

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第1部門第1区分  
 【発行日】令和6年5月17日(2024.5.17)

【国際公開番号】WO2021/226085  
 【公表番号】特表2023-524108(P2023-524108A)  
 【公表日】令和5年6月8日(2023.6.8)  
 【年通号数】公開公報(特許)2023-106  
 【出願番号】特願2022-566653(P2022-566653)  
 【国際特許分類】

10

C 1 2 N 5/0783(2010.01)  
 A 6 1 K 35/17(2015.01)  
 A 6 1 P 35/00(2006.01)  
 A 6 1 K 38/20(2006.01)  
 A 6 1 P 1/00(2006.01)  
 A 6 1 P 11/00(2006.01)  
 G 0 1 N 33/543(2006.01)  
 G 0 1 N 33/53(2006.01)  
 C 1 2 N 5/0781(2010.01)  
 C 0 7 K 16/28(2006.01)  
 C 1 2 M 1/00(2006.01)  
 C 1 2 M 3/04(2006.01)

20

## 【F I】

C 1 2 N 5/0783                    Z N A  
 A 6 1 K 35/17  
 A 6 1 P 35/00  
 A 6 1 K 38/20  
 A 6 1 P 1/00  
 A 6 1 P 11/00  
 G 0 1 N 33/543 5 9 7  
 G 0 1 N 33/53                    Y  
 G 0 1 N 33/543 5 4 1 A  
 C 1 2 N 5/0781  
 C 0 7 K 16/28  
 C 1 2 M 1/00                    D  
 C 1 2 M 3/04                    A

30

## 【手続補正書】

【提出日】令和6年5月7日(2024.5.7)

## 【手続補正1】

40

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

## 【補正の内容】

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に拡張するための方法であって、  
 (a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から取得された、及び/または受容された第1のTIL集団を提供することと、

50

(b) ステップ(a)の前記第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/またはTIGITに富むTIL集団を取得することと、

(c) 前記PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/またはTIGITに富むTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の増殖が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の増殖が、約1~7、8、9、10、または11日の第1の期間行われ、前記第2のTIL集団を取得する、前記産生することと、

10

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の増殖に追加されるAPCの数が、ステップ(c)において追加されるAPCの数の少なくとも2倍であり、前記急速な第2の増殖が、約1~11日の第2の期間行われ、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、前記急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記産生することと、

(e) ステップ(d)から取得された前記治療用TIL集団を採取することと、

(f) ステップ(e)からの前記採取されたTIL集団を注入バッグに移すことと、を含む、前記方法。

20

#### 【請求項2】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に拡張するための方法であって、

a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から取得された、及び/または受容された第1のTIL集団を提供することと、

b) ステップ(a)の前記第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/またはTIGITに富むTIL集団を取得することと、

30

c) 前記PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/またはTIGITに富むTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び任意で抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の増殖が、約1~7、8、9、10、または11日の第1の期間行われ、前記第2のTIL集団を取得する、前記産生することと、

d) 前記第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む細胞培養培地と接触させることにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の増殖が、約1~11日の第2の期間行われ、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療用TIL集団である、前記産生することと、

40

e) ステップ(d)から取得された前記治療用TIL集団を採取することと、を含む、前記方法。

#### 【請求項3】

ステップ(c)において、前記細胞培養培地が抗原提示細胞(APC)をさらに含み、ステップ(d)における前記培養培地中のAPCの数が、ステップ(c)における前記培養培地中のAPCの数よりも多い、またはステップ(c)において、前記細胞培養培地が、抗原提示細胞(APC)をさらに含み、ステップ(d)における前記培養培地中のAPCの数が、ステップ(c)における前記培養培地中のAPCの数に等しい、請求項2に記載の方法。

50

## 【請求項4】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療用TIL集団に拡張するための方法であって、

（a）PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/またはTIGIT陽性であるように選択されている第1のTIL集団であって、腫瘍消化により対象からの腫瘍試料を処理し、前記PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/またはTIGIT陽性TILを選択することにより取得可能な前記第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の増殖が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日の第1の期間行われ、前記第2のTIL集団を取得する、前記産生することと、

10

（b）前記第2のTIL集団に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを含む前記第2のTIL集団の細胞培養培地と接触させることによって、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の増殖におけるAPCの数が、ステップ（a）のAPCの数の少なくとも2倍であり、前記急速な第2の増殖が、約1～11日の第2の期間行われ、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、前記急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記産生することと、

（c）ステップ（b）から取得された前記治療用TIL集団を採取することと、を含む、前記方法。

20

## 【請求項5】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療用TIL集団に拡張するための方法であって、

（a）第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び任意で抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で培養することにより、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/またはTIGIT陽性であるように選択されている前記第1のTIL集団のプライミングによる第1の増殖を行って、第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日の第1の期間行われ、前記第2のTIL集団を取得する、前記産生することと、

30

（b）前記第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む細胞培養培地と接触させることにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の増殖が、約1～11日の第2の期間行われ、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療用TIL集団である、前記産生することと、

