

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0152220

(43) 공개일자 2022년11월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/17 (2015.01) A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01) C07K 16/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/17 (2013.01)

A61K 39/001112 (2018.08)

(21) 출원번호 10-2022-7030939

(22) 출원일자(국제) 2021년02월11일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년09월06일

(86) 국제출원번호 PCT/US2021/017739

(87) 국제공개번호 WO 2021/163391

국제공개일자 2021년08월19일

(30) 우선권주장

62/975,724 2020년02월12일 미국(US)

(71) 출원인

주노 세리퓨티크스 인코퍼레이티드

미국 워싱턴 98109 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400

(72) 발명자

웨스토비, 매튜

미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400

브릭스, 아드리안 랭햄

미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인이름리온

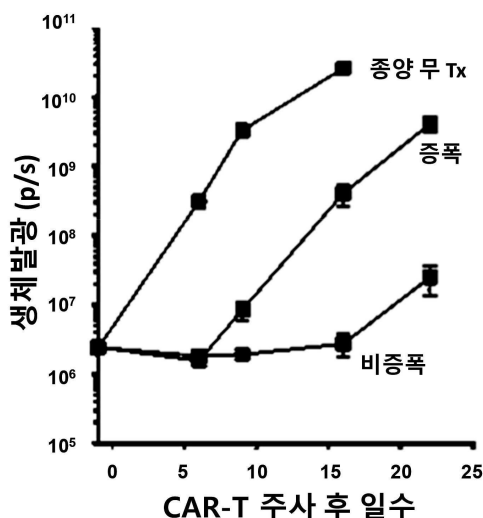
전체 청구항 수 : 총 118 항

(54) 발명의 명칭 C D19-지시된 키메라 항원 수용체 T 세포 조성물 및 이의 방법 및 용도

(57) 요약

일부 측면에서, 비호지킨 림프종(NHL)과 같은 질병 및 병태를 가진 대상체를 치료하기 위한 세포들의 조성물, 및 그와 관련된 방법, 조성물, 용도 및 제조품이 제공된다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 B 세포 비호지킨 림프종(B 세포 NHL)이다. 상기 세포는 일반적으로 상기 림프종의 세포 상에서 CD19와 같은 항원을 표적화하기 위한 키메라 항원 수용체(CAR)와 같은 재조합 수용체를 발현한다.

대표도 - 도11a



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C07K 14/70575 (2013.01)
C07K 16/2803 (2013.01)
A61K 2039/5156 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C07K 2319/03 (2013.01)

(72) 발명자

쿠글러, 데이비드 지.

미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터
 애비뉴 노스 400

캐스페리, 로버트 가이

미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터
 애비뉴 노스 400

찬, 켈빈

미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터
 애비뉴 노스 400

바룬, 디브야

미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터
 애비뉴 노스 400

젤메로스, 로살

독일, 뮌헨 81675 그릴팔젤스트라쎄 10

스탬페르게르, 크리스찬

독일, 뮌헨 81675 그릴팔젤스트라쎄 10

폴토락, 매쉴즈 파웰

독일, 뮌헨 81675 그릴팔젤스트라쎄 10

마슈어, 킨

미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터
 애비뉴 노스 400

마투레비치, 오렉산드르

미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터
 애비뉴 노스 400

키라부즈, 넬절

미국, 뉴저지 07901, 모리스 애비뉴 서밋 86

헤지, 크리스텐

미국, 뉴저지 07901, 모리스 애비뉴 서밋 86

벌게스, 마이클

미국, 뉴저지 07901, 모리스 애비뉴 서밋 86

우, 카이다

미국, 뉴저지 07901, 모리스 애비뉴 서밋 86

살몬, 루스 아만다

미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터
 애비뉴 노스 400

명세서

청구범위

청구항 1

B 세포 비호지킨 림프종(r/r B 세포 NHL)을 치료하는 방법으로서,

상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되,

상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 CD8⁺ T 세포를 포함하고;

상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 100×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고;

상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 CD3⁺ 세포이며; 그리고

상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 나이브(naive)-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 2

B 세포 비호지킨 림프종(r/r B 세포 NHL)을 치료하는 방법으로서,

상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되,

상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 CD8⁺ T 세포를 포함하고;

상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 100×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고;

상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 CD3⁺ 세포이며; 그리고

상기 조성물 중 CD4⁺CAR⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는 CD27⁺CCR7⁺이고/거나 상기 조성물 중 CD8⁺CAR⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는 CD27⁺CCR7⁺인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 CD8⁺ T 세포를 약 1:2.5 내지 약 2.5:1의 비로 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 CD8⁺ T 세포를 약 1:2 내지 약 2:1, 약 1:1.5 내지 약 1.5:1, 또는 (약) 1:1의 비로 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 $CD8^{+}$ T 세포를 약 1:1 내지 약 2.5:1, 약 1.5:1 내지 약 2:1, (약) 1.5:1, 또는 (약) 2:1의 비로 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 50×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 25×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 10×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 (약) 10×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 25×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 (약) 10×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은 (약) 25×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 90%는 $CD3^+$ 세포인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 91%, 적어도 또는 적어도 약 92%, 적어도 또는 적어도 약 93%, 적어도 또는 적어도 약 94%, 적어도 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 또는 적어도 약 96%는 $CD3^+$ 세포인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 5% 내지 (약) 30%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 10% 내지 (약) 15%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 15% 내지 (약) 20%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 20% 내지 (약) 25%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 19

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 25% 내지 (약) 30%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 20

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 5%, (약) 10%, (약) 15%, (약) 20%, (약) 25%, 또는 (약) 30%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 21

제2항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 80% 내지 (약) 85%는 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 23

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 85% 내지 (약) 90%는 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 24

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 90% 내지 (약) 95%는 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 25

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 95% 내지 (약) 99%는 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 85%, (약) 90%, (약) 95%, 또는 (약) 99%는 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 27

제1항 및 제3항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 CAR^+ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 나이브-유사 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서,

나이브-유사 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 상기 표지자는 CD45RA, CD27, CD28, 및 CCR7로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 29

제1항 및 제3항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 CAR^+ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^+$, $\text{CD27}^+\text{CCR7}^+$, 또는 $\text{CD62L}^-\text{CCR7}^+$ 에서 선택되는 표현형을 갖는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 80% 내지 (약) 85%, (약) 85% 내지 (약) 90%, (약) 90% 내지 (약) 95%, 또는 (약) 95% 내지 (약) 99%는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^+$, $\text{CD27}^+\text{CCR7}^+$, 또는 $\text{CD62L}^-\text{CCR7}^+$ 에서 선택되는 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 31

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 80%, (약) 85%, (약) 90%, (약) 95%, 또는 (약) 99%는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^+$, $\text{CD27}^+\text{CCR7}^+$, 또는 $\text{CD62L}^-\text{CCR7}^+$ 에서 선택되는 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 80%, (약) 85%, (약) 90%, (약) 95%, 또는 (약) 99%는, $\text{CD27}^+\text{CCR7}^+$ 인 나이

브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는, $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 인 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 60%는, $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 인 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 70%는, $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 인 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는, $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 인 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 85%는, $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 인 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는, $CD27^+CCR7^+$ 인 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 60%는, $CD27^+CCR7^+$ 인 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 70%는, $CD27^+CCR7^+$ 인 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는, $CD27^+CCR7^+$ 인 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 85%는, $CD27^+CCR7^+$ 인 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD8^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는, $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 인 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD8^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 60%는, $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 인 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD8^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 70%는, $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 인 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD8^{+}CAR^{+}$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는, $CCR7^{+}CD45RA^{+}$ 또는 $CCR7^{+}CD45RA^{-}$ 인 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD8^{+}CAR^{+}$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 85%는, $CCR7^{+}CD45RA^{+}$ 또는 $CCR7^{+}CD45RA^{-}$ 인 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 48

제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD8^{+}CAR^{+}$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는, $CD27^{+}CCR7^{+}$ 인 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD8^{+}CAR^{+}$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 60%는, $CD27^{+}CCR7^{+}$ 인 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 50

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD8^{+}CAR^{+}$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 70%는, $CD27^{+}CCR7^{+}$ 인 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 51

제1항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD8^{+}CAR^{+}$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는, $CD27^{+}CCR7^{+}$ 인 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 $CD8^{+}CAR^{+}$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 85%는, $CD27^{+}CCR7^{+}$ 인 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 53

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 상기 CAR^+ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(integrated vector copy number, iVCN)의 분율(fraction)은 평균적으로 (약) 0.9 미만인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 54

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 상기 CAR^+ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.9 내지 (약) 0.8인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 55

제1항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 상기 CAR^+ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.8 미만인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 56

제1항 내지 제53항 및 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 상기 CAR^+ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.8 내지 (약) 0.7인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 57

제1항 내지 제53항 및 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 상기 CAR^+ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.7 내지 (약) 0.6인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 58

제1항 내지 제53항 및 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 상기 CAR^+ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.6 내지 (약) 0.5인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 59

제1항 내지 제53항 및 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 상기 CAR^+ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.5 내지 (약) 0.4인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 60

제1항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 상기 CAR^+ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적으로 2배체 게놈 당 (약) 0.4개 카피 내지 2배체 게놈 당 3.0개 카피(수치포함)인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 61

제1항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 상기 CAR^+ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적으로 2배체 게놈 당 (약) 0.8개 카피 내지 2배체 게놈 당 2.0개 카피(수치포함)인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 62

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 상기 CAR^+ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적으로 2배체 게놈 당 (약) 0.8개 카피 내지 2배체 게놈 당 1.0개 카피(수치포함)인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 63

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 상기 CAR^+ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적으로 2배체 게놈 당 (약) 1.0개 카피 내지 2배체 게놈 당 1.5개 카피(수치포함)인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 64

제1항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물 중 상기 CAR^+ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적으로 2배체 게놈 당 (약) 1.5개 카피 내지 2배체 게놈 당 2.0개 카피(수치포함)인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 65

제1항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 B 세포 NHL은: 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 선택적으로 DLBCL NOS(달리 명시되지 않음); 형질전환된 DLBCL, 선택적으로 여포성 림프종 또는 변연부 림프종으로부터 형질전환된 DLBCL; 고등급 B 세포 림프종(HGBCL), 선택적으로 MYC와 BCL2 및/또는 BCL6 재배열을 갖고 DLBCL 조직 구조를 갖는 HGBCL; 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종(PMBCL); 및 여포성 림프종(FL), 선택적으로 3b 등급 여포성 림프종(FL3B)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 66

제1항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서,

조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여 시점에 또는 투여 시점 직전에, 상기 대상체는 (i) 상기 B 세포 NHL에 대한 둘 이상의 선행 요법 및/또는 (ii) 자가 줄기세포 이식(ASCT) 요법을 이용해 치료 후 관해된 이후에 재발했거나, 이에 대해 불응성이 된 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 67

제66항에 있어서,

상기 B 세포 NHL에 대한 둘 이상의 선행 요법은 안트라사이클린 및 CD20-표적화 제제를 포함하고, 선택적으로 상기 CD20-표적화 제제는 리툭시맵을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 68

제1항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 대상체는 선행 CAR T 세포 또는 유전자 변형 T 세포 요법을 받지 않은 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 69

제1항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서,

조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물을 제조하기 위해 상기 대상체로부터 백혈구 성분채집술 샘플을 수득하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 투여 전에, 상기 대상체는 림프구 고갈 요법으로 사전 조절된 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 71

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여 직전에, 상기 대상체에 림프구 고갈 요법을 투여하는 단계를 더 포함하되, 상기 림프구 고갈 요법은 플루다라빈 및/또는 시클로포스파미드의 투여를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 72

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서,

조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물 및/또는 상기 림프구 고갈 요법의 투여는 통원환자(outpatient) 전달을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 73

제70항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 림프구 고갈 요법은 3일 동안 각각 매일 $30\text{mg}/\text{m}^2$ (상기 대상체의 체표면적)의 플루다라빈 및 매일 $300\text{mg}/\text{m}^2$

(상기 대상체의 체표면적)의 시클로포스파미드의 투여를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 74

제70항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서,

조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물은 상기 림프구 고갈 요법의 완료 후, (약) 48시간 내지 (약) 9일(수치 포함) 사이에 투여되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 75

제1항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서,

신경 독성 및/또는 사이토카인 방출 증후군 또는 이의 위험의 치료, 예방, 감소, 또는 약화를 위한 제제 또는 치료제를 상기 대상체에 투여하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 76

제75항에 있어서,

상기 제제는 항-IL-6 항체, 항-IL-6 수용체 항체, 또는 스테로이드이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 77

제75항 또는 제76항에 있어서,

상기 제제는 토실리주맙 또는 메틸프레드니솔론이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 78

제1항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 T 세포는 상기 대상체에 대해 자가(autologous)인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 79

제1항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 35%, 적어도 40% 또는 적어도 50%는 완전 반응(CR)을 달성하고;

CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 또는 6개월 이상 동안 지속되는 CR을 나타내고; 및/또는

1개월까지 및/또는 3개월까지 CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 상기 CR을 달성한 후 3개월 이상 및/또는 6개월 이상 및/또는 9개월 이상 동안 반응을 유지하고, CR을 유지하고, 및/또는 생존하거나 진행 없이 생존하고; 및/또는

상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 50%, 적어도 60% 또는 적어도 70%는 객관적 반응(OR)을 달성하고;

OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 또는 6개월 이상 동안 지속되는

OR을 나타내고; 및/또는

OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 35%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%는 상기 OR을 달성한 후 3개월 이상 동안 및/또는 6개월 이상 동안 반응을 유지하거나 생존하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 80

제1항 내지 제79항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포는 상기 대상체에 대해 자가(autoologous)이고,

성분채집술을 위한 최소 절대 림프구 수(ALC)는 상기 요법의 생산을 위해 요구 및/또는 명시되지 않고; 및/또는

상기 세포는, 상기 B 세포 NHL이 있는 대상체들 중 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%에 대해, 상기 방법에 따른 투여를 위한 세포 생성물을 생성할 수 있는 공정에 의해 생산되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 81

제1항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 50%, (약) 60%, (약) 70%, 또는 (약) 80% 넘는 대상체가 3급 이상의 사이토카인 방출 증후군(CRS)을 나타내지 않고/거나 3급 이상의 신경 독성을 나타내지 않고/거나, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 40% 또는 50% 또는 55% 넘는 대상체가 신경 독성 또는 CRS의 어느 것도 나타내지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 82

제1항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 80% 넘는 대상체가 3급 이상의 사이토카인 방출 증후군(CRS)을 나타내지 않고/거나 3급 이상의 신경 독성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 83

제1항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 95% 넘는 대상체가 3급 이상의 CRS를 나타내지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 84

제1항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 85% 넘는 대상체가 3급 이상의 신경 독성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 85

제1항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 30%, (약) 35%, (약) 40%, 또는 (약) 50% 넘는 대상체가 사이

토카인 방출 증후군(CRS) 또는 신경 독성의 어느 등급도 나타내지 않고/거나;

상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 (약) 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는 상기 투여의 개시 이후 3일보다 이전에 CRS의 개시를 나타내지 않고/거나 상기 투여의 개시 이후 5일보다 이전에 신경 독성의 개시를 나타내지 않고/거나;

상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 신경 독성의 중앙값 개시는 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들에서 CRS의 중앙값 피크 또는 그 이후, 또는 CRS의 분해능까지의 중앙값 시간이고/거나, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 신경 독성의 중앙값 개시는 (약) 8, 9, 10, 또는 11일보다 큰 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 86

제1항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 50%는 완전 반응(CR)을 달성하고;

상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 70%는 객관적 반응(OR)을 달성하고;

상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 50% 넘는 대상체가 사이토카인 방출 증후군(CRS) 또는 신경 독성의 어느 등급도 나타내지 않고;

상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 80% 넘는 대상체가 3급 이상의 사이토카인 방출 증후군(CRS)을 나타내지 않고/거나 3급 이상의 신경 독성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 87

제1항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CAR은 CD19에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 선택적으로 4-1BB인 공자극 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인, 및 선택적으로 CD3제타인 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인을 포함하거나;

상기 CAR은 CD19에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 공자극 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인, 및 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인을 순서대로 포함하거나;

상기 CAR은 CD19에 특이적으로 결합하는 세포외 항원 인식 도메인, 막관통 도메인, 및 CD3-제타(CD3ζ) 사슬을 포함하는 세포내 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인인 공자극 신호전달 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 88

제1항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CAR은 CD19에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 4-1BB인 공자극 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인, 및 CD3제타인 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 89

제87항 또는 제88항에 있어서,

상기 세포외 항원 결합 도메인은 scFv인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 90

제89항에 있어서,

상기 scFv는 RASQDISKYLN(서열 번호: 35)의 아미노산 서열, SRLHSGV(서열 번호: 36)의 아미노산 서열, GNTLPYTFG(서열 번호: 37)의 아미노산 서열, DYGVN(서열 번호: 38)의 아미노산 서열, VIWGSETTYNSALKS(서열 번호: 39)의 아미노산 서열, YAMDYWG(서열 번호: 40)의 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 91

제89항 또는 제90항에 있어서,

상기 scFv는 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 FMC63의 가변 경쇄 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 92

제89항 내지 제91항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 scFv는 서열 번호: 43에 제시되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 93

제87항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서,

공자극 분자로부터 유래된 상기 세포질 신호전달 도메인은 4-1BB의 신호전달 도메인이고, 선택적으로 공자극 분자로부터 유래된 상기 세포질 신호전달 도메인은 서열 번호: 12 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 94

제87항 내지 제93항 중 어느 한 항에 있어서,

1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 상기 세포질 신호전달 도메인은 CD3제타 신호전달 도메인이고, 선택적으로 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 상기 세포질 신호전달 도메인은 서열 번호: 13, 14 또는 15 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 95

제87항 내지 제94항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CAR은 상기 막관통 도메인과 상기 세포외 항원 결합 도메인 사이에 스페이서를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 96

제95항에 있어서,

상기 스페이서는 면역글로불린 힌지 또는 이의 변형된 버전, 선택적으로 IgG4 힌지 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성된 폴리펩타이드 스페이서인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 97

제95항 또는 제96항에 있어서,
상기 스페이서는 (약) 12개의 아미노산 길이인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 98

제96항 내지 제97항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 스페이서는 서열 번호: 1의 서열 또는 서열 번호: 2에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 이로 구성된 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 99

제95항 내지 제98항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 스페이서는 서열 번호: 1의 서열을 포함하는 폴리펩타이드 스페이서이고;
공자극 분자로부터 유래된 상기 세포질 신호전달 도메인은 서열 번호: 12를 포함하고;
1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 상기 세포질 신호전달 도메인은 서열 번호: 13, 14 또는 15를 포함하고;
상기 세포외 항원 결합 도메인은 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 FMC63의 가변 경쇄 영역을 포함하는 scFv를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 100

제87항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 막관통 도메인은 CD28 유래 막관통 도메인이고, 선택적으로 서열 번호: 8에 제시된 아미노산의 서열 또는 서열 번호: 8에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산의 서열을 포함하는 막관통 도메인인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 101

제96항 내지 제100항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 CAR은 N-말단에서 C-말단으로: 서열 번호: 43에 제시된 scFv인 세포외 항원 결합 도메인, 서열 번호: 1에 제시된 스페이서, 서열 번호: 8에 제시된 막관통 도메인, 서열 번호: 12에 제시된 4-1BB 공자극 신호전달 도메인, 및 서열 번호: 13에 제시된 CD3-제타(CD3ζ) 사슬의 신호전달 도메인을 순서대로 함유하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 102

제1항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서,
조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물은:
(i) 1차 T 세포를 포함하는 투입 조성물- 상기 투입 조성물은 선택적으로 상기 대상체로부터 선택된 자가 T 세포를 포함함-을 T 세포를 자극하는 조건 하에 복수의 스트렙타비딘 뮤테인 분자를 포함하는 올리고머성 입자 시약을 포함하는 자극 시약과 노출시키고, 그에 의해 자극된 집단을 생성하는 단계-상기 올리고머성 입자 시약은

항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제1 제제 및 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 제제를 포함함-;

(ii) 상기 자극된 집단의 T 세포 내로 CD19를 표적화하는 CAR을 암호화하는 이중 폴리뉴클레오타이드를 도입하고, 그에 의해 형질전환된 세포의 집단을 생성하는 단계;

(iii) 상기 형질전환된 세포의 집단을 최대 96시간 동안 인큐베이션하는 단계; 및

(iv) 상기 형질전환된 세포의 집단의 T 세포를 수확하고, 이에 의해 조작된 세포의 조성물을 생산하는 단계-상기 수확은 상기 자극 시약에 노출이 개시된 후 24 내지 120시간 시점에(수치 포함) 수행됨-;

를 포함하는 제조 공정에 의해 생산되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 103

제102항에 있어서,

상기 항-CD3 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab이고 상기 항-CD28 항체 또는 항원 결합 단편은 Fab인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 104

제102항 또는 제103항에 있어서,

상기 제1 제제 및 상기 제2 제제 각각은 상기 제1 제제 및 상기 제2 제제를 상기 올리고머성 입자 시약에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘-결합 펩타이드를 포함하고, 선택적으로 상기 스트렙타비딘-결합 펩타이드는 서열 번호: 78 내지 82 중 어느 하나에 제시된 아미노산의 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 105

제102항 내지 제104항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 스트렙타비딘 뮤테인 분자는 아미노산 잔기 Val144-Thr45-Ala46-Arg47 또는 Ile44-Gly45-Ala46-Arg47을 포함하는 스트렙타비딘 뮤테인의 4량체이고, 선택적으로 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 서열 번호: 69, 84, 87, 88, 90, 85 또는 59 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 106

제102항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 올리고머성 입자 시약은 1,000 내지 5,000개 스트렙타비딘 뮤테인 4량체(수치 포함)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 107

제102항 내지 제106항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 상기 세포를 수확하기 전에 상기 인큐베이션 후에 또는 동안에 비오틴 또는 비오틴 유사체를 첨가하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 108

제102항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 수확은 상기 자극 시약에 노출이 개시된 후 48 내지 120시간 시점에(수치 포함) 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 109

제102항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 수확은 상기 케놈에서 통합 벡터가 검출되는 시점에 하지만 2배체 게놈 당 안정적 통합 벡터 카피수(iVCN)를 달성하기 전에 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 110

제102항 내지 제109항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 수확은 수확 시 생존 세포의 총 수가 상기 자극된 집단의 총 생존 세포의 수의 (약) 3배를 넘기 전 시점에 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 111

제102항 내지 제110항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 수확은 수확 시 생존 세포의 총 수가 상기 자극된 집단의 총 생존 세포의 수의 (약) 3배이거나, (약) 2배이거나, 동일하거나 거의 동일한 시점에 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 112

제102항 내지 제111항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 수확은, 상기 $CD27^+CCR7^+$ 세포의 백분율이 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 T 세포, 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 $CD3^+$ T 세포, 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 $CD4^+$ T 세포, 또는 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 $CD8^+$ T 세포 중, 또는 상기 형질전환된 세포의 집단에서 CAR-발현 세포 중 (약) 50%보다 큰 시점에 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 113

제102항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 수확은, 상기 $CD45RA^+CCR7^+$ 및 $CD45RA^-CCR7^+$ 세포의 백분율이 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 T 세포, 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 $CD3^+$ T 세포, 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 $CD4^+$ T 세포, 또는 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 $CD8^+$ T 세포 중, 또는 상기 형질전환된 세포의 집단에서 CAR-발현 세포 중 (약) 60%보다 큰 시점에 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 114

제1항 내지 제113항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 투여된 조성물 내 세포는 (i) 조작된 $CD4^+$ T 세포 및 조작된 $CD8^+$ T 세포를 포함하고 (ii) 미리 정해진 특

징을 나타내는 산출 조성물을 생산하는 제조 공정에 의해 생산되고,

여기서 상기 제조 공정의 반복은, 복수의 상이한 개별 대상체들 사이에서 수행될 때, 선택적으로 인간 생물학적 샘플로부터, 복수의 상기 산출 조성물을 생산하고, 상기 복수의 산출 조성물 중 상기 산출 조성물의 상기 미리 정해진 특징은:

약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물 내 기억 표현형의 세포의 평균 백분율;

약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물 내 중심 기억 표현형의 세포의 평균 백분율;

약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물 내 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, 그랜자임 B-, 및/또는 CD127+인 세포의 평균 백분율;

약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물 내 CCR7+/CD45RA- 또는 CCR7+/CD45RO+인 세포의 평균 백분율;

약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물의 상기 조작된 CD4+ T 세포, 선택적으로 CAR+CD4+ T 세포 내 중심 기억 CD4+ T 세포의 평균 백분율;

약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물의 상기 조작된 CD8+ T 세포, 선택적으로 CAR+CD8+ T 세포 내 중심 기억 CD8+ T 세포의 평균 백분율; 및/또는

약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물의 상기 조작된 T 세포, 선택적으로 CAR+ T 세포 내 중심 기억 T 세포, 선택적으로 CD4+ 중심 기억 T 세포 및 CD8+ 중심 기억 T 세포의 평균 백분율;

에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 115

제1항 내지 제114항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 투여되는 조성물은, 미리 정해진 특징, 선택적으로 산출 조성물에서 CAR을 발현하는 세포의 임계 수,를 복수의 상이한 개별 대상체 중에 수행되는 상기 인간 생물학적 샘플들의 적어도 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 97%, 약 99%, 약 100%, 또는 100%에서 나타내는 산출 조성물을 생산하는 제조 공정에 의해 생산되는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 116

제102항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 조작된 세포를 포함하는 상기 조성물은 상기 제조 공정으로부터 유래된 잔류 비드를 함유하지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 117

제1항 내지 제116항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 B 세포 NHL은 재발성 및/또는 불응성 B 세포 비호지킨 림프종(B 세포 NHL)인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 118

제조품으로서,

CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 유전자 조작된 세포를 포함하는 조성물, 및 제1항 내지 제117항 중 어느 한 항의 방법에 따라 상기 세포의 조성물을 투여하기 위한 설명서를 포함하는, 제조품.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2020년 02월 12일에 출원된 미국 가출원 제62/975,724호(제목 “CD19-지시된 키메라 항원 수용체 T 세포 조성물 및 이의 방법 및 용도”)의 우선권을 주장하고, 이의 내용들은 그 전체가 참조로 포함된다.

[0003]

서열 목록의 참조 포함

[0004]

본 출원은 전자 형식의 서열 목록과 함께 제출된다. 서열 목록은 2021년 2월 6일에 생성된 735042022740SEQLIST.txt라는 제목의 파일로 제공되며 이의 크기는 56.9 킬로바이트이다. 서열 목록 내 전자 형식의 정보는 그 전체가 참조로 포함된다.

[0005]

본 개시 내용은 일부 측면에서 비호지킨 림프종(NHL)과 같은 질병 및 병태를 가진 대상체를 치료하기 위해 세포들의 조성물의 투여를 포함하는 입양 세포 요법, 및 그와 관련된 방법, 조성물, 용도 및 제조품에 관한 것이다.

배경 기술

[0006]

질병 및 병태를 치료하기 위한 다양한 면역 요법 및/또는 세포 요법 방법이 이용 가능하다. 예를 들어, 입양 세포 요법(다른 입양 면역 세포 및 입양 T 세포 요법뿐만 아니라 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR) 및/또는 다른 재조합 항원 수용체와 같은 관심 질병 또는 장애에 특이적인 키메라 수용체를 발현하는 세포의 투여를 수반하는 것을 포함)은 암 또는 기타 질병 또는 장애의 치료에 유리할 수 있다. 개선된 접근법이 필요하다. 상기 필요를 충족시키는 방법, 용도 및 제조품이 제공된다.

발명의 내용

[0007]

일 측면에서, B 세포 비호지킨 림프종(B 세포 NHL)을 치료하는 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 상기 조성물은 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 및 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 포함하고, 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 25×10^6 개 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고; 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $CD3^+$ 세포이다.

[0008]

일 측면에서, B 세포 비호지킨 림프종(B 세포 NHL)을 치료하는 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 상기 조성물은 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 및 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 약 1:2.5 내지 2.5:1의 비로 포함하고, 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 100×10^6 개 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고, 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 90%는 $CD3^+$ 세포이다.

[0009]

일 측면에서, B 세포 비호지킨 림프종(B 세포 NHL)을 치료하는 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 상기 조성물은 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 및 CAR을

발현하는 CD8⁺ T 세포를 약 1:1 내지 약 2.5:1의 비로 포함하고, 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 50×10^6 개 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고, 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 CD3⁺ 세포이다.

[0010] 일 측면에서, B 세포 비호지킨 림프종(r/r B 세포 NHL)을 치료하는 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 상기 조성물은 CAR을 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 CAR을 발현하는 CD8⁺ T 세포를 포함하고, 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 100×10^6 개 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고, 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 CD3⁺ 세포이고, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형이다.

[0011] 일 측면에서, B 세포 비호지킨 림프종(r/r B 세포 NHL)을 치료하는 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 상기 조성물은 CAR을 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 CAR을 발현하는 CD8⁺ T 세포를 포함하고, 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 100×10^6 개 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고, 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 CD3⁺ 세포이고, 상기 조성물 중 CD4⁺CAR⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는 CD27⁺CCR7⁺이고/거나 상기 조성물 중 CD8⁺CAR⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는 CD27⁺CCR7⁺이다.

[0012] 일 측면에서, B 세포 비호지킨 림프종(B 세포 NHL)을 치료하는 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 상기 조성물은 CAR을 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 CAR을 발현하는 CD8⁺ T 세포를 포함하고, 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 50×10^6 개 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고, 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 96%는 CD3⁺ 세포이고, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형이다.

[0013] 일 측면에서, B 세포 비호지킨 림프종(r/r B 세포 NHL)을 치료하는 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 상기 조성물은 CAR을 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 CAR을 발현하는 CD8⁺ T 세포를 포함하고, 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 100×10^6 개 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고, 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 CD3⁺ 세포이고, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.9 미만이다.

[0014] 일 측면에서, B 세포 비호지킨 림프종(r/r B 세포 NHL)을 치료하는 방법이 본원에 제공되고, 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 상기 조성물은 CAR을 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 CAR을 발현하는 CD8⁺ T 세포를 포함하고, 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 100×10^6 개 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고, 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 CD3⁺ 세포이고, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 2배체 게놈 당 (약) 0.4개 카피 내지 2배체 게놈 당 (약) 3.0개 카피이다.

[0015] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물은 CAR을 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 CAR을 발현하는 CD8⁺ T 세포를 약 1:2.5 내지 약 2.5:1의 비로 포함한다.

[0016] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 50×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함한다(수치 포함). 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포

내지 (약) 25×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함한다(수치 포함).

[0017] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물은 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 및 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 약 1:2 내지 약 2:1, 약 1:1.5 내지 약 1.5:1, 또는 (약) 1:1의 비로 포함할 수 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물은 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 및 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 약 1:1 내지 약 2.5:1, 약 1.5:1 내지 약 2:1, (약) 1.5:1, 또는 (약) 2:1의 비로 포함할 수 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 10×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함할 수 있다(수치 포함). 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물은 (약) 10×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 25×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함할 수 있다(수치 포함). 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함할 수 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물은 (약) 10×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함할 수 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물은 (약) 25×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함할 수 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물은 (약) 50×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함할 수 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물은 (약) 100×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함할 수 있다.

[0018] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 90%는 $CD3^+$ 세포이다.

[0019] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형이다.

[0020] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 91%, 적어도 또는 적어도 약 92%, 적어도 또는 적어도 약 93%, 적어도 또는 적어도 약 94%, 적어도 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 또는 적어도 약 96%는 $CD3^+$ 세포이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 5% 내지 (약) 30%, 선택적으로 (약) 5% 내지 (약) 30%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현한다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 10% 내지 (약) 15%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현한다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 15% 내지 (약) 20%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현한다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 20% 내지 (약) 25%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현한다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 25% 내지 (약) 30%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현한다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 5%, (약) 10%, (약) 15%, (약) 20%, (약) 25%, 또는 (약) 30%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현한다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 80% 내지 (약) 85%는 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 85% 내지 (약) 90%는 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 90% 내지 (약) 95%는 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 95% 내지 (약) 99%는 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 85%, (약) 90%, (약) 95%, 또는 (약) 99%는 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형이다.

[0021] 본원의 임의의 구현예의 일부에서, 상기 세포자멸사의 표지자는 아넥신 V이다. 본원의 임의의 구현예의 일부에서, 상기 세포자멸사의 표지자는 활성 카스파제 3이다.

[0022] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형인 CAR^+ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 나이브-유사 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부 구현예에서, 나이브-유사 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 상기 표지자는 CD45RA, CD27, CD28, 및 CCR7로 구성된 군에서 선택된다.

브-유사 또는 중심 기억 표현형이다. 임의의 구현예의 일부에서, 상기 조성물 중 $CD8^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 85%는, $CD27^+CCR7^+$ 인 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형이다.

[0028]

본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 나이브-유사 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 본원의 임의의 구현예에서, 나이브-유사 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 상기 표지자는 $CD45RA$, $CD27$, $CD28$, 및 $CCR7$ 로 구성된 군에서 선택된다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $CCR7^+CD45RA^+$, $CD27^+CCR7^+$, 및/또는 $CD62L^-CCR7^+$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 80% 내지 (약) 85%, (약) 85% 내지 (약) 90%, (약) 90% 내지 (약) 95%, 또는 (약) 95% 내지 (약) 99%는 $CCR7^+CD45RA^+$, $CD27^+CCR7^+$, 및/또는 $CD62L^-CCR7^+$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 80%, (약) 85%, (약) 90%, (약) 95%, 또는 (약) 99%는 $CCR7^+CD45RA^+$, $CD27^+CCR7^+$, 및/또는 $CD62L^-CCR7^+$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 80%, (약) 85%, (약) 90%, (약) 95%, 또는 (약) 99%는 $CD27^+CCR7^+$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는 $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 60%는 $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 70%는 $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 85%는 $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는 $CD27^+CCR7^+$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 60%는 $CD27^+CCR7^+$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 70%는 $CD27^+CCR7^+$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $CD27^+CCR7^+$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD4^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 85%는 $CD27^+CCR7^+$ 이다.

