 마우스의 조직에서의 hGAA 단백질의 정량화.**

처치군	간 총 hGAA	혈청 총 hGAA	대뇌 성숙 hGAA	사두근 성숙 hGAA
Gaa$^{-/-}$ 삽입 AAV 단독 음성 대조군	0.02±0.003	0.03±0.02	0.002±0.001	0.006±0.002
Gaa$^{-/-}$ 에피솜 AAV8 TTR 12847scfv:hGAA	2.35±0.72	3.65±2.09	0.49±0.20§§	0.148±0.043§§
Gaa$^{-/-}$ 삽입 12847scfv:hGAA	4.31±0.87*	3.47±2.37	0.57±0.26§§	0.141±0.062§§
Gaa$^{-/-}$ 삽입 항 -CD63scfv:hGAA	2.67±1.04*	0.93±0.55*	0.01±0.003	0.060±0.037

[1258]

[1259] 모든 값은 임의의 단위, 평균 ±SD, 군당 n=3-8이다. 일원 ANOVA *p<0.05 대 *Gaa*$^{-/-}$ 에피솜 AAV8 TTR 12847scfv:GAA 군; $^{§§}p$<0.001 대 AAV 단독 음성 대조군.

[1260] **표 4-10. 삽입 항-hTFRC 12847scfv:hGAA로 처치된 *Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} 마우스의 조직에서의 글리코겐의 정량화.**

처치군	대뇌	사두근
Wt 미처치	0.10±0.07	0.37±0.13
Gaa$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} 미처치 (*Tfrc*^{hum})	2.76±0.41	12.75±1.88
Gaa$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} 삽입 AAV 단독	2.17±0.40*	10.64±2.56
Gaa$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} 에피솜 AAV8 TTR 12847scfv:hGAA	0.13±0.03***§	2.44±2.21***§
Gaa$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} 삽입 12847scfv:hGAA	0.16±0.05***§	1.67±0.76***§
Gaa$^{-/-}$/*Cd63*^{hum} 미처치	2.34±0.30	11.91±1.01
Gaa$^{-/-}$/*Cd63*^{hum} 삽입 항 -CD63scfv:hGAA	1.71±0.20*	4.06±0.13**

[1261]

[1262] 모든 값은 글리코겐 μg/조직 mg, 평균 ±SD, 군당 n=3-8이다. 일원 ANOVA *p<0.01 대 *Gaa*$^{-/-}$/*Cd63*^{hum} 미처치군; **p<0.001 대 *Gaa*$^{-/-}$/*Cd63*^{hum} 미처치군; ***p<0.0001 대 *Gaa*$^{-/-}$/*Tfrc*^{hum} 미처치군; §유의하지 않음 대 *Wt* 미처치군.

[1263] 글리코겐 감소가 근육 기능 개선으로 해석되는지 여부를 평가하기 위해, 투여 후 시점에서 마우스를 그립 강도

장치에서 테스트한다. 사지 그립 강도를 힘 측정기(force meter)(Columbus Instruments, Columbus, OH, USA)로 측정한다. 모든 테스트를 3회 반복한다.

[1264] 요약하면, 간세포로부터 발현된 항-TfR:GAA 단백질은 마우스의 근육 세포와 CNS 세포에 성공적으로 전달되어, 항-TfR scFv의 우수한 근육 표적화 능력 및 혈액-뇌 장벽 횡단 능력을 입증하였다.

[1265] **실시예 5. 항체-올리고뉴클레오티드 접합체(AOC)의 전신 전달 후 표적 조직의 mRNA 녹다운**

[1266] 치료용 올리고뉴클레오티드의 근육- 및/또는 뇌-특이적 전달(예를 들어, 근육- 및/또는 뇌-특이적 전달)을 향상시키기 위해, 인간 트랜스페린 수용체(hTfR)를 표적으로 하는 항체를 개발하였다. 올리고뉴클레오티드(예를 들어, siRNA, ASO)를 이러한 항-hTfR 항체, 항체 변이체 및/또는 항체 단편에 접합하면 예컨대 다양한 질환 또는 장애, 예를 들어 본원에 기재된 근육 및/또는 신경 질환(들) 또는 장애(들)의 치료를 위해 다양한 조직에서 효율적인 유전자 녹다운 또는 엑손 스키핑(skipping)을 제공할 수 있다. 표 5-1은 본 실시예에서 테스트하기 위한 항-hTfR 항체 siRNA 접합체의 설명을 보여준다. 본원에 개시된 다양한 항-hTfR 항체 또는 이의 변이체 또는 단편(아래 표에서 "REGN hTfR Ab1" 및 "REGN hTfR Ab2"로서 예시됨) 중 어느 것이든 테스트될 수 있는 점에 유의해야 한다. 아래 표에 나열된 대조군 siRNA 접합체는 이러한 대조군들의 비제한적인 예일 뿐이다.

[1267] **표 5-1. 테스트용 항-hTfR 항체 siRNA 접합체**

[1268]

REGN ID	설명
REGN hTfR Ab1-M3463-siRNA1	siRNA 와 접합된 hTfR hIgG1 항체 1
REGN hTfR Ab2-M3463-siRNA1	siRNA 와 접합된 hTfR hIgG1 항체 2
아이소타입 대조군 Ab-M3463-siRNA1	siRNA 와 접합된 아이소타입 대조군 hIgG1 항체
대조군 Ab1-M3463-siRNA1	siRNA 와 접합된 아이소타입 대조군 rIgG2a 항체
대조군 Ab2-M3463-siRNA1	siRNA 와 접합된, 상이한 표적을 표적으로 하는 rIgG2a 항체

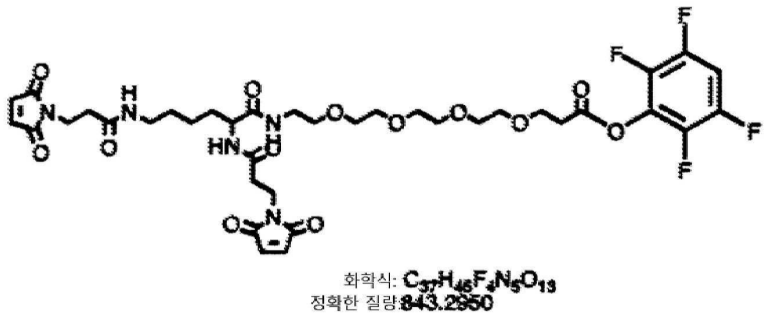
[1269] 표 5-2는 본원에 제시된 방법에 따라 테스트될 수 있는 항-hTfR 항체 siRNA 접합체의 구체적인 비제한적인 예를 제공한다.

[1270] **표 5-2. 항-hTfR 항체 siRNA 접합체의 비제한적 예**

[1271]

접합체
REGN17514 (H1H12847B)-M3463-siRNA1
REGN17512 (H1H12843B)-M3463-siRNA1
REGN17510 (H1H12839B)-M3463-siRNA1
REGN17508 (H1H12799B)-M3463-siRNA1
REGN17513 (H1H12845B)-M3463-siRNA1
REGN17708 (H1H12812B)-M3463-siRNA1

[1272] M3463은 본원에 기재된 항체 siRNA 접합체에서 사용될 수 있는 예시 링커이다. M3463의 구조를 아래 나타내었다(Broadpharm으로부터 구입, BP-22617).



[1273]

[1274] 항-hTfR 항체를 본원에 기재된 다양한 표적 중 어느 하나, 예를 들어 *DMPK, CNBP, 디스트로핀, DUX4, ApoE, MAPT, APP, HTT, SOD1, C9orf72, SNCA, LRRK2, PRNP, SLC5A1, SLC16A3, HDAC6, MMP27, MFAP5, FAM64A, BAIAP3, MYH7, TPM1, RBM20, KLHL24, MYL2* 또는 *TNNT2* 유전자 또는 이의 돌연변이체에 대해 siRNA와 접합시켜, 표적 유전자의 항체-올리고뉴클레오티드 접합체-표적화된 표적 유전자의 녹다운, 또는 마우스의 특정 조직, 예를 들어, 근육, 심장 및/또는 뇌에서 질환 특이적 대립유전자의 침묵을 테스트하였다.

[1275] 접합 반응은 2개의 단계로 구성된다: 제1 단계의 경우, 트랜스글루타미나아제 효소를 사용하여 항체에 N3(아지도 기)을 부가한다. 트랜스글루타미나아제 효소 작동을 위해, 아스파라긴(N297)을 아스파르트(D)로 변경함으로써 N297의 당 잔기를 제거한다. 제2 단계의 경우, 클릭 화학을 사용하여 siRNA를 접합한다.

[1276] 표적 유전자에 대한 siRNA(siRNA1)은 표적 유전자를 표적으로 하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 대조군 시약은 동일한 siRNA와 접합된 비표적 항체이고, 비교 분자는 siRNA와 접합된 상이한 표적 및 이의 관련 아이소타입 대조군에 대한 항체이다. 7주령 C57BL6 수컷 마우스에 음식물 제공을 유지하면서 꼬리 정맥에 PBS 또는 표 5-1의 항체 siRNA 접합체 약 0.1 내지 약 5.0 mg/kg을 주사한다. 군당 5마리의 마우스를 실험에 사용한다. 순환 항체를 검출하기 위한 채혈은 기준선(투여 1주일 전), 투여 후 2시간, 1일, 4일 및 7일째에 수행한다.

[1277] 주사 후 7일째, 마우스를 이소플루란으로 마취한 후 경추 탈골로 희생시킨다. 비복근, 전경골근, 비장근, 사두근, 횡격막, 뇌, 척수, 망막 및 말초신경(예를 들어, 대퇴신경)을 RNAlater에서 수집하고, 뿐만 아니라 심장, 간, 비장, 신장 및 폐도 수집한다. RNAlater에서 4시간 동안 그대로 둔 후, RNA 단리까지 샘플을 -20℃에서 동결시킨다.

