

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0137075

(43) 공개일자 2024년09월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/0783 (2010.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)

C12N 15/90 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 5/0636 (2023.05)

A61K 39/4611 (2023.05)

(21) 출원번호 10-2024-7028375

(22) 출원일자(국제) 2023년01월27일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2024년08월23일

(86) 국제출원번호 PCT/US2023/061510

(87) 국제공개번호 WO 2023/147515

국제공개일자 2023년08월03일

(30) 우선권주장

63/304,502 2022년01월28일 미국(US)

63/438,764 2023년01월12일 미국(US)

(71) 출원인

주노 세리퓨티크스 인코퍼레이티드

미국 워싱턴 98109 시애틀 스위트 1200 텍스터 애

비뉴 노스 400

(72) 발명자

첸, 켈빈

미국 98109 워싱턴 시애틀 텍스터 애비뉴 노스

400 스위트 1200

림, 친-웨이

미국 98109 워싱턴 시애틀 텍스터 애비뉴 노스

400 스위트 1200

(74) 대리인

양영준, 이귀동

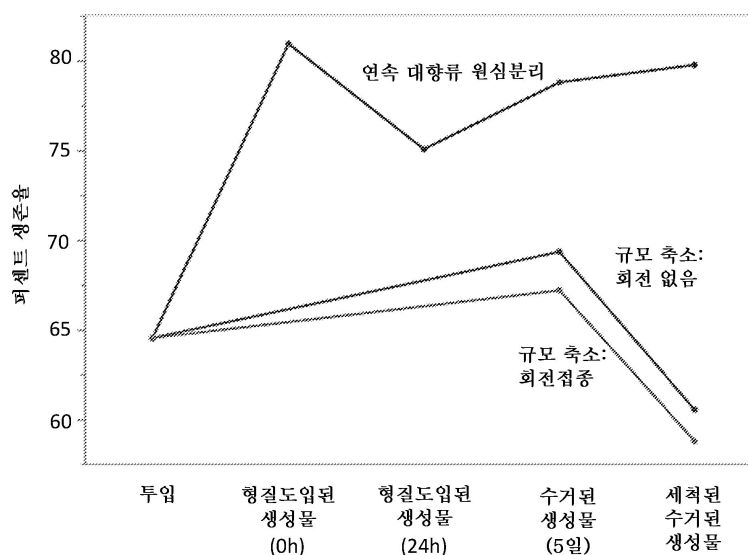
전체 청구항 수 : 총 126 항

(54) 발명의 명칭 세포 조성물의 제조 방법

(57) 요약

재조합 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 세포를 포함하는 T 세포 요법의 생성을 위한 것을 포함하여, 세포 조성물의 제조를 위한 연속 대항류 원심분리 방법이 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 39/4631 (2023.05)
A61K 39/464412 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 15/907 (2013.01)
C12N 2501/2302 (2013.01)
C12N 2501/2307 (2013.01)
C12N 2501/51 (2013.01)
C12N 2501/515 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

유전자 조작된 T 세포의 조성물을 생산하는 방법으로서,

(a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계;

(b) 바이러스 벡터 입자를 원추형 유체 인클로저 내로 로딩하여, 그에 의해 세포 조성물 및 바이러스 벡터 입자를 포함하는 투입 조성물을 생성하는 단계; 및

(c) 투입 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 바이러스 벡터 입자를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 것인 단계

를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 바이러스 벡터 입자의 로딩이 (a)에서의 적용의 적어도 일부 동안 수행되고/거나 (c)에서의 적용의 적어도 일부 동안 수행되는 것인 방법.

청구항 3

유전자 조작된 T 세포의 조성물을 생산하는 방법으로서,

(a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 (i) 바이러스 벡터 입자 및 (ii) T 세포를 포함하는 세포 조성물을 포함하는 투입 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계; 및

(b) 원추형 유체 인클로저 내의 투입 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 바이러스 벡터 입자를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 것인 단계

를 포함하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 세포 조성물 및 바이러스 벡터 입자를 원추형 유체 인클로저 내로 로딩하여, 그에 의해 투입 조성물을 생성하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 세포 조성물의 로딩은 바이러스 벡터 입자의 로딩 전, 로딩 동안 및/또는 로딩 후인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 세포 조성물의 로딩 및/또는 바이러스 벡터 입자의 로딩이 (a)에서의 적용 전 및/또는 그 동안 수행되는 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 원심분리 시스템이 연속 대향류 원심분리 시스템인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 유전자 조작된 T 세포에 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하여 유전자 조작된 T 세포를 포함하는 산출 조성물을 생산하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율이 투입 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 크고, 임의로 적어도 약 5% 더 크거나, 적어도 약 10% 더 크거나, 적어도 약 15% 더 크거나, 적어도 약 20% 더 크거나, 또는 적어도 약 25% 더 큰 것인 방법.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 산출 조성물 중 T 세포의 적어도 또는 적어도 약 5%, 적어도 또는 적어도 약 10%, 적어도 또는 적어도 약 15%, 적어도 또는 적어도 약 20%, 적어도 또는 적어도 약 25%, 또는 적어도 또는 적어도 약 30%가 바이러스 벡터 입자로 형질도입된 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, (i) 제1 원심력이 약 2,000 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제1 유량이 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분이고, 임의로 여기서 제1 원심력 및 제1 유량은 약 15초, 약 30초, 약 45초 또는 약 60초 동안 세포 조성물 또는 투입 조성물에 적용되는 것인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, (i) 제2 원심력이 약 500 G 내지 약 1,500 G이고; (ii) 제2 유량이 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 원심력 (G 단위) 대 제1 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 200 내지 약 400인 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 원심력 (G 단위) 대 제1 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 300인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 원심력이 약 3,000 G이고, 제1 유량이 약 10 mL/분인 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 20 내지 약 100, 약 25 내지 약 85, 또는 약 30 내지 약 65인 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 35인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력이 약 1,000 G이고, 제2 유량이 약 28.5 mL/분인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제10항 및 제12항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, (i) 제2 원심력이 약 500 G 내지 약 1,500 G이고; (ii) 제2 유량이 약 10 mL/분 내지 약 100 mL/분인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제15항 및 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 62.5인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제10항, 제12항 내지 제15항, 제18항 및 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력이 약 625 G이고, 제2 유량이 약 10 mL/분인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제10항, 제12항 내지 제16항 및 제19항 중 어느 한 항에 있어서, (i) 제2 원심력이 약 100 G 내지 약 2,000 G이고; (ii) 제2 유량이 약 10 mL/분 내지 약 100 mL/분인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제15항, 제18항 및 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 30인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제10항, 제12항 내지 제15항, 제21항 및 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력이 약 300 G이고, 제2 유량이 약 10 mL/분인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력 및 제2 유량이 적어도 약 15분, 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 60분, 적어도 약 75분, 또는 적어도 약 90분 동안 투입 조성물에 적용되는 것인 방법.

청구항 25

제7항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, (i) 제3 원심력이 약 2,000 G 내지 약 3,000 G이고; (ii) 제3 유량이 약 15 mL/분 내지 약 25 mL/분인 방법.

청구항 26

제7항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 원심력 (G 단위) 대 제3 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 100 내지 약 150이고, 임의로 제3 원심력 (G 단위) 대 제3 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 125인 방법.

청구항 27

제7항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 원심력이 약 2,500 G이고, 제3 유량이 약 20 mL/분인 방법.

청구항 28

제7항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하기 전에, 유전자 조작된 T 세포를 1회 이상의 세척 단계에 적용하는 것을 포함하며, 임의로 여기서 1회 이상의 세척 단계가 배지 교환을 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 (a)에서의 적용 전에 세포 조성물의 T 세포를 자극 조건 하에 인큐베이션하는 것을 포함하고/거나 (a)에서의 적용 전에 세포 조성물의 T 세포가 자극 조건 하에 인큐베이션되는 것인 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 자극 조건이 TCR 복합체의 1개 이상의 성분의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인 및 1개 이상의 공동자극 분자의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함하는 것인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 자극 시약이 (i) TCR 복합체의 구성원에 특이적으로 결합하는, 임의로 CD3에 특이적으로 결합하는 1차 작용제; 및 (ii) T 세포 공동자극 분자에 특이적으로 결합하는 2차 작용제를 포함하며, 임의로 여기서 공동자극 분자는 CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 및 ICOS로부터 선택된 것인 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 1차 및 2차 작용제 중 적어도 1종이 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 1차 작용제가 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 2차 작용제가 항-CD28 항체 또는 그의 항원-결합 단편인 방법.

청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 1차 작용제 및 2차 작용제가 각각 고체 지지체의 표면 상에 존재하고, 임의로 1차 작용제 및 2차 작용제가 각각 비드, 추가로 임의로 상자성 비드의 표면 상에 존재하는 것인 방법.

청구항 35

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 1차 작용제 및 2차 작용제가 복수의 스트렙타비딘 분자 또는 스트렙타비딘 뮤테인 분자를 포함하는 올리고머 입자 시약의 표면 상에 가역적으로 결합된 것인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 스트렙타비딘 분자 또는 스트렙타비딘 뮤테인 분자가 비오틴 또는 비오틴 유사체에 결합하거나 또는 결합할 수 있는 것인 방법.

청구항 37

제31항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 1차 작용제가 항-CD3 Fab를 포함하고, 2차 작용제가 항-CD28 Fab를 포함하는 것인 방법.

청구항 38

제29항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 자극 조건이 1종 이상의 재조합 시토카인의 존재를 포함하는 것인 방법.

청구항 39

제29항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 자극 조건이 재조합 IL-2, IL-7 및 IL-15 중 1종 이상의 존재를 포함하는 것인 방법.

청구항 40

제7항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 산출 조성물을 수집하는 것을 포함하고/거나 산출 조성물이 수집되는 것인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 방법이 수집된 산출 조성물의 유전자 조작된 T 세포를 인큐베이션하는 것을 포함하고/거나 수집된 산출 조성물의 유전자 조작된 T 세포가 인큐베이션되는 것인 방법.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 수집된 산출 조성물의 유전자 조작된 T 세포가 수집 직후에 적어도 약 1일, 적어도 약 2일, 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 또는 적어도 약 20일 동안 인큐베이션되는 것인 방법.

청구항 43

제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 수집 약 1일 후, 약 2일 후, 약 3일 후, 약 4일 후, 약 5일 후,

청구항 53

제7항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 산출 조성물의 부피가 약 2.5 mL 내지 약 60 mL, 약 5 mL 내지 약 40 mL, 또는 약 10 mL 내지 약 20 mL인 방법.

청구항 54

제7항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 산출 조성물의 부피가 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 약 25 mL, 약 30 mL, 약 35 mL, 약 40 mL, 약 45 mL, 약 50 mL, 약 55 mL, 또는 약 60 mL인 방법.

청구항 55

세포 조성물을 생존 세포에 대해 풍부화하는 방법으로서,

(a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계이며, 여기서 세포 조성물은 생존 및 비-생존 T 세포를 포함하는 것인 단계, 및

(b) 세포 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 세포 조성물의 세포를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 원추형 유체 인클로저로부터 세포 조성물 중 비생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 비생존 T 세포를 갖는 세포 조성물의 폐기물 분획을 분리하고 (elutriating), 원추형 유체 인클로저 내에 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 생존 T 세포를 갖는 풍부화된 조성물을 생산하는 것인 단계

를 포함하는 방법.

청구항 56

제55항에 있어서, (i) 제1 원심력이 약 1,000 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제1 유량이 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분인 방법.

청구항 57

제55항 또는 제56항에 있어서, 제1 원심력 (G 단위) 대 제1 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 200 내지 약 500인 방법.

청구항 58

제55항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 원심력 (G 단위) 대 제1 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 200 내지 약 400인 방법.

청구항 59

제55항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 원심력 및 제1 유량이 적어도 30초 동안 세포 조성물에 적용되는 것인 방법.

청구항 60

제55항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, (i) 제2 원심력이 약 350 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제2 유량이 약 5 mL/분 내지 약 100 mL/분인 방법.

청구항 61

제55항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력이 약 350 G 내지 3,000 G인 방법.

청구항 62

제55항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력이 약 1,500 G 내지 약 3,000 G인 방법.

청구항 63

제55항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력이 약 500 G 내지 약 1,500 G인 방법.

청구항 64

제55항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 유량이 약 65 mL/분 내지 약 100 mL/분인 방법.

청구항 65

제55항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 유량이 약 10 mL/분 내지 약 65 mL/분인 방법.

청구항 66

제55항 내지 제63항 및 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 유량이 약 10 mL/분 내지 약 35 mL/분인 방법.

청구항 67

제55항 내지 제63항, 제65항 및 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 유량이 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분인 방법.

청구항 68

제55항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 30 내지 약 70인 방법.

청구항 69

제55항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 30 내지 약 40인 방법.

청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 약 9 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖는 것인 방법.

청구항 71

제55항 내지 제68항 및 제70항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 약 9 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖고, 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 30 내지 약 70인 방법.

청구항 72

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 9 μm 미만의 평균 직경을 갖는 것인 방법.

청구항 73

제55항 내지 제69항 및 제72항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 9 μm 미만의 평균 직경을 갖고, 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 30 내지 약 40인 방법.

청구항 74

세포 조성물을 생존 세포에 대해 풍부화하는 방법으로서,

(a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계이며, 여기서 세포 조성물은 생존 및 비-생존 T 세포를 포함하고, 여기서 (i) 제1 원심력은 약 2,000 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제1 유량은 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분인 단계; 및

(b) 세포 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 세포 조성물의 세포를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 생존 T 세포를 갖는 풍부화된 조성물을 생성하고, 여기서 (i) 제2 원심력은 약 1,500 G 내지 약 3,000 G이고; (ii) 제2 유량은 약 65 mL/분 내지 약 100 mL/분이고; (iii) 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비는 약 30 내지 약 40인 단계

를 포함하며; 여기서 T 세포는 9 μm 미만의 평균 직경을 갖는 것인 방법.

청구항 75

제1항 내지 제69항 및 제72항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 약 6 μm 내지 약 9 μm 의 평균 직경을 갖는 것인 방법.

청구항 76

제55항 내지 제75항 중 어느 한 항에 있어서, 분리된 폐기물 분획을 수집하는 것을 포함하는 방법.

청구항 77

제76항에 있어서, 분리된 폐기물 분획이 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부와 유체 연통하는 용기에 수집되는 것인 방법.

청구항 78

세포 조성물을 생존 세포에 대해 풍부화하는 방법으로서,

(a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계이며, 여기서 세포 조성물은 생존 및 비-생존 T 세포를 포함하는 것인 단계,

(b) 세포 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 세포 조성물의 세포를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 원추형 유체 인클로저로부터 세포 조성물 중 비생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 비생존 T 세포를 갖는 세포 조성물의 폐기물 분획을 분리하고, 원추형 유체 인클로저 내에 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 생존 T 세포를 갖는 풍부화된 조성물을 생성하는 것인 단계, 및

(c) 단계 (a) 및 (b) 후에 풍부화된 조성물의 세포를 동결보존하여 동결보존된 세포 조성물을 생성하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 79

제78항에 있어서, (d) 단계 (c) 후에 동결보존된 세포 조성물을 해동시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 80

제78항 또는 제79항에 있어서, 제2 유량이 30 mL/분 이하인 방법.

청구항 81

제78항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 유량이 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분인 방법.

청구항 82

세포 조성물을 생존 세포에 대해 풍부화하는 방법으로서,

(a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계이며, 여기서 세포 조성물은 생존 및 비-생존 T 세포를 포함하고, 여기서 (i) 제1 원심력은 약 2,000 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제1 유량은 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분인 단계; 및

(b) 세포 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 세포 조성물의 세포를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 생존 T 세포를 갖는 풍부화된 조성물을 생성하고, 여기서 (i) 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G이고; (ii) 제2 유량은 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분인 단계

를 포함하는 방법.

청구항 83

제82항에 있어서, T 세포가 약 9 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖는 것인 방법.

청구항 84

제82항 또는 제83항에 있어서, 단계 (a) 및 (b)의 적용 후에 풍부화된 조성물의 세포를 동결보존하여, 동결보존된 세포 조성물을 생성하는 것을 포함하는 방법.

청구항 85

제78항 내지 제81항 및 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 동결보존이 세포를 동결보호제를 포함하는 배지 중에 현탁시키고, 세포를 동결시키는 것을 포함하며, 임의로 여기서 동결은 속도 제어 동결기에서 이루어지는 것인 방법.

청구항 86

제78항 내지 제81항, 제84항 및 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 동결보존된 세포 조성물을 해동시키는 것을 추가로 포함하며, 임의로 여기서 해동은 동결보존된 세포 조성물이 적어도 3일 동안 동결된 후에 수행되는 것인 방법.

청구항 87

제78항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력이 약 700 G 내지 약 1,300 G인 방법.

청구항 88

제78항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력이 약 800 G 내지 약 1,200 G인 방법.

청구항 89

제78항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력이 약 900 G 내지 약 1,100 G인 방법.

청구항 90

제78항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력이 약 1,000 G인 방법.

청구항 91

제78항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비가 약 30 내지 약 40인 방법.

청구항 92

제55항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 조성물을 원심분리 시스템 내로 로딩하는 것을 포함하며, 여기서 로딩은 (a)에서의 적용 전 및/또는 (a)에서의 적용의 적어도 일부 동안 수행되는 것인 방법.

청구항 93

제55항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 원심분리 시스템이 연속 대향류 원심분리 시스템인 방법.

청구항 94

제55항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서, (a)에서의 적용 전에, 방법이 세포 조성물의 T 세포를 바이러스 벡터 입자와 접촉시켜, 그에 의해 유전자 조작된 T 세포를 생산하는 것을 포함하고/거나 세포 조성물의 T 세포가 바이러스 벡터 입자와 접촉되어, 그에 의해 유전자 조작된 T 세포가 생산되는 것인 방법.

청구항 95

제55항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율이 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 적어도 약 10% 더 크거나, 적어도 약 20% 더 크거나, 적어도 약 30% 더 크거나, 적어도 약

40% 더 크거나, 적어도 약 50% 더 크거나, 또는 적어도 약 60% 더 큰 것인 방법.

청구항 96

제55항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, (c) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 풍부화된 조성물에 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하여 풍부화된 조성물을 수집하는 단계이며, 여기서 (i) 제3 원심력은 약 2,000 G 내지 약 3,000 G이고; (ii) 제3 유량은 약 15 mL/분 내지 약 25 mL/분인 단계를 포함하는 방법.

청구항 97

제96항에 있어서, 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하기 전에, 풍부화된 조성물을 1회 이상의 세척 단계에 적용하는 것을 포함하며, 임의로 여기서 1회 이상의 세척 단계가 배지 교환을 포함하는 것인 방법.

청구항 98

제28항 내지 제54항 및 제96항 중 어느 한 항에 있어서, 1회 이상의 세척 단계가 제2 원심력 및 제2 유량에서 수행되는 것인 방법.

청구항 99

제1항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 조성물이 활성화된 T 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 100

제55항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 방법이 수집된 풍부화된 조성물을 동결보존하는 것을 포함하고/거나 수집된 풍부화된 조성물이 동결보존되어, 그에 의해 동결보존된 풍부화된 조성물이 생성되는 것인 방법.

청구항 101

제100항에 있어서, 동결보존된 풍부화된 조성물이 해동되어 해동된 풍부화된 조성물이 생산되고, 해동된 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율이 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 크고, 임의로 적어도 약 5% 더 크거나, 적어도 약 10% 더 크거나, 적어도 약 15% 더 크거나, 적어도 약 20% 더 크거나, 적어도 약 25% 더 크거나, 또는 적어도 약 30% 더 큰 것인 방법.

청구항 102

제1항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 방법의 1개 이상의 단계가 자동화되고, 임의로 방법의 1개 이상의 단계가 원심분리 시스템 또는 그의 구성요소에 의해 자동화되는 것인 방법.

청구항 103

제1항 내지 제54항 및 제94항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 벡터 입자가 재조합 분자를 코딩하는 이중 핵산을 포함하는 것인 방법.

청구항 104

제103항에 있어서, 재조합 분자가 케모카인, 케모카인 수용체, 시토카인, 시토카인 수용체, 항원 수용체, 또는 그의 조합인 방법.

청구항 105

제103항 또는 제104항에 있어서, 재조합 분자가 항원 수용체인 방법.

청구항 106

제105항에 있어서, 항원 수용체가 트랜스제닉 T 세포 수용체 (TCR)인 방법.

청구항 107

제105항에 있어서, 항원 수용체가 키메라 항원 수용체 (CAR)인 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 키메라 항원 수용체 (CAR)가 표적 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 항원-인식 도메인 및 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)를 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 109

제108항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 CD3-제타 (CD3 ζ) 3개의 세포내 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 110

제108항 또는 제109항에 있어서, CAR이 세포외 도메인과 세포내 신호전달 도메인을 연결하는 막횡단 도메인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 111

제110항에 있어서, 막횡단 도메인이 CD28의 막횡단 부분을 포함하는 것인 방법.

청구항 112

제108항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 T 세포 공동자극 분자의 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 113

제112항에 있어서, T 세포 공동자극 분자가 CD28 및 4-1BB로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 114

제1항 내지 제54항 및 제94항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 벡터 입자가 레트로바이러스 벡터 입자인 방법.

청구항 115

제114항에 있어서, 레트로바이러스 벡터 입자가 γ -레트로바이러스 벡터인 방법.

청구항 116

제114항에 있어서, 레트로바이러스 벡터 입자가 렌티바이러스 벡터 입자인 방법.

청구항 117

제105항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서, 항원 수용체가 질환 또는 상태와 연관된 항원에 특이적으로 결합하는 것인 방법.

청구항 118

제117항에 있어서, 질환 또는 상태가 암, 자가면역 질환 또는 장애, 및/또는 감염성 질환인 방법.

청구항 119

제117항 또는 제118항에 있어서, 질환 또는 상태가 암인 방법.

청구항 120

제1항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, T 세포가 임의로 인간 대상체로부터의 1차 T 세포인 방법.

청구항 121

제1항 내지 제120항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 유전자 조작된 T 세포를 포함하는 조성물.

청구항 122

제121항에 있어서, 약 1.0×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 2.0×10^9 개의 CAR-발현 T 세포를 포함하는 조성물.

청구항 123

제121항 또는 제122항에 있어서, 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 124

제121항 또는 제122항에 있어서, 동결보호제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 125

질환 또는 장애를 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 제121항 내지 제123항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 126

제125항에 있어서, 유전자 조작된 T 세포가 질환 또는 장애와 연관된 항원에 특이적으로 결합하는 항원 수용체를 발현하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2022년 1월 28일에 출원된 미국 가출원 번호 63/304,502 및 2023년 1월 12일에 출원된 미국 가출원 번호 63/438,764에 대한 우선권을 주장하며, 이들 각각의 내용은 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록의 참조 포함

[0004] 본 출원은 전자 포맷의 서열 목록과 함께 출원된다. 서열 목록은 2023년 1월 23일에 생성되고 크기가 35,102 바이트인, 파일명 735042021040SeqList.xml로서 제공된다. 전자 포맷의 서열 목록의 정보는 그 전문이 참조로 포함된다.

[0005] 분야

[0006] 본 개시내용은 일부 측면에서, 조작된 세포 조성물을 비롯한 세포 조성물의 프로세싱 및 제조에서의 연속 대향류 원심분리(continuous counterflow centrifugation) 방법에 관한 것이다. 일부 측면에서, 연속 대향류 원심분리 방법은 세포 조성물을 생존 세포, 예컨대 생존 T 세포에 대해 풍부화한다. 또한, 생성된 세포 조성물, 예컨대 항원 수용체를 발현하도록 유전자 조작된 T 세포를 포함하는 것이 제공된다. 일부 측면에서, 세포 조성물, 예컨대 림프구 집단을 포함하는 조성물의 형질도입은 연속 대향류 원심분리에 의해 수행된다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 림프구 및 바이러스 벡터 입자의 연속 대향류 원심분리를 수반하는 세포 집단의 형질도입을 위한 방법을 제공하며, 그에 의해 형질도입된 세포를 함유하는 조성물이 생산된다. 일부 실시양태에서, 제공된 세포 및 조성물은 입양 세포 요법 방법에 사용될 수 있다.

배경 기술

[0007] 입양 세포 면역요법 또는 암 요법에 사용하기 위한 항원-특이적 T 세포를 시험관내 풍부화 및 형질도입하는 것을 포함하여, T 세포 집단을 시험관내 풍부화 및/또는 형질도입하기 위한 다양한 전략이 이용가능하다. 대규모 연구, 진단 및 치료 목적을 위한 것을 포함하여, 세포 집단을 시험관내 풍부화 및/또는 형질도입하기 위한 개선된 전략이 필요하다. 이러한 필요를 충족시키는 방법 및 관련 조성물이 제공된다.

발명의 내용

[0008] (a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계; (b) 바이러스 벡터 입자를 원추형 유체 인클로저 내로 로딩하여, 그에 의해 세포 조성물 및 바이러스 벡터 입자를 포함하는 투입 조성물을 생성하는 단계; 및 (c) 투입 조성물에

제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 바이러스 벡터 입자를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 것인 단계를 포함하는, 유전자 조작된 T 세포의 조성물을 생산하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 원심분리 시스템은 연속 대향류 원심분리 시스템이다.

[0009] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자의 로딩은 (a)에서의 적용의 적어도 일부 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자의 로딩은 (c)에서의 적용의 적어도 일부 동안 수행된다.

[0010] 또한, (a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 (i) 바이러스 벡터 입자 및 (ii) T 세포를 포함하는 세포 조성물을 포함하는 투입 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계; 및 (b) 원추형 유체 인클로저 내의 투입 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 바이러스 벡터 입자를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 것인 단계를 포함하는, 유전자 조작된 T 세포의 조성물을 생산하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 원심분리 시스템은 연속 대향류 원심분리 시스템이다.

[0011] 일부 실시양태에서, 방법은 세포 조성물 및 바이러스 벡터 입자를 원추형 유체 인클로저 내로 로딩하여, 그에 의해 투입 조성물을 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 로딩은 바이러스 벡터 입자의 로딩 전, 로딩 동안 및/또는 로딩 후이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 로딩은 바이러스 벡터 입자의 로딩 전이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 로딩은 바이러스 벡터 입자의 로딩 동안이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 로딩은 바이러스 벡터 입자의 로딩 후이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 로딩 및/또는 바이러스 벡터 입자의 로딩은 (a)에서의 적용 전 및/또는 그 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 로딩은 (a)에서의 적용 전 및/또는 그 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 로딩은 (a)에서의 적용 전에 수행된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 로딩은 (a)에서의 적용 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 로딩은 (a)에서의 적용 전 및 그 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자의 로딩은 (a)에서의 적용 전에 수행된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자의 로딩은 (a)에서의 적용 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자의 로딩은 (a)에서의 적용 전 및 그 동안 수행된다.

[0012] 일부 실시양태에서, 방법은 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 유전자 조작된 T 세포에 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하여 유전자 조작된 T 세포를 포함하는 산출 조성물을 생산하는 것을 포함한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 적어도 약 5% 더 크거나, 적어도 약 10% 더 크거나, 적어도 약 15% 더 크거나, 적어도 약 20% 더 크거나, 또는 적어도 약 25% 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 5% 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 10% 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 15% 더 크다.

[0014] 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 T 세포의 적어도 또는 적어도 약 5%, 적어도 또는 적어도 약 10%, 적어도 또는 적어도 약 15%, 적어도 또는 적어도 약 20%, 적어도 또는 적어도 약 25%, 적어도 또는 적어도 약 30%는 바이러스 벡터 입자로 형질도입된다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 T 세포의 적어도 약 20%는 바이러스 벡터 입자로 형질도입된다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 T 세포의 적어도 약 25%는 바이러스 벡터 입자로 형질도입된다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 T 세포의 적어도 약 30%는 바이러스 벡터 입자로 형질도입된다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 T 세포의 적어도 약 35%는 바이러스 벡터 입자로 형질도입된다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 T 세포의 적어도 약 40%는 바이러스 벡터 입자로 형질도입된다.

[0015] 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 2,000 G 내지 약 4,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 15초, 약 30초, 약 45초 또는 약 60초 동안 세포 조성물 또는 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 30초 동안 세포 조성물 또는 투입 조성물에 적용된다.

[0016] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 15분, 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 60분, 적어도 약 75분, 또는 적어도 약 90분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 30분 동안 투입 조성물에 적용된다.

- [0017] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 10 mL/분 내지 약 100 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 15분, 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 60분, 적어도 약 75분, 또는 적어도 약 90분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 30분 동안 투입 조성물에 적용된다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 100 G 내지 약 2,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 10 mL/분 내지 약 100 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 15분, 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 60분, 적어도 약 75분, 또는 적어도 약 90분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 30분 동안 투입 조성물에 적용된다.
- [0019] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 200 내지 약 400이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 300이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 3,000 G이고, 제1 유량은 약 10 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 20 내지 약 100, 약 25 내지 약 85, 또는 약 30 내지 약 65이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 35이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,000 G이고, 제2 유량은 약 28.5 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 62.5이다.
- [0020] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 625 G이고, 제2 유량은 약 10 mL/분이다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 30이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 300 G이고, 제2 유량은 약 10 mL/분이다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,000 G 내지 약 3,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 15 mL/분 내지 약 25 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 100 내지 약 150이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 125이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,500 G이고, 제3 유량은 약 20 mL/분이다.
- [0023] 일부 실시양태에서, 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하기 전에, 방법은 유전자 조작된 T 세포를 1회 이상의 세척 단계에 적용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 세척 단계는 배지 교환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 세척 단계는 제2 원심력 및 제2 유량에서 수행된다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 방법은 (a)에서의 적용 전에 세포 조성물의 T 세포를 자극 조건 하에 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, (a)에서의 적용 전에 세포 조성물의 T 세포는 자극 조건 하에 인큐베이션된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 활성화된 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자극 조건은 TCR 복합체의 1개 이상의 성분의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인 및 1개 이상의 공동자극 분자의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자극 시약은 (i) TCR 복합체의 구성원에 특이적으로 결합하는, 임의로 CD3에 특이적으로 결합하는 1차 작용제; 및 (ii) T 세포 공동자극 분자에 특이적으로 결합하는 2차 작용제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제는 CD3에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 2차 작용제는 CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 및 ICOS로부터 선택된 공동자극 분자에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 2차 작용제는 CD28에 특이적으로 결합한다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 1차 및 2차 작용제 중 적어도 1종은 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제 및 2차 작용제는 각각 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 2차 작용제는 항-CD28 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 2차 작용제는 항-CD28 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제 및 2차 작용제는 각각 고체 지지체의 표면 상에 존재하거나 또는 그에 부착된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 비드이거나 또는 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 표면 부착된 항-CD3 및 항-CD28 항체를 갖는 상자성 비드이다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제 및 2차 작용제는 복수의 스트렙타비딘 분자 또는 스트렙타비딘 mutein 분자를 포함하는 올리고머 입자 시약의 표면 상에 가역적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 스트렙타비딘 분자 또는 스트렙타비딘 mutein 분자는 비오틴, 아비딘, 비오틴 유사체 또는 비오틴 mutein, 아비딘 유사체 또는 아비딘 mutein 및/또는 그의 생물학적 활성 단편에 결합하거나 또는 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제는 항-CD3 Fab를 포함하고, 2차 작용제는 항-CD28 Fab를 포함한다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 자극 조건은 1종 이상의 제조합 시토카인의 존재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자극 조건은 제조합 IL-2, IL-7, 및 IL-15 중 1종 이상의 존재를 포함한다.

- [0027] 일부 실시양태에서, 방법은 산출 조성물을 수집하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물은 수집된다.

[0028] 일부 실시양태에서, 방법은 수집된 산출 조성물의 유전자 조작된 T 세포를 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수집된 산출 조성물의 유전자 조작된 T 세포는 인큐베이션된다. 일부 실시양태에서, 수집된 산출 조성물의 유전자 조작된 T 세포는 수집 직후에 적어도 약 1일, 적어도 약 2일, 적어도 약 3일, 적어도 약 4일, 적어도 약 5일, 적어도 약 6일, 적어도 약 7일, 적어도 약 8일, 적어도 약 9일, 적어도 약 10일, 적어도 약 11일, 적어도 약 12일, 적어도 약 13일, 적어도 약 14일, 적어도 약 15일, 적어도 약 16일, 적어도 약 17일, 적어도 약 18일, 적어도 약 19일, 또는 적어도 약 20일 동안 인큐베이션된다.

[0029] 일부 실시양태에서, 수집 약 1일 후, 약 2일 후, 약 3일 후, 약 4일 후, 약 5일 후, 약 6일 후, 약 7일 후, 약 8일 후, 약 9일 후 또는 약 10일 후에 수집된 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 크다. 일부 실시양태에서, 수집 약 1일 후에 수집된 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 크다. 일부 실시양태에서, 수집 약 5일 후에 수집된 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 크다.

[0030] 일부 실시양태에서, 방법은 수집된 산출 조성물을 동결보존하는 것을 포함하고/거나 수집된 산출 조성물은 동결보존되어, 그에 의해 동결보존된 조성물이 생성된다. 일부 실시양태에서, 방법은 수집된 산출 조성물을 동결보존하여, 그에 의해 동결보존된 조성물을 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수집된 산출 조성물은 동결보존되어, 그에 의해 동결보존된 조성물이 생성된다. 일부 실시양태에서, 동결보존된 조성물은 해동되어 해동된 조성물이 생산되고, 해동된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 크다. 일부 실시양태에서, 해동된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 적어도 약 5% 더 크거나, 적어도 약 10% 더 크거나, 적어도 약 15% 더 크거나, 적어도 약 20% 더 크거나, 적어도 약 25% 더 크거나, 또는 적어도 약 30% 더 크다.

[0031] 일부 실시양태에서, 투입 조성물은 정확히 또는 약 6 마이크로미터 초과, 정확히 또는 약 6 마이크로미터 초과, 정확히 또는 약 7 마이크로미터 초과, 정확히 또는 약 8 마이크로미터 초과, 정확히 또는 약 9 마이크로미터 초과, 정확히 또는 약 10 마이크로미터 초과, 또는 정확히 또는 약 11 마이크로미터 초과의 평균 직경을 갖는 T 세포를 포함한다.

[0032] 일부 실시양태에서, 투입 조성물은 약 1×10^6 개의 총 T 세포 내지 약 2×10^9 개의 총 T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물은 적어도 약 1×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 2×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 3×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 4×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 5×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 6×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 7×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 8×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 9×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 1×10^9 개의 총 T 세포, 적어도 약 1.25×10^9 개의 총 T 세포, 적어도 약 1.50×10^9 개의 총 T 세포, 또는 적어도 약 1.75×10^9 개의 총 T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 5 mL 내지 약 20,000 mL, 약 10 mL 내지 약 2,000 mL, 약 15 mL 내지 약 1,000 mL, 약 20 mL 내지 약 500 mL, 약 25 mL 내지 약 100 mL, 또는 약 30 mL 내지 약 60 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 30 mL 내지 약 60 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 30 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 60 mL이다.

[0033] 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 부피는 약 2.5 mL 내지 약 60 mL, 약 5 mL 내지 약 40 mL, 또는 약 10 mL 내지 약 20 mL이다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 부피는 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 약 25 mL, 약 30 mL, 약 35 mL, 약 40 mL, 약 45 mL, 약 50 mL, 약 55 mL, 또는 약 60 mL이다.

[0034] 일부 실시양태에서, 방법의 1개 이상의 단계는 자동화된다. 일부 실시양태에서, 방법의 1개 이상의 단계는 원심분리 시스템 또는 그의 구성요소에 의해 자동화된다.

[0035] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자는 재조합 분자를 코딩하는 이중 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 재조합 분자는 케모카인, 케모카인 수용체, 시토카인, 시토카인 수용체, 항원 수용체 (예를 들어, CAR 또는 TCR), 또는 그의 조합이다. 일부 실시양태에서, 재조합 분자는 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항원 수용체는 트랜스제닉 T 세포 수용체 (TCR)이다. 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체 (CAR)이다.

- [0036] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체 (CAR)는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 항원-인식 도메인 및 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)를 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타 (CD3 ζ) 체계의 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 세포외 도메인과 세포내 신호전달 도메인을 연결하는 막횡단 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD28의 막횡단 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 T 세포 공동 자극 분자의 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, T 세포 공동자극 분자는 CD28 및 4-1BB로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, CAR은 재조합적으로 발현된다. 일부 실시양태에서, CAR은 벡터로부터 발현된다. 일부 실시양태에서, CAR은 γ -레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터로부터 발현된다. 일부 실시양태에서, CAR은 렌티바이러스 벡터로부터 발현된다.
- [0037] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자는 레트로바이러스 벡터 입자이다. 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터 입자는 γ -레트로바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터 입자는 렌티바이러스 벡터 입자이다.
- [0038] 일부 실시양태에서, 항원 수용체는 질환 또는 상태와 연관된 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 상태는 암, 자가면역 질환 또는 장애, 및/또는 감염성 질환이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 상태는 암이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 임의로 인간 대상체로부터의 1차 T 세포이다.
- [0039] 또한, (a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계이며, 여기서 세포 조성물은 생존 및 비-생존 T 세포를 포함하는 것인 단계, 및 (b) 세포 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 세포 조성물의 세포를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 원추형 유체 인클로저로부터 세포 조성물 중 비생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 비생존 T 세포를 갖는 세포 조성물의 폐기물 분획을 분리하고(elutriating), 원추형 유체 인클로저 내에 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 생존 T 세포를 갖는 풍부화된 조성물을 생산하는 것인 단계를 포함하는, 세포 조성물을 생존 세포에 대해 풍부화하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 원심분리 시스템은 연속 대향류 원심분리 시스템이다.
- [0040] 일부 실시양태에서, (i) 제1 원심력은 약 1,000 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제1 유량은 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분이다.
- [0041] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 (G 단위) 대 제1 유량 (mL/분 단위)의 비는 약 200 내지 약 500이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 (G 단위) 대 제1 유량 (mL/분 단위)의 비는 약 200 내지 약 400이다.
- [0042] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 30초 동안 세포 조성물에 적용된다.
- [0043] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 350 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제2 유량은 약 5 mL/분 내지 약 100 mL/분이다.
- [0044] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 350 G 내지 3,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,500 G 내지 약 3,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G이다.
- [0045] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 65 mL/분 내지 약 100 mL/분이다.
- [0046] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 10 mL/분 내지 약 65 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 10 mL/분 내지 약 35 mL/분이다.
- [0047] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분이다.
- [0048] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비는 약 30 내지 약 70이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비는 약 30 내지 약 40이다.
- [0049] 일부 실시양태에서, T 세포는 약 9 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 9 μ m 미만의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 6 μ m 내지 약 9 μ m의 평균 직경을 갖는다.
- [0050] 일부 실시양태에서, T 세포는 약 9 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 9 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖고, 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비는 약 30 내지 약 70이다.

- [0051] 일부 실시양태에서, T 세포는 약 10 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 12 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 14 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖는다.
- [0052] 일부 실시양태에서, T 세포는 9 μm 미만의 평균 직경을 갖고, 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비는 약 30 내지 약 40이다.
- [0053] 또한, (a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계이며, 여기서 세포 조성물은 생존 및 비-생존 T 세포를 포함하고, 여기서 (i) 제1 원심력은 약 2,000 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제1 유량은 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분인 단계; 및 (b) 세포 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 세포 조성물의 세포를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 생존 T 세포를 갖는 풍부화된 조성물을 생성하고, 여기서 (i) 제2 원심력은 약 1,500 G 내지 약 3,000 G이고; (ii) 제2 유량은 약 65 mL/분 내지 약 100 mL/분이고; (iii) 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비는 약 30 내지 약 40인 단계를 포함하는, 세포 조성물을 생존 세포에 대해 풍부화하는 방법이 본원에 제공되며; 여기서 T 세포는 9 μm 미만의 평균 직경을 갖는다.
- [0054] 일부 실시양태에서, 방법은 분리된 폐기물 분획을 수집하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분리된 폐기물 분획은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부와 유체 연통하는 용기에 수집된다.
- [0055] 또한, (a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계이며, 여기서 세포 조성물은 생존 및 비-생존 T 세포를 포함하는 것인 단계, 및 (b) 세포 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 세포 조성물의 세포를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 원추형 유체 인클로저로부터 세포 조성물 중 비생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 비생존 T 세포를 갖는 세포 조성물의 폐기물 분획을 분리하고, 원추형 유체 인클로저 내에 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 생존 T 세포를 갖는 풍부화된 조성물을 생성하는 것인 단계를 포함하는, 세포 조성물을 생존 세포에 대해 풍부화하는 방법이 본원에 제공되며, 여기서 세포 조성물은 방법의 적용 전에 동결보존 및 해동된 T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 원심분리 시스템은 연속 대향류 원심분리 시스템이다.
- [0056] 또한, (a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계이며, 여기서 세포 조성물은 생존 및 비-생존 T 세포를 포함하는 것인 단계, (b) 세포 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 세포 조성물의 세포를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 원추형 유체 인클로저로부터 세포 조성물 중 비생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 비생존 T 세포를 갖는 세포 조성물의 폐기물 분획을 분리하고, 원추형 유체 인클로저 내에 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 생존 T 세포를 갖는 풍부화된 조성물을 생성하는 것인 단계, 및 (c) 단계 (a) 및 (b) 후에 풍부화된 조성물의 세포를 동결보존하여 동결보존된 세포 조성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 조성물을 생존 세포에 대해 풍부화하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 방법은 (d) 단계 (c) 후에 동결보존된 세포 조성물을 해동시키는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 원심분리 시스템은 연속 대향류 원심분리 시스템이다.
- [0057] 또한, (a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계이며, 여기서 세포 조성물은 생존 및 비-생존 T 세포를 포함하는 것인 단계; 및 (b) 세포 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 세포 조성물의 세포를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 생존 T 세포를 갖는 풍부화된 조성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 조성물을 생존 세포에 대해 풍부화하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 원심분리 시스템은 연속 대향류 원심분리 시스템이다.
- [0058] 일부 실시양태에서, 방법은 분리된 폐기물 분획을 수집하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분리된 폐기물 분획은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부와 유체 연통하는 용기에 수집된다.
- [0059] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 30 mL/분 이하이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분이다.
- [0060] 또한, (a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1

유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계이며, 여기서 세포 조성물은 생존 및 비-생존 T 세포를 포함하고, 여기서 (i) 제1 원심력은 약 2,000 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제1 유량은 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분인 단계; 및 (b) 세포 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 세포 조성물의 세포를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 생존 T 세포를 갖는 풍부화된 조성물을 생성하고, 여기서 (i) 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G이고; (ii) 제2 유량은 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분인 단계를 포함하는, 세포 조성물을 생존 세포에 대해 풍부화하는 방법이 본원에 제공된다.

[0061] 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 방법의 적용 전에 동결보존 및 해동된 T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 동결보존된 세포 조성물을 해동시켜 T 세포를 포함하는 세포 조성물을 생산하는 것을 추가로 포함한다.

[0062] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 700 G 내지 약 1,300 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 800 G 내지 약 1,200 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 900 G 내지 약 1,100 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,000 G이다.

[0063] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 (G 단위) 대 제2 유량 (mL/분 단위)의 비는 약 30 내지 약 40이다.

[0064] 일부 실시양태에서, (i) 제1 원심력은 약 2,000 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제1 유량은 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분이다. 일부 실시양태에서, (i) 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G이고; (ii) 제2 유량은 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포 조성물을 원심분리 시스템 내로 로딩하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 로딩은 (a)에서의 적용 전 및/또는 (a)에서의 적용의 적어도 일부 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 로딩은 (a)에서의 적용 전에 수행된다. 일부 실시양태에서, 로딩은 (a)에서의 적용의 적어도 일부 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 로딩은 (a)에서의 적용 전 및 (a)에서의 적용의 적어도 일부 동안 수행된다.

[0065] 일부 실시양태에서, (a)에서의 적용 전에, 방법은 세포 조성물의 T 세포를 바이러스 벡터 입자와 접촉시켜, 그에 의해 유전자 조작된 T 세포를 생산하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 T 세포는 바이러스 벡터 입자와 접촉되어, 그에 의해 유전자 조작된 T 세포가 생산된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 T 세포는 유전자 조작된 T 세포이다.

[0066] 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 적어도 약 10% 더 크거나, 적어도 약 20% 더 크거나, 적어도 약 30% 더 크거나, 적어도 약 40% 더 크거나, 적어도 약 50% 더 크거나, 또는 적어도 약 60% 더 크다.

[0067] 일부 실시양태에서, 방법은 (c) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 풍부화된 조성물에 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하여 풍부화된 조성물을 수집하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, (i) 제3 원심력은 약 2,000 G 내지 약 3,000 G이고; (ii) 제3 유량은 약 15 mL/분 내지 약 25 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하기 전에, 방법은 풍부화된 조성물을 1회 이상의 세척 단계에 적용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 세척 단계는 배지 교환을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 세척 단계는 제2 원심력 및 제2 유량에서 수행된다.

[0068] 일부 실시양태에서, 수집 약 1일 후, 약 2일 후, 약 3일 후, 약 4일 후, 약 5일 후, 약 6일 후, 약 7일 후, 약 8일 후, 약 9일 후 또는 약 10일 후에 수집된 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 크다. 일부 실시양태에서, 수집 약 1일 후에 수집된 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 크다. 일부 실시양태에서, 수집 약 5일 후에 수집된 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 크다.

[0069] 일부 실시양태에서, 방법은 (a)에서의 적용 전에 세포 조성물의 T 세포를 자극 조건 하에 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, (a)에서의 적용 전에 세포 조성물의 T 세포는 자극 조건 하에 인큐베이션된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 활성화된 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자극 조건은 TCR 복합체의 1개 이상의 성분의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인 및 1개 이상의 공동자극 분자의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자극 시약은 (i) TCR 복합체의 구성원에 특이적으로 결합하는, 임의로 CD3에 특이적으로 결합하는 1차 작용제; 및 (ii) T 세포 공동자극 분자에 특이적으로 결합하는 2차 작용제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제는 CD3에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 2차 작용제는 CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 및 ICOS로부터 선택된 공동자극 분자

에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 2차 작용제는 CD28에 특이적으로 결합한다.

- [0070] 일부 실시양태에서, 1차 및 2차 작용제 중 적어도 1종은 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제 및 2차 작용제는 각각 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 2차 작용제는 항-CD28 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 2차 작용제는 항-CD28 항체 또는 그의 항원-결합 단편이다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제 및 2차 작용제는 각각 고체 지지체의 표면 상에 존재하거나 또는 그에 부착된다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 비드이거나 또는 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고체 지지체는 표면 부착된 항-CD3 및 항-CD28 항체를 갖는 상자성 비드이다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제 및 2차 작용제는 복수의 스트렙타비딘 분자 또는 스트렙타비딘 뮤테인 분자를 포함하는 올리고머 입자 시약의 표면 상에 가역적으로 결합된다. 일부 실시양태에서, 스트렙타비딘 분자 또는 스트렙타비딘 뮤테인 분자는 비오틴, 아비딘, 비오틴 유사체 또는 비오틴 뮤테인, 아비딘 유사체 또는 아비딘 뮤테인 및/또는 그의 생물학적 활성 단편에 결합하거나 또는 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제는 항-CD3 Fab를 포함하고, 2차 작용제는 항-CD28 Fab를 포함한다.
- [0071] 일부 실시양태에서, 자극 조건은 1종 이상의 재조합 시토카인의 존재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자극 조건은 재조합 IL-2, IL-7, 및 IL-15 중 1종 이상의 존재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 활성화된 T 세포를 포함한다.
- [0072] 일부 실시양태에서, 방법은 수집된 풍부화된 조성물을 동결보존하여, 그에 의해 동결보존된 풍부화된 조성물을 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수집된 풍부화된 조성물은 동결보존되어, 그에 의해 동결보존된 풍부화된 조성물이 생성된다. 일부 실시양태에서, 동결보존된 풍부화된 조성물은 해동되어 해동된 풍부화된 조성물이 생산되고, 해동된 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 크다. 일부 실시양태에서, 해동된 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 적어도 약 5% 더 크거나, 적어도 약 10% 더 크거나, 적어도 약 15% 더 크거나, 적어도 약 20% 더 크거나, 적어도 약 25% 더 크거나, 또는 적어도 약 30% 더 크다.
- [0073] 일부 실시양태에서, 방법은 단계 (a) 및 (b)의 적용 후에 풍부화된 조성물의 세포를 동결보존하여, 동결보존된 세포 조성물을 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 동결보존은 세포를 동결보호제를 포함하는 배지 중에 현탁시키고, 세포를 동결시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 동결은 속도 제어 동결기에서 이루어진다.
- [0074] 일부 실시양태에서, 방법은 동결보존된 세포 조성물을 해동시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 해동은 동결보존된 세포 조성물이 적어도 3일 동안 동결된 후에 수행된다.
- [0075] 일부 실시양태에서, 방법의 1개 이상의 단계는 자동화된다. 일부 실시양태에서, 방법의 1개 이상의 단계는 원심분리 시스템 또는 그의 구성요소에 의해 자동화된다.
- [0076] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자는 재조합 분자를 코딩하는 이중 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 재조합 분자는 케모카인, 케모카인 수용체, 시토카인, 시토카인 수용체, 항원 수용체 (예를 들어, CAR 또는 TCR), 또는 그의 조합이다. 일부 실시양태에서, 재조합 분자는 항원 수용체이다. 일부 실시양태에서, 항원 수용체는 트랜스제닉 T 세포 수용체 (TCR)이다. 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체 (CAR)이다.
- [0077] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체 (CAR)는 표적 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 항원-인식 도메인 및 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)를 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타 (CD3 ζ) 외에 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 세포외 도메인과 세포내 신호전달 도메인을 연결하는 막횡단 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD28의 막횡단 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 T 세포 공동 자극 분자의 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, T 세포 공동자극 분자는 CD28 및 4-1BB로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, CAR은 재조합적으로 발현된다. 일부 실시양태에서, CAR은 벡터로부터 발현된다. 일부 실시양태에서, CAR은 γ -레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터로부터 발현된다. 일부 실시양태에서, CAR은 렌티바이러스 벡터로부터 발현된다.
- [0078] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자는 레트로바이러스 벡터 입자이다. 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터 입자는 γ -레트로바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터 입자는 렌티바이러스 벡터 입자이다.

[0079] 일부 실시양태에서, 항원 수용체는 질환 또는 상태와 연관된 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 상태는 암, 자가면역 질환 또는 장애, 및/또는 감염성 질환이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 상태는 암이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 임의로 인간 대상체로부터의 1차 T 세포이다.

[0080] 본원에 제공된 방법 중 임의의 것에 의해 생산된 유전자 조작된 T 세포를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 약 1.0×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 2.0×10^9 개의 CAR-발현 T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 동결보존제를 포함한다.

[0081] 질환 또는 장애를 갖는 대상체를 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 상기 방법은 상기 대상체에게 본원에 제공된 조성물 중 임의의 것을 투여하는 것을 포함한다. 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하기 위한 본원에 제공된 조성물 중 임의의 것의 용도가 본원에 제공된다. 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 본원에 제공된 조성물 중 임의의 것이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 유전자 조작된 세포는 질환 또는 장애와 연관된 항원에 특이적으로 결합하는 항원 수용체를 발현하도록 조작된다.

도면의 간단한 설명

[0082] 도 1a 및 1b는 연속 대항류 원심분리 (실행 1-3)를 통해 투입 세포 조성물을 생존 세포에 대해 풍부화하는 3가지의 상이한 실험의 결과를 보여준다. 도 1a는 투입 조성물, 뿐만 아니라 연속 대항류 원심분리 후의 생성물 및 폐기물 분획의 총 살아있는 세포 및 사멸 세포의 수를 보여준다. 도 1b는 연속 대항류 원심분리에 의한 풍부화 후의 생존 세포의 백분율의 증가를 보여준다.

도 2a 및 2b는 연속 대항류 원심분리-기반 방법 또는 규모-축소 회전접종 방법에 의해 수행된 바이러스 벡터에 의한 형질도입 후의, 형질도입된 생성물 분획에서의 형질도입 효율 및 각각 투입 조성물 및 다양한 생성물 분획에서의 생존 세포의 백분율을 보여준다. 대조군으로서, 규모-축소 방법에 의하였지만 어떠한 원심분리에도 적용되지 않은 ("회전 없음") 바이러스 벡터와 함께 세포를 인큐베이션하였다.

도 3은 연속 대항류 원심분리-기반 방법 또는 규모-축소 회전접종 방법에 의해 수행된 바이러스 벡터에 의한 형질도입 후의, 투입 조성물 및 다양한 생성물 분획에서의 생존 세포의 백분율을 보여준다. 연속 대항류 원심분리-기반 형질도입 방법에 적용된 투입 조성물은 30 mL 또는 60 mL의 총 부피를 포함하였다.

도 4a는 연속 대항류 분리(continuous counterflow elutriation) (CCE)-기반 풍부화 및 완충제 교환 ("세척") 방법 또는 대안적 데드-엔드 원심분리 및 완충제 교환 방법 후, 11명의 상이한 인간 공여자로부터 생성된 투입 조성물 및 세척된 생성물 분획에서의 생존 세포의 백분율을 보여준다.

도 4b는 CCE-기반 방법 또는 대안적 방법을 사용한 세척-전 생성물 ("수거된 생성물"; HP) 분획, 세척된 생성물 (WP) 분획, 제제화된 약물 생성물 (FDP) 분획 및 동결보존된 약물 생성물 (CDP) 분획에서의 생존 세포의 백분율을 보여준다.

도 4c는 세척-전 생성물 (HP) 분획의 생존율 대비, 세척된 생성물 (WP) 분획, 제제화된 약물 생성물 (FDP) 분획, 및 동결보존된 약물 생성물 (CDP) 분획에서의 세포의 생존율을 보여준다.

도 4d는 세척-전 생성물 (HP) 분획, 세척된 생성물 (WP) 분획 및 세척된 폐기물 분획에서의 총 생존 및 비-생존 세포를 보여준다.

도 4e는 다양한 원심력에서의 해동된 동결보존된 약물 생성물 (CDP) 분획 대 세척-전 생성물 (HP) 분획의 생존율 비를 보여준다.

도 4f는 변형된 CCE-기반 방법 또는 대안적 방법을 사용한 최종 생성물 수율을 보여준다.

도 4g는 낮은, 중간, 또는 높은 세포 로드 하에서 변형된 CCE-기반 방법 (Mod CCE) 또는 대안적 (Alt) 방법을 사용한, 해동된 동결보존된 약물 생성물 (CDP) 분획의 평균 생존율을 보여준다.

도 4h, 4i, 및 4j는 보다 낮은 생존율을 나타내는 세척-전 생성물 (HP) 분획을 갖는 공여자 사이 (도 4h) 및 대안적 방법을 사용한 낮은 생존율을 갖는 공여자 사이 (도 4j)를 포함한, 대안적 방법과 비교하여 변형된 CCE-기반 방법에 의해 생산된 CDP의 세포 생존율에서의 예측된 개선을 보여준다.

도 4k는 변형된 CCE-기반 방법의 세척 부피가 증가함에 따른, 유입 배지 중 불순물의 이론상 및 측정된 농도,

및 유출 배지 중 동일한 불순물의 이론상 농도를 보여준다.

도 5a는 투입 조성물, 및 연속 대향류 원심분리 풍부화 방법 후 생성물 및 폐기물 분획에서의 총 및 비-생존 세포의 수를 보여준다. 풍부화 방법의 세척 단계를 62.5 또는 33.3의 원심력 대 유량 비 (G/FR)에서 수행하였다.

도 5b는 투입 조성물, 및 62.5 또는 33.3의 원심력 대 유량 비 (G/FR)에서 수행된 세척 단계 후 세척된 생성물 분획에서의 생존 세포의 백분율을 보여준다.

도 5c는 96시간 동안 자극되었거나 (상부 패널) 또는 활성화 개시 후 15일 동안 배양물 중에서 확장된 (하부 패널), 생존을 풍부화를 위한 투입 조성물에서의 생존 (V) 및 비-생존 (NV) 세포의 크기를 보여준다.

도 6a는 상이한 원심력 및 유량 하에 수행된, 연속 대향류 원심분리-기반 바이러스 벡터에 의한 형질도입 방법 후의 CD3+CAR+ 세포의 백분율을 보여준다. 비교를 위해, CD3+CAR+ 세포의 백분율을 규모-축소 회전접종 형질도입 방법 후에 평가하였다 (도 6b).

도 6c는 3000G 원심력 및 30 mL/분 유량 조건 하에 수행된, 연속 대향류 원심분리-기반 바이러스 벡터에 의한 형질도입 방법 후의 CD3+CAR+ 세포의 백분율을 보여준다. 도 6d는 원심력 및 유량 조건이 인큐베이션 전반에 걸쳐 주기적으로 달라지는 조건 하에 수행된, 연속 대향류 원심분리-기반 바이러스 벡터에 의한 형질도입 방법 후의 CD3+CAR+ 세포의 백분율을 보여준다. 비교를 위해, 규모-축소 회전접종 방법 (693G)을 사용하여 세포를 바이러스 벡터로 형질도입하였다.

도 7a는 백만개의 세포당 1.11 μ L 또는 3.33 μ L의 벡터 입자에 의한, 연속 대향류 원심분리 기반-세포 형질도입 후의 살아있는 CD45+ 세포 중 CD3+CAR+ 세포의 백분율을 보여준다.

도 7b는 백만개의 세포당 6 μ L의 벡터 입자에 의한, 연속 대향류 원심분리 기반-세포 형질도입 후의 CD3+CAR+ 세포의 백분율을 보여준다. 비교를 위해, 규모-축소 회전접종 방법 (693G)을 사용하여 세포를 바이러스 벡터로 형질도입하였다.

도 8a는 연속 대향류 원심분리-기반 형질도입 방법 후의 CD3+CAR+ 세포의 유동 세포측정 분석을 보여주며, 여기서 투입 조성물은 30 mL 또는 60 mL의 총 부피를 포함하였다. 결과를 도 8b에 정량화한다.

도 9a는 연속 대향류 원심분리-기반 형질도입 방법 후의 CD3+CAR+ 세포의 유동 세포측정 분석을 보여주며, 여기서 투입 조성물은 600×10^6 개의 총 세포 또는 200×10^6 개의 총 세포를 포함하였다. 대조군으로서, 15×10^6 개의 총 세포를 규모-축소 회전접종 형질도입 방법에 적용하였다. 결과를 도 9b에 정량화한다.

도 10a는 연속 대향류 원심분리-기반 1차 T 세포의 형질도입 동안 역 원심분리 시스템으로부터 채취한 바이러스 벡터 상청액으로의 형질도입 후의 CAR+ Jurkat 세포의 백분율을 보여준다.

도 10b는 역 원심분리 시스템에서 30분 또는 90분의 연속 대향류 원심분리-기반 형질도입 후의 CD3+CAR+ 1차 T 세포의 백분율을 보여준다.

도 11은 연속 대향류 원심분리-기반 형질도입 방법 동안 연속 대향류 원심분리 시스템에서의 바이러스 벡터 농도 및 분포를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0083] 예컨대 세포 조성물에 포함된 표적 세포, 및 바이러스 벡터 입자를 원심분리에 적용함으로써 세포를 형질도입하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 원심분리 방법은 연속 대향류 분리 (CCE)에 기초한다. 일부 실시양태에서, 방법은 표적 세포가 원심분리기인 인클로저 (예를 들어, 원추형 인클로저)에서 바이러스 벡터 입자에 의해 반복적으로 접촉되는 조건 하에서의 CCE-기반 원심분리에 관한 것이며, 그에 의해 바이러스 벡터로 형질도입된 복수의 표적 세포를 포함하는 조성물이 생성된다. 일부 실시양태에서, 원심분리-기반 형질도입 방법은 또한 생존 표적 세포를 풍부화하거나, 불순물을 제거하거나, 또는 둘 다이다. 또한, 예컨대 제공된 개시 내용에 따른 방법에 의해 생산된, 형질도입된 세포 집단을 함유하는 관련 조성물이 제공된다.

[0084] 또한, 원심분리에 의한 세포, 예컨대 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 형질도입을 수반하는, 바이러스 벡터를 세포 (예를 들어, T 세포) 내로 전달하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 세포, 예컨대 면역 세포 (예를 들어, T 세포), 및 바이러스 벡터 입자, 예컨대 렌티바이러스 벡터를 원심분리에 적용하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 원심분리 방법은 원심분리의 연속 대향류 분리 (CCE) 방법이거나 또는 이에 기초하며, 예컨대 역 원심분리 시스템 (예를 들어, 대향류 원심분리 시스템)에서 수행된다. 일부 실시양태에서,

원심분리 시스템은 WO 2018/204992 및 WO 2019/140491에 기재된 것 중 임의의 것이며, 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 세포, 예컨대 면역 세포 (예를 들어, T 세포), 및 바이러스 벡터 입자, 예컨대 렌티바이러스 벡터를 역 원심분리 시스템 (예를 들어, 대향류 원심분리 시스템)에서의 원심분리에 적용하는 것을 수반하며, 여기서 바이러스 벡터 입자는 시스템을 통해 순환되어 세포와 반복적으로 접촉한다.

[0085] 또한, 원심분리에 의해 세포 조성물, 예컨대 형질도입된 세포 조성물 중 생존 세포를 풍부화하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 T 세포 조성물, 예를 들어 형질도입된 T 세포 조성물이다. 일부 실시양태에서, 원심분리 방법은 CCE 원심분리 방법이거나 또는 그를 기초로 하며, 예컨대 역원심분리 시스템 (예를 들어, 대향류 원심분리 시스템)에서 수행된다. 또한, 예컨대 제공된 개시내용에 따른 방법에 의해 생산된, 생존 세포에 대해 풍부화된 세포 집단을 함유하는 관련 조성물이 제공된다.

[0086] 또한, 원심분리에 의해 세포 조성물, 예를 들어 T 세포 조성물로부터 비드를 제거하는 (탈비드화) 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 원심분리 방법은 CCE 원심분리 방법이거나 또는 그를 기초로 하며, 예컨대 역원심분리 시스템 (예를 들어, 대향류 원심분리 시스템)에서 수행된다. 또한, 예컨대 제공된 개시내용에 따른 방법에 의해 생산된, 탈비드화된 세포 집단을 함유하는 관련 조성물이 제공된다.

[0087] 역 유동 (또한 "대향류"로도 공지됨) 원심분리는 원심 가속 하에 유체 내의 입자의 침강 속도가 지지 배지의 유동에 의해 상쇄되는 기술이다. 그에 의해 입자는 유동층으로서 현탁된다. 역 유동 원심분리는 세포가 배양되어 유동층 상태로 확장될 수 있을 정도로 충분히 완만하다. 세포 응집이 또한 감소될 수 있다. 또한, 이 기술은 상이한 밀도 및 형태 특징으로 인해 살아있는 세포로부터 사멸 세포의 분리를 가능하게 한다. 원심 가속 하에 세포 또는 입자에 방사상 내향으로 유체 유동을 전달하는 것은 대향류 상황을 생성한다. 각각의 입자가 겪는 원심 가속은 회전 중심으로부터 그러한 입자의 방사상 거리에 비례한다. 유동화된 입자의 층을 생성하기 위해서는, 각각의 회전 반경에 대해 상쇄 유량이 조정될 필요가 있다. 제공된 실시양태 중 임의의 것에서, 유량은 연동 펌프에 의해 제공된다. 이는 챔버를, 통상적으로 원추로서 형상화하고, 원추의 팁이 방사상 외향을 향하게 함으로써 달성된다. 반대 유체 유동은 원추 팁을 통해 투입된다. 유체 유동은 상대적으로 높은 속도로 원추의 팁으로 진입하고, 유체 유동의 속도는, 원추의 단면이 증가함으로 인해 방사상 내향으로 진행함에 따라 점진적으로 감소한다. 과거, 문헌 [R. J. Sanderson, K. E. Bird, N. F. Palmer and J. Brenman: "Design Principles for a Counter Flow Centrifugation Cell Separation Chamber" Analytical Biochemistry 71, 615-622 (1976)]에 기록된 바와 같이, 역 유동 원심분리를 위한 챔버 형상 및 특정 원추 기하구조에 대한 조사가 있었다.

[0088] 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 이러한 세포를 재조합 항원 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 트랜스제닉 T 세포 수용체 (TCR)를 코딩하는 이중 분자로 유전자 조작하는 데 사용된다. 생성된 유전자 조작된 세포는 입양 면역요법에 사용될 수 있다. 일부 이러한 실시양태에서, 제공된 방법은 회전접종-기반 형질도입 방법 없이, 입양 요법을 위한 면역 세포, 예컨대 T 세포를 제조하는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 제공된 방법은 세포 조성물, 세포 및 바이러스 벡터 입자 조성물, 및/또는 형질도입된 세포 집단을 생존 세포에 대해 풍부화한다. 일부 측면에서, 생존 세포의 풍부화는 낮은 출발 생존율을 갖는 조성물에서 보다 현저하다. 일부 측면에서, 제공된 방법은 대안적 방법 (예를 들어, 데드-엔드 원심분리 방법)과 비교하여 대등한 최종 세포 수율을 유지시키면서 생존 세포를 풍부화한다.

[0089] 일반적으로, 회전접종-기반 방법을 사용하여 세포, 예컨대 면역 세포 (예를 들어, T 세포)를 바이러스 벡터 입자로 형질도입할 수 있다. 그러나, 이러한 방법은 회전접종-기반 형질도입 방법이 세포 조성물을 생존 세포에 대해 본질적으로 풍부화하지 않기 때문에 적은 수의 생존 세포 및/또는 적은 수의 생존 형질도입된 세포로 인해 불리할 수 있다. 따라서, 기존의 회전접종-기반 방법에 의하면, 하류 사용을 위해, 예를 들어 세포 요법에서의 사용을 위해, 다수의 세포를 생존율을 유지시키면서 형질도입하는 것이 항상 가능하지는 않을 수 있다.

[0090] 또한, 연속 지수 비율로 불순물을 희석하는 연속 대향류 원심분리 시스템에 의하면, 대안적 방법 및 시스템과 비교하여 세포 조성물 중 불순물의 클리어런스가 개선된다. 일부 측면에서, 불순물은 단백질, DNA, 세포 파편, 제조에 사용되는 시약(들), 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0091] 또한, 대안적 원심분리 방법 및 시스템은 반드시 자동화되고/거나 다른 시스템에 통합될 수 없다. 대조적으로, 본원에 제공된 방법의 상이한 단계는 연속 대향류 원심분리 시스템 (예를 들어, CTS 로테아(CTS Rotea)TM 대향류 원심분리 시스템)을 사용하여 자동화될 수 있다. 또한, 이러한 시스템은 상용성이고, 다른 기기 및 시스템과 통합될 수 있다.

- [0092] 제공된 방법은, 예컨대 역 원심분리 시스템 (예를 들어, 예를 들어, CTS 로테아™ 대향류 원심분리 시스템)에서 수행되는 연속 대향류 분리-기반 원심분리 방법이 대상체로부터 수득된 1차 세포의 충분한 형질도입을 달성할 수 있고 세포 조성물을 생존 세포에 대해 풍부화할 수 있다는 관찰에 기초한다.
- [0093] 일부 실시양태에서, 방법은 적어도 특정한 수 또는 백분율의 생존 세포를 달성할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본 방법에 의해 생성된 조성물 중 세포의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 또는 적어도 80%가 생존 세포이다. 일부 실시양태에서, 방법은 투입 조성물보다 더 큰, 예를 들어, 투입 조성물보다 5%, 10%, 15%, 또는 20% 더 큰 백분율의 생존 세포를 갖는 산출 조성물을 생산한다.
- [0094] 일부 이러한 실시양태에서, 생존 세포의 수 또는 백분율은 세포 생존율 또는 그의 결여를 나타내는 마커의 발현 수준을 측정함으로써 모니터링되고/거나 관찰될 수 있다. 예를 들어 세포 표면 단백질과 관련하여, 예컨대 유동 세포측정법 또는 세포 염색 (예를 들어, 면역조직화학)에 의한 세포 사멸 마커, 예컨대 염색질 응축, 아넥신 V, 카스파제, 아이오딘화프로피듐 (PI) 및/또는 포스파티딜세린 (PS)의 검출과 같은, 세포 생존율을 평가하기 위한 다수의 널리 공지된 방법이 사용될 수 있다. 일부 예에서, 발현은 세포에 의해 생산된 분자, 예컨대 락테이트 데히드로게나제 (LDH) 또는 아데노신트립소페이트 (ATP)의 수준의 검출에 의해 측정된다.
- [0095] 일부 실시양태에서, 방법은 T 세포의 집단을 형질도입하는 데 사용될 수 있고, 여기서 집단 내의 T 세포의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 초과는 생존 T 세포, 예컨대 세포 사멸 마커, 예컨대 표면 마커 또는 분비된 분자 또는 다른 마커가 결여된 T 세포이다.
- [0096] 일부 실시양태에서, 방법은 산출 조성물을 생산하고, 여기서 산출 조성물 중 총 세포의 (또는 특정한 표적 세포 유형, 예컨대 T 세포의) 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 또는 적어도 75%는 생존 세포이고/거나 세포 사멸 마커, 예컨대 표면 마커 또는 분비된 분자 또는 다른 마커를 발현하지 않는다.
- [0097] 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 면역 세포, 예를 들어 T 세포의 비교적 높은 생존율을 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 세포 집단, 예를 들어 산출 조성물 내의 세포, 예컨대 T 세포의 적어도 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%가 제공된 방법에 따른 생존 세포이다.
- [0098] 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 T 세포의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% 또는 60% 이하는 비-생존 세포이고/거나, 아넥신 V, 카스파제, 아이오딘화프로피듐 (PI) 및/또는 포스파티딜세린 (PS)으로 이루어진 군으로부터 선택된 표면 마커를 발현하고/거나; 비교적 높은 수준의 LDH 및/또는 비교적 낮은 수준의 ATP를 분비한다. 예를 들어, 일부 측면에서, 투입 조성물 및/또는 산출 조성물의 세포 집단은 적어도 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%가 아넥신 V, 카스파제, 아이오딘화프로피듐 (PI) 및/또는 포스파티딜세린 (PS)에 대해 표면 음성인 것이다.
- [0099] 세포의 생존율을 평가하기 위한 방법 및 기술은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 이러한 마커의 검출을 위한 항체 및 시약은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 용이하게 입수가능하다.
- [0100] 일부 실시양태에서, 방법은 특정 조건 하에 적어도 특정한 형질도입 효율을 달성할 수 있다. 예를 들어, 투입 조성물이 바이러스 및 세포를 세포 1개당 정확히 또는 약 1 감염 단위 (IU) 내지 세포 1개당 10 IU, 예컨대 세포 1개당 적어도 또는 정확히 또는 약 1 감염 단위 (IU), 또는 세포 1개당 적어도 또는 정확히 또는 약 2 IU, 세포 1개당 적어도 또는 정확히 또는 약 5 IU, 또는 세포 1개당 적어도 또는 정확히 또는 약 10 IU의 비로 포함하는 일부 실시양태에서, 방법은 방법에 의해 생성된 조성물 중 세포의 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 또는 적어도 75%가 바이러스 벡터를 포함하는, 예를 들어 바이러스 벡터로 형질도입된 산출 조성물을 생산할 수 있다.
- [0101] 일부 이러한 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자 (예를 들어, 레트로바이러스 벡터)에 의한 세포의 형질도입 효율은 세포, 예컨대 생존 숙주 세포, 예컨대 생존 T 세포, 또는 그의 세포의 집단 내로의 벡터의 형질도입 또는 다른 형태의 전달 후에 바이러스 벡터의 게놈에 함유된 핵산에 의해 코딩된 재조합 분자 또는 단백질, 예컨대 이중 항원 수용체의 발현 수준을 측정함으로써 모니터링되고/거나 관찰될 수 있다. 재조합 분자의 발현 수준을 평가하기 위한 다수의 널리 공지된 방법, 예컨대 친화도-기반 방법, 예를 들어 면역친화도-기반 방법에 의한, 예를 들어 세포 표면 단백질과 관련하여 예컨대 유동 세포측정법에 의한 검출이 사용될 수 있다. 일부 예에서,

발현은 형질도입 마커 및/또는 리포터 구축물의 검출에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 말단절단된 표면 단백질을 코딩하는 핵산이 벡터 내에 포함되고, 그의 발현 및/또는 증진의 마커로서 사용된다.

[0102] 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 세포를 바이러스 입자와 함께 인큐베이션, 예를 들어 형질도입하기 전 또는 후에 동결보존 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 세포를 바이러스 입자와 함께 인큐베이션, 예를 들어 형질도입한 후에 동결보존 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 단계는 프로세스에서 중단 단계를 제공할 수 있어서, 물질의 수송, 물질의 샘플링, 또는 환자의 상태에 따라 요법을 '유보하는 것'을 가능하게 한다. 일부 실시양태에서, 제공된 방법에 의해 달성된 세포 생존율의 풍부화는 동결보존된 약물 생성물 또는 이전에 동결보존되었다가 해동된 약물 생성물에서 유지된다. 일부 실시양태에서, 제공된 방법에 의해 달성된 세포 생존율의 풍부화는 동결보존된 약물 생성물에서 유지된다. 일부 실시양태에서, 제공된 방법에 의해 달성된 세포 생존율의 풍부화는 이전에 동결보존되었다가 해동된 약물 생성물에서 유지된다.

[0103] 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 예를 들어 입양 세포 요법에서의 임상 용도를 위한 세포의 제조에서 하나, 그 초과 또는 모든 단계가 세포를 비-멸균 조건에 노출시키지 않고 멸균실 또는 캐비닛을 사용할 필요 없이 수행되도록 수행된다. 이러한 프로세스의 일부 실시양태에서, 세포는 모두 폐쇄 시스템 내에서 생존율에 대해 풍부화되고/거나 형질도입된다. 일부 실시양태에서, 폐쇄 시스템은 역 원심분리 시스템의 원추형 인클로저이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법 또는 그의 임의의 부분은 자동화 방식으로 수행된다. 일부 실시양태에서, 전체 방법은 자동화 방식으로 수행된다.

[0104] 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 회전접종의 부재 하에 세포를 형질도입하고/거나 세포 생존에 대해 풍부화하여 하류 프로세싱 및 생성물을 개선시키는 최적화된 또는 개선된 과정을 제공한다. 일부 측면에서, 제공된 방법은 또한 보다 양호하거나 보다 바람직한 표현형을 갖는, 대상체에게 투여하기 위한 형질도입된 세포, 예를 들어 보다 나은 생존 세포를 생산할 수 있다.

[0105] 일부 실시양태에서, 방법에 의해 생산된 이러한 세포, 또는 이러한 세포를 포함하는 조성물은 질환 또는 상태를 치료하기 위해 대상체에게 투여된다.

