



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0071225  
(43) 공개일자 2022년05월31일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 39/39 (2006.01) A61K 31/4745 (2006.01)  
A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 37/04 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 39/39 (2013.01)  
A61K 31/4745 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7013406
- (22) 출원일자(국제) 2020년09월29일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년04월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2020/053258
- (87) 국제공개번호 WO 2021/067261  
국제공개일자 2021년04월08일
- (30) 우선권주장  
62/908,305 2019년09월30일 미국(US)

- (71) 출원인  
더 보드 오브 트러스티스 오브 더 리랜드 스탠포드 유니버시티  
미국 캘리포니아 94305-2038 스탠포드 피오박스 20386 메인 퀴드 오피스 오브 더 제너럴 카운셀 빌딩170 3층
- (72) 발명자  
사지브-바르피 이디트  
미국 캘리포니아 94305 스탠포드 파스퇴르 드라이브 300  
레비 로날드  
미국 캘리포니아 94305 스탠포드 블레이크 윌버 드라이브 875 클리닉 씨  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인와이에스장

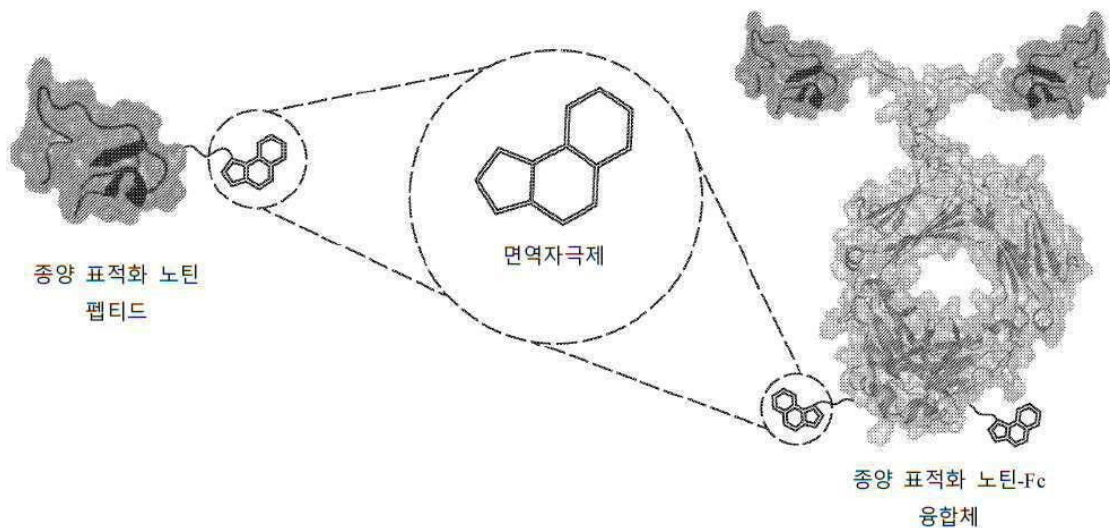
전체 청구항 수 : 총 70 항

(54) 발명의 명칭 노틴-면역자극제 접합체 및 관련 조성물 및 방법

(57) 요약

세포 표면 분자에 결합하는 조작된 루프를 포함하는 노틴 펩티드를 포함하는 접합체 및 링커를 통해 상기 노틴 펩티드에 접합되는 면역자극제가 제공된다. 일부 실시양태에 따르면, 상기 면역자극제는 병원체 인식 수용체 (PRR)를 활성화한다. 예를 들어, 상기 면역자극제는 톨-유사 수용체(TLR) 작용제, 예를 들어, TLR 7, TLR 8 및/또는 TLR 9의 작용제일 수 있다. 또한, 본 개시내용의 접합체를 포함하는 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물)뿐만 아니라 그러한 조성물을 포함하는 키트 및 그러한 조성물을 사용하는 방법이, 예를 들어, 암을 갖는 개체를 치료하기 위해, 제공된다. 또한, 본 개시내용의 접합체를 제조하는 방법이 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

*A61K 47/646* (2017.08)

*A61K 47/68* (2017.08)

*A61P 35/00* (2018.01)

*A61P 37/04* (2018.01)

*A61K 2039/55511* (2013.01)

*A61K 2039/55561* (2013.01)

(72) 발명자

**밀러 케이틀린**

미국 캘리포니아 94305 스탠포드 보우도인 레인  
610 아파트먼트 502에이

**코크란 제니퍼 알.**

미국 캘리포니아 94305 스탠포드 비아 오르테가  
443 쉬리람 119

**베르토찌 캐롤린 알.**

미국 캘리포니아 94063 스탠포드 케크 홀 266

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

접합체로서,

세포 표면 분자에 결합하는 조작된 루프를 포함하는 노틴 펩티드; 및  
링커를 통해 상기 노틴 펩티드에 접합된 면역자극제;를 포함하는, 접합체.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 면역자극제는 병원체 인식 수용체(PRR)를 활성화하는, 접합체.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 PRR는 톨-유사 수용체(TLR), RIG-I-유사 수용체(RLR), NOD-유사 수용체(NLR), C형 렉틴 수용체(CLR), 세포질 dsDNA 센서(CDS), 인터페론 유전자의 자극인자(STING) 및 이들의 임의의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 접합체.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, 상기 면역자극제는 톨-유사 수용체(TLR) 작용제인, 접합체.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 TLR 작용제는 TLR 9 작용제인, 접합체.

#### 청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 상기 TLR 작용제는 올리고뉴클레오티드 기반 TLR 작용제인, 접합체.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 기반 TLR 작용제는 하나 이상의 CpG 디뉴클레오티드를 포함하는, 접합체.

#### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오티드 기반 TLR 작용제는 CpG 올리고데옥시뉴클레오티드(ODN)인, 접합체.

#### 청구항 9

제8항에 있어서, 상기 CpG ODN은 클래스 A(유형 D), 클래스 B(유형 K) 및 클래스 C로 구성되는 군으로부터 선택되는 클래스인, 접합체.

#### 청구항 10

제4항에 있어서, 상기 TLR 작용제는 TLR 7, TLR8 또는 이의 모두의 작용제인, 접합체.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 TLR 작용제는 이미다조퀴놀린(IMZQ) 화합물을 포함하는, 접합체.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 TLR 작용제는 T78a, 하이브리드-2, 파라-아민, 메타-아민, XG1-236, DS802, CL075, CL097 및 R848로 구성되는 군으로부터 선택되는, 접합체.

**청구항 13**

제12항에 있어서, 상기 TLR 작용제는 T78a인, 집합체.

**청구항 14**

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 노틴 펩티드는 2개 이상의 면역자극제에 접합되는, 집합체.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 2개 이상의 면역자극제 중 2개가 동일한, 집합체.

**청구항 16**

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 2개 이상의 면역자극제 중 2개가 상이한, 집합체.

**청구항 17**

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 2개 이상의 면역자극제는 제2항 내지 제13항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 면역자극제로부터 독립적으로 선택되는, 집합체.

**청구항 18**

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 노틴 펩티드는 검출 가능한 표지에 더 접합된, 집합체.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 상기 검출 가능한 표지는 *생체내(in vivo)* 영상화제인, 집합체.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 노틴 펩티드는 하나 이상의 이중성 폴리펩티드에 융합된, 집합체.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 상기 하나 이상의 이중성 폴리펩티드는 Fc 도메인, 알부민, 트랜스페린, XTEN, 호모-아미노산 중합체, 프롤린-알라닌-세린 중합체, 엘라스틴-유사 펩티드 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는, 집합체.

**청구항 22**

제21항에 있어서, 상기 하나 이상의 이중성 폴리펩티드는 Fc 도메인을 포함하는, 집합체.

**청구항 23**

제22항에 있어서, 상기 Fc 도메인은 인간 Fc 도메인인, 집합체.

**청구항 24**

제20항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 하나 이상의 이중성 폴리펩티드는 *생체내(in vivo)* 검출 가능한 폴리펩티드를 포함하는, 집합체.

**청구항 25**

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 노틴 펩티드는 EETI-II 펩티드, AgRP 펩티드,  $\omega$ -코노톡신 펩티드, 칼라타(Kalata) B1 펩티드, MCoTI-II 펩티드, 아가톡신 펩티드 및 클로로톡신 펩티드로 구성되는 군으로부터 선택되는, 집합체.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 상기 노틴 펩티드는 EETI-II 펩티드인, 집합체.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 상기 노틴 펩티드는 서열번호:8에서 제시된 아미노산 서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 집합체.

**청구항 28**

제26항에 있어서, 상기 노틴 펩티드는 서열번호:9에서 제시된 아미노산 서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 집합체.

**청구항 29**

제26항에 있어서, 상기 노틴 펩티드는 서열번호:10에서 제시된 아미노산 서열과 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 100% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 집합체.

**청구항 30**

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 표면 분자는 암 세포 표면 분자인, 집합체.

**청구항 31**

제30항에 있어서, 상기 암 세포 표면 분자는 고형 종양의 암 세포에서 존재하는, 집합체.

**청구항 32**

제30항에 있어서, 상기 암 세포 표면 분자는 액형 종양(liquid tumor)의 암세포에 존재하는, 집합체.

**청구항 33**

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 표면 분자는 세포 표면 수용체인, 집합체.

**청구항 34**

제33항에 있어서, 상기 세포 표면 수용체는 세포 접착 수용체인, 집합체.

**청구항 35**

제34항에 있어서, 상기 세포 접착 수용체는 인테그린인, 집합체.

**청구항 36**

제35항에 있어서, 상기 인테그린은  $\alpha v \beta 1$  인테그린,  $\alpha v \beta 3$  인테그린,  $\alpha v \beta 5$  인테그린,  $\alpha v \beta 6$  인테그린,  $\alpha 5 \beta 1$  인테그린 및 이들의 임의의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 집합체.

**청구항 37**

제34항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 접착 수용체는 종양 혈관계 세포에 존재하는, 집합체.

**청구항 38**

제33항에 있어서, 상기 세포 표면 수용체는 성장 인자 수용체, 케모카인 수용체, 면역 세포 수용체 및 이들의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 집합체.

**청구항 39**

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 표면 분자는 막 프로테아제인, 집합체.

**청구항 40**

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항의 집합체를 포함하는 조성물.

**청구항 41**

제40항에 있어서, 상기 조성물은

상기 접합체; 및

약제학적으로 허용가능한 담체;를 포함하는 약제학적 조성물인, 조성물.

**청구항 42**

제41항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 비경구 투여를 위해 제제화되는, 조성물.

**청구항 43**

제41항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 경구 투여를 위해 제형화되는, 조성물.

**청구항 44**

키트로서,

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물의 치료적 유효량; 및

상기 약제학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하기 위한 지시;를 포함하는, 키트.

**청구항 45**

제44항에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 하나 이상의 단위 투여량으로 존재하는, 키트.

**청구항 46**

제41항 내지 제43항 중 어느 한 항의 약제학적 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 개체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 47**

제46항에 있어서, 상기 투여 단계는 전신 투여에 의한 것인, 방법.

**청구항 48**

제47항에 있어서, 상기 전신 투여는 비경구 투여에 의한 것인, 방법.

**청구항 49**

제48항에 있어서, 상기 비경구 투여는 정맥내 투여에 의한 것인, 방법.

**청구항 50**

제47항에 있어서, 상기 전신 투여는 경구 투여에 의한 것인, 방법.

**청구항 51**

제46항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 암을 갖고, 상기 조작된 루프는 상기 개체에 존재하는 암 세포의 세포 표면 분자에 결합하며, 상기 방법은 상기 개체의 암을 치료하는 방법인, 방법.

**청구항 52**

제51항에 있어서, 상기 세포 표면 분자는 세포 표면 수용체인, 방법.

**청구항 53**

제52항에 있어서, 상기 세포 표면 수용체는 세포 접착 수용체인, 방법.

**청구항 54**

제53항에 있어서, 상기 세포 접착 수용체는 인테그린인, 방법.

**청구항 55**

제54항에 있어서, 상기 인테그린은  $\alpha\beta 1$  인테그린,  $\alpha\beta 3$  인테그린,  $\alpha\beta 5$  인테그린,  $\alpha\beta 6$  인테그린,  $\alpha 5\beta 1$  인테그린 및 이들의 임의의 조합으로 구성되는 군으로부터 선택되는, 방법.

**청구항 56**

제51항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 상기 암 세포를 포함하는 고형 종양을 갖는, 방법.

**청구항 57**

제 56항에 있어서, 상기 투여하는 단계는 전신 투여에 의한 것이고, 상기 고형 종양의 면역 세포 미세환경은, 상기 면역자극제가 상기 개체에 단독으로 전신 투여될 경우 상기 종양의 면역 세포 미세환경과 비교하여, CD8+ T 세포의 증가된 백분율, CD4+ T 세포의 증가된 백분율, B 세포의 증가된 백분율 및/또는 골수 유래 억제인자 세포(MDSC)의 감소된 백분율 중 하나 또는 임의의 조합을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 58**

제56항에 있어서, 상기 투여하는 단계는 전신 투여에 의한 것이고, CD8+ T 세포의 백분율, CD4+ T 세포의 백분율, B 세포의 백분율 및/또는 골수 유래 억제인자 세포(MDSC)의 백분율 중 하나 또는 임의의 조합에 의해 평가된 바와 같은 상기 고형 종양의 면역 세포 미세환경은 상기 면역자극제가 상기 개체에 단독으로 종양내 투여될 경우 상기 종양의 면역 세포 미세환경과 비교하여 통계적으로 유의미하게 상이하지 않은, 방법.

**청구항 59**

제51항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 상기 암 세포를 포함하는 액형 종양(liquid tumor)을 갖는, 방법.

**청구항 60**

노틴-면역자극제 접합체를 제조하는 방법에 있어서, 링커를 통해 노틴 펩티드에 면역자극제를 접합하는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 61**

제60항에 있어서, 상기 접합하는 단계는  
상기 면역자극제를 기능화하는 단계; 및  
상기 노틴 펩티드에 상기 기능화 면역자극제를 접합하는 단계;를 포함하는, 방법.

**청구항 62**

제61항에 있어서, 상기 면역자극제는 1차 아민을 포함하고, 상기 면역자극제를 기능화하는 단계는 상기 1차 아민을 아민-반응성 링커와 반응시키는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 63**

제62항에 있어서, 상기 아민-반응성 링커는 아민-반응성 NHS 에스테르 링커인, 방법.

**청구항 64**

제62항 또는 제63항에 있어서, 상기 아민-반응성 링커는 비시클로[6.1.0]노닌(BCN), 디벤조시클로옥틴(DBCO) 및 아지드 모이어티로 구성되는 군으로부터 선택되는 모이어티를 포함하는, 방법.

**청구항 65**

제64항에 있어서, 상기 노틴 펩티드에 상기 기능화 면역자극제를 접합하는 단계는 상기 아민-반응성 링커의 모이어티를 상기 노틴 펩티드의 모이어티와 반응시키는 단계를 포함하는, 방법.

**청구항 66**

제65항에 있어서 상기 노틴 펩티드는 상기 노틴 펩티드의 모이어티를 포함하는 비천연 아미노산을 포함하는, 방법.

**청구항 67**

제66항에 있어서, 상기 비천연 아미노산은 5-아지도-L-노르발린인, 방법.

**청구항 68**

제65항에 있어서, 상기 노틴 펩티드의 모이어티는 N-말단 아민기인, 방법.

**청구항 69**

제60항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역자극제는 제2항 내지 제13항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 면역자극제인, 방법.

**청구항 70**

제60항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 노틴 펩티드는 제20항 내지 제39항 중 어느 한 항에서 정의된 바와 같은 노틴 펩티드인, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2019년 9월 30일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/908,305호에 대한 이익을 주장하며, 이는 그 전체가 참조로 본원에 인용된다.

**배경 기술**

[0003] 원위치(*in situ*) 암 백신 접종은 면역 활성화를 유발하고 종양 부위에서 이용 가능한 종양 관련 항원을 이용하기 위해 톨-유사 수용체(TLR) 작용제와 같은 면역강화제의 종양내 주사를 포함하는 치료 전략을 대표한다. 이러한 접근법의 장점은 거의 모든 암 유형을 특정 종양 항원에 대한 사전 지식 없이 치료할 수 있다는 것이다. 이러한 전략의 주요 제한 사항은 종양내 주사에 대한 요구 사항이며, 이는 제한된 접근성을 갖는 암(예를 들어, 폐암, 췌장암, 신장암 등) 및 원발성 종양이 외과적으로 절제된 전이성 질환의 경우 매우 어렵다.

**발명의 내용**

[0004] 세포 표면 분자에 결합하는 조작된 루프를 포함하는 노틴 펩티드를 포함하는 접합체 및 링커를 통해 상기 노틴 펩티드에 접합되는 면역자극제가 제공된다. 일부 실시양태에 따르면, 상기 면역자극제는 병원체 인식 수용체(PRR)를 활성화한다. 예를 들어, 상기 면역자극제는 톨-유사 수용체(TLR) 작용제, 예를 들어, TLR 7, TLR 8 및/또는 TLR 9의 작용제일 수 있다. 또한, 본 개시내용의 접합체를 포함하는 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물) 뿐만 아니라 그러한 조성물을 포함하는 키트 및 그러한 조성물을 사용하는 방법이, 예를 들어, 암을 갖는 개체를 치료하기 위해, 제공된다. 또한, 본 개시내용의 접합체를 제조하는 방법이 제공된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0005] **도 1:** 표적화제로서 인테그린 결합 노틴 펩티드 및 노틴-Fc 융합체를 사용한 종양 표적화 면역자극제 접합체의 개략도.
- 도 2:** 본 개시내용의 일부 실시양태에 따른 면역자극제를 기능화하기 위한 전략.
- 도 3:** 본 개시내용의 일부 실시양태에 따른 노틴 펩티드의 서열 및 개략도.
- 도 4:** 본 개시내용의 일부 실시양태에 따른 기능화 면역자극제에 노틴 펩티드를 접합하는 전략.
- 도 5:** 본 개시내용의 일부 실시양태에 따른 상이한 부위에 혼입된 CpG를 갖는 노틴-CpG 접합체.

- 도 6: 본 개시내용의 일부 실시양태에 따른 상이한 링커로 합성된 노틴-CpG 접합체.
- 도 7: 본 개시내용의 일부 실시양태에 따른 노틴-TLR7/8 작용제 접합체.
- 도 8: 본 개시내용의 일부 실시양태에 따른 노틴-Fc 면역자극제 접합체.
- 도 9: 본 개시내용의 일부 실시양태에 따른 생체내(*in vivo*) 형광 추적을 가능하게 하기 위해 검출 가능한 표지에 접합된 노틴 펩티드를 포함하는 접합체.
- 도 10: 종양내 및 종양주위 투여된 본 개시내용의 접합체의 생체내(*in vivo*) 형광 영상화를 나타내는 데이터.
- 도 11: 정맥내 투여된 본 개시내용의 접합체의 생체내(*in vivo*) 형광 영상화를 나타내는 데이터.
- 도 12: 절제된 종양에서 본 개시내용의 접합체의 생체외(*ex vivo*) 형광 영상화를 나타내는 데이터.
- 도 13: 4T1-Luc 유방암종에서 3CM-CpG의 치료 효능을 나타내는 생존 곡선(n = 9-10).
- 도 14: 시간 경과에 따른 4T1-Luc 평균 종양 성장을 나타내는 데이터.
- 도 15: 개별 4T1-Luc 종양 성장 곡선을 나타내는 데이터.
- 도 16: 면역 세포 침윤 데이터 제공. 4T1-luc 세포 종양을 갖는 마우스가 다음 군에 대한 정맥내(IV) 또는 종양내(IT) 주사를 사용하여 도식에 따라 치료되었다: 비히클(Vehicle) IV, CpG IV, 3CM-CpG IV 및 CpG IT. 종양을 치료 후 절제하고 FACS를 통해 종양 침윤 면역 세포에 대해 분석했다. 전체 생존 단일 세포의 %로서 상이한 면역 집단의 존재비를 나타내는 플롯이 제공된다.
- 도 17: 도 16에 대해 설명된 각 치료군에 대한 면역 세포 집단 및 2개의 특징화되지 않은 세포 집단("기타")의 평균 존재비(% 총 생존 단일 세포)를 요약한 파이 차트.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0006] 본 개시내용의 접합체, 조성물, 키트 및 방법을 더 상세히 설명하기 전에, 접합체, 조성물, 키트 및 방법은 설명된 특정 실시양태에 제한되지 않고, 그 자체가 물론 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 실시양태를 설명하기 위한 목적이며, 접합체, 조성물, 키트 및 방법의 범주가 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이기 때문에 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다.
- [0007] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥상 달리 명확하게 지시하지 않는 한, 하한 단위의 10분의 1까지의 각각의 개재된 값은 해당 범위의 상한 및 하한과 해당 언급된 범위 내의 임의의 기타 언급되거나 개재된 값 사이에서 접합체, 조성물, 키트 및 방법 내에 포함되는 것으로 이해된다. 이러한 더 작은 범위의 상한 및 하한은 더 작은 범위에 독립적으로 포함될 수 있으며 언급된 범위에서 임의의 특별히 배제된 한계에 해당하는 접합체, 조성물, 키트 및 방법 내에 또한 포함된다. 또한, 언급된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 그러한 포함된 한계 중 하나 또는 둘 모두를 배제한 범위가 접합체, 조성물, 키트 및 방법에 포함된다.
- [0008] 용어 "약"이 선행되는 수치 값을 갖는 특정 범위가 본원에 제시된다. 용어 "약"은 그가 선행하는 정확한 숫자에 대한 문자적인 지지뿐만 아니라, 그 용어가 선행하는 숫자에 근접하거나 근사치인 숫자를 제공하기 위해 본원에서 사용된다. 숫자가 구체적으로 언급된 숫자에 근접하거나 근사치인지 여부를 결정하는 데 있어서, 근접한 또는 근사치인 언급되지 않은 숫자는, 그것이 제시된 문맥에서, 구체적으로 언급된 숫자와 실질적으로 등가인 것을 제공하는 숫자일 수 있다.
- [0009] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 접합체, 조성물, 키트 및 방법이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 또한, 본원에 설명된 것과 유사하거나 등가인 임의의 접합체, 조성물 및 방법이 접합체, 조성물, 키트 및 방법의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있지만, 대표적이고 예시적인 접합체, 조성물, 키트 및 방법이 이제 설명된다.
- [0010] 본 명세서에 인용된 모든 출판물 및 특허는 각 개별 출판물 또는 특허가 참조로 구체적이고 개별적으로 인용되는 것으로 표시된 바와 같이 참조로 본원에 인용되고, 그 인용된 출판물과 관련된 물질 및/또는 방법을 개시하고 설명하기 위해 참조로 본원에 인용된다. 임의의 출판물의 인용은 출원일 이전의 개시내용을 위한 것이며, 제공된 공개일이 독립적으로 확인될 필요가 있을 수 있는 실제 공개일과 상이할 수 있기 때문에, 본 접합체, 조성물, 키트 및 방법이 그러한 출판물보다 앞선 자격이 없음을 인정하는 것으로 해석되어서는 안 된다.
- [0011] 본원 및 첨부된 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태의 표현은 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한

복수의 언급 대상을 포함한다는 것에 유의해야 한다. 또한, 청구범위는 임의의 선택적 요소를 배제하도록 작성될 수 있다는 것에 유의해야 한다. 그와 같이, 이러한 설명은 청구 요소의 인용 또는 “부정적인” 제한의 사용과 관련하여 “단독으로”, “단지” 등과 같은 그러한 배타적인 용어의 사용에 대한 선행 기준으로서 역할을 하기 위한 것이다.

[0012] 명확성을 위해, 별도의 실시양태의 맥락에서 설명된 집합체, 조성물, 키트 및 방법의 특정 특징이 또한 단일 실시양태에서 조합하여 제공될 수 있음을 이해해야 한다. 반대로, 간결함을 위해, 단일 실시양태의 맥락에서 설명된 집합체, 조성물, 키트 및 방법의 다양한 특징은 또한 개별적으로 또는 임의의 적합한 하위 조합으로 제공될 수 있다. 실시양태의 모든 조합은 본 개시내용에 의해 구체적으로 포함되며 각 조합 및 모든 조합이 개별적이고 명시적으로 개시된 바와 같이 그러한 조합이 실행 가능한 절차 및/또는 조성물을 포괄하는 정도까지 본원에 개시된다. 또한, 그러한 변수를 설명하는 실시양태에 나열된 모든 하위 조합이 또한 본 집합체, 조성물 및 방법에 의해 구체적으로 포괄되며 모든 그러한 하위 조합이 개별적이고 명시적으로 본원에 개시되는 것과 같이 본원에 개시된다.

[0013] 본 개시내용을 검토할 때 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 본원에 기재되고 예시된 각 개별 실시양태는 본 발명의 방법의 범위 또는 사상을 벗어나지 않는 한 임의의 다른 여러 실시양태의 특징으로부터 용이하게 분리되거나 조합될 수 있는 별개의 구성요소 및 특징을 갖는다. 임의의 인용된 방법은 인용된 사건의 순서대로 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서로 수행될 수 있다.