[0029]

본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD8^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는 $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD8^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 60%는 $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD8^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 70%는 $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD8^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD8^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 85%는 $CCR7^+CD45RA^+$ 또는 $CCR7^+CD45RA^-$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD8^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는 $CD27^+CCR7^+$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD8^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 60%는 $CD27^+CCR7^+$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD8^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 70%는 $CD27^+CCR7^+$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD8^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $CD27^+CCR7^+$ 이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 $CD8^+CAR^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 85%는 $CD27^+CCR7^+$ 이다.

[0030]

본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율(fraction)은 평균적으로 (약) 0.9 미만이다.

[0031]

본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.9 내지 (약) 0.8이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 총 VCN에 대

한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율(fraction)은 평균적으로 (약) 0.8 미만이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.8 내지 (약) 0.7이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.7 내지 (약) 0.6이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.6 내지 (약) 0.5이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.5 내지 (약) 0.4이다.

[0032] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적으로 2배체 게놈 당 (약) 0.4개 카피 내지 2배체 게놈 당 3.0개 카피이다.

[0033] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적으로 2배체 게놈 당 (약) 0.8개 카피 내지 2배체 게놈 당 2.0개 카피이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적으로 2배체 게놈 당 (약) 0.8개 카피 내지 2배체 게놈 당 1.0개 카피이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적으로 2배체 게놈 당 (약) 1.0개 카피 내지 2배체 게놈 당 1.5개 카피이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적으로 2배체 게놈 당 (약) 1.5개 카피 내지 2배체 게놈 당 2.0개 카피이다.

[0034] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은: 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 선택적으로 DLBCL NOS(달리 명시되지 않음); 드노보(de novo) 또는 예를 들어 여포성 림프종 또는 변연부 림프종으로부터 형질전환된 DLBCL 포함); 고등급 B 세포 림프종(HGBCL), 선택적으로 MYC와 BCL2 및/또는 BCL6 재배열을 갖고 DLBCL 조직 구조를 갖는 HGBCL; 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종(PMBCL); 및 여포성 림프종(FL), 선택적으로 3b 등급 여포성 림프종(FL3B)으로 구성된 군에서 선택된다.

[0035] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은: 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 선택적으로 DLBCL NOS(달리 명시되지 않음); 형질전환된 DLBCL, 선택적으로 여포성 림프종 또는 변연부 림프종으로부터 형질전환된 DLBCL; 고등급 B 세포 림프종(HGBCL), 선택적으로 MYC와 BCL2 및/또는 BCL6 재배열을 갖고 DLBCL 조직 구조를 갖는 HGBCL; 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종(PMBCL); 및 여포성 림프종(FL), 선택적으로 3b 등급 여포성 림프종(FL3B)으로 구성된 군에서 선택된다.

[0036] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은 미만성 거대 B 세포 림프종이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은 미만성 거대 B 세포 림프종 NOS(달리 명시되지 않음)이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은 드노보(de novo) 미만성 거대 B 세포 림프종이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은 여포성 림프종으로부터 형질전환된 미만성 거대 B 세포 림프종이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은 변연부 림프종으로부터 형질전환된 미만성 거대 B 세포 림프종이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은 고등급 B 세포 림프종(HGBCL)이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은 MYC와 BCL2 및/또는 BCL6 재배열을 갖는 고등급 B 세포 림프종이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은 DLBCL 조직 구조를 갖는 고등급 B 세포 림프종이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은 이중 유전자 이상 림프종 또는 삼중 유전자 이상 림프종이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은 여포성 림프종이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은 3b 등급 여포성 림프종이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은 조직학적으로 확인된다.

[0037] 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여 시점에 또는 투여 시점 직전에, 상기 대상체는 (i) 상기 B 세포 NHL에 대한 둘 이상의 선행 요법 및/또는 (ii) 자가 줄기세포 이식(ASCT) 요법을 이용해 치료 후 관해된 이후에 재발했거나, 이에 대해 불응성이 된다.

[0038] 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여 시점에 또는 투여 시점 직전에, 상기 대상체는, 상기 B 세포 NHL에 대한 둘 이상의 선행 요법을 이용해 치료 후 관해된 이후에 재발했거나, 이에 대해 불응성이 된다. 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여 시점에 또는 투여 시점 직전에, 상기 대상체는, 상기 B 세포 NHL에 대한 셋 이상의 선행 요법을 이용해 치료 후 관해된 이후에 재발했거나, 이에 대해 불응성이 된다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 r/r B 세포 NHL에 대한 둘 이상의 선행

요법은 CAR을 발현하는 세포의 또 다른 용량을 포함하지 않는다.

- [0039] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL에 대한 둘 이상의 선행 요법은 안트라사이클린 및 CD20-표적화 제제를 포함한다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL에 대한 둘 이상의 선행 요법은 선행 무통성 림프종에 대해 제공된 것들을 포함하지 않는다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL에 대한 둘 이상의 선행 요법은 무통성 DLBCL에 대해 주어진 안트라사이클린을 포함하지 않는다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL에 대한 둘 이상의 선행 요법은 CD20-표적화 제제를 포함하고, 상기 B 세포 NHL에 대한 둘 이상의 선행 요법은 안트라사이클린이 선행 무통성 림프종에 주어진 경우 안트라사이클린을 배제한다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 CD20-표적화 제제는 항-CD20 단클론 항체를 포함한다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 CD20-표적화 제제는 리톡시맙을 포함한다.
- [0040] 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여 시점에 또는 투여 시점 직전에, 상기 대상체는 자가 줄기세포 이식(ASCT) 요법을 이용해 치료 후 관해된 이후에 재발했거나, 이에 대해 불응성이 된다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 재발성 및/또는 불응성 DLBCL을 가지고 있다. 일부 구현예에서, 상기 ASCT는 객관적 반응(부분 반응(PR) 또는 더 나아짐) 달성에 실패한다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 ASCT 후, 상기 대상체의 질병은 진행되었다.
- [0041] 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여시 또는 그 전에, 상기 대상체는 공격성 질병 또는 고위험 질병을 가졌거나 불량한 예후를 가진 것으로 확인되었다. 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여시 또는 그 전에, 상기 대상체는 화학 요법 이후 화학 요법 불응성 질병을 가졌거나 지속성 또는 재발성 질병을 가진 것으로 확인되었다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 대상체는 악성 종양에 의한 병리학적으로 확인된 2차 중추신경계(CNS) 침습을 가지고 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 대상체는 악성 종양에 의한 중추신경계(CNS)-단독 침습을 가지고 있지 않다.
- [0042] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 대상체는 선행 CAR T 세포 또는 유전자 변형 T 세포 요법을 받지 않았다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 대상체는 항-CD19 단클론 항체 또는 이중특이성 항체 등의 선행 CD19-표적화 요법을 받지 않았다.
- [0043] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 방법은 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물을 제조하기 위해 상기 대상체로부터 백혈구 성분채집술 샘플을 수득하는 단계를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 코르티코스테로이드의 치료 용량을, 선택적으로 상기 백혈구 성분채집술의 시점 전 (약) 14일 이내에, 받지 않았다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 상기 백혈구 성분채집술 시점 전 (약) 7일 이내에, 림프 독성 화학 요법제 또는 경막내 요법이 아닌 세포독성 화학 요법제를 받지 않았다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 대상체는 상기 백혈구 성분채집술의 시점 전 (약) 4주 이내에, 림프 독성 화학 요법제를 받지 않았다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 대상체는 상기 백혈구 성분채집술의 시점 전 (약) 4주 이내에, 면역 억제 요법을 받지 않았다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 대상체는 상기 백혈구 성분채집술의 시점 전 (약) 6주 이내에, 방사선을 받지 않았다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 대상체는 상기 백혈구 성분채집술의 시점 전 (약) 3주 이내에, 자가 줄기세포 이식을 받지 않았다.
- [0044] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 대상체는 선행 요법에 반응하여 완전 관해(CR)를 달성하지 못했다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 대상체는 선행 요법에 반응하여 객관적 반응(부분 반응(PR) 또는 더 나아짐)을 달성하지 못했다.
- [0045] 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여시 또는 그 전에, 상기 대상체는 중추신경계(CNS) 침습과 연관되거나 이를 수반하는 림프종 또는 2차 CNS 림프종에 대해 평가된다. 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여시 또는 그 전에, 상기 대상체는: 적절한 심장 기능, 선택적으로 (약) 40%, 40% 초과, 또는 약 40% 초과와 좌심실 박출률(LVEF)을 보임; 및/또는 적절한 신장 기능, 선택적으로 (약) 45mL/분, 45mL/분 초과, 또는 약 45mL/분 초과와 계산된 크레아틴 청소율을 보임; 및/또는 적절한 간 기능, 선택적으로 ULN(정상 상한)의 2.5배 이하의 아스파르트산 아미노기 전달효소(AST) 및 알라닌 아미노기 전달효소(ALT) 및 ULN의 1.5배 미만의 빌리루빈을 보임; 및/또는 적절한 폐 기능, 선택적으로 $\leq$ CTCAE 등급 1 호흡곤란 및 실내 공기 상의 포화 산소(예를 들어, $\text{SaO}_2 \geq 92\%$)를 보임;을 가진 것으로 확인되거나 확인되었다. 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여 시 또는 그 전에, 상기 대상체는 성장 인자 지원 없이 (약) 1.0×10^9 개 세포/L, 1.0×10^9 개 세포/L 초과, 또는 약 1.0×10^9 개 세포/L 초과와 절대 호중구 수(ANC)를 가진 것으로 확인되거나 확인되었다. 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세

포를 포함하는 상기 조성물의 투여 시 또는 그 전에, 상기 대상체는 수혈 없이 (약) 50×10^9 개 세포/L, 50×10^9 개 세포/L 초과, 또는 약 50×10^9 개 세포/L 초과와 혈소판을 가진 것으로 확인되거나 확인되었다.

- [0046] 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여 시 또는 그 전에, 상기 대상체는 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물을 생산하기 위한 백혈구 성분채집술의 시점과 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여 사이에 가교 화학 요법을 받았다. 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여시 또는 그 전에, 상기 대상체는 선행 요법 후 질병 통제를 위해 가교 화학 요법을 받았다.

[0047] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 대상체는 0 또는 1의 ECOG PS(Eastern Cooperative Oncology Group 수행도)를 가진 것으로 확인되거나 확인되었다. 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여 시 또는 그 전에, 상기 대상체는 수직 직경들의 곱의 합(SPD)으로 측정했을 때 높은 기준선 종양 부담, 또는 높은 혈청 젖산 탈수소효소(LDH), 예컨대 LDH $\geq 500\text{U/L}$ 을 가진 것으로 확인되거나 확인되었다. 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여 시 또는 그 전에, 상기 대상체는 양전자 방사 단층 촬영(PET)-양성 질병을 가지고 있다.

[0048] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 방법은 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여 전에, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여를 위해 상기 대상체를 식별 또는 선택하는 단계를 더 포함한다.

[0049] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 투여 전에, 상기 대상체는 림프구 고갈 요법으로 사전 조절되었다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 방법은 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여 직전에, 상기 대상체에 림프구 고갈 요법을 투여하는 단계를 더 포함하되, 상기 림프구 고갈 요법은 플루다라빈 및/또는 시클로포스파미드의 투여를 포함한다.

[0050] 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물 및/또는 상기 림프구 고갈 요법의 투여는 통원환자(outpatient) 전달을 통해 수행된다. 임의의 구현예의 일부에서, 상기 조성물의 투여는 통원 기반으로, 선택적으로 상기 대상체가 지속열 또는 해열제로 치료 후 1°C 이상 감소되지 않는 또는 감소되지 않은 발열을 나타내지 않는 한 또는 나타낼 때까지, 수행된다. 임의의 구현예의 일부에서, 상기 조성물의 투여는, 상기 대상체가 병원에 입원하지 않고/거나 병원에 하루 밤 숙박하지 않고, 선택적으로 상기 대상체가 지속열 또는 해열제로 치료 후 1°C 이상 감소되지 않거나 감소되지 않은 발열을 나타내지 않는 한 또는 나타낼 때까지, 수행된다. 임의의 구현예의 일부에서, 상기 조성물의 투여는, 상기 병원에 입원하거나 병원에 하루 밤 숙박할 필요 없이, 선택적으로 상기 대상체가 지속열 또는 해열제로 치료 후 1°C 이상 감소되지 않거나 감소되지 않은 발열을 나타내지 않는 한 또는 나타낼 때까지, 수행된다.

[0051] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 림프구 고갈 요법은 3일 동안 각각 매일 30mg/m^2 (상기 대상체의 체표면적)의 플루다라빈 및 매일 300mg/m^2 (상기 대상체의 체표면적)의 시클로포스파미드의 투여를 포함한다. 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물은 상기 림프구 고갈 요법의 완료 후, (약) 48시간 내지 (약) 9일(수치 포함) 사이에 투여된다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 대상체는 상기 림프구 고갈 요법을 받을 때 적어도 또는 적어도 약 30mL/분 의 크레아틴 청소율을 가진다.

[0052] 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물의 투여 개시 전에, 상기 대상체는 신경 독성 및/또는 사이토카인 방출 증후군 또는 이의 위험의 치료, 예방, 감소 또는 약화를 위한 제제 또는 치료제를 투여받지 않았다. 본원의 임의의 구현예에서, 신경 독성 및/또는 사이토카인 방출 증후군 또는 이의 위험의 치료, 예방, 감소, 또는 약화를 위한 제제 또는 치료제를 상기 대상체에 투여하는 단계를 더 포함한다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 제제는 항-IL-6 항체, 항-IL-6 수용체 항체, 또는 스테로이드이거나 이를 포함한다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 제제는 토실리주맙 또는 메틸프레드니솔론이거나 이를 포함한다.

[0053] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 T 세포는 대상체로부터 수득된 1차 T 세포이다.

[0054] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 T 세포는 대상체에 대해 자가(autologous)이다.

[0055] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 35%, 적어도 40% 또는 적어도 50%는 완전 반응(CR)을 달성하고; CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 또는 6개월 이상 동안 지속되는 CR을 나타내고; 및/또는 1개월까지 및/또는 3개월까지 CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 상기 CR을 달성한 후 3개월 이상 및/또는 6개월 이상 및/또는 9개월 이상 동안 반응을 유지하고, CR을 유지하고, 및/또는 생존하거나 진행 없이 생존하고; 및/또는 상기 방법

에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 50%, 적어도 60% 또는 적어도 70%는 객관적 반응(OR)을 달성하고; OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 또는 6개월 이상 동안 지속되는 OR을 나타내고; 및/또는 OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 35%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%는 상기 OR을 달성한 후 3개월 이상 동안 및/또는 6개월 이상 동안 반응을 유지하거나 생존한다.

[0056] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 50%는 완전 반응(CR)을 달성하고; CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%는 6개월 이상 동안 지속되는 CR을 나타내고; 및/또는 1개월까지 및/또는 3개월까지 CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%는 상기 CR을 달성한 후 6개월 이상 동안 반응을 유지하고, CR을 유지하고, 및/또는 생존하거나 진행 없이 생존하고; 및/또는 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 70%는 객관적 반응(OR)을 달성하고; OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%는 6개월 이상 동안 지속되는 OR을 나타내고; 및/또는 OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 50%는 상기 OR을 달성한 후 6개월 이상 동안 반응을 유지하거나 생존한다.

[0057] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 CR 또는 상기 OR은 3개월 넘게 또는 6개월 넘게 지속되고; 및/또는 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 35%, 적어도 40% 또는 적어도 50%는 3개월 넘게 또는 6개월 넘게 지속되는 CR을 달성하고; 및/또는 상기 방법으로 치료를 받고 CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 또는 6개월 이상 또는 9개월 이상 동안 CR을 유지하거나 반응을 유지하거나 생존을 유지하고; 및/또는 상기 방법으로 치료를 받고 1개월까지 및/또는 3개월까지 CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 및/또는 6개월 이상 및/또는 9개월 이상 동안 반응을 유지하고, CR을 유지하고, 및/또는 생존하거나 진행 없이 생존하고; 및/또는 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 50%, 적어도 60% 또는 적어도 70%는 객관적 반응(OR)을 달성하고; OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 또는 6개월 이상 동안 지속되는 OR을 달성하고; 및/또는 상기 방법으로 치료를 받고 OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 35%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%는 3개월 이상 동안 및/또는 6개월 이상 동안 반응을 유지하거나 생존한다.

[0058] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 세포는 상기 대상체에 대해 자가(autologous)이고, 성분채집술을 위한 최소 절대 림프구 수(ALC)는 요법의 생산을 위해 요구 및/또는 명시되지 않고; 및/또는 상기 세포는, 상기 B 세포 NHL이 있는 대상체들 중 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%에 대해, 상기 방법에 따른 투여를 위한 세포 생성물을 생성할 수 있는 공정에 의해 생산된다.

[0059] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 35%, 적어도 40% 또는 적어도 50%는 CNS 질병의 완전 반응(CR) 또는 관해를 달성하고; CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 또는 6개월 이상 동안 CR을 유지하고; 및/또는 1개월까지 및/또는 3개월까지 CNS 질병의 CR 또는 관해를 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 및/또는 6개월 이상 및/또는 9개월 이상 동안 반응을 유지하고, CR을 유지하고, 및/또는 생존하거나 진행 없이 생존하고; 및/또는 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 50%, 적어도 60% 또는 적어도 70%는 CNS 질병의 객관적 반응(OR) 또는 관해를 달성하고; 상기 OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 또는 6개월 이상 동안 지속되고; 및/또는 CNS의 OR 또는 관해를 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 및/또는 6개월 이상 동안 반응을 유지하거나 생존하고; 및/또는 뇌 병변은 크기 또는 부피가 (약) 25%, 50%, 75% 또는 그 이상 감소되고; 및/또는 CNS 질병의 감소 또는 관해 또는 제거는 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 35%, 적어도 40% 또는 적어도 50%에서 달성된다.

[0060] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 50%, (약) 60%, (약) 70%, 또는 (약) 80% 넘는 대상체가 3급 이상의 사이토카인 방출 증후군(CRS)을 나타내지 않고/거나 3급 이상의 신경 독성을 나타내지 않고/거나 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 40% 또는 50% 또는 55% 넘는 대상체가 신경 독성 또는 CRS의 어느 것도 나타내지 않는다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 80% 넘는 대상체가 3급 이상의 사이토카인 방출 증후군(CRS)을 나타내지 않고/거나 3급 이상의 신경 독성을 나타내지 않는다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 95% 넘는 대상체가 3급 이상의 CRS를 나타내지 않는다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 85% 넘는 대상체가 3급 이상의 신경 독성을 나타내지 않는다.

[0061] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 30%, (약) 35%, (약) 40%, 또는 (약) 50% 넘는 대상체가 사이토카인 방출 증후군(CRS) 또는 신경 독성의 어느 등급도 나타내지 않고/거나; 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 (약) 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는

상기 투여의 개시 이후 3일보다 이전에 CRS의 개시를 나타내지 않고/거나 상기 투여의 개시 이후 5일보다 이전에 신경 독성의 개시를 나타내지 않고/거나; 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 신경 독성의 중앙값 개시는 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들에서 CRS의 중앙값 피크 또는 그 이후, 또는 CRS의 분해능까지의 중앙값 시간이고/거나, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 신경 독성의 중앙값 개시는 (약) 8, 9, 10, 또는 11일보다 크다.

[0062] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 50% 넘는 대상체가 사이토카인 방출 증후군(CRS) 또는 신경 독성의 어느 등급도 나타내지 않고/거나; 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 (약) 45%는 상기 투여의 개시 이후 3일보다 이전에 CRS의 개시를 나타내지 않고/거나 상기 투여의 개시 이후 5일보다 이전에 신경 독성의 개시를 나타내지 않고/거나; 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 신경 독성의 중앙값 개시는 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들에서 CRS의 중앙값 피크 또는 그 이후, 또는 CRS의 분해능까지의 중앙값 시간이고/거나, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 신경 독성의 중앙값 개시는 (약) 8일보다 크다.

[0063] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 50%는 완전 반응(CR)을 달성하고; 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 70%는 객관적 반응(OR)을 달성하고; 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 50% 넘는 대상체가 사이토카인 방출 증후군(CRS) 또는 신경 독성의 어느 등급도 나타내지 않고; 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 80% 넘는 대상체가 3급 이상의 사이토카인 방출 증후군(CRS)을 나타내지 않고/거나 3급 이상의 신경 독성을 나타내지 않는다.

[0064] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 CAR은 상기 항원에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 선택적으로 4-1BB인 공자극 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인, 및 선택적으로 CD3제타인 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인을 포함할 수 있거나; 본원의 임의의 구현예에서, 상기 CAR은 상기 항원에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 공자극 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인, 및 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인을 순서대로 포함할 수 있거나; 상기 CAR은 상기 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 항원 인식 도메인, 막관통 도메인, 및 CD3-제타(CD3ζ) 사슬을 포함하는 세포내 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인인 공자극 신호전달 영역을 포함할 수 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 CAR은 CD19에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 4-1BB로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인, 및 CD3제타로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인을 포함할 수 있다.

[0065] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 CAR은 CD19에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 선택적으로 4-1BB인 공자극 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인, 및 선택적으로 CD3제타인 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인을 포함하거나; 상기 CAR은 CD19에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 공자극 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인, 및 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인을 순서대로 포함하거나; 상기 CAR은 CD19에 특이적으로 결합하는 세포외 항원 인식 도메인 및 CD3-제타(CD3ζ) 사슬을 포함하는 세포내 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인인 공자극 신호전달 영역을 포함한다.

[0066] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 CAR은 CD19에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 4-1BB인 공자극 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인, 및 CD3제타인 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인을 포함한다.

[0067] 본원의 임의의 구현예에서 상기 세포외 항원 결합 도메인은 scFv이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 scFv는 RASQDISKYLN(서열 번호: 35)의 아미노산 서열, SRLHSGV(서열 번호: 36)의 아미노산 서열, 및/또는 GNTLPYTFG(서열 번호: 37)의 아미노산 서열 및/또는 DYGV(서열 번호: 38)의 아미노산 서열, VIWGSETTYNSALKS(서열 번호: 39)의 아미노산 서열, 및/또는 YAMDYWG(서열 번호: 40)의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 scFv의 6개의 CDR 서열(CDR1-L3 및 CDRH1-H3)은 아미노산 서열들 RASQDISKYLN(서열 번호: 35), SRLHSGV(서열 번호: 36), GNTLPYTFG(서열 번호: 37), DYGV(서열 번호: 38), VIWGSETTYNSALKS(서열 번호: 39), 및 YAMDYWG(서열 번호: 40)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 FMC63의 가변 경쇄 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 scFv의 6개 CDR 서열(CDR1-L3 및 CDRH1-H3)은 FMC63의 CDR1 서열, FMC63의 CDR2 서열, FMC63의 CDR3 서열, FMC63의 CDRH1 서열, FMC63의 CDRH2 서열 및 FMC63의 CDRH3 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 전술한 것 중 어느 하나와 동일한 에피토프에 결합하거나 결합을 위해 경쟁하는 scFv일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 VH, 링커, 선택적으로 서열 번호: 24에 제시된 링커 포함, 및 VL을 순서대로 포함한다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 scFv는

VL, 링커, 선택적으로 서열 번호: 24에 제시된 링커 포함, 및 VH를 순서대로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 가요성 링커이다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 서열 번호: 43에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 scFv는 서열 번호: 43에 제시된 것이다.

[0068] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 scFv는 RASQDISKYLN(서열 번호: 35)의 아미노산 서열, SRLHSGV(서열 번호: 36)의 아미노산 서열, 및/또는 GNTLPYTFG(서열 번호: 37)의 아미노산 서열 및/또는 DYGV(서열 번호: 38)의 아미노산 서열, VIWGSETTYNSALKS(서열 번호: 39)의 아미노산 서열, 및/또는 YAMDYWG(서열 번호: 40)의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 FMC63의 가변 경쇄 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 FMC63의 CDRL1 서열, FMC63의 CDRL2 서열, FMC63의 CDRL3 서열, FMC63의 CDRH1 서열, FMC63의 CDRH2 서열 및 FMC63의 CDRH3 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 VH, 링커 서열 번호: 24, 및 VL을 순서대로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 가요성 링커를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 서열 번호: 43에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 CD19-지시된 scFv는 전술한 것 중 어느 하나와 동일한 에피토프에 결합하거나 결합을 위해 경쟁한다.

[0069] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 scFv는 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 FMC63의 가변 경쇄 영역을 포함할 수 있다.

[0070] 일부 구현예에서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호: 8에 제시된 아미노산의 서열 또는 서열 번호: 8에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산의 서열을 포함하는 막관통 도메인이다. 일부 구현예에서, 상기 막관통 도메인은 서열 번호: 9에 제시된 아미노산의 서열 또는 이에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산의 서열을 포함하는 막관통 도메인이다.

[0071] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 공자극 신호전달 영역은 4-1BB의 신호전달 도메인이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 공자극 도메인은 서열 번호: 12 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 1차 신호전달 도메인은 CD3제타 신호전달 도메인이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 1차 신호전달 도메인은 서열 번호: 13, 14 또는 15 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0072] 본원의 임의의 구현예에서, 공자극 분자로부터 유래된 상기 세포질 신호전달 도메인은 4-1BB의 신호전달 도메인이다. 본원의 임의의 구현예에서, 공자극 분자로부터 유래된 상기 세포질 신호전달 도메인은 서열 번호: 12 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함한다.

[0073] 본원의 임의의 구현예에서, 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 상기 세포질 신호전달 도메인은 CD3제타 신호전달 도메인이다. 본원의 임의의 구현예에서, 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 상기 세포질 신호전달 도메인은 서열 번호: 13, 14 또는 15 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0074] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 CAR은 상기 막관통 도메인과 상기 세포의 항원 결합 도메인 사이에 스페이서를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 서열 번호: 1의 서열, 서열 번호: 2에 의해 암호화된 서열, 서열 번호: 30의 서열, 서열 번호: 31의 서열, 서열 번호: 32의 서열, 서열 번호: 33의 서열, 서열 번호: 34의 서열 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 상기 중 어느 하나의 변이체를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 화학식 X_1PPX_2P 를 포함하거나 이로 구성되고, 여기서 X_1 은 글리신, 시스테인 또는 아르기닌이고 X_2 는 시스테인 또는 트레오닌이다.

[0075] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 CAR은 상기 막관통 도메인과 상기 scFv 사이에 스페이서를 더 포함할 수 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 스페이서는 번역글로불린 힌지 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성되는 폴리펩타이드 스페이서이다. 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 IgG4 힌지, 또는 이의 변형된 버전이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 스페이서는 (약) 12개의 아미노산 길이이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 스페이서는 서열 번호: 1의 서열, 서열 번호: 2에 의해 암호화된 서열, 서열 번호: 30, 서열 번호: 31, 서열 번호: 32, 서열 번호: 33, 서열 번호: 34, 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%,

90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 상기 중 어느 하나의 변이체를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 화학식 X_1PPX_2P 를 포함하거나 이로 구성될 수 있고, 여기서 X_1 은 글리신, 시스테인 또는 아르기닌이고 X_2 는 시스테인 또는 트레오닌이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 스페이서는 면역글로불린 힌지 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성될 수 있는 폴리펩타이드 스페이서이거나 약 15개 이하의 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 CD28 세포의 영역 또는 CD8 세포의 영역을 포함하지 않고, 면역글로불린 힌지, 선택적으로 IgG4 힌지, 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성될 수 있고/거나 약 15개 이하의 아미노산을 포함하고, CD28 세포의 영역 또는 CD8 세포의 영역을 포함하지 않는다.

[0076] 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 (약) 12개의 아미노산 길이고/거나 면역글로불린 힌지, 선택적으로 IgG4, 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 서열 번호: 1의 서열, 서열 번호: 2에 의해 암호화된 서열, 서열 번호: 30, 서열 번호: 31, 서열 번호: 32, 서열 번호: 33, 서열 번호: 34, 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 상기 중 어느 하나의 변이체를 갖거나 이로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 화학식 X_1PPX_2P 를 포함하거나 이로 구성될 수 있고, 여기서 X_1 은 글리신, 시스테인 또는 아르기닌이고 X_2 는 시스테인 또는 트레오닌이다. 본원의 임의의 구현예의 일부에서, 상기 공 자극 도메인은 서열 번호: 12 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있다. 제공된 임의의 구현예의 일부에서, 상기 1차 신호전달 도메인은 서열 번호: 13, 14 또는 15 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 임의의 구현예의 일부에서, 상기 scFv는 RASQDISKYLN(서열 번호: 35)의 아미노산 서열, SRLHSGV(서열 번호: 36)의 아미노산 서열, GNTLPYTFG(서열 번호: 37)의 아미노산 서열, DYGVs(서열 번호: 38)의 아미노산 서열, VIWGSETTYNSALKS(서열 번호: 39)의 아미노산 서열, 및 YAMDYWG(서열 번호: 40)의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 FMC63의 가변 경쇄 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 FMC63의 CDRL1 서열, FMC63의 CDRL2 서열, FMC63의 CDRL3 서열, FMC63의 CDRH1 서열, FMC63의 CDRH2 서열 및 FMC63의 CDRH3 서열을 포함하는 6개의 CDR을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 전술한 것 중 어느 하나와 동일한 에피토프에 결합하거나 결합을 위해 경쟁하는 scFv이다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 VH, 링커, 선택적으로 서열 번호: 24를 포함하는 링커, 및 VL을 순서대로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 VL, 링커, 선택적으로 서열 번호: 24를 포함하는 링커, 및 VH를 순서대로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 가요성 링커이다. 일부 구현예에서, 상기 scFv 아미노산 서열은 서열 번호: 43에 제시된다.

[0077] 본원의 임의의 구현예에서, (i) 상기 scFv는 RASQDISKYLN(서열 번호: 35)의 아미노산 서열, SRLHSGV(서열 번호: 36)의 아미노산 서열, GNTLPYTFG(서열 번호: 37)의 아미노산 서열, DYGVs(서열 번호: 38)의 아미노산 서열, VIWGSETTYNSALKS(서열 번호: 39)의 아미노산 서열, 및 YAMDYWG(서열 번호: 40)의 아미노산 서열을 포함할 수 있고, 예컨대 상기 scFv는 서열 번호: 43에 제시된 아미노산 서열을 포함할 수 있고; (ii) 상기 스페이서는 (a) 면역글로불린 힌지 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성되고 약 15개 이하 아미노산 길이인, 및 면역글로불린 힌지, 선택적으로 IgG4 힌지, 또는 이의 변형된 버전을 포함하거나 이로 구성되는 폴리펩타이드 스페이서일 수 있고, 예컨대 상기 스페이서는 서열 번호: 1의 서열, 또는 서열 번호: 2에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있고; (iii) 상기 공 자극 도메인은 서열 번호: 12 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함할 수 있고; (iv) 상기 1차 신호전달 도메인은 서열 번호: 13, 14, 또는 15 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0078] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 CAR은 (i) 상기 scFv는 서열 번호: 43에 제시된 아미노산 서열을 포함하고; (ii) 상기 스페이서는 서열 번호: 1의 서열, 또는 서열 번호: 2에 의해 암호화된 서열을 포함하거나 이로 구성된 폴리펩타이드 스페이서이고; (iii) 공 자극 분자로부터 유래된 상기 세포질 신호전달 도메인은 서열 번호: 12 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하는 공 자극 도메인이고; (iv) 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 상기 세포질 신호전달 도메인은 서열 번호: 13, 14 또는 15 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%,

88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하는 세포질 신호전달 도메인인; 것이다.