[0106] 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 대상체에게 준최적 용량의 세포를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포의 용량은 질환 또는 상태를 치료하기 위한 세포의 치료 유효 용량보다 정확히 또는 약 1.5-배, 2-배, 3-배, 4-배, 5-배 또는 10-배 미만 또는 그 미만이다. 이러한 예에서, 치료 유효량의 세포를 생성하기 위한 세포의 확장은 대상체에게의 세포의 투여 시 생체내에서 이루어질 수 있다.

[0107] 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 세포의 생체내 확장을 포함한다. 일부 측면에서, 세포의 생체내 확장은 투여된 세포의 트랜스진-특이적 활성화 또는 자극에 의해 생체내에서 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원 수용체 (예를 들어, CAR)는 항원의 인식 시 자극되고, 예컨대 활성화 또는 확장된다. 일부 실시양태에서, 대상체에서 생체내 세포의 자극, 활성화 또는 확장을 부스팅, 증대 또는 증가시키기 위해 1종 이상의 작용제가 대상체에게 투여된다.

[0108] 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 대상체에게 투여되는 경우에 증가된 지속성 및/또는 확장을 나타내는 유전자 조작된 T 세포를 생산한다. 일부 실시양태에서, 증가된 지속성 및/또는 확장을 갖는 유전자 조작된 세포는 그것이 투여되는 대상체에서 보다 우수한 효력을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 제공된 바이러스 벡터 입자 및 방법은, 예를 들어 대상체에게 투여하기 전에 T 세포의 생체의 조작을 최소화 및/또는 감소시킴으로써, 입양 면역요법 방법에서 치료 결과의 가변성을 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 형질도입 전에 또는 형질도입과 공동으로 생존 T 세포를 풍부화하는 것은 생체의 조작에 필요한 시간 및 시약을 감소시킴으로써 입양 면역요법을 위한 유전자 조작된 T-세포를 생산 또는 제조하는 프로세스를 개선시킨다. 일부 실시양태에서, 형질도입되거나 조작된 세포의 선택은 유전자 조작 후에 수행된다.

[0109] 또한 제공된 실시양태 중에는 본원에 제공된 방법 중 임의의 것에 의해 생산된 유전자 조작된 세포, 예컨대 재조합 항원 수용체 (예를 들어, TCR 또는 CAR)를 발현하는 세포, 및 입양 면역요법을 위한 이러한 유전자 조작된 세포의 방법 및 용도가 있다.

[0110] 본 출원에서 언급된 특허 문헌, 과학 논문 및 데이터베이스를 포함한 모든 간행물은 각각의 개별 간행물이 개별적으로 참조로 포함된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다. 본원에 제시된 정의가 본원에 참조로 포함된 특허, 출원, 공개된 출원 및 다른 공개에 제시된 정의와 상반되거나 또는 달리 모순되는 경우에, 본원에 제시된 정의가 본원에 참조로 포함된 정의보다 우선한다.

[0111] 본원에 사용된 섹션 표제는 단지 조직화 목적을 위한 것이며, 기재된 대상을 제한하는 것으로 해석되어서는 안

된다.

[0112] I. 세포를 형질도입하는 방법

[0113] 원심분리 시스템에서 유전자 조작된 T 세포의 조성물을 생산하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 방법은 원심분리 시스템에서 세포 조성물을 포함하는 투입 조성물을 바이러스 벡터 입자로 형질도입하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 원심분리 시스템은 역 원심분리 시스템으로도 공지된 연속 대향류 분리 ("CCE") 원심분리 시스템이다. 일부 실시양태에서, 생산된 세포는 세포 요법에 사용하기 위한 것이며, 예컨대 자가 또는 동종 전달을 위해 제조된 1차 세포는 예를 들어 입양 세포 요법에 사용하기 위한 것이다. 방법은 추가의 세포 프로세싱 단계, 예컨대 세포 세척, 단리, 분리, 수집, 제제화, 또는 세포 조성물의 생산과 관련된 다른 단계를 포함할 수 있다.

[0114] 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 바이러스 벡터 입자, 예컨대 레트로바이러스 벡터 입자를 세포, 예컨대 T 세포 내로 도입하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자는 항원 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 트랜스제닉 T 세포 수용체 (TCR)를 코딩하는 이중 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 세포, 예컨대 T 세포에서 유전자 조작된 항원 수용체, 예컨대 트랜스제닉 TCR 또는 CAR을 발현시키는 데 사용될 수 있다. 또한, 이러한 입자에 의해 형질도입된 세포, 및 이러한 세포를 함유하는 방법 및 조성물, 및 그의 사용 방법이 제공된다.

[0115] 일부 실시양태에서, 방법은 입양 면역요법에 사용하기에 바람직한, 형질도입된 세포 및/또는 그의 특정 집단 또는 하위집단의 증가된 생존율을 발생시키는 특색을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 생존 유전자 조작된 세포를 포함하여, 생존 세포를 풍부화한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 제공된 방법으로부터 생성된 세포의 조성물은 형질도입 전과 비교하여 형질도입 후에 증가된 생존율을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 생존율은 형질도입 직후에 관찰되고/거나 형질도입 후 소정의 지속기간 (예를 들어, 수시간 또는 수일) 동안 유지된다.

[0116] A. 투입 조성물

[0117] 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 T 세포를 포함하는 세포 조성물을 항원 수용체를 코딩하는 이중 폴리뉴클레오티드를 함유하는 바이러스 벡터 입자와 (함께 "투입 조성물") 원심분리 시스템에서 접촉시킴으로써 T 세포를 유전자 조작하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 방법은 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 방법은 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하기 전에 세포 조성물을 원추형 유체 인클로저 내로 로딩하는 것을 포함한다.

[0118] 일부 실시양태에서, 원심분리 시스템은 원추형 유체 인클로저 내에 캐놀라를 포함한다. 일부 실시양태에서, 캐놀라는 원추형 유체 인클로저의 길이를 따라 이어진다. 일부 실시양태에서, 캐놀라의 한쪽 단부는 원추형 유체 인클로저의 팁에 또는 그 근처에 있다. 일부 실시양태에서, 캐놀라의 다른쪽 단부는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부에 또는 그 근처에, 예컨대 넓은 단부의 중심에 또는 그 근처에 있다.

[0119] 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 캐놀라를 통해 원추형 유체 인클로저 내로 로딩된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 원추형 유체 인클로저의 팁에서 또는 그 근처에서 원추형 유체 인클로저 내로 로딩된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부로 진입하고, 원추형 유체 인클로저의 팁의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부에서 배출되는 것에 의해 원추형 유체 인클로저 내로 로딩된다.

[0120] 일부 실시양태에서, 방법은 바이러스 벡터 입자를 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내로 로딩하는 것을 포함하며, 여기서 세포 조성물 및 바이러스 벡터 입자를 포함하는 생성된 조성물은 투입 조성물이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자의 로딩은 제1 원심력 및 제1 유량의 적용과 공동으로 또는 그 동안 수행된다.

[0121] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자는 캐놀라를 통해 원추형 유체 인클로저 내로 로딩된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자는 원추형 유체 인클로저의 팁에서 또는 그 근처에서 원추형 유체 인클로저 내로 로딩된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부로 진입하고, 원추형 유체 인클로저의 팁의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부에서 배출되는 것에 의해 원추형 유체 인클로저 내로 로딩된다.

[0122] 일부 실시양태에서, 방법은 투입 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태

에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 바이러스 벡터 입자를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시킨다. 따라서, 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자는 원심분리 시스템을 통한 재순환 동안 세포의 유동층과 반복적으로 접촉한다. 일부 실시양태에서, 방법은 항원 수용체를 발현하는 유전자 조작된 T 세포를 생산한다.

- [0123] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 것은 그에 의해 원추형 유체 인클로저로부터 세포 조성물의 폐기물 분획을 분리한다. 일부 실시양태에서, 분리된 폐기물 분획은 세포 조성물 중 비생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 비생존 T 세포를 갖는다.
- [0124] 일부 실시양태에서, 분리된 세포는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 개구를 통해 원추형 유체 인클로저로부터 배출된다. 일부 실시양태에서, 개구는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부를 적어도 부분적으로 둘러싼다. 일부 실시양태에서, 개구는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부를 둘러싼다.
- [0125] 일부 실시양태에서, 방법은 분리된 폐기물 분획을 수집하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 분리된 폐기물 분획은 용기에 수집된다. 일부 실시양태에서, 용기는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부와 유체 연통한다.
- [0126] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 것은 그에 의해 원추형 유체 인클로저 내에서 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 생존 T 세포를 갖는 풍부화된 조성물을 생산한다.
- [0127] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자의 로딩은 제2 원심력 및 제2 유량의 적용과 공동으로 또는 그 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자는 제2 원심력 및 제2 유량의 적용의 적어도 일부 동안 원심분리 시스템에 존재한다.
- [0128] 일부 실시양태에서, 방법은 (a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계; (b) 항원 수용체를 코딩하는 이중 폴리뉴클레오티드를 함유하는 바이러스 벡터 입자를 원추형 유체 인클로저 내로 로딩하여, 그에 의해 세포 조성물 및 바이러스 벡터 입자를 포함하는 투입 조성물을 생성하는 단계; 및 (c) 투입 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 바이러스 벡터 입자가 세포의 유동층과 반복적으로 접촉하도록 바이러스 벡터 입자를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 것인 단계를 포함한다.
- [0129] 일부 실시양태에서, 방법은 항원 수용체를 코딩하는 이중 폴리뉴클레오티드를 함유하는 바이러스 벡터 입자 및 T 세포를 포함하는 세포 조성물을 포함하는 투입 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자 및 세포 조성물은 둘 다 제1 원심력 및 제1 유량이 적용될 때 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내에 존재한다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량의 적용은 세포의 유동층을 생산한다. 일부 실시양태에서, 방법은 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하기 전에 세포 조성물 및 바이러스 벡터 입자를 원추형 유체 인클로저 내로 로딩하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 로딩은 바이러스 벡터 입자의 로딩 전, 로딩 동안 및/또는 로딩 후이다. 일부 실시양태에서, 방법은 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하기 전에 투입 조성물을 원추형 유체 인클로저 내로 로딩하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물 및/또는 바이러스 벡터 입자는 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하기 전에 또는 그 동안 원추형 유체 인클로저 내로 로딩된다.
- [0130] 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 625 G 내지 약 3,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 625 G 내지 약 3,000 G, 약 625 G 내지 약 2,500 G, 약 625 G 내지 약 2,000 G, 약 625 G 내지 약 1,500 G, 약 625 G 내지 약 1,000 G, 약 1,000 G 내지 약 3,000 G, 약 1,000 G 내지 약 2,500 G, 약 1,000 G 내지 약 2,000 G, 약 1,000 G 내지 약 1,500 G, 약 1,500 G 내지 약 3,000 G, 약 1,500 G 내지 약 2,500 G, 약 1,500 G 내지 약 2,000 G, 약 2,000 G 내지 약 3,000 G, 약 2,000 G 내지 약 2,500 G, 또는 약 2,500 G 내지 약 3,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 2,000 G 내지 약 4,000 G이다.
- [0131] 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 1,000 G 내지 약 5,000 G, 약 1,500 G 내지 약 4,500 G, 약 2,000 G 내지 약 4,000 G, 약 1,500 G 내지 약 3,500 G, 또는 약 2,000 G 내지 약 3,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 1,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 1,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 2,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 2,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 3,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 3,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 4,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 4,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 5,000 G이다.
- [0132] 일부 실시양태에서, 제1 유량은 방사상 내향이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 원추형 유체 인클로저의 팁

으로부터 멀어지는 방향을 향한다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 제1 유량에 의해 상쇄된다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 대향류량이다.

[0133] 일부 실시양태에서, 제1 유량은 캐놀라를 통한 배지의 유동에 의해 유발된다. 일부 실시양태에서, 캐놀라를 통한 배지의 유동은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부로부터 팁까지이다. 일부 실시양태에서, 배지는 캐놀라에서 배출되어 원추형 유체 인클로저에 그의 팁에서 진입한다.

[0134] 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 1 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 3 mL/분 내지 약 18 mL/분, 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분, 또는 약 8 mL/분 내지 약 12 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 1 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 3 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 5 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 8 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 9 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 10 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 11 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 12 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 15 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 18 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 20 mL/분이다.

[0135] 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 1 mL/분 내지 약 50 mL/분, 약 1 mL/분 내지 약 40 mL/분, 약 1 mL/분 내지 약 30 mL/분, 약 1 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 1 mL/분 내지 약 10 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 50 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 40 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 30 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 20 mL/분 내지 약 50 mL/분, 약 20 mL/분 내지 약 40 mL/분, 약 20 mL/분 내지 약 30 mL/분, 약 30 mL/분 내지 약 50 mL/분, 약 30 mL/분 내지 약 40 mL/분, 또는 약 40 mL/분 내지 약 50 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 10 mL/분 내지 약 40 mL/분이다.

[0136] 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 10 mL/분 내지 약 50 mL/분, 약 20 mL/분 내지 약 50 mL/분, 약 30 mL/분 내지 약 50 mL/분, 또는 약 35 mL/분 내지 약 45 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 40 mL/분이다.

[0137] 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분이다. 일부 실시양태에서, (i) 제1 원심력은 약 2,000 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제1 유량은 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분이다.

[0138] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 200 내지 약 400이다. 본원에서 원심력 대 유량의 비는, 달리 나타내지 않는 한, G 단위의 원심력 대 mL/분 단위의 유량의 비이다.

[0139] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 200 내지 약 400, 약 225 내지 약 375, 약 250 내지 약 350, 또는 약 275 내지 약 325이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 200이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 200이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 225이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 250이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 275이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 300이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 325이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 350이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 375이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 400이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 3,000 G이고, 제1 유량은 약 10 mL/분이다.

[0140] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 20 내지 200, 약 20 내지 180, 약 20 내지 160, 약 20 내지 140, 약 20 내지 120, 약 20 내지 100, 약 20 내지 80, 약 20 내지 60, 약 20 내지 40, 약 40 내지 200, 약 40 내지 180, 약 40 내지 160, 약 40 내지 140, 약 40 내지 120, 약 40 내지 100, 약 40 내지 80, 약 40 내지 60, 약 60 내지 200, 약 60 내지 180, 약 60 내지 160, 약 60 내지 140, 약 60 내지 120, 약 60 내지 100, 약 60 내지 80, 약 80 내지 200, 약 80 내지 180, 약 80 내지 160, 약 80 내지 140, 약 80 내지 120, 약 80 내지 100, 약 100 내지 200, 약 100 내지 180, 약 100 내지 160, 약 100 내지 140, 약 100 내지 120, 약 120 내지 200, 약 120 내지 180, 약 120 내지 160, 약 120 내지 140, 약 140 내지 200, 약 140 내지 180, 약 140 내지 160, 약 160 내지 200, 약 160 내지 180, 또는 약 180 내지 200이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 40 내지 200, 약 40 내지 180, 약 40 내지 160, 약 40 내지 140, 약 40 내지 120, 약 40 내지 100, 약 40 내지 80, 또는 약 50 내지 60이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 62.5이다.

[0141] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 62.5 내지 300, 약 62.5 내지 250, 약 62.5 내지 200, 약 62.5 내지 150, 또는 약 62.5 내지 100이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 62.5이다.

[0142] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 62.5 내지 300, 약 100 내지 300, 약 150 내지 300, 약

200 내지 300, 및 약 250 내지 300이다.

[0143] 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 2500 G이고, 제1 유량은 약 40 mL/분이다.

[0144] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 15초, 약 30초, 약 45초, 약 60초, 약 2분, 약 3분, 약 4분, 약 5분, 약 10분, 또는 약 15분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 15초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 30초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 45초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 60초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 1분 내지 약 15분, 약 3분 내지 약 12분, 또는 약 5분 내지 약 10분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 1분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 2분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 3분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 4분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 5분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 6분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 7분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 8분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 9분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 10분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 11분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 12분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 13분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 14분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 15분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 세포의 유동층이 확립될 때까지 세포 조성물에 적용된다.

[0145] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 15초, 적어도 약 30초, 적어도 약 45초, 적어도 약 60초, 적어도 약 2분, 적어도 약 3분, 적어도 약 4분, 적어도 약 5분, 적어도 약 10분, 또는 적어도 약 15분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 15초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 20초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 25초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 30초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 45초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 60초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 2분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 3분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 4분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 5분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 10분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 15분 동안 세포 조성물에 적용된다.

[0146] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 15초 내지 60초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 25초 내지 60초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 30초 내지 60초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 15초 내지 2분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 25초 내지 2분 동안 세포 조성물에 적용된다.

[0147] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 미리 결정된 수의 세포가 원추형 유체 인클로저 내로 로딩될 때까지 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 미리 결정된 수의 세포가 세포의 유동층의 일부일 때까지 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 미리 결정된 수의 세포는 미리 결정된 수의 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 미리 결정된 수의 세포, 예를 들어 T 세포는 약 10백만 내지 100백만, 약 10백만 내지 90백만, 약 10백만 내지 80백만, 약 10백만 내지 70백만, 약 10백만 내지 60백만, 약 10백만 내지 50백만, 약 10백만 내지 40백만, 약 10백만 내지 30백만, 약 10백만 내지 20백만, 약 20백만 내지 100백만, 약 20백만 내지 90백만, 약 20백만 내지 80백만, 약 20백만 내지 70백만, 약 20백만 내지 60백만, 약 20백만 내지 50백만, 약 20백만 내지 40백만, 약 20백만 내지 30백만, 약 30백만 내지 100백만, 약 30백만 내지 90백만, 약 30백만 내지 80백만, 약 30백만 내지 70백만, 약 30백만 내지 60백만, 약 30백만 내지 50백만, 약 30백만 내지 40백만, 약 40백만 내지 100백만, 약 40백만 내지 90백만, 약 40백만 내지 80백만, 약 40백만 내지 70백만,

약 40백만 내지 60백만, 약 40백만 내지 50백만, 약 50백만 내지 100백만, 약 50백만 내지 90백만, 약 50백만 내지 80백만, 약 50백만 내지 70백만, 약 50백만 내지 60백만, 약 60백만 내지 100백만, 약 60백만 내지 90백만, 약 60백만 내지 80백만, 약 60백만 내지 70백만, 약 70백만 내지 100백만, 약 70백만 내지 90백만, 약 70백만 내지 80백만, 약 80백만 내지 100백만, 약 80백만 내지 90백만, 또는 약 90백만 내지 100백만개의 세포, 예를 들어 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 미리 결정된 수의 세포, 예를 들어 T 세포는 약 50백만개의 세포, 예를 들어 T 세포이다.

[0148] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 15초, 약 30초, 약 45초, 약 60초, 약 2분, 약 3분, 약 4분, 약 5분, 약 10분, 또는 약 15분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 15초 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 30초 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 45초 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 60초 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 1분 내지 약 15분, 약 3분 내지 약 12분, 또는 약 5분 내지 약 10분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 1분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 2분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 3분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 4분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 5분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 6분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 7분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 8분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 9분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 10분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 11분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 12분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 13분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 14분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 15분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 세포의 유동층이 확립될 때까지 투입 조성물에 적용된다.

[0149] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 15초, 적어도 약 30초, 적어도 약 45초, 적어도 약 60초, 적어도 약 2분, 적어도 약 3분, 적어도 약 4분, 적어도 약 5분, 적어도 약 10분, 또는 적어도 약 15분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 15초 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 20초 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 25초 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 30초 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 45초 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 60초 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 2분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 3분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 4분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 5분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 10분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 15분 동안 투입 조성물에 적용된다.

[0150] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 15초 내지 60초 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 25초 내지 60초 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 30초 내지 60초 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 15초 내지 2분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 25초 내지 2분 동안 투입 조성물에 적용된다.

[0151] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 미리 결정된 수의 세포가 원추형 유체 인클로저 내로 로딩될 때까지 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 미리 결정된 수의 세포가 세포의 유동층의 일부일 때까지 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 미리 결정된 수의 세포는 미리 결정된 수의 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 미리 결정된 수의 세포, 예를 들어 T 세포는 약 10백만 내지 100백만, 약 10백만 내지 90백만, 약 10백만 내지 80백만, 약 10백만 내지 70백만, 약 10백만 내지 60백만, 약 10백만 내지 50백만, 약 10백만 내지 40백만, 약 10백만 내지 30백만, 약 10백만 내지 20백만, 약 20백만 내지 100백만,

약 20백만 내지 90백만, 약 20백만 내지 80백만, 약 20백만 내지 70백만, 약 20백만 내지 60백만, 약 20백만 내지 50백만, 약 20백만 내지 40백만, 약 20백만 내지 30백만, 약 30백만 내지 100백만, 약 30백만 내지 90백만, 약 30백만 내지 80백만, 약 30백만 내지 70백만, 약 30백만 내지 60백만, 약 30백만 내지 50백만, 약 30백만 내지 40백만, 약 40백만 내지 100백만, 약 40백만 내지 90백만, 약 40백만 내지 80백만, 약 40백만 내지 70백만, 약 40백만 내지 60백만, 약 40백만 내지 50백만, 약 50백만 내지 100백만, 약 50백만 내지 90백만, 약 50백만 내지 80백만, 약 50백만 내지 70백만, 약 50백만 내지 60백만, 약 60백만 내지 100백만, 약 60백만 내지 90백만, 약 60백만 내지 80백만, 약 60백만 내지 70백만, 약 70백만 내지 100백만, 약 70백만 내지 90백만, 약 70백만 내지 80백만, 약 80백만 내지 100백만, 약 80백만 내지 90백만, 또는 약 90백만 내지 100백만개의 세포, 예를 들어 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 미리 결정된 수의 세포, 예를 들어 T 세포는 약 50백만개의 세포, 예를 들어 T 세포이다.

[0152] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 방사상 내향이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 원추형 유체 인클로저의 팁으로부터 멀어지는 방향을 향한다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 제2 유량에 의해 상쇄된다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 대향류량이다.

[0153] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 캐놀라를 통한 배지의 유동에 의해 유발된다. 일부 실시양태에서, 캐놀라를 통한 배지의 유동은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부로부터 팁까지이다. 일부 실시양태에서, 배지는 캐놀라에서 배출되어 원추형 유체 인클로저에 그의 팁에서 진입한다.

[0154] 다른 실시양태에서, 제2 유량은 방사상 외향이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 원추형 유체 인클로저의 팁을 향한다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 방향이다.

[0155] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 원추형 유체 인클로저를 통한 배지의 유동에 의해 유발된다. 일부 실시양태에서, 원추형 유체 인클로저를 통한 배지의 유동은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부로부터 팁까지이다. 일부 실시양태에서, 배지는 원추형 유체 인클로저의 팁에서 배출되어 캐놀라에 진입한다.

[0156] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 100 G 내지 약 2,000 G, 약 200 G 내지 약 1800 G, 약 500 G 내지 약 1,500 G, 또는 약 750 G 내지 약 1,250 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 250 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 500 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 600 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 700 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 800 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 900 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,100 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,200 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,300 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,400 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,300 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,750 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 2,000 G이다.

[0157] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 100 G 내지 약 4,000 G, 약 100 G 내지 약 3,750 G, 약 100 G 내지 약 3,500 G, 약 100 G 내지 약 3,250 G, 약 100 G 내지 약 3,000 G, 약 100 G 내지 약 2,750 G, 약 100 G 내지 약 2,500 G, 약 100 G 내지 약 2,250 G, 약 100 G 내지 약 2,000 G, 약 100 G 내지 약 1,750 G, 약 100 G 내지 약 1,500 G, 약 100 G 내지 약 1,250 G, 약 100 G 내지 약 1,000 G, 약 100 G 내지 약 750 G, 약 100 G 내지 약 500 G, 약 100 G 내지 약 250 G, 약 250 G 내지 약 4,000 G, 약 250 G 내지 약 3,750 G, 약 250 G 내지 약 3,500 G, 약 250 G 내지 약 3,250 G, 약 250 G 내지 약 3,000 G, 약 250 G 내지 약 2,750 G, 약 250 G 내지 약 2,500 G, 약 250 G 내지 약 2,250 G, 약 250 G 내지 약 2,000 G, 약 250 G 내지 약 1,750 G, 약 250 G 내지 약 1,500 G, 약 250 G 내지 약 1,250 G, 약 250 G 내지 약 1,000 G, 약 250 G 내지 약 750 G, 약 250 G 내지 약 500 G, 약 500 G 내지 약 4,000 G, 약 500 G 내지 약 3,750 G, 약 500 G 내지 약 3,500 G, 약 500 G 내지 약 3,250 G, 약 500 G 내지 약 3,000 G, 약 500 G 내지 약 2,750 G, 약 500 G 내지 약 2,500 G, 약 500 G 내지 약 2,250 G, 약 500 G 내지 약 2,000 G, 약 500 G 내지 약 1,750 G, 약 500 G 내지 약 1,500 G, 약 500 G 내지 약 1,250 G, 약 500 G 내지 약 1,000 G, 약 500 G 내지 약 750 G, 약 750 G 내지 약 4,000 G, 약 750 G 내지 약 3,750 G, 약 750 G 내지 약 3,500 G, 약 750 G 내지 약 3,250 G, 약 750 G 내지 약 3,000 G, 약 750 G 내지 약 2,750 G, 약 750 G 내지 약 2,500 G, 약 750 G 내지 약 2,250 G, 약 750 G 내지 약 2,000 G, 약 750 G 내지 약 1,750 G, 약 750 G 내지 약 1,500 G, 약 750 G 내지 약 1,250 G, 약 750 G 내지 약 1,000 G, 약 1,000 G 내지 약 4,000 G, 약 1,000 G 내지 약 3,750 G, 약 1,000 G 내지 약 3,500 G, 약 1,000 G 내지 약 3,250 G, 약 1,000 G 내지 약 3,000 G, 약 1,000 G 내지 약 2,750 G, 약 1,000 G 내지 약 2,500 G, 약 1,000 G 내지 약 2,250 G, 약 1,000 G 내지 약 2,000 G, 약 1,000 G 내지 약 1,750 G, 약 1,000 G 내지 약 1,500 G, 약 1,000 G

내지 약 1,250 G, 약 1,250 G 내지 약 4,000 G, 약 1,250 G 내지 약 3,750 G, 약 1,250 G 내지 약 3,500 G, 약 1,250 G 내지 약 3,250 G, 약 1,250 G 내지 약 3,000 G, 약 1,250 G 내지 약 2,750 G, 약 1,250 G 내지 약 2,500 G, 약 1,250 G 내지 약 2,250 G, 약 1,250 G 내지 약 2,000 G, 약 1,250 G 내지 약 1,750 G, 약 1,250 G 내지 약 1,500 G, 약 1,500 G 내지 약 4,000 G, 약 1,500 G 내지 약 3,750 G, 약 1,500 G 내지 약 3,500 G, 약 1,500 G 내지 약 3,250 G, 약 1,500 G 내지 약 3,000 G, 약 1,500 G 내지 약 2,750 G, 약 1,500 G 내지 약 2,500 G, 약 1,500 G 내지 약 2,250 G, 약 1,500 G 내지 약 2,000 G, 약 1,500 G 내지 약 1,750 G, 약 1,750 G 내지 약 4,000 G, 약 1,750 G 내지 약 3,750 G, 약 1,750 G 내지 약 3,500 G, 약 1,750 G 내지 약 3,250 G, 약 1,750 G 내지 약 3,000 G, 약 1,750 G 내지 약 2,750 G, 약 1,750 G 내지 약 2,500 G, 약 1,750 G 내지 약 2,250 G, 약 2,000 G 내지 약 4,000 G, 약 2,000 G 내지 약 3,750 G, 약 2,000 G 내지 약 3,500 G, 약 2,000 G 내지 약 3,250 G, 약 2,000 G 내지 약 3,000 G, 약 2,000 G 내지 약 2,750 G, 약 2,000 G 내지 약 2,500 G, 약 2,000 G 내지 약 2,250 G, 약 2,250 G 내지 약 4,000 G, 약 2,250 G 내지 약 3,750 G, 약 2,250 G 내지 약 3,500 G, 약 2,250 G 내지 약 3,250 G, 약 2,250 G 내지 약 3,000 G, 약 2,250 G 내지 약 2,750 G, 약 2,250 G 내지 약 2,500 G, 약 2,500 G 내지 약 4,000 G, 약 2,500 G 내지 약 3,750 G, 약 2,500 G 내지 약 3,500 G, 약 2,500 G 내지 약 3,250 G, 약 2,500 G 내지 약 3,000 G, 약 2,500 G 내지 약 2,750 G, 약 2,750 G 내지 약 4,000 G, 약 2,750 G 내지 약 3,750 G, 약 2,750 G 내지 약 3,500 G, 약 2,750 G 내지 약 3,250 G, 약 2,750 G 내지 약 3,000 G, 약 3,000 G 내지 약 4,000 G, 약 3,000 G 내지 약 3,750 G, 약 3,000 G 내지 약 3,500 G, 약 3,000 G 내지 약 3,250 G, 약 3,250 G 내지 약 4,000 G, 약 3,250 G 내지 약 3,750 G, 약 3,250 G 내지 약 3,500 G, 약 3,500 G 내지 약 4,000 G, 약 3,500 G 내지 약 3,750 G, 또는 약 3,750 G 내지 약 4,000 G이다.

[0158] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G, 약 500 G 내지 약 1,400 G, 약 500 G 내지 약 1,300 G, 약 500 G 내지 약 1,200 G, 약 500 G 내지 약 1,100 G, 약 500 G 내지 약 1,000 G, 약 500 G 내지 약 900 G, 약 500 G 내지 약 800 G, 또는 약 500 G 내지 약 700 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 625 G이다.

[0159] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 100 G 내지 약 2,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 100 G 내지 약 2,000 G, 약 100 G 내지 약 1,900 G, 약 100 G 내지 약 1,800 G, 약 100 G 내지 약 1,700 G, 약 100 G 내지 약 1,600 G, 약 100 G 내지 약 1,500 G, 약 100 G 내지 약 1,400 G, 약 100 G 내지 약 1,300 G, 약 100 G 내지 약 1,200 G, 약 100 G 내지 약 1,100 G, 약 100 G 내지 약 1,000 G, 약 100 G 내지 약 900 G, 약 100 G 내지 약 800 G, 약 100 G 내지 약 700 G, 약 100 G 내지 약 600 G, 약 100 G 내지 약 500 G, 또는 약 100 G 내지 약 400 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 300 G이다.

[0160] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 10 내지 약 100 mL/분이다. 일부 실시양태에서, (i) 제2 원심력은 약 100 G 내지 약 2,000 G이고; (ii) 제2 유량은 약 10 mL/분 내지 약 100 mL/분이다. 일부 실시양태에서, (i) 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G이고; (ii) 제2 유량은 약 10 mL/분 내지 약 100 mL/분이다.

[0161] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 10 내지 약 100 mL/분, 약 15 내지 약 90 mL/분, 약 20 내지 약 80 mL/분, 약 25 내지 약 70 mL/분, 약 30 내지 약 60 mL/분, 또는 약 35 내지 약 50 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 20 mL/분, 약 21 mL/분, 약 22 mL/분, 약 23 mL/분, 약 24 mL/분, 약 25 mL/분, 약 25.5 mL/분, 약 26 mL/분, 약 26.5 mL/분, 약 27 mL/분, 약 27.5 mL/분, 약 28 mL/분, 약 28.5 mL/분, 약 29 mL/분, 약 29.5 mL/분, 약 30 mL/분, 약 31 mL/분, 약 32 mL/분, 약 33 mL/분, 약 34 mL/분 또는 약 35 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 25 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 25.5 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 26 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 26.5 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 27 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 27.5 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 28 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 28.5 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 29 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 29.5 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 30 mL/분이다.

[0162] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 5 내지 약 100 mL/분, 약 5 내지 약 90 mL/분, 약 5 내지 약 80 mL/분, 약 5 내지 약 70 mL/분, 약 5 내지 약 60 mL/분, 약 5 내지 약 50 mL/분, 약 5 내지 약 40 mL/분, 약 5 내지 약 30 mL/분, 약 5 내지 약 25 mL/분, 약 5 내지 약 20 mL/분, 약 5 내지 약 15 mL/분, 약 5 내지 약 10 mL/분, 약 10 내지 약 100 mL/분, 약 10 내지 약 90 mL/분, 약 10 내지 약 80 mL/분, 약 10 내지 약 70 mL/분, 약 10 내지 약 60 mL/분, 약 10 내지 약 50 mL/분, 약 10 내지 약 40 mL/분, 약 10 내지 약 30 mL/분, 약 10 내지 약 25 mL/분, 약 10 내지 약 20 mL/분, 약 10 내지 약 15 mL/분, 약 15 내지 약 100 mL/분, 약 15 내지 약 90 mL/

분, 약 15 내지 약 80 mL/분, 약 15 내지 약 70 mL/분, 약 15 내지 약 60 mL/분, 약 15 내지 약 50 mL/분, 약 15 내지 약 40 mL/분, 약 15 내지 약 30 mL/분, 약 15 내지 약 25 mL/분, 약 15 내지 약 20 mL/분, 약 20 내지 약 100 mL/분, 약 20 내지 약 90 mL/분, 약 20 내지 약 80 mL/분, 약 20 내지 약 70 mL/분, 약 20 내지 약 60 mL/분, 약 20 내지 약 50 mL/분, 약 20 내지 약 40 mL/분, 약 20 내지 약 30 mL/분, 약 20 내지 약 25 mL/분, 약 25 내지 약 100 mL/분, 약 25 내지 약 90 mL/분, 약 25 내지 약 80 mL/분, 약 25 내지 약 70 mL/분, 약 25 내지 약 60 mL/분, 약 25 내지 약 50 mL/분, 약 25 내지 약 40 mL/분, 약 25 내지 약 30 mL/분, 약 30 내지 약 100 mL/분, 약 30 내지 약 90 mL/분, 약 30 내지 약 80 mL/분, 약 30 내지 약 70 mL/분, 약 30 내지 약 60 mL/분, 약 30 내지 약 50 mL/분, 약 30 내지 약 40 mL/분, 약 40 내지 약 100 mL/분, 약 40 내지 약 90 mL/분, 약 40 내지 약 80 mL/분, 약 40 내지 약 70 mL/분, 약 40 내지 약 60 mL/분, 약 40 내지 약 50 mL/분, 약 50 내지 약 100 mL/분, 약 50 내지 약 90 mL/분, 약 50 내지 약 80 mL/분, 약 50 내지 약 70 mL/분, 약 50 내지 약 60 mL/분, 약 60 내지 약 100 mL/분, 약 60 내지 약 90 mL/분, 약 60 내지 약 80 mL/분, 약 60 내지 약 70 mL/분, 약 70 내지 약 100 mL/분, 약 70 내지 약 90 mL/분, 약 70 내지 약 80 mL/분, 약 80 내지 약 100 mL/분, 약 80 내지 약 90 mL/분, 또는 약 90 내지 약 100 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 10 mL/분 내지 약 30 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분이다.

[0163] 일부 실시양태에서, (i) 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G이고; (ii) 제2 유량은 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분이다.

[0164] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 5 내지 약 40 mL/분, 약 5 내지 약 35 mL/분, 약 5 내지 약 30 mL/분, 약 5 내지 약 25 mL/분, 약 5 내지 약 20 mL/분, 또는 약 5 내지 약 15 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 10 mL/분이다.

[0165] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 20 내지 약 100이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 25 내지 약 85이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 30 내지 약 65이다.

[0166] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 20 내지 약 100, 약 25 내지 약 80, 또는 약 30 내지 약 60이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 20이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 25이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 30이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 35이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 40이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 45이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 50이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 55이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 60이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 65이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 70이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 75이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,000 G이고, 제2 유량은 약 28.5 mL/분이다.

[0167] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 20 내지 200, 약 20 내지 180, 약 20 내지 160, 약 20 내지 140, 약 20 내지 120, 약 20 내지 100, 약 20 내지 80, 약 20 내지 60, 약 20 내지 40, 약 40 내지 200, 약 40 내지 180, 약 40 내지 160, 약 40 내지 140, 약 40 내지 120, 약 40 내지 100, 약 40 내지 80, 약 40 내지 60, 약 60 내지 200, 약 60 내지 180, 약 60 내지 160, 약 60 내지 140, 약 60 내지 120, 약 60 내지 100, 약 60 내지 80, 약 80 내지 200, 약 80 내지 180, 약 80 내지 160, 약 80 내지 140, 약 80 내지 120, 약 80 내지 100, 약 100 내지 200, 약 100 내지 180, 약 100 내지 160, 약 100 내지 140, 약 100 내지 120, 약 120 내지 200, 약 120 내지 180, 약 120 내지 160, 약 120 내지 140, 약 140 내지 200, 약 140 내지 180, 약 140 내지 160, 약 160 내지 200, 약 160 내지 180, 또는 약 180 내지 200이다.

[0168] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 20 내지 100, 약 20 내지 80, 약 20 내지 60, 또는 약 20 내지 40이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 30이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 300 G이고, 제2 유량은 약 10 mL/분이다.

[0169] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 40 내지 200, 약 40 내지 180, 약 40 내지 160, 약 40 내지 140, 약 40 내지 120, 약 40 내지 100, 약 40 내지 80, 또는 약 50 내지 60이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 62.5이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 625 G이고, 제2 유량은 약 10 mL/분이다.

- [0170] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 5분 내지 약 100분, 약 10분 내지 약 90분, 약 15분 내지 약 80분, 약 20분 내지 약 70분, 약 25분 내지 약 60분, 약 30분 내지 약 50분, 또는 약 35분 내지 약 40분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 5분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 10분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 15분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 20분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 25분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 30분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 45분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 60분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 75분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 90분 동안 투입 조성물에 적용된다.
- [0171] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 15분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 30분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 45분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 60분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 75분 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 90분 동안 투입 조성물에 적용된다.
- [0172] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 투입 조성물에 연속적으로 적용된다.
- [0173] 다른 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 투입 조성물에 비연속적으로 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 투입 조성물에 간헐적으로 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 투입 조성물에 규칙적으로 발생하는 간격으로 적용된다.
- [0174] 상기 실시양태 중 임의의 것에서, 제2 원심력 및 제2 유량이 투입 조성물에 적용되는 시간의 양은 제2 원심력 및 제2 유량이 비연속적으로 적용되는 시간의 총량일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 30-분의 기간 동안 총 약 5분 내지 약 25분 동안 투입 조성물에 비연속적으로 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 30-분의 기간 동안 총 약 15분 동안 투입 조성물에 적용된다.
- [0175] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 제1 기간에 투입 조성물에 적용되고, 이어서 제2 원심력 및 제2 유량이 투입 조성물에 적용되지 않는 제2 기간이 이어진다. 일부 실시양태에서, 각각 제2 원심력 및 제2 유량과 상이한 원심력 및 유량이 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 기간 동안 적용되는 원심력 및 유량은 본원에 기재된 원심력 및 유량 중 임의의 것, 예를 들어 기재된 제2 원심력 및 제2 유량 중 임의의 것, 예컨대 본원에 기재된 제2 원심력 대 제2 유량의 비 중 임의의 것이다.
- [0176] 일부 실시양태에서, 제1 기간 및 제2 기간은 길이가 대략 동등하다.
- [0177] 다른 실시양태에서, 제1 기간 및 제2 기간은 길이가 상이하다.
- [0178] 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 기간은 미리 결정된 횟수로 반복된다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 기간은 미리 결정된 양의 시간이 경과할 때까지 반복된다. 일부 실시양태에서, 미리 결정된 양의 시간은 약 5분 내지 약 100분, 약 10분 내지 약 90분, 약 15분 내지 약 80분, 약 20분 내지 약 70분, 약 25분 내지 약 60분, 약 30분 내지 약 50분, 또는 약 35분 내지 약 40분이다.
- [0179] 일부 실시양태에서, 제1 기간은 약 1분 내지 약 10분, 약 1분 내지 약 9분, 약 1분 내지 약 8분, 약 1분 내지 약 7분, 약 1분 내지 약 6분, 약 1분 내지 약 5분, 약 1분 내지 약 4분, 약 1분 내지 약 3분, 약 1분 내지 약 2분, 약 2분 내지 약 10분, 약 2분 내지 약 9분, 약 2분 내지 약 8분, 약 2분 내지 약 7분, 약 2분 내지 약 6분, 약 2분 내지 약 5분, 약 2분 내지 약 4분, 약 2분 내지 약 3분, 약 3분 내지 약 10분, 약 3분 내지 약 9분, 약 3분 내지 약 8분, 약 3분 내지 약 7분, 약 3분 내지 약 6분, 약 3분 내지 약 5분, 약 3분 내지 약 4분, 약 4분 내지 약 10분, 약 4분 내지 약 9분, 약 4분 내지 약 8분, 약 4분 내지 약 7분, 약 4분 내지 약 6분, 약 4분 내지 약 5분, 약 5분 내지 약 10분, 약 5분 내지 약 9분, 약 5분 내지 약 8분, 약 5분 내지 약 7분, 약 5분 내지 약 6분, 약 6분 내지 약 10분, 약 6분 내지 약 9분, 약 6분 내지 약 8분, 약 6분 내지 약 7분, 약 7분 내지 약 10분, 약 7분 내지 약 9분, 약 7분 내지 약 8분, 약 8분 내지 약 10분, 약 8분 내지 약 9분, 또는 약 9분 내지 약 10분이다. 일부 실시양태에서, 제1 기간은 약 1분 내지 약 10분, 약 1분 내지 약 9분, 약 1분 내지 약 8분, 약 1분 내지 약 7분, 약 1분 내지 약 6분, 약 1분 내지 약 5분, 약 1분 내지 약 4분, 약 1분 내지 약 3분, 또는

약 1분 내지 약 2분이다. 일부 실시양태에서, 제1 기간은 약 1분이다.

[0180] 일부 실시양태에서, 제2 기간은 약 1분 내지 약 10분, 약 1분 내지 약 9분, 약 1분 내지 약 8분, 약 1분 내지 약 7분, 약 1분 내지 약 6분, 약 1분 내지 약 5분, 약 1분 내지 약 4분, 약 1분 내지 약 3분, 약 1분 내지 약 2분, 약 2분 내지 약 10분, 약 2분 내지 약 9분, 약 2분 내지 약 8분, 약 2분 내지 약 7분, 약 2분 내지 약 6분, 약 2분 내지 약 5분, 약 2분 내지 약 4분, 약 2분 내지 약 3분, 약 3분 내지 약 10분, 약 3분 내지 약 9분, 약 3분 내지 약 8분, 약 3분 내지 약 7분, 약 3분 내지 약 6분, 약 3분 내지 약 5분, 약 3분 내지 약 4분, 약 4분 내지 약 10분, 약 4분 내지 약 9분, 약 4분 내지 약 8분, 약 4분 내지 약 7분, 약 4분 내지 약 6분, 약 4분 내지 약 5분, 약 5분 내지 약 10분, 약 5분 내지 약 9분, 약 5분 내지 약 8분, 약 5분 내지 약 7분, 약 5분 내지 약 6분, 약 6분 내지 약 10분, 약 6분 내지 약 9분, 약 6분 내지 약 8분, 약 6분 내지 약 7분, 약 7분 내지 약 10분, 약 7분 내지 약 9분, 약 7분 내지 약 8분, 약 8분 내지 약 10분, 약 8분 내지 약 9분, 또는 약 9분 내지 약 10분이다. 일부 실시양태에서, 제2 기간은 약 1분 내지 약 10분, 약 1분 내지 약 9분, 약 1분 내지 약 8분, 약 1분 내지 약 7분, 약 1분 내지 약 6분, 약 1분 내지 약 5분, 약 1분 내지 약 4분, 약 1분 내지 약 3분, 또는 약 1분 내지 약 2분이다. 일부 실시양태에서, 제2 기간은 약 1분이다.

[0181] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,500 G이고, 제2 유량은 약 10 mL/분이고, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 1분의 제1 기간 동안 투입 조성물에 적용되고, 그 후 약 300 G의 원심력 및 약 10 mL/분의 유량이 약 1분의 제2 기간 동안 투입 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 기간은 약 30분이 경과할 때까지 반복된다.

[0182] 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 5 mL 내지 약 20,000 mL, 약 10 mL 내지 약 2,000 mL, 약 15 mL 내지 약 1,000 mL, 약 20 mL 내지 약 500 mL, 약 25 mL 내지 약 100 mL, 또는 약 30 mL 내지 약 60 mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 30 mL 내지 약 60 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 5 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 10 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 15 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 20 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 25 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 30 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 35 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 40 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 45 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 50 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 55 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 60 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 65 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 70 mL이다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 부피는 약 75 mL이다.

[0183] 용어 "G" 또는 "상대 원심력" (RCF)은 일반적으로 회전축과 비교하여 공간 내 특정한 지점에서의, 지구의 중력 대비, 물체 또는 물질 (예컨대 회전하고 있는 챔버 또는 다른 용기 내의 세포, 샘플, 또는 펠릿 및/또는 지점) 상에 부여되는 유효력인 것으로 이해된다. 값은 중력, 회전 속도 및 회전 반경 (회전 축 및 RCF가 측정될 물체, 물질 또는 입자로부터의 거리)을 고려하여, 널리 공지된 식을 사용하여 결정될 수 있다.

[0184] 일부 실시양태에서, 제공된 방법으로 생산된 세포 (이하 "유전자 조작 T 세포" 또는 "산출 조성물"로도 불림)는 바이러스 벡터, 예컨대 이중 단백질, 예컨대 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 바이러스 벡터로 형질도입된 것을 포함한다. 이와 관련하여 이중은 정상적으로는 바이러스로부터 발현되지 않고/거나 바이러스 게놈에 의해 코딩되지 않은 단백질을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터의 숙주 게놈 내로의 통합은 인큐베이션 후 바이러스 벡터 입자의 게놈에 함유된 핵산에 의해 코딩된 재조합 단백질, 예컨대 이중 단백질의 발현 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다. 재조합 분자의 발현 수준을 평가하기 위한 다수의 널리 공지된 방법, 예컨대 친화도-기반 방법, 예를 들어 면역친화도-기반 방법에 의한, 예를 들어 세포 표면 단백질과 관련하여 예컨대 유동 세포측정법에 의한 검출이 사용될 수 있다. 일부 예에서, 발현은 형질도입 마커 및/또는 리포터 구조물의 검출에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 말단절단된 표면 단백질을 코딩하는 핵산이 벡터 내에 포함되고, 그의 발현 및/또는 증진의 마커로서 사용된다.

[0185] i. 세포 조성물

[0186] 일부 실시양태에서, T 세포를 포함하는 세포 조성물은 예컨대 기재된 방법에 따라 바이러스 벡터 입자로 형질도입된다. 일부 실시양태에서, 투입 조성물의 세포의 농도는 정확히 또는 약 1.0×10^5 개 세포/mL 내지 1.0×10^8 개 세포/mL, 예컨대 적어도 또는 약 적어도 또는 약 1.0×10^5 개 세포/mL, 5×10^5 개 세포/mL, 1×10^6 개 세포/mL, 5×10^6 개 세포/mL, 1×10^7 개 세포/mL, 5×10^7 개 세포/mL 또는 1×10^8 개 세포/mL이다. 일부 실시양태

에서, 세포 조성물은 약 1×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 1.25×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 1.5×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 1.75×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 2×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 2.25×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 2.5×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 2.75×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 3×10^6 개 세포/mL를 포함한다.

[0187] 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 20 mL 내지 약 300 mL, 약 25 mL 내지 약 250 mL, 약 30 mL 내지 약 200 mL, 약 35 mL 내지 약 150 mL, 또는 약 40 mL 내지 약 100 mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 20 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 25 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 30 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 35 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 40 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 45 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 50 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 55 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 60 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 70 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 80 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 100 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 125 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 150 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 175 mL이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 부피는 약 200 mL이다.

[0188] 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 1×10^8 개의 총 세포, 약 2×10^8 개의 총 세포, 약 3×10^8 개의 총 세포, 약 4×10^8 개의 총 세포, 약 5×10^8 개의 총 세포, 약 6×10^8 개의 총 세포, 약 7×10^8 개의 총 세포, 약 8×10^8 개의 총 세포, 약 9×10^8 개의 총 세포, 또는 약 1×10^9 개의 총 세포를 포함한다.

[0189] 일부 실시양태에서, T 세포는 약 5 μ m 내지 약 25 μ m, 약 5 μ m 내지 약 20 μ m, 약 5 μ m 내지 약 15 μ m, 약 5 μ m 내지 약 10 μ m, 약 10 μ m 내지 약 25 μ m, 약 10 μ m 내지 약 20 μ m, 약 10 μ m 내지 약 15 μ m, 약 15 μ m 내지 약 25 μ m, 약 15 μ m 내지 약 20 μ m, 또는 약 20 μ m 내지 약 25 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 9 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖는다.

[0190] 일부 실시양태에서, T 세포는 약 10 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 12 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 14 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖는다.

[0191] 일부 실시양태에서, T 세포는 9 μ m 미만의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 3 μ m 내지 약 9 μ m, 약 4 μ m 내지 약 9 μ m, 약 5 μ m 내지 약 9 μ m, 약 6 μ m 내지 약 9 μ m, 약 7 μ m 내지 약 9 μ m, 또는 약 8 μ m 내지 약 9 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 6 μ m 내지 약 9 μ m의 평균 직경을 갖는다.

[0192] 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 방법의 적용 전에 동결보존 및 해동된 T 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 방법은 동결보존된 세포 조성물을 해동시켜 T 세포를 포함하는 세포 조성물을 생산하는 것을 수반한다.

[0193] 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 방법의 적용 전에 동결보존 또는 해동되지 않은 T 세포를 함유한다.

[0194] 일부 실시양태에서, 세포는 제공된 방법에 따라 형질도입 전에 인큐베이션 및/또는 배양된다. 인큐베이션 단계는 배양, 양성, 자극, 활성화 및/또는 증식을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 방법은 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하기 전에 세포 조성물의 T 세포를 자극 조건 하에 인큐베이션하는 것을 포함한다. 이러한 조건은 집단에서 세포의 증식, 확장, 활성화 및/또는 생존을 유도하고/거나, 항원 노출을 모방하고/거나, 유전자 조작, 예컨대 재조합 항원 수용체의 도입을 위해 세포를 프라이밍하도록 설계된 것을 포함한다. 조건은 특정한 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 작용제, 예를 들어 영양소, 아미노산, 항생제, 이온, 및/또는 자극 인자, 예컨대 시토키인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체, 및 세포를 활성화 시키도록 설계된 임의의 다른 작용제 중 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0195] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량이 적용되기 전에 세포 조성물의 T 세포는 자극 조건 하에 인큐베이션된다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포 조성물을 원심분리 시스템 내로 로딩하기 전에 세포 조성물의 T 세포

를 자극 조건 하에 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물이 원심분리 시스템 내로 로딩되기 전에 세포 조성물의 T 세포는 자극 조건 하에 인큐베이션된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 활성화된 T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L, 4-1BB, 또는 그의 조합을 발현하는 T 세포를 포함한다.

[0196] 일부 실시양태에서, 자극 조건은 자극 시약의 존재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자극 시약은 TCR 복합체의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있다. 일부 측면에서, 작용제는 T 세포에서 TCR/CD3 세포내 신호전달 캐스케이드를 켜거나 개시한다. 이러한 작용제는 항체, 예컨대 TCR 성분 및/또는 공동자극 수용체에 특이적인 것, 예를 들어 고체 지지체, 예컨대 비드에 결합된, 예를 들어 항-CD3, 항-CD28, 및/또는 1종 이상의 시토카인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 자극 시약은 TCR 복합체의 1개 이상의 성분의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인 및 1개 이상의 공동자극 분자의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 자극 시약은 (i) TCR 복합체의 구성원에 특이적으로 결합하는 1차 작용제; 및 (ii) T 세포 공동자극 분자에 특이적으로 결합하는 2차 작용제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제는 CD3에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 공동자극 분자는 CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 또는 ICOS로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 1차 및 2차 작용제 중 적어도 1종은 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 2차 작용제는 항-CD28 항체 또는 그의 항원-결합 단편이거나 또는 이를 포함한다. 임의로, 확장 방법은 항-CD3 및/또는 항 CD28 항체를 배양 배지에 (예를 들어, 적어도 약 0.5 ng/ml의 농도로) 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0197] 일부 실시양태에서, 자극제는 IL-2 및/또는 IL-15, 예를 들어 적어도 약 10 유닛/mL의 IL-2 농도를 포함한다. 일부 측면에서, 인큐베이션은 미국 특허 번호 6,040,177 (Riddell et al.), 문헌 [Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al., (2012) Blood.1:72-82, 및/또는 Wang et al., (2012) J Immunother. 35(9):689-701]에 기재된 것과 같은 기술에 따라 수행된다.

[0198] 일부 실시양태에서, 자극 조건은 인간 T 림프구의 성장에 적합한 온도, 예를 들어, 적어도 약 25°C, 일반적으로 적어도 약 30°C, 및 일반적으로 정확히 또는 약 37°C를 포함한다. 임의로, 인큐베이션은 피더 세포로서 비-분열 EBV-형질전환된 림프모구성 세포 (LCL)를 첨가하는 것을 추가로 포함할 수 있다. LCL은 약 6000 내지 10,000 rad 범위의 감마선으로 조사될 수 있다. 일부 측면에서 LCL 피더 세포는 임의의 적합한 양, 예컨대 적어도 약 10:1의 LCL 피더 세포 대 초기 T 림프구의 비로 제공된다.

[0199] 실시양태에서, 항원-특이적 T 세포, 예컨대 항원-특이적 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포는 나이트 또는 항원 특이적 T 림프구를 항원으로 자극함으로써 획득된다. 예를 들어, 항원-특이적 T 세포주 또는 클론은 감염된 대상체로부터 T 세포를 분리하고 시토크로마 바이러스 항원으로 시험관내에서 세포를 자극함으로써 동일한 항원에 대해 생성될 수 있다.

[0200] 일부 경우에, 세포, 예를 들어 T 세포가 활성화되는 것을 필요로 하지 않는 바이러스 벡터 입자가 사용될 수 있다. 일부 이러한 경우에, 세포는 활성화 전에 및/또는 활성화의 부재 하에 선택 및/또는 형질도입될 수 있다.

[0201] 일부 실시양태에서, 세포 조성물 중 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 초과인 세포, 예를 들어 T 세포가 활성화되고, 예컨대 일부 경우에 HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L 및/또는 4-1BB 중 1종 이상에 대해 표면 양성이다. 일부 실시양태에서, 세포는 제1 원심력 및 제1 유량의 적용의 개시 전에, 예를 들어 유동층의 확립 전에 및/또는 형질도입의 개시 전에, 예컨대 항-CD3/항-CD28의 존재 하에 활성화제로 활성화된다. 외인성 성장 인자의 부재 하 또는 소량의 외인성 성장 인자 하에서의 시험관내 T 세포 집단 확장 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 6,352,694 B1 및 유럽 특허 EP 0 700 430 B1 참조). 일반적으로, 이러한 방법은 다양한 결합제 (예를 들어, 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체)가 고정된 1 μ m 초과의 고체 상 표면을 이용한다. 예를 들어, 디나비즈(Dynabeads)® CD3/CD28 (인비트로젠)은 T 세포 확장을 위한 상업적으로 입수가능한 시약이며, 이는 인간 T 세포 상의 CD3 및 CD28 세포 표면 분자에 대한 친화도 정제된 모노클로날 항체의 혼합물로 코팅된 균일한 4.5 μ m의 초상자성 멸균 비-발열성 폴리스티렌 비드이다. 일부 실시양태에서, 활성화제, 예를 들어 항-CD3 및/또는 항-CD28은 비드, 예컨대 자기 비드 상에 고정화될 수 있다.

[0202] 일부 실시양태에서, 세포 활성화는 또한 IL-2 (예를 들어, 정확히 또는 약 50 IU/mL 내지 200 IU/mL, 예컨대 정확히 또는 약 100 IU/mL)의 존재 하에 수행된다. 일부 실시양태에서, 활성화는 정확히 또는 약 1시간 내지 96시간, 1시간 내지 72시간, 1시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 8시간 내지 30시간 또는 12시간 내지 24시간, 예컨대 적어도 또는 약 적어도 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간 또는 72시간 수행된다. 일부

실시양태에서, 활성화는 정확히 또는 약 25℃ 초과, 예컨대 일반적으로 정확히 또는 약 32℃, 35℃ 또는 37℃ 초과, 예를 들어 정확히 또는 약 37℃ ± 2℃의 온도, 예컨대 정확히 또는 약 37℃의 온도에서 수행된다.

[0203] 일부 실시양태에서, 세포는 접촉의 개시 전에, 예를 들어 형질도입의 개시 전에, 예컨대 항-CD3/항-CD28의 존재 하에 활성화제로 활성화되지 않는다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 복수의 휴지기 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 집단 내의 T 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 초과는 휴지기 T 세포, 예컨대 T 세포 활성화 마커, 예컨대 표면 마커 또는 세포내 시토카인 또는 다른 마커가 결여된 T 세포, 및/또는 세포 주기의 G0 또는 G1 단계에 있는 T 세포이다.

[0204] 특정한 측면에서, 제공된 방법은 접촉 및/또는 인큐베이션 전에 활성화의 필요 없이 T 세포에서 형질도입이 일어나게 한다. 일부 실시양태에서, 방법은 휴지기 또는 나이트 T 세포를 함유하는 T 세포의 집단을 먼저, 예를 들어 형질도입 전에 T 세포를 활성화 및/또는 자극하는 것 없이 바이러스 벡터로 형질도입하는 것을 포함한다. 일부 이러한 실시양태에서, 제공된 방법은 T 세포를 활성화 및/또는 자극하는 단계를 포함하지 않는, 입양 요법을 위한 세포, 예컨대 T 세포를 제조하는 데 사용될 수 있다.

[0205] 일부 실시양태에서, 세포는 일반적으로 진핵 세포, 예컨대 포유동물 세포이고, 전형적으로 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 혈액, 골수, 림프 또는 림프성 기관으로부터 유래되거나, 또는 면역계의 세포, 예컨대 선천성 또는 적응성 면역의 세포, 예를 들어 골수성 또는 림프성 세포, 예컨대 림프구, 전형적으로 T 세포 및/또는 NK 세포이다. 다른 예시적인 세포는 줄기 세포, 예컨대 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)를 비롯한 다능 및 만능 줄기 세포를 포함한다. 세포는 전형적으로 1차 세포, 예컨대 대상체로부터 직접 분리되고/거나 대상체로부터 분리되고 동결된 것이다. 일부 실시양태에서, 세포는 1차 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 인간 대상체로부터의 1차 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 T 세포 또는 다른 세포 유형의 1종 이상의 하위세트, 예컨대 전체 T 세포 집단, CD4+ 세포, CD8+ 세포, 및 그의 하위집단, 예컨대 기능, 활성화 상태, 성숙, 분화 잠재력, 확장, 재순환, 국제화 및/또는 지속 능력, 항원-특이성, 항원 수용체의 유형, 특정한 기관 또는 구획에서의 존재, 마커 또는 시토카인 분비 프로파일, 및/또는 분화 정도에 의해 정의되는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 CD3+ T 세포를 포함하거나 또는 그에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 세포는 CD4+ T 세포를 포함하거나 또는 그에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 세포는 CD8+ T 세포를 포함하거나 또는 그에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 세포는 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함한다. 치료될 대상체에 관하여, 세포는 동종 및/또는 자가일 수 있다. 방법 중에는 기성 방법이 포함된다. 일부 측면에서, 예컨대 기성 기술의 경우, 세포는 만능 및/또는 다능, 예컨대 줄기 세포, 예컨대 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)이다. 일부 실시양태에서, 방법은 본원에 기재된 바와 같이 대상체로부터 세포를 분리하고, 이를 제조, 프로세싱, 배양 및/또는 조작하고, 동결보존 전 또는 후에 이를 동일한 환자 내로 재도입하는 것을 포함한다.

[0206] T 세포 및/또는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 하위유형 및 하위집단 중에는 나이트 T (TN) 세포, 이펙터 T 세포 (TEFF), 기억 T 세포 및 그의 하위유형, 예컨대 줄기 세포 기억 T (TSCM), 중심 기억 T (TCM), 이펙터 기억 T (TEM), 또는 말단 분화 이펙터 기억 T 세포, 종양-침윤 림프구 (TIL), 미성숙 T 세포, 성숙 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 점막-연관 불변 T (MAIT) 세포, 자연 발생 및 적응 조절 T (Treg) 세포, 헬퍼 T 세포, 예컨대 TH1 세포, TH2 세포, TH3 세포, TH17 세포, TH9 세포, TH22 세포, 여포성 헬퍼 T 세포, 알파/베타 T 세포, 및 델타/감마 T 세포가 있다.

[0207] 일부 실시양태에서, 세포는 자연 킬러 (NK) 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 단핵구 또는 과립구, 예를 들어 골수 세포, 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 비만 세포, 호산구 및/또는 호염기구이다.

[0208] 일부 실시양태에서, 세포의 제조는 1회 이상의 배양 및/또는 제조 단계를 포함한다. 세포는 샘플, 예컨대 생물학적 샘플, 예를 들어 대상체로부터 수득되거나 유래된 것으로부터 분리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포가 분리되는 대상체는 질환 또는 상태를 갖거나 또는 세포 요법을 필요로 하거나 또는 세포 요법이 투여될 대상체이다. 일부 실시양태에서 대상체는 특정한 치료적 개입, 예컨대 세포를 분리, 프로세싱 및/또는 조작하는 입양 세포 요법을 필요로 하는 인간이다.

[0209] 따라서, 일부 실시양태에서 세포는 1차 세포, 예를 들어 1차 인간 세포이다. 샘플은 대상체로부터 직접 채취한 조직, 유체 및 다른 샘플, 뿐만 아니라 1종 이상의 프로세싱 단계, 예컨대 분리, 원심분리, 유전자 조작 (예를 들어, 바이러스 벡터로의 형질도입), 세척 및/또는 인큐베이션으로부터 생성된 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플은 생물학적 공급원으로부터 직접 수득된 샘플 또는 프로세싱된 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 체액, 예컨대 혈액, 혈장, 혈청, 뇌척수액, 활액, 소변 및 땀, 조직 및 기관 샘플, 예컨대 그로부터 유래된 프로세싱된 샘플을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0210] 일부 측면에서, 세포가 유래 또는 단리되는 샘플은 혈액 또는 혈액-유래 샘플이거나, 또는 분리반출술 또는 백혈구분리반출술 산물이거나 또는 그로부터 유래된 것이다. 예시적인 샘플은 전혈, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 백혈구, 골수, 흉선, 조직 생검, 종양, 백혈병, 림프종, 림프절, 장 연관 림프성 조직, 점막 연관 림프성 조직, 비장, 다른 림프성 조직, 간, 폐, 위, 장, 결장, 신장, 췌장, 유방, 골, 전립선, 자궁경부, 고환, 난소, 편도 또는 다른 기관, 및/또는 그로부터 유래된 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 PBMC이다. 샘플은 세포 요법, 예를 들어 입양 세포 요법과 관련하여 자가 및 동종 공급원으로부터의 샘플을 포함한다.
- [0211] 일부 실시양태에서, 세포는 세포주, 예를 들어 T 세포주로부터 유래된다. 일부 실시양태에서 세포는 이종 공급원, 예를 들어 마우스, 래트, 비-인간 영장류 또는 돼지로부터 취득된다.
- [0212] 일부 실시양태에서, 세포의 단리는 1개 이상의 제조 및/또는 비-친화도 기반 세포 분리 단계를 포함한다. 일부 예에서, 세포는, 예를 들어 원치않는 성분을 제거하거나, 목적하는 성분을 풍부화하거나, 특정한 시약에 감수성인 세포를 용해 또는 제거하기 위해, 1종 이상의 시약의 존재 하에 세척, 원심분리 및/또는 인큐베이션된다. 일부 예에서, 세포는 1종 이상의 특성, 예컨대 밀도, 부착 특성, 크기, 감수성 및/또는 특정한 성분에 대한 저항성에 기초하여 분리된다.
- [0213] 일부 예에서, 대상체의 순환 혈액으로부터의 세포는, 예를 들어 분리반출술 또는 백혈구분리반출술에 의해 취득된다. 샘플은, 일부 측면에서, T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구 및/또는 혈소판을 포함한 림프구를 함유하고, 일부 측면에서 적혈구 및 혈소판 이외의 세포를 함유한다.
- [0214] 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수집된 혈액 세포는, 예를 들어 혈장 분획을 제거하고 세포를 후속 프로세싱 단계를 위해 적절한 완충제 또는 배지에 넣기 위해 세척된다. 일부 실시양태에서, 세포는 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 세척된다. 일부 실시양태에서, 세척 용액은 칼슘 및/또는 마그네슘 및/또는 많은 또는 모든 2가 양이온이 결여되어 있다. 일부 측면에서, 세척 단계는 반자동화 "관통형" 원심분리기 (예를 들어, 코브(Cobe) 2991 셀 프로세서, 백스터(Baxter))에 의해 제조업체의 지침에 따라 달성된다. 일부 측면에서, 세척 단계는 겹선 흐름 여과 (TFF)에 의해 제조업체의 지침에 따라 달성된다. 일부 실시양태에서, 세포는 세척 후에 다양한 생체적합성 완충제, 예컨대 예를 들어 무 Ca^{++}/Mg^{++} PBS 중에 재현탁된다. 특정 실시양태에서, 혈액 세포 샘플의 성분은 제거되고, 세포는 배양 배지에 직접 재현탁된다.
- [0215] 일부 실시양태에서, 방법은 밀도-기반 세포 분리 방법, 예컨대 적혈구를 용해시키고 피콜 또는 피콜 구배를 통해 원심분리함으로써 말초 혈액으로부터 백혈구를 제조하는 것을 포함한다.
- [0216] 일부 실시양태에서, 제공된 방법을 수행하기 전에 세포를 풍부화하거나 선택할 필요는 없다.
- [0217] 일부 실시양태에서, 단리 방법은 1종 이상의 특이적 분자, 예컨대 표면 마커, 예를 들어 표면 단백질, 세포내 마커 또는 핵산의 세포 내 발현 또는 존재에 기초하여 상이한 세포 유형을 분리하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 마커에 기초한 분리를 위한 임의의 공지된 방법이 사용될 수 있다. 분리 방법은 가역적 시약 시스템, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 작용제 (예컨대 수용체 결합제 또는 선택제) 및 시약을 사용하는 방법을 포함한, 본원에 개시된 것 중 임의의 것을 포함할 수 있다.
- [0218] 일부 실시양태에서, 분리는 친화도- 또는 면역친화도-기반 분리이다. 예를 들어, 일부 측면에서 단리는 1종 이상의 마커, 전형적으로 세포 표면 마커의 세포 발현 또는 발현 수준에 기초한, 예를 들어 이러한 마커에 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 파트너와의 인큐베이션에 이은, 일반적으로 세척 단계, 및 항체 또는 결합 파트너에 결합되지 않은 세포로부터 항체 또는 결합 파트너에 결합된 세포를 분리하는 것에 의한, 세포 및 세포 집단의 분리를 포함한다.
- [0219] 이러한 분리 단계는 시약에 결합된 세포가 추가의 사용을 위해 보유되는 경우 양성 선택 및/또는 항체 또는 결합 파트너에 결합되지 않은 세포가 보유되는 경우 음성 선택에 기초할 수 있다. 일부 예에서, 둘 다의 분획은 추가의 사용을 위해 보유된다. 일부 측면에서, 음성 선택은 불균질 집단에서 세포 유형을 특이적으로 확인하는 항체가 이용가능하지 않은 경우에 특히 유용할 수 있으며, 이에 따라 분리는 목적하는 집단 이외의 다른 세포에 의해 발현된 마커에 기초하여 가장 잘 수행된다.
- [0220] 분리는 특정한 세포 집단 또는 특정한 마커를 발현하는 세포의 100% 풍부화 또는 제거를 유발할 필요는 없다. 예를 들어, 특정한 유형의 세포, 예컨대 마커를 발현하는 세포의 양성 선택 또는 풍부화는 이러한 세포의 수 또는 백분율을 증가시키는 것을 지칭하지만, 마커를 발현하지 않는 세포의 완전한 부재를 유발할 필요는 없다. 마찬가지로, 특정한 유형의 세포, 예컨대 마커를 발현하는 세포의 음성 선택, 제거 또는 고갈은 이러한 세포의

수 또는 백분율을 감소시키는 것을 지칭하지만, 모든 이러한 세포의 완전한 제거를 유발할 필요는 없다.

- [0221] 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 CD3⁺ T 세포에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물 중 세포의 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%는 CD3⁺ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 CD4⁺ T 세포에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물 중 세포의 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%는 CD4⁺ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 CD8⁺ T 세포에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물 중 세포의 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%는 CD8⁺ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물 중 세포의 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%는 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포이다.
- [0222] 일부 예에서, 다중 라운드의 분리 단계가 수행되며, 여기서 하나의 단계로부터 양성으로 또는 음성으로 선택된 분획은 또 다른 분리 단계, 예컨대 후속 양성 또는 음성 선택에 적용된다. 일부 예에서, 단일 분리 단계는, 예컨대 세포를 각각 음성 선택을 위해 표적화된 마커에 특이적인 복수의 항체 또는 결합 파트너와 함께 인큐베이션함으로써, 다중 마커를 발현하는 세포를 동시에 고갈시킬 수 있다. 마찬가지로, 다중 세포 유형은 세포를 다양한 세포 유형 상에서 발현된 복수의 항체 또는 결합 파트너와 함께 인큐베이션함으로써 동시에 양성 선택될 수 있다.
- [0223] 예를 들어, 일부 측면에서, T 세포의 특정 하위집단, 예컨대 양성 또는 높은 수준의 1종 이상의 표면 마커를 발현하는 세포, 예를 들어, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, 및/또는 CD45RO⁺ T 세포는 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 분리된다.
- [0224] 예를 들어, CD3⁺, CD28⁺ T 세포는 CD3/CD28 접합된 자기 비드 (예를 들어, 디나비즈® M-450 CD3/CD28 T 세포 확장제)를 사용하여 양성 선택될 수 있다.
- [0225] 일부 실시양태에서, 단리는 양성 선택에 의한 특정한 세포 집단의 풍부화 또는 음성 선택에 의한 특정한 세포 집단의 고갈에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 양성 또는 음성 선택은 각각 양성 또는 음성 선택된 세포 상에서 발현되거나 (마커⁺) 또는 비교적 더 높은 수준으로 발현된 (마커^고) 1종 이상의 표면 마커에 특이적으로 결합하는 1종 이상의 항체 또는 다른 결합제와 함께 세포를 인큐베이션함으로써 달성된다.
- [0226] 일부 실시양태에서, T 세포는 비-T 세포, 예컨대 B 세포, 단핵구 또는 다른 백혈구 상에서 발현된 마커, 예컨대 CD14의 음성 선택에 의해 PBMC 샘플로부터 분리된다. 일부 측면에서, CD4⁺ 또는 CD8⁺ 선택 단계가 CD4⁺ 헬퍼 및 CD8⁺ 세포독성 T 세포를 분리하는 데 사용된다. 이러한 CD4⁺ 및 CD8⁺ 집단은 1종 이상의 나이브, 기억 및/또는 이펙터 T 세포 하위집단에서 발현되거나 또는 비교적 더 높은 정도로 발현된 마커에 대한 양성 또는 음성 선택에 의해 하위집단으로 추가로 분류될 수 있다.
- [0227] 일부 실시양태에서, CD8⁺ 세포는, 예컨대 각각의 하위집단과 연관된 표면 항원에 기초한 양성 또는 음성 선택에 의해 나이브, 중심 기억, 이펙터 기억 및/또는 중심 기억 줄기 세포에 대해 추가로 풍부화되거나 또는 고갈된다. 일부 실시양태에서, 중심 기억 T (TCM) 세포에 대한 풍부화는 효능을 증가시키기 위해, 예컨대 투여 후 장기간 생존, 확장 및/또는 생착을 개선시키기 위해 수행되며, 이는 일부 측면에서 이러한 하위집단에서 특히 강건하다. 문헌 [Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82; Wang et al., (2012) J Immunother. 35(9):689-701]을 참조한다. 일부 실시양태에서, TCM-풍부화된 CD8⁺ T 세포와 CD4⁺ T 세포를 조합하는 것은 효능을 추가로 증진시킨다.
- [0228] 실시양태에서, 기억 T 세포는 CD8⁺ 말초 혈액 림프구의 CD62L⁺ 및 CD62L⁻ 하위세트 둘 다에 존재한다. PBMC는 예컨대 항-CD8 및 항-CD62L 항체를 사용하는 것에 의해 CD62L-CD8⁺ 및/또는 CD62L+CD8⁺ 분획이 풍부화되거나 또는 고갈될 수 있다.
- [0229] 일부 실시양태에서, 중심 기억 T (TCM) 세포에 대한 풍부화는 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 및/또는 CD 127의 양성 또는 높은 표면 발현에 기초하고; 일부 측면에서, 이는 CD45RA 및/또는 그랜자임 B를 발현하거나 또는 고도로 발현하는 세포에 대한 음성 선택에 기초한다. 일부 측면에서, TCM 세포에 대해 풍부화된 CD8⁺ 집단의 단리는 CD4, CD14, CD45RA를 발현하는 세포의 고갈, 및 CD62L을 발현하는 세포에 대한 양성 선택 또는 풍부화에 의해 수행된다. 한 측면에서, 중심 기억 T (TCM) 세포에 대한 풍부화는 CD4 발현에 기초하여 선택된 세포의 음성 분획으로 출발하여 수행되며, CD14 및 CD45RA의 발현에 기초한 음성 선택 및 CD62L에 기초한 양성 선택이 적용된다. 이러한 선택은 일부 측면에서 동시에 수행되고, 다른 측면에서 임의의 순서로 순차적으로 수행된다.

일부 측면에서, CD4+ 세포 집단 또는 하위집단을 제조하는 데 사용된 동일한 CD4 발현-기반 선택 단계는 또한 CD4+ 세포 집단 또는 하위집단을 생성하는 데 사용되어, CD4-기반 분리로부터의 양성 및 음성 분획 둘 다가 보유되고, 이는 임의로 1개 이상의 추가의 양성 또는 음성 선택 단계 후에 방법의 후속 단계에 사용된다.

