

발명의 설명

발명의 명칭: 피브로넥틴 엑스트라도메인 B (EXTRADOMAIN B OF FIBRONECTIN, EDB-FN) 및 전환성장인자 베타(TRANSFORMING GROWTH FACTOR β , TGF β)에 특이적으로 결합하는 융합 단백질 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 피브로넥틴 엑스트라도메인 B (Extr domain B of Fibronectin, EDB-FN) 및 전환성장인자 베타(transforming growth factor β , TGF β)에 특이적으로 결합하는 융합 단백질 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드 및 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 포함하는 융합 단백질 및 이의 용도에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] TGF β 의 주요 기능 중 하나는 면역 세포, 특히 효과적인 항종양 면역 반응에 중요한 CD8⁺ 세포독성 T 세포의 활성화와 침윤을 억제하는 것이다. TGF β 는 면역 내성을 향상시키는 조절 T 세포(Treg)의 분화를 촉진하여 이러한 면역 억제 기능을 수행한다. 또한 종양 관련 대식세포(TAM)와 암 관련 섬유아세포(CAF)의 면역 억제 활동을 유지하는데, 이 두 세포는 모두 암 미세환경(TME)의 면역 억제 및 탈형성(기질 풍부) 특성에 기여한다. 이러한 기질 세포는 면역 반응을 억제할 뿐만 아니라 세포 외 기질(ECM)의 강성과 밀도를 높여 면역 세포 침윤을 더욱 억제하는 물리적 장벽을 형성하는 데도 기여한다. 또한 TGF β 신호는 종양 세포가 침습성과 전이성을 획득하는 과정인 상피에서 중간엽 전이(EMT)를 촉진하는 데 중추적인 역할을 수행한다. TGF β 에 의해 주도되는 EMT는 종양 세포의 이동성을 높이고 세포 사멸에 저항하며 면역 탐지를 회피할 수 있게 하여 전이와 암 진행을 촉진한다고 알려져 있다(Derynck R, et al., Nat. Rev. Clin. Oncol. Vol. 18(1), pp. 9-34, 2021; Hao Y, et al., Int. J. Mol. Sci. Vol. 20(11):2767, 2019).
- [4] 이러한 기능을 고려할 때, 전신 독성을 최소화하면서 종양 촉진 및 면역 억제 효과를 방해하려면 TME 내에서 TGF β 를 억제하는 것이 필수적이다. 특히 융합 단백질 또는 항체 접합체를 사용하여 ECM을 표적으로 하는 종양 특이적 TGF β 억제는 기질 강성을 줄이고 면역 세포 침윤을 증가시키며 체크포인트 억제제와 같은 면역 기반 치료의 효능을 향상시킴으로써 TME를 효과적으로 재프로그래밍할 수 있다. 따라서 TME 내에서 TGF β 를 억제하면 면역 공격으로부터 종양을 보호하는 면역 억제 상태를 역전시키고 암세포의 전이 및 침습 특성을 억제하는 두 가지 이점을 제공한다. 이러한 효과로 인해 종양 특이적 TGF β 억제제는 암, 특히

TME가 질병 진행에 중요한 역할을 하는 고형 종양에서 유망한 치료 전략으로 떠오르고 있다(Karin E. de Visser et al., Vol. 41(3), pp. 374-403, 2023).

- [5] 한편, 췌관 선암종(PDAC)은 가장 치명적인 암 중 하나로, 췌관 내에 치밀한 섬유성 장벽을 형성하여 물리적 및 면역 억제 문제를 유발하는 탈형성증이 특징이다. 이 치밀한 기질은 면역 관문 억제제(ICI)를 포함한 기존 치료법의 효능을 방해하는데, 다른 암에서는 성공을 보였지만 ECM의 견고한 특성으로 인해 PDAC에는 대부분 효과가 없었다. 따라서 PDAC 환자의 치료 결과를 개선하기 위해서는 ECM을 표적으로 삼는 것이 매우 중요해진 실정이다.
- [6] ECM에서 발견되는 당단백질인 피브로넥틴은 암 진행, 특히 PDAC에서 중요한 역할을 한다. 이 단백질의 동형체 중 엑스트라 도메인 B(EDB-FN)는 악성 조직에서 다시 발현되어 종양 성장, 혈관 신생 및 면역 회피를 지원한다. EDB-FN은 췌장암, 폐암, 전립선암 등 다양한 종양에서 과발현되는 반면, 정상 성인 조직에서는 거의 존재하지 않아 종양 특이적 치료의 매력적인 표적이 된다. ECM 내에서 EDB-FN을 표적으로 삼으면 몇 가지 이점이 있는데, 이 영역에 집중함으로써 치료법을 TME에 국한시켜 표적 이탈 효과를 최소화하고 종양 침투를 개선할 수 있다. 또한 피브로넥틴과 콜라겐 가교 결합으로 인한 ECM의 경직은 면역 세포의 침투를 방해하는 물리적 장벽을 생성하고, 이러한 경직성은 TGFβ와 같은 사이토카인을 가두어 면역 억제 효과를 악화시킨다. 연구에 따르면 항 PD-1과 같은 면역 체크포인트 억제제가 효과가 있어야 하는 암에서 딱딱한 ECM이 종양을 면역 공격으로부터 격리시켜 치료 효과를 감소시키는 것으로 보고되었다(Principe DR. et al., Cancers. Vol. 13(20):5086, 2021; Perez VM. et al., Front. Oncol. Vol. 11:751311, 2021). 따라서 PDAC와 같은 섬유성 종양에서 면역 기반 치료의 잠재력을 실현하려면 TGFβ를 억제하면서 ECM 강성을 감소시키는 이중 표적 전략이 중요한 실정이다.
- [7] EDB-FN 표적 모티프(예: L19 scFv 또는 항-EDB 항체)와 TGFβ-Trap을 결합하는 구조는 EDB-FN 결합을 통해 TGFβ-Trap을 ECM에 고정함으로써 TME 내에서 직접 TGFβ 억제를 국소화하여 전신적 효과가 아닌 국소적 효과를 보장할 것으로 예상된다. 따라서 부작용을 최소화하는 동시에 항종양 면역 반응을 강화할 수 있다. 이러한 융합 단백질은 면역 요법에 대한 ECM의 내성을 극복하여 “차가운” 종양(면역학적으로 비활성)을 “뜨거운” 종양(면역학적으로 활성)으로 전환하여 면역 체크포인트 차단에 더 취약하게 만들 수 있다.
- [8] 하지만, 현재까지 상기와 같은 구조의 융합 단백질 또는 이중 항체는 알려진 바가 없으며, 단지 L19(EDB Ab)-IL12, L19-IL9(Aliyah BS et al., Trends in Pharmacological Sciences, Vol. 42(12), pp. 1064-81, 2021), LTBR-EDB 다중 항체(KR 2022-0130687) 및 TGFβ-Trap-PD-L1(Lind H, et al., J. Immunother. Cancer. Vol. 8(1):e000433, 2020) 등이 알려져 있을 뿐이다.
- [9] 이러한 기술적 배경 아래에서, 본 발명자들은 EDB-FN 표적 모티프와 TGFβ에 동시에 결합하여 뛰어난 항암 효능을 갖는 융합 단백질을 개발하기 위해 예의 노

력한 결과, EDF-FN에 특이적으로 결합하는 TGFβ에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 Fc를 중심으로 융합할 경우, 뛰어난 항암 효과를 나타내는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[10] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상시키기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

[11]

[12] **발명의 요약**

[13] 본 발명의 목적은 피브로넥틴 엑스트라도메인 B (Extr domain B of Fibronectin, EDB-FN) 및 전환성장인자 베타(transforming growth factor β, TGFβ)에 특이적으로 결합하는 융합 단백질을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 핵산을 포함하는 재조합 발현벡터 또는 상기 핵산 또는 발현 벡터가 도입된 세포를 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 융합 단백질의 제조방법을 제공하는 것이다.

[17] 본 발명의 또 다른 목적은 융합 단백질을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[18] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 피브로넥틴 엑스트라도메인 B (Extr domain B of Fibronectin, EDB-FN)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 (b) 전환성장인자 베타(transforming growth factor β, TGFβ)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 를 포함하는 융합 단백질을 제공한다.

[19] 본 발명은 또한, 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 제공한다.

[20] 본 발명은 또한, 상기 핵산을 포함하는 재조합 발현벡터를 제공한다.

[21] 본 발명은 또한, 상기 재조합 발현벡터로 형질감염된 숙주세포를 제공한다.

[22] 본 발명은 또한, 상기 숙주세포를 배양하여 융합 단백질을 생성하는 단계; 및 생성된 융합 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 상기 융합 단백질의 제조방법을 제공한다.

[23] 본 발명은 또한, 상기 융합 단백질을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[24]

도면의 간단한 설명

[25] 도 1a는 인간 유전체 영역에서 Fibronectin 전사체를 분석한 결과이다.

[26] 도 1b는 TCGA 및 GTEx 데이터베이스를 이용하여 EDB 엑손과 전체 FN1 유전자의 발현을 암환자와 정상인에서 분석한 결과이다.

[27] 도 2a 내지 f는 TCGA 데이터베이스에서 FN1 EDB+ 유전자 발현과 예후의 연관성을 분석한 결과로서, ACC는 선양낭성암(adenoid cystic carcinoma), BLCA

는 방광 요로상피세포암(Bladder Urothelial Carcinoma), BRCA는 전이성 유방암(Breast invasive carcinoma), CHOL은 담관암(Cholangiocarcinoma), COAD는 대장암(Colon adenocarcinoma), DLBC는 림프종 중양 미만성 거대 B세포 림프종(Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma), ESCA는 식도암(Esophageal carcinoma), GBM은 교모세포종(Glioblastoma multiforme), HNSC는 두경부 편평상피세포암(Head and Neck squamous cell carcinoma), KICH는 발색성 신세포 암종(Kidney Chromophobe), KIRC는 투명세포형 신세포암(Kidney renal clear cell carcinoma), KIRP는 유두상 신세포암(Kidney renal papillary cell carcinoma), LGG는 저등급성 신경교종(Brain Lower Grade Glioma), LIHC는 간암(Liver hepatocellular carcinoma), LUAD는 폐선암(Lung adenocarcinoma), LUSC는 폐 편평세포암(Lung squamous cell carcinoma), MESO는 중피종(Mesothelioma), OV는 난소 장액낭샘암종(Ovarian serous cystadenocarcinoma), PAAD는 췌장암(Pancreatic adenocarcinoma), SARC는육종(Sarcoma), STAD는 위암(Stomach adenocarcinoma) 및 UVM은 포도막흑색종(Uveal Melanoma)을 의미한다.

- [28] 도 3은 FN1 EDB 도메인의 인간, 원숭이, 쥐 및 생쥐의 서열정렬 결과이다.
- [29] 도 4는 동소이식된 11개의 종양 조직 및 정상 조직에서 FN1-EDB+ 전사체의 발현 수준을 비교한 결과이다.
- [30] 도 5a 및 b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 FEBM과 TGFβ Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질의 정제 결과로서, 마커와 레인 1로 표시된 부분은 SDS-PAGE 결과이고, 그래프로 표시된 부분은 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 결과이다.
- [31] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 FEBM과 TGFβ Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질의 EDB-FN과 TGF-β1 동시 결합 수준을 평가한 결과이다.
- [32] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 FEBM과 TGFβ Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질의 4T-1 동소이식된 마우스 모델에서 조직별 분포를 확인한 결과이다.
- [33] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 FEBM과 TGFβ Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 유방암 동소이식 모델에서의 종양 성장률을 분석한 결과로서, 8a는 각 융합 단백질에 의한 시간에 따른 종양 부피를 측정한 결과이고, 8b는 각 융합 단백질에 의한 25일째 성장율을 측정한 결과이다. 각각의 데이터는 $\pm$ s.e.m을 의미하고; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 을 의미하며; NS는 not significant를 의미하고; two-way ANOVA with post hoc Bonferroni t-test로 분석한 결과이다.
- [34] 도 9는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 FEBM과 TGFβ Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 유방암 동소이식 모델에서의 폐 전이율을 분석한 결과이다. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 를 의미하며; two-way ANOVA with post hoc Bonferroni t-test로 분석한 결과이다.

- [35] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 FEBM과 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 유방암 동소이식 모델에서의 생존율을 측정한 결과이다. $**P < 0.01$, $****P < 0.0001$ 를 의미하며; two-way ANOVA with log-rank test로 분석한 결과이다.
- [36] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 FEBM과 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 유방암 동소이식 모델에서의 종양 경계부위와 중심부위의 α -SMA 발현량을 측정한 결과로서, 왼쪽 패널은 종양 경계부위, 오른쪽 패널은 종양 중심부의 알파 SMA 염색 정량화 결과이다. 각각의 데이터는 $\pm$ s.e.m을 의미하고; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ 을 의미하며; NS는 not significant를 의미하고; two-way ANOVA with post hoc Bonferroni *t*-test로 분석한 결과이다.
- [37] 도 12는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 FEBM과 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 유방암 동소이식 모델에서의 Smad2 인산화 양과 CD8 발현량을 측정한 결과로서, A는 Smad2의 인산화 양, B는 CD8 발현량을 측정한 결과이다. 각각의 데이터는 $\pm$ s.e.m을 의미하고; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ 을 의미하며; NS는 not significant를 의미하고; two-way ANOVA with post hoc Bonferroni *t*-test로 분석한 결과이다.
- [38] 도 13a 및 b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 Anti-EDB-FN antibody, TGF β Trap 및 hFc를 포함하는 융합 단백질의 정제 결과로서, 마커와 레인 1로 표시된 부분은 SDS-PAGE 결과이고, 그래프로 표시된 부분은 크기 배제 크로마토그래피(SEC) 결과이다.
- [39] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 Anti-EDB-FN antibody 및 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질의 EDB-FN과 TGF- β 1 동시 결합 수준을 평가한 결과이다.
- [40] 도 15는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 Anti-EDB-FN antibody 및 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 유방암 동소이식 모델에서의 종양 성장률을 분석한 결과로서, 15a는 각 융합 단백질에 의한 시간에 따른 종양 부피를 측정한 결과이고, 15b는 각 융합 단백질에 의한 시간에 따른 성장율을 측정한 결과이다. 각각의 데이터는 $\pm$ s.e.m을 의미하고; $***P < 0.001$ 을 의미하며; NS는 not significant를 의미하고; two-way ANOVA with post hoc Bonferroni *t*-test로 분석한 결과이다.
- [41] 도 16은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 Anti-EDB-FN antibody 및 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 유방암 동소이식 모델에서의 폐 전이율을 분석한 결과이다. $**P < 0.01$ 을 의미하며; two-way ANOVA with post hoc Bonferroni *t*-test로 분석한 결과이다.
- [42] 도 17은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 Anti-EDB-FN antibody 및 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 유방암 동소이식 모델

에서의 생존율을 측정한 결과이다. $**P < 0.01$ 을 의미하며; two-way ANOVA with log-rank test로 분석한 결과이다.

- [43] 도 18의 a 내지 c는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 FEBM과 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 췌장암 동소이식 모델에서의 종양 성장을 분석한 것으로서, a는 종양 중량, b는 성장을 및 c는 생존율을 측정한 결과이다. 각각의 데이터는 $\pm$ s.e.m을 의미하고; $*P < 0.01$, $**P < 0.001$, $***P < 0.0001$ 을 의미하며; NS는 not significant를 의미하고; two-way ANOVA with post hoc Bonferroni *t*-test로 분석한 결과이다.
- [44] 도 18의 d 내지 f는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 Anti-EDB-FN antibody 및 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 췌장암 동소이식 모델에서의 종양 성장을 분석한 것으로서, a는 종양 중량, b는 성장을 및 c는 생존율을 측정한 결과이다. 각각의 데이터는 $\pm$ s.e.m을 의미하고; $*P < 0.01$, $**P < 0.001$, $***P < 0.0001$ 을 의미하며; NS는 not significant를 의미하고; two-way ANOVA with post hoc Bonferroni *t*-test로 분석한 결과이다.
- [45] 도 19는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 FEBM과 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 췌장암 동소이식 모델에서의 Smad2 인산화 양과 CD8 발현양을 측정한 결과로서, 19a는 Smad2의 인산화 양, 19b는 CD8 발현양을 측정한 결과이다. 각각의 데이터는 $\pm$ s.e.m을 의미하고; $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ 을 의미하며; NS는 not significant를 의미하고; two-way ANOVA with post hoc Bonferroni *t*-test로 분석한 결과이다.
- [46] 도 20은 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 FEBM과 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 및 Anti-EDB-FN antibody 및 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 흑색종 동소이식 -> 폐전이 후 종양성장 모델에서의 종양 성장 억제 효과를 확인한 결과로서, 20a는 시간에 따른 종양 성장율을 측정한 결과이며, 20b는 25일째 되는 날 측정한 종양 성장률이다. 각각의 데이터는 $\pm$ s.e.m을 의미하고; $*P < 0.05$, $**P < 0.05$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ 을 의미하며; NS는 not significant를 의미하고; two-way ANOVA with post hoc Bonferroni *t*-test로 분석한 결과이다.
- [47] 도 21a는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 Anti-EDB-FN antibody, FEBM 및 TGF β Trap을 포함하는 삼중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 유방암 동소이식 모델에서의 종양 성장율을 분석한 결과이다. 각각의 데이터는 $\pm$ s.e.m을 의미하고; $*P < 0.01$, $**P < 0.05$, $***P < 0.001$ 을 의미하며; NS는 not significant를 의미하고; two-way ANOVA with post hoc Bonferroni *t*-test로 분석한 결과이다.
- [48] 도 21b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제작한 Anti-EDB-FN antibody, FEBM 및 TGF β Trap을 포함하는 삼중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 췌장암 동소이식 모델에서의 종양 성장율을 분석한 결과이다. 각각의 데이터는 $\pm$ s.e.m을 의미하고; $*P < 0.01$, $**P < 0.05$, $***P < 0.001$ 을 의미하며; NS는 not significant를 의미하고; two-way ANOVA with post hoc Bonferroni *t*-test로 분석한 결과이다.