- [0079] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 CAR은 (i) 상기 세포의 항원 결합 도메인은 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 FMC63의 가변 경쇄 영역을 포함하는 scFv를 포함하고; 상기 스페이서는 서열 번호: 1의 서열을 포함하는 폴리펩타이드 스페이서이고; 공자극 분자로부터 유래된 상기 세포질 신호전달 도메인은 서열 번호: 12를 포함하고; 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 상기 세포질 신호전달 도메인은 서열 번호: 13, 14 또는 15를 포함하는; 것이다.
- [0080] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 스페이서는 서열 번호: 1의 서열을 포함할 수 있는 폴리펩타이드 스페이서이고; 상기 공자극 도메인은 서열 번호: 12를 포함할 수 있고; 상기 1차 신호전달 도메인은 서열 번호: 13, 14 또는 15를 포함할 수 있고; 상기 항원 결합 도메인은 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 FMC63의 가변 경쇄 영역을 포함하는 scFv를 포함할 수 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 세포의 조성물은 비경구적으로, 선택적으로 정맥내 투여된다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 대상체는 인간 대상체이다.
- [0081] 제공된 방법의 임의의 구체적인 구현예에서, 상기 CAR은 N-말단에서 C-말단으로: 서열 번호: 43에 제시된 scFv인 세포의 항원 결합 도메인, 서열 번호: 1에 제시된 스페이서, 서열 번호: 8에 제시된 막관통 도메인, 서열 번호: 12에 제시된 4-1BB 공자극 신호전달 도메인, 및 서열 번호: 13에 제시된 CD3-제타 (CD3 ζ) 사슬의 신호전달 도메인을 순서대로 함유한다.
- [0082] 임의의 구현예의 일부에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물은: (i) 1차 T 세포를 포함하는 투입 조성물을 T 세포를 자극하는 조건 하에 복수의 스트렙타비딘 뮤테인 분자를 포함하는 올리고머성 입자 시약을 포함하는 자극 시약과 노출시키고, 그에 의해 자극된 집단을 생성하는 단계-상기 올리고머성 입자 시약은 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제1 제제 및 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 제제를 포함함-; (ii) 상기 자극된 집단의 T 세포 내로 CD19를 표적화하는 CAR을 암호화하는 이중 폴리뉴클레오타이드를 도입하고, 그에 의해 형질전환된 세포의 집단을 생성하는 단계; (iii) 상기 형질전환된 세포의 집단을 최대 96시간 동안 인큐베이션하는 단계; 및 (iv) 상기 형질전환된 세포의 집단의 T 세포를 수확하고, 이에 의해 조작된 세포의 조성물을 생산하는 단계-상기 수확은 상기 자극 시약에 노출이 개시된 후 24 내지 120시간 시점에(수치 포함) 수행됨-;를 포함하는 제조 공정에 의해 생산된다. 일부 구현예에서, 상기 투입 조성물은 상기 대상체로부터 선택된, 예컨대 상기 대상체 유래 혈액 또는 성분채집술(예를 들어, 백혈구 성분채집술) 샘플 유래 CD3 T 세포 또는 CD4 및 CD8 T 세포에 대해 면역 친화도 기반 선택에 의해 농축된, 자가 T 세포를 포함한다.
- [0083] 본원의 임의의 구현예에서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물은 1차 T 세포를 포함하는 투입 조성물을 복수의 아비딘, 스트렙타비딘, 아비딘 뮤테인, 또는 스트렙타비딘 뮤테인 분자들을 포함하는 올리고머성 입자 시약을 포함하는 자극 시약과 T 세포를 자극하는 조건에서 노출시키고, 이에 의해 자극된 집단을 생성하는 단계를 포함하는 제조 공정에 의해 생산되고, 여기서 상기 자극 시약은 TCR 복합체의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및 하나 이상의 공자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화할 수 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 제조 공정은 상기 자극된 집단의 T 세포 내로 CD19를 표적화하는 CAR을 암호화하는 이중 폴리뉴클레오타이드를 도입하고, 그에 의해 형질전환된 세포의 집단을 생성하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0084] 임의의 구현예의 일부에서, 상기 올리고머성 입자 시약은 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제1 제제 및 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함하는 제2 제제를 포함한다. 임의의 구현예의 일부에서, 상기 항-CD3 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Fab이고 상기 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 Fab이다. 임의의 구현예의 일부에서, 상기 제1 제제 및 상기 제2 제제 각각은 상기 제1 제제 및 상기 제2 제제를 상기 올리고머성 입자 시약에 가역적으로 결합하는 스트렙타비딘-결합 펩타이드를 포함하고, 선택적으로 상기 스트렙타비딘-결합 펩타이드는 서열 번호: 78 내지 82 중 어느 하나에 제시된 아미노산의 서열을 포함한다. 임의의 구현예의 일부에서, 상기 스트렙타비딘 뮤테인 분자는 아미노산 잔기 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 또는 Ile44-Gly45-Ala46-Arg47을 포함하는 스트렙타비딘 뮤테인의 4량체이고, 선택적으로 상기 스트렙타비딘 뮤테인은 서열 번호: 69, 84, 87, 88, 90, 85 또는 59 중 어느 하나에 제시된 서열을 포함한다. 임의의 구현예의 일부에서, 상기 올리고머성 입자 시약은 1,000 내지 5,000개 스트렙타비딘 뮤테인 4량체(수치 포함)를 포함한다. 임의의 구현예의 일부에서, 상기 방법은 상기 세포를 수확하기 전에 상기 인큐베이션 후에 또는 동안에 비오틴 또는 비오틴 유사체를 첨가하는 단계를 더 포함한다.

[0085] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 제조 공정은 상기 형질전환된 세포의 집단을 최대 96시간 동안 인큐베이션하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 인큐베이션하는 단계는 하나 이상의 재조합 사이토카인이 결여된 기본 배지에서 수행된다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 제조 공정은 상기 형질전환된 세포의 집단의 T 세포를 수확하고, 이에 의해 조작된 세포의 조성물을 생산하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 수확은 상기 자극 시약에 노출이 개시된 후 24 내지 120시간 시점에(수치 포함) 수행된다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 수확은 상기 자극 시약에 노출이 개시된 후 48 내지 120시간 시점에(수치 포함) 수행된다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 수확은 상기 계능에서 통합 벡터가 검출되는 시점에 하지만 2 배체 계능 당 안정적 통합 벡터 카피수(iVCN)를 달성하기 전에 수행된다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 수확은 수확 시 생존 세포의 총 수가 상기 자극된 집단의 총 생존 세포의 수의 (약) 3배를 넘기 전 시점에 수행된다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 수확은 수확 시 생존 세포의 총 수가 상기 자극된 집단의 총 생존 세포의 수의 (약) 3배이거나, (약) 2배이거나, 동일하거나 거의 동일한 시점에 수행된다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 수확은, 상기 $CD27^+CCR7^+$ 세포의 백분율이 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 T 세포, 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 $CD3^+$ T 세포, 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 $CD4^+$ T 세포, 또는 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 $CD8^+$ T 세포 중, 또는 상기 형질전환된 세포의 집단에서 CAR-발현 세포 중 (약) 50%보다 큰 시점에 수행된다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 수확은, 상기 $CD45RA^+CCR7^+$ 및 $CD45RA^-CCR7^+$ 세포의 백분율이 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 T 세포, 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 $CD3^+$ T 세포, 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 $CD4^+$ T 세포, 또는 상기 형질전환된 세포의 집단에서 총 $CD8^+$ T 세포 중, 또는 상기 형질전환된 세포의 집단에서 CAR-발현 세포 중 (약) 60%보다 큰 시점에 수행된다.

[0086] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 투여되는 조성물 내 세포는 (i) 조작된 $CD4^+$ T 세포 및 조작된 $CD8^+$ T 세포를 포함하고 (ii) 미리 정해진 특징을 나타내는 산출 조성물을 생산하는 제조 공정에 의해 생산되고, 여기서 상기 제조 공정의 반복은, 복수의 상이한 개별 대상체들 사이에서 수행될 때, 선택적으로 인간 생물학적 샘플로부터, 복수의 상기 산출 조성물을 생산하고, 여기서 상기 복수의 산출 조성물 중 상기 산출 조성물의 상기 미리 정해진 특징은: 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물 내 기억 표현형의 세포의 평균 백분율; 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물 내 중심 기억 표현형의 세포의 평균 백분율; 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물 내 $CD27^+$, $CD28^+$, $CCR7^+$, $CD45RA^-$, $CD45RO^+$, $CD62L^+$, $CD3^+$, $CD95^+$, 그랜자임 B-, 및/또는 $CD127^+$ 인 세포의 평균 백분율; 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물 내 $CCR7^+/CD45RA^-$ 또는 $CCR7^+/CD45RO^+$ 인 세포의 평균 백분율; 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물의 상기 조작된 $CD4^+$ T 세포, 선택적으로 $CAR+CD4^+$ T 세포 내 중심 기억 $CD4^+$ T 세포의 평균 백분율; 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물의 상기 조작된 $CD8^+$ T 세포, 선택적으로 $CAR+CD8^+$ T 세포 내 중심 기억 $CD8^+$ T 세포의 평균 백분율; 및/또는 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물의 상기 조작된 T 세포, 선택적으로 CAR^+ T 세포 내 중심 기억 T 세포, 선택적으로 $CD4^+$ 중심 기억 T 세포 및 $CD8^+$ 중심 기억 T 세포의 평균 백분율에서 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 복수의 산출 조성물은 인간 생물학적 샘플로부터 생산된다.

[0087] 본원의 임의의 구현예에서, 상기 투여되는 조성물은, 미리 정해진 특징, 선택적으로 산출 조성물에서 CAR을 발현하는 세포의 임계 수,를 복수의 상이한 개별 대상체 중에 수행되는 상기 인간 생물학적 샘플들의 적어도 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 97%, 약 99%, 약 100%, 또는 100%에서 나타내는 산출 조성물을 생산하는 제조 공정에 의해 생산된다. 본원의 임의의 구현예에서, 유전자 조작된 세포를 포함하는 상기 조성물은 상기 제조 공정으로부터 유래된 잔류 비드를 함유하지 않는다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 B 세포 NHL은 재발성 및/또는 불응성 B 세포 비호지킨 림프종(B 세포 NHL)이다. 본원의 임의의 구현예에서, 상기 미리 정해진 특징은 상기 산출 조성물에서 CAR을 발현하는 세포의 임계 수이다.

[0088] $CD19$ 를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 유전자 조작된 세포를 포함하는 조성물, 및 본원에 제

공된 방법들 중 어느 하나에 따라 상기 세포의 조성물을 투여하기 위한 설명서를 포함하는, 제조품이 또한 본원에 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0089]

도 1은 상이한 공여체 유형들(기준, 환자)을 사용하는 비증폭 조작 공정들로부터 생산된 T 세포 조성물들의 세포 순도의 유세포 분석에 의해 측정된 예시적인 정량화를 도시한다. 세포를 항-CD19 CAR을 발현하도록 조작하거나(CD19) 모의 형질도입하였다(모의). 살아있는 CD45+ 세포들 중 CD3+ 세포들의 백분율(왼쪽 패널), 살아있는 CD45+ 세포들 중 NK 세포들의 백분율(가운데 패널), 및 살아있는 CD45+ 세포들 중 CD19+ 세포들의 백분율(오른쪽 패널)을 측정하였다.

도 2 및 3은 상이한 공여체 유형들(기준, 환자)을 사용하는 증폭 및 비증폭 조작 공정들에 대해 유세포 분석에 의해 측정된 세포 표현형들의 예시적인 정량화를 도시한다. 세포를 항-CD19 CAR을 발현하도록 조작하거나(CD19) 모의 형질도입하였다(모의). **도 2**는 살아있는 CD45+ 세포들 중 CD3+CD8+ 및 CD3+CD4+ 세포의 백분율(왼쪽 패널) 및 살아있는 CD45+ 세포들 중 CD8+CAR+ 및 CD4+CAR+ 세포의 백분율을 도시한다. **도 3**은 CD4+ 세포 대 CD8+ 세포의 비, 및 CD4+CAR+ 세포 대 CD8+CAR+ 세포의 비를 도시한다.

도 4는 상이한 공여체 유형들(기준, 환자)을 사용하는 비증폭 조작 공정들로부터 생산된 T 세포 조성물들의 세포 생존력의 유세포 분석에 의해 측정된 예시적인 정량화를 도시한다. 세포를 항-CD19 CAR을 발현하도록 조작하거나(CD19) 모의 형질도입하였다(모의). CD3+ 세포들 중 aCas3+ 세포의 백분율을 알아냈다.

도 5a는 증폭 공정(○) 또는 비증폭 공정(●)을 사용하여 CAR을 발현하도록 조작된, 상이한 인간 공여체들 유래 1차 T 세포에서 생산된 세포 조성물에서 표준 VCN(펄스 필드 젤 전기영동, 즉 PFGE를 거치지 않음) 및 iVCN(PFGE를 거침)으로 평가한 총 세포 중 세포당 카피수 사이의 예시적인 관계를 도시한다. **도 5b 및 5c**는 표준 VCN(**도 5b**) 또는 iVCN(**도 5c**)로 평가한 세포 조성물에서 세포당 카피수와 유세포 분석으로 평가한 생존 CD45+ 세포들 중 CAR-발현 CD3+ 세포의 백분율(%CD3+CAR+)로 표시되는 CAR의 표면 발현 사이의 관계를 도시한다.

도 6a 및 6b는 상이한 공여체 유형들(기준, 환자)을 사용하는 증폭 및 비증폭 조작 공정들로부터 기인한 세포 표현형의 예시적인 백분율을 도시한다. 세포를 항-CD19 CAR을 발현하도록 조작하거나(CD19) 모의 형질도입하였다(모의). **도 6a**는 aCas-CD8+CAR+ 세포들 및 aCas-CD4+CAR+ 세포들 중 CD45RA+CCR7+ 세포의 예시적인 백분율(왼쪽 상단 패널), aCas-CD8+CAR+ 세포들 및 aCas-CD4+CAR+ 세포들 중 CD45RA-CCR7+ 세포의 예시적인 백분율(오른쪽 상단 패널), aCas-CD8+CAR+ 세포들 및 aCas-CD4+CAR+ 세포들 중 CD45RA-CCR7- 세포의 예시적인 백분율(왼쪽 하단 패널), 및 aCas-CD8+CAR+ 세포들 및 aCas-CD4+CAR+ 세포들 중 CD45RA+CCR7- 세포의 예시적인 백분율(오른쪽 하단 패널)을 도시한다. **도 6b**는 aCas-CD8+CAR+ 세포들 및 aCas-CD4+CAR+ 세포들 중 CD27+CCR7+ 세포의 예시적인 백분율을 도시한다.

도 7a 내지 7d는 세포가 항-CD19 CAR을 발현하도록 조작되고, 장기간 CAR-의존성 자극 전(1차) 및 장기간 CAR-의존성 자극 후(작용성 항-이디오타입 항체로 만성 자극 9 내지 14일 후)(2차)에, 공여체-매칭된 증폭 및 비증폭 조작 공정들에 대하여 유세포 분석에 의해 측정되어 표시된 세포 표현형들의 예시적인 정량화를 도시한다. DP1 = 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL) 환자 1; DP2 = DLBCL 환자 2; HD1 = 건강한 공여체 1; MP1 = 외투 세포 림프종 환자 1.

도 8a 내지 8f는 항-ID 항체로 장기간 항-CD19 CAR-의존성 자극 후 비증폭 및 증폭 공정들로부터 생성된 세포의 예시적인 시험관 내 증식 능력을 도시한다. 생존력(**도 8a**) 및 세포 크기(**도 8b**)를 측정하였다. 일일 카운트를 세포의 출발 수로 나누어 증폭의 배수 변화를 계산하고(**도 8c**), 이어서 이를 개별 암들(**도 8d**)에 대해 또는 제조 공정별로(**도 8e**, 만-휘트니 시험을 통한 통계적 유의성; *p < 0.05) 비교를 위해 곡선 하 면적(AUC)으로 변환하였다. 비증폭 공정으로부터 생성된 조성물의 일일 배수 증폭을 취하고 이들을 증폭 공정으로부터 생성된 조성물에 대한 공여체-매칭된 대조군 값들로 나누어 제조 플랫폼들 사이의 개별적인 공여체 배수 증폭을 또한 직접 측정하였다(**도 8f**).

도 9a 및 9b는 상이한 효과기 대 표적 비(ratio)에서 만성 자극 전(**도 9a**) 및 후(**도 9b**)에 비증폭 또는 증폭 공정들에 의해 조작된 항-CD19 CAR T 세포의 예시적인 세포 용해 가능성을 도시한다. 개별 암들에 대해(**도 9a** 및 **도 9b**의 왼쪽 패널) 또는 제조 공정별로(**도 9a** 및 **도 9b**의 오른쪽 패널, 만-휘트니 시험을 통한 통계적 유의성; *p < 0.05) 곡선 하 면적(AUC) 값들을 비교하였다.

도 10은 만성 항원 자극 0일째 및 10일째에 유세포 분석을 이용하여 다기능성 점수로 측정된 비증폭 또는 증폭 공정들에 의해 조작된 세포에 의한 예시적인 사이토카인 생산을 도시한다. 통계적 유의성을 만-휘트니, * $p < 0.05$ 로 평가하였다. 도 11a 및 11b는 비증폭 및 증폭 매칭된-공여체 조작 공정들로부터 생성된 항-CD19 CAR-T 세포 조성물들을 이용한 치료 후 시간에 따른 Nalm6 백혈병 모델에서 예시적인 종양 부담 및 순환하는 CAR-T 세포 수를 도시한다.

도 11a는 각 군에 대한 생체발광(BLI)의 곡선 하 면적(AUC)으로부터 계산된 -1일째(치료 전)부터 치료 후 약 25일째까지의 종양 성장을 도시한다. 도 11b는 각 군에 대해 치료 후 약 5일째 내지 20일째 사이 혈액 $1 \mu\text{l}$ 당 순환하는 항-CD19 CAR T 세포 카운트를 도시한다.

도 12a 및 12b는 비증폭 및 증폭 매칭된-공여체 조작 공정들로부터 생성된 항-CD19 CAR-T 세포 조성물들을 이용한 치료 후 시간에 따른 Raji 림프종 모델에서 예시적인 종양 부담 및 순환하는 CAR-T 세포 수를 도시한다. 도 12a는 비증폭 및 증폭 매칭된-공여체 조작 공정들로부터 생성된 항-CD19 CAR T 세포 조성물의 더 높은(왼쪽 패널) 용량 및 더 낮은(오른쪽 패널) 용량으로, 각 군에 대한 BLI의 곡선 하 면적(AUC)으로부터 계산된 -1일째(치료 전)부터 치료 후 약 80일째까지의 종양 성장을 도시한다. 모든 군(종양 부담)에 대해 BLI 방사 휘도(광자/초; y축)의 변화가 도시된다. 도 12b는 각 군(비증폭, NE; 증폭, E)에 대해 치료 후 표시된 시점들에서 혈액 $1 \mu\text{l}$ 당 순환하는 항-CD19 CAR T 세포 카운트를 도시한다. 각 시점의 절대 카운트는 군 평균으로 표시된다. 만-휘트니 U 시험(* $p < 0.05$)을 이용하여 차이를 비교하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0090]

일반적으로 암 또는 림프종과 같은 종양, 가장 구체적으로는 NHL의 공격성 아형들을 포함하여 비호지킨 림프종(NHL)인 B 세포 악성 종양이거나 이를 포함하는, 질병 또는 병태를 가진 대상체의 치료를 위한 조작된 세포(예를 들어, T 세포) 및/또는 이의 조성물의 방법 및 용도가 본원에 제공된다. 구체적인 측면에서, 대상체는 공격성 또는 고위험 NHL을 갖는다. 제공된 방법의 구현예들에서, 조작된 세포를 함유하는 치료용 T 세포 조성물이 NHL에 걸린 대상체에게, 예를 들어 입양 T 세포 요법 등의 입양 세포 요법을 통해, 투여된다. 임의의 제공된 방법의 구체적인 구현예에서, T 세포는 분화 클러스터 19(CD19)에 대해 지시된 키메라 항원 수용체(CAR)로 조작된다. 일부 측면에서, 질병 또는 병태는 B 세포 림프종이다. 일부 측면에서, 질병 또는 병태는 거대 B 세포 림프종이다. 일부 측면에서, 질병 또는 병태는 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL) 또는 이의 아형이다. 일부 측면에서, 본 방법과 용도는 특정 대체 방법과 비교하여 예를 들어 치료받은 특정 군의 대상체에서 개선된 반응 및/또는 더 장기 지속적인 반응 또는 효능 및/또는 독성 위험 또는 기타 부작용의 감소를 제공하거나 달성한다. 일부 구현예에서, 본 방법은 조작된 세포의 특정 수 또는 비례 수의 투여, 특정 유형의 세포의 정의된 비의 투여, 덜 분화된 세포의 특정 높은 백분율의 세포(예를 들어, 나이트-유사 또는 중심 기억 세포 또는 초기 분화 상태의 세포, 예컨대 CCR7+CD27+ 세포)의 투여, 특정 환자 집단, 예컨대 특정 환자 집단, 예컨대 특정 위험 프로파일, 병기 및/또는 이전 치료 이력을 가진 환자 집단의 치료, 및/또는 이들의 조합에 의해 유리하다.

[0091]

일부 구현예에서, 본 방법 및 용도는 입양 세포 요법에서 NHL에 의해 발현되는, 이와 관련된 및/또는 이에 특이적인 CD19 및/또는 유래된 세포 유형을 인식하는, 키메라 항원 수용체(CAR)와 같은 키메라 수용체인 것이 일반적인, 유전자 조작된 (재조합) 세포 표면수용체를 발현하는 T 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 세포는 일반적으로 투여를 위해 제형화된 조성물로 투여되고; 본 방법은 일반적으로 대상체에게 세포의 하나 이상의 용량을 투여하는 단계를 포함하고, 이 용량(들)은 세포의 특정 수 또는 비례 수의 세포 또는 조작된 세포를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 조성물 내의 CD19-지시된 CAR+ 조작된 세포는 CD4 대 CD8 T 세포와 같이 조성물 내의 2개 이상의 아형의 정의된 비 또는 조성물을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 제공된 방법에서 사용 또는 투여를 위한 세포 조성물은 (i) 탈진된 세포 및/또는 탈진과 관련된 표지자 또는 표현형을 나타내는 세포의 낮은 백분율(예를 들어, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 또는 10% 미만)을 함유하고/거나; (ii) 나이트-유사 T 세포, 중심 기억 T 세포 또는 수명이 긴 기억 T 세포와 같은 기억-유사 T 세포의 비교적 높은 백분율(예를 들어, 50% 초과, 60% 초과, 70% 초과, 80% 초과 또는 90% 초과)을 함유하는, CD19-지시된 CAR을 발현하도록 조작된 1차 T 세포를 포함한다. 제공된 구현예에서, 조성물 및 제공된 방법의 특징은 탈진된 세포 및/또는 탈진과 관련된 표지자 또는 표현형을 나타내는 세포 및/또는 탈진과 관련된 표현형을 나타내는 더 높은 수의 세포를 함유하고/거나 나이트-유사 T 세포, 중심 기억 T 세포 또는 수명이 긴 기억 T 세포와 같은 중심 T 세포의 더 낮은 백분율을 함유하는, 다른 CD19-지시된 CAR T 세포 요법의 투여를 포함하는 방법과 비교하여 개선된 또는 향상된 생존, 증폭, 지속성, 및/또는 항-종양 활성을 가져온다. 제공된 구현예에서, 조성물 및 제공된 방법의 특징은 탈진된 세포 및/또는 탈진과 관련된 표지자 또는 표현형을 나타내는 세포 및/또는 탈진과 관련된 표현형을 나타

내는 더 높은 수의 세포를 함유하고/거나 나이트-유사 T 세포, 중심 기억 T 세포 또는 수명이 긴 기억 T 세포와 같은 중심 T 세포의 더 낮은 백분율을 함유하는, 다른 CD19-지시된 CAR T 세포 요법의 투여를 포함하는 방법과 비교하여 개선된 치료 효능, 예를 들어 완전 반응(CR)을 달성하는 환자의 증가된 백분율을 가져온다. 제공된 방법에서, 조성물 및 제공된 방법의 특징은 탈진된 세포 및/또는 탈진과 관련된 표지자 또는 표현형을 나타내는 세포 및/또는 탈진과 관련된 표현형을 나타내는 더 높은 수의 세포를 함유하고/거나 나이트-유사 T 세포, 중심 기억 T 세포 또는 수명이 긴 기억 T 세포와 같은 기억 유사 T 세포의 더 낮은 백분율을 함유하는, 다른 CD19-지시된 CAR T 세포 요법의 투여를 포함하는 방법과 비교하여 치료 반응(예컨대, CR)의 개선된 임상적 지속성, 예를 들어 요법 개시로부터 일정 시간 후 지속되는 반응을 가져온다. 구체적인 구현예에서, 제공된 방법에서 제공된 CD19-지시된 CAR T 세포 조성물의 사용 또는 투여는 기준 CD19-지시된 CAR T 세포 조성물 (예를 들어, 동일한 또는 유사한 CAR로 조작됨, 예컨대 동일한 항원 결합 도메인으로 조작됨)의 용량보다 2배 이상 더 낮은, 예컨대 5배 또는 10배 더 낮은 세포의 용량으로 달성될 수 있지만, 여기서 기준 CD19-지시된 CAR T 세포 조성물은 탈진된 세포 및/또는 탈진과 관련된 표지자 또는 표현형을 나타내는 세포 및/또는 탈진과 관련된 표현형을 나타내는 더 높은 수의 세포를 함유하고/거나 나이트-유사 T 세포, 중심 기억 T 세포 또는 수명이 긴 기억 T 세포와 같은 기억 유사 T 세포의 더 낮은 백분율을 함유한다. 일부 구현예에서, 기준 CD19-지시된 CAR T 세포 조성물은 세포를 생산하는 공정 동안 세포의 증식 또는 세포의 집단 배가(예를 들어, 공정의 시작과 비교하여 집단 내 세포의 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 배가)를 초래하는 것과 같은, 증폭을 위한 조건 하에서 세포를 육성하는 단계를 수반하는 공정들에 의해 생체외에서 생산되는 조성물이다.

[0092] 일부 구현예에서, 제공된 방법 및 용도에서 사용하기 위한 CD19-지시된 CAR T 세포 조성물은 세포를 증폭 또는 증식시키기 위해 설계된 증폭 조건 하에서 세포를 육성하는 단계를 포함하지 않는 비교적 짧은 공정에 의해 생산된다. CAR을 발현하는 조작된 T 세포를 생성하는 것을 포함하여, 유전자 조작된 T 세포 집단을 함유하는 조성물을 생성하기 위해 상이한 공정들이 이용 가능하며, 이는 전형적으로 세포의 증식을 증폭 또는 증가시키기 위해 세포를 육성하거나 육성하는 목적을 위해 설계된 단계를 포함한다. 그러나, 구체적인 측면에서, 이 공정들 중 일부는 조작된 세포를 생성하기 위해 긴 시간 또는 상대적으로 긴 시간량을 필요로 할 수 있다. 또한, 여러 측면에서, 일부 기존 공정들은 세포 요법에 적합한 조작된 T 세포를 성공적으로 생산하는데 필요한 시간량이 여러 가지일 수 있어, 세포 요법의 투여를 조정하기 어려울 수 있다. 특정 측면에서, 이 공정들 중 일부는 탈진된 세포, 분화된 세포, 또는 낮은 효력을 갖는 세포의 비교적 높은 백분율 또는 양을 포함하는 세포 집단을 생산할 수 있다. 제공된 방법에서 사용하기 위한 제공된 CD19-지시된 CAR T 세포 조성물은 이 문제들 중 하나 이상을 해결한다.

[0093] 구체적인 구현예에서, 제공된 방법은 세포 요법에 사용하기에 적합한 조작된 세포를 효율적으로 생산하거나 생성하기 위한 공정과 관련하여 사용된다. 일부 구현예에서, CD19-지시된 CAR 조작된 T 세포를 함유하는 제공된 조성물은 세포를 증폭시키기 위한 임의의 추가 단계가 필요 없는, 예를 들어 증폭 단위 조작이 없는 및/또는 세포의 증폭을 유발하도록 의도된 단계가 없는 공정에 의해 생산된다. CD19-지시된 CAR T 세포 조성물을 생산하기 위한 공정들의 측면에서, 상기 공정들은 세포 요법을 위한 조성물로서 사용하기 위해 채집되거나 제형화될 수 있는 조작된 T 세포의 집단을 생산하기 위해 T 세포를 자극하고 유전자 조작(예를 들어, 형질전환, 형질도입 또는 형질주입)하는 하나 이상의 단계를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 상기 공정들은 CD19-지시된 CAR을 암호화하는 핵산을 함유하는 바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터)로 세포를 형질도입하는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 제공된 공정들은 (바이러스 벡터로부터 발현된) 이중 핵산의 세포의 게놈 내로의 안정한 통합을 야기한다. 일부 측면에서, 제공된 공정들은 대안적 공정들, 예컨대 세포를 증폭시키는 것을 수반하는 공정들로부터 생산된 조작된 T 세포 조성물과 비교하여 증진된 효력을 갖는 조작된 CD19-지시된 CAR T 세포를 생성한다.

[0094] 구체적인 측면에서, 제공된 조성물을 생산하는 공정들의 지속기간은 세포, 예를 들어 투입 세포 집단 또는 투입 조성물의 T 세포가 본원에서 자극 또는 자극하는 단계의 개시로 지칭되고, 또한 본원에서 자극 시약에 대한 노출로 지칭되는, 자극 조건(예를 들어, 본원의 섹션 II-C에 기술된 바와 같이)에 먼저 접촉 또는 노출될 때로부터 측정될 수 있고, 예를 들어 자극 시약에 대한 노출이 개시될 때 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 세포를 함유하는 산출 집단(본원에서 산출 조성물 또는 조작된 세포, 예를 들어, 조작된 T 세포의 조성물이라고도 지칭됨)을 수확 또는 채집하는 데 필요한 시간의 지속기간은 자극의 개시로부터 측정된다. 구체적인 구현예에서, 이 공정의 총 지속기간은 (약) 120시간, 108시간, 96시간, 84시간, 72시간, 60시간, 48시간, 36시간, 또는 30시간이거나 또는 그 미만이다. 구체적인 구현예에서, 이 공정의 지속기간은 (약) 5일, 4일, 3일, 2일 또는 1일이거나 또는 그 미만이다. 구체적인 구현예에서, 조작된 세포, 예를 들어, 산출 조성물 또는 집단의 세포는 더 긴 시간량을 필요로 하는 공정들로 조작된 세포보다 더 강력하거나, 지속적이거나 또는 나이트-유사하다. 일

부 측면에서, 제공된 공정들의 지속기간, 예를 들어 조작된 T 세포 집단을 생성하거나 생산하기 위해 필요한 시간량은 일부 기존 공정들보다 (약) 또는 적어도 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 또는 7일을 초과하여 더 짧다. 일부 구현예에서, 제공된 공정의 지속기간은 대체의 또는 기존 공정들의 (약) 75%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 15%, 또는 10%이거나 그보다 더 적다.

[0095] 특정 구현예에서, 제공된 공정들이 생물학적 샘플로부터 단리, 농축 또는 선택된 세포, 예를 들어 CD3+, CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 집단에 대해 수행된다. 일부 측면에서, 제공된 방법은 다른 방법 또는 공정과 비교하여 생물학적 샘플이 대상체로부터 채집되는 때로부터 단축된 시간량 내에 조작된 T 세포의 조성물을 생산하거나 생성할 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 생물학적 샘플, 또는 농축, 단리, 또는 선택된 세포가 냉동 보존 및 저장되는 모든 시간을 포함하여, 생물학적 샘플이 대상체로부터 채집되고 조작된 T 세포가 채집, 수확, 또는 제형화될 때까지(예를 들어, 냉동 보존 또는 투여를 위해) (약) 10일, 9일, 8일, 7일, 6일, 5일, 4일, 3일, 또는 2일 내에 또는 (약) 120시간, 96시간, 72시간, 또는 48시간 내에, 조작된 T 세포를 생산 또는 생성할 수 있다.

[0096] 구체적인 구현예에서, T 세포 집단을 생산 또는 조작하는 공정은 예컨대 바이러스 벡터로 형질도입하기 전에 세포를 자극하는 단계를 포함한다. 제공된 공정의 측면에서, 자극은 자극 결합체(들)(예를 들어, 항-CD3/항-CD28)가 고정되거나 부착된 올리고머성 자극 시약, 예컨대 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머로 수행된다. 외인성 성장 인자의 부재 시에 또는 소량의 외인성 성장 인자가 있을 시에 시험관 내에서 T 세포를 자극하는 데 사용하기 위한 기존 시약은 알려져 있다(예를 들어, 문헌[미국 특허 6,352,694 B1 및 유럽 특허 EP 0 700 430 B1] 참조). 일반적으로, 이러한 시약은 다양한 결합체(예를 들어, 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체)가 고정된 1 μm 초과와 직경의 비드(예를 들어, 자성 비드)를 사용할 수 있다. 그러나, 일부 경우에, 이러한 자성 비드는 예를 들어, 대상체에게 증폭된 T 세포를 투여하기 전에 이러한 자성 비드가 완전히 제거되도록 보장해야 하기 때문에 임상 시험 또는 치료 목적을 위해 필요한 조건에서 세포를 자극하기 위한 방법에 통합되기 어렵다. 일부 측면에서, 세포를 자기장에 노출시키는 등에 의한 이러한 제거는 세포 요법에 이용 가능한 생존 세포의 수율을 감소시킬 수 있다. 특정 경우에, 이러한 시약, 예를 들어 자성 비드를 함유하는 자극 시약은 자극 시약으로부터 충분한 양의 T 세포의 탈착을 허용하기 위해 최소한의 시간량 동안 세포와 함께 인큐베이션되어야 한다.

[0097] 올리고머성 자극 시약, 예를 들어 스트렙타비딘 뮤테인 중합체를 이용하는 제공된 공정은 이러한 잠재적인 한계를 극복한다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 제공된 공정은 이 공정에 의해 생성된 또는 생산된 산출 세포에서 잔류 자극 시약, 예를 들어 자성 비드를 함유하는 시약의 위험을 회피하거나 감소시킨다. 일부 구현예에서, 이는 또한 GMP 표준을 따르는 공정이 다른 방법, 예컨대 최종 조작된 T 세포 집단이 비드가 없는 것을 보장하기 위해 추가 조치를 취해야 하는 방법에 비해 보다 용이하게 확립될 수 있음을 의미한다. 일부 구현예에서, 이는 올리고머성 자극 시약을 세포로부터 예를 들어, 단순히 세포를 행거거나 세척함으로써, 예를 들어, 원심분리에 의해 해리시키는 물질, 예를 들어, 경쟁 시약의 첨가에 의해 본 구현예에서 용이하게 달성될 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 물질 또는 경쟁 시약의 첨가 등에 의한 세포로부터 올리고머성 자극 시약의 제거 또는 분리는 비드 기반 자극 시약의 제거 또는 분리와 비교하여 세포 손실을 거의 또는 전혀 초래하지 않는다. 일부 측면에서, 올리고머성 자극 시약의 제거 또는 분리의 타이밍은 비드 기반 자극 시약의 제거 또는 분리보다 제한되지 않거나 또는 그보다 적게 제한된다. 따라서, 일부 측면에서, 올리고머성 자극 시약은 제공된 공정 동안 임의의 시간 또는 단계에서 세포로부터 제거되거나 분리될 수 있다.

[0098] 일부 측면에서, 올리고머성 자극 시약(예를 들어, 항-CD3/항-CD28 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)의 사용은 항-CD3/항-CD28 상자성 비드 등의 대안적인 자극 시약에 비해 자극 신호의 전체적인 감소를 초래할 수 있다. 더 약하거나 감소된 자극을 수반할 수 있는 제공된 공정은 더 강한 자극 조건 또는 더 높은 양 또는 농도의 자극 시약을 수반하는 공정에 의해 생성된 CAR+ T 세포 만큼, 또는 훨씬 더, 강력하거나, 지속적이거나, 또는 효과적인 조작된 CAR+ T 세포를 생성할 수 있으며, 예컨대 항-CD3/항-CD28 상자성 비드로의 자극 후 일어날 수 있다. 또한, 일부 구현예에서, 더 적은 양 또는 상대적으로 적은 양의 올리고머성 자극 시약으로 세포를 자극하는 것은, 더 많은 양의 올리고머성 자극 시약을 사용하는 공정과 비교하여, 생성되는 조작된 세포 집단의 효력, 효능, 또는 지속성을 증가시킬 수 있다. 이러한 구현예는 공정 중 및 공정 후에 활성화 표지자의 발현 또는 활성화 표지자에 대해 양성인 세포의 일부를 감소시키기에 충분히 낮은 용량에서도 이러한 효과가 지속될 수 있음을 고려한다.