- [0230] 특정한 예에서, PBMC의 샘플 또는 다른 백혈구 샘플이 CD4+ 세포의 선택에 적용되며, 여기서 둘 다의 음성 및 양성 분획이 보유된다. 이어서, 음성 분획은 CD14 및 CD45RA 또는 CD19의 발현에 기초한 음성 선택 및 중심 기억 T 세포의 특징적인 마커, 예컨대 CD62L 또는 CCR7에 기초한 양성 선택에 적용되며, 여기서 양성 및 음성 선택은 어느 순서로든 수행된다.
- [0231] CD4+ T 헬퍼 세포는 세포 표면 항원을 갖는 세포 집단을 확인함으로써 나이트, 중심 기억 및 이펙터 세포로 분류된다. CD4+ 림프구는 표준 방법에 의해 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 나이트 CD4+ T 림프구는 CD45RO-, CD45RA+, CD62L+, CD4+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 중심 기억 CD4+ 세포는 CD62L+ 및 CD45RO+이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 CD4+ 세포는 CD62L- 및 CD45RO-이다.
- [0232] 한 예에서, 음성 선택에 의해 CD4+ 세포를 풍부화하기 위해, 모노클로날 항체 콕테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 결합 파트너는 양성 및/또는 음성 선택을 위한 세포의 분리를 가능하게 하기 위해 고체 지지체 또는 매트릭스, 예컨대 자기 비드 또는 상자성 비드에 결합된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 세포 및 세포 집단은 면역자기 (또는 친화도자기) 분리 기술을 사용하여 분리 또는 단리된다 (문헌 [Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ]에서 검토됨).
- [0233] 일부 측면에서, 분리될 세포의 샘플 또는 조성물은 작은, 자화성 또는 자기 반응성 물질, 예컨대 자기 반응성 입자 또는 마이크로입자, 예컨대 상자성 비드 (예를 들어, 예컨대 디날비즈(Dynalbeads) 또는 MACS 비드)와 함께 인큐베이션된다. 자기 반응성 물질, 예를 들어 입자는 일반적으로 분리가 요망되는, 예를 들어 음성 또는 양성 선택이 요망되는 세포, 세포들 또는 세포 집단 상에 존재하는 분자, 예를 들어 표면 마커에 특이적으로 결합하는 결합 파트너, 예를 들어 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 부착된다.
- [0234] 일부 실시양태에서, 자기 입자 또는 비드는 특이적 결합 구성원, 예컨대 항체 또는 다른 결합 파트너에 결합된 자기 반응성 물질을 함유한다. 자기 분리 방법에 사용되는 다수의 널리 공지된 자기 반응성 물질이 존재한다. 적합한 자기 입자는 미국 특허 번호 4,452,773 (Molday) 및 유럽 특허 명세서 EP 452342 B에 기재된 것을 포함하며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 미국 특허 번호 4,795,698 (Owen) 및 미국 특허 번호 5,200,084 (Liberti et al.)에 기재된 것과 같은 콜로이드 크기의 입자는 다른 예이다.
- [0235] 인큐베이션은 일반적으로 자기 입자 또는 비드에 부착된 항체 또는 결합 파트너, 또는 분자, 예컨대 이러한 항체 또는 결합 파트너에 특이적으로 결합하는 2차 항체 또는 다른 시약이, 샘플 내의 세포 상에 존재하는 경우에 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 조건 하에 수행된다.
- [0236] 일부 측면에서, 샘플은 자기장에 배치되고, 자기 반응성 또는 자화성 입자가 부착된 세포는 자석에 유인되어 비표지된 세포로부터 분리될 것이다. 양성 선택의 경우, 자석에 유인된 세포가 보유되고; 음성 선택의 경우, 유인되지 않은 세포 (비표지된 세포)가 보유된다. 일부 측면에서, 양성 및 음성 선택의 조합은 동일한 선택 단계 동안 수행되며, 여기서 양성 및 음성 분획이 보유되고 추가로 프로세싱되거나 또는 추가의 분리 단계에 적용된다.
- [0237] 세포로부터 자화성 입자를 제거하는 방법은 공지되어 있고, 예를 들어 경쟁 비-표지된 항체, 자화성 입자 또는 절단가능한 링커에 접합된 항체 등의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 자화성 입자는 생분해성이다.
- [0238] 일부 실시양태에서, 친화도-기반 선택은 자기-활성화 세포 분류 (MACS) (밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotech), 캘리포니아주 오번)를 통한 것이다. 자기 활성화 세포 분류 (MACS) 시스템은 그에 부착된 자화된 입자를 갖는 세포의 고순도 선택이 가능하다. 특정 실시양태에서, MACS는 비-표적 및 표적 종이 외부 자기장의 인가 후에 순차적으로 용리되는 방식으로 작동한다. 즉, 자화된 입자에 부착된 세포는 제자리에 유지되는 반면, 비부착된 종은 용리된다. 이어서, 이러한 제1 용리 단계가 완료된 후에, 자기장에 포획되고 용리되는 것이 방지된 종은 이들이 용리되고 회수될 수 있도록 일부 방식으로 용리된다. 특정 실시양태에서, 비-표적 세포는 표지되고, 불균질 세포 집단으로부터 고갈된다.
- [0239] 특정 실시양태에서, 단리 또는 분리는 방법의 단리, 세포 제조, 분리, 프로세싱, 인큐베이션, 배양 및/또는 제제화 단계 중 1개 이상을 수행하는 시스템, 디바이스 또는 장치를 사용하여 수행된다. 일부 측면에서, 시스템

은 예를 들어 오류, 사용자 취급 및/또는 오염을 최소화하기 위해 폐쇄 또는 멸균 환경에서 각각의 이들 단계를 수행하는 데 사용된다. 한 예에서, 시스템은 국제 특허 출원 공개 번호 WO2009/072003, 또는 US 20110003380 A1에 기재된 바와 같은 시스템이다.

[0240] 일부 실시양태에서, 시스템 또는 장치는 단리, 프로세싱 및/또는 제제화 단계 중 1개 이상, 예를 들어 모두를 통합형 또는 독립형 시스템에서 및/또는 자동화된 또는 프로그램가능한 방식으로 수행한다. 일부 측면에서, 시스템 또는 장치는 시스템 또는 장치와 통신하는 컴퓨터 및/또는 컴퓨터 프로그램을 포함하며, 이는 사용자가 프로세싱, 단리, 조작 및 제제화 단계의 다양한 측면을 프로그래밍, 제어, 결과 평가 및/또는 조정하게 한다.

[0241] 일부 측면에서, 분리 및/또는 다른 단계는, 예를 들어 폐쇄 및 멸균 시스템에서 임상-규모 수준으로의 세포의 자동화된 분리를 위해, 클리니맥스(CliniMACS) 시스템 (밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec))을 사용하여 수행된다. 특정 실시양태에서, 분리 및/또는 다른 단계는 클리니맥스 프로디지 시스템 (밀테니 바이오텍)을 사용하여 수행된다. 일부 측면에서 클리니맥스 프로디지 시스템에는 원심분리에 의한 세포의 자동화된 세척 및 분획화를 허용하는 세포 프로세싱 유닛이 장착되어 있다.

[0242] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포 집단은 다중 세포 표면 마커에 대해 염색된 세포가 유체 스트림으로 운반되는 유동 세포측정법을 통해 수집되고 풍부화된다 (또는 고갈된다). 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포 집단은 정제용 규모 (FACS)-분류를 통해 수집되고 풍부화된다 (또는 고갈된다). 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 세포 집단은 FACS-기반 검출 시스템과 조합된 마이크로전기기계 시스템 (MEMS) 칩의 사용에 의해 수집되고 풍부화된다 (또는 고갈된다) (예를 들어, WO 2010/033140, 문헌 [Cho et al., (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; 및 Godin et al., (2008) J Biophoton. 1(5):355-376] 참조). 둘 다의 경우에서, 세포는 다중 마커에 의해 표지되어, 잘-규정된 T 세포 하위세트의 고순도로의 단리를 가능하게 할 수 있다.

[0243] 일부 실시양태에서, 제조 방법은 단리, 인큐베이션 및/또는 유전자 조작 전 또는 후에 세포를 동결, 예를 들어 동결보존하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 동결 및 후속 해동 단계는 세포 집단에서 과립구를 제거하고, 어느 정도의 단핵구를 제거한다. 일부 실시양태에서, 세포는, 예를 들어 혈장 및 혈소판을 제거하기 위한 세척 단계 후에 동결 용액 중에 현탁된다. 일부 측면에서 다양한 공지된 동결 용액 및 파라미터 중 임의의 것이 사용될 수 있다. 한 예는 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민 (HSA)을 함유하는 PBS, 또는 다른 적합한 세포 동결 배지를 사용하는 것을 수반한다. 이어서, 이는 DMSO 및 HSA의 최종 농도가 각각 10% 및 4%가 되도록 배지에 의해 1:1 희석된다. 이어서, 세포는 분당 1°의 속도로 -80℃로 동결되고, 액체 질소 저장 탱크의 증기 상에 저장된다.

[0244] ii. 바이러스 벡터 입자

[0245] 일부 실시양태에서, T 세포를 포함하는 세포 조성물은 본원에 제공된 방법 중 임의의 것에 의해 바이러스 벡터 입자, 예컨대 섹션 IV에 기재된 것 중 임의의 것으로 형질도입된다.

[0246] 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터는 조성물로 원심분리기에 로딩된다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터 입자를 포함하는 조성물의 부피는 약 1 mL, 약 2 mL, 약 3 mL, 약 4 mL, 약 5 mL, 약 6 mL, 약 7 mL, 약 8 mL, 약 9 mL, 약 10 mL, 약 11 mL, 약 12 mL, 약 13 mL, 약 14 mL, 약 15 mL, 약 16 mL, 약 17 mL, 약 18 mL, 약 19 mL, 또는 약 20 mL이다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터를 포함하는 조성물의 부피는 약 5 mL이다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터를 포함하는 조성물의 부피는 약 10 mL이다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터를 포함하는 조성물의 부피는 약 15 mL이다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터를 포함하는 조성물의 부피는 약 20 mL이다.

[0247] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자는 투입 조성물 중 세포의 총수당 (IU/세포) 또는 형질도입될 세포의 총수당 바이러스 벡터 입자 카피의 특정 비 또는 그의 감염 단위 (IU)로 제공된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 세포 1개당 정확히 또는 약 또는 적어도 정확히 또는 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 또는 60 IU의 바이러스 벡터 입자로 접촉하는 동안 존재한다.

[0248] 일부 실시양태에서, 형질도입은 100 미만, 예컨대 일반적으로 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5 미만 또는 그 미만의 감염 다중도 (MOI)로 달성될 수 있다.

[0249] B. 산출 조성물

[0250] 일부 실시양태에서, 방법은 유전자 조작된 T 세포에 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하여 유전자 조작된 T 세포를 포함하는 산출 조성물을 생산하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물은 예컨대 세포 요법에서

의 하류 사용을 위해 수집 또는 수거된다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 및 제3 유량은 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 유전자 조작된 T 세포에 적용된다. 일부 실시양태에서, 유전자 조작된 세포에 대한 제3 원심력 및 제3 유량의 적용은 산출 조성물의 수집 또는 수거를 가능하게 한다.

- [0251] 일부 실시양태에서, 산출 조성물은 캐놀라를 통해 수집된다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물은 원추형 유체 인클로저의 팁의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부로 진입하고, 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부에서 배출된다.
- [0252] 일부 실시양태에서, 방법은 산출 조성물을 동결보존하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 세포의 수준은 동결보존된 산출 조성물 중에서 유지된다. 일부 실시양태에서, 방법은 동결보존된 산출 조성물을 해동시키는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 세포의 수준은 해동된 산출 조성물 중에서 유지된다.
- [0253] 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,000 G 내지 약 3,000 G이다.
- [0254] 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,000 G 내지 약 3,000 G, 약 2,200 G 내지 약 2,800 G, 또는 약 2,400 G 내지 약 2,600 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,100 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,200 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,300 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,400 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,600 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,700 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,800 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,900 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 3,000 G이다.
- [0255] 일부 실시양태에서, 제3 유량은 방사상 외향이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 원추형 유체 인클로저의 팁을 향한다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 및 제3 유량은 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 방향이다.
- [0256] 일부 실시양태에서, 제3 유량은 원추형 유체 인클로저를 통한 배지의 유동에 의해 유발된다. 일부 실시양태에서, 원추형 유체 인클로저를 통한 배지의 유동은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부로부터 팁까지이다. 일부 실시양태에서, 배지는 원추형 유체 인클로저의 팁에서 배출되어 캐놀라에 진입한다.
- [0257] 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 10 mL/분 내지 약 30 mL/분, 약 12 mL/분 내지 약 28 mL/분, 약 15 mL/분 내지 약 25 mL/분, 또는 약 18 mL/분 내지 약 22 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 15 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 16 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 17 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 18 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 19 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 20 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 21 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 22 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 23 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 24 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 15 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 25 mL/분이다.
- [0258] 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 15 mL/분 내지 약 25 mL/분이다. 일부 실시양태에서, (i) 제3 원심력은 약 2,000 G 내지 약 3,000 G이고; (ii) 제3 유량은 약 15 mL/분 내지 약 25 mL/분이다.
- [0259] 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 100 내지 약 150, 약 110 내지 140, 또는 약 120 내지 130이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 100이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 105이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 110이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 115이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 120이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 125이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 130이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 135이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 140이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 145이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 150이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,500 G이고, 제3 유량은 약 20 mL/분이다.
- [0260] 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 100 내지 약 150이다.
- [0261] 일부 실시양태에서, 방법은 산출 조성물의 세포를 동결보존하여 동결보존된 조성물을 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 동결보존은 세포를 동결보호제를 포함하는 배지 중에 현탁시키고, 세포를 동결시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 동결은 속도 제어 동결기에서 이루어진다. 일부 실시양태에서, 방법은 동결보

존된 세포 조성물을 해동시키는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 방법은 해동된 세포를 제제화하여 약물 생성물로서 투여하기 위한 세포 조성물을 제조하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 해동은 동결보존된 세포 조성물이 적어도 1일 동안 동결된 후에 수행된다. 일부 실시양태에서, 해동은 동결보존된 세포 조성물이 적어도 2일 동안 동결된 후에 수행된다. 일부 실시양태에서, 해동은 동결보존된 세포 조성물이 적어도 3일 동안 동결된 후에 수행된다. 일부 실시양태에서, 해동은 동결보존된 세포 조성물이 적어도 1주, 10일, 2주, 또는 1개월 동안 동결된 후에 수행된다. 일부 실시양태에서, 해동은 동결보존된 세포 조성물이 최대 10일, 2주, 1개월, 2개월, 3개월, 또는 6개월 동안 동결된 후에 수행된다.

[0262] C. 다른 프로세싱 단계

[0263] 일부 실시양태에서, 예컨대 세포 조작과 관련된 형질도입을 위한 프로세싱 단계는 세포의 세척, 배양, 양성, 자극, 활성화, 증식 및/또는 제제화를 추가적으로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 조작된 세포는 산출 조성물로서 수집되기 전에 1회 이상의 세척 단계에 적용된다. 일부 실시양태에서, 수집된 산출 조성물은 자극 조건 또는 자극제의 존재 하에 인큐베이션된다. 이러한 조건은 집단에서 세포의 증식, 확장, 활성화 및/또는 생존을 유도하고/거나 항원 노출을 모방하도록 설계된 것을 포함한다. 자극은 대상체에게 투여한 후에 생체 외 또는 생체 내에서 수행될 수 있다.

[0264] i. 세척

[0265] 일부 실시양태에서, 유전자 조작된 세포에 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하기 전에, 방법은 유전자 조작된 세포를 1회 이상의 세척 단계에 적용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 세척 단계는 비-생존 세포를 제거한다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 세척 단계는 불순물 (예를 들어, 단백질, DNA, 세포 파편, 시약)을 제거한다.

[0266] 일부 실시양태에서, 1회 이상의 세척 단계는 약 500 G 내지 약 3,000 G의 원심력을 적용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 원심력은 약 500 G이다. 일부 실시양태에서, 원심력은 약 1,000 G이다. 일부 실시양태에서, 원심력은 약 1,500 G이다. 일부 실시양태에서, 원심력은 약 2,000 G이다. 일부 실시양태에서, 원심력은 약 2,500 G이다. 일부 실시양태에서, 원심력은 약 3,000 G이다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 세척 단계는 약 20 mL/분 내지 약 100 mL/분의 유량을 적용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 유량은 약 20 mL/분, 약 30 mL/분, 약 40 mL/분, 약 50 mL/분, 약 60 mL/분, 약 70 mL/분, 약 80 mL/분, 약 90 mL/분, 또는 약 100 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 유량은 약 30 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 유량은 약 35 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 유량은 약 40 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 유량은 약 45 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 유량은 약 50 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 유량은 약 55 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 유량은 약 60 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 유량은 약 65 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 유량은 약 70 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 유량은 약 75 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 유량은 약 80 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 유량은 약 85 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 유량은 약 90 mL/분이다.

[0267] 일부 실시양태에서, 1회 이상의 세척 단계는 원심력 (G) 및 유량 (FR)을 약 20 G/FR 내지 약 80 G/FR의 비로 적용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 세척 단계는 약 20, 약 25, 약 30, 약 35, 약 40, 약 45, 약 50, 약 55, 약 60, 약 65, 약 70, 또는 약 75의 G/F 비를 적용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 일부 실시양태에서, G/FR 비는 약 62.5 G/FR이다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 세척 단계는 약 2,500 G의 원심력 및 약 40 mL/분의 유량을 적용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, G/FR 비는 약 33.3 G/FR이다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 세척 단계는 약 2,500 G의 원심력 및 약 75 mL/분의 유량을 적용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, G/FR 비는 약 35 G/FR이다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 세척 단계는 약 1,000 G의 원심력 및 약 28.5 mL/분의 유량을 적용하는 것을 포함한다.

[0268] 일부 실시양태에서, 유전자 조작된 세포는 1회 이상의 세척 단계 전에 원심분리기 내의 배지에 현탁된다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 세척 단계는 배지 교환을 포함한다. 따라서, 일부 측면에서, 배지는 1회 이상의 세척 단계 동안 상이한 용액으로 교환된다. 일부 실시양태에서, 비-생존 세포는 1회 이상의 세척 단계 동안 분리된다. 일부 실시양태에서, 비-생존 세포는 1회 이상의 세척 단계 동안 폐기물 분획으로서 수집된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 세포는 1회 이상의 세척 단계 동안 형질도입된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 세포 조성물의 세포는 형질도입되고 동시에 세척된다.

[0269] ii. 세포의 형질도입후 활성화 및/또는 확장

[0270] 일부 실시양태에서, 세포, 예를 들어 수집된 산출 조성물은 유전자 조작과 관련하여 추가로 인큐베이션되고/거

나 추가로 배양된다. 인큐베이션 단계는 배양, 양성, 자극, 활성화 및/또는 증식을 포함할 수 있다. 일부 이러한 실시양태에서, 추가의 인큐베이션은 세포 중 1개 이상의 숙주 계층 내로의 바이러스 벡터의 통합을 발생시키는 조건 하에 수행된다. 인큐베이션 및/또는 조작은 배양 용기, 예컨대 유닛, 챔버, 웰, 칼럼, 튜브, 튜빙 세트, 벨브, 바이알, 배양 접시, 백, 또는 세포 배양 또는 양성을 위한 다른 용기에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물 또는 세포는 자극 조건 또는 자극제의 존재 하에 인큐베이션된다. 이러한 조건은 집단에서 세포의 증식, 확장, 활성화 및/또는 생존을 유도하고/거나, 항원 노출을 모방하고/거나, 유전자 조작, 예컨대 재조합 항원 수용체의 도입을 위해 세포를 프라임하도록 설계된 것을 포함한다.

[0271] 일부 실시양태에서, 추가의 인큐베이션은 실온 초과, 예컨대 정확히 또는 약 25°C 초과, 예컨대 일반적으로 정확히 또는 약 32°C, 35°C 또는 37°C 초과 온도에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 추가의 인큐베이션은 정확히 또는 약 37°C ± 2°C의 온도, 예컨대 정확히 또는 약 37°C의 온도에서 수행된다.

[0272] 일부 실시양태에서, 추가의 인큐베이션은 세포의 자극 및/또는 활성화를 위한 조건 하에 수행되며, 이러한 조건은 특정한 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 작용제, 예를 들어 영양소, 아미노산, 항생제, 이온, 및/또는 자극 인자, 예컨대 시토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체, 및 세포를 활성화시키도록 설계된 임의의 다른 작용제 중 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0273] 일부 실시양태에서, 자극 조건 또는 작용제는 TCR 복합체의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 1종 이상의 작용제 (예를 들어, 자극제 및/또는 보조제), 예를 들어 리간드를 포함한다. 일부 측면에서, 작용제는 T 세포에서 TCR/CD3 세포내 신호전달 캐스케이드를 켜거나 개시하며, 예컨대 1차 신호를 전달하는 데, 예를 들어 ITAM-유도된 신호의 활성화를 개시하는 데 적합한 작용제, 예컨대 TCR 성분에 특이적인 것, 및/또는 공동자극 신호를 촉진하는 작용제, 예컨대 T 세포 공동자극 수용체에 특이적인 것, 예를 들어 임의로 고체 지지체, 예컨대 비드에 결합된, 예를 들어 항-CD3, 항-CD28, 또는 항-41-BB, 및/또는 1종 이상의 시토카인이 있다. 자극제 중에는 항-CD3/항-CD28 비드 (예를 들어, 디나비즈® M-450 CD3/CD28 T 세포 확장제, 및/또는 엑스펙트 (ExpACT)® 비드)가 있다. 임의로, 확장 방법은 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체를 배양 배지에 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 자극제는 IL-2 및/또는 IL-15, 예를 들어 적어도 약 10 유닛/mL의 IL-2 농도를 포함한다.

[0274] 일부 실시양태에서, 자극 조건 또는 작용제는 TCR 복합체의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 1종 이상의 작용제, 예를 들어 리간드를 포함한다. 일부 측면에서, 작용제는 T 세포에서 TCR/CD3 세포내 신호전달 캐스케이드를 켜거나 개시한다. 이러한 작용제는 항체, 예컨대 TCR 성분 및/또는 공동자극 수용체에 특이적인 것, 예를 들어 고체 지지체, 예컨대 비드에 결합된, 예를 들어 항-CD3, 항-CD28, 및/또는 1종 이상의 시토카인을 포함할 수 있다. 임의로, 확장 방법은 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체를 배양 배지에 (예를 들어, 적어도 약 0.5 ng/mL의 농도로) 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 자극제는 IL-2 및/또는 IL-15, 예를 들어, 적어도 약 10 유닛/mL, 적어도 약 50 유닛/mL, 적어도 약 100 유닛/mL 또는 적어도 약 200 유닛/mL의 IL-2 농도를 포함한다.

[0275] 조건은 특정한 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 작용제, 예를 들어 영양소, 아미노산, 항생제, 이온, 및/또는 자극 인자, 예컨대 시토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체, 및 세포를 활성화시키도록 설계된 임의의 다른 작용제 중 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0276] 일부 측면에서, 인큐베이션은 미국 특허 번호 6,040,177 (Riddell et al.), 문헌 [Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al., (2012) Blood.1:72-82, 및/또는 Wang et al., (2012) J Immunother. 35(9):689-701]에 기재된 것과 같은 기술에 따라 수행된다.

[0277] 일부 실시양태에서, 추가의 인큐베이션은 원심분리에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 추가의 인큐베이션은 회전 또는 원심분리 없이 수행되며, 이는 일반적으로 산출 조성물의 수집에 후속해서 수행된다. 일부 실시양태에서, 추가의 인큐베이션은 고정상의 외부에서, 예컨대 크로마토그래피 매트릭스의 외부에서, 예를 들어 용액 중에서 수행된다.

[0278] 일부 실시양태에서, 추가의 인큐베이션은 접촉이 일어난 것과 상이한 용기 또는 장치에서, 예컨대 원심분리에 후속하여 세포, 예를 들어 수집된 산출 조성물을 상이한 용기 또는 장치로 전달, 예를 들어 자동 전달하는 것에 의해 수행된다.

[0279] 일부 실시양태에서, 유전자 조작된 T 세포는 배양-개시 조성물에 피더 세포, 예컨대 비-분열 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 첨가하고 (예를 들어, 생성된 세포 집단이 확장될 초기 집단 내의 각각의 T 림프구에 대해 적어도

약 5, 10, 20, 또는 40개 또는 그 초과 PBMC 피더 세포를 함유하도록); 배양물을 (예를 들어, T 세포의 수를 확장시키기에 충분한 시간 동안) 인큐베이션함으로써 확장된다. 일부 측면에서, 비-분열 피더 세포는 감마-조사된 PBMC 피더 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, PBMC는 세포 분열을 방지하기 위해 약 3000 내지 3600 rad 범위의 감마선으로 조사된다. 일부 측면에서, 피더 세포는 유전자 조작된 T 세포의 집단의 첨가 전에 배양 배지에 첨가된다.

[0280] 일부 실시양태에서, 자극 조건은 인간 T 림프구의 성장에 적합한 온도, 예를 들어, 적어도 약 25℃, 일반적으로 적어도 약 30℃, 및 일반적으로 정확히 또는 약 37℃를 포함한다. 임의로, 인큐베이션은 피더 세포로서 비-분열 바이러스-형질전환된 림프모구양 세포 (LCL)를 첨가하는 것을 추가로 포함할 수 있고, 예를 들어 바이러스는 EBV, CMV, 또는 인플루엔자일 수 있고, 형질전환된 LCL은 임의로 MHC와 관련하여 그의 표면 상에 바이러스-유래 항원을 제시한다. 일부 실시양태에서, T 세포는 바이러스 항원을 인식하는 TCR을 발현한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 항원은 EBV, CMV 또는 인플루엔자로부터의 것일 수 있다. LCL은 약 6000 내지 10,000 rad 범위의 감마선으로 조사될 수 있다. 일부 측면에서 LCL 피더 세포는 임의의 적합한 양, 예컨대 적어도 약 10:1의 LCL 피더 세포 대 초기 T 림프구의 비로 제공된다.

[0281] 일부 실시양태에서, 예를 들어 생체의 확장을 용이하게 하기 위한 추가의 배양 또는 인큐베이션은 정확히 또는 약 24시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일 또는 15일 초과 동안 수행된다. 일부 실시양태에서, 추가의 배양 또는 인큐베이션은 6일 이하, 5일 이하, 4일 이하, 3일 이하, 2일 이하 또는 24시간 이하 동안 수행된다.

[0282] 일부 실시양태에서, 예를 들어 자극제와의 인큐베이션의 총 지속기간은 정확히 또는 약 1시간 내지 96시간, 1시간 내지 72시간, 1시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 8시간 내지 30시간 또는 12시간 내지 24시간, 예컨대 적어도 또는 약 적어도 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간 또는 72시간이다. 일부 실시양태에서, 추가의 인큐베이션은 정확히 또는 약 1시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 8시간 내지 30시간 또는 12시간 내지 24시간 (경계값 포함)의 시간 동안 수행된다.

[0283] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 추가의 배양 또는 인큐베이션을 포함하지 않고, 예를 들어 생체의 확장 단계를 포함하지 않거나, 또는 실질적으로 더 짧은 생체의 확장 단계를 포함한다.

[0284] 일부 실시양태에서, 세포 조작, 예를 들어 선택 및/또는 풍부화, 형질도입과 관련된 인큐베이션 및/또는 추가의 배양 또는 양성의 전체 과정은 대상체로부터 샘플을 수득한 후 9일 초과, 8일 이하, 7일 이하, 6일 이하, 5일 이하, 4일 이하, 3일 이하, 2일 이하 또는 1일 이하의 기간 내에 수행된다. 이러한 시기는 세포가 동결보존에 적용되는 임의의 기간은 포함하지 않는 것으로 이해된다.

[0285] 본원에 제공된 방법의 일부 실시양태에서, 조작된 세포, 예를 들어 산출 조성물 또는 제제화된 조성물은 유의한 생체의 확장 없이 형질도입 후 즉시 또는 형질도입 직후에 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포는 형질도입 단계 후 즉시 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포는 형질도입 단계 후 즉시, 예를 들어 유의한 시험관내 활성화, 확장 및/또는 풍부화를 필요로 할 수 있는 통상적인 방법에서와 달리 유의한 생체의 확장 또는 실질적으로 더 짧은 생체의 확장 없이 투여될 수 있다. 예를 들어, 본원에 제공된 방법의 일부 실시양태에서, 조작된 세포는 형질도입의 3, 2 또는 1일 내에 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포는 형질도입 단계의 48, 36, 24, 20, 16, 12, 8, 4, 2, 1시간 또는 그 미만 내에 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포는 통상적인 방법보다, 예를 들어 48, 36, 24, 20, 16, 12, 8, 4, 2, 1시간 또는 그 미만 동안 실질적으로 더 짧은 시험관내 확장에 적용된다.

[0286] 이러한 실시양태 중 임의의 것에서, 세포의 확장 및/또는 활성화는 생체내에서 항원에 대한 노출 후에 이루어질 수 있고, 예를 들어 세포의 투여 후 대상체의 신체에서 조작된 세포의 확장이 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 생체내 확장의 범위, 정도 또는 규모는 투여된 세포, 예를 들어 제조할 수용체 발현 세포의 예를 들어 증가, 확장, 증식, 생존 및/또는 효능을 조정할 수 있는 다양한 방법에 의해 추가로 증대, 부스팅 또는 증진될 수 있다.

[0287] 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 분자의 발현 또는 활성을 변경 (예를 들어, 증가 또는 감소)시키기 위해 작용제, 예를 들어 핵산으로 추가로 변형된 조작된 세포의 투여를 수반하는 것을 포함하며, 여기서 이러한 변경된 발현 또는 활성은 투여된 세포의 확장, 증식, 생존 및/또는 효능을 증대, 부스팅 또는 증진시킨다. 일부 실시양태에서, 작용제, 예를 들어 핵산의 발현은 예컨대 유도제 또는 다른 조정 분자의 투여에 의해 유도가능하고/거나, 억제가능하고/거나, 조절가능하고/거나, 사용자 제어된다.

- [0288] 일부 실시양태에서, 이러한 방법은 투여된 세포, 예를 들어 재조합 수용체 발현 세포의 확장, 증식, 생존 및/또는 효능을 증대, 부스팅 또는 증진시킬 수 있는 약물 또는 작용제와의 조합 투여, 예를 들어 동시 또는 순차적 투여를 수반하는 방법을 포함한다.
- [0289] iii. 제제화
- [0290] 일부 실시양태에서, 추가의 인큐베이션에 후속하여, 세포를 제조하는 방법은 세포를 제제화하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 프로세싱 단계 중에는 이러한 조성물을 제제화하는 것을 포함할 수 있다.
- [0291] 또한, 일부 실시양태에서 제공된 프로세싱 방법과 관련하여, 예컨대 다른 프로세싱 단계가 수행되는 폐쇄 시스템에서, 예컨대 자동화 또는 부분 자동화 방식으로 제제화된, 이러한 방법에 사용하기 위한 제약 조성물 또는 제제가 제공된다.
- [0292] 일부 실시양태에서, 세포 및 조성물은 제약 조성물 또는 제제, 예컨대 세포 또는 세포 집단 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물의 형태로 대상체에게 투여된다.
- [0293] 용어 "제약 제제"는 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이라도 하는 형태로 존재하고, 제제가 투여될 대상체에게 허용되지 않는 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제조물을 지칭한다.
- [0294] 일부 실시양태에서 제약 조성물은 다른 제약 활성제 또는 약물, 예컨대 화학요법제, 예를 들어 아스파라기나제, 부술판, 카르보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 겐시타빈, 히드록시우레아, 메토틱세이트, 파클리탁셀, 리톡시맙, 빈블라스틴, 빈크리스틴 등을 추가적으로 포함한다. 일부 실시양태에서, 작용제는 염, 예를 들어 제약상 허용되는 염의 형태로 투여된다. 적합한 제약상 허용되는 산 부가염은 무기산, 예컨대 염산, 브로민화수소산, 인산, 메타인산, 질산 및 황산, 및 유기산, 예컨대 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 말산, 락트산, 푸마르산, 벤조산, 글리콜산, 글루콘산, 숙신산 및 아릴술폰산, 예를 들어 p-톨루엔술폰산으로부터 유도된 것을 포함한다.
- [0295] "제약상 허용되는 담체"는 대상체에게 비독성인, 활성 성분 이외의 제약 제제 내의 성분을 지칭한다. 제약상 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0296] 일부 측면에서, 담체의 선택은 부분적으로 특정한 세포에 의해 및/또는 투여 방법에 의해 결정된다. 따라서, 다양한 적합한 제제가 존재한다. 예를 들어, 제약 조성물은 보존제를 함유할 수 있다. 적합한 보존제는, 예를 들어 메틸파라벤, 프로필파라벤, 벤조산나트륨 및 벤즈알코늄 클로라이드를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 2종 이상의 보존제의 혼합물이 사용된다. 보존제 또는 그의 혼합물은 전형적으로 전체 조성물의 약 0.0001 중량% 내지 약 2 중량%의 양으로 존재한다. 담체는, 예를 들어 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재되어 있다. 제약상 허용되는 담체는 일반적으로 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 향산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 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 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 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 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0297] 일부 측면에서 완충제가 조성물에 포함된다. 적합한 완충제는, 예를 들어 시트르산, 시트르산나트륨, 인산, 인산칼륨, 및 다양한 다른 산 및 염을 포함한다. 일부 측면에서, 2종 이상의 완충제의 혼합물이 사용된다. 완충제 또는 그의 혼합물은 전형적으로 전체 조성물의 약 0.001 중량% 내지 약 4 중량%의 양으로 존재한다. 투여가 능한 제약 조성물의 제조 방법은 공지되어 있다. 예시적인 방법은, 예를 들어 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)]에 보다 상세히 기재되어 있다.
- [0298] 제제는 수용액을 포함할 수 있다. 제제 또는 조성물은 또한 세포로 치료될 특정한 적응증, 질환 또는 상태에 유용한 1종 초과 활성 성분, 바람직하게는 세포에 상보적인 활성을 갖는 것을 함유할 수 있으며, 여기서 각각

의 활성은 서로 유해한 영향을 미치지 않는다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적
합하게 존재한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 다른 제약 활성제 또는 약물, 예컨대
화학요법제, 예를 들어 아스파라기나제, 부슬판, 카르보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오
로우라실, 겐시타빈, 히드록시우레아, 메토타렉세이트, 파클리탁셀, 리톡시맵, 빈블라스틴 및/또는 빈크리스틴
을 추가로 포함한다.

[0299] 제약 조성물은, 일부 실시양태에서, 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 데 효과적인 양, 예컨대 치료 유효량
또는 예방 유효량으로 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서 치료 또는 예방 효능은 치료받은 대상체의 주기적
평가에 의해 모니터링된다. 목적하는 투여량은 세포의 단일 볼루스 투여에 의해, 세포의 다중 볼루스 투여에
의해, 또는 세포의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0300] 제제는 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강내, 협측, 설하 또는 좌제 투여를 위한 것을 포함
한다. 일부 실시양태에서, 세포 집단은 비경구로 투여된다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 정맥내, 근육내,
피하, 직장, 질 및 복강내 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 정맥내, 복강내 또는 피하 주사에 의
한 말초 전신 전달을 사용하여 대상체에게 투여된다.

[0301] 일부 실시양태에서 조성물은 멸균 액체 제제, 예를 들어 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액 또는 점성 조
성물로서 제공되며, 이는 일부 측면에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 제제는 통상적으로 겔, 다른 점성
조성물 및 고체 조성물보다 제조하기가 더 용이하다. 추가적으로, 액체 조성물은 특히 주사에 의해 투여하기가
다소 더 편리하다. 다른 한편으로는, 특정 조직과의 보다 긴 접촉 기간을 제공하도록 점성 조성물을 적절한 점
도 범위 내에서 제제화할 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은, 예를 들어 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 폴
리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 그의 적합한 혼합물을 함유하는 용
매 또는 분산 매질일 수 있는 담체를 포함할 수 있다.

[0302] 멸균 주사가 가능한 용액은 세포를 용매 중에, 예컨대 적합한 담체, 희석제 또는 부형제, 예컨대 멸균수, 생리 염
수, 글루코스, 텍스트로스 등과 혼합하여 혼입시킴으로써 제조될 수 있다. 조성물은 투여 경로 및 목적하는 제
제에 따라 보조 물질, 예컨대 습윤제, 분산제 또는 유화제 (예를 들어, 메틸셀룰로스), pH 완충제, 겔화제 또는
점도 증진 첨가제, 보존제, 향미제 및/또는 착색제를 함유할 수 있다. 일부 측면에서 적합한 제제를 제조하기
위해 표준 교재를 참고할 수 있다.

[0303] 향미생물 보존제, 항산화제, 킬레이트화제 및 완충제를 비롯한, 조성물의 안정성 및 멸균성을 증진시키는 다양
한 첨가제가 첨가될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클
로로부탄올, 페놀 및 소르브산에 의해 보장될 수 있다. 주사가 가능한 제약 형태의 지속 흡수는 흡수를 지연시키
는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 이루어질 수 있다.

[0304] 생체내 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 멸균된다. 멸균은, 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용
이하게 달성될 수 있다.

[0305] D. 산출 조성물의 예시적인 특색

[0306] 일부 실시양태에서, 산출 조성물 (예를 들어, 수집된 산출 조성물)의 부피는 약 1 mL 내지 약 20,000 mL, 약 5
mL 내지 약 2,000 mL, 약 10 mL 내지 약 1,000 mL, 약 15 mL 내지 약 500 mL, 또는 약 20 mL 내지 약 100 mL를
포함한다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 부피는 약 1 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 약
25 mL, 약 30 mL, 약 35 mL, 약 40 mL, 약 45 mL, 약 50 mL, 약 55 mL, 약 60 mL, 약 65 mL, 약 70 mL, 약 75
mL, 약 80 mL, 약 85 mL, 약 90 mL, 약 95 mL, 또는 약 100 mL이다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 부피
는 약 1 mL이다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 부피는 약 5 mL이다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물의
부피는 약 10 mL이다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 부피는 약 15 mL이다. 일부 실시양태에서, 산출 조
성물의 부피는 약 20 mL이다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 부피는 약 25 mL이다. 일부 실시양태에서,
산출 조성물의 부피는 약 30 mL이다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 부피는 약 35 mL이다. 일부 실시양태
에서, 산출 조성물의 부피는 약 40 mL이다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 부피는 약 45 mL이다. 일부 실
시양태에서, 산출 조성물의 부피는 약 50 mL이다.

[0307] 일부 실시양태에서, 산출 조성물은 세포 조성물 또는 투입 조성물보다 더 큰 백분율의 생존 T 세포를 포함한다.
일부 실시양태에서, 산출 조성물은 세포 조성물보다 더 큰 백분율의 생존 T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에
서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 적어도 약 5% 더
크거나, 적어도 약 10% 더 크거나, 적어도 약 15% 더 크거나, 적어도 약 20% 더 크거나, 또는 적어도 약 25% 더

크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 5% 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 10% 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 15% 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 20% 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 25% 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 30% 더 크다.

[0308] 일부 실시양태에서, 산출 조성물은 투입 조성물보다 더 큰 백분율의 생존 T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 적어도 약 5% 더 크거나, 적어도 약 10% 더 크거나, 적어도 약 15% 더 크거나, 적어도 약 20% 더 크거나, 또는 적어도 약 25% 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율보다 약 5% 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율보다 약 10% 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율보다 약 15% 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율보다 약 20% 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율보다 약 25% 더 크다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율은 투입 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율보다 약 30% 더 크다.

[0309] 특정한 실시양태에서, 산출 조성물은 적어도 정확히 또는 약 50%, 적어도 정확히 또는 약 60%, 적어도 정확히 또는 약 70%, 적어도 정확히 또는 약 75%, 적어도 정확히 또는 약 80%, 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 적어도 정확히 또는 약 95%, 적어도 정확히 또는 약 99%, 또는 적어도 정확히 또는 약 99.9% 생존 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물은 적어도 정확히 또는 약 75% 생존 세포를 함유한다. 특정 실시양태에서, 산출 조성물은 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 또는 적어도 정확히 또는 약 95% 생존 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물은 적어도 정확히 또는 약 50%, 적어도 정확히 또는 약 60%, 적어도 정확히 또는 약 70%, 적어도 정확히 또는 약 75%, 적어도 정확히 또는 약 80%, 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 적어도 정확히 또는 약 95%, 적어도 정확히 또는 약 99%, 또는 적어도 정확히 또는 약 99.9% 생존 CD3+ T 세포를 함유한다. 특정한 실시양태에서, 산출 조성물은 적어도 정확히 또는 약 75% 생존 CD3+ T 세포를 함유한다. 특정 실시양태에서, 산출 조성물은 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 또는 적어도 정확히 또는 약 95% 생존 CD3+ T 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물은 적어도 정확히 또는 약 50%, 적어도 정확히 또는 약 60%, 적어도 정확히 또는 약 70%, 적어도 정확히 또는 약 75%, 적어도 정확히 또는 약 80%, 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 적어도 정확히 또는 약 95%, 적어도 정확히 또는 약 99%, 또는 적어도 정확히 또는 약 99.9% 생존 CD4+ T 세포를 함유한다. 특정 실시양태에서, 산출 조성물은 적어도 정확히 또는 약 75% 생존 CD4+ T 세포를 함유한다. 특정한 실시양태에서, 산출 조성물은 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 또는 적어도 정확히 또는 약 95% 생존 CD4+ T 세포를 함유한다. 특정한 실시양태에서, 산출 조성물은 적어도 정확히 또는 약 50%, 적어도 정확히 또는 약 60%, 적어도 정확히 또는 약 70%, 적어도 정확히 또는 약 75%, 적어도 정확히 또는 약 80%, 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 적어도 정확히 또는 약 95%, 적어도 정확히 또는 약 99%, 또는 적어도 정확히 또는 약 99.9% 생존 CD8+ T 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물은 적어도 정확히 또는 약 75% 생존 CD8+ T 세포를 함유한다. 특정 실시양태에서, 산출 조성물은 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 또는 적어도 정확히 또는 약 95% 생존 CD8+ T 세포를 함유한다.

[0310] 특정한 실시양태에서, 산출 세포는 아폽토시스를 겪고 있는 및/또는 제조되고/거나, 프라이밍되고/거나 아폽토시스에 진입하고 있는 적은 부분 및/또는 빈도의 세포를 갖는다. 특정한 실시양태에서, 산출 세포는 아폽토시스 마커에 대해 양성인 적은 부분 및/또는 빈도의 세포를 갖는다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 세포의 정확히 또는 약 40% 미만, 정확히 또는 약 35% 미만, 정확히 또는 약 30% 미만, 정확히 또는 약 25% 미만, 정확히 또는 약 20% 미만, 정확히 또는 약 15% 미만, 정확히 또는 약 10% 미만, 정확히 또는 약 5% 미만, 또는 정확히 또는 약 1% 미만이 아폽토시스 마커를 발현하고/거나, 함유하고/거나, 그에 대해 양성이다. 특정 실시양태에서, 산출 조성물의 세포의 정확히 또는 약 25% 미만이 아폽토시스 마커를 발현하고/거나, 함유하고/거나, 그에 대해 양성이다. 특정 실시양태에서, 산출 조성물의 세포의 정확히 또는 약 10% 미만이 아폽토시스 마커를 발현하고/거나, 함유하고/거나, 그에 대해 양성이다. 특정 실시양태에서, 산출 조성물의 세포의 정확히 또는 약 5% 미만이 아폽토시스 마커를 발현하고/거나, 함유하고/거나, 그에 대해 양성이다. 특정 실시양태에서, 산

출 조성물의 세포의 정확히 또는 약 1% 미만인 아포토시스 마커를 발현하고/거나, 함유하고/거나, 그에 대해 양성이다.

[0311] 특정한 실시양태에서, 산출 조성물은 CD3+ T 세포에 대해 풍부화된 세포의 조성물이다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 65%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 98.5%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 99.5%, 적어도 또는 약 99.9%, 100%, 또는 약 100%는 CD3+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 86.5%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 87.5%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 88.5%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 89.5%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 90.5%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 91.5%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 92.5%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 93.5%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 94.5%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 95.5%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 96.5%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 97.5%, 적어도 또는 약 98%, 또는 적어도 또는 약 98.5%는 CD3+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 총 세포의 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 98%, 약 88% 내지 약 96%, 또는 약 90% 내지 약 94%는 CD3+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물은 CD3+ T 세포로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 90%는 CD3+ T 세포이고, 산출 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 40%는 제조함 수용체 (예를 들어, CAR)를 발현한다.

[0312] 특정 실시양태에서, 산출 조성물은 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포에 대해 풍부화된 세포의 조성물이다. 특정한 실시양태에서, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 산출 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 65%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 98.5%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 99.5%, 적어도 또는 약 99.9%, 100%, 또는 약 100%를 차지한다. 일부 실시양태에서, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 산출 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 86.5%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 87.5%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 88.5%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 89.5%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 90.5%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 91.5%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 92.5%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 93.5%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 94.5%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 95.5%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 96.5%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 97.5%, 적어도 또는 약 98%, 또는 적어도 또는 약 98.5%를 차지한다. 일부 실시양태에서, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 산출 조성물 중 총 세포의 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 98%, 약 88% 내지 약 96%, 또는 약 90% 내지 약 94%를 차지한다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물은 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포로 본질적으로 이루어진다.

[0313] 특정한 실시양태에서, 산출 조성물은 정확히 또는 약 10% 내지 정확히 또는 약 90%, 정확히 또는 약 20% 내지 정확히 또는 약 80%, 정확히 또는 약 25% 내지 정확히 또는 약 75%, 정확히 또는 약 30% 내지 정확히 또는 약 70%, 정확히 또는 약 35% 내지 정확히 또는 약 65%, 정확히 또는 약 40% 내지 정확히 또는 약 60%, 정확히 또는 약 55% 내지 정확히 또는 약 45%, 또는 약 50% 또는 50% CD4+ T 세포 및 정확히 또는 약 10% 내지 정확히 또는 약 90%, 정확히 또는 약 20% 내지 정확히 또는 약 80%, 정확히 또는 약 25% 내지 정확히 또는 약 75%, 정확히 또는 약 30% 내지 정확히 또는 약 70%, 정확히 또는 약 35% 내지 정확히 또는 약 65%, 정확히 또는 약 40% 내지 정확히 또는 약 60%, 정확히 또는 약 55% 내지 정확히 또는 약 45%, 또는 약 50% 또는 50% CD8+ T 세포를 함유한다. 특정 실시양태에서, 산출 조성물은 정확히 또는 약 35% 내지 정확히 또는 약 65%, 정확히 또는 약 40% 내지 정확히 또는 약 60%, 정확히 또는 약 55% 내지 정확히 또는 약 45%, 또는 약 50% 또는 50% CD4+ T 세포 및 정확히 또는 약 35% 내지 정확히 또는 약 65%, 정확히 또는 약 40% 내지 정확히 또는 약 60%, 정확히 또는 약 55% 내지 정확히 또는 약 45%, 또는 약 50% 또는 50% CD8+ T 세포를 함유한다. 특정한 실시양태에서, 산출 조성물은 정확히 또는 약 35% 내지 정확히 또는 약 65% CD4+ T 세포 및 정확히 또는 약 35% 내지 정확히 또는 약 65% CD8+ T 세포를 함유한다. 특정한 실시양태에서, 산출 조성물은 3:1 내지 1:3, 2.5:1 내지 1:2.5, 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.4:1 내지 1:1.4, 1.3:1 내지 1:1.3, 1.2:1 내지 1:1.2, 또는 1.1:1 내지 1:1.1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 함유한다. 일부 실시양태에서, 세포의 조성물은 정확히 또는 약 3:1, 정확히 또는 약 2.8:1, 정확히 또는 약 2.5:1, 정확히 또는 약 2.25:1, 정확히 또는 약 2:1, 정확히 또는 약 1.8:1, 정확히 또는 약 1.7:1, 정확히 또는 약 1.6:1, 정확히 또는 약 1.5:1, 정확히 또는 약 1.4:1, 정확히 또는 약 1.3:1, 정확히 또는 약 1.2:1, 정확히 또는 약 1.1:1, 정확히 또는 약 1:1, 정확히 또는 약 1:1.1, 정확히 또는 약 1:1.2, 정확히 또는 약 1:1.3, 정확히 또는 약 1:1.4, 정확히 또는 약 1:1.5, 정확히 또는 약 1:1.6, 정확히 또는 약 1:1.7, 정확히 또는 약 1:1.8, 정확히 또는 약 1:2, 정확히 또는 약 1:2.25, 정확히 또는

는 약 1:2.5, 정확히 또는 약 1:2.8, 또는 정확히 또는 약 1:3의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 갖는다.

[0314] 일부 실시양태에서, 산출 조성물은 3:1 내지 1:3, 2.5:1 내지 1:2.5, 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.4:1 내지 1:1.4, 1.3:1 내지 1:1.3, 1.2:1 내지 1:1.2, 또는 1.1:1 내지 1:1.1의, 재조합 수용체 예를 들어 CAR을 발현하는 CD4+ T 세포 대 재조합 수용체 예를 들어 CAR을 발현하는 CD8+ T 세포의 비를 함유한다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물 중 재조합 수용체 (예를 들어, CAR)를 발현하는 CD4+ T 세포 대 재조합 수용체 (예를 들어, CAR)를 발현하는 CD8+ T 세포의 비는 정확히 또는 약 3:1, 정확히 또는 약 2.8:1, 정확히 또는 약 2.5:1, 정확히 또는 약 2.25:1, 정확히 또는 약 2:1, 정확히 또는 약 1.8:1, 정확히 또는 약 1.7:1, 정확히 또는 약 1.6:1, 정확히 또는 약 1.5:1, 정확히 또는 약 1.4:1, 정확히 또는 약 1.3:1, 정확히 또는 약 1.2:1, 정확히 또는 약 1.1:1, 정확히 또는 약 1:1, 정확히 또는 약 1:1.1, 정확히 또는 약 1:1.2, 정확히 또는 약 1:1.3, 정확히 또는 약 1:1.4, 정확히 또는 약 1:1.5, 정확히 또는 약 1:1.6, 정확히 또는 약 1:1.7, 정확히 또는 약 1:1.8, 정확히 또는 약 1:2, 정확히 또는 약 1:2.25, 정확히 또는 약 1:2.5, 정확히 또는 약 1:2.8, 또는 정확히 또는 약 1:3이다.

[0315] 일부 실시양태에서, 제공된 방법과 관련하여 생성되거나 생산된 산출 조성물은 재조합 수용체, 예를 들어 TCR 또는 CAR을 발현하는 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 재조합 수용체를 발현하는 것은 세포 막 및/또는 세포 표면에 국재화된 1개 이상의 재조합 수용체 단백질을 갖는 것, 재조합 수용체 단백질의 검출가능한 양을 갖는 것, 재조합 수용체를 코딩하는 mRNA의 검출가능한 양을 갖는 것, 재조합 수용체를 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 갖거나 함유하는 것, 및/또는 재조합 수용체 발현에 대한 내용물 마커인 mRNA 또는 단백질을 갖거나 함유하는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0316] 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 세포의 적어도 또는 약 5%, 적어도 또는 약 10%, 적어도 또는 약 20%, 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 40%, 적어도 또는 약 45%, 적어도 또는 약 50%, 적어도 또는 약 55%, 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 65%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 99%, 또는 99% 초과가 재조합 수용체를 발현한다. 특정 실시양태에서, 산출 조성물의 세포의 적어도 또는 약 50%가 재조합 수용체를 발현한다. 특정 실시양태에서, 산출 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 또는 약 5%, 적어도 또는 약 10%, 적어도 또는 약 20%, 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 40%, 적어도 또는 약 45%, 적어도 또는 약 50%, 적어도 또는 약 55%, 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 65%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 99%, 또는 99% 초과가 재조합 수용체를 발현한다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 또는 약 50%가 재조합 수용체를 발현한다. 특정 실시양태에서, 산출 조성물의 세포의 적어도 또는 약 5%, 적어도 또는 약 10%, 적어도 또는 약 20%, 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 40%, 적어도 또는 약 45%, 적어도 또는 약 50%, 적어도 또는 약 55%, 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 65%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 99%, 또는 99% 초과가 재조합 수용체를 발현하는 CD3+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 세포의 적어도 또는 약 50%는 재조합 수용체를 발현하는 CD3+ T 세포이다.

[0317] 특정한 실시양태에서, 산출 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 40%, 적어도 또는 약 45%, 적어도 또는 약 50%, 적어도 또는 약 55%, 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 65%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 99%, 또는 99% 초과가 재조합 수용체를 발현한다. 특정한 실시양태에서, 산출 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 또는 약 50%가 재조합 수용체를 발현한다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 40%, 적어도 또는 약 45%, 적어도 또는 약 50%, 적어도 또는 약 55%, 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 65%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 99%, 또는 99% 초과가 재조합 수용체를 발현한다. 특정 실시양태에서, 산출 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 또는 약 50%가 재조합 수용체를 발현한다.

[0318] 특정한 실시양태에서, 산출 조성물의 재조합 수용체-발현 (예를 들어, CAR+) 세포의 적어도 정확히 또는 약 50%, 적어도 정확히 또는 약 60%, 적어도 정확히 또는 약 70%, 적어도 정확히 또는 약 75%, 적어도 정확히 또는 약 80%, 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 적어도 정확히 또는 약 95%, 적어도 정확히 또는 약 99%, 또는 적어도 정확히 또는 약 99.9%는 생존 세포, 예를 들어 아포토시스 마커, 예컨대 카스파제 (예를 들어, 활성화된 카스파제-3)에 대해 음성인 세포이다. 특정 실시양태에서, 산출 조성물의 재조합 수용체

T 세포의 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는 생존 세포, 예를 들어 아폽토시스 마커, 예컨대 카스파제 (예를 들어, 활성화된 카스파제-3)에 대해 음성인 세포이다. 특정 실시양태에서, 평균적으로, 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 복수의 산출 조성물의 재조합 수용체-발현 (예를 들어, CAR+) CD3+ T 세포의 적어도 90%는 생존 세포, 예를 들어 아폽토시스 마커, 예컨대 카스파제 (예를 들어, 활성화된 카스파제-3)에 대해 음성인 세포이다.

[0320] 상기 실시양태 중 임의의 것에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 복수의 산출 조성물은 동일한 또는 상이한 공여자로부터 기원할 수 있다. 일부 측면에서, 복수의 산출 조성물 중 적어도 2종은 상이한 공여자로부터 기원한다. 일부 측면에서, 복수의 산출 조성물 각각은 다수의 상이한 공여자, 예를 들어, 약 2, 약 5, 약 10, 약 15, 약 20, 약 25, 약 30, 약 35, 약 40, 약 45, 약 50, 약 55, 약 60, 또는 약 60명 초과 상이한 공여자, 예를 들어 세포 요법 예컨대 CAR-T 세포 요법을 필요로 하는 환자 중 1명으로부터 기원한다.

[0321] 특정한 실시양태에서, 산출 조성물의 대부분의 세포는 나이브 또는 나이브-유사 세포, 중심 기억 세포, 및/또는 이펙터 기억 세포이다. 특정한 실시양태에서, 산출 조성물의 대부분의 세포는 나이브-유사 또는 중심 기억 세포이다. 일부 실시양태에서, 산출 조성물의 대부분의 세포는 중심 기억 세포이다. 일부 측면에서, 덜 분화된 세포, 예를 들어 중심 기억 세포는 더 오래 생존하고 덜 신속하게 소진되어, 그에 의해 지속성 및 내구성이 증가된다. 일부 측면에서, 세포 요법, 예컨대 CAR-T 세포 요법에 대한 반응자는 중심 기억 유전자의 증가된 발현을 갖는다. 예를 들어, 문헌 [Fraietta et al., (2018) Nat Med. 24(5):563-571]을 참조한다.

[0322] 특정 실시양태에서, 산출 조성물의 세포는 나이브-유사 T 세포, 또는 나이브-유사 T 세포 상에서 발현되는 마커에 대해 표면 양성인 T 세포의 높은 부분 및/또는 빈도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 산출 조성물의 세포는 대안적 프로세스, 예컨대 확장을 수반하는 프로세스 (예를 들어, 확장 유닛 작업을 포함하고/거나 세포의 확장을 유발하도록 의도된 단계를 포함하는 프로세스)로부터 생성된 산출 조성물보다 나이브-유사 세포의 더 큰 부분 및/또는 빈도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 나이브-유사 T 세포는 다양한 분화 상태의 세포를 포함할 수 있고, 특정 세포 마커의 양성 또는 높은 발현 (예를 들어, 표면 발현 또는 세포내 발현) 및/또는 다른 세포 마커의 음성 또는 낮은 발현 (예를 들어, 표면 발현 또는 세포내 발현)을 특징으로 할 수 있다. 일부 측면에서, 나이브-유사 T 세포는 CCR7, CD45RA, CD28 및/또는 CD27의 양성 또는 높은 발현을 특징으로 한다. 일부 측면에서, 나이브-유사 T 세포는 CD25, CD45RO, CD56, CD62L, 및/또는 KLRG1의 음성 발현을 특징으로 한다. 일부 측면에서, 나이브-유사 T 세포는 CD95의 낮은 발현을 특징으로 한다. 특정 실시양태에서, 나이브-유사 T 세포, 또는 나이브-유사 T 세포 상에서 발현되는 마커에 대해 표면 양성인 T 세포는 CCR7+CD45RA+이고, 여기서 세포는 CD27+ 또는 CD27-이다. 특정 실시양태에서, 나이브-유사 T 세포, 또는 나이브-유사 T 세포 상에서 발현되는 마커에 대해 표면 양성인 T 세포는 CD27+CCR7+이고, 여기서 세포는 CD45RA+ 또는 CD45RA-이다. 특정 실시양태에서, 나이브-유사 T 세포, 또는 나이브-유사 T 세포 상에서 발현되는 마커에 대해 표면 양성인 T 세포는 CD62L-CCR7+이다.

[0323] II. 생존 세포를 풍부화하는 방법

[0324] 원심분리 시스템에서 세포 조성물 (예를 들어, 조작된 세포 조성물)을 생존 세포에 대해 풍부화하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 원심분리 시스템은 역 원심분리 시스템으로도 공지된 연속 대향류 분리 ("CCE") 원심분리 시스템이다. 일부 실시양태에서, 생산된 세포는 세포 요법에 사용하기 위한 것이며, 예컨대 자가 또는 동종 전달을 위해 제조된 1차 세포는 예를 들어 이양 세포 요법에 사용하기 위한 것이다. 방법은 추가의 세포 프로세싱 단계, 예컨대 세포 세척, 단리, 분리, 수집, 제제화, 또는 세포 조성물의 생산과 관련된 다른 단계를 포함할 수 있다.

[0325] 또한, (a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계이며, 여기서 세포 조성물은 생존 및 비-생존 T 세포를 포함하는 것인 단계; 및 (b) 세포 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 투입 조성물의 세포를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 생존 T 세포를 갖는 풍부화된 조성물을 생성하는 단계를 포함하는, 세포 조성물을 생존 세포에 대해 풍부화하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포 조성물 (예를 들어, 조작된 세포 조성물)을 원심분리 시스템 내로 로딩하는 것을 포함하며, 여기서 로딩은 (a)에서의 적용 전 및/또는 (a)에서의 적용의 적어도 일부 동안 수행된다.

[0326] 일부 실시양태에서, 원심분리 시스템은 원추형 유체 인클로저 내에 캐놀라를 포함한다. 일부 실시양태에서, 캐놀라는 원추형 유체 인클로저의 길이를 따라 이어진다. 일부 실시양태에서, 캐놀라의 한쪽 단부는 원추형 유체

인클로저의 팁에 또는 그 근처에 있다. 일부 실시양태에서, 캐놀라의 다른쪽 단부는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부에 또는 그 근처에, 예컨대 넓은 단부의 중심에 또는 그 근처에 있다.

- [0327] 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 캐놀라를 통해 원추형 유체 인클로저 내로 로딩된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 원추형 유체 인클로저의 팁에서 또는 그 근처에서 원추형 유체 인클로저 내로 로딩된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부로 진입하고, 원추형 유체 인클로저의 팁의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부에서 배출되는 것에 의해 원추형 유체 인클로저 내로 로딩된다.
- [0328] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 것은 그에 의해 원추형 유체 인클로저로부터 세포 조성물의 폐기물 분획을 분리한다. 일부 실시양태에서, 분리된 폐기물 분획은 세포 조성물 중 비생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 비생존 T 세포를 갖는다.
- [0329] 일부 실시양태에서, 분리된 세포는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 개구를 통해 원추형 유체 인클로저로부터 배출된다. 일부 실시양태에서, 개구는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부를 적어도 부분적으로 둘러싼다. 일부 실시양태에서, 개구는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부를 둘러싼다.
- [0330] 일부 실시양태에서, 방법은 분리된 폐기물 분획을 수집하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 분리된 폐기물 분획은 용기에 수집된다. 일부 실시양태에서, 용기는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부와 유체 연통한다.
- [0331] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 것은 그에 의해 원추형 유체 인클로저 내에서 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 생존 T 세포를 갖는 풍부화된 조성물을 생산한다.
- [0332] 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 생존 세포, 예컨대 T 세포 (예를 들어, 조작된 T 세포)를 풍부화하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 세포는 항원 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 트랜스제닉 T 세포 수용체 (TCR)를 코딩하는 이중 폴리뉴클레오티드로 이전에 도입되었다. 일부 실시양태에서, 세포는 바이러스 벡터 입자에 의해 이중 핵산으로 이전에 도입되었다. 일부 실시양태에서, 세포는 항원 수용체를 코딩하는 이중 폴리뉴클레오티드를 함유하는 바이러스 벡터 입자로 이전에 형질도입되었다. 일부 실시양태에서, 유전자 조작은 세포 조성물의 T 세포를 항원 수용체를 코딩하는 이중 폴리뉴클레오티드를 함유하는 바이러스 벡터 입자와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 항원 수용체를 발현한다. 일부 실시양태에서, (a)에서의 적용 전에, 방법은 세포 조성물의 T 세포를 항원 수용체를 발현하도록 유전자 조작하는 것을 포함하고/거나 세포 조성물의 T 세포는 항원 수용체를 발현하도록 유전자 조작되었다. 따라서, 일부 실시양태에서, 제공된 방법은 항원 수용체, 예컨대 트랜스제닉 TCR 또는 CAR을 발현하도록 이전에 조작된 생존 T 세포를 풍부화하는 데 사용될 수 있다.
- [0333] 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 방법의 적용 전에 동결보존 및 해동된 T 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 방법은 동결보존된 세포 조성물을 해동시켜 T 세포를 포함하는 세포 조성물을 생산하는 것을 수반한다.
- [0334] 일부 실시양태에서, 방법은 풍부화된 조성물의 세포를 동결보존하여 동결보존된 조성물을 생성하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 동결보존은 세포를 동결보호제를 포함하는 배지 중에 현탁시키고, 세포를 동결시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 동결은 속도 제어 동결기에서 이루어진다. 일부 실시양태에서, 방법은 동결보존된 세포 조성물을 해동시키는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 방법은 해동된 세포를 제제화하여 약물 생성물로서 투여하기 위한 세포 조성물을 제조하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 해동은 동결보존된 세포 조성물이 적어도 1일 동안 동결된 후에 수행된다. 일부 실시양태에서, 해동은 동결보존된 세포 조성물이 적어도 2일 동안 동결된 후에 수행된다. 일부 실시양태에서, 해동은 동결보존된 세포 조성물이 적어도 3일 동안 동결된 후에 수행된다. 일부 실시양태에서, 해동은 동결보존된 세포 조성물이 적어도 1주, 10일, 2주, 또는 1개월 동안 동결된 후에 수행된다. 일부 실시양태에서, 해동은 동결보존된 세포 조성물이 최대 10일, 2주, 1개월, 2개월, 3개월, 또는 6개월 동안 동결된 후에 수행된다.
- [0335] 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 방법의 적용 전에 동결보존 또는 해동되지 않은 T 세포를 함유한다.
- [0336] 또한, 이러한 방법에 의해 생산된 세포의 집단 및 그의 사용 방법이 제공된다.
- [0337] 따라서, 일부 실시양태에서, 제공된 방법으로부터 생성된 세포의 조성물은 원심분리 전과 비교하여 원심분리 후에 증가된 생존율을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 증가된 생존율은 원심분리 직후에 관찰되고/거나 원심분리 후 소정의 지속기간 (예를 들어, 수시간 또는 수일) 동안 유지된다.

- [0338] 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 500 G 내지 약 5,000 G, 약 500 G 내지 약 4,500 G, 약 500 G 내지 약 4,000 G, 약 500 G 내지 약 3,500 G, 약 500 G 내지 약 3,000 G, 약 500 G 내지 약 2,500 G, 약 500 G 내지 약 2,000 G, 약 500 G 내지 약 1,500 G, 약 500 G 내지 약 1,000 G, 약 1,000 G 내지 약 5,000 G, 약 1,000 G 내지 약 4,500 G, 약 1,000 G 내지 약 4,000 G, 약 1,000 G 내지 약 3,500 G, 약 1,000 G 내지 약 3,000 G, 약 1,000 G 내지 약 2,500 G, 약 1,000 G 내지 약 2,000 G, 약 1,000 G 내지 약 1,500 G, 약 1,500 G 내지 약 5,000 G, 약 1,500 G 내지 약 4,500 G, 약 1,500 G 내지 약 4,000 G, 약 1,500 G 내지 약 3,500 G, 약 1,500 G 내지 약 3,000 G, 약 1,500 G 내지 약 2,500 G, 약 1,500 G 내지 약 2,000 G, 약 2,000 G 내지 약 5,000 G, 약 2,000 G 내지 약 4,500 G, 약 2,000 G 내지 약 4,000 G, 약 2,000 G 내지 약 3,500 G, 약 2,000 G 내지 약 3,000 G, 약 2,000 G 내지 약 2,500 G, 약 2,500 G 내지 약 5,000 G, 약 2,500 G 내지 약 4,500 G, 약 2,500 G 내지 약 4,000 G, 약 2,500 G 내지 약 3,500 G, 약 2,500 G 내지 약 3,000 G, 약 3,000 G 내지 약 5,000 G, 약 3,000 G 내지 약 4,500 G, 약 3,000 G 내지 약 4,000 G, 약 3,000 G 내지 약 3,500 G, 약 3,500 G 내지 약 5,000 G, 약 3,500 G 내지 약 4,500 G, 약 3,500 G 내지 약 4,000 G, 약 4,000 G 내지 약 5,000 G, 약 4,000 G 내지 약 4,500 G, 또는 정확히 또는 약 4,500 G 내지 약 5,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 1,000 G 내지 약 4,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 2,000 G 내지 약 4,000 G이다.
- [0339] 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 1,000 G 내지 약 5,000 G, 약 1,500 G 내지 약 4,500 G, 약 2,000 G 내지 약 4,000 G, 약 1,500 G 내지 약 3,500 G, 또는 약 2,000 G 내지 약 3,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 1,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 1,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 2,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 2,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 3,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 3,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 4,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 4,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 5,000 G이다.
- [0340] 일부 실시양태에서, 제1 유량은 방사상 내향이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 원추형 유체 인클로저의 팁 으로부터 멀어지는 방향을 향한다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 제1 유량에 의해 상쇄된다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 대향류량이다.
- [0341] 일부 실시양태에서, 제1 유량은 캐놀라를 통한 배지의 유동에 의해 유발된다. 일부 실시양태에서, 캐놀라를 통한 배지의 유동은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부로부터 팁까지이다. 일부 실시양태에서, 배지는 캐놀라에서 배출되어 원추형 유체 인클로저에 그의 팁에서 진입한다.
- [0342] 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 1 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 3 mL/분 내지 약 18 mL/분, 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분, 또는 약 8 mL/분 내지 약 12 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 1 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 3 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 5 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 8 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 9 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 10 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 11 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 12 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 15 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 18 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 20 mL/분이다.
- [0343] 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분이다. 일부 실시양태에서, (i) 제1 원심력은 약 1,000 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제1 유량은 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분이다. 일부 실시양태에서, (i) 제1 원심력은 약 2,000 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제1 유량은 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분이다.
- [0344] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 100 내지 약 600, 약 100 내지 약 500, 약 100 내지 약 400, 약 100 내지 약 300, 약 100 내지 약 200, 약 200 내지 약 600, 약 200 내지 약 500, 약 200 내지 약 400, 약 200 내지 약 300, 약 300 내지 약 600, 약 300 내지 약 500, 약 300 내지 약 400, 약 400 내지 약 600, 약 400 내지 약 500, 또는 약 500 내지 약 600이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 200 내지 약 500이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 200 내지 약 400이다. 본원에서 원심력 대 유량의 비는, 달리 나타내지 않는 한, G 단위의 원심력 대 mL/분 단위의 유량의 비이다.
- [0345] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 200 내지 약 400, 약 225 내지 약 375, 약 250 내지 약 350, 또는 약 275 내지 약 325이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 200이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 200이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 225이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 250이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 275이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 300이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 325이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 325이다.

350이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 375이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비는 약 400이다.

[0346] 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 2,000 G 내지 약 4,000 G이고, 제1 유량은 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 3,000 G이고, 제1 유량은 약 10 mL/분이다.

[0347] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 15초, 약 30초, 약 45초, 약 60초, 약 2분, 약 3분, 약 4분, 약 5분, 약 10분, 또는 약 15분 동안 세포 조성물 (예를 들어, 조작된 세포 조성물)에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 15초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 30초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 45초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 약 60초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 세포의 유동층이 확립될 때까지 세포 조성물에 적용된다.

[0348] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 15초, 적어도 약 30초, 적어도 약 45초, 적어도 약 60초, 적어도 약 2분, 적어도 약 3분, 적어도 약 4분, 적어도 약 5분, 적어도 약 10분, 또는 적어도 약 15분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 15초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 20초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 25초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 30초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 45초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 60초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 2분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 3분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 4분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 5분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 10분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 적어도 약 15분 동안 세포 조성물에 적용된다.

[0349] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 15초 내지 60초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 25초 내지 60초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 30초 내지 60초 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 15초 내지 2분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 정확히 또는 약 25초 내지 2분 동안 세포 조성물에 적용된다.

[0350] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 미리 결정된 수의 세포가 원추형 유체 인클로저 내로 로딩될 때까지 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량은 미리 결정된 수의 세포가 세포의 유동층의 일부일 때까지 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 미리 결정된 수의 세포는 미리 결정된 수의 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 미리 결정된 수의 세포, 예를 들어 T 세포는 약 10백만 내지 100백만, 약 10백만 내지 90백만, 약 10백만 내지 80백만, 약 10백만 내지 70백만, 약 10백만 내지 60백만, 약 10백만 내지 50백만, 약 10백만 내지 40백만, 약 10백만 내지 30백만, 약 10백만 내지 20백만, 약 20백만 내지 100백만, 약 20백만 내지 90백만, 약 20백만 내지 80백만, 약 20백만 내지 70백만, 약 20백만 내지 60백만, 약 20백만 내지 50백만, 약 20백만 내지 40백만, 약 20백만 내지 30백만, 약 30백만 내지 100백만, 약 30백만 내지 90백만, 약 30백만 내지 80백만, 약 30백만 내지 70백만, 약 30백만 내지 60백만, 약 30백만 내지 50백만, 약 30백만 내지 40백만, 약 40백만 내지 100백만, 약 40백만 내지 90백만, 약 40백만 내지 80백만, 약 40백만 내지 70백만, 약 40백만 내지 60백만, 약 40백만 내지 50백만, 약 50백만 내지 100백만, 약 50백만 내지 90백만, 약 50백만 내지 80백만, 약 50백만 내지 70백만, 약 50백만 내지 60백만, 약 60백만 내지 100백만, 약 60백만 내지 90백만, 약 60백만 내지 80백만, 약 60백만 내지 70백만, 약 70백만 내지 100백만, 약 70백만 내지 90백만, 약 70백만 내지 80백만, 약 80백만 내지 100백만, 약 80백만 내지 90백만, 또는 약 90백만 내지 100백만개의 세포, 예를 들어 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 미리 결정된 수의 세포, 예를 들어 T 세포는 약 50백만개의 세포, 예를 들어 T 세포이다.

[0351] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 방사상 내향이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 원추형 유체 인클로저의 팁으로부터 멀어지는 방향을 향한다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 제2 유량에 의해 상쇄된다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 대향류량이다.

- [0352] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 캐놀라를 통한 배지의 유동에 의해 유발된다. 일부 실시양태에서, 캐놀라를 통한 배지의 유동은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부로부터 팁까지이다. 일부 실시양태에서, 배지는 캐놀라에서 배출되어 원추형 유체 인클로저에 그의 팁에서 진입한다.
- [0353] 다른 실시양태에서, 제2 유량은 방사상 외향이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 원추형 유체 인클로저의 팁을 향한다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 방향이다.
- [0354] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 원추형 유체 인클로저를 통한 배지의 유동에 의해 유발된다. 일부 실시양태에서, 원추형 유체 인클로저를 통한 배지의 유동은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부로부터 팁까지이다. 일부 실시양태에서, 배지는 원추형 유체 인클로저의 팁에서 배출되어 캐놀라에 진입한다.
- [0355] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 100 G 내지 약 4,000 G, 약 100 G 내지 약 3,500 G, 약 100 G 내지 약 3,000 G, 약 100 G 내지 약 2,500 G, 약 100 G 내지 약 2,000 G, 약 100 G 내지 약 1,500 G, 약 100 G 내지 약 1,000 G, 약 100 G 내지 약 500 G, 약 100 G 내지 약 350 G, 약 350 G 내지 약 4,000 G, 약 350 G 내지 약 3,500 G, 약 350 G 내지 약 3,000 G, 약 350 G 내지 약 2,500 G, 약 350 G 내지 약 2,000 G, 약 350 G 내지 약 1,500 G, 약 350 G 내지 약 1,000 G, 약 350 G 내지 약 500 G, 약 500 G 내지 약 4,000 G, 약 500 G 내지 약 3,500 G, 약 500 G 내지 약 3,000 G, 약 500 G 내지 약 2,500 G, 약 500 G 내지 약 2,000 G, 약 500 G 내지 약 1,500 G, 약 500 G 내지 약 1,000 G, 약 1,000 G 내지 약 4,000 G, 약 1,000 G 내지 약 3,500 G, 약 1,000 G 내지 약 3,000 G, 약 1,000 G 내지 약 2,500 G, 약 1,000 G 내지 약 2,000 G, 약 1,000 G 내지 약 1,500 G, 약 1,500 G 내지 약 4,000 G, 약 1,500 G 내지 약 3,500 G, 약 1,500 G 내지 약 3,000 G, 약 1,500 G 내지 약 2,500 G, 약 1,500 G 내지 약 2,000 G, 약 2,000 G 내지 약 4,000 G, 약 2,000 G 내지 약 3,500 G, 약 2,000 G 내지 약 3,000 G, 약 2,000 G 내지 약 2,500 G, 약 2,500 G 내지 약 4,000 G, 약 2,500 G 내지 약 3,500 G, 약 2,500 G 내지 약 3,000 G, 약 3,000 G 내지 약 4,000 G, 약 3,000 G 내지 약 3,500 G, 또는 약 3,500 G 내지 약 4,000 G이다.
- [0356] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 350 G 내지 약 4,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 350 G 내지 3,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,500 G 내지 약 3,000 G이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 활성화된 T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포, 예를 들어 활성화된 T 세포는 약 5 μm 내지 약 25 μm , 약 5 μm 내지 약 20 μm , 약 5 μm 내지 약 15 μm , 약 5 μm 내지 약 10 μm , 약 10 μm 내지 약 25 μm , 약 10 μm 내지 약 20 μm , 약 10 μm 내지 약 15 μm , 약 15 μm 내지 약 25 μm , 약 15 μm 내지 약 20 μm , 또는 약 20 μm 내지 약 25 μm 의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 9 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖는다.
- [0357] 일부 실시양태에서, T 세포는 약 10 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 12 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 14 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖는다.
- [0358] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 350 G 내지 약 4,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 350 G 내지 3,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 700 G 내지 약 1,300 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 800 G 내지 약 1,200 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 900 G 내지 약 1,100 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,000 G이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 비-활성화된 또는 덜 활성화된 T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 방법의 적용 전에 동결보존 및 해동되었다. 일부 실시양태에서, T 세포는 9 μm 미만의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 3 μm 내지 약 9 μm , 약 4 μm 내지 약 9 μm , 약 5 μm 내지 약 9 μm , 약 6 μm 내지 약 9 μm , 약 7 μm 내지 약 9 μm , 또는 약 8 μm 내지 약 9 μm 의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 6 μm 내지 약 9 μm 의 평균 직경을 갖는다.
- [0359] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 100 G 내지 약 2,000 G, 약 200 G 내지 약 1800 G, 약 500 G 내지 약 1,500 G, 또는 약 750 G 내지 약 1,250 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 250 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 500 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 600 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 700 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 800 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 900 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,100 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,200 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,300 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,400 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,300 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,750 G이다. 일부 실시양

태에서, 제2 원심력은 약 2,000 G이다.