（c）ステップ（b）から取得された前記治療用TIL集団を採取することと、を含む、前記方法。

## 【請求項6】

ステップ（a）において、前記細胞培養培地が抗原提示細胞（APC）をさらに含み、ステップ（b）における前記培養培地中のAPCの数が、ステップ（a）における前記培養培地中のAPCの数よりも多い、またはステップ（a）において、前記細胞培養培地が、抗原提示細胞（APC）をさらに含み、ステップ（b）における前記培養培地中のAPCの数が、ステップ（a）における前記培養培地中のAPCの数に等しい、請求項5に記載の方法。

40

## 【請求項7】

前記PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/またはTIGIT陽性TILが、PD-1高、CD39高、CD38低、CD103高、CD101低、LAG3高、TIM3高、及び/またはTIGIT高TILである、請求項1、2、4または5に記載の方法。

## 【請求項8】

50

請求項 1 もしくは 2 に記載の方法であって、ステップ ( b ) の前記選択が、または請求項 4 もしくは 5 に記載の方法であって、ステップ ( a ) の前記選択が、フローサイトメトリー ( 例えば、FACS を含む )、抗体系ビーズ選択、及び抗体系磁気ビーズ選択からなる群から選択される選択方法、またはフローサイトメトリー ( 例えば、FACS を含む ) を含み、前記方法が、任意で ( i ) 前記第 1 の TIL 集団を、PD - 1 の IgV ドメインの外側の N 末端ループによって PD - 1 に結合する過剰のモノクローナル抗 PD - 1 IgG 4 抗体に曝露するステップと、( ii ) フルオロフォアに複合した過剰の抗 IgG 4 抗体を追加するステップと、( iii ) 前記フルオロフォアに基づいて流動系細胞選別を行って、PD - 1 に富む TIL 集団を取得するステップと、を含み、任意でモノクローナル抗 PD - 1 IgG 4 抗体は、ニボルマブ、またはそのバリエーション、断片、もしくは複合体であり、任意で前記 IgG 4 抗体が、クローン抗ヒト IgG 4、クローン HP 6023 である、請求項 1 もしくは 2 に記載の方法、または請求項 4 もしくは 5 に記載の方法。

10

【請求項 9】

( i ) PD - 1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/または TIGIT 陽性 TIL の前記選択が、少なくとも  $1 \times 10^6$  の PD - 1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/または TIGIT 陽性 TIL が存在するまで生じる、及び/または

( ii ) 前記第 1 の TIL 集団を培養するための前記細胞培養培地が、2 -メルカプトエタノールを含む、または前記第 2 の TIL 集団を培養するための前記細胞培養培地が、2 -メルカプトエタノールを含む、または前記第 1 の TIL 集団及び前記第 2 の TIL 集団を培養するための前記細胞培養培地が、2 -メルカプトエタノールを含む、及び/または

20

( iii ) 前記 PD - 1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/または TIGIT 陽性 TIL が、それぞれ、抗 PD - 1、抗 CD39、抗 CD38、抗 CD103、抗 CD101、抗 LAG3、抗 TIM3、及び/または抗 TIGIT 抗体複合ビーズを使用して選択される、及び/または前記 PD - 1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/または TIGIT 陽性 TIL が、それぞれ、抗 PD - 1、抗 CD39、抗 CD38、抗 CD103、抗 CD101、抗 LAG3、抗 TIM3、及び/または抗 TIGIT 抗体複合磁気ビーズを使用して選択される、及び/または前記 PD - 1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/または TIGIT 陽性 TIL が、それぞれ、抗 PD - 1、抗 CD39、抗 CD38、抗 CD103、抗 CD101、抗 LAG3、抗 TIM3、及び/または抗 TIGIT 抗体複合ビーズと結合し、前記 PD - 1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/または TIGIT 陰性 TIL が、それぞれ、抗 PD - 1、抗 CD39、抗 CD38、抗 CD103、抗 CD101、抗 LAG3、抗 TIM3、及び/または抗 TIGIT 抗体複合ビーズと結合しない、及び/または

30

( iv ) 前記急速な第 2 の増殖における APC の数対前記プライミングによる第 1 の増殖における APC の数が、約 1.5 : 1 ~ 約 20 : 1 の、約 1.5 : 1 ~ 約 10 : 1 の、約 2 : 1 ~ 約 5 : 1 の、約 2 : 1 ~ 約 3 : 1 の、または約 2 : 1 の範囲から選択される比率である、

40

( v ) 前記プライミングによる第 1 の増殖における APC の数が、約  $1 \times 10^8$  APC ~ 約  $3.5 \times 10^8$  APC の範囲から選択され、前記急速な第 2 の増殖における APC の数が、約  $3.5 \times 10^8$  APC ~ 約  $1 \times 10^9$  APC の範囲から選択される、または前記プライミングによる第 1 の増殖における APC の数が、約  $1.5 \times 10^8$  APC ~ 約  $3 \times 10^8$  APC の範囲から選択され、前記急速な第 2 の増殖における APC の数が、約  $4 \times 10^8$  APC ~ 約  $7.5 \times 10^8$  APC の範囲から選択される、または前記プライミングによる第 1 の増殖における APC の数が、約  $2 \times 10^8$  APC ~ 約  $2.5 \times 10^8$  APC の範囲から選択され、前記急速な第 2 の増殖における APC の数が、約  $4.5 \times 10^8$  APC ~ 約  $5.5 \times 10^8$  APC の範囲から選択される、または約  $2.5 \times 10^8$  APC が、前記プライミングによる第 1 の増殖に追加され、 $5 \times 10^8$  APC が、前記急速な第 2