[0099] 특정 구현예에서, 제공된 공정에 의해 생산된 또는 생성된, 조작된 T 세포, 예를 들어, 키메라 항원 수용체 등의 재조합 수용체를 발현하는 T 세포를 함유하는 T 세포의 산출 조성물 또는 집단은 세포 요법을 위한 세포로 이용될 때 특히 효과적이거나 강력하다. 예를 들면, 일부 측면에서, 제공된 공정으로부터 생성된 조작된 T 세포

(예를 들어, CAR+ T 세포)를 함유하는 산출 조성물은 대안적인 기존 공정에 의해 생성되거나 생산된 조작된 T 세포보다 훨씬 더 높은 효력 및/또는 증식 능력을 갖는다. 일부 측면에서, 제공된 공정에 의해 생산된 조작된 T 세포(예를 들어, CAR+ T 세포)를 함유하는 산출 조성물은 대안적 또는 기존 방법에 의해 생산된 조작된 T 세포(예를 들어, CAR+ T 세포)보다 향상된 항-종양 또는 항암 세포 활성을 갖는다.

[0100] 구체적인 구현예에서, 세포가 임계량 또는 농도까지 증폭되는 단계를 포함하지 않는, 제공된 CD19-지시된 T 세포 조성물을 생산하는 방법은 추가적인 이점이 있다. 일부 측면에서, 출발 세포 집단, 예를 들어 투입 집단으로부터 세포의 수 또는 농도를 증가시키기 위해 세포를 증폭시키는 것에 의존하지 않는 프로토콜은 세포 집단 간에 다를 수 있는 인큐베이션 또는 육성을 필요로 하지 않는다. 예를 들면, 일부 구현예는 특히 고위험, 공격성 및/또는 R/R NHL을 비롯한 NHL 환자의 경우와 같이, 상이한 질병 또는 질병 아형이 있는 대상체와 같은 상이한 대상체들로부터 수득된 세포 집단들이 상이한 속도로 분열 또는 증폭될 수 있음을 고려한다. 특정 측면에서, 세포 증폭을 요구하는 잠재적으로 가변적인 단계들을 제거하는 것은 전체 공정의 지속기간이 엄격하게 제어될 수 있게 한다. 특정 구현예에서, 공정 지속기간의 가변성은 감소되거나 제거되며, 이는 일부 측면에서, 의사, 환자 및 기술자 사이의 약속 및 치료를 위한 개선된 조정을 가능하게 하여 자가 세포 요법을 용이하게 할 수 있다.

[0101] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 특정 군 또는 서브세트의 대상체, 예를 들어, 고위험 질병, 예를 들어 고위험 NHL 또는 고위험 거대 B 세포 림프종을 가진 것으로 식별된 대상체를 치료하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 본 방법은 표준 요법에 대해 재발성 또는 불응성(R/R)이고/거나 불량한 예후를 갖는 NHL과 같은 공격성이고/거나 불량한 예후의 B 세포 비호지킨 림프종(NHL)의 형태를 갖는 대상체를 치료한다. 일부 측면에서, 본 방법은 표준 요법에 대해 재발성 또는 불응성(R/R)인 거대 B 세포 림프종을 가진 대상체를 치료한다. 구체적인 측면에서, 조작된 세포는 대상체에 대해 자가(autologous)이고, 조작된 세포를 생산하는 방법 동안 세포를 증폭시키기 위한 육성 단계를 포함하지 않거나 수반하지 않고/않거나 더 낮은 용량의 투여를 허용하는 덜 분화된 CAR-조작된 T 세포 조성물을 생산할 수 있는 기존 방법과 비교하여 단축된 생체의 공정에 의한 생성 후 투여된다. 그 결과, 제공된 방법은 기존의 방법에 비해 유익한데, 이는 특히 질병 또는 병태를 치료하기 위한 하나 이상의 다른 선행 요법에 이어서 치료에 대해 재발성이거나 불응성인 대상체와 같은 치료를 필요로 하는 환자 중에서, 조작된 T 세포 요법이 환자에게 이용 가능할 때까지의 시간을 단축시킬 수 있기 때문이다. 일부 측면에서, 제공된 방법, 조성물, 용도 및 제조물은 이용 가능한 요법에 대한 개선되고 우수한 반응을 달성한다. 일부 구현예에서, 개선된 또는 우수한 반응은 현재 진료 표준(SOC)에 대한 것이다.

[0102] 비호지킨 림프종(NHL)은 다양한 생물학적 및 임상적 행동을 갖는 림프성 악성 신 생물 군이다. 2019년 미국(US)에서 NHL로부터 약 74,200건의 새로운 사례가 진단되었고 19,970건의 사망이 추정된다(Siegel 등, CA Cancer J Clin. 2019; 69(1):7-34). 비호지킨 림프종은 2개의 예후군: 즉, 무통성 림프종(수년 동안 커지고 작아지는 림프절병증으로 서서히 성장함) 및 공격성 림프종(치료되지 않으면 수주 내에 급속히 성장하여 사망에 이름)으로 분류될 수 있다. 가장 흔한 공격성 림프종은 모든 NHL의 30 내지 40%를 차지하는 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)이다(Li 등, Pathology 2018; 50(1):74-87). 다른 공격성 림프종은 고등급 B 세포 림프종(HGBCL), 소위 이중유전자이상(DHL) 또는 삼중유전자이상(THL) 림프종, 외투 세포 림프종(MCL), 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종(PMBCL), 및 3b 등급 여포성 림프종(FL3B)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 다른 공격성 림프종 아형들의 예후 및 치료는 DLBCL과 유사하다. DLBCL로 새롭게 진단된 환자의 약 50%는 제1선 R-CHOP 면역화학요법(리툰시맙, 시클로포스파미드, 독소루비신, 빈크리스틴 및 프레드니손)으로 치료될 수 있다. 그러나, R-CHOP로 치료된 환자의 약 절반이 치료 후 처음 2년 이내에 재발할 것이다(Coiffier 등, Blood 2010; 116(12):2040-5; Vitolo 등, J Clin Oncol. 2017; 35(31):3529-37). 구체 고용량 면역화학요법 후 자가 줄기세포 이식(ASCT)이 재발성 또는 불응성(R/R) DLBCL에 대한 표준 제2선 치료법이다. R/R 환자들 중 대략 절반은 구체 요법 또는 의학적 병태에 대한 반응이 없기 때문에 이식 자격이 없을 것이고, 환자들의 상당한 부분은 ASCT 후에도 재발할 것이다. 불응성 DLBCL(SCHOLAR-1; n = 636)에서의 회고적 다중코호트 NHL 연구는 다음 치료 라인에 대한 26%의 전체 반응률(ORR) 및 6.3개월의 중앙 생존값(OS)을 갖는 이 환자 집단에서 매우 불량한 결과를 입증하였다(Crump 등, Blood 2017; 130(16):1800-8; Gisselbrecht 등, Br J Haematol. 2018; 182(5):633-43).

[0103] CD19는 면역글로불린 상과의 멤버이며, B 세포 수용체를 통한 신호전달을 양성적으로 조절하는 B 세포 표면 신호전달 복합체의 성분이다. 이것은 형질 세포로 분화될 때까지 초기 발달부터 대부분의 B 세포 악성 종양에 의해 발현된다(Stamenkovic 등, J Exp Med. 1988; 168(3):1205-10). CD19는 B 세포 NHL을 비롯한 대부분의 B 세포 악성 종양에 의해 발현되기 때문에 매력적인 치료 표적이다(Davila 등, Oncoimmunology. 2012;(9):1577-83). 중요하게, CD19 항원은 조혈 줄기세포 상에서 또는 B 세포 계통으로부터 떨어진 임의의 정상 조직 상에서 발현되지 않는다. 또한, 순환계에서 CD19가 방출되지 않아 표적의 역효과가 제한된다(Shank 등,

Pharmacotherapy. 2017;37(3):334-45).

- [0104] 구체적인 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 CD19-지시된 CAR T 세포 요법의 투여에 기초하며, 여기서 CAR은 CD19-지시된 scFv 항원 결합 도메인 (예를 들어, FMC63 유래)을 함유한다. CAR은 CD3제타 유래 신호전달 도메인을 함유하는 세포내 신호전달 도메인을 추가로 함유하고, 또한 CD28 함유 구조체와 비교하여 사이토카인 방출 증후군(CRS) 및 신경 독성(NE)의 더 낮은 발생과 연관된 4-1BB 공자극 도메인을 포함한다(Lu 등 J Clin Oncol. 2018;36:3041).
- [0105] CAR T 세포 발달에 대한 도전 과제는 주입 후 장기 지속적인 항종양 반응을 지속적으로 증폭, 지속 및 매개하는 생성물을 생성하는 것이다. 특정 CD19-지시된 CAR-T 세포 요법은 Kymriah™ (티사젠렉류셀)(Kymriah PI) 및 Yescarta® (엑시캅타젠 시로루셀)(Yescarta PI)를 포함하여 B 세포 림프종의 치료에 대해 이용 가능하다. 두 CAR T 세포 요법 모두 환자 집단을 치료하기 어렵다는 점에서 초기 50 내지 60%의 완전 반응률(CRR)을 갖지만; 6개월에, 반응률은 40 내지 50% 범위까지 떨어지며, 응답자들은 진행중인 장기 지속적인 반응을 가질 가능성이 더 높다(Locke 등, Mol Ther. 2017; 25(1):285-95; Schuster 등, N Engl J Med. 2017; 377(26):2545-54). 따라서, 이러한 요법들로 치료를 받은 환자의 절반 이상이 오래 지속되고 장기 지속적인 반응을 나타내지 않을 것이며, 전체 생존율(OS)에 대한 예후가 매우 불량하다.
- [0106] 제공된 방법은 입양 전달된 T 세포의 더 낮은 분화 상태가 이 세포들의 장기 지속적인 항종양 면역을 지속하고 증진하는 능력에 영향을 줄 수 있다는 발견에 기초한다. 일부 구현예에서, 제공된 CD19-지시된 CAR+ 조작된 T 세포 조성물은 세포가 증폭 조건 하에 육성되지 않아 최종 조작된 산출 조성물의 집단 배가의 수를 제한하거나 감소시켜 덜 분화된 생성물을 생성하는 방법에 의해 생산된다. 그러나, 제공된 조성물은 또한 안정하게 통합된 벡터 카피수(iVCN)를 생성하여 CAR의 일관되고 신뢰할 수 있는 발현을 보장함으로써 대상체에게 투여하기 위한 일관된 세포 생성물 및 투여된 용량에서 CAR-발현 세포들 중에서 낮은 가변성을 초래하는 공정을 통해 생산된다. 대조적으로, T 세포 조작을 위한 대부분의 프로토콜은 일상적으로 생체외에서 9일 내지 14일 이상 동안 T 세포를 증폭시킨다. 본원에 예시된 제공 데이터는 분화가 적은 기억 T 세포의 증가된 조성을 갖는 CAR T 세포 생성물이 향상된 장기 지속적인 항종양 활성을 나타낼 수 있는 모델을 뒷받침한다. 이러한 발견은 CAR T 세포 생성물에서 효과기 분화를 최소화하는 것을 목표로 하는 전략이 개선된 임상 효능을 초래할 수 있다는 것을 보여준다. 이러한 목표를 충족시킬 수 있는 구현예가 본원에 제공된다.
- [0107] 본원의 관찰은 제공된 방법에 따라 CD19-지시된 CAR T 세포 요법으로 고위험 질병을 가진 대상체를 치료하는 것을 뒷받침한다. 예를 들어, 재발성/불응성(R/R) NHL과 같은 공격성 NHL 또는 특정 고위험 특징을 가진 환자를 포함하는 NHL이 있는 대상체는 제공된 방법에 따라 치료될 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 (예를 들어, 질병을 치료하기 위해 하나, 둘, 셋, 넷 또는 그 이상의 선행 요법으로) 아주 많은 선행 치료를 받은 대상체를 치료하기 위해 사용될 수 있다.
- [0108] 본 출원에서 언급된 특허 문헌, 과학 논문 및 데이터베이스를 포함한 모든 출판물은 각각의 개별 출판물이 개별적으로 참조로 통합된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전체가 참조로 포함된다. 본원에 제시된 정의가 본원에 참조로 포함된 특허, 출원, 공개된 출원 및 기타 출판물에 제시된 정의와 상반되거나 달리 부합하지 않는 경우, 본원에 제시된 정의가 본원에 참조로 포함된 정의보다 우선한다.
- [0109] 본원에 사용된 섹션 제목은 단지 구성을 위한 목적이며 기재된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0110] **I. B 세포 비호지킨 림프종에서 CD19-표적화된 세포 요법의 방법 및 용도**
- [0111] 조작된 T 세포와 같은 조작된 세포 또는 조작된 세포를 함유하는 조성물을 투여하는 것을 수반하는 치료 방법이 본원에 제공된다. 또한, 조작된 세포 및/또는 이의 조성물의 투여를 수반하는 R/R NHL 등의 공격성 또는 고위험 NHL을 포함하는 B 세포 비호지킨 림프종(NHL)을 갖는 대상체의 치료 방법을 포함하는, 제공된 CD19-지시된 CAR 조작된 세포(예를 들어, T 세포) 및/또는 이의 조성물의 방법 및 용도가 제공된다. 일부 구현예에서, 적어도 2 종 이상의 선행 요법에 실패한 R/R NHL을 갖는 대상체의 치료 방법을 포함하는, 제공된 CD19-지시된 CAR 조작된 세포(예를 들어, T 세포) 및/또는 이의 조성물의 방법 및 용도가 제공된다. 구체적인 구현예에서, 본 방법은 대상체에게 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하는 T 세포의 용량을 투여하는 것을 포함하며, 여기서 상기 T 세포는 CD19에 특이적으로 결합하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함한다.
- [0112] 일부 구현예에서, 본 방법 및 용도는 입양 세포 요법에서 림프종에 의해 발현되는, 이와 관련된 및/또는 이에 특이적인 CD19 및/또는 유래된 세포 유형을 인식하는, 키메라 항원 수용체(CAR)와 같은 키메라 수용체인 것이 일반적인, 유전자 조작된 (재조합) 세포 표면 수용체를 발현하는 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

상기 세포는 일반적으로 투여를 위해 제형화된 조성물로 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 CD19-지시된 재조합 수용체(예를 들어, CAR)로 세포를 조작하기 위한 목적을 위해 치료 전 대상체로부터 채집된다. 일부 구현예에서, 세포는 백혈구 성분채집술에 의해 채집된다. 일부 측면에서, 세포는 증폭을 위해 세포를 육성하는 것을 포함하지 않는 생체의 방법에 의해 조작된다(이하, 비증폭 공정이라고도 함). 제공된 CAR-발현 치료용 조성물을 조작하기 위한 예시적인 비증폭 공정은 섹션 II-C에 기재되어 있다.

[0113] 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 공격성 NHL이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 이전에 무통성인 공격성 NHL이다. 일부 구현예에서, NHL은 비-무통성이며, 이는 빠르게 이동하는 공격성 림프종이다. 가장 흔한 공격성 NHL 아형 중에는 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)이 있다.

[0114] 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 양전자 방사 단층 촬영(PET)을 사용하여 확진된다(confirmed). 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 PET를 사용하여 확진되고, 루가노 분류(Lugano Classification)에 기초하여 병기가 결정된다(예를 들어, 문헌[Cheson 등, (2014) JCO 32(27):3059-3067; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5] 참조). 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 조직학적으로 확인된다. 본원에 개시된 임의의 구현예에서, 질병 또는 병태, 또는 아형 또는 상태는 자가 T 세포 요법을 위한 T 세포를 수득하는 것과 관련하여 백혈구 성분채집술 전에 결정될 수 있다.

[0115] 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 DLBCL NOS(달리 명시되지 않음)이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 MYC와 BCL2 및/또는 BCL6 재배열을 갖고 DLBCL 조직 구조를 갖는 고등급 B 세포 림프종(HGBCL)이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 여포성 림프종으로부터 형질전환된(tFL) DLBCL이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 변연부 림프종으로부터 형질전환된(tMZL) DLBCL이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 일차 종격동 B 세포 림프종(PMBCL)이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 여포성 림프종(FL)이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 3B 등급 여포성 림프종(FL3B)이다.

[0116] 일부 구현예에서, 백혈구 성분채집술 전의 대상체는 0 또는 1의 ECOG(Eastern Cooperative Oncology Group) 수행도를 가진다(예를 들어, 문헌[Oken 등, (1982) Am J Clin Oncol. 5:649-655] 참조). 일부 구현예에서, ECOG(Eastern Cooperative Oncology Group) 수행도 지표는 치료를 위한 대상체, 예를 들어 선행 요법으로부터 성과가 좋지 않았던 대상체를 평가하거나 선별하기 위해 사용될 수 있다(예를 들어, 문헌[Oken 등, (1982) Am J Clin Oncol. 5:649-655] 참조). 수행도의 ECOG 척도는 스스로를 돌보는 능력, 일상 활동 및 신체 능력(예를 들어, 걷기, 일하기 등)의 관점에서 환자의 기능 수준을 설명한다. 일부 구현예에서, 0의 ECOG 수행도는 대상체가 정상적인 활동을 수행할 수 있음을 나타낸다. 일부 측면에서, 1의 ECOG 수행도를 갖는 대상체는 신체 활동에 일부 제한을 보이거나 대상체는 완전히 보행할 수 있다. 일부 측면에서, 2의 ECOG 수행도를 갖는 환자는 50% 이상 보행할 수 있다. 일부 경우에, 2의 ECOG 수행도를 갖는 대상체는 스스로를 돌볼 수도 있다. 예를 들어, 문헌[Sørensen 등, (1993) Br J Cancer 67(4) 773-775]을 참조한다. ECOG 수행도를 반영하는 기준이 아래 표 1에 기술된다.

표 1

[0117]

표 1. ECOG 수행도 기준	
등급	ECOG 수행도
0	제한없이 모든 질병 전 수행력을 발휘할 수 있는, 완전히 활동적임
1	육체적으로 격렬한 활동이 제한되나 걸을 수 있고 가볍거나 앉아서 하는 성질의 일, 예를 들어 가벼운 집안 일, 사무실 작업을 수행할 수 있음
2	깨어 있는 시간의 50% 이상 일어나 걸을 수 있고 모든 자기 돌봄이 가능하나 어떠한 작업 활동도 수행할 수 없음
3	제한된 자기 돌봄만 가능하며; 깨어 있는 시간의 50% 이상 침대나 의자에서 지냄
4	완전히 지체 부자유함; 어떠한 자기 돌봄도 수행할 수 없음; 전적으로 침대나 의자에서 지냄
5	사망

[0118] 일부 구현예에서, 제공된 CD19-지시된 CAR T 세포 조성물의 투여 전에(예컨대 투여할 시에), 대상체는 NHL에 대해 하나 이상의 선행 요법 이후 관해된 이후 재발했거나 이에 대해 불응성이 되었다. 임의의 구현예에서, CD19-지시된 CAR T 세포 조성물을 조작하는 것과 관련하여 백혈구 성분채집술 이전 시점에, 대상체는 NHL을 치료하기 위한 하나 이상의 선행 요법으로 치료 후 관해된 이후 재발했거나 이에 대해 불응성이 되었다. 따라서, 구체적

인 구현예에서, 치료 시점 전에, 예컨대 백혈구 성분채집술 전에, 대상체는 R/R NHL을 가지고 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 재조합 수용체를 발현하는 세포의 투여 전에, 질병 또는 병태(예를 들어, NHL)를 표적으로 하는 요법 또는 치료제로 앞서 치료를 받았다. 일부 구현예에서, 대상체는 조혈 줄기세포 이식(HSCT), 예를 들어, 동종이계 HSCT 또는 자가 HSCT로 앞서 치료를 받았다. 일부 구현예에서, 대상체는 표준 요법으로 치료 후 예후가 좋지 않았고/거나 선행 요법 중 하나 이상의 치료법에 실패하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 NHL 예컨대 공격성 또는 고위험 NHL, 예컨대 DLBCL 또는 이의 아형을 치료하기 위해 치료를 받았거나 이전에 적어도 또는 적어도 약 또는 약 1, 2, 3, 4회 또는 그 이상의 다른 요법을 받았다. 일부 구현예에서, 대상체는 CD20 표적화 제제(예를 들어, 항-CD20 항체) 및 알킬화제를 포함하는 요법을 받았거나 이전에 받은 적이 있다. 일부 측면에서, 대상체는 선행 요법에 대해 완전 반응(CR) 또는 부분 반응(PR)의 초기 반응 후에 재발하였다. 일부 구현예에서, 대상체는 적어도 하나 이상의 선행 요법에 의한 치료에 불응성이며, 불응성 치료는 선행 요법 후 안정 병변(SD) 또는 진행성 병변(PD)의 최상의 반응이다.

[0119] 일부 구현예에서, 대상체는 질병 또는 병태에 대한 2개 라인 이상의 선행 전신 요법으로 치료한 후 관해 후 재발했거나 이에 대해 불응성이 되었다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 상기 선행 전신 요법 치료는 안트라사이클린 및 항-CD20 단클론 항체 치료를 포함한다. 예시적인 항-CD20 항체에는 리툭시맙(rituximab), 오파투무맙(ofatumumab), 옥렐리주맙(ocrelizumab; GA101 또는 R05072759로도 알려짐), 벨투주맙(veltuzumab), 오비누투주맙(obinutuzumab), TRU-015 (Trubion Pharmaceuticals), 오키라투주맙(ocaratuzumab; AME-133v로도 알려짐) 및 Pro131921(Genentech)이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Lim 등 Haematologica. (2010) 95(1):135-43]을 참조한다. 리툭시맙은 CD20에 결합하고 CD20 발현 세포의 세포 용해를 유발하는 키메라 마우스/인간 단클론 항체 IgG1 카파이다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 상기 선행 전신 요법 치료는 안트라사이클린 및 리툭시맙 치료를 포함한다.

[0120] 일부 구현예에서, 대상체는 자가 줄기세포 이식(ASCT) 치료 이후 관해 후 재발했거나 이에 대해 불응성이 되었다. 일부 구현예에서, ASCT로 치료 후 관해 후 재발 또는 이에 대해 불응성이 되는 것은 ASCT 이후 객관적 반응 달성에 실패한 것이다. 일부 구현예에서, ASCT로 치료 후 관해 후 재발 또는 이에 대해 불응성이 되는 것은 ASCT 이후 부분 반응(PR) 또는 더 나아짐 달성에 실패한 것이다. 일부 구현예에서, ASCT로 치료 후 관해 후 재발 또는 이에 대해 불응성이 되는 것은 ASCT 이후 질병 진행을 포함한다.

[0121] 일부 구현예에서, 대상체는 질병 또는 병태에 대한 두 개 이상의 선행 전신 요법 및 ASCT로 치료한 후 관해 후 재발했거나 이에 대해 불응성이 되었다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 상기 선행 전신 요법 치료는 안트라사이클린 및 항-CD20 단클론 항체 치료를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 상기 선행 전신 요법 치료는 안트라사이클린 및 리툭시맙 치료를 포함한다.

[0122] 일부 구현예에서, 백혈구 성분채집술 전에, 대상체는 질병 또는 병태에 의한 중추신경계(CNS)-단독 침습(involverment)을 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 대상체는 질병 또는 병태에 의한 병리학적으로 확인된 2차 CNS 침습을 갖고 있다.

[0123] 일부 구현예에서, 대상체는 제공된 방법에 따라 CD19-지시된 조작된 CAR T 세포의 투여 전에 CAR T 세포 요법을 이전에 받은 적이 없다. 일부 구현예에서, 대상체는 유전자 변형 T 세포 요법을 받은 적이 없다. 일부 구현예에서, 대상체는 CD19 표적화 요법을 받은 적이 없다. 예시적인 CD19 표적화 요법은 항-CD19 단클론 항체 또는 항-CD19 이중특이성 항체를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 일부 구현예에서, 대상체는 플루다라빈 및/또는 시클로포스파미드에 과민성을 갖고 있지 않다. 일부 구현예에서, 대상체는 면역 억제 요법을 필요로 하는 활성 자가면역 질환을 갖고 있지 않다.

[0124] 일부 구현예에서, 대상체는 백혈구 성분채집술 전 14일 이내에는 코르티코스테로이드의 치료 용량을 받지 않았다. 일부 구현예에서, 코르티코스테로이드의 치료 용량은 20mg/day 초과인 프레드니손 또는 등가물로 정의된다. 일부 구현예에서, 대상체는 백혈구 성분채집술 전 7일 이내에 림프 독성으로 간주되지 않는 세포독성 화학 요법제를 받지 않았다. 일부 구현예에서, 대상체는 백혈구 성분채집술 전 7일 이내에는 경막내 요법(IT)을 받지 않았다. 예시적인 세포독성 화학 요법제는 독소루비신, 빈크리스틴, 젠티타빈, 옥살리플라틴, 카보플라틴, 및 에토포시드를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 일부 구현예에서, 대상체는 백혈구 성분채집술 전 5일 이내에는 경구 화학 요법제를 받지 않았다. 예시적인 경구 화학 요법제는 레날리도마이드 및 이브루티닙을 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 일부 구현예에서, 대상체는 백혈구 성분채집술 전 4주 이내에는 림프 독성 화학 요법제를 받지 않았다. 예시적인 림프 독성 화학 요법제는 시클로포스파미드, 이포스파미드 및 벤다무스틴을 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 일부 구현예에서, 대상체는 백혈구 성분채집술 치료 전 8주 이내(생물학적 제제의 경

우) 또는 5 반감기 이내에(저분자의 경우) 실험 요법을 받지 않았다. 일부 구현예에서, 대상체는 백혈구 성분채집술 전 4주 이내에는 면역 억제 요법을 받지 않았다. 예시적인 면역 억제 요법은 칼시뉴린 억제제, 메토트렉세이트 또는 기타 화학 요법제, 미코페놀레이트, 라파마이신, 항-TNF, 항-IL6, 또는 항-IL6R 등의 면역 억제 항체를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 일부 구현예에서, 대상체는 백혈구 성분채집술 전 6주 이내에는 공여체 림프구 주입을 받지 않았다. 일부 구현예에서, 대상체는 백혈구 성분채집술 6주 이내에는 다중 병변에 대한 방사선 요법을 받지 않았다. 일부 구현예에서, 대상체는 백혈구 성분채집술 전 14일 이내에, 추가 비-조사된(non-irradiated) PET-양성 병변이 존재하는 경우, 단일 병변에 대해 방사선 요법을 받지 않았다. 일부 구현예에서, 대상체는 백혈구 성분채집술 전 3달 이내에는 자가 줄기세포 이식(SCT)을 받지 않았다. 일부 구현예에서, 대상체는 백혈구 성분채집술 전 6달 이내에는 동종이계 SCT를 받지 않았다.

[0125] 일부 구현예에서, 조작된 세포를 투여하는 것을 수반하는 치료에 대한 대상체의 적격성은 백혈구 성분채집술 전에 결정된다. 일부 구현예에서, 백혈구 성분채집술 전의 대상체는 백혈구 성분채집술을 위한 적절한 혈관 접근이 가능하다. 일부 구현예에서, 백혈구 성분채집술 전의 대상체는 적절한 기관 기능을 갖는다. 일부 구현예에서, 적절한 기관 기능은 여러 인자들 중에서, 적격성 결정 후 7일 이내에 성장 인자 지원 없이 절대 호중구 수(ANC)가 1.0×10^9 개 세포/L 초과; 적격성 결정 7일 이내에 수혈 지원 없이 혈소판 수 50×10^9 개 세포/L 초과; 계산된 크레아틴 청소율(CrCl, Cockcroft-Gault 공식) 45mL/min 초과; 아스파르트산 아미노기 전달 효소(AST) 수준이 정상 상한(ULN) 2.5배 이하; 알라닌 아미노기 전달효소(ALT) 수준이 ULN 2.5배 이하; 총 빌리루빈 수준이 ULN 1.5배 미만; 질베르 증후군 또는 간 림프종 침윤의 경우, 직접적인 빌리루빈 수준이 ULN 1.5배 미만; 적절한 폐 기능, 예를 들어 실내 공기의 CTCAE 등급 1 호흡장애 및 포화 산소(SaO₂ 92% 초과) 이하; 적절한 심장 기능, 예를 들어 적격성 판정 30일 이내에 수행된 심초음파도(ECHO) 또는 다중 흡수 게이트 획득(MUGA) 스캔에 의해 평가했을 때 40% 이상의 좌심실 박출률(LVEF); 림프구 고갈(LD) 화학 요법을 받기 위한 적절한 기관 기능; 또는 전술한 것 중 임의의 조합으로 표시된다.

[0126] 구체적인 구현예에서, CD19-지시된 조작된 CAR T 세포의 용량의 투여 전에, 대상체는 림프구 고갈 화학 요법을 투여받거나 또는 받은 적이 있다. 림프구 고갈은 항상성 사이토카인, CD4+CD25+ 조절 T 세포의 감소, 골수 미세환경 내의 SDF-1의 증가, 및 항원 제시 세포에 대한 자극 효과를 통해 CAR T 세포의 생착 및 활성을 향상시킬 수 있다(Grossman 등, Nat Rev Immunol. 2004; 4(5):387-395; Stachel 등, Pediatr Blood Cancer 2004; 43(6):644-50; Pinthus 등, J Clin Invest 2004; 114(12):1774-81; Turk 등, J Exp Med 2004; 200(6):771-82). 또한, LD 화학 요법은 대상체의 종양 부담을 더 감소시키고 잠재적으로 사이토카인 방출 증후군(CRS)의 위험 및 중증도를 낮출 수 있다.

[0127] 따라서, 일부 구현예에서, 본 방법은 조작된 세포의 투여 전에 대상체에 시클로포스파미드, 플루타라빈 또는 이의 조합물과 같은 림프구 고갈제 또는 화학 요법제와 같은 사전 조절제를 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 대상체는 조작된 세포의 투여 적어도 2일 전, 예컨대 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9일 전에 사전 조절제를 투여받을 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 조작된 세포의 투여 9일 이내 전, 예컨대 8, 7, 6, 5, 4, 3 또는 2일 이내 전에 사전 조절제를 투여받는다.

[0128] 일부 구현예에서, 대상체는 대상체의 체중 (약) 20mg/kg 내지 100mg/kg, 예컨대 (약) 40mg/kg 내지 80mg/kg의 용량의 시클로포스파미드로 사전 조절된다. 일부 측면에서, 대상체는 (약) 60mg/kg의 시클로포스파미드로 사전 조절되거나 이를 투여받는다. 일부 구현예에서, 시클로포스파미드는 단일 용량으로 투여될 수 있거나, 예컨대 매일, 격일 또는 3일마다 주어진 복수의 용량으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 시클로포스파미드는 1일 또는 2일 동안 매일 1회 투여된다. 일부 구현예에서, 림프구 고갈제가 시클로포스파미드를 포함하는 경우, 대상체에 (약) $100\text{mg}/\text{m}^2$ 내지 $500\text{mg}/\text{m}^2$ (대상체의 체표면적), 예컨대 (약) $200\text{mg}/\text{m}^2$ 내지 $400\text{mg}/\text{m}^2$ 또는 $250\text{mg}/\text{m}^2$ 내지 $350\text{mg}/\text{m}^2$ (수치 포함)의 용량으로 시클로포스파미드를 투여한다. 일부 경우에, 대상체에 약 $100\text{mg}/\text{m}^2$ 의 시클로포스파미드를 투여한다. 일부 경우에, 대상체에 약 $150\text{mg}/\text{m}^2$ 의 시클로포스파미드를 투여한다. 일부 경우에, 대상체에 약 $200\text{mg}/\text{m}^2$ 의 시클로포스파미드를 투여한다. 일부 경우에, 대상체에 약 $250\text{mg}/\text{m}^2$ 의 시클로포스파미드를 투여한다. 일부 경우에, 대상체에 약 $300\text{mg}/\text{m}^2$ 의 시클로포스파미드를 투여한다. 일부 구현예에서, 시클로포스파미드는 단일 용량으로 투여될 수 있거나, 예컨대 매일, 격일 또는 3일마다 주어진 복수의 용량으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 시클로포스파미드는 예컨대 1 내지 5일 동안, 예를 들어 3 내지 5일 동안 매일 투여된다. 일부 경우에, 대상체에 세포 요법의 개시 전 3일 동안 매일 약 $300\text{mg}/\text{m}^2$ (대상체의 체표면적)의 시클로포스

파미드가 투여된다. 일부 구현예에서, 대상체에 세포 요법의 개시 전에, 총 (약) $300\text{mg}/\text{m}^2$, $400\text{mg}/\text{m}^2$, $500\text{mg}/\text{m}^2$, $600\text{mg}/\text{m}^2$, $700\text{mg}/\text{m}^2$, $800\text{mg}/\text{m}^2$, $900\text{mg}/\text{m}^2$, $1000\text{mg}/\text{m}^2$, $1200\text{mg}/\text{m}^2$, $1500\text{mg}/\text{m}^2$, $1800\text{mg}/\text{m}^2$, $2000\text{mg}/\text{m}^2$, $2500\text{mg}/\text{m}^2$, $2700\text{mg}/\text{m}^2$, $3000\text{mg}/\text{m}^2$, $3300\text{mg}/\text{m}^2$, $3600\text{mg}/\text{m}^2$, $4000\text{mg}/\text{m}^2$ 또는 $5000\text{mg}/\text{m}^2$ 의 시클로포스파미드, 또는 상기 중 임의의 것에 의해 정의된 범위 만큼 투여된다.

