



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년01월25일

(11) 등록번호 10-2630017

(24) 등록일자 2024년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 35/17* (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/2827 (2013.01)
A61K 35/17 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2019-7003606
(22) 출원일자(국제) 2017년07월07일
심사청구일자 2020년07월07일
(85) 번역문제출일자 2019년02월07일
(65) 공개번호 10-2019-0038825
(43) 공개일자 2019년04월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/041241
(87) 국제공개번호 WO 2018/009894
국제공개일자 2018년01월11일
(30) 우선권주장
62/359,612 2016년07월07일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
Oncotarget, Vol. 7, No. 23, pp. 34341-34355
(2016.06.07.)*
WO2016041945 A1
US20160137731 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이오반스 바이오테라퓨틱스, 인크.
미국 94070 캘리포니아주 샌 칼로스 스위트 150
스카이웨이 로드 999
(72) 발명자
라비노비치, 브라이언
캐나다 엘4에이 7엑스5 온타리오주 스토프빌 힐
컨트리 드라이브 98
마틴-오로즈코, 나탈리아
미국 01720 매사추세츠주 액션 캔터베리 힐 로드
98
라드바니, 라즐로
미국 01720 매사추세츠주 액션 캔터베리 힐 로드
98
(74) 대리인
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 45 항

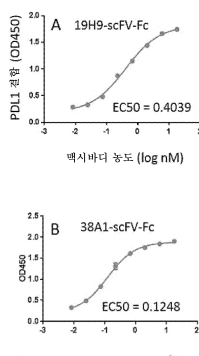
심사관 : 윤소라

(54) 발명의 명칭 프로그램화된 사멸 1 리간드 1 (PD-L1) 결합 단백질 및 그의 사용 방법

(57) 요약

본 개시내용은 프로그램화된 사멸 1 리간드 1 (PD-L1)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부분을 포함하는 단백질, 예컨대 항체를 제공한다. 단백질을 코딩하는 핵산, 및 이러한 핵산을 포함하는 세포 (예를 들어, 유전자 변형된 세포독성 림프구)가 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 대상 방법은 제1-세포 상의 PD-L1과 제2 세 (뒷면에 계속)

대표도 - 도3



포 상의 PD-1 사이의 상호작용을 감소시키는 것을 포함한다. 일부 경우에, 접촉은 생체내에서 이루어진다. 예를 들어, 제공된 방법 및 조성물은 ACT를 통한 또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질의 투여를 통한 바이러스 감염 및 암의 치료, 예컨대 고형 종양의 치료에 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 5/0636 (2023.05)

C12N 5/0638 (2023.05)

C12N 5/0646 (2023.05)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C07K 2317/76 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

PD-L1에 특이적으로 결합하고, 경쇄인 제1 폴리펩티드 및 중쇄인 제2 폴리펩티드를 포함하는 항원 결합 부분을 포함하는 단백질로,

상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함하는, 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 폴리펩티드가 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드가 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백질.

청구항 3

PD-L1에 특이적으로 결합하고, 경쇄인 제1 폴리펩티드 및 중쇄인 제2 폴리펩티드를 포함하는 항원 결합 부분을 포함하는 단백질로,

상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)의 CDR을 포함하는, 단백질.

청구항 4

제3항에 있어서, 제1 폴리펩티드가 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드가 서열식별번호: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 단일-쇄 항체 (scFv)이고, 제1 및 제2 폴리펩티드가 서로에 직접적으로 또는 링커를 통해 융합된 것인 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, scFv가 서열식별번호: 17 또는 서열식별번호: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, 항원 결합 부분에 직접적으로 또는 링커를 통해 융합된 이뮤노글로불린 Fc 도메인을 포함하는 맥시바딘 단백질.

청구항 8

제7항에 있어서, 이뮤노글로불린 Fc 도메인이 IgG1 Fc 도메인인 것인 단백질.

청구항 9

제7항에 있어서, 이뮤노글로불린 Fc 도메인이 IgG4 Fc 도메인인 것인 단백질.

청구항 10

제5항에 있어서, 서열식별번호: 18 또는 서열식별번호: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 단백질.

청구항 11

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 인간화 항체인 단백질.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산.

청구항 13

제12항에 있어서, 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함하는 핵산.

청구항 14

제13항에 있어서, 프로모터가 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터인 핵산.

청구항 15

제12항의 핵산을 포함하는 단리된 세포로, 핵산이 세포의 게놈 내로 통합되는 것인 단리된 세포.

청구항 16

제15항에 있어서, 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된 세포독성 림프구인 단리된 세포.

청구항 17

제16항에 있어서, 세포독성 림프구가 T-세포인 단리된 세포.

청구항 18

제17항에 있어서, T-세포가 말초 혈액으로부터 유래된 것인 단리된 세포.

청구항 19

제16항에 있어서, 세포독성 림프구가 자연 킬러 (NK) 세포인 단리된 세포.

청구항 20

제19항에 있어서, NK 세포가 말초 혈액으로부터 유래된 것인 단리된 세포.

청구항 21

제16항에 있어서, 세포독성 림프구가 대상체로부터의 종양으로부터 유래된 종양 침윤 림프구 (TIL)인 단리된 세포.

청구항 22

제21항에 있어서, TIL이 종양으로부터의 항원에 특이적인 수용체를 포함하는 것인 단리된 세포.

청구항 23

제16항에 있어서, 세포독성 림프구가 나이트 T-세포에 비해 1종 이상의 활성화 항원의 발현의 증가된 수준을 나타내는 것인 단리된 세포.

청구항 24

제23항에 있어서, 1종 이상의 활성화 항원이 CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT 및 HLA-DR로부터 선택되는 것인 단리된 세포.

청구항 25

제23항에 있어서, 세포독성 림프구가 종양 연관 항원에 특이적인 T-세포 수용체를 포함하는 것인 단리된 세포.

청구항 26

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단백질을 포함하는, 암을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 개체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 27

제26항에 있어서, 암이 고형 종양인 제약 조성물.

청구항 28

제26항에 있어서, 단백질이 단백질을 코딩하는 핵산으로서 대상체에 투여되기 위한 것인 제약 조성물.

청구항 29

제26항에 있어서, 단백질이 단백질을 발현하고 분비하는 유전자 변형된 세포독성 림프구로 대상체에 투여되기 위한 것인 제약 조성물.

청구항 30

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단백질을 포함하는, 제1 세포 상의 PD-L1과 제2 세포 상의 PD-1 사이의 상호작용을 감소시키기 위한 개체에서의 바이러스 감염 또는 암 치료에서 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 31

제30항에 있어서, 단백질이 전신 투여 또는 국부 투여를 위한 것인 제약 조성물.

청구항 32

제30항에 있어서, 국부 투여가 종양내 투여를 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 33

대상체에서 종양의 치료에 사용하기 위한, 세포독성 림프구의 집단을 포함하는 제약 조성물로, 세포독성 림프구의 집단은

대상체의 종양으로부터 사전에 단리된 세포독성 림프구 내로 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 코딩하는 핵산을 도입함으로써 세포독성 림프구를 유전자 변형시키는 단계이며, 여기서 유전자 변형된 세포독성 림프구는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 단백질을 발현하고 분비하는 것인 단계;

유전자 변형된 세포독성 림프구를 확장시켜 유전자 변형된 세포독성 림프구의 집단을 생성하는 단계

를 포함하는 방법으로부터 수득가능하며, 세포독성 림프구의 집단은 종양을 치료하기 위해 대상체에게 투여하기 위한 것인 제약 조성물.

청구항 34

제33항에 있어서, 유전자 변형된 세포독성 림프구가 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 구성적으로 발현하거나, 또는 유전자 변형된 세포독성 림프구가 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 유도성으로 발현하는 것인 제약 조성물.

청구항 35

제33항에 있어서, 핵산이 세포독성 림프구의 게놈 내로 통합되는 것인 제약 조성물.

청구항 36

제33항에 있어서, 세포독성 림프구가 T-세포 및 자연 킬러 (NK) 세포로부터 선택되는 것인 제약 조성물.

청구항 37

제33항에 있어서, 유전자 변형된 세포독성 림프구가 종양으로부터의 항원에 특이적인 수용체를 포함하는 것인

제약 조성물.

청구항 38

암을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체로부터 사전에 단리된 세포독성 림프구 내로 제12항의 핵산을 도입함으로써 세포독성 림프구를 유전자 변형시키는 단계이며, 여기서 유전자 변형된 세포독성 림프구는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 발현하고 분비하는 것인 단계

를 포함하는, 유전자 변형된 세포독성 림프구를 제조하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 시험관내에서 세포독성 림프구를 확장시켜 유전자 변형된 세포독성 림프구의 확장된 집단을 제공하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 40

제38항에 있어서, 세포독성 림프구가 T-세포 또는 자연 킬러 (NK) 세포인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, T-세포가 CD8+ T-세포 또는 CD4+ T-헬퍼 세포인 방법.

청구항 42

제38항에 있어서, 핵산이 세포독성 림프구의 게놈 내로 통합되는 것인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 세포독성 림프구가 나이트 T-세포에 비해 1종 이상의 활성화 항원의 발현의 증가된 수준을 나타내는 것인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 1종 이상의 활성화 항원이 CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT 및 HLA-DR로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 45

제38항에 있어서, 유전자 변형된 세포독성 림프구가 대상체의 종양으로부터의 항원에 특이적인 T-세포 수용체를 포함하는 것인 방법.

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 2016년 7월 7일에 출원된 미국 가출원 번호 62/359,612를 우선권 주장하며, 이의 모두는 그 전문이 본원에 참조로 명백하게 포함된다.
- [0003] 서열 목록
- [0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자적으로 제출된 서열 목록을 함유하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 2017년 7월 7일에 생성된 상기 ASCII 카피는 116983-5024_ST25.txt로 명명되고, 101,943 바이트 크기이다.

배경 기술

- [0005] 입양 세포 전달 (ACT)은 환자의 자가 T-세포를 확장시키고, 생체의 조작하고, 이어서 반응, 예를 들어, 항종양 반응을 발휘하도록 환자 내로 재-도입하는 치료 접근법이다. 종양 침윤 림프구 (TIL)는 일반적으로 종양 미세 환경에서 발견될 수 있는 림프구의 이중 집단을 지칭한다. TIL을 사용하는 ACT 요법의 일반적 근거는 항종양 면역 반응이 면역억제 종양 미세환경으로부터 항종양 잠재력을 갖는 세포를 제거하고, 세포를 시험관내 확장시키고, 이어서 세포의 확장된 집단을 종양 부위로 되돌려 종양 세포 및 가능하게는 종양을 지속시키는 다른 세포 표적, 예컨대 혈관 내피 세포를 사멸시킴으로써 증진될 수 있다는 것이다. 문헌 [Lee and Margolin, Curr. Oncol. Rep. 2012; 14(5) 468-474].
- [0006] 프로그램화된 사멸 1 (PD-1)은 그의 리간드인 프로그램화된 사멸 1 리간드 1 (PD-L1) 및 프로그램화된 사멸 1 리간드 2 (PD-L2)와 협력하여 흑색종을 포함한 다양한 인간 암에서 T-세포 매개 항종양 활성을 제한하는 체크포인트 인자로서 작용하는, 활성화된 인간 T-세포 상에 발현되는 널리 기재된 억제 수용체이다. PD-1은 TIL에 의해 발현되며, 이에 따라 종양 미세환경에서의 PD-L1의 발현은, 예를 들어 종양 성장을 포함한 암 질환 진행에 대해 억제성이다.
- [0007] 따라서, 예를 들어 TIL을 사용하는 ACT 요법과 관련하여, PD-1-PD-L1 상호작용의 억제 효과를 방해하는 새로운 조성물 및 방법에 대한 필요가 관련 기술분야에 존재한다.

발명의 내용

- [0008] 본 개시내용은 프로그램화된 사멸 1 리간드 1 (PD-L1)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부분을 포함하는 단백질, 예컨대 항체를 제공한다. 단백질을 코딩하는 핵산, 및 이러한 핵산을 포함하는 세포 (예를 들어, 유전자 변형된 세포독성 림프구)가 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 대상 방법은 제1 세포 상의 PD-L1과 제2 세포 상의 PD-1 사이의 상호작용을 감소시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 제공된 방법 및 조성물은 ACT를 통한 또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질의 투여를 통한 바이러스 감염 및 암의 치료, 예컨대 고형 종양의 치료에 사용될 수 있다.

- [0009] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 유전자 변형된 세포독성 림프구, 예를 들어, 활성화된 T-세포, TIL, 및 NK 세포가 증식되어 세포 요법으로서 주입되도록 할 수 있으며, 이는 대상체에게 투여될 유전자 변형된 세포독성 림프구에서 PD-L1 결합 단백질 (예를 들어, scFv, 맥시바디)의 분비를 가능하게 한다. 이러한 방식으로, 본 개시내용의 세포독성 림프구는 PD-1 체크포인트의 억제 효과에서 그들 자신을 "해방"시킴으로써 유전자 변형된 세포독성 림프구가 투여된 대상체에서 개선된 항암 효과를 제공할 수 있다. 본 개시내용의 특이적 결합 단백질 (예를 들어, 항-PD-L1 항체)은 또한 개체에게 직접적으로, 예를 들어, 정맥내 (i.v.) 또는 종양내 주사로 투여될 수 있다.
- [0010] 본 개시내용은 PD-L1에 특이적으로 결합하고, (a) 서열식별번호(SEQ ID NO): 2-4에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 6-8에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드; 또는 (b) 서열식별번호: 10-12에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 14-16에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하며 제1 및/또는 제2 폴리펩티드의 각각의 3개의 CDR 아미노산 서열이 명시된 서열식별번호에 비해 2개 이하의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 것을 예외로 하는 항원 결합 부분을 포함하는 단백질을 제공한다.
- [0011] 일부 실시양태에서, 항원 결합 부분은 서열식별번호: 2-4에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 6-8에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함한다.
- [0012] 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 항원 결합 부분은 서열식별번호: 10-12에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 14-16에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함한다.
- [0014] 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 서열식별번호: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 경쇄이고, 제2 폴리펩티드는 중쇄이다.
- [0016] 일부 실시양태에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질은 단일-쇄 항체 (scFv)이고, 제1 및 제2 폴리펩티드는 서로에 직접적으로 또는 링커를 통해 융합된다. 일부 실시양태에서, scFv는 서열식별번호: 17 또는 서열식별번호: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0017] 일부 실시양태에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질은 항원 결합 부분에 직접적으로 또는 링커를 통해 융합된 이뮤노글로불린 Fc 도메인을 포함하는 맥시바디이다. 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다. 일부 실시양태에서, 단백질은 서열식별번호: 18 또는 서열식별번호: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린 Fc 도메인은 IgG4 Fc 도메인이다.
- [0018] 일부 실시양태에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질은 인간화 항체이다.
- [0019] 본 개시내용은 또한, 본원에 논의된 바와 같은 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 구성적 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다.
- [0020] 본 개시내용은 또한 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 세포의 게놈 내로 통합된다. 일부 실시양태에서, 세포는 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 T-세포이다. 일부 실시양태에서, T-세포는 CD8+ T-세포이다. 일부 실시양태에서, T-세포는 CD4+ T-헬퍼 세포이다. 일부 실시양태에서, T-세포는 말초 혈액으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 자연 킬러 (NK) 세포이다. 일부 실시양태에서, NK는 말초 혈액으로부터 유래된다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 대상체로부터의 종양으로부터 유래된 종양 침윤 림프구 (TIL)이다.
- [0022] 일부 실시양태에서, TIL은 종양으로부터의 항원에 특이적인 수용체를 포함한다.
- [0023] 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 나이브 T-세포에 비해 1종 이상의 활성화 항원의 발현의 증가된 수준을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 활성화 항원은 CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69,

CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT 및 HLA-DR로부터 선택된다.

- [0024] 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 종양 연관 항원에 특이적인 T-세포 수용체를 포함한다.
- [0025] 본 개시내용은 또한 대상체의 종양으로부터 분리된 세포독성 림프구 내로 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 코딩하는 핵산을 도입함으로써 세포독성 림프구를 유전자 변형시키는 단계이며, 여기서 유전자 변형된 세포독성 림프구는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 발현하고 분비하는 것인 단계; 유전자 변형된 세포독성 림프구를 확장시켜 유전자 변형된 세포독성 림프구의 집단을 생성하는 단계; 및 대상체에게 유전자 변형된 세포독성 림프구의 집단을 투여하여 종양을 치료하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포독성 림프구는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 구성적으로 발현한다. 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포독성 림프구는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 유도성으로 발현한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 세포독성 림프구의 게놈 내로 통합된다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 T-세포이다. 일부 실시양태에서, T-세포는 CD8+ T-세포이다. 일부 실시양태에서, T-세포는 CD4+ T-헬퍼 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 자연 킬러 (NK) 세포이다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포독성 림프구는 종양으로부터의 항원에 특이적인 수용체를 포함한다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 방법은 유전자 변형 전에 대상체로부터 세포독성 림프구를 분리하는 것을 포함한다.
- [0030] 방법의 일부 실시양태에서, 단백질은 PD-L1에 특이적으로 결합하고, (a) 서열식별번호: 2-4에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 6-8에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드; 또는 (b) 서열식별번호: 10-12에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 14-16에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하며 제1 및/또는 제2 폴리펩티드의 각각의 3개의 CDR 아미노산 서열이 명시된 서열식별번호에 비해 2개 이하의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 것을 예외로 하는 항원 결합 부분을 포함한다.
- [0031] 방법의 일부 실시양태에서, 항원 결합 부분은 서열식별번호: 2-4에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 6-8에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함한다.
- [0032] 방법의 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0033] 방법의 일부 실시양태에서, 항원 결합 부분은 서열식별번호: 10-12에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 14-16에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함한다.
- [0034] 방법의 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 서열식별번호: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0035] 방법의 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 경쇄이고, 제2 폴리펩티드는 중쇄이다.
- [0036] 방법의 일부 실시양태에서, 단백질은 단일-쇄 항체 (scFv)이고, 제1 및 제2 폴리펩티드는 서로에 직접적으로 또는 링커를 통해 융합된다.
- [0037] 방법의 일부 실시양태에서, scFv는 서열식별번호: 17 또는 서열식별번호: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0038] 방법의 일부 실시양태에서, 단백질은 항원 결합 부분에 직접적으로 또는 링커를 통해 융합된 이뮤노글로불린 Fc 도메인을 포함하는 맥시마이다.
- [0039] 방법의 일부 실시양태에서, 이뮤노글로불린 Fc 도메인은 IgG1 Fc 도메인이다.
- [0040] 방법의 일부 실시양태에서, 단백질은 서열식별번호: 18 또는 서열식별번호: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함한다.
- [0041] 본 개시내용은 또한 암을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체로부터 분리된 세포독성 림프구 내로 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 코딩하는 핵산을 도입함으로써 세포독성 림프구를 유전자 변형시키는 것을 포함하

며, 여기서 유전자 변형된 세포독성 림프구는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 발현하고 분비하는 것인, 유전자 변형된 세포독성 림프구를 제조하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포독성 림프구는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 구성적으로 발현한다. 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포독성 림프구는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 유도성으로 발현한다.

- [0042] 일부 실시양태에서, 방법은 시험관내에서 세포독성 림프구를 확장시켜 유전자 변형된 세포독성 림프구의 확장된 집단을 제공하는 것을 포함한다.
- [0043] 일부 실시양태에서, 방법은 유전자 변형 전에 대상체로부터 세포독성 림프구를 단리하는 것을 포함한다.
- [0044] 일부 실시양태에서, 단리하는 것은 대상체의 종양으로부터 세포독성 림프구를 단리하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리하는 것은 대상체의 말초 혈액으로부터 세포독성 림프구를 단리하는 것을 포함한다.
- [0045] 방법의 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 T-세포이다. 방법의 일부 실시양태에서, T-세포는 CD8+ T-세포이다. 방법의 일부 실시양태에서, T-세포는 CD4+ T-헬퍼 세포이다. 방법의 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 자연 킬러 (NK) 세포이다.
- [0046] 방법의 일부 실시양태에서, 핵산은 세포독성 림프구의 게놈 내로 통합된다.
- [0047] 방법의 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 나이브 T-세포에 비해 1종 이상의 활성화 항원의 발현의 증가된 수준을 나타낸다. 방법의 일부 실시양태에서, 1종 이상의 활성화 항원은 CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT 및 HLA-DR로부터 선택된다.
- [0048] 방법의 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포독성 림프구는 대상체의 종양으로부터의 항원에 특이적인 T-세포 수용체를 포함한다.
- [0049] 본 개시내용은 또한 암을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 개체 (예를 들어, 대상체 또는 환자, 예를 들어 포유동물 예컨대 인간 포함)에게 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체를 치료하는 방법을 제공한다.
- [0050] 방법의 일부 실시양태에서, 투여하는 것은 대상체 내로 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 것을 포함한다.
- [0051] 방법의 일부 실시양태에서, 투여하는 것은 대상체 내로 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 발현하고 분비하는 유전자 변형된 세포독성 림프구를 도입하는 것을 포함한다.
- [0052] 방법의 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포독성 림프구는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 구성적으로 발현한다. 방법의 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포독성 림프구는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 유도성으로 발현한다. 일부 실시양태에서, 방법은 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질의 발현을 유도하는 것을 포함한다.
- [0053] 방법의 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 T-세포이다. 방법의 일부 실시양태에서, T-세포는 CD8+ T-세포이다. 방법의 일부 실시양태에서, T-세포는 CD4+ T-헬퍼 세포이다. 방법의 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 자연 킬러 (NK) 세포이다.
- [0054] 방법의 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 나이브 T-세포에 비해 1종 이상의 활성화 항원의 발현의 증가된 수준을 나타낸다. 방법의 일부 실시양태에서, 1종 이상의 활성화 항원은 CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT 및 HLA-DR로부터 선택된다.
- [0055] 방법의 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포독성 림프구는 대상체의 종양으로부터의 항원에 특이적인 T-세포 수용체를 포함한다.
- [0056] 본 개시내용은 또한 제1-세포 상의 PD-L1을 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질과 접촉시키는 것을 포함하는, 제1-세포 상의 PD-L1과 제2 세포 상의 PD-1 사이의 상호작용을 감소시키는 방법을 제공한다.
- [0057] 방법의 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 세포는 개체에 도입되고, 접촉시키는 것은 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 투여하는 것을 포함한다. 방법의 일부 실시양태에서, 도입하는 것은 전신 투여를 포함한다. 방법의 일부 실시양태에서, 도입하는 것은 국부 투여를 포함한다. 방법의 일부 실시양태에서, 국부 투여는 종양내 투여를 포함한다. 방법의 일부 실시양태에서, 개체는 암을 갖는다. 방법의 일부 실시양태에서, 개체는 고형 종양을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0058]

본 발명은 첨부 도면과 함께 읽는 경우에 하기 상세한 설명으로부터 가장 잘 이해될 수 있다. 하기 도면이 도면에 포함된다:

도 1은 38A1-Fc, 19H9-Fc 및 FMC63-Fc를 생산하는데 사용된 렌티바이러스 플라스미드의 개략적 표현을 제공한다. 항 PD-L1 맥시바디는 MSCV 프로모터로부터의 U3 프로모터의 하류 및 IRES-eGFP 카세트의 상류에서 코딩된다.

도 2는 38A1-Fc, 19H9-Fc 및 FMC63-Fc를 생산하는데 사용된 레트로바이러스 플라스미드의 개략적 표현을 제공한다. 항 PD-L1 맥시바디는 MSCV 프로모터로부터의 U3 프로모터의 하류 및 IRES-eGFP 카세트의 상류에서 코딩된다.

도 3A-3B는 PD-L1에 대한 38A1-scFV-Fc 및 19H9-scFV-Fc의 친화도를 결정하기 위한 세포 기반 ELISA로부터의 데이터를 제공한다. 293-PD-L1을 19H9-scFV-Fc (패널 A) 또는 38A1-scFV-Fc (패널 B)로 염색하였다. 맥시바디를 293-PD-L1에 대해 100 nM에서 0.01 nM로 적정하고, 세척하고, HRP 표지된 항-인간 Fc γ 특이적 항체로 염색하였다. 결합을 TMB (3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘)의 첨가 후에 450 nm에서의 광학 밀도에 의해 결정하였다. 12D10-scFV-Fc를 음성 대조군으로서 사용하였다.

도 4A-4C는 293-PD-L1 세포가 Jurkat T-세포에 의해 분비된 항-PD-L1 맥시바디에 결합한다는 것을 보여주는 데이터를 제공한다. FMC63-scFV-Fc (패널 A), 38A1-scFV-Fc (패널 B) 또는 19H9-scFV-Fc (패널 C)를 안정하게 발현하는 Jurkat T-세포를 16시간 동안 1:1의 비로 공동-배양하였다. 세포를 수거하고, 알렉사(Alexa) 647 표지된 항-인간 Fc γ 특이적 항체로 염색하였다. 음성 대조군 맥시바디 (FMC63-scFV-Fc)와 비교하여, 평균 형광 강도 (맥시바디의 결합)의 100배 내지 300배 증가가 각각 19H9-scFV-Fc 및 38A1-scFV-Fc에 대해 관찰되었다.

도 5A-5D는 293-PD-L1 세포가 종양 침윤 림프구 (TIL)에 의해 분비된 항-PD-L1 맥시바디에 결합한다는 것을 보여주는 데이터를 제공한다. FMC63-scFV-Fc (패널 A, 패널 C) 또는 38A1-scFV-Fc (패널 B, 패널 D)를 안정하게 발현하는 TIL 세포주 M1034 (패널 A, 패널 B) 및 M1015 (패널 C, 패널 D)로부터의 상청액을 10배 농축시키고, 이를 사용하여 293-PD-L1을 염색하였다. 알렉사 647 표지된 항-인간 Fc γ 특이적 항체를 사용하여 맥시바디를 검출하였다. 음성 대조군 맥시바디 (FMC63-scFV-Fc)와 비교하여, 본 발명자들은 38A1-scFV-Fc에 대해 평균 형광 강도 (맥시바디의 결합)의 50배 초과를 증가를 관찰하였다.

도 6은 NFAT 활성의 PD-L1 매개 억제를 제한하는 항-PD-L1 맥시바디의 능력을 보여주는 데이터를 제공한다. NFAT 프로모터의 하류에서 PD1 및 반딧불이 루시페라제를 발현하는 Jurkat T-세포를 PD-L1 및 독점 T-세포 효능 작용 단백질 (PD1/PD-L1 차단 생물검정 키트, 프로메가(Promega) 카탈로그 번호 CS187111), 및 12D10-scFV-Fc (음성 대조군; 회색), 19H9-scFV-Fc (적색), 38A1-scFV-Fc (청색) 또는 양성 대조군 PD1 특이적 항체 EH12.2H7 (바이오레전드(Biolegend); 녹색) 중 1종을 발현하는 CHO 세포와 2:1 비로 공동-배양하였다. 맥시바디를 25 μ g/ml에서 0.016 μ g/ml로 적정하였다. Jurkat T-세포 활성화 (PD-L1의 탈-억제)를 5'-플루오로루시페린의 첨가 후의 생물발광 활성 (상대 발광 단위; RLU)으로서 측정하였다.

도 7은 새로 생성된 38A1 및 19H9 항체의 항원 결합 영역의 서열, 뿐만 아니라 항원 결합 영역 38A1 또는 19H9를 포함하는 scFV 단백질 (예를 들어, scFV 및 scFV-FC 융합체)의 예를 제공한다.

도 8은 유도성 프로모터를 코딩하는 발현 벡터 (예를 들어, 렌티벡터)의 예의 개략도를 도시한다.

도 9는 유도성 프로모터를 코딩하는 발현 벡터 (예를 들어, 렌티벡터)의 예의 개략도를 도시한다.

도 10은 본 발명의 방법에서 예시적인 벡터로서 사용되는 pLEV 벡터에 대한 공벡터 서열을 제공한다. pLV430G (렌티바이러스 벡터) (서열식별번호: 35) (a) 및 pCIGO-VSV.G (VSVG) (서열식별번호: 36) (b).

도 11a-11b는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37) (a) 및 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38) (b)에 대한 완전한 벡터 뉴클레오타이드 서열을 제공한다.

도 12는 19H9가 더 큰 분비 능력을 나타낸다는 것을 보여주는 데이터를 제공한다. 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 대 38A1을 과다발현하는 Jurkat 세포의 분비 능력의 비교가 제공된다. 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 및 38A1을 과다발현하는 Jurkat 세포로부터의 상청액을 수거하고, 농축시켜 IgG ELISA 검정에서 항-PD-L1 ScFV 농도를 결정하였다. Jurkat 세포 클론 19H9가 38A1과 비교하여 더 큰 분비 능력을 가진 것으로 발견되었다 (9.82 대 6.75 μ g/세포).

도 13a-13b는 38A1이 PD-L1을 과다발현하는 Jurkat 세포에서 더 큰 결합 능력을 나타낸다는 것을 보여주는 데이터를 제공한다. EL4 PD-L1 세포를 사용하여 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 및 38A1의 결합 친화도를 검사하였다. EL4 PD-L1을 1, 3, 10, 30, 100 및 300 ng/ml의 농도의 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 또는 38A1과 함께 인큐베이션하고, 암시안(Amcyan) 및 염소 항-인간 FITC로 염색하였다. 세포를 FACs 완충제로 세척하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 클론 38A1은 PD-L1 양성 세포의 백분율 (a) 및 평균 형광 강도 (MFI) (b) 둘 다에 있어서 PD-L1을 과다발현하는 Jurkat 세포에서 더 큰 결합 능력을 나타냈다.

도 14a-14b는 38A1이 흑색종 종양 세포에서 더 큰 결합 능력을 나타낸다는 것을 보여주는 데이터를 제공한다. EL4 PD-L1 세포를 사용하는 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 및 38A1의 결합 친화도의 비교가 제공된다. EL4 PD-L1을 1, 3, 10, 30, 100 및 300 ng/ml의 농도의 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 또는 38A1과 함께 인큐베이션하고, 암시안 및 염소 항-인간 FITC로 염색하였다. 세포를 FACs 완충제로 세척하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 클론 38A1은 PD-L1 양성 세포의 백분율 (a) 및 평균 형광 강도 (MFI) (b) 둘 다에 있어서 PD-L1을 과다발현하는 Jurkat 세포에서 더 큰 결합 능력을 나타냈다. 종양 세포에서의 항-PD-L1 ScFV의 결합을 검증하기 위해, 3종의 흑색종 종양 세포를 IFN-감마 (100 ng/ml)로 처리하여 PD-L1 발현을 증진시켰다. 3일 후, 세포를 세포 해리 완충제에 의해 수거하고, 100 ng/ml의 농도의 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 또는 38A1과 함께 인큐베이션하고, 염소 항-인간 FITC로 염색하였다. 세포를 FACs 완충제로 세척하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 본 발명자들은 클론 38A1이 PD-L1 양성 세포의 백분율 및 MFI 둘 다에 있어서 더 큰 결합 친화도를 나타냈다는 것을 발견하였다. 종합하면, 클론 38A1은 클론 19H9와 비교하였을 때 더 큰 결합 친화도를 갖지만, 약간 더 적은 분비 능력을 갖는다.

도 15a-15b는 38A1이 19H9보다 더 큰 생물학적 기능을 나타낸다는 것을 보여주는 데이터를 제공한다. 항-PD-L1 ScFV의 2종의 클론 (19H9 및 38A1)의 생물학적 기능을 추가로 결정하기 위해, PD-1 및 PD-L1 상호작용의 결속을 차단하는 항 PD-1 또는 PD-L1 항체의 효력을 결정하는데 사용될 수 있는 PD-L1 차단 검정을 수행하였다. 검정은 2종의 유전자 조작된 세포주로 이루어진다: PD-1 이펙터 세포 (인간 PD-1 및 NFAT-유도된 루시페라제를 안정하게 발현하는 Jurkat T-세포) 및 동족 TCR을 활성화시키는 세포 표면 단백질과 함께 인간 PD-L1을 안정하게 발현하는 PD-L1 aAPC/CHO-K1 세포. 2종의 세포 유형을 공동-배양하였을 때, PD-1 및 PD-L1의 결속은 TCR 신호전달을 억제하고 루시페라제 활성을 감소시켰다. 항-PD-1 또는 PD-L1 차단 항체의 첨가는 억제 신호의 방출을 도왔으며, 이에 따라 TCR 신호전달 및 NFAT-매개 루시페라제 활성을 증진시켰다. 루시페라제 신호 (RLU)는 항-PD1과 비교하여 항-PD-L1로 차단된 경우에 더 큰 것으로 발견되었으며, 이는 PD-L1을 차단하는 것이 이러한 상황에서 PD-1보다 더 효과적인 것으로 보였다는 것을 시사한다 (a). 예상대로, 더 큰 결합 친화도를 갖는 것으로 상기 제시된 항-PD-L1 ScFV 클론 38A1은 정제된 ScFV (P) 및 비-정제된 (NP) 환경 둘 다에서 고도로 증가된 루시페라제 신호로 인해 더 큰 생물학적 기능을 제공하였다 (b).

도 16은 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (a) 및 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (b)에 대한 벡터 지도를 제공한다.

도 17은 IgG1 (서열식별번호: 39), IgG2 (서열식별번호: 40), IgG3 (서열식별번호: 41) 및 IgG4 (서열식별번호: 42) 서열의 예를 제공한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0059] 본 개시내용은 프로그램화된 사멸 1 리간드 1 (PD-L1)에 특이적으로 결합하는 항원 결합 부분을 포함하는 단백질, 예컨대 항체를 제공한다. 단백질을 코딩하는 핵산, 및 이러한 핵산을 포함하는 세포 (예를 들어, 유전자 변형된 세포독성 림프구)가 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 대상 방법은 제1-세포 상의 PD-L1과 제2 세포 상의 PD-1 사이의 상호작용을 감소시키는 것을 포함한다. 예를 들어, 제공된 방법 및 조성물은 ACT를 통한 또는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질의 투여를 통한 바이러스 감염 및 암의 치료, 예컨대 고형 종양의 치료에 사용될 수 있다.
- [0060] 본 개시내용의 조성물 및 방법은 유전자 변형된 세포독성 림프구, 예를 들어, 활성화된 T-세포, TIL, 및 NK 세포를 제공하며, 이는 증식되어 세포 요법으로서 주입될 수 있어, 대상체 내로 주입된 유전자 변형된 세포독성 림프구에서 PD-L1 결합 단백질 (예를 들어, scFV, 맥시바디 등)의 분비를 유발한다. 이러한 방식으로, 본 개시내용의 세포독성 림프구는 PD-1 체크포인트의 억제 효과에서 그들 자신을 "해방"시켜 개선된 항암 효과를 제공할 수 있다. 본 개시내용의 특이적 결합 단백질 (예를 들어, 항-PD-L1 항체)은 또한 개체에게 직접적으로, 예를 들어, 정맥내로 (i.v.) 또는 종양내 주사로 투여될 수 있다.
- [0061] 본 발명이 보다 상세하게 기재되기 전에, 본 발명은 물론 달라질 수 있으므로 기재된 특정한 실시양태로 제한되

지 않는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 발명의 범주는 오직 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이므로, 본원에 사용된 용어는 오직 특정한 실시양태를 기재하는 목적을 위한 것이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

- [0062] 값의 범위가 제공되는 경우에, 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한, 그 범위의 상한치와 하한치 사이에서 하한치 단위의 1/10까지의 각각의 중간 값이 또한 구체적으로 개시되는 것으로 이해된다. 언급된 범위 내 임의의 언급된 값 또는 중간 값 내지 그 언급된 범위 내 임의의 다른 언급된 값 또는 중간 값 사이의 각각의 더 작은 범위가 본 발명 내에 포괄된다. 이러한 더 작은 범위의 상한치 및 하한치는 독립적으로 범위 내에 포함되거나 배제될 수 있고, 더 작은 범위 내에 이러한 한계치 중 어느 하나 또는 둘 다가 포함되는, 또는 둘 다가 포함되지 않는 각각의 범위는 언급된 범위 내의 임의의 구체적으로 배제된 한계치를 조건으로 하여 본 발명 내에 또한 포괄된다. 언급된 범위가 한계치 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우에, 포함된 한계치 중 어느 하나 또는 둘 다를 배제하는 범위가 또한 본 발명에 포함된다.
- [0063] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 이러한 용어는 예시적으로 문헌 [J. Sambrook and D. W. Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press; 4th Ed., 2012; F. M. Ausubel, Ed., Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols; 5th Ed., 2002; B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th Ed., Garland, 2002; D. L. Nelson and M. M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, 4th Ed., W.H. Freeman & Company, 2004; 및 Herdewijn, P. (Ed.), Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications, Methods in Molecular Biology, Humana Press, 2004]을 포함한 다양한 표준 참고문헌의 문맥에서 정의 및 사용되는 것으로 발견된다. 본원에 기재된 것들과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질이 기재된다.
- [0064] 본원에 사용된 각각의 하기 용어는 본 섹션에서 그와 연관된 의미를 갖는다.
- [0065] 단수 용어는 본원에서 하나 또는 하나 초과 (즉, 적어도 하나)의 물품의 문법적 대상을 지칭하기 위해 사용된다. 예로서, "요소"는 하나의 요소 또는 하나 초과의 요소를 의미한다.
- [0066] 본원에 사용된 "약"은, 측정가능한 값 예컨대 양, 시간 기간 등을 언급하는 경우에 명시된 값으로부터 $\pm 20\%$ 또는 $\pm 10\%$, 보다 바람직하게는 $\pm 5\%$, 보다 더 바람직하게는 $\pm 1\%$, 및 보다 더 바람직하게는 $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포괄하는 것으로 의도되며, 이는 이러한 변동이 개시된 방법을 수행하기에 적절하기 때문이다.
- [0067] 본원에 사용된 용어 "항종양 효과"는, 종양 부피의 감소, 종양 세포의 수의 감소, 전이의 수의 감소, 기대 수명의 증가, 또는 암성 상태와 연관된 다양한 생리학적 증상의 호전에 의해 나타내어질 수 있는 생물학적 효과를 지칭한다. "항종양 효과"는 또한 처음에 종양의 발생을 예방하는 개시된 조성물 및 방법의 능력에 의해 나타내어질 수 있다.
- [0068] 용어 "항체"는 달리 명시되지 않는 한, 가장 넓은 의미로 사용되고, 예를 들어 특이적 결합에 대해 무손상 항체와 경쟁하는 무손상 이뮤노글로불린 또는 그의 항원 결합 부분을 포함한다. 항원 결합 부분은 제조항 DNA 기술에 의해 또는 무손상 항체의 효소적 또는 화학적 절단에 의해 생산될 수 있다. 항원 결합 부분은 Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, Fv, 및 도메인 항체 (dAb), 및 상보성 결정 영역 (CDR) 단편, 단일-쇄 항체 (단일-쇄 가변 도메인 단편; scFv), 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 및 폴리펩티드에 특이적 항원 결합을 부여하기에 충분한 이뮤노글로불린의 적어도 일부를 함유하는 폴리펩티드를 포함한다. 항체는 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 재조합 항체, 항원-결합 항체 단편, 단일 쇄 항체, 맥시바디 (Fc 또는 Fc 단편에 대한 링커 또는 직접적 부착에 의해 융합된 scFv), 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, Fab 단편, F(fa')_x 단편, 도메인 항체, IgD 항체, IgE 항체, 및 IgM 항체, 및 IgG1 항체, 및 IgG2 항체, 및 IgG3 항체, 및 IgG4 항체, 및 H-쇄내 디설피드 결합에 대한 경향을 완화시키는 힌지 영역에서의 적어도 1종의 돌연변이를 갖는 IgG4 항체를 포함한다.
- [0069] "Fab 단편"은 VL, VH, CL 및 CH1 도메인을 갖는 1가 단편이고; F(ab')₂ 단편은 힌지 영역에서 디설피드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 갖는 2가 단편이고; Fd 단편은 VH 및 CH1 도메인을 갖고; Fv 단편은 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인을 갖고; dAb 단편은 VH 도메인, VL 도메인, 또는 VH 또는 VL 도메인의 항원-결합 단편을 갖는다.
- [0070] "단일-쇄 항체" (scFv)는 VL 및 VH 영역이 연속적인 단백질 쇄를 형성하도록 직접적으로 융합되거나 또는 링커

(예를 들어, 아미노산 잔기의 합성 서열)를 통해 연결된 항체이며, 여기서 링커는 단백질 쇠가 그 자체 상에서 폴딩되어 1가 항원 결합 부위를 형성하도록 하기에 충분히 길다 (예를 들어, 문헌 [Bird et al., 1988, Science 242:423-26 및 Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-83] 참조). 디아바디는 2개의 폴리펩티드 쇠를 포함하는 2가 항체이며, 여기서 각각의 폴리펩티드 쇠는 동일한 쇠 상의 2개의 도메인 사이에서 쌍형성되도록 하기에는 너무 짧아서 각각의 도메인이 또 다른 폴리펩티드 쇠 상의 상보적 도메인과 쌍형성하도록 하는 링커에 의해 연결된 VH 및 VL 도메인을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Holliger et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 및 Poljak et al., 1994, Structure 2:1121-23] 참조). 디아바디의 2개의 폴리펩티드 쇠가 동일한 경우, 이들의 쌍형성으로부터 생성된 디아바디는 2개의 동일한 항원 결합 부위를 가질 것이다. 상이한 서열을 갖는 폴리펩티드 쇠는 2개의 상이한 항원 결합 부위를 갖는 디아바디를 제조하는데 사용될 수 있다. 유사하게, 트리아바디 및 테트라바디는 각각 3개 및 4개의 폴리펩티드 쇠를 포함하고 각각 3개 및 4개의 항원 결합 부위 (동일하거나 상이할 수 있음)를 형성하는 항체이다.

[0071] 주어진 항체의 상보성 결정 영역 (CDR) 및 프레임워크 영역 (FR)은 문헌 [Kabat et al. in Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991]에 의해 기재된 시스템을 사용하여 확인될 수 있다. 1개 이상의 CDR이 공유적으로 또는 비공유적으로 분자 내로 혼입되어 그것을 항원 결합 단백질로 만들 수 있다. 항원 결합 단백질은 더 큰 폴리펩티드 쇠의 부분으로서 CDR(들)을 혼입시킬 수 있거나, 또 다른 폴리펩티드 쇠에 CDR(들)을 공유적으로 연결시킬 수 있거나, 또는 CDR(들)을 비공유적으로 혼입시킬 수 있다. CDR은 항원 결합 단백질이 특정한 관심 항원에 특이적으로 결합하도록 한다.

[0072] 용어 "인간 항체"는 인간 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 1개 이상의 가변 및 불변 영역을 갖는 모든 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 가변 및 불변 도메인 모두가 인간 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된다 (완전 인간 항체). 인간 항체는 인간 항체를 발현하도록 유전자 변형된 마우스의 면역화를 포함한 다양한 방식으로 제조될 수 있다. 조작된 마우스가 마우스 항체의 부재 하에 인간 항체를 생산할 것으로 예상하면서, 마우스 항체 생산이 결여된 마우스 계통을 인간 Ig 유전자좌의 큰 단편으로 조작할 수 있다. 큰 인간 Ig 단편은 큰 가변 유전자 다양성뿐만 아니라 항체 생산 및 발현의 적절한 조절을 보존할 수 있다. 항체 다양화 및 선택에 대한 마우스 기구, 및 인간 단백질에 대한 면역 반응의 결여를 이용함으로써, 이들 마우스 계통에서의 재생된 인간 항체 레퍼토리는 인간 항원을 포함한 임의의 관심 항원에 대한 고친화도 완전 인간 항체를 생성할 수 있다. 하이브리도마 기술을 사용하여, 목적하는 특이성을 갖는 항원-특이적 인간 MAb를 생산하고 선택할 수 있다. 인간 항체는 또한 파지, 파지미드, 리보솜, 또는 다른 입자 상에 발현된 인간 항체 라이브러리를 패닝함으로써 제조될 수 있다.

[0073] "인간화 항체"는 1개 이상의 아미노산 치환, 결실 및/또는 부가에 의해 비-인간 종으로부터 유래된 항체의 서열과 상이한 서열을 가지며, 이에 따라 인간 대상체에게 투여되는 경우 인간화 항체는 비-인간 종 항체와 비교하여 면역 반응을 유도할 가능성이 적고/적거나 덜 중증인 면역 반응을 유도한다. 한 실시양태에서, 비-인간 종 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 프레임워크 및 불변 도메인 내의 특정 아미노산이 돌연변이되어 인간화 항체가 생산된다. 또 다른 실시양태에서, 인간 항체로부터의 불변 도메인(들)은 비-인간 종의 가변 도메인(들)에 융합된다. 또 다른 실시양태에서, 비-인간 항체의 1개 이상의 CDR 서열 내의 1개 이상의 아미노산 잔기는 비-인간 항체가 인간 대상체에게 투여되는 경우 비-인간 항체의 가능한 면역원성을 감소시키도록 변화되며, 여기서 변화된 아미노산 잔기는 그의 항원에 대한 항체의 면역특이적 결합에 결정적이지 않거나, 또는 아미노산 서열에 대해 이루어진 변화가 보존적 변화여서, 항원에 대한 인간화 항체의 결합이 항원에 대한 비-인간 항체의 결합보다 유의하게 악화되지 않는다. 인간화 항체를 제조하는 방법의 예는 미국 특허 번호 6,054,297, 5,886,152 및 5,877,293에서 찾아볼 수 있으며, 이들 각각의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0074] 용어 "키메라 항체"는 하나의 항체로부터의 1개 이상의 영역, 및 하나 이상의 다른 항체로부터의 1개 이상의 영역을 함유하는 항체를 지칭한다. "CDR 그래프트된 항체"는 특정한 종 또는 이소형의 항체로부터 유래된 1개 이상의 CDR, 및 동일하거나 상이한 종 또는 이소형의 또 다른 항체의 프레임워크를 포함하는 항체이다.

[0075] 본원에 사용된 용어 " K_{assoc} " 또는 " K_a "는 특정한 항체-항원 상호작용의 회합률을 지칭하는 것으로 의도되는 한편, 본원에 사용된 용어 " K_{dis} " 또는 " K_d "는 특정한 항체-항원 상호작용의 해리율을 지칭하는 것으로 의도된다. 본원에 사용된 용어 " K_D "는 K_d 대 K_a 의 비 (즉, K_d/K_a)로부터 수득되고 몰 농도 (M)로 표현되는 해리 상수를 지칭하는 것으로 의도된다. 항체에 대한 K_D 값은 관련 기술분야에 널리 확립된 방법을 사용하여 결정될 수 있다.

일부 실시양태에서, 항체의 K_D 를 결정하는 방법은 표면 플라즈몬 공명을 사용하는 것, 예를 들어, 바이오센서 시스템 예컨대 비아코어(Biacore)® 시스템을 사용하는 것에 의한다.

[0076] 본원에 사용된 용어 IgG 항체에 대한 "고친화도"는 표적 항원에 대해 10^{-8} M 이하, 일부 실시양태에서, 10^{-9} M 이하, 및 일부 실시양태에서, 10^{-10} M 이하의 K_D 를 갖는 항체를 지칭한다. 그러나, "고친화도" 결합은 다른 항체 이소형에 대해 달라질 수 있다. 예를 들어, IgM 이소형에 대한 "고친화도" 결합은 10^{-7} M 이하, 일부 실시양태에서, 10^{-8} M 이하, 및 일부 실시양태에서, 10^{-9} M 이하의 K_D 를 갖는 항체를 지칭한다.

[0077] "구성적" 발현은 유전자 산물이 세포의 대부분의 또는 모든 생리학적 조건 하에 살아있는 세포에서 생산되는 상태를 포함한다.

[0078] 유전자의 "코딩 영역"은 유전자의 코딩 가닥의 뉴클레오티드 잔기 및 유전자의 비-코딩 가닥의 뉴클레오티드를 포함하며, 이는 유전자의 전사에 의해 생산되는 mRNA 분자의 코딩 영역에 대해 각각 상동 또는 상보적이다. mRNA 분자의 "코딩 영역"은 또한 mRNA 분자의 번역 동안 전달 RNA 분자의 안티-코돈 영역과 매칭되거나 또는 정지 코돈을 코딩하는, mRNA 분자의 뉴클레오티드 잔기를 포함한다. 따라서, 코딩 영역은 mRNA 분자에 의해 코딩된 성숙 단백질 내에는 존재하지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 단백질 배출 신호 서열 내의 아미노산 잔기)에 대한 코돈을 포함하는 뉴클레오티드 잔기를 포함할 수 있다.

[0079] 본원에서 "종양 침윤 림프구" 또는 "TIL"이란 대상체의 혈류를 떠나 종양으로 이동한 백혈구로서 원래 수득되는 세포의 집단을 의미한다. TIL은 CD8+ 세포독성 T-세포 (림프구), Th1 및 Th17 CD4+ T-세포, 자연 킬러 세포, 수지상 세포, 및 M1 대식세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. TIL은 1차 및 2차 TIL 둘 다를 포함한다. "1차 TIL"은 본원에 약술된 바와 같은 환자 조직 세포로부터 수득된 것들 (때때로 "새로 수거된" 것으로 지칭됨)이고, "2차 TIL"은 본원에 논의된 바와 같은 벌크 TIL 및 확장된 TIL ("REP TIL")을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 본원에 논의된 바와 같이 확장 또는 증식된 임의의 TIL 세포 집단이다.

[0080] TIL은 일반적으로 세포 표면 마커를 사용하여 생화학적으로, 또는 종양에 침윤하여 치료를 실시하는 그의 능력에 의해 기능적으로 정의될 수 있다. TIL은 일반적으로 하기 바이오마커 중 1종 이상의 발현에 의해 카테고리화될 수 있다: CD4, CD8, TCR $\alpha\beta$, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1, 및 CD25. 추가적으로 및 대안적으로, TIL은 환자 내로의 재도입 시에 고품종 종양에 침윤하는 그의 능력에 의해 정의될 수 있다.

[0081] 용어 "세포독성 림프구"는 세포독성 T (CTL) 세포 (CD8⁺ 세포독성 T 림프구 및 CD4⁺ T-헬퍼 림프구 포함), 자연 킬러 T (NKT) 세포 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 세포독성 림프구는 예를 들어, 종양 연관 항원에 의해 활성화되고/거나 종양 특이적 키메라 항원 수용체 또는 T-세포 수용체로 형질도입된 말초 혈액-유래 $\alpha\beta$ TCR-양성 또는 $\gamma\delta$ TCR-양성 T-세포, 및 종양 침윤 림프구 (TIL)를 포함할 수 있다. 세포독성 림프구는 일반적으로 암 세포, (특히 바이러스에 의해) 감염된 세포, 또는 달리 손상되거나 결합있는 세포를 사멸시킨다. 세포독성 림프구는 또한 세포독성 T-세포, TC, 세포독성 T 림프구, CTL, T-킬러 세포, 세포용해 T-세포, CD8+ T-세포 또는 킬러 T-세포로 지칭될 수 있으며, 이는 T 림프구 (일종의 백혈구)이다.

[0082] 종양을 파괴하는 방법을 기재하기 위해 본원에 사용된 용어 "단편화", "단편" 및 "단편화된"은 기계적 단편화 방법 예컨대 종양 조직을 분쇄, 슬라이싱, 분리, 및 세절하는 것뿐만 아니라 종양 조직의 물리적 구조를 파괴하는 임의의 다른 방법을 포함한다.

[0083] 용어 "생체내"는 대상체의 신체에서 일어나는 사건을 지칭한다.

[0084] 용어 "시험관내"는 대상체의 신체의 외부에서 일어나는 사건을 지칭한다. 시험관내 검정은 살아있는 또는 사멸한 세포가 사용되는 세포-기반 검정을 포괄하고, 또한 무손상-세포가 사용되지 않는 무세포 검정을 포괄할 수 있다.

[0085] 용어 "항-CD3 항체"는 성숙 T-세포의 T-세포 항원 수용체에서 CD3 수용체에 대해 지시되는 인간, 인간화, 키메라 또는 유린 항체를 포함한 항체 또는 그의 변이체, 예를 들어, 모노클로날 항체를 지칭한다. 항-CD3 항체는 무로모넵으로도 알려져 있는 OKT-3을 포함한다. 다른 항-CD3 항체는 예를 들어 오텔릭시주맵, 테플리주맵 및 비실리주맵을 포함한다.

[0086] 용어 "OKT-3" (또한 본원에서 "OKT3"으로도 지칭됨)은 성숙 T-세포의 T-세포 항원 수용체에서 CD3 수용체에 대해 지시되는 인간, 인간화, 키메라 또는 유린 항체를 포함한 모노클로날 항체 또는 그의 바이오시밀러 또는 변

이체를 지칭하고, 상업적으로 입수가 가능한 형태 예컨대 OKT-3 (30 ng/mL, MACS GMP CD3 순수, 밀테니 바이오테크, 인크.(Miltenyi Biotech, Inc.), 미국 캘리포니아주 샌디에고) 및 무로모납 또는 그의 변이체, 보존적 아미노산 치환, 당형태 또는 바이오시밀러를 포함한다. 무로모납의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열은 표 1에 제공된다 (서열식별번호: 27 및 서열식별번호: 28). OKT-3을 생산할 수 있는 하이브리도마는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection)에 기탁되고 ATCC 수탁 번호 CRL 8001로 배정된다. OKT-3을 생산할 수 있는 하이브리도마는 또한 유로피안 콜렉션 오브 오펜티케이티드 셀 컬처스(European Collection of Authenticated Cell Cultures) (ECACC)에 기탁되고 카탈로그 번호 86022706으로 배정된다.

표 1. 무로모납의 아미노산 서열.

식별자	서열 (1-문자 아미노산 기호)
SEQ ID NO:27	QVQLQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INFSGYTNV 60
무로모납	NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120
중쇄	KTTAPSVYPL APVCGGTGTS SVTLGCLVKG YFPEPVTITW NSGSLSSGVH TFFAVLQSDL 180
	YTLSSSVTVT SSTWFSQSIT CNVAHPASST KVDKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240
	PSVFLPPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300
	STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360
	LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW 420
	QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO:28	QIVLTQSPAI MSASPGKVT MTCASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60
무로모납	FRGSGGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQW SSNFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120
경쇄	SEQLTSGGAS VVCFLNRFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLT 180
	TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

용어 "IL-2" (또한 본원에서 "IL2"로도 지칭됨)는 인터류킨-2로도 알려져 있는 T-세포 성장 인자를 지칭하고, 인간 및 포유동물 형태, 그의 보존적 아미노산 치환, 당형태, 바이오시밀러 및 변이체를 포함한 IL-2의 모든 형태를 포함한다. IL-2는 예를 들어 문헌 [Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88 및 Malek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79]에 기재되며, 그 개시내용이 본원에 참조로 포함된다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-2의 아미노산 서열이 표 2에 제공된다 (서열식별번호: 3). 예를 들어, 용어 IL-2는 IL-2의 인간, 재조합 형태 예컨대 알데스류킨 (프로류킨(PROLEUKIN), 단일 사용 바이알당 2천2백만 IU로 다수의 공급업체로부터 상업적으로 입수가 가능함), 뿐만 아니라 미국 뉴햄프셔주 포트머스 소재의 셀제닉스, 인크.(CellGenix, Inc.) (셀그로 GMP) 또는 미국 뉴저지주 이스트 브런즈윅 소재의 프로스펙-타니 테크노진 리미티드(ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.) (카탈로그 번호 CYT-209-b)에 의해 상업적으로 공급되는 재조합 IL-2의 형태 및 다른 공급업체로부터의 다른 상업적 등가물을 포괄한다. 알데스류킨 (테스-알라닐-1, 세린-125 인간 IL-2)은 대략 15 kDa의 분자량을 갖는 IL-2의 비글리코실화 인간 재조합 형태이다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 알데스류킨의 아미노산 서열이 표 2에 제공된다 (서열식별번호: 30). 용어 IL-2는 또한 본원에 기재된 바와 같은, 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 소재의 넥타 테라퓨틱스(Nektar Therapeutics)로부터 입수가 가능한 PEG화 IL2 전구약물 NKTR-214를 포함한 IL-2의 PEG화 형태를 포괄한다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 NKTR-214 및 PEG화 IL-2는 미국 특허 출원 공개 번호 US 2014/0328791 A1 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2012/065086 A1에 기재되며, 그 개시내용이 본원에 참조로 포함된다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 접합된 IL-2의 대안적 형태는 미국 특허 번호 4,766,106, 5,206,344, 5,089,261 및 4,902,502에 기재되며, 그 개시내용이 본원에 참조로 포함된다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 IL-2의 제제는 미국 특허 번호 6,706,289에 기재되며, 그 개시내용이 본원에 참조로 포함된다.

본원에 사용된 인터류킨은 IL-2, IL-4, IL-7, IL-15 및 IL-21을 포함한다. 이들 인터류킨에 대한 예시적인 서열이 하기 표 2에 제공된다.

[0091] 표 2. 인터류킨의 아미노산 서열.