50

の増殖に追加される、請求項 1 または 2 または 4 または 5 に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記方法が、前記治療用 T I L 集団を採取するステップの後に、

前記採取された治療用 T I L 集団を注入バッグに移す追加のステップを行うことを含む、請求項 2 ~ 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1】

( i ) 前記プライミングによる第 1 の増殖が複数の別個の容器中で行われ、その別個の容器の各々において、前記第 2 の T I L 集団が、前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて前記第 1 の T I L 集団から取得され、前記第 3 の T I L 集団が、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて前記第 2 の T I L 集団から取得され、前記第 3 の T I L 集団から取得された前記治療用 T I L 集団が、前記複数の容器の各々から収集され、複合されて、前記採取された T I L 集団を生じさせる、任意で前記複数の別個の容器が、少なくとも 2 個の別個の容器を含む、または前記複数の別個の容器が、2 ~ 2 0 個の別個の容器を含む、または前記複数の別個の容器が、2 ~ 1 0 個の別個の容器を含む、または前記複数の別個の容器が、2 ~ 5 個の別個の容器を含む、任意で前記別個の容器の各々が、第 1 のガス透過性表面積を含む、及び

10

任意で ( i i ) 前記プライミングによる第 1 の増殖ステップが、単一の容器内で行われる、任意で前記単一の容器が、第 1 のガス透過性表面積を含む、任意で前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記細胞培養培地が、抗原提示細胞 ( A P C ) を含み、前記 A P C が、約 1 細胞層 ~ 約 3 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、または前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 1 . 5 細胞層 ~ 約 2 . 5 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、または前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 2 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、または前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 3 細胞層 ~ 約 5 細胞層の厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、または前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 3 . 5 細胞層 ~ 約 4 . 5 細胞層の厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、または前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 4 細胞層の厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 1 ~ 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

30

【請求項 1 2】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記プライミングによる第 1 の増殖が、第 1 のガス透過性表面積を含む第 1 の容器内で行われ、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記急速な第 2 の増殖が、第 2 のガス透過性表面積を含む第 2 の容器内で行われる、任意で前記第 2 の容器が、前記第 1 の容器よりも大きい、任意で前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記細胞培養培地が、抗原提示細胞 ( A P C ) を含み、前記 A P C が、約 1 細胞層 ~ 約 3 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、または前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 1 . 5 細胞層 ~ 約 2 . 5 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、または前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 2 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、または前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 3 細胞層 ~ 約 5 細胞層の平均厚さで、前記第 2 のガス透過性表面積上に層状化される、または前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 3 . 5 細胞層 ~ 約 4 . 5 細胞層の平均厚さで、前記第 2 のガス透過性表面積上に層状化される、または前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 4 細胞層の平均厚さで、前記第 2 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 2 ~ 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 1 3】

前記プライミングによる第 1 の増殖が第 1 の T I L 集団に対して行われる各容器について、前記急速な第 2 の増殖が、同じ容器内で、かかる第 1 の T I L 集団から産生された前

50

記第 2 の T I L 集団に対して行われる、任意で各容器が、第 1 のガス透過性表面積を含む、任意で前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記細胞培養培地が、抗原提示細胞 ( A P C ) を含み、前記 A P C が、約 1 細胞層 ~ 約 3 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、または前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 1 . 5 細胞層 ~ 約 2 . 5 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、または前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 2 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、任意で前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 3 細胞層 ~ 約 5 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、または前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 3 . 5 細胞層 ~ 約 4 . 5 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、または前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 4 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

前記プライミングによる第 1 の増殖が、前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、第 1 の T I L 集団に対して行われる各容器について、前記容器が、第 1 のガス透過性表面積を含み、前記細胞培養培地が、抗原提示細胞 ( A P C ) を含み、前記 A P C が、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化され、前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数に対する前記比率が、約 1 : 1 . 1 ~ 約 1 : 1 0 の、約 1 : 1 . 2 ~ 約 1 : 8 の、約 1 : 1 . 3 ~ 約 1 : 7 の、約 1 : 1 . 4 ~ 約 1 : 6 の、約 1 : 1 . 5 ~ 約 1 : 5 の、約 1 : 1 . 6 ~ 約 1 : 4 の、約 1 : 1 . 7 ~ 約 1 : 3 . 5 の、約 1 : 1 . 8 ~ 約 1 : 3 の、約 1 : 1 . 9 ~ 約 1 : 2 . 5 の、または約 1 : 2 の範囲から選択される、請求項 1 ~ 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 1 5】