[0129] 일부 구현예에서, 림프구 고갈제가 플루다라빈을 포함하는 경우, 대상체에 (약) $1\text{mg}/\text{m}^2$ 내지 (약) $100\text{mg}/\text{m}^2$, 예컨대 (약) $10\text{mg}/\text{m}^2$ 내지 (약) $75\text{mg}/\text{m}^2$, (약) $15\text{mg}/\text{m}^2$ 내지 (약) $50\text{mg}/\text{m}^2$, (약) $20\text{mg}/\text{m}^2$ 내지 (약) $40\text{mg}/\text{m}^2$ 또는 (약) $24\text{mg}/\text{m}^2$ 내지 (약) $35\text{mg}/\text{m}^2$ (수치 포함)의 용량으로 플루다라빈이 투여된다. 일부 경우에, 대상체에 (약) $10\text{mg}/\text{m}^2$ 의 플루다라빈이 투여된다. 일부 경우에, 대상체에 (약) $15\text{mg}/\text{m}^2$ 의 플루다라빈이 투여된다. 일부 경우에, 대상체에 (약) $20\text{mg}/\text{m}^2$ 의 플루다라빈이 투여된다. 일부 경우에, 대상체에 (약) $25\text{mg}/\text{m}^2$ 의 플루다라빈이 투여된다. 일부 경우에, 대상체에 (약) $30\text{mg}/\text{m}^2$ 의 플루다라빈이 투여된다. 일부 구현예에서, 플루다라빈은 단일 용량으로 투여될 수 있거나, 예컨대 매일, 격일 또는 3일마다 주어진 복수의 용량으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 플루다라빈은 예컨대 1 내지 5일 동안, 예를 들어 3 내지 5일 동안 매일 투여된다. 일부 경우에, 대상체에 세포 요법의 개시 전 3일 동안 매일 (약) $30\text{mg}/\text{m}^2$ (대상체의 체표면적)의 플루다라빈이 투여된다. 일부 구현예에서, 대상체에 세포 요법의 개시 전에, 총 (약) $10\text{mg}/\text{m}^2$, $20\text{mg}/\text{m}^2$, $25\text{mg}/\text{m}^2$, $30\text{mg}/\text{m}^2$, $40\text{mg}/\text{m}^2$, $50\text{mg}/\text{m}^2$, $60\text{mg}/\text{m}^2$, $70\text{mg}/\text{m}^2$, $80\text{mg}/\text{m}^2$, $90\text{mg}/\text{m}^2$, $100\text{mg}/\text{m}^2$, $120\text{mg}/\text{m}^2$, $150\text{mg}/\text{m}^2$, $180\text{mg}/\text{m}^2$, $200\text{mg}/\text{m}^2$, $250\text{mg}/\text{m}^2$, $270\text{mg}/\text{m}^2$, $300\text{mg}/\text{m}^2$, $330\text{mg}/\text{m}^2$, $360\text{mg}/\text{m}^2$, $400\text{mg}/\text{m}^2$ 또는 $500\text{mg}/\text{m}^2$ 의 시클로포스파미드, 또는 상기 중 임의의 것에 의해 정의된 범위 만큼 투여된다.

[0130] 일부 구현예에서, 림프구 고갈제는 시클로포스파미드 또는 플루다라빈과 같은 단일 제제를 포함한다. 일부 구현예에서, 대상체에 플루다라빈 또는 다른 림프구 고갈제 없이, 시클로포스파미드만 투여된다. 일부 구현예에서, 투여 전에, 대상체는 2 내지 4일 동안 매일 (약) 200 내지 $400\text{mg}/\text{m}^2$ (대상체의 체표면적), 선택적으로 (약) $300\text{mg}/\text{m}^2$ 의 시클로포스파미드의 투여를 포함하는 림프구 고갈 요법을 받았다. 일부 구현예에서, 대상체에 예를 들어 시클로포스파미드 또는 다른 림프구 고갈제 없이, 플루다라빈만 투여된다. 일부 구현예에서, 투여 전에, 대상체는 2 내지 4일 동안 매일 (약) 20 내지 $40\text{mg}/\text{m}^2$ (대상체의 체표면적), 선택적으로 (약) $30\text{mg}/\text{m}^2$ 의 플루다라빈의 투여를 포함하는 림프구 고갈 요법을 받았다.

[0131] 일부 구현예에서, 림프구 고갈제는 시클로포스파미드 및 플루다라빈의 조합물과 같은 제제의 조합물을 포함한다. 따라서, 상기 제제의 조합물은 상기 기재된 바와 같은 임의의 용량 또는 투여 일정의 시클로포스파미드 및 상기 기재된 바와 같은 임의의 용량 또는 투여 일정의 플루다라빈을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에서, 대상체에 제1 또는 후속 용량 전에 (약) $60\text{mg}/\text{kg}$ ($\sim 2\text{g}/\text{m}^2$)의 시클로포스파미드 및 $25\text{mg}/\text{m}^2$ 플루다라빈의 3 내지 5개 용량이 투여된다. 일부 구현예에서, 대상체에 세포의 투여 전에, 플루다라빈($3\text{일 동안 } 30\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$) 및 시클로포스파미드($3\text{일 동안 } 300\text{mg}/\text{m}^2/\text{day}$) (flu/cy)가 동시에 정맥내 투여된다. 일부 구현예에서, 대상체에 림프구 고갈제의 하나 이상의 용량들 중 감소된, 지연된 또는 제거된 용량이 투여된다.

[0132] 일부 구현예에서, 대상체로부터 세포를 채집한 후에 림프구 고갈(LD) 화학 요법을 투여하기 전에, 대상체는 질병 통제를 위해 가교 요법(bridging therapy)을 받을 수 있다. 환자의 연령, 질병의 중증도 또는 정도, 부작용의 가능성, LD 화학 요법 이전의 투여 시기, 이전의 요법들 및 다른 요인들과 같은 요인들을 기초로 하는 것을 포함하여, 특정 질병 또는 병태를 치료하기 위한 숙련된 의사의 판단을 기초로 가교 요법의 일부로서 임의의 다양한 요법이 투여될 수 있다. 림프구 고갈 요법 전에 가교로서 주어질 수 있는 예시적인 요법은 코르티코스테로이드, 빈크리스틴, 시클로포스파미드, 리톡시맵, 텍사메타손, 프레드니손, 레날리도마이드, 켄타타빈, 옥살리플라틴, 브렌톡시맵, 베도틴, 이브루티닙, 메토트렉세이트, 시토신 아리비노사이드, 시타라빈, 벤다무스틴, 또는 상기 중 임의의 것의 임의의 조합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0133] 일부 구현예에서, 대상체에 예를 들어 주입 반응의 위험을 최소화하기 위해 사전 투약이 이루어진다. 일부 측면에서, 사전 투약은 통증 완화제 및/또는 항히스타민제를 투여하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 사전 투약은 아세트아미노펜 및/또는 디펜히드라민, 또는 또 한 번의 H1-항히스타민제를 투여하는 것을 포함한다. 일부

구현예에서, 환자는 세포 요법으로 치료 전 (약) 30 내지 60분에 아세트아미노펜(예를 들어, 650mg 경구로) 및 디펜히드라민(예를 들어, 25-50mg, IV 또는 경구로), 또는 또 한 번의 H1-항히스타민제가 투여된다.

[0134] 일부 구현예에서, 대상체는 적어도 18세이다. 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 대상체는 인간 대상체이다.

[0135] A. 투약(dosing)

[0136] 일부 구현예에서, 조작된 세포의 일정 용량이 제공된 방법, 및/또는 제공된 제조품 또는 조성물에 부합되게 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 용량의 크기 또는 투여 시기는 대상체에서 특정 질병 또는 병태에 대한 작용으로서 결정된다. 일부 경우에, 제공된 기재의 관점에서 특정 질병에 대한 용량의 크기 또는 투여 시기는 경험적으로 결정될 수 있다.

[0137] 제공된 임의의 구현예의 일부에서, 재조합 수용체를 발현하는 조작된 T 세포와 같은 T 세포의 용량은 CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 또는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포에 대해 농축되거나 또는 농축된 세포 조성물 또는 세포 집단을 포함한다. 상기 임의의 일부 구현예에서, T 세포의 용량 중 세포의 (약) 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 초과는 CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포 또는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포이다. 상기 임의의 일부 구현예에서, T 세포의 용량 중 세포의 (약) 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 초과는 CD3+ T 세포이다. 제공된 임의의 구현예의 일부에서, T 세포의 용량은 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포 둘 모두를 포함한다. 상기 임의의 일부 구현예에서, T 세포의 용량 중 세포의 (약) 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98% 초과는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포이다.

[0138] 일부 구현예에서, 세포의 용량은 대상체의 체중 킬로그램 당 CD19-지시된 CAR 조작된 세포 수(cells/kg)를 (약) 0.1×10^5 내지 (약) 2×10^6 개 세포/kg, 예컨대 (약) 0.1×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 0.5×10^5 개 세포/kg, (약) 0.5×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 1×10^5 개 세포/kg, (약) 1×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 1.5×10^5 개 세포/kg, (약) 1.5×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 2×10^5 개 세포/kg, (약) 2×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 2.5×10^5 개 세포/kg, (약) 2.5×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 3×10^5 개 세포/kg, (약) 3×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 3.5×10^5 개 세포/kg, (약) 3.5×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 4×10^5 개 세포/kg, (약) 4×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 4.5×10^5 개 세포/kg, (약) 4.5×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 5×10^5 개 세포/kg, (약) 5×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 5.5×10^5 개 세포/kg, (약) 5.5×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 6×10^5 개 세포/kg, (약) 6×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 6.5×10^5 개 세포/kg, (약) 6.5×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 7×10^5 개 세포/kg, (약) 7×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 7.5×10^5 개 세포/kg, (약) 7.5×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 8×10^5 개 세포/kg, 또는 (약) 8×10^5 개 세포/kg 내지 (약) 10×10^5 개 세포/kg을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 용량은 대상체의 체중 킬로그램 당 CD19-지시된 CAR 조작된 세포 수(cells/kg)를 2×10^5 개 이내, 예컨대 (약) 3×10^5 개 이내 세포/kg, (약) 4×10^5 개 이내 세포/kg, (약) 5×10^5 개 이내 세포/kg, (약) 6×10^5 개 이내 세포/kg, (약) 7×10^5 개 이내 세포/kg, (약) 8×10^5 개 이내 세포/kg, (약) 9×10^5 개 이내 세포/kg, (약) 1×10^6 개 이내 세포/kg 또는 (약) 2×10^6 개 이내 세포/kg을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 용량은 대상체의 체중 킬로그램 당 CD19-지시된 CAR 조작된 세포 수(cells/kg)를 적어도 (약) 또는 (약) 0.1×10^5 개, 예컨대 적어도 (약) 또는 (약) 0.2×10^5 개 세포/kg, 적어도 (약) 또는 (약) 0.3×10^5 개 세포/kg, 적어도 (약) 또는 (약) 0.4×10^5 개 세포/kg, 적어도 (약) 또는 (약) 0.5×10^5 개 세포/kg, 적어도 (약) 또는 (약) 0.6×10^5 개 세포/kg, 적어도 (약) 또는 (약) 0.7×10^5 개 세포/kg, 적어도 (약) 또는 (약) 0.8×10^5 개 세포/kg, 적어도 (약) 또는 (약) 0.9×10^5 개 세포/kg, 적어도 (약) 또는 (약) 0.1×10^6 개 세포/kg, 또는 적어도 (약) 또는 (약) 0.2×10^6 개 세포/kg을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 수는 상기 세포의 생존 세포, 예를 들어 생존 T 세포 예컨대 CD19-지시된 CAR을 발현하는 생존 CD3+ 세포의 수이다.

[0139] 특정 구현예에서, 세포 또는 세포의 아형의 개별 집단은 (약) 10만 내지 (약) 1000억 세포의 범위로 및/또는 대상체의 체중 kg 당 세포의 양으로, 예컨대, 예를 들어, (약) 10만 내지 (약) 500억 세포(예를 들어, (약) 5백만

세포, (약) 2천5백만 세포, (약) 5억 세포, (약) 10억 세포, (약) 50억 세포, (약) 200억 세포, (약) 300억 세포, (약) 400억 세포 또는 전술한 수치 중 임의의 2개에 의해 정의되는 범위), (약) 1백만 내지 (약) 500억 세포(예를 들어, (약) 5백만 세포, (약) 2천5백만 세포, (약) 5억 세포, (약) 10억 세포, (약) 50억 세포, (약) 200억 세포, (약) 300억 세포, (약) 400억 세포 또는 전술한 수치 중 임의의 2개에 의해 정의되는 범위), 예컨대 (약) 1천만 내지 (약) 1000억 세포(예를 들어, (약) 2천만 세포, (약) 3천만 세포, (약) 4천만 세포, (약) 6천만 세포, (약) 7천만 세포, (약) 8천만 세포, (약) 9천만 세포, (약) 100억 세포, (약) 250억 세포, (약) 500억 세포, (약) 750억 세포, (약) 900억 세포 또는 전술한 수치 중 임의의 2개에 의해 정의되는 범위) 및 일부 경우에 (약) 1억 세포 내지 (약) 500억 세포(예를 들어, (약) 1억2천만 세포, (약) 2억5천만 세포, (약) 3억 5천만 세포, (약) 6억5천만 세포, (약) 8억 세포, (약) 9억 세포, (약) 30억 세포, (약) 300억 세포, (약) 450억 세포) 또는 상기 범위 사이의 임의의 수치 및/또는 대상체의 체중 kg당 세포의 양으로 대상체에 투여된다. 투여량은 질병 또는 장애 및/또는 환자 및/또는 다른 치료의 구체적인 속성에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 수치는 제조할 수용체 발현 세포의 수를 지칭하고; 다른 구현예에서, 이는 투여되는 조성물 중 T 세포 또는 총 세포의 수를 지칭한다. 일부 구현예에서, 세포의 수는 상기 세포의 생존 세포의 수이다.

[0140] 일부 구현예에서, 세포의 용량은 세포의 용량이 대상체의 체표면적 또는 체중에 결부되거나 그에 기초하지 않는 세포의 균일한 용량 또는 세포의 고정된 용량이다.

[0141] 일부 구현예에서, 유전자 조작된 세포의 용량은 (약) 1×10^5 개 내지 (약) 1×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^5 개 내지 (약) 0.8×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^5 개 내지 (약) 0.6×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^5 개 내지 (약) 0.4×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^5 개 내지 (약) 0.2×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^5 개 내지 (약) 1.0×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^5 개 내지 (약) 0.8×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^5 개 내지 (약) 0.6×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^5 개 내지 (약) 0.4×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^5 개 내지 (약) 0.2×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^5 개 내지 (약) 1.0×10^6 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^6 개 내지 (약) 1.0×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^6 개 내지 (약) 0.8×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^6 개 내지 (약) 0.6×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^6 개 내지 (약) 0.4×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^6 개 내지 (약) 0.2×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^6 개 내지 (약) 1.0×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^6 개 내지 (약) 0.8×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^6 개 내지 (약) 0.6×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^6 개 내지 (약) 0.4×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 1×10^6 개 내지 (약) 0.2×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 5×10^6 개 내지 (약) 1.0×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 5×10^6 개 내지 (약) 0.8×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 5×10^6 개 내지 (약) 0.6×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 5×10^6 개 내지 (약) 0.4×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 5×10^6 개 내지 (약) 0.2×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 5×10^6 개 내지 (약) 1.0×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 5×10^6 개 내지 (약) 0.8×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 5×10^6 개 내지 (약) 0.6×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 10×10^6 개 내지 (약) 1.0×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 10×10^6 개 내지 (약) 0.9×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 10×10^6 개 내지 (약) 0.8×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 10×10^6 개 내지 (약) 0.7×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 10×10^6 개 내지 (약) 0.6×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 10×10^6 개 내지 (약) 0.5×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 10×10^6 개 내지 (약) 0.4×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 10×10^6 개 내지 (약) 0.3×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 10×10^6 개 내지 (약) 0.2×10^8 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, (약) 10×10^6

[illegible]

[0142] 일부 구현예에서, 유전자 조작된 세포의 용량은 적어도 또는 적어도 약 1×10^5 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, 적어도 또는 적어도 약 2.5×10^5 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, 적어도 또는 적어도 약 5×10^5 개

CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, 적어도 또는 적어도 약 1×10^6 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, 적어도 또는 적어도 약 2.5×10^6 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, 적어도 또는 적어도 약 5×10^6 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, 적어도 또는 적어도 약 1×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, 적어도 또는 적어도 약 2.5×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포, 또는 적어도 또는 적어도 약 5×10^7 개 CD19-지시된 CAR 발현 총 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 수는 상기 세포의 생존 세포, 예컨대 생존 T 세포의 수이다.

[0143] 일부 구현예에서, 유전자 조작된 세포의 용량은 (약) 1×10^5 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포, (약) 2.5×10^5 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포, (약) 5×10^5 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포, (약) 1×10^6 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포, (약) 2.5×10^6 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포, (약) 5×10^6 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포, (약) 1×10^7 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포, (약) 1.5×10^7 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포, (약) 2×10^7 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포, (약) 2.5×10^7 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포, (약) 3×10^7 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포, (약) 3.5×10^7 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포, (약) 4×10^7 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포, (약) 4.5×10^7 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포, 또는 (약) 5×10^7 개 미만 CD19-지시된 CAR 발현 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 수는 상기 세포의 생존 세포, 예컨대 생존 T 세포의 수이다.

[0144] 일부 구현예에서, 세포 요법은 (약) 1×10^5 개 내지 (약) 5×10^8 개 총 재조합 수용체 발현 세포 또는 총 T 세포, (약) 5×10^5 개 내지 (약) 1×10^7 개 총 재조합 수용체 발현 세포 또는 총 T 세포, 또는 (약) 1×10^6 개 내지 (약) 1×10^7 개 총 재조합 수용체 발현 세포 또는 총 T 세포(각 수치 포함)의 세포 수를 포함하는 용량의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 요법은 의 단위 용량은 (약) 1×10^5 개 내지 (약) 1×10^8 개 총 재조합 수용체 발현 세포 또는 총 T 세포, (약) 5×10^5 개 내지 (약) 1×10^8 개 총 재조합 수용체 발현 세포 또는 총 T 세포, (약) 1×10^6 개 내지 (약) 50×10^6 개 총 재조합 수용체 발현 세포 또는 총 T 세포, (약) 5×10^6 개 내지 (약) 45×10^6 개 총 재조합 수용체 발현 세포 또는 총 T 세포, 또는 (약) 10×10^6 개 내지 (약) 25×10^6 개 총 재조합 수용체 발현 세포 또는 총 T 세포(각 수치 포함)의 세포 수를 포함하는 용량의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 요법은 적어도 또는 적어도 약 1×10^5 개 총 재조합 수용체-발현 세포 또는 총 T 세포, 예컨대 적어도 또는 적어도 약 1×10^6 개, 적어도 또는 적어도 약 1×10^7 개, 적어도 또는 적어도 약 1×10^8 개의 상기 세포의 수를 포함하는 세포의 용량의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 수는 상기 세포의 생존 세포, 예컨대 생존 T 세포의 수이다.

[0145] 일부 구현예에서, 상기 수는 $CD3^+$, $CD8^+$, 또는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 의 총 수, 일부 경우에 또한 재조합 수용체-발현(예를 들어, CAR⁺) 세포의 총 수를 기준으로 한다. 일부 구현예에서, 세포의 수는 상기 세포의 생존 세포의 수이다.

[0146] 일부 구현예에서, 세포 요법은 (약) 1×10^5 개 내지 (약) 1×10^8 개 $CD3^+$, $CD8^+$ 또는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 총 T 세포 또는 $CD3^+$, $CD8^+$ 또는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 세포, (약) 5×10^5 개 내지 (약) 5×10^7 개 $CD3^+$, $CD8^+$ 또는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 총 T 세포 또는 $CD3^+$, $CD8^+$ 또는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 세포, 또는 (약) 1×10^6 개 내지 (약) 2.5×10^7 개 $CD3^+$, $CD8^+$ 또는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 총 T 세포 또는 $CD3^+$, $CD8^+$ 또는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 세포(각 수치 포함)의 세포 수를 포함하는 용량의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 요법은 (약) 1×10^5 내지 (약) 1×10^8 개 총 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$ 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ 세포, (약) 5×10^5 내지 (약) 5×10^7 개 총 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ 세포, 또는 (약) 1×10^6 내지 (약) 2.5×10^7 개 총 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ 세포(각 수치 포함)의 세포 수를 포함하는 단위 용량의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 수는 상기 세포의 생존 세포의 수

이다.

[0147] 일부 구현예에서, 유전자 조작된 세포의 용량은 적어도 또는 적어도 약 0.1×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, 적어도 또는 적어도 약 0.5×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, 적어도 또는 적어도 약 1.0×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, 적어도 또는 적어도 약 2.5×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, 또는 적어도 또는 적어도 약 5×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 조작된 세포의 용량은 (약) 0.1×10^7 개 미만의 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, (약) 0.5×10^7 개 미만의 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, (약) 1.0×10^7 개 미만의 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, (약) 2.5×10^7 개 미만의 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, (약) 5×10^7 개 미만의 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, (약) 7.5×10^7 개 미만의 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, 또는 (약) 10×10^7 개 미만의 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 조작된 세포의 용량은 (약) 0.5×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, (약) 1.0×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, (약) 1.5×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, (약) 2.0×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, (약) 2.5×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, (약) 3.0×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, (약) 3.5×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, (약) 4.0×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, (약) 4.5×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포, (약) 5×10^7 개 $CD3^+/CAR^+$, $CD8^+/CAR^+$, 또는 $CD4^+/CD8^+/CAR^+$ T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 수는 상기 세포의 생존 세포의 수이다.

[0148] 일부 구현예에서, T 세포의 용량은 (약) 0.5×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포, (약) 1.0×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포, (약) 1.5×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포, (약) 2.0×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포, (약) 2.5×10^7 개 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 $CD8^+$ T 세포, (약) 3.0×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포, (약) 3.5×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포, (약) 4.0×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포, 또는 (약) 4.5×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 용량은 (약) 1×10^8 개의 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포 또는 (약) 5×10^7 개의 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 $CD8^+$ T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포의 용량은 (약) 1.5×10^8 개의 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포 또는 (약) 0.75×10^8 개의 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 $CD8^+$ T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 수는 상기 세포의 생존 세포의 수이다.

[0149] 일부 구현예에서, 상기 용량의 T 세포는 $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포 또는 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포를 포함한다.

[0150] 일부 구현예에서, 예를 들어, 대상체가 인간인 경우, $CD4^+$ 및 $CD8^+$ T 세포를 포함하는 용량 내를 포함하여 용량의 $CD8^+$ T 세포는 (약) 1×10^6 내지 (약) 5×10^8 개의 총 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 $CD8^+$ 세포, 예를 들어, (약) 1×10^6 내지 (약) 1×10^8 개의 상기 세포의 범위내, 예컨대 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 , 7.5×10^6 , 1×10^7 , 2.5×10^7 , 5×10^7 , 또는 7.5×10^7 개의 총 상기 세포 수, 또는 전술한 수치 중 임의의 두 개 사이의 범위내 수를 포함한다. 일부 구현예에서, 환자는 다중 용량으로 투여받고, 각각의 용량 또는 총 용량은 전술한 수치 중 어느 하나 내에 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 용량은 (약) 1×10^6 내지 (약) 5×10^7

개의 총 재조합 수용체-발현 CD8⁺ T 세포, (약) 5×10^6 내지 (약) 2.5×10^7 개의 총 재조합 수용체-발현 CD8⁺ T 세포, (약) 10×10^6 내지 (약) 2.5×10^7 개의 총 재조합 수용체-발현 CD8⁺ T 세포(각 수치 포함)의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 수는 상기 세포의 생존 세포의 수이다.

[0151] 일부 구현예에서, 예를 들어, 대상체가 인간인 경우, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 포함하는 용량 내를 포함하여 용량의 CD4⁺ T 세포는 (약) 1×10^6 내지 (약) 5×10^8 개의 총 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 CD4⁺ 세포, 예를 들어, (약) 1×10^6 내지 (약) 1×10^8 개의 상기 세포의 범위내, 예컨대 1×10^6 , 2.5×10^6 , 5×10^6 , 7.5×10^6 , 1×10^7 , 2.5×10^7 , 5×10^7 , 또는 7.5×10^7 개의 총 상기 세포 수, 또는 전술한 수치 중 임의의 두 개 사이의 범위내 수를 포함한다. 일부 구현예에서, 환자는 다중 용량으로 투여받고, 각각의 용량 또는 총 용량은 전술한 수치 중 어느 하나 내에 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 용량은 (약) 1×10^6 내지 (약) 5×10^7 개의 총 재조합 수용체-발현 CD4⁺ T 세포, (약) 5×10^6 내지 (약) 2.5×10^7 개의 총 재조합 수용체-발현 CD4⁺ T 세포, (약) 10×10^6 내지 (약) 2.5×10^7 개의 총 재조합 수용체-발현 CD4⁺ T 세포(각 수치 포함)의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 수는 상기 세포의 생존 세포의 수이다.

[0152] 일부 구현예에서, 예를 들어, 대상체가 인간인 경우, 용량은 약 5×10^8 개 미만의 총 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 세포 또는 T 세포를, 예를 들어, (약) 1×10^6 내지 (약) 1×10^8 개의 상기 세포 수 범위내에서, 예컨대 (약) 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 또는 1×10^8 개의 총 상기 세포 수의 범위내에서, 또는 전술한 수치 중 임의의 두 개 수치 사이의 범위내에서 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 수는 상기 세포의 생존 세포의 수이다.

[0153] 일부 구현예에서, 환자는 다중 용량으로 투여받고, 각각의 용량 또는 총 용량은 전술한 수치 중 어느 하나 내에 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 용량은 (약) 1×10^5 내지 (약) 1×10^8 개의 총 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포 또는 총 T 세포, (약) 1×10^5 내지 (약) 0.5×10^8 개의 총 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포 또는 총 T 세포, (약) 1×10^5 내지 (약) 0.5×10^8 개의 총 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포 또는 총 T 세포, (약) 5×10^5 내지 (약) 5×10^7 개의 총 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포 또는 총 T 세포, 또는 (약) 1×10^6 내지 (약) 1×10^7 개의 총 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 T 세포 또는 총 T 세포(각 수치 포함)의 투여를 포함한다.

[0154] 일부 구현예에서, 상기 용량의 T 세포는 CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포 또는 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포를 포함한다.

[0155] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 재조합 수용체-발현 T 세포의 용량이 단일 용량으로 대상체에 투여되거나 2주, 1개월, 3개월, 6개월, 1년 이상의 기간 내에 1회만 투여된다.

[0156] 입양 세포 요법의 맥락에서, 주어진 “용량(dose)”의 투여는 단일 조성물 및/또는 단일 비중단 투여, 예를 들어 단일 주사 또는 연속 주입으로서 주어진 세포의 양 또는 수의 투여를 포괄하며, 또한 다중 개별 조성물 또는 주입제로 제공된 경우 명시된 기간에 걸쳐, 예컨대 3일 이내에 걸쳐 분할된 용량 또는 복수의 조성물로서 주어진 세포의 양 또는 수의 투여를 포괄한다. 따라서, 일부 맥락에서, 용량은 단일 시점에서 주어진 또는 개시된, 명시된 세포 수의 단일 또는 연속 투여이다. 그러나, 일부 맥락에서, 용량은 3일 동안 또는 2일 동안 하루에 한번 또는 하루의 기간에 걸쳐 다중 주입에 의한 것과 같이 3일 이내의 기간에 걸쳐 다중 주사 또는 주입으로 투여된다.

[0157] 구체적인 구현예에서, 세포의 수 및/또는 농도는 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 세포의 수를 지칭한다. 다른 구현예에서, 세포의 수 및/또는 농도는 투여되는 T 세포의 수 또는 농도를 지칭한다.

[0158] 일부 구현예에서, 대상체는 세포의 다중 용량, 예를 들어 두 개 이상의 용량 또는 다중 연속 용량을 받는다. 일부 구현예에서, 두 개의 용량이 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 대상체는 연속 용량, 예를 들어 제2 용량을 받는데, 이는 제1 용량 후 대략 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21일에 투여된다. 일부 구현예에서, 다중 연속 용량은 제1 용량 후에 투여되어, 추가 용량 또는 용량들이 연속 용량의 투여 후에 투여되도록 한다. 일부 측면에서, 추가 용량으로 대상체에 투여되는 세포의 수는 제1 용량 및/또

는 연속 용량과 동일하거나 유사하다. 일부 구현예에서, 추가 용량 또는 용량들은 선행 용량들보다 더 크다.

- [0159] 일부 측면에서, 용량의 크기는 하나 이상의 기준 예컨대 선행 치료, 예를 들어 화학 요법에 대한 대상체의 반응, 대상체에서 질병 부담, 예컨대 종양 부하, 부피, 크기 또는 전이의 정도, 범위 또는 유형, 병기(stage) 및/또는 대상체가 독성 결과, 예를 들어 CRS, 대식세포 활성화 증후군, 종양 용해 증후군, 신경 독성을 발달시킬 가능성 또는 발생률 및/또는 투여되는 세포 및/또는 재조합 수용체에 대한 숙주 면역 반응에 기초하여 결정된다.
- [0160] 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 구현예에서, 연속 용량의 투여는 제1 용량의 투여 후 약 14일 초과 및 약 28일 미만의 시점에 수행한다. 일부 측면에서, 제1 용량 및 연속 용량 사이 시간은 약 21일이다. 일부 구현예에서, 추가 용량 또는 용량들, 예를 들어, 연속 용량들은 연속 용량의 투여 후 투여된다. 일부 측면에서, 추가 연속 용량 또는 용량들은 선행 용량의 투여 후 적어도 약 14일 이상 내지 약 28일 미만에 투여된다. 일부 구현예에서, 추가 용량은 선행 용량 후 약 14일 미만에, 예를 들어, 선행 용량 후 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13일에 투여된다. 일부 구현예에서, 선행 용량 후 약 14일 미만에 및/또는 선행 용량 후 약 28일 초과하여 어떤 용량도 투여되지 않는다.
- [0161] 일부 구현예에서, 세포의 용량은 일반적으로 질병 부담을 감소시키는 데 효과적인 만큼 충분히 크다.
- [0162] 구체적인 구현예에서, 세포의 수 및/또는 농도는 재조합 수용체(예를 들어, CAR)-발현 세포의 수를 지칭한다. 다른 구현예에서, 세포의 수 및/또는 농도는 투여되는 모든 세포, T 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 수 또는 농도를 지칭한다.
- [0163] 일부 구현예에서, 본 방법은 또한 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 세포 및/또는 림프구 고갈 요법의 하나 이상의 추가 용량의 투여를 포함하고/거나 본 방법의 하나 이상의 단계가 반복된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 용량은 초기 용량과 동일하다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 용량은 초기 용량과 상이하며, 예를 들어, 예컨대 초기 용량보다 (약) 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 또는 그 이상만큼 더 높거나, 초기 용량보다 예를 들어 예컨대 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 또는 그 이상만큼 더 낮다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 용량의 투여는 초기 치료 또는 임의의 선행 치료에 대한 대상체의 반응, 대상체에서 질병 부담, 예컨대 종양 부하, 부피, 크기 또는 전이의 정도, 범위 또는 유형, 병기 및/또는 대상체가 독성 결과, 예를 들어 CRS, 대식세포 활성화 증후군, 종양 용해 증후군, 신경 독성을 발달시킬 가능성 또는 발생률 및/또는 투여되는 세포 및/또는 재조합 수용체에 대한 숙주 면역 반응에 기초하여 결정된다.
- [0164] **B. 반응, 효능, 및 생존**
- [0165] 일부 구현예에서, 제공된 방법에 따른 투여는 대상체가 다른 요법에 내성이 있더라도 대상체를 효과적으로 치료한다. 일부 구현예에서, 본 방법에 따라 치료받은 대상체 중 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70% 또는 적어도 80%가 완전 관해(CR)를 달성한다. 일부 구현예에서, 본 방법에 따라 치료받은 대상체 중 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90%가 객관적 반응(OR)을 달성한다. 일부 구현예에서, 본 방법에 따라 치료받은 대상체 중 적어도 또는 적어도 약 50%, 대상체 중 적어도 또는 적어도 약 60%, 대상체 중 적어도 또는 적어도 약 70%, 대상체 중 적어도 또는 적어도 약 80% 또는 대상체 중 적어도 또는 적어도 약 90%가 CR 및/또는 객관적 반응(OR)을 달성한다. 일부 구현예에서, 효과적인 치료에 대해 평가한 기준은 전체 반응률(ORR; 일부 경우에 객관적 반응률로도 알려짐), 완전 반응(CR; 일부 경우에 완전 관해로도 알려짐), 반응 지속 기간(DOR), 무진행 생존(PFS), 및/또는 전체 생존율(OS)을 포함한다.
- [0166] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 따라 치료받은 대상체 중 적어도 40% 또는 적어도 50%가 완전 관해(CR; 일부 경우에 완전 반응으로도 알려짐)를 달성하고, (약) 3개월, 6개월 또는 12개월 초과 또는 13개월 또는 대략 14개월 초과 무진행 생존(PFS) 및/또는 전체 생존율(OS)을 나타내며; 평균적으로, 본 방법에 따라 치료받은 대상체는 (약) 6개월, 12개월 또는 18개월보다 큰 중간 PFS 또는 OS를 나타내고; 및/또는 대상체는 적어도 또는 약 6, 12, 18개월 또는 그 이상 더 긴 개월 수 이후 PFS 또는 OS를 나타낸다.
- [0167] 일부 구현예에서, 제공된 방법에 따라 치료받은 대상체는 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%의 CRR을 나타낸다. 일부 구현예에서, 완전 반응률(CRR)이 12개월, 18개월, 24개월, 36개월 또는 그 이상의 최상 전체 반응(BOR)을 가진 대상체의 백분율로 계산된다.
- [0168] 일부 측면에서, NHL이 있는 대상체와 같은 대상체의 반응률은 루가노 기준(Lugano criteria)에 기초한다.