[0014] 집합체

[0015] 본 개시내용은 노틴 펩티드-면역자극제 집합체를 제공한다. 집합체는 세포 표면 분자에 결합하는 조각된 루프를 포함하는 노틴 펩티드 및 링커를 통해 노틴 펩티드에 결합되는 면역자극제를 포함한다. 그러한 집합체는 다양한 응용에서 유용하다. 예를 들어, 암 요법의 맥락에서 그리고 본원에서 입증된 바와 같이, 집합체는 예상외로 전신 투여 후 고형 종양에 국소화할 수 있고 상응하는 비접합 면역자극제보다 실질적으로 더 큰 치료 효능을 달성할 수 있다. 또한, 집합체는 CD8+ T 세포, CD4+ T 세포, 및 B 세포의 증가된 백분율뿐만 아니라 골수 유래 억제 인자 세포(MDSC)의 감소로 표시된 바와 같이 노틴 펩티드에 결합되지 않은 면역자극제의 전신 투여와 비교하여 종양 면역 전망을 예상외로 그리고 상당히 변형시킨다. 노틴 펩티드-면역자극제 집합체를 사용한 면역 세포 프로파일의 이러한 극적인 변화는 종양내(IT) 투여된 면역자극제를 사용한 치료로부터 관찰된 변화와 구별할 수 없었다. 이제 본 개시내용의 집합체에 대한 세부사항을 설명한다.

[0016] "면역자극제"는 면역계의 하나 이상의 세포 유형의 활성화 또는 성숙을 직접적으로 또는 간접적으로 유도하는 물질을 의미한다. 다양한 유형의 면역자극제가 본 개시내용의 집합체에 제공될 수 있다. 사용될 수 있는 면역자극제의 비제한적인 예는 폴리펩티드, 핵산(예를 들어, 올리고뉴클레오티드), 탄수화물, 항체, 리간드, 압타머, 나노입자 및 소분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역자극제는 비면역 세포(예를 들어, 상피 세포, 내피 세포, 종양 세포 등)를 자극하여 전염증성 사이토카인을 생성한다.

[0017] 일부 실시양태에 따르면, 본 개시내용의 집합체는 선천성 면역계의 하나 이상의 세포 유형의 활성화 또는 성숙을 직접적으로 또는 간접적으로 유도하는 면역자극제를 포함한다. 면역자극제에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 활성화될 수 있는 선천성 면역계 세포 유형의 비제한적 예는 대식세포, 수지상 세포, NK 세포, 호중구, 호염기구, 호산구, 랑게르한스(Langerhans) 세포, 비만 세포 및/또는 단핵구를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 집합체는 적응성 면역계의 하나 이상의 세포 유형의 활성화 또는 성숙을 유도하는 면역자극제를 포함한다. 면역자극제에 의해 활성화될 수 있는 적응성 면역계 세포 유형의 비제한적인 예는 T 세포 및 B 세포를 포함한다. T 세포의 예는 나이브(naive) T 세포( $T_N$ ), 세포독성 T 세포( $T_{CTL}$ ), 기억 T 세포( $T_{MEM}$ ), T 기억 줄기 세포( $T_{SCM}$ ), 중추 기억 T 세포( $T_{CM}$ ), 효과기 기억 T 세포( $T_{EM}$ ), 조직 상주 기억 T 세포( $T_{RM}$ ), 효과기 T 세포( $T_{EFF}$ ), 조절 T 세포( $T_{REGs}$ ), 보조 T 세포( $T_H$ ,  $T_{H1}$ ,  $T_{H2}$ ,  $T_{H17}$ ) CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, 바이러스 특이적 T 세포, 알파 베타 T 세포( $T_{\alpha\beta}$ ) 및 감마 델타 T 세포( $T_{\gamma\delta}$ )를 포함한다.

[0018] 특정 실시양태에서, 면역자극제는 병원체 관련 분자 패턴(PAMP)을 포함한다. PAMP는 병원체의 생명주기의 일부로서 발현되는 병원체 특이적 당, 지단백질 및/또는 핵산(예를 들어, 디뉴클레오티드 CpG, 이중 가닥 RNA(dsRNA), 단일 가닥 RNA(ssRNA) 등의 하나 이상의 비메틸화 반복을 포함하는 DNA)를 포함한다. 그러한 특정 미생물 패턴을 인식할 수 있는 숙주 단백질을 병원체 인식 수용체(PRR)라고 한다. 일부 실시양태에 따르면, 본 개시내용의 집합체의 면역자극제는 병원체 인식 수용체(PRR)를 활성화한다. 특정 실시양태에서, PRR은 톨-유사 수용체(TLR), RIG-1-유사 수용체(RLR), 뉴클레오티드-결합 올리고머화 도메인(NOD)-유사 수용체(NLR), C형 렉틴

수용체(CLR), 세포질 dsDNA 센서(CDS), 인터페론 유전자의 자극인자(STING) 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택된다. 일부 실시양태에 따르면, 면역자극제는 PRR을 활성화하고 천연 또는 비천연 PAMP를 포함한다. 사용될 수 있는 비천연 PRR 활성화제는 합성 소분자 PRR 작용제를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0019] 일부 실시양태에 따르면, 면역자극제는 톨-유사 수용체(TLR) 작용제이다. TLR은 침입하는 병원체 또는 내인성 손상 신호를 감지하고 선천성 및 적응성 면역 반응을 개시하는 유형 I 막횡단 PRR 계열이다. 인간에는 10개의 기능성 TLR(TLR1 내지 10)이 있고 마우스에는 12개(TLR1 내지 9, 11 내지 13)가 있다. TLR의 다양한 조합은 단핵구, 대식세포, 수지상 세포, 호중구, B 세포, T 세포, 섬유아세포, 내피 세포 및 상피 세포와 같은 면역 및 비면역 세포 유형의 상이한 부분집합에 의해 발현된다. 인간 TLR 중 TLR1, 2, 4, 5, 6 및 10은 세포 표면에서 발현되며 주로 미생물막 및/또는 세포벽 성분을 인식하는 반면, TLR3, 7, 8 및 9는 엔도리소좀 구획의 막에서 발현되며 핵산을 인식한다. TLR은 N-말단에서 수많은 리간드 감지 류신 풍부 반복(LRR) 및 세포질 톨/IL-1R(TIR) 도메인을 갖는다. TIR 도메인은 MyD88, TRIF, TRAM 및 TIRAP/MAL을 포함하는 TLR 신호 조절에 관여하는 어댑터 단백질과 TLR 간의 상호작용을 매개한다. 이러한 어댑터 분자의 다운스트림에서 활성화된 신호 전달 경로는 전염증성 사이토카인, 케모카인 및 유형 I 및 유형 III 인터페론의 발현을 촉진한다.

[0020] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체는 TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 및 TLR10 중 하나 이상의 작용제인 면역자극제를 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 면역자극제는 TLR 9 작용제이다. 인간 TLR9 유전자는 5개의 TLR9 이소형(isoform)(TLR9A, B, C, D 및 E)을 생성하는 전사 동안 생성하는 동안 상이한 이소형으로 스플라이싱할 수 있다. 이러한 TLR9 이소형은 비장, 말초혈액단핵세포(PBMC) 및 림프절과 같은 다양한 면역 기관 및 세포에서 차등적으로 발현된다.

[0021] 일부 실시양태에서, 면역자극제는 올리고뉴클레오타이드 기반 TLR 9 작용제이다. 본원에 사용된 바와 같이, "올리고뉴클레오타이드"는 5 내지 500개 뉴클레오타이드, 예를 들어, 5 내지 100개 뉴클레오타이드의 단일 가닥 다량체 뉴클레오타이드이다. 올리고뉴클레오타이드는 합성될 수 있거나 효소적으로 제조될 수 있으며, 일부 실시양태에서, 길이가 5 내지 50개인 뉴클레오타이드이다. 올리고뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드 단량체(즉, 올리고리보뉴클레오타이드 또는 "RNA 올리고뉴클레오타이드"일 수 있음), 데옥시리보뉴클레오타이드 단량체(즉, 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 또는 "DNA 올리고뉴클레오타이드"일 수 있음) 또는 이들의 조합을 함유할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어, 길이가 10 내지 20, 20 내지 30, 30 내지 40, 40 내지 50, 50 내지 60, 60 내지 70, 70 내지 80, 80 내지 100, 100 내지 150 또는 150 내지 200, 또는 최대 500개 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0022] 면역자극제가 올리고뉴클레오타이드 기반 TLR 9 작용제인 경우, 면역자극제는 하나 이상의 비메틸화 CpG 디뉴클레오타이드를 포함하는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다. TLR9가 비메틸화 CpG 모티프를 함유하는 박테리아 및 합성 DNA에 대한 선천성 면역 반응에서 수행하는 역할은 잘 특징화되어 있다. 예를 들어, 문헌[Uematsu S, Akira S. (2006) *Journal of Molecular Medicine* 84(9):7127725] 참조. 일부 실시양태에 따르면, 면역자극제가 올리고뉴클레오타이드 기반 TLR 9 작용제인 경우, 면역자극제는 CpG 올리고데옥시뉴클레오타이드(ODN)이다. CpG ODN은 시험관내(*in vitro*) 및 생체내(*in vivo*)에서 입증된 바와 같이 백혈구를 활성화할 수 있는 특정 서열 컨텍스트(CpG 모티프)에서 비메틸화 CpG 디뉴클레오타이드를 함유하는 합성 단일 가닥 DNA 분자이다. CpG ODN의 3가지 주요 클래스는 그의 구조적 및 생물학적 특성에 기반하여 식별되고, 클래스 A, 클래스 B, 및 클래스 C로 지정된다. 중심 회문 CpG-함유 포스포디에스테르(PO) 구조 및 이어서 포스포로티오에이트(PS) 호모폴리머 G-스트레치를 특징으로 하는 클래스 A 올리고는 인터페론-알파(IFN- $\alpha$ ) 생성 및 수지상 세포 성숙의 강력한 유도인자이다. 대조적으로, 클래스 B 올리고는 전체 포스포로티오에이트(PS) 백본을 일반적으로 함유한다. 또한, 이러한 올리고는 IFN- $\alpha$  생성을 자극하나, 그 정도는 덜하다. 그러나, 이는 B 세포를 강력하게 활성화한다. 클래스 C 올리고는 클래스 A 및 B의 특성을 결합하고, 완전한 PS 백본 및 회문 CpG 함유 모티프를 특징으로 한다. CpG ODN은 특정 서열 맥락에서 하나 이상의 비메틸화 CpG 디뉴클레오타이드를 함유하며, 이는 포유류 계통에서 이러한 구조의 희귀성으로 인해 미생물 침입의 표지로 포유류 세포에 의해 용이하게 인식된다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체는 클래스 A(유형 D), 클래스 B(유형 K) 및 클래스 C로부터 선택되는 클래스의 CpG ODN을 포함한다.

[0023] 일부 실시양태에서, 면역자극제가 하나 이상의 비메틸화 CpG 디뉴클레오타이드(예를 들어, CpG ODN)를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 기반 TLR 9 작용제인 경우, 면역자극제는 적어도 5개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역자극제는 2 내지 100개, 예를 들어, 약 8 내지 약 40개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역자극제는 10 내지 30개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역자극제는 15 내지 25개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 면역자극제는 하나 이상의 폴리 T 서열을 함유하고/하거나 약 25%보다 많은 T 뉴클레오타이드 잔기를 갖는 T-풍부 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 면역자극제는 CG 디뉴클레오타이드 대신 GTC 트리뉴클레오타이드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 면역자극제는 하나 이상의

변형된 시토신을 갖는다. 일부 실시양태에서, 면역자극제는 부분적으로 단일 가닥이고, 덤벨 모양이며, 공유적으로 폐쇄된 데옥시리보핵산 분자이다. 일부 실시양태에서, 면역자극제는 다음 구조 중 하나 이상을 포함한다:  $[CGN]_x$ ,  $[N_aCG]_x$ ,  $[N_bCGNb]_x$ ,  $[NaCGTTNb]_x$ , 및  $[N_aCGN_bCGN_c]_x$ , 여기서 N은 임의의 뉴클레오티드 염기이고, x는 0 내지 25이며, a, b 및 c는 독립적으로 1 내지 15이다. 예를 들어,  $[N_aCGN_b]_x$ 에 속하는 서열은 ACGT, GTCGTT, TCGGTT, TGACGTT 및 ACGTACGT를 포함한다.

[0024] CpG 모티프는 종 특이성을 나타낸다. 예를 들어, 최적의 마우스 CpG 모티프는 GACGTT이고, 인간 컨텍스트에서 사용하기 위한 것은 GTCGTT이다. 클래스 B CpG ODN인 CpG ODN 1826은 잘 정의된 뮤린 TLR 9 작용제이며, 따라서 설치류 모델에서 널리 사용된다. 이러한 올리고는 마우스 B 세포 증식, 항원 제시 세포의 성숙 및 극성화 Th1형 세포 반응을 이끌어내는 데 효과적이다. CpG ODN 1826은 2개의 CpG 디뉴클레오티드를 함유하며, 둘 모두 5' 말단의 -GA 및 3' 말단의 -TT에 축적한다. 그의 백본은 완전히 포스포티오화되고, 이는 뉴클레아제 저항성을 제공하며, 이는 박테리아 또는 바이러스 게놈에서 발견되는 천연 PO 백본과 대조적이다.

[0025] 특정 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 기반 TLR 9 작용제는 인간 CpG ODN이다. 그러한 인간 CpG ODN은 CpG 모티프 GTCGTT를 포함할 수 있다. 그러한 인간 CpG ODN의 비제한적인 예는 서열 TCGTCGTTTTCGTCGTTTTCGTCGTT(서열 번호:1)을 갖는다. 일부 실시양태에 따르면, 올리고뉴클레오티드 기반 TLR 9 작용제는 마우스 CpG ODN이다. 그러한 마우스 CpG ODN은 CpG 모티프 GACGTT를 포함할 수 있다. 그러한 마우스 CpG ODN의 비제한적인 예는 서열 TCCATGACGTTTCCTGACGTT(서열번호:2)를 갖는다.

[0026] 올리고뉴클레오티드 기반 면역자극제는 하나 이상의 변형을 포함할 수 있어 예를 들어, 뉴클레아제 민감성을 감소시키거나 방지할 수 있다. 그러한 변형의 예에는 천연 포스포디에스테르 올리고데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드 중합체로의 변형이 포함된다. 예를 들어, 올리고뉴클레오티드 기반 면역자극제는 하나 이상의 포스포로티오에이트(PS) 결합을 포함할 수 있다. PS 결합은 올리고뉴클레오티드의 인산염 백본에서 비가교 산소를 황 원자로 대체한다. PS 변형은 뉴클레오티드간 연결을 뉴클레아제 분해에 대해 더 저항성으로 만든다.

[0027] 일부 실시양태에 따르면, 면역자극제는 TLR 7 작용제, TLR 8 작용제 또는 둘 모두이다. 매우 다양한 TLR 7 및/또는 TLR 8 작용제가 알려져 있다. 특정 실시양태에서, TLR 7 및/또는 TLR 8 작용제는 이미다조퀴놀린(IMZQ) 화합물을 포함한다. 이미다조퀴놀린은 톨-유사 수용체, 특히 TLR7 및 TLR8을 통해 기능하는 강력한 면역자극제이다. 특정 실시양태에서, IMZQ 화합물을 포함하는 TLR 7 및/또는 TLR 8 작용제는 T78a이고, 이의 구조는 도 2에 제공된다. 일부 실시양태에 따르면, IMZQ 화합물을 포함하는 TLR 7 및/또는 TLR 8 작용제는 하이브리드-2(1-(4-아미노-2-부틸-1H-이미다조 [4, 5-c] 퀴놀린-1-일)-2-메틸프로판-2-올); XG1-236(2-부틸-2H-피라졸로[3, 4-c] 퀴놀린-4-아민); DS802(2-부틸 [1, 3] 옥사졸로[4, 5-c] 퀴놀린-4-아민); CL075(2-프로필[1, 3] 티아졸로 [4, 5-c] 퀴놀린-4-아민); CL097(2-(에톡시메틸)-1H-이미다조[4, 5-c] 퀴놀린-4-아민); R848(1-[4-아미노-2-(에톡시메틸)-1H-이미다조 [4, 5-c] 퀴놀린-1-일]-2-메틸프로판-2-올); 메타-아민 또는 파라-아민이다. 예를 들어, 문헌 [Kubli-Garfias et al. (2017) *PLoS ONE* 12(6):e0178846; 및 Ganapathi et al. (2015) *PLoS ONE* 10(8):e0134640] 참조.

[0028] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체는 노틴 펩티드에 접합된 2개 이상의 면역자극제를 포함한다. 예를 들어, 노틴 펩티드는 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상 또는 10개 이상의 면역자극제에 접합될 수 있다. 노틴 펩티드가 2개 이상의 면역자극제에 접합되는 경우, 2개 이상의 면역자극제 중 2개는 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 실시양태에 따르면, 2개 이상의 면역자극제는 본원에 설명된 임의의 면역자극제(예를 들어, TLR 9 작용제, TLR 7 및/또는 8 작용제 및/또는 등)로부터 독립적으로 선택된다.

[0029] 일부 실시양태에 따르면, 본 개시내용의 접합체의 노틴 펩티드는 검출 가능한 표지에 더 접합된다. "검출 가능한 표지"는 접합체가 관심 응용(예를 들어, 시험관내(*in vitro*) 및/또는 생체내(*in vivo*) 연구 및/또는 임상 응용)에서 검출될 수 있도록 노틴 펩티드를 표지하는 체제를 의미한다. 검출 가능한 관심 표지는 형광 표지(예를 들어, AlexaFluor 형광단, 예컨대 본원의 실험 섹션에 설명된 AlexaFluor 680), 방사성 동위원소, 검출 가능한 생성물을 생성하는 효소(예를 들어, 양고추냉이 퍼옥시다제, 알칼리 포스파타제, 루시페라제 등), 형광성 단백질, 상자성 원자 등을 포함한다. 특정 양태에서, 노틴 펩티드는 검출 가능한 표지의 특정 결합 파트너에 접합된다(예를 들어, 검출이 아비딘/스트렙타비딘을 포함하는 검출 가능한 표지를 통해 발생할 수 있도록 비오틴에 접합된다).

[0030] 특정 실시양태에 있어서, 검출 가능한 표지는 생체내(*in vivo*) 영상화, 예컨대 근적외선(NIR) 광학 영상화, 단

일-광자 방출 컴퓨터 단층 촬영법(SPECT)/CT 영상화, 양전자 방출 단층 촬영법(PET), 핵 자기 공명(NMR) 분광법 등에서 용도를 발견할 수 있다. 그러한 응용에서 용도를 발견한 검출 가능한 표지는 형광 표지, 방사성동위원소 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정 양태에서, 검출 가능한 표지는 2개 이상의 영상화 접근법을 사용하여 생체내(*in vivo*) 영상화를 허용하는 다중-모드 생체내(*in vivo*) 영상화제이다(예를 들어, 문헌[Thorp-Greenwood and Coogan (2011) *Dalton Trans.* 40:6129-6143] 참조).

[0031] 특정 실시양태에서, 검출 가능한 표지는 근적외선(NIR) 영상화 응용에서 용도를 발견한 생체내(*in vivo*) 영상화제이다. 그러한 제제는 Kodak X-SIGHT 염료, Pz 247, DyLight 750 및 800 Fluors, Cy 5.5 및 7 Fluors, Alexa Fluor 680 및 750 Dyes, IRDye 680 및 800CW Fluors를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에 따르면, 검출 가능한 표지는 SPECT 영상화 응용에서 용도를 발견한 생체내(*in vivo*) 영상화제이고, 이의 비제한적 예는 <sup>99m</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>123</sup>In, <sup>201</sup>Tl, 및 <sup>133</sup>Xe를 포함한다. 특정 실시양태에서, 검출 가능한 표지는 양전자 방출 단층 촬영법(PET) 영상화 응용에서 용도를 발견한 생체내(*in vivo*) 영상화제, 예를 들어 <sup>11</sup>C, <sup>13</sup>N, <sup>15</sup>O, <sup>18</sup>F, <sup>64</sup>Cu, <sup>62</sup>Cu, <sup>124</sup>I, <sup>76</sup>Br, <sup>82</sup>Rb, <sup>68</sup>Ga 등이다.

[0032] 노틴 펩티드

[0033] 본 개시내용의 접합체는 세포 표면 분자에 결합하는 조작된 루프를 포함하는 노틴 펩티드를 포함한다. 본 개시내용의 접합체에 사용된 노틴 펩티드의 유형은 다양할 수 있다. 사용될 수 있는 노틴 펩티드의 비제한적인 예는 EETI-II 펩티드, AgRP 펩티드, ω-코노톡신 펩티드, 칼라타(Kalata) B1 펩티드, MCoTI-II 펩티드, 아가톡신 펩티드 및 클로로톡신 펩티드를 포함한다. 노틴 펩티드의 3차원 구조는 3개의 이황화물 결합의 특정 배열에 의해 최소한으로 정의된다. 이러한 특징적인 토폴로지는 하나의 이황화물 결합이 다른 2개의 체내(intra-chain) 이황화물 가교에 의해 형성된 거대고리를 통과하는 분자 노트를 형성한다. 그의 2차 구조 함량은 일반적으로 낮지만, 노틴은 작은 삼중-가닥 역평행 β-시트를 공유하며, 이는 이황화물 결합 프레임워크에 의해 안정화된다. 노틴의 폴딩 및 기능적 활성은 일반적으로 길이 및 아미노산 조성 모두가 다양한 루프 영역에 의해 매개된다. 3개의 이황화물 결합이 이러한 펩티드 계열의 폴딩을 정의하는 최소 수인 반면, 노틴은 추가 시스템인 잔기를 또한 함유할 수 있으며, 이는 그의 구조에 4개 이상의 이황화물 결합 및 추가 제약된 루프를 갖는 분자를 수득한다. 용어 "시스템"은 황기가 이황화물 연결을 통해 다른 아미노산에 연결된 Cys 잔기를 지칭하며, 용어 "시스템인"은 잔기의 -SH("하프 시스템") 형태를 지칭한다. 결합 루프 부분은 결합 루프의 1차 서열에서 다른 개체 시스템이 없도록 시스템에 인접할 수 있다.

[0034] 노틴 펩티드는 온라인 KNOTTIN 데이터베이스에서 설명된 펩티드일 수 있으며, 이는 시스템-노트 모티프를 함유하는 것으로서 식별될 수천 개의 폴리펩티드에 대한 상세한 아미노산 서열, 구조, 범주화 및 기능 정보를 포함한다. 노틴은 다양한 식물, 동물, 곤충 및 진균에서 발견된다.

[0035] 노틴 펩티드는 전장(즉, 야생형 펩티드/폴리펩티드의 길이)일 수 있으며, 노틴 펩티드는 야생형 펩티드/폴리펩티드의 길이에 대해 절단될 수 있거나, 노틴 펩티드는 펩티드가 야생형 펩티드/폴리펩티드의 길이에 비해 길이가 더 길도록 추가적인 아미노산을 포함할 수 있다.

[0036] 특정 실시양태에 따르면, 본 개시내용의 노틴-약물 접합체(KDC)는 *엑발리움 엘라테리움(Ecballium elaterium)* 트립신 억제제 II(EETI-II) 펩티드, 아구티-관련 단백질(AGRP) 펩티드, ω-코노톡신 펩티드, 칼라타(Kalata) B1 펩티드, MCoTI-II 펩티드, 아가톡신 펩티드 또는 클로로톡신 펩티드 중 임의의 하나에 기반한 노틴 펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 노틴 펩티드는 *엑발리움 엘라테리움* 트립신 억제제 II(EETI-II) 펩티드에 기반한다. 일부 실시양태에서, 노틴 펩티드는 아구티-관련 단백질(AGRP) 펩티드에 기반한다.