[1278] *Fc ELISA* - 순환 항체 수준을 결정하기 위해, 고결합 96-웰 투명 플레이트(Thermo Scientific Pierce, 카탈로그 # 15041)를 인간 및 래트 IgG에 대한 항체(Jackson Immunoresearch, 카탈로그 # 109-005-098, 112-005-167)로 밤새 코팅한다. 플레이트를 세척하고, 차단하고, 다시 세척한 후, 앞서 기재된 채혈로부터의 희석 혈청 샘플과 항온처리한다. 플레이트를 다시 세척하고, 호스래디시 퍼옥시다아제와 접합된 인간 및 래트 IgG에 대한 항체와 항온처리한다. 플레이트를 세척하고 TMB 기질에 이어서, 황산으로 항온처리하여, 반응을 중단시키고, 그 후 450 nm 파장에서 광학 플레이트 판독기에서 판독한다.

[1279] *RNA 단리* - 자동화된 MagMax(Thermo Scientific) 프로토콜을 사용하여 RNAlater에서 샘플로부터 RNA를 정제한다.

[1280] *cDNA 합성/qPCR* - 250 ng - 1 μg의 RNA 샘플을 DNAse I(Thermo Scientific 카탈로그 # EN0521)로 처치한 후 SuperScript VILO Master Mix(Invitrogen 카탈로그 # 11755-050)를 사용하여 역전사한다. cDNA를 뉴클레아제 미함유 H_2O로 10배 희석한 후 qPCR로 검정한다. TaqMan 검정을 이용하여 QuantStudio 6 Flex System(Applied Biosystems)에서 TaqMan Gene Expression Master Mix(Applied Biosystems, 카탈로그 # 4369106)를 사용하여 표적 유전자의 발현을 결정한다.

[1281] **실시예 6. 트랜스페린(TfR) 항체에 대한 에피토프 맵핑**

[1282] 수소-중수소 교환 질량 분석법(HDX-MS)을 수행하여 항-트랜스페린 수용체(TfR) 항체의 결합에 관여하는 마우스 및 인간 트랜스페린(m/hTfR)의 영역을 기술하였다. 테스트된 항-TfR 단클론 항체는 **표 6-1**에 기재되어 있다. 사용된 시약과 해당 로트 번호는 **표 6-2**에 제시되어 있다.

[1283] **표 6-1. 테스트된 단클론 항체 클론**

REGN#	AbPID	로트#
REGN17507	H1H12798B	L1
REGN17508	H1H12799B	L1
REGN17509	H1H12835B	L1
REGN17510	H1H12839B	L1
REGN17511	H1H12841B	L1
REGN17512	H1H12843B	L1
REGN17513	H1H12845B	L1
REGN17514	H1H12847B	L1
REGN17515	H1H12848B	L1
REGN17516	H1H12850B	L1
REGN17517	H1H31874B	L1

[1284]

[1285] **표 6-2. 사용된 시약 및 로트 번호**

REGN#	로트 #	설명
REGN2120	03-121015	hTfR(C89-F763).mmh
REGN2431	L1	hmm.hTfR(C89-F763)

[1286]

[1287] HDX-MS 방법의 일반 설명은 예를 들어 문헌 [Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259; and Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A]에 제시되어 있다. 실험을 Q Exactive HF 질량 분석기(Thermo Fisher Scientific, MA)와 결합된 맞춤형 HDX 자동화 시스템(NovaBioAssays, MA)에서 수행하였다.

[1288] PBS-D_2O 완충액을 100 mL 99.9% D_2O에 PBS 정제 하나를 용해시켜 10 mM 소듐 포스페이트, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, pD 7.0(25℃에서 pH 7.4에 해당)의 용액을 형성하여 제조하였다. 중수소 교환을 개시하기 위해, 10 μL의 단백질 샘플(hTfR 단독 또는 앞서 나열된 단클론 mAb(예를 들어, **표 6-1** 참고) 중 하나와 혼합된 hTfR)을 90 μL PBS-D_2O 완충액으로 희석하였다. 5분 또는 10분 후, 중수소 교환을 100 μL 퀀칭 완충액(0.5 M TCEP, 4 M 구아니딘 하이드로클로라이드, pH 2.08)을 첨가하여 퀀칭한 후, 20℃에서 90초 항온처리하였다. 퀀칭한 샘플을 수중 0.1% 포름산 100 μL/분으로 실온에서 온라인 펩신/프로테아제 XIII 컬럼(NovaBioAssays, MA)에 의해 분해시켰다. 소화성 펩티드를 ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 VanGuard Pre-column(2.1 x 5 mm, Waters, MA)으로 포집하고, -5℃에서 ACQUITY UPLC Peptide BEH C18 컬럼(2.1 x 50 mm, Waters, MA)으로 추가로 분리하였고, 이는 이동상으로서 수 중 0.1% 포름산 및 아세토니트릴 중 0.1% 포름산을 200 μL/분으로 10분 또는 15분 구배를 사용하였다. 용출된 펩티드를 LC-MS/MS 또는 LC-MS 모드에서 질량 분석기로 분석하였다.

[1289] 중수소화되지 않은 샘플 세트를 PBS-H_2O 완충액에서 제조하고 앞서 기재된 방법으로 분석하여 펩티드 서열을 확인하고 중수소 교환 없이 펩티드 질량을 결정하였다. 중수소화되지 않은 샘플의 LC-MS/MS 데이터를 비특이적 효소 분해에 대한 매개변수로 Byonic 검색 엔진(Protein Metrics, CA)을 사용하여 hTfR, 펩신 및 프로테아제 XIII의 서열을 포함하는 데이터베이스에 대해 검색하였다. 그 후, 확인된 펩티드 목록을 모든 중수소화 샘플의 LC-MS 데이터와 함께 HDExaminer 소프트웨어(Sierra Analytics, CA)에서 불러와서 hTfR 유래의 개별 펩티드의 중수소 흡수 백분율(D%)을 계산하였다. 중수소 흡수의 차이를 ΔD% = hTfR-mAb의 D% - hTfR의 D%로서 계산하였다. ΔD% < -5%(|ΔD| > 5% 및 ΔD% < 0과 동일, 2회 반복 평균)인 경우 차이가 유의미한 것으로 간주하였다. 소프트웨어에 의한 D% 계산에 올바른 동위원소 패턴이 사용되었는지를 확실히 하기 위해 유의미한 차이를 나타내는 펩티드의 질량 스펙트럼을 수동으로 조사하였다.

[1290] 시약 가용성과 항체 특이성의 이유로 두 가지 TfR 단백질 구축물을 HDX-MS 실험에 사용하였다: hTfR(C89-F763).mmh 및 hmm.hTfR(C89-F763). HDX 데이터를 mmh 태그가 있는 hTfR의 아미노산의 88%-95%에서 얻었다. 아래 목록의 각각의 아미노산 서열 앞에 제공된 숫자 범위는 나타낸 항체에 의해 보호되는 hTfR의 아미노산(aa) 잔기 위치를 나타낸다. 이러한 아미노산 잔기 위치는 hTfR의 항체 결합 부위를 나타내며 이들 간의 잔기 수준의 접촉을 제공하지 않는다. HDX-MS 기술의 본질로 인해, HDX-MS로 얻은 영역은 X선 결정학 및 극저온 전자 현미경 방법과 같은 고해상도 구조 연구에 의해 결정된 실제 접촉보다 크거나 작을 수 있다.

[1291] REGN17507(H1H12798B)은 hTfR의 다음 영역을 보호한다:

[1292] 146-167 LLNENSYVPREAGSQKDENLAL(서열번호 507);

[1293] 281-295 IYMDQTKFPIVNAEL(서열번호 508); 및

[1294] 572-576 TYKEL(서열번호 509).

[1295] REGN17508(H1H12799B)은 hTfR의 다음 영역을 보호한다:

[1296] 128-146 KRKLSEKLDSTDFTGTIKL(서열번호 510);

[1297] 503-522 YTLIEKTMQNVKHPVTGQFL(서열번호 511); 및

[1298] 576-592 LIERIPELNKVARAAAE(서열번호 512).

[1299] REGN17509(H1H12835B)는 hTfR의 다음 영역을 보호한다:

[1300] 147-165 LNENSYVPREAGSQKDENL(서열번호 513).

[1301] REGN17510(H1H12839B)은 hTfR의 다음 영역을 보호한다:

[1302] 238-246 GTKKDFEDL(서열번호 514).

[1303] REGN17511(H1H12841B)은 hTfR의 다음 영역을 보호한다:

[1304] 199-224 SVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSK(서열번호 515).

[1305] REGN17512(H1H12843B)는 hTfR의 다음 영역을 보호한다:

[1306] 146-164 LLNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 516);

[1307] 284-295 DQTKFPIVNAEL(서열번호 517); 및

[1308] 572-585 TYKELIERIPELNK(서열번호 518).

[1309] REGN17513(H1H12845B)은 hTfR의 다음 영역을 보호한다:

[1310] 199-222 SVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAY(서열 번호 519).

[1311] REGN17514(H1H12847B)는 hTfR의 다음 영역을 보호한다:

[1312] 146-164 LLNENSYVPREAGSQKDEN(서열번호 516); 및

[1313] 572-585 TYKELIERIPELNK(서열번호 518).

[1314] REGN17515(H1H12848B)는 hTfR의 다음 영역을 보호한다:

[1315] 281-295 IYMDQTKFPIVNAEL(서열번호 508); 및

[1316] 346-365 FGNMEGDCPSDWKTDSTCRM(서열 번호 520).

[1317] REGN17516(H1H12850B)은 hTfR의 다음 영역을 보호한다:

[1318] 146-167 LLNENSYVPREAGSQKDENLAL(서열번호 507);

[1319] 212-232 LVENPGGYVAYSKAATVTGKL(서열번호 522);

[1320] 281-297 IYMDQTKFPIVNAELSF(서열번호 523);

[1321] 337-345 ISRAAAEKL(서열번호 524);

[1322] 366-383 VTSESKNVKLTVSNVLKE(서열번호 525); 및

[1323] 557-572 FCEDTDYPYLGTTMDT(서열 번호 526)

[1324] REGN17517(H1H31874B)은 hTfR의 다음 영역을 보호한다:

[1325] 243-246 FEDL(서열 번호 521).

[1326] 앞서 나열된 항-TfR 항체에 의해 보호된 hTfR의 최소 아미노산 서열(즉, 최소 에피토프 서열), 각각의 항체에

의해 보호되는 hTfR의 아미노산(aa) 잔기 위치를 나타내는 수치 범위, 뿐만 아니라 각각의 최소 에피토프의 입체구조 또는 선형 특성은 표 6-3에 기재되어 있다. 각각의 최소 에피토프는 최소 에피토프 서열 내의 하나 이상의 아미노산 잔기에서 이의 상응하는 항체에 의해 결합된다.