식별자	서열 (1-문자 아미노산 기호)	
SEQ ID NO:29	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL	60
재조합 인간 IL-2 (rhIL-2)	EEELKPLEEV LNLQSKRNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN	120
	RWITFCQSI STLT	134
SEQ ID NO:30	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE	60
알테스류킨 (프로류킨®)	ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGS ET TFMCEYAD ET ATIVEFLNRW	120
	ITFSQSIIST LT	132
SEQ ID NO:31	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCAA TVLRQFYSHH	60
재조합 인간 IL-4 (rhIL-4)	EKDRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI	120
	MREKYSKCSS	130
SEQ ID NO:32	MDCDIEGKDG KYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHCDA NKEGMFLFRA	60
재조합 인간 IL-7 (rhIL-7)	ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTL LNCGTQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL	120
	KEQKKLNDLC FLKRLQEI K TCWNKILMGT KEH	153
SEQ ID NO:33	MNVVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI	60
재조합 인간 IL-15 (rhIL-15)	HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHVQM FINTS	115
SEQ ID NO:34	MQDRHMIRM QLIDIVDQLK NYVNDLVEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG	60
재조합 인간 IL-21 (rhIL-21)	NNERIINVS I KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLQKMIHQ	120
	HLSSTRTHGSE DS	132

[0092]

[0093]

용어 "IL-4" (또한 본원에서 "IL4"로도 지칭됨)는 Th2 T-세포에 의해 및 호산구, 호염기구 및 비만 세포에 의해 생산되는, 인터류킨 4로 알려져 있는 시토카인을 지칭한다. IL-4는 나이브 헬퍼 T-세포 (Th0 세포)의 Th2 T-세포로의 분화를 조절한다. 문헌 [Steinke and Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70]. IL-4에 의한 활성화 시에, Th2 T-세포는 후속적으로 양성 피드백 루프에서 추가의 IL-4를 생산한다. IL-4는 또한 B 세포 증식 및 부류 II MHC 발현을 자극하고, IgE로의 부류 전환 및 B 세포로부터의 IgG1 발현을 유도한다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-4는 미국 뉴저지주 이스트 브런즈윅 소재의 프로스펙-타니 테크노진 리미티드 (카탈로그 번호 CYT-211) 및 미국 매사추세츠주 월섬 소재의 써모피셔 사이언티픽, 인크. (ThermoFisher Scientific, Inc.) (인간 IL-15 재조합 단백질, 카탈로그 번호 김코 CTP0043)를 포함한 다수의 공급업체로부터 상업적으로 입수가 가능하다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-4의 아미노산 서열이 표 2에 제공된다 (서열식별번호: 31).

[0094]

용어 "IL-7" (또한 본원에서 "IL7"로도 지칭됨)은 기질 및 상피 세포로부터, 뿐만 아니라 수지상 세포로부터 수득될 수 있는, 인터류킨 7로 알려져 있는 글리코실화 조직-유래 시토카인을 지칭한다. 문헌 [Fry and Mackall, Blood 2002, 99, 3892-904]. IL-7은 T-세포의 발달을 자극할 수 있다. IL-7은 IL-7 수용체 알파 및 공통 감마 체 수용체로 이루어진 이종이량체인 IL-7 수용체에 결합하며, 이는 일련의 신호에서 흉선에서의 T-세포 발달 및 말초에서의 생존에 중요하다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-4는 미국 뉴저지주 이스트 브런즈윅 소재의 프로스펙-타니 테크노진 리미티드 (카탈로그 번호 CYT-254) 및 미국 매사추세츠주 월섬 소재의 써모피셔 사이언티픽, 인크. (인간 IL-15 재조합 단백질, 카탈로그 번호 김코 PHC0071)를 포함한 다수의 공급업체로부터 상업적으로 입수가 가능하다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-7의 아미노산 서열이 표 2에 제공된다 (서열식별번호: 32).

[0095]

용어 "IL-15" (또한 본원에서 "IL15"로도 지칭됨)는 인터류킨 15로 알려져 있는 T-세포 성장 인자를 지칭하고, 인간 및 포유동물 형태, 그의 보존적 아미노산 치환, 당형태, 바이오시밀러 및 변이체를 포함한 IL-2의 모든 형태를 포함한다. IL-15는 예를 들어 문헌 [Fehniger and Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32]에 기재되며, 그 개시내용이 본원에 참조로 포함된다. IL-15는 IL-2와 β 및 γ 신호전달 수용체 서브유닛을 공유한다. 재조합 인간 IL-15는 12.8 kDa의 분자 질량을 갖는, 114개의 아미노산 (및 N-말단 메티오닌)을 함유하는 단일 비-글리코실화 폴리펩티드 체이다. 재조합 인간 IL-15는 미국 뉴저지주 이스트 브런즈윅 소재의 프로스펙-타니 테크노진 리미티드 (카탈로그 번호 CYT-230-b) 및 미국 매사추세츠주 월섬 소재의 써모피셔 사이언티픽, 인크. (인간 IL-15 재조합 단백질, 카탈로그 번호 34-8159-82)를 포함한 다수의 공급업체로부터 상업적으로 입수가 가능하다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-15의 아미노산 서열이 표 2에 제공된다 (서열식별번호: 33).

[0096]

용어 "IL-21" (또한 본원에서 "IL21"로도 지칭됨)은 인터류킨-21로 알려져 있는 다면발현성 시토카인 단백질을 지칭하고, 인간 및 포유동물 형태, 그의 보존적 아미노산 치환, 당형태, 바이오시밀러 및 변이체를 포함한 IL-21의 모든 형태를 포함한다. IL-21은 예를 들어 문헌 [Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95]에 기재되며, 그 개시내용이 본원에 참조로 포함된다. IL-21은 주로 자연 킬러 T-세포 및 활성화된

인간 CD4+ T-세포에 의해 생산된다. 재조합 인간 IL-21은 15.4 kDa의 분자 질량을 갖는, 132개의 아미노산을 함유하는 단일 비-글리코실화 폴리펩티드 쇄이다. 재조합 인간 IL-21은 미국 뉴저지주 이스트 브런즈윅 소재의 프로스펙-타니 테크노진 리미티드 (카탈로그 번호 CYT-408-b) 및 미국 매사추세츠주 월섬 소재의 씨도퍼서 사이언티픽, 인크. (인간 IL-21 재조합 단백질, 카탈로그 번호 14-8219-80)를 포함한 다수의 공급업체로부터 상업적으로 입수가능하다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-21의 아미노산 서열이 표 2에 제공된다 (서열식별번호: 34).

- [0097] "질환"은 동물이 항상성을 유지할 수 없고, 질환이 호전되지 않는 경우 동물의 건강이 계속해서 악화되는 것인 동물의 건강 상태를 포함한다.
- [0098] 대조적으로, 동물에서 "장애"는 동물이 항상성을 유지할 수 있지만, 동물의 건강 상태가 장애가 부재할 경우보다 덜 바람직한 건강 상태를 포함한다. 치료받지 않아도, 장애는 동물의 건강 상태에서 반드시 추가의 감소를 유발하지는 않는다.
- [0099] 질환 또는 장애는 질환 또는 장애의 증상의 중증도가 감소되거나, 환자가 경험하는 이러한 증상의 빈도가 감소되거나, 또는 둘 다가 감소되는 경우에 "완화"된다.
- [0100] 본 발명의 방법과 관련하여, 용어 "종양" 또는 "암"은 급성 림프구성 암, 급성 골수성 백혈병, 폐포형문근육종, 골암, 뇌암, 유방암, 항문암, 항문관암, 또는 항문직장암, 안암, 간내 담관암, 관절암, 경부암, 담낭암, 또는 흉막암, 비암, 비강암, 또는 중이암, 외음부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성암, 자궁경부암, 신경교종, 호지킨 림프종, 하인두암, 신장암, 후두암, 간암, 폐암, 악성 중피종, 흑색종, 다발성 골수종, 비인두암, 비-호지킨 림프종, 난소암, 복막암, 망막암, 및 장간막암, 인두암, 전립선암, 직장암, 신암, 피부암, 연부조직암, 고환암, 갑상선암, 요관암, 방광암, 및 소화관암 예컨대, 예를 들어, 식도암, 위암, 췌장암, 위암, 소장암, 위장 카르시노이드 종양, 구강암, 결장암, 및 간담도암 중 임의의 것을 포함한 임의의 암일 수 있다. 일부 실시양태에서, 암은 흑색종이다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 흑색종이다.
- [0101] 본원에 사용된 용어 "포유동물"은 설치목의 포유동물, 예컨대 마우스 및 햄스터, 및 토끼목의 포유동물, 예컨대 토끼를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 포유동물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 포유동물은 고양이과 (고양이) 및 개과 (개)를 포함한 식육목으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 포유동물은 소과 (소) 및 돼지과 (돼지)를 포함한 우제목, 또는 말과 (말)를 포함한 기제목으로부터의 것이다. 포유동물이 영장류, 세보이드 또는 시모이드 목 (원숭이) 또는 진원류 목 (인간 및 유인원)인 것이 가장 바람직하다. 일부 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.
- [0102] 본원에 사용된 용어 "퇴행", 뿐만 아니라 그로부터 파생된 단어는 반드시 100% 또는 완전한 퇴행을 암시하지는 않는다. 오히려, 관련 기술분야의 통상의 기술자가 잠재적 이익 또는 치료 효과를 갖는 것으로 인식하는 다양한 정도의 퇴행이 존재한다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 포유동물에서 암의 퇴행의 임의의 수준의 임의의 양을 제공할 수 있다. 게다가, 본 발명의 방법에 의해 제공되는 퇴행은 질환, 예를 들어, 암의 1종 이상의 상태 또는 증상의 퇴행을 포함할 수 있다. 또한, 본원의 목적을 위해, "퇴행"은 질환의 개시를 지연시키는 것, 또는 증상의 개시를 지연시키고/거나 그의 상태의 개시를 지연시키는 것을 포괄할 수 있다.
- [0103] 조성물의 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 조성물이 투여되는 대상체에게 유익한 효과를 제공하기에 충분한 조성물의 그러한 양을 포함한다. 전달 비히클의 "유효량"은 조성물에 효과적으로 결합하거나 그를 전달하기에 충분한 그러한 양을 포함한다.
- [0104] "코딩"은 생물학적 과정에서 뉴클레오티드 (즉, rRNA, tRNA 및 mRNA)의 정의된 서열 또는 아미노산의 정의된 서열을 갖는 다른 중합체 및 거대분자의 합성을 위한 주형으로서의 역할을 하는 폴리뉴클레오티드, 예컨대 유전자, cDNA, 또는 mRNA 내의 뉴클레오티드의 특정 서열의 고유한 특성, 및 그로부터 생성된 생물학적 특성을 포함한다. 따라서, 유전자는, 예를 들어 그러한 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질을 생산하는 경우에 단백질을 코딩한다. 뉴클레오티드 서열이 mRNA 서열과 동일하고 통상적으로 서열 목록에서 제공되는 코딩 가닥, 및 유전자 또는 cDNA의 전사를 위한 주형으로서 사용되는 비-코딩 가닥 둘 다는 그러한 유전자 또는 cDNA의 단백질 또는 다른 산물을 코딩하는 것으로 지칭될 수 있다.
- [0105] 본원에 사용된 "내인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터의, 또는 그 내부에서 생산된 임의의 물질을 포함한다.
- [0106] 본원에 사용된 용어 "외인성"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템의 외부로부터 도입되거나 외부에서 생산된 임

의의 물질을 포함한다.

- [0107] "발현 카세트"는 발현 카세트의 프로모터에 작동가능하게 연결된 관심 유전자/코딩 서열의 발현을 지시할 수 있는 임의의 핵산 구축물을 포함한다. 이러한 카세트는 표적-세포 내로 발현 카세트를 전달하기 위해 "벡터", "벡터 구축물", "발현 벡터" 또는 "유전자 전달 벡터" 내로 구축될 수 있다. 따라서, 용어는 클로닝 및 발현 비히클, 뿐만 아니라 바이러스 벡터를 포함한다.
- [0108] 본원에 사용된 용어 "단편"은, 핵산 또는 폴리펩티드에 적용되는 경우에, 더 큰 핵산 또는 폴리펩티드의 하위서열을 포함한다. 핵산의 "단편"은 길이가 적어도 약 15개 뉴클레오타이드; 예를 들어, 적어도 약 50개 뉴클레오타이드 내지 약 100개 뉴클레오타이드; 적어도 약 100개 내지 약 500개 뉴클레오타이드, 적어도 약 500개 내지 약 1000개 뉴클레오타이드, 적어도 약 1000개 뉴클레오타이드 내지 약 1500개 뉴클레오타이드; 또는 약 1500개 뉴클레오타이드 내지 약 2500개 뉴클레오타이드; 또는 약 2500개 뉴클레오타이드 (및 그 사이의 임의의 정수 값)일 수 있다. 폴리펩티드의 "단편"은 길이가 적어도 약 15개 아미노산; 예를 들어, 적어도 약 50개 아미노산 내지 약 100개 아미노산; 적어도 약 100개 내지 약 500개 아미노산, 적어도 약 500개 내지 약 1000개 아미노산, 적어도 약 1000개 아미노산 내지 약 1500개 아미노산; 또는 약 1500개 아미노산 내지 약 2500개 아미노산; 또는 약 2500개 아미노산 (및 그 사이의 임의의 정수 값)일 수 있다.
- [0109] 본원에 사용된 용어 "유전자" 및 "재조합 유전자"는 폴리펩티드를 코딩하는 오픈 리딩 프레임에 포함하는 핵산 분자를 포함한다. 이러한 천연 대립유전자 변이는 전형적으로 주어진 유전자의 뉴클레오타이드 서열에서 1-5% 변이도를 생성할 수 있다. 대안적 대립유전자는 다수의 상이한 개체에서 관심 유전자를 서열분석함으로써 확인될 수 있다. 이는 다양한 개체에서 동일한 유전자좌를 확인하기 위한 혼성화 프로브를 사용함으로써 용이하게 수행될 수 있다. 천연 대립유전자 변이의 결과이며 기능적 활성을 변경시키지 않는 임의의 및 모든 이러한 뉴클레오타이드 변이 및 그에 따른 아미노산 다형성 또는 변이가 본 발명의 범주 내에 있는 것으로 의도된다.
- [0110] 본원에 사용된 "상동"은 2개의 중합체 분자 사이의, 예를 들어 2개의 핵산 분자 사이의, 예를 들어 2개의 DNA 분자 또는 2개의 RNA 분자 사이의, 또는 2개의 폴리펩티드 분자 사이의 서브유닛 서열 유사성을 포함한다. 2개의 분자 둘 다에서의 서브유닛 위치가 동일한 단량체 서브유닛에 의해 점유되는 경우, 예를 들어 2개의 DNA 분자 각각에서의 위치가 아데닌에 의해 점유되는 경우에, 이들은 그 위치에서 상동이다. 2개의 서열 사이의 상동성은 매칭되는 또는 상동인 위치의 수의 직접적 함수이며, 예를 들어 2개의 화합물 서열에서 위치의 절반 (예를 들어, 중합체 10개의 서브유닛 길이에서 5개의 위치)이 상동인 경우에, 2개의 서열은 50% 상동이고, 위치의 90%, 예를 들어 10개 중 9개가 매칭되거나 상동인 경우에, 2개의 서열은 90% 상동성을 공유한다. 예로서, DNA 서열 5'-ATTGCC-3' 및 5'-TATGCC-3'는 50% 상동성을 공유한다.
- [0111] "유도성" 발현은 유전자 산물이 세포 내의 신호의 존재에 반응하는 살아있는 세포에서 생산되는 상태를 포함한다.
- [0112] 본원에 사용된 "지침서"는 본 개시내용에 따른 키트, 예를 들어, 본원에 열거된 다양한 질환 또는 장애를 완화시키기 위한 키트에 공개, 기록, 다이어그램, 또는 본 개시내용의 화합물, 조성물, 벡터 또는 전달 시스템의 유용성 및/또는 용도를 알리는데 사용될 수 있는 임의의 다른 발현 매체를 포함한다. 임의로, 또는 대안적으로, 지침서는 포유동물의 세포 또는 조직에서의 질환 또는 장애를 완화시키는 1종 이상의 방법을 기재할 수 있다. 본 발명의 키트의 지침서는 예를 들어 본 발명의 확인된 화합물, 조성물, 벡터 또는 전달 시스템을 함유하는 용기에 부착되거나, 또는 확인된 화합물, 조성물, 벡터 또는 전달 시스템을 함유하는 용기와 함께 포장될 수 있다. 대안적으로, 지침서는 수용자가 지침서 및 화합물을 협동적으로 사용하도록 용기와 별도로 포장될 수 있다.
- [0113] 용어 "핵산"은 단일-가닥, 이중-가닥, 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드를 포함한 임의의 형태의 1종 초과 뉴클레오타이드를 갖는 RNA 또는 DNA 분자를 포함한다. 용어 "뉴클레오타이드 서열"은 핵산의 단일-가닥 형태의 올리고뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 내의 뉴클레오타이드의 정렬을 포함한다.
- [0114] "핵산 구축물"이란 자연에서 함께 발견되는 1개 이상의 기능적 단위를 포함하도록 구축된 핵산 서열을 의미한다. 예는 원형, 선형, 이중-가닥, 염색체의 DNA 분자 (플라스미드), 코스미드 (람다 파지로부터의 COS 서열을 함유하는 플라스미드), 비-천연 핵산 서열을 포함한 바이러스 게놈 등을 포함한다.
- [0115] 본원에 사용된 용어 "작동가능하게 연결된"은 제2 폴리뉴클레오타이드와 기능적 관계에 있는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 2개의 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나가 그가 특징으로 하는 생리학적 효과를 다른 것에 대해 발휘할 수 있도록 하는 방식으로 핵산 모이어티 내에 배열되어 있는 2개의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 단일-가닥

또는 이중-가닥 핵산 모이어티를 포함한다. 예로서, 유전자의 코딩 영역에 작동가능하게 연결된 프로모터는 코딩 영역의 전사를 촉진할 수 있다. 작동가능하게 연결된 것을 나타내는 경우에 명시된 순서는 중요하지 않다. 예를 들어, 어구 "프로모터는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결됨" 및 "뉴클레오티드 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결됨"은 본원에서 상호교환가능하게 사용되며, 동등한 것으로 간주된다. 일부 경우에, 목적하는 단백질을 코딩하는 핵산이 프로모터/조절 서열을 추가로 포함하는 경우에, 프로모터/조절 서열은 그것이 세포 내의 목적하는 단백질의 발현을 구동하도록 목적하는 단백질 코딩 서열의 5' 말단에 위치한다.

[0116] 본원에서 상호교환가능하게 사용된 용어 "올리고뉴클레오티드", "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산 분자"는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드인 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태를 지칭한다. 따라서, 이러한 용어는 단일-, 이중- 또는 다중-가닥 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 퓨린 및 피리미딘 염기 또는 다른 천연의, 화학적으로 또는 생화학적으로 변형된 비천연의, 또는 유도체화된 뉴클레오티드 염기를 포함하는 중합체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 폴리뉴클레오티드의 백본은 (통상적으로 RNA 또는 DNA에서 발견될 수 있는) 당 및 포스페이트 기, 또는 변형된 또는 치환된 당 또는 포스페이트 기를 포함할 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오티드의 백본은 합성 서브유닛 예컨대 포스포라미데이트 및/또는 포스포포티오에이트의 중합체를 포함할 수 있고, 따라서 올리고데옥시뉴클레오시드 포스포라미데이트 또는 혼합형 포스포라미데이트-포스포디에스테르 올리고머일 수 있다. 문헌 [Peyrottes et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24:1841-1848; Chaturvedi et al. (1996) Nucl. Acids Res. 24:2318-2323]. 폴리뉴클레오티드는 1종 이상의 L-뉴클레오시드를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있고, 비-뉴클레오티드 성분에 의해 개재될 수 있다. 존재하는 경우, 중합체의 조립 전 또는 후에 뉴클레오티드 구조에 대한 변형이 부여될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체, 우라실, 다른 당, 및 연결기 예컨대 플루오로리보스 및 티오에이트, 및 뉴클레오티드 분지를 포함할 수 있다. 뉴클레오티드의 서열은 비-뉴클레오티드 성분에 의해 개재될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합 후에, 예컨대 표지 성분과의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다. 이러한 정의에 포함되는 변형의 다른 유형은 캡, 천연 발생 뉴클레오티드 중 1종 이상의 유사체로의 치환, 및 폴리뉴클레오티드를 단백질, 금속 이온, 표지 성분, 다른 폴리뉴클레오티드 또는 고체 지지체에 부착하기 위한 수단의 도입이다. 폴리뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드가 일련의 문자 (대문자 또는 소문자), 예컨대 "ATGCTG"에 의해 나타내어지는 경우에는, 달리 나타내지 않는 한 또는 문맥으로부터 명백하지 않는 한, 뉴클레오티드가 좌측에서 우측으로 5'→3' 순서이며 "A"는 데옥시아데노신을 나타내고, "C"는 데옥시시티딘을 나타내고, "G"는 데옥시구아노신을 나타내고, "T"는 티미딘을 나타내고, "I"는 데옥시이노신을 나타내고, "U"는 우리딘을 나타내는 것으로 이해될 것이다. 달리 나타내지 않는 한, 용어 및 원자 넘버링 규정은 문헌 [Strachan and Read, Human Molecular Genetics 2 (Wiley-Liss, New York, 1999)]에 개시된 것에 따를 것이다. 폴리뉴클레오티드는 단일, 이중, 또는 트리플렉스, 선형 또는 원형일 수 있고, 임의의 길이일 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 논의함에 있어서, 특정한 폴리뉴클레오티드의 서열 또는 구조는 서열을 5'에서 3' 방향으로 제공하는 규정에 따라 본원에 기재될 수 있다.

[0117] 용어 "재조합"은, 폴리뉴클레오티드에 적용되는 경우에 폴리뉴클레오티드가 클로닝, 제한 또는 라이게이션 단계의 다양한 조합, 및 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오티드와 구별되고/거나 그와 상이한 구축물을 생성하는 다른 절차의 생성물임을 의미한다. 용어는 각각 원래 폴리뉴클레오티드 구축물의 복제물 및 원래 바이러스 구축물의 자손을 포함한다.

[0118] 용어 "프로그램화된 사멸 1 리간드 1 (PD-L1) 결합 단백질"은 세포의 표면 상에 발현된 프로그램화된 사멸 1 리간드 1 (PD-L1) 단백질 (일명 CD274 또는 B7-H1)에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리펩티드 (예를 들어, 융합 단백질, scFV, 맥시바디, 항체 등)를 지칭한다.

[0119] 본원에서 상호교환가능하게 사용된 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 중합체 형태를 지칭하며, 이는 코딩된 및 비-코딩된 아미노산, 화학적으로 또는 생화학적으로 변형된 또는 유도체화된 아미노산, 및 변형된 펩티드 백본을 갖는 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 용어는 글리코실화, 포르밀화, 고리화, 아세틸화, 인산화 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 방식으로 변형되거나 유도체화된 폴리펩티드 쇄를 포함한다. 용어는 자연-발생 펩티드, 합성 펩티드, 및 1종 이상의 아미노산 유사체를 포함하는 펩티드를 포함한다. 용어는 이중 아미노산 서열을 갖는 융합 단백질, 이중 및 상동 리더 서열을 갖고 N-말단 메티오닌 잔기가 존재하거나 존재하지 않는 융합체; 면역학적으로 태그부착된 단백질 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 융합 단백질을 포함한다.

[0120] 용어 "종양-연관 항원"은 관련 기술분야에서 널리 이해되는 용어이며, 동일한 세포 유형의 비-암성 세포에 비해

종양 세포에서 차별적으로 과다-발현되는 분자를 지칭한다. 본원에 사용된 "종양-연관 항원"은 세포 표면 상에 발현될 수 있는 완전한 종양-연관 항원뿐만 아니라 T-세포에 의해 인식되는 그의 에피토프-포함 부분 (단편)을 포함한다. 종양-연관 항원 (TAA)은 자연에서 발견되는 것일 수 있거나, 또는 자연에서 발견되는 TAA의 합성 버전일 수 있거나, 또는 자연-발생 TAA의 변이체, 예를 들어, 증진된 면역원성 특성을 갖는 변이체일 수 있다. TAA는 자연 발생 과다-발현된 단백질, 또는 오직 종양 세포 또는 종양 내의 다른 형질전환된 세포에서만 발현되는 돌연변이된 단백질일 수 있다.

[0121] 본원에 사용된 용어 "프로모터"는 전사될 핵산 서열 예컨대 목적하는 분자를 코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 DNA 서열을 포함한다. 프로모터는 일반적으로 전사될 핵산 서열의 상류에 위치하고, RNA 폴리머라제 및 다른 전사 인자에 의한 특이적 결합 부위를 제공한다.

[0122] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호 교환가능하게 사용된다. "폴리뉴클레오티드 서열"에 의해 코딩된 "폴리펩티드", "단백질" 및 "펩티드"는 자연 발생 단백질에서와 같이 전장 천연 서열을 포함할 뿐만 아니라, 기능적 서열, 변형된 형태 또는 서열 변이체가 어느 정도의 천연 전장 단백질의 기능을 보유하는 한 기능적 서열, 변형된 형태 또는 서열 변이체를 포함한다. 본원에 기재된 바와 같은 방법 및 용도에서, 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 코딩된 이러한 폴리펩티드, 단백질 및 펩티드는 결합있는 내인성 단백질, 또는 발현이 불충분하거나 치료된 포유동물에서 결핍되는 단백질과 동일할 수 있으나 그러하도록 요구되지는 않는다. 용어는 또한 변형된 아미노산 중합체; 예를 들어, 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 인산화, 메틸화, 카르복실화, 탈아미드화, 아세틸화, 또는 표지 성분과의 접합을 포괄한다. 포유동물 대상체에게 유전자 산물을 전달하는 것과 관련하여 논의되는 경우에 폴리펩티드 예컨대 항혈관신생 폴리펩티드, 신경보호 폴리펩티드 등, 및 그에 대한 조성물은 무손상 단백질의 목적하는 생화학적 기능을 보유하는 각각의 무손상 폴리펩티드, 또는 그의 임의의 단편 또는 유전자 조작된 유도체를 지칭한다.

[0123] "재조합 폴리펩티드"는 재조합 폴리뉴클레오티드의 발현 시에 생산되는 것을 포함한다.

[0124] 예를 들어 항체/항원 결합 영역과 관련하여 본원에 사용된 용어 "특이적으로 결합하다"는 특이적 항원을 인식하지만 샘플 내의 다른 분자를 실질적으로 인식하거나 그에 결합하지는 않는 항체/항원 결합 영역을 포함한다. 예를 들어, 하나의 종으로부터의 항원에 특이적으로 결합하는 항체 (예를 들어, scFV)는 또한 하나 이상의 다른 종으로부터의 그러한 항원에 결합할 수 있다. 그러나, 이러한 교차-종 반응성 그 자체는 특이적이라는 항체의 분류를 변경시키지 않는다. 또 다른 예로서, 항원에 특이적으로 결합하는 항체는 또한 항원의 상이한 대립유전자 형태에 결합할 수 있다. 그러나, 이러한 교차 반응성 그 자체는 특이적이라는 항체의 분류를 변경시키지 않는다.

[0125] 일부 경우에, 용어 "특이적 결합" 또는 "특이적으로 결합하는"은 항체, 단백질 또는 펩티드와 제2 화학적 종의 상호작용과 관련하여 상호작용이 화학적 종에 있는 특정한 구조 (예를 들어, 항원 결정기 또는 에피토프)의 존재에 의존한다는 것을 의미하는데 사용될 수 있으며; 예를 들어 항체는 일반적으로 단백질이 아닌 특정 단백질 구조를 인식하고 그에 결합한다. 항체가 에피토프 "A"에 특이적인 경우, 표지된 "A" 및 항체를 함유하는 반응물 중 에피토프 A를 함유하는 분자 (또는 유리 형태의 미표지 A)의 존재는 항체에 결합된 표지된 A의 양을 감소시킬 것이다.

[0126] 본원에 사용된 용어 "합성 항체"는 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성된 항체, 예컨대, 예를 들어, 박테리오파지에 의해 발현된 항체를 포함한다. 용어는 또한 항체를 코딩하는 DNA 분자의 합성에 의해 생성된 항체를 의미하는 것으로 해석되어야 하며, DNA 분자는 항체 단백질, 또는 항체를 특정하는 아미노산 서열을 발현하고, 여기서 DNA 또는 아미노산 서열은 관련 기술분야에서 이용가능하고 널리 공지된 합성 DNA 또는 아미노산 서열 기술을 사용하여 수득되었다.

[0127] 본원에 사용된 용어 "변이체"는 각각 참조 핵산 서열 또는 펩티드 서열과 서열이 상이하지만 참조 분자의 본질적인 생물학적 특성을 보유하는 핵산 서열 또는 펩티드 서열을 포함한다. 핵산 변이체의 서열에서의 변화는 참조 핵산에 의해 코딩된 펩티드의 아미노산 서열을 변경시키지 않을 수 있거나, 또는 아미노산 치환, 부가, 결실, 융합 및 말단절단을 발생시킬 수 있다. 펩티드 변이체의 서열에서의 변화가 전형적으로 제한되거나 보존되어, 참조 펩티드 및 변이체의 서열이 전체적으로 매우 유사하고 여러 영역에서 동일하다. 변이체 및 참조 펩티드는 임의의 조합의 1개 이상의 치환, 부가, 결실에 의해 아미노산 서열이 상이할 수 있다. 핵산 또는 펩티드의 변이체는 대립유전자 변이체와 같이 자연 발생적일 수 있거나, 또는 자연 발생적인 것으로 알려지지 않은 변이체일 수 있다. 핵산 및 펩티드의 비-자연 발생 변이체는 돌연변이 유발 기술에 의해 또는 직접 합성에 의

해 제조될 수 있다.

[0128] "치환"은 각각 폴리펩티드의 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열과 비교하여, 1개 이상의 아미노산 또는 뉴클레오티드의 상이한 아미노산 또는 뉴클레오티드에 의한 대체로부터 발생한다. 치환이 보존적인 경우, 폴리펩티드 내로 치환된 아미노산은 그것이 치환하는 아미노산과 유사한 구조적 또는 화학적 특성 (예를 들어, 전하, 극성, 소수성 등)을 갖는다. 자연 발생 아미노산의 보존적 치환 ("보존적 아미노산 치환")은 통상적으로 제1 아미노산의, 제1 아미노산과 동일한 그룹으로부터의 제2 아미노산으로의 치환을 발생시키며, 여기서 아미노산 그룹의 예는 하기와 같다: (1) 산성 (음으로 하전된) 아미노산 예컨대 아스파르트산 및 글루탐산; (2) 염기성 (양으로 하전된) 아미노산 예컨대 아르기닌, 히스티딘 및 리신; (3) 중성 극성 아미노산 예컨대 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민; 및 (4) 중성 비-극성 아미노산 예컨대 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌. 일부 실시양태에서, 폴리펩티드 변이체는 치환된 아미노산이 구조적 및/또는 화학적 특성에서 상이한 "비-보존적" 변화를 가질 수 있다.

[0129] "결실"은 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열에서, 1개 이상의 아미노산 또는 뉴클레오티드 잔기가 각각 자연 발생 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열과 비교하여 부재하는 변화로서 정의된다. 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열과 관련하여, 결실은 변형되는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열의 길이를 고려하여 2, 5, 10, 최대 20, 최대 30, 또는 최대 50개 또는 그 초과 아미노산 또는 뉴클레오티드 잔기의 결실을 수반할 수 있다.

[0130] "삽입" 또는 "부가"는 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열에서, 자연 발생 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 아미노산 서열 또는 뉴클레오티드 서열과 비교하여 각각 1개 이상의 아미노산 또는 뉴클레오티드 잔기의 추가를 생성하는 그러한 변화이다. "삽입"은 일반적으로 폴리펩티드의 아미노산 서열 내의 1개 이상의 아미노산 잔기 (또는 폴리뉴클레오티드 내의 뉴클레오티드 잔기)의 추가를 지칭하는 한편, "부가"는 삽입될 수 있거나 또는 폴리뉴클레오티드의 N- 또는 C-말단에서 추가된 아미노산 잔기 (또는 폴리뉴클레오티드의 5' 또는 3' 말단에서 추가된 뉴클레오티드 잔기)를 지칭할 수 있다. 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열과 관련하여, 삽입 또는 부가는 최대 10, 최대 20, 최대 30, 또는 최대 50개 또는 그 초과 아미노산 (또는 뉴클레오티드 잔기)으로 이루어질 수 있다.

[0131] "단리된" 플라스미드, 핵산, 벡터, 또는 다른 물질은 물질 또는 유사한 물질이 자연 발생하거나 또는 그것이 처음에 제조된 때에 존재하는 다른 성분 중 적어도 일부가 결여된 물질을 제조하는 것을 지칭한다. 따라서, 예를 들어, 단리된 물질은 그것을 공급원 혼합물로부터 풍부화시키기 위한 정제 기술을 사용함으로써 제조될 수 있다. 풍부화는 절대적 기준, 예컨대 용액 부피당 중량으로 측정될 수 있거나, 또는 공급원 혼합물에 존재하는 제2 잠재적 간섭 물질과 관련하여 측정될 수 있다. 본 발명의 실시양태의 풍부화를 증가시킴으로써 점점 더 단리된다. 단리된 플라스미드, 핵산, 벡터, 또는 다른 물질은 일부 실시양태에서 예를 들어 약 80% 내지 약 90% 순수하게, 적어도 약 90% 순수하게, 적어도 약 95% 순수하게, 적어도 약 98% 순수하게, 또는 적어도 약 99%, 또는 그 초과로 순수하게 단리된다.

[0132] "벡터"는 유전자 서열을 표적-세포에 전달할 수 있다. 전형적으로, "벡터 구축물", "발현 벡터" 및 "유전자 전달 벡터"는 관심 유전자의 발현을 지시할 수 있고 유전자 서열을 표적-세포로 전달할 수 있는 임의의 핵산 구축물을 의미하며, 이는 벡터의 전부 또는 일 부분의 게놈 통합, 또는 염색체의 요소로서의 벡터의 일시적 또는 유전적 유지에 의해 달성될 수 있다. 따라서, 용어는 클로닝, 및 발현 비히클, 뿐만 아니라 통합 벡터를 포함한다.

[0133] 본원에 사용된 용어 "조절 요소"는 핵산 서열의 발현의 일부 측면을 제어하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 조절 요소의 예는 예시적으로 핵산 서열의 복제, 전사 및/또는 전사후 프로세싱에 기여하는 인핸서, 내부 리보솜 진입 부위 (IRES), 인트론, 복제 기점, 폴리아데닐화 신호 (pA), 프로모터, 인핸서, 전사 종결 서열 및 상류 조절 도메인을 포함한다. 경우에 따라, 조절 요소는 또한 시스-조절 DNA 요소뿐만 아니라 전위가능 요소 (TE)를 포함할 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상용 실험을 사용하여 발현 구축물 내의 이들 및 다른 조절 요소를 선택 및 사용할 수 있다. 발현 구축물은 유전자 재조합 접근법을 사용하거나 또는 널리 공지된 방법론을 합성적으로 사용하여 생성될 수 있다.

[0134] "제어 요소" 또는 "제어 서열"은 폴리뉴클레오티드의 복제, 증폭, 전사, 스플라이싱, 번역 또는 분해를 포함한 폴리뉴클레오티드의 기능적 조절에 기여하는 분자의 상호작용에 수반되는 뉴클레오티드 서열이다. 조절은 과정의 빈도, 속도 또는 특이성에 영향을 미칠 수 있고, 자연적으로 증진 또는 억제될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 제어 요소는 예를 들어, 전사 조절 서열 예컨대 프로모터 및 인핸서를 포함한다. 프로모터는 특정 조건

하에 RNA 폴리머라제에 결합하여 통상적으로 프로모터로부터 (3' 방향으로) 하류에 위치하는 코딩 영역의 전사를 개시할 수 있는 DNA 영역이다.

- [0135] "작동적으로 연결된" 또는 "작동가능하게 연결된"은 유전적 요소의 병렬배치를 지칭하며, 여기서 요소는 그들이 예상된 방식으로 작동할 수 있게 해주는 관계에 있다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사를 개시하는데 도움을 주는 경우, 프로모터는 코딩 영역과 작동적으로 연결된다. 이러한 기능적 관계가 유지되는 한 프로모터와 코딩 영역 사이에 개재 잔기가 존재할 수 있다.
- [0136] 용어 "암", "신생물", "종양" 및 "암종"은 세포 증식 제어의 상당한 손실을 특징으로 하는 비정상적인 성장 표현형을 나타내게 하는 비교적 자율적인 성장을 나타내는 세포를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 암성 세포는 양성 또는 악성일 수 있다. 다양한 암의 예는 유방암, 전립선암, 난소암, 자궁경부암, 피부암, 췌장암, 결장직장암, 신암, 간암, 뇌암, 림프종, 백혈병, 폐암 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0137] 어구 "동종 종양"은 그것이 발생한 것과 동일한 유형의 조직으로 구성된 임의의 종양을 의미한다. 추가적으로, 종양은 상기 종양으로부터 유래된 TIL에 대해 동종일 수 있다. 예를 들어, 흑색종 종양은 흑색종 종양으로부터 유래된 TIL에 대해 동종일 수 있고/거나 흑색종 종양으로부터 유래된 TIL은 그것이 유래된 동종 흑색종 종양을 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 동종 종양으로부터 유래된 TIL은 동종 종양을 치료하는데 사용될 수 있다.
- [0138] "개체" 또는 "숙주" 또는 "대상체" 또는 "환자"는 진단, 치료 또는 요법이 요구되는 임의의 포유동물 대상체, 특히 인간을 의미한다. 다른 대상체는 소, 개, 고양이, 기니 피그, 토끼, 래트, 마우스, 말 등을 포함할 수 있다.
- [0139] 본원에 사용된 용어 "단리된"은 단리된 화합물과 관련하여 사용되는 경우에, 화합물이 자연 발생하는 환경과 상이한 환경에 있는 관심 화합물을 지칭한다. "단리된"은 관심 화합물이 실질적으로 풍부한 샘플 및/또는 관심 화합물이 부분적으로 또는 실질적으로 정제된 샘플 내에 있는 화합물을 포함하는 것으로 의도된다.
- [0140] 본원에 사용된 용어 "실질적으로 순수한"은 그의 자연 환경으로부터 분리되고 자연적으로 연관되는 다른 성분은 적어도 60% 없거나, 75% 없거나, 또는 90% 없는 화합물을 지칭한다.
- [0141] 핵산 및 아미노산 "서열 동일성"을 결정하기 위한 기술은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 전형적으로, 이러한 기술은 유전자에 대한 mRNA의 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 것 및/또는 이에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 결정하는 것, 및 이들 서열을 제2 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열과 비교하는 것을 포함한다. 일반적으로, "동일성"은 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열의 정확한 뉴클레오타이드-대-뉴클레오타이드 또는 아미노산-대-아미노산 상응성을 각각 지칭한다. 2개 이상의 서열 (폴리뉴클레오타이드 또는 아미노산)은 이들의 "퍼센트 동일성"을 결정함으로써 비교될 수 있다. 2개의 서열 (핵산 또는 아미노산 서열)의 퍼센트 동일성은 정렬된 2개의 서열 사이의 정확한 매치의 수를 더 짧은 서열의 길이로 나누고 100을 곱한 것이다. 핵산 서열에 대한 대략적인 정렬은 문헌 [Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics*, 2:482-489 (1981)]의 국부 상동성 알고리즘에 의해 제공된다. 이 알고리즘은 문헌 [Dayhoff, *Atlas of Protein Sequences and Structure*, M.O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA]에 의해 개발되고 문헌 [Gribskov, *Nucl. Acids Res.* 14(6):6745-6763 (1986)]에 의해 정규화된 점수화 매트릭스를 사용함으로써 아미노산 서열에 적용될 수 있다.
- [0142] 서열의 퍼센트 동일성을 결정하기 위한 이러한 알고리즘 구현의 예는 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group) (위스콘신주 매디슨)에 의해 "최적피트(BestFit)" 유틸리티 애플리케이션에서 제공된다. 이 방법의 디폴트 파라미터가 위스콘신 서열 분석 패키지 프로그램 매뉴얼, 버전 8 (1995) (제네틱스 컴퓨터 그룹 (위스콘신주 매디슨)으로부터 이용가능)에 기재되어 있다. 본 발명과 관련하여 퍼센트 동일성을 확립하는 또 다른 방법은 에든버러 대학교에 저작권이 있고, 존 에프. 콜린스(John F. Collins) 및 셰인 에스. 스토크(Shane S. Sturrock)이 개발하였으며, 인텔리제네틱스, 인크.(IntelliGenetics, Inc.) (캘리포니아주 마운틴 뷰)가 배포하는 MPSRCH 프로그램 패키지를 사용하는 것이다. 이러한 패키지 스위트로부터, 스미스-워터맨 알고리즘을 사용할 수 있고, 이때 디폴트 파라미터들이 점수화 표에 사용된다 (예를 들어, 갭 오픈 페널티 12, 갭 확장 페널티 1, 및 갭 6). 생성된 데이터로부터, "매치" 값이 "서열 동일성"을 반영한다. 서열 사이의 퍼센트 동일성 또는 유사성을 계산하기 위한 다른 적합한 프로그램이 관련 분야에 일반적으로 공지되어 있고, 예를 들어, 또 다른 정렬 프로그램은 디폴트 파라미터와 함께 사용되는 BLAST이다. 예를 들어, 하기 디폴트 파라미터를 사용하여 BLASTN 및 BLASTP가 사용될 수 있다: 유전자 코드 = 표준; 필터 = 없음; 가닥 = 이중; 컷오프 = 60; 예상 =

10; 매트릭스 = BLOSUM62; 설명 = 50개의 서열; 분류 = 하이 스코어(HIGH SCORE); 데이터베이스 = 비-중복, 진뱅크(GenBank) + EMBL + DDBJ + PDB + 진뱅크 CDS 번역 + 스위스 단백질 + Spupdate + PIR. 이들 프로그램의 세부사항은 blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi 앞에 http://를 입력하여 위치되는 인터넷 주소에서 찾아볼 수 있다.

[0143] 대안적으로, 폴리뉴클레오티드와 관련하여, 상동성 영역들 사이에 안정적인 듀플렉스를 형성하는 조건 하에 폴리뉴클레오티드를 혼성화시킨 후, 단일-가닥-특이적 뉴클레아제(들)에 의해 소화시키고, 소화된 단편의 크기를 결정함으로써 상동성이 결정될 수 있다.

[0144] 2개의 DNA, 또는 2개의 폴리펩티드 서열은 서열이 상기 방법을 사용하여 결정될 시, 분자의 정의된 길이 대비 적어도 약 80%-85%, 적어도 약 85%-90%, 적어도 약 90%-95%, 또는 적어도 약 95%-98% 서열 동일성을 나타내는 경우에 서로 "실질적으로 상동"이다. 본원에 사용된 실질적으로 상동은 또한 명시된 DNA 또는 폴리펩티드 서열에 대한 완전한 동일성을 나타내는 서열을 지칭한다. 실질적으로 상동인 DNA 서열은, 그 특정한 시스템에 대해 정의될 시, 예를 들어 엄격한 조건 하에 서던 혼성화 실험에서 확인될 수 있다. 적절한 혼성화 조건을 정의하는 것은 관련 기술분야의 기술 내에 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook and Russel, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Third Edition, (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY]을 참조한다.

[0145] 제1 폴리뉴클레오티드는 그것이 제2 폴리뉴클레오티드, 그의 cDNA, 그의 상보체의 영역과 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는 경우에, 또는 그것이 상기 기재된 바와 같이 서열 동일성을 나타내는 경우에 제2 폴리뉴클레오티드"로부터 유래된다". 이 용어는 폴리뉴클레오티드가 언급된 기원으로부터 수득되어야만 하는 것을 필요로 하거나 그를 암시하는 것으로 의도되지는 않으며 (그것이 포괄되기는 함), 오히려 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0146] 제1 폴리펩티드 (또는 펩티드)는 그것이 (i) 제2 폴리뉴클레오티드로부터 유래된 제1 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩되거나, 또는 (ii) 상기 기재된 바와 같이 제2 폴리펩티드에 대해 서열 동일성을 나타내는 경우에 제2 폴리펩티드 (또는 펩티드)"로부터 유래된다". 이 용어는 폴리펩티드가 언급된 기원으로부터 수득되어야만 하는 것을 필요로 하거나 그를 암시하는 것으로 의도되지는 않으며 (그것이 포괄되기는 함), 오히려 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0147] 본원에 사용된 용어 "조합하여"는, 예를 들어, 제1 요법이 제2 요법의 전체 투여 과정 동안 투여되는 경우; 제1 요법이 제2 요법의 투여와 중첩되는 시간 기간 동안 투여되는 경우, 예를 들어, 제1 요법의 투여가 제2 요법의 투여 전에 시작되고, 제1 요법의 투여가 제2 요법의 투여가 종료되기 전에 종료되는 경우; 제2 요법의 투여가 제1 요법의 투여 전에 시작되고, 제2 요법의 투여가 제1 요법의 투여가 종료되기 전에 종료되는 경우; 제1 요법의 투여가 제2 요법의 투여가 시작되기 전에 시작되고, 제2 요법의 투여가 제1 요법의 투여가 종료되기 전에 종료되는 경우; 제2 요법의 투여가 제1 요법의 투여가 시작되기 전에 시작되고, 제1 요법의 투여가 제2 요법의 투여가 종료되기 전에 종료되는 경우의 사용을 지칭한다. 이에 따라, "조합하여"는 2종 이상의 요법의 투여를 수반하는 요법을 지칭할 수 있다. 본원에 사용된 "조합하여"는 또한 동일하거나 상이한 제제로, 동일하거나 상이한 경로에 의해, 및 동일하거나 상이한 투여 형태 유형으로 투여될 수 있는 2종 이상의 요법의 투여를 지칭한다.

[0148] 용어 "치료", "치료하는", "치료하다" 등은 목적하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 지칭한다. 효과는 질환 또는 그의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방하는 관점에서 예방적일 수 있고/거나, 질환 및/또는 질환에 기인할 수 있는 유해 효과에 대한 부분적 또는 완전한 치유의 관점에서 치료적일 수 있다. 본원에 사용된 "치료"는 포유동물, 특히 인간에서의 질환의 임의의 치료를 포함하고, (a) 질환에 대한 소인이 있지만, 아직 그것을 갖는 것으로 진단되지는 않은 대상체에서 질환 발생을 예방하는 것; (b) 질환을 억제하는 것, 즉, 그의 발생 또는 진행을 정지시키는 것; 및 (c) 질환을 완화시키는 것, 즉, 질환의 퇴행을 유발하는 것 및/또는 1종 이상의 질환 증상을 완화시키는 것을 포함한다. "치료"는 또한 질환 또는 상태의 부재 하에도 약리학적 효과를 제공하기 위한 작용제의 전달을 포괄하는 것으로 의도된다. 예를 들어, "치료"는 면역 반응을 도출하거나 또는 예를 들어 백신의 경우에, 질환 상태의 부재 하에 면역을 부여할 수 있는 조성물의 전달을 포괄한다.

[0149] 본원에 언급된 임의의 및 모든 공개 (특허 및 특허 출원 공개 포함)는 그와 관련하여 공개에서 인용된 방법 및/또는 물질을 개시하고 기재하기 위해 본원에 참조로 포함된다.

[0150] 본원에 논의된 공개는 본 출원의 출원일 이전의 그의 개시내용에 대해 제공된다. 추가로, 제공되는 공개일은

실제 공개일과는 상이할 수 있으며, 이는 독립적으로 확인되어야 할 필요가 있을 수 있다. 이러한 공개가 본 개시내용의 명시적 또는 암시적 정의 또는 개시내용과 상충되는 정의를 제시할 수 있는 경우에, 본 개시내용의 정의 또는 개시내용이 우선한다.

[0151] 본 개시내용을 읽을 때 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 바와 같이, 본원에 기재되고 예시된 각각의 개별 실시양태는 본 발명의 범주 또는 취지에서 벗어나지 않으면서 임의의 다른 여러 실시양태의 특색과 용이하게 분리되거나 또는 조합될 수 있는 구별되는 구성성분 및 특색을 갖는다. 열거된 임의의 방법은 열거된 사건의 순서로 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서로 수행될 수 있다.

[0152] 조성물

[0153] PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질 (예를 들어, 항체)

[0154] PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질 (예를 들어, 항체), 단백질을 코딩하는 핵산, 및 대상 단백질 및/또는 대상 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 세포가 제공된다. 본 개시내용 전반에 걸쳐, 본원에 기재된 바와 같은 항원 결합 영역을 포함하는 "PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질"은 또한 "PD-L1 결합 단백질"로 지칭된다.

[0155] 2종의 새로운 재조합 항체가 제공되며 (본원에서 "38A1" 및 "19H9"로 지칭됨), 둘 다 인간 프로그램화된 사멸 1 리간드 (PD-L1)에 특이적으로 결합한다. 인간 PD-L1, NCBI 수탁 NP_054862 (버전 NP_054862.1 GI:7661534)는 하기 아미노산 서열을 갖는 290 aa 단백질이다 (aa 1-18에서 추정 신호 펩티드 및 아미노산 19-238에서 엑토도메인을 포함함):

```
MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVE
KQLDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKD
QLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPY
NKINQRILVVDPTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTT
TTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPE
LPLAHPNERNTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMMDVKKCGI
QDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID NO: 21)
```

[0156]

[0157] PD-L1은 또한 CD274 및 B7-H1로 알려져 있고, 세포, 예를 들어, 종양 세포의 표면 상에 발현된다.

[0158] CDR 서열을 포함한 서열 세부사항 및 38A1 및 19H9 항체와 관련된 추가의 정보가 도 7에 제시된다. 이에 따라 일부 경우에, PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질은 서열식별번호: 2-4에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열 (각각 scFV 38A1의 경쇄 CDR L1, L2, 및 L3)을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 6-8에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열 (각각 scFV 38A1의 중쇄 CDR H1, H2, 및 H3)을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 항원 결합 부분을 갖는다. 일부 경우에, PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질은 서열식별번호: 2-4에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열 (각각 scFV 38A1의 경쇄 CDR L1, L2, 및 L3)을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 6-8에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열 (각각 scFV 38A1의 중쇄 CDR H1, H2, 및 H3)을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하며 제1 및/또는 제2 폴리펩티드가 단백질이 PD-L1에 특이적으로 결합하는 한 명시된 서열식별번호에 비해 1개 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 것을 예외로 하는 항원 결합 부분을 갖는다. 일부 경우에, 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 단백질이 PD-L1에 특이적으로 결합하는 한 명시된 서열식별번호에 상응하는 각각의 아미노산 스트레치 내에 2개 이하 (예를 들어, 1개 이하)의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 대상 단백질은 일부 경우에 각각의 CDR 내에 2개 이하 (예를 들어, 1개 이하)의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0159] 일부 경우에, 제1 폴리펩티드는 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열 (38A1 경쇄)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열 (38A1 중쇄)을 포함한다 (예를 들어, 도 7 참조). 일부 경우에, 제1 폴리펩티드는 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하며 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 단백질이 PD-L1에 특이적으로 결합하는 한 명시된 서열식별번호에 비해 1개 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 것을 예외로 한다. 일부 경우에, 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 단백질이 PD-L1에 특이적으로 결합하는 한 명시된 서열식별번호에 상응하는 각각의 아미노산 스트레치 내에 2개 이하 (예를 들어, 1개 이하)의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 대상 단백질은 일부 경우에 각각의 CDR 내에 2개 이하 (예를 들어, 1개 이하)의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 서열식별번호: 2, 3, 및 4에 열거된 CDR을 포함하며, 여기서 단백질은 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 서열식별번호: 6, 7, 및 8에 열거된 CDR을 포함하며, 여기서 단백질은 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 일부 실

시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다.

[0160] 경쇄 - 항체 38A1

SYVLTPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGRKIVHWYQQRPGQAPVLVIYYDTRPAGIPERFSGSN
SGNMATLTISTVGAGDEADYYCQVWDTGSDHVVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO: 1)

CDR1(CDR-L1): NIGRKI (SEQ ID NO:2)

CDR2(CDR-L2): YDT (SEQ ID NO:3)

CDR3(CDR-L3): QVWDTGSDHVV (SEQ ID NO:4)

[0161]

[0162] 중쇄- 항체 38A1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGTTYADSVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDWFRRSSSPDAFDIWGQGTITVTVSA
(SEQ ID NO: 5)

CDR1(CDR-H1): GFTFSNYA (SEQ ID NO:6)

CDR2(CDR-H2): ISGSGGTT (SEQ ID NO:7)

CDR3(CDR-H3): AKDWFRRSSSPDAFDI (SEQ ID NO:8)

[0163]

[0164] 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조).

[0165]

일부 경우에, PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질은 서열식별번호: 10-12에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열 (각각 scFV 19H9의 경쇄 CDR L1, L2, 및 L3)을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 14-16에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열 (각각 scFV 19H9의 중쇄 CDR H1, H2, 및 H3)을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 항원 결합 부분을 갖는다. 일부 경우에, PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질은 서열식별번호: 10-12에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열 (각각 scFV 19H9의 경쇄 CDR L1, L2, 및 L3)을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 14-16에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열 (각각 scFV 19H9의 중쇄 CDR H1, H2, 및 H3)을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하며 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 단백질이 PD-L1에 특이적으로 결합하는 한 명시된 서열식별번호에 비해 1개 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 것을 예외로 하는 항원 결합 부분을 갖는다. 일부 경우에, 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 단백질이 PD-L1에 특이적으로 결합하는 한 명시된 서열식별번호에 상응하는 각각의 아미노산 스트레치 내에 2개 이하 (예를 들어, 1개 이하)의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 대상 단백질은 일부 경우에 각각의 CDR 내에 2개 이하 (예를 들어, 1개 이하)의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 서열식별번호: 10, 11, 및 12에 열거된 CDR을 포함하며, 여기서 단백질은 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 일부 실시

양태에서, 제2 폴리펩티드는 서열식별번호: 14, 15, 및 16에 열거된 CDR을 포함하며, 여기서 단백질은 PD-L1에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다.

경쇄 - 항체 19H9

NFMLTQPHSVSESLGKTVTISCTGSSGSIARKFVQWYQQRPGSSPTTVIYENNQRPSGVSDRFSG
 SIGSSSNSASLTISGLKTEADYYCQSYDSSNVVFGGGTKVTVL
 (SEQ ID NO: 9)

CDR1(CDR-L1): SGSIARKF (SEQ ID NO:10)

CDR2(CDR-L2): ENN (SEQ ID NO:11)

CDR3(CDR-L3): QSYDSSNVV (SEQ ID NO:12)

중쇄 - 항체 19H9

QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSGINTAGDTHYPESVKG
RFTISRDNARNSLNLQMNSLRAEDTAVYYCVRRERVERESGYDAFDIWGQGTTVTVSA
(SEQ ID NO: 13)

CDR1(CDR-H1): GFTFSSYS (SEQ ID NO:14)

CDR2(CDR-H2): INTAGDT (SEQ ID NO:15)

CDR3(CDR-H3): VRERVEREYSGYDAFDI (SEQ ID NO:16)

일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열 (19H9 경쇄)을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 서열식별번호: 13에 제시된 아미노산 서열 (19H9 중쇄)을 포함한다 (예를 들어, 도 7 참조). 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열 (19H9 경쇄)에 대해 90%, 95% 또는 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 서열식별번호: 13에 제시된 아미노산 서열 (19H9 중쇄)에 대해 90%, 95% 또는 98% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 경우에, 제1 폴리펩티드는 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드는 서열식별번호: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하며 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 단백질이 PD-L1에 특이적으로 결합하는 한 명시된 서열식별번호에 비해 1개 이상의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있는 것을 예외로 한다. 일부 경우에, 제1 및/또는 제2 폴리펩티드는 단백질이 PD-L1에 특이적으로 결합하는 한 명시된 서열식별번호에 상응하는 각각의 아미노산 스트레치 내에 2개 이하 (예를 들어, 1개 이하)의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, 이러한 대상 단백질은 일부 경우에 각각의 CDR 내에 2개 이하 (예를 들어, 1개 이하)의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

일부 실시양태에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질은 단일-쇄 항체 (scFv)이다 (상기 논의됨). 이와 같이, 일부 경우에, PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질은 scFv이고, 상기 (예를 들어 본 섹션에서) 기재된 바와 같은 항원 결합 부분의 제1 및 제2 폴리펩티드는 서로 융합된다 (따라서 동일한 폴리펩티드의 부분임). 적합한 scFv의 예는 서열식별번호: 17 및 19에 제시된 것들을 포함하나 이에 제한되지는 않는다 (도 7 참조). 일부 경우에, scFv의 제1 및 제2 폴리펩티드는 링커 (예를 들어, 가요성 링커)를 통해 서로 분리된다. 다양한 링커가 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있을 것이고 임의의 편리한 링커가 사용될 수 있다. 가요성 링커는 예를 들어, 이뮤노글로불린 중쇄로부터 유래된 힌지 영역에 대한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 가요성 링커는 예를 들어, 항체 (예를 들어, scFv)의 항원 결합 부분 (항원 결합 도메인)과 이뮤노글로불린 Fc 도메인 사이에 위치할 수 있다. 예를 들어 1개 이상의 Gly, Ser, Asn, 및/또는 Asp 아미노산을 포함한 가요성 링커를 포함하여, 다양한 가요성 링커가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 가요성 링커는 GGGGS이다. 일부 실시양태에서, 가요성 링커는 (GGGGS)_n (서열식별번호: 35)이며, 여기서 n은 1 내지 10의 정수이다. 일부 실시양태에서, 가요성 링커는 GGGGS이다. 일부 실시양태에서, 가요성 링커는 GGGSGGGGS (서열식별번호: 36)이다. 일부 실시양태에서, 가요성 링커는 GGGSGGGSGGGGS (서열식별번호: 37)이다. 일부 실시양태에서, 가요성 링커는 GGGSGGGSGGGSGGGGS (서열식별번호: 38)이다. 일부 실시양태에서, 가요성 링커는 GGGSGGGSGGGSGGGGS (서열식별번호: 39)이다. 일부 실시양태에서, 가요성 링커는 c-말단 Ala 및 Pro (AP)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 가요성 링커는 GGGSGG GSGGGGSGAP (서열식별번호: 40)이다.