[0037] "EETI"는 단백질 데이터 은행 항목(Protein Data Bank Entry, PDB) 2ETI를 의미한다. KNOTTIN 데이터베이스의 항목은 EETI-II이다. 특정 양태에서, 본 개시내용의 접합체의 노틴 펩티드는 다음의 아미노산 서열을 갖는 EETI-II 펩티드에 기반한다:

[0038] GCPRILMRCKQSDCLAGCVCGPNGFCG(서열번호:3)

[0039] "AGRP"는 PDB 항목 1HYK 및 KNOTTIN 데이터베이스 항목 SwissProt AGRP\_HUMAN을 의미한다. AGRP는 인간 뇌에서 멜라노코르틴 수용체에 결합하고 물질대사 및 식욕 조절에 관여하는 132개의 아미노산의 신경펩티드이다. AGRP의 생물학적 활성은 5개의 이황화물 결합을 함유하는 C-말단 시스템 노트 도메인에 의해 매개되지만, 4개의 이황화물 결합만을 함유하는 34개의 완전 활성 아미노산 절단 AGRP가 개발되었다. 특정 양태에서, 본 개시내용의 접합체의 노틴 펩티드는 다음의 아미노산 서열을 갖는 절단 AGRP 펩티드에 기반한다:

- [0040] CVRLHESCLGQQVPCCDPAATCYCRFFNAFCYCR(서열번호:4)
- [0041] 특정 실시양태에 따르면, 본 개시내용의 접합체의 노틴 펩티드는 다음의 아미노산 서열을 갖는 칼라타(Kalata) B1 펩티드에 기반한다:
- [0042] CGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRNGLPV(서열번호:5)
- [0043] 특정 양태에서, 본 개시내용의 접합체의 노틴 펩티드는 다음의 아미노산 서열을 갖는 MCoTI-II 펩티드에 기반한다:
- [0044] SGSDGGVCPKILKKRRSDCPGACICRNGYCG(서열번호:6)
- [0045] 특정 실시양태에 따르면, 본 개시내용의 접합체의 노틴 펩티드는 다음의 아미노산 서열을 갖는 클로로톡신 펩티드에 기반한다:
- [0046] MCMPCFTTDHMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR(서열번호:7)
- [0047] EETI-II, AgRP,  $\omega$ -코노톡신, 칼라타(Kalata) B1, MCoTI-II, 아가톡신, 클로로톡신 및 본 개시내용의 접합체의 노틴 펩티드가 기반으로 할 수 있는 기타 노틴 펩티드에 대한 서열 및 구조적(예를 들어, 루프) 정보는 PDB, KNOTTIN 데이터베이스 및 기타 단백질 데이터베이스에서 찾을 수 있다.
- [0048] 노틴 펩티드는 세포 표면 분자에 결합하는 조작된 루프를 포함한다. 즉, 루프는 세포 표면 상의 표적 분자에 결합하도록 조작된다. 노틴은 루프 영역을 역평행  $\beta$ -시트의 코어로 제약하는 분자 '노트'로 직조된 3개의 이황화물 결합을 함유한다. 예를 들어, 야생형 EETI는 다음의 3개의 이황화물-제약된 루프를 포함하는 28개의 아미노산으로 구성된다: 루프 1(트립신 결합 루프, 잔기 3 내지 8), 루프 2(잔기 10 내지 14) 및 루프 3(잔기 22 내지 26). 프로테아제 억제제, 독소 및 항미생물제를 포함하는 노틴 계열 구성원은 코어 시스테인 잔기를 제외하고는 서열 상동성을 거의 공유하지 않는다. 그 결과, 이황화물-제약된 루프는 많은 서열 다양성을 허용하며, 이는 노틴이 돌연변이가 3차원 폴딩을 파괴하지 않고 단백질에 도입되어야 하는 단백질 조작 응용에 순응할 수 있게 한다.
- [0049] 조작된 루프는 노틴 펩티드의 기존 루프에서 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있거나, 또는 조작된 루프는 노틴 단백질에 첨가된 루프일 수 있다. 즉, 접합체의 노틴 펩티드는 야생형 펩티드에서 존재하는 하나 이상의 루프 외의 루프를 포함할 수 있다. 유도 진화와 전산 공분산 분석을 조합하여, 노틴 스캐폴드의 루프 영역에 (아미노산 서열 및 루프 길이 모두의) 변형을 도입하기 위한 지침을 기재하였다. 예를 들어, 문헌[Lahti et al. (2009) *PLoS Comput. Biol.* 5(9): e1000499] 참조.
- [0050] 일부 실시양태에서, 노틴의 루프는 암 세포 표면 분자에 결합하기 위해 조작된다. "암 세포"란 신생물성 세포 표현형을 나타내는 세포를 의미하고, 이는 예를 들어, 비정상 세포 성장, 비정상 세포 증식, 밀도 의존성 성장 저해의 소실, 정착 독립성 성장 가능성, 면역저하 비인간 동물 모델에서 종양 성장 및/또는 발생을 촉진시키는 능력 및/또는 세포 변형의 임의의 적절한 지표 중 하나 이상을 특징으로 할 수 있다. "암 세포"는 본원에서 "종양 세포", "악성 세포" 또는 "암성 세포"와 혼용할 수 있으며, 고형 종양, 반고형(semi-solid) 종양, 액형 종양(liquid tumor), 원발성 종양, 전이성 종양 등의 암 세포를 포함한다. 그러한 조작된 루프는 노틴 펩티드에 야생형 펩티드에서 존재하지 않는 암 세포 표면 분자 인식 특성을 부여한다. 특정 측면에서, 암은 하나 이상의 종양 항원을 갖는 것으로 알려진 암이다. 노틴의 조작된 루프가 결합할 수 있는 종양 항원의 비제한적 예는 5T4, AXL 수용체 티로신 키나제(AXL), B-세포 성숙 항원(BCMA), c-MET, C4.4a, 탄산 탈수효소 6(CA6), 탄산 탈수효소 9(CA9), 카데린-6, CD19, CD22, CD25, CD27L, CD30, CD33, CD37, CD44v6, CD56, CD70, CD74, CD79b, CD123, CD138, 암종배아 항원(CEA), cKit, 크립토 단백질, CS1, 텔타-유사 정식 노치(Notch) 리간드 3(DLL3), 엔도텔린 수용체 유형 B(EDNRB), 에프린 A4(EFNA4), 표피 성장 인자 수용체(EGFR), EGFRvIII, 엑토뉴클레오티드 피로포스파타제/포스포디에스테라제 3(ENPP3), EPH 수용체 A2(EPHA2), 섬유아세포 성장 인자 수용체 2(FGFR2), 섬유아세포 성장 인자 수용체 3(FGFR3), FMS-유사 티로신 키나제 3(FLT3), 엽산 수용체 1(FOLR1), 당단백질 비전이성 B(GPNMB), 구아닐레이트 사이클라제 2 C(GUCY2C), 인간 표피 성장 인자 수용체 2(HER2), 인간 표피 성장 인자 수용체 3(HER3), 인테그린 알파, 리소좀 관련 막 단백질 1(LAMP-1), 루이스 Y, LIV-1, 15(LRRC15), 메조텔린(MSLN), 뮤신 1(MUC1), 뮤신 16(MUC16), 나트륨 의존성 인산염 수송 단백질 2B(NaPi2b), 넥틴-4, NMB, NOTCH3, p-카데린(p-CAD), 전립선 특이적 막 항원(PDMA), 단백질 티로신 키나제 7(PTK7), 용질 운반체 계열 44 구성원 4(SLC44A4), SLIT 유사 계열 구성원 6(SLITRK6), STEAP 계열 구성원 1(STEAP1), 조직 인자(TF), T 세포 면역글로불린 및 뮤신 단백질-1(TIM-1) 및 영양막 세포 표면 항원(TROP-2)을 포함한다.

[0051] 특정 실시양태에 따르면, 노틴의 조작된 루프가 결합하는 세포 표면은 수용체, 예를 들어, 세포 접착 수용체, 가용성 인자에 대한 수용체(예를 들어, 성장 인자, 케모카인 또는 다른 가용성 인자 수용체), 면역 세포 수용체 등이다. 일부 실시양태에 따르면, 노틴의 조작된 루프가 결합하는 세포 표면 분자는 세포 접착 수용체, 예를 들어, 암 세포의 표면에서 발현되고/되거나, 중앙 혈관계 세포의 표면에서 발현되는 등의 세포 부착 수용체(예를 들어, 인테그린)이다. 특정 양태에서, 수용체가 세포 접착 수용체인 경우, 수용체는 인테그린이다. 예를 들어, 본 개시내용의 접합체는  $\alpha v\beta 1$  인테그린,  $\alpha v\beta 3$  인테그린,  $\alpha v\beta 5$  인테그린,  $\alpha v\beta 6$  인테그린,  $\alpha 5\beta 1$  인테그린 또는 이들의 임의의 조합 중 임의의 하나에 결합하기 위해 조작된 루프를 갖는 노틴 펩티드를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에 따르면, 조작된 루프는 각  $\alpha v\beta 1$  인테그린,  $\alpha v\beta 3$  인테그린,  $\alpha v\beta 5$  인테그린,  $\alpha v\beta 6$  인테그린 및  $\alpha 5\beta 1$  인테그린에 결합한다.

[0052] 본 개시내용의 접합체에 사용될 수 있는 각  $\alpha v\beta 1$  인테그린,  $\alpha v\beta 3$  인테그린,  $\alpha v\beta 5$  인테그린,  $\alpha v\beta 6$  인테그린 및  $\alpha 5\beta 1$  인테그린에 결합하는 조작된 결합 루프를 갖는 EETI 기반 노틴 펩티드(EETI-2.5D로 지정됨)는 다음의 아미노산 서열을 갖는다(인테그린-결합 루프에 밑줄이 그어져 있음):

[0053] GCPQGRGDWAPTSCQSDCRAGCVCGPNGFCG(서열번호:8)

[0054] 본 개시내용의 접합체에 사용될 수 있는 각  $\alpha v\beta 1$  인테그린,  $\alpha v\beta 3$  인테그린,  $\alpha v\beta 5$  인테그린,  $\alpha v\beta 6$  인테그린 및  $\alpha 5\beta 1$  인테그린에 결합하는 조작된 결합 루프를 갖는 EETI 기반 노틴 펩티드(EETI-2.5F로 지정됨)는 다음의 아미노산 서열을 갖는다(인테그린-결합 루프에 밑줄이 그어져 있음):

[0055] GCPRPRGDNPLTCSQSDCLAGCVCGPNGFCG(서열번호:9)

[0056] 본 개시내용의 접합체에 사용될 수 있는 각  $\alpha v\beta 1$  인테그린,  $\alpha v\beta 3$  인테그린,  $\alpha v\beta 5$  인테그린,  $\alpha v\beta 6$  인테그린 및  $\alpha 5\beta 1$  인테그린에 결합하는 조작된 결합 루프를 갖는 EETI 기반 노틴 펩티드(3CM으로 지정됨)는 다음의 아미노산 서열을 갖고(인테그린-결합 루프에 밑줄이 그어져 있음), 여기에서 Z = 5-아지도-L-노르발린이다:

[0057] \*GCPRPRGDNPLTCZQSDCLAGCVCGPNGYCG(서열번호:10)

[0058] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체의 노틴 펩티드는 표 1에 제시된 바와 같은 인테그린-결합 EETI 기반 노틴 펩티드이다.

**표 1**

EETI 인테그린-결합 노틴 펩티드의 예

[0059]

펩티드 식별자	서열	서열번호:
1.4A	GCAEP <u>RGZ</u> MPWTWCKQSDCLAGCVCGPNGFCG	(서열번호:11)
1.4B	GCVGGRGDWSPKWCKQSDCPAGCVCGPNGFCG	(서열번호:12)
1.4C	GCAELRGDRSYPECKQSDCLAGCVCGPNGFCG	(서열번호:13)
1.4E	GCRLPRGDVPRPHCKQSDCQAGCVCGPNGFCG	(서열번호:14)
1.4H	GCYPLRGDNPYAACKQSDCRAGCVCGPNGFCG	(서열번호:15)
1.5B	GCTIGRGDWAPSECKQSDCLAGCVCGPNGFCG	(서열번호:16)
1.5F	GCHPPRGDNPPVTCKQSDCLAGCVCGPNGFCG	(서열번호:17)
2.3A	GCPEPRGDNPPPSCQSDCRAGCVCGPNGFCG	(서열번호:18)
2.3B	GCLPPRGDNPPPSCQSDCQAGCVCGPNGFCG	(서열번호:19)
2.3C	GCHLGRGDWAPVGCKQSDCPAGCVCGPNGFCG	(서열번호:20)
2.3D	GCNVGRGDWAPSECKQSDCPAGCVCGPNGFCG	(서열번호:21)
2.3E	GCFPGRGDWAPSSCKQSDCRAGCVCGPNGFCG	(서열번호:22)
2.3F	GCPLPRGDNPPTECKQSDCQAGCVCGPNGFCG	(서열번호:23)
2.3G	GCSEARGDNPRLSCKQSDCRAGCVCGPNGFCG	(서열번호:24)
2.3H	GCLLGRGDWAPEACKQSDCRAGCVCGPNGFCG	(서열번호:25)
2.3I	GCHVGRGDWAPLKCKQSDCQAGCVCGPNGFCG	(서열번호:26)
2.3J	GCVRGRGDWAPPSCQSDCPAGCVCGPNGFCG	(서열번호:27)
2.4A	GCLGGRGDWAPPACKQSDCRAGCVCGPNGFCG	(서열번호:28)
2.4C	GCFVGRGDWAPLTCKQSDCQAGCVCGPNGFCG	(서열번호:29)
2.4D	GCPVGRGDWSPASCKQSDCRAGCVCGPNGFCG	(서열번호:30)
2.4E	GCPRPRGDNPLTCKQSDCLAGCVCGPNGFCG	(서열번호:31)
2.4F	GCYQGRGDWSPSSCKQSDCPAGCVCGPNGFCG	(서열번호:32)

2.4G	GCAPGRGDWAPSECKQSDCQAGCVCGPNGFCG	(서열번호:33)
2.4J	GCVQGRGDWSPPSCKQSDCPAGCVCGPNGFCG	(서열번호:34)
2.5A	GCHVGRGDWAPSECKQSDCQAGCVCGPNGFCG	(서열번호:35)
2.5C	GCDGGRGDWAPPACKQSDCRAGCVCGPNGFCG	(서열번호:36)
2.5D	GCPQGRGDWAPTSCQSDCRAGCVCGPNGFCG	(서열번호:8)
2.5F	GCPRPRGDNPLTCKQSDCLAGCVCGPNGFCG	(서열번호:9)
3CM	GCPRPRGDNPLTCZQSDCLAGCVCGPNGYCG	(서열번호:10)
2.5H	GCPQGRGDWAPWCKQSDCPAGCVCGPNGFCG	(서열번호:37)
2.5J	GCPRGRGDWSPPACKQSDCQAGCVCGPNGFCG	(서열번호:38)

[0060] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체의 노틴 펩티드는 표 2에 제시된 바와 같은 인테그린-결합 AgRP 기반 노틴 펩티드이다.

**표 2**

AgRP 인테그린-결합 노틴 펩티드의 예

[0061]

클론	루프 4 서열
7A(5E)(서열번호:39)	GCVRLHESCLGQQVPCCDPAATCYCSGRGDN <del>DL</del> VCYCR
7B(서열번호:40)	GCVRLHESCLGQQVPCCDPAATCYCKGRGDARL <del>Q</del> CYCR
7E(서열번호:41)	GCVRLHESCLGQQVPCCDPAATCYCVGRGDDN <del>LK</del> CYCR
7J(6B)(서열번호:42)	GCVRLHESCLGQQVPCCDPAATCYCEGRGDR <del>DMK</del> CYCR
7C(서열번호:43)	GCVRLHESCLGQQVPCCDPAATCYC YGRGDN <del>DLR</del>

[0062] 일부 실시양태에 따르면, 본 개시내용의 접합체의 노틴 펩티드는 프로테아제에 결합하는 조작된 루프를 포함한다. 프로테아제의 비제한적인 예는 막 프로테아제, 예를 들어, 매트립타제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 노틴 펩티드는 하나 이상의 비천연 아미노산을 포함한다. 그러한 하나 이상의 비천연 아미노산은, 예를 들어, 노틴 펩티드에 대한 약물의 접합을 용이하게 하기 위한, 용도를 찾을 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 접합체를 제조하는 용도를 찾을 수 있는 비천연 아미노산은 아지드, 알킨, 알켄, 아미노-옥시, 히드라진, 알데히드, 니트론, 니트릴 옥사이드, 시클로프로펜, 노르보르넨, 이소-시아나이드, 아릴 할라이드 및 보론산 작용기로부터 선택되는 작용기를 갖는 것을 포함한다. 비천연 아미노산이 관심 작용기를 제공하기 위해 선택될 수 있는 본 개시내용의 노틴-약물 접합체의 노틴 펩티드로 혼입될 수 있는 비천연 아미노산은 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌 [Maza et al. (2015) *Bioconjug. Chem.* 26(9):1884-9; Patterson et al. (2014) *ACS Chem. Biol.* 9:592?605; Adumeau et al. (2016) *Mol. Imaging Biol.* (2):153-65]; 및 다른 곳에서 설명된다. 특정 실시양태에서, 노틴 펩티드는 하나 이상의 5-아지도-L-노르발린 잔기 또는 이의 유도체, 예를 들어, 기능화 면역자극제에 잔기를 접합시킬 시 생성되는 유도체를 포함한다.

[0063] 본 개시내용의 접합체는 본원에 설명된 노틴 펩티드의 아미노산 서열, 예를 들어, 상기 표 1 또는 표 2에 제공된 노틴 펩티드 서열 중 임의의 것에 대해 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 100% 동일성을 갖는 노틴 펩티드를 포함할 수 있다.

[0064] 일부 실시양태에 따르면, 본 개시내용의 접합체의 노틴 펩티드는 하나 이상의 이중 폴리펩티드에 융합된다. 노틴 펩티드는 이중 폴리펩티드에 직접 융합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 노틴 펩티드는 링커를 통해 이중 폴리펩티드에 직접 융합된다. 사용될 수 있는 링커의 비제한적 예는 아미노산 서열 GGGGSGGGGSGGGGS (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub>(서열번호:44)을 포함하는 세린-글리신 링커와 같은 세린-글리신 링커이다. 관심 이중 폴리펩티드는, Fc 도메인(예를 들어, 인간 또는 마우스 Fc 도메인), 알부민, 트랜스페린, XTEN, 호모-아미노산 중합체, 프롤린-알라닌-세린 중합체, 엘라스틴-유사 펩티드 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에서, 이중 폴리펩티드는, 이중 폴리펩티드에 융합되지 않은 동일한 노틴 펩티드와 비교하여, 이를 필요로 하는 개체에 투여한 때 노틴 펩티드의 안정성 및/또는 혈청 반감기를 증가시킨다. 특정 실시양태에서, 인간 Fc 도메인(예를 들어, 전장 인간 Fc 도메인 또는 이의 단편)에 융합된 본 개시의 노틴 펩티드 중 임의의 것을 포함하는 융합 단백질이 제공된다. 본 개시내용의 일부 실시양태에 따라 Fc 도메인에 융합되고 면역자극제에 접합된 노틴 펩티드를 포함하는 접합체의 개략도가 도 1에 개략적으로 예시된다. 특정 실시양태에 따르면, 그러한 융합 단백질은, 예를 들어, 본 개시의 방법에 따라 이를 필요로 하는 개체, 예를 들어, 암을 갖는 개체에 투여하는 것에서 용도를 발견한다. 본 개시의 접합체의 노틴 펩티드에 융합될 수 있는 인간 Fc 도메인의 비제한적인 예는 하

기 표 3에 제시된 서열(서열번호:45)을 갖는 인간 IgG1 Fc 도메인 또는 이의 단편이다.

**표 3**

예시적인 인간 Fc 도메인의 아미노산 서열

	아미노산 서열
예시적인 인간 Fc 도메인 (서열번호:45)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNNHYTQKSLSLSPGK

- [0066] 일부 실시양태에서, 노틴 펩티드가 하나 이상의 이중 폴리펩티드에 융합되는 경우, 노틴 펩티드는 *생체내(in vivo)* 검출 가능한 이중 폴리펩티드에 융합된다. *생체내(in vivo)* 검출 가능한 폴리펩티드의 비제한적인 예는 생물발광 리포터를 포함한다. 특정 실시양태에서, 생물발광 리포터는 루시페라제, 예를 들어, 나노루시페라제이다. 세포 표면 분자에 결합하는 조작된 루프를 갖는 노틴 펩티드가 개발되는 방식은 다양할 수 있다. 합리적이고 조합적인 접근법은 신규 분자 인식 특성을 갖는 노틴을 조작하기 위해 사용되었다. 예를 들어, 노틴 단백질의 라이브러리는, 예를 들어, 박테리아 디스플레이, 파지 디스플레이, 효모 표면 디스플레이, 형광 활성화 세포 분류(FACS) 및/또는 임의의 다른 적합한 스크리닝 방법에 의해 생성될 수 있고 스크리닝될 수 있다.
- [0067] 효모 표면 디스플레이는 신규 분자 인식 특성, 증가된 표적 결합 친화성, 적절한 폴딩 및 개선된 안정성을 갖는 단백질을 조작하기 위해 사용되었던 강력한 조합적인 기술이다. 이러한 플랫폼에서, 단백질 변이체의 라이브러리는 원하는 생화학적 및 생물리학적 특성을 갖는 변이체를 단리하기 위해 고처리량 방식으로 생성되고 스크리닝된다. 효모 표면 디스플레이는 변경된 분자 인식을 갖는 노틴을 조작하기 위한 성공적인 조합적 방법으로 입증되었다. 효모 표면 디스플레이는 진핵 분비 경로의 품질 관리 매커니즘, 샤페론-보조 폴딩 및 효율적인 이황화물 결합 형성으로부터 이점을 얻는다.
- [0068] 관심 세포 표면 분자에 결합하는 조작된 루프를 갖는 노틴 펩티드를 개발하기 위한 일 예시적인 접근법은 효모 세포벽 단백질 Aga1p에 대한 2개의 이황화물 결합에 의해 부착되는 효모 교배형 아글루티닌 단백질 Aga2p에 펩티드를 유전적으로 융합하는 것을 포함한다. 이러한 Aga2p-융합 작제물 및 염색체적으로 통합된 Aga1p 발현 카세트는 적합한 프로모터, 예컨대, 갈락토오스-유도성 프로모터의 제어 하에서 발현될 수 있다. N- 또는 C-말단 에피토프 태그가 형광 표지 1차 또는 2차 항체를 사용하는 유세포 분석으로 세포 표면 발현 수준을 측정하기 위해 포함될 수 있다. 이러한 작제물은 가장 널리 사용되는 디스플레이 포맷을 나타내며, 여기서 노틴(또는 조작될 다른 단백질)의 N-말단은 Aga2에 융합되나, 효모 표면 디스플레이 플라스미드의 여러 대안적인 변이가 설명되며 본 개시내용의 접합체에 사용하기 위한 노틴 펩티드를 개발하기 위해 사용될 수 있다. 파지 또는 mRNA 디스플레이와 함께 사용되는 패닝 기반 방법에 대한 이러한 스크리닝 플랫폼의 이점 중 하나는 2색상 FACS를 사용하여 원하는 표적에 대한 결합 친화도가 2배 정도 상이한 클론을 정량적으로 구별할 수 있다는 것이다.
- [0069] DNA 수준에서 노틴 루프 영역을 선택적으로 돌연변이시키기 위해, 축퇴성 코돈이, 예를 들어, 중첩 확장 PCR을 사용하여, 올리고뉴클레오티드 조립에 의해 도입될 수 있다. 다음으로, 유전 물질이 효모에서 상동성 재조합을 위한 효모 디스플레이 벡터와 충분한 중첩을 갖는 측접(flanking) 프라이머를 사용하여 증폭될 수 있다. 이러한 조립 및 증폭 방법은 상대적으로 저렴한 비용 및 노력으로 노틴 라이브러리를 생성하게 한다. 라이브러리 조성에 대해 정의된 제어를 허용하는 합성 올리고뉴클레오티드 라이브러리 및 최근 방법이 개발되었다.
- [0070] 특정 양태에서, 디스플레이 라이브러리(예를 들어, 효모 디스플레이 라이브러리)는 FACS에 의해 관심 세포 표면 분자에 대한 결합에 대해 스크리닝된다. FACS로 노틴 라이브러리를 스크리닝할 경우, 농축 바인더 풀이 4 내지 7 라운드의 분류로 일반적으로 나타난다. 2색상 FACS는 라이브러리 스크리닝에 사용될 수 있으며, 여기서 하나의 형광 표지는 c-myc 에피토프 태그를 검출하기 위해, 다른 하나는 관심 결합 표적에 대한 노틴 변이체의 상호 작용을 측정하기 위해 사용될 수 있다. 상이한 기기 레이저 및/또는 필터 세트를 사용하여 단일 세포 해상도에서 2개의 형광단의 여기 및 방출 특성을 측정할 수 있다. 이는 효모 발현 수준이 결합으로 표준화될 수 있게 한다. 즉, 불량한 효모 발현을 나타내나 많은 양의 표적에 결합하는 노틴은 높은 수준으로 발현되나 표적에 약하게 결합하는 노틴과 구별될 수 있다. 따라서, 발현 대 결합의 2차원 유세포 분석 플롯은 표적 항원에 결합하는 효모 세포의 대각 집단을 초래할 것이다. 고친화성 결합체는 라이브러리 분류 게이트를 사용하여 단리될 수 있다. 대안적으로, 초기 분류 라운드에서, 전장을 발현하지 않는 원하지 않는 클론의 라이브러리를 제거하는 것이 유용할 수 있다. 스크리닝에 사용된 표적은 최종 응용, 예를 들어, 관심 세포 표면 분자 모방에 구조적 및 기능

적으로 관련이 있다.