[1327] **표 6-3. 항-TfR 항체로 보호되는 hTfR의 최소 에피토프 서열**

항체 ID	에피토프 번호	부류	아미노산 잔기 위치	아미노산 서열	서열 번호
REGN17507 (H1H12798B)	1	입체구조	146-149	LLNE	529
REGN17507 (H1H12798B)	2	입체구조	572-576	TYKEL	509
REGN17508 (H1H12799B)	1	입체구조	136-143	DSTDFTGT	530
REGN17508 (H1H12799B)	2	입체구조	513-521	VKHPVTGQF	531
REGN17508 (H1H12799B)	3	입체구조	577-583	IERIPEL	532
REGN17509 (H1H12835B)	1	선형	147-164	LNENSYVPREAGSQKDEN	533
REGN17510 (H1H12839B)	1	선형	243-246	FEDL	521
REGN17511 (H1H12841B)	1	선형	202-209	IVDKNGRL	534
REGN17512 (H1H12843B)	1	입체구조	146-149	LLNE	529
REGN17512 (H1H12843B)	2	입체구조	572-576	TYKEL	509
REGN17513 (H1H12845B)	1	선형	202-211	IVDKNGRLVY	535
REGN17514 (H1H12847B)	1	입체구조	146-149	LLNE	529
REGN17514 (H1H12847B)	2	입체구조	572-576	TYKEL	509
REGN17515 (H1H12848B)	1	선형	284-288	DQTKF	536
REGN17516 (H1H12850B)	1	입체구조	212-218	LVENPGGY	537
REGN17516 (H1H12850B)	2	입체구조	289-297	PIVNAELSF	538
REGN17516 (H1H12850B)	3	입체구조	564-572	PYLGTTMDT	539
REGN17517 (H1H31874B)	1	선형	243-246	FEDL	521

[1328]

[1329] hTfR의 세포외 단위는 구조적으로 나선형 도메인, 프로테아제 유사 도메인 및 정점 도메인(apical domain)(PDB 1SUV)의 세 가지 도메인으로 분류된다.

[1330] TfR 결합 부위를 확인한 다양한 분자와 복합체를 이루는 TfR의 구조적 연구는 *맘마레나바이러스 마추포엔세* GP1 단백질(PDB 3KAS), 개 파보바이러스(PDB 2NSU), 인간 페리틴(PDB 6GSR), *플라스모듐 비박스 Sal-1* PvRBP2b(PDB 6D04), 인간 HFE 단백질(PDB 1DE4), 인간 트랜스페린(PDB 1SUV) 등을 포함한다. **도 8**은 단일 TfR 분자 위에 중첩된 앞서 나열된 분자의 상호작용을 도시한다.

[1331] HDX-MS 실험에서 테스트된 항체에 대한 HDX 보호는 **도 9**에 도시된 바와 같이 TfR(PDB 1SUV)의 5개 영역에 할당될 수 있다.

[1332] 본 실시예의 데이터의 표 형태 요약은 **표 6-4** 내지 **표 6-8**에 기재되어 있다. **도 10-14**는 아래 표에 해당한다.

[1333] **표 6-4. TfR 정점 도메인의 HDX 보호를 보여주고 *맘마레나바이러스 마추포엔세* GP1, 개 파보바이러스, 인간 페리틴 및 *플라스모듐 비박스 Sal-1* PvRBP2b 결합 부위와 중첩하는 항체.**

항체	REGN#	항원	중수소%의 유의미한 변화가 있는 m/hTfR 잔기	서열 커버리지
H1H12841B	REGN17511	hTfR.mmh	199-224 SVIIVDKNGRLVYLVENPGG YVAYSK (서열번호 515)	~92.9%
H1H12845B	REGN17513	hmm.hTfR	199-222 SVIIVDKNGRLVYLVENPGG YVAY (서열번호 519])	~88.1%

[1334]

[1335] 표 6-5. 표 6-3에 나열된 다른 TfR 결합 파트너에 의해 공유되지 않는 TfR 정점 도메인에서 HDX 보호를 갖는 항체

항체	REGN#	항원	중수소%의 유의미한 변화가 있는 m/hTfR 잔기	서열 커버리지
H1H31874B	REGN17517	hTfR.mmh	243-246 FEDL (서열번호 521)	~92.9%
H1H12839B	REGN17510	hmm.hTfR	238-246 GTKKDFEDL (서열번호 514)	~88.3%

[1336]

[1337] 표 6-6. 인간 페리틴 및 *플라스모듐 비박스 Sal-1* PvRBP2b와 결합 부위를 공유하는 TfR 정점 도메인의 HDX 보호를 갖는 항체

항체	REGN#	항원	중수소%의 유의미한 변화가 있는 m/hTfR 잔기	서열 커버리지
H1H12848B	REGN17515	hTfR.mmh	281-295 IYMDQTKFPIVNAEL (서열번호 508) 346-365 FGNMEGDCPSDWKTDSTC RM (서열번호 520)	~92.9%
H1H12850B	REGN17516	hTfR.mmh	146-167 LLNENSYVPREAGSQKDEN LAL (서열번호 507) 212-232 LVENPGGYVAYSKAATVTG KL (서열번호 522) 281-297 IYMDQTKFPIVNAELSF (서열번호 523) 337-345 ISRAAAEKL (서열번호 524) 366-383 VTSESKNVKLTVSNVLKE (서열번호 525) 557-572 FCEDTDYPYLGTTMDT (서열번호 526)	~92.9%

[1338]

[1339] 표 6-7. *플라스모듐 비박스 Sal-1* PvRBP2b와 결합 부위를 공유하고 TfR 프로테아제-유사 도메인에서 HDX 보호를 갖는 항체

항체	REGN#	항원	중수소%의 유의미한 변화가 있는 m/hTfR 잔기	서열 커버리지
H1H12798B	REGN17507	hmm.hTfR	146-167 LLNENSYVPREAGSQKDENLAL (서열번호 507) 281-295 IYMDQTKFPIVNAEL (서열번호 508) 572-576 TYKEL (서열번호 509)	~87.0%
H1H12843B	REGN17512	hmm.hTfR	146-164 LLNENSYVPREAGSQKDEN (서열번호 516) 284-295 DQTKFPIVNAEL (서열번호 517) 572-585 TYKELIERIPELNK (서열번호 518)	~88.3%
H1H12847B	REGN17514	hmm.hTfR	146-164 LLNENSYVPREAGSQKDEN (서열번호 516) 572-585 TYKELIERIPELNK (서열번호 518)	~88.1%
H1H12835B	REGN17509	hTfR.mmh	147-165 LNENSYVPREAGSQKDENL (서열번호 513)	~92.9%

[1340]

[1341] **표 6-8. TfR 프로테아제 유사 도메인에서 HDX 보호를 갖는 항체. 이 영역은 표 6-6에 나열된 다른 TfR 상호작용 분자에 의해 활용되지 않는다.**

항체	REGN#	항원	중수소%의 유의미한 변화가 있는 m/hTfR 잔기	서열 커버리지
H1H12799B	REGN17508	hmm.hTfR	128-146 KRKLSEKLDSTDFTGTIKL (서열번호 510) 503-522 YTLIEKTMQNVKHPVTGQFL (서열번호 511) 576-592 LIERIPELNKVARAAAE (서열번호 512)	~88.7%

[1342]

[1343] 참고문헌

1. Ehring (1999) Analytical Biochemistry 267(2):252-259

2. Engen and Smith (2001) Anal. Chem. 73:256A-265A

[1344]

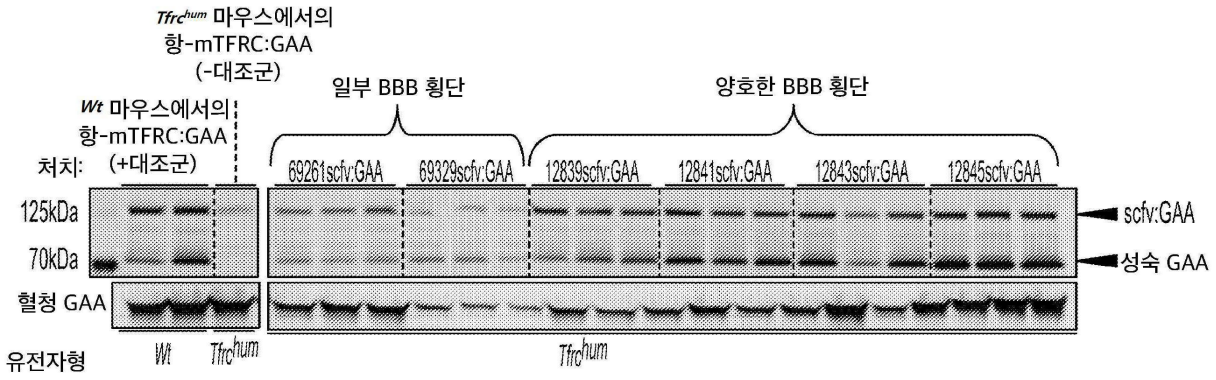
[1345] *********

[1346] 본원에서 인용된 모든 참고문헌은, 각각의 개별 간행물, 데이터베이스 항목(예를 들어, Genbank 서열 또는 GeneID 항목), 특허 출원 또는 특허가 구체적으로 그리고 개별적으로 참고문헌으로 원용됨을 나타낸 바와 동일한 수준으로 참고문헌으로 원용된다. 참고문헌 원용에 대한 이러한 서술은 각각의 모든 개별 간행물, 데이터베이스 항목(예를 들어, Genbank 서열 또는 GeneID 항목), 특허 출원 또는 특허에 관련되도록 출원인에 의해 의도된 것으로, 이들 각각은, 상기 인용이 참고문헌 원용의 전용 서술에 바로 인접하지 않은 경우라도 명확하게 식별된다. 참고문헌 원용의 전용 서술이, 만약 명세서 내에 있더라도, 이는 참고문헌 원용에 대한 이러한 일반적