(Cheson 등, (2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson 등, (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5). 일부 측면에서, 반응 평가는 임상적, 혈액학적 및/또는 분자적 방법 중 어느 하나를 활용한다. 일부 측면에서, 루가노 기준을 사용하여 평가된 반응은 양전자 방사 단층 촬영(PET)-컴퓨터 단층 촬영(CT) 및/또는 CT를 적절하게 사용하는 것을 수반한다. PET-CT 평가는 FDG-친화성 림프종(FDG-avid lymphoma)에 대한 플루오로데옥시글루코스(fluorodeoxyglucose, FDG)의 사용을 더 포함할 수 있다. 일부 측면에서, PET-CT가 FDG-친화성 조직학에서 반응을 평가하는데 사용될 경우, 5점 척도를 사용할 수 있다. 어떤 면에서, 5점 척도는 하기 기준을 포함한다: 1, 백그라운드 위 흡수 없음; 2, 흡수 $\leq$ 종격막; 3, 흡수 $>$ 종격막 그러나 $\leq$ 간; 4, 적당히 흡수 $>$ 간; 5, 간 및/또는 새로운 병변에서보다 현저히 많은 흡수; X, 림프종과 관련이 있을 것 같지 않은 새로운 영역 흡수.

[0169]

일부 측면에서, 루가노 기준을 사용하여 기재된 바와 같은 완전 반응은 다양한 측정 가능한 부위들에서의 완전한 대사 반응 및 완전한 방사선 반응을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 부위들은 림프절 및 림프 외 부위를 포함하며, 여기서 CR은 PET-CT가 사용될 경우 5점 척도에서 잔류 질량을 갖거나 갖지 않는 1, 2 또는 3의 점수로 기재된다. 일부 측면에서, 생리적 흡수가 많거나 비장 또는 골수 내 활성화(예를 들어, 화학 요법 또는 골수성 집락 자극 인자 사용)가 있는 발다이어 고리(Waldayer's ring) 또는 림프절 외 부위들에서, 정상 종격막 및/또는 간에서보다 흡수가 더 많을 수 있다. 이 상황에서, 초기 침습 부위들에서의 흡수가 주변 정상 조직보다 더 많지 않으면 심지어 상기 조직이 많은 생리적 흡수를 하더라도 완전한 대사 반응이 유추될 수 있다. 일부 측면에서, 반응은 CT를 사용하여 림프절에서 평가되며, 여기서 CR은 질병 및 표적 결절/결절의 덩어리의 림프 외 부위가 병변의 가장 긴 횡방향 직경(LDi)에서 $\leq 1.5\text{cm}$ 까지 회귀해서는 안되는 것으로 설명된다. 추가 평가 부위는 골수를 포함하며, 여기서 PET-CT 기반 평가는 골수에서 FDG-친화성 질병의 증거가 부족함을 나타내야 하고, CT 기반 평가는 정상적인 형태를 나타내야 하며, 불명확한 경우 IHC 음성이어야 한다. 추가 부위는 정상으로 회귀해야 하는 기관(organ) 확대의 평가를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 비측정 병변 및 새로운 병변이 평가되며, 이는 CR의 경우 부재해야 한다(Cheson 등, (2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson 등, (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5).

[0170]

일부 측면에서, 루가노 기준을 사용하여 기재된 바와 같은 부분 반응(PR; 일부 경우에 부분 관해로도 알려짐)은 다양한 측정 가능한 부위에서의 부분적인 대사 반응 및/또는 방사선 반응을 포함한다. 일부 측면에서, 이 부위들은 림프절 및 림프 외 부위를 포함하며, 여기서 PR은 PET-CT가 사용될 경우 기준선 및 잔류 덩어리(들)의 임의의 크기와 비교하여 섭취가 감소된 4 또는 5의 점수로 기재된다. 잠정적으로, 상기 발견은 반응하는 질병을 나타낼 수 있다. 치료 마지막에, 이러한 발견은 잔류 질병을 나타낼 수 있다. 일부 측면에서, 반응은 CT를 사용하여 림프절에서 평가되며, 여기서 PR은 최대 6개의 측정 가능한 표적 결절 및 결절 외 부위의 SPD에서 $\geq 50\%$ 감소로 설명된다. 병변이 CT에서 측정하기에 너무 작은 경우, $5\text{mm} \times 5\text{mm}$ 가 기본 값으로 할당되고; 병변이 더 이상 보이지 않는 경우, 상기 값은 $0\text{mm} \times 0\text{mm}$ 이며; 결절이 $>5\text{mm} \times 5\text{mm}$ 이나 정상보다 더 작은 경우, 실제 측정치가 계산에 사용된다. 추가 평가 부위는 골수를 포함하며, 여기서 PET-CT 기반 평가는 기준선(허용된 화학 요법으로부터의 반응 변화와 양립 가능한 확산 흡수)과 비교하여 감소되거나 정상 골수에서의 흡수보다 더 많은 잔류 흡수를 나타내야 한다. 일부 측면에서, 결절 반응의 맥락에서 골수에서 지속적인 병소의 변화가 있는 경우, MRI 또는 생검법 또는 간격 검사로 추가 평가를 하는 것이 고려되어야 한다. 일부 측면에서, 추가 부위는 기관(organ) 확대의 평가를 포함할 수 있으며, 비장은 길이에 있어 정상 이상으로 $>50\%$ 까지 회귀되었어야 한다. 일부 측면에서, 비측정 병변 및 새로운 병변이 평가되고, PR의 경우 부재/정상, 회귀되어야 하나 증가해서는 안된다. 무 반응/안정 병변(SD) 또는 진행성 병변(PD)도 PET-CT 및/또는 CT 기반 평가를 사용하여 측정될 수 있다. (Cheson 등, (2014) JCO 32(27):3059-3067; Johnson 등, (2015) Radiology 2:323-338; Cheson, B.D. (2015) Chin Clin Oncol 4(1):5).

[0171]

일부 측면에서, 무진행 생존(progression-free survival, PFS)은 대상체가 질병을 갖고 살지만 악화되지 않는 암과 같은 질병의 치료 중 및 치료 후의 시간 길이로 설명된다. 일부 측면에서, 객관적 반응(objective response, OR)은 측정 가능한 반응으로 설명된다. 일부 측면에서, 객관적 반응률(objective response rate, ORR; 일부 경우에 전체 반응률로도 알려짐)은 CR 또는 PR을 달성한 환자의 비율로 설명된다. 일부 측면에서, 전체 생존율(overall survival, OS)은 질병으로 진단된 대상체가 여전히 살아 있는, 암과 같은 질병에 대한 진단 일 또는 치료 시작 중 하나로부터의 시간 길이로 설명된다. 일부 측면에서, 무사건 생존(event-free survival, EFS)은, 암에 대한 치료가 끝난 후, 치료가 예방 또는 지연하도록 의도한 특정 합병증 또는 사건이 없는 채로 대상체가 존속하는 시간의 길이로 설명된다. 상기 사건은 암이 뼈에 전파되어 일으키는 뼈 통증과 같은 특정 증상의 개시 또는 암의 재발 또는 죽음을 포함할 수 있다.

- [0172] 일부 구현예에서, 반응 지속 기간(duration of response, DOR)의 척도는 종양 반응의 기록에서 질병 진행까지의 시간을 포함한다. 일부 구현예에서, 반응을 평가하기 위한 매개변수에는 장기 지속적인 반응, 예를 들어, 요법 개시로부터 일정 기간 후에 지속되는 반응이 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 장기 지속적인 반응은 요법 개시 후 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 또는 24개월에서의 반응물로 표시된다. 일부 구현예에서, 반응은 3개월 또는 6개월보다 더 오랫동안 지속된다.
- [0173] 일부 측면에서, RECIST 기준은 객관적 종양 반응을 결정하기 위해 이용되며; 일부 측면에서, 고형 종양에서 사용된다. (Eisenhauer 등, *European Journal of Cancer* 45 (2009) 228-247.) 일부 측면에서, RECIST 기준은 표적 병변에 대한 객관적 종양 반응을 결정하기 위해 이용된다. 일부 측면에서, RECIST 기준을 사용하여 결정된 바와 같은 완전 반응은 모든 표적 병변의 소멸로 설명되고, 임의의 병리적 림프절(표적이건 비표적이건)이 단축(short axis)에서 <10mm까지 축소되어야 한다. 다른 측면에서, RECIST 기준을 사용하여 결정된 바와 같은 부분 반응은 기준선 합계 직경을 기준으로 하여, 표적 병변의 직경의 합계에서 적어도 30% 이상의 감소로 설명된다. 다른 측면에서, 진행성 병변(PD)은 연구 중 가장 작은 합계를 기준으로 하여(이는 기준선 합계가 연구 중 가장 작은 경우 기준선 합계를 포함함) 표적 병변의 직경의 합계에서 적어도 20% 이상의 증가로 설명된다. 20%의 상대적 증가 외에, 합계는 적어도 5mm 이상의 절대적인 증가를 또한 입증해야 한다(일부 측면에서, 하나 이상의 새로운 병변의 출현도 진행으로 간주된다). 다른 측면에서, 안정 병변(stable disease, SD)은 연구 중인 가장 작은 합계 직경을 기준으로 하여, PR에 적절한 충분한 수축도 없고, PD에 적절한 충분한 증가도 없는 것으로 설명된다.
- [0174] 일부 구현예에서, 여포성 림프종(FL)을 가진 대상체에서의 생존율은 일반적으로 상기 기재된 바와 같은 이탈리아 림프종 인터그룹(ILI) 및/또는 국제 여포성 림프종 예후 인자 프로젝트(IFLFPF)에 의해 개발된 점수화 시스템에 기초한다(Luminari 등, (2012) *Rev. Brad. Hematol. Hemoter.*, 34:54-59). 일부 구현예에서, FL 등의 질병의 정도는 일반적으로 상기 기재된 바와 같이 Ann Arbor 병기 결정 스텝, 종양 부담, 부피가 큰 질병, 질병의 절절 또는 림프절 외 부위의 수, 및/또는 골수 침습에 의해 평가될 수 있다.
- [0175] 일부 측면에서, 제공된 방법, 및/또는 제공된 제조품 또는 조성물에 부합되는 투여는 일반적으로 대상체에서 질병 또는 병태의 증폭 또는 부담을 감소시키거나 방지한다. 예를 들어, 질병 또는 병태가 종양인 경우, 본 방법은 일반적으로 골수 또는 분자적으로 검출 가능한 암에서 종양 크기, 규모, 전이, 아세포(blast)의 백분율을 감소시키고/거나 예후 또는 생존 또는 종양 부담과 관련된 다른 증상을 개선한다.
- [0176] 질병 부담은 대상체 내에서 또는 종양 또는 예를 들어, 전이를 나타내는 다른 위치의 기관 또는 조직과 같은 대상체의 기관, 조직 또는 체액 내에서 질병이 있는 세포의 총 수를 포함할 수 있다. 예를 들어, 종양 세포는 특정 혈액성 악성 종양의 맥락에서 혈액 또는 골수에서 검출 및/또는 정량화될 수 있다. 일부 구현예에서, 질병 부담은 종양의 질량, 전이의 수 또는 범위 및/또는 골수에 존재하는 아세포의 백분율을 포함할 수 있다.
- [0177] 일부 측면에서, 최소 잔존 질병(MRD)은 유세포 분석에 의해 검출된다. 유세포 분석은 골수 및 말초 혈액 샘플에서 암 세포를 모니터링하는 데 사용될 수 있다. 구체적인 측면에서, 유세포 분석은 골수에서 암 세포의 존재를 검출 또는 모니터링하는 데 사용된다. 일부 측면에서, 유세포 분석에 의한 다중 매개변수 면역학적 검출이 암 세포 검출에 사용된다(예를 들어, 문헌[Coustan-Smith 등, (1998) *Lancet* 351:550-554] 참조). 일부 측면에서, 질량세포분석(mass cytometry)에 의한 다중 매개변수 면역학적 검출이 암 세포 검출에 사용된다. 일부 예에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50개 매개변수가 암 세포 검출에 사용될 수 있다. 검출에 사용되는 항원은 검출되는 암에 기초하여 선택된다(Foon and Todd (1986) *Blood* 68:1-31).
- [0178] 일부 예에서, 골수 흡인물 또는 골수 생검에 의해 골수가 수확되고, 분석을 위해 림프구가 분리된다. 분리된 림프구 상에서, 형광 색소(예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 피코에리트린, 페리딘 염록소 단백질, 또는 비오틴)에 접합된 단클론 및/또는 다클론 항체를 사용하여 말단 디옥시뉴클레오타이드 전달효소(TdT), CD3, CD10, CD11c, CD13, CD14, CD33, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD34, CD45, CD56, CD79b, IgM, 및/또는 KORS3544와 같은 에피토프를 검출할 수 있다. 그런 후 다중 매개변수 유세포 분석, 또는 질량세포분석과 같은 유세포 분석을 사용하여 표지된 세포를 검출하여 다수의 에피토프를 검출할 수 있다.
- [0179] 림프성 세포를 식별하여 빛 산란 점도표에 기초하여 게이팅한 후 2차로 게이팅하여 관심 있는 면역 표현형 특징을 발현하는 세포 집단을 식별할 수 있다. 예시적인 에피토프가 아래 표 2에 제시된다. 백혈병과 림프종의 다른 면역학적 분류가 Foon 및 Todd에 의해 제공된다(*Blood* (1986) 68(1): 1-31). 일부 측면에서, MRD의 유세포 분

석 평가는 하나 이상의 CLL 면역 표현형(예를 들어, 낮은 전방/측방 산란; CD3^{neg}; CD5⁺; CD14^{neg}; CD19⁺; CD23⁺; CD45⁺; CD56^{neg})을 가진 살아있는 림프구를 정량화하여 달성될 수 있다.

표 2

표 2. 예시적인 면역 표현형 및 세포 유전학적 특성		
질병	면역 표현형	세포 유전학
만성 림프구성 백혈병(CLL)	Pan-B+; CD5+; CD23+; CD79b/CD22 약함; FMC7-; sIg 약함	12삼염색체 del(13)(q14.3) del 11q22-q23 del 17p13 (p53) t(11;14)(q13;q32) BCL1/IgH 재배열 t(14;19)(q32;q13) IgH 결실 (14q32) del(6q) +8q24 +3 +18 del 6q21
소형 림프구성 림프종(SLL)	Pan-B+; CD5+; CD23+; CD10-; sIgM+ 미약함	del(6)(q21-23)
림프구 형질세포성 림프종	Pan-B+; CD5-; CD10-; cyIgM+	t(9;14)(p13;q32) PAX5/IgH
여포 중심 세포 림프종	Pan-B+; CD10+/-; CD5-; sIg+	t(14;18)(q32;q21) / BCL2 재배열
미만성 거대 세포 림프종	CD19+; CD22+; CD10-/+; SIg+	t(14;18) 및 p53 돌연변이 t(3;V)(q27;V)/ BCL6 재배열 변이체 c-MYC 재배열
버킷 림프종	Pan-B+; TdT-; CD10+; CD5-; sIgM+	t(8;14)(q24;q32) 또는 변이체 / c-MYC 재배열
버킷 유사 림프종	Pan-B+; TdT-; CD10-/+ CD5-; sIg+	t(8;14) 또는 변이체 t(8;14)+ t(14;18)
외투 세포 림프종	Pan-B +; CD5+; CD23-; CD10-/+; sIgM+ 밝음	t(11;14)(q13;q32) / BCL1 재배열
변연부 B 세포 림프종(MZBCL)	pan-B+; CD5-/+; CD10-; CD23-; CD11c+/-; cyIg + (세포들 중 40%), sIgM+ 밝음; sIgD-	t(11;18)(q21;q21) / PI2 / MLT 융합: 림프절의 저등급 MALT 림프종; 무통성 질병 t(1;14)(p21;q32): 림프절의 MALT 림프종 del(7)(q22-31): 비장 MZBCL /+3q: 결절성, 림프절의 및 비장 MZBCL
+: 케이스의 >90%에서 양성 +/-: 케이스의 50% 초과에서 양성 -/+ : 케이스의 50% 미만에서 양성 -: 케이스의 <10%에서 양성 Pan-B 표지자: 예를 들어, CD19, CD20, CD79a sIG: 표면 면역글로불린 cyIg: 세포질 면역글로불린		

일부 측면에서, 수확된 B 세포의 면역글로불린 중쇄(IGH) 유전자 자리의 심층 염기서열분석을 사용하여 최소 잔존 질병(MRD)를 검출할 수 있다. 특정 IgG 재배열의 클론의 존재는 CLL 또는 NHL과 같은 B 세포 악성 종양의 존재 및/또는 이의 악성 종양 세포의 잔류 존재를 검출하기 위한 표지자를 제공할 수 있다. 일부 측면에서, B 세포를 함유하거나 함유하는 것으로 의심되는 집단과 같은 세포를 혈액으로부터 수확하고 분리한다. 일부 측면에서, 골수로부터, 예를 들어, 골수 흡인물 또는 골수 생검으로부터 및/또는 다른 생물학적 샘플로부터 세포를 수확하고 분리한다. 일부 측면에서, 상보성 결정 영역 3(CDR3)의 중합효소연쇄반응(PCR) 증폭이 유전자 자리의 V 및 J 영역 내 고 보존 서열에 프라이머를 사용하여 달성되며, 이는 최소 잔존 질병을 평가하는 목적으로 세포의 클론 집단을 식별하는 데 사용될 수 있다. 특정 계통의 세포 및/또는 클론 집단과 같은 가변 중쇄 또는 이의 결합 부위와 같은 특정 가변 사슬을 발현하는 세포의 수에 관한 정보를 제공하는 것을 포함하여, 단일 세포 염기

서열분석 접근법과 같은 클론 집단을 검출하는 다른 방법이 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 퇴화 프라이머 또는 IGH 서열의 공통 V 및 퇴화 공통 J 영역을 인식하는 것과 같이 상이한 세포 클론들 사이에서 공유된 가변 사슬의 영역들을 인식하는 프라이머를 사용하여 IGH DNA가 증폭된다. V 영역의 예시적인 서열은 ACACGGCCTCGTGATTACTGT(서열 번호: 57)이다. J 영역의 예시적인 퇴화 공통 서열은 ACCTGAGGAGACGGTGACC(서열 번호: 58)이다.

[0182] 일부 측면에서, PCR 생성물 또는 염기서열분석 결과는 재배열된 대립유전자에 특이적이고 MRD 검출을 위한 클론 표지자로 기능한다. CDR3 영역의 PCR 증폭 후, PCR 생성물을 염기서열분석하여 CAR-T 세포 요법(예를 들어, CD19 CAR-T 세포 요법)으로 B-세포 악성 종양의 치료 후 MRD의 민감성 검출에 대한 대립유전자-특이적 PCR을 위한 프로브로 작제된 환자-특이적 올리고뉴클레오타이드를 산출할 수 있다. PCR 생성물이 공통 프라이머를 사용하여 생성되지 않는 예에서, 프레임워크 영역 1에 대한 V 영역 측-특이적 프라이머를 대신 사용할 수 있다.

[0183] 일부 측면에서, 치료 후, PCR-검출 가능 종양 세포 예컨대 B 세포 악성 종양의 세포 예컨대 NHL 또는 CLL, 예컨대 악성 또는 클론 IGH 서열에 상응하는 검출 가능한 IGH 서열의 지속은 재발의 위험 증가와 관련된다. 일부 측면에서, 치료 후 악성 IGH 서열에 음성인 환자(일부 측면에서, 확장된 림프절의 지속과 같은 진행성 병변 또는 부분 반응만을 나타내는 다른 기준 또는 일부 맥락에서 질병 또는 완전 반응의 결여와 관련될 수 있는 다른 기준의 맥락에서)는 지속성 악성 IGH 서열을 가진 환자와 비교하여, CR 또는 장기 지속되는 CR 또는 장기간 생존으로 들어가거나 PFS가 될 가능성이 증가하는 것으로 간주될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 예후 및 병기 결정은 예를 들어 림프절 크기 또는 다른 병기 결정 기준과 같은 다른 임상적 증상의 해결과 비교하여, 요법의 투여 후 짧은 기간 내에 악성 세포의 제거가 관찰되는 치료에 특히 적절하다. 예를 들어, 상기 일부 측면에서, 골수와 같은 샘플에서 검출 가능한 IGH 또는 최소 잔존 질병의 부재는 다른 이용 가능한 병기 결정 또는 예후 접근법과 비교하여 반응 또는 반응의 가능성 또는 이의 지속성에 대한 바람직한 관독 정보일 수 있다. 일부 측면에서, MRD의 결과 예를 들어 IGH 심층 염기서열분석 정보는 추가 개입 또는 이의 부족에 대한 정보를 제공할 수 있다. 예를 들어, 일부 맥락에서 본 방법 및 다른 제공된 구현예는 악성 IGH에 음성으로 간주되는 대상체가 일부 측면에서 더 치료받지 않을 수 있을지 또는 제공된 요법의 용량을 더 투여받지 않을 수 있을지, 또는 대상체가 더 낮은 또는 감소된 용량을 투여받을 수 있을지를 제공한다. 역으로, IGH 심층 염기서열분석을 통해 MRD를 나타내는 대상체는 예를 들어 유사한 또는 더 높은 용량으로 최초에 투여된 요법으로 또는 추가 치료로 더 치료받도록 제공되거나 명시될 수 있다. 일부 측면에서, 질병 또는 병태가 제1 용량의 투여 후 지속되고/거나 제1 용량의 투여는 대상체에서 질병 또는 병태를 근절하기에 충분하지 않다.

[0184] 일부 구현예에서, 대상체가 하나 이상의 대체 치료제를 받는 것 및/또는 대상체가 제공된 방법, 및/또는 제공된 제조품 또는 조성물에 부합되게 세포의 용량 및/또는 림프구 고갈제를 받지 않는 것과 같이 대체 투약 요법을 사용하는 비교대상 방법에서 관찰될 수 있는 감소와 비교하여, 본 방법은 질병 또는 병태의 부담(예를 들어, 종양 세포의 수, 종양의 크기, 환자의 생존 또는 무사건 생존 기간)을 더 큰 정도로 및/또는 더 많은 기간 동안 감소시킨다. 일부 구현예에서, 대상체에서 질병 또는 병태의 부담을 검출, 평가 또는 측정한다. 질병 부담은 일부 측면에서 대상체 내, 또는 대상체의 기관, 조직 또는 체액, 예컨대 혈액 또는 혈청 내의 질병 또는 질병 관련 세포, 예를 들어, 종양 세포의 총 수를 검출하여 검출할 수 있다. 일부 측면에서, 대상체의 생존, 특정 기간 내의 생존, 생존의 정도, 무사건 또는 무증상 생존의 존재 또는 지속 기간, 또는 재발 없는 생존을 평가한다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태의 임의의 증상을 평가한다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태 부담의 척도가 명시된다.

[0185] 일부 구현예에서, 대상체의 무사건 생존을 또는 전체 생존율은, 다른 방법, 예를 들어 대상체가 하나 이상의 대체 치료제를 받는 것이 특징인 방법 및/또는 대상체가 제공된 방법, 및/또는 제공된 제조품 또는 조성물에 부합되게 세포의 용량 및/또는 림프구 고갈제를 받지 않는 것이 특징인 방법과 비교하여 본 방법에 의해 향상된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 용량의 투여 이후 6개월 시점에 본 방법에 의해 치료받은 대상체의 무사건 생존율 또는 확률은 약 40%보다 크거나, 약 50%보다 크거나, 약 60%보다 크거나, 약 70%보다 크거나, 약 80%보다 크거나, 약 90%보다 크거나, 또는 약 95%보다 크다. 일부 측면에서, 전체 생존율은 약 40%보다 크거나, 약 50%보다 크거나, 약 60%보다 크거나, 약 70%보다 크거나, 약 80%보다 크거나, 약 90%보다 크거나, 또는 약 95%보다 크다. 일부 구현예에서, 본 방법으로 치료받은 대상체는 적어도 6개월까지, 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10년까지 무사건 생존, 재발 없는 생존, 또는 생존을 나타낸다. 일부 구현예에서, 종양진행시간(TTP)은 (약) 6개월보다 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10년보다 더 긴 종양진행시간과 같이, 향상된다.

[0186] 일부 구현예에서, 본 방법에 의한 치료 후, 재발 확률은, 다른 방법, 예를 들어 대상체가 하나 이상의 대체 치

료제를 받는 것이 특징인 방법 및/또는 대상체가 제공된 방법, 및/또는 제공된 제조품 또는 조성물에 부합되게 세포의 용량 및/또는 림프구 고갈제를 받지 않는 것이 특징인 방법과 비교하여 감소된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 제1 용량 투여 이후 6개월 시점에 재발 확률은 약 80% 미만, 약 70% 미만, 약 60% 미만, 약 50% 미만, 약 40% 미만, 약 30% 미만, 약 20% 미만, 또는 약 10% 미만이다.

[0187] 일부 경우에, 투여된 세포의 이용률, 예를 들어, 생체이용률을 평가하기 위해 투여된 세포, 예를 들어, 입양으로 전달된 세포의 약동학적 특성이 측정된다. 입양으로 전달된 세포의 약동학적 특성을 측정하는 방법은 조작된 세포를 투여받은 대상체로부터 말초 혈액을 채혈하는 것과 말초 혈액에서 조작된 세포의 수 또는 비(ratio)를 측정하는 것을 포함한다. 세포를 선택 및/또는 단리하는 접근법은 키메라 항원 수용체(CAR)-특이적 항체의 사용(예를 들어, Brentjens 등, *Sci. Transl. Med.* 2013 Mar; 5(177): (177ra38) Protein L (Zheng 등, *J. Transl. Med.* 2012 Feb; 10:29)), 에피토프 태그, 예컨대 CAR 내 특이적 부위로 직접 도입되는 Strep-Tag 서열의 사용을 포함하며, 이로써 Strep-Tag를 위한 결합 시약이 사용되어 CAR을 직접 평가하고(Liu 등 (2016) *Nature Biotechnology*, 34:430; 국제 특허 출원 공개 번호 WO2015095895) 그리고 CAR 폴리펩타이드에 특이적으로 결합하는 단클론 항체를 직접 평가한다(국제 특허 출원 공개 번호 WO2014190273 참조). 외인성 표지 유전자는 일부 경우에 세포의 검출 또는 선택을 가능하게 하도록, 일부 경우에 또한 세포 자살을 촉진하도록, 조작된 세포 요법과 관련하여 사용될 수 있다. 일부 경우에 절단형 표피 성장 인자 수용체(epidermal growth factor receptor, EGFRt)는 형질도입된 세포에서 관심 전이 유전자(CAR)와 함께 공발현될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 8,802,374 참조). EGFRt는 항체 세특시맵(Erbix®) 또는 다른 치료용 항-EGFR 항체 또는 결합 분자에 의해 인식되는 에피토프를 함유할 수 있으며, 이는 EGFRt 구조체 및 다른 재조합 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체(CAR)로 조작된 세포를 식별 또는 선택하기 위해 및/또는 상기 수용체를 발현하는 세포를 제거 또는 분리하기 위해 사용될 수 있다. 문헌[미국 특허 번호 8,802,374 및 Liu 등, *Nature Biotech.* 2016 April; 34(4): 430-434]을 참조한다.

[0188] 일부 구현예에서, 환자로부터 수득된 생물학적 샘플(예를 들어, 혈액) 내 CAR⁺ T 세포의 수를 세포 요법의 투여 후 일정 기간에 측정하여 예를 들어 세포의 약동학적 특성을 결정할 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체의 혈액에서, 또는 본 방법에 의해 치료받은 대상체의 대부분에서 검출 가능한 CAR⁺ T 세포, 선택적으로 CAR⁺ CD8⁺ T 세포 및/또는 CAR⁺ CD4⁺ T 세포의 수는 1개 세포/ μ L 초과, 5개 세포/ μ L 초과 또는 10개 세포/ μ L 초과이다.

[0189] C. 독성

[0190] 일부 구현예에서, 제공된 방법은, 대체 CAR⁺ T 세포 조성물과 같은 대체 세포 요법의 투여 및/또는 대체 세포의 투약(예를 들어, 정의된 비로 투여되지 않는 세포의 투약)과 비교하여, 낮은 비율 및/또는 낮은 정도의 독성, 독성 결과 또는 증상, 독성-촉진 프로파일, 인자, 또는 특성, 예컨대 사이토카인 방출 증후군(CRS) 또는 신경 독성(NT)과 관련된 또는 이를 나타내는 증상 또는 결과를 초래하는 특징을 포함하도록 고안된다. 사이토카인 방출 증후군(CRS) 및 신경 독성은 미국 이식 및 세포 치료 학회(ASCT) 공통 등급제에 따라 등급을 정할 수 있다(예를 들어, 문헌[Lee 등 *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019 Apr; 25(4):625-38] 참조).

[0191] 일부 측면에서, 본원에 제공된 방법의 일부로서 투여된 조작된 T 세포의 더 낮은 분화 상태(예를 들어, 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형, 예컨대 CCR7⁺CD45RA⁺, CD27⁺CCR7⁺, 또는 CD62L⁻CCR7⁺로부터 선택된 표현형을 갖는 조작된 T 세포의 더 높은 비율)가 더 분화된 세포보다 더 활성인 것으로 예상되지만, 발견은 세포 요법의 안전성이 성공적으로 관리될 수 있음을 나타낸다. 일부 측면에서, 예를 들어 세포가 더 분화되는 공정, 예컨대 세포의 증폭을 포함하는 공정에 의해 생산된 세포 조성물과 비교하여, 더 낮은 용량의 조성물을 제공하는 것은 강력한 효능 및 높은 안전성을 달성한다. 일부 측면에서, 더 낮은 정도의 독성, 예컨대 중증 사이토카인 방출 증후군(CRS) 또는 중증 신경 독성을 유지하면서 제공된 항-BCMA CAR 조성물의 훨씬 더 높은 용량의 세포가 투여될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 일부 구현예에서, 제공된 방법은, 대체 세포 요법, 예컨대 본원에서 투여되는 것보다 더 많이 분화된 조작된 T 세포를 가진 대체 CAR⁺ T 세포 조성물의 투여를 포함하는 방법과 비교하여, 더 높은 용량의 조작된 T 세포(예를 들어, 50×10^6 개 CAR-발현 T 세포, 예컨대 (약) 100×10^6 개 CAR-발현 T 세포 초과)의 투여를 포함한다.

[0192] 일부 구현예에서, 제공된 방법은, 예컨대 다른 특정 세포 요법과 비교하여, 독성 또는 독성 결과의 높은 비율 또는 가능성을 초래하지 않거나, 또는 독성 또는 독성 결과, 예컨대 신경 독성(NT) 또는 사이토카인 방출 증후군(CRS)의 비율 또는 가능성을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 본 방법은 중증 NT(sNT), 중증 CRS(sCRS), 대식세

포 활성화 증후군, 중앙 용해 증후군, 3일 이상 동안 적어도 (약) 섭씨 38도 이상의 발열 및 적어도 (약) 20mg/dL의 CRP의 혈장 수준을 초래하지 않거나, 이의 위험을 증가시키지 않는다. 일부 구현예에서, 제공된 방법에 따라 치료받은 대상체의 (약) 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60% 또는 그 이상이 어느 등급의 CRS든 또는 어느 등급의 신경 독성이든 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 치료받은 대상체의 50% 이내(예를 들어, 치료받은 대상체의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 그 이상)가 2급보다 높은 사이토카인 방출 증후군(CRS) 및/또는 2급보다 높은 신경 독성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 본 방법에 따라 치료받은 대상체의 적어도 50% 이상(예를 들어, 치료받은 대상체의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 또는 그 이상)이 중증 독성 결과(예를 들어, 중증 CRS 또는 중증 신경 독성)를 나타내지 않고, 예컨대 3급 이상의 신경 독성을 나타내지 않고/거나 중증 CRS를 나타내지 않고, 또는 치료 이후 특정 기간 이내에, 예컨대 세포의 투여 후 1주, 2주, 또는 1개월 이내에 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 특정 독성을 판정하기 위해 평가하는 매개변수에는 이상 반응(AE), 용량 제한 독성(DLT), CRS, 및 NT가 포함된다.

[0193] 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포를 이용한 치료와 같은 입양 T 세포 요법의 투여는 사이토카인 방출 증후군 및 신경 독성과 같은 독성 효과 또는 결과를 유도할 수 있다. 일부 예에서, 상기와 같은 효과 또는 결과는 관찰된 독성의 기초가 될 수 있는 높은 수준의 순환 사이토카인에 필적한다.

[0194] 일부 측면에서, 독성 결과는 사이토카인 방출 증후군(CRS) 또는 중증 CRS(sCRS)이거나 이와 관련이 있거나 이를 나타낸다. 일부 경우에 입양 T 세포 요법 및 대상체에 다른 생물학적 생성물의 투여 이후에 CRS, 예를 들어, sCRS가 발생할 수 있다. 문헌[Davila 등, Sci Transl Med 6, 224ra25 (2014); Brentjens 등, Sci. Transl. Med. 5, 177ra38 (2013); Grupp 등, N. Engl. J. Med. 368, 1509-1518 (2013); 및 Kochenderfer 등, Blood 119, 2709-2720 (2012); Xu 등, Cancer Letters 343 (2014) 172-78]을 참조한다.