[0172] 서열식별번호: 17 및 19의 scFv의 가요성 링커는 도 7에서 볼드체 및 밑줄표시되어 있다. 일부 경우에, PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질은 서열식별번호: 17 및 19 중 임의의 것에 제시된 아미노산 서열과 80% 이상 서열 동일성 (예를 들어, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다 (예를 들어, 도 7 참조).

[0173] 일부 실시양태에서, scFv는 하기 서열을 포함한다:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGS
GGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDWFRSSSPD
AFDIWGQGT TTVTSAGGGGSGGGGSGGGGSGAPSYVLTQPPSVSVAPGQTARIT
CGGNNIGRKIVHWYQQRPGQAPVLVIYYDTRPAGIPERFSGSNSGNMATLTIST
VGAGDEADYYCQVWD TGSDHVVFGGGTKLTVL
(SEQ ID NO: 17).

[0174]

[0175] 일부 실시양태에서, scFv는 하기 서열을 포함한다:

QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSY SMNWVRQAPGKGLEWVSGINT
AGDTHYPESVKGRFTISRDNARNSLNLQMNSLRAEDTAVYYCVRERVEREYSG
YDAFDIWGQGT TTVTSAGGGGSGGGGSGGGGSGAPNFMLTQPHSVSESLGKTV
TISCTGSSGSIARKFVQWYQQRPGSSPTTVIYENNQRPSGVSDRFSGSIGSSSNSAS
LTISGLKTEADYYCQSYDSSNVVFGGGTKVTVL
(SEQ ID NO: 19).

[0176]

[0177] 일부 실시양태에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질 (예를 들어, scFv)은 Fc 도메인 (또는 그의 단편) (예를 들어, IgG1 Fc, IgG2 Fc, IgG3 Fc, IgG4 Fc, 또는 그의 단편)에 직접적으로 또는 링커를 통해 융합되어 맥시바디를 제공한다. 일부 경우에, Fc는 IgG1 Fc 도메인이다. 일부 경우에, IgG1 Fc 도메인은 하기 서열을 갖는다:

CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMetISRTP E VTCVVVDVSQEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMetTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMetHEALH
NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:22)

[0178]

[0179] 일부 실시양태에서, Fc는 IgG4 Fc 도메인이다. 일부 경우에, IgG4 Fc 도메인은 하기 서열을 갖는다:

CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMetISRTP E VTCVVVDVSQEDPEVQFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMetTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMetHEALH
NHYTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:23)

[0180]

[0181] 일부 실시양태에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질은 인간화 항체이다. 일부 경우에, PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질은 Fc 도메인 (또는 그의 단편) (예를 들어, IgG1 Fc, IgG2 Fc, IgG3 Fc, IgG4 Fc, 또는 그의 단편)에 융합된 scFv (예를 들어, 상기 기재된 바와 같음)이다. 일부 경우에, PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질은 서열식별번호: 18 및 20 중 어느 하나에 제시된 아미노산 서열과 80% 이상 서열 동일성 (예를 들어, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 아미노산 서열을 포함한다 (예를 들어, 도 7 참조).

[0182] 일부 실시양태에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질은 하기를 포함한다:

MGSTAILALLLAVLQGVSAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS
WVRQAPGKGLEWVSTISGSGGTTYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRV
EDTAVYYCAKDWFRSSSPDAFDIWGQGTTVTVSAGGGGSGGGGSGGGSGAPS
YVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGRKIVHWYQQRPGQAPVLVIYYDTDRPA
GIPERFSGSNSGNMATLTISTVGAGDEADYYCQVWDTGSDHVVFGGGTKLTVL
GPRANFVYKSGPRPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 18).

[0183]

[0184] 일부 실시양태에서, PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질은 하기를 포함한다:

MGSTAILALLLAVLQGVSAQVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSMN
WVRQAPGKGLEWVSGINTAGDTHYPESVKGRFTISRDNARNSLNLQMNSLRAE
DTAVYYCVREREVERESGYDAFDIWGQGTTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSGA
PNFMLTQPHSVSESLGKTVTISCTGSSGSIARKFVQWYQQRPGSSPTTVIYENNQ
RPSGVSDRFSGSIGSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNVVFGGGTKVTV
LGPRANFVYKSGPRPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 20).

[0185]

[0186] 대상 PD-L1 결합 단백질 (예를 들어, scFV)은 융합 파트너에 융합될 수 있다. 대상 PD-L1 결합 단백질 (예를 들어, scFV)에 대한 융합 파트너의 예는 (a) NK 활성화 수용체 (예를 들어, 엑토도메인 ULBP1)에 대한 리간드, (b) 임의의 인간 이뮤노글로불린 (예를 들어 IgG4 또는 IgG1)의 Fc 도메인 및 그의 변이체 (예를 들어 단량체 힌지 돌연변이체, FcR 결합 돌연변이체), (c) 자기-이량체화 단백질 (예를 들어, 류신 지퍼 단백질), (d) 인간 CD4 도메인 3 및 4 (3/4), 및 (e) 인간 용모성 고나도트로핀 (hCG)의 카르복시-말단 펩티드 (CTP)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0187] 상기 융합 파트너의 서열의 예는 하기와 같고, 자기-이량체화 류신 지퍼 단백질, 인간 CD4 도메인 3 및 4 (3/4), 및 인간 용모성 고나도트로핀 (hCG)의 카르복시-말단 펩티드 (CTP)를 포함한다.

[0188] 일부 실시양태에서, 자기-이량체화 류신 지퍼 단백질은 하기를 포함한다:

RSGSSRMetKQIEDKIEEILSKIYHIENEIARIKKLIGERTSSRG (SEQ ID NO:24)

[0189]

[0190] 일부 실시양태에서, 인간 CD4 도메인 3 및 4 (3/4)는 하기를 포함한다:

ASSIVYKKEGEQVEFSFPLAFTVEKLTGSGELWWQAERASSSKSWITFDLKNKEVS
VKRVTQDPKLQMetGKKLPLHLTLPQALPQYAGSGNLTALAEAKTGKLHQEVNLV
VMetRATQLQKNLTCEVWGPTSPKLMetLSLKLENKEAKVSKREKAVWVLNPEAG
MetWQCLLSDSGQVLLESNIKVL (SEQ ID NO:25)

[0191]

- [0192] 일부 실시양태에서, 인간 용모성 고나도트로핀 (hCG)의 카르복시-말단 펩티드 (CTP)는 하기를 포함한다:
- [0193] SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:26)
- [0194] PD-L1 결합 단백질 특성 & 공동-조성물
- [0195] 일부 실시양태에서, 기재된 조성물 및 방법은 약 100 pM 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 90 pM 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 80 pM 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 70 pM 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 60 pM 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 50 pM 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 40 pM 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 30 pM 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하거나, 또는 약 1 pM 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하는 PD-1 억제제를 포함한다.
- [0196] 일부 실시양태에서, 기재된 조성물 및 방법은 약 7.5×10^5 l/M·s 또는 보다 빠른 k_{assoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 7.5×10^5 l/M·s 또는 보다 빠른 k_{assoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 8×10^5 l/M·s 또는 보다 빠른 k_{assoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 8.5×10^5 l/M·s 또는 보다 빠른 k_{assoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 9×10^5 l/M·s 또는 보다 빠른 k_{assoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 9.5×10^5 l/M·s 또는 보다 빠른 k_{assoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 또는 약 1×10^6 l/M·s 또는 보다 빠른 k_{assoc} 로 인간 PD-1에 결합하는 PD-1 억제제를 포함한다.
- [0197] 일부 실시양태에서, 기재된 조성물 및 방법은 약 2×10^{-5} 1/s 또는 보다 느린 k_{dissoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 2.1×10^{-5} 1/s 또는 보다 느린 k_{dissoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 2.2×10^{-5} 1/s 또는 보다 느린 k_{dissoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 2.3×10^{-5} 1/s 또는 보다 느린 k_{dissoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 2.4×10^{-5} 1/s 또는 보다 느린 k_{dissoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 2.5×10^{-5} 1/s 또는 보다 느린 k_{dissoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 2.6×10^{-5} 1/s 또는 보다 느린 k_{dissoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나 또는 약 2.7×10^{-5} 1/s 또는 보다 느린 k_{dissoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 2.8×10^{-5} 1/s 또는 보다 느린 k_{dissoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 약 2.9×10^{-5} 1/s 또는 보다 느린 k_{dissoc} 로 인간 PD-1에 결합하거나, 또는 약 3×10^{-5} 1/s 또는 보다 느린 k_{dissoc} 로 인간 PD-1에 결합하는 PD-1 억제제를 포함한다.
- [0198] 일부 실시양태에서, 기재된 조성물 및 방법은 약 10 nM 이하의 IC_{50} 으로 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1 또는 인간 PD-L2의 결합을 차단 또는 억제하거나, 약 9 nM 이하의 IC_{50} 으로 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1 또는 인간 PD-L2의 결합을 차단 또는 억제하거나, 약 8 nM 이하의 IC_{50} 으로 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1 또는 인간 PD-L2의 결합을 차단 또는 억제하거나, 약 7 nM 이하의 IC_{50} 으로 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1 또는 인간 PD-L2의 결합을 차단 또는 억제하거나, 약 6 nM 이하의 IC_{50} 으로 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1 또는 인간 PD-L2의 결합을 차단 또는 억제하거나, 약 5 nM 이하의 IC_{50} 으로 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1 또는 인간 PD-L2의 결합을 차단 또는 억제하거나, 약 4 nM 이하의 IC_{50} 으로 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1 또는 인간 PD-L2의 결합을 차단 또는 억제하거나, 약 3 nM 이하의 IC_{50} 으로 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1 또는 인간 PD-L2의 결합을 차단 또는 억제하거나, 약 2 nM 이하의 IC_{50} 으로 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1 또는 인간 PD-L2의 결합을 차단 또는 억제하거나, 또는 약 1 nM 이하의 IC_{50} 으로 인간 PD-1에 대한 인간 PD-L1 또는 인간 PD-L2의 결합을 차단 또는 억제하는 PD-1 억제제를 포함한다.
- [0199] 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 PD-L1 항체이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 항체는 고친화도 항체이

다. 일부 실시양태에서, PD-L1 항체는 인간 PD-L1 항체이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 항체는 무린 항체, 키메라 항체 또는 인간화 항체이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 항체는 모노클로날 항체이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 항체는 5×10^{-8} M 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하거나, 1×10^{-8} M 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하거나, 5×10^{-9} M 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합하거나, 또는 1×10^{-8} M 내지 1×10^{-10} M의 K_D 로 인간 PD-1에 결합한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 항체는 1×10^{-7} M 이하의 K_D 로 인간 PD-1에 결합한다.

[0200] 대상 단백질을 코딩하는 핵산

[0201] 핵산 및 벡터

[0202] (PD-L1에 특이적으로 결합하는) 대상 단백질을 코딩하는 핵산이 제공된다. 대상 단백질은 1종 이상의 핵산에 의해 코딩될 수 있다. 예를 들어, 항원 결합 부분의 제1 및 제2 폴리펩티드가 별개의 폴리펩티드인 경우에 (즉, 서로 융합되지 않은 경우에), 제1 및 제2 폴리펩티드는 동일하거나 상이한 핵산 상에서 코딩될 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상 PD-L1 결합 단백질 (예를 들어, 항체, scFv, 맥시바디 등)을 코딩하는 1종 이상의 핵산은 발현 벡터에 포함된다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 동일한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 상이한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 제1 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 제2 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 PD-L1 결합 단백질을 코딩한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포 측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포 측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포 측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포 측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 동일한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 상이한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 제1 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고,

상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0203] 레트로바이러스 예컨대 렌티바이러스로부터 유래된 벡터는 딸세포에서 트랜스진의 장기간 안정한 통합 및 그의 증식을 가능하게 하기 때문에 장기간 유전자 전달을 달성하는데 적합한 도구이다. 렌티바이러스 벡터는 비-중식 세포, 예컨대 간세포를 형질도입시킬 수 있다는 점에서 종양-레트로바이러스 예컨대 무린 백혈병 바이러스로부터 유래된 벡터에 비해 추가의 이점을 갖는다. 이들은 또한 낮은 면역원성의 추가의 이점을 갖는다.

[0204] 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에게 제공 (예를 들어, 세포 내로 도입)될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 [Sambrook et al., (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)], 및 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다. 벡터로서 유용한 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 헤르페스 바이러스, 및 렌티바이러스를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로, 적합한 벡터는 적어도 1종의 유기체, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 1종 이상의 선택 마커에서 기능적인 복제 기점을 함유한다.

[0205] 다수의 바이러스 기반 시스템이 포유동물 세포 내로의 유전자 전달을 위해 개발되었다. 예를 들어, 레트로바이러스는 유전자 전달 시스템을 위한 편리한 플랫폼을 제공한다. 선택된 유전자는 관련 기술분야에 공지된 기술을 사용하여 벡터 내로 삽입되고 레트로바이러스 입자 내에 패키징될 수 있다. 재조합 바이러스는 이어서 단리되어 목적하는 세포에게 전달될 수 있다.

[0206] 본 개시내용은 또한 본 개시내용의 핵산 구축물이 삽입된 발현 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 유도성 발현 시스템이 이용될 수 있다. 유도성 발현이 바람직한 경우에, 이러한 유도성 발현을 용이하게 하는 다수의 벡터가 이용가능하며, 테트라시클린- 및 테트라시클린 유사체-유도성 벡터, 타목시펜-유도성 벡터, 뿐만 아니라 관련 기술분야에 공지된 다른 유도성 전사 시스템 벡터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

- [0207] 핵산 구축물은 생체내에서 뉴클레오타이드 서열에서 그의 전사 또는 발현을 지시하는 제어 요소에 작동가능하게 연결될 수 있다. 이러한 제어 요소는 통상적으로 선택된 유전자와 회합된 제어 서열을 포함할 수 있다 (예를 들어, 내인성 세포성 제어 요소). 대안적으로, 이중 제어 서열이 사용될 수 있다. 유용한 이중 제어 서열은 일반적으로 포유동물 또는 바이러스 유전자를 코딩하는 서열로부터 유래된 것들을 포함한다. 예는 SV40 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 긴 말단 반복부 (LTR) 프로모터; 아데노바이러스 주요 후기 프로모터 (Ad MLP); 단순 포진 바이러스 (HSV) 프로모터, 관심 유전자에 대해 이중인 내인성 세포성 프로모터, 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 예컨대 CMV 극초기 프로모터 영역 (CMVIE), 라우스 육종 바이러스 (RSV) 프로모터, 합성 프로모터, 하이브리드 프로모터 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 또한, 비바이러스 유전자, 예컨대 뮤린 메탈로티오네인 유전자로부터 유래된 서열이 또한 사용될 수 있다. 이러한 프로모터 서열은 예를 들어, 스트라타진(Stratagene) (캘리포니아주 샌디에고)으로부터 상업적으로 이용가능하다.
- [0208] 일부 실시양태에서, 세포 유형-특이적 또는 조직-특이적 프로모터는 이중 유전자 산물을 코딩하고, 특정한 세포 유형(들) 또는 조직(들)에서 유전자 산물을 선택적으로 또는 우선적으로 생산하도록 하는 (예를 들어 세포독성 림프구에서 발현하는) 핵산 삽입물에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유도성 프로모터는 이중 핵산에 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [0209] 본원에 개시된 벡터는 또한 본 발명에 따라 생산된 벡터로 형질감염된 세포에서 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 핵산 삽입물 (또한 이중 뉴클레오타이드 서열로도 지칭됨)에 작동가능하게 연결된 통상적인 제어 요소를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 "작동가능하게 연결된" 서열은 관심 유전자와 인접한 발현 제어 서열 및 트랜스로 또는 거리를 두고 작용하여 관심 유전자를 제어하는 발현 제어 서열 둘 다를 포함한다.
- [0210] 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 효율적인 RNA 프로세싱 신호 예컨대 스플라이싱 및 폴리아데닐화 (폴리A) 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 증진시키는 서열 (즉, 코작 컨센서스 서열); 단백질 안정성을 증진시키는 서열; 및 원하는 경우에, 코딩된 산물의 분비를 증진시키는 서열을 포함한다. 천연, 구성적, 유도성 및/또는 조직-특이적 프로모터로부터 선택되는 프로모터를 포함한 다수의 발현 제어 서열이 관련 기술분야에 공지되어 있고 이용될 수 있다.
- [0211] 구성적 프로모터의 예는, 비제한적으로, 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스 (RSV) LTR 프로모터 (임의로 RSV 인핸서를 가짐), 뮤린 세포 바이러스 (MSCV) 프로모터, 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 (임의로 CMV 인핸서를 가짐) (예를 들어, 문헌 [Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)] 참조), SV40 프로모터, 디히드로폴레이트 리덕타제 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나제 (PGK) 프로모터, 및 EF1 프로모터 (인비트로젠(Invitrogen))를 포함한다. 유도성 프로모터는 유전자 발현의 조절을 가능하게 하고, 외인적으로 공급된 화합물, 환경 요인 예컨대 온도, 또는 특정 생리학적 상태, 예를 들어 급성기, 세포의 특정한 분화 상태의 존재에 의해, 또는 오직 복제 세포에서 조절될 수 있다. 유도성 프로모터 및 유도성 시스템은, 비제한적으로, 인비트로젠, 클론테크(Clonetech) 및 아리아드(Ariad)를 포함한 다양한 상업적 공급원으로부터 이용가능하다. 많은 다른 시스템이 기재되었고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 선택될 수 있다. 외인적으로 공급된 화합물에 의해 조절되는 유도성 프로모터의 예는 아연-유도성 양 메탈로티오닌 (MT) 프로모터, 텍사메타손 (Dex)-유도성 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV) 프로모터, T7 폴리머라제 프로모터 시스템 (WO 98/10088); 엑디손 곤충 프로모터 (No et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351), 테트라시클린-억제성 시스템 (Gossen et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551), 테트라시클린-유도성 시스템 (문헌 [Gossen et al., (1995) Science, 268:1766-1769], 또한 문헌 [Harvey et al., (1998) Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518] 참조), RU486-유도성 시스템 (Wang et al., (1997) Nat. Biotech., 15:239-243 및 Wang et al., (1997) Gene Ther., 4:432-441) 및 라파마이신-유도성 시스템 (Magari et al., (1997) J. Clin. Invest., 100:2865-2872)을 포함한다. 이와 관련하여 유용한 유도성 프로모터의 다른 유형은 특정 생리학적 상태, 예를 들어, 온도, 급성기, 특정한 세포 분화 상태에 의해 또는 오직 복제 세포에서만 조절되는 것들이다. 일부 실시양태에서, 뮤린 세포 바이러스 (MSCV) 프로모터 또는 인간 신장 인자-1 알파 (EF-1 알파) 프로모터를 함유하는 렌티바이러스 벡터는, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 본원에 기재된 바와 같은 대상 PD-L1 결합 단백질을 코딩하는 핵산을 발현하는데 이용된다.
- [0212] 또 다른 실시양태에서, 핵산 삽입물에 대한 천연 프로모터가 사용될 것이다. 천연 프로모터는 핵산 삽입물의 발현이 천연 발현을 모방해야 하는 것이 요구되는 경우에 바람직할 수 있다. 천연 프로모터는 핵산 삽입물의 발현이 일시적으로 또는 발달상, 또는 조직-특이적 방식으로, 또는 특정 전사 자극에 반응하여 조절되어야 하는 경우에 사용될 수 있다. 추가 실시양태에서, 다른 천연 발현 제어 요소, 예컨대 인핸서 요소, 폴리아데닐화 부

위 또는 코작 컨센서스 서열이 또한 천연 발현을 모방하는데 사용될 수 있다.

- [0213] 핵산의 또 다른 실시양태는 조직-특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자를 포함한다. 예를 들어, T-세포 및/또는 세포독성 림프구에서의 발현이 바람직한 경우에, T-세포 및/또는 세포독성 림프구에서 활성인 프로모터가 사용되어야 한다.
- [0214] 다양한 실시양태에서, 1종 이상의 핵산 삽입물을 보유하는 벡터는 또한 선택 마커 또는 리포터 유전자, 예를 들어, 특히 제네티신, 히그로마이신 또는 퓨로마이신 내성을 코딩하는 서열을 포함한다. 선택 리포터 또는 마커 유전자는, 예를 들어 암피실린 내성을 검사하는 것을 포함하여, 박테리아 세포에서 플라스미드/벡터의 존재를 알리는데 사용될 수 있다. 플라스미드의 다른 성분은 복제 기점을 포함할 수 있다. 이들 및 다른 프로모터 및 벡터 요소의 선택은 통상적이며, 많은 이러한 서열이 이용가능하다 (예를 들어, 문헌 [Sambrook et al.], 및 그 안에 인용된 참고문헌 참조).
- [0215] 일부 경우에, 대상 핵산은 대상 PD-L1 결합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 적합한 프로모터는 구성적 프로모터 (예를 들어, CMV 프로모터, EF1알파 프로모터, MSCV 등) 뿐만 아니라 유도성 프로모터 (예를 들어, 테트라시클린- 및 테트라시클린 유사체- 유도성 프로모터, 타목시펜-유도성 프로모터 등) 및 조건부 프로모터 예컨대 NR4A1 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 트랜스포손을 포함한다.
- [0216] 일부 실시양태에서, 벡터는 도 10에 제공된 바와 같은 뉴클레오타이드 서열을 갖는 pLEV이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질을 함유하는 pLEV 벡터는 도 11에 제공된다. 일부 실시양태에서, 벡터는 서열 식별번호: 41이다 (도 11a). 일부 실시양태에서, 벡터는 서열식별번호: 42이다 (도 11b). 일부 실시양태에서, 벡터는 도 16a에 제시된 벡터이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 도 16b에 제시된다.
- [0217] 일부 실시양태에서, 벡터는 레트로바이러스 벡터, 예컨대 감마레트로바이러스 벡터이다.
- [0218] 일부 경우에, PD-L1 결합 단백질을 코딩하는 대상 핵산은, 예를 들어 진핵 세포에서의 일시적 발현, 진핵 세포에서의 발현 카세트 (이는 프로모터에 작동가능하게 연결된 PD-L1 결합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함함)의 게놈 통합, 박테리아 세포에서의 증식 등을 위해 플라스미드에 포함된다.
- [0219] 세포
- [0220] 본 개시내용은 PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질을 포함하고/거나, 단백질을 코딩하는 핵산 (예를 들어, 상기 논의된 바와 같음)을 포함하는 세포를 제공한다. PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질을 코딩하는 핵산을 포함하는 세포의 경우, 핵산은 에피솜에서 유지될 수 있거나 (예를 들어, 플라스미드일 수 있음), 또는 핵산은 게놈 내로 통합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 동일한 핵산 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 상이한 핵산 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 핵산 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 핵산 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서 핵산은 PD-L1 결합 단백질을 코딩한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에

서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 동일한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 제1 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0221] 세포는 임의의 편리한-세포 유형일 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 대상-세포는 원핵 세포이다. 예를 들어, 대상 단백질을 코딩하는 핵산 (예를 들어, 플라스미드)을 증식시키는데 사용되는 이. 콜라이(*E. coli*) 세포일 수 있다. 일부 경우에, 세포는 진핵 세포 (예를 들어, 포유동물 세포, 래트-세포, 마우스 세포, 인간 세

포)이다. 일부 경우에, 세포는 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포는 세포독성 림프구이고, 가용성 프로그램화된 사멸 1 리간드 (PD-L1) 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된 세포독성 림프구로 지칭될 수 있다. 이러한 경우에, 용어 "유전자 변형된"은 핵산이 세포에서 유지되는 시나리오뿐만 아니라 핵산이 세포의 게놈 내로 통합되는 시나리오를 포괄한다. 일부 경우에, 세포는 가용성 프로그램화된 사멸 1 리간드 (PD-L1) 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된 세포독성 림프구이며, 여기서 유전자 변형은 게놈 변형이다 (즉, 대상 단백질을 코딩하는 핵산은 세포의 게놈 내로 통합됨).

[0222] 본원에 기재된 바와 같은 대상 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형될 수 있는 세포독성 림프구는, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 세포독성 T (CTL) 세포, 자연 킬러 T (NKT) 세포 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 세포독성 림프구는 예를 들어, 중앙 연관 항원에 의해 활성화되고/거나 중앙 특이적 키메라 항원 수용체 또는 T-세포 수용체, 및 중앙-침윤 림프구 (TIL)로 형질도입된 말초 혈액-유래 $\alpha\beta$ TCR-양성 또는 $\gamma\delta$ TCR-양성 T-세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 38A1 및 19H9로 이루어진 군으로부터 선택되는 대상 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 변형되었다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 변형되었다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 변형되었다.

[0223] 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 세포독성 T-세포는 $CD8^+$ T-세포이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 세포독성 T-세포는 $CD4^+$ T-헬퍼 세포이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 세포독성 T-세포는 본원에 기재된 바와 같은 대상 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 변형된 $CD8^+$ T-세포이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 세포독성 T-세포는 본원에 기재된 바와 같은 대상 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 변형된 $CD4^+$ T-헬퍼 세포이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 세포독성 T-세포는 38A1을 발현하고 분비하도록 변형된 $CD8^+$ T-세포이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 세포독성 T-세포는 19H9를 발현하고 분비하도록 변형된 $CD4^+$ T-헬퍼 세포이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 세포독성 T-세포는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 변형된 $CD8^+$ T-세포이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 세포독성 T-세포는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 변형된 $CD4^+$ T-헬퍼 세포이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결합의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고,

상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0224]

본원에 기재된 바와 같은 대상 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형될 수 있는 세포독성 림프구는, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 1종 이상의 활성화 항원을 발현할 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용에 따른 세포독성 림프구는 나이브 T-세포에 비해 1종 이상의 활성화 항원의 증가된 발현 수준을 나타낼 수 있다. 1종 이상의 활성화 항원은 예를 들어, CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT 및 HLA-DR로부터 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표시되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표시되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표시된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된

생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0225]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 대상 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형될 수 있는 세포독성 림프구는, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 종양 연관 항원, 예를 들어, 본 개시내용에 따른 유전자 변형된 세포독성 림프구로 치료될 대상체의 종양으로부터의 종양 연관 항원에 특이적인 수용체를 포함하거나 또는 포함하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포 측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1

양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표시되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표시된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 취득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0226] 본원에 기재된 바와 같은 대상 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형될 수 있는 세포독성 림프구는, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 대상체의 임의의 적합한 조직 또는 체액으로부터 취득될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서 세포독성 림프구는 대상체의 말초 혈액으로부터 취득될 수 있

다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 대상 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형될 수 있는 세포독성 림프구는, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 대상체의 종양으로부터 유래된 TIL이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서,

PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0227] 검출가능한 표지

[0228] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 PD-L1에 특이적으로 결합하는 대상 단백질 (즉 대상 PD-L1 결합 단백질)은, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 1종 이상의 검출가능한 표지를 포함한다. 다양한 적합한 검출가능한 표지가 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 방사성 동위원소, 형광물질, 화학발광물질, 발색단, 효소, 효소 기질, 효소 보조인자, 효소 억제제, 발색단, 염료, 금속 이온, 금속 줄, 리간드 (예를 들어, 비오틴, 아비딘, 스트렙타비딘 또는 합텐) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 용어 "형광물질"은 검출가능한 범위로 형광을 나타낼 수 있는 물질 또는 그의 부분을 지칭한다. 대상 PD-L1 결합 단백질의 성분으로서 사용하기에 적합한 검출가능한 표지의 예는 친화성 태그 및 형광 단백질 (예를 들어, GFP, YFP, RFP, CFP 등)을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scF

v)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0229]

용어 "친화성 태그"는 펩티드 절편, 예를 들어 대상 PD-L1 결합 단백질 내로 혼입되고 친화성 태그에 결합하여 검출가능한 신호를 제공하는 분자 (예를 들어, 형광 화합물 또는 단백질)를 사용하여 검출될 수 있는 이중 펩티드 절편을 나타내기 위해 본원에 사용된다. 원칙적으로, 항체 또는 다른 특이적 결합체가 이용가능한 임의의 펩티드 또는 단백질이 친화성 태그로서 사용될 수 있다. 사용하기에 적합한 친화성 태그의 예는 단핵구성 어댑터 단백질 (MONA) 결합 펩티드, T7 결합 펩티드, 스트렙타비딘 결합 펩티드, 폴리히스티딘 트랙, 단백질 A (Nilsson et al., EMBO J. 4:1075 (1985); Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:3 (1991)), 글루타리온 S 트랜스퍼라제 (Smith and Johnson, Gene 67:31 (1988)), Glu-Glu 친화성 태그 (Grussenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952 (1985)), 물질 P, FLAG 펩티드 (Hopp et al., Biotechnology 6:1204 (1988)), 또는 다른 항원성 에피토프 또는 결합 도메인을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일반적으로, 문헌 [Ford et al., Protein Expression and Purification 2:95 (1991)]을 참조한다. 친화성 태그를 코딩하는 DNA 분자는 상업적 공급업체 (예를 들어, 파마시아 바이오테크(Pharmacia Biotech), 뉴저지주 피스카타웨이)로부터 이용가능하다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰

또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0230]

관련 기술분야에 널리 공지된 임의의 형광 폴리펩티드 (또한 본원에서 형광 표지로도 지칭됨)는 직접적으로 또는 친화성 태그와 함께 검출가능한 표지로서 사용하기에 적합하다. 적합한 형광 폴리펩티드는 목적하는 숙주 세포, 예컨대 박테리아 세포 또는 포유동물 세포에서 발현될 수 있는 것일 것이고, 정성적으로 (양성/음성) 및 정량적으로 (예를 들어, 비교 형광 정도) 평가될 수 있는 검출가능한 신호를 용이하게 제공할 것이다. 형광 폴리펩티드의 예는 황색 형광 단백질 (YFP), 청색 형광 단백질 (CFP), GFP, mRFP, RFP (tdimer2), HCRED 등, 또는 그의 임의의 돌연변이체 (예를 들어, 증진된 형광 또는 이동된 방출 스펙트럼을 제공하도록 변형된 형광 단백질), 유사체 또는 유도체를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 추가로 적합한 형광 폴리펩티드, 뿐만 아니라 본원에 열거된 것들의 구체적 예는 관련 기술분야에 제공되며 널리 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조

군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0231]

비오틴-기반 표지가 또한 본원에 개시된 대상 PD-L1 결합 단백질에 사용될 수 있다. 분자 및 기질의 비오틴화 화가 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 단백질, 핵산, 탄수화물, 카르복실산의 비오틴화를 위한, 아민-반응성 및 티올-반응성 작용제를 포함한 다수의 비오틴화제가 공지되어 있다; 예를 들어, 본원에 참조로 포함된 문헌 [chapter 4, Molecular Probes Catalog, Haugland, 6th Ed. 1996]을 참조한다. 비오틴화 기질은 검출

가능하게 표지된 비오틴 결합 파트너, 예컨대 아비딘 또는 스트렙타비딘의 결합에 의해 검출될 수 있다. 유사하게, 다수의 합테닐화 시약이 또한 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포 측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호:

19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0232] 방법

[0233] 입양 세포 전달

[0234] 입양 세포 전달 (ACT)은 면역요법의 매우 효과적인 형태이고, 항종양 활성을 갖는 면역 세포의 암 환자 내로의 전달을 수반한다. ACT는 항종양 활성을 갖는 림프구의 시험관내 확인, 이들 세포의 큰 수로의 시험관내 확장 및 그의 암-보유 숙주 내로의 주입을 수반하는 치료 접근법이다. 입양 전달에 사용되는 림프구는 절제된 종양의 기질로부터 유래될 수 있다 (종양 침윤 림프구 또는 TIL). 그것은 또한 그것이 항종양 T-세포 수용체 (TCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 유전자 조작되거나, 혼합 림프구 종양 세포 배양 (MLTC)으로 풍부화되거나, 또는 자가 항원 제시 세포 및 종양 유래 펩티드를 사용하여 클로닝되는 경우에 혈액으로부터 유래될 수 있다. 림프구가 주입될 암-보유 숙주로부터 유래하는 ACT는 자가 ACT로 불린다. 미국 공개 번호 2011/0052530은 주로 전이성 흑색종을 앓고 있는 환자의 치료를 위해 암 퇴행을 촉진하기 위한 입양 세포 요법을 수행하는 방법에 관한 것이며, 이들 방법에 대해 그 전문이 참조로 포함된다.

[0235] 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 단일 용량으로 투여될 수 있다. 이러한 투여는 주사, 예를 들어, 정맥내 주사에 의할 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 투여는 1년에 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 또는 6회 초과일 수 있다. 투여는 매월 1회, 격주 1회, 매주 1회, 또는 격일 1회일 수 있다. TIL 및/또는 세포독성 림프구의 투여는 필요한 만큼 계속될 수 있다.

[0236] 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구의 유효 투여량은 약 1×10^6 , 약 2×10^6 , 약 3×10^6 , 약 4×10^6 , 약 5×10^6 , 약 6×10^6 , 약 7×10^6 , 약 8×10^6 , 약 9×10^6 , 약 1×10^7 , 약 2×10^7 , 약 3×10^7 , 약 4×10^7 , 약 5×10^7 , 약 6×10^7 , 약 7×10^7 , 약 8×10^7 , 약 9×10^7 , 약 1×10^8 , 약 2×10^8 , 약 3×10^8 , 약 4×10^8 , 약 5×10^8 , 약 6×10^8 , 약 7×10^8 , 약 8×10^8 , 약 9×10^8 , 약 1×10^9 , 약 2×10^9 , 약 3×10^9 , 약 4×10^9 , 약 5×10^9 , 약 6×10^9 , 약 7×10^9 , 약 8×10^9 , 약 9×10^9 , 약 1×10^{10} , 약 2×10^{10} , 약 3×10^{10} , 약 4×10^{10} , 약 5×10^{10} , 약 6×10^{10} , 약 7×10^{10} , 약 8×10^{10} , 약 9×10^{10} , 약 1×10^{11} , 약 2×10^{11} , 약 3×10^{11} , 약 4×10^{11} , 약 5×10^{11} , 약 6×10^{11} , 약 7×10^{11} , 약 8×10^{11} , 약 9×10^{11} , 약 1×10^{12} , 약 2×10^{12} , 약 3×10^{12} , 약 4×10^{12} , 약 5×10^{12} , 약 6×10^{12} , 약 7×10^{12} , 약 8×10^{12} , 약 9×10^{12} , 약 1×10^{13} , 약 2×10^{13} , 약 3×10^{13} , 약 4×10^{13} , 약 5×10^{13} , 약 6×10^{13} , 약 7×10^{13} , 약 8×10^{13} , 및 약 9×10^{13} 개이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구의 유효 투여량은 약 1×10^6 내지 약 5×10^6 , 약 5×10^6 내지 약 1×10^7 , 약 1×10^7 내지 약 5×10^7 , 약 5×10^7 내지 약 1×10^8 , 약 1×10^8 내지 약 5×10^8 , 약 5×10^8 내지 약 1×10^9 , 약 1×10^9 내지 약 5×10^9 , 약 5×10^9 내지 약 1×10^{10} , 약 1×10^{10} 내지 약 5×10^{10} , 약 5×10^{10} 내지 약 1×10^{11} , 약 5×10^{11} 내지 약 1×10^{12} , 약 1×10^{12} 내지 약 5×10^{12} , 및 약 5×10^{12} 내지 약 1×10^{13} 개 범위 내이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9 또는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)로부터 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)로부터 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 렌티바이러스 벡터에 의해 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰

또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄 동일한 벡터 또는 핵산 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 상이한 벡터 또는 핵산 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 제1 벡터 또는 핵산 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 벡터 또는 핵산 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은

직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0237] 세포를 대상 단백질과 접촉시키는 것

[0238] 제1-세포 (예를 들어, 암 세포 예컨대 종양 세포) 상의 PD-L1과 또 다른 세포 (예를 들어, 면역 세포 예컨대 T-세포) 상의 PD-1 사이의 상호작용을 감소시키는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 제1-세포 상의 PD-L1을 대상 PD-L1 결합 단백질 (예를 들어, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L1 scFv, 항-PD-L1 맥시마디 등)과 접촉시키는 것을 포함할 수 있다. 임의의 양의 감소가 일부 경우에 (상황에 따라) 유용할 수 있다. 일부 경우에, PD-L1과 PD-1 사이의 상호작용은 10% 이상 (예를 들어, 20% 이상, 30% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 또는 100%)만큼 감소된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-

쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0239] 임의의 편리한 검정을 사용하여 감소의 양을 측정할 수 있고, 이러한 검정은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지될 것이다. 감소의 양을 측정하기 위한 검정의 예 (예를 들어, 여기서 검정은 대상 PD-L1 결합 단백질 예컨대 항-PD-L1 항체, 항-PD-L1 scFv, 항-PD-L1 맥시바디 등의 존재 대 부재 하에 수행될 수 있음)는 혼합 림프구 반응 검정 (MLR 검정, 예를 들어, 알로 MLR 검정)에서 시토카인 생산의 억제를 측정하는 것, 중앙 침윤 림프구 (TIL)와 동종 중앙 사이의 상호작용을 측정하는 것, 세포독성을 측정하는 것 (예를 들어, 세포독성 검정 예컨대 PD-L1 발현 세포 예컨대 암 세포에 대한 세포독성 T-세포 활성을 측정하기 위한 검정), 핵으로의 NFkB 전위를 측정하는 것, 및 PI3K/AKT/mTOR 신호전달 경로의 신호전달 활성/출력을 측정하는 것을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다 (예를 들어, 문헌 [Wang et al., Cancer Immunol Res. 2014 Sep;2(9):846-56] 참조).

[0240] 접촉은 시험관내 (예를 들어, 배양물 중 세포)에서 일어날 수 있다. 일부 경우에, 접촉은 생체내에서 이루어진다. 예를 들어, 일부 경우에, 접촉은 대상 PD-L1 결합 단백질을 개체에게 투여하는 것을 포함한다. 이러한 경우에, 방법은 (암을 갖는 개체, 고형 종양을 갖는 개체, 만성 감염 (예를 들어, 만성 바이러스 감염)을 갖는 개체 등을 위한) 치료 방법인 것으로 고려될 수 있다. 일부 경우에, 접촉은 세포 (예를 들어, PD-L1을 발현하는 세포, PD-1을 발현하는 세포, 또는 제3 세포) 내로 대상 PD-L1 결합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 것을 포함하고, 핵산이 도입된 세포는 PD-L1 결합 단백질을 생산하고 분비한다. 핵산이 제3 세포 내로 도입된 경우에, 제3 세포는 이어서 분비를 통해 PD-L1 결합 단백질을 제공하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산이 제3 세포 내로 도입된 경우에, 제3 세포는 이어서 분비를 통해 그를 필요로 하는 개체 또는 대상체에게 PD-L1 결합 단백질을 제공하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표시되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표시되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표시된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는

서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0241] 본 개시내용의 1종 이상의 PD-L1 결합 단백질을 포함하는 치료 제제는 바람직한 정도의 순도를 갖는 PD-L1 결합 단백질을 임의적인 생리학상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), 동결건조 제제 또는 수용액 형태로 저장을 위해 제조될 수 있다. PD-L1 결합 단백질 조성물은 우수한 의료 행위에 부합하는 방식으로 제제화, 투약, 및 투여될 수 있다. 이와 관련하여 고려할 인자는 치료될 특정한 장애, 치료될 특정한 포유동물, 개별 환자의 임상 상태, 장애의 원인, 작용제의 전달 부위, 투여 방법, 투여 스케줄링, 및 의료 진료의에게 알려져 있는 다른 인자를 포함한다. 투여될 PD-L1 결합 단백질의 "치료 유효량"은 이러한 고려사항에 의해 통제될 수 있고, 환자의 질환 (예를 들어, 암, 만성 감염)을 치료하는데 필요한 최소량이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의

증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0242]

치료 용량은 적어도 0.01 mg/kg 체중, 적어도 0.05 mg/kg 체중; 적어도 0.1 mg/kg 체중, 적어도 0.5 mg/kg 체중, 적어도 1 mg/kg 체중, 적어도 2 mg/kg 체중, 적어도 2.5 mg/kg 체중, 적어도 5 mg/kg 체중, 적어도 7.5 mg/kg 체중, 적어도 10 mg/kg 체중, 적어도 15 mg/kg 체중, 적어도 20 mg/kg 체중, 적어도 25 mg/kg 체중, 적어도 30 mg/kg 체중, 적어도 35 mg/kg 체중, 적어도 40 mg/kg 체중, 적어도 45 mg/kg 체중, 적어도 50 mg/kg 체중, 적어도 55 mg/kg 체중, 적어도 60 mg/kg 체중, 적어도 65 mg/kg 체중, 적어도 70 mg/kg 체중, 적어도 75

mg/kg 체중, 적어도 80 mg/kg 체중, 적어도 85 mg/kg 체중, 적어도 90 mg/kg 체중, 적어도 95 mg/kg 체중, 적어도 100 mg/kg 체중, 적어도 110 mg/kg 체중, 적어도 120 mg/kg 체중, 적어도 130 mg/kg 체중, 적어도 140 mg/kg 체중, 적어도 150 mg/kg 체중, 적어도 160 mg/kg 체중, 적어도 170 mg/kg 체중, 적어도 180 mg/kg 체중, 적어도 190 mg/kg 체중, 적어도 200 mg/kg 체중, 적어도 210 mg/kg 체중, 적어도 220 mg/kg 체중, 적어도 230 mg/kg 체중, 적어도 240 mg/kg 체중, 적어도 250 mg/kg 체중, 적어도 260 mg/kg 체중, 적어도 270 mg/kg 체중, 적어도 280 mg/kg 체중, 적어도 290 mg/kg 체중, 적어도 300 mg/kg 체중, 적어도 310 mg/kg 체중, 적어도 320 mg/kg 체중, 적어도 330 mg/kg 체중, 적어도 340 mg/kg 체중, 적어도 350 mg/kg 체중, 적어도 360 mg/kg 체중, 적어도 370 mg/kg 체중, 적어도 380 mg/kg 체중, 적어도 390 mg/kg 체중, 적어도 400 mg/kg 체중, 적어도 410 mg/kg 체중, 적어도 420 mg/kg 체중, 적어도 430 mg/kg 체중, 적어도 440 mg/kg 체중, 적어도 450 mg/kg 체중, 적어도 460 mg/kg 체중, 적어도 470 mg/kg 체중, 적어도 480 mg/kg 체중, 적어도 490 mg/kg 체중, 및 적어도 500 mg/kg 체중일 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여량은 500 mg/kg 체중 이하이다. 이러한 가이드라인은 예를 들어 항체 단편의 사용에서, 또는 항체 접합체의 사용에서 활성제의 분자량에 대해 조정될 것임이 관련 기술 분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다. 투여량은 또한 국제화된 투여, 예를 들어, 비강내, 흡입 등에 대해, 또는 전신 투여, 예를 들어 i.m., i.p., i.v. 등에 대해 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 투여되는 항체는 19H9 또는 38A1, 또는 그의 조합이다. 일부 실시양태에서, 투여되는 항체는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질이 투여된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 투여되는 항체는 38A1이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0243]

PD-L1 결합 단백질은 활성을 강화시키거나, 또는 달리 치료 효과를 증가시키는 1종 이상의 작용제와 함께 제제화될 필요는 없으나, 임의로 제제화된다. 이들은 일반적으로 이전에 사용된 것과 동일한 투여량 및 투여 경로로, 또는 이제까지 사용된 투여량의 약 1 내지 99%로 사용된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포 측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포 측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포 측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포 측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를

포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0244] 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 비-독성이고, 완충제 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 염화암모늄; 핵사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥산올, 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량 (10개 미만의 잔기)의 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스 또는 텍스트린을 포함한 다른 탄수화물; 킬레이트화제 예컨대 EDTA; 당 예컨대 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 반대-이온 예컨대 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비-이온성 계면활성제 예컨대 트윈(TWEEN)TM, 플루로닉스(PLURONICS)TM 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함한다. 생체내 투여에 사용되는 제제는 멸균될 수 있다. 이는 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성된다.

[0245] PD-L1 결합 단백질 (예를 들어, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L1 맥시바디, 항-PD-L1 scFv 등)은 비경구, 피하, 복강내, 폐내 및 비강내를 포함한 임의의 적합한 수단에 의해 투여될 수 있다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 또한, PD-L1 결합 단백질 (예를 들어, 항-PD-L1 항체, 항-PD-L1 맥시바디, 항-PD-L1 scFv 등)은 펄스 주입에 의해, 특히 감소하는 용량의 결합 단백질을 사용하여 적합하게 투여된다. 일부 경우에, 대상 PD-L1 결합 단백질은 전신으로 (예를 들어, i.v.) 투여된다. 일부 경우에, 대상 PD-L1 결합 단백질은 국부로 (예를 들어, 종양내로, 예를 들어, 주사를 통해) 투여된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및

서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0246]

질환의 예방 또는 치료를 위해, PD-L1 결합 단백질의 적절한 투여량은 상기 정의된 바와 같이, 치료하고자 하는 질환의 유형, 질환의 중증도 및 경과, PD-L1 결합 단백질이 예방적 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 환자의 임상 병력 및 PD-L1 결합 단백질에 대한 반응, 및 담당 의사의 판단에 따라 달라질 수 있다. PD-L1 결합 단백질은 한 번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 환자에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일

부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

- [0247] 가용성 프로그램화된 사멸 1 리간드 (PD-L1) 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된 세포독성 림프구를 사용한 입양 세포 전달 방법
- [0248] 본원에 기재된 바와 같은 대상 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하는 세포독성 림프구는, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 예를 들어 암 또는 만성 감염을 치료하는 것과 관련하여, 입양 세포 전달 방법에 사용된다.
- [0249] 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 적합한 방법은 예를 들어, 대상체로부터, 예를 들어, 대상체의 종양 또는 말초 혈액으로부터, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 본원에 기재된 바와 같은 세포독성 림프구를 단리하는 것을 포함한다.
- [0250] 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 적합한 방법은, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 대상 PD-L1 결합 단백질을 코딩하는 핵산을 세포독성 림프구 내로 도입함으로써 세포독성 림프구를 유전자 변형시키는 것을 포함하며, 여기서 유전자 변형된 세포독성 림프구는, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 본원에 기재된 바와 같은 대상 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질

은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표시되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표시되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표시된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결합의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv

(scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0251]

일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 적합한 방법은 예를 들어, 유전자 변형된 세포독성 림프구를 확장시켜 유전자 변형된 세포독성 림프구의 집단을 제공하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9 또는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)로부터 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)로부터 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 렌티바이러스 벡터에 의해 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 동일한 벡터 또는 핵산 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 상이한 벡터 또는 핵산 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 벡터 또는 핵산 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함

하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0252]

일부 실시양태에서, 본 개시내용에 따른 적합한 방법은 예를 들어, 대상체의 질환 또는 장애, 예를 들어, 암 또는 만성 감염을 치료하기 위해 대상체에게 유전자 변형된 세포독성 림프구의 집단을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9 또는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)로부터 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)로부터 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 렌티바이러스 벡터에 의해 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 동일한 벡터 또는 핵산 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 상이한 벡터 또는 핵산 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 제1 벡터 또는 핵산 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 벡터 또는 핵산 상에서 코딩된다.

서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0253] 대상체로부터 세포독성 림프구를 분리하는 것

[0254] 대상체, 예를 들어, 인간 대상체로부터 세포독성 림프구를 분리하기 위한 많은 적합한 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있고, 임의의 편리한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 중앙 침윤 림프구는, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 신선한 환자 생검 시편으로부터 분리될 수 있다. 대안적으로, 세포독성 림프구는 대상체의 말초 혈액으로부터 획득될 수 있다. 한편 본원에 기재된 방법은 주로 ACT에 사용되는 자가 세포독성 림프구와 관련하여 기재된다. 일부 실시양태에서 세포독성 림프구는 하기 추가로 상세하게 논의된 바와 같이, 치료될 대상체 이외의 공급원으로부터 획득 또는 생성될 수 있다는 것에 주목하여야 한다.

[0255] 세포독성 림프구를 유전자 변형시키는 것

[0256] 본원에 기재된 바와 같은 대상 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 세포독성 림프구를 유전자 변형시키는 것은, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 대상 PD-L1 결합 단백질을 코딩하는 핵산을 세포독성 림프구 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 제1 및 제2 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 폴리펩티드 동일한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 폴리펩티드 상이한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드 제1 벡터 상에서 코딩된다. 이를 달성하기 위한 많은 방식이 관련 기술분야에 공지되어 있고, 임의의 편리한 방법이 사용될 수 있다 (예를 들어, 임의의 편리한 벡터 또는 벡터 조합, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 예를 들어, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 또는 다른 벡터를, 예를 들어 적합한 패키징 및 외피 플라스미드와 함께 사

용함). 렌티바이러스 벡터를 위한 조절 요소, 예를 들어, 프로모터는 특히 세포독성 림프구에서의 안정한 발현을 위해 선택될 수 있다. 예를 들어, 최소로 자극된 림프구 및 고도로 활성화된 림프구 둘 다와 함께 사용하기 위한, 뮤린 세포 바이러스 (MSCV) 프로모터를 함유하는 렌티바이러스 벡터의 용도를 기재하는 문헌 [Jones et al. Hum Gene Ther. 2009 Jun; 20(6): 630-640]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서 1종 이상의 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 1종 이상의 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 1종 이상의 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 1종 이상의 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 1종 이상의 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 1종 이상의 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0257]

일부 실시양태에서, 대상 PD-L1 결합 단백질 유전자는 세포독성 림프구 내로 도입된 더 큰 유전자 발현 카세트의 부분일 수 있으며, 이는 예를 들어 대상 PD-L1 유전자를 구동하는 프로모터 요소를 활성화시키는 세포 막 삼투 약물을 사용하여, 대상 PD-L1 결합 단백질의 유도성 발현을 가능하게 한다. 약물의 금단은 조절성 온/오프 대상 PD-L1 결합 단백질 발현을 가능하게 하는 유전자 발현을 차단할 것이다. 이러한 유도성 발현을 용이하게 하는 다수의 벡터가 이용가능하며, 테트라시클린- 및 테트라시클린 유사체- 유도성 벡터, 타목시펜-유도성 벡터, 뿐만 아니라 관련 기술분야에 공지된 다른 유도성 전사 시스템 벡터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합

부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표시되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표시되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표시된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서,

PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0258] 유도성 프로모터를 코딩하는 발현 벡터 (예를 들어, 렌티벡터)의 예의 개략도가 도 8에 제공된다. 기초 설계는 2종의 프로모터를 포함한다. 한 프로모터는 구성적으로 활성이고, 가용성 분자 (SM)에의 결합 시 입체형태를 변화시키는 입체형태적 전사 인자 (CTF)의 전사를 구동한다. 제2 프로모터는 CTF에 결합하여 관심 유전자를 구동한다. 2가지 가능성이 존재한다. 둘 다의 사례에서, CTF의 그의 프로모터에 대한 결합은 전사를 조정한다. 사례 1에서, SM의 첨가는 유도성 프로모터로부터 CTF를 방출시켜, 전사를 중지시킨다. 제2 사례에서, SM의 첨가는 CTF의 유도성 프로모터에 대한 결합 및 전사의 개시를 유도한다.

[0259] 발현 벡터 (예를 들어, 렌티벡터)의 또 다른 예의 개략도가 도 9에 제공되며, 이는 입체형태적 리프레서 단백질을 코딩하는 억제성 발현 벡터를 개략적으로 도시한다. 기초 설계는 2종의 프로모터를 포함한다. 프로모터 둘 다는 구성적으로 활성이다. 하나는 가용성 분자 (SM)에의 결합 시 입체형태를 변화시키는 입체형태적 리프레서 단백질 (CRP)의 전사를 구동한다. CRP는 CRP 결합 부위 (CRP-BS)에 결합하여 관심 유전자의 전사를 구동하는 제2 구성적 프로모터의 전사를 억제한다. 가용성 분자의 첨가는 CRP-BS로부터 CRP를 방출시켜 관심 유전자의 전사를 "해제"한다.

[0260] 도 16은 pLV4301G PDLV scFV 38A1 및 pLV4301G PDLV scFV 19H9를 포함하여, 본 발명의 방법과 함께 사용하기 위한 예시적인 바이러스 벡터의 추가의 개략도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다.

[0261] 상기 기재된 바와 같이 유도성 발현 벡터와 함께 이용되는 가용성 분자는 이러한 유도성 발현 벡터, 예를 들어, 테트라시클린 (또는 그의 유사체) 또는 타목시펜과 함께 사용하기 위한, 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 분자일 수 있다. 이러한 가용성 분자는 대상체에게, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 세포독성 림프구의 투여 전에, 그와 공동으로, 또는 그에 후속적으로, 본원에 기재된 방법 중 1종 이상에 따라 대상체에게 투여될 수 있다. 대안적으로, 또는 추가적으로, 상태에 반응성인 요소 및/또는 대상체 내의 목적하는 작용 부위, 예를 들어, 종양 미세환경에서 존재하는 분자를 포함하는 발현 벡터가 이용될 수 있다. 예를 들어, 저산소증 반응 요소를 포함하는 발현 벡터가 고형 종양의 저산소 미세환경에서의 발현을 선택적으로 유도하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Wang et al. Cancer Gene Ther. 2005 Mar;12(3):276-83]을 참조한다.

[0262] 바이러스 및 비-바이러스 방법을 포함할 수 있는 추가의 형질감염 방법이 세포독성 림프구 내로 대상 PD-L1 결합 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는데 적절하게 이용될 수 있다. 세포독성 림프구 내로의 전달을 용이하게 하는데 이용될 수 있는 방법은 예를 들어, 전기천공, 입자 충격 (유전자 총), 초음파천공, 마그네토펙션, 유체 역학 전달, 나노입자 전달, 리포펙션 등을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 38A1 또는 19H9이다. 일부 실시양태에서, 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 38A1이다. 일부 실시양태에서, 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 19H9이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양

태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 1종 이상의 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 경쇄는 제1 벡터에 의해 코딩되고, 중쇄는 제2 벡터에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서 1종 이상의 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 1종 이상의 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 1종 이상의 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 1종 이상의 벡터에 의해 코딩된 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0263] 바이러스 생산

[0264] 일부 실시양태에서, 형질감염을 위한 바이러스 벡터는 관련 기술분야에 널리 공지된 임의의 방법을 사용하여 생산된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스

백터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 pLEV 기반 바이러스 백터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 감마레트로바이러스 기반 백터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 pMSCIV 기반 백터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 백터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 백터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 백터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 백터이다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표시되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표시되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표시된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결합의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 동일한 백터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 상이한 백터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 제1 백터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 백터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된)

단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0265] 일부 실시양태에서, 5 ml 세포 배양 배지를 함유하는 10 mm 조직 배양 플레이트에 5×10^6 개 포에닉스 세포를 플레이트링하는 것을 포함하는 방법을 사용하는 형질감염을 위한 바이러스 벡터가 생산된다. 일부 실시양태에서, 리포펙타민을 사용하여 항-PD-1 scFV 및 6 μ g pVSV-G를 함유하는 10 μ g pLEV (렌티바이러스 벡터)로 세포를 형질감염시키는 것을 추가로 포함하는 방법을 사용하는 형질감염을 위한 바이러스가 생산된다. 일부 실시양태에서, 60분 후에 상청액을 수집하고 70 μ M 스트레이너에 의해 15 ml 튜브 내로 여과하는 것을 추가로 포함하는 방법을 사용하는 형질감염을 위한 바이러스가 생산된다. 일부 실시양태에서, 하기 단계: 1) 5 ml 세포 배양 배지를 함유하는 10 mm 조직 배양 플레이트에 5×10^6 개 포에닉스 세포를 플레이트링하는 단계; 2) 리포펙타민을 사용하여 항-PD-1 scFV 및 6 μ g pVSV-G를 함유하는 10 μ g pLEV (렌티바이러스 벡터)로 세포를 형질감염시키는 단계; 및 3) 60시간 후에, 상청액을 수집하고 70 μ M 스트레이너에 의해 15 ml 튜브 내로 여과하는 단계를 포함하는 방법을 사용하는 형질감염을 위한 바이러스가 생산된다.