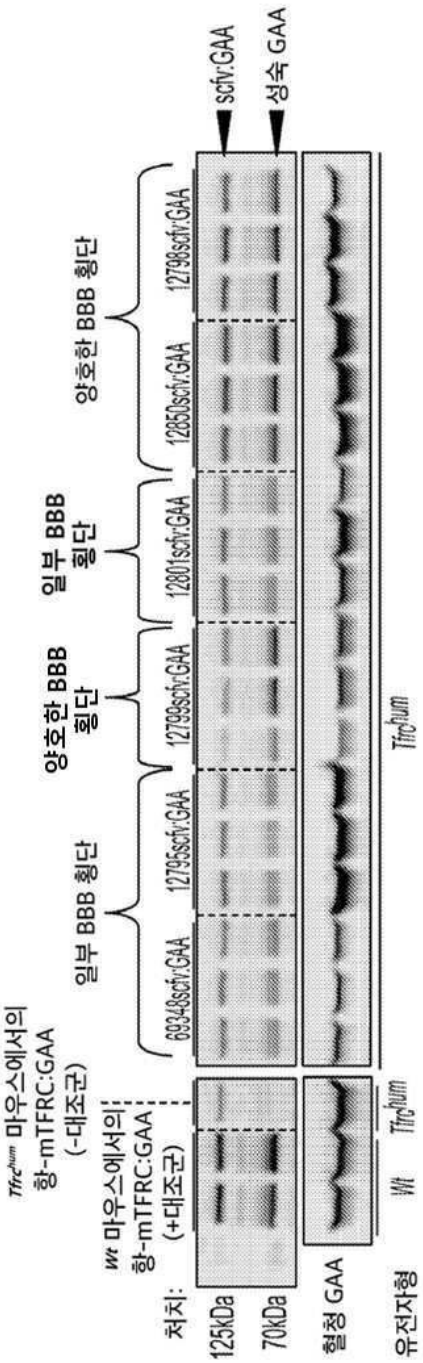
인 서술을 어떤 식으로든 약화시키지 않는다. 본원에서 참고문헌의 인용은 해당 참고문헌이 적절한 선행 기술임을 인정하는 것으로 의도되지 않을뿐 아니라 이들 간행물 또는 문서의 내용이나 날짜에 대한 어떠한 인정도 구성하지 않는다.

도면

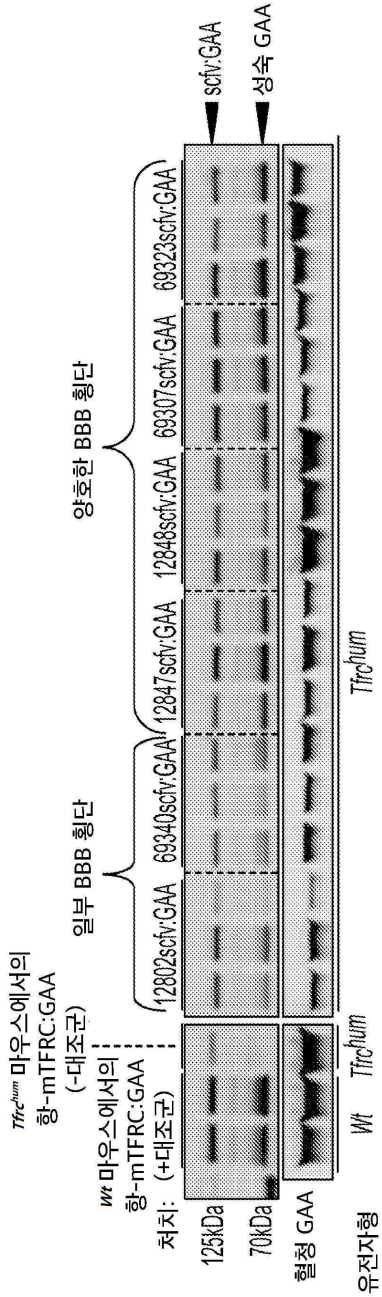
도면1a



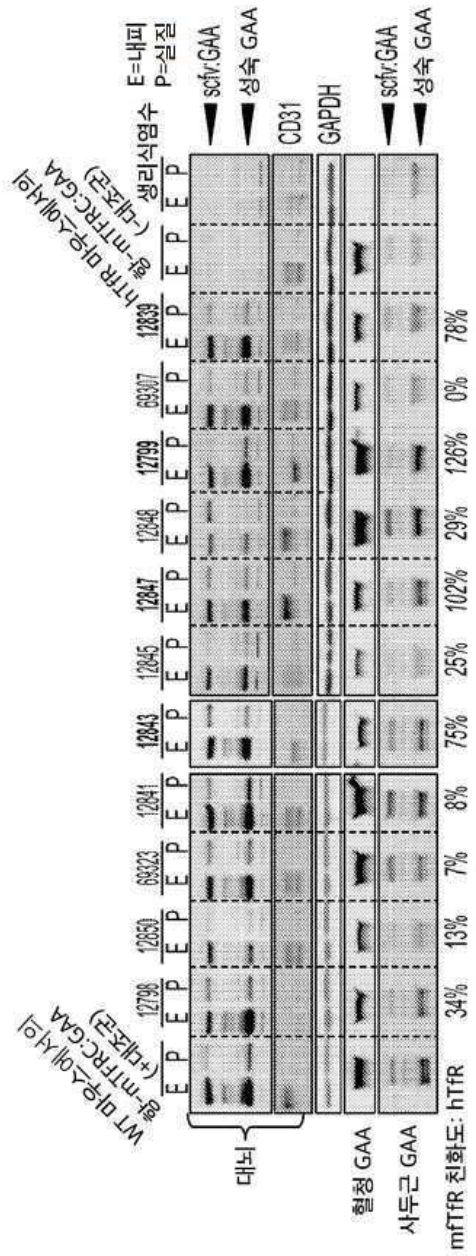
도면1b


scfv:GAA
성숙 GAA
양호한 BBB 횡단
일부 BBB 횡단
양호한 BBB 횡단
일부 BBB 횡단
12798scfv:GAA
12850scfv:GAA
12801scfv:GAA
12799scfv:GAA
12795scfv:GAA
69348scfv:GAA
Trc^hum 마우스에서의 항-mTFRC:GAA (-대조군)
wt 마우스에서의 항-mTFRC:GAA (+대조군)
처치:
125kDa
70kDa
혈청 GAA
유전자형
wt
Trc^hum

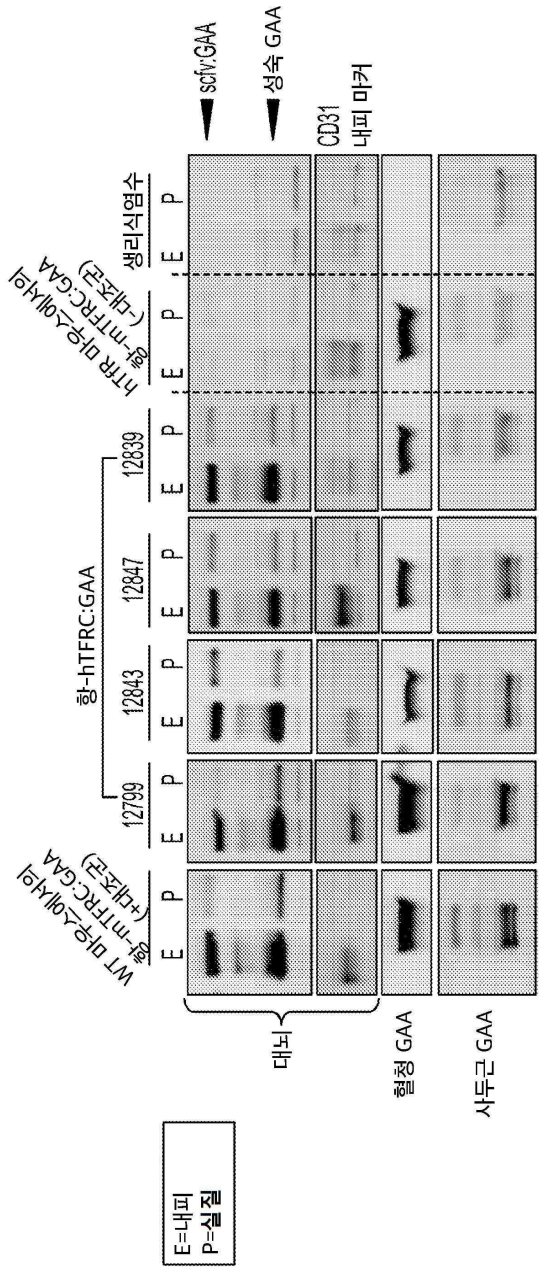
도면1c


Tfrchum 마우스에서의
항-mTFRC:GAA
(-대조군)
wt 마우스에서의
항-mTFRC:GAA
(+대조군)
처치:
125kDa
70kDa
혈청 GAA
유전자형
Wt
Tfrchum
일부 BBB 횡단
양호한 BBB 횡단
12802scfv:GAA
69340scfv:GAA
12847scfv:GAA
12848scfv:GAA
69307scfv:GAA
69323scfv:GAA
scfv:GAA
성숙 GAA
Tfrchum

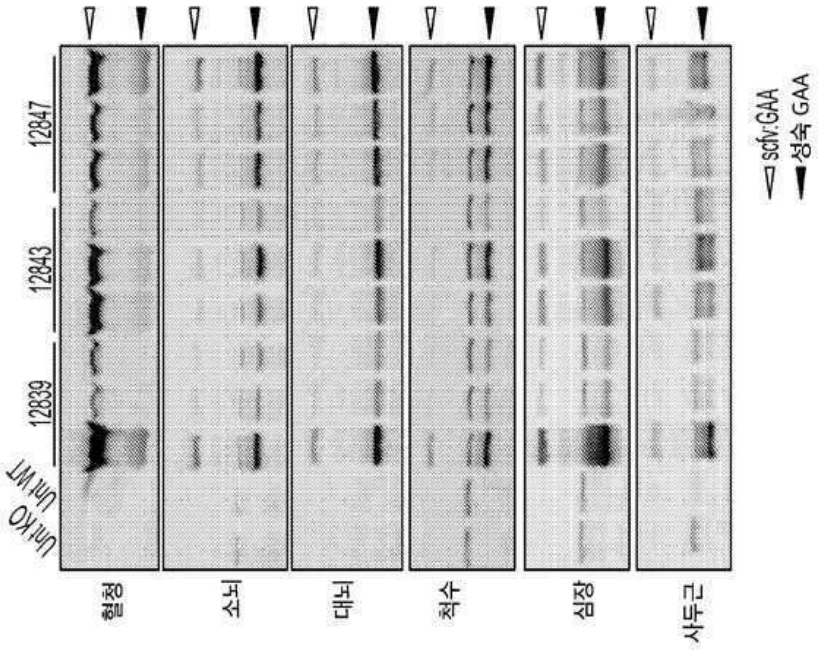
도면2


WT 마우스에서의 hTfR-mTfRC:GAA (+대조군)
hTfR 마우스에서의 hTfR-mTfRC:GAA (-대조군)
생리식염수
E=내피
P=실질
scfv.GAA
성숙 GAA
CD31
GAPDH
scfv.GAA
성숙 GAA
대뇌
혈청 GAA
사두근 GAA
mfTfR 친화도: hTfR
12798 12850 69323 12841 12843 12845 12847 12848 12799 69307 12839
34% 13% 7% 8% 75% 25% 102% 29% 126% 0% 78%