( i ) 2 ~ 3 日間の前記急速な第 2 の増殖のステップの後、前記細胞培養培地に追加の I L - 2 が補充される、及び / または

( i i ) 前記方法が、凍結保存プロセスを使用して、前記治療用 T I L 集団を採取するステップにおいて、前記採取された T I L 集団を凍結保存することをさらに含む、及び / または前記方法が、前記注入バッグを凍結保存するステップをさらに含む、任意で前記凍結保存プロセスが、採取された T I L 集団の、凍結保存培地に対する 1 : 1 比率を使用して行われる、任意で前記凍結保存培地が、ジメチルスルホキシド ( D M S O ) を含む、さらに任意で前記凍結保存培地が、7 % ~ 1 0 % の D M S O を含む、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 1 6】

( i ) 前記抗原提示細胞が、末梢血単核細胞 ( P B M C ) である、任意で前記 P B M C が、放射線照射されており、同種異系である、任意で前記抗原提示細胞が、人工抗原提示細胞である、及び / または

( i i ) 前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記細胞培養培地が、末梢血単核細胞 ( P B M C ) を含み、前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおける前記細胞培養培地中の前記 P B M C の総数が、 $2.5 \times 10^8$  である、及び / または

40

( i i i ) 前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記細胞培養培地中の前記抗原提示細胞 ( A P C ) が、末梢血単核細胞 ( P B M C ) であり、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて前記細胞培養培地に追加される前記 P B M C の総数が、 $5 \times 10^8$  である、及び / または

( i v ) 前記治療用 T I L 集団を採取するステップにおける前記採取が、膜系細胞処理システムを使用して行われる、任意でステップ ( d ) における前記採取が、L O V O 細胞処理システムを使用して行われる、及び / または

50

(v) 前記細胞培養培地が、G容器及びXuriセルバッグからなる群から選択される容器内に提供される、及び/または

(v i) 前記急速な第2の増殖のステップの2~3日後、前記細胞培養培地に、追加のIL-2が補充される、任意でIL-2濃度が、約10,000 IU/mL~約5,000 IU/mLである、任意で前記IL-2濃度が、約6,000 IU/mLである、及び/または

(v i i) 前記採取された治療用TIL集団を注入バッグに移すステップにおける前記注入バッグが、HypoThermosolを含有する注入バッグである、及び/または

(v i i i) 前記複数の断片が、

a) 前記プライミングによる第1の増殖のステップにおいて容器当たり約60個の断片を含み、各断片が、約27 mm<sup>3</sup>の体積を有する、または

b) 約1300 mm<sup>3</sup>~約1500 mm<sup>3</sup>の総体積を伴う約30~約60個の断片を含む、任意で前記複数の断片が、約1350 mm<sup>3</sup>の総体積を伴う約50個の断片を含む、及び/または

約1グラム~約1.5グラムの総質量を伴う約50個の断片を含む、請求項1~15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記プライミングによる第1の増殖のステップ及び前記急速な第2の増殖のステップが、各々、5日、6日、7日、8日、9日、10日、または11日の期間内で個々に行われる、または前記プライミングによる第1の増殖のステップが、5日、6日、または7日の期間内で行われる、または前記プライミングによる第1の増殖のステップが、8日、9日、10日、または11日の期間内で行われる、または前記急速な第2の増殖のステップの前記第2の期間が、7日、8日、または9日の期間内で行われる、または前記急速な第2の増殖のステップの前記第2の期間が、10日または11日の期間内で行われる、または前記プライミングによる第1の増殖のステップ及び前記急速な第2の増殖のステップが、各々、7日の期間内で個々に行われる、または前記プライミングによる第1の増殖のステップ及び前記急速な第2の増殖のステップが、各々、11日の期間内で個々に行われる、請求項1~16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項18】

(i) 前記治療用TIL集団の前記採取をととした前記プライミングによる第1の増殖のステップが、約14日~約16日の期間内で、約15日~約16日の期間内で、約14日の期間内で、約15日の期間内で、または約16日の期間内で行われる、任意で凍結保存プロセスを使用して、前記採取された治療用TIL集団を凍結保存するステップをさらに含み、前記治療用TIL集団の前記採取をととした前記プライミングによる第1の増殖のステップ及び凍結保存のステップが、16日以下のうちに行われる、及び/または

(i i) 前記治療用TIL集団の採取のステップで採取された前記治療用TIL集団が、TILの治療上有効な投与量に十分な前記TILを含む、任意で治療上有効な投与量に十分な前記TILの数が、約 $2.3 \times 10^{10}$ ~約 $1.3.7 \times 10^{10}$ である、請求項1~17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

凍結保存プロセスを使用して、前記採取されたTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップをさらに含み、任意で前記凍結保存プロセスが、採取されたTIL集団の、凍結保存培地に対する1:1比率を使用して行われる、請求項1~18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

すべてのステップが、約14日~約22日の、約14日~約21日の、約14日~約20日の、約14日~約19日の、約14日~約18日の、約14日~約17日の、約14日~約16日の、約15日~約16日の、約14日の、約15日の、約16日の、または16日以内に期間内で行われる、請求項1または2または4または5に記載の方法。

【請求項21】

10

20

30

40

50

( i ) 採取された前記治療用 T I L 集団が、治療上有効な投与量の前記 T I L に十分な T I L を含む、任意で治療上有効な投与量に十分な T I L の数が、約  $2.3 \times 10^{10}$  ~ 約  $13.7 \times 10^{10}$  である、及び/または