[0360] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 5 mL/분 내지 약 100 mL/분, 약 5 mL/분 내지 약 90 mL/분, 약 5 mL/분 내지 약 80 mL/분, 약 5 mL/분 내지 약 70 mL/분, 약 5 mL/분 내지 약 60 mL/분, 약 5 mL/분 내지 약 50 mL/분, 약 5 mL/분 내지 약 40 mL/분, 약 5 mL/분 내지 약 30 mL/분, 약 5 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 5 mL/분 내지 약 10 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 100 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 90 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 80 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 70 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 60 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 50 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 40 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 30 mL/분, 약 10 mL/분 내지 약 20 mL/분, 약 20 mL/분 내지 약 100 mL/분, 약 20 mL/분 내지 약 90 mL/분, 약 20 mL/분 내지 약 80 mL/분, 약 20 mL/분 내지 약 70 mL/분, 약 20 mL/분 내지 약 60 mL/분, 약 20 mL/분 내지 약 50 mL/분, 약 20 mL/분 내지 약 40 mL/분, 약 20 mL/분 내지 약 30 mL/분, 약 30 mL/분 내지 약 100 mL/분, 약 30 mL/분 내지 약 90 mL/분, 약 30 mL/분 내지 약 80 mL/분, 약 30 mL/분 내지 약 70 mL/분, 약 30 mL/분 내지 약 60 mL/분, 약 30 mL/분 내지 약 50 mL/분, 약 30 mL/분 내지 약 40 mL/분, 약 40 mL/분 내지 약 100 mL/분, 약 40 mL/분 내지 약 90 mL/분, 약 40 mL/분 내지 약 80 mL/분, 약 40 mL/분 내지 약 70 mL/분, 약 40 mL/분 내지 약 60 mL/분, 약 40 mL/분 내지 약 50 mL/분, 약 50 mL/분 내지 약 100 mL/분, 약 50 mL/분 내지 약 90 mL/분, 약 50 mL/분 내지 약 80 mL/분, 약 50 mL/분 내지 약 70 mL/분, 약 50 mL/분 내지 약 60 mL/분, 약 60 mL/분 내지 약 100 mL/분, 약 60 mL/분 내지 약 90 mL/분, 약 60 mL/분 내지 약 80 mL/분, 약 60 mL/분 내지 약 70 mL/분, 약 70 mL/분 내지 약 100 mL/분, 약 70 mL/분 내지 약 90 mL/분, 약 80 mL/분 내지 약 100 mL/분, 약 80 mL/분 내지 약 90 mL/분, 또는 약 90 mL/분 내지 약 100 mL/분이다.

[0361] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 5 mL/분 내지 약 100 mL/분이다. 일부 실시양태에서, (i) 제2 원심력은 약 350 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제2 유량은 약 5 mL/분 내지 약 100 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 10 mL/분 내지 약 65 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 10 mL/분 내지 약 35 mL/분이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 활성화된 T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포, 예를 들어 활성화된 T 세포는 약 5 μ m 내지 약 25 μ m, 약 5 μ m 내지 약 20 μ m, 약 5 μ m 내지 약 15 μ m, 약 5 μ m 내지 약 10 μ m, 약 10 μ m 내지 약 25 μ m, 약 10 μ m 내지 약 20 μ m, 약 10 μ m 내지 약 15 μ m, 약 15 μ m 내지 약 25 μ m, 약 15 μ m 내지 약 20 μ m, 또는 약 20 μ m 내지 약 25 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 9 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖는다.

[0362] 일부 실시양태에서, T 세포는 약 10 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 12 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 14 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖는다.

[0363] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 30 mL/분 이하이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분이다. 일부 실시양태에서, (i) 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G이고; (ii) 제2 유량은 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 비-활성화된 또는 덜 활성화된 T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 방법의 적용 전에 동결보존 및 해동되었다. 일부 실시양태에서, T 세포는 9 μ m 미만의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 3 μ m 내지 약 9 μ m, 약 4 μ m 내지 약 9 μ m, 약 5 μ m 내지 약 9 μ m, 약 6 μ m 내지 약 9 μ m, 약 7 μ m 내지 약 9 μ m, 또는 약 8 μ m 내지 약 9 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 6 μ m 내지 약 9 μ m의 평균 직경을 갖는다.

[0364] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 30 mL/분 이하이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분이다. 일부 실시양태에서, (i) 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G이고; (ii) 제2 유량은 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 비-활성화된 또는 덜 활성화된 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하기 전에 세포 조성물의 세포를 활성화 및 배양하는 것 (예를 들어, 적어도 24, 48, 72 또는 96시간 동안 세포를 배양하는 것)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 풍부화된 조성물의 T 세포를 동결보존하고 임의로 해동하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, T 세포는 9 μ m 미만의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 3 μ m 내지 약 9 μ m, 약 4 μ m 내지 약 9 μ m, 약 5 μ m 내지 약 9 μ m, 약 6 μ m 내지 약 9 μ m, 약 7 μ m 내지 약 9 μ m, 또는 약 8 μ m 내지 약 9 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 6 μ m 내지 약 9 μ m의 평균 직경을 갖는다.

[0365] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 65 mL/분 내지 약 100 mL/분이다. 일부 실시양태에서, (i) 제2 원심력은 약 1,500 G 내지 약 3,000 G이고; (ii) 제2 유량은 약 65 mL/분 내지 약 100 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2

유량은 약 65 mL/분 내지 약 90 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 65 mL/분 내지 약 80 mL/분이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 비-활성화된 또는 덜 활성화된 T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 방법의 적용 전에 동결보존 및 해동되었다. 일부 실시양태에서, T 세포는 9 μm 미만의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 3 μm 내지 약 9 μm , 약 4 μm 내지 약 9 μm , 약 5 μm 내지 약 9 μm , 약 6 μm 내지 약 9 μm , 약 7 μm 내지 약 9 μm , 또는 약 8 μm 내지 약 9 μm 의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 6 μm 내지 약 9 μm 의 평균 직경을 갖는다.

[0366] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 65 mL/분 내지 약 100 mL/분이다. 일부 실시양태에서, (i) 제2 원심력은 약 1,500 G 내지 약 3,000 G이고; (ii) 제2 유량은 약 65 mL/분 내지 약 100 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 65 mL/분 내지 약 90 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 65 mL/분 내지 약 80 mL/분이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 비-활성화된 또는 덜 활성화된 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 방법은 풍부화된 조성물의 세포를 동결보존하고 임의로 해동하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, T 세포는 9 μm 미만의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 3 μm 내지 약 9 μm , 약 4 μm 내지 약 9 μm , 약 5 μm 내지 약 9 μm , 약 6 μm 내지 약 9 μm , 약 7 μm 내지 약 9 μm , 또는 약 8 μm 내지 약 9 μm 의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 6 μm 내지 약 9 μm 의 평균 직경을 갖는다.

[0367] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 10 내지 약 100 mL/분, 약 15 내지 약 90 mL/분, 약 20 내지 약 80 mL/분, 약 25 내지 약 70 mL/분, 약 30 내지 약 60 mL/분, 또는 약 35 내지 약 50 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 20 mL/분, 약 21 mL/분, 약 22 mL/분, 약 23 mL/분, 약 24 mL/분, 약 25 mL/분, 약 25.5 mL/분, 약 26 mL/분, 약 26.5 mL/분, 약 27 mL/분, 약 27.5 mL/분, 약 28 mL/분, 약 28.5 mL/분, 약 29 mL/분, 약 29.5 mL/분, 약 30 mL/분, 약 31 mL/분, 약 32 mL/분, 약 33 mL/분, 약 34 mL/분 또는 약 35 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 25 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 25.5 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 26 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 26.5 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 27 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 27.5 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 28 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 28.5 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 29 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 29.5 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 30 mL/분이다.

[0368] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 20 내지 약 100, 약 20 내지 약 90, 약 20 내지 약 80, 약 20 내지 약 70, 약 20 내지 약 60, 약 20 내지 약 50, 약 20 내지 약 40, 약 20 내지 약 30, 약 30 내지 약 100, 약 30 내지 약 90, 약 30 내지 약 80, 약 30 내지 약 70, 약 30 내지 약 60, 약 30 내지 약 50, 약 30 내지 약 40, 약 40 내지 약 100, 약 40 내지 약 90, 약 40 내지 약 80, 약 40 내지 약 70, 약 40 내지 약 60, 약 40 내지 약 50, 약 50 내지 약 100, 약 50 내지 약 90, 약 50 내지 약 80, 약 50 내지 약 70, 약 50 내지 약 60, 약 60 내지 약 100, 약 60 내지 약 90, 약 60 내지 약 80, 약 60 내지 약 70, 약 70 내지 약 100, 약 70 내지 약 90, 약 80 내지 약 100, 약 80 내지 약 90, 또는 약 90 내지 약 100이다.

[0369] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 30 내지 약 70이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 30 내지 약 40이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 활성화된 T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포, 예를 들어 활성화된 T 세포는 약 5 μm 내지 약 25 μm , 약 5 μm 내지 약 20 μm , 약 5 μm 내지 약 15 μm , 약 5 μm 내지 약 10 μm , 약 10 μm 내지 약 25 μm , 약 10 μm 내지 약 20 μm , 약 10 μm 내지 약 15 μm , 약 15 μm 내지 약 25 μm , 약 15 μm 내지 약 20 μm , 또는 약 20 μm 내지 약 25 μm 의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 9 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖는다.

[0370] 일부 실시양태에서, T 세포는 약 10 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 12 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 14 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖는다.

[0371] 일부 실시양태에서, T 세포는 약 9 μm 내지 약 20 μm 의 평균 직경을 갖고, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 30 내지 약 70이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 10 μm 내지 20 μm (예를 들어, 12 μm 내지 20 μm 또는 14 μm 내지 20 μm)의 평균 직경을 갖고, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 30 내지 약 70이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 12 μm 내지 20 μm 의 평균 직경을 갖고, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 30 내지 약 70이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 14 μm 내지 20 μm 의 평균 직경을 갖고, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 30 내지 약 70이다.

[0372] 일부 실시양태에서, T 세포는 9 μm 미만의 평균 직경을 갖고, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 30 내지 약

40이다.

- [0373] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 30 내지 약 40이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 비-활성화된 또는 덜 활성화된 T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 방법의 적용 전에 동결보존 및 해동되었다. 일부 실시양태에서, T 세포는 9 μm 미만의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 3 μm 내지 약 9 μm , 약 4 μm 내지 약 9 μm , 약 5 μm 내지 약 9 μm , 약 6 μm 내지 약 9 μm , 약 7 μm 내지 약 9 μm , 또는 약 8 μm 내지 약 9 μm 의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 6 μm 내지 약 9 μm 의 평균 직경을 갖는다.
- [0374] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 20 내지 약 100, 약 25 내지 약 80, 또는 약 30 내지 약 60이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 20이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 25이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 30이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 35이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 40이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 45이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 50이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 55이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 60이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 65이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 70이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비는 약 75이다.
- [0375] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G이고, 제2 유량은 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 1,000 G이고, 유량은 약 28.5 mL/분이다.
- [0376] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 5분 내지 약 100분, 약 10분 내지 약 90분, 약 15분 내지 약 80분, 약 20분 내지 약 70분, 약 25분 내지 약 60분, 약 30분 내지 약 50분, 또는 약 35분 내지 약 40분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 5분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 10분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 15분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 20분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 25분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 30분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 45분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 60분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 75분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 약 90분 동안 세포 조성물에 적용된다.
- [0377] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 15분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 30분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 45분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 60분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 75분 동안 세포 조성물에 적용된다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량은 적어도 약 90분 동안 세포 조성물에 적용된다.
- [0378] A. 세포 조성물 (예를 들어, 조작된 세포 조성물)
- [0379] 일부 실시양태에서, T 세포 (예를 들어, 항원 수용체를 발현하도록 이전에 조작된 T 세포)를 포함하는 세포 조성물은 연속 대향류 원심분리 시스템에서 생존 세포에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 세포의 농도는 정확히 또는 약 1.0×10^5 개 세포/mL 내지 1.0×10^8 개 세포/mL, 예컨대 적어도 또는 약 1.0×10^5 개 세포/mL, 5×10^5 개 세포/mL, 1×10^6 개 세포/mL, 5×10^6 개 세포/mL, 1×10^7 개 세포/mL, 5×10^7 개 세포/mL 또는 1×10^8 개 세포/mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물은 약 1×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물은 약 1.25×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 1.5×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물은 약 1.75×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물은 약 2×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물은 약 2.25×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서,

조작된 세포 조성물은 약 2.5×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물은 약 2.75×10^6 개 세포/mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물은 약 3×10^6 개 세포/mL를 포함한다.

[0380] 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 20 mL 내지 약 300 mL, 약 25 mL 내지 약 250 mL, 약 30 mL 내지 약 200 mL, 약 35 mL 내지 약 150 mL, 또는 약 40 mL 내지 약 100 mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 20 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 25 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 30 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 35 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 40 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 45 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 50 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 55 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 60 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 70 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 80 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 100 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 125 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 150 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 175 mL이다. 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물의 부피는 약 200 mL이다.

[0381] 일부 실시양태에서, 조작된 세포 조성물은 약 1×10^8 개의 총 세포, 약 2×10^8 개의 총 세포, 약 3×10^8 개의 총 세포, 약 4×10^8 개의 총 세포, 약 5×10^8 개의 총 세포, 약 6×10^8 개의 총 세포, 약 7×10^8 개의 총 세포, 약 8×10^8 개의 총 세포, 약 9×10^8 개의 총 세포, 또는 약 1×10^9 개의 총 세포를 포함한다.

[0382] 일부 실시양태에서, T 세포는 약 5 μ m 내지 약 25 μ m, 약 5 μ m 내지 약 20 μ m, 약 5 μ m 내지 약 15 μ m, 약 5 μ m 내지 약 10 μ m, 약 10 μ m 내지 약 25 μ m, 약 10 μ m 내지 약 20 μ m, 약 10 μ m 내지 약 15 μ m, 약 15 μ m 내지 약 25 μ m, 약 15 μ m 내지 약 20 μ m, 또는 약 20 μ m 내지 약 25 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 9 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 활성화된 T 세포이다.

[0383] 일부 실시양태에서, T 세포는 약 10 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 12 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 14 μ m 내지 약 20 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 활성화된 T 세포이다.

[0384] 일부 실시양태에서, T 세포는 9 μ m 미만의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 3 μ m 내지 약 9 μ m, 약 4 μ m 내지 약 9 μ m, 약 5 μ m 내지 약 9 μ m, 약 6 μ m 내지 약 9 μ m, 약 7 μ m 내지 약 9 μ m, 또는 약 8 μ m 내지 약 9 μ m의 평균 직경을 갖는다. 일부 실시양태에서, T 세포는 약 6 μ m 내지 약 9 μ m의 평균 직경을 갖는다.

[0385] 일부 실시양태에서, 세포는 제공된 방법에 따라 유전자 조작 전에 인큐베이션 및/또는 배양된다. 인큐베이션 단계는 배양, 양성, 자극, 활성화 및/또는 증식을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포 조성물의 T 세포를 유전자 조작 전에 자극 조건 하에 인큐베이션하는 것을 포함한다. 이러한 조건은 집단에서 세포의 증식, 확장, 활성화 및/또는 생존을 유도하고/거나, 항원 노출을 모방하고/거나, 유전자 조작, 예컨대 재조합 항원 수용체의 도입을 위해 세포를 프라이밍하도록 설계된 것을 포함한다. 조건은 특정한 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 작용제, 예를 들어 영양소, 아미노산, 항생제, 이온, 및/또는 자극 인자, 예컨대 시토키인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체, 및 세포를 활성화시키도록 설계된 임의의 다른 작용제 중 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0386] 일부 실시양태에서, 제1 원심력 및 제1 유량이 적용되기 전에 세포 조성물의 T 세포는 자극 조건 하에 인큐베이션된다. 일부 실시양태에서, 방법은 세포 조성물을 원심분리 시스템 내로 로딩하기 전에 세포 조성물의 T 세포를 자극 조건 하에 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물이 원심분리 시스템 내로 로딩되기 전에 세포 조성물의 T 세포는 자극 조건 하에 인큐베이션된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 활성화된 T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L, 4-1BB, 또는 그의 조합을 발현하는 T 세포를 포함한다.

[0387] 일부 실시양태에서, 자극 조건은 자극 시약의 존재를 포함한다. 일부 실시양태에서, 자극 시약은 TCR 복합체의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있다. 일부 측면에서, 작용제는 T 세포에서 TCR/CD3 세포내 신호전달 캐스케이드를 켜거나 개시한다. 이러한 작용제는 항체, 예컨대 TCR 성분 및/또는 공동자극 수용체에 특이적인

것, 예를 들어 고체 지지체, 예컨대 비드에 결합된, 예를 들어 항-CD3, 항-CD28, 및/또는 1종 이상의 시토카인을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 자극 시약은 TCR 복합체의 1개 이상의 성분의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인 및 1개 이상의 공동자극 분자의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 자극 시약은 (i) TCR 복합체의 구성원에 특이적으로 결합하는 1차 작용제; 및 (ii) T 세포 공동자극 분자에 특이적으로 결합하는 2차 작용제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제는 CD3에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 공동자극 분자는 CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 또는 ICOS로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 1차 및 2차 작용제 중 적어도 1종은 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 2차 작용제는 항-CD28 항체 또는 그의 항원-결합 단편이거나 또는 이를 포함한다. 임의로, 확장 방법은 항-CD3 및/또는 항 CD28 항체를 배양 배지에 (예를 들어, 적어도 약 0.5 ng/ml의 농도로) 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0388] 일부 실시양태에서, 자극제는 IL-2 및/또는 IL-15, 예를 들어 적어도 약 10 유닛/mL의 IL-2 농도를 포함한다. 일부 측면에서, 인큐베이션은 미국 특허 번호 6,040,177 (Riddell et al.), 문헌 [Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al., (2012) Blood.1:72-82, 및/또는 Wang et al., (2012) J Immunother. 35(9):689-701]에 기재된 것과 같은 기술에 따라 수행된다.

[0389] 일부 실시양태에서, 자극 조건은 인간 T 림프구의 성장에 적합한 온도, 예를 들어, 적어도 약 25°C, 일반적으로 적어도 약 30°C, 및 일반적으로 정확히 또는 약 37°C를 포함한다. 임의로, 인큐베이션은 피더 세포로서 비-분열 EBV-형질전환된 림프모구성 세포 (LCL)를 첨가하는 것을 추가로 포함할 수 있다. LCL은 약 6000 내지 10,000 rad 범위의 감마선으로 조사될 수 있다. 일부 측면에서 LCL 피더 세포는 임의의 적합한 양, 예컨대 적어도 약 10:1의 LCL 피더 세포 대 초기 T 림프구의 비로 제공된다.

[0390] 실시양태에서, 항원-특이적 T 세포, 예컨대 항원-특이적 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포는 나이트 또는 항원 특이적 T 림프구를 항원으로 자극함으로써 획득된다. 예를 들어, 항원-특이적 T 세포주 또는 클론은 감염된 대상체로부터 T 세포를 분리하고 시토메갈로바이러스 항원으로 시험관내에서 세포를 자극함으로써 동일한 항원에 대해 생성될 수 있다.

[0391] 일부 경우에, 세포, 예를 들어 T 세포가 활성화되는 것을 필요로 하지 않는 바이러스 벡터 입자가 사용될 수 있다. 일부 이러한 경우에, 세포는 활성화 전에 및/또는 활성화의 부재 하에 선택 및/또는 형질도입될 수 있다.

[0392] 일부 실시양태에서, 세포 조성물 중 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 초과인 세포, 예를 들어 T 세포가 활성화되고, 예컨대 일부 경우에 HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L 및/또는 4-1BB 중 1종 이상에 대해 표면 양성이다. 일부 실시양태에서, 세포는 제1 원심력 및 제1 유량의 적용의 개시 전에, 예를 들어 유동층의 확립 전에 및/또는 형질도입의 개시 전에, 예컨대 항-CD3/항-CD28의 존재 하에 활성화제로 활성화된다. 외인성 성장 인자의 부재 하 또는 소량의 외인성 성장 인자 하에서의 시험관내 T 세포 집단 확장 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 6,352,694 B1 및 유럽 특허 EP 0 700 430 B1 참조). 일반적으로, 이러한 방법은 다양한 결합제 (예를 들어, 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체)가 고정된 1 μ m 초과의 고체 상 표면을 이용한다. 예를 들어, 디나비즈® CD3/CD28 (인비트로젠)은 T 세포 확장을 위한 상업적으로 입수가 가능한 시약이며, 이는 인간 T 세포 상의 CD3 및 CD28 세포 표면 분자에 대한 친화도 정제된 모노클로날 항체의 혼합물로 코팅된 균일한 4.5 μ m의 초상자성 멸균 비-발열성 폴리스티렌 비드이다. 일부 실시양태에서, 활성화제, 예를 들어 항-CD3 및/또는 항-CD28은 비드, 예컨대 자기 비드 상에 고정화될 수 있다.

[0393] 일부 실시양태에서, 세포 활성화는 또한 IL-2 (예를 들어, 정확히 또는 약 50 IU/mL 내지 200 IU/mL, 예컨대 정확히 또는 약 100 IU/mL)의 존재 하에 수행된다. 일부 실시양태에서, 활성화는 정확히 또는 약 1시간 내지 96시간, 1시간 내지 72시간, 1시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 8시간 내지 30시간 또는 12시간 내지 24시간, 예컨대 적어도 또는 약 적어도 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간 또는 72시간 수행된다. 일부 실시양태에서, 활성화는 정확히 또는 약 25°C 초과, 예컨대 일반적으로 정확히 또는 약 32°C, 35°C 또는 37°C 초과, 예를 들어 정확히 또는 약 37°C $\pm$ 2°C의 온도, 예컨대 정확히 또는 약 37°C의 온도에서 수행된다.

[0394] 일부 실시양태에서, 세포는 접촉의 개시 전에, 예를 들어 형질도입의 개시 전에, 예컨대 항-CD3/항-CD28의 존재 하에 활성화제로 활성화되지 않는다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 복수의 휴지기 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 집단 내의 T 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 그 초과는 휴지기 T 세포, 예컨대 T 세포 활성화 마커, 예컨대 표면 마커 또는 세포내 시토카인 또는 다른 마커가 결여된 T 세포, 및/또는 세포 주기의 G0 또는 G0G1a 단계에 있는 T 세포이다.

- [0395] 특정한 측면에서, 제공된 방법은 올리고머 단백질 시약, 예컨대 다량체화 시약과의 접촉 및/또는 인큐베이션 전에 활성화의 필요 없이 T 세포에서 형질도입이 일어나게 한다. 일부 실시양태에서, 방법은 휴지기 또는 나이트 T 세포를 함유하는 T 세포의 집단을 먼저, 예를 들어 형질도입 전에 T 세포를 활성화 및/또는 자극하는 것 없이 바이러스 벡터로 형질도입하는 것을 포함한다. 일부 이러한 실시양태에서, 제공된 방법은 T 세포를 활성화 및/또는 자극하는 단계를 포함하지 않는, 입양 요법을 위한 세포, 예컨대 T 세포를 제조하는 데 사용될 수 있다.
- [0396] 일부 실시양태에서, 세포는 일반적으로 진핵 세포, 예컨대 포유동물 세포이고, 전형적으로 인간 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 혈액, 골수, 림프 또는 림프성 기관으로부터 유래되거나, 또는 면역계의 세포, 예컨대 선천성 또는 적응성 면역의 세포, 예를 들어 골수성 또는 림프성 세포, 예컨대 림프구, 전형적으로 T 세포 및/또는 NK 세포이다. 다른 예시적인 세포는 줄기 세포, 예컨대 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)를 비롯한 다능 및 만능 줄기 세포를 포함한다. 세포는 전형적으로 1차 세포, 예컨대 대상체로부터 직접 분리되고/거나 대상체로부터 분리되고 동결된 것이다. 일부 실시양태에서, 세포는 1차 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 인간 대상체로부터의 1차 T 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 T 세포 또는 다른 세포 유형의 1종 이상의 하위세트, 예컨대 전체 T 세포 집단, CD4+ 세포, CD8+ 세포, 및 그의 하위집단, 예컨대 기능, 활성화 상태, 성숙, 분화 잠재력, 확장, 재순환, 국제화 및/또는 지속 능력, 항원-특이성, 항원 수용체의 유형, 특정한 기관 또는 구획에서의 존재, 마커 또는 시토킴인 분비 프로파일, 및/또는 분화 정도에 의해 정의되는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 CD3+ T 세포를 포함하거나 또는 그에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 세포는 CD4+ T 세포를 포함하거나 또는 그에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 세포는 CD8+ T 세포를 포함하거나 또는 그에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 세포는 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함한다. 치료될 대상체에 관하여, 세포는 동종 및/또는 자가일 수 있다. 방법 중에는 기성 방법이 포함된다. 일부 측면에서, 예컨대 기성 기술의 경우, 세포는 만능 및/또는 다능, 예컨대 줄기 세포, 예컨대 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)이다. 일부 실시양태에서, 방법은 본원에 기재된 바와 같이 대상체로부터 세포를 분리하고, 이를 제조, 프로세싱, 배양 및/또는 조작하고, 동결보존 전 또는 후에 이를 동일한 환자 내로 재도입하는 것을 포함한다.
- [0397] T 세포 및/또는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 하위유형 및 하위집단 중에는 나이트 T (TN) 세포, 이펙터 T 세포 (TEFF), 기억 T 세포 및 그의 하위유형, 예컨대 줄기 세포 기억 T (TSCM), 중심 기억 T (TCM), 이펙터 기억 T (TEM), 또는 말단 분화 이펙터 기억 T 세포, 중앙-침윤 림프구 (TIL), 미성숙 T 세포, 성숙 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 점막-연관 불변 T (MAIT) 세포, 자연 발생 및 적응 조절 T (Treg) 세포, 헬퍼 T 세포, 예컨대 TH1 세포, TH2 세포, TH3 세포, TH17 세포, TH9 세포, TH22 세포, 여포성 헬퍼 T 세포, 알파/베타 T 세포, 및 델타/감마 T 세포가 있다.
- [0398] 일부 실시양태에서, 세포는 자연 킬러 (NK) 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 단핵구 또는 과립구, 예를 들어 골수 세포, 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 비만 세포, 호산구 및/또는 호염기구이다.
- [0399] 일부 실시양태에서, 세포의 제조는 1회 이상의 배양 및/또는 제조 단계를 포함한다. 세포는 샘플, 예컨대 생물학적 샘플, 예를 들어 대상체로부터 수득되거나 유래된 것으로부터 분리될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포가 분리되는 대상체는 질환 또는 상태를 갖거나 또는 세포 요법을 필요로 하거나 또는 세포 요법이 투여될 대상체이다. 일부 실시양태에서 대상체는 특정한 치료적 개입, 예컨대 세포를 분리, 프로세싱 및/또는 조작하는 입양 세포 요법을 필요로 하는 인간이다.
- [0400] 따라서, 일부 실시양태에서 세포는 1차 세포, 예를 들어 1차 인간 세포이다. 샘플은 대상체로부터 직접 채취한 조직, 유체 및 다른 샘플, 뿐만 아니라 1종 이상의 프로세싱 단계, 예컨대 분리, 원심분리, 유전자 조작 (예를 들어, 바이러스 벡터로의 형질도입), 세척 및/또는 인큐베이션으로부터 생성된 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플은 생물학적 공급원으로부터 직접 수득된 샘플 또는 프로세싱된 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 체액, 예컨대 혈액, 혈장, 혈청, 뇌척수액, 활액, 소변 및 땀, 조직 및 기관 샘플, 예컨대 그로부터 유래된 프로세싱된 샘플을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0401] 일부 측면에서, 세포가 유래 또는 분리되는 샘플은 혈액 또는 혈액-유래 샘플이거나, 또는 분리반출술 또는 백혈구분리반출술 산물이거나 또는 그로부터 유래된 것이다. 예시적인 샘플은 전혈, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 백혈구, 골수, 흉선, 조직 생검, 중앙, 백혈병, 림프종, 림프절, 장 연관 림프성 조직, 점막 연관 림프성 조직, 비장, 다른 림프성 조직, 간, 폐, 위, 장, 결장, 신장, 췌장, 유방, 골, 전립선, 자궁경부, 고환, 난소, 편도 또는 다른 기관, 및/또는 그로부터 유래된 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 PBMC이다. 샘플은 세포 요법, 예를 들어 입양 세포 요법과 관련하여 자가 및 동종 공급원으로부터의 샘플을 포함한다.
- [0402] 일부 실시양태에서, 세포는 세포주, 예를 들어 T 세포주로부터 유래된다. 일부 실시양태에서 세포는 이중 공급

원, 예를 들어 마우스, 래트, 비-인간 영장류 또는 돼지로부터 수득된다.

- [0403] 일부 실시양태에서, 세포의 단리는 1개 이상의 제조 및/또는 비-친화도 기반 세포 분리 단계를 포함한다. 일부 예에서, 세포는, 예를 들어 원치않는 성분을 제거하거나, 목적하는 성분을 풍부화하거나, 특정한 시약에 감수성인 세포를 용해 또는 제거하기 위해, 1종 이상의 시약의 존재 하에 세척, 원심분리 및/또는 인큐베이션된다. 일부 예에서, 세포는 1종 이상의 특성, 예컨대 밀도, 부착 특성, 크기, 감수성 및/또는 특정한 성분에 대한 저항성에 기초하여 분리된다.
- [0404] 일부 예에서, 대상체의 순환 혈액으로부터의 세포는, 예를 들어 분리반출술 또는 백혈구분리반출술에 의해 수득된다. 샘플은, 일부 측면에서, T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 다른 유핵 백혈구, 적혈구 및/또는 혈소판을 포함한 림프구를 함유하고, 일부 측면에서 적혈구 및 혈소판 이외의 세포를 함유한다.
- [0405] 일부 실시양태에서, 대상체로부터 수집된 혈액 세포는, 예를 들어 혈장 분획을 제거하고 세포를 후속 프로세싱 단계를 위해 적절한 완충제 또는 배지에 넣기 위해 세척된다. 일부 실시양태에서, 세포는 포스페이트 완충 염수 (PBS)로 세척된다. 일부 실시양태에서, 세척 용액은 칼슘 및/또는 마그네슘 및/또는 많은 또는 모든 2가 양이온이 결여되어 있다. 일부 측면에서, 세척 단계는 반자동화 "관통형" 원심분리기 (예를 들어, 코브 2991 셀 프로세서, 백스터)에 의해 제조업체의 지침에 따라 달성된다. 일부 측면에서, 세척 단계는 접선 흐름 여과 (TFF)에 의해 제조업체의 지침에 따라 달성된다. 일부 실시양태에서, 세포는 세척 후에 다양한 생체적합성 완충제, 예컨대 예를 들어 무 Ca^{++}/Mg^{++} PBS 중에 재현탁된다. 특정 실시양태에서, 혈액 세포 샘플의 성분은 제거되고, 세포는 배양 배지에 직접 재현탁된다.
- [0406] 일부 실시양태에서, 방법은 밀도-기반 세포 분리 방법, 예컨대 적혈구를 용해시키고 퍼콜 또는 퍼콜 구배를 통해 원심분리함으로써 말초 혈액으로부터 백혈구를 제조하는 것을 포함한다.
- [0407] 일부 실시양태에서, 제공된 방법을 수행하기 전에 세포를 풍부화하거나 선택할 필요는 없다.
- [0408] 일부 실시양태에서, 단리 방법은 1종 이상의 특이적 분자, 예컨대 표면 마커, 예를 들어 표면 단백질, 세포내 마커 또는 핵산의 세포 내 발현 또는 존재에 기초하여 상이한 세포 유형을 분리하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 마커에 기초한 분리를 위한 임의의 공지된 방법이 사용될 수 있다. 분리 방법은 가역적 시약 시스템, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 작용제 (예컨대 수용체 결합제 또는 선택제) 및 시약을 사용하는 방법을 포함한, 본원에 개시된 것 중 임의의 것을 포함할 수 있다.
- [0409] 일부 실시양태에서, 분리는 친화도- 또는 면역친화도-기반 분리이다. 예를 들어, 일부 측면에서 단리는 1종 이상의 마커, 전형적으로 세포 표면 마커의 세포 발현 또는 발현 수준에 기초한, 예를 들어 이러한 마커에 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 파트너와의 인큐베이션에 이은, 일반적으로 세척 단계, 및 항체 또는 결합 파트너에 결합되지 않은 세포로부터 항체 또는 결합 파트너에 결합된 세포를 분리하는 것에 의한, 세포 및 세포 집단의 분리를 포함한다.
- [0410] 이러한 분리 단계는 시약에 결합된 세포가 추가의 사용을 위해 보유되는 경우 양성 선택 및/또는 항체 또는 결합 파트너에 결합되지 않은 세포가 보유되는 경우 음성 선택에 기초할 수 있다. 일부 예에서, 둘 다의 분획은 추가의 사용을 위해 보유된다. 일부 측면에서, 음성 선택은 불균질 집단에서 세포 유형을 특이적으로 확인하는 항체가 이용가능하지 않은 경우에 특히 유용할 수 있으며, 이에 따라 분리는 목적하는 집단 이외의 다른 세포에 의해 발현된 마커에 기초하여 가장 잘 수행된다.
- [0411] 분리는 특정한 세포 집단 또는 특정한 마커를 발현하는 세포의 100% 풍부화 또는 제거를 유발할 필요는 없다. 예를 들어, 특정한 유형의 세포, 예컨대 마커를 발현하는 세포의 양성 선택 또는 풍부화는 이러한 세포의 수 또는 백분율을 증가시키는 것을 지칭하지만, 마커를 발현하지 않는 세포의 완전한 부재를 유발할 필요는 없다. 마찬가지로, 특정한 유형의 세포, 예컨대 마커를 발현하는 세포의 음성 선택, 제거 또는 고갈은 이러한 세포의 수 또는 백분율을 감소시키는 것을 지칭하지만, 모든 이러한 세포의 완전한 제거를 유발할 필요는 없다.
- [0412] 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 $CD3^{+}$ T 세포에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물 중 세포의 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%는 $CD3^{+}$ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 $CD4^{+}$ T 세포에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물 중 세포의 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%는 $CD4^{+}$ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 $CD8^{+}$ T 세포에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물 중 세포의 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%는 $CD8^{+}$ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 $CD4^{+}$ 및 $CD8^{+}$

T 세포에 대해 풍부화된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물 중 세포의 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포이다.

- [0413] 일부 예에서, 다중 라운드의 분리 단계가 수행되며, 여기서 하나의 단계로부터 양성으로 또는 음성으로 선택된 분획은 또 다른 분리 단계, 예컨대 후속 양성 또는 음성 선택에 적용된다. 일부 예에서, 단일 분리 단계는, 예컨대 세포를 각각 음성 선택을 위해 표적화된 마커에 특이적인 복수의 항체 또는 결합 파트너와 함께 인큐베이션함으로써, 다중 마커를 발현하는 세포를 동시에 고갈시킬 수 있다. 마찬가지로, 다중 세포 유형은 세포를 다양한 세포 유형 상에서 발현된 복수의 항체 또는 결합 파트너와 함께 인큐베이션함으로써 동시에 양성 선택될 수 있다.
- [0414] 예를 들어, 일부 측면에서, T 세포의 특정 하위집단, 예컨대 양성 또는 높은 수준의 1종 이상의 표면 마커를 발현하는 세포, 예를 들어, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및/또는 CD45RO+ T 세포는 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 분리된다.
- [0415] 예를 들어, CD3+, CD28+ T 세포는 CD3/CD28 접합된 자기 비드 (예를 들어, 디나비즈® M-450 CD3/CD28 T 세포 확장제)를 사용하여 양성 선택될 수 있다.
- [0416] 일부 실시양태에서, 단리는 양성 선택에 의한 특정한 세포 집단의 풍부화 또는 음성 선택에 의한 특정한 세포 집단의 고갈에 의해 수행된다. 일부 실시양태에서, 양성 또는 음성 선택은 각각 양성 또는 음성 선택된 세포 상에서 발현되거나 (마커+) 또는 비교적 더 높은 수준으로 발현된 (마커^고) 1종 이상의 표면 마커에 특이적으로 결합하는 1종 이상의 항체 또는 다른 결합제와 함께 세포를 인큐베이션함으로써 달성된다.
- [0417] 일부 실시양태에서, T 세포는 비-T 세포, 예컨대 B 세포, 단핵구 또는 다른 백혈구 상에서 발현된 마커, 예컨대 CD14의 음성 선택에 의해 PBMC 샘플로부터 분리된다. 일부 측면에서, CD4+ 또는 CD8+ 선택 단계가 CD4+ 헬퍼 및 CD8+ 세포독성 T 세포를 분리하는 데 사용된다. 이러한 CD4+ 및 CD8+ 집단은 1종 이상의 나이브, 기억 및/또는 이펙터 T 세포 하위집단에서 발현되거나 또는 비교적 더 높은 정도로 발현된 마커에 대한 양성 또는 음성 선택에 의해 하위집단으로 추가로 분류될 수 있다.
- [0418] 일부 실시양태에서, CD8+ 세포는, 예컨대 각각의 하위집단과 연관된 표면 항원에 기초한 양성 또는 음성 선택에 의해 나이브, 중심 기억, 이펙터 기억 및/또는 중심 기억 줄기 세포에 대해 추가로 풍부화되거나 또는 고갈된다. 일부 실시양태에서, 중심 기억 T (TCM) 세포에 대한 풍부화는 효능을 증가시키기 위해, 예컨대 투여 후 장기간 생존, 확장 및/또는 생착을 개선시키기 위해 수행되며, 이는 일부 측면에서 이러한 하위집단에서 특히 강건하다. 문헌 [Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82; Wang et al., (2012) J Immunother. 35(9):689-701]을 참조한다. 일부 실시양태에서, TCM-풍부화된 CD8+ T 세포와 CD4+ T 세포를 조합하는 것은 효능을 추가로 증진시킨다.
- [0419] 실시양태에서, 기억 T 세포는 CD8+ 말초 혈액 림프구의 CD62L+ 및 CD62L- 하위세트 둘 다에 존재한다. PBMC는 예컨대 항-CD8 및 항-CD62L 항체를 사용하는 것에 의해 CD62L-CD8+ 및/또는 CD62L+CD8+ 분획이 풍부화되거나 또는 고갈될 수 있다.
- [0420] 일부 실시양태에서, 중심 기억 T (TCM) 세포에 대한 풍부화는 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 및/또는 CD 127의 양성 또는 높은 표면 발현에 기초하고; 일부 측면에서, 이는 CD45RA 및/또는 그랜자임 B를 발현하거나 또는 고도로 발현하는 세포에 대한 음성 선택에 기초한다. 일부 측면에서, TCM 세포에 대해 풍부화된 CD8+ 집단의 단리는 CD4, CD14, CD45RA를 발현하는 세포의 고갈, 및 CD62L을 발현하는 세포에 대한 양성 선택 또는 풍부화에 의해 수행된다. 한 측면에서, 중심 기억 T (TCM) 세포에 대한 풍부화는 CD4 발현에 기초하여 선택된 세포의 음성 분획으로 출발하여 수행되며, CD14 및 CD45RA의 발현에 기초한 음성 선택 및 CD62L에 기초한 양성 선택이 적용된다. 이러한 선택은 일부 측면에서 동시에 수행되고, 다른 측면에서 임의의 순서로 순차적으로 수행된다. 일부 측면에서, CD8+ 세포 집단 또는 하위집단을 제조하는 데 사용된 동일한 CD4 발현-기반 선택 단계는 또한 CD4+ 세포 집단 또는 하위집단을 생성하는 데 사용되어, CD4-기반 분리로부터의 양성 및 음성 분획 둘 다가 보유되고, 이는 임의로 1개 이상의 추가의 양성 또는 음성 선택 단계 후에 방법의 후속 단계에 사용된다.
- [0421] 특정한 예에서, PBMC의 샘플 또는 다른 백혈구 샘플이 CD4+ 세포의 선택에 적용되며, 여기서 둘 다의 음성 및 양성 분획이 보유된다. 이어서, 음성 분획은 CD14 및 CD45RA 또는 CD19의 발현에 기초한 음성 선택 및 중심 기억 T 세포의 특징적인 마커, 예컨대 CD62L 또는 CCR7에 기초한 양성 선택에 적용되며, 여기서 양성 및 음성 선택은 어느 순서로든 수행된다.

- [0422] CD4+ T 헬퍼 세포는 세포 표면 항원을 갖는 세포 집단을 확인함으로써 나이트, 중심 기억 및 이펙터 세포로 분류된다. CD4+ 림프구는 표준 방법에 의해 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 나이트 CD4+ T 림프구는 CD45RO-, CD45RA+, CD62L+, CD4+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 중심 기억 CD4+ 세포는 CD62L+ 및 CD45RO+이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 CD4+ 세포는 CD62L- 및 CD45RO-이다.
- [0423] 한 예에서, 음성 선택에 의해 CD4+ 세포를 풍부화하기 위해, 모노클로날 항체 콕테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 결합 파트너는 양성 및/또는 음성 선택을 위한 세포의 분리를 가능하게 하기 위해 고체 지지체 또는 매트릭스, 예컨대 자기 비드 또는 상자성 비드에 결합된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 세포 및 세포 집단은 면역자기 (또는 친화도자기) 분리 기술을 사용하여 분리 또는 단리된다 (문헌 [Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher © Humana Press Inc., Totowa, NJ]에서 검토됨).
- [0424] 일부 측면에서, 분리될 세포의 샘플 또는 조성물은 작은, 자화성 또는 자기 반응성 물질, 예컨대 자기 반응성 입자 또는 마이크로입자, 예컨대 상자성 비드 (예를 들어, 예컨대 디날비즈(Dynalbeads) 또는 MACS 비드)와 함께 인큐베이션된다. 자기 반응성 물질, 예를 들어 입자는 일반적으로 분리가 요망되는, 예를 들어 음성 또는 양성 선택이 요망되는 세포, 세포들 또는 세포 집단 상에 존재하는 분자, 예를 들어 표면 마커에 특이적으로 결합하는 결합 파트너, 예를 들어 항체에 직접적으로 또는 간접적으로 부착된다.
- [0425] 일부 실시양태에서, 자기 입자 또는 비드는 특이적 결합 구성원, 예컨대 항체 또는 다른 결합 파트너에 결합된 자기 반응성 물질을 함유한다. 자기 분리 방법에 사용되는 다수의 널리 공지된 자기 반응성 물질이 존재한다. 적합한 자기입자는 미국 특허 번호 4,452,773 (Molday) 및 유럽 특허 명세서 EP 452342 B에 기재된 것을 포함하며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 미국 특허 번호 4,795,698 (Owen) 및 미국 특허 번호 5,200,084 (Liberti et al.)에 기재된 것과 같은 콜로이드 크기의 입자는 다른 예이다.
- [0426] 인큐베이션은 일반적으로 자기 입자 또는 비드에 부착된 항체 또는 결합 파트너, 또는 분자, 예컨대 이러한 항체 또는 결합 파트너에 특이적으로 결합하는 2차 항체 또는 다른 시약이, 샘플 내의 세포 상에 존재하는 경우에 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 조건 하에 수행된다.
- [0427] 일부 측면에서, 샘플은 자기장에 배치되고, 자기 반응성 또는 자화성 입자가 부착된 세포는 자석에 유인되어 비표지된 세포로부터 분리될 것이다. 양성 선택의 경우, 자석에 유인된 세포가 보유되고; 음성 선택의 경우, 유인되지 않은 세포 (비표지된 세포)가 보유된다. 일부 측면에서, 양성 및 음성 선택의 조합은 동일한 선택 단계 동안 수행되며, 여기서 양성 및 음성 분획이 보유되고 추가로 프로세싱되거나 또는 추가의 분리 단계에 적용된다.
- [0428] 세포로부터 자화성 입자를 제거하는 방법은 공지되어 있고, 예를 들어 경쟁 비-표지된 항체, 자화성 입자 또는 절단가능한 링커에 접합된 항체 등의 사용을 포함한다. 일부 실시양태에서, 자화성 입자는 생분해성이다.
- [0429] 일부 실시양태에서, 친화도-기반 선택은 자기-활성화 세포 분류 (MACS) (밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotech), 캘리포니아주 오번)를 통한 것이다. 자기 활성화 세포 분류 (MACS) 시스템은 그에 부착된 자화된 입자를 갖는 세포의 고순도 선택이 가능하다. 특정 실시양태에서, MACS는 비-표적 및 표적 종이 외부 자기장의 인가 후에 순차적으로 용리되는 방식으로 작동한다. 즉, 자화된 입자에 부착된 세포는 제자리에 유지되는 반면, 비부착된 종은 용리된다. 이어서, 이러한 제1 용리 단계가 완료된 후에, 자기장에 포획되고 용리되는 것이 방지된 종은 이들이 용리되고 회수될 수 있도록 일부 방식으로 용리된다. 특정 실시양태에서, 비-표적 세포는 표지되고, 불균질 세포 집단으로부터 고갈된다.
- [0430] 특정 실시양태에서, 단리 또는 분리는 방법의 단리, 세포 제조, 분리, 프로세싱, 인큐베이션, 배양 및/또는 제제화 단계 중 1개 이상을 수행하는 시스템, 디바이스 또는 장치를 사용하여 수행된다. 일부 측면에서, 시스템은 예를 들어 오류, 사용자 취급 및/또는 오염을 최소화하기 위해 폐쇄 또는 멸균 환경에서 각각의 이들 단계를 수행하는 데 사용된다. 한 예에서, 시스템은 국제 특허 출원 공개 번호 WO2009/072003, 또는 US 20110003380 A1에 기재된 바와 같은 시스템이다.
- [0431] 일부 실시양태에서, 시스템 또는 장치는 단리, 프로세싱, 조작, 및 제제화 단계 중 1개 이상, 예를 들어 모두를 통합형 또는 독립형 시스템에서 및/또는 자동화된 또는 프로그램가능한 방식으로 수행한다. 일부 측면에서, 시스템 또는 장치는 시스템 또는 장치와 통신하는 컴퓨터 및/또는 컴퓨터 프로그램을 포함하며, 이는 사용자가 프로세싱, 단리, 조작 및 제제화 단계의 다양한 측면을 프로그래밍, 제어, 결과 평가 및/또는 조정하게 한다.

- [0432] 일부 측면에서, 분리 및/또는 다른 단계는, 예를 들어 폐쇄 및 멸균 시스템에서 임상-규모 수준으로의 세포의 자동화된 분리를 위해, 클리니맥스 시스템 (밀테니 바이오텍)을 사용하여 수행된다. 특정 실시양태에서, 분리 및/또는 다른 단계는 클리니맥스 프로디지 시스템 (밀테니 바이오텍)을 사용하여 수행된다. 일부 측면에서 클리니맥스 프로디지 시스템에는 원심분리에 의한 세포의 자동화된 세척 및 분획화를 허용하는 세포 프로세싱 유닛이 장착되어 있다.
- [0433] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포 집단은 다중 세포 표면 마커에 대해 염색된 세포가 유체 스트림으로 운반되는 유동 세포측정법을 통해 수집되고 풍부화된다 (또는 고갈된다). 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포 집단은 정제용 규모 (FACS)-분류를 통해 수집되고 풍부화된다 (또는 고갈된다). 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 세포 집단은 FACS-기반 검출 시스템과 조합된 마이크로전기기계 시스템 (MEMS) 칩의 사용에 의해 수집되고 풍부화된다 (또는 고갈된다) (예를 들어, WO 2010/033140, 문헌 [Cho et al., (2010) Lab Chip 10, 1567-1573; 및 Godin et al., (2008) J Biophoton. 1(5):355-376] 참조). 둘 다의 경우에서, 세포는 다중 마커에 의해 표지되어, 잘-규정된 T 세포 하위세트의 고순도로의 단리를 가능하게 할 수 있다.
- [0434] 일부 실시양태에서, 제조 방법은 단리, 인큐베이션 및/또는 유전자 조작 전 또는 후에 세포를 동결, 예를 들어 동결보존하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 동결 및 후속 해동 단계는 세포 집단에서 과립구를 제거하고, 어느 정도의 단핵구를 제거한다. 일부 실시양태에서, 세포는, 예를 들어 혈장 및 혈소판을 제거하기 위한 세척 단계 후에 동결 용액 중에 현탁된다. 일부 측면에서 다양한 공지된 동결 용액 및 파라미터 중 임의의 것이 사용될 수 있다. 한 예는 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민 (HSA)을 함유하는 PBS, 또는 다른 적합한 세포 동결 배지를 사용하는 것을 수반한다. 이어서, 이는 DMSO 및 HSA의 최종 농도가 각각 10% 및 4%가 되도록 배지에 의해 1:1 희석된다. 이어서, 세포는 분당 1°의 속도로 -80℃로 동결되고, 액체 질소 저장 탱크의 증기 상에 저장된다.
- [0435] B. 풍부화된 조성물
- [0436] 일부 실시양태에서, 방법은 풍부화된 조성물에 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하여 생존을 풍부화된 세포를 포함하는 (예를 들어 조작된 세포를 포함하는) 풍부화된 조성물을 생산하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 예컨대 세포 오염에서의 하류 사용을 위해 수집 또는 수거된다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 및 제3 유량은 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 풍부화된 조성물의 세포에 적용된다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 세포에 대한 제3 원심력 및 제3 유량의 적용은 풍부화된 조성물의 수집 또는 수거를 가능하게 한다.
- [0437] 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 캐놀라를 통해 수집된다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 원추형 유체 인클로저의 팁의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부로 진입하고, 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부에서 배출된다.
- [0438] 일부 실시양태에서, 방법은 풍부화된 조성물을 동결보존하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 세포의 수준은 동결보존된 풍부화된 조성물 중에서 유지된다. 일부 실시양태에서, 방법은 동결보존된 풍부화된 조성물을 해동시키는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 세포의 수준은 해동된 풍부화된 조성물 중에서 유지된다.
- [0439] 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,000 G 내지 약 3,000 G, 약 2,200 G 내지 약 2,800 G, 또는 약 2,400 G 내지 약 2,600 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,100 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,200 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,300 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,400 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,600 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,700 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,800 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,900 G이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 3,000 G이다.
- [0440] 일부 실시양태에서, 제3 유량은 방사상 외향이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 원추형 유체 인클로저의 팁을 향한다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 및 제3 유량은 동일하거나 또는 실질적으로 동일한 방향이다.
- [0441] 일부 실시양태에서, 제3 유량은 원추형 유체 인클로저를 통한 배지의 유동에 의해 유발된다. 일부 실시양태에서, 원추형 유체 인클로저를 통한 배지의 유동은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부로부터 팁까지이다. 일부 실시양태에서, 배지는 원추형 유체 인클로저의 팁에서 배출되어 캐놀라에 진입한다.

- [0442] 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 10 mL/분 내지 약 30 mL/분, 약 12 mL/분 내지 약 28 mL/분, 약 15 mL/분 내지 약 25 mL/분, 또는 약 18 mL/분 내지 약 22 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 15 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 16 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 17 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 18 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 19 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 20 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 21 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 22 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 23 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 24 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 15 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 유량은 약 25 mL/분이다.
- [0443] 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 100 내지 약 150, 약 110 내지 140, 또는 약 120 내지 130이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 100이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 105이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 110이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 115이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 120이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 125이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 130이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 135이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 140이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 145이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비는 약 150이다.
- [0444] 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,000 G 내지 약 3,000 G이고; 제3 유량은 약 15 mL/분 내지 약 25 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제3 원심력은 약 2,500 G이고, 제3 유량은 약 20 mL/분이다.
- [0445] 일부 실시양태에서, 프로세싱 단계는 세포의 세척, 배양, 양성, 자극, 활성화, 증식 및/또는 제제화를 추가적으로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 세포는 산출 조성물로서 수집되기 전에 1회 이상의 세척 단계에 적용된다. 일부 실시양태에서, 수집된 풍부화된 조성물 세포는 자극 조건 또는 자극제의 존재 하에 인큐베이션된다. 이러한 조건은 집단에서 세포의 증식, 확장, 활성화 및/또는 생존을 유도하고/거나 항원 노출을 모방하도록 설계된 것을 포함한다. 자극은 대상체에게 투여한 후에 생체외 또는 생체내에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물이 수집되고, 섹션 I.C에 기재된 것 중 임의의 것을 비롯한 추가의 프로세싱 단계에 적용된다.
- [0446] C. 풍부화된 조성물의 예시적인 특성
- [0447] 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 (예를 들어, 수집된 풍부화된 조성물)의 부피는 약 1 mL 내지 약 20,000 mL, 약 5 mL 내지 약 2,000 mL, 약 10 mL 내지 약 1,000 mL, 약 15 mL 내지 약 500 mL, 또는 약 20 mL 내지 약 100 mL를 포함한다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 부피는 약 1 mL, 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 약 25 mL, 약 30 mL, 약 35 mL, 약 40 mL, 약 45 mL, 약 50 mL, 약 55 mL, 약 60 mL, 약 65 mL, 약 70 mL, 약 75 mL, 약 80 mL, 약 85 mL, 약 90 mL, 약 95 mL, 또는 약 100 mL이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 부피는 약 1 mL이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 부피는 약 5 mL이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 부피는 약 10 mL이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 부피는 약 15 mL이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 부피는 약 20 mL이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 부피는 약 25 mL이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 부피는 약 30 mL이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 부피는 약 35 mL이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 부피는 약 40 mL이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 부피는 약 45 mL이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 부피는 약 50 mL이다.
- [0448] 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 세포 조성물 또는 세포 조성물보다 더 큰 백분율의 생존 T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 세포 조성물보다 더 큰 백분율의 생존 T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 적어도 약 5% 더 크거나, 적어도 약 10% 더 크거나, 적어도 약 15% 더 크거나, 적어도 약 20% 더 크거나, 또는 적어도 약 25% 더 크다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 5% 더 크다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 10% 더 크다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 15% 더 크다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 20% 더 크다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 25% 더 크다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 약 30% 더 크다.

[0449] 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 세포 조성물 (예를 들어, 조작된 세포 조성물)보다 더 큰 백분율의 생존 T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 적어도 약 5% 더 크거나, 적어도 약 10% 더 크거나, 적어도 약 15% 더 크거나, 적어도 약 20% 더 크거나, 또는 적어도 약 25% 더 크다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율보다 약 5% 더 크다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율보다 약 10% 더 크다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율보다 약 15% 더 크다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율보다 약 20% 더 크다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율보다 약 25% 더 크다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율은 세포 조성물 중 생존 T 투입물의 백분율보다 약 30% 더 크다.

[0450] 특정한 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 적어도 정확히 또는 약 50%, 적어도 정확히 또는 약 60%, 적어도 정확히 또는 약 70%, 적어도 정확히 또는 약 75%, 적어도 정확히 또는 약 80%, 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 적어도 정확히 또는 약 95%, 적어도 정확히 또는 약 99%, 또는 적어도 정확히 또는 약 99.9% 생존 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 적어도 정확히 또는 약 75% 생존 세포를 함유한다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 또는 적어도 정확히 또는 약 95% 생존 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 적어도 정확히 또는 약 50%, 적어도 정확히 또는 약 60%, 적어도 정확히 또는 약 70%, 적어도 정확히 또는 약 75%, 적어도 정확히 또는 약 80%, 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 적어도 정확히 또는 약 95%, 적어도 정확히 또는 약 99%, 또는 적어도 정확히 또는 약 99.9% 생존 CD3+ T 세포를 함유한다. 특정한 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 적어도 정확히 또는 약 75% 생존 CD3+ T 세포를 함유한다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 또는 적어도 정확히 또는 약 95% 생존 CD3+ T 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 적어도 정확히 또는 약 50%, 적어도 정확히 또는 약 60%, 적어도 정확히 또는 약 70%, 적어도 정확히 또는 약 75%, 적어도 정확히 또는 약 80%, 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 적어도 정확히 또는 약 95%, 적어도 정확히 또는 약 99%, 또는 적어도 정확히 또는 약 99.9% 생존 CD4+ T 세포를 함유한다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 적어도 정확히 또는 약 75% 생존 CD4+ T 세포를 함유한다. 특정한 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 또는 적어도 정확히 또는 약 95% 생존 CD4+ T 세포를 함유한다. 특정한 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 적어도 정확히 또는 약 50%, 적어도 정확히 또는 약 60%, 적어도 정확히 또는 약 70%, 적어도 정확히 또는 약 75%, 적어도 정확히 또는 약 80%, 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 적어도 정확히 또는 약 95%, 적어도 정확히 또는 약 99%, 또는 적어도 정확히 또는 약 99.9% 생존 CD8+ T 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 적어도 정확히 또는 약 75% 생존 CD8+ T 세포를 함유한다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 또는 적어도 정확히 또는 약 95% 생존 CD8+ T 세포를 함유한다.

[0451] 특정한 실시양태에서, 산출 세포는 아폽토시스를 겪고 있는 및/또는 제조되고/거나, 프라이밍되고/거나 아폽토시스에 진입하고 있는 적은 부분 및/또는 빈도의 세포를 갖는다. 특정한 실시양태에서, 산출 세포는 아폽토시스 마커에 대해 양성인 적은 부분 및/또는 빈도의 세포를 갖는다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 세포의 정확히 또는 약 40% 미만, 정확히 또는 약 35% 미만, 정확히 또는 약 30% 미만, 정확히 또는 약 25% 미만, 정확히 또는 약 20% 미만, 정확히 또는 약 15% 미만, 정확히 또는 약 10% 미만, 정확히 또는 약 5% 미만, 또는 정확히 또는 약 1% 미만이 아폽토시스 마커를 발현하고/거나, 함유하고/거나, 그에 대해 양성이다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 세포의 정확히 또는 약 25% 미만이 아폽토시스 마커를 발현하고/거나, 함유하고/거나, 그에 대해 양성이다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 세포의 정확히 또는 약 10% 미만이 아폽토시스 마커를 발현하고/거나, 함유하고/거나, 그에 대해 양성이다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 세포의 정확히 또는 약 5% 미만이 아폽토시스 마커를 발현하고/거나, 함유하고/거나, 그에 대해 양성이다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 세포의 정확히 또는 약 1% 미만이 아폽토시스 마커를 발현하고/거나, 함유하고/거나, 그에 대해 양성이다.

[0452] 특정한 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 CD3+ T 세포에 대해 풍부화된 세포의 조성물이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 65%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도

도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 98.5%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 99.5%, 적어도 또는 약 99.9%, 100%, 또는 약 100%는 CD3+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 86.5%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 87.5%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 88.5%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 89.5%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 90.5%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 91.5%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 92.5%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 93.5%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 94.5%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 95.5%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 96.5%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 97.5%, 적어도 또는 약 98%, 또는 적어도 또는 약 98.5%는 CD3+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 총 세포의 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 98%, 약 88% 내지 약 96%, 또는 약 90% 내지 약 94%는 CD3+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 CD3+ T 세포로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 90%는 CD3+ T 세포이고, 풍부화된 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 40%는 재조합 수용체 (예를 들어, CAR)를 발현한다.

[0453] 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포에 대해 풍부화된 세포의 조성물이다. 특정한 실시양태에서, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 풍부화된 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 65%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 98.5%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 99.5%, 적어도 또는 약 99.9%, 100%, 또는 약 100%를 차지한다. 일부 실시양태에서, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 풍부화된 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 86%, 적어도 또는 약 86.5%, 적어도 또는 약 87%, 적어도 또는 약 87.5%, 적어도 또는 약 88%, 적어도 또는 약 88.5%, 적어도 또는 약 89%, 적어도 또는 약 89.5%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 90.5%, 적어도 또는 약 91%, 적어도 또는 약 91.5%, 적어도 또는 약 92%, 적어도 또는 약 92.5%, 적어도 또는 약 93%, 적어도 또는 약 93.5%, 적어도 또는 약 94%, 적어도 또는 약 94.5%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 95.5%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 96.5%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 97.5%, 적어도 또는 약 98%, 또는 적어도 또는 약 98.5%를 차지한다. 일부 실시양태에서, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 풍부화된 조성물 중 총 세포의 약 80% 내지 약 100%, 약 85% 내지 약 98%, 약 88% 내지 약 96%, 또는 약 90% 내지 약 94%를 차지한다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포로 본질적으로 이루어진다.

[0454] 특정한 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 정확히 또는 약 10% 내지 정확히 또는 약 90%, 정확히 또는 약 20% 내지 정확히 또는 약 80%, 정확히 또는 약 25% 내지 정확히 또는 약 75%, 정확히 또는 약 30% 내지 정확히 또는 약 70%, 정확히 또는 약 35% 내지 정확히 또는 약 65%, 정확히 또는 약 40% 내지 정확히 또는 약 60%, 정확히 또는 약 55% 내지 정확히 또는 약 45%, 또는 약 50% 또는 50% CD4+ T 세포 및 정확히 또는 약 10% 내지 정확히 또는 약 90%, 정확히 또는 약 20% 내지 정확히 또는 약 80%, 정확히 또는 약 25% 내지 정확히 또는 약 75%, 정확히 또는 약 30% 내지 정확히 또는 약 70%, 정확히 또는 약 35% 내지 정확히 또는 약 65%, 정확히 또는 약 40% 내지 정확히 또는 약 60%, 정확히 또는 약 55% 내지 정확히 또는 약 45%, 또는 약 50% 또는 50% CD8+ T 세포를 함유한다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 정확히 또는 약 35% 내지 정확히 또는 약 65%, 정확히 또는 약 40% 내지 정확히 또는 약 60%, 정확히 또는 약 55% 내지 정확히 또는 약 45%, 또는 약 50% 또는 50% CD4+ T 세포 및 정확히 또는 약 35% 내지 정확히 또는 약 65%, 정확히 또는 약 40% 내지 정확히 또는 약 60%, 정확히 또는 약 55% 내지 정확히 또는 약 45%, 또는 약 50% 또는 50% CD8+ T 세포를 함유한다. 특정한 실시양태에서, 산출물은 정확히 또는 약 35% 내지 정확히 또는 약 65% CD4+ T 세포 및 정확히 또는 약 35% 내지 정확히 또는 약 65% CD8+ T 세포를 함유한다. 특정한 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 3:1 내지 1:3, 2.5:1 내지 1:2.5, 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.4:1 내지 1:1.4, 1.3:1 내지 1:1.3, 1.2:1 내지 1:1.2, 또는 1.1:1 내지 1:1.1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 함유한다. 일부 실시양태에서, 세포의 조성물은 정확히 또는 약 3:1, 정확히 또는 약 2.8:1, 정확히 또는 약 2.5:1, 정확히 또는 약 2.25:1, 정확히 또는 약 2:1, 정확히 또는 약 1.8:1, 정확히 또는 약 1.7:1, 정확히 또는 약 1.6:1, 정확히 또는 약 1.5:1, 정확히 또는 약 1.4:1, 정확히 또는 약 1.3:1, 정확히 또는 약 1.2:1, 정확히 또는 약 1.1:1, 정확히 또는 약 1:1, 정확히 또는 약 1:1.1, 정확히 또는 약 1:1.2, 정확히 또는 약 1:1.3, 정확히 또는 약 1:1.4, 정확히 또는 약 1:1.5, 정확히 또는 약 1:1.6, 정확히 또는 약 1:1.7, 정확히 또는 약 1:1.8, 정확히 또는 약 1:2, 정확히 또는 약 1:2.25, 정확히 또는 약 1:2.5, 정확히 또는 약 1:2.8, 또는 정확히 또는 약 1:3의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 갖는다.

[0455] 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물은 3:1 내지 1:3, 2.5:1 내지 1:2.5, 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.4:1 내지 1:1.4, 1.3:1 내지 1:1.3, 1.2:1 내지 1:1.2, 또는 1.1:1 내지 1:1.1의, 재조합 수용체 예를 들어 CAR을 발현하는 CD4+ T 세포 대 재조합 수용체 예를 들어 CAR을 발현하는 CD8+ T 세포의 비를 함유한다. 일부

실시양태에서, 풍부화된 조성물 중 재조합 수용체 (예를 들어, CAR)를 발현하는 CD4+ T 세포 대 재조합 수용체 (예를 들어, CAR)를 발현하는 CD8+ T 세포의 비는 정확히 또는 약 3:1, 정확히 또는 약 2.8:1, 정확히 또는 약 2.5:1, 정확히 또는 약 2.25:1, 정확히 또는 약 2:1, 정확히 또는 약 1.8:1, 정확히 또는 약 1.7:1, 정확히 또는 약 1.6:1, 정확히 또는 약 1.5:1, 정확히 또는 약 1.4:1, 정확히 또는 약 1.3:1, 정확히 또는 약 1.2:1, 정확히 또는 약 1.1:1, 정확히 또는 약 1:1, 정확히 또는 약 1:1.1, 정확히 또는 약 1:1.2, 정확히 또는 약 1:1.3, 정확히 또는 약 1:1.4, 정확히 또는 약 1:1.5, 정확히 또는 약 1:1.6, 정확히 또는 약 1:1.7, 정확히 또는 약 1:1.8, 정확히 또는 약 1:2, 정확히 또는 약 1:2.25, 정확히 또는 약 1:2.5, 정확히 또는 약 1:2.8, 또는 정확히 또는 약 1:3이다.

[0456] 일부 실시양태에서, 제공된 방법과 관련하여 생성되거나 생산된 풍부화된 조성물은 재조합 수용체, 예를 들어 TCR 또는 CAR을 발현하는 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서, 재조합 수용체를 발현하는 것은 세포 막 및/또는 세포 표면에 국제화된 1개 이상의 재조합 수용체 단백질을 갖는 것, 재조합 수용체 단백질의 검출가능한 양을 갖는 것, 재조합 수용체를 코딩하는 mRNA의 검출가능한 양을 갖는 것, 재조합 수용체를 코딩하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 갖거나 함유하는 것, 및/또는 재조합 수용체 발현에 대한 대용물 마커인 mRNA 또는 단백질을 갖거나 함유하는 것을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0457] 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 세포의 적어도 또는 약 5%, 적어도 또는 약 10%, 적어도 또는 약 20%, 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 40%, 적어도 또는 약 45%, 적어도 또는 약 50%, 적어도 또는 약 55%, 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 65%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 99%, 또는 99% 초과가 재조합 수용체를 발현한다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 세포의 적어도 또는 약 50%가 재조합 수용체를 발현한다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 또는 약 5%, 적어도 또는 약 10%, 적어도 또는 약 20%, 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 40%, 적어도 또는 약 45%, 적어도 또는 약 50%, 적어도 또는 약 55%, 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 65%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 99%, 또는 99% 초과가 재조합 수용체를 발현한다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 또는 약 50%가 재조합 수용체를 발현한다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 세포의 적어도 또는 약 5%, 적어도 또는 약 10%, 적어도 또는 약 20%, 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 40%, 적어도 또는 약 45%, 적어도 또는 약 50%, 적어도 또는 약 55%, 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 65%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 99%, 또는 99% 초과는 재조합 수용체를 발현하는 CD3+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 세포의 적어도 또는 약 50%는 재조합 수용체를 발현하는 CD3+ T 세포이다.

[0458] 특정한 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 40%, 적어도 또는 약 45%, 적어도 또는 약 50%, 적어도 또는 약 55%, 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 65%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 99%, 또는 99% 초과가 재조합 수용체를 발현한다. 특정한 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 또는 약 50%가 재조합 수용체를 발현한다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 40%, 적어도 또는 약 45%, 적어도 또는 약 50%, 적어도 또는 약 55%, 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 65%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 75%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 99%, 또는 99% 초과가 재조합 수용체를 발현한다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 또는 약 50%가 재조합 수용체를 발현한다.

[0459] 특정한 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 재조합 수용체-발현 (예를 들어, CAR+) 세포의 적어도 정확히 또는 약 50%, 적어도 정확히 또는 약 60%, 적어도 정확히 또는 약 70%, 적어도 정확히 또는 약 75%, 적어도 정확히 또는 약 80%, 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 적어도 정확히 또는 약 95%, 적어도 정확히 또는 약 99%, 또는 적어도 정확히 또는 약 99.9%는 생존 세포, 예를 들어 아포토시스 마커, 예컨대 카스파제 (예를 들어, 활성화된 카스파제-3)에 대해 음성인 세포이다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 재조합 수용체-발현 (예를 들어, CAR+) 세포의 적어도 정확히 또는 약 85%, 적어도 정확히 또는 약 90%, 또는 적어도 정확히 또는 약 95%는 생존 세포, 예를 들어 아포토시스 마커, 예컨대 카스파제 (예를 들어, 활성화된 카스파제-3)에 대해 음성인 세포이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 재조합 수용체-발현 (예를 들어, CAR+) 세포의 적어도 정확히 또는 약 90%는 생존 세포, 예를 들어 아포토시스 마커, 예컨대 카스파제 (예를 들어, 활성

활성화된 카스파제-3)에 대해 음성인 세포이다.

- [0461] 상기 실시양태 중 임의의 것에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 복수의 풍부화된 조성물은 동일한 또는 상이한 공여자로부터 기원할 수 있다. 일부 측면에서, 복수의 풍부화된 조성물 중 적어도 2종은 상이한 공여자로부터 기원한다. 일부 측면에서, 복수의 풍부화된 조성물 각각은 다수의 상이한 공여자, 예를 들어, 약 2, 약 5, 약 10, 약 15, 약 20, 약 25, 약 30, 약 35, 약 40, 약 45, 약 50, 약 55, 약 60, 또는 약 60명 초과와 상이한 공여자, 예를 들어 세포 요법 예컨대 CAR-T 세포 요법을 필요로 하는 환자 중 1명으로부터 기원한다.
- [0462] 특정한 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 대부분의 세포는 나이브 또는 나이브-유사 세포, 중심 기억 세포, 및/또는 이펙터 기억 세포이다. 특정한 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 대부분의 세포는 나이브-유사 또는 중심 기억 세포이다. 일부 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 대부분의 세포는 중심 기억 세포이다. 일부 측면에서, 덜 분화된 세포, 예를 들어 중심 기억 세포는 더 오래 생존하고 덜 신속하게 소진되어, 그에 의해 지속성 및 내구성이 증가된다. 일부 측면에서, 세포 요법, 예컨대 CAR-T 세포 요법에 대한 반응자는 중심 기억 유전자의 증가된 발현을 갖는다. 예를 들어, 문헌 [Fraietta et al., (2018) Nat Med. 24(5):563-571]을 참조한다.
- [0463] 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 세포는 나이브-유사 T 세포, 또는 나이브-유사 T 세포 상에서 발현되는 마커에 대해 표면 양성인 T 세포의 높은 부분 및/또는 빈도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 풍부화된 조성물의 세포는 대안적 프로세스, 예컨대 확장을 수반하는 프로세스 (예를 들어, 확장 유닛 작업을 포함하고/거나 세포의 확장을 유발하도록 의도된 단계를 포함하는 프로세스)로부터 생성된 풍부화된 조성물보다 나이브-유사 세포의 더 큰 부분 및/또는 빈도를 갖는다. 특정 실시양태에서, 나이브-유사 T 세포는 다양한 분화 상태의 세포를 포함할 수 있고, 특정 세포 마커의 양성 또는 높은 발현 (예를 들어, 표면 발현 또는 세포내 발현) 및/또는 다른 세포 마커의 음성 또는 낮은 발현 (예를 들어, 표면 발현 또는 세포내 발현)을 특징으로 할 수 있다. 일부 측면에서, 나이브-유사 T 세포는 CCR7, CD45RA, CD28 및/또는 CD27의 양성 또는 높은 발현을 특징으로 한다. 일부 측면에서, 나이브-유사 T 세포는 CD25, CD45RO, CD56, CD62L, 및/또는 KLRG1의 음성 발현을 특징으로 한다. 일부 측면에서, 나이브-유사 T 세포는 CD95의 낮은 발현을 특징으로 한다. 특정 실시양태에서, 나이브-유사 T 세포, 또는 나이브-유사 T 세포 상에서 발현되는 마커에 대해 표면 양성인 T 세포는 CCR7+CD45RA+이고, 여기서 세포는 CD27+ 또는 CD27-이다. 특정 실시양태에서, 나이브-유사 T 세포, 또는 나이브-유사 T 세포 상에서 발현되는 마커에 대해 표면 양성인 T 세포는 CD27+CCR7+이고, 여기서 세포는 CD45RA+ 또는 CD45RA-이다. 특정 실시양태에서, 나이브-유사 T 세포, 또는 나이브-유사 T 세포 상에서 발현되는 마커에 대해 표면 양성인 T 세포는 CD62L-CCR7+이다.
- [0464] III. 세포 조성물의 탈비드화 방법
- [0465] 원심분리 시스템 (예를 들어, "역" 또는 연속 대향류 원심분리 시스템)을 사용하여 비드를 제거하거나 또는 세포 조성물을 "탈비드화"하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 섹션 I.A.i에 기재된 것과 같은 것 중 임의의 것, 예컨대 비드 (예를 들어, 상자성 비드)와 함께 이전에 인큐베이션된 세포 조성물을 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 세포 (예를 들어, T 세포) 및 비드 (예를 들어, 상자성 비드)를 포함한다.
- [0466] 일부 실시양태에서, 비드는 상자성 비드, 예컨대 상자성 폴리스티렌 비드이다. 일부 실시양태에서, 예를 들어 세포를 활성화 또는 자극하기 위해, 세포는 이전에 비드와의 인큐베이션에 적용되었다. 일부 실시양태에서, 비드는 자극 시약으로 코팅된다. 일부 실시양태에서, 자극 시약은 TCR 복합체의 1개 이상의 성분의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인 및 1개 이상의 공동자극 분자의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 자극 시약은 (i) TCR 복합체의 구성원에 특이적으로 결합하는 1차 작용제; 및 (ii) T 세포 공동자극 분자에 특이적으로 결합하는 2차 작용제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제는 CD3에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 공동자극 분자는 CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 또는 ICOS로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 1차 및 2차 작용제 중 적어도 1종은 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1차 작용제는 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 2차 작용제는 항-CD28 항체 또는 그의 항원-결합 단편이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비드는 항-CD3 항체로 코팅된 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비드는 항-CD28 항체로 코팅된 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 비드는 항-CD3 항체로 코팅된 비드 및 항-CD28 항체로 코팅된 비드를 포함한다.
- [0467] 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 적어도 약 10×10^6 개의 비드, 적어도 약 25×10^6 개의 비드, 적어도 약 50

$x 10^6$ 개의 비드, 적어도 약 75×10^6 개의 비드, 적어도 약 100×10^6 개의 비드, 적어도 약 125×10^6 개의 비드, 적어도 약 150×10^6 개의 비드, 적어도 약 175×10^6 개의 비드, 적어도 약 200×10^6 개의 비드, 적어도 약 225×10^6 개의 비드, 적어도 약 250×10^6 개의 비드, 적어도 약 275×10^6 개의 비드, 또는 적어도 약 300×10^6 개의 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 100×10^6 개의 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 150×10^6 개의 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 200×10^6 개의 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 250×10^6 개의 비드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 약 300×10^6 개의 비드를 포함한다.