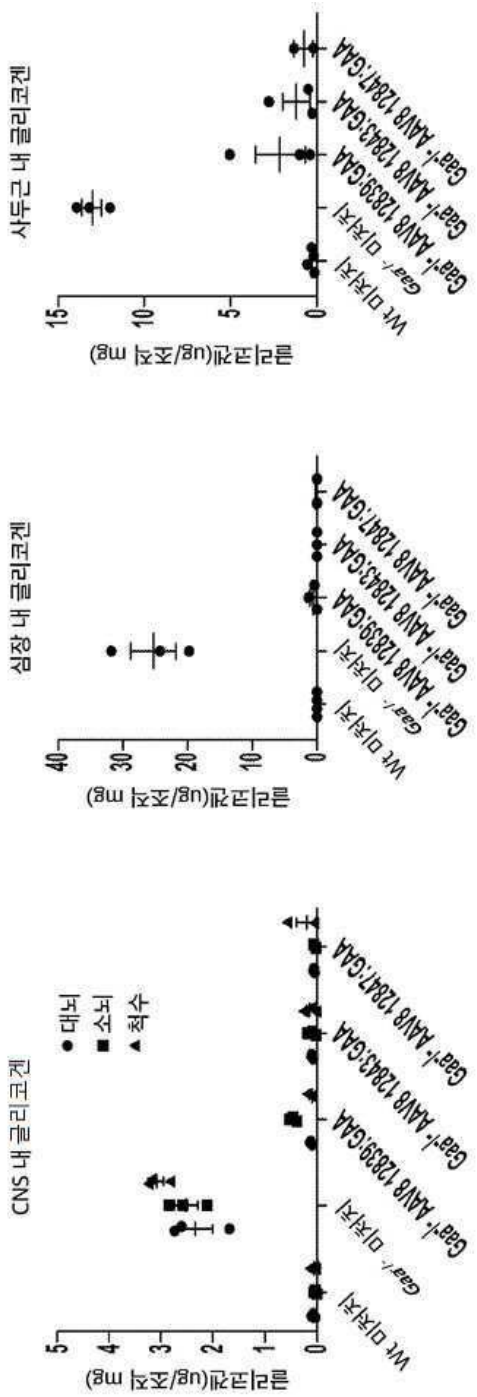
도면3


scfv:GAA
성숙 GAA
CD31
내피 마커
생리식염수
hTfR 마우스에서의 항-mTfRC:GAA (+대조군)
WT 마우스에서의 항-mTfRC:GAA (-대조군)
항-hTFRC:GAA
12799
12843
12847
12839
E
P
E=내피
P=실질
대뇌
혈청 GAA
사두근 GAA

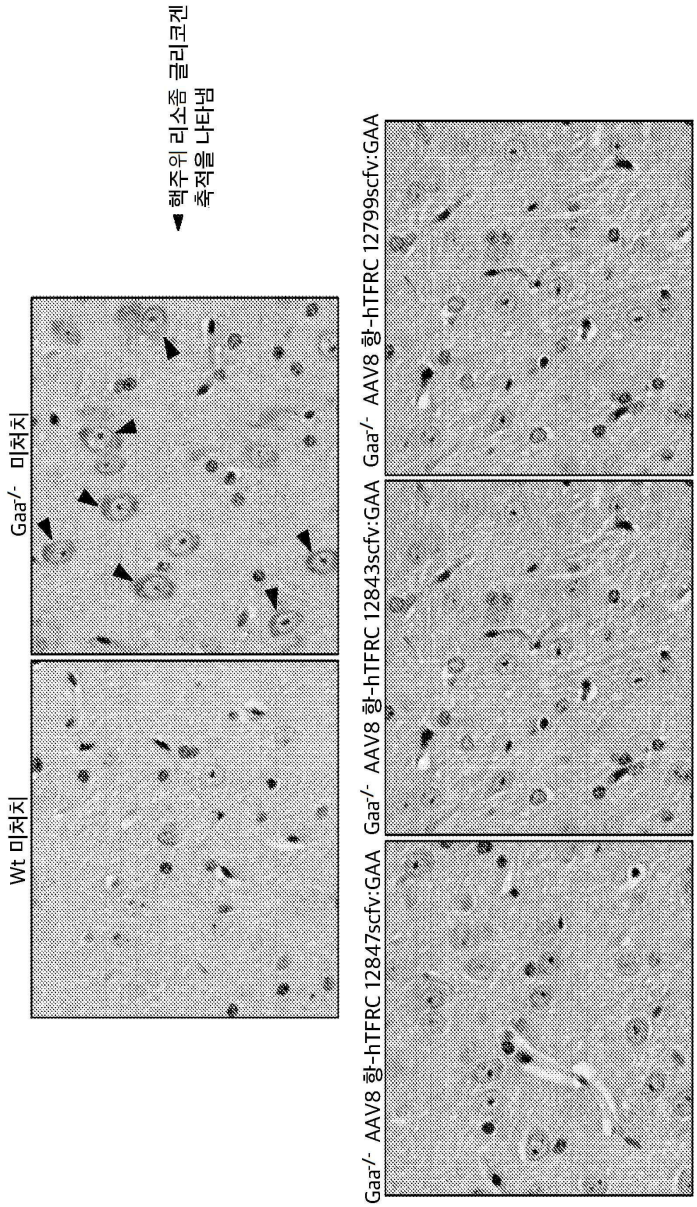
도면4


12847
12843
12839
Unc KO
Unc WT
혈청
소뇌
대뇌
척수
심장
사두근
scfv:GAA
성숙 GAA

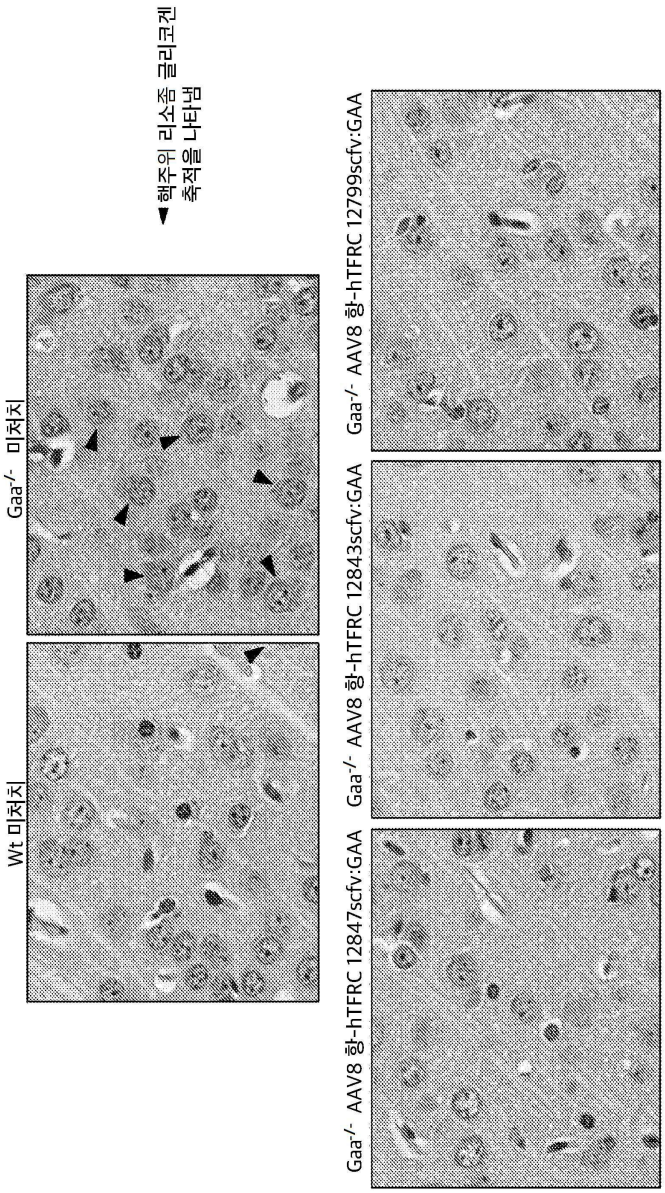
도면5


CNS 내 글리코겐
● 대뇌
■ 소뇌
▲ 척수
글리코겐(ug/조직 mg)
0
1
2
3
4
5
Wt 미처치
Gaa-/- 미처치
Gaa-/- AAV8 1283;GAA
Gaa-/- AAV8 1284;GAA
Gaa-/- AAV8 1284;7;GAA
심장 내 글리코겐
글리코겐(ug/조직 mg)
0
10
20
30
40
Wt 미처치
Gaa-/- 미처치
Gaa-/- AAV8 1283;GAA
Gaa-/- AAV8 1284;GAA
Gaa-/- AAV8 1284;7;GAA
사두근 내 글리코겐
글리코겐(ug/조직 mg)
0
5
10
15
Wt 미처치
Gaa-/- 미처치
Gaa-/- AAV8 1283;GAA
Gaa-/- AAV8 1284;GAA
Gaa-/- AAV8 1284;7;GAA