( i i ) 前記プライミングによる第 1 の増殖ステップにおける前記容器が、前記急速な第 2 の増殖のステップにおける前記容器よりも大きい、及び/または

( i i i ) 前記第 3 の T I L 集団から取得されたエフェクター T 細胞及び/またはセントラルメモリー T 細胞が、前記第 2 の細胞集団から取得されたエフェクター T 細胞及び/またはセントラルメモリー T 細胞と比較して、増加した C D 8 及び C D 2 8 発現を示す、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2】

がんを有する対象を治療するための方法であって、前記方法が ( T I L ) を提供することを含み、

( a ) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から取得された、及び/または受容された第 1 の T I L 集団を提供することと、

( b ) ステップ ( a ) の前記第 1 の T I L 集団から P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び/または T I G I T 陽性 T I L を選択して、P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び/または T I G I T に富む T I L 集団を取得することと、

( c ) 前記 P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び/または T I G I T に富む T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 ( A P C ) を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第 1 の増殖を行って、第 2 の T I L 集団を産生することであって、前記プライミングによる第 1 の増殖が、第 1 のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第 1 の増殖が、約 1 ~ 7、8、9、1 0、または 1 1 日行われ、前記第 2 の T I L 集団を取得する、前記産生することと、

( d ) 前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地に追加の I L - 2、O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を行って、第 3 の T I L 集団を産生することであって、前記急速な第 2 の増殖に追加される A P C の数が、ステップ ( b ) において追加される A P C の数の少なくとも 2 倍であり、前記急速な第 2 の増殖が、約 1 ~ 1 1 日間行われ、前記第 3 の T I L 集団を取得し、前記第 3 の T I L 集団が、治療用 T I L 集団であり、前記急速な第 2 の増殖が、第 2 のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記産生することと、

( e ) ステップ ( c ) から取得された前記治療用 T I L 集団を採取することと、

( f ) ステップ ( d ) からの前記採取された T I L 集団を注入バッグに移すことと、

( g ) 前記対象に投与するために治療上有効な投与量のステップ ( e ) からの前記 T I L を提供することと、を含む、前記方法に使用するための拡張した腫瘍浸潤リンパ球集団。

【請求項 2 3】

( i ) ステップ ( g ) において治療上有効な投与量を投与するのに十分な T I L の数が、約  $2.3 \times 10^{10}$  ~ 約  $13.7 \times 10^{10}$  である、任意で前記 P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び/または T I G I T 陽性 T I L が、P D - 1 高、C D 3 9 高、C D 3 8 低、C D 1 0 3 高/低、C D 1 0 1 低、L A G 3 高、T I M 3 高、及び/または T I G I T 高 T I L である、及び/または

( i i ) ステップ ( b ) の前記選択が、( i ) 前記第 1 の T I L 集団を、P D - 1 の I g V ドメインの外側の N 末端ループによって P D - 1 に結合する過剰のモノクローナル抗 P D - 1 I g G 4 抗体に曝露するステップと、( i i ) フルオロフォアに複合した過剰の抗 I g G 4 抗体を追加するステップと、( i i i ) 前記フルオロフォアに基づいて流動系細胞選別を行って、P D - 1 に富む T I L 集団を取得するステップと、を含む、任意で前記モノクローナル抗 P D - 1 I g G 4 抗体が、ニボルマブ、またはそのパリアント、

10

20

30

40

50

断片、もしくは複合体である、任意で前記抗 I g G 4 抗体が、クローン抗ヒト I g G 4、クローン H P 6 0 2 3 である、任意で前記抗原提示細胞 ( A P C ) が、 P B M C である、及び/または

( i i i ) ステップ ( g ) において治療上有効な投与量の T I L 細胞を投与する前に、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが前記対象に投与されている、任意で前記骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを  $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で 2 日間投与し、続いてフルダラピンを  $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$  の用量で 5 日間投与するステップを含む、及び/または

( i v ) 前記方法が、ステップ ( g ) における前記対象への前記 T I L 細胞の投与の翌日に開始する高用量 I L - 2 レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、任意

10

投与される  $600,000$  または  $720,000 \text{ IU} / \text{kg}$  を含む、請求項 22 に記載の方法における使用のための拡張した腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 集団。

【請求項 24】

( i ) 前記対象が、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 ( N S C L C )、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌 ( 頭頸部扁平上皮癌 ( H N S C C ) を含む )、神経膠芽細胞腫 ( G B M を含む )、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択されるがんを有する、任意で前記がんが、黒色腫、H N S C C、子宮頸癌、N S C L C、膠芽腫 ( G B M を含む )、及び胃腸癌からなる群から選択される、任意で前記がんが、高頻度変異癌である、任意で前記がんが、小児高頻度変異癌である、及び/または

20

( i i ) 前記プライミングによる第 1 の増殖が、第 1 の容器内で行われ、前記急速な第 2 の増殖が、第 2 の容器内で行われ、前記第 1 及び第 2 の容器の各々が、G R E X - 1 0、G R E X - 1 0 0 または G R E X - 5 0 0 である、及び/または