- [49]
- [50] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현에
- [51] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용 되는 것이다.
- [52] 본 발명에서는, EDB-FN과 TGF β 에 동시에 결합하는 융합 단백질을 사용할 경우, 다양한 압중에서 높은 항암 효과가 나타나는 것을 확인하고자 하였다.
- [53] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는, EDB-FN과 TGF β 에 동시에 결합하는 융합 단백질(표 2)을 이용할 경우, EDB-FN의 발현이 높거나(채장암), 낮거나(흑색종), 중간 인(유방암) 종양에서 모두 뛰어난 항암 효과가 나타난다는 것을 확인하였다(도 10 내지 도 20).
- [54] 따라서, 본 발명은 일관점에서,
- [55] (a) 피브로넥틴 엑스트라도메인 B (Extr domain B of Fibronectin, EDB-FN)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및
- [56] (b) 전환성장인자 베타(transforming growth factor β , TGF β)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [57] 를 포함하는 융합 단백질에 관한 것이다.
- [58]
- [59] 본 발명에 있어서, 상기 융합단백질은 (c) 항체 불변영역 (constant region)을 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [60] 본 발명에 있어서, 상기 (a), (b) 및 (c)를 포함하는 융합 단백질은 N 말단에서 C 말단으로,
- [61] (i) EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [62] (ii) TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [63] (iii) 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 항체 불변영역; 및 하나 이상의 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [64] (iv) 하나 이상의 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 항체 불변영역; 및 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [65] (v) 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 하나 이상의 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 항체 불변영역;
- [66] (vi) 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 하나 이상의 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 항체 불변영역; 및 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;

- [67] (vii) 하나 이상의 TGFβ에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 항체 불변영역; 및 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [68] (viii) 항체 불변영역; 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 하나 이상의 TGFβ에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [69] (ix) 항체 불변영역; 하나 이상의 TGFβ에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [70] (x) 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 항체 불변영역; 하나 이상의 TGFβ에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [71] 로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 구조를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [72] 본 발명에 있어서, 상기 융합 단백질은 N 말단에서 C 말단으로,
- [73] (7-1) 항체 불변영역; EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 TGFβ에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및
- [74] (7-2) 항체 불변영역; TGFβ에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [75] 로 구성된 군에서 선택되는 구조를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [76]
- [77] 본 발명에 있어서, 상기 융합단백질은 (d) 종양 항원에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [78] 본 발명에서 용어 "종양 항원"은 (바람직하게 악성) 종양 또는 암 질병으로부터 유래되거나 또는 관련된 항원성 (폴리-)펩타이드 또는 단백질을 의미한다. 본원에 사용된 "암" 및 "종양"이라는 용어는 주변 조직을 침범하고 먼 신체 부위로 전이하는 경향이 있는 세포의 제어되지 않고 일반적으로 빠른 증식을 특징으로 하는 신생물(neoplasm)을 지칭하는 것으로 상호교환적으로 사용된다. 이 용어는 양성 및 악성 신생물을 포함한다. 암의 악성 종양은 통상적으로 퇴화(anaplasia), 침습성 및 전이를 특징으로 하며; 양성 악성 종양은 통상적으로 이러한 특성을 갖지 않는다. "암" 및 "종양"이라는 용어는 특히 종양 성장을 특징으로 하는 신생물 뿐만 아니라 혈액 및 림프계의 암을 지칭한다. "종양 항원"은 통상적으로 종양/암 세포, 바람직하게는 포유 동물 종양/암 세포로부터 유래되고, 포유 동물, 바람직하게는 포유동물, 바람직하게 인간으로부터 유래된 종양 세포, 종양, 예를 들어 전신 또는 고형 종양의 내부 또는 표면에 위치할 수 있다. "종양 항원"은 일반적으로 종양-특이적 항원 (TSA) 및 종양-관련-항원 (TAA)을 포함한다. TSA는 통상적으로 종양 특이적 돌연변이에 기인하고, 종양 세포에 의해 특이적으로 발현된다. 보다 흔한 TAA는 일반적으로 종양 및 "정상" (건강하고, 비-종양) 세포에 의해 제시된다.
- [79]

- [80] 본 발명에 있어서, 상기 종양 항원은 4-1BB, 5T4, 인테그린 (integrin), 액티빈 (Activin), 안지오포에틴(Angiopoietin), 안지오포에틴 유사물질 3(angiopoietin-like 3), 세포 성숙화 항원 (B cell maturation antigen, BCMA), B세포 활성화인자 (B-cell activating factor, BAFF), BAGE-1, BCL-2, B7-H3, bcr/abl, 베타-카테닌/m, BING-4, BRCA1/m, BRCA2/m, CA 15-3/CA 27-29, CA 19-9, CA72-4, CA125, 칼레티쿨린(calreticulin), CAMEL, CASP-8/m, 카텡신 B(cathepsin B), 카텡신 L, CCR4, CCR5, CCL11, CD11a, CD16A, CD19, CD2, CD20, CD22, CD25, CD3, CDE30, CD33, CD4, CD40, CD45, CD46, CD47, CD52, CD55, CD56, CD6, CD80, CD86, CTLA4, CD105, CD123, CD154, CD166, CD262, CD278, CD319, CD326, CDC27/m, CDK4/m, CDKN2A/m, CEA, CLCA2, CML28, CML66, COA-1/m, c-met, 코액토신-유사 단백질, 콜라주(collage) XXIII, COX-2, CT-9/BRD6, Cten, 사이클린 B1, 사이클린 D1, cyp-B, CYPB1, DAM-10, DAM-6, DEK-CAN, EFTUD2/m, EGFR, ELF2/m, EMMPRIN, EpCam, EphA2, EphA3, ErbB3, ETV6-AML1, EZH2, FGF-5, FN, Frau-1, G250, GAGE-1, GAGE-2, GAGE-3, GAGE-4, GAGE-5, GAGE-6, GAGE7b, GAGE-8, GDEP, GnT-V, gp100, GPC3, GPNMB/m, HAGE, HAST-2, 헵신(hepsin), HER2, HER3, HERVK-MEL, HLA-A*0201 - R1 7I, HLA-A1 1/m, HLA-A2/m, HNE, 호메오박스(homeobox) NKX3.1, HOM-TES-14/SCP-1, HOM-TES- 85, HPV-E6, HPV-E7, HSP70-2M, HST-2, hTERT, iCE, IGF-1 R, IL-13Ra2, IL-2R, IL-5, 미숙 라미닌 수용체, 칼리크레인-2, 칼리크레인-4, i67, KIAA0205, KIAA0205/m, KK-LC- 1, K-Ras/m, LAGE-A1, LDLR-FUT, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A12, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-B10, MAGE-B1 6, MAGE-B1 7, MAGE-C1, MAGE-C2, MAGE-C3, MAGE- D1, MAGED2, MAGE-D4, MAGE-E1, MAGE-E2, MAGE-F1, MAGE-H I, MAGEL2, 맘마글로빈(mammaglobin) A, MART-1/멜란-A, MART-2, MART-2/m, 기질 단백질 22, MC1 R, M-CSF, ME 1/m, 메소텔린(mesothelin), MG50/PXDN, MMP1 1, MN/CA IX-항원, MRP-3, MUC-1, MUC-2, MUM-1/m, MUM-2/m, MUM-3/m, 미오신 클래스 I/m, NA88-A, N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제- V, 네오-PAP, 네오-PAP/m, NFYC/m, NGEP, NMP22, NPM/ALK, N-Ras/m, NSE, NY-ESO-1, NY-ESOB, OA1, OFA-iLRP, OGT, OGT/m, OS-9, OS- 9/m, 오스테오칼신(osteocalcin), 오스테오폰틴(osteopontin), pi 5, p190 마이너 bcr-abl, p53, p53/m, PAGE-4, PAI-1, PAI-2, PAP, PART-1, PATE, PDEF, PD-1, PD-L1, Pim-1 -Kinase, Pin-1, Pml/PARalpha, POTE, PRAME, PRDX5/m, 프로스테인(prostein), 프로테이나제-3, PSA, PSCA, PSGR, PSM, PSMA, PTPRK/m, RAGE-1, RBAF600/m, RHAMM/CD1 68, RU1, RU2, S-100, SAGE, SART-1, SART-2, SART-3, SCC, SIRT2/m, Sp1 7, SSX-1, SSX-2/HOM-MEL-40, SSX-4, STAMP-1, STEAP-1, 서바이빈, 서바이빈-2B, SYT-SSX-1, SYT-SSX-2, TA-90, TAG-72, TARP, TEL-AML1, TGM-4, TPI/m, TRAG- 3, TRG, TRP-1, TRP-2/6b, TRP/INT2, TRP-p8, T세포 면역글로블린 및 뮤신-도메인 함유

물질 3 (T cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3, Tim-3), 조직인자 (Tissue factor), 조직인자경로억제제 (Tissue factor pathway inhibitor, TFPI), 종양 괴사인자(tumor necrosis factor, TNF), 티로시나제, UPA, 혈관내피세포성장인자 (Vascular endothelial growth factor, VEGF), VEGF 수용체, vWF(von Willebrand Factor), VEGFR-2/FLK-1, WT1 및 림프성 혈구의 면역글로불린 유전자형 또는 림프구 혈구의 T 세포 수용체 또는 상기 종양 항원의 상동체, 단편, 변이체 또는 유도체일 수 있고, 더욱 바람직하게는 PD-1, PD-L1, CTLA-4, CD80, CD86 및 VEGF로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있으며, 가장 바람직하게는 PD-1인 것을 특징으로 할 수 있다.

[81]

[82] 본 발명에 있어서, (d) 종양 항원에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드는 PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드인 것을 특징으로 할 수 있다.

[83]

[84] 본 발명에 있어서, 상기 (d) 종양 항원에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드가 항체일 경우, 상기 항체는 우렐루맵 (Urelumab), 우토밀루맵 (Utomilumab), 벵텔로비맵 (Bebtelovimab), 아두카누맵 (Aducanumab), 바피네주맵 (Bapinezumab), 크레네주맵 (Crenezumab), 도나네맵 (Donanemab), 간테네루맵 (Gantenerumab), 레카네맵 (Lecanemab), 솔라네주맵 (Solanezumab), 네스바쿠맵 (Nesvacumab), 에비나쿠맵 (Evinacumab), 에놀리투주맵 (Enoblituzumab), 옴부르타맵 (Omburtamab), 벨리무맵 (Belimumab), 이아나루맵 (Ianalumab), 타발루맵 (Tabalumab), 베르틸리무맵 (Bertilimumab), 모가몰리주맵 (Mogamulizumab), 레론리맵 (Leronlimab), 시필리주맵 (Siplizumab), 포랄루맵 (Foralumab), 무로모납-CD3(Muromonab-CD3), 오텔릭시주맵 (Otelixizumab), 테플리주맵 (Teplizumab), 이발리주맵 (Ibalizumab), 트레갈리주맵 (Tregalizumab), 자노리무맵 (Zanolimumab), 이톨리주맵 (Itolizumab), 에팔리주맵 (Efalizumab), 이네빌리주맵 (Inebilizumab), 타파시타맵 (Tafasitamab), 토시투모맵 (Tositumomab), 오크렐리주맵 (Ocrelizumab), 오파투무맵 (Ofatumumab), 리톡시맵 (Rituximab), 우블리톡시맵 (Ublituximab), 벨투주맵(Veltuzumab), 에프라투주맵 (Epratuzumab), 바실릭시맵 (Basiliximab), 다클리주맵 (Daclizumab), 바르릴루맵 (Varlilumab), 롤리주맵 (Lulizumab), 이라투무맵 (Iratumumab), 린투주맵 (Lintuzumab), 다라투무맵 (Daratumumab), 펠자르타맵 (Felzartamab), 이사톡시맵 (Isatuximab), 메자키타맵 (Mezagitamab), 블레셀루맵 (Bleselumab), 다췌투주맵 (Dacetuzumab), 이스칼리맵 (Iscalimab), 루카투무맵 (Lucatumumab), 미타잘리맵 (Mitazalimab), 소티갈리맵 (Sotigalimab), 테고프루바르트 (Tegoprubart), 다피롤리주맵 (Dapirolizumab), 아파미스타맵 (Apamistamab), 리구팔리맵 (Ligufalimab), 마그롤리맵 (Magrolimab), 알렘투주맵 (Alemtuzumab), 크리잔리주맵 (Crizanlizumab), 인클라쿠맵 (Inclacumab), 쿠사투주맵 (Cusatuzumab), 올레클루맵 (Oleclumab), 밀라투주맵 (Milatuzumab), 갈릭시맵 (Galiximab), 카로톡시맵 (Carotuximab), 아데카투무맵 (Adecatumumab), 엠

티네주맵 (Eptinezumab), 에레누맵 (Erenumab), 프레마네주맵 (Fremanezumab),
 갈카네주맵 (Galcanezumab), 졸베크시맵 (Zolbetuximab), 오나르투주맵
 (Onartuzumab), 에쿨리주맵 (Eculizumab), 포젤리맵 (Pozelimab), 라블리주맵
 (Ravulizumab), 라크노투주맵 (Lacnotuzumab), 악사틸리맵 (Axatilimab), 카비랄
 리주맵 (Cabiralizumab), 에막투주맵 (Emactuzumab), 이필리무맵 (Ipilimumab),
 쿠아본리맵 (Quavonlimab), 트레멜리무맵 (Tremelimumab), 잘리프레리맵
 (Zalifrelimab), 세톡시맵 (Cetuximab), 데파톡시주맵 (Depatuxizumab), 푸톡시
 맵 (Futuximab), 임가투주맵 (Imgatuzumab), 마투주맵 (Matuzumab), 모도톡시
 맵 (Modotuximab), 네씨투무맵 (Necitumumab), 니모투주맵 (Nimotuzumab),
 파니투무맵 (Panitumumab), 토무조톡시맵 (Tomuzotuximab), 잘루투무맵
 (Zalutumumab), 바토클리맵 (Batoclimab), 니포칼리맵 (Nipocalimab), 로자놀릭시
 주맵 (Rozanolixizumab), 부로수맵 (Burosumab), 팔레투주맵 (Farletuzumab), 디누
 톱시맵 (Dinutuximab), 디누톡시맵 베타 (Dinutuximab beta), 낙시타맵 (Naxitamab),
 라기필리맵 (Ragifilimab), 김실루맵 (Gimsilumab), 렌질루맵 (Lenzilumab),
 마브릴리무맵 (Mavrilimumab), 나밀루맵 (Namilumab), 오틸리맵 (Otilimab),
 플론마를리맵 (Plonmarlimab), 코드리투주맵 (Codrituzumab), 마르게톡시맵
 (Margetuximab), 페르투주맵 (Pertuzumab), 트라스투주맵 (Trastuzumab), 다토
 포타맵 (Datopotamab), 파트리투맵 (Patritumab), 세리반투맵 (Seribantumab),
 둘리고투주맵 (Duligotuzumab), 피클라투주맵 (Ficlatuzumab), 릴로투무맵
 (Rilotumumab), 알롬필리맵 (Alomfilimab), 아니프롤루맵 (Anifrolumab), 에마팔루
 맵 (Emapalumab), 리겔리주맵 (Ligelizumab), 오말리주맵 (Omalizumab), 씨크투무
 맵 (Cixutumumab), 달로투주맵 (Dalotuzumab), 피키투무맵 (Figitumumab), 가니투
 맵 (Ganitumab), 테프로투무맵 (Teprotumumab), 베르메키맵 (Bermekimab), 카나기
 누맵 (Canakinumab), 게보키주맵 (Gevokizumab), 브리아키누맵 (Briakinumab), 우
 스테키누맵 (Ustekinumab), 안루킨주맵 (Anrukinzumab), 쉐다키맵 (Cendakimab),
 레브리키주맵 (Lebrikizumab), 트랄로키누맵 (Tralokinumab), 브로달루맵
 (Brodalumab), 비메키주맵 (Bimekizumab), 익세키주맵 (Ixekezumab), 세쿠기누맵
 (Secukinumab), 브라지쿠맵 (Brazikumab), 구셀쿠맵 (Guselkumab), 미리키주맵
 (Mirikizumab), 리산키주맵 (Risankizumab), 틸드라키주맵 (Tildrakizumab), 네몰
 리주맵 (Nemolizumab), 임시돌리맵 (Imsidolimab), 스페솔리맵 (Spesolimab), 파스
 콜리주맵 (Pascolizumab), 두필루맵 (Dupilumab), 데페모키맵 (Depemokimab), 메
 폴리주맵 (Mepolizumab), 레슬리주맵 (Reslizumab), 벤랄리주맵 (Benralizumab),
 클라자키주맵 (Clazakizumab), 올로키주맵 (Olokizumab), 실톡시맵 (Siltuximab),
 시루쿠맵 (Sirukumab), 질티베키맵 (Ziltivekimab), 레빌리맵 (Levilimab), 사릴
 루맵 (Sarilumab), 사트랄리주맵 (Satralizumab), 토셀리주맵 (Tocilizumab), 아
 비투주맵 (Abituzumab), 파베젤리맵 (Favezelimab), 피안리맵 (Fianlimab), 이에
 라밀리맵 (Ieramilimab), 렐라틀리맵 (Relatlimab), 심투주맵 (Simtuzumab), 아
 바고보맵 (Abagovomab), 오레고보맵 (Oregovomab), 타네주맵 (Tanezumab),

이브록솔리맵 (Ivuxolimab), 로카틴리맵 (Rocatinlimab), 타볼리맵 (Tavolimab),
 텔라조를리맵 (Telazorlimab), 본레롤리주맵 (Vonlerolizumab), 알리로쿠맵
 (Alirocumab), 보코씨주맵 (Bococizumab), 에브로누씨맵 (Ebronucimab), 에볼로쿠
 맵 (Evolocumab), 프로보씨맵 (Frovocimab), 온게리씨맵 (Ongerlicimab), 타폴레씨
 맵 (Tafolecimab), 도스타를리맵 (Dostarlimab), 발스틸리맵 (Balstilimab), 캄렐리주
 맵 (Camrelizumab), 쉐미플리맵 (Cemiplimab), 겐타놀리맵 (Geptanolimab), 니볼루
 맵 (Nivolumab), 펌브롤리주맵 (Pembrolizumab), 펜폴리맵 (Penpulimab), 피딜리주
 맵 (Pidilizumab), 프롤골리맵 (Prolgolimab), 레티판리맵 (Retifanlimab), 사산리맵
 (Sasanlimab), 세르플루리맵 (Serplulimab), 신틸리맵 (Sintilimab), 스파르탈리주맵
 (Spartalizumab), 티슬렐리주맵 (Tislelizumab), 토리팔리맵 (Toripalimab), 에자벤리
 맵 (Ezabenlimab), 짐베렐리맵 (Zimberelimab), 아테졸리주맵 (Atezolizumab), 아벨
 루맵 (Avelumab), 코시벨리맵 (Cosibelimab), 수게말리맵 (Sugemalimab), 두르발
 루맵 (Durvalumab), 엔바폴리맵 (Envafolimab), 수브라톡수맵 (Suvratoxumab), 데
 노수맵 (Denosumab), 질로베르타맵 (Zilovertamab), 엘로투주맵 (Elotuzumab), 돔
 바날리맵 (Domvanalimab), 에티길리맵 (Etigilimab), 오씨페를리맵 (Ociperlimab),
 티라골루맵 (Tiragolumab), 비보스톨리맵 (Vibostolimab), 수르제비셀리맵
 (Surzebiclimab), 코볼리맵 (Cobolimab), 사바톨리맵 (Sabatolimab), 콘씨주맵
 (Concizumab), 마르스타씨맵 (Marstacimab), 아달리무맵 (Adalimumab), 골리
 무맵 (Golimumab), 인플릭시맵 (Infliximab), 쉐르톨리주맵 (Certolizumab), 코나
 투무맵 (Conatumumab), 티가투주맵 (Tigatuzumab), 테제펠루맵 (Tezepelumab),
 가티포투주맵 (Gatipotuzumab), 카비랄리주맵 (Cabiralizumab), 베바씨주맵
 (Bevacizumab), 브롤루씨주맵 (Brolucizumab), 라니비주맵 (Ranibizumab), 올린바
 씨맵 (Olinvacimab), 이크루쿠맵 (Icrucumab), 라무씨루맵 (Ramucirumab), 카프라
 씨주맵 (Ciplacizumab), 아부릴루맵 (Abrilumab), 에트롤리주맵 (Etrolizumab), 베
 돌리주맵 (Vedolizumab), 인테투무맵 (Intetumumab), 나탈리주맵 (Natalizumab),
 쉐레바프스프 알파 (Cinrebafusp alfa), 로지바프스프 알파 (Rozibafusp alfa), 오브
 린다타맵 (Obrindatamab), 엘라나타맵 (Elranatamab), 린보셀타맵 (Linvoseltamab),
 테클리스타맵 (Teclistamab), 엠코리타맵 (Epcoritamab), 글로피타맵 (Glofitamab),
 모수네투주맵 (Mosunetuzumab), 오드로넥스타맵 (Odronextamab), 플로테투주맵
 (Flotetuzumab), 비베코타맵 (Vibecotamab), 카투막소맵 (Catumaxomab), 씨비사타
 맵 (Cibisatamab), 탈쿠에타맵 (Talquetamab), 우바마타맵 (Ubamatamab), 엠피자
 타맵 (Emfizatamab), 블리나투모맵 (Blinatumomab), 아미반타맵 (Amivantamab),
 에미씨주맵 (Emicizumab), 제노쿠투주맵 (Zenocutuzumab), 자니다타맵
 (Zanidatamab), 티볼리주맵 (Tibulizumab), 나프투모맵 (Naptumomab), 벨란타
 맵 (Belantamab), 피베키맵 (Pivekimab), 프랄루자타맵 (Praluzatamab), 콜룩시맵
 (Coltuximab), 데닌투주맵 (Denintuzumab), 론카스톡시맵 (Loncastuximab), 이브
 리투모맵 (Ibritumomab), 이노투주맵 (Inotuzumab), 에프라투주맵 (Epratuzumab),
 목세투모맵 (Moxetumomab), 브렌톡시맵 (Brentuximab), 겐투주맵 (Gemtuzumab),