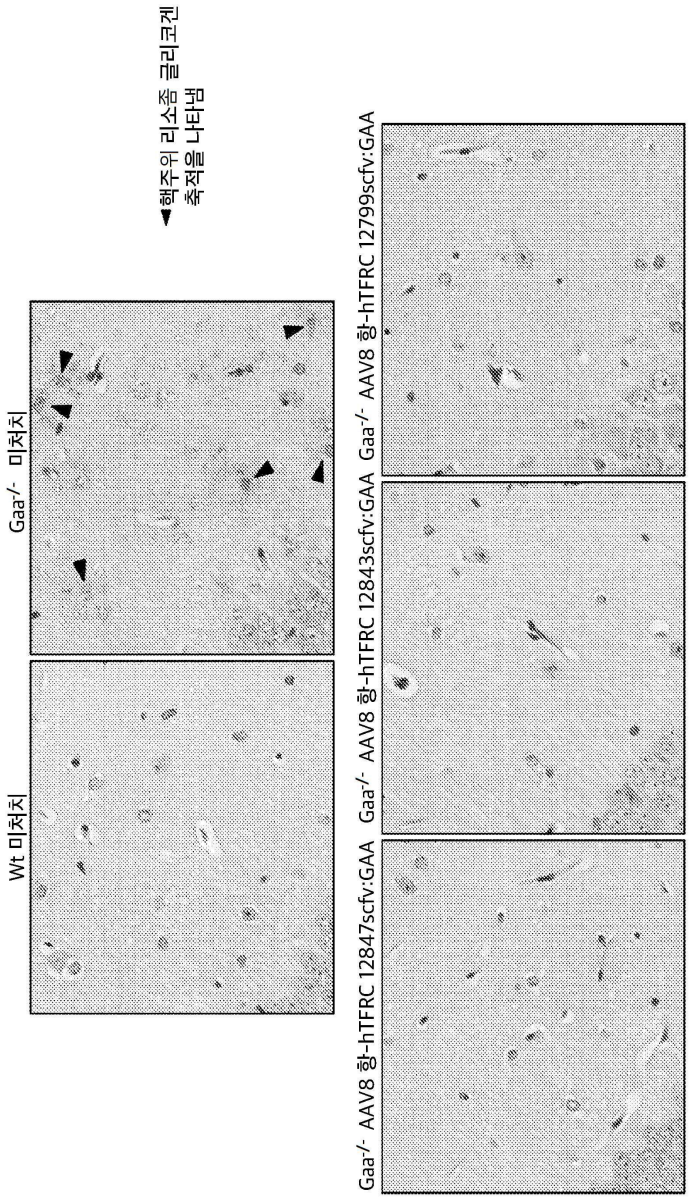
도면6a


핵주위 리소좀 글리코겐
축적을 나타냄
Wt 미처치
Gaa-/- 미처치
Gaa-/- AAV8 항-hTFRC 12847scfv:GAA
Gaa-/- AAV8 항-hTFRC 12843scfv:GAA
Gaa-/- AAV8 항-hTFRC 12799scfv:GAA

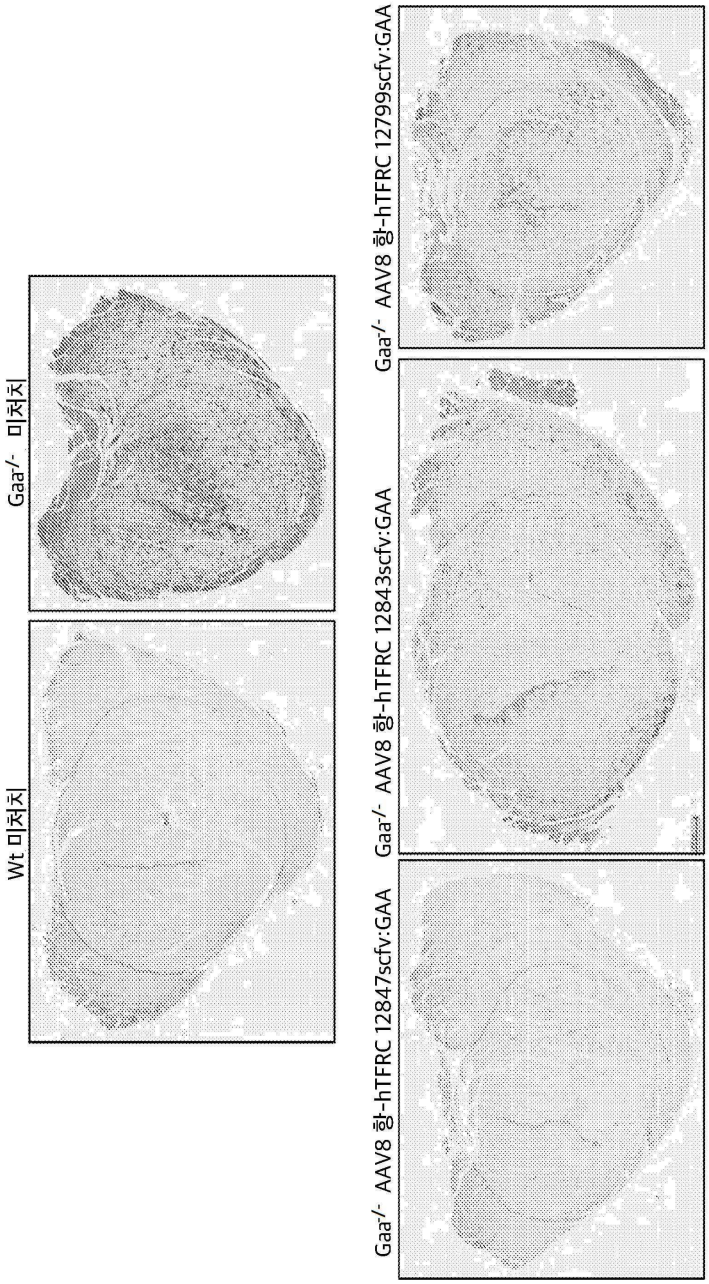
도면6b


Wt 미처치
Gaa-/- 미처치
▼ 핵주위 리소좀 글리코겐 축적을 나타냄
Gaa-/- AAV8 항-hTFRC 12847scfv:GAA
Gaa-/- AAV8 항-hTFRC 12843scfv:GAA
Gaa-/- AAV8 항-hTFRC 12799scfv:GAA

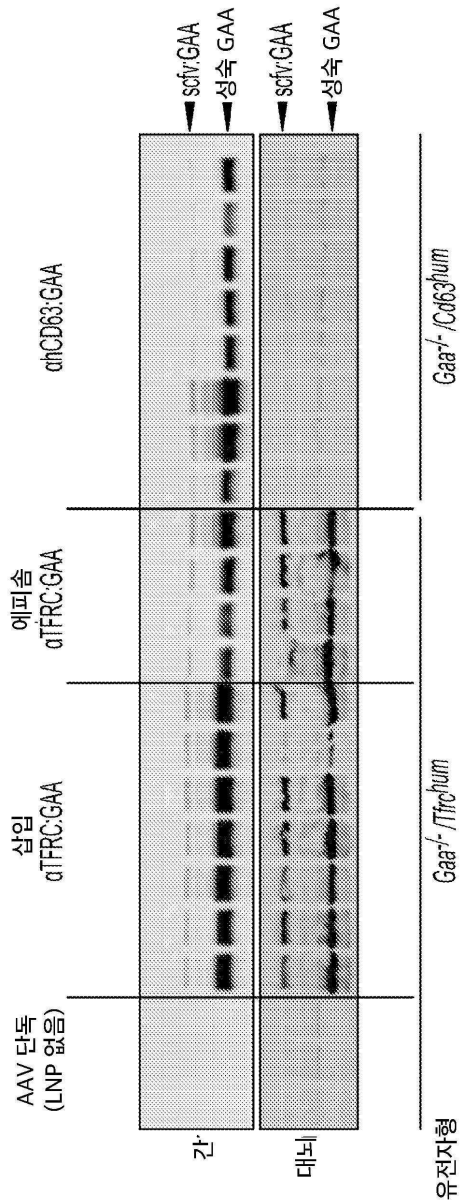
도면6c


Wt 미처치
Gaa-/- 미처치
◀핵주위 리소좀 글리코겐
축적을 나타냄
Gaa-/- AAV8 항-hTFRC 12847scfv:GAA
Gaa-/- AAV8 항-hTFRC 12843scfv:GAA
Gaa-/- AAV8 항-hTFRC 12799scfv:GAA

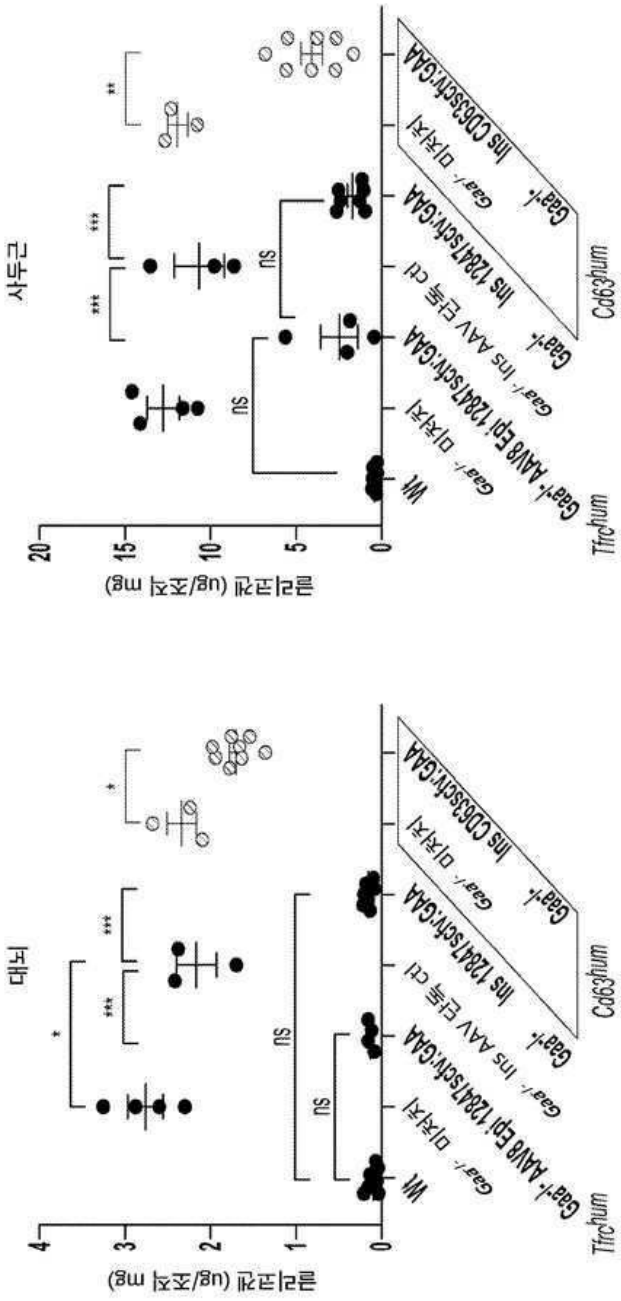
도면6d


Wt 미처치
Gaa-/- 미처치
Gaa-/- AAV8 항-hTFRC 12847scfv:GAA
Gaa-/- AAV8 항-hTFRC 12843scfv:GAA
Gaa-/- AAV8 항-hTFRC 12799scfv:GAA