[0195] 통상적으로, CRS는 예를 들어 T 세포, B 세포, NK 세포, 단핵구, 및/또는 대식세포에 의해 매개되는 과도한 전신 면역 반응에 의해 일어난다. 상기 세포들은 사이토카인 및 케모카인과 같은 많은 양의 염증성 매개인자를 방출할 수 있다. 사이토카인은 급성 염증 반응을 촉발할 수 있고/거나 내피 기관 손상을 유도할 수 있으며, 이는 미세 혈관 누출, 심부전, 또는 사망을 초래할 수 있다. 중증의 생명을 위협하는 CRS는 폐침윤 및 폐손상, 신부전, 또는 파종성 혈관내 응고로 이어질 수 있다. 다른 중증의 생명을 위협하는 독성에는 심장 독성, 호흡곤란, 신경학상 독성 및/또는 간부전이 포함될 수 있다. 일부 측면에서, 발열, 특히 높은 발열 ($\geq 38.5^{\circ}\text{C}$ 또는 $\geq 101.3^{\circ}\text{F}$)은 CRS 또는 이의 위험과 연관된다. 일부 경우에, CRS의 특징 또는 증상은 감염을 모방한다. 일부 구현예에서, 감염은 또한 CRS 증상을 나타내는 대상체에서 고려되고, 배양에 의한 모니터링과 경험적 항생제 요법이 시행될 수 있다. CRS와 연관된 다른 증상은 심장 기능장애, 성인 호흡곤란 증후군, 신부전 및/또는 간부전, 응고장애, 파종성 혈관내 응고, 및 모세혈관 누출 증후군을 포함할 수 있다.

[0196] CRS는 항-염증 요법 예컨대 항-IL-6 요법, 예를 들어, 항-IL-6 항체, 예를 들어, 토실리주맙, 또는 항생제 또는 기술된 바와 같은 다른 제제를 사용하여 치료될 수 있다. CRS의 결과, 징후 및 증상은 알려져 있으며 본원에 기술된 것들이 포함된다. 일부 구현예에서, 특정 투여량 요법 또는 투여가 주어진 CRS-관련 결과, 징후, 또는 증상에 효과가 있거나 효과가 없는 경우, 특정 결과, 징후, 및 증상 및/또는 이의 수량 또는 정도가 명시될 수 있다.

[0197] CAR 발현 세포를 투여하는 맥락에서, CRS는 통상적으로 CAR을 발현하는 세포의 주입 후 6 내지 20일에 발생한다. 문헌[Xu 등, Cancer Letters 343 (2014) 172-78]을 참조한다. 일부 경우에, CRS는 CAR T 세포 주입 후 6일 미만에 또는 20일 넘어서 발생한다. CRS의 발생률 및 시기는 주입 시점의 기준선 사이토카인 수준 또는 중앙 부담과 관련이 있을 수 있다. 보통으로, CRS는 인터페론(IFN)- γ , 중앙 괴사 인자(TNF)- α , 및/또는 인터루킨(IL)-2의 혈청 수준 상승을 수반한다. CRS에서 급속하게 유도될 수 있는 다른 사이토카인은 IL-1 β , IL-6, IL-8, 및 IL-10이다.

[0198] CRS와 관련된 예시적인 결과에는 발열, 경직, 오한, 저혈압, 호흡장애, 급성 호흡곤란 증후군(ARDS), 뇌병증, ALT/AST 상승, 신부전, 심장 장애, 저산소증, 신경계 장애, 및 사망이 포함된다. 신경계 합병증에는 섬망, 발작 유사 활성화, 착란상태, 단어 찾기 장애, 실어증, 및/또는 둔감해짐 등이 있다. 다른 CRS 관련 결과에는 피로, 구역질, 두통, 발작, 심계항진, 근육통, 발진, 급성 혈관 누출 증후군, 간 기능 장애, 및 신부전이 포함된다. 일부 측면에서, CRS는 혈청 페리틴, d-2량체, 아미노기 전달효소, 젖산 탈수소효소 및 트리글리세리드와 같은 하나 이상의 인자의 증가와 관련되거나 또는 저섬유소원혈증 또는 간비장비대증과 관련된다. CRS와 관련된 다른 예시적인 징후 또는 증상에는 혈류역학적 불안정, 열성 호중구 감소증, 혈청 C 반응성 단백질(CRP)의 증가, 응고 매개변수(예를 들어, 국제 표준화 비율(INR), 프로트롬빈 시간(PTI) 및/또는 피브리노겐)의 변화, 심장 및 기

타 기관 기능 및/또는 절대 호중구 수(ANC)의 변화가 포함된다.

- [0199] 일부 구현예에서, CRS와 관련된 결과는: 지속적인 발열, 예를 들어, 2일 이상, 예를 들어, 3일 이상, 예를 들어, 4일 이상 또는 적어도 3연속일 이상 동안, 지정된 온도, 예를 들어, (약) 섭씨 38도를 넘는 발열; (약) 섭씨 38도를 넘는 발열; 적어도 둘 이상의 사이토카인(예를 들어, 인터페론 감마($IFN\gamma$), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프렉탈카인, 및 IL-5, 및/또는 종양 괴사 인자 알파($TNF\alpha$)로 구성된 군 중 적어도 둘 이상)의 치료전 수준, 또는 예를 들어, 상기 사이토카인들 중 적어도 하나 이상의 적어도 (약) 250의 최대 배수 변화와 비교하여, 예를 들어, 적어도 (약) 75의 최대 배수 변화와 같은 사이토카인의 상승; 및/또는 저혈압(예를 들어, 적어도 하나 이상의 정맥내 혈관 수압제에 의해 측정된 바와 같음)과 같은 적어도 하나 이상의 임상적 독성 징후; 저산소증(예를 들어, (약) 90% 미만의 혈장 산소(PO_2) 수준); 및/또는 (정신 상태 변화, 둔감, 및 발작을 포함) 하나 이상의 신경 장애 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 신경 독성(NT)은 CRS와 동시에 관찰될 수 있다.
- [0200] 예시적인 CRS 관련 결과는 사이토카인과 케모카인, 및 CRS와 관련된 다른 인자를 포함하여 하나 이상의 인자의 증가된 또는 높은 혈청 수준을 포함한다. 예시적인 결과는 상기 인자들 중 하나 이상의 합성 또는 분비의 증가를 더 포함한다. 상기 합성 또는 분비는 T 세포, 또는 선천 면역 세포 또는 B 세포와 같이 T 세포와 상호작용하는 세포에 의한 것일 수 있다.
- [0201] 일부 구현예에서, CRS와 관련된 혈청 인자 또는 CRS 관련 결과는 인터페론 감마($IFN-\gamma$), $TNF-\alpha$, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2Ra, 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF), 대식세포 염증성 단백질(MIP)-1, 종양 괴사 인자 알파($TNF\alpha$), IL-6, 및 IL-10, IL-1 β , IL-8, IL-2, MIP-1, Flt-3L, 프렉탈카인, 및/또는 IL-5를 포함한, 염증성 사이토카인 및/또는 케모카인을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 인자 또는 결과는 C 반응성 단백질(CRP)을 포함한다. 초기에 그리고 쉽게 측정 가능한 CRS 위험 인자인 것에 더하여, CRP는 또한 세포 증폭에 대한 표지자이다. 일부 구현예에서, 높은 수준의 CRP, 예컨대 $\geq 15\text{mg/dL}$ 을 가진 것으로 측정된 대상체는 CRS를 가지고 있다. 일부 구현예에서, 높은 수준의 CRP를 가진 것으로 측정된 대상체는 CRS를 가지고 있지 않다. 일부 구현예에서, CRS의 측정은 CRP 및 CRS를 나타내는 다른 인자의 측정을 포함한다.
- [0202] 일부 구현예에서, 하나 이상의 염증성 사이토카인 또는 케모카인은 CAR 치료 전, 도중, 또는 이후에 모니터링된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 사이토카인 또는 케모카인은 $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, IL-2, IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, sIL-2Ra, 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF), 또는 대식세포 염증성 단백질(MIP)을 포함한다. 일부 구현예에서, $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$, 및 IL-6이 모니터링된다.
- [0203] 어느 환자가 sCRS 발생 위험 가능성이 더 있는지 예측하기 위해 CRS의 시작과 상관관계가 있는 것으로 보이는 CRS 기준이 개발되었다(문헌[Davilla 등 Science translational medicine. 2014;6(224):224ra25] 참조). 인자들에는 발열, 저산소증, 저혈압, 신경계 변화, 염증성 사이토카인의 혈청 수준 상승, 예컨대 치료로 인해 유도된 상승이 치료전 종양 부담 및 sCRS 증상 모두와 상관관계가 있을 수 있는 일곱 가지 사이토카인($IFN\gamma$, IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프렉탈카인, 및 GM-CSF) 세트가 포함된다. CRS의 진단 및 관리에 대한 다른 지침은 알려져 있다(예를 들어, 문헌[Lee et al, Blood. 2014;124(2):188-95; Lee 등, Biol Blood Marrow Transplant 2019; 25(4):625-38] 참조). 일부 구현예에서, CRS 등급을 반영하는 기준은 아래 표 3에 세부 사항이 나와 있다.

[0204] [표 3]

표 3: 예시적인 CRS 등급 부여 기준	
등급	증상의 설명
1 경미함(Mild)	생명을 위협하는 정도는 아니고, 해열제 및 항구토제와 같은 증상 치료만 필요함(예를 들어, 발열, 구역질, 피로, 두통, 신체 불편감)
2 보통(Moderate)	중도적 개입이 필요하며 이에 대해 반응함: ☐ 산소 요구량 < 40%, 또는 ☐ 체액 또는 저용량의 단일 승압약에 빠르게 반응하는 저혈압, 또는 ☐ 2 급 기관 독성(CTCAE v4.0 에 의함)
3 중증(Severe)	공격적 개입이 필요하며 이에 대해 반응함: ☐ 산소 요구량 ≥ 40%, 또는 ☐ 고용량의 단일 승압약(예를 들어, 노르에피네프린 ≥ 20μg/kg/min, 도파민 ≥ 10μg/kg/min, 페닐에프린 ≥ 200μg/kg/min, 또는 에피네프린 ≥ 10μg/kg/min)을 필요로 하는 저혈압, 또는 ☐ 다수의 승압약(예를 들어, 바소프레신 + 상기 제제들 중 하나, 또는 ≥ 20μg/kg/min 노르에피네프린에 상응하는 조합 승압약들)을 필요로 하는 저혈압, 또는 ☐ 3 급 기관 독성 또는 4 급 transaminitis(간 효소 수치 상승 현상)(CTCAE v4.0 에 의함)
4 생명 위협	생명 위협: ☐ 산소호흡기 지원 필요, 또는 ☐ 4 급 기관 독성(transaminitis 제외)
5 치명적	사망

[0205]

[0206] 일부 구현예에서, CRS 등급을 반영하는 기준은 아래 표 4에 세부 사항이 나와 있다.

[0207] [표 4]

표 4. 예시적인 CRS 등급 부여 기준				
증상/징후	1급 (경미함)	2급 (보통)	3급 (중증)	4급 (생명 위협)
		CRS 등급은 가장 중증의 증상(발열은 제외)에 의해 정의된다.		
온도 $\geq$ 38.5°C/101.3°F	어느 것이든	어느 것이든	어느 것이든	어느 것이든
수축기 혈압 $\leq$ 90 mm Hg	N/A	유체 또는 단일 저용량 승압약에 반응한다	고용량 또는 다수 승압약 필요함	생명 위협
산소가 SaO ₂ > 90%에 도달 필요함	N/A	FiO ₂ < 40%	FiO ₂ $\geq$ 40%	인공 호흡기 지원 필요함
기관 독성	N/A	2급	3급 또는 transaminitis(간 효소 수치 상승 현상)	4급 (transaminitis 제외)

[0208]

[0209] 일부 구현예에서, 고용량 승압약 요법은 아래 표 5에 기술된 것을 포함한다.

[0210] [표 5]

표 5. 고용량 승압약(모든 용량은 $\geq$ 3시간 필요)	
승압약	용량
노르에피네프린 단일요법	$\geq 20 \mu\text{g}/\text{min}$
도파민 단일요법	$\geq 10 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$
페닐에프린 단일요법	$\geq 200 \mu\text{g}/\text{min}$
에피네프린 단일요법	$\geq 10 \mu\text{g}/\text{min}$
바소프레신 있는 경우	바소프레신 + 노르에피네프린 등가물(NE) $\geq 10 \mu\text{g}/\text{min}^a$
조합 승압약들이 있는 경우(바소프레신 아님)	노르에피네프린 등가물 $\geq 20 \mu\text{g}/\text{min}^a$
^a VASST 시험 승압약 등가물 방정식: 노르에피네프린 등가물 용량 = [노르에피네프린 ($\mu\text{g}/\text{min}$)] + [도파민 ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) $\div$ 2] + [에피네프린 ($\mu\text{g}/\text{min}$)] + [페닐에프린 ($\mu\text{g}/\text{min}$) $\div$ 10]	

[0211]

[0212] 일부 구현예에서, 독성 결과는 중증 CRS이다. 일부 구현예에서, 독성 결과는 중증 CRS의 부재(예를 들어, 보통 또는 경미한 CRS)이다. 일부 구현예에서, 세포 요법 또는 이의 세포의 용량의 투여 이후에 대상체가: (1) 적어도 3일 이상 동안 적어도 섭씨 38도 이상의 발열; (2) (a) 투여 직후 수준과 비교하여 다음 일곱 가지 사이토카인 그룹: 인터페론 감마(IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프렉탈카인, 및 IL-5 중 적어도 두 개 이상에 대하여 적어도 75 이상의 최대 배수 변화 및/또는 (b) 투여 직후 수준과 비교하여 다음 일곱 가지 사이토카인 그룹: 인터페론 감마(IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프렉탈카인, 및 IL-5 중 적어도 한 개 이상에 대하여 적어도 250 이상의 최대 배수 변화; 및 (c) (적어도 하나 이상의 정맥내 혈관 승압제를 필요로 하는) 저혈압 또는 저산소증(PO₂ < 90%)과 같은 독성 또는 (정신 상태 변화, 둔감, 및/또는 발작을 포함한) 하나 이상의 신경 장애 중 적어도 하나 이상의 임상적 징후; 중 하나를 포함하는 사이토카인 상승을 나타내는 경우, 대상체는 세포 요법 또는 이의 세포의 용량의 투여에 반응하여 또는 이에 대해 부차적으로 “중증 CRS” (“sCRS”)가 발생한 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 중증 CRS에는 표 3 및 표 4에 제시된 바와 같이 3급 이상의 CRS가 포함된다.

- [0213] 일부 구현예에서, 독성 결과, 예를 들어 CRS-관련 결과의 수준, 예를 들어 CRS의 지표의 혈청 수준을 ELISA에 의해 측정한다. 일부 구현예에서, 발열 및/또는 C 반응성 단백질(CRP)의 수준을 측정할 수 있다. 일부 구현예에서, 발열 및 CRP $\geq 15\text{mg/dL}$ 가 있는 대상체는 중증 CRS를 발생시킬 고위험이 있는 것으로 간주될 수 있다. 일부 구현예에서, CRS 관련 혈청 인자 또는 CRS 관련 결과는 Flt-3L, 프랙탈카인, 과립구 대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF), 인터루킨-1 베타(IL-1 β), IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, 인터페론 감마(IFN- γ), 대식세포 염증성 단백질(MIP)-1, MIP-1, sIL-2R α , 또는 종양 괴사 인자 알파(TNF α)를 포함한 염증성 사이토카인 및/또는 케모카인의 수준 및/또는 농도의 증가를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 인자 또는 결과는 C 반응성 단백질(CRP)을 포함한다. 초기에 그리고 쉽게 측정 가능한 CRS 위험 인자인 것에 더하여, CRP는 또한 세포 증폭에 대한 표지자이다. 일부 구현예에서, 높은 수준의 CRP, 예컨대 $\geq 15\text{mg/dL}$ 을 가진 것으로 측정된 대상체는 CRS를 가지고 있다. 일부 구현예에서, 높은 수준의 CRP를 가진 것으로 측정된 대상체는 CRS를 가지고 있지 않다. 일부 구현예에서, CRS의 측정은 CRP 및 CRS를 나타내는 다른 인자의 측정을 포함한다.
- [0214] 일부 구현예에서, 중증 CRS 또는 3급 CRS 이상, 예컨대 4급 이상과 관련된 결과는: 지속적인 발열, 예를 들어, 2일 이상, 예를 들어, 3일 이상, 예를 들어, 4일 이상 또는 적어도 3연속일 이상 동안, 지정된 온도, 예를 들어, (약) 섭씨 38도를 넘는 발열; (약) 섭씨 38도 넘는 발열; 적어도 둘 이상의 사이토카인(예를 들어, 인터페론 감마(IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프랙탈카인, 및 IL-5, 및/또는 종양 괴사 인자 알파(TNF α)로 구성된 군 중 적어도 둘 이상)의 치료전 수준, 또는 예를 들어, 상기 사이토카인들 중 적어도 하나 이상의 적어도 (약) 250의 최대 배수 변화와 비교하여, 예를 들어, 적어도 (약) 75의 최대 배수 변화와 같은 사이토카인의 상승; 및/또는 저혈압(예를 들어, 적어도 하나 이상의 정맥내 혈관 수압계에 의해 측정된 바와 같음)과 같은 적어도 하나 이상의 임상적 독성 징후; 저산소증(예를 들어, (약) 90% 미만의 혈장 산소(PO_2) 수준); 및/또는 (정신 상태 변화, 둔감, 및 발작을 포함한) 하나 이상의 신경 장애 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 중증 CRS에는 집중 치료실(ICU)에서 관리 또는 치료가 필요한 CRS가 포함된다.
- [0215] 일부 구현예에서, 중증 CRS와 같은 CRS는 (1) 지속적인 발열(적어도 3일 이상 동안 적어도 섭씨 38도 이상의 발열) 및 (2) 적어도 (약) 20mg/dL 이상의 CRP의 혈청 수준의 조합을 포괄한다. 일부 구현예에서, CRS는 둘 이상의 승압약의 사용을 필요로 하는 저혈압 또는 기계적 인공호흡이 필요한 호흡부전을 포괄한다. 일부 구현예에서, 승압약의 투여량은 두 번째 또는 후속 투여에서 증가한다.
- [0216] 일부 구현예에서, 중증 CRS 또는 3급 CRS는 알라닌 아미노기 전달효소의 증가, 아스파르트산 아미노기 전달효소의 증가, 오한, 열성 호중구 감소증, 두통, 좌심실 기능 부전, 뇌병증, 뇌수종, 및/또는 떨림을 포괄한다.
- [0217] 다양한 결과를 측정 또는 검출하는 방법은 명시될 수 있다.
- [0218] 일부 측면에서, 독성 결과는 신경 독성이거나 이와 관련된다. 일부 구현예에서, 신경 독성의 임상적 위험과 관련된 증상에는 착란상태, 섬망, 실어증, 표현실어증, 둔감, 간대성 근경련, 무기력, 정신 상태 변화, 경련, 발작 유사 활성화, 발작(선택적으로 뇌전도(EEG)에 의해 확인된 바와 같음), 베타 아밀로이드(A β)의 수준 상승, 글루타메이트의 수준 상승, 및 산소 라디칼의 수준 상승이 포함된다. 일부 구현예에서, 신경 독성은 예를 들어, 1~5급 척도를 사용하는 중증도에 기초하여 등급이 매겨진다(예를 들어, 문헌[Guido Cavaletti & Paola Marmiroli *Nature Reviews Neurology* 6, 657-666 (December 2010); National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria version 4.03 (NCI-CTCAE v4.03)] 참조).
- [0219] 일부 경우에, 신경계 증상은 sCRS의 가장 초기 증상일 수 있다. 일부 구현예에서, 신경계 증상은 세포 요법 주입 후 5 내지 7일 후에 시작되는 것으로 보인다. 일부 구현예에서, 신경계 변화의 지속 기간은 3 내지 19일 범위일 수 있다. 일부 경우에, sCRS의 다른 증상이 해결된 후에 신경계 변화의 회복이 일어난다. 일부 구현예에서, 신경계 변화의 해결의 시간 또는 정도는 항-IL-6 및/또는 스테로이드(들)를 이용한 치료로 앞당겨지지 않는다.
- [0220] 일부 구현예에서, 세포 요법 또는 이의 세포의 용량의 투여 이후에, 대상체가: 1) 말초 운동 신경의 염증 또는 변성(degeneration)을 포함한, 말초 운동 신경 장애의 증상들; 2) 말초 감각 신경의 염증 또는 변성을 포함한 말초 감각 신경 장애; 비정상적이고 불쾌한 감각을 초래하는 감각 지각의 왜곡과 같은 감각 장애; 신경 또는 신경근을 따라 느껴지는 극심하게 고통스러운 감각과 같은 신경통; 및/또는 따끔거림, 무감각, 압박감, 추위 및 자극이 없는 열기의 비정상적인 피부 감각을 초래하는 감각 뉴런의 기능 장애와 같은 감각 이상의 증상들; 중에서 자기 스스로 돌보기(예를 들어, 목욕, 옷 입고 벗기, 음식 먹기, 변기 사용하기, 약 복용)를 제한하는 증상들을 나타내는 경우, 대상체는 세포 요법 또는 이의 세포의 용량의 투여에 반응하여 또는 이에 대해 부차적으로

“중증 신경 독성”이 발생한 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 중증 신경 독성에는 표 6에 제시된 바와 같이 3급 이상의 신경 독성이 포함된다.

[표 6]

표 6: 예시적인 신경 독성 등급 부여 기준	
등급	증상의 설명
1 무증상 또는 경미함	경미한 증상 또는 무증상
2 보통(Moderate)	식사 준비, 식료품이나 의복 구매, 전화기 사용, 돈 관리 등 수단적 일상 생활 활동(ADL)을 제한하는 증상의 존재
3 중증(Severe)	목욕, 옷 입고 벗기, 스스로 음식 먹기, 변기 사용하기, 약 복용하기 등 자기 스스로를 돌보는 ADL을 제한하는 증상의 존재
4 생명 위협	긴급한 개입이 필요한, 생명을 위협하는 증상
5 치명적	사망

일부 구현예에서, 본 방법은 다른 방법과 비교하여 CRS 또는 신경 독성과 관련된 증상을 감소시킨다. 일부 측면에서, 제공된 방법은 다른 방법과 비교하여 중증 CRS 또는 3급 이상의 CRS와 관련된 증상, 결과 또는 인자를 포함하여, CRS와 연관된 증상, 결과 또는 인자를 감소시킨다. 예를 들어, 본 방법에 따라 치료받은 대상체는 예를 들어 표 3 및 표 4에 제시된 임의의 기술된 바와 같은 CRS, 예를 들어, 중증 CRS 또는 3급 이상 CRS의 증상, 결과 또는 인자가 검출 가능하지 않고/거나 감소될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 방법에 따라 치료받은 대상체는 다른 방법으로 치료받은 대상체와 비교하여, 팔다리 쇠약 또는 무감각; 기억, 시력 및/또는 지적 능력의 손실; 통제할 수 없는 집착적이고/거나 강박적인 행동; 망상; 두통; 운동 통제력 상실, 인지 열화, 및 자율 신경계 기능 장애를 포함한 인지 및 행동 문제; 및 성 기능 장애와 같은, 신경 독성의 증상이 감소할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 방법에 따라 치료받은 대상체는 말초 운동 신경 장애, 말초 감각 신경 장애, 감각 장애, 신경통 또는 감각 이상과 관련된 증상이 감소될 수 있다.

일부 구현예에서, 본 방법은 뉴런의 사멸과 같이 신경계 및/또는 뇌의 손상을 포함한 신경 독성과 관련된 결과를 감소시킨다. 일부 측면에서, 본 방법은 베타 아밀로이드(Aβ), 글루타메이트, 및 산소 라디칼과 같은 신경 독성과 관련된 인자의 수준을 감소시킨다.

일부 구현예에서, 독성 결과는 용량 제한 독성(DLT)이다. 일부 구현예에서, 독성 결과는 용량 제한 독성이다. 일부 구현예에서, 독성 결과는 용량 제한 독성의 부재이다. 일부 구현예에서, 용량 제한 독성(DLT)은, 예컨대 상기 설명된 바와 같은 그리고 미국 국립 암 연구소(NCI)의 CTCAE(Common Terminology Criteria for Adverse Events) 버전 4.0을 포함하는, 특정 독성을 평가하기 위한 임의의 알려진 또는 출판된 지침에 의해 평가되는 바와 같은 3급 이상 독성으로 정의된다.

일부 구현예에서, 제공된 방법, 및/또는 제공된 제조품 또는 조성물에 부합되게 T 세포의 용량을 투여하고 관찰되는, 독성, 예를 들어, CRS 또는 신경 독성 또는 중증 CRS 또는 신경 독성, 예를 들어, 3급 이상의 CRS 또는 신경 독성의 낮은 비율, 위험 또는 가능성은 통원 기준으로 세포 요법의 투여를 가능하게 한다. 일부 구현예에서, 제공된 방법, 및/또는 제공된 제조품 또는 조성물에 부합되게 세포 요법, 예를 들어, T 세포(예를 들어, CAR⁺ T 세포)의 용량의 투여는 통원 기준으로 수행되거나 또는 숙박이 필요한 병원 입원 등처럼 대상체가 병원에 입원할 필요가 없다.

일부 측면에서, 제공된 방법, 및/또는 제공된 제조품 또는 조성물에 부합되게 세포 요법, 예를 들어, T 세포(예를 들어, CAR⁺ T 세포)의 용량을 투여받은 대상체는, 통원 기준으로 치료받은 대상체를 포함하여, 대상체가 독성, 예컨대 신경 독성 또는 CRS의 징후 또는 증상을 나타내지 않는 한 또는 나타낼 때까지, 세포 용량의 투여 전에 또는 투여와 함께 임의의 독성을 치료하기 위한 개입을 받지 않는다. 독성을 치료, 지연, 약화 또는 개선

하기 위한 예시적인 제제가 섹션 I-C에서 기술된다.

[0228] 일부 구현예에서, 세포 요법, 예를 들어, T 세포(예를 들어, CAR⁺ T 세포)의 용량을 투여받은 대상체가, 통원 기준으로 치료받은 대상체를 포함하여, 발열을 나타내면, 대상체는 발열을 낮추기 위한 치료를 제공받거나 해당 치료를 받거나 실시하도록 안내를 받는다. 일부 구현예에서, 대상체의 발열은 특정 임계 온도 또는 수준 이상인 (또는 그렇게 측정된) 대상체의 신체 온도를 특징으로 한다. 일부 측면에서, 임계 온도는 적어도 낮은 등급 이상의 발열, 적어도 중간 정도의 발열, 및/또는 적어도 높은 등급의 발열과 관련된다. 일부 구현예에서, 임계 온도는 특정 온도 또는 범위이다. 예를 들어, 임계 온도는 (약) 또는 적어도 (약) 섭씨 38, 39, 40, 41 또는 42도 일 수 있고/거나, (약) 섭씨 38도 내지 (약) 섭씨 39도의 범위, (약) 섭씨 39도 내지 (약) 섭씨 40도의 범위, (약) 섭씨 40도 내지 (약) 섭씨 41도의 범위, 또는 (약) 섭씨 41도 내지 (약) 섭씨 42도의 범위일 수 있다.

[0229] 일부 구현예에서, 발열을 줄이기 위해 설계된 치료는 해열제를 이용한 치료를 포함한다. 해열제에는 NSAID(이부프로펜, 나프록센, 케토프로펜, 및 니메실라이드 등); 아스피린, 살리실산콜린, 살리실산마그네슘, 및 살리실산 나트륨과 같은 살리실산염; 파라세타몰; 아세트아미노펜; 메타미졸, 나부메톤, 페낙손(Phenaxone), 안티피린, 해열제(febrifuge)와 같이 해열 효과가 있는 것으로 공지된 다수의 임의의 제제 중 하나와 같이 열을 내리는 임의의 제제, 예를 들어 화합물, 조성물, 또는 성분이 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 해열제는 아세트아미노펜이다. 일부 구현예에서, 아세트아미노펜은 12.5mg/kg의 용량으로 최대 4시간마다 경구로 또는 정맥 내로 투여할 수 있다. 일부 구현예에서, 이것은 이부프로펜 또는 아스피린이거나 이를 포함한다.

[0230] 일부 구현예에서, 발열이 지속열인 경우, 대상체는 독성을 치료하기 위해 아래 섹션 I-C에 기술된 것과 같은 대체 치료를 받는다. 통원 기준으로 치료받는 대상체의 경우, 대상체가 지속열을 가졌고/거나 가진 것으로 확인된 경우 대상체는 병원으로 돌아가도록 안내 받는다. 일부 구현예에서, 대상체가 타당한 임계 온도 이상의 발열을 나타내는 경우, 그리고 지정된 치료 이후에, 예컨대 발열을 내리기 위해 설계된 치료, 예컨대 해열제, 예를 들어, NSAID 또는 살리실산염, 예를 들어, 이부프로펜, 아세트아미노펜 또는 아스피린을 이용한 치료 이후에, 대상체의 발열 또는 신체 온도가 내려가지 않거나, 또는 지정된 양 이상(예를 들어, 1° C 이상, 그리고 일반적으로 변동되지 않고, 또는 약 0.5° C, 0.4° C, 0.3° C, 또는 0.2° C 이상) 내려가지 않는 경우, 대상체는 지속열이 있고/거나 가진 것으로 확인되거나 간주된다. 예를 들어, 대상체가 적어도 (약) 섭씨 38 또는 39도 이상의 발열을 나타내거나 나타내는 것으로 확인되고, 아세트아미노펜과 같은 해열제로 치료를 받은 이후에도, 6시간 동안, 8시간 동안, 또는 12시간 동안, 또는 24시간 동안, 열이 (약) 0.5° C, 0.4° C, 0.3° C, 또는 0.2° C 이상, 또는 (약) 1%, 2%, 3%, 4%, 또는 5% 이상 내려가지 않는 경우, 대상체는 지속열을 가진 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, 해열제의 투여량은 발열 또는 세균 또는 바이러스 감염, 예를 들어, 국소 또는 전신 감염과 관련된 발열과 같은 특정 유형의 열을 내리기 위해 대상체 등에 일반적으로 효과적인 투여량이다.

[0231] 일부 구현예에서, 대상체가 타당한 임계 온도 이상의 발열을 나타내는 경우, 그리고 대상체의 발열 또는 신체 온도가 약 1° C 이상 변동되지 않고, 그리고 일반적으로 약 0.5° C, 0.4° C, 0.3° C, 또는 0.2° C 이상 변동되지 않는 경우, 대상체는 지속열이 있고/거나 가진 것으로 확인되거나 간주된다. 상기 특정 양 이상의 변동의 부재는 일정 기간 동안(예컨대 24시간, 12시간, 8시간, 6시간, 3시간, 또는 1시간 동안, 발열의 첫 징후부터 또는 표시된 임계값을 넘는 첫 온도부터 측정할 수 있음) 측정된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 대상체가 적어도 (약) 섭씨 38 또는 39도 이상의 발열을 나타내거나 나타내는 것으로 확인되고, 6시간 동안, 8시간 동안, 또는 12시간 동안, 또는 24시간 동안, (약) 0.5° C, 0.4° C, 0.3° C, 또는 0.2° C 이상 변동이 없으면, 대상체는 지속열을 나타내는 것으로 간주되거나 확인된다.

[0232] 일부 구현예에서, 발열은 지속열이고; 일부 측면에서, 독성을 유도할 잠재성이 있는 최초 요법, 예컨대, 세포 요법, 예컨대 T 세포의 용량(예를 들어, CAR⁺ T 세포) 투여 이후에, 대상체가 지속열을 가진 것으로 확인된 시점에, 예컨대 상기 확인한 지 또는 첫 번째로 상기 확인한 지 1, 2, 3, 4, 5, 6시간 이하 시간 내에, 대상체는 치료를 받는다.

[0233] 일부 구현예에서, 예를 들어, 진술한 구현예 중 어느 하나에 따라 측정된 바와 같이, 대상체가 지속열을 나타내는 것으로 확인되거나 확인된(예컨대 처음으로 확인 또는 확인된) 시점에 또는 직후에 독성을 치료하기 위한 하나 이상의 개입 또는 제제, 예컨대 독성-표적화 요법이 투여된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 독성-표적화 요법은 상기 확인 또는 확인된 지 특정 시간 내에, 예컨대 그로부터 30분, 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 6시간, 또는 8시간 내에 투여된다.