[0468] 일부 실시양태에서, 방법은 (i) 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 확립하는 단계; 및 (ii) 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하여 세포 조성물로부터 비드를 제거하여, 그에 의해 탈비드화된 조성물을 생성하는 단계를 포함한다.

[0469] 일부 실시양태에서, 방법은 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하기 전에 세포 조성물을 원추형 유체 인클로저 내로 로딩하는 것을 포함한다.

[0470] 일부 실시양태에서, 원심분리 시스템은 원추형 유체 인클로저 내에 캐놀라를 포함한다. 일부 실시양태에서, 캐놀라는 원추형 유체 인클로저의 길이를 따라 이어진다. 일부 실시양태에서, 캐놀라의 한쪽 단부는 원추형 유체 인클로저의 팁에 또는 그 근처에 있다. 일부 실시양태에서, 캐놀라의 다른쪽 단부는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부에 또는 그 근처에, 예컨대 넓은 단부의 중심에 또는 그 근처에 있다.

[0471] 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 캐놀라를 통해 원추형 유체 인클로저 내로 로딩된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 원추형 유체 인클로저의 팁에서 또는 그 근처에서 원추형 유체 인클로저 내로 로딩된다. 일부 실시양태에서, 세포 조성물은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부로 진입하고, 원추형 유체 인클로저의 팁의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부에서 배출되는 것에 의해 원추형 유체 인클로저 내로 로딩된다.

[0472] 일부 실시양태에서, 비드는 원추형 유체 인클로저로부터 세포를 분리하는 것에 의해 세포 조성물로부터 제거된다. 일부 실시양태에서, 분리된 세포는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 개구를 통해 원추형 유체 인클로저로부터 배출된다. 일부 실시양태에서, 개구는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부를 적어도 부분적으로 둘러싼다. 일부 실시양태에서, 개구는 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부를 둘러싼다.

[0473] 일부 실시양태에서, 비드는 원추형 유체 인클로저 내에 남아있다. 일부 실시양태에서, 비드는 세포의 분리 후에 원추형 유체 인클로저로부터 제거된다. 일부 실시양태에서, 비드는 캐놀라를 통해 제거된다. 일부 실시양태에서, 비드는 원추형 유체 인클로저의 팁의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부로 진입하고, 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부의 또는 그 근처의 캐놀라의 단부에서 배출된다.

[0474] 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 500 G 내지 약 2,000 G, 또는 약 750 G 내지 약 1,500 G 또는 약 500 G 내지 약 1,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 500 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 1,000 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 1,500 G이다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 2,000 G이다.

[0475] 일부 실시양태에서, 제1 유량은 방사상 내향이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 원추형 유체 인클로저의 팁으로부터 멀어지는 방향을 향한다. 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 제1 유량에 의해 상쇄된다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 대향류량이다.

[0476] 일부 실시양태에서, 제1 유량은 캐놀라를 통한 배지의 유동에 의해 유발된다. 일부 실시양태에서, 캐놀라를 통한 배지의 유동은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부로부터 팁까지이다. 일부 실시양태에서, 배지는 캐놀라에서 배출되어 원추형 유체 인클로저에 그의 팁에서 진입한다.

[0477] 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 10 mL/분 내지 약 50 mL/분, 약 15 mL/분 내지 약 45 mL/분, 약 20 mL/분 내지 약 40 mL/분, 또는 약 25 mL/분 내지 약 35 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 20 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 25 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 30 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 35 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 40 mL/분이다. 일부 실시양태에

서, 제1 유량은 약 45 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제1 유량은 약 50 mL/분이다.

[0478] 일부 실시양태에서, 제1 원심력은 약 1,000 G이고, 제1 유량은 약 30 mL/분이다.

[0479] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 100 G 내지 약 1,000 G, 약 200 G 내지 약 800 G, 또는 약 400 G 내지 약 600 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 100 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 200 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 300 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 400 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 500 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 600 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 700 G이다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 800 G이다.

[0480] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 방사상 내향이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 원추형 유체 인클로저의 팁으로부터 멀어지는 방향을 향한다. 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 제2 유량에 의해 상쇄된다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 대향류량이다.

[0481] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 캐놀라를 통한 배지의 유동에 의해 유발된다. 일부 실시양태에서, 캐놀라를 통한 배지의 유동은 원추형 유체 인클로저의 넓은 단부로부터 팁까지이다. 일부 실시양태에서, 배지는 캐놀라에서 배출되어 원추형 유체 인클로저에 그의 팁에서 진입한다.

[0482] 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 10 mL/분 내지 약 100 mL/분, 약 20 mL/분 내지 약 80 mL/분, 또는 약 30 mL/분 내지 약 60 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 10 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 20 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 30 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 40 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 50 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 60 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 70 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 80 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 90 mL/분이다. 일부 실시양태에서, 제2 유량은 약 100 mL/분이다.

[0483] 일부 실시양태에서, 제2 원심력은 약 600 G이고, 제2 유량은 약 50 mL/분이다.

[0484] 일부 실시양태에서, 제2 원심력 및 제2 유량의 적용은 세포 조성물로부터 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 약 99%의 비드를 제거한다.

[0485] 일부 실시양태에서, 탈비드화된 조성물은 세포 조성물에 함유된 약 10% 미만, 약 5% 미만, 약 2% 미만, 약 1% 미만, 약 0.5% 미만, 약 0.2% 미만, 약 0.1% 미만, 약 0.05% 미만, 약 0.02% 미만, 또는 약 0.01% 미만의 비드를 함유한다. 일부 실시양태에서, 탈비드화된 조성물은 세포 조성물에 함유된 약 10%의 비드를 함유한다. 일부 실시양태에서, 탈비드화된 조성물은 세포 조성물에 함유된 약 5%의 비드를 함유한다. 일부 실시양태에서, 탈비드화된 조성물은 세포 조성물에 함유된 약 1%의 비드를 함유한다. 일부 실시양태에서, 탈비드화된 조성물은 세포 조성물에 함유된 약 1%의 비드를 함유한다. 일부 실시양태에서, 탈비드화된 조성물은 세포 조성물에 함유된 약 0.5%의 비드를 함유한다. 일부 실시양태에서, 탈비드화된 조성물은 세포 조성물에 함유된 약 0.1%의 비드를 함유한다. 일부 실시양태에서, 탈비드화된 조성물은 세포 조성물에 함유된 약 0.05%의 비드를 함유한다. 일부 실시양태에서, 탈비드화된 조성물은 세포 조성물에 함유된 약 0.01%의 비드를 함유한다. 일부 실시양태에서, 탈비드화된 조성물은 탈비드화된 산출 조성물로서 수집된다. 일부 실시양태에서, 방법은 탈비드화된 산출 조성물을 1가지 이상의 추가의 프로세싱 단계, 예컨대 세포의 형질도입, 세척, 배양, 양성, 자극, 증식 및/또는 제제화에 적용하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 탈비드화된 산출 조성물은, 예컨대 세포 요법에 사용하기 위해 후속적으로 형질도입에 적용된다.

[0486] IV. 바이러스 벡터 입자

[0487] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자는 레트로바이러스 벡터 입자, 예컨대 렌티바이러스 입자이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자는 바이러스 벡터의 게놈에 재조합 및/또는 이중 분자, 예를 들어 재조합 또는 이중 단백질, 예컨대 재조합 및/또는 이중 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 다른 항원 수용체를 코딩하는 핵산을 함유한다. 일부 실시양태에서, 재조합 분자는 케모카인, 케모카인 수용체, 시토카인, 시토카인 수용체, 항원 수용체 (예를 들어, CAR 또는 TCR), 또는 그의 조합이다. 일부 실시양태에서, 재조합 분자는 케모카인이다. 일부 실시양태에서, 재조합 분자는 케모카인 수용체이다. 일부 실시양태에서, 재조합 분자는 시토카인이다. 일부 실시양태에서, 재조합 분자는 시토카인 수용체이다. 일부 실시양태에서, 재조합 분자는 항원 수용체 (예를 들어, CAR 또는 TCR)이다. 일부 실시양태에서, 항원 수용체는 키메라 항원 수용체 (CAR)이다. 일부 실시양태에서, 항원 수용체는 T 세포 수용체 (TCR)이다. 바이러스 벡터 입자의 게놈은 전형적으로 재조합 분자를 코딩하는 핵산에 더하여 서열을 포함한다. 이러한 서열은 게놈이 바이러스 입자 내로 패키징되

도록 하는 서열 및/또는 재조합 수용체, 예컨대 CAR을 코딩하는 핵산의 발현을 촉진하는 서열을 포함할 수 있다.

[0488] A. 바이러스 벡터

[0489] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 입자는 레트로바이러스 게놈 기반 벡터로부터 유래된, 예컨대 렌티바이러스 게놈 기반 벡터로부터 유래된 게놈을 함유한다. 제공된 바이러스 벡터의 일부 측면에서, 재조합 수용체, 예컨대 항원 수용체, 예컨대 CAR을 코딩하는 이중 핵산은 벡터 게놈의 5' LTR과 3' LTR 서열 사이에 함유되고/거나 위치한다.

[0490] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 게놈은 렌티바이러스 게놈, 예컨대 HIV-1 게놈 또는 SIV 게놈이다. 예를 들어, 렌티바이러스 벡터는 병독성 유전자를 다중 약독화시킴으로써 생성되었고, 예를 들어 유전자 env, vif, vpr 및 nef를 결실시켜 벡터를 치료 목적에 보다 안전하게 만들 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 공지되어 있다. 문헌 [Naldini et al., (1996 and 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998], 미국 특허 번호 6,013,516; 및 5,994,136을 참조한다. 일부 실시양태에서, 이들 바이러스 벡터는 플라스미드-기반 또는 바이러스-기반이고, 외래 핵산을 혼입하고, 선택하고, 핵산을 숙주 세포 내로 전달하기 위한 필수 서열을 보유하도록 구성된다. 공지된 렌티바이러스는 기탁소 또는 콜렉션, 예컨대 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 ("ATCC"; 미국 20110-2209 버지니아주 마나사스 유니버시티 볼러바드 10801)으로부터 용이하게 취득할 수 있거나, 또는 통상적으로 입수가 가능한 기술을 사용하여 공지된 공급원으로부터 단리할 수 있다.

[0491] 렌티바이러스 벡터의 비제한적 예는 렌티바이러스, 예컨대 인간 면역결핍 바이러스 1 (HIV-1), HIV-2, 원숭이 면역결핍 바이러스 (SIV), 인간 T-림프항성 바이러스 1 (HTLV-1), HTLV-2 또는 말 감염 빈혈 바이러스 (E1AV)로부터 유래된 것을 포함한다. 예를 들어, 렌티바이러스 벡터는 HIV 병독성 유전자를 다중 약독화시킴으로써 생성되었고, 예를 들어 유전자 env, vif, vpr, vpu 및 nef를 결실시켜 벡터를 치료 목적에 보다 안전하게 만든다. 렌티바이러스 벡터는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 문헌 [Naldini et al., (1996 and 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998], 미국 특허 번호 6,013,516; 및 5,994,136을 참조한다. 일부 실시양태에서, 이들 바이러스 벡터는 플라스미드-기반 또는 바이러스-기반이고, 외래 핵산을 혼입하고, 선택하고, 핵산을 숙주 세포 내로 전달하기 위한 필수 서열을 보유하도록 구성된다. 공지된 렌티바이러스는 기탁소 또는 콜렉션, 예컨대 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 ("ATCC"; 미국 20110-2209 버지니아주 마나사스 유니버시티 볼러바드 10801)으로부터 용이하게 취득할 수 있거나, 또는 통상적으로 입수가 가능한 기술을 사용하여 공지된 공급원으로부터 단리할 수 있다.

[0492] 일부 실시양태에서, 바이러스 게놈 벡터는 레트로바이러스, 예컨대 렌티바이러스의 5' 및 3' LTR의 서열을 함유할 수 있다. 일부 측면에서, 바이러스 게놈 구축물은 렌티바이러스의 5' 및 3' LTR로부터의 서열을 함유할 수 있고, 특히 렌티바이러스의 5' LTR로부터의 R 및 U5 서열 및 렌티바이러스로부터의 불활성화 또는 자기-불활성화 3' LTR을 함유할 수 있다. LTR 서열은 임의의 종으로부터의 임의의 렌티바이러스로부터의 LTR 서열일 수 있다. 예를 들어, 이들은 HIV, SIV, FIV 또는 BIV로부터의 LTR 서열일 수 있다. 전형적으로, LTR 서열은 HIV LTR 서열이다.

[0493] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터, 예컨대 HIV 바이러스 벡터의 핵산은 추가의 전사 단위가 결여되어 있다. 벡터 게놈은 불활성화 또는 자기-불활성화 3' LTR을 함유할 수 있다 (Zufferey et al., J Virol 72: 9873, 1998; Miyoshi et al., J Virol 72:8150, 1998). 예를 들어, 바이러스 벡터 RNA를 생산하는 데 사용된 핵산의 3' LTR의 U3 영역에서의 결실이 자기-불활성화 (SIN) 벡터를 생성하는 데 사용될 수 있다. 이어서, 이러한 결실은 역전사 동안 프로바이러스 DNA의 5' LTR로 전달될 수 있다. 자기-불활성화 벡터는 일반적으로 3' 긴 말단 반복부 (LTR)로부터 인핸서 및 프로모터 서열의 결실을 가지며, 이는 벡터 통합 동안 5' LTR로 카피된다. 일부 실시양태에서, TATA 박스의 제거를 비롯하여 충분한 서열을 제거하여 LTR의 전사 활성을 없앨 수 있다. 이는 형질도입된 세포에서 전장 벡터 RNA의 생산을 방지할 수 있다. 일부 측면에서, 3' LTR의 U3 요소는 그의 인핸서 서열, TATA 박스, Sp1 및 NF-카파 B 부위의 결실을 함유한다. 자기-불활성화 3' LTR의 결과로서, 진입 및 역전사 후 생성되는 프로바이러스는 불활성화된 5' LTR을 함유한다. 이는 벡터 게놈의 가동화의 위험 및 근처의 세포 프로모터에 대한 LTR의 영향을 감소시킴으로써 안전성을 개선시킬 수 있다. 자기-불활성화 3' LTR은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 구축될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이는 벡터 역가 또는 벡터의 시험관내 또는 생체내 특성에 영향을 미치지 않는다.

[0494] 임의로, 렌티바이러스 5' LTR로부터의 U3 서열은 바이러스 구축물 내의 프로모터 서열, 예컨대 이중 프로모터 서열로 대체될 수 있다. 이는 패키징 세포주로부터 회수되는 바이러스의 역가를 증가시킬 수 있다. 인핸서 서

열이 또한 포함될 수 있다. 패키징 세포주에서 바이러스 RNA 게놈의 발현을 증가시키는 임의의 인핸서/프로모터 조합이 사용될 수 있다. 한 예에서, CMV 인핸서/프로모터 서열이 사용된다 (미국 특허 번호 5,385,839 및 미국 특허 번호 5,168,062).

- [0495] 특정 실시양태에서, 삽입 돌연변이유발의 위험은 레트로바이러스 벡터 게놈, 예컨대 렌티바이러스 벡터 게놈을 통합 결함이 있도록 구축함으로써 최소화할 수 있다. 비-통합 벡터 게놈을 생산하기 위해 다양한 접근법이 추구될 수 있다. 일부 실시양태에서, 돌연변이(들)는 불활성 인테그라제를 갖는 단백질을 코딩하도록 pol 유전자의 인테그라제 효소 성분 내로 조작될 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터 게놈 자체는, 예를 들어 하나 또는 둘 다의 부작 부위를 돌연변이시키거나 결실시킴으로써, 또는 3' LTR-근위 폴리퓨린 트랙 (PPT)을 결실 또는 변형을 통해 비-기능적으로 만듦으로써 통합을 방지하도록 변형시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 비-유전자 접근법이 이용가능하고; 이들은 인테그라제의 1종 이상의 기능을 억제하는 약리학적 작용제를 포함한다. 접근법은 상호 배타적이지 않으며; 즉, 이들 중 1가지 초과가 한 번에 사용될 수 있다. 예를 들어, 인테그라제 및 부작 부위 둘 다가 비-기능적일 수 있거나, 또는 인테그라제 및 PPT 부위가 비-기능적일 수 있거나, 또는 부작 부위 및 PPT 부위가 비-기능적일 수 있거나, 또는 이들 모두가 비-기능적일 수 있다. 이러한 방법 및 바이러스 벡터 게놈은 공지되어 있고 이용가능하다 (문헌 [Philpott and Thrasher, Human Gene Therapy 18:483, 2007; Engelman et al., J Virol 69:2729, 1995; Brown et al., J Virol 73:9011 (1999); WO 2009/076524; McWilliams et al., J Virol 77:11150, 2003; Powell and Levin J Virol 70:5288, 1996] 참조).
- [0496] 일부 실시양태에서, 벡터는 숙주 세포, 예컨대 원핵 숙주 세포에서의 증식을 위한 서열을 함유한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터의 핵산은 원핵 세포, 예컨대 박테리아 세포에서의 증식을 위한 1개 이상의 복제 기점을 함유한다. 일부 실시양태에서, 원핵 복제 기점을 포함하는 벡터는 또한, 그의 발현이 검출가능한 마커 또는 선택 마커, 예컨대 약물 저항성을 부여하는 유전자를 함유할 수 있다.
- [0497] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 이중 재조합 단백질을 코딩하는 핵산을 함유한다. 일부 실시양태에서, 이중 재조합 분자는 재조합 수용체, 예를 들어 항원 수용체, 예를 들어 유전자 침묵을 위한 SB-트랜스포손, 캡시드-봉입 트랜스포손, 예를 들어 게놈 재조합을 위한 상동 이중 가닥 핵산 또는 리포터 유전자 (예를 들어, 형광 단백질, 예컨대 GFP) 또는 루시페라제이거나 또는 이를 포함한다.
- [0498] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 재조합 수용체 및/또는 키메라 수용체, 예컨대 이중 수용체 단백질을 코딩하는 핵산을 함유한다. 재조합 수용체, 예컨대 이중 수용체는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함한 항원 수용체, 예컨대 기능적 비-T 세포 수용체 (TCR) 항원 수용체, 및 다른 항원-결합 수용체, 예컨대 트랜스제닉 TCR을 포함할 수 있다. 수용체는 또한 다른 수용체, 예컨대 다른 키메라 수용체, 예컨대 특정한 리간드에 결합하고 CAR에 존재하는 것과 유사한 막횡단 및/또는 세포내 신호전달 도메인을 갖는 수용체를 포함할 수 있다.
- [0499] 이러한 예 중 임의의 것에서, 핵산은 바이러스 벡터의 영역, 예컨대 일반적으로 바이러스 게놈의 비-필수 영역에 삽입되거나 또는 위치한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 바이러스 게놈 내에 특정 바이러스 서열 대신 삽입되어 복제 결손인 바이러스를 생산한다.
- [0500] 일부 실시양태에서, 코딩된 재조합 항원 수용체, 예를 들어 CAR은 표적화될 질환, 예컨대 암, 감염성 질환, 염증성 또는 자가면역 질환, 또는 다른 질환 또는 상태, 예컨대 제공된 방법 및 조성물을 사용한 표적화를 위해 본원에 기재된 질환의 세포 상의 1개 이상의 리간드에 특이적으로 결합할 수 있는 것이다.
- [0501] 특정 실시양태에서, 예시적인 항원은 $\alpha v \beta 6$ 인테그린 (avb6 인테그린), B 세포 성숙 항원 (BCMA), B7-H3, B7-H6, 탄산 안하이드라제 9 (CA9, 또한 CAIX 또는 G250으로도 공지됨), 암-고환 항원, 암/고환 항원 1B (CTAG, 또한 NY-ESO-1 및 LAGE-2로도 공지됨), 암배아성 항원 (CEA), 시클린, 시클린 A2, C-C 모터프 케모카인 리간드 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, 표피 성장 인자 단백질 (EGFR), 말단절단된 표피 성장 인자 단백질 (tEGFR), 유형 III 표피 성장 인자 수용체 돌연변이 (EGFR vIII), 상피 당단백질 2 (EPG-2), 상피 당단백질 40 (EPG-40), 에프린B2, 에프린 수용체 A2 (EPHa2), 에스트로겐 수용체, Fc 수용체 유사 5 (FCRL5; 또한 Fc 수용체 상동체 5 또는 FCRH5로도 공지됨), 태아 아세틸콜린 수용체 (태아 AChR), 폴레이트 결합 단백질 (FBP), 폴레이트 수용체 알파, 강글리오시드 GD2, O-아세틸화 GD2 (OGD2), 강글리오시드 GD3, 당단백질 100 (gp100), G 단백질 커플링된 수용체 5D (GPCR5D), Her2/neu (수용체 티로신 키나제 erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), erbB 이량체, 인간 고분자량-흑색종-연관 항원 (HMW-MAA), B형 간염 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1 (HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2 (HLA-A2), IL-22 수용체 알파 (IL-22Ra), IL-13 수용체 알파 2 (IL-13Ra2), 키나제 삽입 도메인 수용체 (kdr), 카파 경쇄, L1 세포 부착 분자 (L1-CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 류신 풍부 반복부 함유 8 패밀리 구성원 A

(LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종-연관 항원 (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, 메소텔린, c-Met, 뮤린 시토메갈로바이러스 (CMV), 뮤신 1 (MUC1), MUC16, 자연 킬러 군 2 구성원 D (NKG2D) 리간드, 멜란 A (MART-1), 신경 세포 부착 분자 (NCAM), 종양태아성 항원, 흑색종의 우선적으로 발현된 항원 (PRAME), 프로게스테론 수용체, 전립선 특이적 항원, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1 (ROR1), 서바이빈, 영양막 당단백질 (TPBG, 또한 5T4로도 공지됨), 종양-연관 당단백질 72 (TAG72), 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2 (VEGFR2), 윌름스 종양 1 (WT-1), 병원체-특이적 항원, 또는 범용 태그 및/또는 비오틴화된 분자 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체에 의해 발현된 분자와 연관된 항원이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서 수용체에 의해 표적화된 항원은 B 세포 악성종양과 연관된 항원, 예컨대 다수의 공지된 B 세포 마커 중 임의의 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원은 CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig카파, Ig람다, CD79a, CD79b 또는 CD30이거나 또는 이를 포함한다.

[0502] 일부 실시양태에서, 예시적인 항원은 고아 티로신 키나제 수용체 ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, 메소텔린, CEA, 및 B형 간염 표면 항원, 항-폴레이트 수용체, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3, 또는 4, FBP, 태아 아세틸콜린 수용체, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-알파, IL-13R-알파2, kdr, 카파 경쇄, 루이스 Y, L1-세포 부착 분자, MAGE-A1, 메소텔린, MUC1, MUC16, PSCA, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, MART-1, gp100, 종양태아 항원, ROR1, TAG72, VEGF-R2, 암배아성 항원 (CEA), 전립선 특이적 항원, PSMA, Her2/neu, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 에프린B2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2, 및 MAGE A3, CE7, 윌름스 종양 1 (WT-1), 시클린, 예컨대 시클린 A1 (CCNA1), 및/또는 비오틴화된 분자, 및/또는 HIV, HCV, HBV, HPV, 및/또는 다른 병원체 및/또는 그의 종양원성 버전에 의해 발현되고/거나 그에 대해 특징적이거나 특이적인 분자이다.

[0503] 일부 실시양태에서, 항원은 병원체-특이적 또는 병원체-발현된 항원이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원은 바이러스 항원 (예컨대 HIV, HCV, HBV 등으로부터의 바이러스 항원), 박테리아 항원 및/또는 기생충 항원이다.

[0504] CAR 및 재조합 TCR을 포함한 항원 수용체, 및 그의 생산 및 도입은, 일부 실시양태에서, 예를 들어 국제 특허 출원 공개 번호 WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, 미국 특허 출원 공개 번호 US2002131960, US2013287748, US20130149337, 미국 특허 번호 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353, 및 8,479,118, 및 유럽 특허 출원 번호 EP2537416에 기재된 것, 및/또는 문헌 [Sadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al., (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2): 160-75]에 기재된 것을 포함한다.

[0505] i. 키메라 항원 수용체 (CAR)

[0506] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터의 게놈에 함유된 핵산은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩한다. CAR은 일반적으로 1개 이상의 세포내 신호전달 성분에 연결된 세포의 리간드 결합 도메인, 예컨대 항체 또는 그의 단편을 함유하는 세포의 부분을 갖는 유전자 조작된 수용체이다. 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체는 세포의 도메인과 세포내 신호전달 도메인을 연결하는 막횡단 도메인 및/또는 세포내 도메인을 포함한다. 이러한 분자는 전형적으로 천연 항원 수용체를 통한 신호 및/또는 공동자극 수용체와 조합된 이러한 수용체를 통한 신호를 모방하거나 근사화한다.

[0507] 일부 실시양태에서, CAR은 특정한 마커, 예컨대 입양 요법에 의해 표적화된 특정한 세포 유형에서 발현되는 마커, 예를 들어 암 마커 및/또는 기재된 항원 중 임의의 것에 대해 특이성을 갖도록 구축된다. 따라서, CAR은 전형적으로 항체의 1개 이상의 항원-결합 단편, 도메인, 또는 부분, 또는 1개 이상의 항체 가변 도메인, 및/또는 항체 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 항체 분자의 항원-결합 부분 또는 부분들, 예컨대 가변 중쇄 (VH) 또는 그의 항원-결합 부분, 또는 모노클로날 항체 (mAb)의 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL)로부터 유래된 단일-쇄 항체 단편 (scFv)을 포함한다.

[0508] 일부 실시양태에서, 특정한 항원 (또는 마커 또는 리간드), 예컨대 특정한 세포 유형의 표면 상에 발현된 항원에 대해 특이성을 갖는 CAR을 발현하는 조작된 세포, 예컨대 T 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 항원은 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 이는 탄수화물 또는 다른 분자이다. 일부 실시양태에서, 항원은 정상 또는 비-표적화된 세포 또는 조직과 비교하여 질환 또는 상태의 세포, 예를 들어 종양 또는 병원성 세포 상에서

선택적으로 발현 또는 과다발현된다. 다른 실시양태에서, 항원은 정상 세포 상에서 발현되고/거나 조작된 세포 상에서 발현된다.

[0509] 특정한 실시양태에서, 재조합 수용체, 예컨대 키메라 수용체는 세포질 신호전달 도메인 또는 영역 (또한 상호교환가능하게 세포내 신호전달 도메인 또는 영역으로도 불림), 예컨대 T 세포에서 1차 활성화 신호를 유도할 수 있는 세포질 (세포내) 영역, 예를 들어 T 세포 수용체 (TCR) 성분의 세포질 신호전달 도메인 또는 영역 (예를 들어, CD3-제타 (CD3ζ) 쌍의 제타 쌍의 세포질 신호전달 도메인 또는 영역 또는 그의 기능적 변이체 또는 신호전달 부분)을 포함하고/거나 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)를 포함하는 세포내 신호전달 영역을 함유한다.

[0510] 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 리간드 (예를 들어, 항원) 항원에 특이적으로 결합하는 세포의 리간드-결합 도메인을 추가로 함유한다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 항원에 특이적으로 결합하는 세포의 항원-인식 도메인을 함유하는 CAR이다. 일부 실시양태에서, 리간드, 예컨대 항원은 세포의 표면 상에 발현된 단백질이다. 일부 실시양태에서, CAR은 TCR-유사 CAR이고, 항원은 프로세싱된 펩티드 항원, 예컨대 TCR과 유사하게 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자와 관련하여 세포 표면 상에서 인식되는 세포내 단백질의 펩티드 항원이다.

[0511] CAR을 포함한 예시적인 항원 수용체, 및 이러한 수용체를 조작 및 세포 내로 도입하는 방법은, 예를 들어 국제 특허 출원 공개 번호 WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, 미국 특허 출원 공개 번호 US2002131960, US2013287748, US20130149337, 미국 특허 번호 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353, 및 8,479,118, 및 유럽 특허 출원 번호 EP2537416에 기재된 것, 및/또는 문헌 [Sadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al., (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2): 160-75]에 기재된 것을 포함한다. 일부 측면에서, 항원 수용체는 미국 특허 번호 7,446,190에 기재된 바와 같은 CAR, 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO/2014055668 A1에 기재된 것을 포함한다. CAR의 예는 상기 언급된 공개, 예컨대 WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, 미국 특허 번호 7,446,190, 미국 특허 번호 8,389,282, 문헌 [Kochenderfer et al., 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang et al., (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; 및 Brentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5(177)] 중 임의의 것에 개시된 바와 같은 CAR을 포함한다. 또한, WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, 미국 특허 번호 7,446,190, 및 미국 특허 번호 8,389,282를 참조한다.

[0512] 일부 실시양태에서, CAR은 특정한 항원 (또는 마커 또는 리간드), 예컨대 입양 요법에 의해 표적화될 특정한 세포 유형에서 발현되는 항원, 예를 들어 암 마커, 및/또는 약화 반응을 유도하는 것이 의도되는 항원, 예컨대 정상 또는 비-이환 세포 유형 상에서 발현되는 항원에 대해 특이성을 갖도록 구축된다. 따라서, CAR은 전형적으로 그의 세포의 부분에 1개 이상의 항원 결합 분자, 예컨대 1개 이상의 항원-결합 단편, 도메인, 또는 부분, 또는 1개 이상의 항체 가변 도메인, 및/또는 항체 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 항체 분자의 항원-결합 부분 또는 부분들, 예컨대 모노클로날 항체 (mAb)의 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL)로부터 유래된 단일-쇄 항체 단편 (scFv)을 포함한다.

[0513] CAR을 포함한 예시적인 항원 수용체, 및 이러한 수용체를 조작 및 세포 내로 도입하는 방법은, 예를 들어 국제 특허 출원 공개 번호 WO2000/14257, WO2013/126726, WO2012/129514, WO2014/031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, WO2016/0046724, WO2016/014789, WO2016/090320, WO2016/094304, WO2017/025038, 및 WO2017/173256, 미국 특허 출원 공개 번호 US2002131960, US2013287748, 및 US20130149337, 미국 특허 번호 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353, 8,479,118, 및 9,765,342, 및 유럽 특허 출원 번호 EP2537416에 기재된 것, 및/또는 문헌 [Sadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al., (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5): 633-39; 및 Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2): 160-75]에 기재된 것을 포함한다. 일부 측면에서, 항원 수용체는 미국 특허 번호 7,446,190에 기재된 바와 같은 CAR, 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO/2014055668 A1에 기재된 것을 포함한다. CAR의 예는 상기 언급된 공개, 예컨대 WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, 미국 특허 번호 7,446,190, 미국 특허 번호 8,389,282, 문헌 [Kochenderfer et al., 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang et al., (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; 및 Brentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5(177)] 중 임의의 것에 개시된 바와 같은 CAR을 포함한다. 또한,

WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, 미국 특허 번호 7,446,190, 및 미국 특허 번호 8,389,282를 참조한다.

[0514] 예시적인 항원 수용체, 예를 들어 CAR은 또한 문헌 [Marofi et al., Stem Cell Res Ther 12: 81 (2021); Townsend et al., J Exp Clin Cancer Res 37: 163 (2018); Ma et al., Int J Biol Sci 15(12): 2548-2560 (2019); Zhao and Cao, Front Immunol 10: 2250 (2019); Han et al., J Cancer 12(2): 326-334 (2021); Specht et al., Cancer Res 79: 4 Supplement, Abstract P2-09-13; Byers et al., Journal of Clinical Oncology 37, no. 15_suppl (2019); Panowski et al., Cancer Res 79 (13 Supplement) 2326 (2019); 및 Sauer et al., Blood 134 (Supplement_1): 1932 (2019)]에 기재된 임의의 것을 포함하거나; 또는 미국 특허 번호 8,153,765; 8,603,477, 및 8,008,450; 미국 공개 번호 US20120189622 및 US20100260748; 및 국제 PCT 공개 번호 WO2006099875, WO2009080829, WO2012092612, 및 WO2014210064에 기재된 항체 또는 항원-결합 단편 중 임의의 것을 함유할 수 있다.

[0515] 추가의 예시적인 항원 수용체, 예를 들어 CAR, 예컨대 항-BCMA CAR은 이데캡타진 비클류셀, ABECMA®, BCMA02, JCARH125, JNJ-68284528 (LCAR-B38M; 신타캡타진 오토류셀; CARVYKTI™) (얀센(Janssen)/레전드(Legend)), P-BCMA-101 (포세이다(Poseida)), PBCAR269A (포세이다), P-BCMA-Allo1 (포세이다), Allo-715 (화이자(Pfizer)/알로진(Allogene)), CT053 (카르스젠(Carsgen)), 데스카르테스-08 (카르테시안(Cartesian)), PHE885 (노파르티스(Novartis)), ARI-002 (호스피탈 클리닉 바르셀로나(Hospital Clinic Barcelona), IDIBAPS), 및 CTX120 (CRISPR 테라퓨틱스(CRISPR Therapeutics))의 CAR을 포함한다. 특정한 실시양태에서, CAR은 이데캡타진 비클류셀 세포의 CAR이다. 특정한 실시양태에서, CAR은 ABECMA® 세포 (ABECMA® 면역요법에 사용되는 세포)의 CAR이다. 특정한 실시양태에서, CAR은 신타캡타진 오토류셀 세포의 CAR이다. 특정한 실시양태에서, CAR은 CARVYKTI™ 세포 (CARVYKTI™ 면역요법에 사용되는 세포)의 CAR이다.

[0516] 예시적인 항원 수용체, 예를 들어 CAR은 또한 FDA-승인된 제품 BREYANZI® (리소캡타진 마랄류셀), TECARTUS™ (브렉수캡타진 오토류셀), KYMRIAH™ (티사젠렉류셀), 및 YESCARTA™ (악시캡타진 실로류셀), ABECMA® (이데캡타진 비클류셀), 및 CARVYKTI™ (신타캡타진 오토류셀)의 CAR을 포함한다. 제공된 실시양태 중 임의의 것의 일부에서, CAR은 BREYANZI® (리소캡타진 마랄류셀), TECARTUS™ (브렉수캡타진 오토류셀), KYMRIAH™ (티사젠렉류셀), YESCARTA™ (악시캡타진 실로류셀), ABECMA® (이데캡타진 비클류셀), 또는 CARVYKTI™ (신타캡타진 오토류셀)의 CAR이다. 제공된 실시양태 중 임의의 것의 일부에서, CAR은 BREYANZI® (리소캡타진 마랄류셀, 문헌 [Sehgal et al., 2020, Journal of Clinical Oncology 38:15_suppl, 8040; Teoh et al., 2019, Blood 134(Supplement_1):593; 및 Abramson et al., 2020, The Lancet 396(10254): 839-852] 참조)의 CAR이다. 제공된 실시양태 중 임의의 것의 일부에서, CAR은 TECARTUS™ (브렉수캡타진 오토류셀, 문헌 [Mian and Hill, 2021, Expert Opin Biol Ther; 21(4):435-441; 및 Wang et al., 2021, Blood 138(Supplement 1):744] 참조)의 CAR이다. 제공된 실시양태 중 임의의 것의 일부에서, CAR은 KYMRIAH™ (티사젠렉류셀, 문헌 [Bishop et al., 2022, N Engl J Med 386:629:639; Schuster et al., 2019, N Engl J Med 380:45-56; Halford et al., 2021, Ann Pharmacother 55(4):466-479; Mueller et al., 2021, Blood Adv. 5(23):4980-4991; 및 Fowler et al., 2022, Nature Medicine 28:325-332] 참조)의 CAR이다. 제공된 실시양태 중 임의의 것의 일부에서, CAR은 YESCARTA™ (악시캡타진 실로류셀, 문헌 [Neelapu et al., 2017, N Engl J Med 377(26):2531-2544; Jacobson et al., 2021, The Lancet 23(1):P91-103; 및 Locke et al., 2022, N Engl J Med 386:640-654] 참조)의 CAR이다. 제공된 실시양태 중 임의의 것의 일부에서, CAR은 ABECMA® (이데카브타진 비클류셀, 문헌 [Raje et al., 2019, N Engl J Med 380:1726-1737; 및 Munshi et al., 2021, N Engl J Med 384:705-716] 참조)의 CAR이다. 제공된 실시양태 중 임의의 것의 일부에서, CAR은 CARVYKTI™ (신타캡타진 오토류셀, 문헌 [Berdeja et al., Lancet. 2021 Jul 24;398(10297):314-324; 및 Martin, Abstract #549 [Oral], presented at 2021 American Society of Hematology (ASH) Annual Meeting & Exposition]) 참조)의 CAR이다.

[0517] 일부 실시양태에서, 항원은 BCMA이다. 일부 실시양태에서, CAR은 항체 분자의 BCMA-결합 부분 또는 부분들, 예컨대 항체의 중쇄 가변 (VH) 영역 및/또는 경쇄 가변 (VL) 영역, 예를 들어 scFv 항체 단편을 포함한다. 키메라 수용체, 예컨대 CAR은 일반적으로 세포외 항원 결합 도메인, 예컨대 항체 분자의 부분, 일반적으로 항체의 가변 중쇄 (VH) 영역 및/또는 가변 경쇄 (VL) 영역, 예를 들어 scFv 항체 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제공된 BCMA-결합 CAR은 제공된 CAR의 BCMA-결합 특성을 부여하는 항체, 예컨대 항-BCMA 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 함유한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 도메인은 기재된 임의의 항-BCMA 항체일 수 있거나 또는 기재된 임의의 항-BCMA 항체로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Carpenter et al., Clin. Cancer Res., 2013, 19(8):2048-2060; Feng et al., Scand. J. Immunol. (2020) 92:e12910];

미국 특허 번호 9,034,324; 미국 특허 번호 9,765,342; 미국 특허 공개 번호 US2016/0046724, US20170183418; 및 국제 PCT 출원 번호 WO 2016090320, WO2016090327, WO2016094304, WO2016014565, WO2016014789, WO2010104949, WO2017025038, WO2017173256, WO2018085690, 또는 WO2021091978을 참조한다. 이러한 항-BCMA 항체 또는 항원-결합 단편 중 임의의 것은 제공된 CAR에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-BCMA CAR은 1종 이상의 단일-도메인 항-BCMA 항체를 함유한다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 단일-도메인 항-BCMA 항체는 WO2017025038 또는 WO2018028647에 기재된 항체로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 항-BCMA CAR은 2종의 단일-도메인 항-BCMA 항체를 함유한다. 일부 실시양태에서, 2종의 단일-도메인 항-BCMA 항체는 WO2017025038 또는 WO2018028647에 기재된 1종 이상의 항체로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, BCMA 결합 도메인은 WO2017025038 또는 WO2018028647에 기재되고 예를 들어 WO2017025038 또는 WO2018028647의 서열식별번호(SEQ ID NO): 300, 301 및 302 (신호 펩티드를 갖거나 갖지 않음)에 제공된 A37353-G4S-A37917 (G4S는 2개의 결합 도메인 사이의 링커임)을 포함하거나 또는 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 항-BCMA CAR은 가변 중쇄 (VH) 및/또는 가변 경쇄 (VL) 영역을 함유하는 scFv인 항원-결합 도메인을 함유한다. 일부 실시양태에서, 가변 중쇄 (VH) 및/또는 가변 경쇄 (VL) 영역을 함유하는 scFv는 WO2016090320 또는 WO2016090327에 기재된 항체로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 가변 중쇄 (VH) 및/또는 가변 경쇄 (VL) 영역을 함유하는 scFv는 WO2019/090003에 기재된 항체로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 가변 중쇄 (VH) 및/또는 가변 경쇄 (VL) 영역을 함유하는 scFv는 WO2016094304 또는 WO2021091978에 기재된 항체로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 가변 중쇄 (VH) 및/또는 가변 경쇄 (VL) 영역을 함유하는 scFv는 WO2018133877에 기재된 항체로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 가변 중쇄 (VH) 및/또는 가변 경쇄 (VL) 영역을 함유하는 scFv는 WO2019149269에 기재된 항체로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 항-BCMA CAR은 WO2019173636 또는 WO2020051374A에 기재된 바와 같은 임의의 것이다. 일부 실시양태에서, 항-BCMA CAR은 WO2018102752에 기재된 바와 같은 임의의 것이다. 일부 실시양태에서, 항-BCMA CAR은 WO2020112796 또는 WO2021173630에 기재된 바와 같은 임의의 것이다.

[0518] 일부 실시양태에서, CAR은 BCMA, 예를 들어 인간 BCMA에 특이적인 항-BCMA CAR이다. 마우스 항-인간 BCMA 항체 및 인간 항-인간 BCMA 항체를 비롯한, 항-BCMA 항체를 함유하는 키메라 항원 수용체 및 이러한 키메라 수용체를 발현하는 세포는 이전에 기재된 바 있다. 문헌 [Carpenter et al., Clin Cancer Res., 2013, 19(8):2048-2060], US 9,765,342, WO 2016/090320, WO2016090327, WO2010104949A2, WO2016/0046724, WO2016/014789, WO2016/094304, WO2017/025038, 및 WO2017173256을 참조한다.

[0519] 일부 실시양태에서, 항-BCMA CAR은 WO2016094304 또는 WO2021091978에 기재된 항체로부터 유래된 가변 중쇄 (VH) 및/또는 가변 경쇄 (VL) 영역을 함유하는 항원-결합 도메인, 예컨대 scFv를 함유한다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 도메인은 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL) 영역을 함유하는 항체 단편이다. 일부 실시양태에서, 항-BCMA CAR은 WO 2016/090320 또는 WO2016090327에 기재된 항체로부터 유래된 가변 중쇄 (VH) 및/또는 가변 경쇄 (VL) 영역을 함유하는 항원-결합 도메인, 예컨대 scFv를 함유한다.

[0520] 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편 (예를 들어 scFv 또는 V_H 도메인)은 항원, 예컨대 CD19를 특이적으로 인식한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항원-결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원-결합 단편으로부터 유래되거나, 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 항원은 CD19이다. 일부 실시양태에서, scFv는 CD19에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터 유래된 V_H 및 V_L 을 함유한다. 일부 실시양태에서, CD19에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 마우스 유래 항체, 예컨대 FMC63 및 SJ25C1이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 항체 단편은, 예를 들어 미국 특허 공개 번호 US 2016/0152723에 기재된 바와 같은 인간 항체이다. 일부 실시양태에서, 항원-결합 도메인은 FMC63으로부터 유래된 V_H 및/또는 V_L 을 포함하며, 이는 일부 측면에서 scFv일 수 있다. FMC63은 일반적으로 인간 기원의 CD19를 발현하는 Nalm-1 및 -16 세포에 대해 생성된 마우스 모노클로날 IgG1 항체를 지칭한다 (Ling, N. R., et al., (1987). Leucocyte typing III. 302). 일부 실시양태에서 항원-결합 도메인은 SJ25C1로부터 유래된 V_H 및/또는 V_L 을 포함하며, 이는 일부 측면에서 scFv일 수 있다. SJ25C1은 인간 기원의 CD19를 발현하는 Nalm-1 및 -16 세포에 대해 생성된 마우스 모노클로날 IgG1 항체이다 (Ling, N. R., et al., (1987). Leucocyte typing III. 302).

[0521] 일부 실시양태에서, 항원은 CD20이다. 일부 실시양태에서, scFv는 CD20에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터 유래된 V_H 및 V_L 을 함유한다. 일부 실시양태에서, CD20에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 리툽시맙이거나 또는 그로부터 유래된 항체, 예컨대 리툽시맙 scFv이다.

[0522] 일부 실시양태에서, 항원은 CD22이다. 일부 실시양태에서, scFv는 CD22에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터

터 유래된 V_H 및 V_L 을 함유한다. 일부 실시양태에서, CD22에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 m971이거나 또는 그로부터 유래된 항체, 예컨대 m971 scFv이다.

[0523] 일부 실시양태에서, 항원 또는 항원 결합 도메인은 GPRC5D이다. 일부 실시양태에서, scFv는 GPRC5D에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터 유래된 V_H 및 V_L 을 함유한다. 일부 실시양태에서, GPRC5D에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 국제 공개 번호 WO 2016/090329 및 WO 2016/090312에 제시된 항체 또는 항체 단편으로부터의 V_H 및 V_L 이거나 또는 이를 함유한다.

[0524] 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 재조합 수용체, 예컨대 항원 수용체의 일부로서 세포 상에서 발현된다. 항원 수용체 중에는 기능적 비-TCR 항원 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR)가 있다. 일반적으로, 펩티드-MHC 복합체에 대해 지시된 TCR-유사 특이성을 나타내는 항체 또는 항원-결합 단편을 함유하는 CAR은 또한 TCR-유사 CAR로 지칭될 수 있다. 일부 실시양태에서, TCR-유사 CAR의 MHC-펩티드 복합체에 특이적인 세포의 항원 결합 도메인은 일부 측면에서 링커 및/또는 막횡단 도메인(들)을 통해 1개 이상의 세포내 신호전달 성분에 연결된다. 일부 실시양태에서, 이러한 분자는 전형적으로 천연 항원 수용체, 예컨대 TCR을 통한 신호, 및 임의로 공동자극 수용체와 조합된 이러한 수용체를 통한 신호를 모방하거나 근사화할 수 있다.

[0525] 일부 실시양태에서, 재조합 수용체, 예컨대 키메라 수용체 (예를 들어, CAR)는 항원 (또는 리간드)에 결합하는, 예컨대 특이적으로 결합하는 리간드-결합 도메인을 포함한다. 키메라 수용체에 의해 표적화되는 항원 중에는 입양 세포 요법을 통해 표적화될 질환, 상태 또는 세포 유형과 관련하여 발현되는 것이 있다. 질환 및 상태 중에는 증식성, 신생물성, 및 악성 질환 및 장애, 예컨대 암 및 종양, 예컨대 혈액암, 면역계의 암, 예컨대 림프종, 백혈병, 및/또는 골수종, 예컨대 B, T, 및 골수성 백혈병, 림프종, 및 다발성 골수종이 있다.

[0526] 일부 실시양태에서, 항원 (또는 리간드)은 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 이는 탄수화물 또는 다른 분자이다. 일부 실시양태에서, 항원 (또는 리간드)은 정상 또는 비-표적화된 세포 또는 조직과 비교하여 질환 또는 상태의 세포, 예를 들어 종양 또는 병원성 세포 상에서 선택적으로 발현되거나 과다발현된다. 다른 실시양태에서, 항원은 정상 세포 상에서 발현되고/거나 조작된 세포 상에서 발현된다.

[0527] 일부 실시양태에서, CAR은 세포의 표면 상에 발현된 항원, 예컨대 무손상 항원을 특이적으로 인식하는 항체 또는 항원-결합 단편 (예를 들어, scFv)을 함유한다.

[0528] 일부 실시양태에서, 항원 (또는 리간드)은 종양 항원 또는 암 마커이다. 일부 실시양태에서, 항원 (또는 리간드) 항원은 $\alpha v \beta 6$ 인테그린 (avb6 인테그린), B 세포 성숙 항원 (BCMA), B7-H3, B7-H6, 탄산 안히드라제9 (CA9, 또한 CAIX 또는 G250으로도 공지됨), 암-고환 항원, 암/고환 항원_{IB} (CTAG, 또한 NY-ESO-1 및 LAGE-2로도 공지됨), 암배아성 항원 (CEA), 시클린, 시클린 A2, C-C 모티프 케모카인 리간드 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, 표피 성장 인자 단백질 (EGFR), 말단절단된 표피 성장 인자 단백질 (tEGFR), 유형 III 표피 성장 인자 수용체 돌연변이 (EGFR vIII), 상피 당단백질 2 (EPG-2), 상피 당단백질 40 (EPG-40), 에프린B2, 에프린 수용체 A2 (EPHa2), 에스트로젠 수용체, Fc 수용체 유사 5 (FCRL5; 또한 Fc 수용체 상동체 5 또는 FCRH5로도 공지됨), 태아 아세틸콜린 수용체 (태아 AchR), 폴레이트 결합 단백질 (FBP), 폴레이트 수용체 알파, 강글리오시드 GD2, O-아세틸화 GD2 (OGD2), 강글리오시드 GD3, 당단백질 100 (gp100), G 단백질 커플링된 수용체 5D (GPCR5D), Her2/neu (수용체 티로신 키나제 erb-B2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), erbB 이량체, 인간 고분자량-흑색종-연관 항원 (HMW-MAA), B형 간염 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1 (HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2 (HLA-A2), IL-22 수용체 알파(IL-22Ra), IL-13 수용체 알파 2 (IL-13Ra2), 키나제 삽입 도메인 수용체 (kdr), 카파 경쇄, L1 세포 부착 분자 (L1-CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 류신 풍부 반복부 함유 8 패밀리를 구성원 A (LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종-연관 항원 (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, 메소텔린, c-Met, 뮤린 시토메갈로바이러스 (CMV), 뮤신 1 (MUC1), MUC16, 자연 킬러 군 2 구성원 D (NKG2D) 리간드, 멜란 A (MART-1), 신경 세포 부착 분자 (NCAM), 종양배아성 항원, 흑색종의 우선적으로 발현된 항원 (PRAME), 프로게스테론 수용체, 전립선 특이적 항원, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1 (ROR1), 서바이빈, 영양막 당단백질 (TPBG, 또한 5T4로도 공지됨), 종양-연관 당단백질 72 (TAG72), 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2 (VEGFR2), 윌름스 종양 1 (WT-1), 병원체-특이적 항원, 또는 범용 태그 및/또는 비오틴화된 분자 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체에 의해 발현된 분자와 연관된 항원이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서 수용체에 의해 표적화된 항원은 B 세포 악성종양과 연관된 항원, 예컨대 다수의 공지된 B 세포 마커 중 임의의 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원은 CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45,

CD21, CD5, CD33, Ig카파, Ig람다, CD79a, CD79b 또는 CD30이거나 또는 이를 포함한다.

[0529] 일부 실시양태에서, 항원은 병원체-특이적 또는 병원체-발현된 항원이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항원은 바이러스 항원 (예컨대 HIV, HCV, HBV 등으로부터의 바이러스 항원), 박테리아 항원 및/또는 기생충 항원이다. 일부 실시양태에서, CAR은 TCR-유사 항체, 예컨대 세포 표면 상에 MHC-펩티드 복합체로서 제시된 세포내 항원, 예컨대 종양-연관 항원을 특이적으로 인식하는 항체 또는 항원-결합 단편 (예를 들어, scFv)을 함유한다. 일부 실시양태에서, MHC-펩티드 복합체를 인식하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 세포 상에서 재조합 수용체, 예컨대 항원 수용체의 일부로서 발현될 수 있다. 항원 수용체 중에는 기능적 비-TCR 항원 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR)가 있다. 일반적으로, 펩티드-MHC 복합체에 대해 지시된 TCR-유사 특이성을 나타내는 항체 또는 항원-결합 단편을 함유하는 CAR은 또한 TCR-유사 CAR로 지칭될 수 있다.

[0530] "주요 조직적합성 복합체" (MHC)에 대한 언급은 일부 경우에 세포 기구에 의해 프로세싱된 펩티드 항원을 비롯한 폴리펩티드의 펩티드 항원과 복합체화될 수 있는 다형성 펩티드 결합 부위 또는 결합 홈을 함유하는 단백질을, 일반적으로 당단백질을 지칭한다. 일부 경우에, MHC 분자는 T 세포 상의 항원 수용체, 예컨대 TCR 또는 TCR-유사 항체에 의해 인식가능한 입체형태의 항원의 제시를 위해, 예컨대 펩티드와의 복합체, 예를 들어 MHC-펩티드 복합체로서 세포 표면 상에서 디스플레이되거나 발현될 수 있다. 일반적으로, MHC 부류 I 분자는 막 관통 α 쇄 (일부 경우에 3개의 α 도메인이 있음) 및 비-공유 회합된 $\beta 2$ 마이크로글로불린을 갖는 이종이량체이다. 일반적으로, MHC 부류 II 분자는 2개의 막횡단 당단백질, α 및 β 로 구성되며, 이들 둘 다는 전형적으로 막을 관통한다. MHC 분자는 펩티드에 결합하기 위한 항원 결합 부위 또는 부위들 및 적절한 항원 수용체에 의한 인식에 필요한 서열을 함유하는 MHC의 유효 부분을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 분자는 시토플라즘에서 기원하는 펩티드를 세포 표면으로 전달하며, 여기서 MHC-펩티드 복합체는 T 세포, 예컨대 일반적으로 $CD8^+$ T 세포, 그러나 일부 경우에는 $CD4^+$ T 세포에 의해 인식된다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 II 분자는 소포성 시스템에서 기원하는 펩티드를 세포 표면으로 전달하며, 여기서 이들은 전형적으로 $CD4^+$ T 세포에 의해 인식된다. 일반적으로, MHC 분자는 마우스에서는 H-2로 및 인간에서는 인간 백혈구 항원 (HLA)으로 총칭되는 연결된 유전자좌들의 군에 의해 코딩된다. 따라서, 전형적으로 인간 MHC는 또한 인간 백혈구 항원 (HLA)으로도 지칭될 수 있다.

[0531] 용어 "MHC-펩티드 복합체" 또는 "펩티드-MHC 복합체" 또는 그의 변형은, 예컨대 일반적으로 MHC 분자의 결합 홈 또는 틈에서의 펩티드의 비-공유 상호작용에 의한 펩티드 항원 및 MHC 분자의 복합체 또는 회합체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, MHC-펩티드 복합체는 세포의 표면 상에 제시 또는 디스플레이된다. 일부 실시양태에서, MHC-펩티드 복합체는 항원 수용체, 예컨대 TCR, TCR-유사 CAR 또는 그의 항원-결합 부분에 의해 특이적으로 인식될 수 있다.

[0532] 일부 실시양태에서, 폴리펩티드의 펩티드, 예컨대 펩티드 항원 또는 에피토프는 예컨대 항원 수용체에 의한 인식을 위해 MHC 분자와 회합할 수 있다. 일반적으로, 펩티드는 더 긴 생물학적 분자, 예컨대 폴리펩티드 또는 단백질의 단편으로부터 유래되거나 또는 그에 기초한다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 전형적으로 약 8 내지 약 24개 아미노산 길이이다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 MHC 부류 II 복합체에서의 인식을 위해 정확히 또는 약 9 내지 22개 아미노산의 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 MHC 부류 I 복합체에서의 인식을 위해 정확히 또는 약 8 내지 13개 아미노산의 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, MHC 분자와 관련한 펩티드, 예컨대 MHC-펩티드 복합체의 인식 시에, 항원 수용체, 예컨대 TCR 또는 TCR-유사 CAR은 T 세포에 T 세포 반응, 예컨대 T 세포 증식, 시토킨 생산, 세포독성 T 세포 반응 또는 다른 반응을 유도하는 활성화 신호를 생산 또는 촉발한다.

[0533] 일부 실시양태에서, TCR-유사 항체 또는 항원-결합 부분은 공지되어 있거나 또는 공지된 방법에 의해 생산될 수 있다 (예를 들어 미국 공개 출원 번호 US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US20090226474; US20090304679; 및 국제 PCT 공개 번호 WO 03/068201 참조).

[0534] 일부 실시양태에서, MHC-펩티드 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 특이적 MHC-펩티드 복합체를 함유하는 면역원의 유효량으로 숙주를 면역화시킴으로써 생산될 수 있다. 일부 경우에, MHC-펩티드 복합체의 펩티드는 MHC에 결합할 수 있는 항원, 예컨대 종양 항원, 예를 들어 범용 종양 항원, 골수종 항원 또는 하기 기재된 바와 같은 다른 항원의 에피토프이다. 일부 실시양태에서, 이어서 유효량의 면역원이 면역 반응을 도출하기 위해 숙주에게 투여되며, 여기서 면역원은 MHC 분자의 결합 홈 내 펩티드의 3차원 제시에 대한 면역 반응을 도출하기에 충분한 기간 동안 그의 3차원 형태를 보유한다. 이어서, 숙주로부터 수집된 혈청은 MHC 분자의 결합 홈 내 펩티드의 3차원 제시를 인식하는 목적하는 항체가 생산되고 있는지를 결정하기 위해

검정된다. 일부 실시양태에서, 생산된 항체는 항체가 MHC 분자 단독, 관심 펩티드 단독 및 MHC와 비관련 펩티드의 복합체로부터 MHC-펩티드 복합체를 구별할 수 있다는 것을 확인하기 위해 평가될 수 있다. 이어서, 목적하는 항체는 분리될 수 있다.

[0535] 일부 실시양태에서, MHC-펩티드 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 항체 라이브러리 디스플레이 방법, 예컨대 파지 항체 라이브러리를 사용함으로써 생산될 수 있다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 Fab, scFv 또는 다른 항체 형태의 파지 디스플레이 라이브러리, 예를 들어 라이브러리의 구성원이 CDR 또는 CDR들의 1개 이상의 잔기에서 돌연변이된 라이브러리가 생성될 수 있다. 예를 들어, 미국 공개 출원 번호 US20020150914, US2014/0294841; 및 문헌 [Cohen CJ. Et al., (2003) J Mol. Recogn. 16:324-332]을 참조한다.

[0536] 본원에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 폴리클로날 및 모노클로날 항체, 예컨대 무손상 항체 및 기능적 (항원-결합) 항체 단편, 예컨대 단편 항원 결합 (Fab) 단편, F(ab')₂ 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 재조합 IgG (rIgG) 단편, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 가변 중쇄 (V_H) 영역, 단일쇄 항체 단편, 예컨대 단일쇄 가변 단편 (scFv), 및 단일 도메인 항체 (예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디) 단편을 포함한다. 상기 용어는 유전자 조작된 및/또는 달리 변형된 형태의 이뮤노글로불린, 예컨대 인트라바디, 펩티바디, 키메라 항체, 완전 인간 항체, 인간화 항체 및 이중접합체 항체, 다중특이적, 예를 들어 이중특이적 항체, 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디, 텐덤 디-scFv, 텐덤 트리-scFv를 포괄한다. 달리 언급되지 않는 한, 용어 "항체"는 그의 기능적 항체 단편을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 상기 용어는 또한 무손상 또는 전장 항체, 예컨대 임의의 부류 또는 하위부류의 항체, 예컨대 IgG 및 그의 하위부류, IgM, IgE, IgA 및 IgD를 포괄한다.

[0537] 일부 실시양태에서, 항원-결합 단백질, 항체 및 그의 항원 결합 단편은 전장 항체의 항원을 특이적으로 인식한다. 일부 실시양태에서, 항체의 중쇄 및 경쇄는 전장일 수 있거나 또는 항원-결합 부분 (Fab, F(ab')₂, Fv 또는 단일쇄 Fv 단편 (scFv))일 수 있다. 다른 실시양태에서, 항체 중쇄 불변 영역은, 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE로부터 선택되고, 특히 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로부터 선택되고, 보다 특히 IgG1 (예를 들어, 인간 IgG1)이다. 또 다른 실시양태에서, 항체 경쇄 불변 영역은 예를 들어 카파 또는 람다, 특히 카파로부터 선택된다.

[0538] 제공된 항체 중에는 항체 단편이 있다. "항체 단편"은 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 무손상 항체의 부분을 포함하는 무손상 항체 이외의 다른 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 가변 중쇄 (V_H) 영역, 단일-쇄 항체 분자, 예컨대 scFv 및 단일-도메인 V_H 단일 항체; 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정한 실시양태에서, 항체는 가변 중쇄 영역 및/또는 가변 경쇄 영역을 포함하는 단일-쇄 항체 단편, 예컨대 scFv이다.

[0539] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체의 항원에 대한 결합에 수반되는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인 (각각 V_H 및 V_L)은 일반적으로 유사한 구조를 갖고, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역 (FR) 및 3개의 CDR을 포함한다. (예를 들어, 문헌 [Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)] 참조). 단일 V_H 또는 V_L 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정한 항원에 결합하는 항체는 각각 상보성 V_L 또는 V_H 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 V_H 또는 V_L 도메인을 사용하여 분리될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)]을 참조한다.

[0540] 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 실시양태에서, 단일-도메인 항체는 인간 단일-도메인 항체이다. 일부 실시양태에서, CAR은 항원, 예컨대 표적화된 세포 또는 질환, 예컨대 종양 세포 또는 암 세포의 암 마커 또는 세포 표면 항원, 예컨대 본원에 기재되거나 공지된 표적 항원 중 임의의 것에 특이적으로 결합하는 항체 중쇄 도메인을 포함한다.

[0541] 항체 단편은 무손상 항체의 단백질분해적 소화뿐만 아니라 재조합 숙주 세포에 의한 생산을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 재조합적으로 생산된 단편, 예컨대 자연적으로 발생하지 않는 배열, 예컨대 합성 링커, 예를 들어 펩티드 링커에 의해 연결된 2개 이상의 항체 영역 또는쇄를 갖는 것을 포함하고/거나 자연 발생 무손상 항체의 효소 소화에 의해 생산되지 않을 수 있는 단

편이다. 일부 실시양태에서, 항체 단편은 scFv이다.

[0542] "인간화" 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 아미노산 잔기가 비-인간 CDR로부터 유래되고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 아미노산 잔기가 인간 FR로부터 유래된 항체이다. 인간화 항체는 임의로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 한 부분을 포함할 수 있다. 비-인간 항체의 "인간화 형태"는 모 비-인간 항체의 특이성 및 친화도를 보유하면서, 전형적으로 인간에 대한 면역원성을 감소시키기 위해 인간화를 거친 비-인간 항체의 변이체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 인간화 항체 내 일부 FR 잔기는, 예를 들어 항체 특이성 또는 친화도를 회복 또는 개선시키기 위해 비-인간 항체 (예를 들어, CDR 잔기가 유래된 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.

[0543] 따라서, 일부 실시양태에서, TCR-유사 CAR을 포함한 키메라 항원 수용체는 항체 또는 항체 단편을 함유하는 세포의 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 단편은 scFv를 포함한다. 일부 측면에서, 키메라 항원 수용체는 항체 또는 단편을 함유하는 세포의 부분 및 세포내 신호전달 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 영역은 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 도메인, T 세포에서 1차 활성화 신호를 유도할 수 있는 신호전달 도메인, T 세포 수용체 (TCR) 성분의 신호전달 도메인, 및/또는 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)를 포함하는 신호전달 도메인이거나 또는 이를 포함한다.

[0544] 일부 실시양태에서, CAR의 세포외 부분, 예컨대 그의 항체 부분은 스페이서, 예컨대 항원-인식 성분, 예를 들어 scFv와 막횡단 도메인 사이의 스페이서 영역을 추가로 포함한다. 스페이서는 이뮤노글로불린 불변 영역 또는 그의 변이체 또는 변형된 버전의 적어도 한 부분, 예컨대 힌지 영역, 예를 들어 IgG4 힌지 영역, 및/또는 CH1/CL 및/또는 Fc 영역이거나 또는 이를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 재조합 수용체는 스페이서 및/또는 힌지 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 불변 영역 또는 부분은 인간 IgG, 예컨대 IgG4 또는 IgG1의 것이다. 일부 측면에서, 불변 영역의 부분은 항원-인식 성분, 예를 들어 scFv와 막횡단 도메인 사이의 스페이서 영역으로서의 역할을 한다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖고, 서열식별번호: 2에 제시된 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 서열식별번호: 3에 제시된 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 서열식별번호: 4에 제시된 서열을 갖는다.

[0545] 일부 실시양태에서, 불변 영역 또는 부분은 IgD의 것이다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 서열식별번호: 5에 제시된 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 서열식별번호: 1, 3, 4 및 5 중 임의의 것에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과와 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는다.

[0546] 일부 실시양태에서, 스페이서는 이뮤노글로불린 불변 영역 또는 그의 변이체 또는 변형된 버전의 적어도 한 부분, 예컨대 힌지 영역, 예를 들어 IgG4 힌지 영역, 및/또는 C_H1/C_L 및/또는 Fc 영역이거나 또는 이를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 재조합 수용체는 스페이서 및/또는 힌지 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 불변 영역 또는 부분은 인간 IgG, 예컨대 IgG4 또는 IgG1의 것이다. 일부 측면에서, 불변 영역의 부분은 항원-인식 성분, 예를 들어 scFv와 막횡단 도메인 사이의 스페이서 영역으로서의 역할을 한다. 스페이서는 스페이서의 부재 하의 경우와 비교하여, 항원 결합 후에 세포의 증가된 반응성을 제공하는 길이일 수 있다. 일부 예에서, 스페이서는 정확히 또는 약 12개 아미노산 길이거나, 또는 12개 이하의 아미노산 길이이다. 예시적인 스페이서는 적어도 약 10 내지 229개 아미노산, 약 10 내지 200개 아미노산, 약 10 내지 175개 아미노산, 약 10 내지 150개 아미노산, 약 10 내지 125개 아미노산, 약 10 내지 100개 아미노산, 약 10 내지 75개 아미노산, 약 10 내지 50개 아미노산, 약 10 내지 40개 아미노산, 약 10 내지 30개 아미노산, 약 10 내지 20개 아미노산, 또는 약 10 내지 15개 아미노산을 갖고 열거된 범위 중 임의의 것의 종점 사이의 임의의 정수를 포함하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 스페이서 영역은 약 12개 이하의 아미노산, 약 119개 이하의 아미노산, 또는 약 229개 이하의 아미노산을 갖는다. 예시적인 스페이서는 IgG4 힌지 단독, CH2 및 CH3 도메인에 연결된 IgG4 힌지, 또는 CH3 도메인에 연결된 IgG4 힌지를 포함한다. 예시적인 스페이서는 문헌 [Hudecek et al., (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153] 또는 국제 특허 출원 공개 번호 W02014/031687에 기재된 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 서열식별번호: 1에 제시된 서열을 갖고, 서열식별번호: 2에 제시된 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 서열식별번호: 3에 제시된 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 서열식별번호: 4에 제시된 서열을 갖는다.

[0547] 일부 실시양태에서, 불변 영역 또는 부분은 IgD의 것이다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 서열식별번호: 5에 제시된 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 서열식별번호: 1, 3, 4 및 5 중 임의의 것에 대해 적어도

도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과
의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는다.

[0548] 세포외 리간드 결합, 예컨대 항원 인식 도메인은 일반적으로 1개 이상의 세포내 신호전달 성분, 예컨대 CAR의
경우에 항원 수용체 복합체, 예컨대 TCR 복합체를 통한 활성화를 모방하고/거나 또 다른 세포 표면 수용체를 통
해 신호를 전달하는 신호전달 성분에 연결된다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 세포외 리간드 결합 및
세포내 신호전달 도메인을 연결한다. 일부 실시양태에서, 항원 결합 성분 (예를 들어, 항체)은 1개 이상의 막
횡단 및 세포내 신호전달 영역에 연결된다. 일부 실시양태에서, CAR은 세포외 도메인에 융합된 막횡단 도메인
을 포함한다. 한 실시양태에서, 수용체, 예를 들어 CAR 내의 도메인 중 1개와 천연적으로 회합된 막횡단 도메
인이 사용된다. 일부 경우에, 막횡단 도메인은 이러한 도메인이 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막횡단
도메인에 결합하는 것을 피하여 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하도록 선택되거나 또는 아
미노산 치환에 의해 변형된다.

[0549] 일부 실시양태에서 막횡단 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래된다. 공급원이 천연인 경우에, 도메
인은 일부 측면에서 임의의 막-결합 또는 막횡단 단백질로부터 유래된다. 막횡단 영역은 T-세포 수용체, CD28,
CD3 앵글론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137 또는
CD154의 알파, 베타 또는 제타쇄로부터 유래된 것을 포함한다 (예를 들어, 적어도 그의 막횡단 영역(들)을 포
함함). 대안적으로, 일부 실시양태에서 막횡단 도메인은 합성된 것이다. 일부 측면에서, 합성 막횡단 도메인
은 소수성 잔기, 예컨대 류신 및 발린을 우세하게 포함한다. 일부 측면에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의
삼중체가 합성 막횡단 도메인의 각각의 단부에서 발견될 것이다. 일부 실시양태에서, 연결은 링커, 스페이서
및/또는 막횡단 도메인(들)에 의한다.

[0550] 일부 실시양태에서, 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커, 예를 들어 2 내지 10개 아미노산 길이의 링커, 예컨대
글리신 및 세린을 함유하는 것, 예를 들어 글리신-세린 이중체가 존재하고, CAR의 막횡단 도메인과 세포질 신호
전달 도메인 사이에 연결을 형성한다.

[0551] 제조할 수용체, 예를 들어 CAR은 일반적으로 적어도 1개의 세포내 신호전달 성분 또는 성분들을 포함한다. 일
부 실시양태에서, 수용체는 TCR 복합체의 세포내 성분, 예컨대 T-세포 활성화 및 세포독성을 매개하는 TCR CD3
쇄, 예를 들어 CD3 제타쇄를 포함한다. 따라서, 일부 측면에서, 항원-결합 부분은 1개 이상의 세포 신호전달
모듈에 연결된다. 일부 실시양태에서, 세포 신호전달 모듈은 CD3 막횡단 도메인, CD3 세포내 신호전달 도메인,
및/또는 다른 CD 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수용체, 예를 들어 CAR은 1종 이상의 추가의
분자, 예컨대 Fc 수용체 γ , CD8, CD4, CD25 또는 CD16의 부분을 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 측면에서,
CAR 또는 다른 키메라 수용체는 CD3-제타 (CD3- ζ) 또는 Fc 수용체 γ 와 CD8, CD4, CD25, 또는 CD16 사이의 키
메라 분자를 포함한다.

[0552] 일부 실시양태에서, CAR 또는 다른 키메라 수용체의 라이제이션 시, 수용체의 세포질 도메인 및/또는 영역 또는
세포내 신호전달 도메인 및/또는 영역은 면역 세포, 예를 들어 CAR을 발현하도록 조작된 T 세포의 정상 이펙터
기능 또는 반응 중 적어도 1종을 활성화시킨다. 예를 들어, 일부 문맥에서, CAR은 T 세포의 기능, 예컨대 세포
용해 활성 또는 T-헬퍼 활성, 예컨대 시토카인 또는 다른 인자의 분비를 유도한다. 일부 실시양태에서, 항원
수용체 성분 또는 공동자극 분자의 세포내 신호전달 도메인의 말단절단된 부분은, 예를 들어 이펙터 기능 신호
를 전달하는 경우에, 무손상 면역자극쇄 대신에 사용된다. 일부 실시양태에서, 예를 들어 세포내 도메인 또는
도메인들을 포함하는 세포내 신호전달 영역은 T 세포 수용체 (TCR)의 세포질 서열을 포함하고, 일부 측면에서는
또한, 천연 상황에서 이러한 수용체와 협력하여 작용하여 항원 수용체 결합 후 신호 전달을 개시하는 보조-수용
체의 것 및/또는 이러한 분자의 임의의 유도체 또는 변이체, 및/또는 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성
서열을 포함한다.

[0553] 천연 TCR과 관련하여, 완전한 활성화는 일반적으로 TCR을 통한 신호전달, 뿐만 아니라 공동자극 신호를 필요로
한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 완전한 활성화를 촉진하기 위해, 2차 또는 공동-자극 신호를 생성하는 성분
이 또한 CAR에 포함된다. 다른 실시양태에서, CAR은 공동자극 신호를 생성하는 성분을 포함하지 않는다. 일부
측면에서, 추가의 CAR이 동일한 세포에서 발현되고, 2차 또는 공동자극 신호를 생성하는 성분을 제공한다.

[0554] T 세포 활성화는 일부 측면에서 적어도 2종의 부류의 세포질 신호전달 서열: TCR을 통해 항원-의존성 1차 활성
화를 개시하는 것 (1차 세포질 신호전달 서열), 및 항원-비의존성 방식으로 작용하여 2차 또는 공동-자극 신호
를 제공하는 것 (2차 세포질 신호전달 서열)에 의해 매개되는 것으로 기재된다. 일부 측면에서, CAR은 이러한
신호전달 성분 중 하나 또는 둘 다를 포함한다.