바다스톡시맙 (Vadastuximab), 로보투주맙 (Lorvotuzumab), 폴라투주맙 (Polatuzumab), 투사마타맙 (Tusamitamab), 텔리소투주맙 (Telisotuzumab), 로발피투주맙 (Rovalpituzumab), 데파톡시주맙 (Depatuxizumab), 파를레투주맙 (Farletuzumab), 미르베톡시맙 (Mirvetuximab), 디시타맙 (Disitamab), 아네투맙 (Anetumab), 엔포르투맙 (Enfortumab), 사씨투주맙 고비데칸 (Sacituzumab), 보바릴리주맙 (Vobarilizumab), 카도닐리맙 (Cadonilimab), 부달리맙 (Vudalimab), 테보텔리맙 (Tebotelimab), 이보네스씨맙 (Ivonescimab), 에르폰릴리맙 (Erfonrilimab), 오조랄리주맙 (Ozoralizumab), 파리시맙 (Faricimab), 바누씨주맙 (Vanucizumab) 및 나비썬시주맙 (Navicixizumab)으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [85]
- [86] 본 발명에 있어서, 상기 (a), (b), (c) 및 (d)를 포함하는 융합 단백질은 N 말단에서 C 말단으로,
- [87] (A) PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 TGFβ에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [88] (B) PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; TGFβ에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [89] (C) TGFβ에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [90] (D) PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 항체 불변영역; EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 TGFβ에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [91] (E) PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 항체 불변영역; TGFβ에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
- [92] (F) TGFβ에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 항체 불변영역; 및
- [93] (G) EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; TGFβ에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 항체 불변영역;
- [94] 로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 구조를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [95]
- [96] 본 발명에서, 상기 융합 단백질은 각 구성요소가 링커를 통해 연결될 수 있다.
- [97] 본 발명에서 상기 링커는 펩타이드 링커일 수 있으며, 약 1-25 aa 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 글리신 및/또는 세린과 같은 친수성 아미노산이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [98] 구체적으로, 상기 링커는 예를 들어, 단백질 가수분해 효소에 의해 잘리지 않으면서 구조적 유연성을 부여하는 GGG, (GS)_n, (GGS)_n, (GGGGS)_n, (SSSSG)_n 또는 (G_nS)_m (n, m은 각각 1 내지 10)을 포함할 수 있고, 보다 구체적으로 상기 링커는 예를 들어 GGG, (GGGGS)_n 또는 (SSSSG)_n (n, m은 각각 1 내지 10)일 수 있다.
- [99]
- [100] 본 발명에 있어서, 상기 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드는 피브로넥틴 EDB 결합 도메인(Fibronectin EDB binding motif, FEBM), EDB-FN에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [101]
- [102] 본 명세서에서 사용된 용어, "항체(antibody)"는 표적 물질(예를 들어 EDB-FN, TGFβ 및 PD-1)에 특이적으로 결합하는 항체를 의미한다.
- [103] 완전한 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 구조이며, 각각의 경쇄는 중쇄와 다이설파이드 결합으로 연결되어 있다.
- [104] 본 명세서에서 사용되는 용어, "중쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VH 및 3개의 불변영역 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 전체길이 중쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어, "경쇄"는 항원에 특이성을 부여하기 위한 충분한 가변 영역 서열을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 가변 영역 도메인 VL 및 불변영역 도메인 CL을 포함하는 전체길이 경쇄 및 이의 단편을 모두 의미한다.
- [105] 상기 전체 항체는 IgA, IgD, IgE, IgM 및 IgG의 아형(subtype)을 포함하며, 특히 IgG는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4를 포함한다. 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ε) 타입을 가지고 서브클래스로 감마1(γ1), 감마2(γ2), 감마3(γ3), 감마4(γ4), 알파1(α1) 및 알파2(α2)를 가진다. 경쇄의 불변영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가진다.
- [106] 항체의 항원 결합 단편 또는 항체 단편이란 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등을 포함한다. 항체 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 불변영역 및 중쇄의 첫 번째 불변영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge-region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 다이설파이드 결합을 이루면서 생성된다.
- [107] Fv는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역만을 가지고 있는 최소의 항체조각에 해당한다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유결합으로 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역이 연결되어 있고, 단쇄 Fv(single-chain Fv, scFv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 경쇄의 가변 영역이 공유결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 이합체와 같은 구조를

이룰 수 있다. 이러한 항체 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용하거나(예를 들어, 완전한 형태의 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 $F(ab')_2$ 를 얻을 수 있다), 유전자 재조합 기술을 이용하여 제작할 수 있다.

- [108] "Fv" 단편은 완전한 항체 인식 및 결합 부위를 함유하는 항체 단편이다. 이러한 영역은 1개의 중쇄 가변 도메인과 1개의 경쇄 가변 도메인이 결합된 이량체이다.
- [109] "Fab" 단편은 경쇄의 가변 및 불변 도메인과, 중쇄의 가변 및 제1 불변 도메인(CH1)을 포함한다. $F(ab')_2$ 항체 단편은 일반적으로 Fab'단편 C-말단에 존재하는 힌지 영역의 시스테인에 의해 공유적으로 연결된 한 쌍의 Fab' 단편을 포함한다.
- [110] "단일쇄 Fv(scFv)" 항체 단편은 항체의 VH 및 VL 도메인을 포함하는 단일 폴리펩타이드로 이루어진 구조체이다. scFv가 항원 결합을 위해 목적하는 구조를 형성할 수 있도록 하는 폴리펩타이드 링커를 VH 도메인과 VL 도메인 사이에 추가로 포함할 수 있다.
- [111] 하나의 실시예에서, 본 발명의 항체는 단일클론 항체, 다특이적 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, scFv, Fab 단편, $F(ab')_2$ 단편, 다이설파이드-결합 Fvs(sdFv) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 또는 상기 항체들의 에피토프-결합 단편 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [112] 상기 중쇄 불변영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 또는 엡실론(ϵ) 중의 어느 한 이소타입으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 불변영역은 감마1(IgG1), 감마2(IgG2), 감마3(IgG3) 또는 감마4(IgG4)이다. 경쇄 불변영역은 카파 또는 람다 형일 수 있다.
- [113]
- [114] 본 발명에 있어서, 상기 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드는 TGF β 수용체 2형 엑토도메인(TGF β RII ectodomain, TGF β Trap), TGF β 에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [115] 본 발명에 있어서, 상기 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드는 서열번호 5 내지 8의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩타이드 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [116]
- [117] 본 발명에 있어서, 상기 항체 불변영역은 중쇄 불변영역 또는 경쇄 불변영역인 것을 특징으로 하는 할 수 있다.
- [118] 본 발명에 있어서, 상기 항체 불변영역은 서열번호 12 내지 15의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩타이드 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [119]
- [120] 본 발명에 있어서, 상기 PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드는 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편인 것을 특징으로 할 수 있다.

- [121] 본 발명에 있어서, 상기 PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드는 서열번호 9 내지 11의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩타이드 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [122]
- [123] 본 발명에 있어서, 상기 (a), (b) 및 (c)를 포함하는 융합 단백질은 N 말단에서 C 말단으로,
- [124] (4-1) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [125] (4-2) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 12의 폴리펩타이드;
- [126] (4-3) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 12의 폴리펩타이드;
- [127] (4-4) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [128] (4-5) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [129] (4-6) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [130] (4-7) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 12의 폴리펩타이드;
- [131] (4-8) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [132] (4-9) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [133] (4-10) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [134] (4-11) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 13의 폴리펩타이드;
- [135] (4-12) 서열번호 13의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [136] (4-13) 서열번호 2의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [137] (4-14) 서열번호 3의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [138] (4-15) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 2의 폴리펩타이드; 및 서열번호 13의 폴리펩타이드;
- [139] (4-16) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;

- [140] (4-17) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [141] (4-18) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 12의 폴리펩타이드;
- [142] (4-19) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- [143] (4-20) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [144] (4-21) 서열번호 6의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [145] (4-22) 서열번호 7의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [146] (4-23) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 6의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- [147] (4-24) 서열번호 2의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [148] (4-25) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 12의 폴리펩타이드;
- [149] (4-26) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- [150] (4-27) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [151] (4-28) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [152] (4-29) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- [153] (4-30) 서열번호 2의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- [154] (4-31) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- [155] (4-32) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 2의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- [156] (4-33) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 6의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- [157] (4-34) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 12의 폴리펩타이드;
- [158] (4-35) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 12의 폴리펩타이드;
- [159] (4-36) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;

- [160] (4-37) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- [161] (4-38) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및
- [162] (4-39) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- [163] 로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 (4-5) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드; 또는 (4-6) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드; 를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [164] 본 발명에 있어서, 상기 (a), (b) 및 (c)를 포함하는 융합 단백질은 서열번호 16 내지 56으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 20의 아미노산 서열로 표시되거나, 서열번호 21의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [165]
- [166] 본 발명에 있어서, 상기 (a), (b), (c) 및 (d)를 포함하는 융합 단백질은 N 말단에 서 C 말단으로,
- [167] (5-1) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [168] (5-2) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [169] (5-3) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [170] (5-4) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [171] (5-5) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- [172] (5-6) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- [173] (5-7) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [174] (5-8) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [175] (5-9) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 11의 폴리펩타이드;
- [176] (5-10) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [177] (5-11) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;

- [178] (5-12) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 11의 폴리펩타이드;
- [179] (5-13) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [180] (5-14) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- [181] (5-15) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [182] (5-16) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- [183] (5-17) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- [184] (5-18) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- [185] (5-19) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [186] (5-20) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- [187] (5-21) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 11의 폴리펩타이드;
- [188] (5-22) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- [189] (5-23) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- [190] (5-24) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 11의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- [191] (5-25) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- [192] (5-26) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [193] (5-27) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- [194] (5-28) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [195] (5-29) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- [196] (5-30) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;

- [197] (5-31) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- [198] (5-32) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [199] (5-33) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 11의 폴리펩타이드;
- [200] (5-34) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- [201] (5-35) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- [202] (5-36) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 11의 폴리펩타이드;
- [203] (5-37) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- [204] (5-38) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- [205] (5-39) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- [206] (5-40) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- [207] (5-41) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- [208] (5-42) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- [209] (5-43) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- [210] (5-44) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- [211] (5-45) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 11의 폴리펩타이드;
- [212] (5-46) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- [213] (5-47) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및
- [214] (5-48) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 11의 폴리펩타이드;
- [215] 로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

- [216] 본 발명에 있어서, 상기 (a), (b), (c) 및 (d)를 포함하는 융합 단백질은 서열번호 57 내지 104로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [217]
- [218] 본 발명의 융합 단백질은 EDB-FN 및 TGF β 를 특이적으로 인식할 수 있는 범위 내에서, 본 명세서에 기재된 본 발명의 융합 단백질의 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물도 포함할 수 있다. 예를 들면, 단백질의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 단백질의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은 예를 들어, 단백질의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은 유사한 크기를 가지며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.
- [219] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명의 융합 단백질 또는 이를 코딩하는 핵산 분자는 서열번호에 기재된 서열과 실질적인 동일성 (substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 90%의 상동성, 가장 바람직하게는 최소 95%의 상동성, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 얼라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)은 NCBI 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다. BLAST는 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/에서 접속 가능하다. 이 프로그램을 이용한 서열 상동성 비교 방법은 www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/blast_help.html에서 확인할 수 있다.
- [220] 이에 기초하여, 본 발명의 융합 단백질은 명세서에 기재된 명시된 서열 또는 전체와 비교하여 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 이상의 상동성을 가질 수 있다. 이러한 상동성은 당업계에 공지된 방법에 의한 서열 비교 및/또는 정렬에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 서열 비교 알고리즘(즉, BLAST 또는 BLAST 2.0), 수동 정렬, 육안 검사를 이용하여 본 발명의 핵산 또는 단백질의 퍼센트 서열 상동성을 결정할 수 있다.
- [221]

- [222] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 융합 단백질을 코딩하는 핵산에 관한 것이다. 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 분리하여 융합 단백질을 재조합적으로 생산할 수 있다.
- [223] "핵산"은 DNA(gDNA 및 cDNA) 및 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산에서 기본 구성단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다. 본 발명의 융합 단백질을 코딩하는 핵산의 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오타이드의 추가, 결실, 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.
- [224] 상기 융합 단백질을 암호화하는 DNA는 통상적인 분자생물학적 수법을 사용하여 (예를 들어, 항체와 중쇄와 경쇄를 암호화하는 DNA와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리 또는 합성할 수 있으며, 핵산을 분리하고, 이를 복제 가능한 벡터 내로 삽입하여 추가로 클로닝하거나(DNA의 증폭) 또는 추가로 발현시켰다.
- [225] 이를 바탕으로, 본 발명은 또 다른 관점에서 상기 핵산을 포함하는 재조합 발현 벡터에 관한 것이다.
- [226] 본 명세서에서 사용되는 용어, "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단으로, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터 등을 포함한다. 벡터의 성분으로는 일반적으로 다음 중의 하나 이상이 포함되지만, 그에 제한되지 않는다: 신호 서열, 복제 기점, 하나 이상의 항생제 내성 마커 유전자, 증강인자 요소, 프로모터, 전사 종결 서열. 융합 단백질을 코딩하는 핵산은 프로모터 및 전사 종결 서열 등과 같이 작동적으로 연결되어 있다.
- [227] "작동적으로 연결"은 핵산 발현조절서열(예: 프로모터, 시그널 서열 또는 전사 조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 따라 상기 조절서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절하게 된다.
- [228] 원핵세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터 (예컨대, tac 프로모터, lac 프로모터, lacUV5 프로모터, lpp 프로모터, pL λ 프로모터, pR λ 프로모터, rac5 프로모터, amp 프로모터, recA 프로모터, SP6 프로모터, trp 프로모터 및 T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 또한, 예를 들어, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 포유동물 세포의 지놈으로부터 유래된 프로모터(예: 메탈로티오닌 프로모터, β -액틴 프로모터, 사람 헤로글로빈 프로모터 및 사람 근육 크레아틴 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터(예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40프로모터, 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, HSV의 tk 프로모터, 마우스 유방종양 바이러스(MMTV) 프로모터, HIV의 LTR 프로모터, 몰로니 바이러스의 프로모터엡스타인바 바이러스(EBV)의 프로모터 및 로우스 사코마 바이러스(RSV)의 프로모터)

가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.

[229] 경우에 따라서, 벡터는 그로부터 발현되는 융합 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여 다른 서열과 융합될 수도 있다. 융합되는 서열은, 예컨대 글루타티온 S-트랜스퍼라제(Pharmacia, 미국), 말토스 결합 단백질(NEB, 미국), FLAG(ABI, 미국) 및 6x His(hexahistidine) (Quiagen, 독일) 등이 있다.

[230] 상기 벡터는 선택표지로서 당업계에서 통상적으로 이용되는 항생제 내성 유전자를 포함하며, 예를 들어 암피실린, 겐타마이신, 카베니실린, 클로람페니콜, 스트렙토마이신, 카나마이신, 게네티신, 네오마이신 및 테트라사이클린에 대한 내성 유전자가 있다.

[231]

[232] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 재조합 발현 벡터로 형질감염된 숙주세포에 관한 것이다. 본 발명의 융합 단백질을 생성시키기 위해 사용된 숙주세포는 원핵 생물, 효모 또는 고등 진핵생물 세포일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[233] 에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 바실러스 투링기엔시스(*Bacillus thuringiensis*)와 같은 바실러스 속 균주, 스트렙토마이세스(*Streptomyces*), 슈도모나스(*Pseudomonas*)(예를 들면, 슈도모나스 푸티다(*Pseudomonas putida*)), 프로테우스미라빌리스(*Proteus mirabilis*) 및 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*)(예를 들면, 스태필로코쿠스 카르노수스(*Staphylococcus carnosus*))와 같은 원핵 숙주세포를 이용할 수 있다.

[234] 다만, 동물 세포에 대한 관심이 가장 크며, 유용한 숙주 세포주의 예는 COS-7, BHK, CHO, CHOK1, DXB-11, DG-44, CHO/-DHFR, CV1, COS-7, HEK293, BHK, TM4, VERO, HELA, MDCK, BRL 3A, W138, Hep G2, SK-Hep, MMT, TRI, MRC 5, FS4, 3T3, RIN, A549, PC12, K562, PER.C6, SP2/0, NS-0, U20S, 또는 HT1080일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[235]

[236] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 숙주세포를 배양하여 융합 단백질을 생성하는 단계; 및 생성된 융합 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 융합 단백질의 제조방법에 관한 것이다.

[237] 상기 숙주세포는 각종 배지에서 배양할 수 있다. 시판용 배지 중 제한없이 배양 배지로서 사용할 수 있다. 당업자에게 공지되어 있는 기타 모든 필수 보충물이 적당한 농도로 포함될 수도 있다. 배양 조건, 예를 들어 온도, pH 등이 발현을 위해 선별된 숙주세포와 함께 이미 사용되고 있고, 이는 당업자에게 명백할 것이다.

[238] 상기 융합 단백질의 회수는 예를 들어 원심분리 또는 한외여과에 의해 불순물을 제거하고, 그 결과물을 예를 들어 친화 크로마토그래피 등을 이용하여 정제할 수 있다. 추가의 기타 정제 기술 예를 들어 음이온 또는 양이온 교환 크로마토그

래피, 소수성 상호 작용 크로마토그래피, 히드록실아파타이트 크로마토그래피 등이 사용될 수 있다.

[239]

[240] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 융합 단백질을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[241] 본 발명에서 상기 암은 편평상피세포암, 소세포폐암, 비소세포폐암, 폐의 선암, 폐의 편평상피암, 복막암, 피부암, 피부 또는 안구내 흑색종, 직장암, 항문부근암, 식도암, 소장암, 내분비선암, 부갑상선암, 부신암, 연조직 육종, 요도암, 만성 또는 급성 백혈병, 림프구 림프종, 간세포암, 위장암, 췌장암, 교아종, 경부암, 난소암, 간암, 방광암, 간종양, 유방암, 결장암, 대장암, 자궁내막 또는 자궁암, 침샘암, 신장암, 간암, 전립선암, 음문암, 갑상선암, 간암 및 두경부암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[242] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"은 본 발명의 약학 조성물의 투여에 의해 면역 질환 또는 염증성 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[243] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"는 본 발명의 약학 조성물의 투여에 의해 면역 질환 또는 염증성 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[244] 본 발명에서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 상기 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[245] 암의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 상기 조성물의 바람직한 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 mg/kg 범위 내이다. 용어 "약학적 유효량"은 암을 예방 또는 치료하는 데, 또는 혈관신생으로 인한 질환의 예방 또는 치료하는 데 충분한 양을 의미한다.

[246] 상기 조성물은 당해 당업자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를

추가적으로 포함할 수 있다. 또한, 상기 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 한편, 상기 조성물은 항체 또는 항원 결합 단편을 포함하므로, 면역 리포솜으로 제형화될 수 있다. 항체를 포함하는 리포솜은 당업계에 널리 알려진 방법에 따라 제조될 수 있다. 상기 면역 리포솜은 포스파티딜콜린, 콜레스테롤 및 폴리에틸렌글리콜-유도체화된 포스파티딜에탄올아민을 포함하는 지질 조성물로서 역상 증발법에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 항체의 Fab' 단편은 디설파이드-교체 반응을 통해 리포솜에 접합될 수 있다. 독소루비신과 같은 화학치료제가 추가로 리포솜 내에 포함될 수 있다.

[247]

[248] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 융합 단백질을 유효성분으로 포함하는 암 치료용 조성물에 관한 것이다.

[249] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 융합 단백질을 투여하는 단계를 포함하는 암의 치료방법에 관한 것이다.

[250] 본 발명은 또 다른 관점에서, 암 치료용 약제의 제조를 위한 상기 융합 단백질의 사용에 관한 것이다.

[251] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 a) 피브로넥틴 엑스트라도메인 B (Extr domain B of Fibronectin, EDB-FN)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 (b) 전환성장인자 베타(transforming growth factor β , TGF β)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;를 포함하는 융합 단백질의 용도에 관한 것이다.

[252] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 a) 피브로넥틴 엑스트라도메인 B (Extr domain B of Fibronectin, EDB-FN)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 (b) 전환성장인자 베타(transforming growth factor β , TGF β)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;를 포함하는 융합 단백질의 사용에 관한 것이다.

[253] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 a) 피브로넥틴 엑스트라도메인 B (Extr domain B of Fibronectin, EDB-FN)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 (b) 전환성장인자 베타(transforming growth factor β , TGF β)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;를 포함하는 융합 단백질의 병용 치료용도에 관한 것이다.