( i i i ) 前記対象が、以前に抗 P D - 1 抗体で治療されている、または前記対象が、以前に抗 P D - 1 抗体で治療されていない、及び/または

( i v ) 前記プライミングによる第 1 の増殖ステップが、第 1 の T I L 集団を抗 P D - 1 抗体と接触させて、前記第 1 の T I L 集団において前記抗 P D - 1 抗体と T I L 細胞との第 1 の複合体を形成し、次いで、前記第 1 の複合体を単離して、P D - 1 陽性 T I L について選択または濃縮される前記第 1 の T I L 集団を取得することによって、P D - 1 陽性 T I L について選択または濃縮される前記第 1 の T I L 集団に対して行われる、任意で前記抗 P D - 1 抗体が、

30

( a ) F c 領域を含み、前記第 1 の複合体を形成するステップの後に、かつ前記第 1 の複合体を単離するステップの前に、前記方法が、前記第 1 の複合体を前記抗 P D - 1 抗体の前記 F c 領域に結合する抗 F c 抗体と接触させて、前記抗 F c 抗体と前記第 1 の複合体との第 2 の複合体を形成するステップをさらに含み、前記第 1 の複合体を単離するステップが、前記第 2 の複合体を単離することにより行われる、または

( b ) E H 1 2 . 2 H 7、P D 1 . 3 . 1、S Y M 0 2 1、M 1 H 4、A 1 7 1 8 8 B、ニボルマブ ( B M S - 9 3 6 5 5 8、B r i s t o l - M y e r s S q u i b b ; O p d i v o ( 登録商標 ) )、ペムプロリズマブ ( ラムプロリズマブ、M K 0 3 4 7 5 または M K - 3 4 7 5、M e r c k ; K e y t r u d a ( 登録商標 ) )、H 1 2 . 1、P D 1 . 3 . 1、N A T 1 0 5、ヒト化抗 P D - 1 抗体 J S 0 0 1 ( S h a n g H a i J u n S h i )、モノクローナル抗 P D - 1 抗体 T S R - 0 4 2 ( T e s a r o , I n c . )、ピジリズマブ ( 抗 P D - 1 m A b C T - 0 1 1、M e d i v a t i o n )、抗 P D - 1 モノクローナル抗体 B G B - A 3 1 7 ( B e i G e n e )、及び/または抗 P D - 1 抗体 S H R - 1 2 1 0 ( S h a n g H a i H e n g R u i )、ヒトモノクローナル抗体 R E G N 2 8 1 0 ( R e g e n e r o n )、ヒトモノクローナル抗体 M D X - 1 1 0 6 ( B r i s t o l - M y e r s S q u i b b )、ヒト化抗 P D - 1 I g G 4 抗体 P D R 0 0 1 ( N o v a r t i s )、及び R M P 1 - 1 4 ( ラット I g G ) - B i o X c e l

40

50

1 カタログ番号 B P 0 1 4 6 からなる群から選択される、任意で前記抗 P D - 1 抗体が、E H 1 2 . 2 H 7 である、任意で前記抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブまたはペムブロリズマブとは異なるエピトープに結合する、任意で前記抗 P D - 1 抗体が、E H 1 2 . 2 H 7 またはニボルマブと同じエピトープに結合する、任意で前記抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブである、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法、または請求項 2 2 もしくは 2 3 に記載の使用のための T I L 集団。

【請求項 2 5】

前記対象が、( i ) 以前に第 1 の抗 P D 1 抗体で治療されており、前記プライミングによる第 1 の増殖ステップが、第 1 の T I L 集団を第 2 の抗 P D - 1 抗体と接触させて、前記第 1 の T I L 集団において前記第 2 の抗 P D - 1 抗体と T I L 細胞との第 1 の複合体を形成し、次いで、前記第 1 の複合体を単離して、P D - 1 陽性 T I L について選択または濃縮される前記第 1 の T I L 集団を取得することによって、P D - 1 陽性 T I L について選択または濃縮される前記第 1 の T I L 集団に対して行われ、前記第 2 の抗 P D - 1 抗体が、前記第 1 の T I L 集団で不溶化された前記第 1 の抗 P D - 1 抗体によって、前記第 1 の T I L 集団と結合することから遮断されない、または

( i i ) 以前に第 1 の抗 P D 1 抗体で治療されており、前記プライミングによる第 1 の増殖ステップが、第 1 の T I L 集団を第 2 の抗 P D - 1 抗体と接触させて、前記第 1 の T I L 集団において前記第 2 の抗 P D - 1 抗体と T I L 細胞との第 1 の複合体を形成し、次いで、前記第 1 の複合体を単離し、P D - 1 陽性 T I L について選択または濃縮される前記第 1 の T I L 集団を取得することによって、P D - 1 陽性 T I L について選択または濃縮される前記第 1 の T I L 集団に対して行われ、前記第 2 の抗 P D - 1 抗体が、前記第 1 の T I L 集団で不溶化された前記第 1 の抗 P D - 1 抗体によって、前記第 1 の T I L 集団と結合することから遮断される、