[0266] T-세포 형질도입

[0267] 일부 실시양태에서, 예를 들어 세포독성 림프구를 포함한 T-세포는 바이러스 벡터에 의해 형질도입된다 (즉, 바이러스 벡터에 의해 유전자 변형된다). 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 PD-L1 결합 단백질을 코딩하는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, T-세포, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, T-세포, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, T-세포, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의

해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 동일한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 상이한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 제1 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0268] 일부 실시양태에서, T-세포는 12-웰-플레이트 내 2 ml TIL 배양 배지 중 300 ng/ml의 농도의 항-CD3으로 1×10^6 개의 TIL을 활성화시키는 것을 포함하는 방법을 사용하여 형질도입된다. 일부 실시양태에서, 형질도입 방법은 48시간 후에, TIL을 2개의 웰로 분할하고, 1 ml의 상청액 (바이러스 생산에서의 단계 3으로부터)을 8 μ g/ml의 농도의 폴리브렌과 함께 각각의 웰 내로 첨가하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 형질도입 방법은 32°C에서 800 x g로 30분 동안 세포를 원심분리하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 형질도입 방법

은 바이러스 함유 배지를 제거하고 세포 펠릿을 2 ml의 신선한 완전 배양 배지에 재현탁시키고, 세포를 24시간 동안 인큐베이션하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 형질도입 방법은 하기 제공된 유전자 변형된 세포독성 림프구의 확장, 뿐만 아니라 TIL 집단 내 세포독성 림프구의 확장에 적용될 수 있는 TIL의 확장에 대한 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 방법을 사용하여 세포를 증식시키는 것을 추가로 포함한다.

[0269] 종양 샘플

[0270] 일부 실시양태에서, 방법은 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 획득하는 것을 포함하며, 여기서 종양 샘플은 TIL 함유 세포독성 림프구를 포함한다. 종양 조직 샘플은 종양 생검 또는 부검을 포함하나 이에 제한되지는 않는 수많은 공급원으로부터 획득될 수 있다. 종양 조직 샘플은 본원에 기재된 임의의 암을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 암으로부터 획득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 암은 흑색종이다. 종양 조직 샘플은 임의의 포유동물로부터 획득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 조직 샘플은 인간으로부터 획득된다. 일부 실시양태에서, 종양 조직 샘플은 종양 조직 단편일 수 있다. 종양 조직 샘플은 종양 조직 단편을 제공하기 위해, 예를 들어 절개에 의해 단편화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 대안적으로 또는 추가적으로, 종양 조직 샘플은 임의로 효소적으로 또는 기계적으로 소화될 수 있다. 종양 조직 샘플을 단편화하기 위한 적합한 효소는 콜라게나제를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 종양 조직 샘플은 소화 없이 단편화된다. 종양 조직 단편은 임의의 적합한 크기일 수 있다. 바람직하게는, 종양 조직 단편은 약 1 mm^3 이하 내지 약 8 mm^3 이상, 약 1 mm^3 내지 약 4 mm^3 , 약 1 mm^3 내지 약 2 mm^3 , 또는 약 1 mm^3 의 크기를 갖는다.

[0271] 개시된 조성물 및 방법에 의해 치료된 암은 일부 측면에서 TIL이 생산될 수 있는 임의의 고형 종양일 수 있다. 암은 또한 전이성 및/또는 재발성일 수 있다. 암은 임의의 급성 림프구성 암, 급성 골수성 백혈병, 폐포 횡문근육종, 골암, 뇌암, 유방암, 항문, 항문관 또는 항문직장의 암, 안암, 간내 담관암, 관절암, 경부, 담낭 또는 흉막의 암, 코, 비강 또는 중이의 암, 구강암, 외음부암, 만성 림프구성 백혈병, 만성 골수성암, 결장암, 식도암, 자궁경부암, 소화관암, 위암, 위장 카르시노이드 종양, 신경교종, 간담도암, 호지킨 림프종, 하인두암, 신장암, 후두암, 간암, 폐암, 악성 중피종, 흑색종, 다발성 골수종, 비인두암, 비-호지킨 림프종, 난소암, 췌장암, 복막, 망 및 장간막 암, 인두암, 전립선암, 직장암, 신암, 피부암, 소장암, 연부조직암, 위암, 고환암, 갑상선암, 요관암, 및 방광암을 포함한 임의의 암일 수 있다. 일부 실시양태에서, 암은 흑색종이다. 일부 실시양태에서, 암은 전이성 흑색종이다.

[0272] 본원에 사용된 용어 "포유동물"은 설치목의 포유동물, 예컨대 마우스 및 햄스터, 및 토끼목의 포유동물, 예컨대 토끼를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 포유동물을 지칭한다. 포유동물이 고양이과 (고양이) 및 개과 (개)를 포함한 식육목으로부터의 포유동물인 것이 바람직하다. 포유동물이 소과 (소) 및 돼지과 (돼지)를 포함한 우제목, 또는 말과 (말)를 포함한 기제목으로부터의 포유동물인 것이 보다 바람직하다. 포유동물이 영장류, 세보이드 또는 시모이드 목 (원숭이) 또는 진원류 목 (인간 및 유인원)의 포유동물인 것이 가장 바람직하다. 일부 실시양태에서, 포유동물은 인간이다.

[0273] TIL 함유 세포독성 림프구의 일반적 확장 방법

[0274] 종양-침윤 림프구 (TIL) 함유 세포독성 림프구 생산은 일반적으로 2-단계 과정이다: 1) 세포를 표준 실험실 배지 예컨대 RPMI에서 성장시키고 TIL을 시약 예컨대 조사된 피더 세포 및 항-CD3 항체로 처리하여 목적하는 효과를 달성하는 사전-REP (급속 확장) 단계; 및 2) 환자를 치료하기에 충분히 큰 배양물 양으로 TIL 함유 세포독성 림프구를 확장시키는 REP 단계. REP 단계는 cGMP (현행 우수 제조 절차) 등급 시약 및 30-40 L의 배양 배지를 요구한다. 그러나, 사전-REP 단계는 실험실 등급 시약을 이용할 수 있으며 (실험실 등급 시약이 REP 단계 동안 희석되어 나온다는 가정 하에), 이는 TIL 생산을 개선시키기 위한 대안적 전략의 혼입을 보다 용이하게 한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 개시된 TLR 효능제 및/또는 펩티드 또는 펩티드모방체는 사전-REP 단계 동안 배양 배지에 포함될 수 있다. 사전-REP 배양물은 일부 실시양태에서 IL-2를 포함한다.

[0275] 일부 실시양태에서, ACT는 (i) 포유동물로부터 자가 TIL 함유 세포독성 림프구를 획득하고, (ii) 자가 TIL 함유 세포독성 림프구를 배양하여 확장된 림프구를 생산하고 (예를 들어, REP 포함), (ii) 포유동물에게 확장된 TIL 함유 세포독성 림프구를 투여함으로써 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL 함유 세포독성 림프구는 종양-유래되며, 즉, 이들은 세포독성을 함유하는 TIL이고, 치료된 포유동물로부터 단리된다, 즉 자가 전달된다. 일부 실시양태에서, 자가 TIL 함유 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 자가 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 자가 림프구는 바이러스 벡터를 사용하여 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 자가 림프구는

배양 전 또는 후에, 그러나 포유동물에 대한 투여 전에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결합의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 동일한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 상이한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 제1 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을

포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0276]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 자가 ACT는 또한 (i) 자가 TIL 함유 세포독성 림프구를 배양하여 확장된 림프구를 생산하고; (ii) 포유동물에게 비골수절제 림프구고갈 화학요법을 임의로 투여하고; (iii) 비골수절제 림프구고갈 화학요법을 임의로 투여한 후, 포유동물에게 확장된 TIL 함유 세포독성 림프구를 투여함으로써 수행될 수 있다. 자가 TIL은 절제된 종양의 기질로부터 획득될 수 있다. 이를 위해, 종양 샘플이 환자로부터 획득되고 단세포 현탁액이 획득된다. 단세포 현탁액은 임의의 적합한 방식으로, 예를 들어 기계적으로 (예를 들어, 캘리포니아주 오번 소재 밀테니 바이오텍의 겐틀맥스(gentleMACS)TM 해리기를 사용하여 종양을 분해함) 또는 효소적으로 (예를 들어, 콜라게나제 또는 DNase) 획득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 자가 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 자가 림프구는 바이러스 벡터를 사용하여 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 자가 림프구는 배양 전 또는 후에, 그러나 포유동물에 대한 투여 전에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 획득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유

동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결합의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 동일한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 상이한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 제1 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0277]

종양-침윤 림프구를 포함한 림프구, 예컨대 T-세포의 확장은 하기 본원에 기재된 것들을 포함한, 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 임의의 다수의 방법에 의해 수행될 수 있다. 예를 들어, T-세포는 퍼디 림프구 및 인터류킨-2 (IL-2), IL-7, IL-15, IL-21 또는 그의 조합의 존재 하에 비-특이적 T-세포를 사용하여 급속하게 확장될 수 있다. 비-특이적 T-세포 수용체 자극은, 예를 들어 약 30 ng/ml의 마우스 모노클로날 항-CD3 항체인 OKT3

(뉴저지주 라리탄 소재 오르토-맥네일(Ortho-McNeil)TM 또는 독일 베르기쉬 글라드바흐 소재 밀테니 바이오텍으로부터 입수가능함)을 포함할 수 있다. 대안적으로, T-세포는 T-세포 성장 인자, 예컨대 약 200-400 μ l/ml, 예컨대 300 IU/ml IL-2 또는 IL-15 (IL-2가 바람직함)의 존재 하에 벡터로부터 임의로 발현될 수 있는 암의 1종 이상의 항원 (그의 항원 부분, 예컨대 에피토프(들), 또는 세포), 예컨대 인간 백혈구 항원 A2 (HLA-A2) 결합 펩티드, 예를 들어 대략 0.3 μ M MART-1:26-35 (27 L) 또는 gp100:209-217 (210M)에 의한 시험관내 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 자극에 의해 급속하게 확장될 수 있다. 시험관내-유도된 T-세포는 HLA-A2-발현 항원-제시 세포 상으로 펄스된 암의 동일한 항원(들)에 의한 재자극에 의해 급속하게 확장된다. 대안적으로, T-세포는, 예를 들어 조사된 자가 림프구 또는 조사된 HLA-A2+ 동종 림프구 및 IL-2에 의해 재자극될 수 있다. 예를 들어, 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함된 국제 특허 공개 WO 2015/143328을 참조한다.

[0278] 확장된 TIL의 특이적 종양 반응성은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어 종양 세포와의 공동-배양 후 시토카인 방출 (예를 들어, 인터페론-감마)을 측정함으로써 시험될 수 있다. 한 실시양태에서, 자가 ACT 방법은 세포의 급속 확장 전 배양된 TIL에 CD8+ T-세포를 풍부화시키는 것을 포함한다. IL-2 하에 TIL의 배양 후, 예를 들어 CD8 마이크로비드 분리 (예를 들어, 클리니맥스(CliniMACS)<플러스>CD8 마이크로비드 시스템 (밀테니 바이오텍)을 사용함)를 사용하여 T-세포는 CD4+ 세포가 고갈되고 CD8+ 세포가 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 자가 T-세포의 성장 및 활성화를 촉진하는 T-세포 성장 인자는 자가 T-세포와 병용으로 또는 자가 T-세포에 후속적으로 포유동물에게 투여된다. T-세포 성장 인자는 자가 T-세포의 성장 및 활성화를 촉진하는 임의의 적합한 성장 인자일 수 있다. 적합한 T-세포 성장 인자의 예는 인터류킨 (IL)-2, IL-7, IL-15, IL-12 및 IL-21을 포함하며, 이는 단독으로 사용될 수 있거나 또는 다양한 조합으로, 예컨대 IL-2 및 IL-7, IL-2 및 IL-15, IL-7 및 IL-15, IL-2, IL-7 및 IL-15, IL-12 및 IL-7, IL-12 및 IL-15, 또는 IL-12 및 IL-2로 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 4-1BB 공-자극 증진은 입양 세포 요법을 위한 활성 TIL 확장을 증가시키는데 사용될 수 있다.

[0279] 유전자 변형된 세포독성 림프구의 확장

[0280] TIL 함유 세포독성 림프구의 확장 및/또는 유전자 변형된 세포독성 림프구의 집단을 제공하기 위한 유전자 변형된 세포독성 림프구의 확장 (즉, REP)은, 예를 들어 대상체 (예를 들어 포유동물 포함)에 대한 재도입을 위해, TIL 함유 세포독성 림프구를 생체의 배양하여 TIL 함유 세포독성 림프구의 집단을 제공하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 대상체로부터 또는 동종 공여자로부터 백혈구분리반출술에 의해 분리된, 조사된 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) (피더 세포), 및 적합한 시약 예컨대 인터류킨 2 (IL-2), 예를 들어 인간 IL-2, 및 OKT3 (항-CD3 항체)을 함유하는 적합한 배지에서 배양된다. PBMC의 사용에 대한 대안으로서, 인공 항원 제시 세포, 예를 들어 인간 Fc 수용체 CD32 및 CD64를 발현하도록 유전자 변형된 K562 세포이며 이에 의해 α CD3 및 α CD28 모노클로날 항체에 결합하고 이를 제시할 수 있는 K562 세포가 세포독성 림프구의 확장에 사용될 수 있다. 다양한 공동자극 분자를 발현하는 인공 항원 제시 세포를 포함한 이러한 인공 항원 제시 세포는, 예를 들어 문헌 [Turtle and Riddell Cancer J. 2010 Jul-Aug; 16(4): 374-381]에 기재되어 있다.

[0281] 확장 단계의 일부로서 또는 추가의 단계(들)로서, 예를 들어 1종 이상의 면역학적 검정을 통해 관심 TIL 및/또는 세포독성 림프구 (예를 들어, 1종 이상의 종양 연관 항원에 대한 수용체를 발현하는 세포독성 림프구)를 풍부화시키는 1개 이상의 선택 단계가 수행될 수 있다.

[0282] TIL 이외에도, 세포독성 림프구, 대식세포, 단핵구 및 자연 킬러 (NK) 세포는 또한 TIL에 대해 본원에 기재된 바와 같이 종양 조직 샘플로부터 수득되고, 배양되고, 확장될 수 있다. 따라서, 방법은 또한 포유동물에게 대식세포, 단핵구 및 자연 킬러 (NK) 세포를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 방법은, 예를 들어 REP 확장 단계(들)를 포함한 세포독성 림프구의 확장에 사용될 수 있다.

[0283] TIL 함유 세포독성 림프구를 포함하는 종양 샘플을 수득한 후, TIL 및/또는 세포독성 림프구가 확장된다. 일부 실시양태에서, TIL 함유 세포독성 림프구 및/또는 유전자 변형된 세포독성 림프구를 증식시키는 방법은 (i) IL-2를 사용하는 것을 포함하여, TIL 함유 세포독성 림프구를 배양하는 단계 (즉, 사전-REP); (ii) 배양된 세포독성 림프구를 OKT3 항체, IL-2 및 피더 림프구를 사용하여 확장시키며, 여기서 배양된 세포독성 림프구는 세포독성 림프구의 확장 전에 CD8+ T-세포가 풍부화되는 것인 단계 (즉, REP); (iii) 포유동물에게 비골수절제 림프구 고갈 화학요법을 임의로 투여하는 단계; 및 (iv) 비골수절제 림프구고갈 화학요법을 임의로 투여한 후, 포유동물에게 확장된 세포독성 림프구를 투여하며, 여기서 포유동물에게 투여된 세포독성 림프구는 약 19 내지 약 35 일령이고 특이적 종양 반응성에 대해 스크리닝되지 않은 것인 단계를 포함하며, 이에 의해 포유동물에서의 암의 퇴행이 촉진된다. 일부 실시양태에서, 투여된 세포독성 림프구는 약 35일령 미만, 예를 들어 약 19 내지 약 26

일령이다. 예를 들어 미국 특허 번호 8,383,099에 기재된 그러한 방법, 뿐만 아니라 본원에 제공된 방법을 참조한다.

[0284]

일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 수득한 후 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 TIL 함유 세포독성 림프구를 배양하기 전 또는 후에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 배양된 세포독성 림프구를 OKT3 항체, IL-2 및 피더 림프구를 사용하여 확장시키기 전 또는 후에 유전자 변형되며, 여기서 배양된 세포독성 림프구는 TIL 및/또는 세포독성 림프구의 확장 전에 CD8⁺ T-세포가 풍부화된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 포유동물에게 투여하기 전에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 바이러스 벡터를 사용하여 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 동일한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 폴리펩티드는 상이한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리펩티드는 제1 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 제2 폴리펩티드는 제2 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포 측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포 측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포 측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포 측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 동일한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 상이한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 제1 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는

항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0285] 일부 실시양태에서, 약 19 내지 약 35일령인 세포독성 림프구는 약 44일령 이상인 세포독성 림프구와 비교하여 개선된 생체내 증식, 생존 및 항종양 활성을 제공하는 것으로 여겨진다. 더욱이, 비글수절제 화학요법을 포함하는 실시양태에서, 본 발명의 방법은 전신 방사선 조사 (TBI)를 수반하는 치료에 적격이 아닌 환자, 예컨대, 예를 들어 치료 전에 이미 골수절제 요법, 예를 들어 방사선요법을 받은 환자; 동반이환 상태를 갖는 환자; 및 2×10^6 개 미만의 CD34⁺ 세포/kg을 갖는 환자를 치료하기 위해 유리하게 사용될 수 있다.

[0286] 일부 실시양태에서, 입양 세포 요법 (ACT)을 위한 세포독성 림프구를 생성하는데 요구되는 기간은 평균 약 44일에서 약 19 내지 약 35일 (또는 약 35일 미만, 예를 들어 약 19 내지 약 29일, 또는 약 19 내지 약 26일)로 단축될 수 있다. 따라서, 보다 많은 환자는 그의 질환 부담이 ACT의 투여가 더 이상 안전하거나 가능하지 않을 수 있는 단계로 진행되기 전에 치료될 수 있다. 일부 실시양태에서, 방법은 투여 전에 특이적 항원 반응성의 시험관내 시험을 요구하지 않고, 본 발명의 방법은 환자의 치료와 연관된 시간, 비용 및 노동을 감소시킨다. 추가적으로, 본 발명의 방법은 마이크로배양물로부터 유래된 것 대신에 벌크 배양물로부터 풀링된 세포독성 림프구를 투여하는 것을 사용할 수 있다.

[0287] 방법의 한 실시양태는 자가 세포독성 림프구를 배양하는 것을 포함한다. 종양 샘플이 환자로부터 수득되고 단세포 현탁액이 수득된다. 단세포 현탁액은 임의의 적합한 방식으로, 예를 들어 기계적으로 (예를 들어, 캘리포니아주 오번 소재 밀테니 바이오텍의 젠틀맥스™ 헤리기를 사용하여 종양을 분해함) 또는 효소적으로 (예를 들어, 콜라게나제 또는 DNase) 수득될 수 있다. 종양 효소적 소화물의 단세포 현탁액은, 예를 들어 다중 웰에서 인터류킨-2 (IL-2) 하에 배양된다. 세포는, 예를 들어 약 5 내지 약 21일, 바람직하게는 약 10 내지 약 14일간 전면생장률 (예를 들어, 약 2×10^6 개 림프구)까지 배양된다. 예를 들어, 세포는 5일, 5.5일, 또는 5.8일 내지 21일, 21.5일, 또는 21.8일, 바람직하게는 10일, 10.5일, 또는 10.8일 내지 14일, 14.5일, 또는 14.8일간 배양될 수 있다.

[0288]

일부 실시양태에서, 방법은 배양된 TIL 함유 세포독성 림프구를 확장시키는 것을 포함한다. 배양된 TIL 함유 세포독성 림프구는 폴딩되고, 급속하게 확장된다. 급속 확장은 약 10일 내지 약 14일, 및 일부 실시양태에서, 약 14일의 기간에 걸쳐 적어도 약 50배 (예를 들어, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 또는 100배, 또는 그 초과)의 항원-특이적 T-세포의 수의 증가를 제공한다. 일부 실시양태에서, 급속 확장은 약 10 내지 약 14일, 일부 실시양태에서, 약 14일의 기간에 걸쳐 적어도 약 200배 (예를 들어, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 또는 그 초과)의 증가를 제공한다. 일부 실시양태에서, 급속 확장은 약 10 내지 약 14일, 일부 실시양태에서, 약 14일의 기간에 걸쳐 적어도 약 1000배의 증가를 제공한다. 일부 실시양태에서, 급속 확장은 약 14일의 기간에 걸쳐 약 1000배의 증가를 제공한다. 일부 실시양태에서, 배양된 TIL 함유 세포독성 림프구는 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 배양된 TIL 함유 세포독성 림프구는 바이러스 벡터를 사용하여 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서

PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0289] 확장은 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 임의의 다수의 방법에 의해 달성될 수 있다. 예를 들어, 세포독성 림프구는 퍼더 림프구 및 인터류킨-2 (IL-2) 또는 인터류킨-15 (IL-15) (IL-2가 바람직함)의 존재 하에 비-특이적 T-세포를 사용하여 급속하게 확장될 수 있다. 비-특이적 T-세포 수용체 자극은 약 30 ng/ml의 마우스 모노클로날 항-CD3 항체인 OKT3 (뉴저지주 라리탄 소재 오르토-맥네일[™]로부터 입수가능함)을 포함할 수 있다. 대안적으로, 세포독성 림프구는 T-세포 성장 인자, 예컨대 300 IU/ml IL-2 또는 IL-15의 존재 하에 벡터로부터 임의로 발현될 수 있는 암의 1종 이상의 항원 (그의 항원 부분, 예컨대 에피토프(들), 또는 세포), 예컨대 인간 백혈구 항원 A2 (HLA-A2) 결합 펩티드, 예를 들어 0.3 μ M MART-1:26-35 (27 L) 또는 gp100:209-217 (210M)에 의한 시험관내 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 자극에 의해 급속하게 확장될 수 있다. 일부 실시양태에서, T-세포 성장 인자는 IL-2인 것이 바람직하다. 시험관내-유도된 세포독성 림프구는 HLA-A2-발현 항원-제시 세포 상으로 펄스된 암의 동일한 항원(들)에 의한 재자극에 의해 급속하게 확장된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는, 예를 들어 조사된 자가 림프구 또는 조사된 HLA-A2+ 동종 림프구 및 IL-2에 의해 재자극될 수 있다.

[0290] 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구의 성장 및 활성화를 촉진하는 T-세포 성장 인자는 TIL과 병용으로 또는 TIL에 후속적으로 포유동물에게 투여된다. T-세포 성장 인자는 TIL의 성장 및 활성화를 촉진하는 임의의 적합한 성장 인자일 수 있다. 적합한 T-세포 성장 인자의 예는 인터류킨 (IL)-2, IL-7, IL-15, 및 IL-12를 포함하며, 이는 단독으로 사용될 수 있거나 또는 다양한 조합으로, 예컨대 IL-2 및 IL-7, IL-2 및 IL-15, IL-7 및 IL-15, IL-2, IL-7 및 IL-15, IL-12 및 IL-7, IL-12 및 IL-15, 또는 IL-12 및 IL-2로 사용될 수 있다. IL-2가 바람직한 T-세포 성장 인자이다.

[0291] 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 TIL 및/또는 세포독성 림프구의 성장 및 활성화를 촉진하는 T-세포 성장 인자를 발현하도록 추가로 변형된다. 적합한 T-세포 성장 인자는, 예를 들어 상기 기재된 것들 중 임의의 것을 포함한다. 적합한 변형 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; 및 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 변형된 TIL 및/또는 세포독성 림프구는 T-세포 성장 인자를 높은 수준으로 발현한다. T-세포 성장 인자 코딩 서열, 예컨대 IL-12의 것은, T-세포 성장 인자 코딩 서열에 대한 작동가능한 연결이 높은-수준 발현을 촉진하는 프로모터와 같이, 관련 기술분야에서 용이

하게 이용가능하다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 세계 지적 재산권 기구 특허 출원 공개 번호 WO 2010/126766 (이는 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이 IL-12를 발현하도록 변형될 수 있다.

[0292] 일부 실시양태에서, 2종의 시토카인은 단일 시토카인보다 더 효과적일 수 있고, 일부 실시양태에서, 3종의 시토카인, 예를 들어 IL-2, IL-7 및 IL-15는 임의의 2종의 시토카인보다 더 효과적일 수 있다. IL-15는 종양-특이적 CD8⁺ T-세포 반응을 증진시킨다고 여겨진다. 이와 관련하여, IL-2와 함께 IL-15-배양된 세포의 투여 (예컨대 볼루스 주사)는 특히 효과적일 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-15를 발현하도록 변형된 TIL 및/또는 세포독성 림프구는 볼루스 주사로서 IL-2와 함께 투여될 수 있다.

[0293] T-세포 성장 인자는 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 1종 초과 T-세포 성장 인자가 투여되는 실시양태에서, 이들은 동시에 또는 순차적으로, 임의의 순서로, 및 동일한 경로 또는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, T-세포 성장 인자, 예컨대 IL-2는 볼루스 주사로서 정맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, T-세포 성장 인자, 예컨대 IL-2의 투여량은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 높은 것으로 간주되는 것이다. 일부 실시양태에서, 특히 암이 흑색종인 경우에, 내성까지 IL-2의 용량 약 720,000 IU/kg이 매일 3회 투여된다. 일부 실시양태에서, IL-2의 약 5 내지 약 15회 용량, 평균 약 8회 용량이 투여된다.

[0294] TIL 및/또는 세포독성 림프구는 각각의 종양 세포 계능에 의해 코딩되는 10,000개로 추정되는 유전자 돌연변이의 결과로서 생산된 고유한 항원 중 임의의 것을 인식할 수 있다. 그러나, 항원은 고유할 필요가 없다. TIL 및/또는 세포독성 림프구는 암의 1종 이상의 항원의 항원 부분, 예컨대 에피토프, 또는 세포를 포함한, 암의 1종 이상의 항원을 인식할 수 있다. "암의 항원" 및 "그 암의 항원"은 모든 상기 언급된 항원을 포괄하도록 의도된다. 암이 흑색종, 예컨대 전이성 흑색종인 경우에, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 MART-1 (예컨대 MART-1:26-35 (27L)), gp100 (예컨대 gp100 : 209-217 (210M)), 또는 종양-코딩된 돌연변이로부터 유래된 "고유한" 또는 환자-특이적 항원을 인식할 수 있다. TIL에 의해 인식될 수 있는 다른 적합한 흑색종 항원은 티로시나제, 티로시나제 관련 단백질 (TRP)1, TRP2 및 MAGE를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. TIL은 또한 항원, 예컨대, 예를 들어 NY-ESO-1, 텔로머라제, p53, HER2/neu, 암배아성 항원, 또는 폐 암종, 유방암, 결장암, 전립선암 등의 치료를 위한 전립선-특이적 항원을 인식할 수 있다.

[0295] 일부 실시양태에서, 방법은 포유동물 비골수절제 림프구고갈 화학요법을 임의로 투여하는 것을 포함한다. 비골수절제 림프구고갈 화학요법은 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있는 임의의 적합한 이러한 요법일 수 있다. 특히 암이 전이성일 수 있는 흑색종인 경우에, 비골수절제 림프구고갈 화학요법은, 예를 들어 시클로포스파미드 및 플루다라빈의 투여를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드 및 플루다라빈을 투여하는 경로는 정맥내이다. 마찬가지로, 시클로포스파미드 및 플루다라빈의 임의의 적합한 용량이 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 약 25 mg/m²의 플루다라빈이 5일 동안 투여된 후 2일 동안 약 60 mg/kg의 시클로포스파미드가 투여된다. 일부 실시양태에서, 약 25 mg/m²의 플루다라빈이 5일 동안 투여된 후 2일 동안 약 60 mg/kg의 시클로포스파미드가 투여되고, 암/종양은 흑색종이다.

[0296] 일부 실시양태에서, 방법은 비골수절제 림프구고갈 화학요법을 임의로 투여한 후에, 포유동물에게 확장된 세포독성 림프구를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 포유동물에게 투여된 세포독성 림프구는 약 19 내지 약 35일령이다. 예를 들어, 투여된 세포독성 림프구는 19일, 19.5일, 또는 19.8일 내지 35일, 35.5일, 또는 35.8일령일 수 있다. 일부 실시양태에서, 포유동물에게 투여된 세포독성 림프구는 약 19일 내지 약 29일령, 또는 약 23일 내지 약 29일령, 또는 약 26일령이다. 예를 들어, 투여된 세포독성 림프구는 19일, 19.5일, 또는 19.8일 내지 29, 29.5, 또는 29.8일령; 23, 23.5, 또는 23.8 내지 29, 29.5, 또는 29.8일령; 또는 26, 26.5, 또는 26.8일령일 수 있다. 일부 실시양태에서, 포유동물에게 투여된 세포독성 림프구는 "어린" 세포독성 림프구, 즉, 최소로 배양된 세포독성 림프구, 또는 19일 내지 약 29일령, 또는 약 23일 내지 약 29일령, 또는 약 26일령의 세포독성 림프구이다.

[0297] 본 발명의 한 실시양태에 따라 포유동물에게 투여된 어린 세포독성 림프구 배양물은 유리하게는 생체내 지속성, 증식 및 항종양 활성과 연관된 특색을 갖는다. 예를 들어, 어린 세포독성 림프구 배양물은 약 44일령인 세포독성 림프구보다 더 높은 CD27 및/또는 CD28 발현을 갖는다. 특정한 이론에 얽매이지는 않지만, CD27 및 CD28은 증식, 생체내 지속성 및 세포독성 림프구의 덜 분화된 상태와 연관되는 것으로 여겨진다 (이론에 얽매이지는 않지만, 세포독성 림프구의 증가된 분화는 생체내에서 기능하는 세포독성 림프구의 능력에 부정적인 영향을 미치는 것으로 여겨진다). CD27의 보다 높은 수준을 발현하는 세포독성 림프구는 CD27-저 세포보다 더 우수한 항종양 활성을 갖는 것으로 여겨진다. 더욱이, 어린 세포독성 림프구 배양물 (예를 들어, 19일 내지 약 29일령, 또

는 약 23일 내지 약 29일령, 또는 약 26일령)은 약 44일령인 세포독성 림프구보다 더 높은 빈도의 $CD4^{+}$ 세포를 갖는다.

[0298] 추가로, 어린 세포독성 림프구 배양물은 약 44일령인 세포독성 림프구의 경우보다 더 긴 평균 텔로미어 길이를 갖는다. 특정한 이론에 얽매이지는 않지만, 세포독성 림프구는 배양 중 1주일에 0.8 kb로 추정되는 텔로미어 길이를 상실하고 어린 세포독성 림프구 배양물은 약 44일령인 세포독성 림프구보다 약 1.4 kb 더 긴 텔로미어를 갖는 것으로 여겨진다. 특정한 이론에 얽매이지는 않지만, 보다 긴 텔로미어 길이는 대상체에서의 양성 객관적 임상 반응 및 생체내 세포의 지속성과 연관되는 것으로 여겨진다.

[0299] 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 환자에게 투여 전에 종양 반응성 세포독성 림프구를 확인하기 위해 특이적 종양 반응성에 대해 시험되지 않는다. 특이적 종양 반응성은 종양 세포와의 공동-배양 후 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어 시토카인 방출 (예를 들어, 인터페론- γ)을 측정함으로써 시험될 수 있다. 본 발명의 방법은 유리하게는 특이적 종양 인식에 대한 사전 스크리닝의 필요성 없이 포유동물에게 세포독성 림프구를 투여함으로써 포유동물에서의 암의 퇴행을 촉진하는 것을 가능하게 한다. 방법의 실시양태는, 원하는 경우에, 세포독성 림프구를 포유동물에게 투여하기 전에 세포독성 림프구를 효력에 대해 비-항원-특이적 방식으로 시험하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구 효력은, 예를 들어 OKT3 자극 후 시토카인 방출을 측정하는 비-특이적 효력 검정에 의해 임의로 시험될 수 있다. T-세포는, 예를 들어 인터페론 (IFN) 방출이 약 50 pg/mL 초과, 약 100 pg/mL 초과, 약 150 pg/mL 초과, 또는 약 200 pg/mL 초과인 경우에, 강력한 것으로 간주될 수 있다. 방법의 덜 바람직한 실시양태는 확장된 세포독성 림프구를 특이적 종양 반응성에 대해 시험하여 종양-반응성 세포독성 림프구를 확인하는 것을 포함한다.

[0300] 일부 실시양태에서, 본 발명은 (i) IL-2를 사용하는 것을 포함하여, 자가 세포독성 림프구 및/또는 유전자 변형된 세포독성 림프구 (일부 실시양태에서, 자가 유전자 변형된 세포독성 림프구)를 배양하는 단계 (즉, 사전-REP); (ii) 배양된 세포독성 림프구를 OKT3 항체, IL-2 및 피더 림프구를 사용하여 확장시키며, 여기서 배양된 세포독성 림프구는 세포독성 림프구의 확장 전에 $CD8^{+}$ T-세포가 풍부화되는 것인 단계; (iii) 포유동물에게 비골수절제 림프구고갈 화학요법을 임의로 투여하는 단계; 및 (iv) 비골수절제 림프구고갈 화학요법을 임의로 투여한 후, 포유동물에게 확장된 세포독성 림프구를 투여하며, 여기서 포유동물에게 투여된 세포독성 림프구는 약 19일 내지 약 29일령, 또는 약 23일 내지 약 29일령, 또는 약 26일령인 단계를 포함하며, 이에 의해 포유동물에서의 암의 퇴행이 촉진되는 것인, 포유동물에서 암의 퇴행을 촉진하는 방법을 제공한다. 예를 들어, 포유동물에게 투여된 세포독성 림프구는 19일 내지 약 29일령, 또는 약 23일 내지 약 29일령일 수 있다. 일부 실시양태에서는, 약 19일 내지 약 29일령, 또는 약 23일 내지 약 29일령, 또는 약 26일령이다. 일부 실시양태에서, 배양된 TIL 함유 세포독성 림프구는 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 배양된 TIL 함유 세포독성 림프구는 바이러스 벡터를 사용하여 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 배양된 TIL 함유 세포독성 림프구는 배양하기 전 또는 후에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 배양된 TIL 함유 세포독성 림프구는 배양된 TIL 함유 세포독성 림프구를 OKT3 항체, IL-2 및 피더 림프구를 사용하여 확장시키기 전 또는 후에 유전자 변형되며, 여기서 배양된 세포독성 림프구는 세포독성 림프구의 확장 전에 $CD8^{+}$ T-세포가 풍부화된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은

19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

- [0301] 일부 실시양태에서, 방법은 본원에 기재된 바와 같은 자가 T-세포를 약 19일 내지 약 29일, 또는 약 23일 내지 약 29일, 또는 약 26일 배양하는 것 (예를 들어, 사전-REP)을 포함한다. 방법은 배양된 세포독성 림프구를 확장시키고 (예를 들어, REP) 포유동물에게 본원에 기재된 바와 같은 비골수절제 림프구고갈 화학요법을 임의로 투여하는 것을 추가로 포함한다. 비골수절제 림프구고갈 화학요법을 임의로 투여한 후, 방법은 포유동물에게 본원에 기재된 바와 같은 확장된 세포독성 림프구를 투여하는 것을 포함하며, 이에 의해 포유동물에서의 암의 퇴행이 촉진된다. 방법의 일부 실시양태에서, 투여된 세포독성 림프구는 특이적 종양 반응성에 대해 스크리닝되지 않았다. 일부 실시양태에서, 포유동물에게 투여된 확장된 세포독성 림프구는 약 19일 내지 약 29일령, 또는 약 23일 내지 약 29일령, 또는 약 26일령이다. 예를 들어, 투여된 세포독성 림프구는 19일, 19.5일, 또는 19.8일 내지 29, 29.5, 또는 29.8일령; 23, 23.5, 또는 23.8 내지 29, 29.5, 또는 29.8일령; 또는 26, 26.5, 또는 26.8일령일 수 있다.
- [0302] 일부 실시양태에서, 방법은 세포의 급속 확장 전에 세포독성 림프구를 함유하는 배양된 T-세포에 $CD8^+$ T-세포를 풍부화시키는 것을 포함한다. IL-2 하에 TIL 함유 세포독성 림프구의 배양 후, 예를 들어 $CD8$ 마이크로비드 분리 (예를 들어, 클리니맥스® 플러스 $CD8$ 마이크로비드 시스템 (밀테니 바이오텍으로부터 상업적으로 입수가능함)을 사용함)를 사용하여 TIL 함유 세포독성 림프구는 $CD4^+$ 세포가 고갈되고 $CD8^+$ 세포가 풍부화된다. 일부 실시양태에서, $CD4^+$ 및 $CD25^+$ 조절 T-세포는 항종양 반응을 방해할 수 있다. 일부 실시양태에서, 배양된 세포독성 림프구에 $CD8^+$ 세포독성 림프구를 풍부화시키고 $CD4^+$ 세포를 감소시키거나 제거하는 것은 임상 전달된 항-종양 $CD8^+$ 세포의 영향을 개선시킬 수 있고/거나, 환자에서의 반응률을 개선시킬 수 있고/거나, $CD4^+$ 세포에 의한 시토크인의 생산에 의해 관찰된 독성을 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 일부 T-세포 배양물의 $CD8^+$ 풍부화는 벌크 배양에서는 분명하지 않을 수 있는 시험관내 종양 인식, 및 다른 배양물에서의 개선된 시험관내 종양 인식을 드러낸다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 $CD8^+$ 어린 세포독성 림프구는 벌크 T-세포보다 더 신뢰할 만하게 기능할 수 있고 예상대로 임상 규모에서 급속 확장될 수 있다.
- [0303] 기체 투과성 용기를 사용하는 유전자 변형된 세포독성 림프구의 확장
- [0304] 본 발명의 한 실시양태는 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 수득하는 단계; 안에 세포 배지를 함유하는 제1 기체 투과성 용기에서 종양 조직 샘플을 배양하는 단계 (즉, 사전-REP); 종양 조직 샘플로부터 세포독성 림프구를 수득하는 단계; 조사된 동종 피더 세포 및/또는 조사된 자가 피더 세포를 사용하여 안에 세포 배지를 함유하는 제2 기체 투과성 용기에서 세포독성 림프구의 수를 확장시키는 단계 (즉, REP); 및 포유동물에게 확장된 수의 세포독성 림프구를 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 암의 퇴행을 촉진하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 종양 조직 샘플로부터의 단리 후, 그러나 상기 제1 기체 투과성 용기에서 배양하기 전에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 상기 제1 기체 투과성 용기에서 배양한 후, 그러나 상기 제2 기체 투과성 용기에서 배양하기 전에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 포유동물에게 확장된 수의 세포독성 림프구의 투여 전에 유전자 변형된다. 예를 들어 미국 특허 공개 2017/0152478에 기재된 방법, 뿐만 아니라 본원에 기재된 것들을 참조한다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 벡터를 사용하여 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑

색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 동일한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 상이한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 제1 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적

이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0305] 일부 실시양태에서, 기체 투과성 용기를 사용하여 확장된 세포독성 림프구 및/또는 유전자 변형된 세포독성 림프구를 사용하여 암의 퇴행을 촉진하는 본 방법은 보다 단순하고, 보다 덜 노동 집약적이고, 보다 적은 시약을 사용하며, 비-기체 투과성 용기 (예를 들어, T-플라스크 또는 T-175 플라스크, 백 및 멀티-웰 플레이트)를 사용하는 절차보다 더 단순한 장비를 사용하여 수행될 수 있다. 추가로, 기체 투과성 용기는 일부 실시양태에서 "개방" 시스템일 수 있는 비-기체 투과성 용기보다 더 효과적으로 세포를 미생물 오염으로부터 보호할 수 있다. 추가로, 기체 투과성 용기를 사용하는 방법은 일부 실시양태에서, 비-기체 투과성 용기를 사용하는 방법과 비교하여 사용되는 용기의 수를 감소시켜, 이에 의해 방법을 수행하는데 필요한 노동의 양을 감소시키고 또한 미생물 오염의 위험을 감소시킬 수 있다. 따라서, 기체 투과성 용기에서의 세포 생산은, 예를 들어 III상 임상 시험에 요구되는 현행 우수 제조 관리기준 (cGMP) 조건을 준수하는데 보다 적합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 기체-투과성 용기를 사용하는 방법은 비-기체 투과성 용기에 의해 수득된 것보다 더 낮게 최종 배양 부피를 감소시키며, 이는 세포를 성장시키는데 요구되는 인큐베이터 용량을 낮출 수 있고, 세포를 성장시키는데 필요한 시약 (예를 들어, 세포 배양 배지 및 첨가제)의 양을 감소시키고, 세포를 농축 및 세척하기 위한 장비 및/또는 절차를 단순화한다. 일부 실시양태에서, 특히 세포 및/또는 종양 조직 샘플이 기체 투과성 용기에서 적어도 약 1.3 cm의 세포 배양 배지 하에 액침 배양될 때, 세포는 비-기체 투과성 용기에서 (예를 들어, 격일)보다 기체-투과성 용기에서 (예를 들어, 약 3일마다 내지 4일마다) 덜 빈번하게 공급될 수 있다. 일부 실시양태에서, 기체 투과성 용기에서의 세포는 비-기체 투과성 용기 (예를 들어, 백)에서의 세포보다 덜 빈번하게 취급될 수 있으며, 이는 종양 단편의 방해를 최소화하고 보다 재현가능한 세포독성 림프구 성장을 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구의 배양 및/또는 확장을 포함하나 이에 제한되지는 않는 방법의 다양한 부분은 자동화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 기체 투과성 플라스크의 사용은, 기체 투과성 플라스크를 사용하지 않는 이전 방법의 기술적 및 물류적 복잡성으로 인해 충분한 수의 세포독성 림프구가 생성되지 않았기 때문에 이전에 성공적으로 치료되지 않았을 수 있는 대상체의 치료를 가능하게 하기에 충분한 수의 세포독성 림프구의 생성을 가능하게 한다.

[0306] 일부 실시양태에서, 방법은 안에 세포 배지를 함유하는 제1 기체 투과성 용기에서 종양 조직 샘플을 배양시키는 것을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 종양 조직 샘플은 소화 없이 기체 투과성 용기 내 기체 투과성 물질 상에서 직접적으로 배양된다. 또 다른 실시양태에서, 효소적으로 또는 기계적으로 소화된 종양 조직 샘플은 기체 투과성 물질 상에서 직접적으로 배양될 수 있다. 임의의 적합한 세포 배지가 사용될 수 있다. 세포 배양 배지는 임의의 적합한 T-세포 성장 인자, 예컨대, 예를 들어 인터류킨 (IL)-2를 추가로 포함할 수 있다. 세포 배양 배지는 임의로 인간 AB 혈청을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 조직 샘플은 대상체에 자가인 TIL을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 조직 샘플을 배양하는 것은 종양 샘플에 존재하는 TIL을 배양하는 것을 포함한다.

[0307] 방법은 또한 종양 조직 샘플로부터 TIL을 수득하는 것을 포함한다. 종양 조직 샘플은 TIL을 포함한다. 종양 조직 샘플이 기체 투과성 용기에서, 예를 들어 용기 내 기체 투과성 물질 상에서 배양됨에 따라, 종양 조직 샘플에 존재하는 TIL은 또한 기체 투과성 용기에서, 예를 들어 기체 투과성 물질 상에서 성장하기 시작한다. TIL은 임의의 적합한 방식으로 종양 조직 샘플로부터 수득될 수 있다.

[0308] 일부 실시양태에서, 제1 기체 투과성 용기는 임의의 적합한 기체 투과성 용기일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 기체 투과성 용기는 기저부, 측부 및 캡을 포함한다. 일부 실시양태에서, 용기는 기체 투과성 지지체 및 기체 투과성 물질, 예를 들어 기체 투과성 막을 포함한다. 일부 실시양태에서, 용기의 기저부는 기체 투과성 지지체 및 기체 투과성 물질, 예를 들어 기체 투과성 막을 포함한다. 일부 실시양태에서, 기체 투과성 물질은 용기 내부에, 용기의 내부와 주위 기체 사이의 기체 교환을 용이하게 하기 위해 주위 기체와 유체 연통하는 개구부 (예를 들어, 채널)를 포함하는 기체 투과성 지지체 상에 직접적으로 위치될 수 있다. 일부 실시양태에서, 캡은 배기구 및/또는 포트 (예를 들어, 접근 포트)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 접근 포트는 약 1 mm 내지 약 1 cm 초과 (예를 들어, 약 1 mm 초과 또는 약 1 cm 초과)의 개구부를 가질 수 있다. 약 1 mm 내지 약 1 cm 초과인 개구부를 갖는 접근 포트는 유리하게는 TIL의 방해를 제거하거나 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 배기구 또는 배기 포트를 포함하며, 이는 취급 동안 용기 내 온도가 하락하는 경우에 유리할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 기체 투과성 용기는 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0106717 (이는 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같은 기체 투과성 용기이고, 이는 윌슨 울프 매뉴팩처링 코퍼레이션(Wilson Wolf Manufacturing Corporation)으로부터 상업적으로 입수가능하다 (예를 들어, G-Rex10, GP200, G-Rex100, GP2000 용기) (미네소타주 뉴 브라이튼).

- [0309] 일부 실시양태에서, 제1 기체 투과성 용기는 임의의 적합한 세포 배지 부피 용량을 갖는다. 예를 들어, 제1 기체 투과성 용기는 약 40 mL 이상; 약 200 mL 이상; 약 500 mL 이상; 약 2,000 mL 이상; 또는 약 5,000 mL 이상의 배지 부피 용량을 가질 수 있다. 제1 기체 투과성 용기가 임의의 적합한 배지 부피 용량을 가질 수 있지만, 종양 조직 샘플 및/또는 TIL 함유 세포독성 림프구는 임의의 적합한 부피의 배지에서 배양될 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 조직 샘플 및/또는 TIL 함유 세포독성 림프구는 적어도 약 1.3 cm의 높이의 세포 배양 배지 하에 액침 배양된다. 일부 실시양태에서, 종양 조직 샘플 및/또는 TIL 함유 세포독성 림프구는 적어도 약 2.0 cm의 높이의 세포 배양 배지 하에 액침 배양된다. 적어도 약 1.3 cm의 높이 또는 적어도 약 2.0 cm의 높이의 배지 하에 액침된 기체 투과성 물질 상에서 배양된 종양 조직 샘플 및/또는 TIL은 유리하게 취급될 수 있고 보다 덜 빈번하게 공급될 수 있다.
- [0310] 일부 실시양태에서, 제1 기체 투과성 용기는 TIL 함유 세포독성 림프구의 성장을 위한 임의의 적합한 표면적을 제공할 수 있다. 일부 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 TIL의 성장을 위한 약 10 cm^2 이상; 약 100 cm^2 이상; 또는 약 650 cm^2 이상의 표면적을 가질 수 있다.
- [0311] 일부 실시양태에서, 종양 조직 샘플 및/또는 TIL 함유 세포독성 림프구는 제1 기체 투과성 용기 내부에서 기체 투과성 물질과 접촉하여 배양되고, 적합한 부피의 배양 배지 하에 액침된다. 종양 조직 샘플 및/또는 TIL을 기체 투과성 물질과 접촉하여 배양하는 것은 세포와 주위 공기 사이의 기체 교환을 용이하게 한다. 세포와 주위 공기 사이의 기체 교환을 용이하게 하는 것은 세포의 호흡, 성장 및 생존을 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, 기체 투과성 물질을 가로지르는 기체 교환은 용기 내에서 배지의 순환 (예를 들어, 대류 및 확산에 의한)을 용이하게 할 수 있고, 이는 TIL 함유 세포독성 림프구의 공급을 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 제1 기체 투과성 용기에서 배양하기 전 또는 후에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 벡터를 사용하여 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포 측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포 측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포 측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포 측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양

태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 동일한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 상이한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 제1 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0312] 일부 실시양태에서, 방법은 조사된 동종 피더 세포 및/또는 조사된 자가 피더 세포를 사용하여 안에 세포 배지를 함유하는 제2 기체 투과성 용기에서 TIL 함유 세포독성 림프구의 수를 확장시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, TIL 함유 세포독성 림프구의 수는 약 1개의 TIL 대 적어도 약 20개의 피더 세포, 약 1개의 TIL 대 적어도 약 25개의 피더 세포, 약 1개의 TIL 대 적어도 약 50개의 피더 세포, 약 1개의 TIL 대 적어도 약 100개의 피더 세포, 약 1개의 TIL 대 적어도 약 200개의 피더 세포의 비, 예를 들어 약 1 대 약 20, 약 1 대 약 25, 약 1 대 약 50, 약 1 대 약 100, 또는 약 1 대 약 200의 TIL-대-피더 세포 비를 사용하여 확장된다. 일부 실시양태에서, 제2 기체 투과성 용기는 제1 용기에 대해 기재된 바와 같을 수 있다.

[0313] 일부 실시양태에서, 배양된 TIL 함유 세포독성 림프구는 확장된다. 일부 실시양태에서, 배양된 TIL 함유 세포독성 림프구는 급속하게 확장된다. 급속 확장은 약 10일 내지 약 14일의 기간에 걸쳐, 및 일부 실시양태에서, 약 14일에 걸쳐 적어도 약 50배 (또는 60배, 70배, 80배, 90배 또는 100배, 또는 그 초과)의 TIL 함유 세포독성 림프구의 수의 증가를 제공한다. 일부 실시양태에서, 급속 확장은 약 10일 내지 약 14일의 기간에 걸쳐, 및 일부 실시양태에서, 약 14일에 걸쳐 적어도 약 200배 (또는 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 또는 그 초과)의 증가를 제공한다. 일부 실시양태에서, 급속 확장은 약 10 내지 약 14일의 기간, 및 일부 실시

양태에서, 약 14일에 걸쳐 적어도 약 1000배의 증가를 제공한다. 일부 실시양태에서, 급속 확장은 약 14일의 기간에 걸쳐 약 1000배 내지 약 2000배, 예를 들어 약 1000배, 약 1500배, 또는 약 2,000배의 증가를 제공한다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 확장시키기 전 또는 후에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 벡터를 사용하여 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마 레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 동일한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 상이한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 제1 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은

경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0314] 일부 실시양태에서, 확장 (즉, REP)은 임의의 적합한 방법에 의해 기체 투과성 용기에서 달성될 수 있다. 예를 들어, TIL 함유 세포독성 림프구는 피더 세포 (예를 들어, 조사된 동종 피더 세포, 조사된 자가 피더 세포, 및/또는 인공 항원 제시 세포 (예를 들어, CD3 및/또는 CD8을 코딩하는 핵산으로 형질도입된 K562 백혈병 세포)) 및 인터류킨-2 (IL-2) 또는 인터류킨-15 (IL-15), 및 일부 실시양태에서, IL-2의 존재 하에 비-특이적 T-세포를 사용하여 급속하게 확장될 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL 함유 세포독성 림프구의 수를 확장시키는 것은 약 1×10^9 내지 약 4×10^9 개의 동종 피더 세포 및/또는 자가 피더 세포, 바람직하게는 약 2×10^9 내지 약 3×10^9 개의 동종 피더 세포 및/또는 자가 피더 세포를 사용한다. 비-특이적 T-세포 수용체 자극은, 예를 들어 약 30 ng/ml의 마우스 모노클로날 항-CD3 항체인 OKT3 (뉴저지주 라리탄 소재 오르토-맥네일 또는 캘리포니아주 오번 소재 밀테니 바이오테크로부터 입수가가능함)을 포함할 수 있다. 대안적으로, TIL 함유 세포독성 림프구는 T-세포 성장 인자, 예컨대 300 IU/ml IL-2 또는 IL-15, 및 일부 실시양태에서 IL-2의 존재 하에 백터로부터 임의로 발현될 수 있는 암의 항원 (그의 항원 부분, 예컨대 에피토프(들), 또는 세포를 포함한 1종 이상), 예컨대 인간 백혈구 항원 A2 (HLA-A2) 결합 펩티드, 예를 들어 0.3 μ M MART-1:26-35 (27L) 또는 gp100:209-217 (210M)에 의한 시험관내 TIL 함유 세포독성 림프구의 자극에 의해 급속하게 확장될 수 있다. 다른 적합한 항원은, 예를 들어 NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, 티로시나제 암 항원, MAGE-A3, SSX-2 및 VEGFR2, 또는 그의 항원 부분을 포함할 수 있다. 시험관내-유도된 TIL은 HLA-A2-발현 항원-제시 세포 상으로 펄스된 암의 동일한 항원(들)에 의한 재자극에 의해 급속하게 확장된다. 대안적으로, TIL은, 예를 들어 조사된 자가 림프구 또는 조사된 HLA-A2+ 동종 림프구 및 IL-2에 의해 재자극될 수 있다.

[0315] 일부 실시양태에서, TIL의 수를 확장시키는 것은 약 5,000 mL 내지 약 10,000 mL의 세포 배지, 바람직하게는 약 5,800 mL 내지 약 8,700 mL의 세포 배지를 사용하는 것을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, TIL의 수를 확장시키는 것은 1종 이하의 유형의 세포 배양 배지를 사용한다. 임의의 적합한 세포 배양 배지, 예를 들어 AIM-V 세포 배지 (L-글루타민, 50 μ g/ml 스트렙토마이신 술페이트, 및 10 μ g/ml 겐타미신 술페이트) 세포 배양 배지 (인비트로젠, 캘리포니아주 칼스배드)가 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 유리하게는 TIL 함유 세포독성 림프구의 수를 확장시키는데 요구되는 배지의 양 및 배지의 유형의 수를 감소시킨다.

[0316] 일부 실시양태에서, TIL 함유 세포독성 림프구의 수를 확장시키는 것은 3일마다 또는 4일마다보다 더 빈번하지 않게 세포를 공급하는 것을 포함할 수 있다. 기체 투과성 용기에서 세포의 수를 확장시키는 것은 유리하게는 세포를 확장시키는데 필요한 공급 빈도를 감소시킴으로써 세포의 수를 확장시키는데 필요한 절차를 단순화한다.

[0317] 일부 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 기체 투과성 용기 내 세포 배지는 비여과된다. 특정한 이론에 얽매이지는 않지만, 일부 세포 배지 보충제에 존재하는 미립자 혈청 성분 (예를 들어, AB 혈청)은 TIL 성장에 대해 유해한 효과를 거의 또는 전혀 갖지 않는 것으로 여겨진다. 비여과 세포 배지의 사용은 유리하게는 세포의 수를 확장

시키는데 필요한 절차를 단순화할 수 있다.

[0318] 일부 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 기체 투과성 용기 내 세포 배지는 베타-메르캅토에탄올 (BME)이 결여되어 있다. 일부 실시양태에서, 세포 배지로부터의 BME의 부재는 유리하게는 cGMP (현행 우수 제조 절차)를 더 잘 준수할 수 있고, 따라서 유리하게는 규제 승인을 얻기가 보다 용이해진다.

[0319] 일부 실시양태에서, 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 수득하는 단계; 안에 세포 배지를 함유하는 제1 기체 투과성 용기에서 종양 조직 샘플을 배양하는 단계 (즉, 사전-REP); 종양 조직 샘플로부터 TIL 함유 세포독성 림프구를 수득하는 단계; 조사된 동종 피더 세포 및/또는 조사된 자가 피더 세포를 사용하여 안에 세포 배지를 함유하는 제2 기체 투과성 용기에서 TIL 함유 세포독성 림프구의 수를 확장시키는 단계 (즉, REP)를 포함하는 방법의 지속기간은 약 28 내지 약 42일, 예를 들어 약 28일일 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 배양하기 전 또는 후에, TIL-함유 세포독성 림프구를 수득하기 전 또는 후에, 또는 확장시키기 전 또는 후에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 백터를 사용하여 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 렌티바이러스 기반 백터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 pLEV 기반 바이러스 백터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 감마레트로바이러스 기반 백터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 pMSCIV 기반 백터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 백터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 백터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 백터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 백터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 백터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 동일한 백터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 상이한 백터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 제1 백터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 백터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7

(CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0320]

일부 실시양태에서, 방법은 포유동물에게 확장된 TIL 함유 세포독성 림프구를 투여하는 것을 포함한다. TIL 함유 세포독성 림프구는 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서 TIL 및/또는 세포독성 림프구는 바람직하게는 약 30 내지 약 60분 동안 지속되는 동맥내 또는 정맥내 주입으로서 투여된다. 투여 경로의 다른 예는 복강내, 척수강내 및 림프관을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 투여 전에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 바이러스를 사용하여 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCiV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와

비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 동일한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄 및 경쇄는 상이한 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 중쇄는 제1 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 경쇄는 제2 벡터 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0321]

TIL 이외에도, 세포독성 림프구, 대식세포, 단핵구 및 자연 킬러 (NK) 세포가 또한 TIL에 대해 본원에 기재된

바와 같이 종양 조직 샘플로부터 수득되고, 배양되고, 확장될 수 있다. 따라서, 방법은 또한 포유동물에게 대식세포, 단핵구 및 자연 킬러 (NK) 세포를 투여하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포독성 림프구를 확장시키기 위해 사용될 수 있다.