[254]

[255] 실시예

[256] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[257]

[258] 실시예 1. 재료 및 방법

[259] 1-1. Fibronectin 전사체 발현 및 예후 분석

- [260] TCGA 또는 GTEX database 분석은 gepia2(<http://gepia2.cancer-pku.cn/#index>)를 통해 FN1 (Fibronectin 1)의 EDB domain을 포함하는 exon mRNA level을 다운로드하여 데이터를 확보한 다음, TCGA (인간 암유전체/전사체 및 암환자 정보 데이터리소스), GTEX (정상인 조직유전체/전사체 정보 데이터리소스)를 활용하여 gepia2의 사용자 매뉴얼에 따라 분석하였다.
- [261]
- [262] 1-2. 동소 이식 종양 조직 및 정상 세포 배양 및 발현 분석
- [263] 동소이식된 11개의 다양한 종양 조직 및 정상 조직에서 FN1-EDB+ 전사체의 발현 수준 비교를 비교하였다.
- [264] 즉, Renca murine renal adenocarcinoma(RENCA, 신장암), Colon 26 murine colorectal cancer(Colon26, 대장암), 4T1-Luc murine breast cancer(4T-1, 유방암), B16F10-Luc murine melanoma(B16F10, 흑색종), Hepa6 murine hepatoma(Hepa6, 간암), 및 RM1 murine prostate cancer(RM1, 전립선암) 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, 미국)에서 구입하였다. GL26 murine glioblastoma(뇌종양) 세포주는 Johns Hopkins Medical School Henry Brem 박사로부터 수득하였다. YTN-16 murine gastric cell line(YTN16, 위암)은 University of Tokyo의 Sachiyo Nomura 교수로부터 수득하였다. The Panc02 murine pancreatic adenocarcinoma cell line(PANC02, 췌장암)은 충남대에서 수득하였다. KRasG12D/+TP53-/- PLC (Primary lung cancer cell lines derived from spontaneous Kras/p53 GEMMs, 폐암), KRasG12D/+TP53-/- PSC (Primary sarcoma cell lines derived from spontaneous Kras/p53 GEMMs, 육종) 및 TP53-/- PTLC (Primary T lymphoma cell lines derived from spontaneous p53 GEMMs, 림프종) 세포주는 KRasG12D/+TP53-/- 마우스를 Howard Hughes Medical Institute에서 분양 받아 각각의 원발성 종양을 확보하였다(Nature. 2001, 26;410(6832):1111-6.). 정상 조직의 회수를 위해 C57BL/6 마우스와 BALB/c 마우스 (오리엔트바이오, 한국)를 구매하였다.
- [265] 4T1-Luc 세포를 BALB/c 마우스(오리엔트바이오, 한국)의 유선 지방 패드에 이식하고, 한 달 후, 폐 전이 결절을 수집하여 단일 세포로 소화하는 과정을 2회 반복하여, 4T1-LMT-2-Luc(높은 폐전이성을 가진 암세포주)라고 불리는 전이성 암세포를 분리한 후 시험관 내에서 배양하여 추후 동종이식 마우스 모델 제작에 사용하였다.
- [266] 4T1, 4T1-Luc, 4T1-LMT-2-Luc 세포주는 R10 배지(페니실린/스트렙토마이신 (웰진, 한국) 및 10% 열불활성화된 fetal bovine serum (웰진, 한국) 함유 RPMI1640(웰진, 한국) 2에서 배양하였다. Panc02-luc, Panc02, B16F10-luc, B16F10, colon 26, Hepa6, GL26, RM1 및 Renca 세포주는 10% FBS를 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (웰진, 한국) 배양하였다. KRasG12D/+TP53-/- PLC(자연발생적 KRas/p53 GEMM에서 유래한 원발성 폐암 세포; LA1, Nature. 2001, 26;410(6832):1111-6), PSC(자연발생적 KRas/p53 GEMM에서 유래한 원발성 육종 세포, 육종), TP53-/- PTLC(자연발생적 p53 GEMM에서 유래한

원발성 T 림프종 세포주, 림프종) 세포는 p53이 결실된 발암성 KrasG12D 마우스의 연부골 육종, 폐 종양, 흉선 종양에서 각각 생성하였다. 이들의 기원은 절제된 Kras 및 p53 대립유전자의 PCR을 통해 확인하였고, 콜라젠 코팅기반 조직 배양이후, 10% FBS를 포함하는 DMEM/F12 배지에서 배양하였다. 모든 세포주는 37°C에서 5% CO₂ 농도에서 in vivo implantation을 수행하기 전, 2-16회 배양한 다음, TrypLE Express (Thermo fisher scientific, 미국) 또는 0.25% trypsin을 이용하여 수확하였다.

[267] 수확한 세포주를 700 µL QIAzol lysis reagent (QIAGEN, 독일)를 이용하여 용해한 다음, 균질화(homogenize) 하였다. RNeasy Micro Kit (Qiagen)를 이용하여 전체 RNA를 추출한 다음, SuperScript II Reverse Transcriptase (Thermo fisher Scientific, 미국)를 이용하여 역전사를 진행하고, SuperScript II Reverse Transcriptase (Thermo fisher Scientific, 미국)를 이용하여 StepOnePlus Real-Time PCR System (Thermo fisher Scientific, 미국)에서 증폭을 수행하였다. change-in-cycling-threshold ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 방법으로 타겟 유전자의 발현양을 확인하였고, Gapdh를 이용해 정규화하였다.

[268]

[269] 1-3. 융합 단백질 설계

[270] 하기 실시예에서 사용하기 위한 융합 단백질의 각 구성요소를 하기 표 1과 같이 구성한 다음, 표 2에 기재된 바와 같이 각각의 구성 요소를 링커로 연결하여 융합 단백질을 설계하였다.

[271] [표1]

서열 번호	이름	서열
1	FE8M	SSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ
2	Anti-EDB-FN-HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQGLTVTVSS
3	Anti-EDB-FN-LC	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPG QAPRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
4	anti-EDB-FN-scfv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAP GKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQGLTVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLA WYQQKPGQAPRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISR LEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
5	TGFβ Trap	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDN QKSCMSNCSITSICEKPEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPK LPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNII FSEYNTSNPD
6	Anti-TGFβ1-HC	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYWGQGLTVTVSS
7	Anti-TGFβ1-LC	SYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQQKAGQ APVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADY YCQVWDRDSDQYVFGTGKVTVL
8	Anti-TGFβ1-scfv	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAP GQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYWGQGLTVTVSSSSSS GSSSSGSSSSSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSV HWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTIS RVEAGDEADYYCQVWDRDSDQYVFGTGKVTVL
9	Anti-PD-1-HC	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTNYYMYWVRQA PGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAY MELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTTVTVSS

[272]

10	Anti-PD-1-LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQK PGQAPRLLIYLASYLESQVPAFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFA VYYCQHSRDLPFTFGGGTKVEIK
11	Anti-PD-1-scfv	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTFTNYYMYWVRQA PGQGLEWMGGINPSNGGTNFKNEKFNRLTDTSSSTTTAY MELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTVTVSS GGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASK GVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESQVPAFSGS GSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPFTFGGGTKVEIK
12	hFc(=hlgG4-Fc)	ESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLK
13	hlgG1-Fc	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
14	IGHG	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTCTYCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
15	IGKC	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFNRGE

서열 번호	이름	서열
16	TGFβ Trap- hFc- FEBM	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT SICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKK KPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEYNTSNPDGGGESKYGPPCPPCPAPEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SLGKGGGGSGGGSSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ
17	TGFβ Trap- FEBM- hFc	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT SICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKK KPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEYNTSNPDGGGGSSSPIQGSWTWENGK WTWKGIIRLEQGGGGSGGGSESKEYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFF YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
18	FEBM- TGFβ Trap- hFc	SSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGGSIIPPHVQKSVNNDMIVTDNN GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDEN ITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNI IFSEYNTSNPDGGGGSGGGSESKEYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFF LYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
19	FEBM- hFc- TGFβ Trap	SSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGIPP HVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSIC

[274]

		EKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPG ETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNP
20	hFc- FEBM- TGFβ Trap	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSSSPIQGSGWTWENGKWTWKGIIRLEQG GGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMS NCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCM KEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD
21	hFc- TGFβ Trap- FEBM	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQL CKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCH DPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTS NPDGGGGSSSPIQGSGWTWENGKWTWKGIIRLEQ
22	FEBM- TGFβ Trap- FEBM- hFc	SSSPIQGSGWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNN GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDEN ITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNI IFSEEYNTSNPDGGGGSSSPIQGSGWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGGSGGG GSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLK
23	hFc- FEBM- TGFβ Trap- FEBM	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSSSPIQGSGWTWENGKWTWKGIIRLEQG GGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMS

[275]

		NCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIM KEKKKPGETFFMCSYSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSSSSPIQG SWTWENGKWTWKGIIRLEQ
24	FEBM- TGFβ Trap- FEBM- hFc- FEBM	SSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMI VTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSYSSDE CNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSSSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGG GSGGGGSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSSSPIQGSWTWENGKWTWK GIIRLEQ
25	FEBM- hFc- FEBM- TGFβ Trap- FEBM	SSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGGSGGGGSESKYGPPCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSLGLKGGGSSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGGGSIPPHVQKSVN NDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCA VAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCS YSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSSSSPIQGSWTWENGKWTW KGIIRLEQ
26	TGFβ Trap- FEBM- hlgG1- Fc	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSIT SICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKK KPGETFFMCSYSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD GGGSSSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGGSGGGGSTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTPVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

[276]

27	hlgG1- Fc- FEBM- TGFβ Trap	THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSSSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGG GSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNC SITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKE KKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD
28	hFc- soluble TGFβ Trap	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQL CKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCH DPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTS NPD
29	Anti- EDB- FN-HC- IGHG- TGFβ Trap	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNN GAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDEN ITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSYSSDECNDNI IFSEEYNTSNPD
30	Anti- EDB- FN-LC- IGKC- TGFβ Trap	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYASS RATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG ECGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTC

[277]

		DNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILE DAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD
31	TGFβ Trap- anti- EDB- FN- hlgG	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT SICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKK KPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGT TYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPKNTKVDKRV SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV HEALHNHYTQKSLSLGLK
32	Anti- EDB- FN- scFv- hFc- TGFβ Trap	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRAS QSVSSSLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSGESKYGPPCPPC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVHEALHNHY TQKSLSLGLKGGGGSGGGGSIIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKF CDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPK LPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD
33	hFc- anti- EDB- FN- scFv- TGFβ Trap	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKSSSSGSSSSGSSSGEVQLLESGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGTLVTVSSGGGGSG

		GGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQ APRLIIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTF GQGTKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSSGIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLC KFCDFVFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHD PKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCS CSSDECNDNIIFSEEYNTSN PD
34	Anti- EDB- FN- scFv- TGFβ Trap- hFc	EVQLLES GGGGLVQP GGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFPFYFDY WGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRAS QSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSGIPPHVQKSVN NDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFVFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCA VAVWRKNDENITLETVCHD PKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCS CSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSESKYGPCCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKS LSLSLGK
35	hFc- TGFβ Trap- Anti- EDB-FN scFv	ESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGKSSSSSGSSSSSGSSSGIPPHVQKSVNNDMIVTD NNGAVKFPQLCKFCDFVFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKN DENITLETVCHD PKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCS CSSDECND NIIFSEEYNTSNPDSSSSSGSSSSSGSSSGEVQLLES GGGGLVQP GGGSLRLSCAA SGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFPFYFDYWGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSG GGGGSEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLI IYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGT KVEIK

36	Anti- EDB-FN scFv- TGFβ Trap	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGT LVT VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRAS QSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKEIKSSSSSGSSSSSGSSSGIPPHVQKSVN NDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEV VAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCS CSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD
37	Anti- TGFβ1- HC- IGHG- FEBM	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVR ALPSVYWGQGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKP SNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEPVT VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSSSPIQGSWTWENGKWTW KGIIRLEQ
38	Anti- TGFβ1- LC- IGKC- FEBM	SYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDII RPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTGK VTVLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS FNRGECGGGSSSPIQGSWTWENGKWTW KGIIRLEQ
39	FEBM- Anti- TGFβ1- IGHG	SSSPIQGSWTWENGKWTW KGIIRLEQGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSG AEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYWG QGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTEPVT CVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK

40	Anti-TGFβ1 scFv-FEBM-hFc	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVR ALPSVYWGQGTLVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARIT CGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTI SRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTGKVTVLGGGSSSPIQGSSWTWEN GKWTWKGIIRLEQGGGGSGGGGSGGGGSESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
41	FEBM-Anti-TGFβ1 scFv-hFc	SSSPIQGSSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSG AEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYWG QGTLVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSK SVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEA DYYCQVWDRSDQYVFGTGKVTVLGGGGSGGGGSGGGGSESKYGPPCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHY TQKSLSLGLGK
42	hFc-FEBM-anti-TGFβ1 scFv	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGKGGGSSSPIQGSSWTWENGKWTWKGIIRLEQG GGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISW VRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARGLWEVRALPSVYWGQGTLVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSYELT QPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGI PERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTGKVTVL

[281]

43	hFc- anti- TGFβ1- scFv- FEBM	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKP GSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYWGQGLTVTV SSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQ QKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV WDRSDQYVFGTGTKVTVLSSSSGSSSSGSSSSGSSSPIQGSWTWENGKWT WKGIIIRLEQ
44	Anti- TGFβ1- scFv- FEBM	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVR ALPSVYWGQGLTVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARIT CGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTI SRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTGTKVTVLGGGGSGGGGSGGGGS SSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIIRLEQ
45	FEBM- anti- TGFβ1 scFv	SSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIIRLEQGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSG AEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYWG QGLTVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSK SVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEA DYYCQVWDRSDQYVFGTGTKVTVL
46	Anti- EDB- FN-HC- IGHG- anti- TGFβ1 scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVD KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQE DPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY SDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKP GSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYWGQGLTVTV

		SSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQ QKAGQAPVLVVSIEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV WDRDSDQYVFGTGTKVTVL
47	Anti- TGFβ1- hlgG- Anti- EDB-FN scFv	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVR ALPSVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPK SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKSSSSGSSSSGSSSSGVEQLLES GLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYA DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGT VSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLA WYQKPKGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQTGRIPPTFGQGTKVEIK
48	Anti- TGFβ1 scFv- anti- EDB- FN- hlgG	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVR ALPSVYWGQGTLVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARIT CGANDIGSKSVHWYQKAGQAPVLVVSIEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLT ISRVEAGDEADYYCQVWDRDSDQYVFGTGTKVTVLGGGGGSGGGGSGGGG SEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNSAMTWVRQAPGKRLEWVAS ISGGGTTYYPDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSHYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPK SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK

49	Anti-TGFβ1 scFv- anti- EDB-FN- hlgG	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVR ALPSVYWGGQGLTVTVSSSSSSSGSSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARIT CGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTI SRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTGKTVLGGGGSGGGSGGGG SEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNSAMTWVRQAPGKRLEWVAS ISGGGTYYPD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSHYWG QGT LVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKR VESKYGPCCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVS NKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
50	Anti- EDB-FN scFv- Anti- TGFβ1 hlgG	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKEIKSSSSGSSSSGSSSSGQVQLVQSGAE VKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQ KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYWGGQ TLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVES KYGPCCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLGK
51	Anti- EDB-FN scFv- anti- TGFβ1	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGLTVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKEIKSSSSGSSSSGSSSSGQVQLVQSGAE VKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQ

	scFv- hFc	KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVVYCARGLWEVRALPSVYWGGQ TLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSK SVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEA DYYCQVWDRSDQYVFGTGTKVTVLGGGGSGGGGSGGGGSESKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNH YTQKSLSLSLGK
52	Anti- TGFβ1 scFv- anti- EDB-FN scFv- hFc	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVVYCARGLWEVR ALPSVYWGGQTLVTVSSSSSSSGSSSSSGSSSSSYELTQPPSVSVAPGQTARIT CGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTI SRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTGTKVTVLGGGGSGGGGSGGGGGS EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCAKPFYFDY WGQGTTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNH YTQKSLSLSLGK
53	hFc- Anti- EDB-FN scFv- Anti- TGFβ1 scfv	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGSSSSSGSSSSSGSSSSGEVQLLESGLVQPGGSL RLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTYYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVVYCAKPFYFDYWGGQTLVTVSSGGGGSG GGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQ APRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTF GQGTKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTF

		SSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDNAVYYCARGLWEVRALPSVYWGQGLTVTVSSSSSSGSSSSGSSS SGSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVNSE DIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTG TKVTVL
54	hFc- Anti- TGFB1 scFv- Anti- EDB-FN scFv	ESKYGPPCPPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKP GSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQ RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGLWEVRALPSVYWGQGLTV SSSSSSGSSSSGSSSSGSGSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQ QKAGQAPVLVNSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV WDRSDQYVFGTGKTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQK PGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRI PPTFGQGTKVEIK
55	Anti- EDB-FN scFv- Anti- TGFB scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVSSFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGQVQLVQSGAE VKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQ KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGLWEVRALPSVYWGQG TLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSK SVHWYQQKAGQAPVLVNSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEA DYYCQVWDRSDQYVFGTGKTVLG
56	Anti- TGFB1 scFv- Anti-	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGLWEVR ALPSVYWGQGLTVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSGSYELTQPPSVSVAPGQTARIT CGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVNSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLT

	EDB-FN scFv	SRVEAGDEADYYCQVWDRDSDQYVFGTGKTVLGGGGSGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGT LVT VSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
57	Anti- PD-1- HC- IGHG- FEBM- TGFβ Trap	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLT TDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGQGT TVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSSSPIQGSWTWENGK WTWKGIIRLEQGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCK FCDVRFSTCDNQSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDP KLPYHDFILED AASPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEYNTSNP D
58	Anti- PD-1- HC- IGHG- TGFβ Trap- FEBM	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLT TDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGQGT TVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKGGGGSIPPHVQKSVNND MIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQSCMSNCSITSICEKPQEVCAV WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASPKCIMKEKKKPGETFFMCSYSS DECNDNIIFSEYNTSNPDGGGGSGGGGSSSPIQGSWTWENGKWTWKGI RLEQ

59	Anti- PD-1- LC- IGKC- FEBM- TGFβ Trap	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYL ASYLESQVPAFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTVK EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGSSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGGSGGGGSIPPHVQK SVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQ EVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD
60	Anti- PD-1- LC- IGKC- TGFβ trap- FEBM	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYL ASYLESQVPAFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTVK EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGGSGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKF CDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVAVWRKNDENITLETVCHDPK LPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD SSSSGSSSSGSSSSGSSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ
61	TGFβ Trap- FEBM- anti- PD-1- HC- IGHG	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSIT SICEKPQEVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKK KPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGSGGGSSSSPI QGSWTWENGKWTWKGIIRLEQSSSSGSSSSGSSSQVQLVQSGVEVKKPG ASVKVSCASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKF KNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLK
62	FEBM- TGFβ Trap- anti- PD-1-	SSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQSSSSGSSSSGSSSGIPPHVQKSVNN DMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVAV AVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSC SDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGSGGGGSQVQLVQSGVEVKKPG ASVKVSCASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKF

	HC- IGHG	KNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESK YGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLGLK
63	Anti- PD-1 scFv- hFc- FEBM- TGFβ Trap	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESGVPARFSGSG SGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIKSSSSGSSSSGSSSS GESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQG GGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMS NCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIM KEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEYNTSNPD
64	Anti- PD-1 scFv- hFc- TGFβ Trap- FEBM	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVCKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESGVPARFSGSG SGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIKSSSSGSSSSGSSSS GESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP QLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETV CHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEYN TSNPDGGGGSGGGGSSSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ

65	TGFβ Trap- FEBM- hFc- anti- PD1- scFv	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT SICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKK KPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSSSSPI QGSWTWENGKWTWKGIIRLEQSSSSGSSSSGSSSSGESKYGPCPPCPAPEF LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWVVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSLGKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKKASGYFTT NYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVLTLDSTTTAY MELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGTGTTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQ APRLLIYLASYLESQVPAFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTF GGGKVEIK
66	Anti- PD-1 scFv- FEBM- TGFβ Trap	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLTLDSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGGTGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESQVPAFSGSG SGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIKSSSSGSSSSGSSSS GSSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGGSGGGGSGGGGSIIPPHVQKS VNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFM CSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD
67	Anti- PD-1 scFv- TGFβ Trap- FEBM	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLTLDSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGGTGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESQVPAFSGSG SGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIKSSSSGSSSSGSSSS GIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS ITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEK KKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSSSSP IQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ

68	TGFβ Trap- FEBM- anti- PD1- scFv	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT SICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKK KPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSSSSPI QGSWTWENGKWTWKGIIRLEQSSSSGSSSSGSSSSGQVQLVQSGVEVKKPG ASVKVSCKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKF KNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTT VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSG YSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESQVAPRFSGSGSGTDFLTISSELEPDF AVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIK
69	Anti- PD1- HC- IGHG- anti- EDB-FN scfv- TGFβ Trap	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKSSSSGSSSSGSSSSGSEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGT TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQ GTLTVTSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SSFLAWYQQKPGQAPRLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPDF AVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGIPPHVQKSVNNDMI VTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE CNDNIIFSEEYNTSNPD
70	Anti- PD1- HC- IGHG- TGFβ Trap- anti-	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS

[291]

	EDB-FN scfv	RWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGGSIPPHVQKSVNND MIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAV WRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSS DECNDNIIFSEYNTSNPDSSSSSGSSSSSGSSSGEVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISR NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQGLTVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQA PRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFG QGTKVEIK
71	Anti- PD1- LC- IGKC- anti- EDB-FN scfv- TGFB Trap	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQAPRLLIYL ASYLESQVPAARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECSGSSSGSSSGSSSGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQ SPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYASSRATGIP DRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKGGGGSG GGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMS NCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIM KEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEYNTSNPD
72	Anti- PD1- LC- IGKC- TGFB Trap- anti- EDB-FN scfv	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQAPRLLIYL ASYLESQVPAARFSGSGSGTDFLTISSELEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECSGSSSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRF TCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDF ILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEYNTSNPDSSSSGS SSSGSSSGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGK GLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKPFYFDYWGGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGE RATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK

73	Anti- EDB-FN scfv- TGFβ Trap- anti- PD1- HC- IGHG	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRAS QSVSSSLAWYQQKPGQAPRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDM IVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVAVW RKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSSSDE CNDNIIFSEYNTSNPDSSSSGSSSSGSSSSGQVQLVQSGVEVKKPGASVKVS CKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLT TDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTVTVSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHY TQKSLSLSLGK
74	TGFβ Trap- anti- EDB-FN scfv- anti- PD1- HC- IGHG	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT SICEKPQEVCAVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKK KPGETFFMCSSSDEECNDNIIFSEYNTSNPDSSSSGSSSSGSSSSGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTY YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGTLL TVTSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSF LAWYQQKPGQAPRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGQVQLVQSGVEVKKPGAS VKVSCASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKN RVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL LHNHYTQKSLSLSLGK

75	Anti- PD1- scfv- hFc- anti- EDB-FN scfv- TGFβ Trap	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESQVPAFSGSG SGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKEIKSSSSGSSSSGSSSS GESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKSSSSGSSSSGSSSSGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQTLTVSSGGGGSG GGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQ APRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTF GQGTKVEIKGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKL PYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEYNTSNPD
76	Anti- PD1- scfv- hFc- TGFβ Trap- anti- EDB-FN scfv	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESQVPAFSGSG SGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKEIKSSSSGSSSSGSSSS GESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKSSSSGSSSSGSSSSGSEVQLLESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFTSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQTLTVSSGGGGSG GGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQ APRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTF GQGTKVEIKGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFC DVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPKL PYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEYNTSNPD

77	Anti- EDB-FN scfv- TGFβ Trap hFc- anti- PD1 scfv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSIPPHVQKSVNNDM IVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVW RKNDENITLETVCHDPLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDE CNDNIIFSEEYNTSNPDSSSSSGSSSSSGSSSGESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDDSGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKSS SSGSSSSSGSSSGQVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVR QAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVLTLDSTTTAYMELKSLQFD DTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVL TQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYL ESGVPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKEIK
78	Anti- PD1- scfv- anti- EDB-FN scfv- TGFβ Trap	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLTLDSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESQVAPRFSGSG SGTDFLTISLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKEIKSSSSSGSSSSSGSSS GEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFD YWGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE EPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSGIPPHVQKSVN NDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCA VAVWRKNDENITLETVCHDPLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKKPGETFFMCSC CSSDECNDNIIFSEEYNTSNPD

79	Anti- PD1- scfv- TGFβ Trap- anti- EDB-FN scfv	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLTLDSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESVGPARGSGSG SGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKEIKSSSSSGSSSSSGSSSS GIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCS ITSICEKPQEVCAVVRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEK KKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDEVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFPYFDYWGGQGLTVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQKPGQA PRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFG QGTKVEIK
80	TGFβ Trap- Anti- PD1- scfv- anti- EDB-FN scfv	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSIT SICEKPQEVCAVVRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKK KPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDSSSSGSSSSSGSSSSGQVQLVQ SGVEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSN GGTNFNEKFKNRVLTLDSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGF DYWGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESVGPARGSGSGSGTDFTL TISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKEIKSSSSSGSSSSSGSSSSGEVQLLE SGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTT YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFPYFDYWGGQ TLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSS SFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
81	Anti- PD1- HC- IGHG- FEBM- anti- TGFβ1 scfv	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLTLDSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS

		RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGKSSSSGSSSSGSSSSGSSSPI QGSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVK KPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKF QGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDATVYYCARGLWEVRALPSVYWGQGT LVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSSSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVH WYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYY CQVWDRDSDQYVFGTGKVTVL
82	Anti-PD1-HC-IGHG-anti-TGFβ1 scfv-FEBM	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFKFKNRVLTLDSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGQGTITVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSEQDEPVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGKGGGSGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIP FGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDATVYYCARGLWEVRALP SVYWGQGTITVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSSSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGA NDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDRDSDQYVFGTGKVTVLGGGGSGGGGSGGGGSSSSPI QGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ
83	Anti-PD1-LC-IGKC-FEBM-anti-TGFβ1 scfv	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYL ASYLESQVPAARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGGSGGGGSGGGGSSSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGG SGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQA PGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDATV YYCARGLWEVRALPSVYWGQGTITVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSSSYELTQPPSV SVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISG SNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDRDSDQYVFGTGKVTVL

84	Anti- PD1- LC- IGKC- anti- TGFB1 scfv- FEBM	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYL ASYLESQVPAFSGSGSGTDFLTLSLEPEDFAVYYCQHSRDLPFTFGGGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSS YAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSEDNAVYYCARGLWEVRALPSVYWGQGLTVTVSSSSSSGSSSSGSSSSG SYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDI RPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTGTK VTVLGGGSGGGGSSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQ
85	Anti- TGFB1 scfv- FEBM- anti- PD1- HC- IGHG	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGLWEVR ALPSVYWGQGLTVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSSSYELTQPPSVSVAPGQTARIT CGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTGTKVTVLGGGSGGGGSSSPIQGS SWTWENGKWTWKGIIRLEQSSSSGSSSSGSSSSGQVQLVQSGVEVKKPGAS VKVSCASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKN RVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVS NKGLEPPSIKTKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLK
86	FEBM- anti- TGFB1 scfv- anti- PD1- HC- IGHG	SSSPIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSG AEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGLWEVRALPSVYWG QGLTVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSSSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSK SVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEA DYYCQVWDRSDQYVFGTGTKVTVLGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSG VEVKKPGASVKVSCASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGG TNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDY WGQGT VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW

		NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQ EDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
87	Anti- PD1- scfv- hFc- FEBM- anti- TGFβ1 scfv	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLTLDSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESGVPARFSGSG SGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPITFGGGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSS GESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGGSGGGGSSSSPIQGSWTWENGKWTWK GIIRLEQGGGGSGGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTF SSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYM ELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYWGQGLTVTVSSSSSGSSSSGSSSS SGSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSE DIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDRDSDQYVFGTG TKVTVL
88	Anti- PD1- scfv- hFc- anti- TGFβ1 scfv- FEBM	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLTLDSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESGVPARFSGSG SGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPITFGGGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSS GESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGGSGGGGGSGGGGSQVQLVQSGAEVKKP GSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQG

		RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGLWEVRALPSVYWGGTLTV SSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQ QKAGQAPVLVVSIEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV WDRSDQYVFGTGTKVTVLGGGSGGGGSSSSPIQGSWTWENGKWTWK GIIRLEQ
89	anti- TGFβ1 scfv- FEBM- hFc- anti- PD1 scfv	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGLWEVR ALPSVYWGGTLTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARIT CGANDIGSKSVHWYQKAGQAPVLVVSIEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLT SRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTGTKVTVLGGGSGGGGSSSSPIQ GSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGSGGGGSGGGGSESKYPPCPPCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSLGKSSSSGSSSSGSSSSGQVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYFTN YYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAY MELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTVTVSSGGGSGGGG SGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQ APRLLIYLAYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTF GGGKVEIK
90	Anti- PD1- scfv- FEBM- anti- TGFβ1 scfv	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGGQTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLAYLESGVPARFSGSG SGTDFTLTSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIKGGGSGGGGSSSS PIQGSWTWENGKWTWKGIIRLEQGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEV KKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCARGLWEVRALPSVYWGGT LTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVH

[300]

		WYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYY CQVWDRDSDQYVFGTGKVTVL
91	Anti- PD1- scfv- anti- TGFβ1 scfv- FEBM	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESVGPARGSGSG SGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQHSRDLPFTFGGGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSS GQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG GIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEV RALPSVYWGGQTLVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARIT CGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTI SRVEAGDEADYYCQVWDRDSDQYVFGTGKVTVLGGGGSGGGGSSSSPIQ GSWTWENGKWTWKGIIRLEQ
92	Anti- TGFβ1 scfv- FEBM- anti- PD1 scfv	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVR ALPSVYWGGQTLVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARIT CGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTI SRVEAGDEADYYCQVWDRDSDQYVFGTGKVTVLGGGGSGGGGSSSSPIQ GSWTWENGKWTWKGIIRLEQSSSSGSSSSGSSSSGQVQLVQSGVEVKKPGA SVKVSKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFK NRVLTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGGQTTV TVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGY SYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESVGPARGSGSGTDFTLTISSELEPEDFA VYYCQHSRDLPFTFGGGTKVEIK

[301]

93	Anti- PD1- HC- IGHG- anti- EDB-FN scfv- anti- TGFβ1 scfv	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVCKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLTITDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGGQTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKSSSSSGSSSSSGSSSSGEVQLL ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGT TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQ GTLVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SSFLAWYQQKPGQAPRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSGQVQLVQSGAEVKKP GSSVKVCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYWGGTLTV SSSSSSGSSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQ QKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV WDRDSDQYVFGTGTKVTVL
94	Anti- PD1- HC- IGHG- anti- TGFβ1 scfv- anti- EDB-FN scfv	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVCKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLTITDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGGQTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLKGGGGSGGGGGSGGGGSQV QLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPI FGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALP SVYWGGTLTVSSSSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGA NDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDRDSDQYVFGTGTKVTVLSSSSSGSSSSSGSSSSGEVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTY

		YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQTL VTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSF LAWYQQKPGQAPRLIIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVY YCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
95	Anti- PD1- LC- IGKC- anti- EDB-FN scfv- anti- TGFβ1 scfv	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQAPRLIIYL ASYLESQVPAARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGQTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFSM SWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQ SPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLIIYASSRATGIP DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSGSS SSGSSSSGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAIWVRQAPGQ GLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYC ARGLWEVRALPSVYWGQGLTVTVSSSSSSSGSSSSSGSYELTQPPSVSVA PGQTARITCGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVVEDIIRPSGIPERISGSNS GNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTGKVTVL
96	Anti- PD1- LC- IGKC- anti- TGFβ1 scfv- anti- EDB-FN scfv	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQAPRLIIYL ASYLESQVPAARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGQTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGECSGGGGSGGGGSGGGGSGQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSS YAIWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMEL SSLRSED TAVYYCARGLWEVRALPSVYWGQGLTVTVSSSSSSSGSSSSSGSSSSG SYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVVEDII RPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTGK VTVLSSSSSGSSSSSGGGGSEVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFSMS WVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQS

[303]

		PGTSLSPGERATLSCRASQSVSSSLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYQCQTGRIPPTFGQGTKVEIK
97	Anti- EDB-FN scfv- anti- TGFβ1 scfv- anti- PD1- HC- IGHG	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVSSSLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYQCQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGQVQLVQSGAE VKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQ KFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYWGQG TLVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSV HWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADY YCQVWDRSDQYVFGTGTKVTVLGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGVEV KKPGASVKVCKASGYFTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNF NEKFKNRVLTLDSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWG QGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSG ALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSEQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK
98	Anti- TGFβ1 scfv- anti- EDB-FN scfv- anti- PD1-	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVR ALPSVYWGQGTLLTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARIT CGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTI SRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTGTKVTVLGGGGSGGGGSGGGGGS EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGTLLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS

	HC- IGHG	QSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGQVQLVQSGVE VKKPGASVKVSCASGYFTFTNYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNNGGTN FNEKFKNRVLTLDSSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYW GQGTTTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLK
99	Anti- PD1- scfv- hFc- anti- EDB-FN scfv- anti- TGFβ1 scfv	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYFTFTNYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNNGGTNFNEKFKNRVLTLDSSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWQGTTTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLAYLESVGPARFSGSG SGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIKSSSSGSSSSGSSSS GESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGLVQPG GSLRLSCAASGFTSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAKPFYFDYWQGTLTVTSSGGG GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSFLAWYQQK PGQAPRLLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRI PPTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTANYAQKFQGRVTITADES TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYWGQGLTVTSSSSSSGSS SSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQQKAGQAP VLVVSIEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDRSDQ YVFGTGKVTVL

[305]

100	Anti-PD1-scfv-hFc-anti-TGFβ1-scfv-anti-EDB-FN-scfv	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLTLDSSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWGGQTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESQVPAFSGSG SGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKVEIKSSSSGSSSSGSSSS GESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNGKLPSSIETISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKP GSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANYAQKFQG RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYWGQGLTVT SSSSSSGSSSSGSSSSGSELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSKSVHWYQ QKAGQAPVLVVSIEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV WDRSDQYVFGTGTKVTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPG GSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGGQGLTVTVSSGGG GSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQK PGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRI PPTFGQGTKVEIK
101	Anti-EDB-FN-scfv-anti-TGFβ1-scfv-hFc-anti-PD1-scfv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGLTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSG AEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIIPFGTANY AQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYWG QGTLTVTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGSK SVHWYQQKAGQAPVLVVSIEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDEA DYYCQVWDRSDQYVFGTGTKVTVLGGGGSGGGGSGGGGSESKYGPCCPP CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNGKLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVSMHEALHNHY

		TQKSLSLGKSSSSGSSSSGSSSSGQVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGY TFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKNRVLTITDSSTT TAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWQGTTVTVSSGGGGSGG GGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKP GQAPRLLIYLAAYLESVGPARGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQHSRDL LTFGGGTKEIK
102	Anti- PD1- scfv- anti- EDB-FN scfv- anti- TGFβ1 scfv	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLTITDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLAAYLESVGPARGSGG SGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKEIKSSSSGSSSSGSSSS GEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKLEWVSSI SGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFD YWQGTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSSLAWYQQKPGQAPRLIYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISR EPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKEIKGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQS GAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGTAN YAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVRALPSVYW GQGTTLTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARITCGANDIGS KSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTISRVEAGDE ADYYCQVWDRSDQYVFGTGKVTVL
103	Anti- PD1- scfv- anti- TGFβ1 scfv- anti- EDB-FN scfv	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVLTITDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDY RFDMGFDYWQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGE RATLSCRASKGVSTSGSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLAAYLESVGPARGSGG SGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKEIKSSSSGSSSSGSSSS GQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMG GIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEV RALPSVYWQGTLTVSSSSSSGSSSSGSSSSGSYELTQPPSVSVAPGQTARIT CGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTI

		SRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTGTKVTVLGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGTLLTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIK
104	Anti- TGFβ1 scfv- anti- EDB-FN scfv- anti- PD1 scfv	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGG IIPFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGLWEVR ALPSVYWQGTLLTVSSSSSSSGSSSSSGSSSYELTQPPSVSVAPGQTARIT CGANDIGSKSVHWYQQKAGQAPVLVSEDIIRPSGIPERISGSNSGNTATLTI SRVEAGDEADYYCQVWDRSDQYVFGTGTKVTVLGGGSGGGGSGGGGS EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGTLLTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS QSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKSSSSSGSSSSSGSSSQVQLVQSGVE VKKPGASVKVSCASGYFTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGGINPSNGGTN FNEKFKNRVLTITDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYW GQGTTTVTVSSGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASK GVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLIYLASYLESGVPARFSGSGSGTDFTLTISS LEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGTKVEIK
105	Soluble TGFβ Trap- hFc	IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSIT SICEKPQEVCAVVRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCIMKEKKK PGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGGGSGGGGSGGGGSESKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLGLK

[308]

106	hFc-soluble TGFβ Trap	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSGGGGSGGGGSIIPHVQKSVNNDMIVT DNNGAVKFPQLCKFCDFRSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRK NDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAAAPKCMKEKKKPGETFFMCSCSSDEC NDNIIFSEEYNTSNPD
107	hFc-FEBM	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLGLKGGGSGGGGSSSSPIQGSWTWENGKWTWKGII RLEQ
108	Anti-EDB-FN-HC-IGHG	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSIS GSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSQED PEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK
109	Anti-PD-1-HC-IGHG	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVCKASGYFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMG GINPSNGGTNFNEKFKNRVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYR FDMGFDYWGGQTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPSSSLGKTYTCNVDHK PSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

[309] 1-4. 융합 단백질 생산 및 정제

[310] 일시적 CHO 발현

[311] 실시예 1-2의 융합 단백질의 N-말단에 신호 서열인

MGWSCIIFLVATATGAYA(서열번호 112)를 포함하였다. pCAG 포유동물 발현 플라스미드 벡터(FUJIFILM Wako, 일본)의 KpnI (5' 단부) 및 NotI (3' 단부)부위

로 클로닝한 다음, 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포의 일시적 형질감염에 의해 융합 단백질을 생산하였다.

[312] 즉, ExpiCHO™ 발현 시스템 키트 (Thermo fisher Scientific, 미국)을 사용하였다. 글루타맥스(Thermo fisher Scientific, 미국)가 포함된 무혈청 ExpiCHO™ 발현배지(Thermo fisher Scientific, 미국)에서 ExpiCHO-S 세포의 각각 400 mL 부터 1,200 mL 배양액에 플라스미드 DNA를 형질감염시키고, 37°C로 유지하였다.

[313] 형질감염 조건은 ExpiCHO™ 발현시스템의 사용자 가이드에 따라 수행하였다. 배양 플라스크 1L 기준으로 DNA 1 μ g/mL과 ExpiFectamine™ CHO Reagent를 OptiPRO SFM (Thermo fisher Scientific, 미국)에 희석하여 처리하였다. 형질감염 18-22시간 후, ExpiCHO™ 피드(Feed) 및 ExpiCHO™ 인헨서(Enhancer)를 첨가하고, 온도 37°C에서, 형질감염 후 7-11일 동안 유지한 후, 세포를 수확하였다. 최종 수확 시 세포 생존율은 70% - 80% 이었다.

[314] 정제

[315] CHO 세포로부터 수확한 상층액을 0.22 μ m PES 필터(Corning, NY, 미국)로 여과하고, 단백질 A 멤셀렉트 슈어 엘엑스(Cytiva, 미국) 레진이 패킹된 컬럼 XK16(Cytiva, 미국)에 로딩 하였다. 세척1 버퍼와 세척2 버퍼를 각각 5 컬럼 부피로 세척하고, 5 컬럼 부피의 0.02 M 소듐 나트륨 pH 4.0과 pH3.8 버퍼를 사용하여 단백질을 용리하였다.

[316] 용리된 단백질의 정제 분획 시료는 크기배제크로마토그래피(SEC) 분석과 비환원조건의 소듐 도데실 설페이트 폴리 아크릴아마이드 겔 일렉트로포레시스 (SDS-PAGE) 분석을 진행하여 순도가 높은 시료를 선정하였다. 또한, 순도가 90% 이하인 정제 분획 시료는 생산량을 최대화하기 위하여, 단백질 A 컬럼 상에 재 공정을 목적으로 다시 로딩하고, 상기 기재된 바와 같이 용리하였다. 또한, 용리된 정제 단백질은 동일한 방법으로 분석하였다.