- [0555] 일부 측면에서, CAR은 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절하는 1차 세포질 신호전달 서열을 포함한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호전달 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지된 신호전달 모티프를 함유할 수 있다. ITAM 함유 1차 세포질 신호전달 서열의 예는 TCR 또는 CD3 제타, FcR 감마, FcR 베타, CD3 감마, CD3 델타, CD3 엡실론, CD8, CD22, CD79a, CD79b 및 CD66d로부터 유래된 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, ITAM 함유 1차 세포질 신호전달 서열은 TCR 또는 CD3 제타, FcR 감마 또는 FcR 베타로부터 유래된 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR 내의 세포질 신호전달 분자(들)는 세포질 신호전달 도메인, 그 일부, 또는 CD3 제타로부터 유래된 서열을 함유한다.
- [0556] 일부 실시양태에서, CAR은 공동자극 수용체, 예컨대 CD28, 4-1BB, OX40, CD27, DAP10 및 ICOS의 신호전달 도메인 및/또는 막횡단 부분을 포함한다. 일부 측면에서, 동일한 CAR은 활성화 또는 신호전달 영역 및 공동자극 성분 둘 다를 포함한다.
- [0557] 일부 실시양태에서, 활성화 도메인은 하나의 CAR 내에 포함되는 반면, 공동자극 성분은 또 다른 항원을 인식하는 또 다른 CAR에 의해 제공된다. 일부 실시양태에서, CAR은 활성화 또는 자극 CAR, 및 공동자극 CAR을 포함하며, 둘 다는 동일한 세포 상에서 발현된다 (W02014/055668 참조). 일부 측면에서, CAR은 자극 또는 활성화 CAR 이고; 다른 측면에서, 이는 공동자극 CAR이다. 일부 실시양태에서, 세포는 억제 CAR (iCAR, 문헌 [Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (December, 2013)] 참조), 예컨대 상이한 항원을 인식하는 CAR을 추가로 포함하며, 이에 의해 제1 항원을 인식하는 CAR을 통해 전달되는 활성화 신호는 억제 CAR이 그의 리간드에 결합하는 것에 의해 감소 또는 억제되어, 예를 들어 오프-타겟 효과가 감소된다.
- [0558] 특정 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 세포내 도메인에 연결된 CD28 막횡단 및 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3 세포내 도메인에 연결된 키메라 CD28 및 CD137 공동-자극 도메인을 포함한다.
- [0559] 일부 실시양태에서, CD8⁺ 세포독성 T 세포의 세포내 신호전달 도메인은 CD4⁺ 헬퍼 T 세포의 세포내 신호전달 도메인과 동일하다. 일부 실시양태에서, CD8⁺ 세포독성 T 세포의 세포내 신호전달 도메인은 CD4⁺ 헬퍼 T 세포의 세포내 신호전달 도메인과 상이하다.
- [0560] 일부 실시양태에서, CAR은 세포질 부분에 1개 이상, 예를 들어 2개 이상의 공동자극 도메인 및 활성화 도메인, 예를 들어 1차 활성화 도메인을 포괄한다. 예시적인 CAR은 CD3-제타, CD28, 및 4-1BB의 세포내 성분을 포함한다.
- [0561] 일부 실시양태에서, 제공된 바이러스 벡터 내의 핵산(들)에 의해 코딩된 재조합 수용체(들), 예를 들어 CAR은, 예를 들어 수용체를 발현시키기 위한 세포의 형질도입 또는 조작 및/또는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩된 분자(들)를 발현하는 세포의 선택 및/또는 표적화를 확인하기 위한 목적으로, 1종 이상의 마커를 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 이러한 마커는 상이한 핵산 또는 폴리뉴클레오티드에 의해 코딩될 수 있고, 이는 또한 유전자 조작 공정 동안, 전형적으로 동일한 방법, 예를 들어 본원에 제공된 방법 중 임의의 것에 의한 형질도입을 통해, 예를 들어 동일한 벡터 또는 벡터의 유형을 통해 도입될 수 있다.
- [0562] 일부 측면에서, 마커, 예를 들어 형질도입 마커는 단백질이고/거나 세포 표면 분자이다. 예시적인 마커는 자연 발생, 예를 들어 내인성 마커, 예컨대 자연 발생 세포 표면 분자의 말단절단된 변이체이다. 일부 측면에서, 변이체는 천연 또는 내인성 세포 표면 분자와 비교하여 감소된 면역원성, 감소된 트래픽킹 기능, 및/또는 감소된 신호전달 기능을 갖는다. 일부 실시양태에서, 마커는 세포 표면 수용체의 말단절단된 버전, 예컨대 말단절단된 EGFR (tEGFR)이다. 일부 측면에서, 마커는 CD34, NGFR, 또는 표피 성장 인자 수용체 (예를 들어, tEGFR)의 전부 또는 일부 (예를 들어, 말단절단된 형태)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마커를 코딩하는 핵산은 링커 서열, 예컨대 절단가능한 링커 서열, 예를 들어 T2A P2A, E2A 및/또는 F2A를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, W02014/031687을 참조한다.
- [0563] 일부 실시양태에서, 마커는 T 세포 상에서 자연적으로 발견되지 않거나 T 세포의 표면 상에서 자연적으로 발견되지 않는 분자, 예를 들어 세포 표면 단백질, 또는 그 일부이다.
- [0564] 일부 실시양태에서, 분자는 비-자기 분자, 예를 들어 비-자기 단백질, 즉 세포가 입양 전달될 숙주의 면역계에 의해 "자기"로 인식되지 않는 것이다.
- [0565] 일부 실시양태에서, 마커는 치료 기능을 제공하지 않고/거나, 유전자 조작, 예를 들어 성공적으로 조작된 세포를 선택하기 위한 마커로서 사용되는 것 이외의 다른 효과를 생성하지 않는다. 다른 실시양태에서, 마커는 치

료 분자 또는 달리 일부 목적하는 효과를 발휘하는 분자, 예컨대 생체내에서 마주치게 될 세포에 대한 리간드, 예컨대 입양 전달 시 및 리간드와 마주칠 때 세포의 반응을 증진시키고/거나 약화시키는 공동자극 또는 면역 체크포인트 분자일 수 있다.

[0566] 일부 경우에, CAR은 제1, 제2, 및/또는 제3 세대 CAR로 지칭된다. 일부 측면에서, 제1 세대 CAR은 항원 결합 시 CD3-쇄 유도된 신호만을 제공하는 것이고; 일부 측면에서, 제2-세대 CAR은 이러한 신호 및 공동자극 신호를 제공하는 것, 예컨대 공동자극 수용체, 예컨대 CD28 또는 CD137로부터의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 것이고; 일부 측면에서, 제3 세대 CAR은 일부 측면에서 상이한 공동자극 수용체의 다중 공동자극 도메인을 포함하는 것이다.

[0567] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체는 세포의 리간드-결합 부분, 예컨대 항원-결합 부분, 예컨대 항체 또는 그의 단편 및 세포내 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 단편은 scFv 또는 단일-도메인 VH 항체를 포함하고, 세포내 도메인은 ITAM을 함유한다. 일부 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타 (CD3 ζ) 쇄의 제타 쇄의 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체는 세포의 도메인과 세포내 신호전달 영역 또는 도메인 사이를 연결하고/거나 이들 사이에 배치된 막횡단 도메인을 포함한다.

[0568] 일부 측면에서, 막횡단 도메인은 CD28의 막횡단 부분을 함유한다. 세포의 도메인 및 막횡단 도메인은 직접적으로 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포의 도메인 및 막횡단 도메인은 스페이서, 예컨대 본원에 기재된 임의의 것에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체는 예컨대 막횡단 도메인과 세포내 신호전달 도메인 사이에 T 세포 공동자극 분자의 세포내 도메인을 함유한다. 일부 측면에서, T 세포 공동자극 분자는 CD28 또는 4-1BB이다.

[0569] 일부 실시양태에서, CAR은 항체, 예를 들어 항체 단편, CD28의 막횡단 부분이거나 또는 이를 함유하는 막횡단 도메인 또는 그의 기능적 변이체, 및 CD28의 신호전달 부분 또는 그의 기능적 변이체 및 CD3 제타의 신호전달 부분 또는 그의 기능적 변이체를 함유하는 세포내 신호전달 도메인을 함유한다. 일부 실시양태에서, CAR은 항체, 예를 들어 항체 단편, CD28의 막횡단 부분이거나 또는 이를 함유하는 막횡단 도메인 또는 그의 기능적 변이체, 및 4-1BB의 신호전달 부분 또는 그의 기능적 변이체 및 CD3 제타의 신호전달 부분 또는 그의 기능적 변이체를 함유하는 세포내 신호전달 도메인을 함유한다. 일부 이러한 실시양태에서, 수용체는 Ig 분자, 예컨대 인간 Ig 분자의 부분을 함유하는 스페이서, 예컨대 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지, 예컨대 힌지-단독 스페이서를 추가로 포함한다.

[0570] 일부 실시양태에서, 수용체, 예를 들어 CAR의 막횡단 도메인은 인간 CD28 또는 그의 변이체의 막횡단 도메인, 예를 들어 인간 CD28의 27-아미노산 막횡단 도메인 (수탁 번호: P10747.1)이거나, 또는 서열식별번호: 8에 제시된 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 8에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과와 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 막횡단 도메인이고; 일부 실시양태에서, 재조합 수용체의 막횡단-도메인 함유 부분은 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열 또는 그에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과와 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0571] 일부 실시양태에서, 키메라 항원 수용체는 T 세포 공동자극 분자의 세포내 도메인을 함유한다. 일부 측면에서, T 세포 공동자극 분자는 CD28 또는 4-1BB이다.

[0572] 일부 실시양태에서, 세포내 도메인은 인간 CD28의 세포내 공동자극 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 변이체 또는 부분, 예컨대 그의 41개 아미노산 도메인 및/또는 천연 CD28 단백질의 위치 186-187에서 LL에서 GG로의 치환을 갖는 이러한 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 영역 및/또는 도메인은 서열식별번호: 10 또는 11에 제시된 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 10 또는 11에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과와 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포내 영역 및/또는 도메인은 4-1BB의 세포내 공동자극 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 변이체, 예컨대 인간 4-1BB의 42-아미노산 세포질 도메인 (수탁 번호 Q07011.1), 또는 그의 기능적 변이체 또는 부분, 예컨대 서열식별번호: 12에 제시된 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 12에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과와 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0573] 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 영역 및/또는 도메인은 인간 CD3 쇄, 임의로 CD3 제타 자극 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 변이체, 예컨대 인간 CD3 ζ 의 이소형 3의 112 AA 세포질 도메인 (수탁 번호: P20963.2) 또

는 미국 특허 번호 7,446,190 또는 미국 특허 번호 8,911,993에 기재된 바와 같은 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포내 신호전달 영역은 서열식별번호: 13, 14 또는 15에 제시된 아미노산 서열 또는 서열식별번호: 13, 14 또는 15에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과와 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0574] 일부 측면에서, 스페이서는 IgG의 힌지 영역만을, 예컨대 IgG4 또는 IgG1의 힌지만을, 예컨대 서열식별번호: 1에 제시된 힌지 단독 스페이서를 함유한다. 다른 실시양태에서, 스페이서는 CH2 및/또는 CH3 도메인에 연결된 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지이다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 예컨대 서열식별번호: 3에 제시된, C_H2 및 C_H3 도메인에 연결된 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지이다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 예컨대 서열식별번호: 4에 제시된, C_H3 도메인에만 연결된 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지이다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 글리신-세린 풍부 서열 또는 다른 가요성 링커, 예컨대 공지된 가요성 링커이거나 또는 이를 포함한다.

[0575] 예를 들어, 일부 실시양태에서, CAR은 항원, 예를 들어 본원에 기재된 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 리간드-결합 부분, 예컨대 항원-결합 부분, 예컨대 항체 또는 sdAb 및 scFv를 포함한 그의 단편; 스페이서, 예컨대 Ig-힌지 함유 스페이서 중 임의의 것; CD28의 부분인 막횡단 도메인 또는 그의 변이체; CD28의 신호전달 부분을 함유하는 세포내 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 변이체; 및 CD3 제타 신호전달 도메인의 신호전달 부분 또는 그의 기능적 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR은 항원, 예를 들어 본원에 기재된 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 리간드-결합 부분, 예컨대 항원-결합 부분, 예컨대 항체 또는 sdAb 및 scFv를 포함한 그의 단편; 스페이서, 예컨대 Ig-힌지 함유 스페이서 중 임의의 것; CD28의 부분인 막횡단 도메인 또는 그의 변이체; 4-1BB의 신호전달 부분을 함유하는 세포내 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 변이체; 및 CD3 제타 신호전달 도메인의 신호전달 부분 또는 그의 기능적 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 CAR 구축물은, 예를 들어 CAR의 하류에 T2A 리보솜 스킵 요소 및/또는 tEGFR 서열을 추가로 포함한다.

[0576] ii. T 세포 수용체 (TCR)

[0577] 일부 실시양태에서, 핵산(들)에 의해 코딩된 재조합 분자(들)는 재조합 T 세포 수용체 (TCR)이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 재조합 TCR은 항원, 일반적으로 표적 세포 상에 존재하는 항원, 예컨대 종양-특이적 항원, 자가면역 또는 염증성 질환과 연관된 특정한 세포 유형 상에 발현된 항원, 또는 바이러스 병원체 또는 박테리아 병원체로부터 유래된 항원에 특이적이다. 일부 실시양태에서, 표적 폴리펩티드, 예컨대 종양, 바이러스 또는 자가면역 단백질의 항원의 펩티드 에피토프 또는 T 세포 에피토프를 인식하는 TCR 또는 그의 항원-결합 부분을 발현하는 조작된 세포, 예컨대 T 세포가 제공된다.

[0578] 일부 실시양태에서, "T 세포 수용체" 또는 "TCR"은 가변 α 및 β 쇄 (또한 각각 TCR α 및 TCR β로도 공지됨) 또는 가변 γ 및 δ 쇄 (또한 각각 TCR α 및 TCR β로도 공지됨) 또는 그의 항원-결합 부분을 함유하고, MHC 분자에 결합된 펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 분자이다. 일부 실시양태에서, TCR은 αβ 형태이다. 전형적으로, αβ 및 γδ 형태로 존재하는 TCR은 일반적으로 구조적으로 유사하지만, 이들을 발현하는 T 세포는 별개의 해부학적 위치 또는 기능을 가질 수 있다. TCR은 세포의 표면 상에서 또는 가용성 형태로 발견될 수 있다. 일반적으로, TCR은 T 세포 (또는 T 림프구)의 표면 상에서 발견되며, 여기서 이는 일반적으로 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 결합된 항원을 인식하는 것을 담당한다.

[0579] 달리 언급되지 않는 한, 용어 "TCR"은 전체 TCR뿐만 아니라 그의 항원-결합 부분 또는 항원-결합 단편을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 실시양태에서, TCR은 αβ 형태 또는 γδ 형태의 TCR을 포함한 무손상 또는 전장 TCR이다. 일부 실시양태에서, TCR은 전장 TCR보다 작지만 MHC 분자에 결합된 특이적 펩티드에 결합하는, 예컨대 MHC-펩티드 복합체에 결합하는 항원-결합 부분이다. 일부 경우에, TCR의 항원-결합 부분 또는 단편은 전장 또는 무손상 TCR의 구조적 도메인의 단지 한 부분만을 함유할 수 있지만, 여전히 전체 TCR이 결합하는 펩티드 에피토프, 예컨대 MHC-펩티드 복합체에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 항원-결합 부분은 특이적 MHC-펩티드 복합체에 결합하기 위한 결합 부위를 형성하기에 충분한 TCR의 가변 도메인, 예컨대 TCR의 가변 α 쇄 및 가변 β 쇄를 함유한다. 일반적으로, TCR의 가변 쇄는 펩티드, MHC 및/또는 MHC-펩티드 복합체의 인식에 수반되는 상보성 결정 영역을 함유한다.

[0580] 일부 실시양태에서, TCR의 가변 도메인은 일반적으로 항원 인식 및 결합 능력 및 특이성에 대한 주요 기여자인 초가변 루프 또는 상보성 결정 영역 (CDR)을 함유한다. 일부 실시양태에서, TCR의 CDR 또는 그의 조합은 주어진 TCR 분자의 모든 또는 실질적으로 모든 항원-결합 부위를 형성한다. TCR 쇄의 가변 영역 내의 다양한 CDR은

일반적으로 프레임워크 영역 (FR)에 의해 분리되고, 이는 일반적으로 CDR과 비교하여 TCR 분자 사이에서 보다 적은 가변성을 디스플레이한다 (예를 들어, 문헌 [Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988] 참조; 또한 문헌 [Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003] 참조). 일부 실시양태에서, CDR3은 항원 결합 또는 특이성을 담당하는 주요 CDR이거나, 또는 항원 인식 및/또는 펩티드-MHC 복합체의 프로세싱된 펩티드 부분과의 상호작용을 위한, 주어진 TCR 가변 영역 상의 3개의 CDR 중에서 가장 중요한 것이다. 일부 문맥에서, 알파쇄의 CDR1은 특정 항원성 펩티드의 N-말단 부분과 상호작용할 수 있다. 일부 문맥에서, 베타쇄의 CDR1은 펩티드의 C-말단 부분과 상호작용할 수 있다. 일부 문맥에서, CDR2는 MHC-펩티드 복합체의 MHC 부분과의 상호작용 또는 그의 인식에 가장 강하게 기여하거나 또는 이를 담당하는 1차 CDR이다. 일부 실시양태에서, β -쇄의 가변 영역은 추가의 초가변 영역 (CDR4 또는 HVR4)을 함유할 수 있으며, 이는 일반적으로 초항원 결합에 수반되고 항원 인식에는 수반되지 않는다 (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).

[0581] 일부 실시양태에서, TCR은 또한 불변 도메인, 막횡단 도메인 및/또는 짧은 세포질 꼬리를 함유할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997] 참조). 일부 측면에서, TCR의 각각의 쇄는 1개의 N-말단 이뮤노글로불린 가변 도메인, 1개의 이뮤노글로불린 불변 도메인, 막횡단 영역, 및 C-말단 단부의 짧은 세포질 꼬리를 보유할 수 있다. 일부 실시양태에서, TCR은 신호 전달을 매개하는 데 수반되는 CD3 복합체의 불변 단백질과 회합된다.

[0582] 일부 실시양태에서, TCR 쇄는 1개 이상의 불변 도메인을 함유한다. 예를 들어, 주어진 TCR 쇄 (예를 들어, α -쇄 또는 β -쇄)의 세포외 부분은 2개의 이뮤노글로불린-유사 도메인, 예컨대 세포 막에 인접한 가변 도메인 (예를 들어, V α 또는 V β ; 전형적으로 카바트 넘버링 문헌 [Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.]에 기초하여 아미노산 1 내지 116) 및 불변 도메인 (예를 들어, α -쇄 불변 도메인 또는 C α , 전형적으로 카바트 넘버링에 기초하여 쇄의 위치 117 내지 259 또는 β 쇄 불변 도메인 또는 C β , 전형적으로 카바트에 기초하여 쇄의 위치 117 내지 295)을 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 2개의 쇄에 의해 형성된 TCR의 세포외 부분은 2개의 막-근위 불변 도메인 및 2개의 막-원위 가변 도메인을 함유하며, 가변 도메인은 각각 CDR을 함유한다. TCR의 불변 도메인은 짧은 연결 서열을 함유할 수 있으며, 여기서 시스테인 잔기는 디설피드 결합을 형성함으로써 TCR의 2개의 쇄를 연결한다. 일부 실시양태에서, TCR은 각각의 α 및 β 쇄에 추가의 시스테인 잔기를 가질 수 있어서, TCR은 불변 도메인에 2개의 디설피드 결합을 함유한다.

[0583] 일부 실시양태에서, TCR 쇄는 막횡단 도메인을 함유한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 양으로 하전된다. 일부 경우에, TCR 쇄는 세포질 꼬리를 함유한다. 일부 경우에, 구조는 TCR이 CD3 및 그의 서브유닛과 같은 다른 분자와 회합되도록 한다. 예를 들어, 막횡단 영역을 갖는 불변 도메인을 함유하는 TCR은 세포 막에 단백질을 고정시킬 수 있고 CD3 신호전달 장치 또는 복합체의 불변 서브유닛과 회합할 수 있다. CD3 신호전달 서브유닛 (예를 들어, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ 및 CD3 ζ 쇄)의 세포내 꼬리는 TCR 복합체의 신호전달 능력에 수반되는 1개 이상의 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM을 함유한다.

[0584] 일부 실시양태에서, TCR은 2개의 쇄 α 및 β (또는 임의로 γ 및 δ)의 이중이량체일 수 있거나, 또는 이는 단일 쇄 TCR 구조물일 수 있다. 일부 실시양태에서, TCR은 예컨대 디설피드 결합 또는 디설피드 결합들에 의해 연결된 2개의 별개의 쇄 (α 및 β 쇄 또는 γ 및 δ 쇄)를 함유하는 이중이량체이다.

[0585] 일부 실시양태에서, TCR은 공지된 TCR 서열(들), 예컨대 V α , β 쇄의 서열로부터 생성될 수 있으며, 이를 위해 실질적으로 전장 코딩 서열이 용이하게 이용가능하다. 세포 공급원으로부터 V 쇄 서열을 비롯한 전장 TCR 서열을 수득하는 방법은 널리 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, TCR을 코딩하는 핵산은 다양한 공급원으로부터, 예컨대 주어진 세포 또는 세포들 내의 또는 그로부터 단리된 TCR-코딩 핵산의 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 증폭, 또는 공중 이용가능한 TCR DNA 서열의 합성에 의해 수득될 수 있다.

[0586] 일부 실시양태에서, TCR은 생물학적 공급원으로부터, 예컨대 세포로부터, 예컨대 T 세포 (예를 들어, 세포독성 T 세포), T-세포 하이브리도마 또는 다른 공중 이용가능한 공급원으로부터 수득된다. 일부 실시양태에서, T-세포는 생체내 단리된 세포로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, TCR은 흉선 선택된 TCR이다. 일부 실시양태에서, TCR은 네오에피토프-제한된 TCR이다. 일부 실시양태에서, T-세포는 배양된 T-세포 하이브리도마 또는 클론일 수 있다. 일부 실시양태에서, TCR 또는 그의 항원-결합 부분 또는 그의 항원-결합 단편은 TCR의 서

열의 지식으로부터 합성적으로 생성될 수 있다.

[0587] 일부 실시양태에서, TCR은 표적 폴리펩티드 항원 또는 그의 표적 T 세포 에피토프에 대한 후보 TCR의 라이브러리를 스크리닝하는 것으로부터 확인되거나 선택된 TCR로부터 생성된다. TCR 라이브러리는 PBMC, 비장 또는 다른 림프성 기관에 존재하는 세포를 비롯한 대상체로부터 단리된 T 세포로부터 $V\alpha$ 및 $V\beta$ 의 레퍼토리의 증폭에 의해 생성될 수 있다. 일부 경우에, T 세포는 중앙-침윤 림프구 (TIL)로부터 증폭될 수 있다. 일부 실시양태에서, TCR 라이브러리는 CD4+ 또는 CD8+ 세포로부터 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, TCR은 정상 건강한 대상체의 T 세포 공급원, 예를 들어 정상 TCR 라이브러리로부터 증폭될 수 있다. 일부 실시양태에서, TCR은 이환 대상체의 T 세포 공급원, 예를 들어 이환 TCR 라이브러리로부터 증폭될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간으로부터 수득된 샘플, 예컨대 T 세포에서 예컨대 RT-PCR에 의해 $V\alpha$ 및 $V\beta$ 의 유전자 레퍼토리를 증폭시키는 데 축증성 프라이머가 사용된다. 일부 실시양태에서, scTv 라이브러리는 나이브 $V\alpha$ 및 $V\beta$ 라이브러리로부터 어셈블리될 수 있고, 여기서 증폭된 산물은 링커에 의해 분리되도록 클로닝 또는 어셈블리된다. 대상체 및 세포의 공급원에 따라, 라이브러리는 HLA 대립유전자-특이적일 수 있다. 대안적으로, 일부 실시양태에서, TCR 라이브러리는 모 또는 스캐폴드 TCR 분자의 돌연변이유발 또는 다양화에 의해 생성될 수 있다. 일부 측면에서, TCR은 예를 들어 α 또는 β 쇄의, 예컨대 돌연변이유발에 의한 방향적 진화에 적용된다. 일부 측면에서, TCR의 CDR 내의 특정한 잔기가 변경된다. 일부 실시양태에서, 선택된 TCR은 친화도 성숙에 의해 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원-특이적 T 세포는 예컨대 펩티드에 대한 CTL 활성을 평가하기 위한 스크리닝에 의해 선택될 수 있다. 일부 측면에서, 예를 들어 항원-특이적 T 세포 상에 존재하는 TCR은 예컨대 결합 활성, 예를 들어 항원에 대한 특정한 친화도 또는 결합력에 의해 선택될 수 있다.

[0588] 일부 실시양태에서, 유전자 조작된 항원 수용체는 재조합 T 세포 수용체 (TCR) 및/또는 자연 발생 T 세포로부터 클로닝된 TCR을 포함한다. 일부 실시양태에서, TCR은 자연 발생 T 세포로부터 클로닝된 것이다. 일부 실시양태에서, 표적 항원 (예를 들어, 암 항원)에 대한 고친화도 T 세포 클론이 확인되고, 환자로부터 단리되고, 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 표적 항원에 대한 TCR 클론은 인간 면역계 유전자 (예를 들어, 인간 백혈구 항원계, 또는 HLA)로 조작된 트랜스제닉 마우스에서 생성되었다. 예를 들어, 중앙 항원을 참조한다 (예를 들어, 문헌 [Parkhurst et al., (2009) Clin Cancer Res. 15:169-180 및 Cohen et al., (2005) J Immunol. 175:5799-5808] 참조). 일부 실시양태에서, 파지 디스플레이가 표적 항원에 대한 TCR을 단리하는 데 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Varela-Rohena et al., (2008) Nat Med. 14:1390-1395 및 Li (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354] 참조). 일부 실시양태에서, TCR 또는 그의 항원-결합 부분은 변형 또는 조작된 것이다. 일부 실시양태에서, 변경된 특성을 갖는, 예컨대 특이적 MHC-펩티드 복합체에 대해 보다 높은 친화도를 갖는 TCR을 생성하는 데 방향적 진화 방법이 사용된다. 일부 실시양태에서, 방향성 진화는 효모 디스플레이 (Holler et al., (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al., (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92), 파지 디스플레이 (Li et al., (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54), 또는 T 세포 디스플레이 (Chervin et al., (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 디스플레이 방법에 의해 달성된다. 일부 실시양태에서, 디스플레이 접근법은 공지된, 모 또는 참조 TCR을 조작하거나 변형시키는 것을 수반한다. 예를 들어, 일부 경우에, 야생형 TCR은 CDR의 1개 이상의 잔기가 돌연변이된 돌연변이유발된 TCR을 생산하기 위한 주형으로서 사용될 수 있고, 목적하는 변경된 특성, 예컨대 목적하는 표적 항원에 대한 보다 높은 친화도를 갖는 돌연변이체가 선택된다.

[0589] 일부 실시양태에서, 관심 TCR을 생산 또는 생성하는 데 사용하기 위한 표적 폴리펩티드의 펩티드는 공지되어 있거나 또는 통상의 기술자가 용이하게 확인할 수 있다. 일부 실시양태에서, TCR 또는 항원-결합 부분을 생성하는 데 사용하기에 적합한 펩티드는 관심 표적 폴리펩티드, 예컨대 하기 기재된 표적 폴리펩티드에서의 HLA-제한된 모티프의 존재에 기초하여 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 펩티드는 이용가능한 컴퓨터 예측 모델을 사용하여 확인된다. 일부 실시양태에서, MHC 부류 I 결합 부위를 예측하기 위한, 이러한 모델은 ProPred1 (Singh and Raghava (2001) Bioinformatics 17(12):1236-1237), 및 SYFPEITHI (문헌 [Schuler et al. (2007) Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, 409(1): 75-93 2007] 참조)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, MHC-제한된 에피토프는 모든 백인의 대략 39-46%에서 발현되는 HLA-A0201이고, 따라서 이는 TCR 또는 다른 MHC-펩티드 결합 분자를 제조하는 데 사용하기 위한 MHC 항원의 적합한 선택을 나타낸다.

[0590] 컴퓨터 예측 모델을 사용한 HLA-A0201-결합 모티프 및 프로테아솜 및 면역-프로테아솜에 대한 절단 부위는 공지되어 있다. MHC 부류 I 결합 부위를 예측하기 위한, 이러한 모델은 ProPred1 (문헌 [Singh and Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. BIOINFORMATICS 17(12):1236-1237 2001]에 보다 상세하게 기

재됨) 및 SYFPEITHI (문헌 [Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. In Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409(1): 75-93 2007] 참조)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0591] 일부 실시양태에서, TCR 또는 그의 항원 결합 부분은 재조합적으로 생산된 천연 단백질 또는 1개 이상의 특성, 예컨대 결합 특성이 변경된 그의 돌연변이된 형태일 수 있다. 일부 실시양태에서, TCR은 다양한 동물 종, 예컨대 인간, 마우스, 래트 또는 다른 포유동물 중 하나로부터 유래될 수 있다. TCR은 세포-결합되거나 또는 가용성 형태일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제공된 방법의 목적을 위해, TCR은 세포의 표면 상에 발현된 세포-결합된 형태이다.
- [0592] 일부 실시양태에서, TCR은 전장 TCR이다. 일부 실시양태에서, TCR은 항원-결합 부분이다. 일부 실시양태에서, TCR은 이량체 TCR (dTCR)이다. 일부 실시양태에서, TCR은 단일-쇄 TCR (sc-TCR)이다. 일부 실시양태에서, dTCR 또는 scTCR은 WO 03/020763, WO 04/033685, WO2011/044186에 기재된 바와 같은 구조를 갖는다.
- [0593] 일부 실시양태에서, TCR은 막횡단 서열에 상응하는 서열을 함유한다. 일부 실시양태에서, TCR은 세포질 서열에 상응하는 서열을 함유한다. 일부 실시양태에서, TCR은 CD3과 TCR 복합체를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, dTCR 또는 scTCR을 포함한 TCR 중 임의의 것은 T 세포의 표면 상에 활성 TCR을 생성하는 신호전달 도메인에 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, TCR은 세포의 표면 상에 발현된다.
- [0594] 일부 실시양태에서, dTCR은 TCR α 쇠 가변 영역 서열에 상응하는 서열이 TCR α 쇠 불변 영역 세포의 서열에 상응하는 서열의 N 말단에 융합된 제1 폴리펩티드, 및 TCR β 쇠 가변 영역 서열에 상응하는 서열이 TCR β 쇠 불변 영역 세포의 서열에 상응하는 서열의 N 말단에 융합된 제2 폴리펩티드를 함유하며, 제1 및 제2 폴리펩티드는 디설피드 결합에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 결합은 천연 이량체 $\alpha\beta$ TCR에 존재하는 천연 쇠간 디설피드 결합에 상응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 쇠간 디설피드 결합은 천연 TCR에 존재하지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 1개 이상의 시스테인이 dTCR 폴리펩티드 쌍의 불변 영역 세포의 서열 내로 혼입될 수 있다. 일부 경우에, 천연 및 비-천연 디설피드 결합 둘 다가 바람직할 수 있다. 일부 실시양태에서, TCR은 막에 앵커링되는 막횡단 서열을 함유한다.
- [0595] 일부 실시양태에서, dTCR은 가변 α 도메인, 불변 α 도메인, 및 불변 α 도메인의 C-말단에 부착된 제1 이량체화 모티프를 함유하는 TCR α 쇠, 및 가변 β 도메인, 불변 β 도메인, 및 불변 β 도메인의 C-말단에 부착된 제1 이량체화 모티프를 포함하는 TCR β 쇠를 함유하며, 여기서 제1 및 제2 이량체화 모티프는 용이하게 상호작용하여 TCR α 쇠와 TCR β 쇠를 함께 연결하는 제1 이량체화 모티프 내의 아미노산과 제2 이량체화 모티프 내의 아미노산 사이에 공유 결합을 형성한다.
- [0596] 일부 실시양태에서, TCR은 scTCR이다. 전형적으로, scTCR은 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있으며, 예를 들어 문헌 [Soo Hoo, W. F. et al., PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wuelfing, C. and Plueckthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al., PNAS (USA) 90 3830 (1993)]; 국제 공개 PCT 번호 WO 96/13593, WO 96/18105, WO99/60120, WO99/18129, WO 03/020763, WO2011/044186; 및 문헌 [Schlueter, C. J. et al., J. Mol. Biol. 256, 859 (1996)]을 참조한다. 일부 실시양태에서, scTCR은 TCR 쇠의 회합을 용이하게 하기 위해 도입된 비-천연 디설피드 쇠간 결합을 함유한다 (예를 들어, 국제 공개 PCT 번호 WO 03/020763 참조). 일부 실시양태에서, scTCR은 비-디설피드 연결된 말단절단된 TCR이며, 여기서 그의 C-말단에 융합된 이중 류신 지퍼는 쇠 회합을 용이하게 한다 (예를 들어, 국제 공개 PCT 번호 WO99/60120 참조). 일부 실시양태에서, scTCR은 펩티드 링커를 통해 TCR β 가변 도메인에 공유 연결된 TCR α 가변 도메인을 함유한다 (예를 들어, 국제 공개 PCT 번호 WO99/18129 참조).
- [0597] 일부 실시양태에서, scTCR은 TCR α 쇠 가변 영역에 상응하는 아미노산 서열에 의해 구성된 제1 절편, TCR β 쇠 불변 도메인 세포의 서열에 상응하는 아미노산 서열의 N 말단에 융합된 TCR β 쇠 가변 영역 서열에 상응하는 아미노산 서열에 의해 구성된 제2 절편, 및 제1 절편의 C 말단을 제2 절편의 N 말단에 연결하는 링커 서열을 함유한다.
- [0598] 일부 실시양태에서, scTCR은 α 쇠 세포의 불변 도메인 서열의 N 말단에 융합된 α 쇠 가변 영역 서열로 구성된 제1 절편, 및 서열 β 쇠 세포의 불변의 N 말단에 융합된 β 쇠 가변 영역 서열 및 막횡단 서열로 구성된 제2 절편, 및 임의로, 제1 절편의 C 말단을 제2 절편의 N 말단에 연결하는 링커 서열을 함유한다.
- [0599] 일부 실시양태에서, scTCR은 β 쇠 세포의 불변 도메인 서열의 N 말단에 융합된 TCR β 쇠 가변 영역 서열로 구성된 제1 절편, 및 서열 α 쇠 세포의 불변의 N 말단에 융합된 α 쇠 가변 영역 서열 및 막횡단 서열로 구성된

제2 절편, 및 임의로, 제1 절편의 C 말단을 제2 절편의 N 말단에 연결하는 링커 서열을 함유한다.

[0600] 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 TCR 절편을 연결하는 scTCR의 링커는 TCR 결합 특이성을 보유하면서 단일 폴리펩티드 가닥을 형성할 수 있는 임의의 링커일 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커 서열은 예를 들어 화학식 -P-AA-P-를 가질 수 있으며, 여기서 P는 프롤린이고, AA는 아미노산 서열을 나타내며, 여기서 아미노산은 글리신 및 세린이다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 절편은 그의 가변 영역 서열이 이러한 결합을 위해 배향되도록 쌍형성된다. 따라서, 일부 경우에, 링커는 제1 절편의 C 말단과 제2 절편의 N 말단 또는 그 반대 사이의 거리를 메우기에 충분한 길이를 갖지만, 표적 리간드에 대한 scTCR의 결합을 차단하거나 감소시키기에는 너무 길지 않다. 일부 실시양태에서, 링커는 정확히 또는 약 10 내지 45개의 아미노산, 예컨대 10 내지 30개의 아미노산 또는 26 내지 41개의 아미노산 잔기, 예를 들어 29, 30, 31 또는 32개의 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 화학식 -PGGG-(SGGG)₅-P-를 가지며, 여기서 P는 프롤린이고, G는 글리신이고, S는 세린이다 (서열식별번호: 22). 일부 실시양태에서, 링커는 서열 GSADDAKKDAAKKDGKS (서열식별번호: 23)를 갖는다.

[0601] 일부 실시양태에서, scTCR은 α 채의 불변 도메인의 이뮤노글로불린 영역의 잔기를 β 채의 불변 도메인의 이뮤노글로불린 영역의 잔기에 연결하는 공유 디설피드 결합을 함유한다. 일부 실시양태에서, 천연 TCR 내의 채간 디설피드 결합은 존재하지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 1개 이상의 시스테인이 scTCR 폴리펩티드의 제1 및 제2 절편의 불변 영역 세포의 서열 내로 혼입될 수 있다. 일부 경우에, 천연 및 비-천연 디설피드 결합 둘 다 바람직할 수 있다.

[0602] 도입된 채간 디설피드 결합을 함유하는 dTCR 또는 scTCR의 일부 실시양태에서, 천연 디설피드 결합은 존재하지 않는다. 일부 실시양태에서, 천연 채간 디설피드 결합을 형성하는 천연 시스테인 중 1개 이상은 또 다른 잔기, 예컨대 세린 또는 알라닌으로 치환된다. 일부 실시양태에서, 도입된 디설피드 결합은 제1 및 제2 절편 상의 비-시스테인 잔기를 시스테인으로 돌연변이시킴으로써 형성될 수 있다. TCR의 예시적인 비-천연 디설피드 결합은 공개된 국제 PCT 번호 W02006/000830에 기재되어 있다.

[0603] 일부 실시양태에서, TCR 또는 그의 항원-결합 단편은 표적 항원에 대해 정확히 또는 약 10⁻⁵ 내지 10⁻¹² M 및 그 안의 모든 개별 값 및 범위의 평형 결합 상수로의 친화도를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 표적 항원은 MHC-펩티드 복합체 또는 리간드이다.

[0604] 일부 실시양태에서, TCR, 예컨대 α 및 β 채를 코딩하는 핵산 또는 핵산들은 PCR, 클로닝 또는 다른 적합한 수단에 의해 증폭되고, 적합한 발현 벡터 또는 벡터들 내로 클로닝될 수 있다. 발현 벡터는 임의의 적합한 재조합 발현 벡터일 수 있고, 임의의 적합한 숙주를 형질전환 또는 형질감염시키는 데 사용될 수 있다. 적합한 벡터는 증식 및 확장을 위해 또는 발현을 위해 또는 둘 다를 위해 설계된 것, 예컨대 플라스미드 및 바이러스 벡터를 포함한다.

[0605] 일부 실시양태에서, 벡터는 pUC 시리즈 (페르멘타스 라이프 사이언시스(Fermentas Life Sciences)), p블루스크립트(pBluescript) 시리즈 (스트라타진(Stratagene), 캘리포니아주 라호야), pET 시리즈 (노바젠(Novagen), 위스콘신주 매디슨), pGEX 시리즈 (파마시아 바이오테크(Pharmacia Biotech), 스웨덴 옘살라), 또는 pEX 시리즈 (클론테크(Clontech), 캘리포니아주 팔로 알토)의 벡터일 수 있다. 일부 경우에, 박테리오파지 벡터, 예컨대 λG10, λGT11, λZapII (스트라타진), λEMBL4, 및 λNM1149가 또한 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 식물 발현 벡터가 사용될 수 있고, 이는 pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 및 pBIN19 (클론테크)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 동물 발현 벡터는 pEUK-C1, pMAM 및 pMAMneo (클론테크)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스 벡터가 사용된다.

[0606] 일부 실시양태에서, 재조합 발현 벡터는 표준 재조합 DNA 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 적절한 경우에 및 벡터가 DNA- 또는 RNA-기반인지를 고려하여 벡터가 도입될 숙주의 유형 (예를 들어, 박테리아, 진균, 식물 또는 동물)에 특이적인 조절 서열, 예컨대 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 TCR 또는 항원-결합 부분 (또는 다른 MHC-펩티드 결합 분자)을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 비천연 프로모터를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 비-바이러스 프로모터 또는 바이러스 프로모터, 예컨대 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, SV40 프로모터, RSV 프로모터, 및 뮤린 줄기 세포 바이러스의 긴-말단 반복부에서 발견되는 프로모터일 수 있다. 다른 공지된 프로모터가 또한 고려된다.

[0607] 일부 실시양태에서, T-세포 클론이 수득된 후에, TCR 알파 및 베타 채는 분리되고 유전자 발현 벡터 내로 클로닝된다. 일부 실시양태에서, TCR 알파 및 베타 유전자는 둘 다의 채가 공동발현되도록 피코르나바이러스 2A 리

보숨 스킵 펩티드를 통해 연결된다. 일부 실시양태에서, TCR을 코딩하는 핵산은 수용체를 발현하는 세포의 형질도입 또는 조작을 확인하기 위한 마커를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, TCR의 유전자 전달은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 통해, 또는 트랜스포손을 통해 달성된다 (예를 들어, 문헌 [Baum et al., (2006) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 13:1050-1063; Frecha et al., (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18:1748-1757; 및 Hackett et al., (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18:674-683] 참조).

[0608] 일부 실시양태에서, TCR을 코딩하는 벡터를 생성하기 위해, α 및 β 쇄는 관심 TCR을 발현하는 T 세포 클론으로부터 단리된 총 cDNA로부터 PCR 증폭되고, 발현 벡터 내로 클로닝된다. 일부 실시양태에서, α 및 β 쇄는 동일한 벡터 내로 클로닝된다. 일부 실시양태에서, α 및 β 쇄는 상이한 벡터 내로 클로닝된다. 일부 실시양태에서, 생성된 α 및 β 쇄는 레트로바이러스, 예를 들어 렌티바이러스 벡터 내로 혼입된다.

[0609] iii. 다른 조절 요소

[0610] 본원에 제공된 방법 및 조성물의 일부 실시양태에서, 재조합 수용체, 예컨대 항원 수용체, 예를 들어 CAR을 코딩하는 바이러스 벡터 게놈 내에 함유된 핵산 서열은 다른 유전자 요소, 예를 들어 프로모터 또는 인핸서를 포함한 전사 조절 서열과 기능적 관계로 작동가능하게 연결되어 특정한 방식으로 관심 서열의 발현을 조절한다. 특정 경우에, 이러한 전사 조절 서열은 활성과 관련하여 시간적으로 및/또는 공간적으로 조절되는 것이다. 성분의 발현을 조절하는 데 사용될 수 있는 발현 제어 요소는 공지되어 있고, 유도성 프로모터, 구성적 프로모터, 분비 신호, 인핸서 및 다른 조절 요소를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 게놈 내에 함유된 핵산 서열은 재조합 수용체 및/또는 조작된 세포, 예를 들어 조작된 수용체를 발현하는 세포의 발현, 기능 및/또는 활성이 조절될 수 있도록, 예를 들어 유도가능하고/거나, 억제가능하고/거나, 조절가능하고/거나 및/또는 사용자 제어되도록, 상이한 코딩된 성분, 예를 들어 상이한 수용체 성분 및/또는 신호전달 성분을 제어하는 다중 발현 제어 요소를 함유한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 벡터는 핵산 서열이 함께, 코딩된 성분, 예를 들어 재조합 수용체, 또는 조작된 세포의 발현, 활성 및/또는 기능을 조절할 수 있도록, 1개 이상의 발현 제어 요소 및/또는 1개 이상의 코딩된 성분을 함유하는 1개 이상의 핵산 서열을 함유할 수 있다.

[0611] 일부 실시양태에서, 재조합 수용체, 예컨대 항원 수용체, 예를 들어 CAR을 코딩하는 핵산 서열은 내부 프로모터/인핸서 조절 서열과 작동가능하게 연결된다. 사용되는 프로모터는 구성적이고/거나, 조직-특이적이고/거나, 유도성이고/거나, 도입된 DNA 절편의 높은 수준 발현을 지시하는 적절한 조건 하에 유용할 수 있다. 프로모터는 이중 또는 내인성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로모터 및/또는 인핸서는 합성적으로 생산된다. 일부 실시양태에서, 프로모터 및/또는 인핸서는 재조합 클로닝 및/또는 핵산 증폭 기술을 사용하여 생산된다.

[0612] 일부 경우에, 재조합 수용체를 코딩하는 핵산 서열은 신호 펩티드를 코딩하는 신호 서열을 함유한다. 일부 측면에서, 신호 서열은 천연 폴리펩티드로부터 유래된 신호 펩티드를 코딩할 수 있다. 다른 측면에서, 신호 서열은 이중 또는 비-천연 신호 펩티드, 예컨대 서열식별번호: 25에 제시되고, 서열식별번호: 24에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 GMCSFR 알파쇄의 예시적인 신호 펩티드를 코딩할 수 있다. 일부 경우에, 재조합 수용체, 예를 들어, 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산 서열은 신호 펩티드를 코딩하는 신호 서열을 함유한다. 신호 펩티드의 비제한적인 예시적인 예는, 예를 들어 서열식별번호: 25에 제시되고 서열식별번호: 24에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 코딩된 GMCSFR 알파쇄 신호 펩티드, 또는 서열식별번호: 26에 제시된 CD8 알파 신호 펩티드를 포함한다.

[0613] 일부 실시양태에서, 재조합 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드는 재조합 수용체의 발현을 제어하도록 작동가능하게 연결된 적어도 1개의 프로모터를 함유한다. 일부 예에서, 폴리뉴클레오타이드는 재조합 수용체의 발현을 제어하도록 작동가능하게 연결된 2, 3개 또는 그 초과 프로모터를 함유한다.

[0614] 핵산 분자가 2개 이상의 상이한 폴리펩티드쇄, 예를 들어 재조합 수용체 및 마커를 코딩하는 특정 경우에, 각각의 폴리펩티드쇄는 개별 핵산 분자에 의해 코딩될 수 있다. 예를 들어, 2개의 개별 핵산이 제공되고, 각각은 세포에서의 발현을 위해 세포 내로 개별적으로 전달 또는 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 재조합 수용체를 코딩하는 핵산 및 마커를 코딩하는 핵산은 동일한 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 내부 리보솜 진입부위 (IRES) 또는 자기-절단 펩티드 또는 리보솜 스킵핑을 유발하는 펩티드, 임의로 T2A, P2A, E2A 또는 F2A를 코딩하는 핵산에 의해 임의로 분리된다. 일부 실시양태에서, 마커를 코딩하는 핵산 및 재조합 수용체를 코딩하는 핵산은 2개의 상이한 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 마커를 코딩하는 핵산 및 재조합 수용체를 코딩하는 핵산은 세포의 게놈 내의 상이한 위치에 존재하거나 삽입된다. 일부 실시양태에서, 재

조합 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는, 예컨대 레트로바이러스 형질도입, 형질감염 또는 형질전환에 의해, 배양된 세포를 함유하는 조성물 내로 도입된다.

[0615] 일부 실시양태에서, 예컨대 폴리뉴클레오티드가 제1 및 제2 핵산 서열을 함유하는 실시양태에서, 각각의 상이한 폴리펩티드쇄를 코딩하는 코딩 서열은 동일하거나 상이할 수 있는 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산 분자는 2개 이상의 상이한 폴리펩티드쇄의 발현을 구동하는 프로모터를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 핵산 분자는 멀티시스트론 (비시스트론 또는 트리시스트론, 예를 들어 미국 특허 번호 6,060,273 참조)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 전사 단위는 IRES (내부 리보솜 진입 부위)를 함유하는 비시스트론 단위로서 조작될 수 있고, 이는 단일 프로모터로부터의 메세지에 의한 유전자 산물 (예를 들어, 마커를 코딩하고 재조합 수용체를 코딩함)의 공동발현을 가능하게 한다. 대안적으로, 일부 경우에, 단일 프로모터는 단일 오픈 리딩 프레임 (ORF) 내에서 자기-절단 펩티드 (예를 들어, 2A 서열) 또는 프로테아제 인식 부위 (예를 들어, 푸린)를 코딩하는 서열에 의해 서로 분리된 2 또는 3개의 유전자 (예를 들어, 마커를 코딩하는 것 및 재조합 수용체를 코딩하는 것)를 함유하는 RNA의 발현을 지시할 수 있다. 따라서, ORF는 단일 폴리펩티드를 코딩하고, 이는 (2A의 경우) 번역 동안 또는 번역 후에 개별 단백질로 프로세싱된다. 일부 경우에, 펩티드, 예컨대 T2A는 리보솜이 2A 요소의 C-말단에서의 펩티드 결합의 합성을 스킵하도록 하여 (리보솜 스킵핑), 2A 서열의 단부와 다음 펩티드 하류 사이의 분리를 유도할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [de Felipe, Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) 및 de Felipe et al., Traffic 5:616-626 (2004)] 참조). 다양한 2A 요소가 공지되어 있다. 본원에 개시된 방법 및 시스템에 사용될 수 있는 2A 서열의 예는, 비제한적으로, 미국 특허 공개 번호 20070116690에 기재된 바와 같은 구제역 바이러스 (F2A, 예를 들어, 서열식별번호: 21), 말 비염 A 바이러스 (E2A, 예를 들어, 서열식별번호: 20), 토세아 아시그나(Thosea asigna) 바이러스 (T2A, 예를 들어, 서열식별번호: 6 또는 17), 및 돼지 테스코바이러스-1 (P2A, 예를 들어, 서열식별번호: 18 또는 19)로부터의 2A 서열이다.

[0616] 본원에 기재된 재조합 수용체 중 임의의 것은 재조합 수용체를 코딩하는 1개 이상의 핵산 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드에 의해 임의의 조합 또는 배열로 코딩될 수 있다. 예를 들어, 1, 2, 3개 또는 그 초과 폴리뉴클레오티드는 1, 2, 3개 또는 그 초과 상이한 폴리펩티드, 예를 들어 재조합 수용체를 코딩할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나의 벡터 또는 구축물은 마커를 코딩하는 핵산 서열을 함유하고, 별개의 벡터 또는 구축물은 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 함유한다. 일부 실시양태에서, 마커를 코딩하는 핵산 및 재조합 수용체를 코딩하는 핵산은 2개의 상이한 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 재조합 수용체를 코딩하는 핵산은 마커를 코딩하는 핵산의 하류에 존재한다.

[0617] 일부 실시양태에서, 벡터 백본은 1개 이상의 마커(들)를 코딩하는 핵산 서열을 함유한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 마커(들)는 형질도입 마커, 대용물 마커 및/또는 선택 마커이다.

[0618] 일부 실시양태에서, 마커는 형질도입 마커 또는 대용물 마커이다. 형질도입 마커 또는 대용물 마커는 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 재조합 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 도입된 세포를 검출하는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 형질도입 마커는 세포의 변형을 나타내거나 확인시켜 줄 수 있다. 일부 실시양태에서, 대용물 마커는 세포 표면 상에서 재조합 수용체, 예를 들어 CAR과 공동-발현되도록 제조된 단백질이다. 특정 실시양태에서, 이러한 대용물 마커는 활성을 거의 또는 전혀 갖지 않도록 변형된 표면 단백질이다. 특정 실시양태에서, 대용물 마커는 재조합 수용체를 코딩하는 동일한 폴리뉴클레오티드 상에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, 재조합 수용체를 코딩하는 핵산 서열은 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 또는 자기-절단 펩티드 또는 리보솜 스킵핑을 유발하는 펩티드, 예컨대 2A 서열, 예컨대 T2A, P2A, E2A 또는 F2A를 코딩하는 핵산에 의해 임의로 분리되어, 마커를 코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다. 외인성 마커 유전자는 일부 경우에 세포의 검출 또는 선택을 허용하고, 일부 경우에 또한 세포 자살을 촉진하기 위해, 조작된 세포와 관련하여 이용될 수 있다.

[0619] 예시적인 대용물 마커는 말단절단된 세포 표면 폴리펩티드, 예컨대 말단절단된 인간 표피 성장 인자 수용체 2 (tHER2), 말단절단된 표피 성장 인자 수용체 (EGFRt, 서열식별번호: 7 또는 16에 제시된 예시적인 EGFRt 서열) 또는 전립선-특이적 막 항원 (PSMA) 또는 그의 변형된 형태를 포함할 수 있다. EGFRt는 항체 세특시맵 (에르비투스(Erbix)®) 또는 다른 치료 항-EGFR 항체 또는 결합 분자에 의해 인식되는 에피토프를 함유할 수 있고, 이는 EGFRt 구축물 및 재조합 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR)로 조작된 세포를 확인 또는 선택하는데, 및/또는 수용체를 발현하는 세포를 제거 또는 분리하는 데 사용될 수 있다. 미국 특허 번호 8,802,374 및 문헌 [Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434]을 참조한다. 일부 측면에서, 마커, 예를 들어, 대용물 마커는 CD34, NGFR, 또는 표피 성장 인자 수용체 (예를 들어, tEGFR)의 전부 또는 일부 (예를 들어,

어, 말단절단된 형태)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마커를 코딩하는 핵산은 링커 서열, 예컨대 절단가능한 링커 서열, 예를 들어 T2A를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 마커, 및 임의로 링커 서열은 PCT 공개 번호 WO2014031687에 개시된 바와 같은 임의의 것일 수 있다. 예를 들어, 마커는 임의로 링커 서열, 예컨대 T2A 절단가능한 링커 서열에 연결된 말단절단된 EGFR (tEGFR)일 수 있다. 말단절단된 EGFR (예를 들어, tEGFR)에 대한 예시적인 폴리펩티드는 서열식별번호: 7 또는 16에 제시된 아미노산 서열, 또는 서열식별번호: 7 또는 16에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0620] 일부 실시양태에서, 마커는 형광 단백질, 예컨대 녹색 형광 단백질 (GFP), 증강 녹색 형광 단백질 (EGFP), 예컨대 슈퍼폴드 GFP, 적색 형광 단백질 (RFP), 예컨대 tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed 또는 DsRed2, 시안 형광 단백질 (CFP), 청색 녹색 형광 단백질 (BFP), 증강 청색 형광 단백질 (EBFP), 및 황색 형광 단백질 (YFP), 및 그의 변이체 (형광 단백질의 중 변이체, 단량체 변이체, 및 코돈-최적화 및/또는 증진된 변이체 포함)이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 마커는 효소, 예컨대 루시페라제, 이. 콜라이(E. coli)로부터의 lacZ 유전자, 알칼리성 포스파타제, 분비된 배아 알칼리성 포스파타제 (SEAP), 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제 (CAT)이거나 또는 이를 포함한다. 예시적인 발광 리포터 유전자는 루시페라제 (luc), β -갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 (CAT), β -글루쿠로니다제 (GUS) 또는 그의 변이체를 포함한다.

[0621] 일부 실시양태에서, 마커는 선택 마커이다. 일부 실시양태에서, 선택 마커는 외인성 작용제 또는 약물에 대한 저항성을 부여하는 폴리펩티드이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 선택 마커는 항생제 저항성 유전자이다. 일부 실시양태에서, 선택 마커는 포유동물 세포에 항생제 저항성을 부여하는 항생제 저항성 유전자이다. 일부 실시양태에서, 선택 마커는 퓨로마이신 저항성 유전자, 히그로마이신 저항성 유전자, 블라스티시딘 저항성 유전자, 네오마이신 저항성 유전자, 제네티신 저항성 유전자 또는 제오신 저항성 유전자 또는 그의 변형된 형태이거나 또는 이를 포함한다.

[0622] 추가의 핵산, 예를 들어 도입을 위한 유전자 중에는, 예컨대 전달된 세포의 생존을 및/또는 기능을 촉진함으로써 요법의 효능을 개선시키는 것; 세포의 선택 및/또는 평가를 위한, 예컨대 생체내 생존 또는 국제화를 평가하기 위한 유전자 마커를 제공하는 유전자; 예를 들어 문헌 [Lupton S. D. et al., Mol. And Cell Biol., 11:6 (1991); 및 Riddell et al., Human Gene Therapy 3:319-338 (1992)]에 기재된 바와 같이 세포를 생체내 음성 선택에 감수성 있게 함으로써 안전성을 개선시키는 유전자가 있고; 또한 음성 양성 선택 마커를 음성 선택 마커와 융합시키는 것으로부터 유래된 이중기능적 선택 융합 유전자의 사용을 기재한 PCT/US91/08442 및 PCT/US94/05601 (Lupton et al.) 공개를 참조한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,040,177, 칼럼 14-17 (Riddell et al.)을 참조한다.

[0623] 일부 실시양태에서 프로모터 및/또는 인핸서는, 코딩 절편 및/또는 엑손의 상류에 위치한 5' 비-코딩 서열을 단리함으로써 수득될 수 있는 것과 같이, 핵산 서열과 자연적으로 회합된 것일 수 있다. 대안적으로, 일부 실시양태에서, 코딩 핵산 절편은 천연 환경에서는 코딩 핵산 서열과 정상적으로 회합되지 않는 제조합 및/또는 이중 프로모터 및/또는 인핸서의 제어 하에 위치할 수 있다. 예를 들어, 제조합 DNA 구축에 사용되는 예시적인 프로모터는 β -락타마제 (페니실리나제), 락토스, 트립토판 (trp), RNA 폴리머라제 (pol) III 프로모터, 예컨대 인간 및 뮤린 U6 pol III 프로모터뿐만 아니라 인간 및 뮤린 H1 RNA pol III 프로모터; RNA 폴리머라제 (pol) II 프로모터; 시토메갈로바이러스 극초기 프로모터 (pCMV), 신장 인자-1 알파 (EF-1 알파), 및 라우스 육종 바이러스 긴 말단 반복부 프로모터 (pRSV) 프로모터 시스템을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 프로모터는, 예를 들어 바이러스, 예컨대 폴리오마 바이러스, 계두 바이러스, 아데노바이러스, 소 유두종 바이러스, 조류 육종 바이러스, 시토메갈로바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 원숭이 바이러스 40 (SV40)의 계놈으로부터 수득될 수 있다. 프로모터는 또한, 예를 들어 이중 포유동물 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터 또는 이뮤노글로불린 프로모터, 열-쇼크 프로모터, 또는 천연 서열과 정상적으로 회합된 프로모터일 수 있으며, 단 이러한 프로모터는 표적 세포와 상용성이다. 한 실시양태에서, 프로모터는 바이러스 발현 시스템에서의 자연 발생 바이러스 프로모터이다.

[0624] 일부 실시양태에서, 프로모터는 구성적으로 활성일 수 있다. 사용될 수 있는 구성적 프로모터의 비제한적 예는 유비퀴틴 (미국 특허 번호 5,510,474; WO 98/32869), CMV (Thomsen et al., PNAS 81:659, 1984; 미국 특허 번호 5,168,062), 베타-액틴 (Gunning et al., 1989 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4831-4835) 및 pgk (예를 들어, 문헌 [Adra et al., 1987 Gene 60:65-74; Singer-Sam et al., 1984 Gene 32:409-417; 및 Dobson et al., 1982 Nucleic Acids Res. 10:2635-2637] 참조)에 대한 프로모터를 포함한다.

- [0625] 일부 실시양태에서, 프로모터는 조직 특이적 프로모터 및/또는 표적 세포-특이적 프로모터일 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 관심 서열의 유도성 발현을 가능하게 하도록 선택될 수 있다. 유도성 발현을 위한 다수의 시스템, 예컨대 테트라시클린 반응성 시스템, lac 오퍼레이터-리프레서 시스템, 뿐만 아니라 다양한 환경적 또는 생리학적 변화에 반응성인 프로모터, 예컨대 열 쇼크, 금속 이온에 대한, 예컨대 메탈로티오네인 프로모터, 인터페론, 저산소증, 스테로이드에 대한, 예컨대 프로게스테론 또는 글루코코르티코이드 수용체 프로모터, 방사선에 대한, 예컨대 VEGF 프로모터가 공지되어 있다. 일부 실시양태에서, 테트라시클린-(tet)-조절가능 시스템은 tet 오퍼레이터 서열 (TECO)에 대한 에스케리키아 콜라이의 tet 억압 (tetr)의 억제 작용을 기초로 하며, 이는 포유동물 시스템에 사용하기 위해 변형될 수 있고, 발현 카세트를 위한 조절가능한 요소로서 사용될 수 있다. 이들 시스템은 널리 공지되어 있다. (문헌 [Goshen and Badgered, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-51 (1992), Shockett et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:6522-26 (1996), Lindemann et al., Mol. Med. 3:466-76 (1997)] 참조).
- [0626] 관심 유전자의 목적하는 발현을 수득하기 위해 프로모터의 조합이 또한 사용될 수 있다. 통상의 기술자는 관심 유기체 또는 표적 세포에서의 유전자의 목적하는 발현 패턴에 기초하여 프로모터를 선택할 수 있을 것이다.
- [0627] 일부 실시양태에서, 관심 유전자의 발현을 증가시키기 위해 인헨서가 또한 바이러스 구축물에 존재할 수 있다. 인헨서는 전형적으로 프로모터에 작용하여 그의 전사를 증가시키는 시스-작용 핵산 요소로서, 통상적으로 약 10 내지 300개 길이이다. 바이러스 게놈, 예컨대 HIV 또는 CMV에서의 많은 인헨서가 공지되어 있다. 예를 들어, CMV 인헨서 (Boshart et al., Cell, 41:521, 1985)가 사용될 수 있다. 다른 예는, 예를 들어 복제 기점의 후기 측면 (bp 100-270) 상의 SV40 인헨서, 시토메갈로바이러스 초기 프로모터 인헨서, 복제 기점의 후기 측면 상의 폴리오마 인헨서, 및 아데노바이러스 인헨서를 포함한다. 일부 경우에, 인헨서는 포유동물 유전자로부터의 것, 예컨대 글로빈, 엘라스타제, 알부민, 알파-태아단백질 또는 인슐린으로부터의 인헨서이다. 인헨서는 이중 프로모터와 조합되어 사용될 수 있다. 인헨서는 관심 유전자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 대해 위치 5' 또는 3'에서 백터 내로 스플라이싱될 수 있지만, 일반적으로 프로모터로부터 부위 5'에 위치한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 목적하는 발현 패턴에 기초하여 적절한 인헨서를 선택할 수 있을 것이다.
- [0628] 바이러스 백터 게놈은 또한 추가의 유전 요소를 함유할 수 있다. 구축물에 포함될 수 있는 요소의 유형은 어떠한 방식으로든 제한되지 않고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 선택될 수 있다.
- [0629] 예를 들어, 표적 세포에서 바이러스 게놈의 핵 진입을 용이하게 하는 신호가 포함될 수 있다. 이러한 신호의 예는 HIV-1 flap 신호 (일부 경우에 flap 서열로 지칭됨)이다. 또한, 백터 게놈은 관심 유전자의 발현을 증진시키도록 설계된 1개 이상의 유전 요소를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 게놈은 전사후 활성을 나타내는 전사후 조절 요소 (PRE) 또는 그의 변형된 형태를 함유한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 우드척 간염 바이러스 전사후 반응성 요소 (WPRES)가 구축물에 배치될 수 있다 (Zufferey et al., 1999. J. Virol. 74:3668-3681; Deglon et al., 2000. Hum. Gene Ther. 11:179-190). 일부 실시양태에서, 백터 게놈은 flap 서열이 결여되고/거나 WPRES가 결여된다. 일부 실시양태에서, 백터 게놈은 돌연변이된 또는 결함있는 flap 서열 및/또는 WPRES를 함유한다.
- [0630] 일부 경우에, 개별 이중 단백질을 코딩하는 1개 초과인 오픈 리딩 프레임이 포함될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 리포터 및/또는 검출 및/또는 선택 유전자가 발현 구축물에 포함되는 경우에, 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 서열이 포함될 수 있다. 전형적으로, 추가의 유전 요소는 독립적인 프로모터/인헨서와 작동가능하게 연결되고 그에 의해 제어된다. 추가의 유전 요소는 리포터 유전자, 선택 마커 또는 다른 목적하는 유전자일 수 있다.
- [0631] 일부 실시양태에서, 다른 다양한 조절 요소는 전사 개시 영역 및/또는 종결 영역을 포함할 수 있다. 발현 백터는 또한 전사의 종결 및 mRNA의 안정화를 위한 서열을 함유할 수 있다. 이러한 서열은 공지되어 있고, 종종 진핵 또는 바이러스 DNA 또는 cDNA의 5' 및 때때로 3' 비번역 영역에서 자연적으로 발견된다. 전사 종결 영역의 예는 폴리아데닐화 신호 서열을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 폴리아데닐화 신호 서열의 예는 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리(A), SV40 후기 폴리(A), 토끼 베타-글로빈 (RBG) 폴리(A), 티미딘 키나제 (TK) 폴리(A) 서열, 및 그의 임의의 변이체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0632] 일부 실시양태에서, 조절 요소는 재조합 수용체, 예를 들어 CAR의 조절가능한 발현 및/또는 활성을 가능하게 하는 조절 요소 및/또는 시스템을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조절가능한 발현 및/또는 활성은 특정 조절 요소 및/또는 시스템을 함유하거나 또는 그에 의해 제어되도록 재조합 수용체를 구성함으로써 달성된다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 추가의 수용체가 발현 조절 시스템에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 발

현 조절 시스템은 재조합 수용체의 발현 및/또는 활성을 조절할 수 있는 특이적 리간드에 대한 노출 또는 결합을 필요로 하는 시스템을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 재조합 수용체, 예를 들어 CAR의 조절된 발현은 조절가능한 전사 인자 방출 시스템, 예를 들어 변형된 Notch 신호전달 시스템에 의해 달성된다 (예를 들어, 문헌 [Roybal et al., Cell (2016) 164:770-779; Morsut et al., Cell (2016) 164:780-791] 참조). 일부 실시양태에서, 재조합 수용체의 활성의 조절은 폴리펩티드, 예를 들어 재조합 수용체의 입체형태적 변화 및/또는 다량체화를 유도할 수 있는 추가의 작용제의 투여에 의해 달성된다. 일부 실시양태에서, 추가의 작용제는 화학적 유도제이다 (예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2016/0046700, 문헌 [Clackson et al., (1998) Proc Natl Acad Sci U S A. 95(18):10437-42; Spencer et al., (1993) Science 262(5136):1019-24; Farrar et al., (1996) Nature 383 (6596):178-81; Miyamoto et al., (2012) Nature Chemical Biology 8(5): 465-70; Erhart et al., (2013) Chemistry and Biology 20(4): 549-57] 참조).

[0633] B. 바이러스 벡터 입자의 제조

[0634] 바이러스 벡터 게놈은 전형적으로 패키징 또는 생산자 세포주 내로 형질감염될 수 있는 플라스미드 형태로 구축된다. 게놈이 바이러스 벡터 게놈의 RNA 카피를 함유하는 레트로바이러스 입자를 생산하기 위해 다양한 공지된 방법 중 임의의 것이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스-기반 유전자 전달 시스템을 제조하는 데 적어도 2종의 성분이 수반되며: 제1은 구조 단백질뿐만 아니라 바이러스 벡터 입자를 생성하는 데 필요한 효소를 포괄하는 패키징 플라스미드이고, 제2는 바이러스 벡터 자체, 예를 들어 전달될 유전 물질이다. 생물안전성 보호조치는 이들 성분 중 하나 또는 둘 다의 설계에 도입될 수 있다.

[0635] 일부 실시양태에서, 패키징 플라스미드는 외피 단백질 외의 모든 레트로바이러스, 예컨대 HIV-1 단백질을 함유할 수 있다 (Naldini et al., 1998). 다른 실시양태에서, 바이러스 벡터는 추가의 바이러스 유전자, 예컨대 병독성과 연관된 것, 예를 들어 vpr, vif, vpu 및 nef, 및/또는 HIV의 1차 전사활성인자인 Tat가 결합될 수 있다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 벡터, 예컨대 HIV-기반 렌티바이러스 벡터는 모 바이러스의 단지 3개의 유전자: gag, pol 및 rev만을 포함하며, 이는 재조합을 통한 야생형 바이러스의 재구성 가능성을 감소시키거나 제거한다.

[0636] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 게놈은 바이러스 벡터 게놈으로부터 전사된 바이러스 게놈 RNA를 바이러스 입자 내로 패키징하는 데 필요한 모든 성분을 함유하는 패키징 세포주 내로 도입된다. 대안적으로, 바이러스 벡터 게놈은 1개 이상의 관심 서열, 예를 들어 재조합 핵산에 더하여 바이러스 성분을 코딩하는 1개 이상의 유전자를 포함할 수 있다. 그러나, 일부 측면에서, 표적 세포에서 게놈의 복제를 방지하기 위해, 복제에 필요한 내인성 바이러스 유전자가 제거되고, 패키징 세포주에 개별적으로 제공된다.

[0637] 일부 실시양태에서, 패키징 세포주는 입자를 생성하는 데 필요한 성분을 함유하는 1개 이상의 플라스미드 벡터로 형질감염된다. 일부 실시양태에서, 패키징 세포주는 LTR, 시스-작용 패키징 서열 및 관심 서열, 예를 들어 항원 수용체, 예컨대 CAR을 코딩하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터 게놈을 함유하는 플라스미드; 및 바이러스 효소적 및/또는 구조적 성분, 예컨대 Gag, pol 및/또는 rev를 코딩하는 1개 이상의 헬퍼 플라스미드로 형질감염된다. 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터 입자를 생성하는 다양한 유전자 성분을 분리하기 위해 다중 벡터가 사용된다. 일부 이러한 실시양태에서, 패키징 세포에 개별 벡터를 제공하는 것은 그렇지 않을 경우 복제적격 바이러스를 생성할 수 있는 재조합 사건의 기회를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 모든 레트로바이러스 성분을 갖는 단일 플라스미드 벡터가 사용될 수 있다.

[0638] 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터 입자, 예컨대 렌티바이러스 벡터 입자는 숙주 세포의 형질도입 효율을 증가시키기 위해 유사형화된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터 입자, 예컨대 렌티바이러스 벡터 입자는 VSV-G 당단백질로 유사형화되고, 이는 형질도입될 수 있는 세포 유형을 확장하는 광범위한 세포 숙주 범위를 제공한다. 일부 실시양태에서, 패키징 세포주는 비-천연 외피 당단백질을 코딩하는 플라스미드 또는 폴리뉴클레오티드로 형질감염되며, 예컨대 이중향성, 다중향성 또는 양쪽향성 외피, 예컨대 신드비스 바이러스 외피, GALV 또는 VSV-G를 포함한다.

[0639] 일부 실시양태에서, 패키징 세포주는 바이러스 게놈 RNA의 렌티바이러스 벡터 입자 내로의 패키징을 위해 트랜스로 요구되는, 바이러스 조절 및 구조 단백질을 포함한 성분을 제공한다. 일부 실시양태에서, 패키징 세포주는 렌티바이러스 단백질을 발현하고 기능적 렌티바이러스 벡터 입자를 생산할 수 있는 임의의 세포주일 수 있다. 일부 측면에서, 적합한 패키징 세포주는 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLA (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) 및 Cf2Th (ATCC CRL 1430) 세포를 포함한다.

- [0640] 일부 실시양태에서, 패키징 세포주는 바이러스 단백질(들)을 안정하게 발현한다. 예를 들어, 일부 측면에서, gag, pol, rev 및/또는 다른 구조 유전자를 함유하지만 LTR 및 패키징 성분은 없는 패키징 세포주가 구축될 수 있다. 일부 실시양태에서, 패키징 세포주는 이중 단백질을 코딩하는 핵산 분자, 및/또는 외피 당단백질을 코딩하는 핵산을 함유하는 바이러스 벡터 계통과 함께 1개 이상의 바이러스 단백질을 코딩하는 핵산 분자로 일시적으로 형질감염될 수 있다.
- [0641] 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터 및 패키징 및/또는 헬퍼 플라스미드는 형질감염 또는 감염을 통해 패키징 세포주 내로 도입된다. 패키징 세포주는 바이러스 벡터 계통을 함유하는 바이러스 벡터 입자를 생산한다. 형질감염 또는 감염 방법은 널리 공지되어 있다. 비제한적 예는 인산칼슘, DEAE-텍스트란 및 리포펙션 방법, 전기천공 및 미세주사를 포함한다.
- [0642] 재조합 플라스미드 및 레트로바이러스 LTR 및 패키징 서열이 (예를 들어, 인산칼슘 침전에 의해 예를 들어) 특수 세포주 내로 도입될 때, 패키징 서열은 재조합 플라스미드의 RNA 전사체가 바이러스 입자 내로 패키징되도록 허용할 수 있고, 이는 이어서 배양 배지 내로 분비될 수 있다. 이어서, 일부 실시양태에서 재조합 레트로바이러스를 함유하는 배지를 수집하고, 임의로 농축시키고, 유전자 전달에 사용한다. 예를 들어, 일부 측면에서, 패키징 플라스미드 및 전달 벡터로 패키징 세포주를 공동형질감염시킨 후, 바이러스 벡터 입자는 배양 배지로부터 회수되고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 사용되는 표준 방법에 의해 적정된다.
- [0643] 일부 실시양태에서, 레트로바이러스 벡터, 예컨대 렌티바이러스 벡터는 렌티바이러스 입자의 생성을 가능하게 하는 플라스미드의 도입에 의해 패키징 세포주, 예컨대 예시적인 HEK 293T 세포주에서 생산될 수 있다. 일부 실시양태에서, 패키징 세포는 gag 및 pol을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 재조합 수용체, 예컨대 항원 수용체, 예를 들어 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 형질감염되고/거나 이를 함유한다. 일부 실시양태에서, 패키징 세포주는 rev 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 임의로 및/또는 추가적으로 형질감염되고/거나 이를 함유한다. 일부 실시양태에서, 패키징 세포주는 비-천연 외피 당단백질, 예컨대 VSV-G를 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 임의로 및/또는 추가적으로 형질감염되고/거나 이를 함유한다. 일부 이러한 실시양태에서, 세포, 예를 들어 HEK 293T 세포의 형질감염 대략 2일 후에, 세포 상청액은 재조합 렌티바이러스 벡터를 함유하며, 이는 회수 및 적정될 수 있다.
- [0644] 회수 및/또는 생산된 레트로바이러스 벡터 입자는 기재된 방법을 사용하여 표적 세포를 형질도입하는 데 사용될 수 있다. 표적 세포에서, 바이러스 RNA는 역전사되고, 핵 내로 유입되고, 숙주 계통 내로 안정하게 통합된다. 바이러스 RNA의 통합 1 또는 2일 후에, 재조합 단백질, 예를 들어 항원 수용체, 예컨대 CAR의 발현이 검출될 수 있다.
- [0645] V. 조성물, 제제, 및 투여 방법
- [0646] 또한, 조작된 수용체 (예를 들어, 조작된 항원 수용체), 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체 (TCR)를 발현하는 세포의 형질도입된 집단을 함유하는 조성물, 및 조작된 세포를 함유하는 조성물, 예컨대 제약 조성물 및 제제가 제공된다. 또한, 예컨대 항원이 발현되는 질환, 상태 및 장애의 치료, 또는 검출, 진단 및 예후 방법에서의 조성물의 사용 방법 및 용도가 제공된다.
- [0647] 또한, 생존 세포에 대해 풍부화된 세포의 집단을 함유하는 조성물이 제공되며, 이는 생존 세포에 대해 풍부화된 세포의 형질도입된 집단일 수 있다. 또한, 탈비드화된 세포의 집단을 함유하는 조성물이 본원에 제공되며, 이는 탈비드화된 세포의 형질도입된 집단일 수 있다. 일부 실시양태에서, 형질도입된 세포의 집단은 조작된 수용체 (예를 들어, 조작된 항원 수용체), 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 T 세포 수용체 (TCR)를 발현한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 제약 조성물 및 제제를 포함한다. 또한, 예컨대 항원이 발현되는 질환, 상태 및 장애의 치료, 또는 검출, 진단 및 예후 방법에서의 조성물의 사용 방법 및 용도가 제공된다.
- [0648] A. 조성물 및 제제
- [0649] 일부 실시양태에서, 재조합 항원 수용체, 예를 들어 CAR 또는 TCR로 조작된 세포를 포함하는 세포의 용량이 조성물 또는 제제, 예컨대 제약 조성물 또는 제제로서 제공된다. 이러한 조성물은 제공된 방법에 따라, 및/또는 제공된 제조 물질 또는 조성물로, 예컨대 질환, 상태 및 장애의 예방 또는 치료에서 또는 검출, 진단 및 예후 방법에서 사용될 수 있다.
- [0650] 용어 "제약 제제"는 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이라도 하는 형태로 존재하고, 제제가 투여될 대상체에게 허용되지 않는 독성인 추가의 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.