[0322] 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구의 성장 및 활성화를 촉진하는 T-세포 성장 인자는 TIL과 병용으로 또는 TIL에 후속적으로 포유동물에게 투여된다. T-세포 성장 인자는 TIL의 성장 및 활성화를 촉진하는 임의의 적합한 성장 인자일 수 있다. 적합한 T-세포 성장 인자의 예는 인터류킨 (IL)-2, IL-7, IL-15, 및 IL-12를 포함하며, 이는 단독으로 사용될 수 있거나 또는 다양한 조합으로, 예컨대 IL-2 및 IL-7, IL-2 및 IL-15, IL-7 및 IL-15, IL-2, IL-7 및 IL-15, IL-12 및 IL-7, IL-12 및 IL-15, 또는 IL-12 및 IL-2로 사용될 수 있다. IL-2가 바람직한 T-세포 성장 인자이다.

[0323] 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 TIL 및/또는 세포독성 림프구의 성장 및 활성화를 촉진하는 T-세포 성장 인자를 발현하도록 변형된다. 적합한 T-세포 성장 인자는, 예를 들어 상기 기재된 것들 중 임의의 것을 포함한다. 적합한 변형 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; 및 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 변형된 TIL 및/또는 세포독성 림프구는 T-세포 성장 인자를 높은 수준으로 발현한다. T-세포 성장 인자 코딩 서열, 예컨대 IL-12의 것은, T-세포 성장 인자 코딩 서열에 대한 작동가능한 연결이 높은-수준 발현을 촉진하는 프로모터와 같이, 관련 기술분야에서 용이하게 이용 가능하다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 세계 지적 재산권 기구 특허 출원 공개 번호 WO 2010/126766 (이는 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이 IL-12를 발현하도록 변형될 수 있다.

[0324] 일부 실시양태에서, 2종의 시토카인은 단일 시토카인보다 더 효과적일 수 있고, 일부 실시양태에서, 3종의 시토카인, 예를 들어 IL-2, IL-7 및 IL-15는 임의의 2종의 시토카인보다 더 효과적일 수 있다. IL-15는 종양-특이적 CD8⁺ T-세포 반응을 증진시킨다고 여겨진다. 이와 관련하여, IL-2와 함께 IL-15-배양된 세포의 투여 (예컨대 볼루스 주사)는 특히 효과적일 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-15를 발현하도록 변형된 TIL 및/또는 세포독성 림프구는 볼루스 주사로서 IL-2와 함께 투여될 수 있다.

[0325] T-세포 성장 인자는 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 1종 초과 T-세포 성장 인자가 투여되는 실시양태에서, 이들은 동시에 또는 순차적으로, 임의의 순서로, 및 동일한 경로 또는 상이한 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, T-세포 성장 인자, 예컨대 IL-2는 볼루스 주사로서 정맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, T-세포 성장 인자, 예컨대 IL-2의 투여량은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 높은 것으로 간주되는 것이다. 일부 실시양태에서, 특히 암이 흑색종인 경우에, 내성까지 IL-2의 용량 약 720,000 IU/kg이 매일 3회 투여된다. 일부 실시양태에서, IL-2의 약 5 내지 약 15회 용량, 평균 약 8회 용량이 투여된다.

[0326] TIL 및/또는 세포독성 림프구는 각각의 종양 세포 계통에 의해 코딩되는 10,000개로 추정되는 유전자 돌연변이의 결과로서 생산된 고유한 항원 중 임의의 것을 인식할 수 있다. 그러나, 항원은 고유할 필요가 없다. TIL 및/또는 세포독성 림프구는 암의 1종 이상의 항원의 항원 부분, 예컨대 에피토프, 또는 세포를 포함한, 암의 1종 이상의 항원을 인식할 수 있다. "암의 항원" 및 "그 암의 항원"은 모든 상기 언급된 항원을 포괄하도록 의도된다. 암이 흑색종, 예컨대 전이성 흑색종인 경우에, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 MART-1 (예컨대 MART-1:26-35 (27L)), gp100 (예컨대 gp100:209-217 (210M)), 또는 종양-코딩된 돌연변이로부터 유래된 "고유한" 또는 환자-특이적 항원을 인식할 수 있다. TIL에 의해 인식될 수 있는 다른 적합한 흑색종 항원은 티로시나제, 티로시나제 관련 단백질 (TRP)1, TRP2 및 MAGE를 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. TIL은 또한 항원, 예컨대, 예를 들어 NY-ESO-1, 텔로머라제, p53, HER2/neu, 암배아성 항원, 또는 폐 암종, 유방암, 결장암, 전립선암 등의 치료를 위한 전립선-특이적 항원을 인식할 수 있다.

[0327] 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 수득하는 단계; 안에 세포 배지를 함유하는 제1 기체 투과성 용기에서 종양 조직 샘플을 배양하는 단계; 종양 조직 샘플로부터 TIL 및/또는 세포독성 림프구를 수득하는 단계; 조사된 동종 피더 세포 및/또는 조사된 자가 피더 세포를 사용하여 안에 세포 배지를 함유하는 제2 기체 투과성 용기에서 TIL 및/또는 세포독성 림프구의 수를 확장시키는 단계를 포함하는, 입양 세포 면역요법을 위해 포유동물로부터 확장된 수의 TIL 및/또는 세포독성 림프구를 수득하는 방법이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 바이러스 벡터에 의해 유전자 변형된다.

일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결합의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉,

IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0328]

일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 수득한 후에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 안에 세포 배지를 함유하는 제1 기체 투과성 용기에서 종양 조직 샘플을 배양하기 (즉, 사전-REP) 전 또는 후에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 종양 조직 샘플로부터 TIL 및/또는 세포독성 림프구를 수득한 후에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 조사된 동종 피더 세포 및/또는 조사된 자가 피더 세포를 사용하여 안에 세포 배지를 함유하는 제2 기체 투과성 용기에서 TIL 및/또는 세포독성 림프구의 수를 확장시킨 (즉, REP) 후에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 바이러스 벡터에 의해 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양

태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

- [0329] 일부 실시양태에서, 방법은 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 수득하는 것을 포함한다. 종양 조직 샘플은 본 발명의 임의의 실시양태에 관하여 본원에 기재된 바와 같이 수득될 수 있다.
- [0330] 일부 실시양태에서, 방법은 안에 세포 배지를 함유하는 제1 기체 투과성 용기에서 종양 조직 샘플을 배양하는 것을 포함한다. 종양 조직 샘플은 본 발명의 임의의 실시양태에 관하여 본원에 기재된 바와 같이 제1 기체 투과성 용기에서 배양될 수 있다.
- [0331] 일부 실시양태에서, 방법은 종양 조직 샘플로부터 TIL 함유 세포독성 림프구를 수득하는 것을 포함한다. TIL 함유 세포독성 림프구는 본 발명의 임의의 실시양태에 관하여 본원에 기재된 바와 같이 종양 조직 샘플로부터 수득될 수 있다.
- [0332] 일부 실시양태에서, 방법은 조사된 동종 피더 세포 및/또는 조사된 자가 피더 세포를 사용하여 안에 세포 배지를 함유하는 제2 기체 투과성 용기에서 TIL 및/또는 세포독성 림프구의 수를 확장시키는 것을 포함한다. TIL 및/또는 세포독성 림프구의 수는 본 발명의 임의의 실시양태에 관하여 본원에 기재된 바와 같이 확장될 수 있다.
- [0333] 일부 실시양태에서, 방법은 입양 세포 면역요법을 위해 포유동물로부터 확장된 수의 TIL 및/또는 세포독성 림프구를 수득하는 것을 수반하며, 여기서 방법은 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 수득하는 단계; 종양 조직 샘플

로부터 TIL 함유 세포독성 림프구를 수득하는 단계; 조사된 동종 피더 세포 및/또는 조사된 자가 피더 세포를 사용하여 안에 세포 배지를 함유하는 기체 투과성 용기에서 TIL 및/또는 세포독성 림프구의 수를 확장시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 제1 기체 투과성 용기이다. 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 수득하는 단계, 종양 조직 샘플로부터 TIL 및/또는 세포독성 림프구를 수득하는 단계, 및 조사된 동종 피더 세포 및/또는 조사된 자가 피더 세포를 사용하여 안에 세포 배지를 함유하는 제2 기체 투과성 용기에서 TIL 및/또는 세포독성 림프구의 수를 확장시키는 단계는 본 발명의 임의의 실시양태에 관하여 본원에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 바이러스 벡터에 의해 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포 측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포 측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포 측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포 측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중

쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0334]

일부 실시양태에서, 제공된 방법은 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 수득하는 단계; 종양 조직 샘플로부터 TIL 함유 세포독성 림프구를 수득하는 단계; 조사된 동종 피더 세포 및/또는 조사된 자가 피더 세포를 사용하여 안에 세포 배지를 함유하는 제1 기체 투과성 용기 및 제2 기체 투과성 용기에서 TIL 및/또는 세포독성 림프구의 수를 확장시키는 단계; 및 포유동물에게 확장된 수의 TIL 및/또는 세포독성 림프구를 투여하는 단계를 포함하는, 포유동물에서 암의 퇴행을 촉진하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 수득하는 단계, 종양 조직 샘플로부터 TIL을 수득하는 단계, 조사된 동종 피더 세포 및/또는 조사된 자가 피더 세포를 사용하여 안에 세포 배지를 함유하는 기체 투과성 용기에서 TIL 및/또는 세포독성 림프구의 수를 확장시키는 단계, 및 포유동물에게 확장된 수의 TIL 및/또는 세포독성 림프구를 투여하는 단계는 본원에 기재된 임의의 실시양태에 관하여 본원에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 방법은 암 세포를 용해시킬 수 있는 TIL 및/또는 세포독성 림프구를 선택하는 것을 추가로 포함한다. TIL 및/또는 세포독성 림프구는 본 발명의 임의의 실시양태에 관하여 본원에 기재된 바와 같이 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 바이러스 벡터에 의해 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부

실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

- [0335] 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 수득한 후에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 종양 조직 샘플로부터 TIL 함유 세포독성 림프구를 분리하기 전 또는 후에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 조사된 동종 피더 세포 및/또는 조사된 자가 피더 세포를 사용하여 안에 세포 배지를 함유하는 제2 기체 투과성 용기에서 TIL 및/또는 세포독성 림프구의 수를 확장시키기 전 또는 후에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 포유동물에게 확장된 수의 TIL 및/또는 세포독성 림프구를 투여하기 전에 유전자 변형된다.
- [0336] 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 환자에게 투여 전에 종양 반응성 세포독성 림프구를 확인하기 위해 특이적 종양 반응성에 대해 시험되지 않는다. 특이적 종양 반응성은 종양 세포와의 공동-배양 후 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해, 예를 들어 시토카인 방출 (예를 들어, 인터페론- γ)을 측정함으로써 시험될 수 있다. 본 발명의 방법은 유리하게는 특이적 종양 인식에 대한 사전 스크리닝의 필요성 없이 포유동물에게 세포독성 림프구를 투여함으로써 포유동물에서의 암의 퇴행을 촉진하는 것을 가능하게 한다. 방법의 실시양태는, 원하는 경우에, 세포독성 림프구를 포유동물에게 투여하기 전에 세포독성 림프구를 효력에 대해 비-항원-특이적 방식으로 시험하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구 효력은, 예를 들어 OKT3 자극 후 시토카인 방출을 측정하는 비-특이적 효력 검정에 의해 임의로 시험될 수 있다. T-세포는, 예를 들어 인터페론 (IFN) 방출이 약 50 pg/mL 초과, 약 100 pg/mL 초과, 약 150 pg/mL 초과, 또는 약 200 pg/mL 초과인 경우에, 강력한 것으로 간주될 수 있다. 방법의 덜 바람직한 실시양태는 확장된 세포독성 림프구를 특이적 종양 반응성에 대해 시험하여 종양-반응성 세포독성 림프구를 확인하는 것을 포함한다.
- [0337] TIL 및/또는 세포독성 림프구를 배양하는 추가의 방법
- [0338] 일부 실시양태에서, 방법은 종양 조직 샘플로부터 TIL 및/또는 세포독성 림프구의 수득을 용이하게 하는 임의의 적합한 방법에 의해 종양 조직을 배양하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 종양 조직은 다중 독립적 배양물, 예를 들어 마이크로배양물을 확립하는 것을 포함할 수 있다. 예를 들어, 종양 조직을 배양하는 것은 플레이트, 예를 들어 24-웰 플레이트에서 종양 단편을 배양하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 조직은 기체 투과성 용기 없이 배양된다.
- [0339] 일부 실시양태에서, 방법은 암 세포를 용해시킬 수 있는 TIL 및/또는 세포독성 림프구를 선택하는 것을 추가로 포함하는 한편, 다른 실시양태에서 방법은 암 세포를 용해시킬 수 있는 TIL을 선택하는 것을 포함하지 않는다. 암 세포를 용해시킬 수 있는 TIL은 암 세포의 용해 및/또는 암의 퇴행과 연관된 임의의 적합한 형질을 갖는 TIL을 확인함으로써 선택될 수 있다. TIL을 선택하기 위한 기준으로서의 역할을 할 수 있는 예시적인 적합한 TIL 형질은 자가 종양 세포와의 공동-배양 시 IFN- γ 방출; CD8, CD27 및 CD28 중 1종 이상의 세포 표면 발현; 및 텔로미어 길이 중 어느 1종 이상을 포함할 수 있다. 특정한 이론에 얽매이지는 않지만, CD8, CD27 및 CD28 중 1종 이상의 세포 표면 발현 및 보다 긴 텔로미어 길이는 환자에서의 양성 객관적 임상 반응 및 생체내 세포의 지속성과 연관되는 것으로 여겨진다. 바람직하게는 형질은 자가 종양 세포와의 공동-배양 시 IFN- γ 방출이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 선택된 TIL은 종양 세포와의 공동-배양 시 약 200 pg/ml 이상의 IFN- γ 를 방출한다.
- [0340] 일부 실시양태에서, 암 세포를 용해시킬 수 있는 TIL을 선택하는 것은 개별 배양물을 형질의 존재에 대해 시험하고 형질을 보유하는 TIL을 확인하는 것을 포함한다. 배양물을 자가 종양 세포와의 공동-배양 시 IFN- γ 방출; CD8, CD27 및 CD28 중 1종 이상의 세포 표면 발현; 및 텔로미어 길이 (보다 긴 텔로미어가 암의 퇴행과 연관됨) 중 어느 1종 이상의 존재에 대해 시험하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다.
- [0341] 일부 실시양태에서, 임의의 수의 배양물이 선택될 수 있다. 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과수의 배양물이 선택될 수 있다. 2개 이상의 배양물이 선택된 실시양태에서, 선택된 배양물은 조합될 수 있고, TIL의 수는 1개 (또는 그 초과)의 기체 투과성 용기에서 확장될 수 있다. 2개 이상의 배양물이 선택된 실시양태에서, 각각의 선택된 배양물은 기체 투과성 용기를 포함한 개별 용기가 사용되는 경우에 이러한 용기에서 개별적으로 확장된다.
- [0342] 일부 실시양태에서, 방법은 본 발명의 임의의 실시양태에 관하여 본원에 기재된 바와 같이 조사된 동종 피더 세포 및/또는 조사된 자가 피더 세포를 사용하여 안에 세포 배지를 함유하는 제2 기체 투과성 용기 내 확인된 배양물에서 TIL 및/또는 세포독성 림프구의 수를 확장시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 기체 투과성 용기에서 확장된 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 바이러스 벡터에 의해 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이

러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포 측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포 측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포 측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포 측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4

서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0343] 유전자 변형된 세포독성 림프구의 집단의 투여

[0344] 적합한 수로 확장되면, 유전자 변형된 세포독성 림프구의 집단은 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법 및/또는 장치를 사용하여 대상체에게 투여, 예를 들어 주입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 바이러스 벡터에 의해 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을

포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0345] 본 개시내용의 조성물, 예를 들어 본 개시내용의 유전자 변형된 세포독성 림프구는 단독으로, 또는 희석제 및/또는 다른 성분, 예컨대 IL-2 또는 다른 시토키인 또는 세포 집단과 조합되어 제약 조성물로서 투여될 수 있다. 간략하게, 본 개시내용의 제약 조성물은, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 세포독성 림프구의 집단을, 1종 이상의 제약상 또는 생리학상 허용되는 담체, 희석제 또는 부형제와 조합하여 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 완충제, 예컨대 중성 완충 염수, 포스페이트 완충 염수 등; 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스, 수크로스 또는 텍스트란, 만니톨; 단백질; 폴리펩티드 또는 아미노산, 예컨대 글리신; 항산화제; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA 또는 글루타티온; 아주반트 (예를 들어, 수산화알루미늄); 및 보존제를 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물은 바람직하게는 정맥내 투여 또는 종양 부위의 주사를 위해 제제화된다.

[0346] 본 발명의 제약 조성물은 치료될 (또는 예방될) 질환에 적절한 방식으로 투여될 수 있다. 투여의 양 및 빈도는, 적절한 투여량이 임상 시험에 의해 결정될 수 있지만, 환자의 상태, 및 환자의 질환의 유형 및 중증도와 같은 인자에 의해 결정될 것이다.

[0347] "항종양 유효량", "종양-억제 유효량", 또는 "치료량"이 나타내어지는 경우에, 투여될 본 발명의 조성물의 정확한 양은 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이의 정도, 및 환자 (대상체)의 상태에서의 개별 차이를 고려하여 의사가 결정할 수 있다. 본원에 기재된 유전자 변형된 세포독성 림프구를 포함하는 제약 조성물은 10^4 내지 10^{11} 개 세포/kg 체중 (예를 들어, 10^5 내지 10^6 , 10^5 내지 10^{10} , 10^5 내지 10^{11} , 10^6 내지 10^{10} , 10^6 내지 10^{11} , 10^7

내지 10^{11} , 10^7 내지 10^{10} , 10^8 내지 10^{11} , 10^8 내지 10^{10} , 10^9 내지 10^{11} , 또는 10^9 내지 10^{10} 개 세포/kg 체중) (상기 범위 내의 모든 정수 값 포함)의 투여량으로 투여될 수 있는 것으로 일반적으로 언급될 수 있다. 유전자 변형된 세포독성 림프구 조성물은 또한 이들 투여량으로 다수회 투여될 수 있다. 유전자 변형된 세포독성 림프구는 면역요법에서 통상적으로 공지된 주입 기술을 사용함으로써 투여될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988] 참조). 특정한 환자를 위한 최적 투여량 및 치료 요법은 질환의 징후에 대해 환자를 모니터링하고 이에 따라 치료를 조정함으로써 의학 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0348] 대상 조성물의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 이식(implantation) 또는 이식(transplantation)에 의한 것을 포함한 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 환자에게 전신으로 또는 국부로 (예를 들어, 종양의 부위에) 투여될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 환자에게 피하로, 피내로, 종양 내로, 결절내로, 수질내로, 근육내로, 정맥내 (i.v.) 주사에 의해, 또는 복강내로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조성물은 환자에게 피내 또는 피하 주사에 의해 투여된다. 일부 경우에, 본 개시내용의 조성물은 i.v. 주사에 의해 투여된다. 본 개시내용의 조성물은 종양, 림프절 또는 감염 부위 내로 직접적으로 주사될 수 있다.

[0349] 일부 실시양태에서, 개시된 방법에 의해 생산된 확장된 TIL 함유 세포독성 림프구, 세포독성 림프구 및/또는 유전자 변형된 세포독성 림프구는 동맥내 또는 정맥내 주입으로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 투여는 약 30 내지 약 60분 동안 지속된다. 일부 실시양태에서, 투여 경로는 복강내, 척수강내 및 림프관을 포함한다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 수득한 후, 확장 동안 언제든지, 그러나 포유동물에게 투여 전에 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 바이러스 벡터를 사용하여 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또

는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0350] 림프구고갈 방법

[0351] 일부 실시양태에서, 비골수절제 림프구고갈 화학요법은 포유동물에게 종양-침윤 림프구로부터 수득된 확장된 세포독성 림프구를 투여하기 전에 포유동물에게 투여된다. 림프구고갈의 목적은, 특히 조절 T-세포 및 항상성 시토크인과 경쟁하는 다른 비-특이적 T-세포를 제거함으로써 주입된 림프구에 대한 공간을 만드는 것이다. 비골수절제 림프구고갈 화학요법은 통상의 기술자에게 공지된 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있는 임의의 적합한 이러한 요법일 수 있다. 특히 암이 전이성일 수 있는 흑색종인 경우에, 비골수절제 림프구고갈 화학요법은, 예를 들어 시클로포스파미드 및 플루다라빈의 투여를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드 및 플루다라빈을 투여하는 경로는 정맥내이다. 마찬가지로, 시클로포스파미드 및 플루다라빈의 임의의 적합한 용량이 투여될 수 있다. 바람직하게는, 특히 암이 흑색종인 경우에, 약 15-35 mg/m², 예컨대 약 25 mg/m²의 플루다라빈이 약 5일 동안 투여된 후 대략 2일 동안 약 40-80 mg/kg, 예컨대 약 60 mg/kg의 시클로포스파미드가 투여된다.

[0352] 일부 실시양태에서, 비골수절제 림프구고갈 화학요법은 포유동물에게 유전자 변형된 세포독성 림프구를 투여하기 전에 포유동물에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 바이러스 벡터에 의해 유전자 변형

된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결합의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉,

IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0353] 조합 요법

[0354] 일부 실시양태에서, 적합한 요법은 본 개시내용의 유전자 변형된 세포독성 림프구의 투여 전에 대상체를 1종 이상의 림프구교갈 조치에 노출시키는 것을 포함할 것이다. 림프구교갈 조치는 화학- 또는 방사선요법의 형태를 취할 수 있다. 적합한 화학요법 조치는, 예를 들어 시클로포스파미드 및/또는 플루다라빈을 사용한 치료를 포함할 수 있다.

[0355] 본 개시내용의 일부 실시양태에서, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여 본원에 기재된 방법, 또는 림프구가 치료 수준으로 확장되는 관련 기술분야에 공지된 다른 방법을 사용하여 확장된 세포는 항바이러스 요법, 시도포비르 및 인터루킨-2와 같은 작용제를 사용한 치료, MS 환자를 위한 시타라빈 (또한 ARA-C로 공지됨) 또는 나탈리주맙 치료, 또는 건선 환자를 위한 에팔리주맙 치료, 또는 PML 환자를 위한 다른 치료를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 수의 관련 치료 양식과 함께 (예를 들어, 그 전에, 그와 동시에 또는 그 후에) 환자에게 투여된다. 추가 실시양태에서, 본 발명의 유전자 변형된 세포독성 림프구는 화학요법, 방사선, 면역억제제, 예컨대 시클로스포린, 아자티오프린, 메토트렉세이트, 미코페놀레이트 및 FK506, 항체 또는 다른 면역절제제, 예컨대 캄파트, 항-CD3 항체 또는 다른 항체 요법, 시토킨, 플루다라빈, 시클로스포린, FK506, 라파마이신, 미코페놀산, 스테로이드, FR901228, 시토카인, 및 조사와 조합되어 사용될 수 있다. 이들 약물은 칼슘 의존성 포스포타제 칼시뉴린 (시클로스포린 및 FK506)을 억제하거나 또는 성장 인자 유도된 신호전달에 중요한 p70S6 키나제 (라파마이신)를 억제한다 (Liu et al., Cell 66:807-815, 1991; Henderson et al., Immun. 73:316-321, 1991; Bierer et al., Curr. Opin. Immun. 5:763- 773, 1 993). 추가 실시양태에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 골수 이식, 화학요법제, 예컨대 플루다라빈, 외부-빔 방사선 요법 (XRT), 시클로포스파미드, 또는 항체, 예컨대 OKT3 또는 캄파트를 사용하는 T-세포 절제 요법과 함께 (예를 들어, 그 전에, 그와 동시에 또는 그 후에) 환자에게 투여된다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용의 세포 조성물은 B-세포 절제 요법, 예컨대 CD20과 반응하는 작용제, 예를 들어 리툭산 후에 투여된다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 대상체는 고용량 화학요법에 이어서 말초 혈액 줄기 세포 이식을 사용한 표준 치료를 받을 수 있다. 특정 실시양태에서, 이식 후, 대상체는 본 개시내용의 확장된 유전자 변형된 세포독성 림프구의 주입을 받는다. 추가의 실시양태에서, 확장된 세포는 수술 전 또는 후에 투여된다.

[0356] 일부 실시양태에서, 수술 전 또는 후에 투여된 확장된 세포는 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 바이러스 벡터에 의해 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일

부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는

(즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0357] 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포독성 림프구는 표준 항암 약물 또는 요법과 동시에 투여된다. 수많은 항암 약물 및 요법이 본 방법 및 조성물과의 조합에 이용가능하다. 하기는 조사와 함께 사용될 수 있는 항암 (항신생물성) 약물의 비-완전 목록이다: 아시비신; 아클라루비신; 아코다졸 히드로클로라이드; AcrQnine; 아도젤레신; 알데스큐린; 알트레타민; 암보마이신; 아메탄트론 아세테이트; 아미노글루테티미드; 암사크린; 아나스트로졸; 안트라마이신; 아스파라기나제; 아스페롤린; 아자시티딘; 아제테파; 아조토마이신; 바티마스타트; 벤조데파; 비칼루타미드; 비산트렌 히드로클로라이드; 비스나피드 디메실레이트; 비젤레신; 블레오마이신 술페이트; 브레퀴나르 소듐; 브로피리민; 부술판; 캅티노마이신; 칼루스테론; 카라세미드; 카르베티머; 카르보플라틴; 카르무스틴; 카루비신 히드로클로라이드; 카르젤레신; 세데핀골; 클로람부실; 시클레마이신; 시스플라틴; 클라드리빈; 크리스나톨 메실레이트; 시클로포스파미드; 시타라빈; 다카르바진; 닥티노마이신; 다우노루비신 히드로클로라이드; 데시타빈; 텍소르마플라틴; 데자구아닌; 데자구아닌 메실레이트; 디아지쿠온; 도세탁셀; 독소루비신; 독소루비신 히드로클로라이드; 드롤록시펜; 드롤록시펜 시트레이트; 드로모스타놀론 프로피오네이트; 두아조마이신; 에다트렉세이트; 에플로미딘 히드로클로라이드; 엘사미트루신; 엔로플라틴; 엔프로메이트; 에피프로피딘; 에피루비신 히드로클로라이드; 에르블로졸; 에소루비신 히드로클로라이드; 에스트라무스틴; 에스트라무스틴 포스페이트 소듐; 에타나다졸; 에티오다이즈드 오일 1131; 에토포시드; 에토포시드 포스페이트; 에토프린; 파드로졸 히드로클로라이드; 파자라빈; 펜레티니드; 플록수리딘; 플루다라빈 포스페이트; 플루오로우라실; 플루로시타빈; 포스퀴돈; 포스트리에신 소듐; 겐시타빈; 겐시타빈 히드로클로라이드; 골드 Au 198; 히드록시우레아; 이다루비신 히드로클로라이드; 이포스파미드; 일모포신; 이프로플라틴; 이리노테칸 히드로클로라이드; 칸레오티드 아세테이트; 레트조졸; 류프롤리드 아세테이트; 리아로졸 히드로클로라이드; 로메트렉솔 소듐; 로무스틴; 로속산트론 히드로클로라이드; 마소프로콜; 메이탄신; 메클로레타민 히드로클로라이드; 메게스트롤 아세테이트; 멜레게스트롤 아세테이트; 멜팔란; 메노가렐; 메르캅토프린; 메토티렉세이트; 메토티렉세이트 소듐; 메토프린; 메투레데파; 미틴도미드; 미토카르신; 미토코로민; 미토길린; 미토말신; 미토마이신; 미토스퍼; 미토탄; 미복산트론 히드로클로라이드; 미코페놀산; 노코다졸; 노갈라마이신; 오르마플라틴; 옥시수란; 파클리탁셀; 페가스파르가제; 펠리오마이신; 펜타무스틴; 페플로마이신 술페이트; 피포스파미드; 피포브로만; 피포술판; 피복산트론 히드로클로라이드; 플리카마이신; 플로메스탄; 포르피머 소듐; 포르피로마이신; 프레드니무스틴; 프로카르바진 히드로클로라이드; 퓨로마이신; 퓨로마이신 히드로클로라이드; 피라조푸린; 리보프린; 로글레티미드; 사핀골; 사핀골 히드로클로라이드; 세무스틴; 심트라젠; 스파르포세이트 소듐; 스파르소마이신; 스피로게르마늄 히드로클로라이드; 스피로무스틴; 스피로플라틴; 스트렙토니그린; 스트렙토조신; 스트론튬 클로라이드 Sr 89; 솔로페누르; 탈리소마이신; 탁산; 탁소이드; 테코갈란 소듐; 테가푸르; 텔록산트론 히드로클로라이드; 테모포르핀; 테니포시드; 테록시론; 테스토라톤; 티아미프린; 티오구아닌; 티오테파; 티아조푸린; 티라파자민; 토포테칸 히드로클로라이드; 토레미펜 시트레이트; 트레스톨론 아세테이트; 트리스리빈 포스페이트; 트리메트렉세이트; 트리메트렉세이트 글루쿠로네이트; 트립토텔린; 투볼로졸 히드로클로라이드; 우라실 머스타드; 우레데파; 바르페오티드; 베르테포르핀; 빈블라스틴 술페이트; 빈크리스틴 술페이트; 빈데신; 빈데신 술페이트; 비네피딘 술페이트; 빈글리시네이트 술페이트; 빈류로신 술페이트; 비노렐빈 타르트레이트; 빈로시딘 술페이트; 빈줄리딘 술페이트; 보로졸; 제니플라틴; 지노스타틴; 조루비신 히드로클로라이드.

[0358] 치료에 적합한 대상체

[0359] 개시된 방법 및 조성물을 사용한 치료에 적합한 대상체는 암 및/또는 만성 바이러스 감염을 갖는 (예를 들어, 갖는 것으로 진단된) 또는 가질 위험이 있는 자를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에 개시된 방법 및 조성물을 통한 치료를 잘 받아들일 수 있는 암의 유형은 전이성 흑색종, 림프종, 백혈병, 및 췌장 또는 뇌 기원의 고형 종양을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 본원에 개시된 방법 및 조성물을 통한 치료를 잘 받아들일 수 있는 만성 바이러스 감염의 유형은 엡스타인-바르 바이러스 (EBV) 감염과 연관된 이식후 림프종식성 질환 (PTLD), 인간 유두종바이러스 (HPV), 시토메갈로바이러스 및 아데노바이러스 감염을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. C형 및 B형 간염 바이러스로 감염된 대상체는 또한 본원에 개시된 방법 및 조성물을 통한 치료를 잘 받아들일 수 있다.

[0360] 치료될 수 있는 암은 혈관화되지 않거나 아직 실질적으로 혈관화되지 않은 종양, 뿐만 아니라 혈관화된 종양을 포함한다. 암은 비-고형 종양 (예컨대 혈액 종양, 예를 들어 백혈병 및 림프종)을 포함할 수 있거나 또는 고형

종양을 포함할 수 있다. 본 개시내용의 방법 및 조성물로 치료될 암의 유형은 암종, 모세포종 및 육종, 및 특정 백혈병 또는 림프성 악성종양, 양성 및 악성 종양, 및 악성종양, 예를 들어 육종, 암종 및 흑색종을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 성인 종양/암 및 소아 종양/암이 또한 포함된다.

[0361] 혈액암은 혈액 또는 골수의 암이다. 혈액 (또는 혈액형) 암의 예는 급성 백혈병 (예컨대 급성 림프구성 백혈병, 급성 골수구성 백혈병, 급성 골수 백혈병 및 골수모구성, 전골수구성, 골수단핵구성, 단핵구성 및 적백혈병), 만성 백혈병 (예컨대 만성 골수구성 (과립구성) 백혈병, 만성 골수 백혈병 및 만성 림프구성 백혈병)을 포함한 백혈병, 진성 다혈구혈증, 림프종, 호지킨병, 비-호지킨 림프종 (무통성 및 고등급 형태), 다발성 골수종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증, 중쇄 질환, 골수이형성 증후군, 모발상 세포 백혈병 및 골수이형성증을 포함한다.

[0362] 고형 종양은 통상적으로 낭 또는 액체 영역을 함유하지 않는 조직의 비정상적 덩어리이다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 상이한 유형의 고형 종양은 그를 형성하는 세포의 유형에 대해 명명된다 (예컨대 육종, 암종 및 림프종). 고형 종양, 예컨대 육종 및 암종의 예는 섬유육종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골육종, 및 다른 육종, 활막종, 중피종, 유잉 종양, 평활근육종, 횡문근육종, 결장 암종, 림프성 악성종양, 췌장암, 유방암, 폐암, 난소암, 전립선암, 간세포성 암종, 편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 선암종, 한선 암종, 수질성 갑상선 암종, 유두상 갑상선 암종, 크롬친화세포종 피지선 암종, 유두상 암종, 유두상 선암종, 수질성 암종, 기관지원성 암종, 신세포 암종, 간세포암, 담관 암종, 용모막암종, 윌름스 종양, 자궁경부암, 고환 종양, 정상피종, 방광 암종, 흑색종, 및 CNS 종양 (예컨대 신경교종 (예컨대 뇌간 신경교종 및 혼합 신경교종), 교모세포종 (또한 다형성 교모세포종으로 공지됨) 성상세포종, CNS 림프종, 배세포종, 수모세포종, 슈반세포종 두개인두종, 상의세포종, 송과체종, 혈관모세포종, 청신경종, 뿔지교종, 수막종, 신경모세포종, 망막모세포종 및 뇌 전이)을 포함한다.

[0363] 일부 실시양태에서, 방법은 암 퇴행을 촉진한다. 포유동물에서 암의 퇴행을 촉진하는 것은 포유동물에서 암을 치료 또는 예방하는 것을 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "치료하다", "예방하다" 및 "퇴행", 뿐만 아니라 그로부터 유래하는 단어는 반드시 100% 또는 완전 퇴행을 의미하는 것은 아니다. 오히려, 관련 기술분야의 통상의 기술자가 잠재적 이익 또는 치료 효과를 갖는 것으로 인식하는 다양한 정도의 치료, 예방 및 퇴행이 존재한다. 이러한 점에서, 본 발명의 방법은 포유동물에서 암의 임의의 수준의 치료, 예방 또는 퇴행의 임의의 양을 제공할 수 있다. 추가로, 본 발명의 방법에 의해 제공된 치료, 예방 또는 퇴행은 질환, 예를 들어 암의 1 종 이상의 상태 또는 증상의 치료, 예방 또는 퇴행을 포함할 수 있다. 또한, 본원의 목적상, "치료", "예방" 및 "퇴행"은 질환, 그의 증상 또는 상태의 발병을 지연시키는 것을 포괄할 수 있다.

[0364] 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 치료 요법의 일부로서 투여된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 치료 요법의 일부로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질과 조합되어 치료 요법의 일부로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포독성 림프구는 치료 요법의 일부로서 투여된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 바이러스 벡터에 의해 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증

가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포 측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0365]

가용성 프로그램화된 사멸 1 리간드 1 (PD-L1) 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된 세포독성 림

프구를 제조하는 방법

[0366] 본 개시내용에 따라 유전자 변형된 세포독성 림프구를 제조하는 방법은 상기 기재된 단리, 유전자 변형 및 확장 단계 중 1개 이상을 포함할 수 있다.

[0367] 일부 실시양태에서, 유전자 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따라 제조된 유전자 변형된 세포독성 림프구는 바이러스 벡터를 사용하여 유전자 변형되었다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표시되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표시되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표시된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결합의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다.

일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0368] 키트

[0369] 본 개시내용은 또한, 예를 들어 다음으로부터 선택된 본 개시내용의 1종 이상의 조성물을 포함하는 키트를 제공한다: (i) 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여 대상 PD-L1 결합 단백질 (예를 들어, scFv, 맥시바디 등), (ii) 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여 본 개시내용에 따른 대상 PD-L1 결합 단백질을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열(들)을 포함하는 1종 이상의 핵산 (예를 들어, 벡터), 및 (iii) 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여 본 개시내용에 따른 1종 이상의 유전자 변형된 세포 (예를 들어, 세포독성 림프구) (예를 들어, 1종 이상의 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물 중). 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구가 키트에 포함된다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질이 키트에 포함된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구가 PD-L1 결합 단백질과 조합되어 키트에 포함된다. 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포독성 림프구가 키트에 포함된다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 유전자 변형된 세포독성 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 바이러스 벡터에 의해 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 38A1 (서열식별번호: 37; 도 11a, 도 16a)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLV4301G PDLV scFV 19H9 (서열식별번호: 38; 도 11b, 도 16b)이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 감마레트로바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 pMSCIV 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 19H9를 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 렌티바이러스 기반 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 38A1을 코딩하는 pLEV 기반 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 19H9를 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 38A1을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 PD-L1 결합 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 항원 결합 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 흑색종에서 더 큰 또는 증가된 결합 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질을 사용하여 유동 세포측정법 검정에서 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율을 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 PD-L1 양성 세포의 수를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 유동 세포측정법에 의해 검출된 PD-L1 양성 세포의 백분율의 증가는 결합 능력의 증

가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, 증가된 결합 능력은 (i) 형광 표지로 표지되거나 그에 의해 검출가능한 PD-L1 결합 단백질로 표지된, 유동 세포측정법 검정에서의 PD-L1 양성 세포의 평균 형광 강도 (MFI)를 결정하고, (ii) PD-L1 결합 단백질에 의해 수득된 MFI를 대조군 항체와 비교하거나 또는 19H9와 비교함으로써 측정되며, 여기서 대조군 항체 또는 19H9와 비교하여 PD-L1 결합 단백질을 사용한 유동 세포측정법에 의한 총 세포 집단의 MFI의 증가는 결합 능력의 증가를 나타낸다 (예를 들어, 실시예 3에서의 검정 참조). 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 38A1 단백질은 19H9와 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 생물학적 기능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1의 결속의 차단을 포함한다. 일부 실시양태에서, 생물학적 기능은 PD-1 및 PD-L1 신호전달 경로의 억제체를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 19H9 단백질은 38A1과 비교하여 Jurkat 세포에서 더 큰 또는 증가된 분비 능력을 나타낸다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 2 (CDR-L1), 서열식별번호: 3 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 4 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 6 (CDR-H1), 서열식별번호: 7 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 8 (CDR-H3)의 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서 PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 항체 또는 그의 단편이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 10 (CDR-L1), 서열식별번호: 11 (CDR-L2) 및 서열식별번호: 12 (CDR-L3)의 CDR을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 14 (CDR-H1), 서열식별번호: 15 (CDR-H2) 및 서열식별번호: 16 (CDR-H3)을 포함하는 CDR을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 1을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 5를 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 17을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 18을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13에 대한 90%, 95% 또는 98% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 경쇄 및 중쇄를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이며, 여기서 상기 경쇄는 서열식별번호: 9를 포함하고, 상기 중쇄는 서열식별번호: 13을 포함한다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 19를 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1, IgG2, IgG3 또는 IgG4 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 IgG1 서열을 추가로 포함하는 (즉, IgG1 서열에 접합된) 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, PD-L1 결합 단백질은 서열식별번호: 20을 포함하는 단일-쇄 Fv (scFv)이다. 일부 실시양태에서, 접합은 직접적이다. 일부 실시양태에서, 접합은 링커를 통해 이루어진다.

[0370] 일부 경우에, 대상 키트는, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 실시양태와 관련하여, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 방법을 실시하기 위한 적합한 지침서를 포함한다.

[0371] 본 개시내용의 비제한적 측면의 예

[0372] 실시양태를 포함한 상기 기재된 본 발명의 주제의 측면은 단독으로 또는 하나 이상의 다른 측면 또는 실시양태와 조합하여 유익할 수 있다. 상기 설명을 제한하지 않으면서, 1-76으로 넘버링된 본 개시내용의 특정 비제한

적 측면이 하기에 제공된다. 본 개시내용을 읽었을 때 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 분명할 바와 같이, 각각의 개별적으로 넘버링된 측면은 임의의 상기 또는 하기의 개별적으로 넘버링된 측면과 함께 사용되거나 그와 조합될 수 있다. 이는 모든 이러한 측면의 조합에 대한 제제를 제공하도록 의도되며, 하기에 명시적으로 제공된 측면의 조합으로 제한되지는 않는다:

- [0373] 1. PD-L1에 특이적으로 결합하고,
- [0374] (a) 서열식별번호: 2-4에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 6-8에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드; 또는
- [0375] (b) 서열식별번호: 10-12에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 14-16에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드
- [0376] 를 포함하며 제1 및/또는 제2 폴리펩티드의 각각의 3개의 CDR 아미노산 서열이 명시된 서열식별번호에 비해 2개 이하의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 것을 예외로 하는
- [0377] 항원 결합 부분을 포함하는 단백질.
- [0378] 2. 1에 있어서, 항원 결합 부분이 서열식별번호: 2-4에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 6-8에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 것인 단백질.
- [0379] 3. 2에 있어서, 제1 폴리펩티드가 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드가 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백질.
- [0380] 4. 1에 있어서, 항원 결합 부분이 서열식별번호: 10-12에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 14-16에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 것인 단백질.
- [0381] 5. 4에 있어서, 제1 폴리펩티드가 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드가 서열식별번호: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백질.
- [0382] 6. 1-5 중 어느 것에 있어서, 제1 폴리펩티드가 경쇄이고, 제2 폴리펩티드가 중쇄인 단백질.
- [0383] 7. 1-6 중 어느 것에 있어서, 단백질이 단일-쇄 항체 (scFv)이고, 제1 및 제2 폴리펩티드가 서로에 직접적으로 또는 링커를 통해 융합된 것인 단백질.
- [0384] 8. 7에 있어서, scFv가 서열식별번호: 17 또는 서열식별번호: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 단백질.
- [0385] 9. 1-8 중 어느 것에 있어서, 항원 결합 부분에 직접적으로 또는 링커를 통해 융합된 이뮤노글로불린 Fc 도메인을 포함하는 맥시바딘인 단백질.
- [0386] 10. 9에 있어서, 이뮤노글로불린 Fc 도메인이 IgG1 Fc 도메인인 단백질.
- [0387] 11. 10에 있어서, 서열식별번호: 18 또는 서열식별번호: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 단백질.
- [0388] 12. 9에 있어서, 이뮤노글로불린 Fc 도메인이 IgG4 Fc 도메인인 단백질.
- [0389] 13. 1-6 중 어느 것에 있어서, 인간화 항체인 단백질.
- [0390] 14. 1-13 중 어느 것의 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산.
- [0391] 15. 14에 있어서, 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 핵산.
- [0392] 16. 15에 있어서, 프로모터가 구성적 프로모터인 핵산.
- [0393] 17. 15에 있어서, 프로모터가 유도성 프로모터인 핵산.
- [0394] 18. 14-17 중 어느 것의 핵산을 포함하는 세포.
- [0395] 19. 18에 있어서, 핵산이 세포의 게놈 내로 통합되는 것인 세포.
- [0396] 20. 18 또는 19에 있어서, 단백질을 발현하고 분비하도록 유전자 변형된 세포독성 림프구인 세포.

- [0397] 21. 20에 있어서, 세포독성 림프구가 T-세포인 세포.
- [0398] 22. 21에 있어서, T-세포가 CD8+ T-세포인 세포.
- [0399] 23. 21에 있어서, T-세포가 CD4+ T-헬퍼 세포인 세포.
- [0400] 24. 21에 있어서, T-세포가 말초 혈액으로부터 유래된 것인 세포.
- [0401] 25. 20에 있어서, 세포독성 림프구가 자연 킬러 (NK) 세포인 세포.
- [0402] 26. 25에 있어서, NK가 말초 혈액으로부터 유래된 것인 세포.
- [0403] 27. 20에 있어서, 세포독성 림프구가 대상체로부터의 종양으로부터 유래된 종양 침윤 림프구 (TIL)인 세포.
- [0404] 28. 27에 있어서, TIL이 종양으로부터의 항원에 특이적인 수용체를 포함하는 것인 세포.
- [0405] 29. 20-28 중 어느 것에 있어서, 세포독성 림프구가 나이트 T-세포에 비해 1종 이상의 활성화 항원의 발현의 증가된 수준을 나타내는 것인 세포.
- [0406] 30. 29에 있어서, 1종 이상의 활성화 항원이 CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT 및 HLA-DR로부터 선택된 것인 세포.
- [0407] 31. 29 또는 30에 있어서, 세포독성 림프구가 종양 연관 항원에 특이적인 T-세포 수용체를 포함하는 것인 세포.
- [0408] 32. 대상체의 종양으로부터 단리된 세포독성 림프구 내로 14항-17항 중 어느 한 항의 핵산을 도입함으로써 세포독성 림프구를 유전자 변형시키는 단계이며, 여기서 유전자 변형된 세포독성 림프구는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 발현하고 분비하는 것인 단계;
- [0409] 유전자 변형된 세포독성 림프구를 확장시켜 유전자 변형된 세포독성 림프구의 집단을 생성하는 단계; 및
- [0410] 대상체에게 유전자 변형된 세포독성 림프구의 집단을 투여하여 종양을 치료하는 단계
- [0411] 를 포함하는 방법.
- [0412] 33. 32항에 있어서, 유전자 변형된 세포독성 림프구가 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 구성적으로 발현하는 것인 방법.
- [0413] 34. 32항에 있어서, 유전자 변형된 세포독성 림프구가 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 유도성으로 발현하는 것인 방법.
- [0414] 35. 32항-34항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 세포독성 림프구의 게놈 내로 통합되는 것인 방법.
- [0415] 36. 32항-35항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성 림프구가 T-세포인 방법.
- [0416] 37. 36항에 있어서, T-세포가 CD8+ T-세포인 방법.
- [0417] 38. 36항에 있어서, T-세포가 CD4+ T-헬퍼 세포인 방법.
- [0418] 39. 32항-35항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성 림프구가 자연 킬러 (NK) 세포인 방법.
- [0419] 40. 32항-39항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 변형된 세포독성 림프구가 종양으로부터의 항원에 특이적인 수용체를 포함하는 것인 방법.
- [0420] 41. 32항-40항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 변형 전에 대상체로부터 세포독성 림프구를 단리하는 것을 포함하는 방법.
- [0421] 42. 32항-41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단백질이 PD-L1에 특이적으로 결합하고,
- [0422] (a) 서열식별번호: 2-4에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 6-8에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드; 또는
- [0423] (b) 서열식별번호: 10-12에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 14-16에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드
- [0424] 를 포함하며 제1 및/또는 제2 폴리펩티드의 각각의 3개의 CDR 아미노산 서열이 명시된 서열식별번호에 비해 2개

이하의 보존적 아미노산 치환을 포함하는 것을 예외로 하는

- [0425] 항원 결합 부분을 포함하는 것인 방법.
- [0426] 43. 42항에 있어서, 상기 항원 결합 부분이 서열식별번호: 2-4에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 6-8에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법.
- [0427] 44. 43항에 있어서, 제1 폴리펩티드가 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드가 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0428] 45. 42항에 있어서, 항원 결합 부분이 서열식별번호: 10-12에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제1 폴리펩티드, 및 서열식별번호: 14-16에 제시된 3개의 CDR 아미노산 서열을 포함하는 제2 폴리펩티드를 포함하는 것인 방법.
- [0429] 46. 45항에 있어서, 제1 폴리펩티드가 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 제2 폴리펩티드가 서열식별번호: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0430] 47. 42항-46항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 폴리펩티드가 경쇄이고, 제2 폴리펩티드가 중쇄인 방법.
- [0431] 48. 42항-47항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 단일-쇄 항체 (scFv)이고, 제1 및 제2 폴리펩티드가 서로에 직접적으로 또는 링커를 통해 융합된 것인 방법.
- [0432] 49. 48항에 있어서, scFv가 서열식별번호: 17 또는 서열식별번호: 19에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0433] 50. 42항-49항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질이 항원 결합 부분에 직접적으로 또는 링커를 통해 융합된 이뮤노글로불린 Fc 도메인을 포함하는 맥시바딘인 방법.
- [0434] 51. 50항에 있어서, 이뮤노글로불린 Fc 도메인이 IgG1 Fc 도메인인 방법.
- [0435] 52. 51항에 있어서, 단백질이 서열식별번호: 18 또는 서열식별번호: 20에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.
- [0436] 53. 암을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체로부터 단리된 세포독성 림프구 내로 14항-17항 중 어느 한 항의 핵산을 도입함으로써 세포독성 림프구를 유전자 변형시키는 것을 포함하며, 여기서 유전자 변형된 세포독성 림프구는 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 발현하고 분비하는 것인, 유전자 변형된 세포독성 림프구를 제조하는 방법.
- [0437] 54. 53항에 있어서, 유전자 변형된 세포독성 림프구가 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 구성적으로 발현하는 것인 방법.
- [0438] 55. 53항에 있어서, 유전자 변형된 세포독성 림프구가 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 유도성으로 발현하는 것인 방법.
- [0439] 56. 53항-55항 중 어느 한 항에 있어서, 시험관내에서 세포독성 림프구를 확장시켜 유전자 변형된 세포독성 림프구의 확장된 집단을 제공하는 것을 포함하는 방법.
- [0440] 57. 53항-56항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 변형 전에 대상체로부터 세포독성 림프구를 단리하는 것을 포함하는 방법.
- [0441] 58. 57항에 있어서, 단리하는 것이 대상체의 종양으로부터 세포독성 림프구를 단리하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0442] 59. 57항에 있어서, 단리하는 것이 대상체의 말초 혈액으로부터 세포독성 림프구를 단리하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0443] 60. 53항-59항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성 림프구가 T-세포인 방법.
- [0444] 61. 60항에 있어서, T-세포가 CD8+ T-세포인 방법.
- [0445] 62. 60항에 있어서, T-세포가 CD4+ T-헬퍼 세포인 방법.

- [0446] 63. 53항-59항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성 림프구가 자연 킬러 (NK) 세포인 방법.
- [0447] 64. 53항-63항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산이 세포독성 림프구의 게놈 내로 통합되는 것인 방법.
- [0448] 65. 53항-64항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성 림프구가 나이브 T-세포에 비해 1종 이상의 활성화 항원의 발현의 증가된 수준을 나타내는 것인 방법.
- [0449] 66. 65항에 있어서, 1종 이상의 활성화 항원이 CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT 및 HLA-DR로부터 선택된 것인 방법.
- [0450] 67. 65항 또는 66항에 있어서, 유전자 변형된 세포독성 림프구가 대상체의 종양으로부터의 항원에 특이적인 T-세포 수용체를 포함하는 것인 방법.
- [0451] 68. 암을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 개체에게 1항-13항 중 어느 한 항에 따른 PD-L1에 특이적으로 결합하는 단백질을 투여하는 것을 포함하는, 상기 개체를 치료하는 방법.
- [0452] 69. 68항에 있어서, 투여하는 것이 대상체 내로 단백질을 코딩하는 핵산을 도입하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0453] 70. 68항에 있어서, 투여하는 것이 대상체 내로 단백질을 발현하고 분비하는 유전자 변형된 세포독성 림프구를 도입하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0454] 71. 70항에 있어서, 유전자 변형된 세포독성 림프구가 단백질을 구성적으로 발현하는 것인 방법.
- [0455] 72. 71항에 있어서, 유전자 변형된 세포독성 림프구가 단백질을 유도성으로 발현하는 것인 방법.
- [0456] 73. 72항에 있어서, 단백질의 발현을 유도하는 것을 포함하는 방법.
- [0457] 74. 70항-73항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성 림프구가 T-세포인 방법.
- [0458] 75. 74항에 있어서, T-세포가 CD8+ T-세포인 방법.
- [0459] 76. 74항에 있어서, T-세포가 CD4+ T-헬퍼 세포인 방법.
- [0460] 77. 70항-73항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성 림프구가 자연 킬러 (NK) 세포인 방법.
- [0461] 78. 70항-77항 중 어느 한 항에 있어서, 세포독성 림프구가 나이브 T-세포에 비해 1종 이상의 활성화 항원의 발현의 증가된 수준을 나타내는 것인 방법.
- [0462] 79. 78항에 있어서, 1종 이상의 활성화 항원이 CD25, CD26, CD27, CD28, CD38, CD40L, CD69, CD134, CD137, BTLA, PD-1, HVEM, LIGHT 및 HLA-DR로부터 선택된 것인 방법.
- [0463] 80. 78항 또는 79항에 있어서, 유전자 변형된 세포독성 림프구가 대상체의 종양으로부터의 항원에 특이적인 T-세포 수용체를 포함하는 것인 방법.
- [0464] 81. 제1-세포 상의 PD-L1을 1항-13항 중 어느 한 항의 단백질과 접촉시키는 것을 포함하는, 제1-세포 상의 PD-L1과 제2 세포 상의 PD-1 사이의 상호작용을 감소시키는 방법.
- [0465] 82. 81항에 있어서, 제1 및 제2 세포가 개체에 존재하고, 접촉시키는 것이 개체에게 1항-13항 중 어느 한 항의 단백질을 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.
- [0466] 83. 82항에 있어서, 도입하는 것이 전신 투여를 포함하는 것인 방법.
- [0467] 84. 82항에 있어서, 도입하는 것이 국부 투여를 포함하는 것인 방법.
- [0468] 85. 84항에 있어서, 국부 투여가 종양내 투여를 포함하는 것인 방법.
- [0469] 86. 81항-85항 중 어느 한 항에 있어서, 개체가 암을 갖는 것인 방법.
- [0470] 87. 87항에 있어서, 개체가 고형 종양을 갖는 것인 방법.
- [0471] 실시예
- [0472] 상기 제공된 개시내용으로부터 인식될 수 있는 바와 같이, 본 개시내용은 매우 다양한 적용을 갖는다. 따라서, 하기 실시예는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 본 발명을 어떻게 제조하고 사용하는지에 대한 완전한 개시 내용 및 설명을 제공하기 위해 제시되고, 본 발명자들이 그의 발명으로서 간주하는 것의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않을 뿐만 아니라 하기 실험이 수행되는 실험의 전부 또는 유일한 것임을 나타내는 것으로 의도되

지도 않는다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본질적으로 유사한 결과를 생성하도록 변화 또는 변형될 수 있는 다양한 중요하지 않은 파라미터를 용이하게 인식할 것이다. 사용된 숫자 (예를 들어 양, 온도 등)에 대해 정확성을 보장하기 위해 노력했으나 일부 실험 오차 및 편차를 고려해야만 한다. 달리 나타내지 않는 한, 부는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도이고, 압력은 대기압이거나 또는 대기압에 가깝다. 표준 약어, 예를 들어 bp, 염기쌍(들); kb, 킬로염기(들); pl, 피코리터; s 또는 sec, 초; min, 분; h 또는 hr, 시간; aa, 아미노산(들); nt, 뉴클레오티드(들) 등이 사용될 수 있다.

[0473] 실시예 1: 항원 결합 부분을 갖는 PD-L1 결합 단백질

[0474] PD-L1에 특이적인 재조합 항체 (인간 IgG의 인간 Fc 도메인에 융합된 항-PD-L1 scFv)를 생성하였다. scFv 과지 디스플레이 라이브러리 (비바 바이오테크놀로지스)를 사용하여, PD-L1에 특이적인 여러 scFv를 분리하였다. 2종의 scFv가 천연 PD-L1에 결합하였으며, 이를 38A1 및 19H9로 명명하였다. 38A1-scFv, 19H9-scFv 및 FMC63-scFv (항-CD19 scFv 음성 대조군)를 인간 IgG1의 Fc 도메인에 융합시켰다 (38A1-scFv-Fc, 19H9-scFv-Fc 및 FMC63-scFv-Fc). 이들을 다중부위 램다 과지 "게이트웨이" 재조합을 사용하여 렌티바이러스 및 레트로바이러스 플라스미드에 구축하였다 (예를 들어, 도 1 참조). 각각의 scFv 서열 옆에 진아트 (라이프 테크놀로지스)에 의해 합성되고 pMK 내로 서브클로닝된 재조합 부위 attL1 및 attR5를 플랜킹하였다. IgG1 Fc에 대한 서열 옆에 진아트 (라이프 테크놀로지스)에 의해 합성되고 pMK 내로 서브클로닝된 재조합 부위 attL5 및 attL2를 플랜킹하였다. 각각의 scFv를 렌티바이러스 플라스미드 (pLVU3pIRESeGFP; 도 2) 또는 레트로바이러스 플라스미드 (pMSCVIRESeGFP; 도 3)에서 IgG1-Fc와 재조합하였다. 재조합된 구축물은 attB5 재조합 부위를 통해 IgG1-Fc에 융합된 scFv (38A1, 19H9 또는 FMC63)의 융합체로 이루어진다.