[317] 융합 단백질을 함유하는 정제 분획 시료를 풀링(Pooling)하였고, 1 M 트리스 (Tris)를 사용하여 용리된 분획을 약 pH7.0으로 중화하였다. SEC 분석은, 애질런트(Agilent infinity II)시스템을 사용하여, PBS (Enzynomics, 한국)에 희석하여 20-40 μ g의 단백질을 TSKgel guard column(7.0 μ m, 6.0 X 40 mm)이 장착된 TSKgel G3000SWxL(Tosoh, 일본) SEC 분석컬럼 (5.0 μ m, 7.8 X 300 mm) 상에 주사하였다. 실온에서 0.8 mL/분의 유량에서 30분 동안 해상하였으며, 목표 단백질 피크는 애질런트 VWD 검출기(애질런트, 미국)를 이용하여 UV 280nm/214nm에서 검출하였다. SDS-PAGE 분석은 비환원 조건에서 EzStainAqua (아토(ATTO), 일본) 염색을 진행 후, 3차 증류수를 사용하여 탈 염색하였다.

[318]

[319] 1-5. 융합 단백질의 타겟 결합 수준 평가

[320] 샌드위치 ELISA 방법을 이용하여 각각의 융합 단백질이 타겟에 동시에 결합하는 수준을 평가하였다.

- [321] 즉, 96웰의 제조합 EDB-FN-6x His(Abcam)가 코팅된 ELISA 플레이트(Nunc, 미국)를 1% BSA(Abcam, 미국) 함유 PBS 용액으로 1시간 동안 상온에서 블로킹한 다음, FEBM-, L19 hIgG-, L19 scfv-fusion TGF β -Trap 또는 soluble Trap control 등의 다양한 연속 희석된(1:2) 목적 단백질을 2시간 동안 상온에서 반응시킨 후, 세척 버퍼로 X회 세척한 다음, 바이오티닐화된 TGF- β 1(R&D Systems, Catalog #NFTG0, 미국) PBS에서 1:50 희석 후)를 상온에서 2시간동안 반응시킨 다음, 4회 희석 후, 각 웰마다 100 μ l의 ELISA 기질(호스래디시 퍼옥시다제가 붙은 스트렙 타비딘)을 첨가한 다음, 2N H₂SO₄를 첨가하여 HRP 반응을 중지시킨 후, 광학 밀도(OD)를 450nm에서 측정하여 결합수준을 평가하였다.
- [322]
- [323] 1-6. 유방암 동소 이식 마우스 모델 제작 및 융합 단백질 효과 확인
- [324] 실시예 1-2에서 제작한 5×10^4 개의 4T-1-LMT-2-Luc 세포주를 BALB/c 마우스 (오리엔트바이오, 한국)에 주사하여 유방암 동소 이식 마우스 모델을 제작하였다.
- [325] 생체 내 융합 단백질 분포 확인
- [326] 동소이식된 마우스 모델에 Cy5 표지된 20mg/kg의 다양한 융합 단백질(예시: hFc-soluble TGF β Trap, FEBM-hFc-TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap 및 hFc-TGF β Trap-FEBM 등)을 정맥 주사한 후 6일 후에 희생하여 조직별로 수집한 후 Cy5 형광신호를 IVIS imaging-Lumina S5(PerkinElmer, 미국)으로 분석하였다.
- [327] 종양 크기 분석
- [328] 동소이식된 마우스 모델에 20mg/kg의 다양한 융합 단백질(예시: hFc-soluble TGF β Trap, FEBM-hFc-TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap, hFc-TGF β Trap-FEBM 등) 및 대조군(예시: control-hFc)을 5일에서 25일까지 4일 간격으로 피하주사하였다. 종양 크기는 electronic calipers를 이용하여, 5일, 9일, 13일, 17일, 21일 및 25일에 측정하였다.
- [329] 전이율 분석
- [330] 동소이식된 마우스 모델의 성장 7일째에, D-luciferin을 복강내 주사하여 BLI(bioluminescence) 신호를 배경으로 사용하였다. primary fat pad tumor의 성장을 BLI 신호로 모니터링하여 유사한 BLI 신호를 가지는 5개의 그룹으로 분리하였다. 20mg/kg의 다양한 융합 단백질(예시: hFc-soluble TGF β Trap, FEBM-hFc-TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap, hFc-TGF β Trap-FEBM 등) 및 대조군(예시: control-hFc)을 5일에서 25일까지 4일 간격으로 피하주사하였다.
- [331] 암 전이율은 5, 11, 18, 21 및 25일째의 BLI 신호를 IVIS imaging-Lumina S5(PerkinElmer, 미국)으로 분석하였다. 죽은 마우스는 6시간 내에 해부하여 전이가 존재하는 지 분석하였다.
- [332] 생존률 분석
- [333] 전이율 분석과 동일한 방법으로 마우스 모델에 다양한 융합 단백질을 준비한 다음, 50일까지 생존한 마우스 수를 세어 생존곡선을 작성하였다.

- [334] 항-pSMAD 및 항-CD8 면역조직화학 분석
- [335] 동소이식된 마우스 모델에 20mg/kg의 다양한 융합 단백질(예시: hFc-soluble TGFβ Trap, FEBM-hFc-TGFβ Trap, hFc-FEBM-TGFβ Trap, hFc-TGFβ Trap-FEBM 등) 및 대조군(예시: control-hFc)을 5일부터 25일까지 4일 간격으로 투여한 다음, 24시간 뒤에 희생시킨 후, 4T-1-L2-Luc 종양조직을 포르말린에 고정한 후 파라핀에 매립하여 5 μm의 종양절편을 만들어 SuperFrost Plus 슬라이드(Thermo fisher Scientific, 미국)에 올린 뒤, Leica Bond autostainer의 유저 가이드에 따라 염색하였다.
- [336] 즉, 슬라이드를 베이킹, 디왁싱, 재수화시킨 다음, 95°C에서 ER2를 이용하여 20분간 항원을 노출시킨 후, 2.5% normal goat serum으로 블로킹한 다음, 일차 SMAD2 인산화 항체(Ser465/467, clone 138D4, NEB, 0.6 μg/mL, 미국) 및 일차 mCD8a 항체(clone 4SM15, eBioscience, 2.5 μg/mL, 미국)로 60분간 반응시켰다. HRP(Vector Labs, MP-7444, 미국)가 결합된 2차 항-rabbit 및 항-rat 이차 항체를 이용하여 항원을 검출하고, DAB 기질(Abcam, AB64238, 미국)을 이용하여 시각화하였다. Definiens Tissue Studio software를 이용하여 신호를 정량화하였고, hematoxylin 염색된 핵의 개수를 카운팅하여 전체 세포 개수를 계산하였다. DAB 크로모젠에 대한 임계값을 배경신호 이상으로 설정하여 양성 신호를 감지하였다.
- [337]
- [338] 1-7. 췌장암 동소 이식 마우스 모델 제작 및 융합 단백질 효과 확인
- [339] 실시예 1-2에서 제작한 2×10^6 PANC02-Luc 세포주를 C57BL/6J 마우스(오리엔트바이오, 한국)에 주사하여 췌장암 동소 이식 마우스 모델을 제작하였다.
- [340] 종양 무게 분석
- [341] 동소이식된 마우스 모델에 30mg/kg의 다양한 융합 단백질(예시: hFc-soluble TGFβ Trap, FEBM-hFc-TGFβ Trap, hFc-FEBM-TGFβ Trap, hFc-TGFβ Trap-FEBM 등) 및 대조군(예시: control-hFc)을 7일에서 57일까지 5일 간격으로 피하주사하였다. 종양 무게는 63일째에 모든 마우스를 희생한 후 종양을 수집하여 측정하였다.
- [342] 전이율 분석
- [343] 동소이식된 마우스 모델을 7일간 성장시킨 다음, D-luciferin을 복강내 주사하여 BLI(bioluminescence) 신호를 배경으로 사용하였다. primary fat pad tumor의 성장을 BLI 신호로 모니터링하여 유사한 BLI 신호를 가지는 7개의 그룹으로 분리하였다. 30mg/kg의 다양한 융합 단백질(예시: hFc-soluble TGFβ Trap, FEBM-hFc-TGFβ Trap, hFc-FEBM-TGFβ Trap, hFc-TGFβ Trap-FEBM 등) 및 대조군(예시: control-hFc)을 7일에서 57일까지 5일 간격으로 피하주사하였다.
- [344] 암 전이율은 7일 및 62일째의 BLI 신호를 IVIS imaging -Lumina S5(PerkinElmer, 미국)으로 분석하였다. 죽은 마우스는 6시간 내에 해부하여 전이가 존재하는 지 분석하였다. 63일째에 모든 마우스를 희생하였다.

- [345] 생존률 분석
- [346] 전이율 분석과 동일한 방법으로 마우스 모델에 다양한 융합 단백질을 준비한 다음, 63일까지 생존한 마우스 수를 세어 생존곡선을 작성하였다.
- [347] 항-pSMAD 및 항-CD8 면역조직화학 분석
- [348] Panc02-Luc 종양조직을 포르말린에 고정한 후 파라핀에 매립하여 5 μ m의 종양 절편을 만들어 이를 유방암 동소이식 마우스 모델 분석과 동일한 방법으로 분석하였다.
- [349] 1-8. 흑색종 정맥 이식 -> 흑색종 폐 전이 후 종양성장 마우스 모델 제작 및 융합 단백질 효과 확인
- [350] 실시예 1-2에서 제작한 1×10^5 B16-F10-Luc 세포주를 C57BL/6 수컷 마우스 (오리엔트바이오, 대한민국)에 정맥 주사하여 흑색종 이식 마우스 모델을 제작하였다.
- [351] 성장을 분석
- [352] 정맥 이식된 마우스 모델에 30mg/kg의 다양한 융합 단백질(예시: hFc-soluble TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap, hFc-TGF β Trap-FEBM, hFc-FEBM-anti-TGF β 1 scFv, Anti-EDB-FN-TGF β Trap-hFc, or hFc-anti-EDB-FN scFv-anti-TGF β 1 scFv 등) 및 대조군(예시: control-hFc)을 5일에서 25일까지 3일 간격으로 미정맥 주사하였다. 5일째에, D-luciferin을 복강내 주사하여 BLI(bioluminescence) 신호를 배경으로 사용하였다. primary fat pad tumor의 성장을 BLI 신호로 모니터링하여 유사한 BLI 신호를 가지는 5개의 그룹으로 분리하였다. 폐에서의 B16-F10-Luc-tumor 성장율은 5, 11, 18, 21, 및 28일째의 BLI 신호를 IVIS imaging-Lumina S5(PerkinElmer, 미국)으로 분석하였다. 평균 radiant efficiency 값은 전체 값을 각 ROI 크기로 정규화한 값이다.
- [353]
- [354] 실시예 2. Fibronectin 유전자 FN1 및 EDB domain의 암 연관성 확인
- [355] 실시예 1-1의 방법으로 Fibronectin EDB 전사체 발현을 분석한 결과, 도 1a에 기재된 바와 같이 인간 유전체 영역에서 Fibronectin 전사체 중 4개의 전사체가 암 조직에서 특이적으로 발현되는 EDB 엑손을 포함하는 것을 확인하였고, 실시예 1-1의 발현 분석방법으로 EDB 엑손과 전체 FN1 유전자의 발현을 분석한 결과, 도 1b에 기재된 바와 같이, EDB 엑손과 FN1 유전자 모두 정상 조직에 비해 종양 조직에서 더 높은 발현을 보이는 것을 확인하였다.
- [356] 또한 실시예 1-1의 예후 분석 방법을 이용하여 TCGA 데이터에서 다양한 암종에서의 FN1 EDB+ 유전자의 발현을 분석한 결과, 도 2a 내지 f에 기재된 바와 같이, 대부분의 암종에서 FN1 EDB+ 유전자 발현이 높을수록 예후가 좋지 않은 것을 확인하였으며, 실시예 1-1의 서열 정렬방법으로 FN1 EDB 도메인을 인간, 원숭이, 쥐 및 생쥐에서 분석한 결과, 도 3에 기재된 바와 같이 상기 4종에서 100% 보존되어 있는 것을 확인하였다.

- [357] 아울러, 실시예 1-2의 방법으로 동소이식된 11개의 다양한 종양 조직 및 정상 조직에서 FN1-EDB+ 전사체의 발현 수준 비교한 결과, 도 4에 기재된 바와 같이 4T-1(유방암), Colon26(대장암), PANC02(췌장암), KRasG12D/+TP53-/- PLC (Primary lung cancer cell lines derived from spontaneous Kras/p53 GEMMs, 폐암), B16F10(흑색종), Hepa6(간암), GL26(뇌종양), RM1(전립선암), YTN16(위암), RENCA(신장암), KRasG12D/+TP53-/- PSC (Primary sarcoma cell lines derived from spontaneous Kras/p53 GEMMs, 육종)등 모든 고형 종양 조직에서 FN1 EDB+ 발현이 3개의 정상 조직보다 월등히 높은 것을 확인하였고, TP53-/- PTLCL (Primary T lymphoma cell lines derived from spontaneous p53 GEMMs, 림프종) 혈액암은 정상 조직과 유사하게 발현하는 것을 확인하였으며, 이식한 고형암 중에서 췌장암 종양이 가장 높은 FN1 EDB+ 발현을 보였고, 가장 낮은 발현은 이식된 흑색종 종양인 것을 확인하였다.
- [358] 추후, 효력 평가를 위해 FN1-EDB high(췌장암 모델), FN1-EDB intermediate(유방암 모델), FN1-EDB low(흑색종 모델) 수준의 종양 모델을 사용하였다.
- [359]
- [360] 실시예 3. FEBM과 TGFβ Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 제작 및 결합능 확인
- [361] 3-1. FEBM과 TGFβ Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 생산 및 정제
- [362] 실시예 1-3의 방법으로 설계한 FEBM과 TGFβ Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질을 실시예 1-4의 방법으로 정제한 결과 도 5의 a 및 b에 기재된 바와 같이 단백질 순도는 90% 이상, 엔도톡신 수치는 0.1 EU/mL 이하인 것을 확인하였다. 본 실시예에서는 표 2의 FEBM과 TGFβ Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 중,
- [363] Control-hFc (서열번호 12): 인간 IgG4 중쇄 Fc 영역 (hIgG4-Fc)
- [364] hFc-FEBM (서열번호 107): hIgG4-Fc의 C-말단에 FEBM 폴리펩타이드가 융합 (hIgG4-Fc-FEBM)
- [365] Soluble TGFβ Trap-hFc (서열번호 105): hIgG4-Fc의 N-말단에 TGFβRII ectodomain 도메인이 융합.
- [366] TGFβ Trap-hFc-FEBM (서열번호 16): hIgG4-Fc의 N-말단에 TGFβRII ectodomain 도메인이 융합, Fc의 C-말단에 FEBM 폴리펩타이드가 융합됨.
- [367] TGFβ Trap-FEBM-hFc (서열번호 17): hIgG4-Fc의 N-말단에 FEBM 폴리펩타이드가 융합, 그 위에 TGFβRII ectodomain 도메인이 융합됨.
- [368] FEBM-TGFβ Trap-hFc (서열번호 18): hIgG4-Fc의 N-말단에 TGFβRII ectodomain 도메인이 융합, 그 위에 FEBM 폴리펩타이드가 융합됨.
- [369] hFc-soluble TGFβ Trap (서열번호 106): hIgG4-Fc의 C-말단에 TGFβRII ectodomain 도메인이 융합.
- [370] FEBM-hFc-TGFβ Trap (서열번호 19): hIgG4-Fc의 N-말단에 FEBM 폴리펩타이드가 융합, C-말단에 TGFβRII ectodomain 도메인이 융합됨.

- [371] hFc-FEBM-TGF β Trap (서열번호 20): hIgG4-Fc의 C-말단에 FEBM 폴리펩타이드가 융합, 그 뒤에 TGF β RII ectodomain 도메인이 융합됨.
- [372] hFc-TGF β Trap-FEBM (서열번호 21): hIgG4-Fc의 C-말단에 TGF β RII ectodomain 도메인이 융합, 그 뒤에 FEBM 폴리펩타이드가 융합됨.
- [373] 등의 단백질을 생산하고 정제하였다.
- [374] 3-2. FEBM과 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 결합능 평가
- [375] 실시예 1-5의 방법으로 실시예 3-1에서 정제한 융합 단백질들의 결합능을 평가한 결과, 도 6에 기재된 바와 같이 FEBM-TGF β Trap 구조의 다른 위치에서 구조적 변화에도 불구하고 두 표적 모두에 304.3~370ng/ml 범위에서 일관된 결합 친화성이 형성되는 것을 확인하였다.
- [376] 3-3. FEBM과 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질의 유방암 동소 이식 모델에서의 결합능 확인
- [377] 4T1 유방암 종양은 공격적인 성장, 전이 가능성, 인간 암에서 볼 수 있는 면역 반응을 시뮬레이션하는 능력으로 인해 삼중 음성 유방암(TNBC)을 연구하는 데 일반적으로 사용되는 쥐 모델이다. 이러한 종양은 종종 단독 요법으로 또는 다른 치료와 병용하여 항-PD-1 또는 항-PD-L1 요법에 반응하지 않으며, 이는 이 모델에서 종양 미세 환경(TME)의 면역 억제적 특성을 반영한다. 고도로 면역 억제적인 종양 미세 환경:4T1 종양 모델의 특징 중 하나는 효과적인 항종양 면역 반응에 필수적인 CD8⁺ 세포독성 T 세포의 침윤이 부족하다는 것이다. 이러한 면역 세포 침윤의 부족은 부분적으로 종양을 둘러싼 밀도가 높은 세포외 기질(ECM)과 섬유성 기질로 인해 발생하며, 이는 물리적 장벽이 된다.
- [378] 이전 연구에서 4T1 유방암 종양은 활성화된 TGF β 신호전달을 보였고, 최근 연구에서는 고형 종양에서 EDB-FN의 중간에서 높은 발현을 관찰하였다. 이러한 결과를 바탕으로 종양 ECM에 결합하고 국소적 TGF β 트래핑을 가능하게 하는 FN1 EDB⁺를 이중으로 표적으로 하는 약물을 평가하는 것이 적절할 것이라고 결정하였다.
- [379] 이에, 실시예 1-6의 방법으로 제작한 4T1 동소이식 마우스에서 수집한 종양 및 장기의 생체 내 분포를 확인한 결과, 도 7에 기재된 바와 같이 간과 신장에서 비교적 높은 형광 신호 강도가 관찰되었는데, 이는 프로브가 주로 이러한 기관을 통해 배출되기 때문이고, Cy5를 투여하지 않은 쥐의 간 조직에서 높은 형광 배경이 나타났음에도 불구하고, 자가형광을 제외한 복사 효율을 기준으로 볼 때 hFc-FEBM-TGF β Trap 또는 hFc-TGF β Trap-FEBM 이중 융합단백질로 처리한 종양에서 hFc-soluble TGF β Trap 및 FEBM-hFc-TGF β Trap에 비해 가장 높은 형광 강도가 나타나는 것을 확인하였다.
- [380] 또한 hFc-FEBM-TGF β Trap 과 hFc-TGF β Trap-FEBM 단백질은 모두 9가지 정상 조직 및 장기보다 종양에서 상당히 높은 형광 강도를 보였으며, hFc-FEBM-TGF β Trap은 hFc-TGF β Trap-FEBM 단백질에 비해 약간 더 높은 종양 특이성을 나타내는 것을 확인하였고, hFc-soluble TGF β Trap은 종양 특이성을 나타내지 않았고,

FEbM-hFc-TGFβ Trap은 간을 제외한 모든 정상 조직과 비교하여 약간의 종양 특이성을 보였지만, 그 차이는 유의하지 않았으며, hFc-FEBM-TGFβ Trap 과 hFc-TGFβ Trap-FEBM 단백질은 4T-1 동소 이식 종양에서 풍부하게 발현되는 EDB-FN에 대한 높은 특이도로 결합하는 것을 확인할 수 있었다.

[381]

[382] 실시예 4. FEBM과 TGFβ Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질의 치료 효과 확인

[383] 4-1. 종양 성장을 분석

[384] 유방 패드에 동소 이식한 진행성 유방 종양 모델은 장기 특이적 종양의 확립으로 인해 피하 종양 모델보다 임상적으로 더 관련이 있다. 고도로 전이된 세포주를 확립하기 위해 실시예 1-6의 방법을 사용했으며 그 결과, 도 8a에 기재된 바와 같이, hFc-FEBM-TGFβ Trap 및 hFc-TGFβ Trap-FEBM는 전체 고형암 가운데 중간 수준의 EDB 발현이 관찰된 동소 이식한 마우스 진행성 유방암 모델에서 다른 실험군에 비교했을 때 통계적 유의한 강력한 항종양 활성을 나타내는 것을 확인하였다.