- [0071] 관심 세포 표면 분자에 대한 결합체에 대한 노틴 라이브러리의 농축 이후, 효모 플라스미드를 회수하고 시퀀싱한다. FACS의 추가 라운드는 증가된 분류 엄격성 하에서 수행될 수 있다. 그 후, 개별 효모 디스플레이 노틴 클론의 결합 친화도 또는 동역학적 오프율(off-rate)이 측정될 수 있다.
- [0072] 관심 세포 표면 분자에 결합하는 조작된 루프를 갖는 노틴 펩티드가 표면 디스플레이(예를 들어, 효모 표면 디스플레이)에 의해 식별되면, 조작된 노틴은 적합한 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 작은 크기의 노틴은 화학적 합성 및 재조합 발현 모두에 대해 순응할 수 있다. 특정 실시양태에 따르면, 노틴 펩티드는 고체상 펩티드 합성에 이어서 시험관내(in vitro) 폴딩에 의해 생성될 수 있다. 화학적 합성은 노틴 펩티드에 대한 비천연 아미노산 또는 기타 화학적 핸들(chemical handle)의 용이한 혼입을 가능하게 한다.
- [0073] 큰 이종 도메인에 융합되지 않은 노틴 펩티드는 자동 합성기에서 고체상 펩티드 화학을 사용하여 용이하게 합성된다. 예를 들어, 표준 9-플루오레닐메틸옥시카르보닐(Fmoc) 기반 고체상 펩티드 화학이 사용될 수 있다. 그 후, 선형 펩티드는 시스테인 측쇄 티올의 산화를 촉진하여 이황화물 결합을 형성하는 조건 하에서 폴딩될 수 있고, 정제, 예를 들어, 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)가 이어진다.
- [0074] 특정 양태에서, 노틴 펩티드 또는 노틴 펩티드를 포함하는 융합 단백질은 재조합 DNA 접근법을 사용하여 생성된다. 다양한 숙주 세포 유형에서 재조합 방법을 사용하여 노틴 펩티드를 생성하기 위한 임의의 적합한 전략이 사용될 수 있다. 예를 들어, 기능성 노틴은 유전적 융합 파트너로서 바르나제를 사용하여 생성되었으며, 이는 대장균(*E. coli*) 세포질주위 공간에서 폴딩을 촉진하고 유용한 정제 핸들(handle)의 역할을 한다. 특정 실시양태에 따르면, 조작된 노틴 펩티드는 효모에서 발현된다. 예를 들어, 효모 균주 *피치아 파스토리스(Pichia pastoris)*는 2 내지 10 mg/L의 정제되고 조작된 노틴을 생성하기 위해 성공적으로 사용되었다. 효모 발현 작제물은 하나 이상의 태그(예를 들어, 금속 킬레이팅 크로마토그래피(Ni-NTA)로 정제하기 위한 C-말단 헥사히스타딘 태그)를 인코딩할 수 있다. 그 후, 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 응집물, 미스폴딩된(misfolded) 다량체 등을 제거할 수 있다.
- [0075] 본 개시내용의 양태는 본 개시내용의 접합체에 사용된 노틴 펩티드 및 융합 단백질을 인코딩하는 핵산을 포함한다. 즉, 관심 세포 표면 분자에 결합하는 조작된 루프를 갖는 본원에 설명된 노틴 펩티드 및 융합 단백질 중 임의의 것을 인코딩하는 핵산을 제공한다. 특정 양태에서, 그러한 핵산은 발현 벡터에 존재한다. 발현 벡터는 노틴 펩티드를 인코딩하는 핵산에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함하며, 프로모터는 노틴 펩티드를 발현하기 위해 선택된 숙주 세포의 유형에 기반하여 선택된다. 또한, 본 개시내용의 노틴 펩티드-인코딩 핵산 중 임의의 것뿐만 아니라 이를 포함하는 임의의 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.
- [0076] 직접 결합 또는 경쟁 결합 검정을 사용하여 세포(예를 들어, 암세포, 예컨대, 포유동물 암세포)의 표면 상에 발현된 분자에 대한 노틴의 친화도를 측정하는 방법이 이용 가능하다. 직접 결합 검정에서, 평형 결합 상수( $K_D$ )는 형광단 또는 방사성 동위원소에 접합된 노틴, 또는 표지된 항체에 의한 검출을 위한 N- 또는 C-말단 에피토프 태그를 함유하는 노틴을 사용하여 측정될 수 있다. 표지 또는 태그가 실현 가능하지 않거나 이를 원하지 않는 경우, 경쟁 결합 검정을 사용하여 표지된 경쟁자의 최대 신호의 50%가 검출 가능한 비표지된 노틴의 양인 반수 최대 억제 농도(IC<sub>50</sub>)을 결정할 수 있다. 그 후, 측정된 IC<sub>50</sub> 값으로부터 KD 값을 계산할 수 있다. 리간드 고갈은 더 낮은 농도 범위에서 고친화도 상호작용을 측정할 경우 더 두드러질 것이며, 실험에 첨가된 세포 수를 감소시키거나 결합 반응 부피를 증가시켜 회피하거나 최소화할 수 있다.
- [0077] 특정 양태에서, 노틴 펩티드는 약 0.01nM 내지 100nM, 예컨대, 약 0.025nM 내지 75nM, 약 0.05nM 내지 50nM, 0.075nM 내지 25nM 또는 약 0.1nM 내지 10nM의 세포 표면 분자에 대한 평형 결합 상수( $K_D$ )를 갖는다. 일부 실시양태에서, 노틴 펩티드는 약 0.1nM 내지 10nM의 세포 표면 분자에 대한 평형 결합 상수( $K_D$ )를 갖는다. 일부 실시양태에서, 노틴 펩티드는 약 0.1nM의 세포 표면 분자에 대한 평형 결합 상수( $K_D$ )를 갖는다. 일부 실시양태에서, 노틴 펩티드는 약 0.5nM의 세포 표면 분자에 대한 평형 결합 상수( $K_D$ )를 갖는다. 일부 실시양태에서, 노틴 펩티드는 약 1nM의 세포 표면 분자에 대한 평형 결합 상수( $K_D$ )를 갖는다. 일부 실시양태에서, 노틴 펩티드는 약 5nM의 세포 표면 분자에 대한 평형 결합 상수( $K_D$ )를 갖는다. 일부 실시양태에서, 노틴 펩티드는 약 10nM의 세포 표면 분자에 대한 평형 결합 상수( $K_D$ )를 갖는다.
- [0078] 노틴 라이브러리 작제 및 스크리닝을 포함하는 효모 표면 디스플레이 기술에 의한 노틴 조작뿐만 아니라 화학적

합성 및 재조합 발현에 의한 노틴 생성 및 추가로 직접 결합 또는 경쟁 결합 검정을 사용하여 세포 표면에서 발현되는 분자(예를 들어, 수용체)에 대한 노틴의 친화도를 측정하기 위한 세포 결합 검정에 대한 상세한 지침 및 구체적인 프로토콜은 문헌[Moore, S. and Cochran, J. (2012) Engineering Knottins as Novel Binding Agents, *Methods in Enzymology*, 503, 223-251]에 설명되어 있다.

- [0079] 링커
- [0080] 본 개시내용의 면역자극제는 다양한 적합한 링커를 통해 노틴 펩티드에 접합될 수 있다. 본 개시내용의 접합체에서 용도가 확인되는 링커는 에스테르 링커, 아마이드 링커, 말레이미드 또는 말레이미드 기반 링커; 발린-시트룰린 링커; 히드라존 링커; N-숙신이미딜-4-(2-피리디디티오)부티레이트(SPDB) 링커; 숙신이미딜-4-(N-말레이미도메틸)시클로헥산-1-카르복실레이트(SMCC) 링커; 비닐설폰 기반 링커; 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 예컨대, 테트라에틸렌 글리콜을 포함하나 이에 제한되지 않는 링커; 프로판산을 포함하는 링커; 카프롤레산을 포함하는 링커 및 이들의 임의의 조합을 포함하는 링커를 포함한다.
- [0081] 특정 양태에서, 링커는 화학적으로 불안정한 링커, 예컨대, 중성 pH(혈류 pH 7.3 내지 7.5)에서 안정하나 표적 세포(예를 들어, 암 세포)의 약산성인 엔도솜(pH 5.0 내지 6.5) 및 리소솜(pH 4.5 내지 5.0)으로 내재화 시 가수분해를 겪는 산 절단 가능한 링커이다. 화학적으로 불안정한 링커는 히드라존 기반 링커, 옥심 기반 링커, 카보네이트 기반 링커, 에스테르 기반 링커 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 특정 실시양태에 따르면, 링커는 효소 불안정 링커, 예컨대 혈류에서 안정하나 예를 들어, 표적 세포(예를 들어, 암 세포)의 리소솜에서 리소솜 프로테아제(예컨대, 카텝신 또는 플라스민)에 의해 표적 세포로 내재화 시 효소 절단을 겪는 효소 불안정 링커이다. 효소 불안정 링커는 펩티드 결합을 포함하는 링커, 예를 들어, 디펩티드 기반 링커, 예컨대, 발린-시트룰린 링커, 예컨대, 말레이미도카프로일-발린-시트룰린-*p*-아미노벤질(MC-vc-PAB) 링커, 발린-알라닐-*para*-아미노벤질옥시(Val-Ala-PAB) 링커 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 화학적으로 불안정한 링커, 효소 불안정 링커 및 절단 불가능한 링커가 알려져 있고, 예를 들어, 문헌[Ducry & Stump (2010) *Bioconjugate Chem.* 21:5-13]에 상세히 설명되어 있다.
- [0082] 특정 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체는 본 개시내용의 하기 접합체를 제조하는 방법 및 실험 섹션뿐만 아니라 도면에 설명된 링커를 통해 노틴 펩티드에 접합된 면역자극제를 포함한다.
- [0083] 접합체를 제조하는 방법
- [0084] 접합체를 제조하는 방법이 또한 제공된다. 일부 실시양태에 따르면, 링커를 통해 노틴 펩티드에 면역자극제를 접합하는 단계를 포함하는 노틴-면역자극제 접합체를 제조하는 방법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 접합하는 단계는 면역자극제를 기능화하는 단계 및 노틴 펩티드에 기능화 면역자극제를 접합하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 노틴 펩티드 및/또는 면역자극제는 상기 및 하기 실험 섹션에 설명된 임의의 노틴 펩티드 및/또는 면역자극제로부터 선택된다.
- [0085] 일부 실시양태에 따르면, 면역자극제는 1차 아민을 포함하고, 면역자극제를 기능화하는 단계는 1차 아민을 아민-반응성 링커와 반응시키는 단계를 포함한다. 노틴-면역자극제 접합체를 제조하는 방법을 실시할 경우, 다양한 아민-반응성 링커가 사용될 수 있다. 일 비제한적인 예에 따르면, 아민 반응성 링커는 아민 반응성 NHS 에스테르 링커이다. 특정 실시양태에서, 아민 반응성 링커가 사용될 경우, 아민 반응성 링커는 비시클로[6.1.0]노닌(BCN), 디벤조시클로옥틴(DBCO) 및 아지드 모이어티로부터 선택되는 모이어티를 포함한다. 아민-반응성 링커가 그러한 모이어티를 포함하는 경우, 노틴 펩티드에 기능화 면역자극제를 접합하는 단계는 아민-반응성 링커의 모이어티를 노틴 펩티드의 모이어티와 반응시키는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에 따르면, 노틴 펩티드는 노틴 펩티드의 모이어티를 포함하는 비천연 아미노산을 포함한다. 예를 들어, 비천연 아미노산은 아지드 모이어티를 제공할 수 있다. 일 비제한적 예에서, 원하는 위치(들)에서 노틴 펩티드 내로 하나 이상의 5-아지도-L-노르발린을 혼입하여 아지드 모이어티가 제공된다. 특정 실시양태에서, 기능화 면역자극제가 반응하는 노틴 펩티드의 모이어티는 N-말단 아민기이다.
- [0086] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 노틴-면역자극제 접합체는 도 2 내지 4, 8 및 9에 예시된 및/또는 하기 실험 섹션에서 설명된 접근법 중 임의의 것에 따라 제조된다.
- [0087] 도 2는 면역자극제를 기능화하기 위한 예시적인 전략을 제공한다. (A) 접합을 위해 이용 가능한 1차 아민을 갖는 면역자극제는 (B) 클릭 화학 핸들(handle)(예를 들어, BCN, DBCO, 아지드)이 있는 아민 반응성 NHS 에스테르 링커에 반응할 수 있으며, 이는 (C) 클릭 화학 핸들(handle)(예를 들어, BCN, DBCO, 아지드)이 있는 기능화 면역자극제를 초래하고, 이는 중앙 표적화체에 면역자극제를 접합하기 위해 사용된다(도 4에 설명됨).

- [0088] 도 3은 노틴 펩티드의 예시적인 서열 및 예시를 제공한다. (A) 인테그린 결합 루프(PRPRGDNPLT) 및 시스테인-노트 스캐폴드의 이황화물 결합을 갖는 노틴 펩티드 2.5F 및 3CM의 서열이 표시된다. (B) 표시된 N-말단 아민기를 갖는 2.5F 및  $X_1$  위치에 5-아지도-L-노르발린을 갖는 3CM에 대한 노틴 펩티드 구조의 예시가 표시된다. 노틴 펩티드 2.5F는 N-말단 아민기에서 접합될 수 있는 반면, 3CM은  $X_1$  아지드 부위에서 접합될 수 있다(이러한 목적을 위해 혼입된 비천연 아미노산). 또한, 3CM은 면역자극제 또는 프로브, 예컨대 형광단에 반응할 수 있는 이용 가능한 N-말단 아민기를 갖는다(도 9 참조). 또한, 2.5F의  $X_2$  위치의 페닐알라닌은 UV 흡수에 의한 농도 측정을 용이하게 하기 위해 3CM의 티로신으로 치환될 수 있다.  $X_2$ 의 아미노산 중 하나는 결합 친화성을 손상시키지 않고 사용될 수 있다.
- [0089] 도 4는 기능화 면역자극제에 노틴 펩티드를 접합하는 예시적인 전략을 나타낸다. (A) 3CM의  $X_1$  아지드는 균주 촉진 아지드-알킨 고리첨가(SPAAC)를 사용하여 BCN 또는 DBCO 기능화 면역자극제(예를 들어, 하나 이상의 CpG 디뉴클레오타이드(예를 들어, CpG ODN)를 포함하는 올리고뉴클레오타이드 기반 TLR 9 작용제, 이는 때때로 본원의 도면, 이의 설명 및 실험 섹션에서 "CpG"로 지칭됨; 또는 T78a)에 반응할 수 있다. (B) 2.5F의 N-말단 아민은 N-말단 아지드를 혼입하기 위해 아지드-PEG4-NHS 에스테르 링커를 사용하여 변형될 수 있다. N-말단 아지드는 SPAAC를 사용하여 BCN 또는 DBCO 기능화 면역자극제에 반응할 수 있다.
- [0090] 도 8(상부)은 본 개시내용의 실시양태에 따른 노틴-면역자극제 접합체(본 예에서 노틴-Fc-T78a)를 제조하는 방법을 개략적으로 예시한다. 나타낸 바와 같이, T78a에 노틴-Fc(KFc)를 접합하여 KFc-T78a를 생성하기 위해, BCN-변형 KFc 및 아지도-T78a를 사용하였다.
- [0091] 도 9(상부)는 노틴-면역자극제 접합체를 제조하는 방법을 개략적으로 예시하며, 여기서 노틴은 검출 가능한 표지에 더 접합된다. 본 예에서, 검출 가능한 표지는 AlexaFluor 680이다. 3CM-CpG-AF680을 합성하기 위한 본 예시적인 접근법에 따르면, 3CM은 AF680-NHS 에스테르(형광단)를 사용하여 N-말단에서 변형되었고 DBCO-CpG를 사용하여  $X_1$  아지드에서 변형되었다.
- [0092] 조성물
- [0093] 상기 요약된 바와 같이, 본 개시내용은 조성물을 제공한다. 조성물은 상기 접합체 섹션에 설명된 접합체 중 임의의 것을 포함하는 본 개시내용의 접합체 중 임의의 것을 포함할 수 있으며, 이는 원용되지만 간결함을 위해 반복되지 않는다.
- [0094] 특정 양태에서, 조성물은 액체 매질에 존재하는 본 개시내용의 접합체를 포함한다. 액체 매질은 수성 액체 매질, 예컨대, 물 및 완충 용액 등일 수 있다. 하나 이상의 첨가제, 예컨대 염(예를 들어, NaCl, MgCl<sub>2</sub>, KCl, MgSO<sub>4</sub>), 완충제(Tris 완충제, N-(2-히드록시에틸)피페라진-N'-(2-에탄설포산)(HEPES), 2-(N-모르폴리노)에탄설포산(MES), 2-(N-모르폴리노)에탄설포산 나트륨염(MES), 3-(N-모르폴리노)프로판설포산(MOPS), N-트리스[히드록시메틸]메틸-3-아미노프로판설포산(TAPS) 등), 프로테아제 억제제, 글리세롤 등이 그러한 조성물에 존재할 수 있다.
- [0095] 또한, 약제학적 조성물이 제공된다. 약제학적 조성물은 본 개시내용의 접합체 중 임의의 것 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 약제학적 조성물은 일반적으로 치료적 유효량의 접합체를 포함한다. "치료적 유효량"은 원하는 결과를 얻기에 충분한 투여량, 예컨대, 유의한 또는 원하는 치료적(예방적 포함) 결과, 예컨대, 조작된 루프가 결합하는 세포 표면 분자와 관련된 세포 증식성 장애(예를 들어, 암)를 갖는 개체에서 세포 증식의 저하를 얻기 위해 충분한 양 등을 의미한다. 유효량은 1회 이상의 투여로 투여될 수 있다.
- [0096] 본 개시내용의 접합체는 치료적 투여를 위한 다양한 제형에 혼입될 수 있다. 더 특히, 접합체는 적절한 약제학적으로 허용 가능한 부형제 또는 희석제와 조합하여 약제학적 조성물로 제형화될 수 있으며, 고체, 반고체(semi-solid), 액체 또는 기체 형태의 제제, 예컨대, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 연고, 용액, 주사제, 흡입제 및 에어로졸로 제형화될 수 있다.
- [0097] 개체에 대한 투여를 위해 적합한(예를 들어, 인간 투여에 적합한) 본 개시내용의 접합체의 제형은 일반적으로 멸균성이며 선택되는 투여 경로에 따른 개체에 대한 투여가 금지된 검출 가능한 발열원 또는 기타 오염물질이 더 없을 수 있다.
- [0098] 약제학적 투여량 형태에서, 접합체는 단독으로 또는 다른 약제학적 활성 화합물과의 적절한 회합으로뿐만 아니라

라 조합하여 투여될 수 있다. 하기 방법 및 부형제는 단지 예시이며 제한하고자 하는 것이 아니다.

- [0099] 경구 제제의 경우, 접합체를 단독으로 또는 적절한 첨가제와 조합하여 사용하여, 예를 들어, 통상적인 첨가제, 예컨대, 락토스, 만니톨, 옥수수 전분 또는 감자 전분과 함께; 결합제, 예컨대, 결정질 셀룰로스, 셀룰로스 유도체, 아카시아, 옥수수 전분 또는 젤라틴과 함께; 붕해제, 예컨대, 옥수수 전분, 감자 전분 또는 나트륨 카복시메틸셀룰로스와 함께; 윤활제, 예컨대, 활석 또는 마그네슘 스테아레이트와 함께; 및 원하는 경우, 희석제, 완충제, 습윤제, 보존제 및 향미제와 함께, 정제, 분말, 과립 또는 캡슐을 제조할 수 있다.
- [0100] 접합체는 수성 또는 비수성 용매, 예컨대, 식물성 또는 기타 유사한 오일, 합성 지방족 산 글리세리드, 고급 지방족 산의 에스테르 또는 프로필렌 글리콜에서; 및 원하는 경우, 통상적인 첨가제, 예컨대, 가용화제, 등장화제, 현탁화제, 에멀전화제, 안정제 및 보존제와 함께 용해, 현탁 또는 에멀전화하여 주사용 제제로 제형화할 수 있다.
- [0101] 약제학적 조성물은 액체 형태, 동결건조 형태 또는 동결건조 형태로부터 재구성된 액체 형태일 수 있고, 여기서 동결건조 제제는 투여 전 멸균 용액을 사용하여 재구성되어야 한다. 동결건조 조성물을 재구성하기 위한 표준 절차는 일정 부피의 순수한 물(통상적으로 동결건조 동안 제거된 부피와 등가임)을 다시 첨가하고; 그러나 항균제를 포함하는 용액이 비경구 투여를 위한 약제학적 조성물의 생성을 위해 사용될 수 있다.
- [0102] 접합체의 수성 제형은 예를 들어, 약 4.0 내지 약 8.0, 예컨대, 약 4.5 내지 약 7.5, 예를 들어, 약 5.0 내지 약 7.0 범위의 pH로, pH 완충 용액에서 제조될 수 있다. 이러한 범위 내의 pH에 적합한 완충제의 예는 포스페이트 완충제, 히스티딘 완충제, 시트레이트 완충제, 숙시네이트 완충제, 아세테이트 완충제 및 다른 유기 산 완충제를 포함한다. 완충제 농도는, 예를 들어, 완충제 및 제형의 원하는 등장성에 따라, 약 1mM 내지 약 100mM 또는 약 5mM 내지 약 50mM일 수 있다.
- [0103] 키트
- [0104] 본 개시내용의 양태는 키트를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상 키트는 본 개시내용의 접합체 중 임의의 것(상기 접합체 섹션에 설명된 접합체 중 임의의 것을 포함함, 이는 원용되지만 간결함을 위해 반복되지 않음) 또는 이를 포함하는 약제학적 조성물, 및 약제학적 조성물을 이들을 필요로 하는 개체에 투여하기 위한 지시를 포함한다. 특정 실시양태에서, 접합체는 암 세포 표면 분자 및/또는 종양 혈관계 세포의 표면의 분자에 결합하는 조작된 루프(예를 들어, 본원의 다른 곳에서 설명된 임의의 종양 항원, 세포 접착 수용체(예를 들어, 인테그린) 등에 결합하는 조작된 루프)를 포함하는 노틴 펩티드를 포함하고, 지시는 암을 치료하기 위해 암을 갖는 개체에 약제학적 조성물을 투여하기 위한 것이다.
- [0105] 일부 실시양태에서, 접합체 또는 약제학적 조성물은 하나 이상(예를 들어, 2개 이상)의 단위 투여량으로 존재한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "단위 투여량"은 인간 및 동물 대상체에 대한 일원적 투여량으로서 적합한 물리적으로 별개인 단위를 지칭하며, 각 단위는 원하는 효과를 생성하기에 충분한 양으로 계산된 사전 결정된 양의 접합체 또는 조성물을 함유한다. 단위 투여량의 양은 개체에서의 다양한 인자, 예컨대, 사용된 특정 접합체, 달성될 효과 및 접합체와 관련된 약력학에 따른다. 다른 실시양태에서, 키트는 접합체 또는 약제학적 조성물의 단일 다중 투여량을 포함할 수 있다.
- [0106] 키트의 구성요소가 별도의 용기에 존재할 수 있거나, 또는 다수의 구성요소가 단일의 용기에 존재할 수 있다.
- [0107] 키트에 포함된 지시는 적합한 기록 매체에 기록될 수 있다. 예를 들어, 지시는 기재, 예컨대, 종이 또는 플라스틱 등에 인쇄될 수 있다. 그와 같이, 지시는 패키지 삽입물로서 키트에, 키트 또는 이의 구성요소의 용기의 표지(즉, 포장재 또는 하위포장재와 관련됨) 등에 존재할 수 있다. 다른 실시양태에서, 지시는 적합한 컴퓨터 관독 가능한 저장 매체, 예를 들어, 휴대용 플래시 드라이브, DVD, CD-ROM, 디스켓 등에 존재하는 전자 저장 데이터 파일로서 존재한다. 다른 실시양태에서, 실제 지시는 키트에 존재하지 않으나, 원격 공급원 예를 들어, 인터넷을 통해 지시를 취득하기 위한 수단을 제공한다. 이러한 실시형태의 예는 지시를 검토할 수 있고/있거나 지시를 다운로드할 수 있는 웹 주소를 포함하는 키트이다. 지시에서와 같이, 지시를 취득하기 위한 수단이 적합한 기재에 기록되어 있다.
- [0108] 사용 방법
- [0109] \*상기 요약된 바와 같이, 본 개시내용의 접합체를 사용하는 방법을 또한 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 상기 접합체 섹션에 기재된 접합체 중 임의의 것을 사용하는 단계를 포함하며, 이는 원용되지만 간결함을 위해 반복되지 않는다.