[0475] PD-L1에 대한 38A1-scFv-Fc (서열식별번호: 17) 및 19H9-scFv-Fc (서열식별번호: 19) 맥시바디의 친화도를 결정하기 위해 (음성 대조군으로서 미세관 회합된 단백질 특이적 시약인 12D10-scFv-Fc를 사용함), 293-PD-L1을 사용하여 "세포 기반 ELISA"를 수행하였다. 38A1-scFv-Fc의 친화도 (EC50 = 0.1248)는 19H9-scFv-Fc에 대한 것 (EC50 = 0.4039; 도 5)보다 3.2배 더 큰 것으로 관찰되었다.

[0476] Jurak T-세포를 38A1-scFv-Fc, 19H9-scFv-Fc 또는 FMC63-scFv-Fc를 코딩하는 렌티바이러스로 형질도입하였다. 293-PD-L1을 38A1-scFv-Fc, 19H9-scFv-Fc 또는 FMC63-scFv-Fc를 안정하게 분비하는 Jurkat T-세포와 함께 16시간 동안 1:1의 비로 공동-배양하였다. 본 발명자들은 38A1-scFv-Fc, 19H9-scFv-Fc가 293-PD-L1에 결합하였지만 FMC63-scFv-Fc는 결합하지 않았다는 것을 발견하였다. 19H9-scFv-Fc와 비교하여, 본 발명자들은 293-PD-L1에 대한 38A1-scFv-Fc의 1.5배 초과 증진된 결합을 관찰하였다 (도 5). 이 결과는 19H9-scFv-Fc와 비교하여 PD-L1에 대한 38A1-scFv-Fc의 더 큰 친화도와 일치하였다.

[0477] TIL 세포주 M1034 및 M1015를 38A1-scFv-Fc, 19H9-scFv-Fc 또는 FMC63-scFv-Fc를 코딩하는 렌티바이러스로 형질도입하였다. eGFP 코-리포터에 대한 분류 및 시험관내 확장을 위해, 상청액을 FMC63-scFv-Fc 및 38A1-scFv-Fc를 분비하는 TIL로부터 수집하고, 10배 농축시키고, 이를 사용하여 293-PD-L1을 염색하였다. 음성 대조군 맥시바디 (FMC63-scFv-Fc)와 비교하여, 본 발명자들은 293-PD-L1에 대한 38A1-scFv-Fc의 50배 초과 증진된 결합을 관찰하였다 (도 6).

[0478] 이어서 PD-L1에 의해 차단된 T-세포 활성의 억제를 포기하는 38A1-scFv-Fc 및 19H9-scFv-Fc의 능력을 시험하였다. 그렇게 하기 위해, 12D10-scFv-Fc (미세관 회합된 단백질 특이적 음성 대조군), 19H9-scFv-Fc 및 38A1-scFv-Fc를, 활성화되었을 때 반딧불이 루시페라제를 생산하는 Jurkat T-세포 및 T-세포를 활성화시키지만 또한 상기 기재된 바와 같이 PD-L1의 과다-발현을 통해 이러한 활성화를 억제하도록 조작된 CHO 세포의 공동-배양물에 첨가하였다. Jurkat/CHO 공동-배양물에 대한 38A1-scFv-Fc 및 19H9-scFv-Fc의 첨가는 증가된 생물발광 활성을 유도하였지만 12D10-scFv-Fc의 첨가는 그렇지 않았다. 둘 다의 경우에서, PD-L1의 "탈-억제"는 용량 의존성이었다. 생물발광 활성을 유도하는 38A1-scFv-Fc의 능력은 19H9-scFv-Fc에 대한 것보다 3.6배 더 컸으며, 이는 PD-L1에 대한 친화도에서 관찰된 3.2배 차이와 일치하였다 (도 7).

[0479] 실시예 2: PD-L1 scFv를 발현하는 TIL의 생산

[0480] 바이러스 생산

[0481] 방법 단계:

[0482] 1) 5 ml 세포 배양 배지를 함유하는 10 mm 조직 배양 플레이트에 5x10⁶개 포에닉스 세포를 플레이팅한다.

[0483] 2) 리포펙타민을 사용하여 항-PD-1 scFv 및 6 ug pVSV-G를 함유하는 10 ug pLEV (렌티바이러스 벡터)로 세포를

형질감염시킨다.

- [0484] 3) 60시간 후에, 상청액을 수집하고 70 μ M 스트레이너에 의해 15 ml 튜브 내로 여과한다.
- [0485] T-세포 형질도입
- [0486] 방법 단계:
- [0487] 1) 12-웰-플레이트 내 2 ml TIL 배양 배지 중 300 ng/ml의 농도의 항-CD3으로 1×10^6 개 TIL을 활성화시킨다.
- [0488] 2) 48시간 후에, TIL을 2개의 웰로 분할하고, 1 ml의 상청액 (바이러스 생산에서의 단계 3으로부터)을 8 μ g/ml의 농도의 폴리브렌과 함께 각각의 웰 내로 첨가한다.
- [0489] 3) 32°C에서 800 x g로 30분 동안 세포를 원심분리한다.
- [0490] 4) 바이러스 함유 배지를 제거하고 세포 펠릿을 2 ml의 신선한 완전 배양 배지에 재현탁시키고, 세포를 24시간 동안 인큐베이션한다.
- [0491] 5) 세포를 급속 확장 프로토콜 (REP)을 사용하여 증식시킨다.
- [0492] 실시예 3: 19H9 및 38A1의 특징화
- [0493] 19H9는 더 큰 분비 능력을 나타냄
- [0494] 목적: 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 대 38A1을 과다발현하는 Jurkat 세포의 분비 능력을 비교하기 위함.
- [0495] 대체로, 19H9는 더 큰 분비 능력을 나타낸다. 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 대 38A1을 과다발현하는 Jurkat 세포의 분비 능력의 비교가 도 12에 제공된다. 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 및 38A1을 과다발현하는 Jurkat 세포로부터의 상청액을 수거하고, 농축시켜 IgG ELISA 검정에서 항-PD-L1 ScFV 농도를 결정하였다. Jurkat 세포 클론 19H9가 38A1과 비교하여 더 큰 분비 능력을 가진 것으로 발견되었다 (9.82 대 6.75 μ g/세포).
- [0496] 38A1은 PD-L1을 과다발현하는 Jurkat 세포에서 더 큰 결합 능력을 나타냄
- [0497] 목적: EL4 PD-L1 세포를 사용하여 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 및 38A1의 결합 친화도를 검사하기 위함.
- [0498] 대체로, 38A1은 PD-L1을 과다발현하는 Jurkat 세포에서 더 큰 결합 능력을 나타낸다. EL4 PD-L1 세포를 사용하여 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 및 38A1의 결합 친화도를 검사하였다 (도 13). EL4 PD-L1을 1, 3, 10, 30, 100 및 300 ng/ml의 농도의 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 또는 38A1과 함께 인큐베이션하고, 암시안 및 염소 항-인간 FITC로 염색하였다. 세포를 FACs 완충제로 세척하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 클론 38A1은 PD-L1 양성 세포의 백분율 (도 13a) 및 평균 형광 강도 (MFI) (도 13b) 둘 다에 있어서 PD-L1을 과다발현하는 Jurkat 세포에서 더 큰 결합 능력을 나타냈다.
- [0499] 38A1은 흑색종 종양 세포에서 더 큰 결합 능력을 나타냄
- [0500] 목적: 종양 세포에서 항-PD-L1 ScFV의 결합을 검증하기 위함.
- [0501] 대체로, 38A1은 흑색종 종양 세포에서 더 큰 결합 능력을 나타낸다. EL4 PD-L1 세포를 사용하는 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 및 38A1의 결합 친화도의 비교가 도 14에 제공된다. EL4 PD-L1을 1, 3, 10, 30, 100 및 300 ng/ml의 농도의 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 또는 38A1과 함께 인큐베이션하고, 암시안 및 염소 항-인간 FITC로 염색하였다. 세포를 FACs 완충제로 세척하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 클론 38A1은 PD-L1 양성 세포의 백분율 (도 14a) 및 평균 형광 강도 (MFI) (도 14b) 둘 다에 있어서 PD-L1을 과다발현하는 Jurkat 세포에서 더 큰 결합 능력을 나타냈다. 종양 세포에서 항-PD-L1 ScFV의 결합을 검증하기 위해, 3개의 흑색종 종양 세포를 IFN-감마 (100 ng/ml)로 처리하여 PD-L1 발현을 증진시켰다. 3일 후에, 세포를 세포 해리 완충제에 의해 수거하고, 100 ng/ml의 농도의 항-PD-L1 ScFV 클론 19H9 또는 38A1과 함께 인큐베이션하고, 염소 항-인간 FITC로 염색하였다. 세포를 FACs 완충제로 세척하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. 본 발명자들은 클론 38A1이 PD-L1 양성 세포의 백분율 및 MFI 둘 다에서 더 큰 결합 친화도를 나타냈다는 것을 발견하였다. 종합하면, 클론 38A1은 클론 19H9와 비교하였을 때 더 큰 결합 친화도를 갖지만, 약간 더 적은 분비 능력을 갖는다.
- [0502] 38A1은 더 큰 생물학적 기능을 나타냄
- [0503] 목적: 항-PD-L1 ScFV의 2종의 클론 (19H9 및 38A1)의 생물학적 기능을 추가로 특징화하기 위함.
- [0504] 대체로, 38A1은 19H9보다 더 큰 생물학적 기능을 나타낸다. 항-PD-L1 ScFV의 2종의 클론 (19H9 및 38A1)의 생

물학적 기능을 추가로 결정하기 위해, PD-1 및 PD-L1 상호작용의 결속을 차단하는 항 PD-1 또는 PD-L1 항체의 효력을 결정하는데 사용될 수 있는 PD-L1 차단 검정을 수행하였다 (도 15). 검정은 2종의 유전자 조작된 세포주로 이루어진다: PD-1 이펙터 세포 (인간 PD-1 및 NFAT-유도된 루시페라제를 안정하게 발현하는 Jurkat T-세포) 및 동족 TCR을 활성화시키는 세포 표면 단백질과 인간 PD-L1을 안정하게 발현하는 PD-L1 aAPC/CHO-K1 세포. 2종의 세포 유형을 공동-배양하였을 때, PD-1 및 PD-L1의 결속은 TCR 신호전달을 억제하고 루시페라제 활성을 감소시켰다. 항-PD-1 또는 PD-L1 차단 항체의 첨가는 억제 신호의 방출을 도왔으며, 이에 따라 TCR 신호전달 및 NFAT-매개 루시페라제 활성을 증진시켰다. 루시페라제 신호 (RLU)는 항-PD-1과 비교하여 항-PD-L1로 차단된 경우에 더 큰 것으로 발견되었으며, 이는 PD-L1을 차단하는 것이 이러한 상황에서 PD-1보다 더 효과적인 것으로 보였다는 것을 시사한다 (도 15a). 예상대로, 더 큰 결합 친화도를 갖는 것으로 상기 제시된 항-PD-L1 ScFv 클론 38A1은 정제된 ScFv (P) 및 비-정제된 (NP) 환경 둘 다에서 고도로 증가된 루시페라제 신호로 인해 더 큰 생물학적 기능을 제공하였다 (도 15b).

[0505] 상기는 단지 본 발명의 원리를 설명한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는, 본원에 명백하게 기재되거나 제시되어 있지 않지만 본 발명의 원리를 구현하고 그의 취지 및 범주 내에 포함되는 다양한 배열을 고안할 수 있을 것이라고 인지될 것이다. 추가로, 본원에 기재된 모든 예 및 조건 언어는 주로 독자가 본 발명의 원리를 이해하는데 도움이 되도록 의도되고, 이러한 구체적으로 기재된 예 및 조건으로 제한되지 않는다. 더욱이, 본 발명의 원리, 측면 및 실시양태 뿐만 아니라 그의 구체적 예를 기재하는 본원의 모든 서술은 그의 구조적 및 기능적 등가물 둘 다를 포괄하는 것으로 의도된다. 추가적으로, 이러한 등가물은 현재 공지된 등가물 및 향후 개발될 등가물, 즉 구조에 상관 없이 동일한 기능을 수행하도록 개발된 임의의 요소 둘 다를 포함하는 것으로 의도된다. 따라서 본 발명의 범주는 본원에 제시되고 기재된 예시적인 실시양태에 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 오히려, 본 발명의 취지 및 범주는 첨부된 청구범위에 의해 구현된다.

[0506] 상기 제시된 예는 본 발명의 조성물, 시스템 및 방법의 실시양태를 어떻게 제조하고 사용하는지에 대한 완전한 개시내용 및 설명을 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 제공하기 위해 제시되고, 본 발명자들이 그의 발명으로서 간주하는 것의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 본 발명을 수행하기 위한 상기-기재된 방식의 변형은 하기 청구범위의 범주 내에 포함되는 것으로 의도된다. 본 명세서에 언급된 모든 특허 및 공개는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자의 기술 수준을 나타낸다. 본 개시내용에 언급된 모든 참고문헌은 각각의 참고문헌이 개별적으로 그 전문이 참조로 포함되어 있는 것과 동일한 정도로 참조로 포함된다.

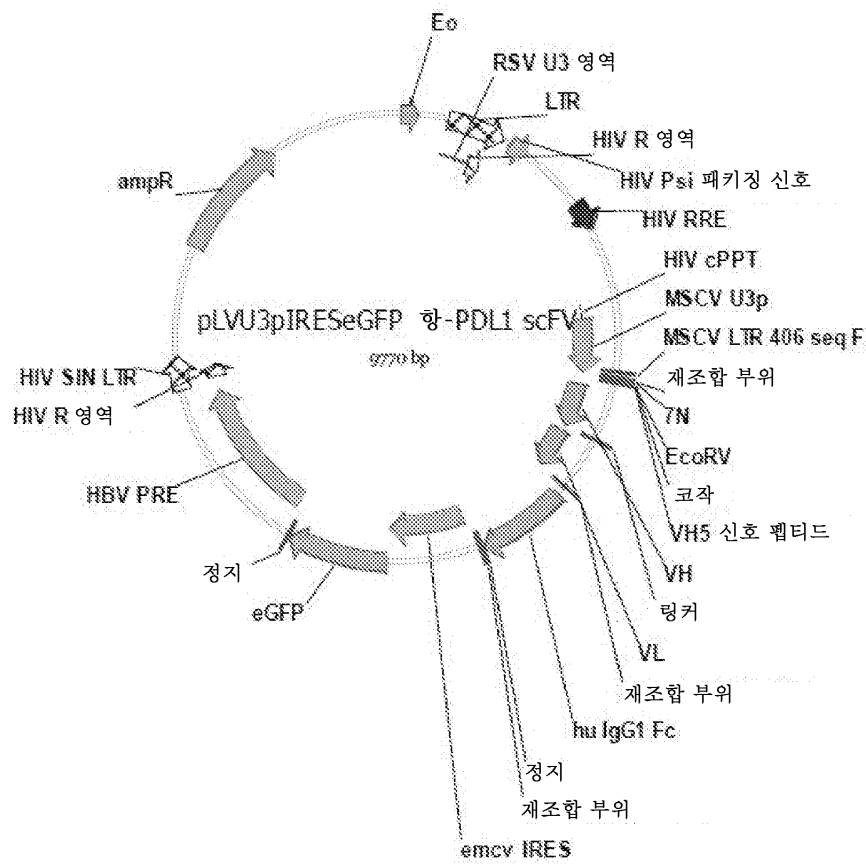
[0507] 모든 표제 및 섹션 명칭은 단지 명확성 및 참조 목적을 위해서만 사용되고, 어떤 방식으로든 제한으로 간주되는 것은 아니다. 예를 들어, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 본 발명의 취지 및 범주에 따라 적절한 경우 상이한 표제 및 섹션으로부터 다양한 측면을 조합하는 유용성을 인지할 것이다.

[0508] 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 참조로 본원에 포함되고, 모든 목적을 위해, 각각의 개별 공보 또는 특허 또는 특허 출원이 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 나타내어진 것과 동일한 정도로 본원에 포함된다.

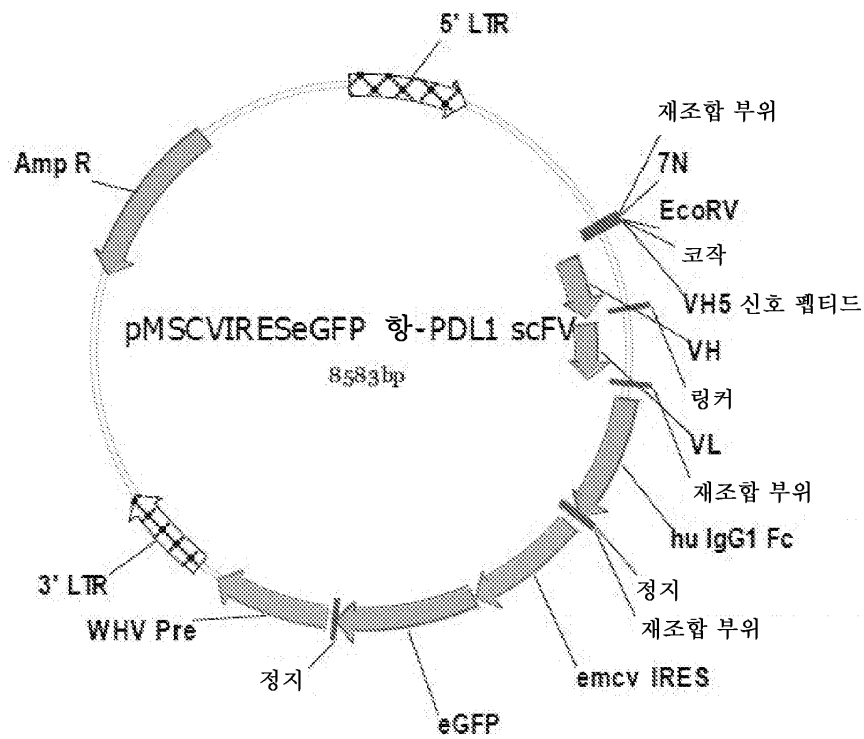
[0509] 본 출원의 많은 변형 및 변경은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 분명할 것이므로 그의 취지 및 범주를 벗어나지 않고 이루어질 수 있다. 본원에 기재된 구체적 실시양태 및 실시예는 단지 예로 제공되고, 본 출원은 단지 첨부된 청구범위, 이와 함께 이러한 청구범위에 의해 부여되는 등가물의 전체 범주의 관점에서만 제한될 것이다.

도면

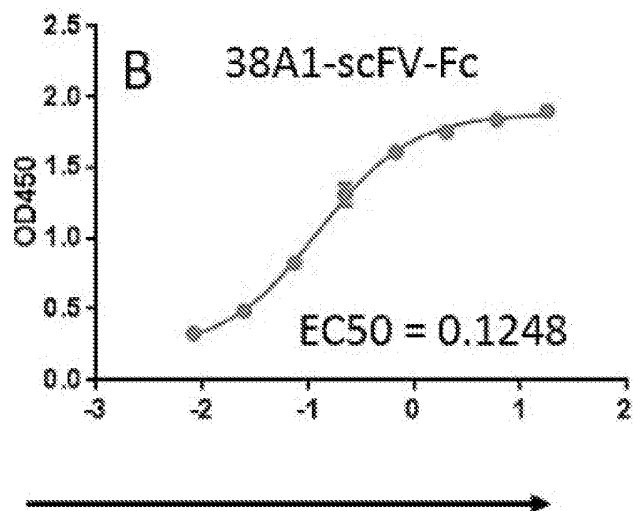
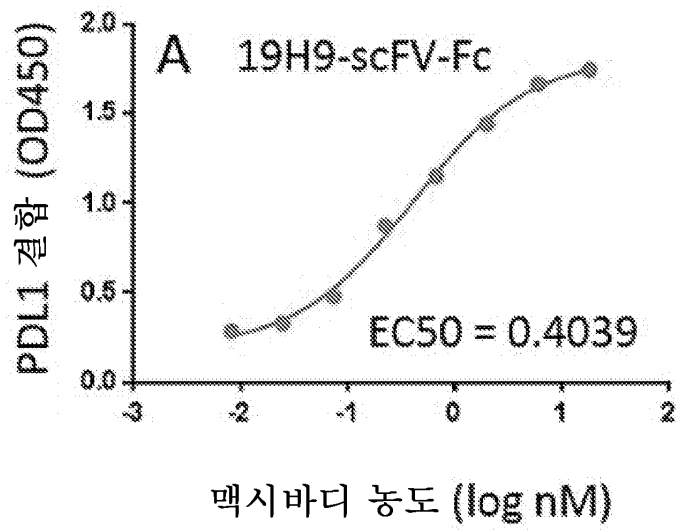
도면1



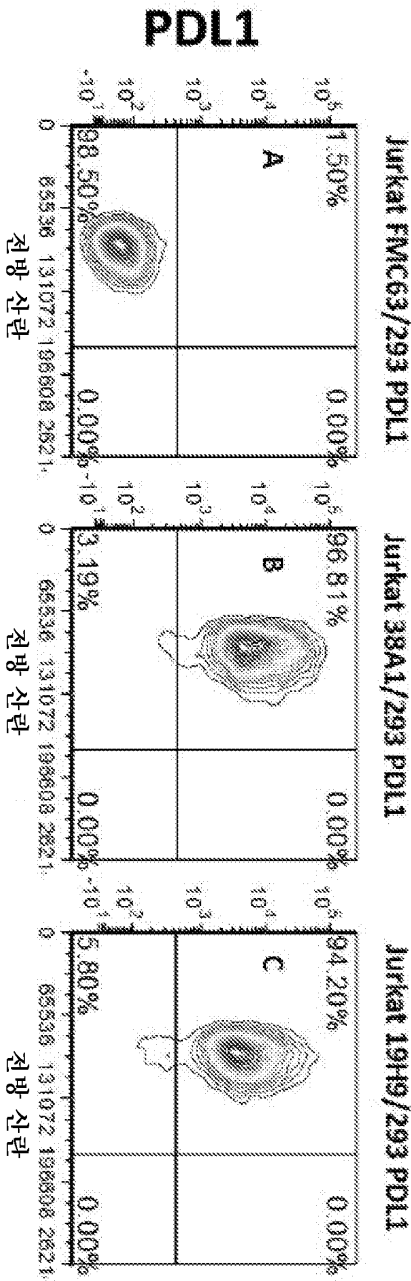
도면2



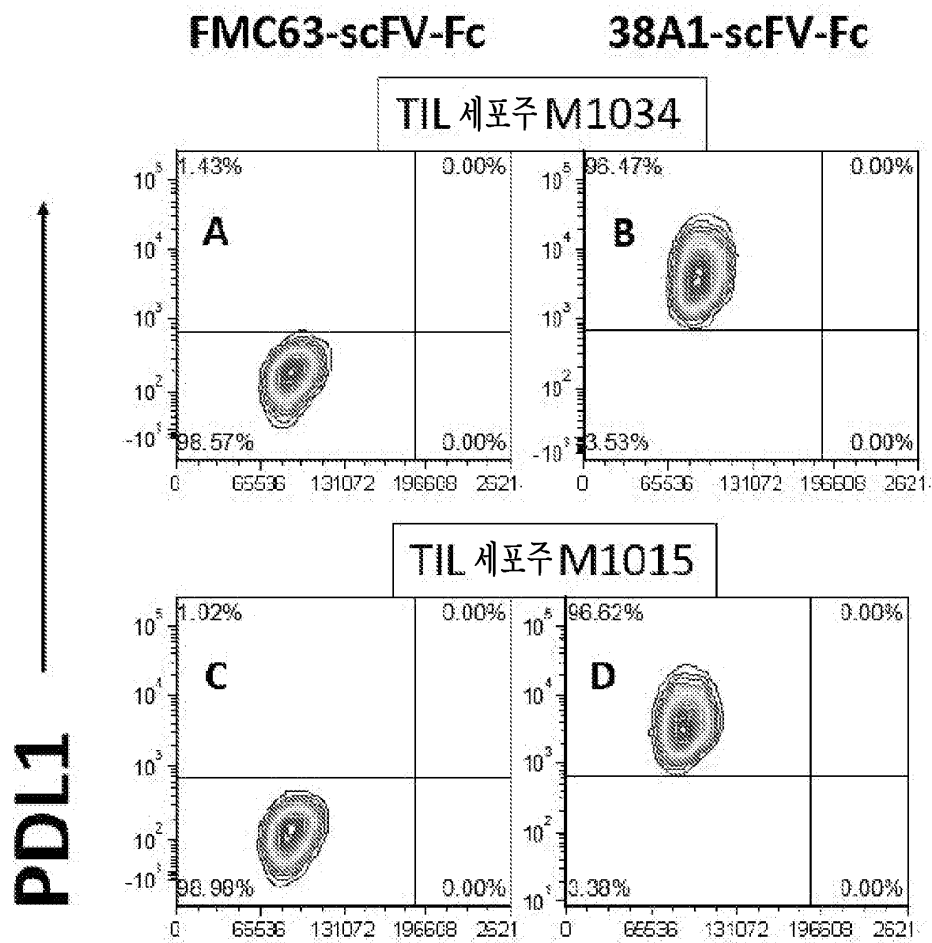
도면3



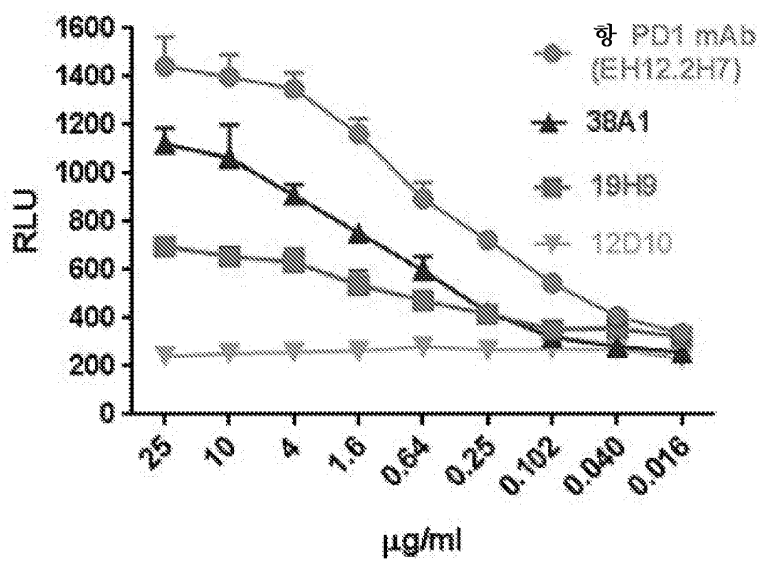
도면4



도면5



도면6



도면7a

항체 38A1

경쇄

SYVLTPPSVSVAPGQTARITCGGN**NIGRK**IVHWYQQRPGQAPVLVIY**YDT**DRPAGIPERFSGSN
SGNMTALTISTVGAGDEADYYC**QVWDTGSDHV**VFGGGTKLTVL

(SEQ ID NO: 1)

CDR1 (CDR-L1): NIGRKI (SEQ ID NO: 2)

CDR2 (CDR-L2): YDT (SEQ ID NO: 3)

CDR3 (CDR-L3): QVWDTGSDHV (SEQ ID NO: 4)

중쇄

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSNYA**MSWVRQAPGKGLEWVST**ISGSGGTT**YYADSVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYC**AKDWFRSSSPDAFDI**WGQGTTTVSA

(SEQ ID NO: 5)

CDR1 (CDR-H1): GFTFSNYA (SEQ ID NO: 6)

CDR2 (CDR-H2): ISGSGGTT (SEQ ID NO: 7)

CDR3 (CDR-H3): AKDWFRSSSPDAFDI (SEQ ID NO: 8)

항체 19H9

경쇄

NFMLTQPHSVSESLGKTVTISCTGSS**SGSIARKF**VQWYQQRPGSSPTTVIY**ENN**QRPSGVSDRFSG
SIGSSNSASLTISGLKTEADYYC**QSYDSSNV**VFGGGTKVTVL

(SEQ ID NO: 9)

CDR1 (CDR-L1): SGSIARKF (SEQ ID NO: 10)

CDR2 (CDR-L2): ENN (SEQ ID NO: 11)

CDR3 (CDR-L3): QSYDSSNV (SEQ ID NO: 12)

중쇄

QVQLQESGGGLVKPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYS**MNWWVRQAPGKGLEWVSG**INTAGDT**HYPESVKG
RFTISRDNARNSLNLQMNSLRAEDTAVYYC**VRERVERYSGYDAFDI**WGQGTTTVSA

(SEQ ID NO: 13)

CDR1 (CDR-H1): GFTFSSYS (SEQ ID NO: 14)

CDR2 (CDR-H2): INTAGDT (SEQ ID NO: 15)

CDR3 (CDR-H3): VRERVERYSGYDAFDI (SEQ ID NO: 16)

도면7b

38A1 ScFv 의 예

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLEWVSTISGSGGTTYADSVK
GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDWFRSSSPDAFDIWGGQTTVTVSAGGGGSGGG
GGGGGGSGAPSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGRKIVHWYQQRPGQAPVLVIYYDTRPA
GIPERFSGSNSGNMATLTISTVGAGDEADYYCQVWDTGSDHVVFGGKLTVL
(SEQ ID NO: 17)

*38A1 중쇄 (SEQ ID NO: 5)에 이어서 링커 (볼드체/밑줄표시)가 존재하며,
이에 이어서 38A1 경쇄 (SEQ ID NO: 1)가 존재한다.

Fc 도메인 (IgG1)에 융합된 38A1 ScFv를 갖는 단백질의 예

MGSTAILALLLAVLQGVSAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE
WVSTISGSGGTTYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRVEDTAVYYCAKDWFRSSSPDAFDI
WGQGTTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSGAPSYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGRKIVHWYQ
QRPGQAPVLVIYYDTRPAGIPERFSGSNSGNMATLTISTVGAGDEADYYCQVWDTGSDHVVFGG
GKLTVLGPRANFVYKSGPRPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNQ
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

(SEQ ID NO: 18)

*SEQ ID NO: 17의 단백질 (이탈릭체/밑줄표시)에 이어서 IgG1 Fc
도메인 (볼드체/밑줄표시)이 존재한다.

19H9 ScFv 의 예

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSGINTAGDTHYPESVKG
RFTISRDNARNSLNLQMNSLRAEDTAVYYCVREREVEREYSGYDAFDIWGGQTTVTVSAGGGGSGG
GGGGGGSGAPNFMLTQPHSVESLGTVTISCTGSSGSIARKFVQWYQQRPGSSPTTVIYENNQ
RPSGVSDRFSGSIGSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNVVFGGKTKVTVL
(SEQ ID NO: 19)

*19H9 중쇄 (SEQ ID NO: 13)에 이어서 링커 (볼드체/밑줄표시)가 존재하며,
이에 이어서 19H9 경쇄 (SEQ ID NO: 9)가 존재한다.

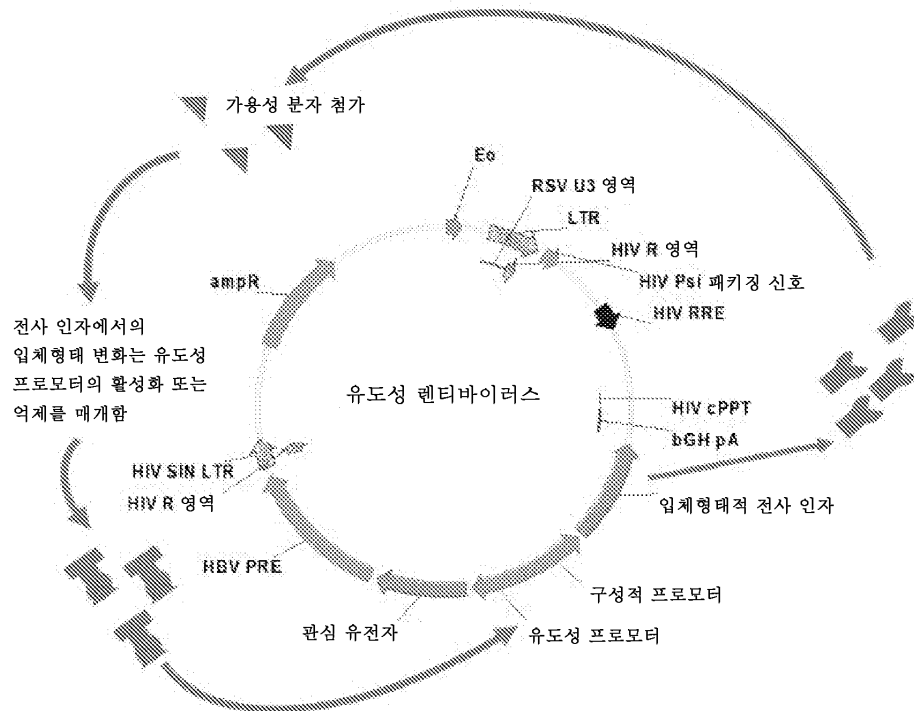
Fc 도메인 (IgG1)에 융합된 19H9 ScFv를 갖는 단백질의 예

MGSTAILALLLAVLQGVSAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLE
WVSGINTAGDTHYPESVKGRTISRDNARNSLNLQMNSLRAEDTAVYYCVREREVEREYSGYDAFD
IWGGQTTVTVSAGGGGSGGGGSGGGGSGAPNFMLTQPHSVESLGTVTISCTGSSGSIARKFVQ
WYQQRPGSSPTTVIYENNQRPVSDRFSGSIGSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSNVV
FGGKTKVTVLGPANFVYKSGPRPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTPPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

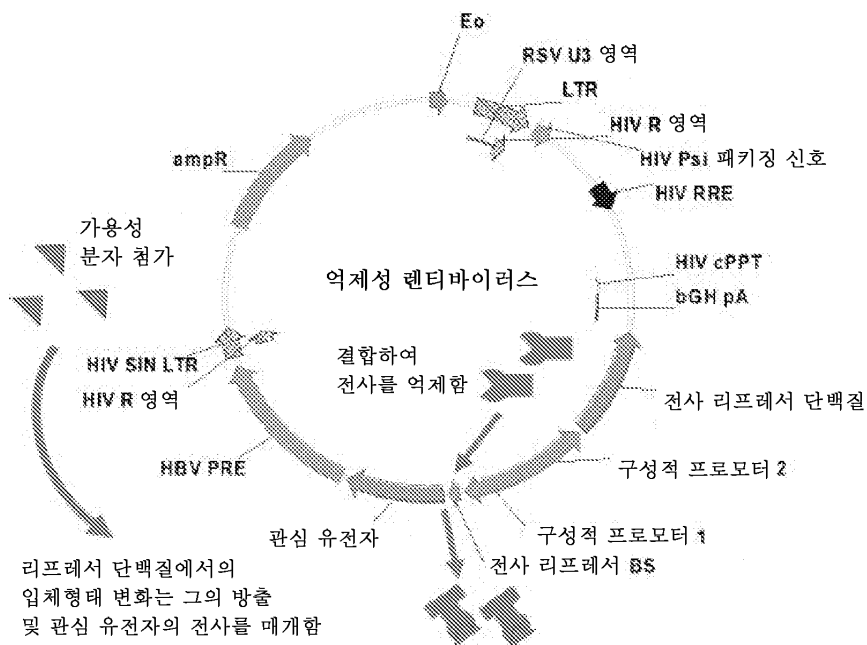
(SEQ ID NO: 20)

*SEQ ID NO: 19의 단백질 (이탈릭체/밑줄표시)에 이어서 IgG1 Fc
도메인 (볼드체/밑줄표시)이 존재한다.

도면8



도면9



도면 10aa

pLV430G (헤파바이러스 벡터) (SEQ ID NO:35)

cgataaccctaattcgatagcatatgcttccggtgggtaacatatgctattgaattagggttagtctggatagtataactactaccgggaa
gcatatgctaccggttaggttaccggtgatccggccacgatcgctccggcgtagaggatctaattgtagtttagctactcattaggcacc
ccaggtttacactttatgcttccggctcgtatgtgtggaattgtgagcggaatacaattcacacaggaaacagctatgacatgattac
gccaagcgcgcaattaaccctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaattgtagtcttatgcaatactctttagtcttgaaca
tggtaacgatgagtttagcaacatgcttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagtaagggtgtagctgctgctta
tttagaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgattgagagatatgtatttaagtgcctagctgatac
ataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgcctt
gagtcttcaagtagtgtgctccgctgtgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatcttagcagt
ggcgcccgaacagggacttgaagcgaaagggaaccagaggagctctctcgacgcaggactcggttgcgaagcgcgacggcaaga
ggcgaggggcgggactggtgagtagccaaaaatttgactagcgaggctagaaggagagagatgggtgagagcgctcagtattaa
cgggggagaattagatcgcatgggaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaataataaataaacatagtagtggaagc
agggagctagaacgattcgagtttaactcctggcctgttagaacaatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaacatcccttca
gacaggatcagaagaacttagatcattatataatcagtagcaaccctctattgtgtgcatcaaggatagagataaaagacaccaaggaa
gctttagacaagatagaggagagcaaaaacaaagttaagaccaccgcacagcaagcgccgctgatcttcagacctggaggaggagata
tgagggacaattggagaagtgaattataataataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagag
tggtgacagagaaaaagagcagtggaataggagctttgttcttgggttcttgggagcagcaggaaagcactatggcgagcgtcaat
gacgctgacgtacagccagacaattattgtctggtatagtcagcagcagaacaatttgcagggtatttagggcgcaacagcatctgtt
gcaactcacagctctgggcatcaagcagctcagcgaagaatcctggctgtggaagatacctaaaggatcaacagctcctggggtttg
gggtgctctggaaaactcatttgcaccactgctgtccttggaaatgctagtgtggagtaataaatctctggaacagatttgaatcacagacct
ggatggagtgggacagagaaaataacaattacacagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaaaatgaac
aagaattattggaattagataaattggcaagtttgggaattggttaacatacaaaattggctgtggtatataaaattattcataatgtagt
aggaggcttggtaggtttaagaatagtttttctgcttctctatagtagaattagtaggagggatattcaccattatcgtttcagaccacc
tcccaaccgcaggggaccgacagcccggaaggaatagaagaagaggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtaac
ggactctgcaggtatcggttttaaaagaaaagggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtagacataatgcaacagacat
acaaactaaagaattacaaaacaaattacaaaattcaaaattttatcgattttttagtctccgaaaaaggggggaatgaaagacccc
acctgtaggtttgcaagcagcttaagtaacgccattttgcaaggcatggaaaatacataactgagaatagagaagttcagatcaagggtta
ggaacagagagacagcagaataggccaaacaggatattctgtgtaagcagttcctgccccggctcaggggccaagaacagatggtccc
agatcggtccgcccctcagcagttctagagaaccatcagatgtttccagggtgccccaggacctgaaatgacctgtgcttatttgaact
aaccaatcagttcgcttctgcttctgttcgctgcttctgctccccgagctcaataaaagagcccacaaccctcactcgcgcgagctcct
ccgatagactgctgcccgggtaccgatatacaagttgtacaaaaagctgaacgagaaacgtaaaatgataaaatataatataatta
aattagattttgcataaaaaacagactacataaactgtaaaaacacataatccagtcactatggcgccgcattaggcaccggcgttta
cactttatgcttccggctcgtataatgtgtggaattttaggttaggacgtcgagattttcaggagctaaaggaagctaaaaatggagaaaaaat
cactgatataccaccgttgatataatcccaatggcatgtaagaacattttgaggcatttcagtcagttgctcaatgtacctataaccagacc
gttcagctgatatattcggccttttaagaccgttaagaaaaataagcacaagttttatccggcctttattcacattcttcccgcttgatgaa
tgctcatccggaattccgtatggcaatgaaagacggtgagctggtgatatgggagatgtgtcaccttgttacaccgttttccatgagcaaac
gaaacgttttcatcgctcgtgagtgaaataccacgacgatttccggcagtttctacacatatattcgcaagatgtggcgtgttacggtgaaaacc
tggcctatttccctaaagggtttattgagaatgttttctgctcagccaatccctgggtgagtttaccagttttgatttaaacgtggccaatat
ggacaacttcttccccggttttaccatgggcaaatattatcgcaaggcgacaaggtgctgatgccgctggcgattcaggttcatcatgcc
gtttgtgattggcttccatgctgcgagaaatgcttaattacaacagtagtgcgatgagtgaggcgggcggttaaacgctggatccgg
cttaataaaagccagataacagatgctgctatttgcgctgctatttgcggtataagaatatatactgatgtatataccgaagtatgtcaaaa
agaggtagctatgaagcagctattacagtgacagtgacagctatcagttgctcaaggcatatgatgtcaatatctcgggtct
ggttaagcacaaactgcagaatgaagcccgtcgtcgtgcggaacgctggaagcggaatcaggaaagggtggctgaggtcggcg
gtttattgaaatgaacgctcttttgcgtacgagaaacagggggtggtgaaatgagtttaaacctataaaagagagagcggttatc
gtctgtttgtgagtagtacagagtagattattgacacgcccggcgacggatggtgatccccctggccagtgacgctcgtctcagataaagt

도면10ab

ctccgctgaactttaccggtggtgcatatcggggatgaaagctggcgcatgatgaccacgcatatggccagtggtccggtctccgttatcgg
ggaagaaagtggtctgactcagccaccgcaaaatgacatcaaaaacgcatcattacgtgtctggggaatataaatgacaggtccctta
tacacagccagctgctgaggtcgaccatagtgactggatgtgtgtgtttacagtattatgtagtctgtttttatgcaaaatcaatttaatat
tgatatttatatcattttacgtttctgttcagctttctgtacaaagtggtgattcaggttaattaagctagcctagtccattgttcagtggttc
gtagggctttccccactgtttggcttcagtatatggatgatgtggtattggggccaagtctgtacagcatctgagtcctttttaccgctgt
taccaattttctgtctttgggtatatacattaaacctaacaacaaagagatgggggtactctctaaattttatgggttatgtcattggatgt
tatgggtccttggccacaagaacacatatacaaaaaacaaagatgttttagaaaactcctattaacaggtcattgattgaaagtatgt
caacgaattgtgggtctttgggtttgtctgccccttttacacaatgtggttatcctgctgtgacgtttgtatgcatgtattcaatcaagcagg
ctttcactttctgccaacttacaagcctttctgtgtaacaatacctgaacctttaccggttgcgggcaacggcaggtctgtgccaagt
ttgtctgacgcaacccccactggctggggcttggtcatgggcatcagcgcatgctggaaccttttcggctctctgctgcatcactacggt
aactcctagcgtgtgtttgtctgcagcaggtctggagcaaacattatcgggactgataactctgtgtctatcccgcaaatatacatcgtt
ccatggctgctaggtctgtctgccaactggatctgctgggacgtctttgttacctccgctggcgctgaatctgctggacgacctctctg
gggtcgtctgggactctctgctcccttctcgtctgctgctgacgacgagggcgacctctctttacgctggactccccgtctgtgcttc
tcatctgcccggagcgtgtgcaactgcttcacctctgacgtcgcagtgagaccacgtgaacgccaccaaatattgccaaaggtcttacata
agaggactctggactctcagcaatgtcaacgacgaccttgaggcatacttcaaagactgtttttaagactgggaggagtgggggag
gagattaggttaaaggctttgtactaggaggctgtaggcataaattggctgctgcaccagcaccatggcgcaatcactagagcgggtacct
ttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccacttttaaaagaaaagggggactggaagggttaattcactcccaacgaag
acaagatctgcttttctgttactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctgctaactagggaacccactgcttaagc
ctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgctgcccgtctgtgtgactctgtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgt
ggaaaatctctagcagtagtagttcatcttattattcagtagttataacttcaaagaaatgaatatcagagagttagaggaaactgtt
tattgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcaaaaattcacaataaagcatttttctactgcattctagtgtgtgtttgccaa
actcatcaatgtatcttatcatgtctggtctagctatcccccttaactccgcccatactccgcccagttccgcccattctccg
ccccatggctgactaattttttatgtcagagggcggagccggatcccttgagtggtttcatctctggagcagactttgcagctgtggtact
gcaacacaacattgcctttatgttaactcttgctgaagctcttacaccaatgtgaggggacatgtaactccaggggccaggaagactac
gggaggctacaccaacgtcaatcagaggggctgtgtgactaccgataaagcggaacctcaagagggcattagcaatagtgtttataaggcc
ccctgttaattcttgaagacgaaaggcctctgatacgcctattttataggttaattgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggc
acttttggggaaatgtgctgaggaaacccctattgtttttttaaatacattcaaatatgtatccgctcatgagacaataaacctgataaat
gcttcaataatattgaaaagggaagtagtagtattcaacatttccgtgtcgccttattccctttttgcgcattttgccttctgttttgc
accagaaaacgctggtgaaagttaaagatctgaagatcagttgggtgacagagtggtttacatcgaactggtatcaacagcggttaagat
ccttagagagttttccccgaagaacgttttcaatgatgagcacttttaaagttctgtatgtggcgcggtattatccgtgttgacgcccggc
aagagcaactcgtgctgcccatacactattctagaatgacttggttagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgaca
gtaagagaattatgcagtgtgccaataacctagtgataacactcgcccaacttactctgacaacgatcggaggaccgaaggagctaa
ccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaacggagctgaatgaagccatacaaacgacgagcgtgac
accacgatcctgagcaatggcaacaacgttgcgcaaacatttaactgggaactacttacttagcttccggcaacaattatagactgg
atggaggcggataaagtgcaggaccactctgctgctggcccttccggctgggtttattgtctgataaatctggagccgggtgagcgtggg
tctcgcggtatcattgagcactggggccagatggttaagccctccgtatcgtagttatctacacgacggggagttaggcaactatggatgaa
cgaaatagacagatcgtgagataggtgctcactgattaagcattggtaactgtcagaccaagttactcatatacttttagattgatttaa
aacttatttttaattaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttctgttccactgagcgt
cagacccctgagaaaagatcaaaggatcttcttgagatcctttttctgctgataatctgctgttcaacaaaaaacacgcctaccag
cggtgtttgtttccggatcaagagctaccaactcttttccgaagtaactggttcagcagagcgagatacacaataactgtccttctagt
gtagcctgtagttaggccaccacttcaagactctgtagcaccgctacatacctgctctgtaactctgttaccagtggtgctgctccagtggc
gataagctgtgttaccgggttgactcaagacgatagttaccggataaggcgacggtcggtgaacggggggttcgtgcacacagcc
cagcttgagcgaacgacctacacgaactgagatcctacagcgtgagcattgagaagcgccacgctcccgaaggagaaaggcgga
caggtatccggttaaggcagggctggaacaggagagcgacagggaggttcagggggaaacgcctggtatctttatagctcgtgctggg
tttccacactctgactgagcgtcatttttgtgtagctgctcagggggcgaggcctatggaaaacgccagcaacgcggtcttttacggt

도면10ac

tcctgctcttttctgctgcttttgaagctgtccctgatggtgctcatctacctgctggacagcatggcctgcaacgcgggcatcccgatccg
ccggaagcgagaagaatcataatggggaaggccatccagcctcgctcg

도면 10b

pClGO-VSV.G (VSVG) (SEQ ID NO:36)

gtcgacggatcgggagatcaattccggcacctgtcctacgagttgcatgataaagaagacagtcataagtcggcgacgatagtcacccc
gcgcccaccggaaggagctgactgggtgaaggctcctcaaggcgatcggtcgatgcaggaaaaggacaagcagcgaataacacgcccc
ttgggaggtggcgcatatgcaaaggatagcactccactctactactgggtatcatatgctgactgtatatgcatgaggatagcatatgcta
cccgatacagattaggatagcatatactaccagatatagattaggatagcatatgctaccagatatagattaggatagcctatgtacc
agatataaattaggatagcatatactaccagatatagattaggatagcatatgctaccagatatagattaggatagcctatgtaccaga
tatagattaggatagcatatgctaccagatatagattaggatagcatatgctatccagatatttgggtagtatatgctaccagatataaatt
aggatagcatatactaccctaattctctattaggatagcatatgctaccggatacagattaggatagcatatactaccagatatagattagg
atagcatatgctaccagatatagattaggatagcctatgctaccagatataaattaggatagcatatactaccagatatagattaggata
gcatatgctaccagatatagattaggatagcctatgctaccagatatagattaggatagcatatgctatccagatatttgggtagtatatgc
taccttggaacattagcccacgtgctctcagcgacctgtgaatatgaggaccaacaacctgtgcttggcgctcaggcgcaagtgtgtg
taatttgcctccagatcgcaaatcgccccctatcttggccccccactctatgacaggtattccccggggtgccattagtggtttgtgg
gcaagtgtttgacgcagtggttagcggggttaacaatcagccaagttattacaccttattttacagtcacaaaccgagggcgcggtgtgg
gggtgacgcgtgccccactccacaattcaaaaaaagagtgccactgtcttttttggggccattggcggtggagccccgtttaatt
ttcgggggtgttagagacaacaggatggagtcgctgctgctggcgctccactctcttccccctgttacaaatagagtgaacaacatggtcac
ctgcttggctccctgctgggacacatctaataccccagatcatattgactaggattatgtgttggccatagccataaattcgtgtgagat
ggacatccagctcttaccgctgttcccccccatggatttctattgttaaaagatttcagaatgttcttactactagtagtatttattgccaa
ggggtttgtgagggttatattggtgtcatagcaccaatgccaccactgaacccccgtcacaattttattctggggcgctcacctgaacacctgtt
ttcagacacctcacataccttactgttcacaactcagcagttattctattagctaaacgaaggagaatgaagaagcaggcgcaagattcag
gagagttcactgccgctcctgtatcttcagccactgccccgtgactaaaatggttactacctctgtgaatcctgaccccatgtaataaa
accgtgacagctcatgggggtggagatagctgttcccttaggacccctttactaacctaattcgatagcatatgcttccgttgggttaacata
tgctattgaattagggttagctggatagatatactactaccgggaagcatatgctaccgtttagggttaacaaggggcttataaacac
tattgtaatccctcttgggggtcgcttctcggtagctacacaggccccctgattgacgttgggtgtagcctccctagcttctcctgggccccct
gggaggtacatgtccccagcattggtgaagcctcagccaaggttacacataaaggcaattgtgtgttcagtcacacagactgcaaag
tctgtccaggatgaaagccactcaaggagcttcaatattggccattagccatattattcattggttatatagcataaataatattggtcatt
ggccattgcatagttgtatctatataatgtacatttatattggctcatgtccaatatgaccgccatgttggcattgattattgactagtta
ttaatagtaataattacgggggtcattagttcatagcccatataggagttccgcttacataactacggttaaatggcccgcctggctgaccg
cccaacgacccccccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacccaatagggactttccattgacgtcaatgggtggagatt
tacggtaaaactgcccacttggcagtagacaaagtgtatcatatgccaaagtcgccccctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggc
attatgcccagtagacattacgggacttctacttggcagtagacatctacgtattagtcacgtattaccatggtgatcggttttggcag
acaccaatggggtgtagcggtttgactcaggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatgggagttgttttggcaccaaaatca
acgggactttccaaaatgtcgaataacccccccccgttgacgcaaatggggtgagcggtgtacgggtgggaggtctataaagcagagctc
gtttagtgaacgctcagatcactagaagctttattgcggtatttatcacagttaaattgctaacgcagtcagtgcttctgacacaacagctc
aacttaagctgcagaagttggtcgtgaggcactgggcaggtaagtatcaaggttacaagacaggtttaaaggagaccaatagaactgggct
gtcagagacagagaagactcttgcgttctgataggcacctattggtcttactgacatccacttgcctttctccacaggtgtccactccag
tcaattacagctcttaaggctagtagtactaatacagactcactataggctagcggtaccgagctcggtaccactagtaacggccgagctgtg
ctggaattcaacagagatcgatctgttcttgcactatgaagtccttttgcacttagccttttattcattgggggaattgcaagttcac
agtttttccacacacacaaaaggaaactggaataatgttcttcaattaccattattgcccgtaagctcagatttaaatggcataatgac
ttaataggcacagccatacaagtaaaatgccaaagagtcacaagctattcaagcagacgggttgatgtgtcatgcttccaaatgggtcac
tacttgtgatttccgctggtatggaccgaagtataaacacagtcacatccgactcctcactccatctgtagaacaatgaaggaaagcattgaa
caaacgaacaaggaaactggctgaatccaggcttccctcctcaagttgtggatgcaactgtgacggatgccgaagcagtgattgtcca
ggtagctcctcaccatgtgctggtgatgaatacacaggagaatgggttgattcacagttcatcaacggaaaatgcagcaattacatgccc
cactgtccataacttacaacctggcattctgactataaggtcaaagggtatgtgattctaacctcatttccatggacatcaccttctctcag

도면 10bb

aggacggagagctatcatccctgggaaaggaggcgacaggggtcagaagtaactcttgcctatgaaactggaggcaggcctgcaaaat
gcaatactgcaagcattggggagtcagactcccatcaggtgtctggttcgagatggctgataaggatctcttctgcagccagattccctga
atgccagaagggtcaagatctctctccatctcagacctcagtggaagtaagtaattcaggacgttgagaggatcttgattattccctct
gccaagaacactggagcaaaatcagagcgggtcttccaatctctccagtgatctcagctatcttgcctctaaaccagggaaccggctctg
ctttaccataatcaatggtaccctaaatactttgagaccagatacatcagagtcgataattgctgctccaatcctctcaagaatggtcggat
gatcagtggaactaccacagaagggaactgtgggagtgactgggcacatatgaagacgtggaaattggaccatggagttctgaggacc
agttcaggatataagtttctttatcatgattggacatggtatgttgactccgatcttcatcttagctcaaaggctcaggtgttcgaacatct
cacattcaagacgctcttcgcaacttcctgatgatgagagttatgttggatgatactgggctatccaaaaatcaatcgagcttgaagg
ttggttcagtagttggaagaagctctattgctctttttctttatcatagggtaatactggactattcttggttctccgagttggtatccatcttg
cattaaattaaagcacaccaagaaaagacagatttatcacagacatagagatgaaccgacttggaagtaactcaaatcctgcacaacagat
tcttcatgtttggaccaaatcaactgtgatacatgctcaaaggcctcaattatattgagttttaaattttatggaattctgcagatatcca
tcacactggcgccgctcgagcatgcatcagaggccctattctatagtgacctaataatgctagagctcgctgatcgctcagctgactgtcct
tctagttgccagcatctgttgttccccctccccgctgcttcttgaccctggaagggtgccactccactgtccttcttaataaaatgaggaa
attgcatcgcatgttctgagtaggtgtcattctattctgggggtgggggtggggcaggacagcaaggggaggattgggaagacaatagcag
gcatgctggggatgctgggtgggtctatgcttctgaggcggaagaaccagctcattaatgaatcgccaaacgcggggagaggcggtt
tgcgtattggcgctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgtcgtcgttccgctgaggcgagcggtatcagctcactcaaaaggcgta
atcgggttatccacagaatcaggggataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaaccgtaaaaggccgc
gttgcgtggcttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaataatcgacgtcaagtcagaggtggcgaaaccgcagaggactat
aaagataccagcggtttccccctgggaagctccctgctgctctctggttccgacctgctgcttaccggatacctgtccgcttctcccttccg
gaagcgtggcgcttttcaatgctcagctgtaggtatctcagttcggttaggtcgttgcctcaagctgggctgtgtgcacgaacccccgtt
cagcccagccgctgcgcttatccggtaactatcgtcttgagttcaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaac
aggattagcagagcgaggatgtaggcggtgctacagagttctgaagtgggtggcctaactacggctacactagaaggacagtatttggtat
ctgcgctctgtaagccagttaccttggaaaaagagttggtagctcttgatcggcaaaacacaccgctggtagcggtgggtttttgtt
gcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcttgcattttctacggggtctgacgtcagtggaacgaaaaactca
cgtaagggttttggcatgagattatcaaaaaggatcttcacatagatccttttaataaaaaatgaagtttaaatcaatctaaagtata
tgagtaaaacttggtctgacagttacatgcttaatacagtgaggcacatctcagcgatctgtctatttgcgtatccatagttgcctgactccc
cgtcgtgtagataactacgatacgggagggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctcagattt
atcagcaataaacagccagcggaaggcgagcgagcaagtggtcctgcaactttatccgctccatccagttctattaattgttgcggg
aagctagagtaagtagttcgccagttatagtttgcgcaacgtgttgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtctgttggatggct
tcattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcggttagctccttcggctcctcgatcgtgt
cagaagtaagttggcgagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattcttactgtcatgccaatcgtaagatgctttctgtga
ctggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatgcggcgaccgagttgctcttggcggtcaatacgggataataccgcgccac
atagcagaactttaaaagtctcatcattggaaaacgttctcgggcgcaaaactcaaggatcttaccgctgttgagatccagttcagtgta
accactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacagggaaggcaaaatgccgcaaaaa
gggaataaggcgacacggaatgttgaatactcatacttcttctttcaatattatgaagcatttaccagggttattgtctcatgagcggt
acatatttgaatgatttagaaaaataacaaatagggggtccgcgcacatttccccgaaaagtgcacctgac