- [0651] "제약상 허용되는 담체"는 대상체에게 비독성인, 활성 성분 이외의 제약 제제 내의 성분을 지칭한다. 제약상 허용되는 담체는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0652] 일부 측면에서, 담체의 선택은 부분적으로 특정한 세포 또는 작용제에 의해 및/또는 투여 방법에 의해 결정된다. 따라서, 다양한 적합한 제제가 존재한다. 예를 들어, 제약 조성물은 보존제를 함유할 수 있다. 적합한 보존제는, 예를 들어 메틸파라벤, 프로필파라벤, 벤조산나트륨 및 벤즈알코늄 클로라이드를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 2종 이상의 보존제의 혼합물이 사용된다. 보존제 또는 그의 혼합물은 전형적으로 전체 조성물의 약 0.0001 중량% 내지 약 2 중량%의 양으로 존재한다. 담체는, 예를 들어 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재되어 있다. 제약상 허용되는 담체는 일반적으로 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 향산화제, 예를 들어 아스코르브산 및 메티오닌; 보존제 (예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 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 (약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 이뮤노글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 모노사카라이드, 디사카라이드 및 다른 탄수화물, 예컨대 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 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 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0653] 일부 측면에서 완충제가 조성물에 포함된다. 적합한 완충제는, 예를 들어 시트르산, 시트르산나트륨, 인산, 인산칼륨, 및 다양한 다른 산 및 염을 포함한다. 일부 측면에서, 2종 이상의 완충제의 혼합물이 사용된다. 완충제 또는 그의 혼합물은 전형적으로 전체 조성물의 약 0.001 중량% 내지 약 4 중량%의 양으로 존재한다. 투여가 능한 제약 조성물의 제조 방법은 공지되어 있다. 예시적인 방법은, 예를 들어 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)]에 보다 상세히 기재되어 있다.
- [0654] 제제 또는 조성물은 또한 세포 또는 작용제로 예방 또는 치료될 특정한 적응증, 질환 또는 상태에 유용한 1종 초과 활성 성분을 함유할 수 있으며, 여기서 각각의 활성은 서로 유해한 영향을 미치지 않는다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 유효한 양으로 조합되어 적합하게 존재한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 다른 제약 활성제 또는 약물, 예컨대 화학요법제, 예를 들어 아스파라기나제, 부술판, 카르보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 겐시타빈, 히드록시우레아, 메토트렉세이트, 파클리탁셀, 리톡시마, 빈블라스틴, 빈크리스틴 등을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 작용제 또는 세포는 염, 예를 들어 제약상 허용되는 염의 형태로 투여된다. 적합한 제약상 허용되는 산 부가염은 무기 산, 예컨대 염산, 브로민화 수소산, 인산, 메타인산, 질산 및 황산, 및 유기 산, 예컨대 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 말산, 락트산, 푸마르산, 벤조산, 글리콜산, 글루콘산, 숙신산 및 아릴술폰산, 예를 들어 p-톨루엔술폰산으로부터 유도된 것을 포함한다.
- [0655] 제약 조성물은, 일부 실시양태에서, 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 데 효과적인 양, 예컨대 치료 유효량 또는 예방 유효량으로 작용제 또는 세포를 함유한다. 일부 실시양태에서 치료 또는 예방 효능은 치료받은 대상체의 주기적 평가에 의해 모니터링된다. 수일 이상에 걸쳐 반복 투여하는 경우에, 상태에 따라, 치료는 질환 증상의 목적하는 억제가 발생할 때까지 반복된다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있고 결정될 수 있다. 목적하는 투여량은 조성물의 단일 볼루스 투여에 의해, 조성물의 다중 볼루스 투여에 의해, 또는 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.
- [0656] 작용제 또는 세포는 임의의 적합한 수단에 의해, 예를 들어 볼루스 주입에 의해, 주사, 예를 들어 정맥내 또는 피하 주사, 안내 주사, 안구주위 주사, 망막하 주사, 유리체내 주사, 경-중격 주사, 공막하 주사, 맥락막내 주사, 전방내 주사, 결막하 주사, 태눈하 주사, 안구후 주사, 안구주위 주사 또는 후공막근접 전달에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이는 비경구, 폐내 및 비강내로 투여되고, 원하는 경우에 국부 치료를 위해 병변내 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, 주어진 용량은 세포 또는 작용제의 단일 볼루스 투여에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 이는 예를 들어 3일 이하의 기간에 걸친 세포 또는 작용제의 다중 볼루스 투여에 의해, 또는 세포 또는 작용제의 연속 주입 투여에 의해 투여된다.

- [0657] 질환의 예방 또는 치료를 위해, 적절한 투여량은 치료될 질환의 유형, 작용제 또는 작용제들의 유형, 세포 또는 재조합 수용체의 유형, 질환의 중증도 및 경과, 작용제 또는 세포가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 대상체의 임상 병력 및 작용제 또는 세포에 대한 반응, 및 담당 의사의 판단에 좌우될 수 있다. 조성물은 일부 실시양태에서 대상체에게 1회 또는 일련의 치료에 걸쳐 적합하게 투여된다.
- [0658] 세포 또는 작용제는 표준 투여 기술, 제제 및/또는 디바이스를 사용하여 투여될 수 있다. 조성물의 저장 및 투여를 위한 제제 및 디바이스, 예컨대 시린지 및 바이알이 제공된다. 세포와 관련하여, 투여는 자가 또는 이종일 수 있다. 예를 들어, 면역반응성 세포 또는 전구세포는 1명의 대상체로부터 수득되고, 동일한 대상체 또는 상이한 상용성 대상체에게 투여될 수 있다. 말초 혈액 유래 면역반응성 세포 또는 그의 자손 (예를 들어, 생체내, 생체의 또는 시험관내 유래)은 카테터 투여, 전신 주사, 국부 주사, 정맥내 주사 또는 비경구 투여를 포함한 국부 주사를 통해 투여될 수 있다. 치료 조성물 (예를 들어, 유전자 변형된 면역반응성 세포 또는 신경독성의 증상을 치료하거나 호전시키는 작용제를 함유하는 제약 조성물)을 투여하는 경우에, 이는 일반적으로 단위 투여량의 주사가 가능한 형태 (용액, 현탁액, 에멀전)로 제제화될 것이다.
- [0659] 제제는 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강내, 협측, 설하 또는 좌제 투여를 위한 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 작용제 또는 세포 집단은 비경구로 투여된다. 본원에 사용된 용어 "비경구"는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질 및 복강내 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, 작용제 또는 세포 집단은 정맥내, 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달을 사용하여 대상체에게 투여된다.
- [0660] 일부 실시양태에서 조성물은 멸균 액체 제제, 예를 들어 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액 또는 점성 조성물로서 제공되며, 이는 일부 측면에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 제제는 통상적으로 겔, 다른 점성 조성물 및 고체 조성물보다 제조하기가 더 용이하다. 추가적으로, 액체 조성물은 특히 주사에 의해 투여하기가 다소 더 편리하다. 다른 한편으로는, 특정 조직과의 보다 긴 접촉 기간을 제공하도록 점성 조성물을 적절한 점도 범위 내에서 제제화할 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은, 예를 들어 물, 염수, 포스페이트 완충 염수, 폴리에틸렌 글리콜 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 그의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있는 담체를 포함할 수 있다.
- [0661] 멸균 주사가 가능한 용액은 작용제 또는 세포를 용매 중에, 예컨대 적합한 담체, 희석제 또는 부형제, 예컨대 멸균수, 생리 염수, 글루코스, 텍스트로스 등과 혼합하여 혼입시킴으로써 제조될 수 있다.
- [0662] 생체내 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 멸균된다. 멸균은, 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.
- [0663] B. 투여량 및 투여
- [0664] 세포 또는 조성물은 질환 또는 상태를 치료하기 위해 생체내에서 치료 유효량의 재조합 수용체 (예를 들어, CAR)-발현 세포를 생성하는 용량으로 투여된다. 질환의 예방 또는 치료를 위해, 적절한 투여량은 치료될 질환의 유형, 세포 또는 재조합 수용체의 유형, 세포 확장을 부스팅, 증대 또는 증진시키는 것과 같은 다른 약물 또는 작용제의 조합 투여, 질환의 중증도 및 경과, 세포가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 선행 요법, 대상체의 임상 병력 및 세포에 대한 반응, 및 담당 의사의 판단에 좌우될 수 있다. 조성물 및 세포는 일부 실시양태에서 대상체에게 1회 또는 일련의 치료에 걸쳐 적합하게 투여된다.
- [0665] 투여와 관련하여 작용제, 예를 들어 제약 제제, 세포 또는 조성물의 "유효량"은 목적하는 결과, 예컨대 치료 또는 예방 결과를 달성하는 데 필요한 투여량/양에서 및 그러한 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다.
- [0666] 작용제, 예를 들어 제약 제제 또는 세포의 "치료 유효량"은 목적하는 치료 결과, 예컨대 질환, 상태 또는 장애의 치료, 및/또는 치료의 약동학적 또는 약역학적 효과를 달성하는 데 필요한 투여량에서 및 그러한 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 치료 유효량은 대상체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중, 및 투여되는 세포 집단, 및 조합되어, 예컨대 공동으로 투여되는 다른 약물 또는 작용제와 같은 인자에 따라 달라질 수 있다.
- [0667] "예방 유효량"은 목적하는 예방 결과를 달성하는 데 필요한 투여량에서 및 그러한 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 반드시 는 아니지만 전형적으로, 예방 용량은 질환 전에 또는 초기 병기에 대상체에서 사용되기 때문에, 예방 유효량은 치료 유효량 미만일 것이다.
- [0668] 일부 실시양태에서, 세포 또는 조성물은 질환 또는 상태를 치료 또는 예방하는 데 효과적인 양, 예컨대 치료 유효량 또는 예방 유효량으로 투여된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 투여 방법은 세포 및 조성물을 유효량으로 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서 치료 또는 예방 효능은 치료받은 대상체의 주기적 평가에 의해 모

니터링된다. 수일 이상에 걸쳐 반복 투여하는 경우에, 상태에 따라, 치료는 질환 증상의 목적하는 억제 발생 할 때까지 반복된다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있고 결정될 수 있다.

[0669] 일부 실시양태에서, 치료 유효량의 세포가 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 예컨대 세포가 세포의 생체내 확장을 위한 조건 하에 투여되는 특정 경우에, 준최적 용량의 세포가 대상체에게 투여된다.

[0670] 특정 실시양태에서, 세포, 또는 세포의 하위유형의 개별 집단은 대상체에게 약 0.1백만개 내지 약 1000억개의 세포의 범위 및/또는 대상체의 체중 킬로그램당 세포의 양, 예컨대 예를 들어 0.1백만개 내지 약 500억개의 세포 (예를 들어, 0.5백만개 미만의 세포, 1백만개 미만의 세포, 약 0.1백만개 세포, 약 0.2백만개 세포, 약 0.3백만개 세포, 약 0.4백만개 세포, 약 0.5백만개 세포, 약 1백만개 세포, 약 5백만개 세포, 약 25백만개 세포, 약 500백만개 세포, 약 10억개 세포, 약 50억개 세포, 약 200억개 세포, 약 300억개 세포, 약 400억개 세포, 또는 상기 값 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위), 1백만개 내지 약 500억개 세포 (예를 들어, 약 5백만개 세포, 약 25백만개 세포, 약 500백만개 세포, 약 10억개 세포, 약 50억개 세포, 약 200억개 세포, 약 300억개 세포, 약 400억개 세포, 또는 상기 값 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위), 예컨대 약 10백만개 내지 약 1000억개 세포 (예를 들어, 약 20백만개 세포, 약 30백만개 세포, 약 40백만개 세포, 약 60백만개 세포, 약 70백만개 세포, 약 80백만개 세포, 약 90백만개 세포, 약 100억개 세포, 약 250억개 세포, 약 500억개 세포, 약 750억개 세포, 약 900억개 세포, 또는 상기 값 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위), 및 일부 경우에 약 100백만개 세포 내지 약 500억개 세포 (예를 들어, 약 120백만개 세포, 약 250백만개 세포, 약 350백만개 세포, 약 450백만개 세포, 약 650백만개 세포, 약 800백만개 세포, 약 900백만개 세포, 약 30억개 세포, 약 300억개 세포, 약 450억개 세포) 또는 이들 범위 사이 및/또는 대상체의 체중 킬로그램당 임의의 값으로 투여된다. 투여량은 질환 또는 장애 및/또는 환자 및/또는 다른 치료에 대해 특정한 속성에 따라 달라질 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 값은 재조합 수용체-발현 세포의 수를 지칭하고; 다른 실시양태에서, 이는 투여된 T 세포 또는 PBMC 또는 전체 세포의 수를 지칭한다.

[0671] 일부 실시양태에서, 세포 요법은 적어도 또는 적어도 약 또는 정확히 또는 정확히 약 0.1×10^6 개 세포/kg 대상체의 체중, 0.2×10^6 개 세포/kg, 0.3×10^6 개 세포/kg, 0.4×10^6 개 세포/kg, 0.5×10^6 개 세포/kg, 1×10^6 개 세포/kg, 2.0×10^6 개 세포/kg, 3×10^6 개 세포/kg 또는 5×10^6 개 세포/kg인 다수의 세포를 포함하는 용량을 투여하는 것을 포함한다.

[0672] 일부 실시양태에서, 세포 요법은 정확히 또는 약 0.1×10^6 개 세포/kg 대상체의 체중 내지 1.0×10^7 개 세포/kg, 정확히 또는 약 0.5×10^6 개 세포/kg 내지 5×10^6 개 세포/kg, 정확히 또는 약 0.5×10^6 개 세포/kg 내지 3×10^6 개 세포/kg, 정확히 또는 약 0.5×10^6 개 세포/kg 내지 2×10^6 개 세포/kg, 정확히 또는 약 0.5×10^6 개 세포/kg 내지 1×10^6 개 세포/kg, 정확히 또는 약 1.0×10^6 개 세포/kg 대상체의 체중 내지 5×10^6 개 세포/kg, 정확히 또는 약 1.0×10^6 개 세포/kg 내지 3×10^6 개 세포/kg, 정확히 또는 약 1.0×10^6 개 세포/kg 내지 2×10^6 개 세포/kg, 정확히 또는 약 2.0×10^6 개 세포/kg 대상체의 체중 내지 5×10^6 개 세포/kg, 정확히 또는 약 2.0×10^6 개 세포/kg 내지 3×10^6 개 세포/kg, 또는 정확히 또는 약 3.0×10^6 개 세포/kg 대상체의 체중 내지 5×10^6 개 세포/kg (각각 경계값 포함)인 다수의 세포를 포함하는 용량을 투여하는 것을 포함한다.

[0673] 일부 실시양태에서, 세포의 용량은 정확히 또는 약 2×10^5 개 세포/kg 내지 정확히 또는 약 2×10^6 개 세포/kg, 예컨대 정확히 또는 약 4×10^5 개 세포/kg 내지 정확히 또는 약 1×10^6 개 세포/kg 또는 정확히 또는 약 6×10^5 개 세포/kg 내지 정확히 또는 약 8×10^5 개 세포/kg을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포의 용량은 대상체의 체중 킬로그램당 2×10^5 개 이하의 세포 (예를 들어, 항원-발현, 예컨대 CAR-발현 세포) (세포/kg), 예컨대 정확히 또는 약 3×10^5 개 이하의 세포/kg, 정확히 또는 약 4×10^5 개 이하의 세포/kg, 정확히 또는 약 5×10^5 개 이하의 세포/kg, 정확히 또는 약 6×10^5 개 이하의 세포/kg, 정확히 또는 약 7×10^5 개 이하의 세포/kg, 정확히 또는 약 8×10^5 개 이하의 세포/kg, 정확히 또는 약 9×10^5 개 이하의 세포/kg, 정확히 또는 약 1×10^6 개 이하의 세포/kg, 또는 정확히 또는 약 2×10^6 개 이하의 세포/kg을 포함한다.

- [0674] 일부 실시양태에서, 세포의 용량은 대상체의 체중 킬로그램당 적어도 또는 적어도 약 또는 정확히 또는 약 2×10^5 개의 세포 (예를 들어, 항원-발현, 예컨대 CAR-발현 세포) (세포/kg), 예컨대 적어도 또는 적어도 약 또는 정확히 또는 약 3×10^5 개의 세포/kg, 적어도 또는 적어도 약 또는 정확히 또는 약 4×10^5 개의 세포/kg, 적어도 또는 적어도 약 또는 정확히 또는 약 5×10^5 개의 세포/kg, 적어도 또는 적어도 약 또는 정확히 또는 약 6×10^5 개의 세포/kg, 적어도 또는 적어도 약 또는 정확히 또는 약 7×10^5 개의 세포/kg, 적어도 또는 적어도 약 또는 정확히 또는 약 8×10^5 개의 세포/kg, 적어도 또는 적어도 약 또는 정확히 또는 약 9×10^5 개의 세포/kg, 적어도 또는 적어도 약 또는 정확히 또는 약 1×10^6 개의 세포/kg, 또는 적어도 또는 적어도 약 또는 정확히 또는 약 2×10^6 개의 세포/kg을 포함한다.
- [0675] 일부 실시양태에서, 세포의 용량은 세포의 용량이 대상체의 체표면적 또는 체중에 얹매이지 않거나 또는 그에 기초하지 않도록 하는, 세포의 균일 용량 또는 세포의 고정 용량이다.
- [0676] 특정 실시양태에서, 세포, 또는 세포의 하위유형의 개별 집단은 대상체에게 약 1백만 내지 약 1000억개 세포의 범위 및/또는 체중 킬로그램당 세포의 양, 예컨대, 예를 들어, 1백만 내지 약 500억개 세포 (예를 들어, 약 5백만개 세포, 약 25백만개 세포, 약 500백만개 세포, 약 10억개 세포, 약 50억개 세포, 약 200억개 세포, 약 300억개 세포, 약 400억개 세포, 또는 상기 값 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위), 예컨대 약 10백만개 내지 약 1000억개 세포 (예를 들어, 약 20백만개 세포, 약 30백만개 세포, 약 40백만개 세포, 약 60백만개 세포, 약 70백만개 세포, 약 80백만개 세포, 약 90백만개 세포, 약 100억개 세포, 약 250억개 세포, 약 500억개 세포, 약 750억개 세포, 약 900억개 세포, 또는 상기 값 중 임의의 2개에 의해 규정된 범위), 및 일부 경우에 약 100백만개 세포 내지 약 500억개 세포 (예를 들어, 약 120백만개 세포, 약 250백만개 세포, 약 350백만개 세포, 약 450백만개 세포, 약 650백만개 세포, 약 800백만개 세포, 약 900백만개 세포, 약 30억개 세포, 약 300억개 세포, 약 450억개 세포) 또는 이들 범위 사이 및/또는 체중 킬로그램당 임의의 값으로 투여된다. 투여량은 질환 또는 장애 및/또는 환자 및/또는 다른 치료에 대해 특정한 속성에 따라 달라질 수 있다.
- [0677] 일부 실시양태에서, 예를 들어 대상체가 인간인 경우에, 용량은 약 5×10^8 개 미만의 총 제조합 수용체 (예를 들어, CAR)-발현 세포, T 세포, 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 예를 들어 약 1×10^6 내지 5×10^8 개의 이러한 세포의 범위, 예컨대 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 또는 5×10^8 개의 총 이러한 세포, 또는 상기 값 중 임의의 2개 사이의 범위를 포함한다.
- [0678] 일부 실시양태에서, 세포 요법은 정확히 또는 약 1×10^5 내지 5×10^8 개의 총 제조합 수용체-발현 세포, 총 T 세포, 또는 총 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 정확히 또는 약 5×10^5 내지 1×10^7 개의 총 제조합 수용체-발현 세포, 총 T 세포, 또는 총 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 또는 정확히 또는 약 1×10^6 내지 1×10^7 개의 총 제조합 수용체-발현 세포, 총 T 세포, 또는 총 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) (각각 경계값 포함)의 다수의 세포를 포함하는 용량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 요법은 적어도 또는 적어도 약 1×10^5 개의 총 제조합 수용체-발현 세포, 총 T 세포, 또는 총 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 예컨대 적어도 또는 적어도 1×10^6 , 적어도 또는 적어도 약 1×10^7 , 적어도 또는 적어도 약 1×10^8 개의 이러한 세포의 다수의 세포를 포함하는 세포의 용량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 수는 CD3+ 또는 CD8+, 일부 경우에 또한 제조합 수용체-발현 (예를 들어, CAR+) 세포의 총수에 대한 것이다. 일부 실시양태에서, 세포 요법은 정확히 또는 약 1×10^5 내지 5×10^8 개의 CD3+ 또는 CD8+ 총 T 세포 또는 CD3+ 또는 CD8+ 제조합 수용체-발현 세포, 정확히 또는 약 5×10^5 내지 1×10^7 개의 CD3+ 또는 CD8+ 총 T 세포 또는 CD3+ 또는 CD8+ 제조합 수용체-발현 세포, 또는 정확히 또는 약 1×10^6 내지 1×10^7 개의 CD3+ 또는 CD8+ 총 T 세포 또는 CD3+ 또는 CD8+ 제조합 수용체-발현 세포 (각각 경계값 포함)의 다수의 세포를 포함하는 용량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 요법은 정확히 또는 약 1×10^5 내지 5×10^8 개의 총 CD3+/CAR+ 또는 CD8+/CAR+ 세포, 정확히 또는 약 5×10^5 내지 1×10^7 개의 총 CD3+/CAR+ 또는 CD8+/CAR+ 세포, 또는 정확히 또는 약 1×10^6 내지 1×10^7 개의 총 CD3+/CAR+ 또는 CD8+/CAR+ 세포 (각각 경계값 포함)의 다수의 세포를 포함하는 용량을 투여하는 것을 포함한다.

- [0679] 일부 실시양태에서, 용량 중 T 세포는 CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포 또는 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 포함한다.
- [0680] 일부 실시양태에서, 예를 들어 대상체가 인간인 경우에, 용량 중, 예컨대 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 포함하는 용량에서의 CD8⁺ T 세포는 약 1×10^6 내지 5×10^8 개의 총 재조합 수용체 (예를 들어, CAR)-발현 CD8⁺ 세포, 예를 들어, 약 5×10^6 내지 1×10^8 개의 이러한 세포, 이러한 세포 1×10^7 , 2.5×10^7 , 5×10^7 , 7.5×10^7 , 1×10^8 , 또는 5×10^8 개의 총 이러한 세포의 범위, 또는 상기 값 중 임의의 2개 사이의 범위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 환자는 다중 용량을 투여받고, 각각의 용량 또는 총 용량은 상기 값 중 임의의 것 내일 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포의 용량은 정확히 또는 약 1×10^7 내지 0.75×10^8 개의 총 재조합 수용체-발현 CD8⁺ T 세포, 1×10^7 내지 2.5×10^7 개의 총 재조합 수용체-발현 CD8⁺ T 세포, 정확히 또는 약 1×10^7 내지 0.75×10^8 개의 총 재조합 수용체-발현 CD8⁺ T 세포 (각각 경계값 포함)의 투여를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포의 용량은 정확히 또는 약 1×10^7 , 2.5×10^7 , 5×10^7 , 7.5×10^7 , 1×10^8 , 또는 5×10^8 개의 총 재조합 수용체-발현 CD8⁺ T 세포의 투여를 포함한다.
- [0681] 일부 실시양태에서, 세포, 예를 들어 재조합 수용체-발현 T 세포의 용량은 대상체에게 단일 용량으로서 투여되거나, 또는 2주, 1개월, 3개월, 6개월, 1년 또는 그 초과 기간 내에 단지 1회 투여된다.
- [0682] 입양 세포 요법과 관련하여, 주어진 "용량"의 세포의 투여는 주어진 양 또는 수의 세포를 단일 조성물로서 및/또는 단일 비중단 투여로서, 예를 들어 단일 주사로서 또는 연속 주입으로서 투여하는 것을 포괄하고, 또한 주어진 양 또는 수의 세포를 분할 용량으로서 또는 다중 개별 조성물 또는 주입으로 제공되는 복수의 조성물로서 명시된 기간에 걸쳐, 예컨대 3일 이하에 걸쳐 투여하는 것을 포괄한다. 따라서, 일부 문맥에서, 용량은 단일 시점에 주어지거나 개시된, 명시된 수의 세포의 단일 또는 연속 투여이다. 그러나, 일부 문맥에서, 용량은 3일 이하의 기간에 걸쳐 다중 주사 또는 주입으로, 예컨대 3일 동안 또는 2일 동안 1일 1회 또는 1일 기간에 걸쳐 다중 주입에 의해 투여된다.
- [0683] 따라서, 일부 측면에서, 용량의 세포는 단일 제약 조성물로 투여된다. 일부 실시양태에서, 용량의 세포는 용량의 세포를 집합적으로 함유하는 복수의 조성물로 투여된다.
- [0684] 용어 "분할 용량"은 1일 초과에 걸쳐 투여되도록 분할된 용량을 지칭한다. 이러한 유형의 투여는 본 방법에 포괄되며, 단일 용량인 것으로 간주된다. 일부 실시양태에서, 분할 용량의 세포는 용량의 세포를 집합적으로 포함하는 복수의 조성물로 3일 이하의 기간에 걸쳐 투여된다.
- [0685] 따라서, 세포의 용량은 분할 용량, 예를 들어 시간 경과에 따라 투여되는 분할 용량으로서 투여될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 용량은 2일에 걸쳐 또는 3일에 걸쳐 대상체에게 투여될 수 있다. 분할 투여를 위한 예시적인 방법은 제1일에 용량의 25%를 투여하고, 제2일에 용량의 나머지 75%를 투여하는 것을 포함한다. 다른 실시양태에서, 용량의 33%가 제1일에 투여될 수 있고, 나머지 67%가 제2일에 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 용량의 10%가 제1일에 투여되고, 용량의 30%가 제2일에 투여되고, 용량의 60%가 제3일에 투여된다. 일부 실시양태에서, 분할 용량은 3일 초과에 걸쳐 확산되지 않는다.
- [0686] 일부 실시양태에서, 용량의 세포는 각각 용량의 일부 세포를 함유하는 복수의 조성물 또는 용액, 예컨대 제1 및 제2, 임의로 그 초과 조성물의 투여에 의해 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 각각 상이한 세포 집단 및/또는 하위유형을 함유하는 복수의 조성물은 개별적으로 또는 독립적으로, 임의로 특정 기간 내에 투여된다. 예를 들어, 세포 집단 또는 하위유형은 각각 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포, 및/또는 각각 CD8⁺ 및 CD4⁺-풍부화된 집단, 예를 들어 재조합 수용체를 발현하도록 유전자 조작된 세포를 각각 개별적으로 포함하는 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ T 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 용량의 투여는 CD8⁺ T 세포의 용량 또는 CD4⁺ T 세포의 용량을 포함하는 제1 조성물의 투여 및 CD4⁺ T 세포의 용량 및 CD8⁺ T 세포 중 다른 것을 포함하는 제2 조성물의 투여를 포함한다.
- [0687] 일부 실시양태에서, 조성물 또는 용량의 투여, 예를 들어 복수의 세포 조성물의 투여는 세포 조성물을 개별적으로 투여하는 것을 수반한다. 일부 측면에서, 개별 투여는 동시에, 또는 임의의 순서로 순차적으로 수행된다. 일부 실시양태에서, 용량은 제1 조성물 및 제2 조성물을 포함하고, 제1 조성물 및 제2 조성물은 0 내지 12시간 간격, 0 내지 6시간 간격 또는 0 내지 2시간 간격으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 제1 조성물의 투여 개시 및 제2 조성물의 투여 개시는 2시간 이하, 1시간 이하, 또는 30분 이하 간격, 15분 이하, 10분 이하 또는 5분

이하 간격으로 수행된다. 일부 실시양태에서, 제1 조성물의 투여의 개시 및/또는 완료 및 제2 조성물의 투여의 완료 및/또는 개시는 2시간 이하, 1시간 이하, 또는 30분 이하, 15분 이하, 10분 이하 또는 5분 이하 간격으로 수행된다.

[0688] 일부 조성물에서, 제1 조성물, 예를 들어 용량의 제1 조성물은 CD4⁺ T 세포를 포함한다. 일부 조성물에서, 제1 조성물, 예를 들어 용량의 제1 조성물은 CD8⁺ T 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 조성물은 제2 조성물 전에 투여된다.

[0689] 일부 실시양태에서, 세포의 용량 또는 조성은 재조합 수용체를 발현하는 CD4⁺ 세포 대 재조합 수용체를 발현하는 CD8⁺ 세포 및/또는 CD4⁺ 세포 대 CD8⁺ 세포의 규정된 또는 표적 비를 포함하며, 상기 비는 임의로 대략 1:1 이거나 또는 대략 1:3 내지 대략 3:1, 예컨대 대략 1:1이다. 일부 측면에서, 상이한 세포 집단의 표적 또는 목적하는 비 (예컨대 CD4⁺:CD8⁺ 비 또는 CAR+CD4⁺:CAR+CD8⁺ 비, 예를 들어, 1:1)에 의한 조성물 또는 용량의 투여는 집단 중 하나를 함유하는 세포 조성물의 투여, 및 이어서 집단 중 다른 것을 포함하는 별개의 세포 조성물의 투여를 수반하며, 여기서 투여는 정확한 또는 대략적인 표적 또는 목적하는 비이다. 일부 측면에서, 규정된 비의 세포의 용량 또는 조성물의 투여는 T 세포 요법의 개선된 확장, 지속성 및/또는 항종양 활성을 유도한다.

[0690] 일부 실시양태에서, 대상체는 세포의 다중 용량, 예를 들어 2회 이상의 용량 또는 다중 연속 용량을 제공받는다. 일부 실시양태에서, 2회 용량이 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 연속 용량을 제공받고, 예를 들어 제2 용량은 제1 용량의 대략 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21일 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, 다중 연속 용량은 제1 용량 후에 투여되어, 추가의 용량 또는 용량들이 연속 용량의 투여 후에 투여된다. 일부 측면에서, 추가의 용량으로 대상체에게 투여되는 세포의 수는 제1 용량 및/또는 연속 용량과 동일하거나 유사하다. 일부 실시양태에서, 추가의 용량 또는 용량들은 이전 용량보다 더 크다.

[0691] 일부 측면에서, 제1 및/또는 연속 용량의 크기는 1종 이상의 기준, 예컨대 선행 치료, 예를 들어 화학요법에 대한 대상체의 반응, 대상체에서의 질환 부담, 예컨대 종양 로드, 벌크, 크기, 또는 전이의 정도, 범위, 또는 유형, 병기, 및/또는 대상체에서 독성 결과, 예를 들어 CRS, 대식세포 활성화 증후군, 종양 용해 증후군, 신경독성, 및/또는 투여되는 세포 및/또는 재조합 수용체에 대한 숙주 면역 반응이 발생할 가능성 또는 발생률에 기초하여 결정된다.

[0692] 일부 측면에서, 제1 용량의 투여와 연속 용량의 투여 사이의 시간은 약 9 내지 약 35일, 약 14 내지 약 28일, 또는 15 내지 27일이다. 일부 실시양태에서, 연속 용량의 투여는 제1 용량의 투여 후 약 14일 초과 및 약 28일 미만의 시점에 이루어진다. 일부 측면에서, 제1 및 연속 용량 사이의 시간은 약 21일이다. 일부 실시양태에서, 추가의 용량 또는 용량들, 예를 들어 연속 용량은 연속 용량의 투여 후에 투여된다. 일부 측면에서, 추가의 연속 용량 또는 용량들은 이전 용량의 투여의 적어도 약 14일 및 약 28일 미만 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, 추가의 용량은 이전 용량의 약 14일 미만 후에, 예를 들어 이전 용량의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13일 후에 투여된다. 일부 실시양태에서, 어떠한 용량도 이전 용량의 약 14일 미만 후에는 투여되지 않고/거나 어떠한 용량도 이전 용량의 약 28일 초과 후에는 투여되지 않는다.

[0693] 일부 실시양태에서, 세포, 예를 들어 재조합 수용체-발현 세포의 용량은 T 세포의 제1 용량 및 T 세포의 연속 용량을 포함하는 2회 용량 (예를 들어, 이중 용량)을 포함하며, 여기서 제1 용량 및 제2 용량 중 하나 또는 둘 다는 T 세포의 분할 용량의 투여를 포함한다.

[0694] 일부 실시양태에서, 세포의 용량은 일반적으로 질환 부담을 감소시키는 데 효과적이라도 충분히 크다.

[0695] 일부 실시양태에서, 세포는 일부 측면에서 목적하는 용량 또는 수의 세포 또는 세포 유형(들) 및/또는 목적하는 비의 세포 유형을 포함하는 목적하는 투여량으로 투여된다. 따라서, 일부 실시양태에서 세포의 투여량은 세포의 총수 (또는 kg 체중당 수) 및 개별 집단 또는 하위유형의 목적하는 비, 예컨대 CD4⁺ 대 CD8⁺ 비를 기초로 한다. 일부 실시양태에서, 세포의 투여량은 개별 집단 또는 개별 세포 유형에서의 세포의 목적하는 총수 (또는 체중 kg당 수)에 기초한다. 일부 실시양태에서, 투여량은 이러한 특색, 예컨대 개별 집단에서의 총 세포의 목적하는 수, 목적하는 비, 및 세포의 목적하는 총수의 조합에 기초한다.

[0696] 일부 실시양태에서, 세포의 집단 또는 하위유형, 예컨대 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포는 총 세포의 목적하는 용량, 예컨대 T 세포의 목적하는 용량의 허용 차이로 또는 그 내에서 투여된다. 일부 측면에서, 목적하는 용량은 세포의 목적하는 수 또는 세포가 투여되는 대상체의 체중 단위당 세포의 목적하는 수, 예를 들어 세포/kg이다. 일부 측면에서, 목적하는 용량은 정확히 세포의 최소 수 또는 체중 단위당 세포의 최소 수, 또는 그 초과이다. 일부

측면에서, 목적하는 용량으로 투여되는 총 세포 중에서, 개별 집단 또는 하위유형은 목적하는 산출 비 (예컨대 $CD4^+$ 대 $CD8^+$ 비)에서 또는 그 근처에서, 예를 들어 이러한 비의 특정 허용 차이 또는 오차 내에서 존재한다.

[0697] 일부 실시양태에서, 세포는 세포의 개별 집단 또는 하위유형 중 1종 이상의 목적하는 용량, 예컨대 $CD4^+$ 세포의 목적하는 용량 및/또는 $CD8^+$ 세포의 목적하는 용량의 허용되는 차이에서 또는 그 내에서 투여된다. 일부 측면에서, 목적하는 용량은 하위유형 또는 집단의 세포의 목적하는 수, 또는 세포가 투여되는 대상체의 단위 체중당 이러한 세포의 목적하는 수, 예를 들어 세포/kg이다. 일부 측면에서, 목적하는 용량은 정확히 집단 또는 하위유형의 세포의 최소 수 또는 체중 단위당 집단 또는 하위유형의 세포의 최소 수, 또는 그 초과이다.

[0698] 따라서, 일부 실시양태에서, 투여량은 총 세포의 목적하는 고정 용량 및 목적하는 비에 기초하고/거나, 1종 이상, 예를 들어 개별 하위유형 또는 하위집단 각각의 목적하는 고정 용량에 기초한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 투여량은 T 세포의 목적하는 고정 또는 최소 용량 및 $CD4^+$ 대 $CD8^+$ 세포의 목적하는 비에 기초하고/거나, $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ 세포의 목적하는 고정 또는 최소 용량에 기초한다.

[0699] 일부 실시양태에서, 세포는 다중 세포 집단 또는 하위유형, 예컨대 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 세포 또는 하위유형의 목적하는 산출 비의 허용되는 범위에서 또는 그 내에서 투여된다. 일부 측면에서, 목적하는 비는 특정 비율 수 있거나 또는 비의 범위일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 목적하는 비 (예를 들어, $CD4^+$ 대 $CD8^+$ 세포의 비)는 정확히 또는 약 5:1 내지 정확히 또는 약 5:1 (또는 약 1:5 초과 및 약 5:1 미만), 또는 정확히 또는 약 1:3 내지 정확히 또는 약 3:1 (또는 약 1:3 초과 및 약 3:1 미만), 예컨대 정확히 또는 약 2:1 내지 정확히 또는 약 1:5 (또는 약 1:5 초과 및 약 2:1 미만, 예컨대 정확히 또는 약 5:1, 4.5:1, 4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9: 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4, 1:4.5, 또는 1:5이다. 일부 측면에서, 허용되는 차이는 목적하는 비의 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4%, 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50% 내 (이들 범위 사이의 임의의 값을 포함함)이다.

[0700] 특정한 실시양태에서, 세포의 수 및/또는 농도는 제조합 수용체 (예를 들어, CAR)-발현 세포의 수를 지칭한다. 다른 실시양태에서, 세포의 수 및/또는 농도는 투여된 모든 세포, T 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 수 또는 농도를 지칭한다.

[0701] 일부 측면에서, 용량의 크기는 1종 이상의 기준, 예컨대 선행 치료, 예를 들어 화학요법에 대한 대상체의 반응, 대상체에서의 질환 부담, 예컨대 종양 로드, 벌크, 크기, 또는 전이의 정도, 범위, 또는 유형, 병기, 및/또는 대상체에서 독성 결과, 예를 들어 CRS, 대식세포 활성화 증후군, 종양 용해 증후군, 신경독성, 및/또는 투여되는 세포 및/또는 제조합 수용체에 대한 숙주 면역 반응이 발생할 가능성 또는 발생률에 기초하여 결정된다.

[0702] 일부 실시양태에서, 방법은 또한 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 세포의 1회 이상의 추가의 용량 및/또는 림프구교갈 요법을 투여하는 것을 포함하고/거나, 방법의 하나 이상의 단계가 반복된다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 추가의 용량은 초기 용량과 동일하다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 추가의 용량은 초기 용량과 상이하며, 예를 들어 초기 용량보다 더 높거나, 예컨대 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배 또는 10-배 또는 그 초과로 더 높거나, 또는 초기 용량보다 더 낮거나, 예컨대 예를 들어 더 높거나, 예컨대 2-배, 3-배, 4-배, 5-배, 6-배, 7-배, 8-배, 9-배 또는 10-배 또는 그 초과로 더 낮다. 일부 실시양태에서, 1회 이상의 추가의 용량의 투여는 초기 치료 또는 임의의 선행 치료에 대한 대상체의 반응, 대상체에서의 질환 부담, 예컨대 종양 로드, 벌크, 크기, 또는 전이의 정도, 범위, 또는 유형, 병기, 및/또는 대상체에서 독성 결과, 예를 들어 CRS, 대식세포 활성화 증후군, 종양 용해 증후군, 신경독성, 및/또는 투여되는 세포 및/또는 제조합 수용체에 대한 숙주 면역 반응이 발생할 가능성 또는 발생률에 기초하여 결정된다.

[0703] 일부 실시양태에서, 비교적 더 낮은 용량의 세포, 예컨대 준최적 용량의 세포 또는 치료 유효량보다 더 낮은 세포의 용량이 투여될 수 있으며, 이는 (예를 들어, 내인성 항원 또는 외인성 작용제에 의한) 생체내 자극 시 대상체에 존재하는 조작된 세포의 수의 부스팅, 예컨대 증가 또는 확장으로 이어질 수 있다. 이러한 실시양태 중 임의의 것에서, 세포의 확장 및/또는 활성화는 생체내 항원에의 노출, 예를 들어 세포의 투여 후 대상체의 신체에서의 조작된 세포의 확장에 의해 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 생체내 확장의 범위, 정도 또는 규모는 투여된 세포, 예를 들어 제조합 수용체 발현 세포의 예를 들어 증가, 확장, 증식, 생존 및/또는 효능을 조정할 수 있는 다양한 방법에 의해 추가로 증대, 부스팅 또는 증진될 수 있다.

[0704] 세포가 대상체 (예를 들어, 인간)에게 투여되면, 일부 측면에서 세포 집단의 생물학적 활성은 다수의 공지된 방

법 중 임의의 것에 의해 측정된다. 평가할 파라미터는 생체내, 예를 들어 영상화에 의한, 또는 생체외, 예를 들어 ELISA 또는 유동 세포측정법에 의한, 항원에 대한 세포의 특이적 결합을 포함한다. 특정 실시양태에서, 표적 세포를 파괴하는 세포의 능력은 관련 기술분야에 공지된 임의의 적합한 방법, 예컨대 예를 들어 문헌 [Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), 및 Herman et al., J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)]에 기재된 세포독성 검정을 사용하여 측정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포의 생물학적 활성은 또한 특정 시토카인, 예컨대 CD107a, IFN γ , IL-2 및 TNF의 발현 및/또는 분비를 검정함으로써 측정될 수 있다. 일부 측면에서, 생물학적 활성은 임상 결과, 예컨대 종양 부담 또는 로드의 감소를 평가함으로써 측정된다. 일부 측면에서, 독성 결과, 세포의 지속성 및/또는 확장, 및/또는 숙주 면역 반응의 존재 또는 부재가 평가된다.

[0705] VI. 제조 물품 및 키트

[0706] 일부 실시양태에서, 제공된 방법을 수행하는 데 유용한 시스템, 장치 및 키트가 또한 제공된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자 및/또는 세포, 및 임의로 사용에 대한 지침서를 함유하는 제조 물품, 예컨대 키트 또는 디바이스가 제공된다. 일부 실시양태에서, 키트는 예컨대 입양 세포 요법을 위해 유전자 조작된 세포를 제조하는 것에 따라 세포를 형질도입하는 방법에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 예컨대 형질도입된 세포에서 생존 세포를 풍부화하는 방법에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 키트는 세포를 탈비드화하는 데 사용될 수 있다.

[0707] 일부 실시양태에서, 제조 물품은 1개 이상의 용기, 전형적으로 복수의 용기, 포장 재료, 및 일반적으로 세포의 형질도입, 예컨대 대상체로부터의 세포의 형질도입에 대한 지침서를 포함한, 용기 또는 용기들 및/또는 포장 상의 또는 그와 회합된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함한다. 대안적으로, 지침서는 생존 세포의 풍부화 또는 세포의 탈비드화에 대한 것일 수 있다.

[0708] 본원에 제공된 제조 물품은 포장 재료를 함유한다. 제공된 물질의 포장에 사용하기 위한 포장 재료는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,323,907, 5,052,558 및 5,033,252를 참조하고, 이들 각각은 그 전문이 본원에 포함된다. 포장 재료의 예는 블리스터 팩, 병, 튜브, 흡입기, 펌프, 백, 바이알, 용기, 시린지 또는 병을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 제조 물품은 물질의 분배를 용이하게 하기 위해 바늘 또는 다른 주사 디바이스를 포함할 수 있다. 전형적으로, 포장은 그 안에 함유된 조성물과 비-반응성이다.

[0709] 일부 실시양태에서, 바이러스 입자 및 세포는 개별적으로 포장된다. 일부 실시양태에서, 각각의 용기는 단일 구획을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자를 함유하는 용기는 사용자에 의해, 예를 들어 구획의 개구부를 통해 세포를 첨가하는 것 또는 그 반대의 경우가 가능한 것이다. 바이러스 입자 및/또는 세포의 봉쇄를 위한 규정 공간을 갖는 것이 가능하고, 세포와 회합된 바이러스 입자를 함유하는 투입 조성물을 생산하기 위해 혼합물에 필요한 최종 성분의 첨가를 허용하는 간단한 조작이 가능한 임의의 용기 또는 다른 제조 물품이 고려된다. 일부 실시양태에서, 세포는 세포 조성물 및 바이러스 입자를 원심분리기에 로딩하기 전에 바이러스 입자에 첨가된다.

[0710] 일부 실시양태에서, 이러한 물질은, 예를 들어 성분이 용기 내에서 혼합 또는 조합될 수 있도록 동일한 용기 내에 개별적으로 포장된다. 일부 측면에서, 이러한 용기의 예는 바이러스 입자를 함유하는 봉입된 한정된 공간, 및 2개의 공간이 용이하게 제거가능한 막에 의해 분리되어, 그의 제거 시 성분이 혼합되는 것을 허용하도록 세포를 함유하는 별개의 봉입된 한정된 공간을 갖는 것을 포함한다. 성분이 분리되어 유지될 수 있는 임의의 용기 또는 다른 제조 물품이 고려된다. 일부 실시양태에서, 제조 물품은 분리 부재, 예컨대 막에 의해 분리된 인접 구획에 각각의 성분을 함유할 수 있으며, 이는 제조 물품의 압축 시 파열되어 분리된 성분이 혼합되는 것을 허용한다. 적합한 실시양태에 대해서는, 예를 들어 미국 특허 번호 3,539,794 및 5,171,081에 기재된 용기를 참조한다.

[0711] VII. 정의

[0712] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어, 표기법, 및 다른 기술 과학 용어 또는 용어는 청구된 대상이 속하는 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 의도된다. 일부 경우에, 통상적으로 이해되는 의미를 갖는 용어는 명확성을 위해 및/또는 용이한 참조를 위해 본원에 정의되며, 본원에서의 이러한 정의의 포함은 반드시 관련 기술분야에서 일반적으로 이해되는 것에 비해 실질적인 차이를 나타내는 것으로 해석되어서는 안된다.

- [0713] 본원에 사용된 단수 형태는 문맥이 달리 명백하게 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 예를 들어, 단수형은 "적어도 하나" 또는 "하나 이상"을 의미한다. 본원에 기재된 측면 및 변형은 측면 및 변형으로 "이루어진" 및/또는 "본질적으로 이루어진" 것을 포함하는 것으로 이해된다.
- [0714] 본 개시내용 전반에 걸쳐, 청구된 대상의 다양한 측면은 범위 포맷으로 제시된다. 범위 포맷의 기재는 단지 편의 및 간결성을 위한 것이며, 청구된 대상의 범주에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안된다는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 범위의 기재는 구체적으로 개시된 모든 가능한 하위-범위뿐만 아니라 그러한 범위 내의 개별 수치 값을 갖는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 값의 범위가 제공되는 경우에, 그러한 범위의 상한치와 하한치 사이의 각각의 개재 값 및 그러한 언급된 범위 내의 임의의 다른 언급된 값 또는 개재 값이 청구된 대상 내에 포괄되는 것으로 이해된다. 이들 보다 작은 범위의 상한치 및 하한치는 독립적으로 보다 작은 범위에 포함될 수 있고, 또한 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 배제된 한계치를 조건으로 청구된 대상 내에 포괄된다. 언급된 범위가 한계치 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우에, 그러한 포함된 한계치 중 어느 하나 또는 둘 다를 배제하는 범위가 또한 청구된 대상에 포함된다. 이는 범위의 폭과 상관없이 적용된다.
- [0715] 본원에 사용된 용어 "약"은 이러한 기술 분야의 통상의 기술자가 용이하게 아는 각각의 값에 대한 통상의 오차 범위를 지칭한다. 본원에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 그러한 값 또는 파라미터 자체에 관한 실시양태를 포함 (및 기재)한다. 예를 들어, "약 X"를 언급하는 기재는 "X"의 기재를 포함한다.
- [0716] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 그에 연결된 또 다른 핵산을 증식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자기-복제 핵산 구조로서의 벡터뿐만 아니라 그것이 도입된 숙주 세포의 게놈 내로 혼입된 벡터를 포함한다. 특정 벡터는 작동가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다. 벡터중에는 바이러스 벡터 입자, 예컨대 레트로바이러스, 예를 들어 감마레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터가 있다.
- [0717] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양물"은 상호교환가능하게 사용되고, 외인성 핵산이 도입된 세포를, 이러한 세포의 자손을 포함하여 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하며, 이는 1차 형질전환된 세포 및 계대 횟수와 관계없이 그로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 모 세포와 핵산 함량이 완전히 동일하지 않을 수 있지만, 돌연변이를 함유할 수 있다. 원래 형질전환된 세포에 대해 스크리닝 또는 선택된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이체 자손이 본원에 포함된다.
- [0718] 본원에 사용된 바와 같이, 조성물은 세포를 포함한, 2종 이상의 생성물, 물질 또는 화합물의 임의의 혼합물을 지칭한다. 이는 용액, 현탁액, 액체, 분말, 페이스트, 수성, 비-수성, 또는 그의 임의의 조합일 수 있다.
- [0719] 본원에 사용된, 1종 이상의 특정한 세포 유형 또는 세포 집단을 지칭하는 경우의 "풍부화"는, 예컨대 집단 또는 세포에 의해 발현되는 마커에 기초한 양성 선택에 의해, 또는 고갈될 세포 집단 또는 세포 상에 존재하지 않는 마커에 기초한 음성 선택에 의해, 예를 들어 조성물 내의 세포의 총수 또는 조성물의 부피와 비교하여 또는 다른 세포 유형에 비해 세포 유형 또는 집단의 수 또는 백분율을 증가시키는 것을 지칭한다. 상기 용어는 조성물로부터의 다른 세포, 세포 유형 또는 집단의 완전한 제거를 필요로 하지 않으며, 그렇게 풍부화된 세포가 풍부화된 조성물 중에 100%로 또는 심지어 거의 100%로 존재하는 것을 필요로 하지 않는다.
- [0720] 본원에 사용된 바와 같이, 세포 또는 세포의 집단이 특정한 마커에 대해 "양성"이라는 언급은 특정한 마커, 전형적으로 표면 마커의 세포 상의 또는 그 내의 검출가능한 존재를 지칭한다. 표면 마커를 지칭하는 경우에, 상기 용어는 유동 세포측정법에 의해, 예를 들어 마커에 특이적으로 결합하는 항체로 염색하고 상기 항체를 검출하는 것에 의해 검출되는 바와 같은 표면 발현의 존재를 지칭하며, 여기서 염색은 이소형-매칭 대조군을 사용하여 그 외에는 동일한 조건 하에 동일한 절차를 수행하여 검출된 염색을 실질적으로 초과하는 수준에서 및/또는 마커에 대해 양성인 것으로 공지된 세포에 대한 것과 실질적으로 유사한 수준에서 및/또는 마커에 대해 음성인 것으로 공지된 세포에 대한 것보다 실질적으로 더 높은 수준에서 유동 세포측정법에 의해 검출가능하다.
- [0721] 본원에 사용된 바와 같이, 세포 또는 세포의 집단이 특정한 마커에 대해 "음성"이라는 언급은 특정한 마커, 전형적으로 표면 마커의 세포 상의 또는 그 내의 실질적 검출가능한 존재의 부재를 지칭한다. 표면 마커를 지칭하는 경우에, 상기 용어는 유동 세포측정법에 의해, 예를 들어 마커에 특이적으로 결합하는 항체로 염색하고 상기 항체를 검출하는 것에 의해 검출되는 바와 같은 표면 발현의 부재를 지칭하며, 여기서 염색은 이소형-매칭 대조군을 사용하여 그 외에는 동일한 조건 하에 동일한 절차를 수행하여 검출된 염색을 실질적으로 초과하는 수준에서 및/또는 마커에 대해 양성인 것으로 공지된 세포에 대한 것보다 실질적으로 더 낮은 수준에서 및/또는 마커에 대해 음성인 것으로 공지된 세포에 대한 것과 비교하여 실질적으로 유사한 수준에서 유동 세포측정법에

의해 검출되지 않는다.

- [0722] 본원에 사용된 용어 "발현"은 폴리펩티드가 핵산 분자, 예컨대 유전자의 코딩 서열에 기초하여 생산되는 프로세스를 지칭한다. 프로세스는 전사, 전사후 제어, 전사후 변형, 번역, 번역후 제어, 번역후 변형, 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다.
- [0723] 본원에 사용된 "역" 또는 "대향류" 원심분리는 원심 가속 하에 유체 (예를 들어, 지지 배지) 내의 입자의 침강 속도가 지지 배지의 유동에 의해 상쇄되는 기술을 지칭한다.
- [0724] 본원에 사용된 "연속" 유동 원심분리는, "데드 엔드(dead end)" 또는 "배치" 원심분리와 대조적으로, 로터를 빈번하게 정지시키고 개시하거나, 또는 원심분리 튜브를 빈번하게 충전하고 경사분리하는 것을 필요로 하지 않으면서, 큰 부피 또는 물질이 예컨대 높은 원심력에서 원심분리될 수 있는 기술을 지칭한다. 연속 유동 시스템은 연속 유동 기준으로 기능할 수 있다. 데드-엔드 원심분리의 예는 스윙-버킷 로터 원심분리이다.
- [0725] 본원에 사용된 대조군은 시험 파라미터로 처리되지 않은 것을 제외하고는 시험 샘플과 실질적으로 동일한 샘플을 지칭하거나, 또는 혈장 샘플인 경우, 이는 관심 상태가 이환되지 않은 정상 지원자로부터의 것일 수 있다. 대조군은 또한 내부 대조군일 수 있다.
- [0726] VIII. 예시적 실시양태
- [0727] 본원에 제공된 실시양태 중에는 하기가 존재한다:
- [0728] 1. 유전자 조작된 T 세포의 조성물을 생산하는 방법으로서,
- [0729] (a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계;
- [0730] (b) 바이러스 벡터 입자를 원추형 유체 인클로저 내로 로딩하여, 그에 의해 세포 조성물 및 바이러스 벡터 입자를 포함하는 투입 조성물을 생성하는 단계; 및
- [0731] (c) 투입 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 바이러스 벡터 입자를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 것인 단계
- [0732] 를 포함하는 방법.
- [0733] 2. 실시양태 1에 있어서, 바이러스 벡터 입자의 로딩이 (a)에서의 적용의 적어도 일부 동안 수행되고/거나 (c)에서의 적용의 적어도 일부 동안 수행되는 것인 방법.
- [0734] 3. 유전자 조작된 T 세포의 조성물을 생산하는 방법으로서,
- [0735] (a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 (i) 바이러스 벡터 입자 및 (ii) T 세포를 포함하는 세포 조성물을 포함하는 투입 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계; 및
- [0736] (b) 원추형 유체 인클로저 내의 투입 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 바이러스 벡터 입자를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 것인 단계
- [0737] 를 포함하는 방법.
- [0738] 4. 실시양태 3에 있어서, 세포 조성물 및 바이러스 벡터 입자를 원추형 유체 인클로저 내로 로딩하여, 그에 의해 투입 조성물을 생성하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 세포 조성물의 로딩은 바이러스 벡터 입자의 로딩 전, 로딩 동안 및/또는 로딩 후인 방법.
- [0739] 5. 실시양태 4에 있어서, 세포 조성물의 로딩 및/또는 바이러스 벡터 입자의 로딩이 (a)에서의 적용 전 및/또는 그 동안 수행되는 것인 방법.
- [0740] 6. 실시양태 1-5 중 어느 하나에 있어서, 원심분리 시스템이 연속 대향류 원심분리 시스템인 방법.
- [0741] 7. 실시양태 1-6 중 어느 하나에 있어서, 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 유전자 조작된 T 세포에 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하여 유전자 조작된 T 세포를 포함하는 산출 조성물을 생산하는 것을 추가로 포함하는 방법.

- [0742] 8. 실시양태 7에 있어서, 산출 조성물 중 생존 T 세포의 백분율이 투입 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 크고, 임의로 적어도 약 5% 더 크거나, 적어도 약 10% 더 크거나, 적어도 약 15% 더 크거나, 적어도 약 20% 더 크거나, 또는 적어도 약 25% 더 큰 것인 방법.
- [0743] 9. 실시양태 7 또는 실시양태 8에 있어서, 산출 조성물 중 T 세포의 적어도 또는 적어도 약 5%, 적어도 또는 적어도 약 10%, 적어도 또는 적어도 약 15%, 적어도 또는 적어도 약 20%, 적어도 또는 적어도 약 25%, 또는 적어도 또는 적어도 약 30%가 바이러스 벡터 입자로 형질도입된 것인 방법.
- [0744] 10. 실시양태 1-9 중 어느 하나에 있어서, (i) 제1 원심력이 약 2,000 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제1 유량이 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분이고, 임의로 여기서 제1 원심력 및 제1 유량은 약 15초, 약 30초, 약 45초 또는 약 60초 동안 세포 조성물 또는 투입 조성물에 적용되는 것인 방법.
- [0745] 11. 실시양태 1-10 중 어느 하나에 있어서, (i) 제2 원심력이 약 500 G 내지 약 1,500 G이고; (ii) 제2 유량이 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분인 방법.
- [0746] 12. 실시양태 11에 있어서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비가 약 200 내지 약 400인 방법.
- [0747] 13. 실시양태 1-12 중 어느 하나에 있어서, 제1 원심력 대 제1 유량의 비가 약 300인 방법.
- [0748] 14. 실시양태 1-13 중 어느 하나에 있어서, 제1 원심력이 약 3,000 G이고, 제1 유량이 약 10 mL/분인 방법.
- [0749] 15. 실시양태 1-14 중 어느 하나에 있어서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비가 약 20 내지 약 100, 약 25 내지 약 85, 또는 약 30 내지 약 65인 방법.
- [0750] 16. 실시양태 1-15 중 어느 하나에 있어서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비가 약 35인 방법.
- [0751] 17. 실시양태 1-16 중 어느 하나에 있어서, 제2 원심력이 약 1,000 G이고, 제2 유량이 약 28.5 mL/분인 방법.
- [0752] 18. 실시양태 1-15 중 어느 하나에 있어서, 제2 원심력 대 제2 유량의 비가 약 62.5인 방법.
- [0753] 19. 실시양태 1-17 중 어느 하나에 있어서, 제2 원심력 및 제2 유량이 적어도 약 15분, 적어도 약 30분, 적어도 약 45분, 적어도 약 60분, 적어도 약 75분, 또는 적어도 약 90분 동안 투입 조성물에 적용되는 것인 방법.
- [0754] 20. 실시양태 7-19 중 어느 하나에 있어서, (i) 제3 원심력이 약 2,000 G 내지 약 3,000 G이고; (ii) 제3 유량이 약 15 mL/분 내지 약 25 mL/분인 방법.
- [0755] 21. 실시양태 7-20 중 어느 하나에 있어서, 제3 원심력 대 제3 유량의 비가 약 100 내지 약 150이고, 임의로 제3 원심력 대 제3 유량의 비가 약 125인 방법.
- [0756] 22. 실시양태 7-21 중 어느 하나에 있어서, 제3 원심력이 약 2,500 G이고, 제3 유량이 약 20 mL/분인 방법.
- [0757] 23. 실시양태 7-22 중 어느 하나에 있어서, 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하기 전에, 유전자 조작된 T 세포를 1회 이상의 세척 단계에 적용하는 것을 포함하며, 임의로 여기서 1회 이상의 세척 단계가 배지 교환을 포함하는 것인 방법.
- [0758] 24. 실시양태 1-23 중 어느 하나에 있어서, 방법이 (a)에서의 적용 전에 세포 조성물의 T 세포를 자극 조건 하에 인큐베이션하는 것을 포함하고/거나 (a)에서의 적용 전에 세포 조성물의 T 세포가 자극 조건 하에 인큐베이션되는 것인 방법.
- [0759] 25. 실시양태 24에 있어서, 자극 조건이 TCR 복합체의 1개 이상의 성분의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인 및 1개 이상의 공동자극 분자의 1개 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함하는 것인 방법.
- [0760] 26. 실시양태 25에 있어서, 자극 시약이 (i) TCR 복합체의 구성원에 특이적으로 결합하는, 임의로 CD3에 특이적으로 결합하는 1차 작용제; 및 (ii) T 세포 공동자극 분자에 특이적으로 결합하는 2차 작용제를 포함하며, 임의로 여기서 공동자극 분자는 CD28, CD137 (4-1-BB), OX40 또는 ICOS로부터 선택된 것인 방법.
- [0761] 27. 실시양태 26에 있어서, 1차 및 2차 작용제 중 적어도 1종이 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 것인 방법.
- [0762] 28. 실시양태 26 또는 실시양태 27에 있어서, 1차 작용제가 항-CD3 항체 또는 그의 항원-결합 단편이고, 2차 작용제가 항-CD28 항체 또는 그의 항원-결합 단편인 방법.

10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 3×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 4×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 5×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 6×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 7×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 8×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 7×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 8×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 9×10^8 개의 총 T 세포, 적어도 약 1×10^9 개의 총 T 세포, 적어도 약 1.25×10^9 개의 총 T 세포, 적어도 약 1.50×10^9 개의 총 T 세포, 또는 적어도 약 1.75×10^9 개의 총 T 세포를 포함하는 것인 방법.

- [0780] 46. 실시양태 1-45 중 어느 하나에 있어서, 투입 조성물의 부피가 약 5 mL 내지 약 20,000 mL, 약 10 mL 내지 약 2,000 mL, 약 15 mL 내지 약 1,000 mL, 약 20 mL 내지 약 500 mL, 약 25 mL 내지 약 100 mL, 또는 약 30 mL 내지 약 60 mL인 방법.
- [0781] 47. 실시양태 1-46 중 어느 하나에 있어서, 투입 조성물의 부피가 약 30 mL 내지 약 60 mL인 방법.
- [0782] 48. 실시양태 7-47 중 어느 하나에 있어서, 산출 조성물의 부피가 약 2.5 mL 내지 약 60 mL, 약 5 mL 내지 약 40 mL, 또는 약 10 mL 내지 약 20 mL인 방법.
- [0783] 49. 실시양태 7-48 중 어느 하나에 있어서, 산출 조성물의 부피가 약 5 mL, 약 10 mL, 약 15 mL, 약 20 mL, 약 25 mL, 약 30 mL, 약 35 mL, 약 40 mL, 약 45 mL, 약 50 mL, 약 55 mL, 또는 약 60 mL인 방법.
- [0784] 50. 세포 조성물을 생존 세포에 대해 풍부화하는 방법으로서,
- [0785] (a) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 T 세포를 포함하는 세포 조성물에 제1 원심력 및 제1 유량을 적용하여 세포의 유동층을 생산하는 단계이며, 여기서 세포 조성물은 생존 및 비-생존 T 세포를 포함하고, 여기서 (i) 제1 원심력은 약 2,000 G 내지 약 4,000 G이고; (ii) 제1 유량은 약 5 mL/분 내지 약 15 mL/분인 단계; 및
- [0786] (b) 세포 조성물에 제2 원심력 및 제2 유량을 적용하는 단계이며, 여기서 제2 원심력 및 제2 유량은 투입 조성물의 세포를 원심분리 시스템의 유체 경로로 재순환시켜, 그에 의해 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 높은 백분율의 생존 T 세포를 갖는 풍부화된 조성물을 생성하고, 여기서 (i) 제2 원심력은 약 500 G 내지 약 1,500 G이고; (ii) 제2 유량은 약 25 mL/분 내지 약 30 mL/분인 단계
- [0787] 를 포함하는 방법.
- [0788] 51. 실시양태 50에 있어서, 세포 조성물을 원심분리 시스템 내로 로딩하는 것을 포함하며, 여기서 로딩은 (a)에서의 적용 전 및/또는 (a)에서의 적용의 적어도 일부 동안 수행되는 것인 방법.
- [0789] 52. 실시양태 50 또는 실시양태 51에 있어서, 원심분리 시스템이 연속 대향류 원심분리 시스템인 방법.
- [0790] 53. 실시양태 50-52 중 어느 하나에 있어서, (a)에서의 적용 전에, 방법이 세포 조성물의 T 세포를 바이러스 벡터 입자와 접촉시켜, 그에 의해 유전자 조작된 T 세포를 생산하는 것을 포함하고/거나 세포 조성물의 T 세포가 바이러스 벡터 입자와 접촉되어, 그에 의해 유전자 조작된 T 세포가 생산되는 것인 방법.
- [0791] 54. 실시양태 50-53 중 어느 하나에 있어서, 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율이 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 적어도 약 10% 더 크거나, 적어도 약 20% 더 크거나, 적어도 약 30% 더 크거나, 적어도 약 40% 더 크거나, 적어도 약 50% 더 크거나, 또는 적어도 약 60% 더 큰 것인 방법.
- [0792] 55. 실시양태 50-54 중 어느 하나에 있어서, (c) 원심분리 시스템의 원추형 유체 인클로저 내의 풍부화된 조성물에 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하여 풍부화된 조성물을 수집하는 단계이며, 여기서 (i) 제3 원심력은 약 2,000 G 내지 약 3,000 G이고; (ii) 제3 유량은 약 15 mL/분 내지 약 25 mL/분인 단계를 포함하는 방법.
- [0793] 56. 실시양태 55에 있어서, 제3 원심력 및 제3 유량을 적용하기 전에, 풍부화된 조성물을 1회 이상의 세척 단계에 적용하는 것을 포함하며, 임의로 여기서 1회 이상의 세척 단계가 배지 교환을 포함하는 것인 방법.
- [0794] 57. 실시양태 23-49 및 56 중 어느 하나에 있어서, 1회 이상의 세척 단계가 제2 원심력 및 제2 유량에서 수행되는 것인 방법.
- [0795] 58. 실시양태 1-57 중 어느 하나에 있어서, 세포 조성물이 활성화된 T 세포를 포함하는 것인 방법.
- [0796] 59. 실시양태 50-58 중 어느 하나에 있어서, 방법이 수집된 풍부화된 조성물을 동결보존하는 것을 포함하고/거나 수집된 풍부화된 조성물이 동결보존되어, 그에 의해 동결보존된 풍부화된 조성물이 생성되는 것인 방법.

- [0797] 60. 실시양태 59에 있어서, 동결보존된 풍부화된 조성물이 해동되어 해동된 풍부화된 조성물이 생산되고, 해동된 풍부화된 조성물 중 생존 T 세포의 백분율이 세포 조성물 중 생존 T 세포의 백분율보다 더 크고, 임의로 적어도 약 5% 더 크거나, 적어도 약 10% 더 크거나, 적어도 약 15% 더 크거나, 적어도 약 20% 더 크거나, 적어도 약 25% 더 크거나, 또는 적어도 약 30% 더 큰 것인 방법.
- [0798] 61. 실시양태 1-60 중 어느 하나에 있어서, 방법의 1개 이상의 단계가 자동화되고, 임의로 방법의 1개 이상의 단계가 원심분리 시스템 또는 그의 구성요소에 의해 자동화되는 것인 방법.
- [0799] 62. 실시양태 1-61 중 어느 하나에 있어서, 바이러스 벡터 입자가 재조합 분자를 코딩하는 이중 핵산을 포함하는 것인 방법.
- [0800] 63. 실시양태 62에 있어서, 재조합 분자가 케모카인, 케모카인 수용체, 시토카인, 시토카인 수용체, 항원 수용체 (예를 들어, CAR 또는 TCR), 또는 그의 조합인 방법.
- [0801] 64. 실시양태 62 또는 실시양태 63에 있어서, 재조합 분자가 항원 수용체인 방법.
- [0802] 65. 실시양태 64에 있어서, 항원 수용체가 트랜스제닉 T 세포 수용체 (TCR)인 방법.
- [0803] 66. 실시양태 65에 있어서, 항원 수용체가 키메라 항원 수용체 (CAR)인 방법.
- [0804] 67. 실시양태 66에 있어서, 키메라 항원 수용체 (CAR)가 표적 항원에 특이적으로 결합하는 세포의 항원-인식 도메인 및 ITAM을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 것인 방법.
- [0805] 68. 실시양태 67에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 CD3-제타 (CD3 ζ) 쌍의 세포내 도메인을 포함하는 것인 방법.
- [0806] 69. 실시양태 67 또는 실시양태 68에 있어서, CAR이 세포의 도메인과 세포내 신호전달 도메인을 연결하는 막횡단 도메인을 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0807] 70. 실시양태 69에 있어서, 막횡단 도메인이 CD28의 막횡단 부분을 포함하는 것인 방법.
- [0808] 71. 실시양태 67-70 중 어느 하나에 있어서, 세포내 신호전달 도메인이 T 세포 공동자극 분자의 세포내 신호전달 도메인을 추가로 포함하는 것인 방법.
- [0809] 72. 실시양태 71에 있어서, T 세포 공동자극 분자가 CD28 및 4-1BB로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.
- [0810] 73. 실시양태 66-72 중 어느 하나에 있어서, CAR이 재조합적으로 발현되는 것인 방법.
- [0811] 74. 실시양태 66-73 중 어느 하나에 있어서, CAR이 벡터, 임의로 γ -레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터로부터 발현되는 것인 방법.
- [0812] 75. 실시양태 66-74 중 어느 하나에 있어서, CAR이 렌티바이러스 벡터로부터 발현되는 것인 방법.
- [0813] 76. 실시양태 64-75 중 어느 하나에 있어서, 항원 수용체가 질환 또는 상태와 연관된 항원에 특이적으로 결합하는 것인 방법.
- [0814] 77. 실시양태 76에 있어서, 질환 또는 상태가 암, 자가면역 질환 또는 장애, 및/또는 감염성 질환인 방법.
- [0815] 78. 실시양태 76 또는 실시양태 77에 있어서, 질환 또는 상태가 암인 방법.
- [0816] 79. 실시양태 1-78 중 어느 하나에 있어서, T 세포가 임의로 인간 대상체로부터의 1차 T 세포인 방법.
- [0817] 80. 실시양태 1-79 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 유전자 조작된 T 세포를 포함하는 조성물.
- [0818] 81. 실시양태 80에 있어서, 약 1.0×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 2.0×10^9 개의 CAR-발현 T 세포를 포함하는 조성물.
- [0819] 82. 실시양태 80 또는 81에 있어서, 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함하는 조성물.
- [0820] 83. 실시양태 80 또는 실시양태 81에 있어서, 동결보호제를 추가로 포함하는 조성물.
- [0821] 84. 질환 또는 장애를 갖는 대상체를 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 실시양태 80-82 중 어느 하나의 조성물을 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0822] 85. 실시양태 84에 있어서, 유전자 조작된 T 세포가 질환 또는 장애와 연관된 항원에 특이적으로 결합하는 항

원 수용체를 발현하는 것인 방법.

- [0823] IX. 실시예
- [0824] 하기 실시예는 단지 예시적 목적을 위해 포함되며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.
- [0825] 실시예 1 연속 대향류 원심분리에 의한 형질도입 동안 생존 세포의 풍부화
- [0826] A. 형질도입 동안 생존 세포의 풍부화
- [0827] 4명의 인간 공여자로부터의 백혈구분리반출술 샘플로부터의 분리된 PBMC로부터 면역친화도-기반 풍부화에 의해 CD4+ 및 CD8+ 세포의 개별 조성물을 선택하였다. 선택된 세포 조성물을 동결보존하고, 후속적으로 해동하고, 생존 CD4+ 대 생존 CD8+ 세포의 1:1 비로 배양하였다. 이어서, 합한 CD4+ 및 CD8+ 세포 조성물을 재조합 IL-2, IL-7, 및 IL-15를 함유하는 배지 중에서 항-CD3/항-CD28 Fab 접합된 올리고머 스트랩타비딘 뮤테인 시약 (예를 들어, W02018197949 및 문헌 [Poltorak et al., (2020) Sci Rep 10, 17832] 참조)과 함께 인큐베이션하여 T 세포를 18-30시간 동안 활성화시켰다.
- [0828] 활성화 후에, T 세포 조성물을 항-CD19 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 렌티바이러스 벡터 입자의 존재 하에 연속 대향류 원심분리 시스템 (CTS 로테아™ 대향류 원심분리 시스템)에서 연속 대향류 분리 ("CCE")-기반 원심분리 방법에 적용하여, T 세포를 벡터로 형질도입하였다 ("투입 조성물"). CAR은 뮤린 항체로부터 유래된 항-CD19 scFv (FMC63으로부터 유래된 가변 영역, 이뮤노글로불린-유래 스페이서, CD28로부터 유래된 막횡단 도메인, 4-1BB로부터 유래된 공동자극 영역, 및 CD3-체타 세포내 신호전달 도메인)를 함유하였다. 바이러스 벡터 내의 발현 구축물은 추가로, 말단절단된 수용체를 코딩하는 서열을 함유하였으며, 이는 T2A 리보솜 스킵 서열에 의해 CAR 서열과 분리되었고, CAR 발현에 대한 대용물 마커로서 작용하였다.
- [0829] 시작하기 위해, 200 mL의 총 배지 부피 내에 1-2백만개 세포/mL를 함유하도록 T 세포 조성물을 생성하고, 이를 원추형 인클로저 부분의 길이를 따라 진행되는 좁은 캐놀라를 통해 시스템의 원추형 인클로저 부분 내로 로딩하였다. 로딩 동안, T 세포 조성물은 원추형 인클로저 부분의 넓은 단부에서 캐놀라에 진입하여, 원추형 인클로저 부분의 팁에서 캐놀라를 빠져나갔다. T 세포 조성물을 초기에 3,000 x g의 원심력 및 10 mL/분의 유량에 적용하여, 3,000:10의 원심력 대 유량 비 (300의 G/FR)를 생성함으로써 세포의 유동층을 형성하였다. 비-생존 세포는 원추형 인클로저 부분의 팁의 외부 모서리를 향해 응집되는 경향이 있었다. 유동화 세포 층의 확립 후에, 원심력 및 유량을 유지시키면서 렌티바이러스 벡터 입자를 함유하는 10 mL 용액을 연속 대향류 원심분리 시스템의 캐놀라를 통해 원추형 인클로저 부분에 로딩하여 세포 및 벡터 입자의 유동층을 확립하였다.
- [0830] 세포 및 벡터 입자의 유동층을 확립한 후, 유량은 10 mL/분으로 유지시켰지만 원심력은 625 x g로 하여, 62.5의 G/FR이 되게 하였다. 이들 조건은 보다 크고 점착성인 비-생존 T 세포 응집체가 원추형 인클로저 부분의 원추형 팁에서 펠릿으로서 계속 응집되게 하는 한편 ("폐기물" 분획), 유동화된 T 세포 (생존 또는 비-생존) 및 벡터 입자는 원추형 인클로저 부분의 중심을 향하도록 강제하였고, 원추형 인클로저 부분의 넓은 단부로부터 배출 (분리)되고 "산출" 분획으로서 유체 경로를 통해 수집 챔버 내로 유동하게 하였다. 세포 조성물이 재지시되고 최종 형질도입된 세포 "생성물" 분획으로서 수집될 때까지, 산출 분획을 총 30분 동안 연속 대향류 원심분리 시스템의 원추형 인클로저 부분을 통해 재순환시켰다.
- [0831] 재순환 후, 산출 분획을 재지시하고, 2,500 x g의 원심력 및 20 mL/분의 유량으로 125의 G/FR이 되게 하여 최종 생존 세포 "생성물" 분획으로서 수집하였다. 형질도입된 "생성물" 분획을 캐놀라를 통해 수집하였고, 수집된 세포는 원추형 인클로저 부분의 팁에서 캐놀라에 진입하여, 원추형 인클로저 부분의 넓은 단부에서 캐놀라를 빠져나갔다. 형질도입된 "생성물" 분획을 배지에 0.75×10^6 세포/mL의 농도로 재현탁시키고, 37°C에서 24시간 동안 인큐베이션하여 바이러스 벡터가 통합되게 하였다. 다양한 분획에서의 생존 및 비-생존 세포의 수를 형광 현미경검사-기반 세포 계수 기기에 의해 결정하였다.
- [0832] 3가지 상이한 실험으로부터의 결과를 도 1a 및 1b에 제시한다. 예시적인 원심분리 형질도입 방법은 평균 대략 50%의 비-생존 세포를 제거하였고 (도 1a, 하부 패널), 생존 세포 수율을 평균 대략 20% 증가시켰다 (도 1b). 이들 결과는 CCE-기반 형질도입 방법이 샘플 내 생존 세포를 풍부화하고 그의 백분율을 증가시킬 수 있음을 입증한다.
- [0833] B. 형질도입 효율 및 형질도입 후 세포 생존율
- [0834] 1차 인간 T 세포 조성물을 인간 성인 공여자로부터의 백혈구분리반출술 샘플로부터 생성하고, 항-CD19 CAR을 코

당하는 렌티바이러스 벡터의 존재 하에 CCE-기반 원심분리 방법에 적용하여, 섹션 A에 기재된 바와 같이 T 세포를 벡터로 형질도입하였다 ("투입" 조성물). 원심분리된 세포 조성물의 형질도입 효율 및 세포 생존율을 형질도입 직후에, 뿐만 아니라 그 후 다수회의 시점에 평가하였다.