- [0110] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 접합체 중 임의의 것 또는 약제학적 조성물 중 임의의 것의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 개체는 암을 갖고, 접합체의 노틴 펩티드는 개체에 존재하는 암 세포 및/또는 종양 혈관계 세포의 세포 표면 분자에 결합하는 조작된 루프를 포함하고, 접합체를 포함하는 약제학적 조성물은 암을 치료하기 위해 개체에 암 치료에 효과적인 양으로 투여된다. 따라서, 본 개시내용의 양태는 암을 갖는 개체에 본 개시내용의 접합체 중 임의의 것 또는 약제학적 조성물 중 임의의 것의 치료적 유효량을 투여하여 암을 치료하는 방법을 포함한다.
- [0111] 다양한 개체가 해당 방법에 따라 치료 가능하다. 일반적으로, 그러한 대상은 “포유동물” 또는 “포유류” 이고, 여기서 이러한 용어는 육식동물(예를 들어, 개 및 고양이), 설치류(예를 들어, 마우스, 기니아 피그 및 랫트) 및 영장류(예를 들어, 인간, 침팬지 및 원숭이) 목을 포함하는 포유류 강 내에 있는 유기체를 설명하기 위해 널리 사용된다. 일부 실시양태에서, 개체는 사람이다. 일부 실시양태에서, 개체는 동물 모델, 예컨대, 마우스 모델이다.
- [0112] 일부 실시양태에서, 치료적 유효량의 접합체(또는 이를 포함하는 약제학적 조성물)는 단독으로(예컨대, 단일요법으로) 또는 하나 이상의 추가인 치료제와 조합하여(예컨대, 병용 요법으로), 하나 이상의 용량으로 투여될 경우 접합체 또는 약제학적 조성물을 사용한 치료가 존재하지 않는 개체의 증상과 비교하여, 개체의 의학적 병태(예를 들어, 암 등)의 증상을 적어도 약 5% 이상, 적어도 약 10% 이상, 적어도 약 15% 이상, 적어도 약 20% 이상, 적어도 약 25% 이상, 적어도 약 30% 이상, 적어도 약 40% 이상, 적어도 약 50% 이상, 적어도 약 60% 이상, 적어도 약 70% 이상, 적어도 약 80% 이상, 적어도 약 90% 이상 또는 그 보다 더 감소시키기 위해 효과적인 양이다.
- [0113] 일부 실시양태에서, 개체는 암을 갖고, 본 개시내용의 방법은 개체의 암의 치료에서 용도를 발견한다. 일부 실시양태에서, 개체는 고형 종양, 반고형(semi-solid) 종양, 원발성 종양, 전이성 종양, 액형 종양(liquid tumor)(예를 들어, 백혈병, 림프종 등) 및/또는 기타의 존재를 특징으로 하는 KRAS 암을 갖는다. 일부 실시양태에서, 개체는 유방암, 교모세포종, 신경모세포종, 두경부암, 위장암, 난소암, 피부암(예를 들어, 기저 세포 암종, 흑색종 등), 폐암, 결장직장암, 전립선암, 신경교종, 방광암, 자궁내막암, 신장암, 백혈병(예를 들어, 급성 골수성 백혈병(AML)), 간암(예를 들면, 간세포성 암종(HCC), 예컨대 원발성 또는 재발성 HCC), 비호지킨(non-Hodgkin) 림프종(NHL), 췌장암, 갑상선암, B-세포 악성종양 및 이들의 임의의 조합, 및 이들의 임의의 하위유형으로부터 선택되는 암을 갖는다. 특정 실시양태에 따르면, 개체는 신생물성 및/또는 악성 세포의 존재를 특징으로 하는 병태를 갖는다.
- [0114] “치료한다”, “치료하는” 또는 “치료” 는 적어도 개체의 의학적 병태(예를 들어, 세포 증식성 장애, 예를 들어, 암)와 관련된 증상의 개선을 의미하고, 여기서 개선은 넓은 의미에서 치료하고자 하는 의학적 병태와 관련된 매개변수, 예를 들어, 증상의 규모를 적어도 감소시키는 것을 지칭한다. 그와 같이, 치료는 개체가 더이상 의학적 병태 또는 적어도 의학적 병태를 특징으로 하는 증상으로 고통받지 않도록 의학적 병태(예를 들어, 암) 또는 적어도 이와 관련된 증상이 완전히 억제되는, 예를 들어 발생이 예방되거나 중단되는, 예를 들어 종결되는 상황을 또한 포함한다.
- [0115] 접합체 또는 약제학적 조성물은 생체내(*in vivo*) 및 생체외(*ex vivo*) 방법뿐만 아니라 전신 및 국소 투여 경로를 포함하는 약물 전달에 적합한 임의의 이용 가능한 방법 및 경로를 사용하여 개체에 투여될 수 있다. 통상적이고 약제학적으로 허용 가능한 투여 경로는 비강내, 근육내, 기관내, 피하, 진피내, 국부 도포, 안구, 정맥내, 동맥내, 비강, 경구 및 다른 장관 및 비경구 투여 경로를 포함한다. 일부 실시양태에서, 투여는 비경구 투여에 의한 것이다. 투여 경로는, 원하는 경우, 조합되거나, 접합체 및/또는 원하는 효과에 따라 조정될 수 있다. 접합체 또는 약제학적 조성물은 단일 용량으로 또는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 접합체 또는 약제학적 조성물은 정맥내 투여된다. 일부 실시양태에서, 접합체 또는 약제학적 조성물은 주사, 예를 들어, 종양내 주사, 종양주위 주사 및/또는 기타에 의해, 예를 들어, 전신 전달(예를 들어, 정맥내 주입)을 위해 또는 국소 부위로 투여된다.
- [0116] 일부 실시양태에서, 개체는 고형 종양을 갖는다. 일부 실시양태에서, 개체가 고형 종양을 갖는 경우, 방법은 개체에 본 개시내용의 노틴-면역자극제 접합체(KDC)를 투여하는 단계를 포함한다. 본원에서 입증된 바와 같이, 그러한 접합체는 예상외로 전신 투여 후 고형 종양에 국소화할 수 있고 상응하는 비접합 면역자극제보다 실질적으로 더 큰 치료 효능을 달성할 수 있다. 일부 실시 양태에 따르면, 개체는 고형 종양을 갖고, 투여하는 단계는 전신 투여에 의한 것이고, 고형 종양의 면역 세포 미세환경은, 면역자극제가 개체에 단독으로 전신 투여될 경우 종양의 면역 세포 미세환경과 비교하여, CD8+ T 세포의 증가된 백분율, CD4+ T 세포의 증가된 백분율, B 세포의

증가된 백분율 및/또는 골수 유래 억제인자 세포(MDSC)의 감소된 백분율 중 하나 또는 임의의 조합을 특징으로 한다. 일부 실시 형태에 따르면, 개체는 고형 종양을 갖고, 투여하는 단계는 전신 투여에 의한 것이고, CD8+ T 세포의 백분율, CD4+ T 세포의 백분율, B 세포의 백분율 및/또는 골수 유래 억제인자 세포(MDSC)의 백분율 중 하나 또는 임의의 조합에 의해 평가된 바와 같은 고형 종양의 면역 세포 미세환경은 면역자극제가 개체에 단독으로 종양내 투여될 경우 종양의 면역 세포 미세환경과 비교하여 통계적으로 유의미하게 상이하지 않다.

[0117] 일부 실시양태에서, 개체는 접합체가 혈액-뇌 장벽(BBB)을 통과해야 하는 치료를 필요로 하는 암을 갖는다. 그러한 암의 비제한적인 예는 뇌종양, 예를 들어, 교모세포종 등이다. 일부 실시양태에서, 개체가 접합체가 BBB를 통과하는 치료를 필요로 하는 암을 갖는 경우, 방법은 개체에 저분자량 접합체, 예컨대 본 개시내용의 노틴-면역자극제 접합체(KDC)를 투여하는 단계를 포함한다.

[0118] 다음의 실시예는 제한이 아니라 예시로서 제공된다.

[0119] 실험

[0120] 실시예 1 - 상이한 부위에 혼입된 CpG를 갖는 노틴-CpG 접합체

[0121] 본 실시예에서, 노틴 펩티드-면역자극제 접합체는 면역자극제가 상이한 부위에 혼입되어 제조되었다. 본 특정 실시예는 상이한 부위에 혼입된 CpG ODN(본원 및 도면에서 "CpG"로 지칭됨)에 접합된 노틴 펩티드 2.5F 및 3CM을 포함한다. 아미노-CpG, 3CM-CpG(X<sub>1</sub> 아지드) 및 2.5F-CpG(N-말단 아지드)에 대한 RAW-Blue NF-κB 활성화 검정 결과는 도 5의 좌측 패널에 표시된다. BCN-CpG는 괄호 안에 나타난 부위에 접합되었다. 3CM, 3CM-CpG(X<sub>1</sub> 아지드) 및 2.5F-CpG(N-말단 아지드)를 비교한 경쟁 결합 검정 결과를 도 5의 우측 패널에 나타냈다.

[0122] (어느 접합 부위에서든) 노틴-CpG 접합체는 아미노-CpG(양성 대조군)와 비교하여 유사한 NF-κB 활성화 프로필을 나타내었고 또한 비변형 3CM(양성 대조군)과 비교하여 유사한 결합 프로필을 나타냈다. 따라서, 접합 부위(X<sub>1</sub> 아지드 또는 N-말단 아지드)는 TLR 작용제 활성화 또는 결합 친화도에 부정적인 영향을 미치지 않으면서 노틴-CpG 접합체를 합성하기 위해 사용될 수 있다. 아미노-CpG는 비변형 CpG와 같은 NF-κB 활성화 프로필을 나타냈다(데이터는 나타내지 않음).

[0123] 실시예 2 - 상이한 링커로 합성된 노틴-CpG 접합체

[0124] 본 실시예에서, 노틴 펩티드-면역자극제 접합체는 상이한 링커를 사용하여 제조되었다. 본 특정 실시예는 상이한 링커를 사용하여 CpG에 접합된 노틴 펩티드 3CM을 포함한다. 아미노-CpG, 3CM-CpG(DBCO) 및 3CM-CpG(BCN)에 대한 RAW-Blue NF-κB 활성화 검정 결과를 도 6의 좌측 패널에 나타냈다. CpG는 두 접합체 모두에 대해 3CM에서 X<sub>1</sub> 아지드에 접합되었다. 3CM, 3CM-CpG(DBCO) 및 3CM-CpG(BCN)를 비교한 경쟁 결합 검정 결과는 도 6의 우측 패널에 나타냈다.

[0125] 노틴-CpG 접합체(링커 포함)는 아미노-CpG(양성 대조군)와 비교하여 유사한 NF-κB 활성화 프로필을 나타내었고 또한 비변형 3CM(양성 대조군)과 비교하여 유사한 결합 프로필을 나타냈다. 따라서, 링커 전략(DBCO 또는 BCN)을 사용하여 TLR 작용제 활성화 또는 결합 친화도에 부정적인 영향을 미치지 않고 노틴-CpG 접합체를 합성할 수 있다.

[0126] 실시예 3 - 노틴-TLR7/8 작용제(T78a) 접합체

[0127] 본 실시예에서, 노틴 펩티드-면역자극제가 제조되고 테스트되었으며, 여기서 노틴 펩티드는 3CM이고 면역자극제는 TLR7/8 작용제 T78a였다. 3CM, T78a 및 3CM-T78a에 대한 RAW-Blue NF-κB 활성화 검정 결과는 도 7의 좌측 패널에 표시된다. 3CM과 3CM-T78a를 비교한 경쟁 결합 검정 결과를 도 7의 우측 패널에 나타냈다.

[0128] TLR7/8 작용제(T78a)는 테스트된 더 높은 농도(500 내지 5,000nM)에서만 NF-κB를 활성화한 반면, 3CM-T78a 접합체는 더 낮은 농도(50 내지 5,000nM)에서 활성화를 유도했다. 또한, 3CM-T78a는 비접합 3CM과 유사한 결합 프로필을 나타냈고 따라서 인테그린에 대한 높은 친화도를 유지한다.

[0129] 실시예 4 - 노틴-Fc 면역자극제 접합체

[0130] 본 실시예에서, Fc 도메인에 융합되고 면역자극제에 접합된 노틴 펩티드를 포함하는 접합체를 합성하고 시험하였다. 도 8(상단)은 접합체(본 실시예에서 노틴-Fc-T78a)를 제조하는 방법을 개략적으로 예시한다. 나타난 바와 같이, T78a에 노틴-Fc(KFc)를 접합하여 KFc-T78a를 생성하기 위해, BCN-변형 KFc 및 아지도-T78a를 사용하였다. 도 8(하단 패널)은 KFc, T78a 및 KFc-T78a 접합체에 대한 RAW-Blue 활성화 검정 결과를 나타낸다.

- [0131] KFc-T78a의 NF- $\kappa$ B 활성화는 테스트된 각 농도에서 KFc 또는 T78a보다 상당히 더 높다( $p < 0.0001$ ). 합성을 위해, BCN기 및 아지드기는 KFc가 아지도-NHS 에스테르 링커로 변형되고 BCN-T78a(또는 BCN-CpG)에 접합되도록 전환될 수 있다. DBCO는 BCN도 대체할 수 있다.
- [0132] 실시예 5 - 검출 가능하게 표지된 노틴-면역자극제 접합체
- [0133] 본 실시예에서 면역자극제와 및 검출 가능한 표지(여기서, AlexaFluor 680)에 접합된 노틴 펩티드를 포함하는 접합체를 합성하고 테스트했다. 도 9(상단)는 본 실시예에서 사용된 접근법을 개략적으로 예시한다. 3CM-CpG-AF680을 합성하기 위해, 3CM은 AF680-NHS 에스테르(형광단)를 사용하여 N-말단에서 변형되었고, DBCO-CpG를 사용하여 X<sub>1</sub> 아지드에서 변형되었다. 도 9(하단)는 3CM과 비교한 3CM-CpG-AF680에 대한 경쟁 결합 검정 결과를 나타낸다.
- [0134] 3CM-CpG-AF680의 결합 친화도는 3CM과 유의미하게 상이하지 않다(쌍을 이루지 않는 스튜던트 t 테스트에 의해 결정됨). 데이터는 3개의 독립적인 실험의 평균( $\pm$  표준 편차, SD)을 나타낸다.
- [0135] 실시예 6 - 비침입적 생체내(in vivo) 및 생체외(ex vivo) 형광 영상화
- [0136] 본 실시예에서, 종양내 및 종양주위 주사 3CM-CpG-AF680 접합체의 비침입적 생체내(in vivo) 형광 영상화를 수행하였다. 결과는 도 10에 나타났다. "용량"은 종양내 CpG 요법에 대한 일반적인 용량(동일 물) = 5.2nmole(50  $\mu$ g)이다. 영상 좌측에 시간으로 나타낸 시간은 주사 후 시간이다. 3CM-CpG-AF680 접합체는 4시간 또는 26시간 후 IT 또는 PT 주사 후 주사되지 않은 종양 부위에 국소화되지 않았다.
- [0137] 또한 본 실시예에서, 정맥내 주사된 3CM-CpG-AF680 접합체의 비침입적 생체내(in vivo) 형광 영상화를 수행하였다. 결과를 도 11에 나타났다. 좌측 및 우측 어깨에 2개의 CT26 결장암종 종양이 있는 마우스에 표시된 용량으로 3CM-CpG-AF680을 정맥내(IV; 꼬리 정맥) 주사했다. "용량"은 종양내 CpG 요법에 대한 일반적인 용량(동일 물) = 5.2nmole(50  $\mu$ g)이다. 영상 좌측에 시간으로 나타낸 시간은 주사 후 시간이다. 3CM-CpG-AF680(4X 용량)은 IV 주사 후 4시간 이내에 두 종양에 모두 국소화되고 24시간 이상 종양 부위에 유지된다. 또한, 더 낮은 복용량은 종양 국소화를 유발할 수 있으나, 생체내(in vivo) 형광 영상화로 측정할 수 없다.
- [0138] 26시간 후 종양을 절제하고 2X 용량 및 4X 용량을 주사한 마우스로부터 생체외(ex vivo) 종양 형광이 관찰되었다(도 12 참조). 결과가 도 12에 도시되어 있다. 좌측 및 우측 어깨에 2개의 CT26 결장암종 종양이 있는 마우스에 표시된 용량으로 3CM-CpG-AF680을 종양내(IT, 좌측 종양에서), 종양주위(PT, 좌측 종양 옆으로), 또는 정맥내(IV; 꼬리 정맥) 주사했다. "용량"은 종양내 CpG 요법에 대한 일반적인 용량(동일 물) = 5.2nmole(50ug)이다. 종양이 주사 후 26시간차에 영상화를 위해 절제되었다. 생체외(ex vivo) 영상은 생체내(in vivo) 영상화에서 관찰을 지원한다. A) 3CM-CpG-AF680은 26시간 후 IT 또는 PT 주사 후 주사되지 않은 종양(우측 종양)에 국소화되지 않았다.
- [0139] B) PD 전달된 3CM-CpG-AF680은 주사 후 26시간차에 종양 흡수를 초래하고, 접합체는 종양주위 주사 부위(종양 주변 영역)에도 존재할 수 있다. C) IV 전달된 3CM-CpG-AF680(4X 용량)은 주사 후 26시간차에 두 종양 모두에 국소화된다. 국소화가 IV 전달된 3CM-CpG-AF680(2X 용량)을 갖는 한 종양에서도 관찰되었다.
- [0140] 실시예 7 - 종양 성장에 의해 표시되는 노틴-면역자극제 접합체의 치료 효능
- [0141] 본 실시예에서, 예시적인 노틴-면역자극제 접합체의 치료 효능이 평가되었다. 원리의 증거로서, 3CM-CpG 접합체가 본 실시예에서 사용되었다. 공격적 4T1 유방암 마우스 모델이 사용되었다. 4T1-Luc 유방암종(n = 9-10)의 3CM-CpG의 치료 효능을 나타내는 생존 곡선을 도 13에 나타났다. 3회 용량의 정맥내 노틴-CpG를 투여받은 확립된 종양을 갖는 마우스는 3회 용량의 정맥내 변형되지 않은 CpG 또는 비히클 대조군으로 치료된 마우스와 비교하여 유의미하게 연장된 생존을 가졌다.
- [0142] 또한, 노틴-CpG 치료는 9마리 중 6마리에서 완전한 종양 퇴행을 유도했으며 나머지 3마리는 비히클 치료 마우스와 비교하여 지연된 종양 성장을 보였다. 완전한 종양 퇴행을 나타낸 마우스의 경우, 종양 퇴행 후 수개월 동안 종양 재발의 징후 없이 마우스의 50%가 치유되었다(6마리 중 3마리). 이러한 결과는 중요하고 예상치 못한 것인데, 대체 전신 단일요법으로 4T1 모델에서 완치를 달성한 것은 전례가 없었기 때문이다.
- [0143] 또한 접종 후 141일차에 생존한 마우스에 원래 접종에 사용된 세포 수의 2배를 사용하여 복부 반대측에 피하로 4T1-luc 종양 세포를 재주사하는 재도전 실험이 수행되었다. 또한, 나이브 마우스(Naive)에 동일한 수의 종양 세포를 주사했다. 접종 후 16일차에, 생존한 마우스 중 어느 것도 종양이 없었던 반면, 모든 나이브 마우스는

확립된 종양을 가졌다.

[0144] 시간 경과에 따른 4T1-Luc 평균 종양 성장을 도 14에 나타냈다. 평균 종양 부피는 제1 마우스가 (비히클군에서) 안락사될 때까지 각 군에 대해 플롯된다. 화살표는 3회 용량을 받은 군의 치료일(7일차, 9일차, 11일차)을 나타내며, 1회 투여군에 대해서만 7일차를 나타낸다. 데이터는 평균  $\pm$  SEM을 나타낸다( $n = 9-10$ ).

[0145] 개별 4T1-Luc 종양 성장 곡선을 도 15에 나타냈다. 재발 없는 완전 반응(CR)을 나타내는 각 군의 마우스 비율 ("장기 생존자")과 재발 있는 CR을 나타내는 마우스의 비율이 개별 플롯에 표시된다. CR은 종양의 완전한 퇴행으로 정의된다. 재발 있는 CR은 종양의 완전한 퇴행에 이어지는 종양 퇴행 후 어떤 시점에서의 재성장으로 정의된다.

[0146] 실시예 8 - 노틴-면역자극제 접합체에 의한 종양 면역 미세환경의 변형

[0147] 본 실시예에서, 정맥내 투여된 예시적인 노틴-면역자극제 접합체의 치료 효능의 매커니즘은 종양-침윤성 면역 세포에 대한 검정에 의해 평가되었다. 노틴-면역자극제 접합체를 개발하는 한 가지 동기는 종양 부위에 표적화 전달을 사용한 전신 주사를 가능하게 하는 것이었다. 노틴-면역자극제가 종양 부위에 도달하여 면역 반응을 자극하는 경우, 종양의 면역 세포 프로파일 이러한 항종양 면역 반응(예를 들어, 증가된  $CD8^+$  T 세포)을 촉진하도록 변경될 것으로 예상된다. 원리의 증거로서, 3CM-CpG 접합체가 본 실시예에서 사용되었다. 면역 세포 프로파일의 원하는 변화에 대한 양성 대조군으로서 종양에 직접 주사된(따라서 종양 부위에 도달하는) 종양내 CpG로 치료된 마우스군이 포함되었으며 국소적으로 면역 반응을 자극하는 것으로 알려져 있다.

[0148] 4T1-luc 세포를 BALB/c 마우스의 복부 한쪽에 피하 이식하고 9일 동안 성장시켰다. 일단 종양이 발달하면, 다음 군에 대해 정맥내(IV) 또는 종양내(IT) 주사로 도식(도 16, 좌측 상단)에 따라 마우스를 2회 치료했다(군 당  $n = 3$  마우스): 비히클 IV, CpG IV(18.2nmol), 3CM-CpG IV(18.2nmol) 및 CpG IT(5.2nmol, 일반적인 IT 용량). 치료 후 3일차에, 종양을 절제하고 FACS를 통해 에 대해 분석했다.  $CD8^+$  T 세포,  $CD4^+$  T 세포, B 세포, 골수 유래 억제인자 세포(MDSC) 및 NK 세포를 포함한 상이한 면역 집단(총 살아있는 단일 세포의 %)의 존재비 플롯을 도 16에 나타냈다. 통계 분석을 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트와 함께 일방향 ANOVA를 사용하여 수행했다. 각 군을 다른 모든 군과 비교했다. 통계적으로 유의미한 군 비교는 우측에 별표를 갖는 두 군 사이에 검은색 선으로 표시되어 있다: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ . 다른 미표시 군 비교는 유의미하게 상이하지 않았다. 각 치료군에 대한 면역 세포 집단 및 2개의 미특성화 세포 집단("기타")의 평균 존재비(% 총 생존 단일 세포)를 요약한 파이 차트를 도 17에 나타냈다. 본 분석에서 정의되지 않은 종양, 기질 및 다른 면역 세포를 포함할 수 있는 미특성화 세포는  $CD11b$  발현을 표시하기 위해 두 집단으로 나뉘었다.

[0149] 이러한 결과는 3CM-CpG IV가 이러한 결과는 노틴-면역자극제 접합체의 전신 주사가 면역자극제가 종양 부위에 직접 주사된 것과 같이 면역 세포 집단이 변화하도록 유도할 수 있음을 입증한다.

[0150] 재료 및 방법

[0151] 세포주 및 마우스

[0152] B16F10 흑색종 및 CT26 결장암종 세포주는 ATCC에서 취득하였고, 4T1-Luc 유방암 세포주는 기증으로서 취득하였다. 종양 세포를 10% 소태아 혈청 및 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유하는 완전 배지(4T1-Luc 및 CT26용 50  $\mu$ M 2-머캅토에탄올을 갖는 RPMI 1640; B16-F10용 DMEM)에서 배양하였다. 세포주는 마이코플라스마 오염에 대해 일상적으로 테스트되었다. 6 내지 8주 암컷 BALB/c 마우스를 Charles River Laboratory에서 구입했다.

[0153] NF- $\kappa$ B 활성화 검정

[0154] 무린 RAW 264.7 대식세포에서 유래한 RAW-Blue 리포터 세포주(Invivogen)를 사용하여 작용제 효능을 평가하였다. TLR 작용제로 리포터 세포주를 자극하면 NF- $\kappa$ B 및 AP-1의 활성화 및 분비된 배아 알칼리 포스파타제(SEAP)의 후속 생성으로 이어지는 신호 전달 경로가 유도된다. RAW-Blue 세포를 24시간 동안 다양한 농도의 TLR 작용제(유리 또는 접합)와 함께 배양했다. 상청액 중 SEAP의 수준은 제조사의 프로토콜(Invivogen)에 따라 QUANTI-Blue 검출 배지를 사용하여 비색법에 의해 정량화되었다. 데이터는 미치료 대조군과 비교하여 NF- $\kappa$ B 활성의 배수 변화로 보고된다. 오차 막대는 삼중으로 수행된 실험의 표준 편차를 나타낸다. 치료 조건과 미치료 대조군 사이의 통계적 차이는 Prism 소프트웨어(GraphPad)를 사용한 일반적인 양방향 ANOVA 분석 및 투키(Tukey)의 다중 비교 테스트에 의해 결정되었다. 통계적 유의성은 미치료 대조군과 비교하여 \* $p \leq 0.05$ , \*\* $p \leq 0.01$ , \*\*\* $p \leq 0.001$  및 \*\*\*\* $p \leq 0.0001$ 이다.