도면 11a

PLV4301G38A1 (또한 pLV4301G PDLV scFV 38A1로 지칭됨)(SEQ ID NO:37)

cgataaccctaattcgatagcatatgcttcccgttggttaacatatgctattgaattagggttagtctggatagtataactactaccgggaa
gcatatgtaccggttaggttcacgggtgatgccggccacgatgcgtccggcgttagaggatctaattgtgagttagctactcattaggcacc
ccaggctttacactttatgcttccgctcgatgttgtgtggaattgtgagcggataacaatttcacacaggaacacgatgacccattac
gccaagcgcgaattaacctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaattgtagtcttatgcaatactctttagtcttgcaaca
tggtaacgatgagttagcaacatgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagttaagggtgtacgatcgtgcctta
ttaggaaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgattgcagagatattgtatttaagtgcttagctcgatac
ataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgctt
gagtgcttcaagtagtgtgtcccgtctgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaatctctagcagt
ggcgcccgaacagggacttgaagcgaaagggaacacagaggagctctctgcacgcaggactcggcttctgaagcgcgcacgggaaga
ggcgaggggcggcgactggtgagtagcgaataattttagttagcggaggctagaaggagagagatgggtgagagcgtcagattaaag
cgggggagaattagatcgctgagggaaaaattcgttaaggccagggggaaagaaaaataaataaaacatatagtagtgggcaagc
agggagctagaacgattcgagtttaattcctgctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaacctccctca
gacagatcagaagaacttagatcattatataatcacagtagcaacctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaa
gctttagacaagatagaggaaagacaaacaaaagtaagaccacccacagcaagcggcgcgtgatcttcagacctggaggaggagata
tgagggacaattggagaagtgaattatataataaagtagtaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaagagaagag
tggtgcagagagaaaaaagcagtggaattattgtctggtatagtcagcagcagaacaattgtcagggtctattaggcgcgaacagcatctgtt
gcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaaagataacctaaaggatcaacagctcctgggatttgg
gggtgctctggaactcatttgcaccactgctgtccttggaaatgctagtggagtaataatctctggaacagatttggaaatcacacgacct
ggatggagtgaggacagagaataaacaattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaagaatgaac
aagaattattggaattagataaattgggcaagtgttggaaattggttaacatacaaaattggctgtgtatataaaattattcataatgtagt
aggaggcttgtaggtttaagaatagttttgtctgtactttctatagtagaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagaccacc
tcccaaccccgaggggaccgcagggccggaagaatagaagaagaagggtggagagagagacagagacagatccattcgattagtgaaac
ggatctcgacgggtatcggttttaaaagaaaagggggattggggggtacagtgcagggggaaagaatagtagacataatagcaacagacat
acaaactaaagaattacaaaaaacaattacaaaaattcaaaatttatcgattttatttagtctccagaaaaaggggggaatgaaagacccc
acctgtaggtttggcaagctagcttaagtaacgccattttgcaaggcatggaataacataactgagaatagagaagttcagatcaagggtta
ggaacagagagacagcagaatatgggccaacagagatatctgtgtaagcagttcctgcccggctcaggggccaagaacagatggtcccc
agatcggtccccctcagcagtttctagagaacctcagatgtttccagggtgccccaggacctgaaatgacctgtgcttatttgaact
aaccaatcagttcgttctcgttctgttgcgcgcttctgtccccgagctcaataaaagagcccaacccctcactcggcgcgccagtct
ccgatagactgcgtgcccgggtaccgatatacacaactttgtacaaaaagctgaacgatatcgccacctgggcagcacagccattctgg
ccctgctgtggcagtgctgcaggcggtgtagctGaagtgcagctggtggaatctggcggcggactggtgcagcctggcggatctctgaga
ctgagctgtgcccgagcggcttcaccttcagcaactacgcatgagctgggtgcgccaggccctggaaaaggcctggaatgggtgtccac
catcagcggtctggtcggaaccactactacgcatagcgtgaaggcggttaccatctccgggacaacagcaagaacaccctgtac
ctgcagatgaacagcctggtggggaagataccggtgtactactgcgccaaggactggttcagaagcagcagcccgacgccttcgaca
tctggggccagggaacaaccgtgacctgtctgtggtgagcgagcagcagcgggaggtcagggggaggcggaagcggagcacctt
cttacgtgctgacccagccccctagcgtgtcagtggtcctggacagaccgcagaatcacctgtggcggaacaacatcgccgggaagatc
gtgactggtatcagcagagcccgacaggtcctcgtgctgtgactactacgacaccgacagacctgcggcatccccgagagattcag
cggcagcaacagcggcaacatggccacctgacctcagcacagtgaggagccggcgacgaggccgactactactgtcaagtgtgggacac
cggcagcgatcacgtgtgtttggaggcggaaccaagctgacagtgctgggcccgggccaactttgtatacaaaagtgcagcgagagc
aagtacggccctcctgcccccttgcctgccccgagttcctggcgagccagcgtgttctgttcccccaagccaaggacacctga
tgatcagcgggacccccgaggtgacctgtgtgtgtgtgacgtgtccaggaggaccccgaggtccagttcaactggtacgtggacggtg
gaggtgcacaacccaagaccaagccccgggaggagcagttcaatagcacctaccgggtgtgtccgtgctgacctgtgcaccaggact

도면11ab

ggctgaacggcaaggaatacaagtgaaggtgtccaacaaggcctgcccagcagcatcgagaaaaccatcagcaaggccaaggccag
cctcgggagccccaggtgtacacctgccccctagccaaggagatgaccaagaatcagggtgtcctgacctgctggtgaaggcttcta
ccccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggcag
cttcttctgtacagcaggctgacctggacaagagcgggtggcaggagggaacgtcttttagctgctcgtgatgcagagccctgcaca
accactacaccagaagagcctgctcctgagcctgggcaagatgttcagatctgtgatattacatctgggcacccctggccggaatctgcgt
ggcccttctgctgcttctgatcatcactctcatctgtacggctccaccagcggctccggcaagcccggctctgcgagggtccaccagcggc
gactacaaggacgacgatgacaagtaatagatatcggttcagcttctgtgtaaaagttgggattcgagtttaagtttaacgaattcccc
ccctctccccccccctaacgttactggccgaagcggcttggaataaggcgggtgtgcgtttgtctatatgttatttccaccatattgccc
tcttttggcaatgtgaggggcccgaacactggccctgtcttctgacgagcattcttaggggtctttccctctcgccaaagggaatgcaaggtct
gttgaatgtctggaaggagcagttctctggaagcttctgaagacaaacacgtctgtagcgacctttgaggcagcggaacccccac
ctggcgacaggtgctctgctggccaaaagccagctgtataagatacacctgcaaaggcggcacacccagtgccacgttgtgagttggata
gttgtggaaagagtaaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgcccagaaggtacccattgtatgggactgtgactg
gggcctcgggtcacatgctttacatgtgttagtgcagggttaaaaaacgtctaggccccgaaccaggggacgtgttttctttgaaaaac
acgatgataataggccacaacctgggaggcggaagcggcgagggtctccctcgaggcaccatggtgagcaaggcgaggagctgttca
cgggggtgggtcccactcctggtcgagctggacggcgagctaaacggccacaagttcagcgtgtccggcgaggcgaggcgatgccaccta
cggcaagctgacctgaagttcatctgaccaccggcaagctgccgtgccctggcccacctcgtgaccacctgacctacggcgtgcagtg
cttcagcgcgtaccccgaccacatgaagcagcagcacttctcaagtcgccatcccgaaggctacgtccaggagcgacacatcttctcaa
ggacgacggcaactacaagaccgcgcgaggtgaagttcgaggcgacaccctgggtgaaccgcatcgagctgaaggcgatcgacttcaa
ggaggacggcaacatctggggcacaagctggagtagacaactacaacgccacaacgtctatatcatgcccgaagcagaagaacggcat
caagggaacttaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgagctgcggaccactaccagcagaacacccccatcggcgacgg
ccccgtgctgctgccgacaacactacgtgagcaccagtcggccctgagcaaaagcccaacgagaagcggatcacatggctcgtgctgg
agttcgtgacggcggcgaggtcactctcgcatggcagcagctgtacaagtaacgcgtcccggtctagagctagcggtagcatgacattacgt
agtcgacgaactaataagctagctagtcagtcatttgggttcgttagggctttccccactgtttggctttcagttatatggatgatgtgg
tattgggggccaagtctgtacagatctgtagtcctttttaccgctgttaacaattttctttgttgggtatataattaaacccatacaaaaac
aaagagatggggttactctctaattttatgggttatgtcatggatgttatgggtccttgccacaagaacacatcataaaaaatcaaaga
atgttttagaaaacttctattaacaggcctattgattggaaagtatgtcaacgaattgtgggtcttttgggttttctgcccctttacacaatgt
ggttatcctgctgtgatcctttgtatgcatgtattcaatctaagcaggcttctactttctgccaactacaaggcctttctgtgtaaaataacc
tgaacctttacccgttggccgcaacggccaggtctgtccaagtgttctgacgcaacccctgctggggcttggatcatggccatca
gcgcatgctggaaccttttgggtcctctgctgacatccatgacggaaactcctagccgtgttttctgctgacaggtctgagcaaacatta
tcgggactgataactctgttctctatcccgaataatacatcgtttccatggctgtaggctgtgctgccaactggatcctgctgaggacgtcc
ttgttttacgtccgctggcgtgaatcctcgggacgaccttctcggggtcgttggactctctgctccccttctcgtctgctgctccgacgg
accacggggcgacactcttttacgagactccccgtctgtccttctcatctgcccggaccgtgtgcaacttgccttccctctgcacgtcgtatg
gagaccacgtgaacgcccacaaatattgccaaaggtcttataagaggactcttgagctcagcaatgtcaacgaccgaccttgaggc
atacttcaaagactgtttgtttaagactgggaggttgggggaggagattaggttaaaggctttgtactaggaggctgtaggcataaatt
ggctcgcgaccagcaccatggcgcaatcactagagcgggtacctttaagaccaatgactacaaggcagctgtagatcttagccatttt
aaaagaaaaggggggactggaagggtcaattcactccaacgaagacaagatctgcttttctgtactgggtctctggttagaccagat
ctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgccttgagtgcttcaagtagtgtgtcccgtctg
ttgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaaatcttagcagtagtagttcatgtcatcttattatcagtat
ttataactgcaaagaaatgaatatcagagagtgagaggaactgtttattgagccttataatgggttacaataaagcaatagcatcacaat
tcacaaaataagcatttttactgacttctagttgtgtttgtccaaactcatcaatgtatcttatcatgtctggcttagctatcccggcct
aactccgccccatcccggccttaactccggcagttccgcccattctccggcctggctgactaatttttttatttatgagaggccgaggccg
gatcccttgagtggttctatcctggagcagacttgcagctgtggactgcaacacaacattgcctttatgtgtaactctggctgaagctctta

도면11ac

caccaatgctgggggacatgtacctcccaggggccagggaagactacgggaggctacacaaacgtcaatcagaggggcctgtgtagctacc
gataagcgggacccccaagagggcattagcaatagtgtttataaggcccccgtttaattcttgaaacgaaaggccctgtgatacgctatt
tttatagggtaatgtcatgataataatggtttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctattgtttattttctaa
atacattcaaataatgtatccgtcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaagggaagagtatgagtattcaacatttc
cgtgtcgccttattcccttttttcgggcattttgccttctgtttttgctcaccagaaacgctggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttg
gggtgcagagtgggttacatgaaactggatctcaacagcggttaagatccttgagagttttcgcccgaagaacgttttccaatgatgagcact
tttaaaagtctctatgtggcgggtattatcccggttgtagcggggcaagagcaactcggtcgcgcatacactattctcagaatgacttgg
ttgagtactcaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgagtgctccataaacatgagtataacact
gcggccaacttactctgacaacatcgaggagaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgcttgatcgt
tgggaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgcagcaatgggcaacaacgttgcgcaactatta
actggcgaactacttacttagcttccggcaacaattaatagactggatggagggcgataaagttgcaggaccacttctgcgtcggccctt
ccggctggctggtttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatggtaagccctcc
cgatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaatagacagatcgctgagataggtgcctcactgattaagca
ttgtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaactcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatccttttgat
aatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttctgctcactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttt
tctgcgtaactctgctgcttgcacaaaaaaaccacgctaccagcgggtggtttgttgcggatcaagagctaccaactcttttcggaag
gtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagttagccgtagttaggcccacttcaagaactctgtagcaccgcct
acatacctgcctctgtaactcctgttacagtggtgctgacagtgagcgtgataagtcgtgttaccgggttgactcaagacgatagttaccgg
ataagcgcagcggctgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacacacgaactgagatacctacagc
gtgagcattgagaagcgccacgcttccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtaagcggcagggtcggaacaggagagcgacg
aggagccttcagggggaaacgctggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccacctctgacttgagcgtcgatttttggatgctcgtcagg
ggggcgagcctatggaaaaacgccagcaacgcgcccttttacggttcctggccttttgcggccttttgaagctgtccctgatggtcgtcat
ctacgtcctggacagcatggcctgcaacgcgggcatcccgatgcccggaagcgagaagaatcataatggggaaggccatccagcctcg
cgtcg

도면11ba

PLV4301G19H9 (또한 pLV4301G PDLV scFV 19H9로 지칭됨)(SEQ ID NO:38)

cgataaccctaattcgatagcatatgcttcccgttgggtaacatatgctattgaattagggtagtctggatagtatatactactaccgggaa
gcatatgtaccggttaggggtaccgggtgatgcccgcacgatgctgcccgttagaggatctaattgtgagtagctactcattaggcacc
ccaggctttacactttatgcttccggtcgtatgtgtgtggaattgtgagcggaatacaattcacacaggaacagctatgacatgattac
gccaagcgcgcaattaacctcactaaagggaacaaaagctggagctgcaagcttaattgtagtcttatgcaatactctttagtcttgcaaca
tggttaacgatgagtagcaacatgcttacaaggagagaaaaagcacgtgcatgccgattgggtggaagttaagggtgacgatcgtgcctta
ttagggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaaccactgaattgccgattgcagagatattgtatttaagtgcttagctcgatac
ataaacgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcctt
gagtgtctcaagtagtgtgtcccgtctgtgtgactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtggaaaaatctctagcagt
ggcgcccgaacagggttagtgaagcgaaagggaacacagaggagctctctgacgcaggactcggttctgaagcgcgcacggcaaga
ggcgagggggcgcgactggtgagtagcgcacaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgtcagattaaag
cgggggagaattagatcgcatgggaaaaaattcggttaaggccagggggaaagaaaaatataaattaaaacatatagtagggcaagc
aggagctagaacgattcgagtttaactctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggacagctacaacctcccttca
gacaggatcagaagaacttagatcattatataatcacagtagcaacctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacccaaggaa
gctttagacaagatagagggaagagcaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggcctgtagcttcagacctggaggaggagata
tgagggacaattggagaagtgaattatataataaagtagtaaaaattgaaccattaggtagtagcaccaccaaaggcaagagaagag
tggtgcagagagaaaaagagcagtggggaataggagcttcttcttgggttcttgggagcagcaggaaagcactatggcgagcgtcaat
gacgtgacgggtacaggccagacaattattgtctggtatagtagcagcagcagaacaattgtcagggtctattgaggcgcaacagcatctgtt
gcaactcacagtctgggcatcaagcagctccaggcaagaatcctggctgtggaagatacctaaggatcaacagctctggggatttgg
ggtgtcttggaaaactcattgcaccactgtgtgcttggatgtgtagtggaagtaataaattcttggaaacagatttggaaatcacacgacct
ggatggagtgggacagagaaatcaacattacacaagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaaaatgaac
aagaattatttgaattagataaattgggcaagtttgggaattggttaacatacaaaattggctgtggtatataaattattcataatgtagt
aggaggctgtgtaggtttaaagaatagtttctgtactttctatagtagaagtagtaggcaggatattcaccattatcgtttcagaccacc
tcccaaccccgaggggaccgcagggcccgaaggaatagaagaagaagggtggagagagacagagacagatccattcgattagtagaac
ggatctgcagcgtatcggttttaaaagaaaagggggattggggggtacagtgcagggggaagaatagtagacataatagcaacagacat
acaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaaattcaaaattttatcgattttatttagtctccagaaaaaggggggaatgaagacccc
acctgtagggttggcaagctagcttaagtaacccatttgaaggcagtggaataacataactgagaatagagaagttcagatcaagggtta
ggaacagagagacagcagaatatgggcaaacaggatattctgtgtaagcagttcttccccggctcagggccaaagacagatgggtcccc
agatcggtccccctcagcagtttctagagaacacatcagatgttccagggtgccccaaaggacctgaatgacctgtgccttatttgaact
aacaatcagttcgttctcgttctgttctgcgcgcttctgctccccgagctcaataaaagagcccacaacctcactcggcgcgcagtcct
ccgatagactgctgcccgggtaccgatatacacaactttgtacaaaaagctgaacgatatcgccacctgggacagacacattctgg
ccctgctgctggcagtgctgcaggcggtgcagctGaagtgcagctgtggaatctggcggcggactggtgcagcctggcggtatcttgaga
ctgagctgtgcccagcggttcccttccagcaactacgcatgagctgggtgcccagggcccctggaaaaggcctggaatgggtgtccac
catcagcggtcttggcggaaccacctaactacgcatgagctggaaggccggttcacatctccccgggacaacagcaagaacacctgtac
ctgcagatgaacagcctgcggttgaagataccgctgtactactgcgcaaggactggttcagaagcagcagccccgacgcttgcaca
tctggggccagggaacacgtgacctgtctgctggcgaggcggtacaggcgggaggatcagggggaggcggaagcgagcacctt
cttacgtgctgaccagccccctagcgtgtcagtggctcctggacagaccgcaaatcacctgtggcggaacaacatcggcgggaagatc
gtgactggtatcagcagaggccggacaggtcccgtgctgctgactactacgacaccgacagacctgcccgcacccccgagagattcag
cggcagcaacagcggcaacatggccacctgacctcagcagtgaggcgccgacgagccgactactactgtcaagtgtgggacac
cggcagcagatcacgtggtgttggaggcggaaccaagctgacagtgctggggccgaggccaaacttggatataaaaaagttgagcagagagc
aagtacggccctcccccttgcctgccccgagttcctggcggaaccagcgtgttctgttcccccccaagccaaggacacctga
tgatcagccggacccccgaggtgacctgtgtgtgtggagcgtgtccaggaggacccccagggtccagttcaactggtacgtggacggcgtg

도면11bb

gaggtcacacgccaagacccaagccccggggaggagcagttcaatagcacctaccgggtggtgctccgtgctgaccgtgctgcaccaggact
ggctgaacggcaaggaataacaagtgaaggtgtccaacaaggcctgccagcagcatcgagaaaaccatcagcaaggccaaggccag
cctcggggagccccaggtgtacacctgtccccctagccaagaggagatgaccaagaatcaggtgtccctgacctgctggtgaagggtctta
ccccagcgacatcgcgtggagtgaggagagcaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgctggacagcgacggcag
cttctcctgtacagcaggtgacctgtggacaagagccgggtggcaggagggaacgtctttagctgctccgtgatgcagaggccctgcaca
accactacaccagaagagcctgtccctgagcctgggcaagatgttcagatcttgtgatattacatctgggcaccccttggccggaatctgcgt
ggcccttctgctgcttgcacatctctatctgctacggctccaccagcggctccggcaagcccggctctggcgagggtccaccagcggc
gactacaaggacgacgatgacaagtaataaggatctgggtcagcttctgttacaagttgggattcaggttaattaagtaacgaattcccc
ccctctccctccccccctaactgttactggccgaagcgccttgggaataaggccggtgtgctgttctgtatatgttatttccaccatattgccc
tcttttggcaatgtgaggggccgggaacactggccctgtcttcttgacgagcattcctaggggtcttccctctcgccaaaggaaatgcaaggtct
gttgaaatgtcgtgaagggaagcagttcctctgggaagcttcttgagacaacaacgtctgtagcgaccttgcaggcagcggaaacccccac
ctggcgacaggtgctcctgcgccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaggcggcacacccagtgccacgttgtgagttggata
gttgggaagagtgcaaatggctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccagaaggtagcccatgttatgggatctgatctg
ggccctcgggtgcacatgctttacatgtgtttagtgcaggttaaaaaacgtctagggccccgaaccacggggagcgtgttttcttgaaaaac
acgatgataaatgcccacaacctgggaggcggaagcggcgagggtccctcagggcaccatggtagcaaggcgaggagctgttca
ccgggggtgggtcccatctgtgctgagctggacggcgacgtaaacggccacaagttagcgtgtccggcgaggcgaggcgagtgccaccta
cggcaagctgacctgaagtctatctgacccacggcaagctgcccgtgcccactctgacccactgacctacggcgtgagtg
cttcagccgctaccccgaccacatgaagcagcagcacttctcaagtcgcatgccgaaggctacgtccaggagcgaccatcttctcaa
ggacgacggcaactacaagaccgcgcggaggtgaagttcgaggcgacacctggtgaaccgcatcgagctgaaggcgatcgacttcaa
ggaggacggcaacatcctggggcacaagctggagtacaactacaacgacacacgtctatatcatggccgacagaagaacggcat
caagggtgaacttcaagatccgcacaacatcgaggacggcagcgtgagctgcgacacctaccagagaaacccccatcggcgacgg
cccgtgtcgtgctgcccgaacaccactacctgagcaccagtcgcccctgagcaaaagacccaacgagaagcgcgatcacatggctcgtg
agttcgtgacggccgggactcctcggcatggacgagctgtacaagtaacgctccgggtctagagctagcggtagcatgacattacgt
agtcgacgacttaattaagtagcttagtccattgttcagtggtctgtagggcttccccactgttggctttagttatatggatgagtg
tattggggccaaagctgtacagcatcttgagtcctttttaccgctgttaccattttcttcttgggtatacattaaacccaaacaaac
aaagagatgggggtactctctaaatttatgggttatgtcattgagttatgggtccttgccacaagaacacatcataaaaaatcaaga
atgttttagaaaacttctattaaacaggcctattgattggaaagtatgtcaacgaattggggtcttttgggttttctgcccctttacacaatgt
ggttatcctgctgtgatgcttgtatgatgtattcaatctaagcaggcttccactttctcgaactacaaggccttctgtgtaacaatacc
tgaaactttacccgttgcggcgaacggccaggtctgtccaagtgttctgacgcaacccccactggctggggcttggcatgggccaatca
gcgatgcgtggaaacttttggctcctctgccgatccatactcggaactcctagccgctgttttctcgcagcaggtctggagcaaacatta
tcgggactgataactctgtgtcctatcccgaatatatacatggttccatggctgtaggctgtgctgcaactggatcctgcgaggagcgtcc
ttgttttacgtccgctggcgtgaatcctgcggacgaccttctcggggtcgttgggactcctcgtcccttctcgtctgctgctccgactccg
accacggggcgccactctctttacgggactccccgtctgtgccttctcatctgcggacacctgtgcacttgccttcacctctgcacgtcgcag
gagaccacgtgaacgcccacaaatattgccaaaggtcttacataagaggactcttgagactcagcaatgtcaacgaccgaccttgaggc
atacttcaaagactgtttgttaagactgggaggagttggggaggagattaggttaaaggctttgtactaggaggctgtaggcataaatt
ggctcgcgaccagcaccatggcgcaactactagagcggggtacctttaagaccaatgactacaaggcagctgtagatcttagccactttt
aaaagaaaagggggagctggaagggtcaattcactccaacgaagacaagatctgcttttctgtactgggtctctctggttagaccagat
ctgagcctgggagctctctgctaactagggaacccactgcttaagcctcaataaagcttgcctgagtgctcaagtagtgtgtcccgtctg
ttgtgtgactctgtaactagagatccctcagaccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagtagtagttcatcttatttattcagtat
ttataacttgaagaaatgaatatcagagagtgagaggaactgtttattgcagcttataatggttacaataaagcaatagcatcaaaat
ttacaataaagcatttttctactgacttctagttgtgtgttgcacaaactcatatgtatcttatcatgtctgctagctatccccccct
aactccgcccaccccccactccgcccagttccgcccattcgcggcctgctgactaatttttttattatgcagaggccgaggccg
gatcccttgagtggtttcatcttgagcagactttgagctgtggactgcaacacaacattgcctttatgtgtaactcttggtgaagctctta

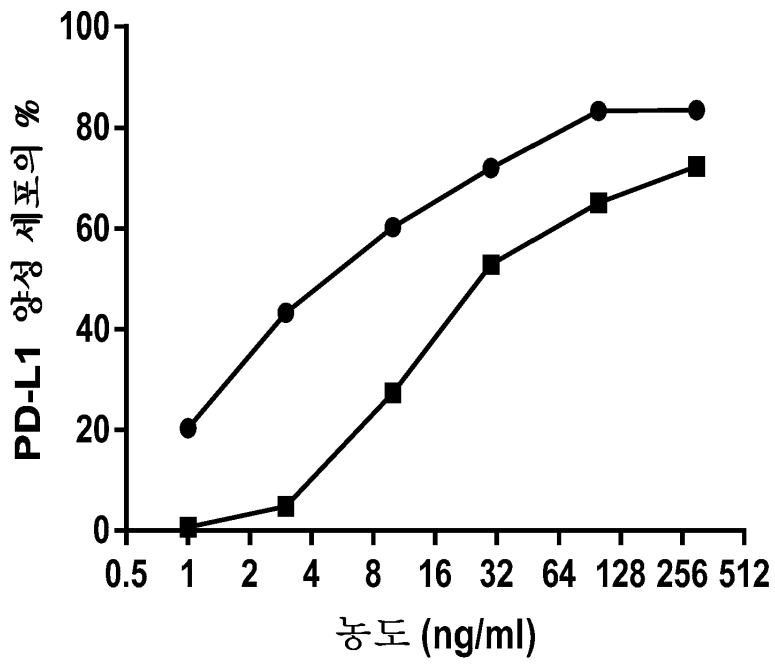
도면11bc

caccaatgctggggacatgtacctcccaggggcccaggaagactacgggaggctaccaacgtcaatcagaggggcctgtgtagctacc
gataagcggaccctcaagagggcattagcaatagtgtttataaggcccccctgttaattcttgaagacgaaagggcctgtgatacgcctatt
tttatagggttaatgtcatgataataatggttcttagacgtcaggtggcacttttcggggaaatgtgcgcggaacccctattgtttatcttaa
atacattcaaataatgtatccgtcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataattgaaaaaggaagagtatgagtattcaacatttc
cgtgtcgccttattcccttttttcgggcattttgcttctgttttctcaccagaaacgtggtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttg
gggtcacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcccccgaagaacgttttccaatgatgagcact
tttaagttctgctatgtggcgggtattatcccgtgttgacccgggcaagagcaactcggtcgcccatacactatttctcagaatgacttgg
ttgagtactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtctgccataacatgagtataacact
ggcgcaacttactctgacaacatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactcgccttgatcgt
tgggaacgggagctgaatgaagccataccaaacgacgagcgtgacaccacgatcctgcagcaatggcaacaacgttgccaaactatta
actggcgaactacttactctagcttccggcaacaataatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgcctcggccctt
ccggctggctggtttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcggtatcatgcagcactggggccagatggtaagccctcc
cgtatcgtagtattctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagca
ttgtaactgtcagaccaagtttactcatatatacttttagattgatttaaaacttcatttttaatttaaaaggatctaggtgaagatcctttgat
aatctcatgacaaaaatcccttaacgtgagtttcttccactgagcgtcagacccgtagaaaagatcaaaggatcttcttgagatccttttt
tctgcgcgtaactgctgcttgcacaaacaaaaaacaccgcgtaccagcgggtggttgttgcgggatcaagagctaccaactcttttccgaag
gtaactggcttcagcagagcgcagataccaaatactgtccttctagtgtagcgttagtgccaccacttcaagaactctgtagaccgcct
acatacctgcctctgctaactcgtttaccagtggtgctgcccagtggtgataagtcgtgttaccgggttgactcaagacgatagttaccgg
ataagcgcgagcgtcgggtgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacacaccgaactgagatacctacagc
gtgagcattgagaaaagcgcacgcttcccgaaggagaaaggcggacaggtatccggtgaagcggcaggggtcggaacaggagagcgacg
aggagccttcagggggaaacgcttggtatctttagtctgtcgggtttccacactctgacttgagcgtcgatttttgtagtgcgtcagg
ggggcggagcctatggaaaaacccagcaacgcggcctttttacggttctggtccttttgcgtggttttgaagctgtccctgatggtcgtcat
ctacgtcctggacagcatggcctgcaacgcgggcatcccgatccgcccgaagcgagaagaatcataatggggaaggccatccagcctcg
cgtcg

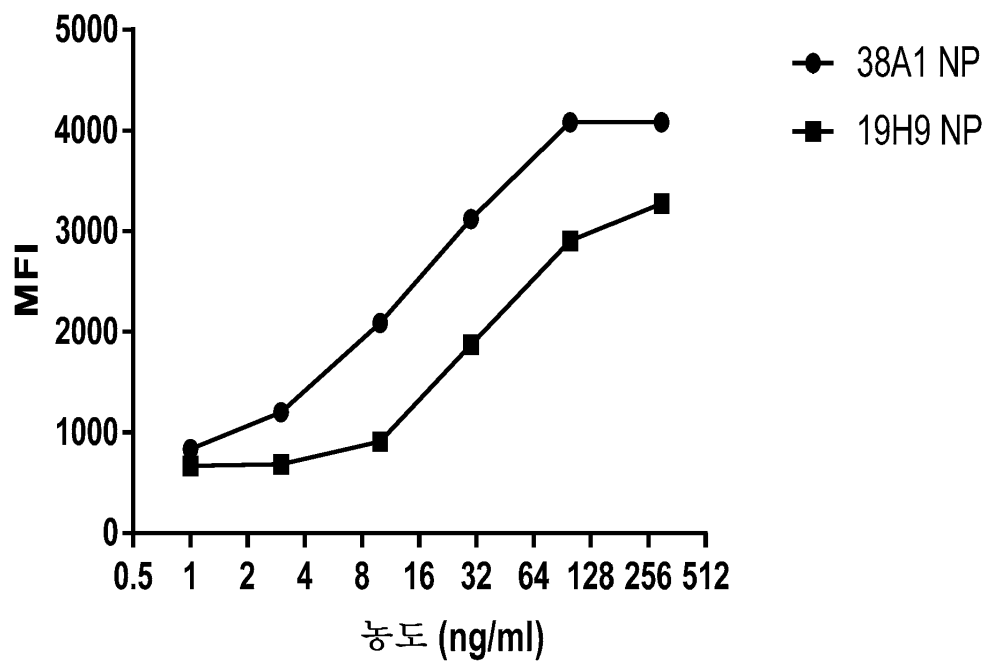
도면12

	19H9	38A1
세포 농도 (ml당)	3.23e6	2.99e6
부피	120 mL	120 mL
총 세포	3.88E+08	3.59E+08
aPDL1 농도	31.76 ug/mL	20.20 ug/mL
총 aPDL1 (mg)	3.81	2.42
분비 능력 (1e6개 세포당 ug)	9.82	6.75

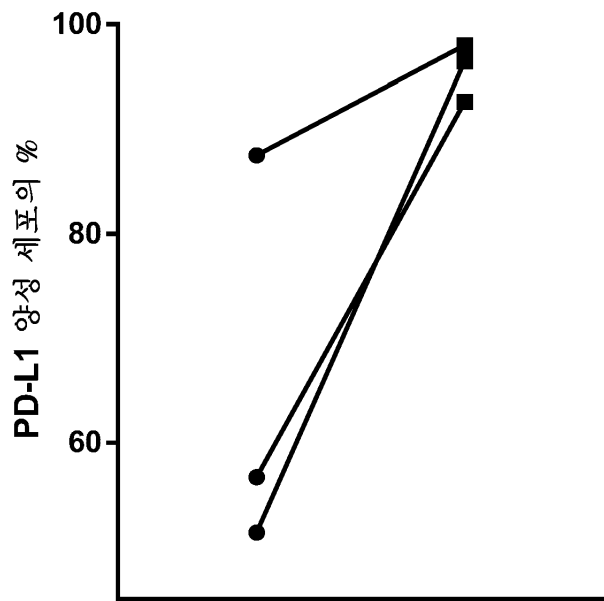
도면13a



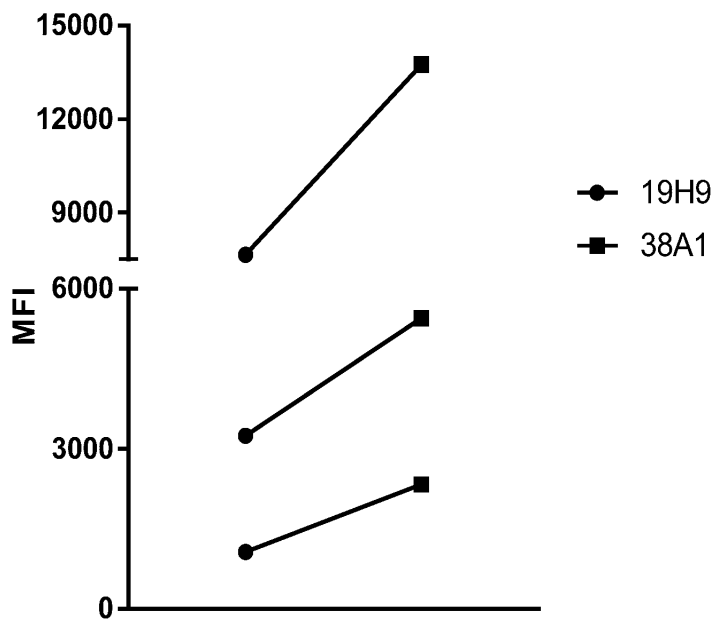
도면13b



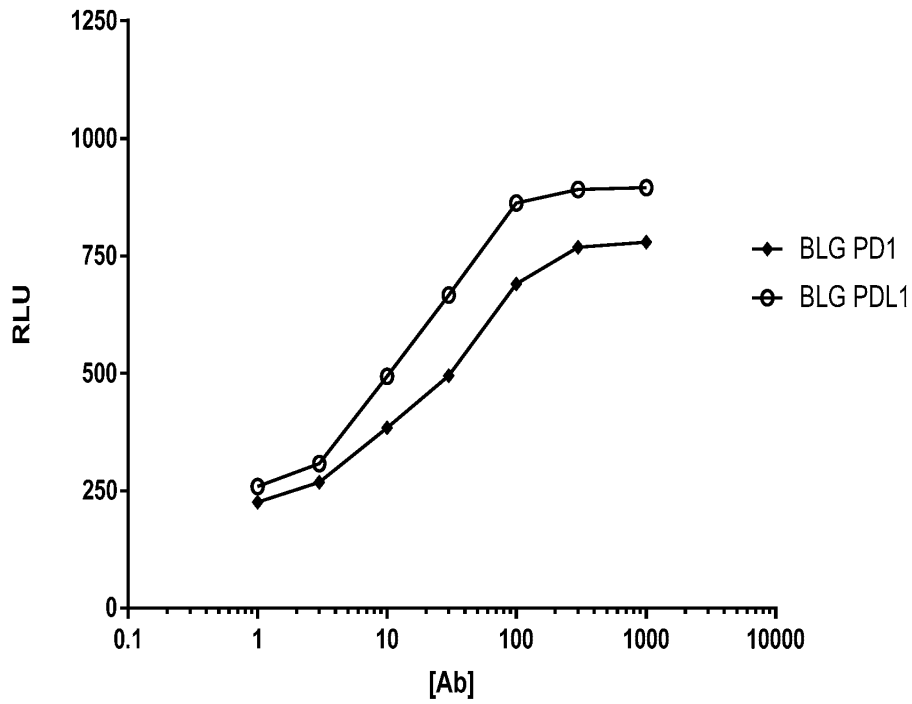
도면14a



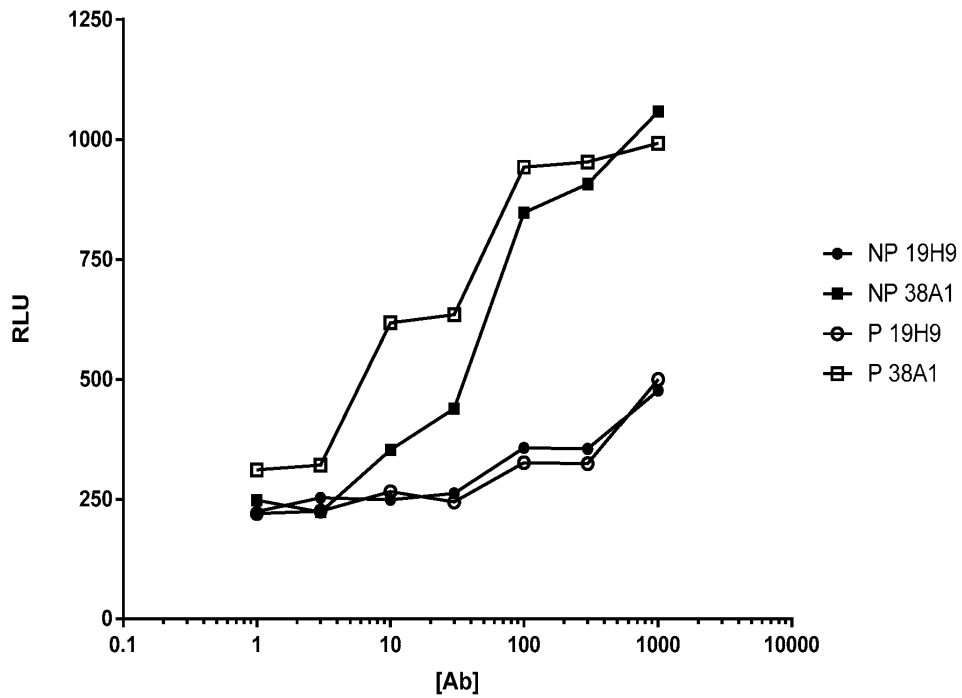
도면14b



도면15a

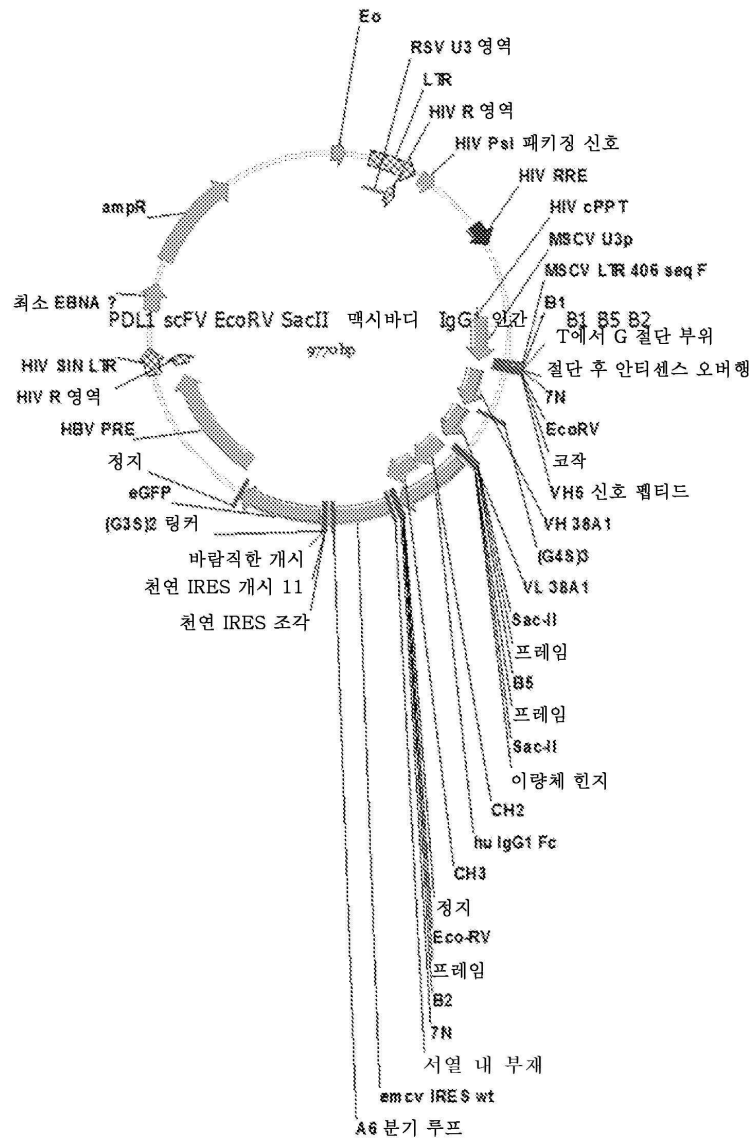


도면15b



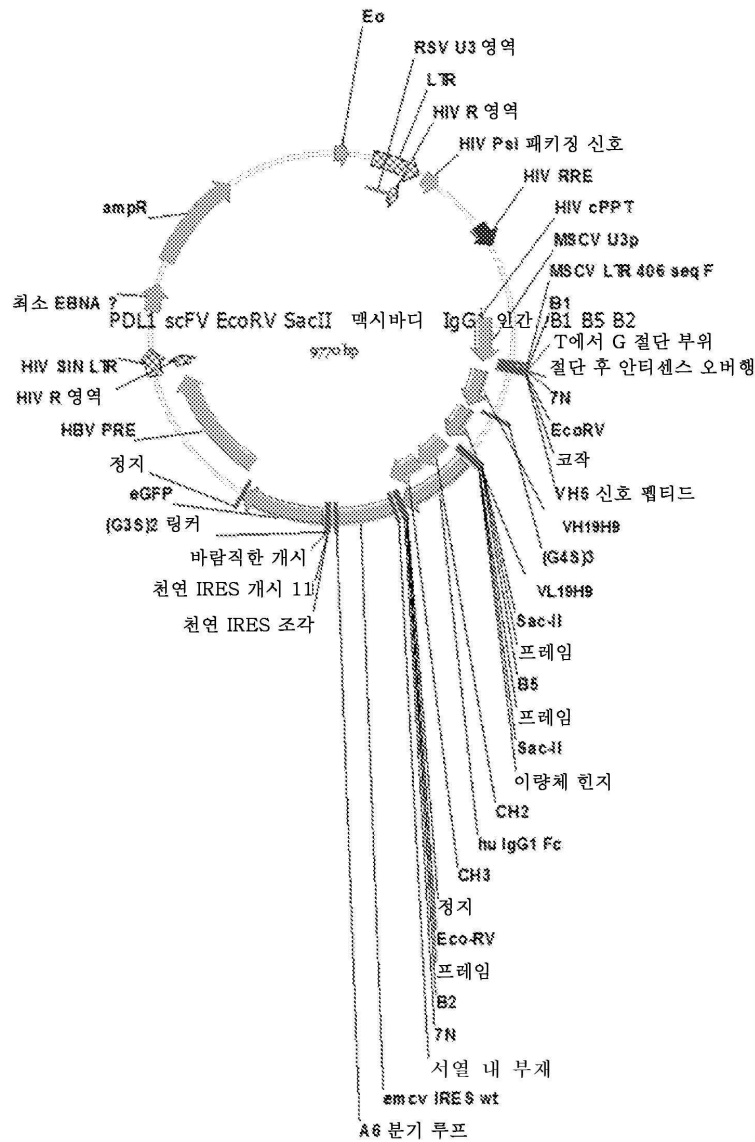
도면16a

pLV4301G PDLV scFV 38A1



도면16b

pLV4301G PDLV scFV 19H9



도면17a

CH1	
EU 인덱스	118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138
IgG1	A S T K Q P S V F P L A P S S K S T S G G
IgG2	A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S
IgG3	A S T K G P S V F P L A P C S R S T S G G
IgG4	A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S
EU 인덱스	139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159
IgG1	T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
IgG2	T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
IgG3	T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
IgG4	T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N
EU 인덱스	160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180
IgG1	S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y
IgG2	S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y
IgG3	S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y
IgG4	S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y
EU 인덱스	191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201
IgG1	S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y I C N
IgG2	S L S S V V T V P S S N F G T Q T Y T C N
IgG3	S L S S V V T V P S S S L G T Q T Y T C N
IgG4	S L S S V V T V P S S S L G T K T Y T C N
EU 인덱스	202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220
IgG1	V N H K P S N T K V D K K V E P K S C
IgG2	V D H K P S N T K V D K T V E R K C C
IgG3	V N H K P S N T K V D K R V E L K T P
IgG4	V D H K P S N T K V D K R V E S K Y O
인지 Fc >	
EU 인덱스	221 222 223 224 225 226 227 228
IgG1	D K T H T C P P
IgG2	V E C P P
IgG3	L G D T T H T C P R C P E P K S C D T P P
IgG4	P P C P S
EU 인덱스	
IgG1	
IgG2	
IgG3	P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P
IgG4	
Fc >	
EU 인덱스	229 230 231 232 233 234 235 236
IgG1	C P A P E L L G
IgG2	C P A P P V A
IgG3	E P K S C D T P P P C P R C P A P E L L G
IgG4	C P A P E F L G

도면17b

CH2																																		
EU 인덱스	237	236	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257													
IgG1	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P													
IgG2	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P													
IgG3	G	P	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P													
IgG4	G	F	S	V	F	L	F	P	P	K	P	K	D	T	L	M	I	S	R	T	P													
EU 인덱스	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278													
IgG1	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y													
IgG2	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y													
IgG3	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y													
IgG4	E	V	T	C	V	V	V	D	V	S	H	E	D	P	E	V	K	F	N	W	Y													
EU 인덱스	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299													
IgG1	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	V	N	S	T													
IgG2	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	V	N	S	T													
IgG3	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	V	N	S	T													
IgG4	V	D	G	V	E	V	H	N	A	K	T	K	P	R	E	E	Q	V	N	S	T													
EU 인덱스	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315																		

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> IOVANCE BIOTHERAPEUTICS

Rabinovich, Brian

Martin-Orozco, Natalia

Radvanyi, Laszlo

<120> PROGRAMMED DEATH 1 LIGAND 1 (PD-L1) BINDING PROTEINS AND METHODS

OF USE THEREOF

<130> 116983-5024-WO

<150> US 62/359,612

<151> 2016-07-07

<160> 42

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 1

Ser Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln

1	5	10	15
Thr	Ala	Arg	Ile
Thr	Cys	Gly	Gly
Asn	Asn	Ile	Gly
Arg	Lys	Ile	Val
20	25	30	
His	Trp	Tyr	Gln
Gln	Arg	Pro	Gly
Gln	Ala	Pro	Val
Leu	Val	Ile	Tyr
35	40	45	
Tyr	Asp	Thr	Asp
Arg	Pro	Ala	Gly
Ile	Pro	Glu	Arg
Phe	Ser	Gly	Ser
50	55	60	
Asn	Ser	Gly	Asn
Met	Ala	Thr	Leu
Thr	Ile	Ser	Thr
Val	Gly	Ala	Gly

65	70	75	80
Asp	Glu	Ala	Asp
Tyr	Tyr	Cys	Gln
Val	Trp	Asp	Thr
Gly	Ser	Asp	His
85	90	95	
Val	Val	Phe	Gly
Gly	Gly	Thr	Lys
Leu	Thr	Val	Leu
100	105		

<210> 2

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 2

Asn Ile Gly Arg Lys Ile

1	5
---	---

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 3

Tyr Asp Thr

1

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 4

Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp His Val Val

1 5 10

<210> 5

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Lys Asp Trp Phe Arg Ser Ser Ser Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp

100

105

110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala

115

120

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 6

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala

1

5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 7

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr

1

5

<210> 8

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 8

Ala Lys Asp Trp Phe Arg Ser Ser Ser Pro Asp Ala Phe Asp Ile

1

5

10

15

<210> 9

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400>

> 9

Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Leu Gly Lys

1 5 10 15

Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Arg Lys

20 25 30

Phe Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val

35 40 45

Ile Tyr Glu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Ile Gly Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly

65 70 75 80

Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser

85 90 95

Ser Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

100 105 110

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 10

Ser Gly Ser Ile Ala Arg Lys Phe

1 5

<210> 11

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 11

Glu Asn Asn

1

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 12

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Val Val

1 5

<210> 13

<211> 123

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 13

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Asn Thr Ala Gly Asp Thr His Tyr Pro Glu Ser Val Lys

50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ser Leu Asn Leu

65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val

85 90 95

Arg Glu Arg Val Glu Arg Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Ala Phe Asp Ile

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala

115 120

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 14

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 15

Ile Asn Thr Ala Gly Asp Thr

1 5

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 16

Val Arg Glu Arg Val Glu Arg Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Ala Phe Asp

1 5 10 15

Ile

<210>

> 17

<211> 248

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Asp Trp Phe Arg Ser Ser Ser Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Ser Tyr Val Leu
130 135 140
Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile
145 150 155 160
Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Arg Lys Ile Val His Trp Tyr Gln
165 170 175
Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr Asp Thr Asp
180 185 190
Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn
195 200 205
Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Thr Val Gly Ala Gly Asp Glu Ala Asp
210 215 220
Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp His Val Val Phe Gly
225 230 235 240
Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
245

<210> 18
<211> 511
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 18

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly

1 5 10 15

Val Ser Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ser Thr Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala

65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Val Glu Asp Thr Ala Val

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Trp Phe Arg Ser Ser Ser Pro Asp Ala Phe

115 120 125

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly

130 135 140

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Ser

145 150 155 160

Tyr Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr

165 170 175

Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Arg Lys Ile Val His

180 185 190

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Ile Tyr Tyr

195 200 205

Asp Thr Asp Arg Pro Ala Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn

210 215 220

Ser Gly Asn Met Ala Thr Leu Thr Ile Ser Thr Val Gly Ala Gly Asp

225 230 235 240
 Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Thr Gly Ser Asp His Val

 245 250 255
 Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Pro Arg Ala Asn
 260 265 270
 Phe Val Tyr Lys Ser Gly Pro Arg Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
 275 280 285
 Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 290 295 300
 Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

 305 310 315 320
 Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
 325 330 335
 Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 340 345 350
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 355 360 365
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

 370 375 380
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
 385 390 395 400
 Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 405 410 415
 Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 420 425 430
 Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn

 435 440 445
 Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 450 455 460
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 465 470 475 480

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
485 490 495
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
500 505 510
<210> 19
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> synthetic sequence
<400> 19
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Gly Ile Asn Thr Ala Gly Asp Thr His Tyr Pro Glu Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ser Leu Asn Leu
65 70 75 80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val
85 90 95
Arg Glu Arg Val Glu Arg Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Ala Phe Asp Ile
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Asn Phe Met
130 135 140
Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Leu Gly Lys Thr Val Thr
145 150 155 160
Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Arg Lys Phe Val Gln

165 170 175

Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu

180 185 190

Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile

195 200 205

Gly Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr

210 215 220

Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Asn Val

225 230 235 240

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

245 250

<210> 20

<211> 514

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 20

Met Gly Ser Thr Ala Ile Leu Ala Leu Leu Leu Ala Val Leu Gln Gly

1 5 10 15

Val Ser Ala Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys

20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe

35 40 45

Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Val Ser Gly Ile Asn Thr Ala Gly Asp Thr His Tyr Pro Glu

65 70 75 80

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ser

85 90 95

Leu Asn Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr

100 105 110

Tyr Cys Val Arg Glu Arg Val Glu Arg Glu Tyr Ser Gly Tyr Asp Ala
 115 120 125
 Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala Gly Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro
 145 150 155 160
 Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser Glu Ser Leu Gly Lys
 165 170 175
 Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Gly Ser Ile Ala Arg Lys
 180 185 190
 Phe Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val
 195 200 205
 Ile Tyr Glu Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser
 210 215 220
 Gly Ser Ile Gly Ser Ser Ser Asn Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly
 225 230 235 240
 Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser
 245 250 255
 Ser Asn Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Pro
 260 265 270
 Arg Ala Asn Phe Val Tyr Lys Ser Gly Pro Arg Pro Lys Ser Cys Asp
 275 280 285
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 290 295 300
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 305 310 315 320
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 325 330 335
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 340 345 350
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

355 360 365
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
370 375 380
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
385 390 395 400
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
405 410 415
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

420 425 430
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
435 440 445
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
450 455 460
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
465 470 475 480
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

485 490 495
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
500 505 510
Gly Lys

<210> 21

<211> 290

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 21

Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15
Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr

20 25 30
Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu

35 40 45
 Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
 50 55 60
 Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
 65 70 75 80
 Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn

 85 90 95
 Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110
 Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115 120 125
 Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140
 Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr

 145 150 155 160
 Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175
 Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190
 Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205
 Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu

 210 215 220
 Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240
 Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 245 250 255
 Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 260 265 270
 Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu

 275 280 285

Glu Thr

290

<210> 22

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 22

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe

1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Glu Thr Ile Ser Arg

20 25 30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro

35 40 45

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala

50 55 60

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val

65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr

85 90 95

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr

100 105 110

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu

115 120 125

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Glu Thr Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

130 135 140

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp

145 150 155 160

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

165 170 175

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp

180 185 190

Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met Glu
195 200 205

Thr His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Leu Gly Lys
225

<210> 23

<211> 228

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 23

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe
1 5 10 15

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Glu Thr Ile Ser Arg
20 25 30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro
35 40 45

Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr
100 105 110

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
115 120 125

Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Glu Thr Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
130 135 140

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
145 150 155 160

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
165 170 175

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp

180 185 190
Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met Glu
195 200 205

Thr His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
210 215 220

Ser Leu Gly Lys

225

<210> 24

<211> 46

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 24

Arg Ser Gly Ser Ser Arg Met Glu Thr Lys Gln Ile Glu Asp Lys Ile

1 5 10 15
Glu Glu Ile Leu Ser Lys Ile Tyr His Ile Glu Asn Glu Ile Ala Arg

20 25 30
Ile Lys Lys Leu Ile Gly Glu Arg Gly Thr Ser Ser Arg Gly

35 40 45

<210> 25

<211> 189

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 25

Ala Ser Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu Gln Val Glu Phe Ser

1 5 10 15

Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu
20 25 30

Trp Trp Gln Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Thr Phe
 35 40 45
 Asp Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg Val Thr Gln Asp Pro
 50 55 60
 Lys Leu Gln Met Glu Thr Gly Lys Lys Leu Pro Leu His Leu Thr Leu
 65 70 75 80

Pro Gln Ala Leu Pro Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Ala
 85 90 95
 Leu Glu Ala Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn Leu Val Val
 100 105 110
 Met Glu Thr Arg Ala Thr Gln Leu Gln Lys Asn Leu Thr Cys Glu Val
 115 120 125
 Trp Gly Pro Thr Ser Pro Lys Leu Met Glu Thr Leu Ser Leu Lys Leu
 130 135 140

Glu Asn Lys Glu Ala Lys Val Ser Lys Arg Glu Lys Ala Val Trp Val
 145 150 155 160
 Leu Asn Pro Glu Ala Gly Met Glu Thr Trp Gln Cys Leu Leu Ser Asp
 165 170 175
 Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys Val Leu
 180 185

<210> 26

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 26

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg

1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

20 25

<210> 27

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 27

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr

20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr

115 120 125

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu

130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp

145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

165 170 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser

180 185 190

Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser

195 200 205

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

210	215	220	
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly			
225	230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile			
	245	250	255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu			
	260	265	270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His			
275	280	285	
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg			
290	295	300	
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys			
305	310	315	320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu			
	325	330	335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr			
340	345	350	
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu			
355	360	365	
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp			
370	375	380	
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val			
385	390	395	400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp			
	405	410	415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His			
420	425	430	
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro			
435	440	445	
Gly Lys			
450			

<210> 28

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 28

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg Ala Asp Thr Ala Pro
100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn
130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn
145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser
165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr
180 185 190

Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe

195	200	205
Asn Arg Asn Glu Cys		
210		
<210>	29	
<211>	134	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic sequence	
<400>	29	
Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu		
1	5	10
His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr		
	20	25
Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro		30
	35	40
		45
Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu		
50	55	60
Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His		
65	70	75
Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu		
	85	90
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr		95
	100	105
		110
Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser		
115	120	125
Ile Ile Ser Thr Leu Thr		
130		
<210>	30	
<211>	132	
<212>	PRT	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	synthetic sequence	

<400> 30

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
20 25 30

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
35 40 45

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
50 55 60

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65 70 75 80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys
85 90 95

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
100 105 110

Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
115 120 125

Ser Thr Leu Thr
130

<210> 31

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 31

Met His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp
20 25 30

Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg
35 40 45

Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr

50 55 60
Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu
65 70 75 80

Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly
85 90 95
Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn
100 105 110
Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys
115 120 125

Ser Ser

130

<210> 32

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 32

Met Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val
1 5 10 15
Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly
20 25 30
Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
35 40 45
Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
50 55 60

Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
65 70 75 80
Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
85 90 95
Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
100 105 110
Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp

115 120 125

Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn

130 135 140

Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His

145 150

<210> 33

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 33

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu

1 5 10 15

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val

20 25 30

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu

35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val

50 55 60

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn

65 70 75 80

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn

85 90 95

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile

100 105 110

Asn Thr Ser

115

<210> 34

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic sequence

<400> 34

Met Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val

1 5 10 15

Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro

20 25 30

Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys

35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg

50 55 60

Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr

65 70 75 80

Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp

85 90 95

Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser

100 105 110

Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly

115 120 125

Ser Glu Asp Ser

130

<210> 35

<211> 8449

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pLV430G (Lentiviral Vector)