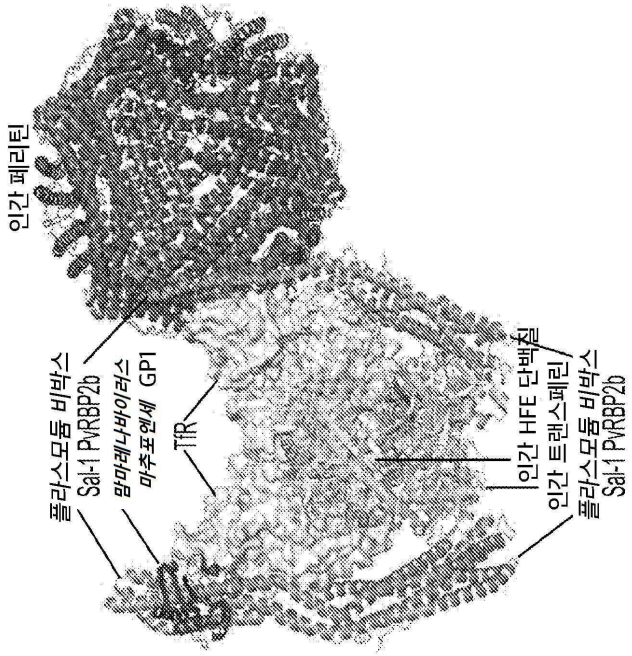
도면7a


scfv:GAA
성숙 GAA
scfv:GAA
성숙 GAA
AAV 단독
(LNP 없음)
삽입
αTFRC:GAA
에피솜
αTFRC:GAA
αhCD63:GAA
간
대뇌
Gaa-/- /Tfrchum
Gaa-/- /Cd63hum
유전자형

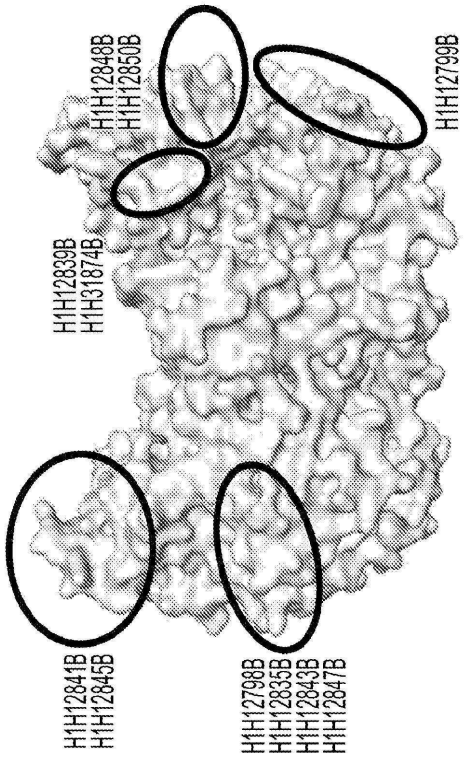
도면7b


사두근
대뇌
글리코겐 (ug/조직 mg)
Tfrc hum
Cd63 hum
Wt
Gaa-/-
Gaa-/- 미처치
Gaa-/- AAV8 Ex1 1264T Sctv.GAA
Gaa-/- ins AAV 단독 대
Gaa-/- ins 1264T Sctv.GAA
Gaa-/- 미처치
Gaa+/+
Gaa+/+ ins CD63 Sctv.GAA
ns
su
*
**
***

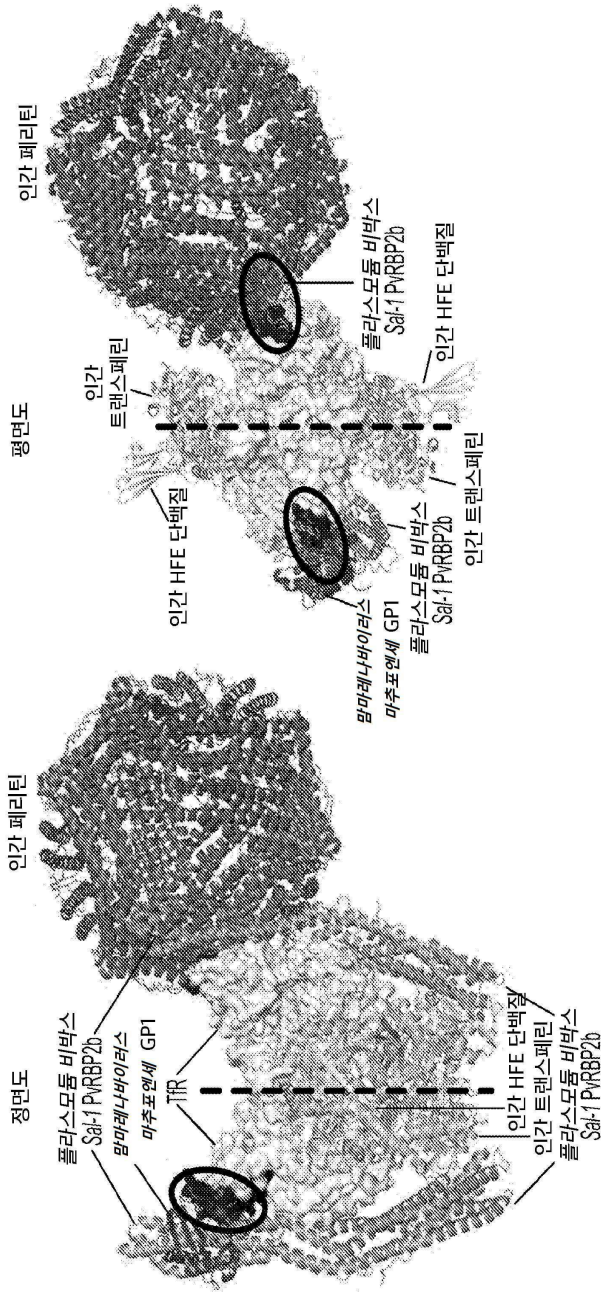
도면8


인간 페리틴
플라스모듐 비박스
Sal-1 PvRBP2b
말라레나바이러스
마추포엔세 GP1
TfR
인간 HFE 단백질
인간 트랜스페린
플라스모듐 비박스
Sal-1 PvRBP2b