- [0155] 경쟁 결합 검정
- [0156] 비표지 노틴 및 노틴-TLR 작용제 접합체의 상대적 결합 친화도를 비교하기 위해, 세포 기반 경쟁 결합 검정을 일부 변형과 함께 이전에 문헌[Cox et al. (2016) Angew Chem Int Ed. 55(34): 9894-7]에 설명된 바와 같이 수행했다. Alexa Fluor 488-표지 3CM(3CM-AF488)은 비표지 리간드(즉, 비형광 3CM-면역자극제 접합체)의 결합 친화도를 비교하기 위해 경쟁자로 사용되었다.
- [0157] B16F10 흑색종 세포(샘플 당  $5 \times 10^4$  개)를 세포 해리 완충액으로 분리하고, PBS로 세척하고, 4° C에서 3시간 동안 200  $\mu$ L의 인테그린 결합 완충액(IBB: 25mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM MnCl<sub>2</sub> 및 0.1% BSA)에서 0.5nM 3CM-AF488 및 다양한 농도의 비표지 리간드와 함께 배양했다. CpG를 포함하는 결합 검정의 경우, 세포 표면 DNA 결합 상호작용을 통해 매개되는 리간드 고갈을 감소시키기 위해 인테그린 결합체와 함께 배양하기 전에 세포를 비변형 CpG로 전치료했다. 세포를 500nM 비변형 CpG(100  $\mu$ L/샘플)로 실온에서 10분 동안 전치료한 후 경쟁자 및 비표지 리간드(최종 부피 200  $\mu$ L/샘플)의 용액에 첨가했다.
- [0158] PBS + 0.5% BSA로 여러 번 세척한 후 잔여 세포 결합 형광을 유세포 분석으로 분석했다. 각 샘플의 기하 평균 형광 강도(MFI)를 결정하고, 경쟁자 단독으로 치료된 세포의 MFI가 100% 결합과 같도록 데이터셋을 정규화했다. 반수 최대 억제 농도(IC50) 값은 Cheng-Prusoff(Cheng-Prusoff) 관계를 사용하여 평형 해리 상수(K<sub>i</sub>) 값으로의 변환에 대한 비선형 회귀 분석에 의해 결정되었다.
- [0159] 생체내(*in vivo*) 형광 영상화
- [0160] CT26 대장암 세포( $5 \times 10^5$ )를 좌측 및 우측 어깨 모두에 피하 주사하였다. 두 종양이 모두 확립된 지 5일 후, 마우스에 지시된 용량으로 3CM-CpG-AF680을 종양내(IT, 좌측 종양에서), 종양주위(PT, 좌측 종양 옆으로) 또는 꼬리 정맥을 통해 정맥내(IV) 주사했다. "용량"은 CpG(5.2nmol, 50ug)에 대한 표준 종양내 용량의 동일한 몰량이다. 따라서, 0.2X 용량 = 1nmol, 1X 용량 = 5.2nmol, 2X 용량 = 10.4nmol, 및 4X 용량 = 20.8nmol.
- [0161] 주사 후 4시간 및 26시간에, 마우스를 2% 이소플루란 가스를 사용하여 마취하고 Spectral Instruments Imaging Ami Imager를 사용하여 영상화하였다. 주사 후 26시간에 마지막 스캔 후, 군 당 한 마리의 마우스를 희생시키고 종양을 절제하고 영상화했다. 형광 영상화 설정: 여기/방출: 640/730nm, 여기 전력 = 10, 비닝 = 2, 노출 시간 = 10초, Fstop = 2, FOV = 25.
- [0162] 종양 접종 및 치료 연구
- [0163] 4T1-Luc 종양 세포( $1 \times 10^4$ )를 BALB/c 마우스의 복부 우측에 피하 주사하였다(0일차). 접종 7일 후, 마우스를 실험군으로 무작위 배정했다(군 당 n = 9 내지 10). 마우스에 3회 용량(7일차, 9일차, 11일차) 또는 단일 용량(7일차만)의 CpG(18.2nmol, 176ug) 또는 동일한 몰량의 3CM-CpG(18.2nmol, 250ug)를 꼬리 정맥을 통해 주사했다. 비히클군의 마우스에 멸균 PBS를 IV 주사했다(7일차, 9일차, 11일차). 모든 치료는 주사 전에 멸균 PBS에서 제형화되었고 여과되었다(0.2 $\mu$ m 멸균 필터). 종양 크기는 2 내지 3일마다 디지털 캘리퍼(Mitutoyo)로 모니터링되었고 부피(길이  $\times$  너비  $\times$  높이)로 표시했다. 종양 크기가 가장 큰 직경에서 1.5cm에 도달하거나 종양이 지 침에 따라 케양화되면 마우스를 안락사시켰다. 기록된 생존 날짜는 주어진 마우스가 안락사 기준에 도달했을 때를 나타낸다. 생존분석은 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 방법을 사용하였다. P 값은 로그 순위(Mantel-Cox) 테스트를 사용하여 계산되었다.
- [0164] 합성 - 기능화 면역자극제
- [0165] 면역 자극제는 SPAAC(스트레인 축진 아지드-알킨 고리첨가)를 사용하여 표적화제에 부착할 수 있도록 클릭 화학 핸들로 기능화되었다. 1차 알킬 아민-변형 TLR 7/8 작용제(T78a로 명명) 및 5' 아민-변형 클래스 C CpG-C792(아미노-CpG로 명명)를 Acme Biosciences 및 Integrated DNA Technologies에서 각각 구입했다. 면역자극제는 변형에 순응한다고 보고된 부위에 접합되었다: 이미다조퀴놀린의 경우 N1 연결 및 클래스 C CpG의 경우 5' 인산염.
- [0166] 면역 자극제(아미노-CpG 또는 T78a)의 1차 알킬 아민은 N-히드록시숙신이미드(NHS) 에스테르 링커를 사용하여 기능화되어 각각의 링커 BCN-PEG2-NHS 에스테르, DBCO-PEG4-NHS 에스테르 또는 아지드-PEG4-NHS 에스테르를 사용하여 비시클로노닌(BCN), 디벤조시클로옥틴(DBCO) 또는 아지드 핸들을 혼입했다(도 2에서 나타냄). 아미노-CpG(1당량)를 25% DMSO/75% 100mM 붕산나트륨 완충액(pH 8.5)에서 NHS 에스테르 링커(15당량)와 혼합하고 밤새 실온에서 교반했다. 기능화 CpG는 샘플 로딩 전 PBS로 완충제 교환된 제바(Zeba) 스핀 탈염 컬럼(7K MWC0)을 사

용하여 크기 배제에 의해 잔여 NHS 에스테르 링커로부터 정제되었다. T78a(1.2당량)를 4.4당량 트리에틸아민과 함께 무수 DMSO에서 NHS 에스테르 링커(1당량)와 혼합하고 5 내지 8시간 동안 실온에서 교반하였다. 반응은 분석용 C18 컬럼을 사용하는 분석용 HPLC 및/또는 LCMS를 사용하여 모니터링되었다. CpG 기능화를 모니터링하기 위한 HPLC 방법: 30분에 걸쳐 5%에서 65% 용매 B로 선형 구배(용매 A: pH 7 물 중 100mM 트리에틸암모늄 아세테이트; 용매 B: 아세트니트릴; 35° C). T78a 기능화를 모니터링하기 위한 HPLC 방법: 2분 동안 5% 용매 B에서 등용매 유지, 이어서 15분에 걸쳐 5% 내지 75% 용매로 선형 구배(용매 A: 물 + 0.1% TFA, 용매 B: 아세트니트릴 + 0.1% TFA, 실온).

[0167] DBCO-CpG 합성에 더하여, DBCO-CpG도 Integrated DNA Technologies(IDT)에서 직접 주문했다.

[0168] 합성 ? 노틴 펩티드 접합체

[0169] 고체상 펩티드 합성(SPPS)은 표준 Fmoc 조건을 사용하여 노틴 펩티드를 합성하기 위해 사용되었다. 펩티드 합성, 절단, 폴딩 및 HPLC 정제 프로토콜은 문헌[Cox et al. (2016) Angew Chem Int Ed. 55(34): 9894-7]에서 설명된다. 노틴 펩티드가 라이신 잔기를 갖지 않는다는 점을 감안하면서, 2.5F는 밤새 실온에서 교반하면서 DMSO 중 4.4당량의 TEA와 함께 아지드-PEG4-NHS 에스테르 링커를 사용하여 N-말단 아민에서 부위특이적으로 접합되어 N-말단 아지드-변형 2.5F를 생성했고, 이는 RP-HPLC로 정제되었다. 3CM으로 명명된 2.5F의 변형 버전은 2.5F 서열의 위치 15의 비천연 아미노산 5-아지도-L-노르발린으로 합성되어 대체 접합 부위(도 3a에서 X<sub>1</sub> 아지드로 나타냄)를 제공했다. 또한, UV 흡수에 의한 농도 측정을 용이하게 하기 위해 위치 31의 페닐알라닌(도 3a에서 X<sub>2</sub>로 나타냄)이 3CM의 티로신으로 치환되었다. 그러나, 위치 31의 아미노산 중 하나는 결합 친화도를 손상시키지 않고 사용할 수 있다.

[0170] 아지드가 있는 노틴(3CM 또는 아지도-2.5F)(1.2당량)을 밤새 30° C로 PBS에서 BCN 또는 DBCO-변형 CpG(1당량)와 반응시켜 도 4에 나타낸 바와 같은 노틴-CpG 접합체(3CM-CpG 또는 2.5F)를 생성했다. 노틴-CpG 접합체는 샘플 로딩 전에 PBS로 완충액 교환된 제바(Zeba) 스핀 탈염 컬럼(7K MWC0)을 사용하여 크기 배제에 의해 미반응 노틴 펩티드로부터 정제되었다. 3CM-T78a를 생성하기 위해, BCN-T78a(1.15당량)를 1:1 DMSO/PBS에서 3CM(1당량)과 반응시키고, 이를 실온에서 밤새 교반하였다. 반응물은 2분 동안 5% 용매 B에서 등용매 유지로 시작하는 방법을 사용하여 C18 컬럼에서 RP-HPLC로 정제되었고, 30분에 걸쳐 5% 내지 75% 용매로 선형 구배가 이어졌다(용매 A: 물 + 0.1% TFA, 용매 B: 아세트니트릴 + 0.1% TFA, 실온). 생성물 분획을 수집하고, 물에 희석하고, 동결시키고, 동결건조시켰다. 분석용 HPLC 및/또는 LCMS를 사용하여 CpG 및 T78a에 대한 "기능화 면역자극제" 섹션에 나열된 동일한 방법을 사용하여 반응을 모니터링했다.

[0171] 합성 ? 노틴-Fc 접합체

[0172] 노틴-Fc(KFc) 융합 단백질은 이전에 설명된 바와 같이 재조합으로 발현되고 정제되었다(문헌[BH Kwan, et al., J Exp Med. 2017, 214(6): 1679-90]). NHS 에스테르 표지는 도 8과 같이 BCN-PEG2-NHS 에스테르 링커를 사용하여 클릭 가능한 핸들(clickable handle)(BCN기)이 있는 KFc 융합을 기능화하기 위해 사용되었다. NHS 에스테르는 단백질의 1차 아민(라이신 잔기 및 N-말단)과 반응하여 안정한 아미드 결합을 형성한다. KFc를 2시간 동안 실온으로 pH 8.3 100mM 중탄산나트륨 완충액에서 BCN-PEG2-NHS 에스테르 링커(6당량)와 혼합하였다. 이러한 표지 프로토콜은 일반적으로 KFc당 2 내지 3개의 연결을 생성한다. BCN-변형 KFc는 샘플 로딩 전 PBS로 완충액 교환된 제바(Zeba) 스핀 탈염 컬럼(7K MWC0)을 사용하여 크기 배제에 의해 잔여 링커로부터 정제되었다.

[0173] KFc-면역자극제 접합체를 생성하기 위해, 밤새 실온 교반 하에 BCN-변형 KFc(1당량)를 PBS 중 아지도-T78a(6당량)와 반응시켰다. KFc-T78a 접합체는 샘플 로딩 전 PBS로 완충제 교환된 제바(Zeba) 스핀 탈염 컬럼(7K MWC0)을 사용하여 크기 배제에 의해 미반응 아지도-T78a로부터 정제되었다.

[0174] 합성을 위해, BCN 및 아지드기는 KFc가 아지도-NHS 에스테르 링커로 변형되고 BCN-T78a에 접합되도록 전환될 수 있다. 기능화 CpG는 기능화 T78a도 대체할 수 있다. 또한, DBCO는 언제든지 BCN을 대체할 수 있다.

[0175] 면역 세포 침윤

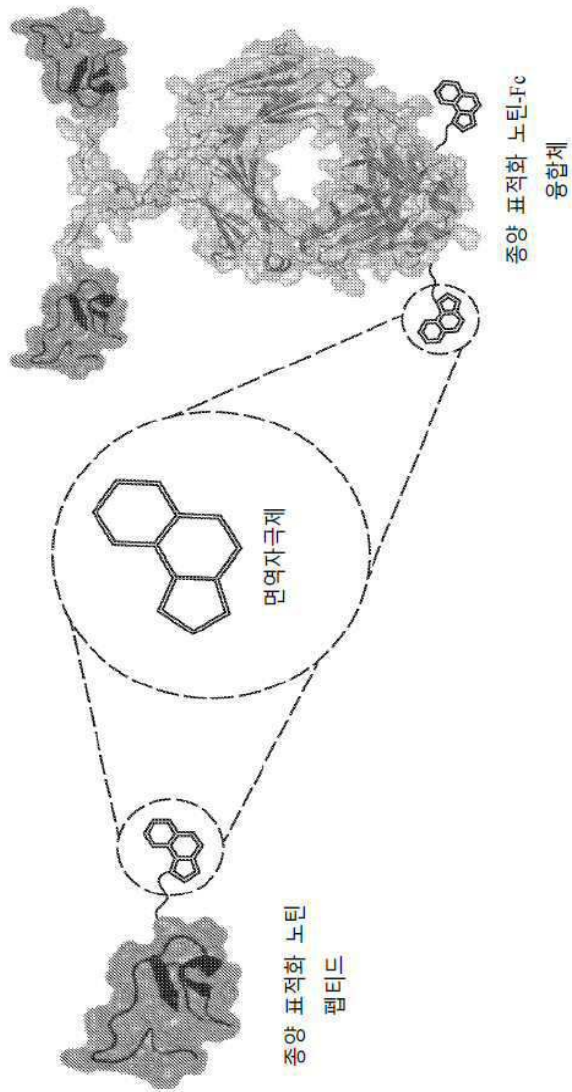
[0176] 4T1-luc 세포(2 x 10<sup>4</sup>)를 BALB/c 마우스의 복부 한쪽에 피하 이식하고 9일 동안 성장시켰다. 종양이 발달하면(치료 후 0일차로 지칭함), 마우스는 다음 군에 대해 치료 후 0일차 및 2일차에 정맥내(IV) 또는 종양내(IT) 주사로 IV 치료했다(n = 군 당 3마리의 마우스): 비히클 IV(PBS), CpG IV(18.2nmol), 3CM-CpG IV(18.2nmol) 및 CpG IT(5.2nmol). CpG IT 용량(5.2nmol = 50ug)은 마우스에 제공되는 일반적인 IT 용량이며 IV 용량보다 낮다.

제1 투여 3일 후, 종양을 절제하고 기계적으로 단일 세포 현탁액으로 분리했다.

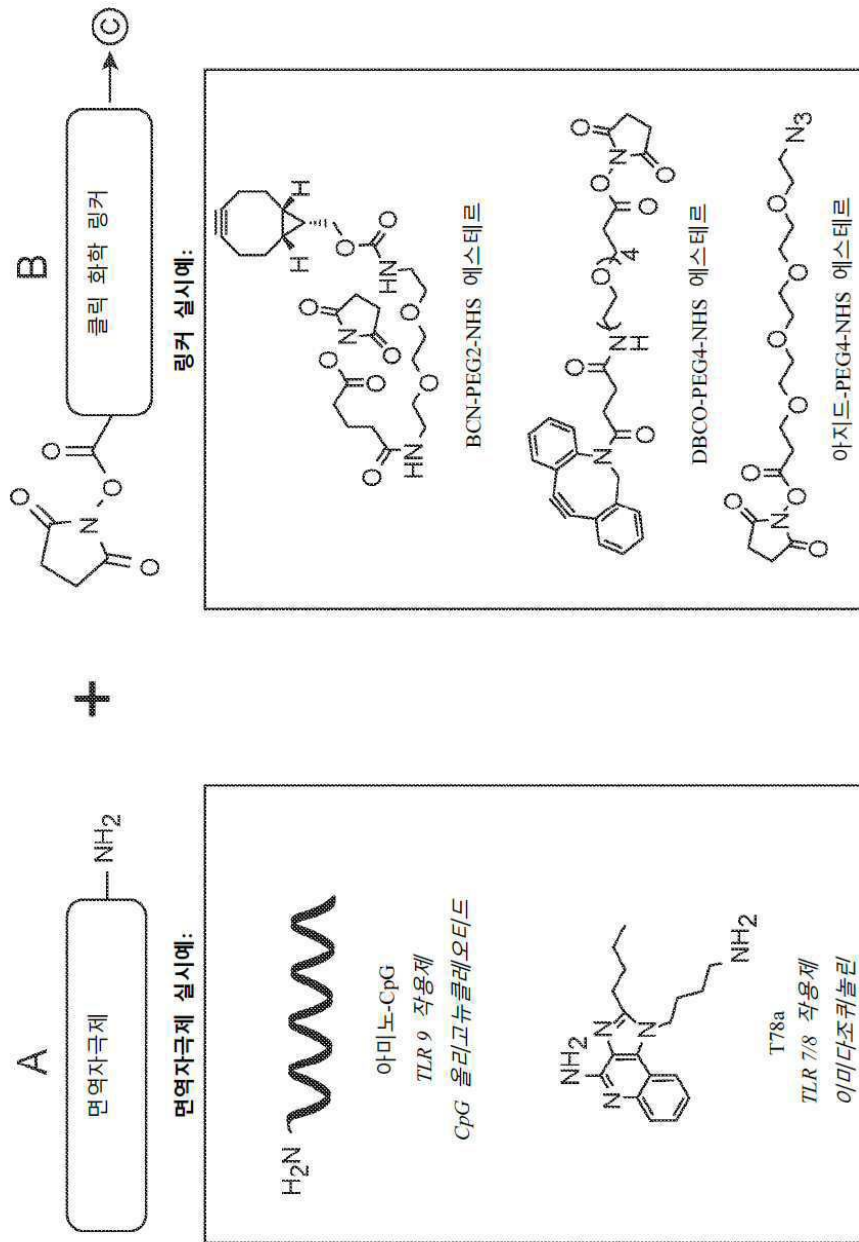
- [0177] 세포를 항체 염색 전에 LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain과 함께 배양했다. 세포를 인산완충식염수 (PBS), 1% 소 혈청 알부민 및 0.01% 아지드화나트륨에서 형광 표지 항체로 표면 염색하고, 2% 파라포름알데히드에 고정하고, 유세포 분석으로 분석했다. 데이터는 Cytobank([www.cytobank.org](http://www.cytobank.org))를 사용하여 저장되고 분석되었다.
- [0178] 데이터 분석을 위해, 세포는 생존 단일 세포만 포함하도록 게이팅되었다. 골수 유래 억제인자 세포(MDSC)는  $CD11b^+ GR1^+$ 로 특징화되었다. NK 세포는  $CD3^- CD49b^+$ 로 특징화되었다.  $CD8^+$  T 세포는  $CD3^+ CD8^+ CD49b^-$ 로 특징화되었다.  $CD4^+$  T 세포는  $CD3^+ CD4^+ CD49b^-$ 로 특징화되었다.  $CD8^+$  B 세포는  $CD3^- B220^+ CD49b^-$ 로 특징화되었다.
- [0179] 따라서, 상술한 내용은 단지 본 개시내용의 원리를 예시하는 것이다. 통상의 기술자는, 본원에 명시적으로 설명되거나 나타내지는 않았지만, 본 발명의 원리를 구현하고 이의 사상 및 범위에 포함되는 다양한 배열을 고안할 수 있는 것으로 이해될 것이다. 나아가, 본원에 인용된 모든 예 및 조건부 언어는 주로 독자가 본 발명의 원리와 본 발명자가 해당 분야를 발전시키기 위해 기여한 개념을 이해하도록 돕기 위한 것이며, 그러한 구체적으로 인용된 예 및 조건에 제한되지 않는 것으로서 해석되어야 한다. 나아가, 본 발명의 원리, 양태 및 실시양태뿐만 아니라 이들의 구체적인 예를 인용한 본원의 모든 설명은 이의 구조적 및 기능적 등가물 모두를 포함하는 것으로 의도된다. 또한, 그러한 등가물은, 현재 알려진 등가물 및 미래에 개발될 등가물, 즉 구조에 관계없이 동일한 기능을 수행하는 임의의 개발된 요소 모두를 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 본 발명의 범위는 본원에 나타내고 설명된 예시적인 실시형태에 제한되는 것이 아닌 것으로 의도된다.

도면

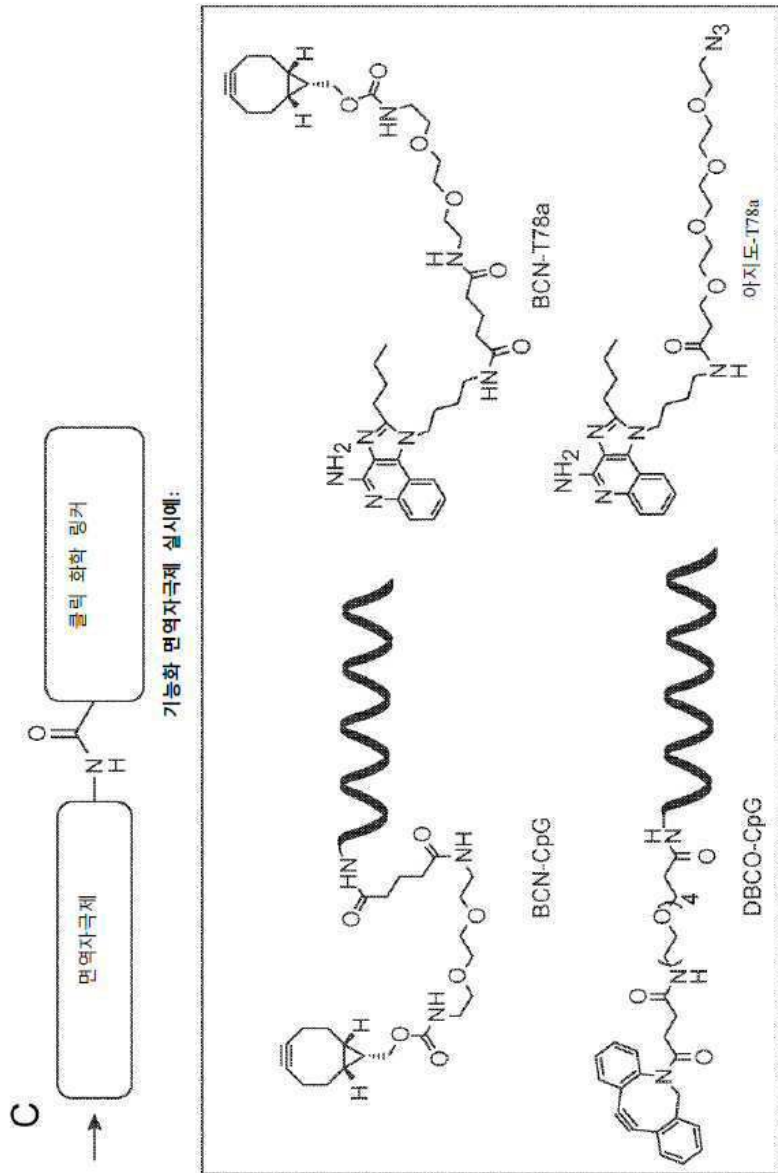
도면1



도면2

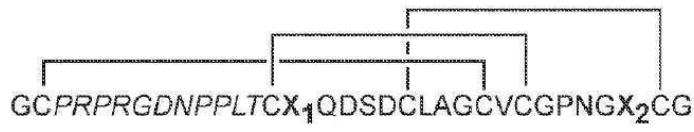


도면2c



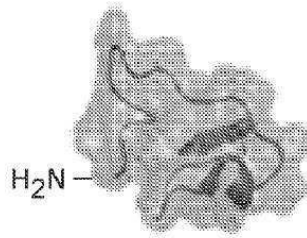
도면3

A

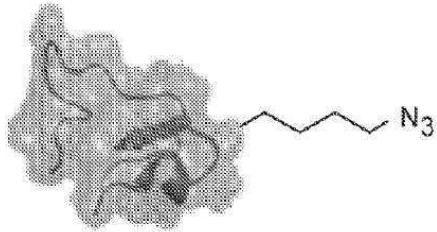


노틴	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	접합 부위:
2.5F	세린	페닐알라닌	N-말단
3CM	5-아지도-L-노르발린	티로신	N-말단 또는 X <sub>1</sub> 아지드

B

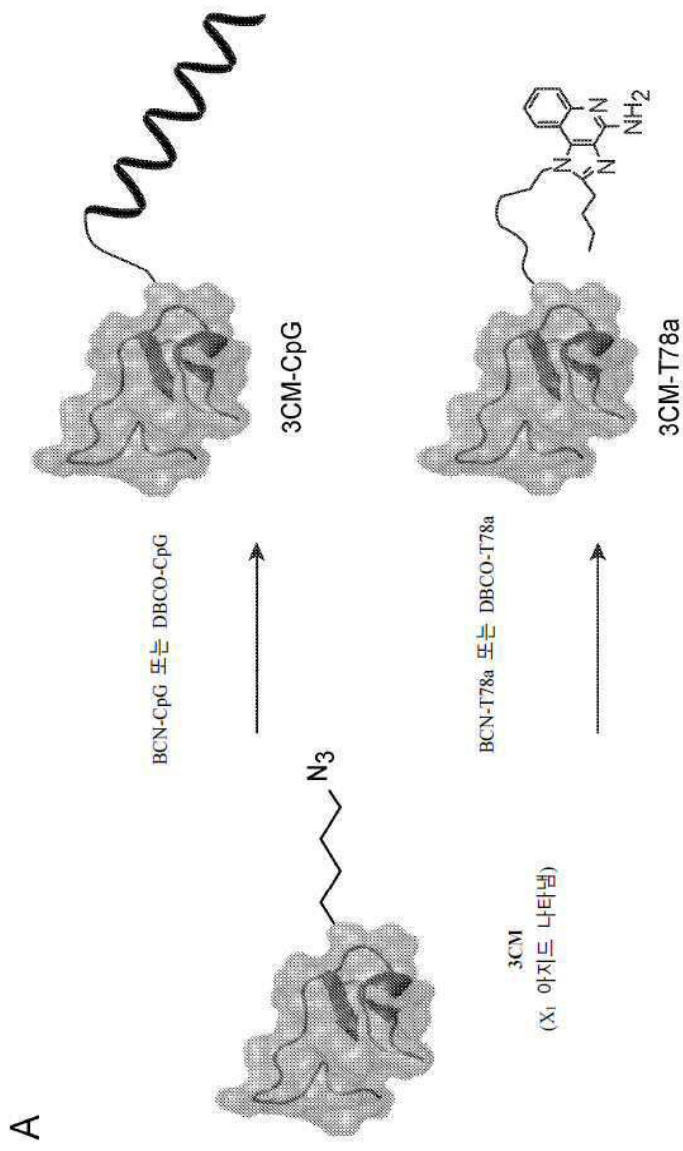


2.5F  
(N-말단 나타냄)