[385] 또한, 도 8b에 기재된 바와 같이, 25일째 되는 날 hFc-soluble TGFβ Trap, FEBM-hFc-TGFβ Trap, hFc-FEBM-TGFβ Trap, 또는 hFc-TGFβ Trap-FEBM 투여군의 종양 부피는 이소타입 대조군의 종양 부피에 비해 각각 약 32.5%, 약 42.4%, 약 92.8%, 약 74.9% 감소하는 것을 확인하였다. 즉, hFc-FEBM-TGFβ Trap, 또는 hFc-TGFβ Trap-FEBM 투여는 각각 hFc-soluble TGFβ Trap보다 더 큰 폭(각각 >90%, >50%)으로 종양 성장을 억제하는 것을 확인하였다.

[386] 4-2. 폐 전이율 분석

[387] 실시예 1-6의 방법으로 hFc-soluble TGFβ Trap, FEBM-hFc-TGFβ Trap, hFc-FEBM-TGFβ Trap 및 hFc-TGFβ Trap-FEBM 융합 단백질 투여에 의한 유방암 동소이식 모델의 폐 전이율을 분석한 결과, 도 9에 기재된 바와 같이, 33일째에 hFc-soluble TGFβ Trap, FEBM-hFc-TGFβ Trap, hFc-FEBM-TGFβ Trap, or hFc-TGFβ Trap-FEBM 투여군의 폐 전이 특성은 각각 동종형 대조군에 비해 평균 0%, 0%, 100%, 100% 감소한 것을 확인하였다.

[388] 또한, hFc-FEBM-TGFβ Trap을 투여한 결과, 원발성 종양이 완전 반응한 반면 hFc-TGFβ Trap-FEBM는 5 마리 중 2 마리가 반응했으며, hFc-FEBM-TGFβ Trap는 폐로 전이되는 비율이 0%로 나타난 것을 확인하였다. 43일째에 hFc-soluble TGFβ Trap 및 FEBM-hFc-TGFβ Trap 투여군은 100% 폐전이율이 나타났으며, hFc-TGFβ Trap-FEBM는 폐로 전이되는 비율이 40%인 것을 확인하였다.

[389] 4-3. 생존율 분석

[390] 실시예 1-6의 방법으로 hFc-soluble TGFβ Trap, FEBM-hFc-TGFβ Trap, hFc-FEBM-TGFβ Trap 및 hFc-TGFβ Trap-FEBM 융합 단백질 투여에 의한 유방암 동소이식 모델의 생존율을 분석한 결과, 도 10에 기재된 바와 같이, 이소타입 대조군 대비 hFc-TGFβ Trap-FEBM는 50일 기준 생존율이 통계적으로 유의하게 40%

증가된 것을 확인하였으며, 더 놀랍게도 hFc-FEBM-TGF β Trap를 투여하면 약물 투여를 중단한 후에도 모든 쥐가 50일 동안 생존한 것을 확인하였다.

- [391] 4-4. 종양 경계부위와 종양 중심부위의 α -SMA 발현 분석
- [392] 알파 평활근 액틴(α -SMA)은 근섬유모세포와 암 관련 섬유모세포(CAF)의 핵심 마커로, 종양 미세환경(TME)의 세포외 기질(ECM)을 형성하는 데 중요한 역할을 하며, 그 발현은 종양 경계부위와 중심부위 사이에서 다른 경향이 있으며, α -SMA 양성 CAF는 ECM 단백질의 축적을 촉진하여 면역 억제 환경을 만드는 데 기여하여 밀도가 높은 스트로마를 형성한다. 이 스트로마는 물리적 장벽 역할을 하여 면역 세포가 종양 핵으로 침투하는 것을 제한하며, 높은 α -SMA 발현은 면역 세포 침투 및 낮은 면역 저항성 과 상관관계가 있다.
- [393] 4T-1 종양 경계부위(tumor margin)는 경계의 양쪽에서 200~300 μ m에 걸쳐 있는 영역 또는 50 μ m보다 큰 종양 기질의 여러 영역을 포함하는 종양 상피 섬으로 구성된 ROI로 정의하였고, 종양 중심부위(tumor core)는 종양 경계 내의 모든 영역으로 정의하였다.
- [394] 실시예 1-6의 방법으로 4T-1 종양 경계부와 종양 중심부에서 알파 SMA 염색의 정량화를 수행한 결과, 도 11의 좌측 패널에 기재된 바와 같이, hFc-soluble TGF β Trap, FEBM-hFc-TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap, 또는 hFc-TGF β Trap-FEBM 투여군의 tumor margin에서 α -SMA 발현이 이소타입 대조군에 비해 각각 약 21.0%, 약 38.1%, 약 83.7%, 약 61.7% 감소한 것을 확인하였다. 특히, hFc-FEBM-TGF β Trap 및 hFc-TGF β Trap-FEBM를 투여한 그룹은 종양 경계부위의 α -SMA 발현을 각각 hFc-soluble TGF β Trap보다 더 큰 폭(각각 >80%, >50%)으로 억제하는 것을 확인하였다.
- [395] 또한 도 11의 우측 패널에 기재된 바와 같이, hFc-soluble TGF β Trap, FEBM-hFc-TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap, 또는 hFc-TGF β Trap-FEBM 투여군의 종양 중심부에서 α -SMA 발현이 이소타입 대조군에 비해 각각 약 2.5배, 약 4.4배, 약 20배, 약 9.7배 증가한 것을 확인하였다. 특히, hFc-FEBM-TGF β Trap 및 hFc-TGF β Trap-FEBM를 투여한 그룹은 종양 중심부위의 α -SMA 발현이 각각 hFc-soluble TGF β Trap보다 더 큰 폭(각각 8배, 4배 이상)으로 증가하는 것을 확인하였다.
- [396] 4-5. Smad2의 인산화 감소 및 Cytotoxic immune CD8+ T 세포의 증가 확인
- [397] 실시예 1-6의 방법으로 Smad2의 인산화와 CD8의 발현양을 확인한 결과, 도 12a에 기재된 바와 같이, hFc-soluble TGF β Trap, FEBM-hFc-TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap, 또는 hFc-TGF β Trap-FEBM 투여군의 Tumor에서 Smad2의 인산화는 이소타입 대조군(control-hFc)에 비해 각각 약 23.8%, 약 39.2%, 약 67.2%, 약 57.8% 감소한 것을 확인하였다.
- [398] 특히, FEBM-hFc-TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap 및 hFc-TGF β Trap-FEBM를 투여한 그룹은 p-smad2 수준을 hFc-soluble TGF β Trap보다 각각 더 큰 폭(>21%, >57%, >43%)으로 억제하는 것을 확인하였다. 전신 노출을 특징으로 하는 hFc-soluble TGF β Trap은 마지막 투여 후 2일 후에 희생된 쥐의 종양 조직에서 Smad2

인산화를 유지하지 못했지만, FEBM 융합 단백질은 종양 특이성과 종양 미세환경에서의 더 높은 지속성으로 인해 TGF β Trap을 통해 Smad2 인산화를 더 효과적으로 억제하는 것을 확인하였다.

- [399] 또한, 도 12b에 기재된 바와 같이, hFc-soluble TGF β Trap, FEBM-hFc-TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap, 또는 hFc-TGF β Trap-FEBM 투여군의 암세포 사멸에 효과적인 기억 마커인 CD8 발현은 이소타입 대조군(Control-hFc)에 비해 각각 약 2.6배, 약 4.2배, 약 18.7배, 약 10.1배 증가한 것을 확인하였다. 특히, hFc-FEBM-TGF β Trap 및 hFc-TGF β Trap-FEBM를 투여한 그룹의 종양 특이적 CD8+ T세포는 hFc-soluble TGF β Trap에 비해 각각 약 8배, 약 4배 증가한 것을 확인하였다.
- [400] Fc-FEBM-TGF β Trap, 또는 hFc-TGF β Trap-FEBM 투여에 의한 CD8 활성화는 1) TME에서 기질-면역 회피 관련 세포의 상호작용으로 인한 CD8+ 면역 세포의 강력한 비활성화 억제 효과 또는 2) TME 특이적 표적 TGF β 억제로 인한 기질 세포의 불균형/재프로그래밍을 유도하여 면역 탈중앙화 TME에 CD8+ 면역 세포가 침투하는 효과로 인한 직간접적으로 이루어질 수 있다. hFc-FEBM-TGF β Trap 및 hFc-TGF β Trap-FEBM이 투여된 종양은 종양 상피와 기질에 관계없이 종양 중심 부위와 종양 경계부위에서 감소된 p-Smad2 수준 및 CD8+ T 세포의 풍부함이 관찰되는 것을 확인하였다.
- [401]
- [402] 실시예 5. Anti-EDB-FN antibody와 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 제작 및 결합능 확인
- [403] 5-1. Anti-EDB-FN antibody와 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 생산 및 정제
- [404] 실시예 1-3의 방법으로 설계한 Anti-EDB-FN antibody와 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 단백질을 실시예 1-4의 방법으로 정제한 결과 도 13의 a 및 b에 기재된 바와 같이 단백질 순도는 90% 이상, 엔도톡신 수치는 0.1 EU/mL 이하인 것을 확인하였다. 본 실시예에서는 표 2의 Anti-EDB-FN antibody와 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 중,
- [405] Control-hIgG: RecombiMAb human IgG4 (S228P) isotype control, anti-hen egg lysozyme Cat: CP147, Bio X cell, 미국)
- [406] Anti-EDB-FN-hIgG (서열번호 108): Anti-EDB-FN antibody (L19) hIgG4 형태
- [407] Soluble TGF β Trap-hFc (서열번호 105): hIgG4-Fc의 N-말단에 TGF β RII ectodomain 도메인이 융합됨.
- [408] Anti-EDB-FN-hIgG-TGF β Trap (L19-hIgG-TGF β Trap, 서열번호 29): TGF β RII ectodomain은 L19 hIgG4-Fc의 C 말단에 융합됨.
- [409] Anti-EDB-FN-hIgG-LC-TGF β Trap (L19-hIgG-LC-TGF β Trap, 서열번호 30): TGF β RII ectodomain은 L19 hIgG4-경쇄(LC)의 C 말단에 융합됨.

- [410] Anti-EDB-FN scFv-hFc-TGF β Trap (L19 scFv-hFc-TGF β Trap, 서열번호 32): L19 scFv 항체 단편은 중쇄 Fc 영역의 N-말단에 융합되고, TGF β RII ectodomain은 중쇄 Fc 영역의 C-말단에 융합됨.
- [411] Anti-EDB-FN scFv-TGF β Trap-hFc (L19 scFv-TGF β Trap-hFc, 서열번호 34): L19 scFv 항체 단편과 TGF β RII ectodomain은 IgG4-Fc의 N-말단에서 융합됨.
- [412] hFc-Anti-EDB-FN-TGF β Trap (서열번호 33): TGF β RII ectodomain은 L19 scFv 항체 단편의 C 말단에 융합되어 중쇄 Fc 영역 아래에 연결됨.
- [413] hFc-TGF β Trap-Anti-EDB-FN (서열번호 35): L19 scFv 항체 단편은 TGF β RII ectodomain의 C-말단에 융합되어 중쇄 Fc 영역 아래에 Trap.
- [414] Anti-EDB-FN scFv-TGF β Trap (서열번호 36): FC 융합 없이 L19 scFv 항체 단편은 TGF β Trap 위에 융합됨
- [415] 등의 단백질을 생산하고 정제하였다.
- [416] 5-2. Anti-EDB-FN antibody와 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질 결합능 평가
- [417] 실시예 1-5의 방법으로 실시예 5-1에서 정제한 융합 단백질들의 결합능을 평가한 결과, 도 14에 기재된 바와 같이 L19 antibody 또는 L19 scfv와 TGF β Trap의 다른 위치에서 구조적 변화에도 불구하고 10~86 ng/ml 범위의 결합수준에서 두 표적 모두에 일관된 공동 결합 친화성을 나타내는 것을 확인하였다. Fc 융합 형태와 비교했을 때, Fc 융합이 없는 Anti-EDB-FN scFv-TGF β Trap은 두 표적에 대한 동시 결합 친화도가 낮은 것을 확인하였다.
- [418]
- [419] 실시예 6. Anti-EDB-FN antibody와 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질의 치료 효과 확인
- [420] 6-1. 종양 성장을 분석
- [421] 유방 패드에 동소이식한 진행성 유방 종양 모델은 장기 특이적 종양의 확립으로 인해 피하 종양 모델보다 임상적으로 더 관련이 있다. 고도로 전이된 세포주를 확립하기 위해 실시예 1-6의 방법을 사용했으며 그 결과, 도 15a에 기재된 바와 같이, anti-EDB-FN scfv-TGF β Trap-hFc와 hFc-anti-EDB-FN scFv-TGF β Trap은 동소이식한 마우스 진행성 유방암 모델에서 다른 실험군에 비교했을 때 통계적 유의한 강력한 항종양 활성을 나타내는 것을 확인하였다.
- [422] 또한, 도 15b에 기재된 바와 같이, 25일째 되는 날 anti-EDB-FN-hIgG, anti-EDB-FN-hIgG-TGF β Trap, anti-EDB-FN scfv-TGF β Trap-hFc, 또는 hFc-anti-EDB-FN scFv-TGF β Trap 투여군의 종양 부피는 이소타입 대조군 (control hIgG)의 종양 부피에 비해 각각 약 1%, 약 6%, 약 57%, 약 51% 감소한 것을 확인하였으며, anti-EDB-FN scfv-TGF β Trap-hFc와 hFc-anti-EDB-FN scFv-TGF β Trap 투여만으로 표준 개념 구조로 설계된 anti-EDB-FN-hIgG-TGF β Trap과 비교했을 때 종양 성장을 50% 이상 억제하는 것을 확인하였다.
- [423] 6-2. 폐 전이율 분석

- [424] 실시예 1-6의 방법으로 EDB FN의 L19 antibody 또는 L19 scfv간의 결합을 기반으로 L19 antibody-TGFβ Trap 또는 L19 scfv-TGFβ Trap으로 구성된 이중 중쇄 융합 단백질 투여에 의한 유방암 동소이식 모델의 폐 전이율을 분석한 결과, 도 16에 기재된 바와 같이, 35일째에 anti-EDB-FN-hIgG, anti-EDB-FN-hIgG-TGFβ Trap, anti-EDB-FN scfv-TGFβ Trap-hFc, 또는, hFc-anti-EDB-FN scFv-TGFβ Trap 투여군의 폐 전이율은 이소타입 대조군 (control hIgG) 대비 각각 평균 0%, 0%, 80%, 60% 감소한 것을 확인하였다.
- [425] 6-3. 생존율 분석
- [426] 실시예 1-6의 방법으로 EDB FN의 L19 antibody 또는 L19 scfv간의 결합을 기반으로 L19 antibody-TGFβ Trap 또는 L19 scfv-TGFβ Trap으로 구성된 이중 중쇄 융합 단백질 투여에 의한 유방암 동소이식 모델의 생존율을 분석한 결과, 도 17에 기재된 바와 같이, 동형 대조군과 항-EDB-FN-hIgG에 비해 표준 이중 특이 분자로 설계된 anti-EDB-FN scFv-hFc-TGFβ Trap은 35일까지 생존율을 전혀 개선하지 못했지만, anti-EDB-FN hIgG-TGFβ Trap-hFc와 hFc-anti-EDB-FN scFv-TGFβ Trap을 투여한 그룹은 생존율이 통계적으로 유의하게 60%, 60% 각각 증가한 것을 확인하였다.
- [427] 앞선 hFc-FEBM-TGFβ Trap과 hFc-TGFβ Trap-FEBM의 두 물질의 치료 효과와 anti-EDB-FN hIgG-TGFβ Trap-hFc과 hFc-anti-EDB-FN scFv-TGFβ Trap의 치료 효과의 공통점은 EDB-FN 타겟과 TGFβ 트랩을 직접 연결하는 구조적 특성을 지녀 종양의 ECM을 타겟으로 하는 3차원적 구조와 TGFβ 트래핑의 활성을 반영한 것으로 판단된다.
- [428]
- [429] 실시예 7. FEBM-, L19 antibody-TGFβ Trap 또는 L19 scfv-TGFβ Trap으로 구성된 이중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 췌장암 동소이식 모델의 치료 효과 확인
- [430] 7-1. FEBM-TGFβ Trap으로 구성된 이중특이적 Fc 융합 단백질의 종양 성장을 분석
- [431] 췌장의 꼬리에 동소이식한 진행성 Panc02 immune desert tumors인 췌장암 모델은 장기 특이적 종양의 확립으로 인해 피하 종양 모델보다 임상적으로 더 관련이 있다고 알려져 있다. 이에 실시예 1-7의 방법으로 제작한 췌장암 동소이식 마우스에 hFc-soluble TGFβ Trap, FEBM-hFc-TGFβ Trap, hFc-FEBM-TGFβ Trap, or hFc-TGFβ Trap-FEBM 및 isotype control Fc를 투여하고, 실시예 1-7에 기재된 방법으로 치료효과를 확인하였다.
- [432] 그 결과, 도 18a에 기재된 바와 같이 hFc-soluble TGFβ Trap는 이소타입 대조군에 비해 종양무게의 감소에 통계적으로 유의성이 없는 반면, hFc-FEBM-TGFβ Trap 및 hFc-TGFβ Trap-FEBM는 전체 고형암 가운데 가장 높은 수준의 EDB 발현이 관찰된 동소이식한 마우스 진행성 췌장암 모델에서 다른 실험군에 비교했을 때 통계적 유의한 강력한 항종양 활성을 나타내는 것을 확인하였고,

- [433] 도 18b에 기재된 바와 같이, 세포 이식 이후 63일째 되는 날 hFc-soluble TGF β Trap, FEBM-hFc-TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap, 또는 hFc-TGF β Trap-FEBM 투여군의 종양 무게는 이소타입 대조군(control hIgG)에 비해 각각 약 22.1%, 약 38.7%, 약 90.1%, 약 76.4% 감소한 것을 확인하였다. hFc-FEBM-TGF β Trap, 또는 hFc-TGF β Trap-FEBM 투여는 각각 hFc-soluble TGF β Trap보다 더 큰 폭(각각 >85%, >70%)으로 종양 성장을 억제한 것을 확인하였다.
- [434] 또한, 도 18c에 기재된 바와 같이, 63일째에 hFc-soluble TGF β Trap, FEBM-hFc-TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap 또는 hFc-TGF β Trap-FEBM 투여군의 간, 흉막, 횡격막을 포함한 전이율은 각각 동종형 대조군에 비해 평균 20%, 40%, 100%, 100% 감소한 것을 확인하였다.
- [435] 7-2. FEBM-TGF β Trap으로 구성된 이중 중쇄 융합 단백질의 Smad2의 인산화 감소 및 Cytotoxic immune CD8+ T 세포의 증가 확인
- [436] 실시예 1-7의 방법으로 Smad2의 인산화와 CD8의 발현양을 확인한 결과, 도 19a에 기재된 바와 같이, hFc-soluble TGF β Trap, FEBM-hFc-TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap, 또는 hFc-TGF β Trap-FEBM 투여군의 Tumor에서 Smad2의 인산화는 이소타입 대조군에 비해 각각 약 17.2%, 약 33%, 약 84.5%, 약 72.8% 감소한 것을 확인하였다. 특히, FEBM-hFc-TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap 및 hFc-TGF β Trap-FEBM 투여군은 각각 hFc-soluble TGF β Trap보다 더 큰 폭(각각 >80%, >65%)으로 p-smad2 수준을 억제한 것을 확인하였다. 전신 노출을 특징으로 하는 hFc-soluble TGF β Trap은 마지막 투여 후 2일 후에 희생된 쥐의 종양 조직에서 Smad2 인산화를 유지하지 못했지만, FEBM 융합 구조는 종양 특이성과 종양 미세환경에서의 더 높은 지속성으로 인해 TGF β Trap을 통해 Smad2 인산화를 더 효과적으로 억제하는 것으로 판단된다.
- [437] 또한, 도 19b에 기재된 바와 같이, hFc-soluble TGF β Trap, FEBM-hFc-TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap, 또는 hFc-TGF β Trap-FEBM 투여군의 암세포 사멸에 효과적인 기억 마커인 CD8 발현은 이소타입 대조군(Control-Fc)에 비해 각각 약 3.4배, 약 7.7배, 약 25.4배, 약 16.1배 증가한 것을 확인하였다. 특히, hFc-FEBM-TGF β Trap 및 hFc-TGF β Trap-FEBM 투여군의 종양 특이적 CD8+ T세포는 hFc-soluble TGF β Trap에 비해 각각 약 7.4배, 약 4.7배 증가한 것을 확인하였다.
- [438] hFc-FEBM-TGF β Trap 또는 hFc-TGF β Trap-FEBM이 투여된 종양 상피와 기질에 관계없이 종양 중심부위와 종양 경계부위에서 감소된 p-Smad2 수준 및 CD8+ T 세포의 풍부함이 관찰되는 것을 확인하였다.
- [439] 7-3. Anti-EDB-FN antibody와 TGF β Trap을 포함하는 이중특이적 Fc 융합 단백질의 종양 성장을 분석
- [440] 실시예 1-7의 방법으로 제작한 췌장암 동소이식 마우스에 30 mg/kg anti-EDB-FN-hIgG, anti-EDB-FN-hIgG-TGF β Trap, or anti-EDB-FN scFv-TGF β Trap-hFc 및 isotype control Fc를 투여하고, 실시예 1-7에 기재된 방법으로 치료효과를 확인하였다.