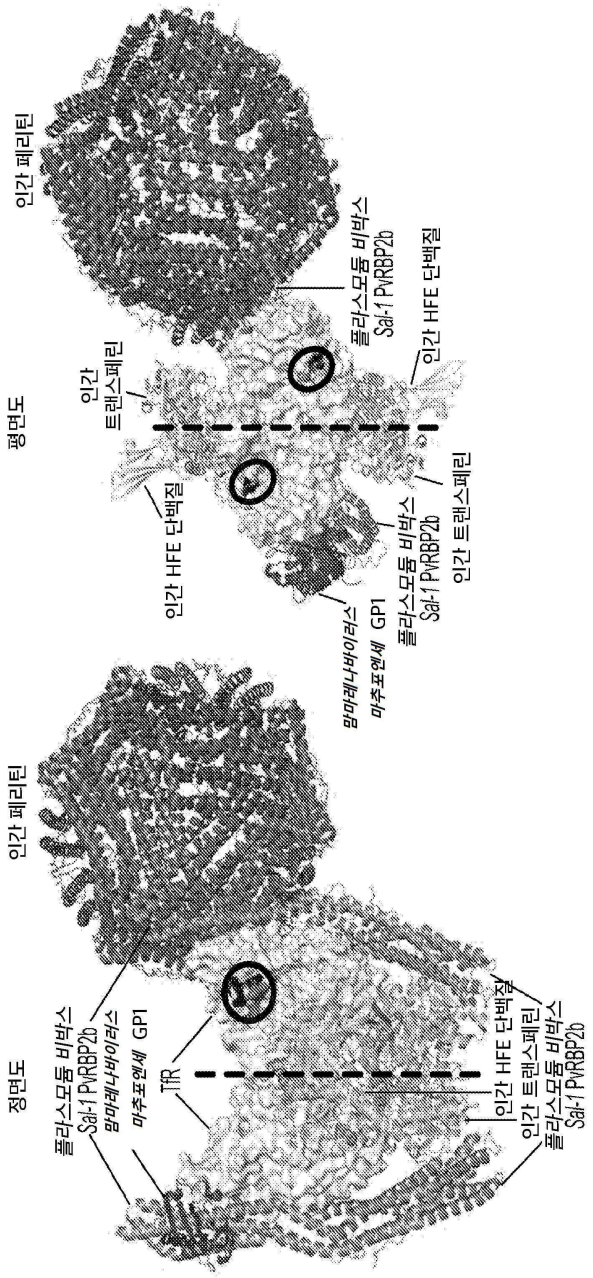
도면9


H1H12848B
H1H12850B
H1H12799B
H1H12839B
H1H31874B
H1H12841B
H1H12845B
H1H12798B
H1H12835B
H1H12843B
H1H12847B

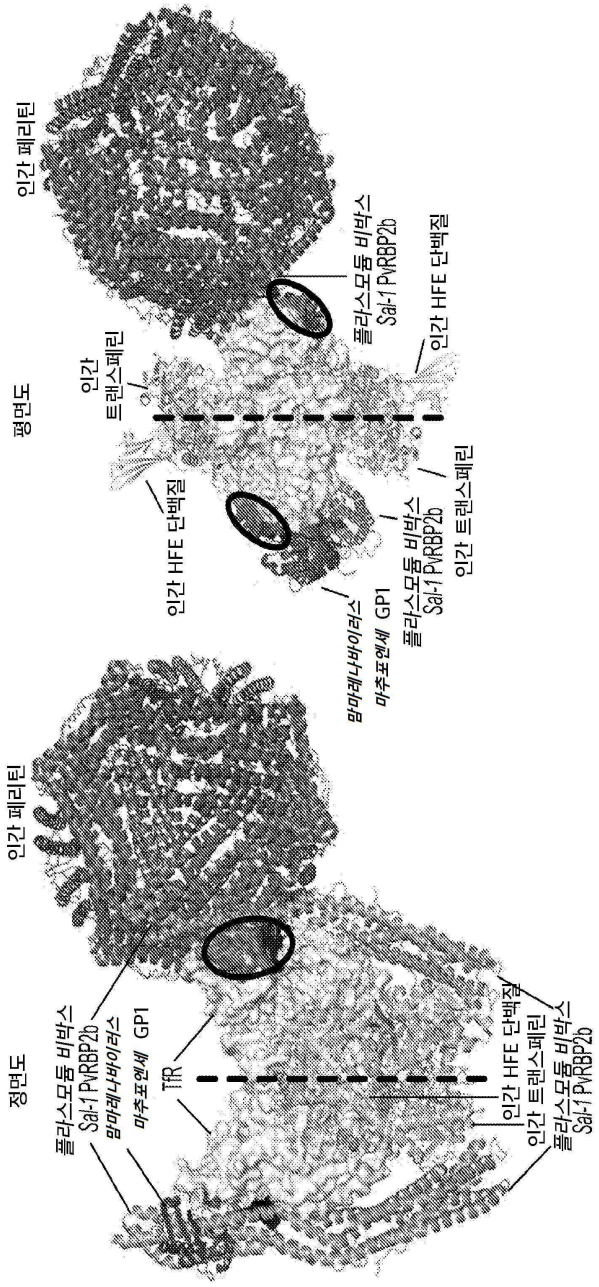
도면10


인간 페리틴
평면도
인간
트랜스페린
인간 HFE 단백질
플라스모듐 비박스
Sal-1 PvRBP2b
인간 HFE 단백질
인간 트랜스페린
플라스모듐 비박스
Sal-1 PvRBP2b
말라리아바이러스
마추포엔세 GP1
인간 페리틴
정면도
플라스모듐 비박스
Sal-1 PvRBP2b
말라리아바이러스
마추포엔세 GP1
TfR
인간 HFE 단백질
인간 트랜스페린
플라스모듐 비박스
Sal-1 PvRBP2b

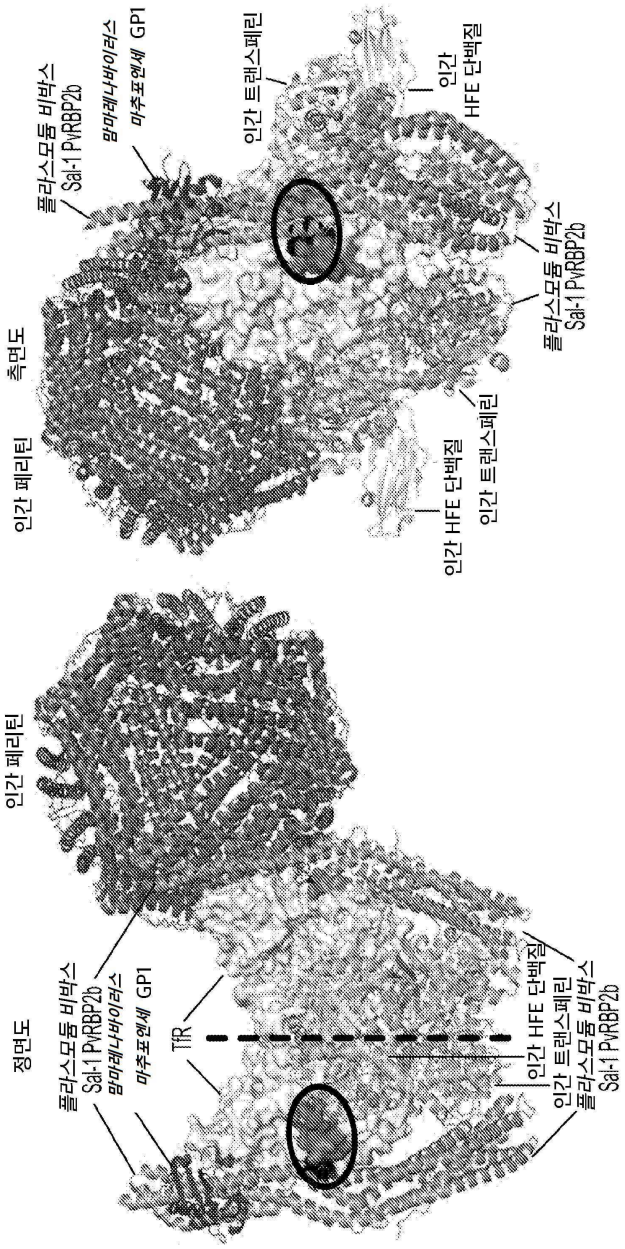
도면11


평면도
인간 페리틴
인간
트랜스페린
인간 HFE 단백질
플라스모듐 비박스
Sal-1 PvRBP2b
인간 HFE 단백질
인간 트랜스페린
플라스모듐 비박스
Sal-1 PvRBP2b
말라리아바이러스
마추포엔세 GP1
정면도
인간 페리틴
플라스모듐 비박스
Sal-1 PvRBP2b
말라리아바이러스
마추포엔세 GP1
TfR
인간 HFE 단백질
인간 트랜스페린
플라스모듐 비박스
Sal-1 PvRBP2b

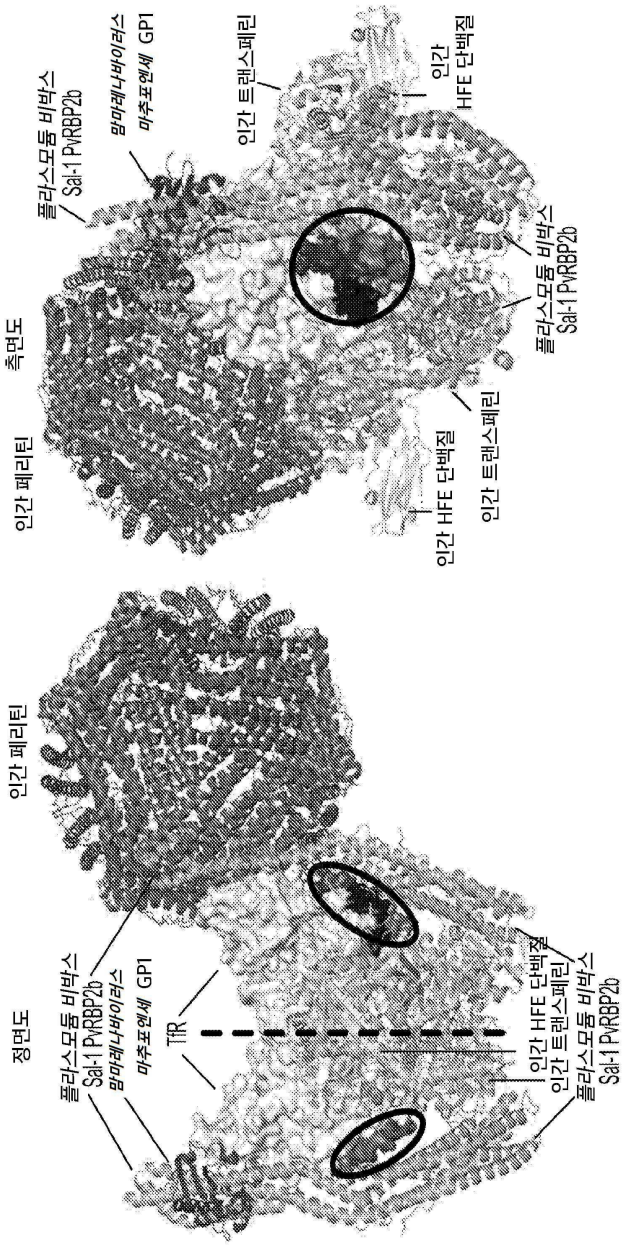
도면12


정면도
인간 페리틴
플라스모듐 비박스 Sal-1 PvRBP2b
암마레나바이러스
마추포엔세 GP1
TfR
인간 HFE 단백질
인간 트랜스페린
플라스모듐 비박스 Sal-1 PvRBP2b
평면도
인간 페리틴
인간 트랜스페린
인간 HFE 단백질
암마레나바이러스
마추포엔세 GP1
플라스모듐 비박스 Sal-1 PvRBP2b
플라스모듐 비박스 Sal-1 PvRBP2b
인간 HFE 단백질
인간 트랜스페린

도면13


측면도
인간 페리틴
플라스모듐 비박스
Sal-1 PvRBP2b
엄마레나바이러스
마추포엔세 GP1
인간 트랜스페린
인간
HFE 단백질
플라스모듐 비박스
Sal-1 PvRBP2b
인간 트랜스페린
인간 HFE 단백질
정면도
인간 페리틴
플라스모듐 비박스
Sal-1 PvRBP2b
엄마레나바이러스
마추포엔세 GP1
TfR
인간 HFE 단백질
인간 트랜스페린
플라스모듐 비박스
Sal-1 PvRBP2b

도면14


측면도
인간 페리틴
플라스모듐 비박스 Sal-1 PvRBP2b
말라리아바이러스 마추포엔세 GP1
인간 트랜스페린
인간 HFE 단백질
인간 HFE 단백질
인간 트랜스페린
플라스모듐 비박스 Sal-1 PvRBP2b
정면도
인간 페리틴
플라스모듐 비박스 Sal-1 PvRBP2b
말라리아바이러스 마추포엔세 GP1
TfR
인간 HFE 단백질
인간 트랜스페린
플라스모듐 비박스 Sal-1 PvRBP2b

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.