任意で前記第 1 の抗 P D - 1 抗体及び前記第 2 の抗 P D - 1 抗体が、F c 領域を含み、前記第 1 の複合体を形成するステップの後に、かつ前記第 1 の複合体を単離するステップの前に、前記方法が、前記第 1 の複合体を前記第 1 の抗 P D - 1 抗体の前記 F c 領域及び前記第 2 の抗 P D - 1 抗体の前記 F c 領域に結合する抗 F c 抗体と接触させて、前記抗 F c 抗体と前記第 1 の複合体との第 2 の複合体を形成するステップをさらに含み、前記第 1 の複合体を単離するステップが、前記第 2 の複合体を単離することにより行われる、及び/または前記対象が、以前に第 1 の抗 P D 1 抗体で治療されており、前記プライミングによる第 1 の増殖ステップが、( i ) 第 1 の T I L 集団を第 2 の抗 P D - 1 抗体と接触させて、前記第 2 の抗 P D - 1 抗体と前記第 1 の T I L 集団との第 1 の複合体を形成することであって、前記第 2 の抗 P D - 1 抗体が、前記第 1 の T I L 集団で不溶化された前記第 1 の抗 P D - 1 抗体によって、前記 P D - 1 陽性 T I L と結合することから遮断され、前記第 1 の抗 P D - 1 抗体及び前記第 2 の抗 P D - 1 抗体が、F c 領域を含む、前記形成することと、( i i ) 前記第 1 の複合体を前記第 2 の抗 P D - 1 抗体の前記 F c 領域と結合する抗 F c 抗体と接触させ、前記抗 F c 抗体と前記第 1 の複合体との第 2 の複合体を形成し、前記第 1 の T I L 集団で不溶化された前記第 1 の抗 P D - 1 抗体を前記抗 F c 抗体と接触させ、前記抗 F c 抗体と前記第 1 の T I L 集団で不溶化された前記第 1 の抗 P D - 1 抗体との第 3 の複合体を形成することと、( i i i ) 前記第 2 及び第 3 の複合体を分離して、P D - 1 陽性 T I L について選択または濃縮される前記第 1 の T I L 集団を取得することと、によって P D - 1 陽性 T I L について選択または濃縮される前記第 1 の T I L 集団に対して行われる、請求項 2 2 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の使用のための T I L 集団。

【請求項 2 6】

患者から取得された腫瘍組織試料の消化物から選択された P D - 1、L A G 3、T I M 3、及び/または T I G I T 陽性細胞から調製された治療用腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) 集団であって、前記治療用 T I L 集団が、増加した有効性及び/または増加したインターフェロンガンマ産生を提供する、任意で前記治療用 T I L 集団が、増加したインターフェロンガンマ産生を提供する、及び/または前記治療用 T I L 集団が、増加した有効性を提供する、任意で前記治療用 T I L 集団が、1 6 日より長いプロセスによって調製された T

I Lと比較して、少なくとも1倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である、及び/または前記治療用T I L集団が、16～22日より長いプロセスによって調製されたT I Lと比較して、少なくとも1倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である、前記治療用T I L集団。

【請求項27】

(i) 前記プライミングによる第1の増殖ステップが、少なくとも11.27%～74.4%のPD-1陽性T I Lを伴うPD-1、LAG3、TIM3、及び/またはT I G I T陽性T I Lについて選択または濃縮される第1のT I L集団に対して行われる、及び/または

(i i) 前記プライミングによる第1の増殖ステップが、

(a) 前記第1のT I L集団及びP B M C集団を、PD-1のI g Vドメインの外側のN末端ループによってPD-1に結合する過剰のモノクローナル抗PD-1 I g G 4抗体に曝露するステップと、

(b) フルオロフォアに複合した過剰の抗I g G 4抗体を追加するステップと、

(c) 蛍光活性化細胞選別法(F A C S)により行われた場合の前記P B M C集団の強度と比較した前記第1のT I L集団中の前記PD-1陽性T I Lの前記フルオロフォアの強度に基づいて、PD-1陽性T I Lについて選択または濃縮される前記第1のT I L集団を取得するステップと、によってPD-1陽性T I Lについて選択または濃縮される第1のT I L集団に対して行われる、

任家前記第1のT I L集団及び前記P B M C集団の両方における前記フルオロフォアの強度を使用して、それぞれPD-1陰性T I L、PD-1中間T I L、及びPD-1陽性T I Lに対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するためのF A C Sゲートを設定する、任意で前記F A C Sゲートが、ステップ(a)の後に設定される、

(i i i) 前記PD-1、LAG3、TIM3、及び/またはT I G I T陽性T I Lが、PD-1高、LAG3高、TIM3高、及び/またはT I G I T高T I Lである、及び/または

(i v) PD-1陽性T I Lについて選択または濃縮される前記第1のT I L集団の少なくとも80%が、PD-1陽性T I Lであり、LAG3陽性T I Lについて選択または濃縮される前記第1のT I L集団の少なくとも80%が、LAG3陽性T I Lであり、TIM3陽性T I Lについて選択または濃縮される前記第1のT I L集団の少なくとも80%が、TIM3陽性T I Lであり、及び/またはT I G I T陽性T I Lについて選択または濃縮される前記第1のT I L集団の少なくとも80%が、T I G I T陽性T I Lである、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法、または請求項22～26のいずれか1項に記載の使用のためのT I L集団。