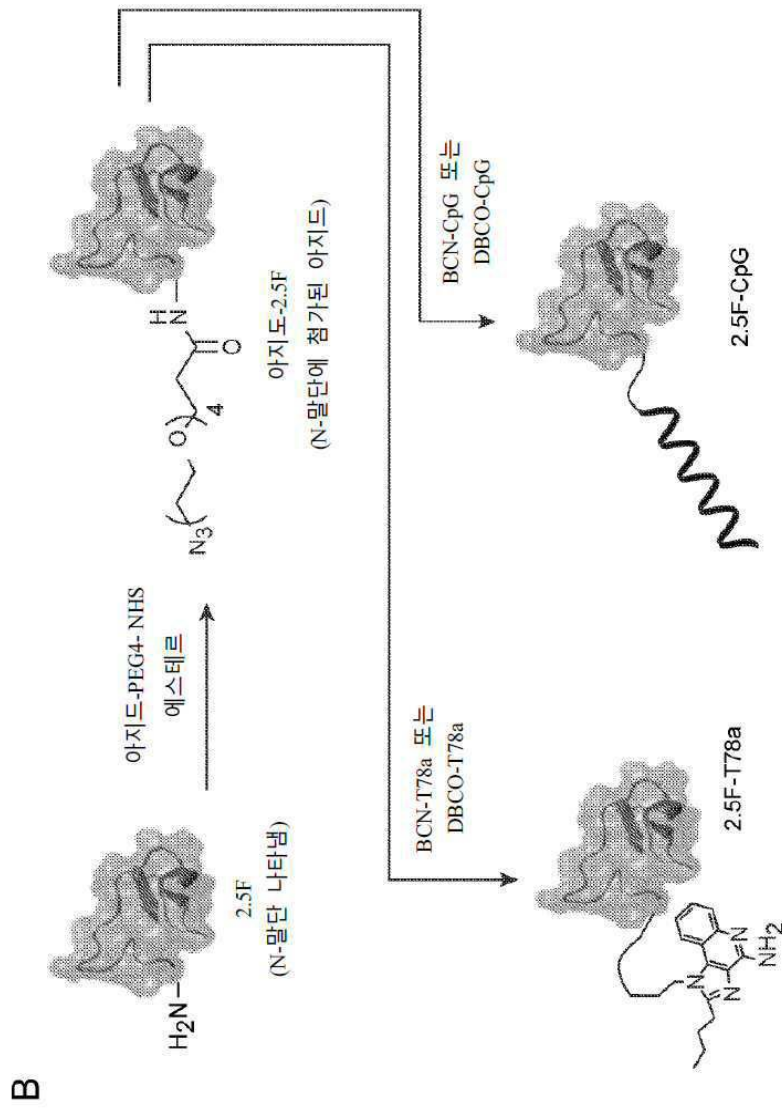


3CM  
(X<sub>1</sub> 아지드 나타냄)

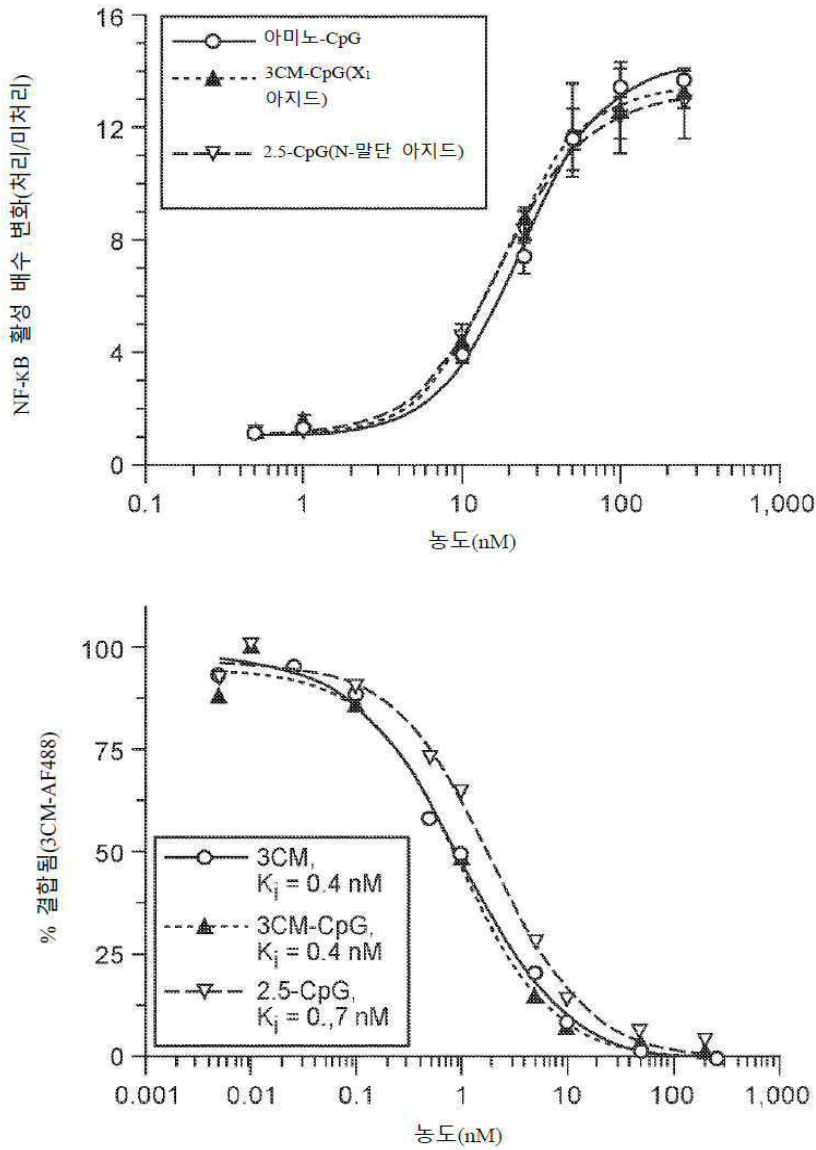
도면4



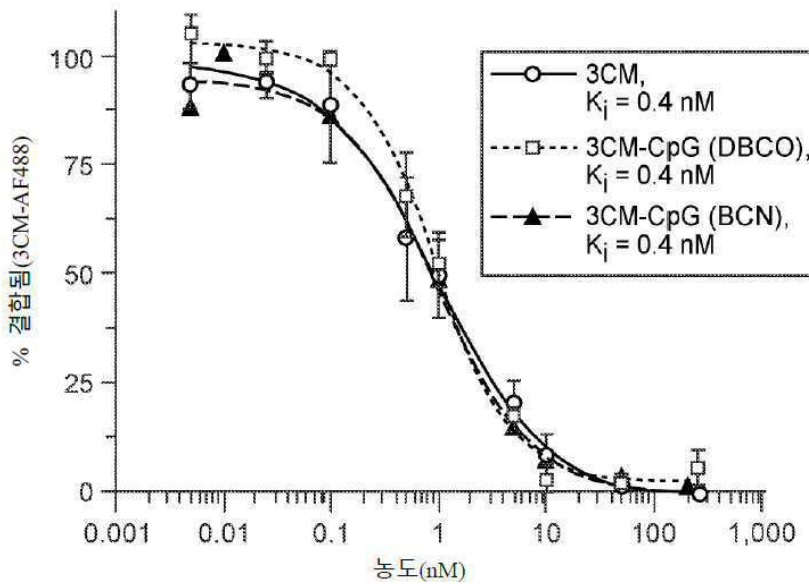
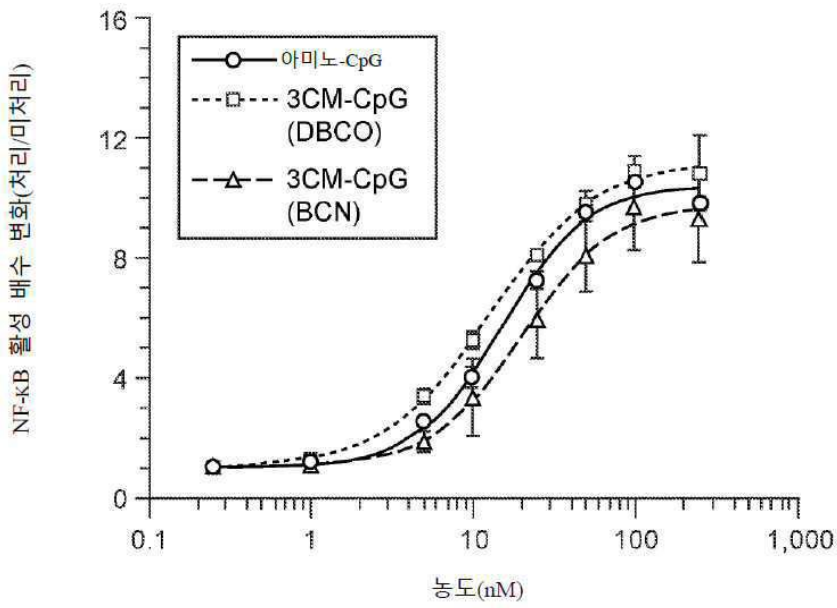
도면4c



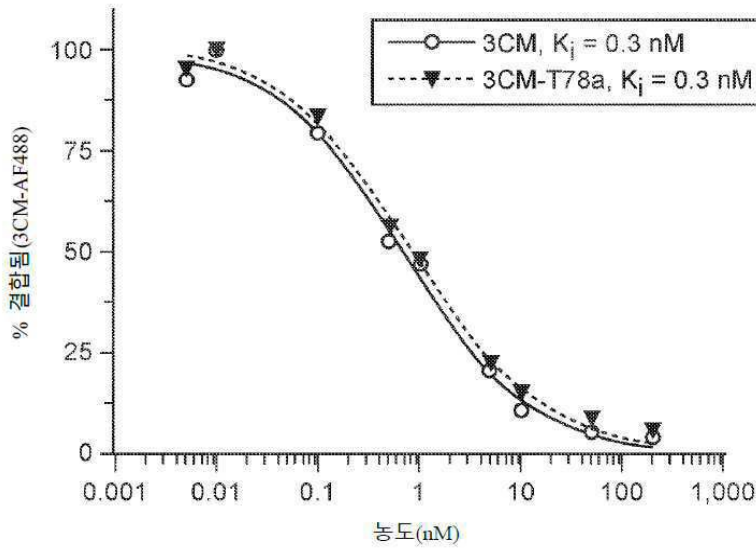
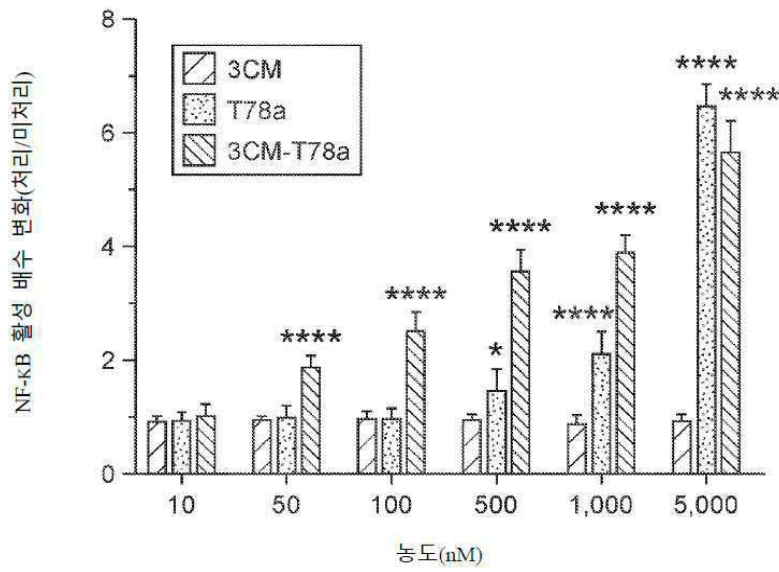
도면5



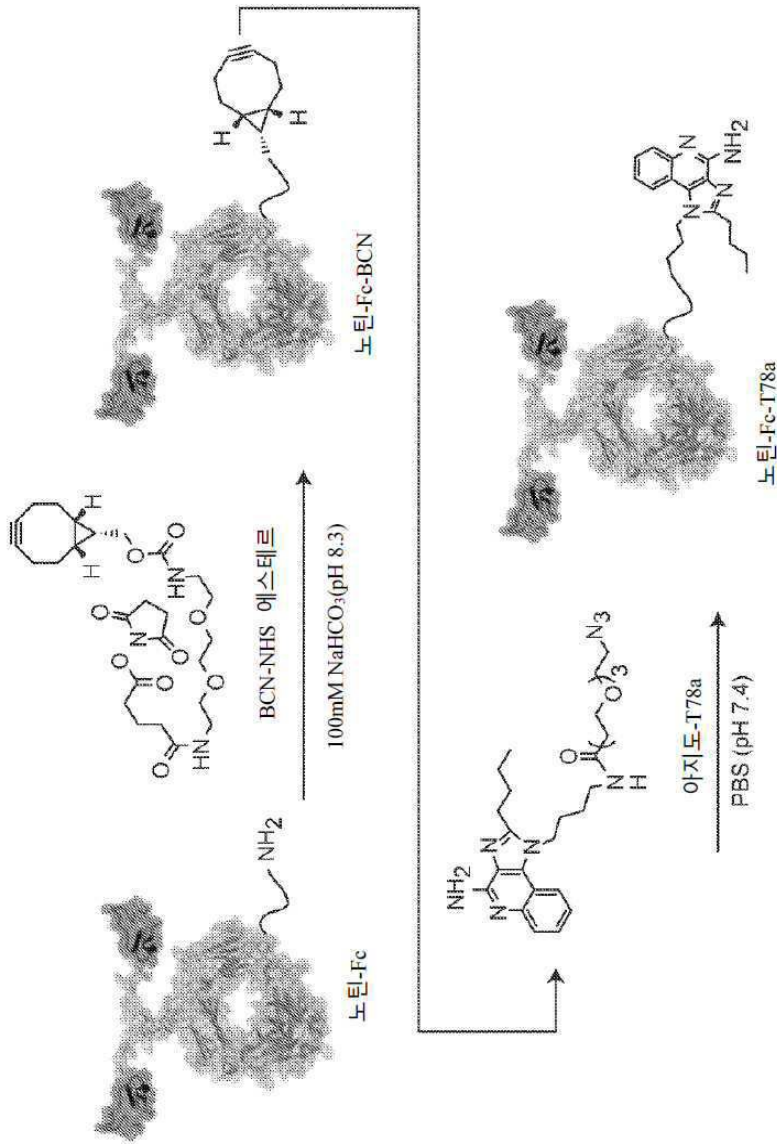
도면6



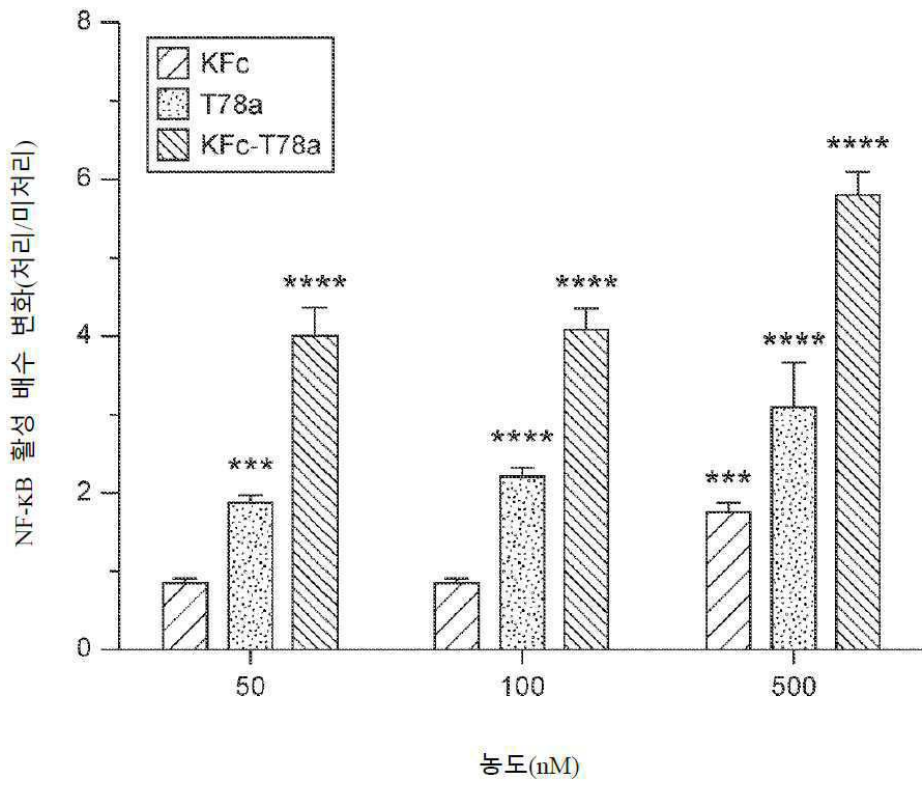
도면7



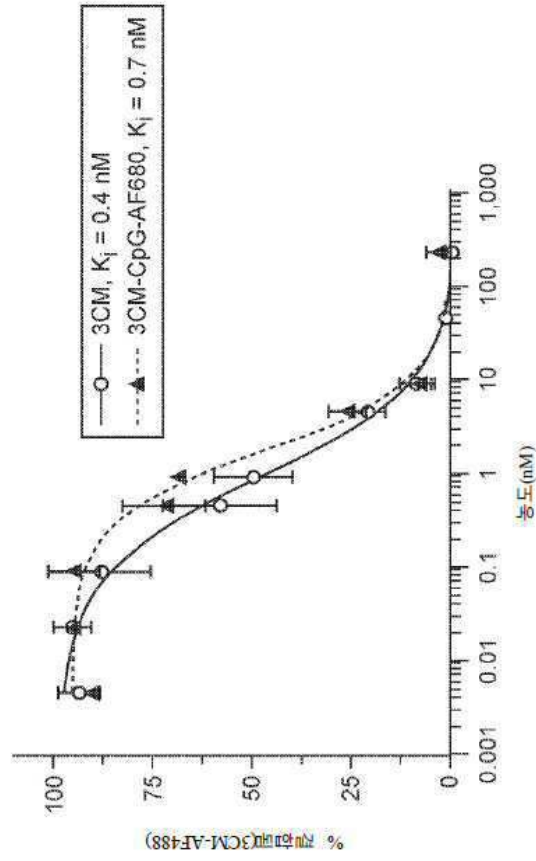
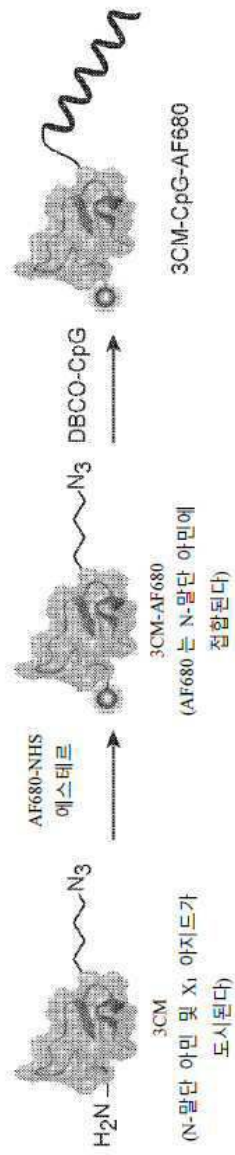
도면8