- [441] 그 결과, 도 18d에 기재된 바와 같이 종양의 ECM의 EDB-FN에 결합하는 polypeptide인 FEBM외에 항체 플랫폼 형태의 L19 scfv를 가진 anti-EDB-FN scfv-TGF β Trap-hFc 투여군은 동소이식한 마우스 진행성 췌장암 모델에서 다른 실험군에 비교했을 때 통계적 유의한 항종양 활성을 나타내는 것을 확인하였고, 도 18e에 기재된 바와 같이, 세포 이식 이후 63일째 되는 날 anti-EDB-FN-hIgG, anti-EDB-FN-hIgG-TGF β Trap, 또는 anti-EDB-FN scfv-TGF β Trap-hFc 투여군의 종양 무게는 이소타입 대조군에 비해 각각 약 9.2%, 약 31.2%, 약 60.4% 감소한 것을 확인하였다. Anti-EDB-FN scfv-TGF β Trap-hFc 투여만으로 표준 개념 구조로 설계된 anti-EDB-FN-hIgG-TGF β Trap과 비교했을 때 종양 성장을 50% 이상 억제한 것이다.
- [442] 또한, 도 18f에 기재된 바와 같이, 63일째에 Anti-EDB-FN-hIgG, anti-EDB-FN-hIgG-TGF β Trap, 또는 anti-EDB-FN scfv-TGF β Trap-hFc 투여군의 간, 흉막, 횡격막을 포함한 전이율은 각각 동종형 대조군에 비해 평균 20%, 40%, 80% 감소한 것을 확인하였다.
- [443]
- [444] 실시예 8. FEBM-, L19 antibody-TGF β Trap 또는 L19 scfv-TGF β Trap으로 구성된 이중특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 흑색종 동소이식 혹은 폐전이 후 종양 성장 모델의 치료 효과 확인
- [445] B16-F10은 사이토카인이 결핍되고 MHC-I가 억제된 종양 모델로, 면역 체계에서 보이지 않으므로 면역 세포에 많이 침투하지 않는다. 따라서 적당히 높은 돌연변이 부담에도 불구하고, 이 종양은 종종 면역학적으로 차가운 종양으로 분류된다. B16-F10는 악성 흑색종 세포로서 전신에 퍼지는 강한 전이성이 가장 큰 특징으로 꼬리 정맥을 통한 폐전이 모델이 임상적 반응을 대변하는 것으로 알려져 있으므로 실시예 1-8의 방법으로 제작한 전이성 흑색종 종양 모델에 Control hFc, hFc-soluble TGF β Trap, hFc-FEBM-TGF β Trap, hFc-TGF β Trap-FEBM, hFc-FEBM-anti-TGF β 1 scfv, Anti-EDB-FN-TGF β Trap-hFc 및 hFc-anti-EDB-FN scfv-anti-TGF β 1 scfv를 투여하여 종양 성장을 분석하였다.
- [446] 흑색종은 멜라니세포가 있는 모든 기관에서 발생될 수 있기 때문에 폐에서도 원발성 종양이 발생할 수 있으며, 폐 전이는 악성 흑색종에서 가장 흔한 원격 전이성 질환의 위치이다. 따라서 가장 많은 흑색종의 임상적 치료적 위치인 폐에서 종양의 성장을 억제할 수 있는지 관찰하는 것은 중요하다. 이식 5일째 폐로 전이된 세포가 안착되었음을 확인후, 종양성장에 대한 평가를 진행하였다.
- [447]
- [448] 그 결과, 도 20a에 기재된 바와 같이, 다른 고형암에 비해 피브로넥틴 EDB 발현이 상대적으로 낮음에도 불구하고, ECM fused TGF β trapping을 위해 잘 구조화된 hFc-FEBM-TGF β Trap, hFc-TGF β Trap-FEBM, hFc-FEBM-anti-TGF β 1 scfv, Anti-EDB-FN-TGF β Trap-hFc, 또는 hFc-anti-EDB-FN scfv-anti-TGF β 1 scfv 투여는 10일

이후부터 전이성 B16F10 흑색종 모델에서 강력한 항암 및 항전이 활동을 나타내는 것을 확인하였다.

- [449] 또한 도 20b에 기재된 바와 같이, 종양 이식 25일째 되는 날 hFc-soluble TGF β Trap (lane 2), hFc-FEBM-TGF β Trap (lane 3), hFc-TGF β Trap-FEBM (lane 4), hFc-FEBM-anti-TGF β 1 scfv (lane 5), Anti-EDB-FN-TGF β Trap-hFc (lane 6) 및 hFc-anti-EDB-FN scfv-anti-TGF β 1 scfv (lane 7) 투여군의 종양내 평균 발광 활성은 이소타입 대조군 (Control-Fc)의 발광 활성에 비해 각각 약 28.5%, 약 96.1%, 약 88.8%, 약 72.2%, 약 76.9%, 그리고 약 81.7%, 각각 감소한 것을 확인하였으며, hFc-FEBM-TGF β Trap (lane 3), hFc-TGF β Trap-FEBM (lane 4), hFc-FEBM-anti-TGF β 1 scfv (lane 5), Anti-EDB-FN-TGF β Trap-hFc (lane 6) 및 hFc-anti-EDB-FN scfv-anti-TGF β 1 scfv (lane 7) 투여군은 hFc-soluble TGF β Trap (lane 2)보다 더 큰 폭(각각 >94%, >84%, >60.6%, >67.2%, >74.1%)으로 통계적 유의한 종양 성장을 억제한 것을 확인하였다.
- [450] 즉, B16-F10가 이식된 마우스의 종양내 EDB-FN1의 mRNA 발현은 정상조직보다 높지만, 타 고형암에 비해 가장 낮은 수준이었으나, EDB-FN 표적화/TGF β Trapping을 위한 최적 구조 조합은 충분한 유효성이 있는 것을 확인하였다.
- [451]
- [452] 실시예 9. FEBM 또는 L19 scfv, TGF β Trap 및 PD-1 항체 또는 scFv로 구성된 삼중 특이적 Fc 융합 단백질 투여에 의한 암 치료효과 확인
- [453] 고빈도-현미부수체 불안정성(MSI-H)을 가진 대부분의 고형암 환자는 anti-PD-1 항체와 병용투여의 기회가 있고, 유전자 복제의 결함이 낮거나 혹은 없는 암에 대해서는 anti-PD-1 항체 혹은 scfv의 융합과 관련된 수많은 시도와 수천개의 임상이 진행되고 있다. 따라서, 본 발명에서도 EDB-FN/TGF β 를 표적으로 하는 최적의 구조에 anti-PD-1 항체 혹은 scfv의 융합하여 기존 임상이 진행되고 있는 Anti-PD1 / TGF β Trap과 종양 억제 효능을 전이성 유방암과 췌장암 모델에서 비교하였다.
- [454] 9-1. 삼중 특이적 융합 단백질 제작 및 생산
- [455] anti-PD-1 항체 또는 anti-PD-1 scfv를 기반으로 EDB-FN 표적화를 위한 FEBM-, L19 scfv 구조와 TGF β 신호전달을 억제하기 위한 TGF β Trap으로 구성된 삼중 융합 단백질 제작 및 생산은 실시예 1-3 및 1-4의 방법으로 수행하였으며, 표 2의 융합 단백질 중, Anti-PD-1-hIgG-FEBM-TGF β Trap (서열번호 57), Anti-EDB-FN scfv-TGF β Trap-hFc-anti-PD1 scfv (서열번호 77) 융합 단백질을 제작 및 생산하였다.
- [456] 또한, 대조군으로 Control hIgG (RecombiMAB human IgG4(S228P) isotype control, BioXcell, 미국)을, Anti-PD-1 (서열번호 109)은 제작 및 생산하였으며, 임상시험 중인 Bs anti-PD-1 / TGF β Trap (Bintrafusp alfa, Cat. No.: HY-P99480, MedChemExpress, 중국)을 추후 실시예에 사용하였다.
- [457] 9-2. 유방암 동소이식 모델의 종양 성장을 분석

- [458] 실시예 1-6의 방법으로 유방암 동소이식 모델을 제작한 다음, 15 mg/kg의 Anti-PD-1 hIgG4, Bs anti-PD-1-hIgG4/TGF β Trap, anti-PD-1-hIgG-FEBM-TGF β Trap and anti-EDB-FN scFv-TGF β Trap-hFc-anti-PD-1 scFv 및 control-hFc를 투여하고 실시예 1-6에 기재된 종양 성장을 분석방법으로 분석하였다.
- [459] 그 결과, 도 21에 기재된 바와 같이, 25일째 되는 날 Anti-PD-1 hIgG4, Bs anti-PD-1-hIgG4/TGF β Trap, anti-PD-1-hIgG-FEBM-TGF β Trap과 anti-EDB-FN scfv-TGF β Trap-hFc-anti-PD-1 scfv 투여군의 종양 부피는 이소타입 대조군 (control hIgG)의 종양 부피에 비해 각각 약 2.2%, 약 3.1%, 약 88%, 약 75.5% 감소한 것을 확인하였다.
- [460] 9-3. 췌장암 동소이식 모델의 종양 성장을 분석
- [461] 실시예 1-7의 방법으로 췌장암 동소이식 모델을 제작한 다음, 20 mg/kg의 Anti-PD-1 hIgG4, Bs anti-PD-1-hIgG4/TGF β Trap, anti-PD-1-hIgG-FEBM-TGF β Trap and anti-EDB-FN scFv-TGF β Trap-hFc-anti-PD-1 scFv 및 control-hFc를 투여하고 실시예 1-7에 기재된 종양 성장을 분석방법으로 분석하였다.
- [462] 그 결과, 도 21b에 기재된 바와 같이 57일째 되는 날 Anti-PD-1 hIgG4, Bs anti-PD-1-hIgG4/TGF β Trap, anti-PD-1-hIgG-FEBM-TGF β Trap과 anti-EDB-FN scfv-TGF β Trap-hFc-anti-PD-1 scfv 투여군의 종양 부피는 이소타입 대조군 (control hIgG)의 종양 부피에 비해 각각 약 16.0%, 약 20.1%, 약 89.2%, 약 74.8% 감소한 것을 확인하였다.
- [463] 즉, 유방암과 췌장암 모델에서 anti-PD-1 단독 및 soluble-TGF β Trap이 이중 융합된 물질의 투여는 이소타입 대조군 (control hIgG)와 비교했을 때 통계적 유의한 항종양 활성을 관찰할 수 없었지만, Anti-PD-1-hIgG-FEBM-TGF β Trap과 Anti-EDB-FN scfv-TGF β Trap-hFc-anti-PD-1 scfv 단백질의 투여는 강력한 항종양 효과를 나타내는 것을 확인하였으며, EDB-FN 표적화/TGF β Trap 구조가 연결된 이중 구조 아래에서도 anti-PD-1이 융합된 삼중 단백질은 anti-PD-1 단독 및 병용투여에도 반응하지 않는 암 중에서 강력한 항암 효능을 나타내는 것을 확인하였다.
- [464]
- [465] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [466]
- 산업상 이용가능성**
- [467] 본 발명에 따른 융합 단백질은 항종양 면역 반응에 중요한 TGF β 를 세포외 기질에 고정함으로써 암 미세환경 내에서 직접 TGF β 억제를 국소화하여 전신적 효과가 아닌 국소적 효과를 보장하여, 모든 암종에서 뛰어난 항암 효과를 나타낼 뿐

만 아니라, 세포외기질의 강성 때문에 일반적인 TGF β 억제제가 작용하지 못하는
췌장암에서도 뛰어난 항암 효과를 나타내어 암 예방 또는 치료에 유용하게 사용
될 수 있다.

[468]

서열목록

[469] 전자파일 첨부하였음.

청구범위

- [청구항 1] (a) 피브로넥틴 엑스트라도메인 B (Extr domain B of Fibronectin, EDB-FN)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및
(b) 전환성장인자 베타(transforming growth factor β , TGF β)에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
를 포함하는 융합 단백질.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 융합단백질은 (c) 항체 불변영역 (constant region)을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 융합단백질은 (d) 종양 항원에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 종양 항원은 PD-1, PD-L1, CTLA-4, CD80, CD86 및 VEGF로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 5] 제3항에 있어서, 상기 융합 단백질은 PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 6] 제2항에 있어서, 상기 융합 단백질은 N 말단에서 C 말단으로,
(i) EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
(ii) TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
(iii) 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 항체 불변영역; 및 하나 이상의 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
(iv) 하나 이상의 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 항체 불변영역; 및 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
(v) 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 하나 이상의 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 항체 불변영역;
(vi) 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 하나 이상의 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 항체 불변영역; 및 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
(vii) 하나 이상의 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 항체 불변영역; 및 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
(viii) 항체 불변영역; 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 하나 이상의 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
(ix) 항체 불변영역; 하나 이상의 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및

(x) 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 항체 불변영역; 하나 이상의 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 하나 이상의 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 구조를 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

[청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 융합 단백질은 N 말단에서 C 말단으로,
(7-1) 항체 불변영역; EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및
(7-2) 항체 불변영역; TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
로 구성된 군에서 선택되는 구조를 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

[청구항 8] 제5항에 있어서, 상기 융합 단백질은 N 말단에서 C 말단으로,
(A) PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
(B) PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
(C) TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
(D) PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 항체 불변영역; EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
(E) PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 항체 불변영역; TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드;
(F) TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 항체 불변영역; 및
(G) EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드; 및 항체 불변영역;
로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 구조를 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

[청구항 9] 제1항에 있어서, 상기 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드는 피브로넥틴 EDB 결합 도메인(Fibronectin EDB binding motif, FEBM), EDB-FN에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

- [청구항 10] 제1항에 있어서, 상기 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드는 TGF β 수용체 2형 엑토도메인(TGF β RII ectodomain, TGF β Trap), TGF β 에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 11] 제2항에 있어서, 상기 항체 불변영역은 중쇄 불변영역 또는 경쇄 불변영역인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 12] 제5항에 있어서, 상기 PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드는 PD-1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 단편인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 13] 제9항에 있어서, 상기 EDB-FN에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드는 서열번호 1 내지 4의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩타이드 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 14] 제10항에 있어서, 상기 TGF β 에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드는 서열번호 5 내지 8의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩타이드 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 15] 제11항에 있어서, 상기 항체 불변영역은 서열번호 12 내지 15의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩타이드 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 16] 제12항에 있어서, 상기 PD-1에 특이적으로 결합하는 폴리펩타이드는 서열번호 9 내지 11의 아미노산 서열로 표시되는 폴리펩타이드 중 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.
- [청구항 17] 제6항에 있어서, 상기 융합 단백질은 N 말단에서 C 말단으로,
 (4-1) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
 (4-2) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 12의 폴리펩타이드;
 (4-3) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 12의 폴리펩타이드;
 (4-4) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
 (4-5) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
 (4-6) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
 (4-7) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 12의 폴리펩타이드;
 (4-8) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;

- (4-9) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- (4-10) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- (4-11) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 13의 폴리펩타이드;
- (4-12) 서열번호 13의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- (4-13) 서열번호 2의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- (4-14) 서열번호 3의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- (4-15) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 2의 폴리펩타이드; 및 서열번호 13의 폴리펩타이드;
- (4-16) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- (4-17) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- (4-18) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 12의 폴리펩타이드;
- (4-19) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- (4-20) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- (4-21) 서열번호 6의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- (4-22) 서열번호 7의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- (4-23) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 6의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- (4-24) 서열번호 2의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- (4-25) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 12의 폴리펩타이드;
- (4-26) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;

(4-27) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
 (4-28) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
 (4-29) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
 (4-30) 서열번호 2의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
 (4-31) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
 (4-32) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 2의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
 (4-33) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 6의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
 (4-34) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 12의 폴리펩타이드;
 (4-35) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 12의 폴리펩타이드;
 (4-36) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
 (4-37) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
 (4-38) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및
 (4-39) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
 로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

[청구항 18] 제6항에 있어서, 상기 융합 단백질은 N 말단에서 C 말단으로,

(4-5) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드; 또는
 (4-6) 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

[청구항 19] 제8항에 있어서, 상기 융합 단백질은 N 말단에서 C 말단으로,

(5-1) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
 (5-2) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
 (5-3) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
 (5-4) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;

- (5-5) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- (5-6) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- (5-7) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- (5-8) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- (5-9) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 11의 폴리펩타이드;
- (5-10) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- (5-11) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- (5-12) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 11의 폴리펩타이드;
- (5-13) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- (5-14) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- (5-15) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- (5-16) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- (5-17) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- (5-18) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- (5-19) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- (5-20) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- (5-21) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 11의 폴리펩타이드;
- (5-22) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 5의 폴리펩타이드;
- (5-23) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 5의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;

- (5-24) 서열번호 5의 폴리펩타이드; 서열번호 11의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- (5-25) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- (5-26) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- (5-27) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- (5-28) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- (5-29) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- (5-30) 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- (5-31) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- (5-32) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- (5-33) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 11의 폴리펩타이드;
- (5-34) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- (5-35) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 1의 폴리펩타이드;
- (5-36) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 1의 폴리펩타이드; 및 서열번호 11의 폴리펩타이드;
- (5-37) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- (5-38) 서열번호 9의 폴리펩타이드; 서열번호 14의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- (5-39) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;
- (5-40) 서열번호 10의 폴리펩타이드; 서열번호 15의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;
- (5-41) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;
- (5-42) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 9의 폴리펩타이드; 및 서열번호 14의 폴리펩타이드;

(5-43) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;

(5-44) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드;

(5-45) 서열번호 4의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 12의 폴리펩타이드; 및 서열번호 11의 폴리펩타이드;

(5-46) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 8의 폴리펩타이드;

(5-47) 서열번호 11의 폴리펩타이드; 서열번호 8의 폴리펩타이드; 및 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및

(5-48) 서열번호 8의 폴리펩타이드; 서열번호 4의 폴리펩타이드; 및 서열번호 11의 폴리펩타이드;

로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

[청구항 20] 제17항에 있어서, 상기 융합단백질은 서열번호 16 내지 56으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

[청구항 21] 제18항에 있어서, 상기 융합단백질은 서열번호 20의 아미노산 서열로 표시되거나, 서열번호 21의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

[청구항 22] 제19항에 있어서, 상기 융합단백질은 서열번호 57 내지 104로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 융합 단백질.

[청구항 23] 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 코딩하는 핵산.

[청구항 24] 제23항의 핵산을 포함하는 재조합 발현벡터.

[청구항 25] 제24항의 재조합 발현벡터로 형질감염된 숙주세포.

[청구항 26] 제25항의 숙주세포를 배양하여 융합 단백질을 생성하는 단계; 및 생성된 융합 단백질을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 융합 단백질의 제조방법.

[청구항 27] 제1항 내지 제22항 중 어느 한 항의 융합 단백질을 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물.