【請求項28】

(i) 前記T I Lが、PD-1陽性(PD-1+)、LAG3陽性(LAG3+陽性)、CD38陽性(CD38+)、及びCD101陽性(CD101+)として選択される、または前記T I Lが、PD-1高、LAG3高、CD38低、及びCD101低として選択される、または前記T I Lが、PD-1陽性(PD-1+)、LAG3陽性(LAG3+陽性)、及びCD38陽性(CD38+)として選択される、または前記T I Lが、PD-1高、LAG3高、及びCD38低として選択される、または前記T I Lが、PD-1陽性(PD-1+)、LAG3陽性(LAG3+陽性)、及びCD101陽性(CD101+)として選択される、または前記T I Lが、PD-1高、LAG3高、及びCD101低として選択される、または前記T I Lが、PD-1陽性(PD-1+)、及びCD38陽性(CD38+)として選択される、または前記T I Lが、PD-1高、及びCD38低として選択される、または前記T I Lが、PD-1陽性(PD-1+)、及びCD101陽性(CD101+)として選択される、または前記T I Lが、PD-1高、及びCD101低として選択される、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法、または請求項22～26のいずれか1項に記載の使用のためのT I L集団。

【請求項29】

10

20

30

40

50

( i ) 前記選択が、フローサイトメトリー（例えば、F A C Sを含む）、抗体系ビーズ選択、及び抗体系磁気ビーズ選択からなる群から選択される選択方法を含む、及び/または

( i i ) 前記選択が、2ステップ選択を含み、

( a ) P D - 1 +、L A G 3 +、T I M 3 +、及び/またはT I G I T +を選択する方法を含む第1の選択ステップと、

( b ) C D 3 8 +及び/またはC D 1 0 1 +を選択する方法を含む第2の選択ステップと、を含む、

任意で前記第1の選択ステップが、P D - 1高、L A G 3高、T I M 3高、及び/またはT I G I T高を選択する方法を含む、または前記第1の選択ステップが、P D - 1高またはL A G 3高を選択する方法を含む、任意で前記第2の選択ステップが、C D 3 8低及び/またはC D 1 0 1低を選択する方法を含む、及び/または前記第1の選択ステップが、フローサイトメトリー（例えば、F A C Sを含む）を含み、前記第2の選択ステップが、フローサイトメトリー（例えば、F A C Sを含む）を含み、または前記第1の選択ステップが、抗体系ビーズ選択を含み、前記第2の選択ステップが、フローサイトメトリー（例えば、F A C Sを含む）を含み、または前記第1の選択ステップが、抗体系磁気ビーズ選択を含み、前記第2の選択ステップが、フローサイトメトリー（例えば、F A C Sを含む）を含み、または前記第1の選択ステップが、抗体系ビーズ選択または抗体系磁気ビーズ選択を含み、前記第2の選択ステップが、抗体系ビーズ選択または抗体系磁気ビーズ選択を含む、請求項1～21のいずれか1項に記載の方法。

10

20

#### 【請求項30】

( i ) P D - 1 +、L A G 3 +、T I M 3 +、及び/またはT I G I T + T I Lの前記抗体系ビーズ選択に使用されるビーズが、それぞれ、抗P D - 1、抗L A G 3、抗T I M 3及び/または抗T I G I T抗体複合ビーズである、及び/または

( i i ) C D 3 8 +またはC D 1 0 1 + T I Lの前記抗体系ビーズ選択に使用されるビーズが、それぞれ、抗C D 3 8または抗C D 1 0 1抗体複合ビーズである、及び/または

( i i i ) P D - 1 +、L A G 3 +、T I M 3 +、及び/またはT I G I T + T I Lの前記抗体系磁気ビーズ選択に使用されるビーズが、それぞれ、抗P D - 1、抗L A G 3、抗T I M 3及び/または抗T I G I T抗体複合磁気ビーズである、及び/または

( i v ) C D 3 8 +またはC D 1 0 1 + T I Lの前記抗体系磁気ビーズ選択に使用されるビーズが、それぞれ、抗C D 3 8または抗C D 1 0 1抗体複合磁気ビーズである、及び/または

30

( v ) 前記P D - 1 +、L A G 3 +、T I M 3 +、及びT I G I T + T I Lが、それぞれ、抗P D - 1、抗L A G 3、抗T I M 3、及び/または抗T I G I T抗体複合ビーズと結合し、前記P D - 1、L A G 3、T I M 3、及び/またはT I G I T陰性T I Lが、それぞれ、前記抗P D - 1、抗L A G 3、抗T I M 3、及び/または抗T I G I T抗体複合ビーズと結合しない、請求項29に記載の方法。

#### 【請求項31】

前記プライミングによる第1の増殖ステップが、患者または対象から取得された腫瘍試料の消化物から選択または濃縮される第1のT I L集団に対して行われる、任意で前記消化物が、酵素の混合物を用いて行われる、任意で前記酵素の混合物が、中性プロテアーゼ、コラゲナーゼ、及びD N a s eを含む、請求項1～21及び29～30のいずれか1項に記載の方法。

40