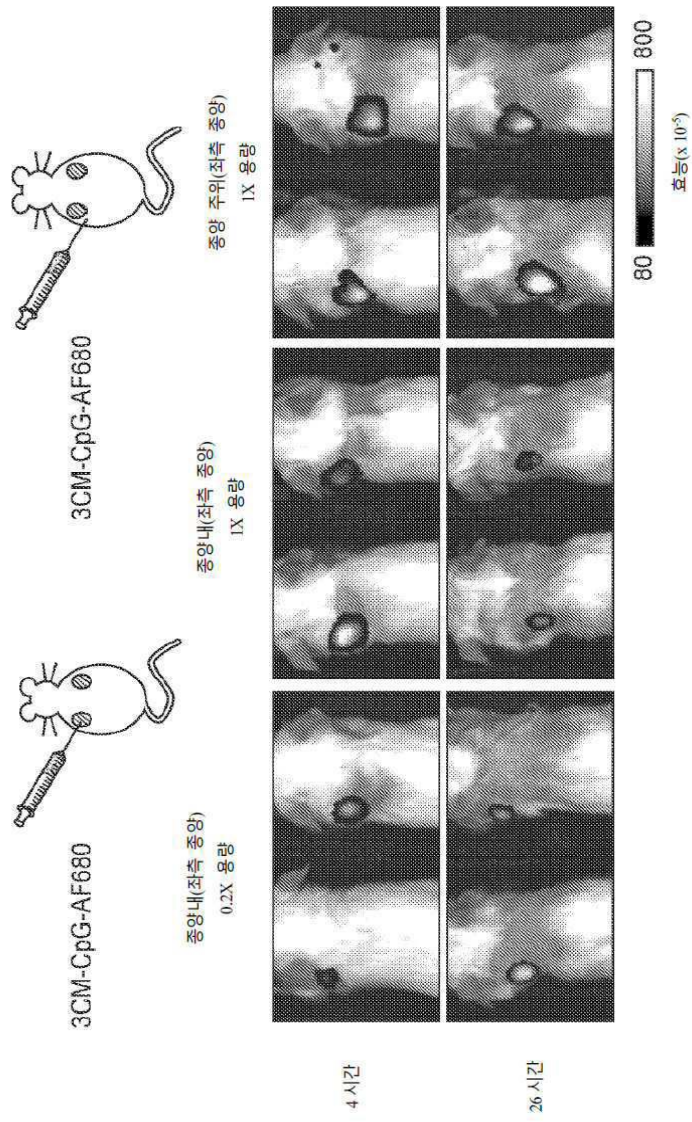
도면8c



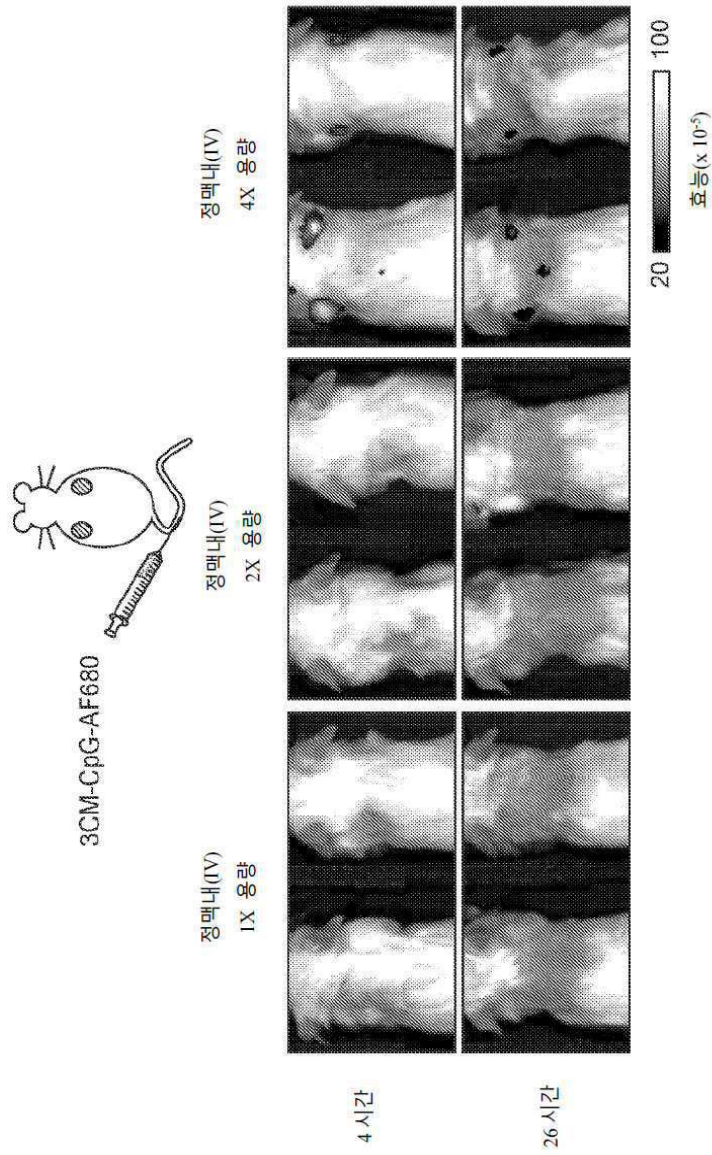
도면9



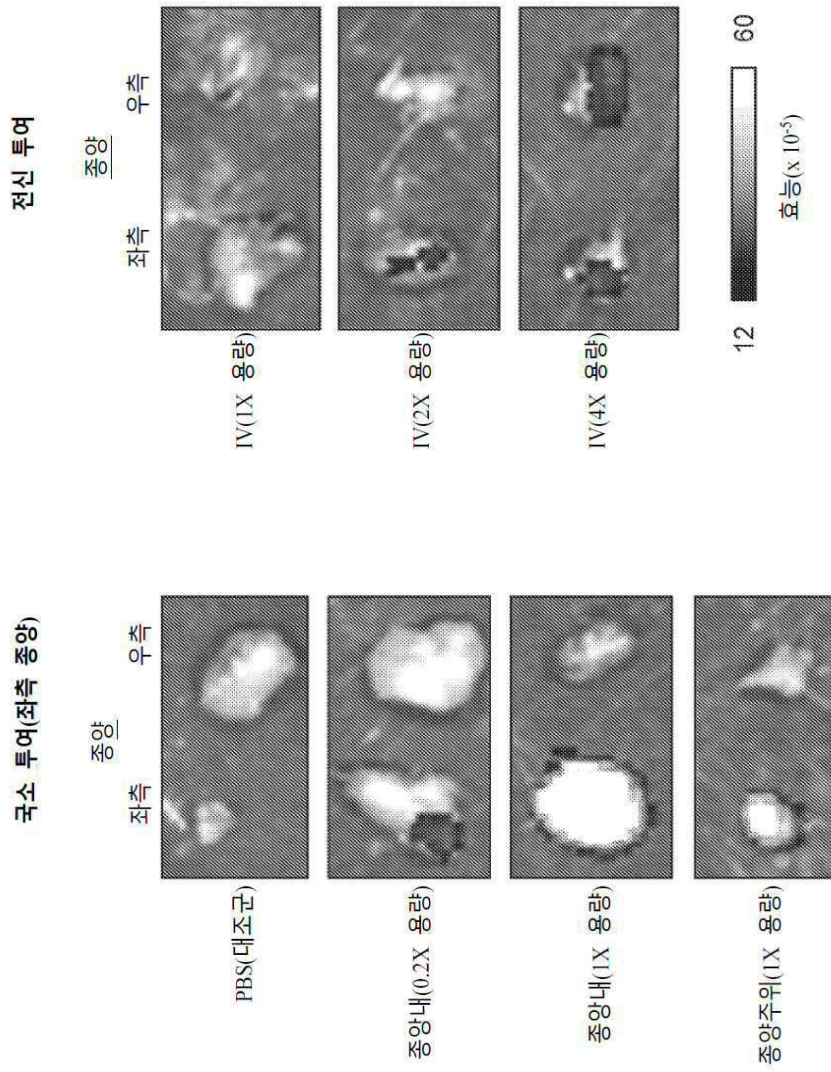
도면10



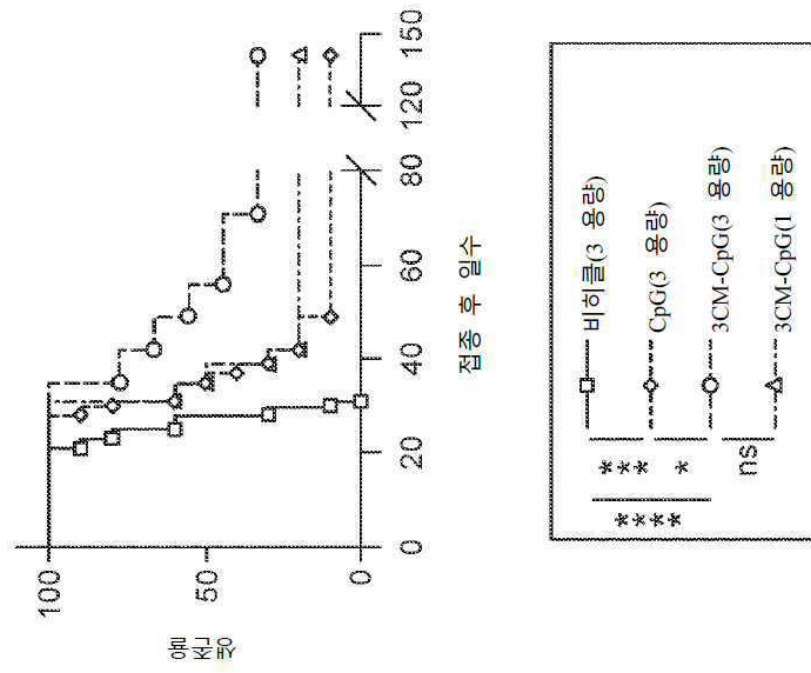
도면11



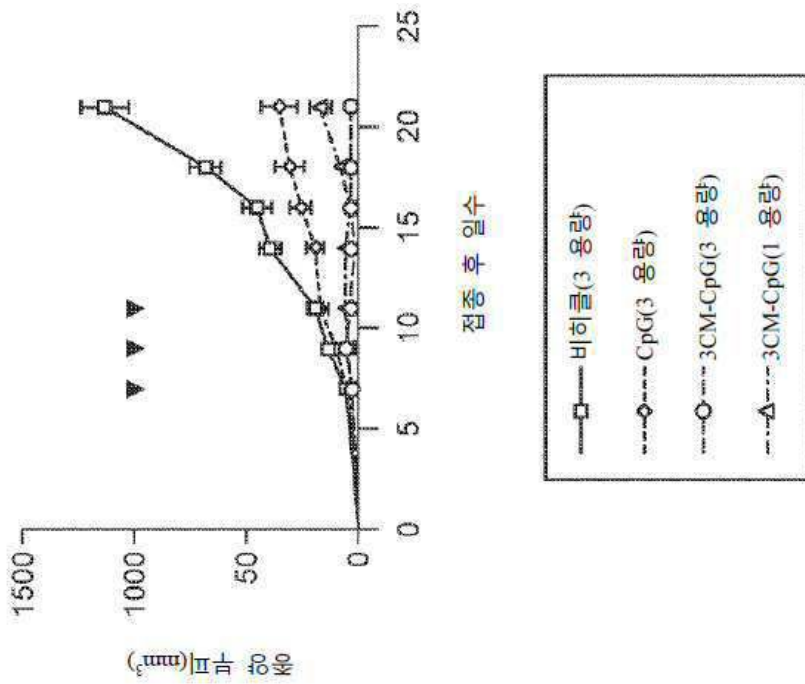
도면12



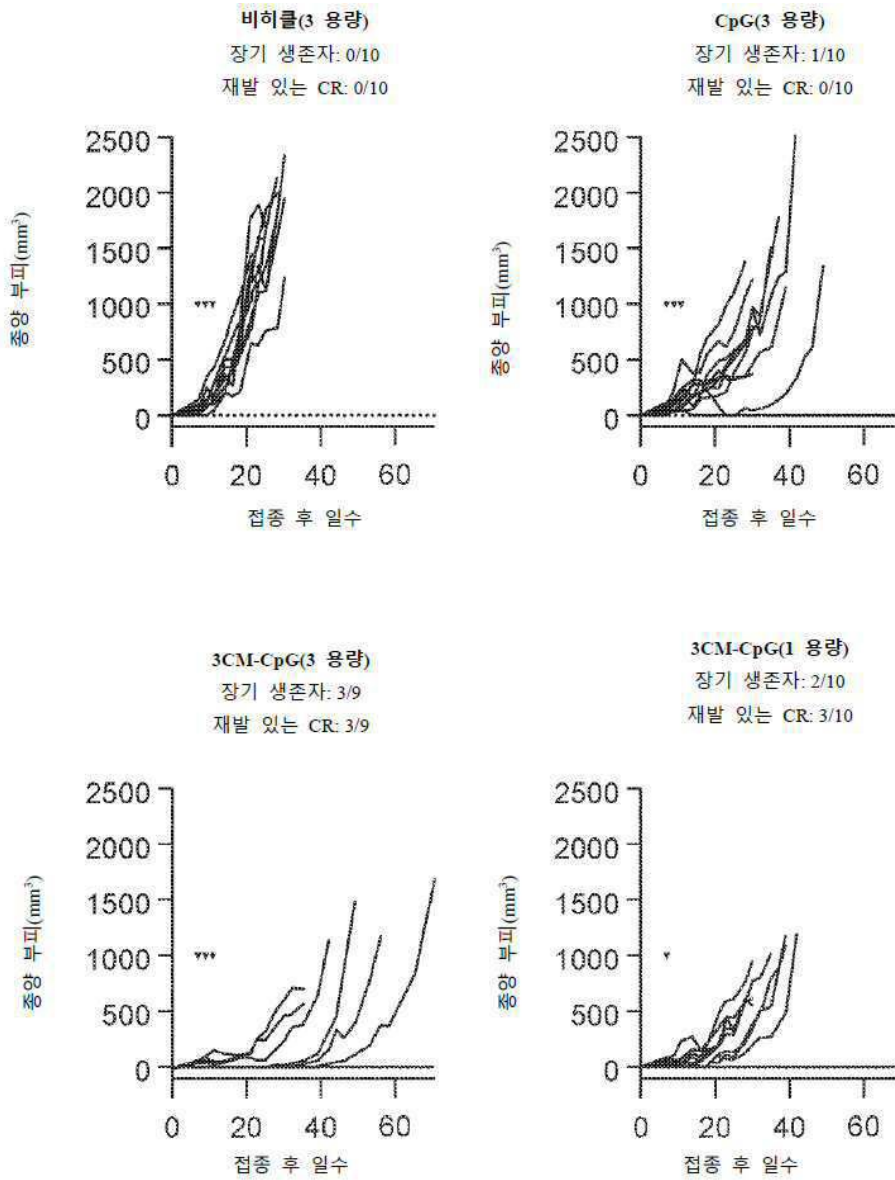
도면13



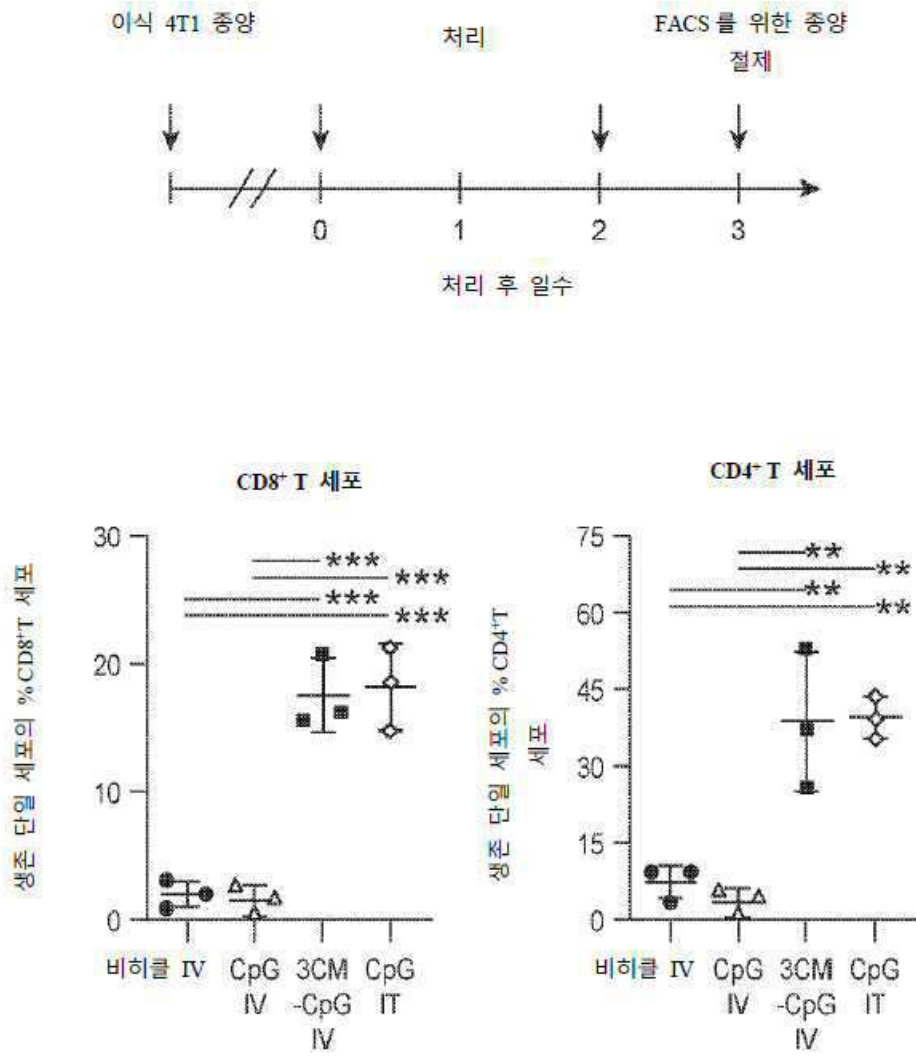
도면14



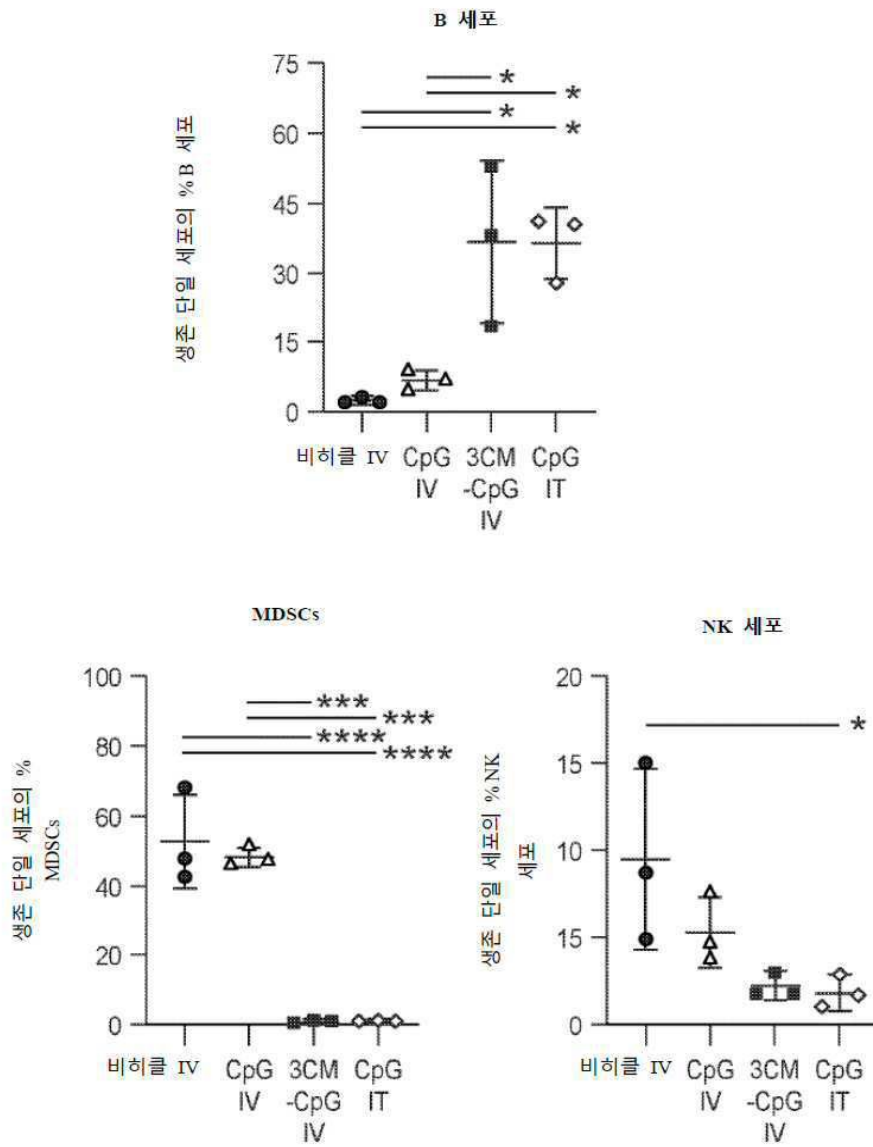
도면15



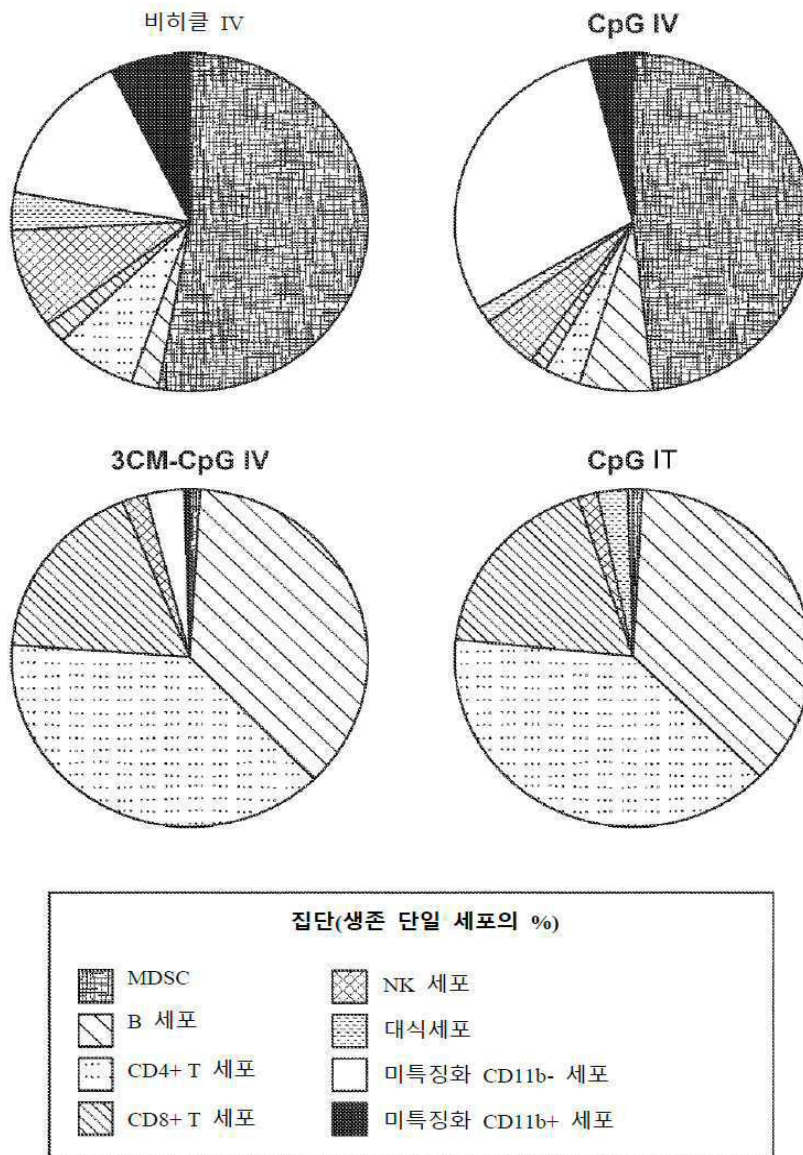
도면16



도면16c



도면17



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Board of Trustees of the Leland Stanford Junior  
 University  
 Miller, Caitlyn  
 Cochran, Jennifer R  
 Bertozzi, Carolyn R  
 Sagiv-Barfi, Idit  
 Levy, Ronald

<120> KNOTTIN-IMMUNOSTIMULANT CONJUGATES AND RELATED COMPOSITIONS AND

METHODS

<130> STAN-1651WO

<150> US 62/908,305

<151> 2019-09-30

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

tcgtcgtttt gtcgttttgt cggt 24

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

tccatgacgt tcctgacgtt 20

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 3

Gly Cys Pro Arg Ile Leu Met Arg Cys Lys Gln Asp Ser Asp Cys Leu

1 5 10 15

Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys Gly

20 25

<210> 4

<211> 34

<

212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 4

Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys Cys

1                    5                    10                    15

Asp Pro Ala Ala Thr Cys Tyr Cys Arg Phe Phe Asn Ala Phe Cys Tyr

                  20                    25                    30

Cys Arg

<210> 5

<211> 29

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 5

Cys Gly Glu Thr Cys Val Gly Gly Thr Cys Asn Thr Pro Gly Cys Thr

1                    5                    10                    15

Cys Ser Trp Pro Val Cys Thr Arg Asn Gly Leu Pro Val

                  20                    25

<210> 6

<211> 34

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 6

Ser Gly Ser Asp Gly Gly Val Cys Pro Lys Ile Leu Lys Lys Cys Arg

1                    5                    10                    15

Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Ala Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr

                  20                    25                    30

Cys Gly

<210> 7

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 7

Met Cys Met Pro Cys Phe Thr Thr Asp His Gln Met Ala Arg Lys Cys

1                    5                    10                    15

Asp Asp Cys Cys Gly Gly Lys Gly Arg Gly Lys Cys Tyr Gly Pro Gln

                  20                    25                    30

Cys Leu Cys Arg

                  35

<210> 8

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 8

Gly Cys Pro Gln Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Thr Ser Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 9

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 9

Gly Cys Pro Arg Pro Arg Gly Asp Asn Pro Pro Leu Thr Cys Ser Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Leu Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 10

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 10

Gly Cys Pro Arg Pro Arg Gly Asp Asn Pro Pro Leu Thr Cys Glx Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Leu Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Tyr Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 11

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 11

Gly Cys Ala Glu Pro Arg Gly Asp Met Pro Trp Thr Trp Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Leu Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 12

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 12

Gly Cys Val Gly Gly Arg Gly Asp Trp Ser Pro Lys Trp Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Pro Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 13

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 13

Gly Cys Ala Glu Leu Arg Gly Asp Arg Ser Tyr Pro Glu Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Leu Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 14

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 14

Gly Cys Arg Leu Pro Arg Gly Asp Val Pro Arg Pro His Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Gln Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 15

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 15

Gly Cys Tyr Pro Leu Arg Gly Asp Asn Pro Tyr Ala Ala Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15  
 Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys  
                          20                    25                    30

Gly

<210> 16

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 16

Gly Cys Thr Ile Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Ser Glu Cys Lys Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Ser Asp Cys Leu Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys  
                          20                    25                    30

Gly

<210> 17

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 17

Gly Cys His Pro Pro Arg Gly Asp Asn Pro Pro Val Thr Cys Lys Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Ser Asp Cys Leu Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys  
                          20                    25                    30

Gly

<210> 18

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 18

Gly Cys Pro Glu Pro Arg Gly Asp Asn Pro Pro Pro Ser Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 19

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 19

Gly Cys Leu Pro Pro Arg Gly Asp Asn Pro Pro Pro Ser Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Gln Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 20

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 20

Gly Cys His Leu Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Val Gly Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Pro Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 21

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 21

Gly Cys Asn Val Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Ser Glu Cys Lys Gln  
 1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Pro Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys  
                   20                    25                    30

Gly

<210> 22

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 22

Gly Cys Phe Pro Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Ser Ser Cys Lys Gln  
 1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys  
                   20                    25                    30

Gly

<210> 23

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 23

Gly Cys Pro Leu Pro Arg Gly Asp Asn Pro Pro Thr Glu Cys Lys Gln  
 1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Gln Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys  
                   20                    25                    30

Gly

<210> 24

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 24

Gly Cys Ser Glu Ala Arg Gly Asp Asn Pro Arg Leu Ser Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 25

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 25

Gly Cys Leu Leu Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Glu Ala Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 26

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 26

Gly Cys His Val Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Leu Lys Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15  
 Asp Ser Asp Cys Gln Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys  
                          20                    25                    30

Gly

<210> 27

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 27

Gly Cys Val Arg Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Pro Ser Cys Lys Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Ser Asp Cys Pro Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys  
                          20                    25                    30

Gly

<210> 28

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 28

Gly Cys Leu Gly Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Pro Ala Cys Lys Gln  
 1                    5                    10                    15  
 Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys  
                          20                    25                    30

Gly

<210> 29

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 29

Gly Cys Phe Val Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Leu Thr Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Gln Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 30

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 30

Gly Cys Pro Val Gly Arg Gly Asp Trp Ser Pro Ala Ser Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 31

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 31

Gly Cys Pro Arg Pro Arg Gly Asp Asn Pro Pro Leu Thr Cys Lys Gln

1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Leu Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

                  20                    25                    30

Gly

<210> 32

<211> 33  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220><223> synthetic sequence  
<400> 32

Gly Cys Tyr Gln Gly Arg Gly Asp Trp Ser Pro Ser Ser Cys Lys Gln  
1                   5                   10                   15  
Asp Ser Asp Cys Pro Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys  
                  20                   25                   30  
Gly

<210> 33  
<211> 33  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220><223> synthetic sequence  
<400> 33

Gly Cys Ala Pro Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Ser Glu Cys Lys Gln  
1                   5                   10                   15  
Asp Ser Asp Cys Gln Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys  
                  20                   25                   30  
Gly

<210> 34  
<211> 33  
<212> PRT  
<213> Artificial sequence  
<220><223> synthetic sequence  
<400> 34

Gly Cys Val Gln Gly Arg Gly Asp Trp Ser Pro Pro Ser Cys Lys Gln  
1                   5                   10                   15  
Asp Ser Asp Cys Pro Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

20 25 30

Gly

<210> 35

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 35

Gly Cys His Val Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Glu Glu Cys Lys Gln

1 5 10 15

Asp Ser Asp Cys Gln Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

20 25 30

Gly

<210> 36

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 36

Gly Cys Asp Gly Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Pro Ala Cys Lys Gln

1 5 10 15

Asp Ser Asp Cys Arg Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys

20 25 30

Gly

<210> 37

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 37

Gly Cys Pro Gln Gly Arg Gly Asp Trp Ala Pro Glu Trp Cys Lys Gln  
 1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Pro Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys  
                   20                    25                    30

Gly

<210> 38

<211> 33

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 38

Gly Cys Pro Arg Gly Arg Gly Asp Trp Ser Pro Pro Ala Cys Lys Gln  
 1                    5                    10                    15

Asp Ser Asp Cys Gln Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro Asn Gly Phe Cys  
                   20                    25                    30

Gly

<210> 39

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 39

Gly Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys  
 1                    5                    10                    15

Cys Asp Pro Ala Ala Thr Cys Tyr Cys Ser Gly Arg Gly Asp Asn Asp  
                   20                    25                    30

Leu Val Cys Tyr Cys Arg

35

<210> 40

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> synthetic sequence

<400> 40

Gly Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys

1                    5                    10                    15

Cys Asp Pro Ala Ala Thr Cys Tyr Cys Lys Gly Arg Gly Asp Ala Arg

                  20                    25                    30

Leu Gln Cys Tyr Cys Arg

                  35

<210> 41

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 41

Gly Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys

1                    5                    10                    15

Cys Asp Pro Ala Ala Thr Cys Tyr Cys Val Gly Arg Gly Asp Asp Asn

                  20                    25                    30

Leu Lys Cys Tyr Cys Arg

                  35

<210> 42

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 42

Gly Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys

1                    5                    10                    15

Cys Asp Pro Ala Ala Thr Cys Tyr Cys Glu Gly Arg Gly Asp Arg Asp

                  20                    25                    30

Met Lys Cys Tyr Cys Arg

35

<210> 43

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 43

Gly Cys Val Arg Leu His Glu Ser Cys Leu Gly Gln Gln Val Pro Cys

1                    5                    10                    15

Cys Asp Pro Ala Ala Thr Cys Tyr Cys Tyr Gly Arg Gly Asp Asn Asp

                  20                    25                    30

Leu Arg Cys Tyr Cys Arg

35

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 44

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1                    5                    10                    15

<210> 45

<211> 227

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