<400> 35

cgataaccct aattcgatag catatgcttc ccgttgggta acatatgcta ttgaattagg 60

gttagtctgg atagtatata ctactaccg ggaagcatat gctaccggt tagggttcac 120

cggtgatgcc ggccacgatg cgtccggcgt agaggatcta atgtgagtta gctcactcat 180

taggcacccc aggctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc 240

ggataacaat ttcacacagg aaacagctat gaccatgatt acgccaagcg cgcaattaac 300

cctcactaaa gggaacaaaa gctggagctg caagcttaat gtagtcttat gcaatactct 360

tgtagtcttg caacatggta acgatgagtt agcaacatgc cttacaagga gagaaaaagc 420

accgtgcatg ccgattgggtg gaagtaaggt ggtacgatcg tgccttatta ggaaggcaac 480

agacgggtct gacatggatt ggacgaacca ctgaattgcc gcattgcaga gatattgtat 540

ttaagtgcct agctcgatac ataaacgggt ctctctgggt agaccagatc tgagcctggg 600

agctctctgg ctaactaggg aaccactgc ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc 660

ttcaagtagt gtgtgcccggt ctgttgtgtg actctggtaa ctagagatcc ctcagaccct 720

tttagtcagt gtggaaaatc tctagcagtg gcgcccgaac agggacttga aagcgaaagg 780

gaaaccagag gagctctctc gacgcaggac tcggcttgct gaagcgcgca cggcaagagg 840

cgaggggcgg cgactgggtga gtacgccaaa aattttgact agcggaggct agaaggagag 900

agatgggtgc gagagcgtca gtattaaagcg ggggagaatt agatcgcat gggaaaaaat 960

tcggttaagg ccagggggaa agaaaaata taaattaaaa catatagtat gggcaagcag 1020

ggagctagaa cgattcgagc ttaatcctgg cctgttagaa acatcagaag gctgtagaca 1080

aatactggga cagctacaac catcccttca gacaggatca gaagaactta gatcattata 1140

taatacagta gcaaccctct attgtgtgca tcaaaggata gagataaaag acaccaagga 1200

agctttagac aagatagagg aagagcaaaa caaaagtaag accaccgcac agcaagcggc 1260

cgctgatctt cagacctgga ggaggagata tgagggacaa ttggagaagt gaattatata 1320

aatataaagt agtaaaaatt gaaccattag gagtagcacc caccaaggca aagagaagag 1380

tgggtcagag agaaaaaga gcagtgggaa taggagcttt gttccttggg ttcttgggag 1440

cagcaggaag cactatgggc gcagcgtcaa tgacgtgac ggtacaggcc agacaattat 1500

tgtctggtat agtgcagcag cagaacaatt tgcctgaggc tattgaggcg caacagcatc 1560

tgttgcaact cacagtctgg ggcatcaagc agctccaggc aagaatcctg gctgtggaaa 1620

gatacctaaa ggatcaacag ctctctggga ttgggggttg ctctggaaaa ctcatattgca 1680

ccactgctgt gccttggat gctagttaga gtaataaatc tctggaacag atttggaatc 1740

acacgacctg gatggagtgg gacagagaaa ttaacaatta cacaagctta atacactcct 1800

taattgaaga atcgcaaac cagcaagaaa agaataaaca agaattattg gaattagata 1860

aatgggcaag ttgttggat tggtttaaca taacaaattg gctgtggtat ataaaattat 1920

tcataatgat agtaggagc ttggtagggt taagaatagt ttttctgtga ctttctatag 1980

tgaatagagt taggcaggga tattcacat tatcgtttca gaccacctc ccaaccccgga 2040

ggggacccga caggcccgaa ggaatagaag aagaaggtgg agagagagac agagacagat 2100

ccattcgatt agtgaacgga tctcgacggt atcggtttta aaagaaaagg ggggattggg 2160

gggtacagtg caggggaaag aatagtagac ataatagcaa cagacataca aactaaagaa 2220
 ttacaaaaac aaattacaaa aattcaaaat ttatcgtatt ttatttagtc tccagaaaaa 2280
 ggggggaatg aaagacccca cctgtaggtt tggcaagcta gcttaagtaa cgccattttg 2340
 caaggcatgg aaaatacata actgagaata gagaagtca gatcaagggt aggaacagag 2400
 agacagcaga atatgggcca aacaggatat ctgtggttaag cagttcctgc cccggtcag 2460
 ggccaagaac agatggtccc cagatgcggt cccgccctca gcagtttcta gagaaccatc 2520
 agatgtttcc aggggtgcccc aaggacctga aatgacctg tgccttattt gaactaacca 2580

 atcagttcgc ttctcgcttc tgttcgcgcg cttctgctcc ccgagctcaa taaaagagcc 2640
 cacaaccctt cactcggcgc gccagtcctc cgatagactg cgtcgcccg gtaccgatat 2700
 cacaagtttg tacaaaaag ctgaacgaga aacgtaaaat gatataaata tcaatatatt 2760
 aaattagatt ttgcataaaa aacagactac ataatactgt aaaacacaac atatccagtc 2820
 actatggcgg ccgcattagg caccacaggc ttacacttt atgcttccgg ctctgataat 2880
 gtgtggattt tgagttagga tccgtcgaga tttcaggag ctaaggaagc taaaatggag 2940
 aaaaaaatca ctggatafac caccgttgat atatcccaat ggcatcgtaa agaacatttt 3000

 gaggcatttc agtcagttgc tcaatgtacc tataaccaga ccgttcagct ggatattacg 3060
 gcctttttaa agaccgtaaa gaaaaataag cacaagtttt atccggcctt tattcacatt 3120
 ctgtcccgcc tgatgaatgc tcatccggaa ttccgtatgg caatgaaaga cggtagagctg 3180
 gtgatatggg atagtgttca cccttgttac accgttttcc atgagcaaac tgaacgttt 3240
 tcatcgctct ggagtgaata ccacagcat ttccggcagt ttctacacat atattcgcaa 3300
 gatgtggcgt gttacggta aaacctggcc tatttccta aagggtttat tgagaatatg 3360
 ttttctgtct cagccaatcc ctgggtgagt ttaccagtt ttgatttaa cgtggccaat 3420

 atggacaact tcttcgcccc cgttttcacc atgggcaaat attatacgca aggcgacaag 3480
 gtgctgatgc cgctggcgat tcaggttcat catgccgttt gtgatggctt ccatgtcggc 3540
 agaatgctta atgaattaca acagtactgc gatgagtggc agggcggggc gtaaacgcgt 3600
 ggatccggct tactaaaagc cagataacag tatgcgtatt tgcgcgtga tttttcgggt 3660
 ataagaatat atactgatat gtataccga agtatgtcaa aaagaggtat gctatgaagc 3720
 agcgtattac agtgacagtt gacagcgaca gctatcagtt gctcaaggca tatatgatgt 3780
 caatactctc ggctcgttaa gcacaacat gcagaatgaa gcccgctcgc tgcgtgccga 3840

 acgctggaaa gcggaaaatc aggaagggat ggctgaggtc gcccggttta ttgaaatgaa 3900
 cggtcttttt gctgacgaga acaggggctg gtgaaatgca gtttaagggt tacacctata 3960
 aaagagagag ccgttatcgt ctgtttgtgg atgtacagag tgatattatt gacacgcccc 4020

ggcgacggat ggigatcccc ctggccagtg cacgtctgct gtcagataaa gtctcccgtg 4080
 aactttatccc ggtggtgcat atcggggatg aaagctggcg catgatgacc accgatatgg 4140
 ccagtgtgcc ggtctccgtt atcggggaag aagtggctga tctcagccac cgcgaaaatg 4200
 acatcaaaaa cgccattaac ctgatgttct ggggaatata aatgtcaggc tcccttatac 4260

 acagccagtc tgcaggtcga ccatagtac tggatatgtt gtgttttaca gtattatgta 4320
 gtctgttttt tatgcaaaat ctaatttaat atattgatat ttatatcatt ttacgtttct 4380
 cgttcagctt tctgtacaa agtggtgatt cgagttaatt aagctagcct agtgccattt 4440
 gtacagtggg tcgtagggtt tccccccact gtttggcttt cagttatatg gatgatgtgg 4500
 tattgggggc caagtctgta cagcatcttg agtccctttt taccgctgtt accaattttc 4560
 ttttgccttt gggatatacat ttaaaccta acaaaacaaa gagatggggg tactctctaa 4620
 attttatggg ttatgtcatt ggatgttatg ggtccttgcc acaagaacac atcatacaaa 4680

 aaatcaaaga atgtttttaga aaacttccta ttaacaggcc tattgattgg aaagtatgtc 4740
 aacgaattgt gggctctttg ggttttctg ccccttttac acaatgtggt taccctgcgt 4800
 tgatgccttt gtatgcattg attcaatcta agcaggtctt cactttctcg ccaacttaca 4860
 aggcctttct gtglaaaca tacctgaacc ttaccctgt tgcccgcaa cggccaggtc 4920
 tgtccaagt gtttctgac gcaacccca ctggctgggg cttggtcatt ggccatcagc 4980
 gcatgcgtgg aaccttttcg gctctctgc cgatccatac tgcggaactc ctagecgctt 5040
 gttttgctcg cagcaggtct ggagcaaaca ttatcgggac tgataactct gttgtcctat 5100

 cccgcaaata tacatcggtt ccatggctgc taggctgtgc tgccaactgg atcctgcgcg 5160
 ggacgtcctt tgtttacgtc ccgtcggcgc tgaatcctgc ggacgacct tctcggggtc 5220
 gcttgggact ctctcgtccc ctctccgtc tgccgttcgg accgaccag gggcgacct 5280
 ctctttacgc ggactccccg tctgtgcctt ctcatctgcc ggaccgtgtg cacttcgctt 5340
 cacctctgca cgtcgcattg agaccaccgt gaacgcccac caaatattgc ccaaggtctt 5400
 acataagagg actcttgagc tctcagcaat gtcaacgacc gaccttgagg catactcaa 5460
 agactgtttg tttaaagact gggaggagt gggggaggag attaggttaa aggtctttgt 5520

 actaggaggc ttaggcata aattggtctg cgcaccagca ccatggcgca atcactagag 5580
 cggggtaacct ttaagaccaa tgacttaca ggacgtgta gatcttagcc actttttaaa 5640
 agaaaagggg ggactggaag ggctaattca ctcccaacga agacaagatc tgctttttgc 5700
 ttgtactggg tctctctggt tagaccagat ctgagcctgg gagctctctg gctaactagg 5760
 gaacccactg cttaaagctc aataaagctt gccttgagtg cttcaagtag tgtgtccccg 5820
 tctgttgtgt gactctggta actagagatc cctcagaccc ttttagtcag tgtggaaaat 5880

ctctagcagt agtagttcat gtcacattat tattcagtat ttataacttg caaagaaatg 5940

aatatcagag agtgagagga acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa 6000

tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc 6060

caaactcadc aatgtatctt atcatgtctg gctctagcta tcccgccct aactccgcc 6120

atcccgcctc taactccgcc cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt 6180

tttatttatg cagaggccga ggccggatcc cttgagtggc tttcatcctg gagcagactt 6240

tgcagctctg ggactgcaac acaacattgc ctttatgtgt aactcttggc tgaagctctt 6300

acaccaatgc tgggggacat gtacctccca ggggcccgagg aagactacgg gaggtacac 6360

caacgtcaat cagaggggcc tgtgtagcta ccgataagcg gacctcaag agggcattag 6420

caatagtgtt tataaggccc cttgtttaat tcttgaagac gaaaggccct cgtgatacgc 6480

ctatttttat aggttaatgt catgataata atggtttctt agacgtcagg tggcactttt 6540

cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgi ttatttttct aaatcacatc aaatatgtat 6600

ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg cttcaataat attgaaaaag gaagagtatg 6660

agtattcaac atttccgtgt gcgcccttatt cctttttttg cggcattttg ccttctgtt 6720

tttgctcacc cagaaacgct ggtgaaagta aaagatgctg aagatcagtt ggggtgcacga 6780

gtgggttaca tcgaactgga tctcaacagc ggtaagatcc ttgagagttt tcgccccgaa 6840

gaacgttttc caatgatgag cactttttaa gtctctgctat gtggcgcggt attatcccgt 6900

gttgacgccg ggcaagagca actcggtcgc cgcatacact attctcagaa tgacttggtt 6960

gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt acggatggca tgacagtaag agaattatgc 7020

agtgtctgcca taacatgag tgataacact gcggccaact tacttctgac aacgatcgga 7080

ggaccgaagg agctaaccgc ttttttgac aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat 7140

cgttgggaac cggagctgaa tgaagccata ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct 7200

gcagcaatgg caacaacgtt gcgcaacta ttaactggcg aactacttac tctagcttcc 7260

cggcaacaat taatagactg gatggaggcg gataaagttg caggaccact tctgcgctcg 7320

gcccttccgg ctggctggtt tattgctgat aaatctggag ccggtgagcg tgggtctcgc 7380

ggatcattg cagcactggg gccagatggt aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg 7440

acgggggagtc aggcaactat ggatgaacga aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca 7500

ctgattaagc attggttaact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta 7560

aaacttcatt ttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc 7620

aaaatccctt aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa 7680
 ggatcttctt gagatccttt tttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca 7740
 ccgctaccag cggtaggtttg ttgcccgat caagagctac caactctttt tccgaaggta 7800
 actggcttca gcagagcgca gataccaaat actgtccttc tagttagcc gtagttaggc 7860
 caccacttca agaactctgt agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca 7920
 gtggctgctg ccagtggcga taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta 7980
 ccggataagg cgagcggtc gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag 8040

cgaacgacct acaccgaact gagataccta cagcgtgagc attgagaaag cgccacgctt 8100
 cccgaaggga gaaaggcgga caggtatccg gtaagcggca gggtaggaac aggagagcgc 8160
 acgaggagc ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtcctgtcgg gtttcgccac 8220
 ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggaggagcct atggaaaaac 8280
 gccagcaacg cggccttttt acggttcctg gccttttgct ggcctttttg aagctgtccc 8340
 tgatggctgt catctacctg cctggacagc atggcctgca acgaggcat cccgatgccg 8400
 ccggaagcga gaagaatcat aatggggaag gccatccagc ctgcgctcg 8449

<210> 36

<211> 7298

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pCIG0-VSV.G (VSVG)

<400> 36

gtcgacggat cgggagatca attccggcac ctgtcctacg agttgcatga taaagaagac 60
 agtcataagt gcggcgacga tagtcatgcc ccgcgccac cggaaggagc tgactgggtt 120
 gaaggctctc aagggcacg gtcgatgcag gaaaaggaca agcagcgaaa attcacgcc 180
 ccttgggagg tggcggcata tgcaaaggat agcactccca ctctactact gggatcata 240
 tgctgactgt atatgcatga ggatagcata tgctaccagg atacagatta ggatagcata 300
 tactaccag atatagatta ggatagcata tgctaccag atatagatta ggatagcata 360

tgctaccag atataaatta ggatagcata tactaccag atatagatta ggatagcata 420
 tgctaccag atatagatta ggatagcata tgctaccag atatagatta ggatagcata 480
 tgctaccag atatagatta ggatagcata tgctaccag atatttgggt agtatatgct 540
 accagatat aaattaggat agcatatact accctaact ctattaggat agcatatgct 600
 accggatac agattaggat agcatatact accagatat agattaggat agcatatgct 660
 accagatat agattaggat agcctatgct accagatat aaattaggat agcatatact 720

acccagatat agattaggat agcatatgct acccagatat agattaggat agcctatgct 780

 acccagatat agattaggat agcatatgct atccagatat ttgggtagta tatgctaccc 840
 atggcaacat tagcccaccg tgctctcagc gacctcgtga atatgaggac caacaaccct 900
 gtgcttggcg ctcaggcgca agtgtgtgta atttgtctc cagatcgag caatcgcgc 960
 cctatcttgg cccgcccacc tacttatgca ggtattcccc ggggtgccat tagtggtttt 1020
 gtgggcaagt ggttgaccg cagtggtag cggggttaca atcagccaag ttattacacc 1080
 cttattttac agtccaaaac cgcaggcgcg cgtgtggggg ctgacgcgtg cccccactcc 1140
 acaatttcaa aaaaaagagt ggccacttgt cttgttttat gggccccatt ggcgtggagc 1200

 cccgtttaat tticgggggt gttagagaca accagtggag tccgtgctg tcggcgtcca 1260
 ctctctttcc ccttggtaca aatagagtgt aacaacatgg ttcacctgtc ttggtccctg 1320
 cctgggacac atcttaataa cccagtatc atattgcact aggattatgt gttgcccata 1380
 gccataaatt cgtgtgagat ggacatccag tctttacggc ttgtccccc cccatggatt 1440
 tctattgtta aagatattca gaatgtttca ttctacact agtattttatt gccaagggg 1500
 ttgtgagggt ttatatttgt gtcatagcac aatgccacca ctgaaccccc cgtccaaatt 1560
 ttattctggg ggcgtcacct gaaaccttgt ttctgagcac ctacataca cttactgtt 1620

 cacaactcag cagtattct attagctaaa cgaaggagaa tgaagaagca ggcaagatt 1680
 caggagagtt cactgccgc tcttgatct tcagccactg cccttgtgac taaaatggtt 1740
 cactaccctc gtggaatcct gaccccatgt aaataaaacc gtgacagctc atggggtggg 1800
 agatatcgct gttccttagg acccttttac taaccctaatt tcgatagcat atgcttcccg 1860
 ttgggttaaca taigctattg aattaggggt agtctggata gtatatacta ctaccggga 1920
 agcatatgct acccgtttag ggttaacaag ggggccttat aaactatt gctaatgcc 1980
 tcttgagggt ccgcttatcg gtagctacac aggccctct gattgacgtt ggtgtagcct 2040

 cccgtagtct tctggggccc ctgggaggta catgtcccc agcattggtg taagagcttc 2100
 agccaagagt tacacataaa ggcaatgttg tgttcagtc cacagactgc aaagtctgct 2160
 ccaggatgaa agccactcaa gggatcttca atattggcca ttagccatat tattcattgg 2220
 ttatatagca taaatcaata ttggctattg gccattgcat acgttgtatc tatatcataa 2280
 tatgtacatt tatattggct catgtccaat atgaccgcca tgttggcatt gattattgac 2340
 tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtcat agcccatata tggagttccg 2400
 cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggtgaccg cccaacgacc cccgcccatt 2460

gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 2520
atgggtggag tatttacgtt aaactgccca ctggcagta catcaagtgt atcatatgcc 2580
aagtccgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta 2640
catgacctta cgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 2700
catggtgatg cggttttggc agtacacaa tgggcgtgga tagcggtttg actcacgggg 2760
atttccaagt ctccacccca ttgacgtcaa tgggagttag ttttggcacc aaaatcaacg 2820
ggactttcca aaatgtcgta ataaccccg cccgttgacg caaatgggcg gtaggcgtgt 2880

acggtgggag gtctatataa gcagagctcg tttagtgaac cgtcagatca ctagaagctt 2940
tattgcggta gtttatcaca gttaaattgc taacgcagtc agtgcttctg acacaacagt 3000
ctcgaactta agctgcagaa gttggtcgtg aggcactggg caggtlaagta tcaaggttac 3060
aagacagggt taaggagacc aatagaaact gggcttgcg agacagagaa gactcttgcg 3120
tttctgatag gcacctattg gtcttactga catccacttt gcctttctct ccacaggtgt 3180
ccactcccag ttcaattaca gctcttaagg ctagagtact taatacgact cactataggc 3240
tagcggtagc gagctcggat ccactagtaa cggccgccag tgtgctggaa ttcaacagag 3300

atcgatctgt ttcttgaca ctatgaagtg ccttttgtac ttagcctttt tattcattgg 3360
ggtgaattgc aagttcacca tagtttttcc acacaaccaa aaaggaaact ggaaaaatgt 3420
tccttctaata taccattatt gcccgtaag ctgagattta aattggcata atgacttaata 3480
aggcacagcc atacaagtca aaatgcccaa gagtcacaag gctattcaag cagacggttg 3540
gatgtgtcat gcttccaaat gggtcactac ttgtgatttc cgctggtatg gaccgaagta 3600
tataacacag tccatccgat ccttactcc atctgtagaa caatgcaagg aaagcattga 3660
acaaacgaaa caaggaactt ggctgaatcc aggccttcct cctcaaagtt gtggatatgc 3720

aactgtgacg gatgccgaag cagtgattgt ccaggtagt cctcaccatg tgctggttga 3780
tgaatacaca ggagaatggg ttgattcaca gttcatcaac ggaaaatgca gcaattacat 3840
atgccccact gtccataact ctacaacctg gcattctgac tataaggtca aagggtatg 3900
tgattctaac ctcatctcca tggacatcac cttcttctca gaggacggag agctatcatc 3960
cctgggaaag gagggcacag ggttcagaag taactacttt gcttatgaaa ctggaggcaa 4020
ggcctgcaaa atgcaatact gcaagcattg gggagtcaga ctcccatcag gtgtctggtt 4080
cgagatggct gataaggatc tctttgctgc agccagattc cctgaatgcc cagaagggtc 4140

aagtatctct gctccatctc agacctcagt ggatgtaagt ctaattcagg acgttgagag 4200
gatcttggat tattccctct gccaaagaaac ctggagcaaa atcagagcgg gtcttccaat 4260
ctctccagtg gatctcagct atcttgcctc taaaaacca ggaaccggtc ctgctttcac 4320

cataatcaat ggiaccctaa aatactttga gaccagatac atcagagtcg atattgctgc	4380
tccaatcctc tcaagaatgg tccgaatgat cagtggaaact accacagaaa gggaactgtg	4440
ggatgactgg gcaccatatg aagacgtgga aattggaccc aatggagtgc tgaggaccag	4500
ttcaggatat aagtttcctt tatacatgat tggacatggg atgttggact ccgatcttca	4560
tcttagctca aaggctcagg tgttcgaaca tcttcacatt caagacgtg cttcgcaact	4620
tctgatgat gagagtttat tttttggtga tactgggcta tccaaaaac caatcgagct	4680
tgtagaaggt tggttcagta gttggaaaag ctctattgcc tctttttct ttatcatagg	4740
gttaatcatt ggactattct tggttctccg agttggtatc catctttgca ttaaattaaa	4800
gcacaccaag aaaagacaga tttatacaga catagagatg aaccgacttg gaaagtaact	4860
caaatcctgc acaacagatt cttcatgttt ggaccaaac aacttgtgat accatgctca	4920
aagaggcctc aattatatat gagtttttaa tttttatgga attctgcaga tatccatcac	4980
actggcggcc gctcgagcat gcatctagag ggccctattc tatagtgtca cctaaatgct	5040
agagctcgct gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc	5100
tccccgtgc cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtccttc ctaataaaat	5160
gaggaaattg catcgattg tctgagtagg tgtcattcta tttgggggg tggggtgggg	5220
caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc atgtgggga tgcggtgggc	5280
tctatggctt ctgaggcgga aagaaccagc tgcattaatg aatcggccaa cgcgcgggga	5340
gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg ctgcgctcgg	5400
tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg ttatccacag	5460
aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag gccaggaacc	5520
gtaaaaagcg cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg cccccctgac gagcatcaca	5580
aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga taccaggcgt	5640
ttccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt accggatacc	5700
tgtccgctt tctcccttg ggaagcgtgg cgctttctca atgtcacgc ttaggtatc	5760
tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaacce cccgttcagc	5820
ccgaccgtg cgccttatcc ggtaactatc gtcttagtc caaccggta agacacgact	5880
tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggatg taggcgggtg	5940
ctacagagtt ctigaagtgg tggcctaact acggctacac tagaaggaca gtatttggtg	6000
tctgcgctt gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct tgatccggca	6060
aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt acgcgcagaa	6120
aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct cagtggaacg	6180

aaaactcacg ttaagggatt ttggatcatga gattatcaaa aaggatcttc acctagatcc 6240

 ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat atatgagtaa acttggctctg 6300
 acagttagca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc gatctgtcta tttcgttcat 6360
 ccatagttag ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat acgggagggc ttaccatctg 6420
 gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgtcacc ggctccagat ttatcagcaa 6480
 taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtggctc tgcaacttta tccgcctcca 6540
 tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag ttcgccagtt aatagtttgc 6600
 gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgcacg ctgctgttt ggtatggctt 6660

 cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg atccccatg ttgtgcaaaa 6720
 aagcggttag ctcttcggt cctccgatcg ttgtcagaag taagttggcc gcagtgttat 6780
 cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt catgccatcc gtaagatgct 6840
 tttctgtgac tggtagtagt tcaaccaagt cattctgaga atagtgtatg cggcgaccga 6900
 gttgctcttg cccggcgta atacgggata ataccgcgc acatagcaga actttaaaag 6960
 tgctcatcat tgaaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc aaggatctta ccgctgttga 7020
 gatccagttc gatgtaacc actcgtgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca 7080

 ccagcgtttc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg 7140
 cgacacggaa atgttgaata ctactactct tctttttca atattattga agcatttata 7200
 agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttgaaaaat aaacaaatag 7260
 gggttcgcg cacatttccc gaaaagtgc cacctgac 7298

 <210> 37
 <211> 9932
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PLV4301G38A1
 <400> 37

 cgataaccct aattcgatag catatgcttc ccgttgggta acatagcta ttgaattagg 60
 gttagtctgg atagtatata ctactaccg ggaagcatat gctaccggt tagggttcac 120

 cggatgatgc gccacgatg cgtccggcgt agaggatcta atgtgagtta gctcactcat 180
 taggcacccc aggttttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc 240
 ggataacaat ttacacagc aaacagctat gaccatgatt acgccaagcg cgcaattaac 300
 cctcactaaa gggaacaaaa gctggagctg caagcttaat gtagtcttat gcaatactct 360

tgtagtcttg caacatggta acgatgagtt agcaacatgc cttacaagga gagaaaaagc	420
accgtgcatg ccgattgggt gaagtaaggt ggtacgatcg tgccttatta ggaaggcaac	480
agacgggtct gacatggatt ggacgaacca ctgaattgcc gcattgcaga gatattgtat	540
ttaagtgcct agctcgatac ataaacgggt ctctctgggt agaccagatc tgagcctggg	600
agctctctgg ctaactaggg aaccactgc ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc	660
ttcaagtagt gtgtgccgt ctgttgtgtg actctggtaa ctagagatcc ctcagaccct	720
tttagtcagt gtggaaaatc tctagcagtg gcgcccgaa agggacttga aagcgaaagg	780
gaaaccagag gagctctctc gacgcaggac tcggcttgct gaagcgcga cggcaagagg	840
cgagggcgcg cgactgggtg gtacccaaa aattttgact agcggaggct agaaggagag	900
agatgggtgc gagagcgtca gtattaagcg ggggagaatt agatcgcgat gggaaaaaat	960
tcggttaagg ccagggggaa agaaaaata taaattaaaa catatagtat gggcaagcag	1020
ggagctagaa cgattcgcag ttaatcctgg cctgttagaa acatcagaag gctgtagaca	1080
aatactggga cagctacaac catcccttca gacaggatca gaagaactta gatcattata	1140
taatacagta gcaacctct attgtgtgca tcaaaggata gagataaaag acaccaagga	1200
agcttttagac aagatagagg aagagcaaaa caaaagtaag accaccgcac agcaagcggc	1260
cgctgatctt cagacctgga ggaggagata tgagggacaa ttggagaagt gaattatata	1320
aatataaagt agtaaaaatt gaaccattag gagtagcacc caccaaggca aagagaagag	1380
tggtgcagag agaaaaaaga gcagtgggaa taggagcttt gttccttggg ttcttgggag	1440
cagcaggaag cactatgggc gcagcgtcaa tgacgtgac ggtacaggcc agacaattat	1500
tgtctggtat agtgcagcag cagaacaatt tgctgagggc tatigaggcg caacagcatc	1560
tgttgcaact cacagtctgg ggcacaaagc agctccaggc aagaatcctg gctgtggaaa	1620
gatacctaaa ggatcaacag ctctggggga tttggggttg ctctggaaaa ctcatttgca	1680
ccactgctgt gccttggaat gctagttaga gtaataaatc tctggaacag atttggaatc	1740
acacgacctg gatggagtgg gacagagaaa ttaacaatta cacaagctta atacactcct	1800
taattgaaga atcgcaaac cagcaagaaa agaataaaca agaattattg gaattagata	1860
aatgggcaag tttgtggaat tggtttaaca taacaaattg gctgtggtat ataaaattat	1920
tcataatgat agtaggagcg ttggtaggtt taagaatagt ttttctgtga ctttctatag	1980
tgaatagagt taggcaggga tattcacat tatcgtttca gaccacctc ccaaccccg	2040
ggggacccga caggcccgaa ggaatagaag aagaaggtgg agagagagac agagacagat	2100
ccattcgatt agtgaacgga tctcgacggt atcggtttta aaagaaaagg ggggattggg	2160

gggtacagtg caggggaaag aatagtagac ataatagcaa cagacataca aactaaagaa 2220

ttacaaaaac aaattacaaa aattcaaaat ttatcgtatt ttatttagtc tccagaaaaa 2280

ggggggaatg aaagacccca cctgtaggtt tggcaagcta gcttaagtaa cgccattttg 2340

caaggcatgg aaaatacata actgagaata gagaagttca gatcaaggtt aggaacagag 2400

agacagcaga atatgggcca aacaggatat ctgtggttaag cagttcctgc cccggctcag 2460

ggccaagaac agatgggtccc cagatgcggt cccgccctca gcagtttcta gagaaccatc 2520

agatgtttcc aggggtgcccc aaggacctga aatgacctg tgccttattt gaactaacca 2580

atcagttcgc ttctcgcttc tgttcgcgcg cttctgctcc ccgagctcaa taaaagagcc 2640

cacaaccctt cactcggcgc gccagtcctc cgatagactg cgtcgcccgg gtaccgatat 2700

caccaacttt gtacaaaaaa gctgaacgat atcgccacca tgggcagcac agccattctg 2760

gccctgctgc tggcagtgtc gcagggcgtg tcagctgaag tgcagctggt ggaatctggc 2820

ggcggactgg tgcagcctgg cggatctctg agactgagct gtgccgccag cggttcacc 2880

ttcagcaact acgcatgag ctgggtgcgc caggccccctg gaaaaggcct ggaatgggtg 2940

tccaccatca gcggctctgg cggaaccacc tactacgccg atagcgtgaa gggccggttc 3000

accatctccc gggacaacag caagaacacc ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggtg 3060

gaagataccg ccgtgtacta ctgcccaag gactggttca gaagcagcag ccccgacgcc 3120

ttcgacatct ggggccaggg aacaaccgtg accgtgtctg ctggcggagg cggatcaggc 3180

ggcggaggat cagggggagg cggaagcgga gcaccttctt acgtgctgac ccagccccct 3240

agcgtgtcag tggctcctgg acagaccgcc agaatacct gtggcggcaa caacatcggc 3300

cggaagatcg tgcactggtt tcagcagagg cccggacagg ctcccgtgct cgtgatctac 3360

tacgacaccg acagacctgc cggcatcccc gagagattca gcggcagcaa cagcggcaac 3420

atggccacc tgaccatcag cacagtggga gccggcgacg aggcgcgacta ctactgtcaa 3480

gtgtgggaca ccggcagcga tcacgtggtg ttgaggcg gcaccaagct gacagtgtg 3540

ggcccgcggg ccaactttgt atacaaaagt tgcagcgaga gcaagtacgg ccctccctgc 3600

cccccttgcc ctgccccga gttcctgggc ggaccagcg tgttcctgtt ccccccaag 3660

cccaaggaca cctgatgat cagccggacc cccgaggtga cctgtgtggt ggtggacgtg 3720

tcccaggagg accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac 3780

gccaagacca agccccggga ggagcagttc aatagcacct accgggtggt gtccgtgctg 3840

accgtgctgc accaggactg gctgaacggc aaggaatata agtgaaggt gtccaacaag 3900

ggcctgcccc gcagcatcga gaaaaccatc agcaaggcca agggccagcc tcgggagccc 3960
 caggtgtaca ccttgcccc tagccaagag gagatgacca agaatacaggt gtccctgacc 4020
 tgcttggtga agggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caacggccag 4080
 cccgagaaca actacaagac cccccccct gtgctggaca gcgacggcag cttcttcctg 4140
 tacagcaggc tgaccgtgga caagagccgg tggcaggagg gcaacgtctt tagctgctcc 4200
 gtgatgcacg aggccctgca caaccactac acccagaaga gcctgtccct gagcctgggc 4260
 aagatgttca gatcttga tatttaccatc tgggcaccct tggccggaat ctgcgtggcc 4320

 cttctgctgt ccttgatcat cactctcatc tgctacggct ccaccagcgg ctccggcaag 4380
 cccggctctg gcgagggtc caccagcggc gactacaagg acgacgatga caagtaatag 4440
 gatatcggtt cagctttctt gtacaaagt gggattcgag ttaattaagt taacgaattc 4500
 cccccctctc cttcccccc ccttaacgtt actggccgaa gccgcttgga ataagccgg 4560
 tgtgcgtttg tctatatgtt atttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc 4620
 cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtctttccc tctcgccaaa 4680
 ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga 4740

 caaacaacgt ctglagcgac ctttgcagg cagcgggaacc cccacctgg cgacaggtgc 4800
 ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc 4860
 cacgttgtga gttggatagt tgtggaaga gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac 4920
 aaggggtga aggatgcccc gaaggtacc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg 4980
 tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg 5040
 gggacgtggt ttctcttga aaaacacgat gataatatgg ccacaacat gggaggcggga 5100
 agcggcggag gctccccctg aggcaccatg gtgagcaagg gcgaggagct gttaccggg 5160

 gtggtgcccc tcttggtcga gctggacggc gacgtaaacg gccacaagtt cagcgtgtcc 5220
 ggcgaggcg agggcgatgc cacctacggc aagctgacc tgaagtcat ctgcaccacc 5280
 ggcaagctgc ccgtgccctg gccaccctc gtgaccacc tgacctacgg cgtgcagtgc 5340
 ttcagccgt accccgacca catgaagcag cagacttct tcaagtccgc catgcccgaa 5400
 ggctacgtcc aggagcgcac catctcttc aaggacgacg gcaactaaa gaccgcgcc 5460
 gaggtgaagt tcgaggcgca caccctggtg aaccgcatc agctgaagg catcgacttc 5520
 aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc 5580

 tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc atcaagtgat acttcaagat ccgccacaac 5640
 atcgaggacg gcagcgtgca gctcgccgac cactaccagc agaacacccc catcgcgac 5700
 ggccccgtgc tgctgcccga caaccactac ctgagcacc agtccgcct gagcaaagac 5760

cccaacgaga agcgcgatca catggctctg ctggagtctg tgaccgccgc cgggatcact 5820
 ctccggcatgg acgagctgta caagtaacgc gtccccgggtc tagagctagc ggtaccatgc 5880
 attacgtagt cgacgactta attaagctag cctagtgccca tttgttcagt ggttcgtagg 5940
 gctttccccc acigtgttggc tticagttaa atggatgatg tggatattggg ggccaagtct 6000

 gtacagcattc ttgagtcctt tttaccgct gttaccaatt ttcttttgc tttgggtata 6060
 catttaaac ctaacaaaac aaagagatgg ggttactctc taaatttat gggttatgtc 6120
 attggatgtt atgggtcctt gccacaagaa cacatcatc aaaaaatcaa agaattttt 6180
 agaaaacttc ctattaacg gcctattgat tggaaaagtat gtcaacgaat tgtgggtctt 6240
 ttgggttttg ctgccccctt tacacaatgt ggttatcctg cgttgatgcc tttgtatgca 6300
 tgtattcaat ctaagcaggc ttctacttc tcgccaactt acaaggcctt tctgtgtaaa 6360
 caatacctga acctttaccg cgttgccccg caacggccag gtctgtgccca agtgtttgct 6420

 gacgcaaccc ccactggctg gggcttggc atgggccatc agcgcatgcg tggaaccttt 6480
 tcggctctc tcgcatcca tactgcggaa ctctagccg cttgttttgc tcgcagcagg 6540
 tctggagcaa acattatcgg gactgataac tctgttctc tatcccgcaa atatacatc 6600
 ttccatggc tgctaggctg tgctgccaac tggatcctgc gcgggacgtc cttgtttac 6660
 gtcccgctcg cgtgaatcc tgcggacgac cttctcggg gtctcttggg actctctct 6720
 cccctctcc gtctgccgtt ccgaccgacc acggggcgca cctctctta cgcggactcc 6780
 ccgtctgtgc cttctcatc gccggaccgt gtgcacttcg cttcacctct gcacgtcga 6840

 tggagaccac cgtgaacgcc caccaatat tgcccaaggt cttacataag aggactcttg 6900
 gactctcagc aatgtcaacg accgaccttg aggcatactt caaagactgt ttgtttaaag 6960
 actgggagga gttgggggag gagattaggt taaaggtctt tgtactagga ggctgtaggc 7020
 ataaattggt ctgcgcacca gcacatggc gcaatcacta gagcggggta cttttaagac 7080
 caatgactta caaggcagct gtagatctta gccacttttt aaaagaaaag gggggacttg 7140
 aagggtaat tcaactccaa cgaagacaag atctgctttt tgcctgtact gggctctct 7200
 ggtagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaacca ctgcttaagc 7260

 ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtactctg 7320
 gtaactagag atccctcaga cctttttagt cagtgtggaa aatctctagc agtagtagtt 7380
 catgtcatct tattattcag tatttataac ttgcaaagaa atgaatatca gagagtgaga 7440
 ggaacttggt tattgcagct tataatggtt acaataaag caatagcatc acaaatttca 7500
 caaataaagc attttttca ctgcatctta gttgtggttt gtcctaaact atcaatgtat 7560
 cttatcatgt ctggctctag ctatcccgcc cctaactccg cccatccgc ccctaactcc 7620

gcccagttcc gccattctc cgcccatgg ctgactaatt tttttatatt atgcagaggc	7680
cgaggccgga tcccttgagt ggctttcatc ctggagcaga ctttgagtc tgtggactgc	7740
aacacaacat tgcctttatg tgtaactctt ggtgaagct cttacaccaa tgctggggga	7800
catgtacctc ccagggggccc aggaagacta cgggaggcta caccaacgtc aatcagaggg	7860
gcctgtgtag ctaccgataa gcggaccctc aagagggcat tagcaatagt gtttataagg	7920
cccccttggt aattcttgaa gacgaaaggg cctcgtgata cgctatttt tataggttaa	7980
tgtcatgata ataattggtt cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg	8040
aaccctatt tgtttatatt tctaaataca ttcaaatatg tatccgtca tgagacaata	8100
accctgataa atgcttcaat aatattgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg	8160
tgtcgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttctt gttttgctc acccagaaac	8220
gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtgggtt acatcgaact	8280
ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat	8340
gagcactttt aaagtctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtgttgacg ccgggcaaga	8400
gcaactcggt cgccgatac actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac	8460
agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataacat	8520
gagtgataac actgcggcca acttacttct gacaacgac ggaggaccga aggagctaac	8580
cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgctt gatcgttggg aaccggagct	8640
gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgcagcaa tggcaacaac	8700
gttgcgcaaa ctattactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga	8760
ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg	8820
gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact	8880
ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac	8940
tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gatagggtcc tcactgatta agcattggta	9000
actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt	9060
taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga	9120
gttttcgttc cactgagcgt cagaccccg agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc	9180
ttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgtac cagcgttggt	9240
ttgtttgccg gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc	9300
gcagatacca aatactgtcc ttctagtgt gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc	9360

tgtacaccg cctacatacc tcgctctgct aatcctgtta ccagtggctg ctgccagtgg	9420
cgataagtgc tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg	9480
gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gcccagcttg gagcgaacga cctacaccga	9540
actgagatac ctacagcgtg agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaaggc	9600
ggacaggtat ccggttaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg	9660
gggaaacgcc tggatatctt atagtctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg	9720
atctttgtga tgctcgtcag gggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcgcctt	9780
tttacggttc ctggcctttt gctggccttt ttgaagctgt ccctgatggt cgtcatctac	9840
ctgcctggac agcatggcct gcaacgcggg catcccgatg ccgccggaag cgagaagaat	9900
cataatgggg aaggccatcc agcctcgcgt cg	9932
<210> 38	
<211> 9932	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PLV4301G19H9	
<400> 38	
cgataaacct aattcgatag catatgcttc ccgttgggta acatatgcta ttgaattagg	60
gttagtctgg atagtatata ctactaccg ggaagcatat gctaccctgt tagggttcac	120
cggatgatcc ggccacgatg cgtccggcgt agaggatcta atgtgagtta gctcactcat	180
taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc	240
ggataacaat ttacacacgg aaacagctat gaccatgatt acgccaagcg cgcaattaac	300
cctcactaaa gggaacaaaa gctggagctg caagcttaat gtagtcttat gcaatactct	360
tgtagtcttg caacatggta acgatgagtt agcaacatgc cttacaagga gagaaaaagc	420
accgtgatg ccgattgggt gaagtaaggt ggtacgatcg tgccttatta ggaaggcaac	480
agacgggtct gacatggatt ggacgaacca ctgaattgcc gcattgcaga gatattgtat	540
ttaagtgcct agctcgatac ataaacgggt ctctctgggt agaccagatc tgagcctggg	600
agctctctgg ctaactaggg aaccactgc ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc	660
ttcaagtagt gtgtgccgt ctgttgtgtg actctggtaa ctagagatcc ctacagacct	720
tttagtcagt gtggaaaatc tctagcagtg gcgccgaac agggacttga aagcgaaagg	780
gaaaccagag gagctctctc gacgcaggac tcggcttgct gaagcgcgca cggcaagagg	840
cgaggggcgg cgactgggtg gtacgcaaaa aatcttgact agcggaggct agaaggagag	900
agatgggtgc gagagcgtca gtattaagcg ggggagaatt agatcgcgat gggaaaaaat	960

tcggttaagg ccagggggaa agaaaaata taaattaaaa catatagtat gggcaagcag	1020
ggagctagaa cgattcgcag ttaatcctgg cctgttagaa acatcagaag gctgtagaca	1080
aatactggga cagctacaac catcccttca gacaggatca gaagaactta gatcattata	1140
taatacagta gcaaccctct attgtgtgca tcaaaggata gagataaaag acaccaagga	1200
agcttttagac aagatagagg aagagcaaaa caaaagtaag accaccgcac agcaagcggc	1260
cgctgatctt cagacctgga ggaggagata tgagggacaa ttggagaagt gaattatata	1320
aatataaagt agtaaaaatt gaaccattag gagtagcacc caccaaggca aagagaagag	1380
tgggtgcagag agaaaaaaga gcagtgggaa taggagcttt gttccttggg ttcttgggag	1440
cagcaggaag cactatgggc gcagcgtcaa tgacgctgac ggtacaggcc agacaattat	1500
tgtctggtat agtgcagcag cagaacaatt tgctgagggc tattgaggcg caacagcatc	1560
tgttgcaact cacagtctgg ggcatacagc agctccaggc aagaatcctg gctgtggaaa	1620
gatacctaaa ggatcaacag ctccctgggga ttgggggttg ctctggaaaa ctcatattgca	1680
ccactgctgt gccttggat gctagttaga gtaataaatc tctggaacag atttggatc	1740
acacgacctg gatggagtgg gacagagaaa ttaacaatta cacaagctta atacactcct	1800
taattgaaga atcgcaaac cagcaagaaa agaatagaaca agaattattg gaattagata	1860
aatgggcaag tttgtggaat tggtttaaca taacaaattg gctgtggtat ataaaattat	1920
tcataatgat agtaggaggc ttggtagggt taagaatagt ttttgctgta ctttctatag	1980
tgaatagagt taggcaggga tattcaccat tatcgtttca gaccacctc ccaacccga	2040
ggggaccga caggcccgaa ggaatagaag aagaaggtgg agagagagac agagacagat	2100
ccattcgatt agtgaacgga tctcgacggt atcggtttta aaagaaaagg ggggattggg	2160
gggtacagt gaggggaaag aatagtagac ataatagcaa cagacataca aactaaagaa	2220
ttacaaaaac aaattacaaa aattcaaat tttatcgatt ttatttagtc tccagaaaaa	2280
ggggggaatg aaagaccca cctgtagggt tggcaagcta gcttaagtaa cgccattttg	2340
caaggcatgg aaaatacata actgagaata gagaagttca gatcaaggtt aggaacagag	2400
agacagcaga atatgggcca aacaggatat ctgtggtgta cagttcctgc cccggctcag	2460
ggccaagaac agatggtccc cagatgcggt cccgcctca gcagtttcta gagaaccatc	2520
agatgtttcc aggtgcccc aaggacctga aatgacctg tgccttattt gaactaacca	2580
atcagttcgc ttctcgcttc tgttcgcgcg cttctgctcc ccgagctcaa taaaagagcc	2640
cacaaccct cactcggcgc gccagtctc cgatagactg cgtcgcccgg gtaccgatat	2700

caccaacttt gtacaaaaa gctgaacgat atcgccacca tgggcagcac agccattctg 2760
 gccctgctgc tggcagtgtc gcagggcgtg tcagctgaag tgcagctggt ggaatctggc 2820
 ggccggactgg tgcagcctgg cggatctctg agactgagct gtgccgccag cggttcacc 2880
 ttcagcaact acgcatgag ctgggtgctg caggcccttg gaaaaggcct ggaatgggtg 2940
 tccaccatca gcggctctg cggaaaccacc tactacgccg atagcgtgaa gggccggttc 3000
 accatctccc gggacaacag caagaacacc ctgtacctgc agatgaacag cctgcgggtg 3060
 gaagataccg ccgtgtacta ctgcgccaag gactggttca gaagcagcag ccccgacgcc 3120

 ttcgacatct ggggccaggg aacaaccgtg accgtgtctg ctggcggagg cggatcaggc 3180
 ggccgaggat cagggggagg cggaagcggg gcaccttctt acgtgctgac ccagccccct 3240
 agcgtgtcag tggctcctgg acagaccgcc agaatacct gtggcggcaa caacatcgcc 3300
 cggaagatcg tgcactgga tcagcagagg cccggacagg ctcccgtgct cgtgatctac 3360
 tacgacaccg acagacctgc cggcatcccc gagagattca gcggcagcaa cagcggcaac 3420
 atggccacc tgaccatcag cacagtggga gccggcgacg aggccgacta ctactgtcaa 3480
 gtgtgggaca ccggcagcga tcacgtggtg tttggaggcg gcaccaagct gacagtgtctg 3540

 ggcccccggg ccaactttgt atacaaaagt tgcagcgaga gcaagtacgg cctccctgc 3600
 ccccttgcc ctgccccga gttcttgggc ggaccagcg tgttctgtt ccccccaag 3660
 cccaaggaca cctgatgat cagccggacc cccgaggtga cctgtgtggt ggtggacgtg 3720
 tcccaggagg accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg acggcgtgga ggtgcacaac 3780
 gccaaagaca agccccggga ggagcagttc aatagcacct accgggtggt gtccgtgctg 3840
 accgtgctgc accaggactg gctgaacggc aaggaataca agtctaaggt gtccaacaag 3900
 gccctgccc gcagcatcg gaaaaccatc agcaaggcca agggccagcc tcgggagccc 3960

 caggtgtaca cctgcccc tagccaagag gagatgacca agaatacagt gtccctgacc 4020
 tgcctggtga agggcttcta cccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caacggccag 4080
 cccgagaaca actacaagac cccccccct gtgctggaca gcgacggcag cttcttctg 4140
 tacagcagcg tgaccgtgga caagagccgg tggcaggagg gcaacgtctt tagctgctcc 4200
 gtgatgcacg aggccctgca caaccactac acccagaaga gcctgtccct gacccgggc 4260
 aagatgttca gatcttgtga tatttacatc tgggcacct tggccggaat ctgctggcc 4320
 cttctgctgt ccttgatcat cactctcatc tgetacggct ccaccagcg ctcggcaag 4380

 cccggtctg gcgagggtc caccagcggc gactacaagg acgacgatga caagtaatag 4440
 gatatcggtt cagctttctt gtacaaagt gggattcgag ttaattaagt taacgaattc 4500
 cccccctc cccccccc ccctaactt actggccgaa gccgcttgga ataaggccgg 4560

tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc	4620
cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa	4680
ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga	4740
caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg cagcgggaacc ccccacctgg cgacaggtgc	4800
ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc	4860
cacgttgtga gttggatagt tgtggaaaga gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac	4920
aaggggctga aggatgccca gaaggtaccc cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg	4980
tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg ttaaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg	5040
gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat gataatatgg ccacaacat gggaggcggga	5100
agcggcggag gctccccctg aggcaccatg gtgagcaagg gcgaggagct gttcacggg	5160
gtggtgcccc tcttggtcga gctggacggc gacgtaaagc gccacaagtt cagcgtgtcc	5220
ggcggaggcg agggcgatgc cacctacggc aagctgacct tgaagttcat ctgcaccacc	5280
ggcaagctgc ccgtgccctg gccaccctc gtgaccacct tgacctacgg cgtgcagtgc	5340
ttcagccgct accccgacca catgaagcag cagcacttct tcaagtccgc catgcccgaa	5400
ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc aaggacgacg gcaactaaa gacccgcgcc	5460
gaggtgaagt tcgaggcgca caccctggtg aaccgcatcg agctgaaggc catcgacttc	5520
aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc	5580
tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac	5640
atcgaggacg gcagcgtgca gtcgcccac cactaccagc agaacacccc catcgccgac	5700
ggccccgtgc tgctgccga caaccactac ctgagcacct agtccgcctt gagcaaagac	5760
cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg ctggagtctg tgaccgccgc cgggatcact	5820
ctcgcatgg acgagctgta caagtaacgc gtcccgggtc tagagctagc ggtaccatgc	5880
attacgtagt cgacgactta attaaactag cctagtgcc tttgttcagt ggttcgtagg	5940
gctttcccc actgtttggc tttcagttat atggatgatg tggatttggg ggccaagtct	6000
gtacagcate ttgagtcctt tttaccgt gttaccaatt ttttttgc tttgggtata	6060
catttaaacc ctaacaaaac aaagagatgg ggttactctc taaattttat gggttatgtc	6120
attggatgtt atgggtcctt gccacaagaa cacatcatac aaaaaatcaa agaattttt	6180
agaaaacttc ctattaacag gcctattgat tggaaagtat gtcaacgaat tgtgggtctt	6240
ttgggttttg ctgccccctt tacacaatgt ggttatcctg cgttgatgcc tttgtatgca	6300
tgtattcaat ctaagcagc tttcactttc tcgccaactt acaaggcctt tctgtgtaaa	6360
caatacctga acctttacc cgttgccccg caacggccag gtctgtgcca agtgtttgct	6420

gacgcaaccc ccactggctg gggcttggtc atgggccatc agcgcatgcg tggaaccttt 6480

tcggctcctc tgccgatcca tactgcggaa ctctagccg cttgttttgc tcgcagcagg 6540

tctggagcaa acattatcgg gactgataac tctgttgtec tatcccgcaa atatacatcg 6600

tttccatggc tgctaggctg tgctgccaac tggatcctgc gcgggacgtc ctttgtttac 6660

gtcccgctcg cgctgaatcc tgcggacgac ctttctcggg gtctgttggg actctctcgt 6720

ccccctctcc gtctgccgtt ccgaccgacc acggggcgca cctctcttta cgcggaactcc 6780

ccgtctgtgc ctctcatct gccggaccgt gtgcacttcg cttcacctct gcacgtcgca 6840

tggagaccac cgtgaacgcc caccaatat tgcccaagggt cttacataag aggactcttg 6900

gactctcagc aatgtcaacg accgaccttg aggcatactt caaagactgt ttgtttaaag 6960

actgggagga gttgggggag gagattaggt taaaggtctt tgtactagga ggctgtaggc 7020

ataaatgtgt ctgcgcacca gcaccatggc gcaatcacta gagcggggta cttttaagac 7080

caatgactta caaggcagct gtagatctta gccacttttt aaaagaaaag gggggactgg 7140

aagggtaat tcaactccaa cgaagacaag atctgctttt tgcttgtact gggctctctt 7200

ggttagacca gatctgaccc tgggagctct ctggctaact agggaaacca ctgcttaagc 7260

ctcaataaag ctigccctga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg 7320

gtaactagag atccctcaga ccccttttagt cagtgtggaa aatctctagc agtagtagtt 7380

catgtcatct tattattcag tatttataac ttgcaaagaa atgaatatca gagagtgaga 7440

ggaacttggt tattgcagct tataatggtt acaataaag caatagcatc acaaatttca 7500

caaataaagc atttttttca ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat 7560

cttatcatgt ctggctctag ctatcccgcc cctaactccg cccatcccgcc ccctaactcc 7620

gcccagtacc gccattctc cgccccatgg ctgactaatt ttttttattt atgcagaggc 7680

cgaggccgga tcctttgagt ggctttcatc ctggagcaga ctttgcagtc tgtggactgc 7740

aacacaacat tgcctttatg tgtaactctt ggctgaagct cttacaccaa tgctggggga 7800

catgtacctc ccaggggccc aggaagacta cgggaggcta caccaacgtc aatcagaggg 7860

gcctgtgtag ctaccgataa gcggaccctc aagagggcct tagcaatagt gtttataagg 7920

cccccttggt aattcttgaa gacgaaaggg cctcgtgata cgcctatttt tataggttaa 7980

tgatcatgata ataatggttt cttagacgtc aggtggcact tttcggggaa atgtgcgcgg 8040

aaccctatt tgtttatttt tctaataaca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata 8100

accctgataa atgcttcaat aatatgaaa aaggaagagt atgagtattc aacatttccg 8160

tgctgccctt attccctttt ttgcggcatt ttgccttcct gtttttgctc acccagaaac	8220
gctggtgaaa gtaaaagatg ctgaagatca gttgggtgca cgagtggtt acatcgaact	8280
ggatctcaac agcggtaaga tccttgagag ttttcgcccc gaagaacgtt ttccaatgat	8340
gagcactttt aaagtctgc tatgtggcgc ggtattatcc cgtgttgacg cgggcaaga	8400
gcaactcgtt cggcgcatc actattctca gaatgacttg gttgagtact caccagtcac	8460
agaaaagcat cttacggatg gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataacat	8520
gagtataac actgcggcca acttacttct gacaacgac ggaggaccga aggagctaac	8580
cgcttttttg cacaacatgg gggatcatgt aactcgctt gatcgttggg aaccggagct	8640
gaatgaagcc ataccaaacg acgagcgtga caccacgatg cctgcagcaa tggcaacaac	8700
gttgcgcaa ctattaactg gcgaactact tactctagct tcccggcaac aattaataga	8760
ctggatggag gcggataaag ttgcaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggttggtg	8820
gtttattgct gataaatctg gagccggtga gcgtgggtct cgcggtatca ttgcagcact	8880
ggggccagat ggtaagccct cccgtatcgt agttatctac acgacgggga gtcaggcaac	8940
tatggatgaa cgaaatagac agatcgctga gatagggtgc tcaatgatta agcattggta	9000
actgtcagac caagtttact catatatact ttagattgat ttaaaacttc atttttaatt	9060
taaaaggatc taggtgaaga tcctttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga	9120
gttttcgttc cactgagcgt cagacccgt agaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc	9180
ttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgtac cagcgttggt	9240
ttgtttgcc gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggt tcagcagagc	9300
gcagatacca aatactgtcc ttctagtga gccgtagtta ggccaccact tcaagaactc	9360
tgtagcaccg cctacatacc tcgtctgtct aatcctgta ccagtggtg ctgccagtgg	9420
cgataagtcg tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggcgcagcg	9480
gtcgggtga acggggggtt cgtgcacaca gccagcttg gagcgaacga cctacaccga	9540
actgagatac ctacagcgtg agcattgaga aagcgccacg cttcccgaag ggagaaagc	9600
ggacaggat cggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttcagg	9660
gggaaacgcc tgglatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg	9720
attttttgta tgctcgtcag gggggcggag cctatgaaa aacgccagca acgcggcctt	9780
tttacggttc ctggccttt gctggccttt ttgaagctgt ccctgatggt cgtcatctac	9840
ctgcctggac agcatggcct gcaacgcggg catcccgatg ccgccgaag cgagaagaat	9900
cataatgggg aaggccatcc agcctcgcgt cg	9932

<210> 39

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG1

<400> 39

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 40

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG2

<400> 40

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 165 170 175
 Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 41

<211> 377

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG3

<400> 41

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro

100 105 110

Arg Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg

115 120 125

Cys Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys

130 135 140

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

145 150 155 160

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

165 170 175

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

180 185 190

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr
195 200 205

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
210 215 220

Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
225 230 235 240

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
245 250 255

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln
260 265 270

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
275 280 285

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
290 295 300

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn
305 310 315 320

Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
325 330 335

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile
340 345 350

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln
355 360 365

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
370 375

<210> 42

<211> 327

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IgG4

<400> 42

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

260	265	270	
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser			
275	280	285	
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser			
290	295	300	
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser			
305	310	315	320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys			
325			