[0835] 대조군으로서, T 세포를 회전접종의 존재 또는 부재 하에 규모-축소 방법에 의해 렌티바이러스 벡터로 형질도입하였다. 회전접종 방법의 경우, T 세포 조성물을 2×10^7 개의 생존 세포/mL를 함유하도록 생성하고, 실질적으로 강성인 실린더형 원심분리 챔버에서 693 g에서 30분 동안 원심분리하였다. "회전 없음" 대조군 샘플을 동일한 조건 하에, 그러나 원심분리 없이 인큐베이션하였다. 벡터 역가는 모든 샘플에 대해 백만개의 세포당 1.11 μ L였다. 대조군 조성물을 또한 형질도입 후에 인큐베이션하여 바이러스 벡터가 통합되게 하였다.

[0836] 인큐베이션 후, 형질도입된 생성물 분획을 수집하고, 테드-엔드 원심분리 및 완충제 교환의 자동화 방법에 의해 세척하였다. 형질도입된 세포 조성물에서 CAR의 표면 발현을 갖는 CD3+ T 세포의 백분율에 기초하여 형질도입 효율을 결정하였다. 형질도입된 세포 조성물의 생존율을 섹션 A에 기재된 바와 같이 평가하였다.

[0837] 도 2a에 제시된 바와 같이, 2명의 공여자로부터의 세포로부터 생산된 형질도입된 세포 조성물에 대해 CCE-기반 방법은 회전-없음 대조군 방법에 비해 개선된 형질도입 효율을 생성하였다. CCE 방법의 형질도입 효율은 회전 접종 방법에 의해 달성된 것보다 낮았다.

[0838] 도 2b에 제시된 바와 같이, T 세포의 생존율은 벡터와의 연속 대향류 원심분리 직후에 65 퍼센트에서 81 퍼센트로 증가하였다 ("투입" vs. "0h"). 형질도입 후 24시간째 ("24h") 및 5일째 ("제5일") 둘 다에, 형질도입된 T 세포는 그의 형질도입-전 생존율과 비교하여 증가된 세포 생존율을 계속 나타내었다. 대조적으로, 대조군 샘플에서는 세포 생존율이 형질도입-전 생존율 수준으로부터 유의하게 변화되지 않았다.

[0839] C. 세포 생존율에 대한 형질도입 부피의 효과

[0840] 관련 실험에서, T 세포를 동일한 방법으로 연속 대향류 원심분리 시스템에서 백만개의 세포당 1.11 μ L의 벡터를 사용한 CCE 방법에 의해 30 mL 또는 60 mL의 총 부피로 형질도입하였다. 대조군으로서, T 세포를 규모-축소 회전접종 방법에 적용하였다. CCE 방법에 적용된 둘 다의 30 mL 및 60 mL 세포 및 벡터 조성물의 생존율은 대등하게 증가하였으며 (도 3), 이는 조성물 부피가 형질도입된 세포의 생존율에 대해 유의한 효과를 갖지 않았음을 나타낸다.

[0841] 결과는 연속 대향류 원심분리 시스템이 T 세포 조성물을 바이러스 벡터 입자로 형질도입하고 동시에 조성물을 생존 T 세포에 대해 풍부화하는 데 사용될 수 있다는 관찰과 일치한다.

[0842] 실시예 2 연속 대향류 원심분리 vs. 대안적 자동화 원심분리에 의한 형질도입된 생존 세포의 풍부화

[0843] T 세포 조성물을 11명의 인간 공여자로부터 생성하고, 실시예 1에 기재된 바와 같이 활성화시켰다. 활성화 후에, 세포를 재조합 IL-2, IL-7, 및 IL-15를 함유하는 배지 중에 재현탁시키고, 693 g에서 30분 동안의 회전접종에 의해 항-CD19 CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입하였다. CAR은 뮤린 항체로부터 유래된 항-CD19 scFv (FMC63으로부터 유래된 가변 영역, 이뮤노글로불린-유래 스페이서, CD28로부터 유래된 막형단 도메인, 4-1BB로부터 유래된 공동자극 영역, 및 CD3-제타 세포내 신호전달 도메인)를 함유하였다. 바이러스 벡터 내의 발현 구축물은 추가로, 말단절단된 수용체를 코딩하는 서열을 함유하였으며, 이는 CAR 발현에 대한 대응물 마커로서 작용하였고, T2A 리보솜 스킵 서열에 의해 CAR 서열로부터 분리되었다.

[0844] 회전접종된 세포를 세척하고, 배지 중에 재현탁시키고, 활성화의 개시 후 96시간까지 37°C에서 배양하였다. 배양 후, 형질도입된 T 세포 조성물 ("투입 조성물")을 연속 대향류 원심분리 시스템 (CTS 로테아™ 대향류 원심분리 시스템)의 원추형 인클로저 부분 내로 로딩하고, 3,000 g의 원심력 및 10 mL/분의 유량에 30초 동안 적용하여 유동화 세포 층을 확립하였다. 이어서, 형질도입된 세포를 2,500 g의 원심력 및 40 mL/분 (62.5 G/FR) 또는 75 mL/분 (33.3 G/FR)의 유량에 적용하였다. 이들 조건 하에, 이어서 배지를 "세척" 단계로서 1.25% 인간 혈청 알부민을 함유하는 플라스마라이트 pH 7.4로 교환하여, 폐기물 분획의 수집 및 분석을 위한 비-생존 세포의 분리가 가능하게 하였다.

[0845] 대조군으로서, 동일한 공여자로부터 유래되고 동일한 방법에 의해 생성된 형질도입된 T 세포 조성물을 자동화, 테드-엔드 원심분리 및 완충제 교환의 대안적 방법 ("대안적 방법")에 적용하였다.

[0846] 연속 대향류-기반 방법 또는 대안적 방법에 의해 생성된 투입 조성물, 세척된 생성물 분획 및 폐기물 분획의 세포 생존율을 이전에 기재된 바와 같이 평가하였다. 도 4a에 제시된 바와 같이 (각각의 선은 공여자를 나타냄),

투입 조성물의 연속 대향류 원심분리는 세척된 생성물 분획에서 일관되게 개선된 세포 생존율을 발생시켰고, 이는 대안적 원심분리 및 완충제 교환 방법에 적용된 투입 조성물에서는 관찰되지 않았다. 관찰은 시험된 G/FR 비 둘 다에 대해 유사하였다.

[0847] 실시예 3 동결보존된 생성물에서의 개선된 생존율의 유지

[0848] 실시예 2로부터의 세척된 생성물 (WP) 분획을 후속적으로 25% 완충제 및 75% 크리오스토르(CryoStor)® CS-10 배지 중에 재현탁시켜 제제화된 약물 생성물 (FDP)을 생산하였다. FDP의 생존율을 실질적으로 기재된 바와 같이 평가하였다. 세척된 생성물 분획에서 관찰된 개선된 세포 생존율은 FDP에서 유지되는 것으로 확인되었다. 이어서, FDP를 속도 제어 동결기에서 동결시켜 동결보존된 약물 생성물 (CDP)을 생산하였다. CDP를 액체 질소에서 적어도 3일 동안 저장한 후, 실온에서의 해동을 위해 꺼내었다. 해동된 CDP의 생존율은 세척-전 생성물 분획 ("수거된 생성물"; HP), WP 분획 및 FDP의 생존율과 비교하여 감소된 것으로 관찰되었다 (도 4b).

[0849] FDP와 해동된 CDP 사이의 생존율의 손실이 공여자-의존성인지 결정하기 위해, 각각의 공여자에 대한 WP 분획, FDP, 및 해동된 CDP의 세포 생존율을 동일한 공여자의 세척-전 생성물 분획에서의 초기 세포 생존율에 대해 정규화하였다 (도 4c). 공여자-특이적 효과는 관찰되지 않았다. 낮은 생존율을 갖는 공여자 세척-전 생성물 분획에서 CCE-기반 원심분리 프로토콜에 의해 생존 세포가 풍부화되는지 추가로 확인하기 위해, 최저 생존율을 갖는 공여자 세척-전 생성물 분획에서 프로세스의 각각의 단계 동안 세포의 수 및 위치를 추적하였다. 세척-전 생성물 (HP) 분획은 61% 세포 생존율을 나타낸 반면, 세척된 생성물 (WP) 분획은 92% 생존율을 나타내었으며 (도 4d), 이는 세척-전 생성물 분획 생존율에 상관없이, 생존 및 비-생존 세포가 CCE-기반 원심분리 동안 상이한 분획으로 분리 및 분포된다는 것을 나타낸다.

[0850] 해동된 CDP에서 관찰된 생존율 풍부화에서의 손실을 감소시키기 위해 CCE-기반 원심분리 프로토콜을 변형시켰다 ("변형된 CCE-기반 방법"). 특히, 원심력 및 유량을 하향 조정하여 세포에 대한 원심력 스트레스를 감소시켰다. 도 4e에 제시된 바와 같이 (낮은 생존율 (<70%)을 갖는 투입 분획은 다이아몬드 및 별표에 의해 지정됨), 원심력을 2500 g에서 1000 g로 감소시키고 28.5 mL/분의 유량으로 실행하는 것 (35 G/FR)은 해동된 CDP에서 생존율 풍부화 효과를 보존하였다. 또한 변형된 CCE-기반 방법은 대안적 방법과 비교하여 세포수의 대등한 수율을 달성하는 것으로 확인되었다 (도 4f). 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 이들 관찰은 보다 낮은 원심력 및 유량이 해동된 CDP에서 관찰된 세포 생존율의 손실을 감소시킬 수 있다는 발견과 일치한다.

[0851] 관련 실험에서, 공여자 샘플로부터의 세포의 낮은 ($230-400 \times 10^6$ 개의 세포), 중간 ($400-750 \times 10^6$ 개의 세포), 및 높은 ($>750 \times 10^6$ 개의 세포) 로드를 실시예 2에 기재된 변형된 CCE-기반 방법 ("Mod CCE") 또는 대안적 방법 ("Alt")에 적용하였다. 공여자 샘플을 각각의 변형된 CCE-기반 및 대안적 방법 사이에 매칭시켰다. 세포 로드는 변형된 CCE-기반 방법으로부터 생산된 CDP의 생존율에 영향을 미친다는 것이 관찰되지 않았다. 또한, 변형된 CCE-기반 방법에 의해 생산된 CDP는 세포 로드와 상관없이 대안적 방법과 비교하여 유사하거나 또는 더 높은 생존율을 나타내었다 (도 4g).

[0852] 세척-전 생성물 (HP) 분획에서 소정 범위의 생존율을 나타내는 공여자 샘플 중에서, 변형된 CCE-기반 방법 또는 대안적 방법으로부터 생산된 CDP의 세포 생존율에서의 개선을 예측하기 위해 모델링을 수행하였다. 도 4h, 4i, 및 4j에 제시된 바와 같이, 모델링은, 특히 보다 낮은 생존율을 나타내는 세척-전 생성물 분획 ("HP")을 갖는 공여자 중에서, 변형된 CCE-기반 방법이 대안적 방법과 비교하여 증가된 생존율 풍부화를 제공할 것으로 예측하였다. 따라서, 생존율 풍부화는 대등한 최종 생성물 수율을 유지하면서 달성될 수 있다. CCE-기반 방법이 잠재적 불순물 (예를 들어, 제조 동안 사용된 단백질, DNA, 세포 파편, 및 시약)을 제거하는 능력을 또한 유입 및 유출 배지의 모델링 및 유입 배지의 실제 측정에 의해 평가하였다. 특히, 도 4k는 유입 및 유출 배지 중 불순물의 예측된 농도, 뿐만 아니라 유입 배지 중 불순물의 측정된 농도를 보여준다.

[0853] 이에 따라, 모델링은 변형된 CCE-기반 방법이 생성물 제조에 성공하는 공여자의 수를 증가시킬 수 있음을 나타낸다.

[0854] 실시예 4 확장된 배양 프로토콜 후 연속 대향류 원심분리에 의한 형질도입된 생존 세포의 풍부화

[0855] 1차 인간 T 세포 조성물을 생성하고 활성화의 개시 후에 T 세포를 총 15일 동안 배양하는 확장된 프로토콜에 세포를 적용한 것을 제외하고는, 실시예 2에 기재된 바와 같이 형질도입하였다. 활성화의 개시 후 15일 동안 T 세포 조성물을 인큐베이션함으로써, 세포는 덜 활성화되며, 그에 의해 그의 크기를 변화시킬 수 있다. 따라서, G/FR 비가 확장된 프로토콜에 적용된 생존 세포의 풍부화에 어떻게 영향을 미치는지 이해하기 위한 실험을 수행

하였다.

[0856] 확장된 배양 프로토콜 후, 50% 세포 생존율을 나타내는 형질도입된 T 세포 투입 조성물을 연속 대향류 원심분리 시스템 (CTS 로테아™ 대향류 원심분리 시스템)의 원추형 인클로저 부분 내로 로딩하고, 3,000 g의 원심력 및 10 mL/분의 유량에 30초 동안 적용하여 유동화 세포 층을 확립하였다. 이어서, 원심력을 2,500 g로 감소시키고, 유량을 40 mL/분으로 증가시켜 62.5의 G/FR 비를 생성하였다. 실시예 2에서와 같이, 배지를 "세척" 단계로서 1.25% 인간 혈청 알부민을 함유하는 플라스마라이트 pH 7.4로 교환하여, 폐기물 분획의 수집 및 분석을 위한 비-생존 세포의 분리가 가능하게 하였다.

[0857] 생존 및 비-생존 세포의 수를 이전에 기재된 바와 같이 평가하였다. 도 5a (좌측 패널)에 제시된 바와 같이, 원심분리 프로세스 전반에 걸쳐 원심력 및 유량을 62.5 G/FR로 일정하게 유지시킨 경우, 생성물 분획 (세척된 생성물 1)에서의 생존 세포의 백분율은 투입 조성물 (투입)에서의 생존 세포의 백분율과 비교하여 크게 변화되지 않았다. 또한, 세척된 폐기물 분획 (세척 폐기물)에는 최소의 비-생존 세포가 존재하였다.

[0858] 추가의 비-생존 세포를 분리하기 위해, 제1 세척 동안 수집된 세포 (세척된 생성물 1)에 대해 제2 세척 단계를 수행하였다. 제2 세척 단계 동안, 원심력을 2,500 g로 두고 유량을 75 mL/분으로 유지시켜, 33.3 G/FR 비를 생성하였다. 33.3의 G/FR 비에서의 제2 세척 후에, 세척된 폐기물 분획 (세척 폐기물)에서 유의한 수의 비-생존 세포가 발견되었고 (도 5a; 우측 패널), 생성물 분획 (세척된 생성물 2)에서의 생존 세포의 백분율은 투입 조성물에서의 세포의 백분율과 비교하여 유의하게 개선되었다 (도 5b). 실시예 3에 기재된 결과와 조합하여, 보다 낮은 G/FR 비 (예를 들어, 33.3 또는 35)는 생존 세포에 대한 풍부화를 개선시키는 것으로 관찰되었다.

[0859] 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 확장된 프로토콜 후 세포 크기의 변화는 확장된 세포의 생존율 풍부화에 사용될 수 있는 원심력, 유량 및 그의 비의 차이에 영향을 미칠 수 있다. 도 5c (하부 패널)에 제시된 바와 같이, 확장된 프로토콜 후의 세포의 크기를 세척된 생성물 1의 세포에 기초하여 결정하였다. 세척된 생성물 1의 생존 (V) 및 비-생존 (NV) 세포는 둘 다 9 μ m 미만의 평균 크기를 가졌다. 비교를 위해, 별개의 실험에서의 활성화 3일 후의 세포의 크기를 도 5c (상부 패널)에 제시한다. 3일 동안 활성화된 세포는 활성화 개시 15일 후에 수집된 세척된 생성물 1의 세포보다 평균적으로 더 컸다. 이러한 발견은 세포가 초기 활성화 동안 크기가 증가한 후, 배양물에서의 확장 동안 덜 활성화되고 크기가 감소하는 것과 일치한다. 또한, 3일 동안 활성화된 세포의 비-생존 세포 (NV)는 약 9 μ m의 평균 크기를 가졌지만, 3일 동안 활성화된 세포의 생존 세포 (V)의 큰 비율은 보다 큰 크기 (약 14 μ m)를 가졌다.

[0860] 실시예 5 연속 대향류 원심분리에 의한 바이러스 형질도입의 효율

[0861] 실시예 1에서와 같이 인간 성인 공여자로부터의 백혈구분리반출술 샘플로부터 1차 인간 T 세포 조성물을 생성하고, 항-CD19 CAR을 코딩하는 벡터의 존재 하에 CCE-기반 원심분리 방법에 적용하여 T 세포를 형질도입하였다. 연속 대향류 원심분리 방법의 다양한 파라미터를 하기 섹션에 기재된 바와 같이 독립적으로 변경하고, 형질도입 효율을 평가하였다.

[0862] A. 형질도입 효율에 대한 원심력 및 유량의 효과

[0863] 원심력 및 유량을 변경한 것을 제외하고는, 실질적으로 실시예 1에 기재된 바와 같이 CCE-기반 방법을 사용하여 항-CD19 CAR을 코딩하는 렌티바이러스 벡터로 T 세포 조성물을 형질도입하였다. 세포 및 벡터 입자의 유동층의 확립 후에, 원심력을 625 x g 또는 1,500 x g로 조정하고, 유량을 10 mL/분 또는 24 mL/분으로 조정하여, 62.5 또는 150의 G/FR 비를 생성하였다 (표 E1 참조).

표 E1. 시험된 힘 vs. 유량			
원심분리 (G)	625	1500	1500
유량 (mL/분)	10	24	10
G/FR 비	62.5	62.5	150

[0864]

[0865] CAR의 표면 발현을 갖는 CD3+ T 세포의 백분율을 결정함으로써 형질도입 효율을 계산하였다. 도 6a에 제시된 바와 같이, T 세포 조성물을 표 E1에 제시된 원심력 및 유량에서 CAR을 코딩하는 벡터로 형질도입하였다. 시험된 상이한 파라미터는 유사한 백분율의 CD3+CAR+ T 세포를 생성하였다.

[0866] 대조군으로서, 연속 대향류 원심분리 시스템-기반 방법을 실시예 1의 서브섹션 B에 기재된 규모-축소 회전접종 형질도입 방법과 비교하였다. 원심분리후 벡터 통합을 실시예 1에 기재된 바와 같이 진행되도록 하고, 형질도입 효율을 평가하였다. 규모-축소 회전접종-기반 형질도입의 결과를 도 6b에 제시한다. 2가지 방법의 형질도

입 효율은 대등한 것으로 관찰되었고, 따라서 CCE-기반 방법은 대등한 형질도입 효율을 생성하지만, 세포 생존율은 더 높았다.

[0867] 추가의 원심력 및 유량, 구체적으로 300G 원심력-대-10 mL/분 유량 (300G/10FR) 및 3000G/30FR 조건을 재순환 동안 시험하였다. 300G/10FR에서의 재순환은 표 E1의 시험된 파라미터에 의해 달성된 것과 대등한 형질도입 효율을 생성하였다. 도 6c에 제시된 바와 같이, 3000G/30FR에서의 재순환은 625G/10FR에서의 재순환 및 규모-축소 회전접종 제어 방법에 의해 달성된 것과 비교하여 감소된 형질도입 효율을 발생시켰다.

[0868] 1500G/10FR 조건을 1분 동안 적용하고, 이어서 300G/10FR 조건을 1분 동안 적용하는 또 다른 재순환 절차를 시험하였다. 이러한 절차를 30-분 인큐베이션에 걸쳐 반복함으로써, 인큐베이션 전반에 걸쳐 원추형 인클로저 내의 유동층의 크기를 진동시켰다. 도 6d에 제시된 바와 같이, 이러한 진동 재순환 절차는 625G/10FR에서의 재순환에 의해 달성된 것과 대등한 형질도입 효율을 발생시켰다.

[0869] B. 형질도입 효율에 대한 백터 역가의 효과

[0870] T 세포 조성물을 백만개의 세포당 1.11 또는 3.33 μ L의 백터를 사용하여, 실질적으로 상기 섹션에 기재된 바와 같이 CCE-기반 방법에 의해 형질도입하였다. 도 7a에 제시된 바와 같이, CD3+CAR+ 세포의 퍼센트는 백만개의 세포당 3.33 μ L의 백터를 사용한 경우에 증가하였다.

[0871] 백만개의 세포당 개별 백터 로트로부터의 6 μ L의 백터를 재순환 동안 625G/10FR 조건 하에 형질도입에 사용하여 추가의 실험을 수행하였다. 도 7b에 제시된 바와 같이, 5명의 공여자로부터의 형질도입된 T 세포에 대해, 이러한 백터 역가는 693G에서 당해-규모 회전접종 대조군 방법과 대등한 형질도입 효율을 생성하였고, 이는 당해-규모 회전접종 대조군 방법과 대등한 효율이 최적 역가에서 달성될 수 있음을 나타낸다.

[0872] C. 형질도입 효율에 대한 인큐베이션 부피의 효과

[0873] 백터 역가를 일정하게 유지시키면서 형질도입 부피를 변경한 것을 제외하고는, 실질적으로 상기 섹션에 기재된 바와 같이 T 세포를 연속 대향류 원심분리 시스템 (CTS 로테아™ 대향류 원심분리 시스템)에서 형질도입하였다. T 세포를 백만개의 세포당 1.11 μ L의 백터와 함께 30 mL 또는 60 mL의 총 부피로 원심분리하였다 (표 E2 참조). 도 8a에 도시되고 도 8b에 정량화된 바와 같이, 결과는 형질도입 부피를 변경하는 것이 CCE-기반 방법의 형질도입 효율에 유의한 영향을 미치지 않았음을 나타내었다. 25 mL, 35 mL, 및 65 mL 형질도입 부피를 시험한 추가의 공여자로부터 생산된 형질도입된 T 세포에 대해 유사한 결과가 달성되었다.

표 E2. 형질도입 효율에 대한 인큐베이션 부피의 효과						
	백터 역가 (μ L/1x10 ⁶ 개 세포)	목적하는 형질도입 TNC (x1E6)	백터 부피 (μ L)	형질도입 부피 (mL)	상대적 백터 농도	형질도입 VCC (x1E6/mL)
CCE	1.11	240.00	266.40	60.00	4.44	4.00
CCE	1.11	240.00	266.40	30.00	8.88	8.00

[0874]

[0875] D. 형질도입 효율에 대한 T 세포수의 효과

[0876] 또 다른 실험에서, 형질도입 부피 및 백터 역가를 일정하게 유지시키면서 T 세포의 수를 변경한 것을 제외하고는, 실질적으로 상기 섹션에 기재된 바와 같이 T 세포를 연속 대향류 원심분리 시스템 (CTS 로테아™ 대향류 원심분리 시스템)에서 형질도입하였다. 표 E3에 제시된 바와 같이, 200 또는 600백만개의 T 세포를 백만개의 세포당 1.11 μ L의 백터와 함께 35 mL의 총 부피로 원심분리하였다. 대조군으로서, 15백만개의 T 세포를 이전에 기재된 규모-축소 회전접종 방법에 적용하였다. 600백만개의 T 세포를 함유하는 조성물은 200백만개의 T 세포를 함유하는 조성물보다 더 크고 더 조밀한 유동화 세포 층을 생성하였다 (데이터는 제시되지 않음). 형질도입 효율을 이전 섹션에 기재된 바와 같이 결정하였다. 결과는, 도 9a에 제시되고 도 9b에 정량화된 바와 같이, CCE 조건 사이에서, 투입 조성물 중 보다 많은 수의 T 세포가 보다 높은 형질도입률을 발생시켰음을 입증하였다.

표 E3. 형질도입 효율에 대한 T 세포수의 효과					
	백터 역가 ($\mu\text{L}/1 \times 10^6$ 개 세포)	목적하는 형질도입 TNC ($\times 10^6$)	백터 부피 (μL)	형질도입 부피 (mL)	상대적 백터 농도
회전점중	1.11	15	16.65	0.76	21.91
CCE	1.11	200	222	35	6.34
CCE	1.11	600	666	35	19.03

[0877]

[0878]

[0879]

E. 형질도입 효율에 대한 인큐베이션 시간의 효과

산출 분획이 연속 대향류 원심분리 시스템의 원추형 인클로저를 통해 30분 또는 90분 동안 재순환되도록 함으로써 인큐베이션 시간을 변경한 것을 제외하고는, 실질적으로 상기 섹션에 기재된 바와 같이 200×10^6 개의 T 세포를 연속 대향류 원심분리 시스템 (CTS 로테아™ 대향류 원심분리 시스템)에서 형질도입하였다. 상청액 샘플을 원심분리 챔버로부터 주기적으로 수집하여 시간 경과에 따른 렌티바이러스 벡터의 소모를 모니터링하였다. Jurkat 세포를 샘플로 형질도입하고, 각각의 상청액 샘플 중 렌티바이러스 벡터의 양을 형질도입 효율에 기초하여 평가하였다. 연속 대향류 원심분리 시스템에 의해 형질도입된 T 세포의 형질도입 효율을 또한 평가하였다.

[0880]

도 10a에 제시된 바와 같이, 5분의 인큐베이션 후에 수득된 렌티바이러스 벡터 상청액 샘플에 의해 형질도입된 Jurkat 세포의 퍼센트는 출발 렌티바이러스 벡터 물질에 의해 형질도입된 Jurkat 세포와 비교하여 대략 20% 감소하였다. 도 10b에 제시된 바와 같이, 30분 동안 렌티바이러스 벡터 입자와 함께 인큐베이션된 T 세포와 90분 동안 입자와 함께 인큐베이션된 것 사이에 형질도입 효율에서 어떠한 유의한 차이도 관찰되지 않았다. 이론에 얽매는 것을 원하지는 않지만, 본 실험의 결과는 대다수의 렌티바이러스 벡터가 인큐베이션의 처음 5분 내에 소모되어, 보다 긴 인큐베이션 시간이 형질도입 효율을 증가시키지 않을 수 있다는 것을 나타낸다.

[0881]

F. 벡터 농도에 대한 원심분리 시스템 부피의 효과

[0882]

유체 경로에 인큐베이션 백을 첨가함으로써 연속 대향류 원심분리 시스템의 총 부피를 증가시킨 것을 제외하고는, 재순환 동안 625G/10FR 조건 하에 실시예 1에 기재된 CCE-기반 방법을 사용하여 T 세포를 형질도입하였다. 인큐베이션 백이 없는 총 시스템 부피는 25 mL였다. 인큐베이션 백을 첨가하여 총 시스템 부피를 39 mL 또는 72 mL로 증가시켰다. 원추형 인클로저 부분의 부피는 15 mL였다.

[0883]

총 시스템 부피를 39 mL에서 72 mL로 증가시키는 것은 형질도입 효율에 영향을 미치지 않았다. 추가의 분석은 39-mL 시스템에서, 바이러스 벡터가 원심력장이 존재하는 원추형 인클로저 부분에서, 원추형 인클로저 부분이 총 시스템 부피의 단지 15 mL만을 차지함에도 불구하고, 우선적으로 농축되었음을 밝혀내었다 (도 11, 좌측 패널). 72-mL 시스템에서는, 바이러스 벡터의 덜 우선적인 농축이 관찰되었다 (도 11, 우측 패널).

[0884]

실시예 6 원심 분리에 의한 비드-세포 조성물의 탈비드화

[0885]

1차 인간 T 세포 조성물을 실시예 1에 기재된 바와 같이 생성하였다. T 세포를 항-CD3 및 항-CD28 항체로 코팅된 대략 200×10^6 개의 상자성 폴리스티렌 비드와 함께 24시간 동안 37°C에서 인큐베이션하여 T 세포를 자극하였다. 자극 후, 세포 및 비드 조성물을 7.5×10^5 개의 세포/mL로 희석하고, 37°C에서 72시간 동안 추가로 인큐베이션하였다. 추가의 인큐베이션 후에, 세포 조성물은 자동화 세포 계수기에 의해 분석된 바와 같이, 1.60×10^6 개의 세포/mL를 66% 생존율로 함유하는 것으로 결정되었다. 이어서, 세포-비드 조성물을 "투입" 조성물로서 연속 대향류 원심분리 시스템 (CTS 로테아™ 대향류 원심분리 시스템)의 원추형 유체 인클로저 부분에 넣고, 연속 대향류 분리 ("CCE")-기반 원심분리 방법에 적용하였다. 투입 조성물을 초기에 1,000 g의 원심력 및 30 mL/분의 유량에 적용하여 원추형 유체 인클로저 내에 세포-비드 조성물의 유동층을 확립하였다.

[0886]

후속적으로, 세포-비드 조성물의 유동층을 50 mL/분의 유량에 적용하였다. 원심력을 1,000 g에서 200 g로 100 g 증분으로 단계적으로 감소시켰다. 세포수 및 생존율의 분석을 위해 샘플을 간격을 두고 채취하였다. 수집된 데이터에 기초하여, 후속 실험을 위해 50 mL/분의 유량 및 600 g의 원심력을 선택하였다.

[0887]

후속 실험에서, 대략 200×10^6 개의 비드 및 2.08×10^6 개의 세포/mL를 함유하는 69.5% 생존율의 T 세포 투입 조성물을 생성하였다. 초기에 1,000 g의 원심력 및 30 mL/분의 유량에 적용하여 세포-비드 조성물의 유동층을 확립한 후, 투입 조성물을 600 g의 원심력 및 50 mL/분의 유량에 적용하여 T 세포의 "산출" 분획을 생성하였고, 이것이 "생성물" 분획으로서 최종 수집 챔버로 재지시될 때까지, 연속 대향류 원심분리 시스템을 통해 유체 경

로로 재순환시켰다.

- [0888] 투입 조성물 및 생성물 및 폐기물 분획에서의 비드의 수를 형광 현미경검사-기반 사이테이션(Cytation)TM 5 세포 영상화 시스템을 사용하여 결정하였다. 최종 생성물 분획은 투입 조성물에 존재하는 비드 입자의 대략 0.01%를 나타내는 220개의 비드/mL를 함유하였다. 수집된 폐기물 분획은 40,930개의 비드/mL를 함유하였다. 산출 분획에서의 세포 및 비드 입자의 수를 표 E4에 제시한다.

표 E4. 세포-비드 조성물 탈비드화			
분획	총 비드 계산치	비드/mL	비드 수율 (투입 조성물 중 200 x 10 ⁶ 개의 비드에 기초함)
투입	3.66 x 10 ⁶	31,618	N/A
생성물 ₁	2.87 x 10 ⁴	220	0.01%
생성물 ₂	3.64 x 10 ⁴	343	0.02%
폐기물	2.61 x 10 ⁶	40,930	1.31%

- [0889] 생성물₁은 전체 투입 조성물이 챔버를 통과한 후의 제1 분리 분획이다.

- [0891] 생성물₂는 챔버를 완충제로 행군 후의 제2 분리 분획이다.

- [0892] 실시예 7 연속 대향류 원심분리 시스템에서의 형질도입을 위한 추가의 방법

- [0893] 연속 대향류 원심분리 시스템 (CTS 로테아TM 대향류 원심분리 시스템)에서 세포를 형질도입하는 추가의 방법을 형질도입 효율에 대한 그의 효과에 대해 시험하였다. 하기 기재된 변형 이외에, 추가의 방법은 달리 실시예 1에 기재된 바와 같았다.

- [0894] 시험된 하나의 추가의 방법에서, T 세포 및 렌티바이러스 벡터 입자를 세포 및 벡터 입자의 유동층이 확립된 후 1분 동안 인큐베이션하고, 그 후 이어서 형질도입된 생성물 분획을 재순환 없이 즉시 수집하였다. 이 방법은 실시예 1에 기재된 625G/10FR CCE 방법에 의해 달성된 것에 비해 감소된 형질도입 효율을 초래하였다.

- [0895] 시험된 또 다른 추가의 방법에서, T 세포 및 렌티바이러스 벡터 입자를 세포 및 벡터 입자의 유동층이 확립된 후 625G/10FR 조건 하에 30분 동안 인큐베이션하였다. 그러나, 인큐베이션 동안, 유체 경로에서의 유동은 원추형 인클로저 부분의 중심을 통한 방사상 내향인 반대 유동보다는, 원추형 인클로저 부분의 팁을 통한 방사상 외향으로 지시되었다. 이 방법은 실시예 1에 기재된 625G/10FR CCE 방법에 의해 달성된 것과 대등한 형질도입 효율을 초래하였다.

- [0896] 시험된 또 다른 추가의 방법에서, 세포 및 벡터 입자의 유동층을 2500G/40FR에서 확립하고, 625G/10FR에서 1분 동안 인큐베이션하고, 그 후 여전히 625G/10FR에서 유동을 역전시켜, 유동층으로부터의 세포 및 벡터 입자가 원추형 인클로저 부분의 팁으로부터 중심까지 원추형 인클로저 부분의 길이를 따라 전개되는 좁은 캐놀라를 통과하도록 하였다. 세포 및 바이러스 입자를 캐놀라로부터 1-분 기간에 걸쳐 수집하고, 그 후 수집되지 않은 세포 및 벡터 입자로 세포 및 벡터 입자의 유동층을 재확립하였다. 이 절차를 30-분 인큐베이션에 걸쳐 반복하였다. 이 방법은 실시예 1에 기재된 625G/10FR CCE 방법에 의해 달성된 것과 대등한 형질도입 효율을 초래하였다.

- [0897] 종합하면, 이들 결과는 비-대향류 방법 또는 연속 대향류 원심분리 시스템으로부터 세포의 주기적 수거를 수반하는 방법을 비롯하여, 연속 대향류 원심분리 시스템에서 형질도입을 위한 다른 방법이 수행될 수 있음을 확립한다.

- [0898] 본 발명은, 예를 들어 본 발명의 다양한 측면을 예시하기 위해 제공된 특정한 개시된 실시양태로 범주가 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 기재된 조성물 및 방법에 대한 다양한 변형은 본원의 설명 및 교시로부터 명백해질 것이다. 이러한 변형은 본 개시내용의 진정한 범주 및 취지로부터 벗어나지 않으면서 실시될 수 있고, 본 개시내용의 범주 내에 속하는 것으로 의도된다.

[0899] 서열

SEQ ID NO	서열	설명
1	ESKYGPPCPPCP	스페이서 (IgG4힌지) (aa)
2	gaatctaagtacggaccgcccctgcccccttgcct	스페이서 (IgG4힌지) (nt)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	힌지-CH3 스페이서
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNATKTPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK	힌지-CH2-CH3 스페이서
5	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLDKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPV KLSLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSHEDSR TLLNASRSLEVSYVTDH	IgD-힌지-Fc
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNIGIGEFKDSLSINATNIHKFNCTSSISGDLHLPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGC TGPGLGCPPTNGPKIPSIATGMVGALLLVVALGIGLFM	tEGFR
8	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIHFWV	CD28 (수탁 번호 P10747의 아미노산 153-179)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIHFWV	CD28 (수탁 번호 P10747의 아미노산 114-179)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (P10747의 아미노산 180-220)

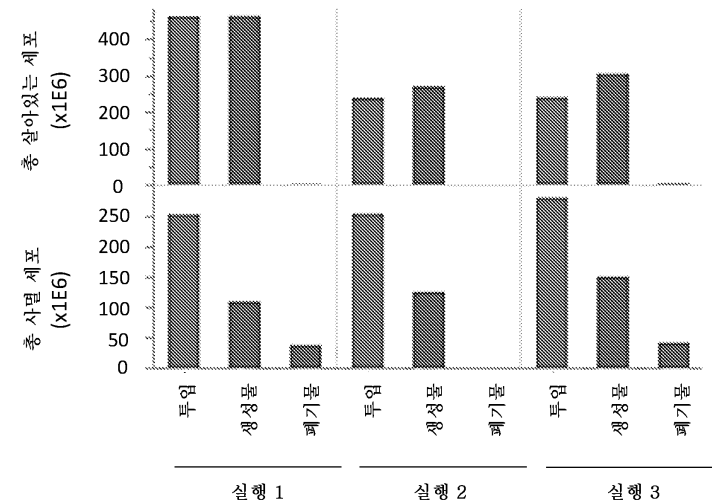
[0900]

11	RSKRSRGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL에서 GG)
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSRFEEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1의 아미노산 214-255)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 제타
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 제타
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 제타
16	RKVCNIGIGIEFKDLSINATNIHFKNCTSSISGDLHLPVAFRGDS FTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIR GRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYA NTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCW GPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPE CLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNT LVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPGPKIPSIATG MVGALLLLVVALGIGLFM	IEGFR
17	EGRGSLTCGDVEENPGP	T2A
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-(SGGGG) ₃ -P- 여기서 P는 프롤린이고, G는 글리신이고, S는 세린임	링커
23	GSADDAKKDAAKKDGS	링커
24	atgcttctctcgttgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattctctctgatcca	GMCSFR 알파 체 신호 서열
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFR 알파 체 신호 서열
26	MALPVTALLPLALLHA	CD8 알파 신호 캡티드

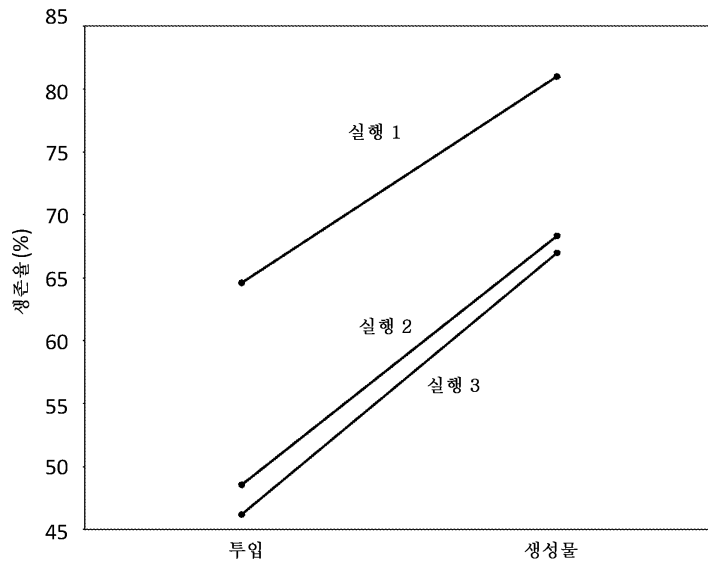
[0901]

도면

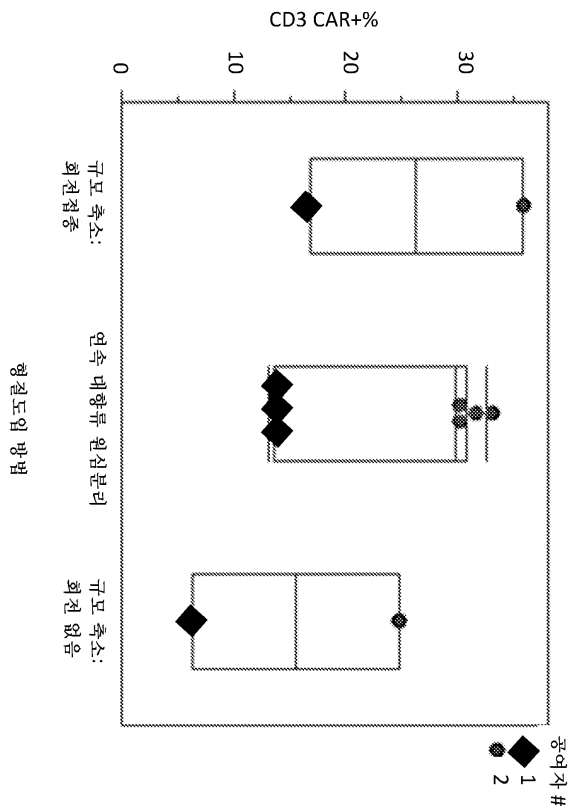
도면1a



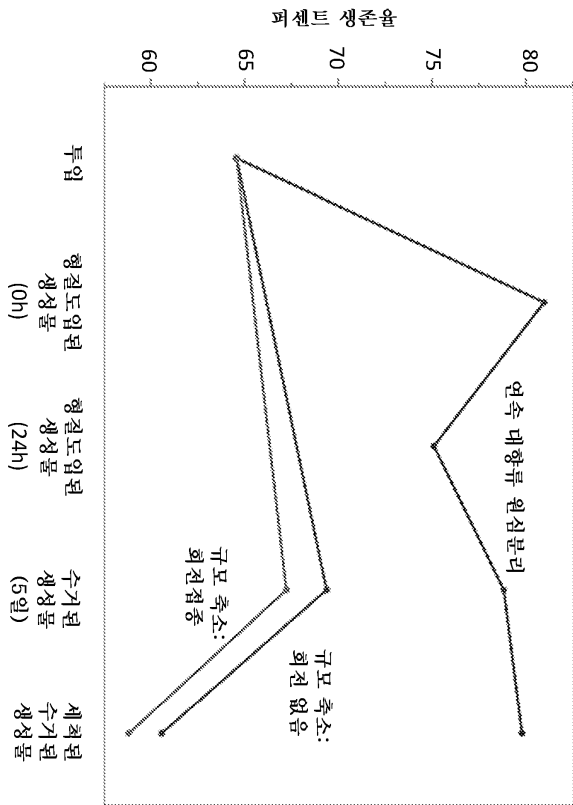
도면1b



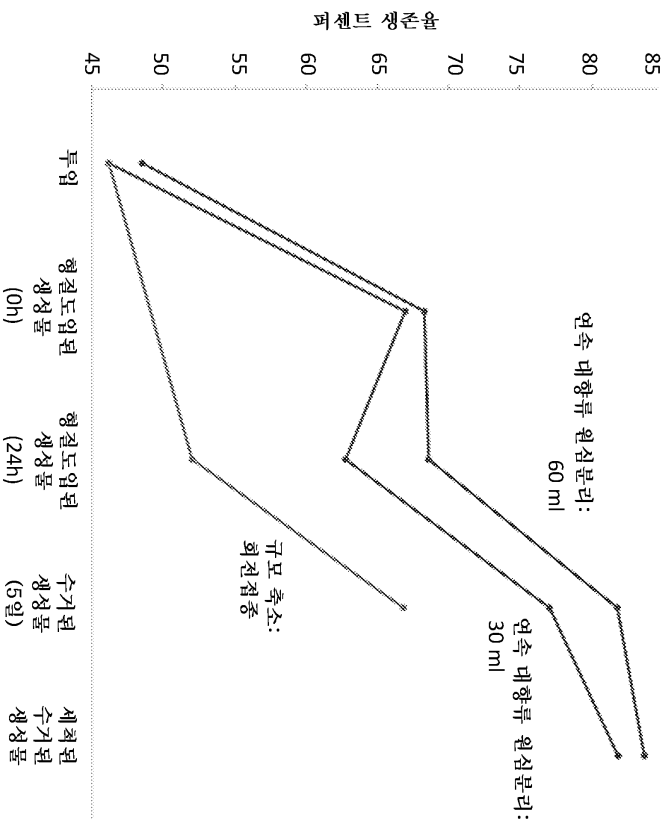
도면2a



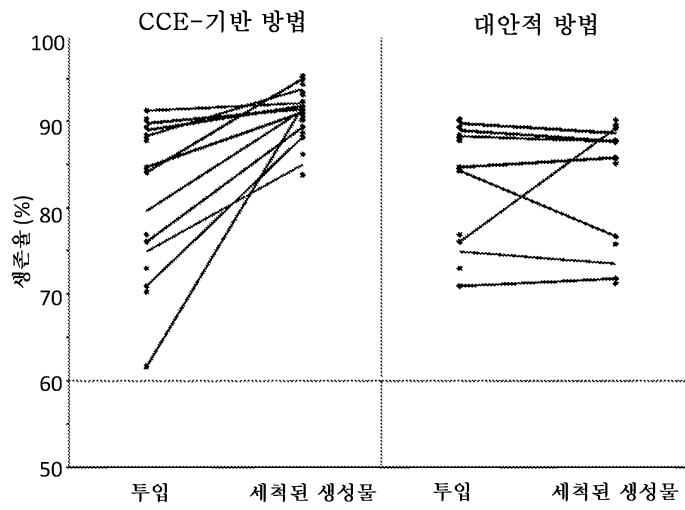
도면2b



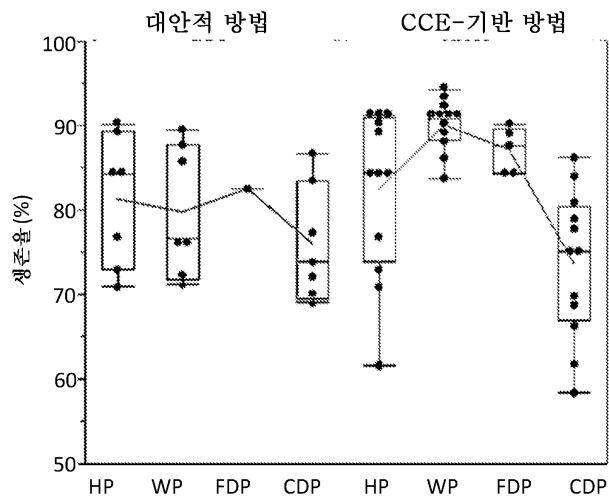
도면3



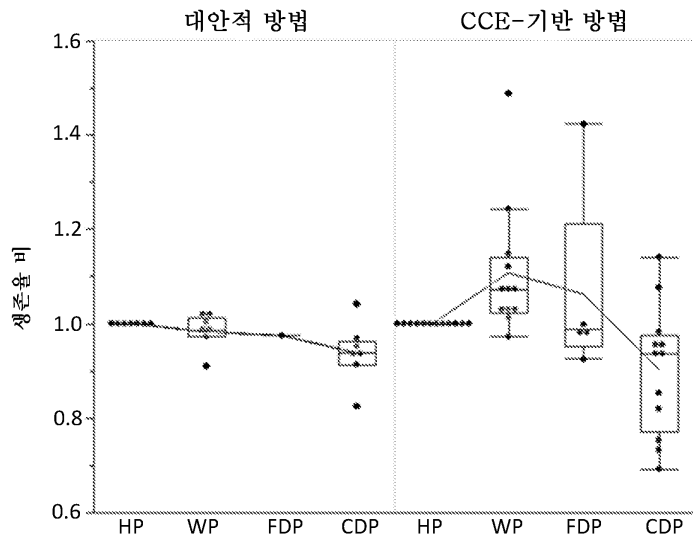
도면4a



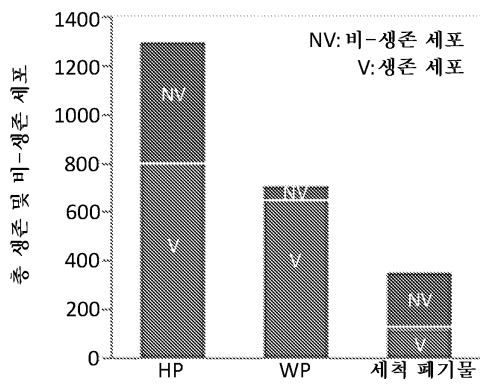
도면4b



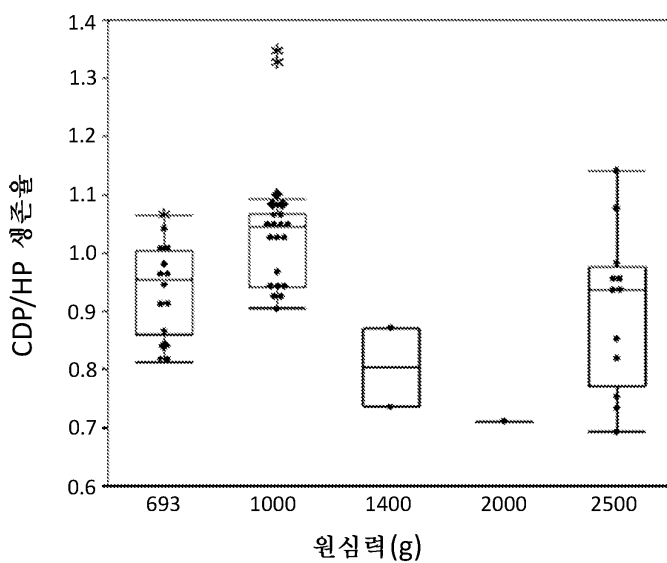
도면4c



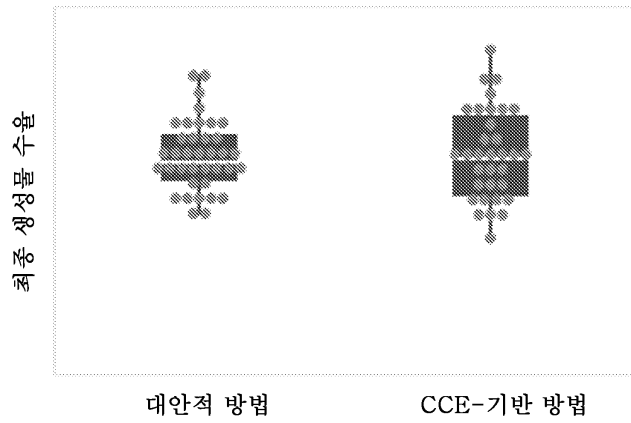
도면4d



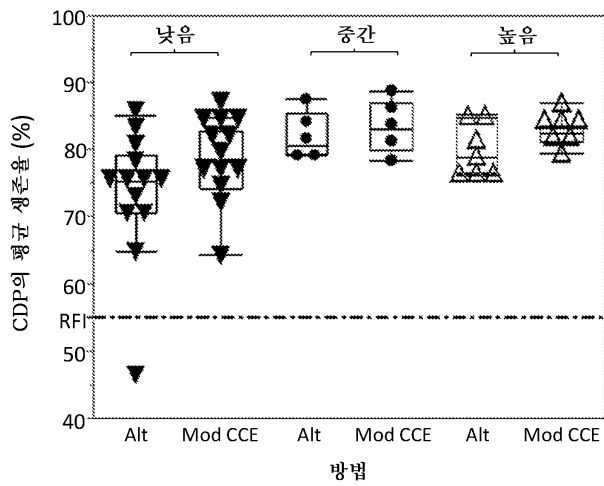
도면4e



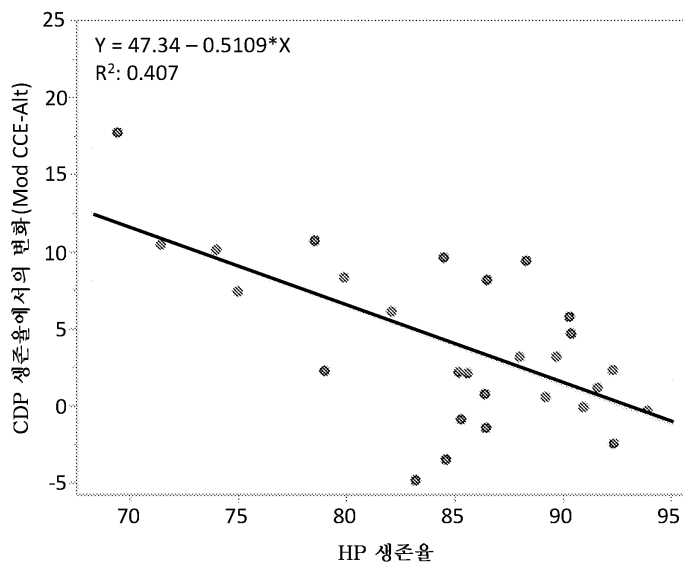
도면4f



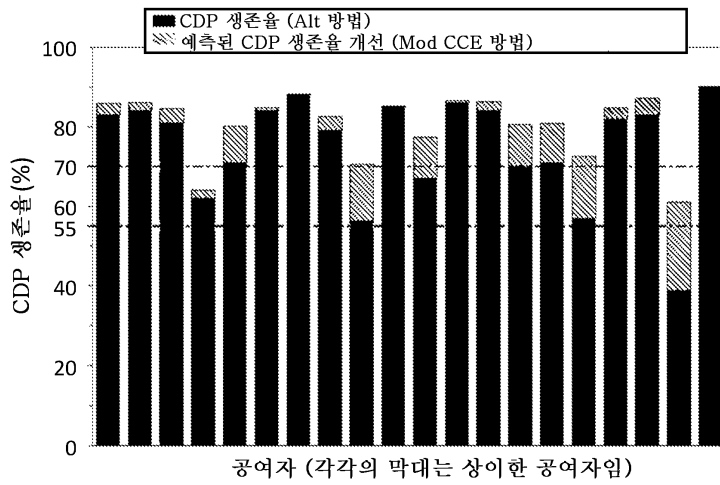
도면4g



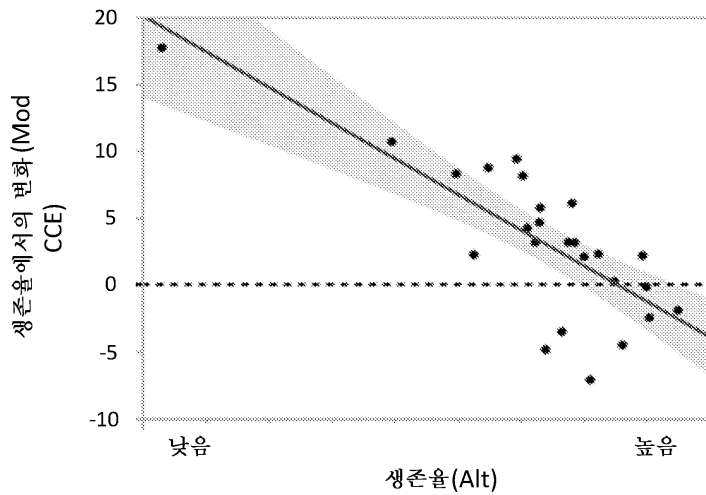
도면4h



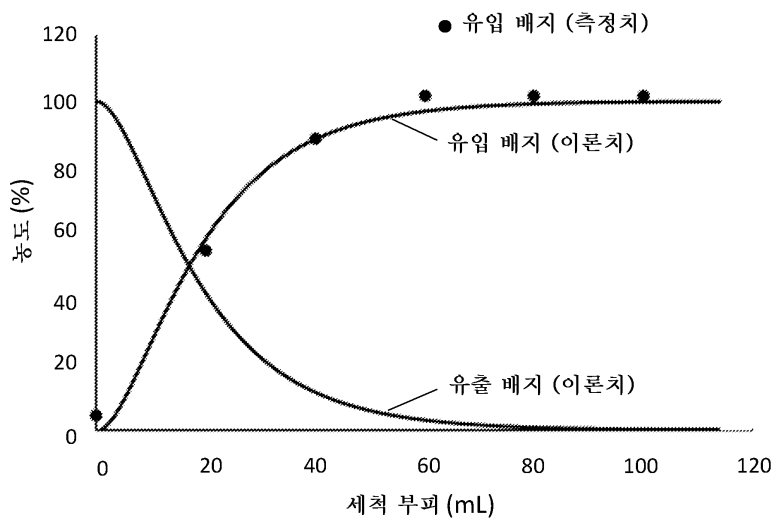
도면4i



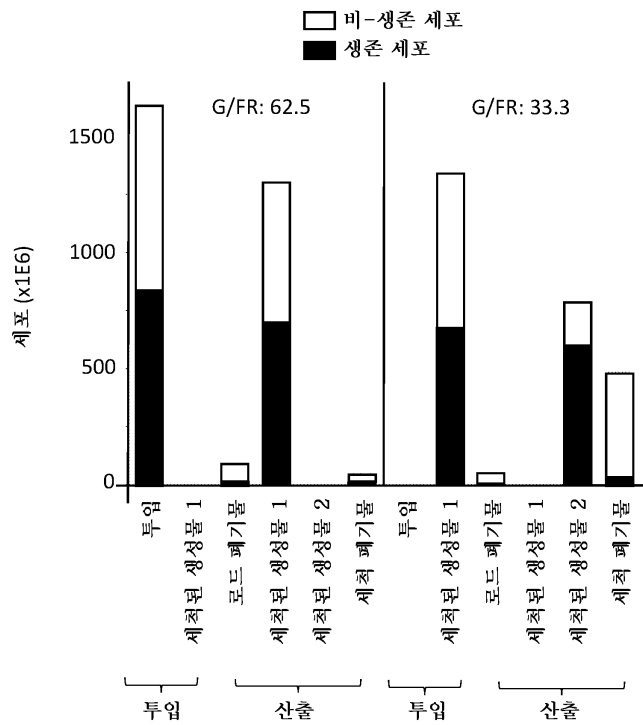
도면4j



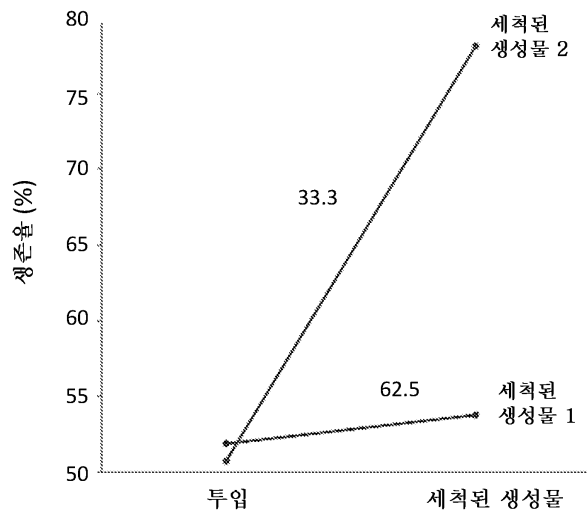
도면4k



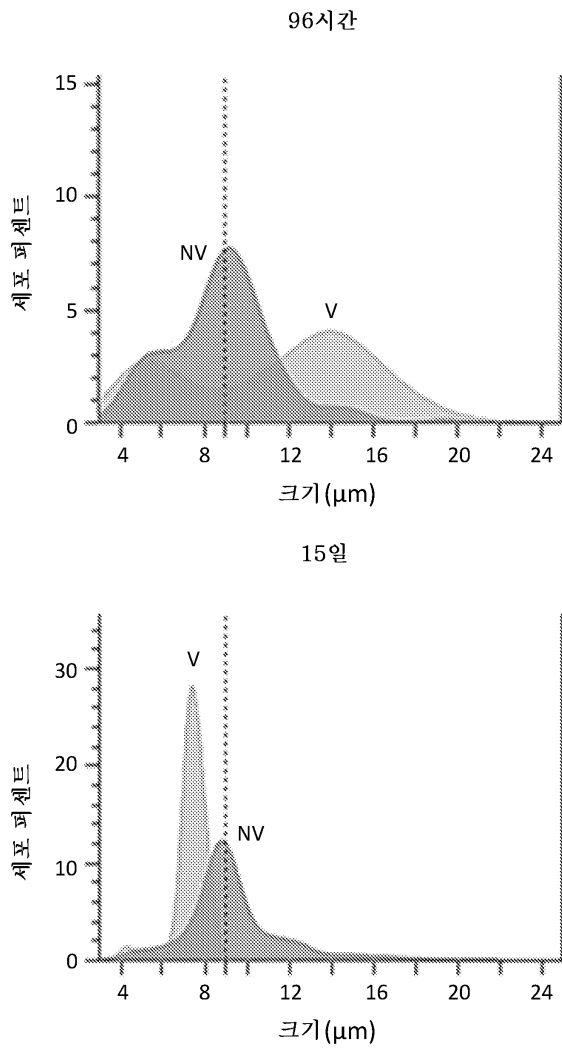
도면5a



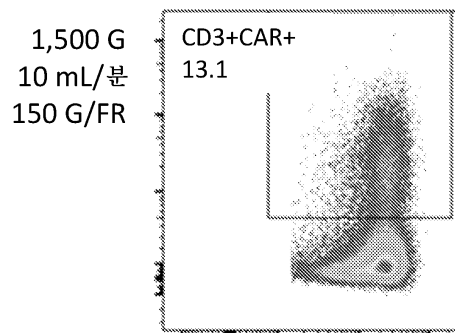
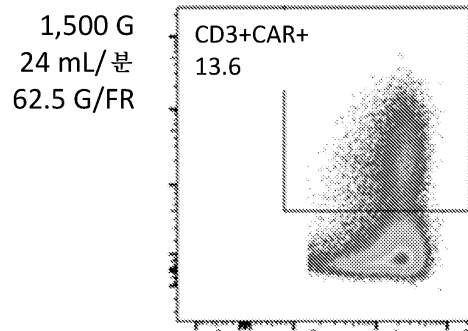
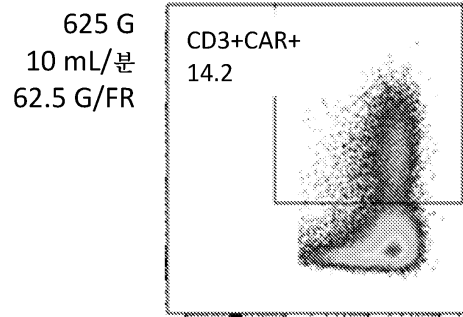
도면5b



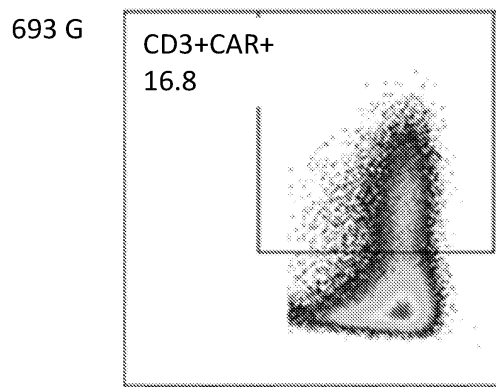
도면5c



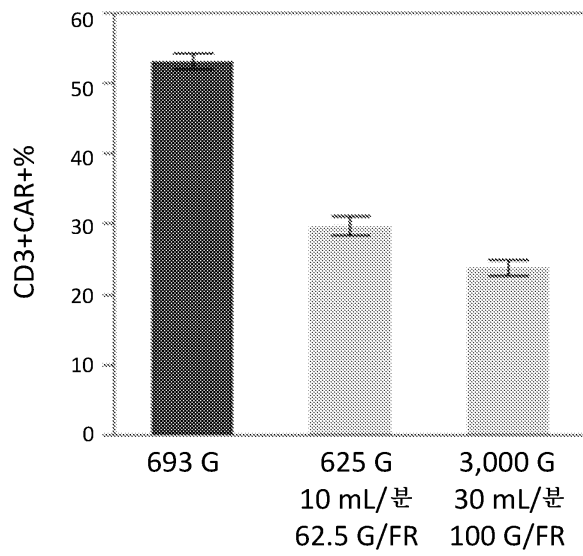
도면6a



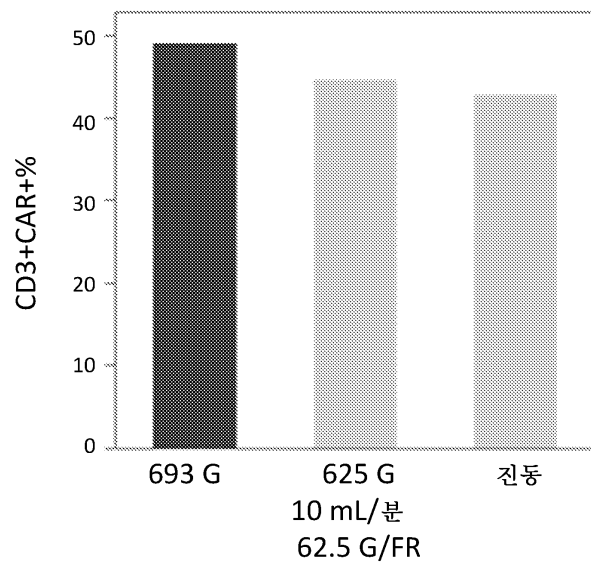
도면6b



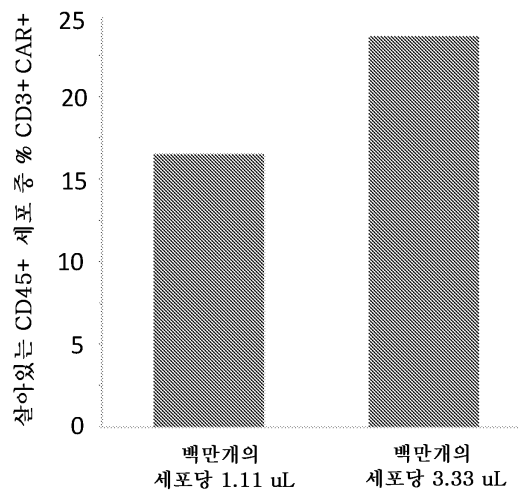
도면6c



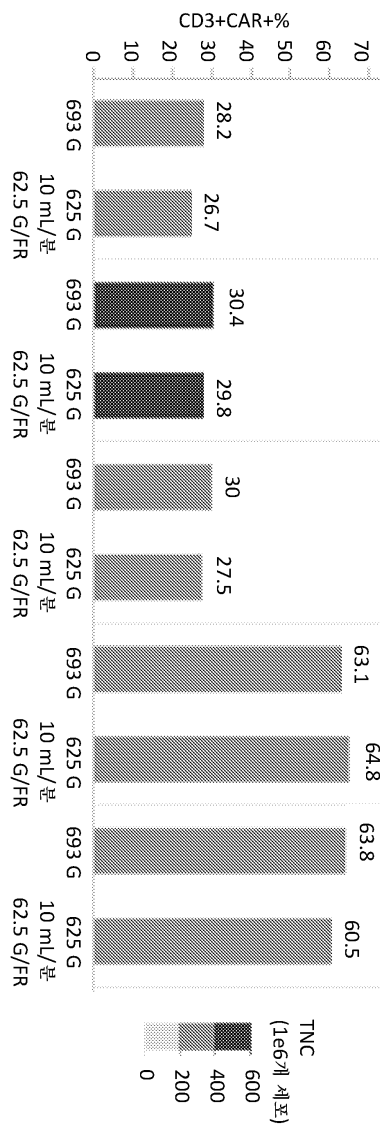
도면6d



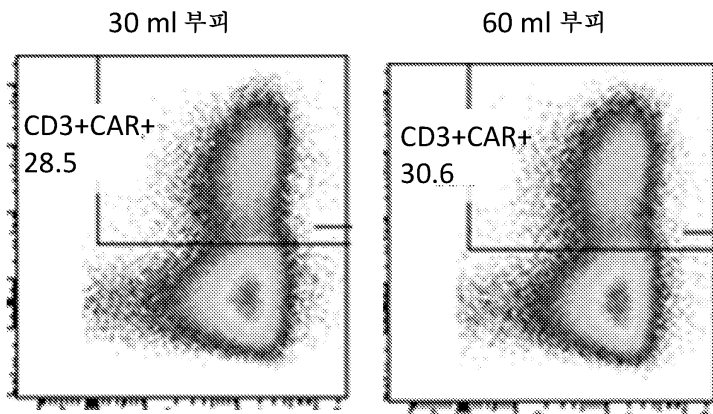
도면7a



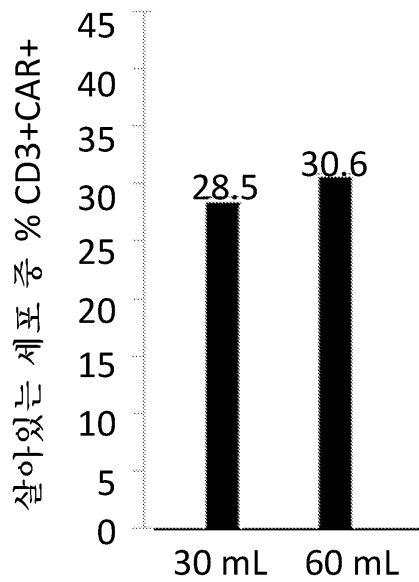
도면7b



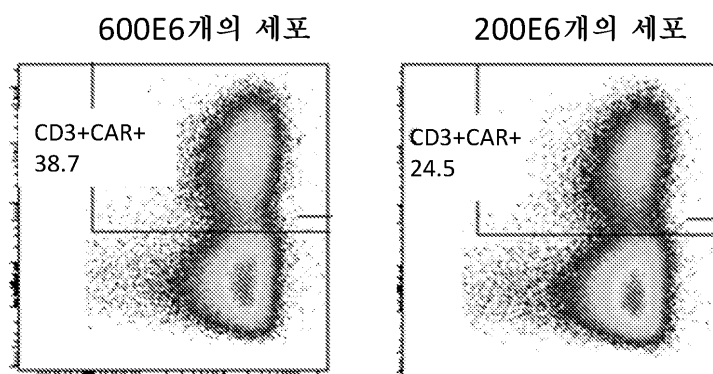
도면8a



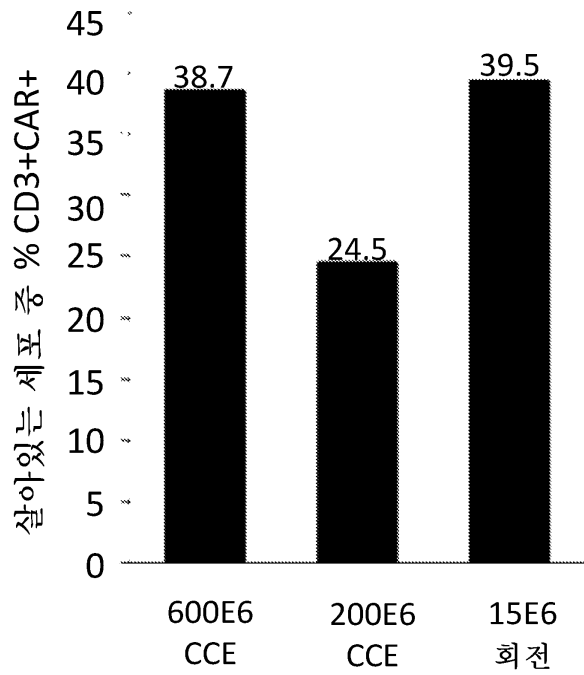
도면8b



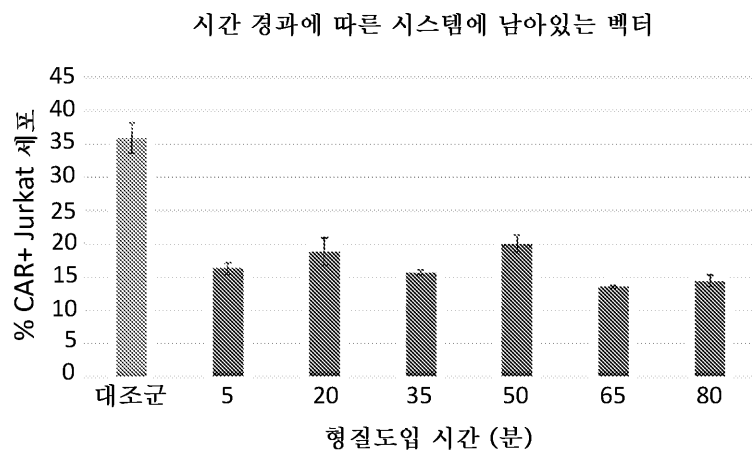
도면9a



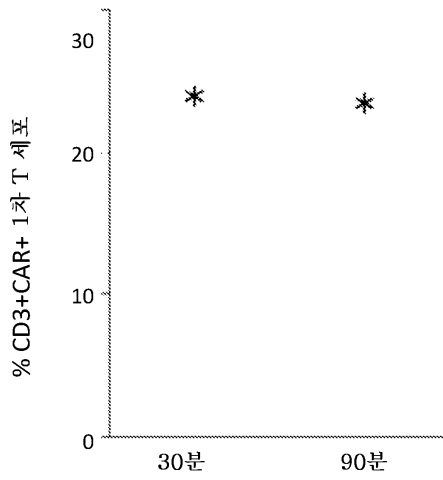
도면9b



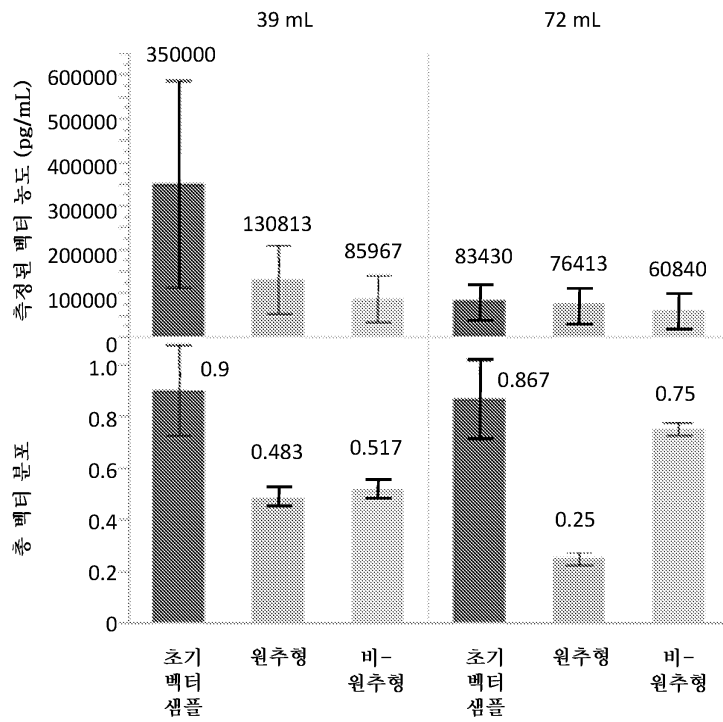
도면10a



도면10b



도면11



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.