[0234] II. 세포 요법 및 세포 조작

- [0235] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 세포 요법(예를 들어, T 세포 요법) 방법은 질병 또는 병태와 연관된 항원, 예컨대 r/r/B 세포 NHL을 인식하고/거나 그에 특이적으로 결합하도록 설계된 재조합 수용체(예를 들어, CAR)를 발현하는 조작된 세포를 투여하는 것을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 재조합 수용체(예를 들어, CAR)에 의해 결합 또는 인식되는 항원은 CD19이다. 일부 구현예에서, 항원에 대한 결합은 이러한 항원에 대한 면역 반응과 같은 반응을 초래한다. 일부 구현예에서, 세포는 키메라 항원 수용체(CAR)와 같은 재조합 수용체를 함유하거나 함유하도록 조작된다. CAR과 같은 재조합 수용체는 일반적으로 하나 이상의 세포내 신호전달 성분에, 일부 측면에서 링커들 및/또는 막관통 도메인(들)을 통해 연결된 항원에 특이적인 세포외 항원(또는 리간드) 결합 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, 조작된 세포는 예컨대 입양 세포 요법을 위해 대상체에게 투여하기에 적합한 약학 조성물 및 제형으로서 제공된다. 대상체, 예를 들어 환자에게 세포 및 조성물을 투여하기 위한 치료 방법이 또한 제공된다.
- [0236] 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작을 통해 도입된 하나 이상의 핵산을 포함하고, 이에 의해 상기 핵산의 재조합 또는 유전자 조작된 생성물을 발현한다. 일부 구현예에서, 유전자 전달은 먼저 세포를 자극하고, 예컨대 세포를 증식, 생존 및/또는 활성화와 같은 반응을 유도하는 자극과 조합하고, 예를 들어 사이토카인 또는 활성화 표지자의 발현에 의해 측정된 바와 같이, 뒤이어 활성화된 세포의 형질도입 및 임상 적용에 충분한 수로 배양에서 증폭시켜 달성된다.
- [0237] **A. 키메라 항원 수용체**
- [0238] 제공된 방법 및 용도의 일부 구현예에서, T 세포와 같은 조작된 세포는, 원하는 항원(예를 들어, 종양 항원)에 대한 특이성을 제공하는 리간드-결합 도메인(예를 들어, 항체 또는 항체 단편)을 세포내 신호전달 도메인과 결합하는 하나 이상의 도메인을 함유하는, 키메라 항원 수용체(CAR)와 같은 키메라 수용체를 발현한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 T 세포 활성화 도메인과 같은 활성화 세포내 도메인 부분이고, 1차 활성화 신호를 제공한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 효과기 기능을 촉진하기 위한 공자극 신호전달 도메인을 함유하거나 추가로 함유한다. 분자(예를 들어, 항원)에 특이적 결합 시, 수용체는 일반적으로 면역 자극 신호, 예컨대 ITAM-변환 신호를 세포 내로 전달하여 질병 또는 병태에 표적화된 면역 반응을 촉진한다. 일부 구현예에서, 면역 세포로 유전자 조작될 때 키메라 수용체는 T 세포 활성을 조절할 수 있고, 일부 경우에, T 세포 분화 또는 항상성을 조절할 수 있으며, 이로써 예컨대 입양 세포 요법 방법에서 사용하기 위해, *생체 내* 수명, 생존 및/또는 지속성이 향상된 유전자 조작된 세포가 생성될 수 있다.
- [0239] CAR을 포함하는 예시적 항원 수용체 및 상기 수용체를 조작하고 세포 내로 도입하는 방법은 예를 들어 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061 및 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 EP2537416]에 기재된 것들 및/또는 문헌[Sadelain 등, Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila 등 (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle 등, Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5): 633-39; Wu 등, Cancer, 2012 March 18(2): 160-75]에 기재된 것들을 포함한다. 일부 측면에서, 항원 수용체는 문헌[미국 특허 번호 7,446,190]에 기재된 바와 같은 CAR 및 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO/2014055668 A1]에 기재된 것을 포함한다. CAR의 예로는 전술한 간행물 중 어느 하나, 예컨대 문헌[WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, U.S. Patent No.: 7,446,190, US Patent No.: 8,389,282, Kochenderfer 등, 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang 등 (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; 및 Brentjens 등, Sci Transl Med. 2013 5(177)]에 개시된 바와 같은 CAR이 포함된다. 또한 문헌[WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, 미국 특허 번호 7,446,190 및 미국 특허 번호 8,389,282]을 참조한다.
- [0240] 일부 구현예에서, T 세포와 같은 조작된 세포는 특정 세포 유형의 표면 상에 발현된 항원과 같은 특정 항원(또는 표지자 또는 리간드)에 대한 특이성을 갖는 키메라 항원 수용체(CAR)와 같은 재조합 수용체를 발현한다. 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화되는 항원은 폴리펩타이드이다. 일부 구현예에서, 이는 탄수화물 또는 다른 분자이다. 일부 구현예에서, 항원은 정상 또는 비-표적화 세포 또는 조직과 비교하여 질병 또는 병태의 세포 상에서, 예를 들어 종양 또는 병원성 세포 상에서 선택적으로 발현되거나 과발현된다. 다른 구현예에서, 항원은 정상 세포 상에서 발현되고/거나 조작된 세포 상에서 발현된다.
- [0241] 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화되는 항원은 다수의 알려진 B 세포 표지자 중 어느 하나와 같은 B 세포 악성 종양과 연관된 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화되는 항원은 CD20, CD19, CD22,

ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig카파, Ig람다, CD79a, CD79b 또는 CD30이다. 구체적인 측면에서, 항원은 CD19이다. 일부 구현예에서, 이러한 항원 중 임의의 것은 인간 B 세포 상에서 발현된 항원이다.

[0242] CAR과 같은 키메라 수용체는 일반적으로 항체 분자의 항원 결합 부분 또는 부분들인 세포의 항원 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 항체 분자의 부분, 일반적으로 항체(예를 들어, scFv 항체 단편)의 가변 중쇄(V_H) 영역 및/또는 가변 경쇄(V_L) 영역이다. 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 단일 도메인 항체(sdAb), 예컨대 scFv, 나노바디, V_{HH} 및 V_{NAR} 이다. 일부 구현예에서, 항원 결합 단편은 가요성 링커에 의해 연결되는 항체 가변 영역을 포함한다.

[0243] 일부 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편(예를 들어, scFv 또는 V_H 도메인)은 CD19와 같은 항원을 특이적으로 인식한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편은 CD19에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편으로부터 유래되거나 이의 변이체이다. 일부 구현예에서, 항원은 CD19이다. 일부 구현예에서, scFv는 CD19에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터 유래된 V_H 및 V_L 을 함유한다. 일부 구현예에서, CD19에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 FMC63 및 SJ25C1과 같은 마우스 유래 항체이다. 일부 구현예에서, 항체 또는 항체 단편은 예를 들어, 문헌[미국 특허 공개 번호 US 2016/0152723]에 기재된 바와 같은 인간 항체이다.

[0244] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 일부 측면에서 scFv일 수 있는 FMC63로부터 유래된 V_H 및/또는 V_L 을 포함한다. FMC63은 일반적으로 인간 기원의 CD19를 발현하는 Nalm-1 및 -16 세포에 대하여 발생된 마우스 단클론성 IgG1 항체를 지칭한다(Ling, N. R., 등 (1987). *Leucocyte typing III*. 302). 일부 구현예에서, FMC63 항체는 서열 번호: 38 및 39에 각각 제시된 CDR-H1 및 CDR-H2, 및 서열 번호: 40 또는 54에 제시된 CDR-H3 및 서열 번호: 35에 제시된 CDR-L1 및 서열 번호: 36 또는 55에 제시된 CDR-L2 및 서열 번호: 37 또는 56에 제시된 CDR-L3 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, FMC63 항체는 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H) 및 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함한다.

[0245] 일부 구현예에서, scFv는 서열 번호: 35의 CDR-L1 서열, 서열 번호: 36의 CDR-L2 서열, 서열 번호: 37의 CDR-L3 서열을 함유하는 가변 경쇄 및/또는 서열 번호: 38의 CDR-H1 서열, 서열 번호: 39의 CDR-H2 서열, 및 서열 번호: 40의 CDR-H3 서열을 함유하는 가변 중쇄, 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 전술한 것 중 임의의 것의 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 서열 번호: 41에 제시된 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 서열 번호: 42에 제시된 FMC63의 가변 경쇄 영역, 또는 그에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 전술한 것 중 임의의 것의 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 서열 번호: 24에 제시된다. 일부 구현예에서, scFv는 V_H , 링커 및 V_L 을 순서대로 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 V_L , 링커 및 V_H 을 순서대로 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 서열 번호: 25에 제시된 뉴클레오타이드 서열 또는 서열 번호: 25에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 나타내는 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, scFv는 서열 번호: 43에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호: 43에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.

[0246] 일부 구현예에서, 항원 결합 도메인은 일부 측면에서 scFv일 수 있는 SJ25C1로부터 유래된 V_H 및/또는 V_L 을 포함한다. SJ25C1은 인간 기원의 CD19를 발현하는 Nalm-1 및 -16 세포에 대하여 발생된 마우스 단클론성 IgG1 항체이다(Ling, N. R., 등 (1987). *Leucocyte typing III*. 302). 일부 구현예에서, SJ25C1 항체는 서열 번호: 47-49에 각각 제시된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 및 서열 번호: 44-46에 각각 제시된 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, SJ25C1 항체는 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H) 및 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 서열 번호: 44의 CDR-L1 서열, 서열 번호: 45의 CDR-L2 서열, 서열 번호: 46의 CDR-L3 서열을 함유하는 가변 경쇄 및/또는 서열 번호: 47의 CDR-H1 서열, 서열 번호: 48의 CDR-H2 서열, 및 서열 번호: 49의 CDR-H3 서열을 함유하는 가변 중쇄, 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 전술한 것 중 임의의 것의 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 서열 번호: 50에 제시된 SJ25C1의 가변 중쇄 영역 및 서열 번호: 51에 제시된 SJ25C1의 가변 경쇄 영역, 또는 그에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%

또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 전술한 것 중 임의의 것의 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 서열 번호: 52에 제시된다. 일부 구현예에서, scFv는 V_H , 링커 및 V_L 을 순서대로 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 V_L , 링커 및 V_H 를 순서대로 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 서열 번호: 53에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호: 53에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.

[0247] 본원에서 용어 “항체(antibody)”는 가장 넓은 의미로 사용되며, 온전한 항체 및 기능성(항원-결합) 항체 단편을 포함하는 다클론성 및 단클론성 항체를 포함하며, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 단편 항원 결합(Fab) 단편, $F(ab')_2$ 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 재조합 IgG(rIgG) 단편, 가변 중쇄(V_H) 영역, 단일 사슬 가변 단편(scFv)을 포함한 단일 사슬 항체 단편 및 단일 도메인 항체(예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디, V_{HH} 또는 V_{NAR}) 또는 단편을 포함한다. 상기 용어는 유전자 조작된 및/또는 달리 변형된 형태의 면역글로불린, 예컨대 인트라바디(intrabodies), 펩티바디(peptibodies), 키메라 항체, 완전한 인간 항체, 인간화 항체 및 이중 접합 항체, 다중특이성(예를 들어, 이중 특이성) 항체, 디아바디(diabodies), 트리아바디(triabodies) 및 테트라바디(tetrabodies), 탠덤 디-scFv, 탠덤 트리-scFv를 포괄한다. 달리 언급되지 않는 한, 용어 “항체”는 이의 기능성 항체 단편을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 상기 용어는 또한 IgG 및 이의 하위 클래스, IgM, IgE, IgA 및 IgD를 포함하는 임의의 클래스 또는 하위 클래스의 항체를 포함하는 온전한 또는 전장 항체를 포괄한다. 일부 측면에서, CAR은 예를 들어 상이한 특이성을 갖는 2개의 항원 결합 도메인을 함유하는 이중특이성 CAR이다.

[0248] 일부 구현예에서, 항원 결합 단백질, 항체 및 이의 항원 결합 단편은 전장 항체의 항원을 특이적으로 인식한다. 일부 구현예에서, 항체의 중쇄 및 경쇄는 전장일 수 있거나 또는 항원 결합 부분(Fab, $F(ab')_2$, Fv 또는 단일 사슬 Fv 단편(scFv))일 수 있다. 다른 구현예에서, 항체 중쇄 불변 영역은 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE로부터 선택되고, 구체적으로 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로부터 선택되고, 더 구체적으로, IgG1(예를 들어, 인간 IgG1)로부터 선택된다. 다른 구현예에서, 항체 경쇄 불변 영역은 예를 들어, 카파 또는 람다, 구체적으로 카파로부터 선택된다.

[0249] 일부 경우에 용어 “초가변 영역(hypervariable region)” 또는 “HVR”과 동의어인 “상보성 결정 영역(complementarity determining region)” 및 “CDR”은 항원 특이성 및/또는 결합 친화도를 부여하는 항체 가변 영역 내의 비인접 아미노산 서열을 지칭하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로, 각각의 중쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3)이 있고 각각의 경쇄 가변 영역에는 3개의 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3)이 있다. 일부 경우에, “프레임워크 영역(framework region)” 및 “FR”은 중쇄 및 경쇄 가변 영역의 비-CDR 부분을 지칭하는 것으로 알려져 있다. 일반적으로, 각각의 전장 중쇄 가변 영역에는 4개의 FR(FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FR-H4)이 있고, 각각의 전장 경쇄 가변 영역에는 4개의 FR(FR-L1, FR-L2, FR-L3 및 FR-L4)이 있다.

[0250] 주어진 CDR 또는 FR의 정확한 아미노산 서열 경계는 문헌[Kabat 등 (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (“Kabat” 넘버링 체계); Al-Lazikani 등, (1997) JMB 273,927-948 (“Chothia” 넘버링 체계); MacCallum 등, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), “Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography,” J. Mol. Biol. 262, 732-745.” (“Contact” 넘버링 체계); Lefranc MP 등, “IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,” Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (“IMGT” 넘버링 체계); Honegger A and Pluckthun A, “Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool,” J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70, (“Aho” 넘버링 체계); 및 Martin 등, “Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm,” PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (“AbM” 넘버링 체계)]에 기재된 것을 포함한 다수의 잘 알려진 체계 중 어느 하나를 사용하여 용이하게 결정될 수 있다.

[0251] 주어진 CDR 또는 FR의 경계는 식별에 사용된 체계에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, Kabat 체계는 구조적 정보를 기반으로 하는 반면 Chothia 체계는 구조적 정보를 기반으로 한다. Kabat 및 Chothia 체계 모두에 대한 넘버링은 삽입 문자, 예를 들어 “30a”에 의해 수용되는 삽입(insertion) 및 일부 항체에서 나타나는 결실(deletion)이 있는 가장 일반적인 항체 영역 서열 길이에 기반한다. 이 두 체계는 상이한 위치에 특정 삽입 및 결실(“삽입-결실(indel)”)을 배치하여 차이가 있는 넘버링이 된다. Contact 체계는 복잡한 결정 구조의 분석에 기반하며 여러 측면에서 Chothia 넘버링 체계와 유사하다. AbM 체계는 Oxford Molecular's AbM 항체 모델링 소프트웨어에서 사용된 것에 기반한 Kabat와 Chothia 정의 사이의 절충안이다.

[0252] 하기 표 7은 Kabat, Chothia, AbM 및 Contact 체계에 의해 각각 식별된 바와 같은 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 및 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3의 예시적인 위치 경계를 열거한다. CDR-H1의 경우, Kabat 및 Chothia 넘버링 체계 둘 다를 사용하여 잔기 넘버링이 나열된다. FR들은 예를 들어 CDR-L1 앞에 위치한 FR-L1, CDR-L1과 CDR-L2 사이에 위치한 FR-L2, CDR-L2와 CDR-L3 사이에 위치한 FR-L3과 같은 식으로 CDR들 사이에 위치한다. 도시된 Kabat 넘버링 체계는 H35A 및 H35B에 삽입을 배치하기 때문에, 도시된 Kabat 넘버링 관례를 사용하여 넘버링될 때 Chothia CDR-H1 루프의 끝은 루프의 길이에 따라 H32와 H34 사이에서 변한다.

[0253] [표 7]

[0254] 다양한 넘버링 체계에 따른 CDR의 경계.

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
CDR-H1 (Kabat 넘버링 ¹⁾)	H31--H35B	H26--H32..34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Chothia 넘버링 ²⁾)	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

[0255]

[0256] 1 - Kabat 등 (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD

[0257] 2 - Al-Lazikani 등, (1997) JMB 273,927-948

[0258] 따라서, 달리 명시되지 않는 한, 주어진 항체 또는 이의 영역, 예컨대 이의 가변 영역의 "CDR" 또는 "상보성 결정 영역(complementary determining region)" 또는 개별 지정 CDR(예를 들어, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3)은 전술한 체계 중 어느 하나 또는 다른 알려진 체계에 의해 정의된 바와 같은 (또는 특정) 상보성 결정 영역을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 특정 CDR(예를 들어, CDR-H3)이 주어진 V_H 또는 V_L 영역 아미노산 서열에 있는 해당 CDR의 아미노산 서열을 함유한다고 언급될 경우, 상기 CDR은 전술한 체계 중 어느 하나 또는 다른 알려진 체계에 의해 정의된 바와 같은 가변 영역 내의 해당 CDR(예를 들어, CDR-H3)의 서열을 갖는다고 이해된다. 일부 구현예에서, 특정 CDR 서열이 명시된다. 제공된 항체의 예시적인 CDR 서열은 다양한 넘버링 체계를 사용하여 기재되지만, 제공된 항체는 전술한 다른 넘버링 체계 중 어느 하나 또는 당업자에게 알려진 다른 넘버링 체계에 따라 기재된 바와 같은 CDR을 포함할 수 있는 것으로 이해된다.

[0259] 마찬가지로, 달리 명시되지 않는 한, 주어진 항체 또는 이의 영역, 예컨대 이의 가변 영역의 FR 또는 개별 지정 FR(들)(예를 들어, FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4)은 알려진 체계 중 어느 하나에 의해 정의된 바와 같은 (또는 특정) 프레임워크 영역을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 경우에, CDR과 같은 특정 CDR, FR 또는 FR들 또는 CDR들의 식별을 위한 체계는 Kabat, Chothia, AbM 또는 Contact 방법 또는 다른 알려진 체계에 의해 정의된 바와 같이 명시된다. 다른 경우에, CDR 또는 FR의 특정 아미노산 서열이 제공된다.

[0260] 용어 "가변 영역(variable region)" 또는 "가변 도메인(variable domain)"은 항체가 항원에 결합하는 데 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄(각각 V_H 및 V_L) 가변 영역은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(framework region, FR) 및 3개의 CDR을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Kindt 등 Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)]을 참조한다. 단일 V_H 또는 V_L 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정 항원에 결합하는 항체는 상보적 V_L 또는 V_H 도메인 라이브러리를 각각 선별하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 V_H 또는 V_L 도메인을 사용하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Portolano 등, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson 등, Nature 352:624-628 (1991)]을 참조한다.

[0261] 제공된 항체 중에는 항체 단편이 있다. "항체 단편(antibody fragment)"은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab,

Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 가변 중쇄(V_H) 영역, scFv와 같은 단일 사슬 항체 분자 및 단일 도메인 V_H 단일 항체; 및 항체 단편들로부터 형성된 다중특이성 항체를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 구체적인 구현예에서, 항체는 scFv와 같은, 가변 중쇄 영역 및/또는 가변 경쇄 영역을 포함하는, 단일 사슬 항체 단편이다.

[0262] 용어 “가변 영역(variable region)” 또는 “가변 도메인(variable domain)”은 항체가 항원에 결합하는 데 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄(각각 V_H 및 V_L) 가변 도메인은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각각의 도메인은 4개의 보존된 프레임워크 영역(framework region, FR) 및 3개의 CDR을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Kindt 등 Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)]을 참조한다. 단일 V_H 또는 V_L 도메인은 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정 항원에 결합하는 항체는 상보적 V_L 또는 V_H 도메인 라이브러리를 각각 선별하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 V_H 또는 V_L 도메인을 사용하여 단리될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Portolano 등, J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson 등, Nature 352:624-628 (1991)]을 참조한다.

[0263] 단일 도메인 항체(sdAb)는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 구현예에서, 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다. 일부 구현예에서, CAR은 본원에 기술되거나 알려진 표적 항원 중 어느 하나와 같이, 종양 세포 또는 암세포와 같은 표적화될 세포 또는 질병의 암 표지자 또는 세포 표면 항원과 같은 항원에 특이적으로 결합하는 항체 중쇄 도메인을 포함한다. 예시적인 단일 도메인 항체는 sdFv, 나노바디, V_HH 또는 V_{NAR}을 포함한다.

[0264] 항체 단편은 온전한 항체의 단백질 가수 분해 소화 및 재조합 숙주 세포에 의한 생산을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 기술에 의해 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 합성 링커, 예를 들어 펩타이드 링커에 의해 연결된 둘 이상의 항체 영역 또는 사슬을 갖는 것과 같이 자연적으로 발생하지 않고/거나 자연적으로 발생하는 온전한 항체의 효소 소화에 의해 생성되지 않을 수 있는 배열을 포함하는 단편과 같은 재조합으로 생성된 단편이다. 일부 구현예에서, 항체 단편은 scFv이다.

[0265] “인간화(humanized)” 항체는, 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 아미노산 잔기가 비인간 CDR로부터 유래되고 모든 또는 실질적으로 모든 FR 아미노산 잔기가 인간 FR로부터 유래된, 항체이다. 인간화 항체는 선택적으로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 포함할 수 있다. 비인간 항체의 “인간화 형태(humanized form)”는 모체 비인간 항체의 특이성 및 친화도를 유지하면서, 통상적으로 인간에 대한 면역원성을 감소시키기 위해 인간화를 거친 비인간 항체의 변이체를 지칭한다. 일부 구현예에서, 인간화 항체의 일부 FR 잔기는 비인간 항체(예를 들어, CDR 잔기가 유래된 항체)의 해당 잔기로 치환되어 예를 들어, 항체 특이성 또는 친화도가 회복되거나 개선된다.

[0266] 일부 측면에서, 재조합 수용체(예를 들어, 키메라 항원 수용체)는 항체 또는 이의 단편과 같은 하나 이상의 리간드-(예를 들어, 항원-)결합 도메인을 함유하는 세포의 부분, 및 하나 이상의 세포내 신호전달 영역 또는 도메인(상호 교환적으로 세포질 신호전달 도메인 또는 영역으로도 불림)을 포함한다. 일부 측면에서, 재조합 수용체(예를 들어, CAR)는 스페이서 및/또는 막관통 도메인 또는 부분을 더 포함한다. 일부 측면에서, 스페이서 및/또는 막관통 도메인은 리간드-(예를 들어, 항원-)결합 도메인을 함유하는 세포의 부분과 세포내 신호전달 영역(들) 또는 도메인(들)을 연결할 수 있다.

[0267] 일부 구현예에서, CAR과 같은 재조합 수용체는, 면역글로불린 불변 영역 또는 이의 변이체 또는 변형된 버전, 예컨대 힌지 영역, 예를 들어 IgG4 힌지 영역 및/또는 C_H1/C_L 및/또는 Fc 영역의 적어도 일부이거나 이를 포함할 수 있는, 스페이서를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체는 스페이서 및/또는 힌지 영역을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 불변 영역 또는 부분은 IgG4 또는 IgG1과 같은 인간 IgG의 것이다. 일부 측면에서, 불변 영역의 부분은 항원-인식 성분, 예를 들어, scFv와 막관통 도메인 사이에서 스페이서 영역으로 기능한다. 스페이서는 스페이서의 부재와 비교하여 항원 결합 후에 세포의 반응성 증가를 제공하는 길이의 것일 수 있다. 일부 예에서, 스페이서는 (약) 12개 아미노산 길이거나 또는 12개 이내의 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 15개의 아미노산을 갖는 것을 포함하고, 열거된 범위 중 임의의 종점들 사이 임의의 정수를 포함한다. 일부

구현예에서, 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 등 (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, Hudecek 등 (2015) Cancer Immunol Res. 3(2): 125-135 또는 국제 특허 출원 공개 번호 WO2014031687]에 기재된 것을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0268] 일부 구현예에서, 스페이서는 서열 번호: 1에 제시된 힌지 단독 스페이서와 같은 IgG4 또는 IgG1의 힌지 단독과 같은 IgG의 힌지 영역 단독을 함유하며, 서열 번호: 2에 제시된 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, 스페이서는 C_H2 및/또는 C_H3 도메인에 연결된 Ig 힌지(예를 들어, IgG4 힌지)이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열 번호: 4에 제시된 바와 같은 C_H2 및 C_H3 도메인에 연결된 Ig 힌지(예를 들어, IgG4 힌지)이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열 번호: 3에 제시된 바와 같은 C_H3 도메인에만 연결된 Ig 힌지(예를 들어, IgG4 힌지)이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 글리신-세린 풍부 서열 또는 알려진 가요성 링커(flexible linker)와 같은 다른 가요성 링커이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 불변 영역 또는 부분은 IgD의 것이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열 번호: 5에 제시된 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열 번호: 1, 3, 4 및 5 중 어느 하나에 대해 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는다.

[0269] 일부 측면에서, 스페이서는 (a) 면역글로불린 힌지 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성되거나, 약 15개 이하의 아미노산을 포함하고, CD28 세포외 영역 또는 CD8 세포외 영역을 포함하지 않거나; (b) 면역글로불린 힌지, 선택적으로 IgG4 힌지, 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성되고/거나, 약 15개 이하의 아미노산을 포함하고, CD28 세포외 영역 또는 CD8 세포외 영역을 포함하지 않거나; (c) (약) 12개의 아미노산 길이고/거나 면역글로불린 힌지, 선택적으로 IgG4, 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성되거나; (d) 서열 번호: 1, 3-5, 27-34 또는 24에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 상기 중 어느 하나의 변이체로 구성되거나 이를 포함하거나; 또는 (e) 화학식 X₁PPX₂P(여기에서 X₁는 글리신, 시스테인 또는 아르기닌이고 X₂는 시스테인 또는 트레오닌임)을 포함하거나 이로 구성되는; 폴리펩타이드 스페이서이다.

[0270] 일부 구현예에서, 항원 수용체는 세포외 도메인에 직접 또는 간접적으로 연결된 세포내 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 세포외 도메인과 세포내 신호전달 도메인을 연결하는 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 ITAM을 포함한다. 예를 들어, 일부 측면에서, 항원 인식 도메인(예를 들어, 세포외 도메인)은 일반적으로 CAR의 경우에 TCR 복합체와 같은 항원 수용체 복합체를 통한 활성화 및/또는 다른 세포 표면 수용체를 통한 신호를 모방하는 신호전달 성분과 같은 하나 이상의 세포내 신호전달 성분에 연결된다. 일부 구현예에서, 키메라 수용체는 세포외 도메인(예를 들어, scFv) 및 세포내 신호전달 도메인 사이에 연결되거나 융합된 막관통 도메인을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 항원 결합 성분(예를 들어, 항체)은 하나 이상의 막관통 도메인 및 세포내 신호전달 도메인에 연결된다.

[0271] 일 구현예에서, 수용체(예를 들어, CAR)에 있는 도메인 중 하나와 자연적으로 회합하는 막관통 도메인이 사용된다. 일부 경우에, 막관통 도메인은 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막관통 도메인에 대한 상기 도메인의 결합을 피하도록 아미노산 치환에 의해 변형되거나 선택되어 수용체 복합체의 다른 멤버와의 상호 작용이 최소화된다.

[0272] 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유래된다. 공급원이 천연인 경우, 일부 측면에서, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막관통 단백질로부터 유래된다. 막 관통 영역은 T 세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137(4-1BB) 또는 CD154로부터 유래된 것을 포함한다(즉, 적어도 이들의 막관통 영역(들)을 포함한다). 대안적으로 일부 구현예에서 막관통 도메인은 합성이다. 일부 측면에서, 합성 막관통 도메인은 주로 류신 및 발린 등의 소수성 잔기를 포함한다. 일부 측면에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛(triplet)이 합성 막관통 도메인의 각 말단에서 발견될 것이다. 일부 구현예에서, 연결은 링커들, 스페이서들 및/또는 막관통 도메인(들)에 의한 것이다. 일부 측면에서, 막관통 도메인은 CD28 또는 이의 변이체의 막관통 부분을 함유한다. 세포외 도메인과 막관통은 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포외 도메인과 막관통은 본원에 기술된 임의의 것과 같은 스페이서에 의해 연결된다.

- [0273] 일부 구현예에서, 수용체(예를 들어, CAR)의 막관통 도메인은 인간 CD28의 막관통 도메인 또는 이의 변이체, 예를 들어, 인간 CD28의 27개 아미노산 막관통 도메인(수탁 번호: P10747.1)이거나, 서열 번호: 8에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호: 8에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 막관통 도메인이다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체의 부분을 함유하는 막관통 도메인은 서열 번호: 9에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0274] 일부 구현예에서, 재조합 수용체(예를 들어, CAR)는 적어도 하나의 세포내 신호전달 성분 또는 성분들, 예컨대 세포내 신호전달 영역 또는 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, T 세포 활성화는 두 종류의 세포질 신호전달 서열, 즉 TCR을 통한 항원-의존적 1차 활성화를 개시하는 서열(1차 세포질 신호전달 서열) 및 항원-비의존적 방식으로 작용하여 2차 또는 공자극 신호를 제공하는 서열(2차 세포질 신호전달 서열)에 의해 매개되는 것으로 설명된다. 일부 측면에서, CAR은 상기 신호전달 성분들 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다. 세포내 신호전달 영역 중에는 천연 항원 수용체를 통한 신호, 공자극 수용체와 조합으로 상기 수용체를 통한 신호 및/또는 공자극 수용체 단독을 통한 신호를 모방하거나 이와 유사한 것이 있다. 일부 구현예에서, 짧은 올리고- 또는 폴리펩타이드 링커, 예컨대 글리신 및 세린, 예를 들어 글리신-세린 더블릿(doublet)을 함유하는 것과 같은 2 내지 10개 아미노산 길이의 링커가 CAR의 막관통 도메인과 세포질 신호전달 도메인 사이에 존재하고 연결을 형성한다.
- [0275] 일부 구현예에서, CAR의 결합시, CAR의 세포질 도메인 또는 세포내 신호전달 영역은 면역 세포, 예를 들어 CAR을 발현하도록 조작된 T 세포의 정상 효과기 기능 또는 반응 중 적어도 하나를 활성화시킨다. 예를 들어, 일부 맥락에서, CAR은 T 세포의 기능, 예컨대 세포 용해 활성 또는 T-헬퍼 활성, 예컨대 사이토카인 또는 기타 인자의 분비를 유도한다. 일부 구현예에서, 항원 수용체 성분 또는 공자극 분자의 세포내 신호전달 영역의 절단 부분은 예를 들어 그것이 효과기 기능 신호를 형질도입하는 경우 온전한 면역 자극 사슬 대신에 사용된다. 일부 구현예에서, 예를 들어 세포내 도메인 또는 도메인들을 포함하는 세포내 신호전달 영역은 T 세포 수용체(TCR)의 세포질 서열 및 일부 측면에서 천연 맥락에서 항원 수용체 결합 후에 신호전달을 개시하기 위해 상기 수용체와 협력하여 작용하는 공-수용체 및/또는 상기 분자의 임의의 유도체 또는 변이체 및/또는 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열의 세포질 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 예를 들어 세포내 도메인 또는 도메인들을 포함하는 세포내 신호전달 영역은 공자극 신호를 제공하는 데 관여하는 영역 또는 도메인의 세포질 서열을 포함한다.
- [0276] 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 알려진 신호전달 모티프를 함유할 수 있다. 1차 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예에는 CD3 제타 사슬, FcR 감마, CD3 감마, CD3 델타 및 CD3 엡실론으로부터 유래된 것들이 포함된다. 일부 구현예에서, CAR의 세포질 신호전달 분자(들)는 CD3 제타로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인, 이의 부분, 또는 서열을 함유한다.
- [0277] 일부 구현예에서, 수용체는 T-세포 활성화 및 세포 독성을 매개하는 TCR CD3 사슬, 예를 들어 CD3 제타 사슬과 같은 TCR 복합체의 세포내 성분을 포함한다. 따라서, 일부 측면에서, 항원 결합 부분은 하나 이상의 세포 신호전달 모듈에 연결된다. 일부 구현예에서, 세포 신호전달 모듈은 CD3 막관통 도메인, CD3 세포내 신호전달 도메인 및/또는 기타 CD 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체(예를 들어, CAR)는 Fc 수용체 γ , CD8 알파, CD8 베타, CD4, CD25 또는 CD16과 같은 하나 이상의 추가적인 분자의 일부를 더 포함한다. 예를 들어, 일부 측면에서, CAR 또는 다른 키메라 수용체는 CD3-제타(CD3- ζ) 또는 Fc 수용체 γ 와 CD8알파, CD8베타, CD4, CD25 또는 CD16 사이에 키메라 분자를 포함한다.
- [0278] 일부 구현예에서, 세포내(또는 세포질) 신호전달 영역은 인간 CD3 사슬, 선택적으로 CD3 제타 자극성 신호전달 도메인 또는 이의 기능적 변이체, 예컨대 인간 CD3 ζ 의 동형 단백질 3의 112 AA 세포질 도메인(수탁 번호: P20963.2) 또는 문헌[미국 특허 번호 7,446,190 또는 미국 특허 번호 8,911,993]에 기술된 바와 같은 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 영역은 서열 번호: 13, 14 또는 15에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호: 13, 14 또는 15에 대해 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0279] 천연 TCR의 맥락에서, 완전한 활성화는 일반적으로 TCR을 통한 신호전달뿐만 아니라 공자극 신호가 필요하다. 따라서, 일부 구현예에서, 완전한 활성화를 촉진하기 위해, 2차 또는 공자극 신호를 생성하기 위한 성분이 CAR에 또한 포함된다. 다른 구현예에서, CAR은 공자극 신호를 생성하기 위한 성분을 포함하지 않는다. 일부 측면에

서, 추가의 CAR이 동일한 세포에서 발현되고 2차 또는 공자극 신호를 생성하기 위한 성분을 제공한다.

- [0280] 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 T 세포 공자극 분자의 세포내 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, CAR은 공자극 수용체, 예컨대 CD28, 4-1BB, OX40(CD134), CD27, DAP10, DAP12, ICOS 및/또는 다른 공자극 수용체의 신호전달 도메인 및/또는 막관통 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 CD28 또는 4-1BB, 예컨대 인간 CD28 또는 인간 4-1BB의 공자극 영역 또는 도메인을 포함한다.
- [0281] 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 영역 또는 도메인은 인간 CD28 또는 이의 기능적 변이체 또는 이의 일부의 세포내 공자극 신호전달 도메인, 예컨대 이의 41개의 아미노산 도메인 및/또는 천연 CD28 단백질의 186-187 위치에서 LL의 GG로의 치환을 갖는 상기 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 도메인은 서열 번호: 10 또는 11에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호: 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 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포내 영역은 4-1BB 또는 이의 기능적 변이체 또는 이의 일부의 세포내 공자극 신호전달 도메인, 예컨대 인간 4-1BB 또는 이의 기능적 변이체 또는 이의 일부의 42-아미노산 세포질 도메인(수탁 번호: Q07011.1), 예컨대 서열 번호: 12에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호: 12에 대해 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0282] 일부 측면에서, 동일한 CAR은 1차(또는 활성화) 세포질 신호전달 영역 및 공자극 신호전달 성분 둘 모두를 포함한다.
- [0283] 일부 구현예에서, 활성화 도메인은 하나의 CAR 내에 포함되는 반면, 공자극 성분은 다른 항원을 인식하는 다른 CAR에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, CAR은 활성화 또는 자극성 CAR, 공자극 CAR을 포함하며, 둘 다 동일한 세포 상에서 발현된다(WO2014/055668 참조). 일부 측면에서, 세포는 하나 이상의 자극성 또는 활성화 CAR 및/또는 공자극 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 억제성 CAR(iCAR, Fedorov 등, Sci. Transl. Medicine, 5(215) (December, 2013) 참조), 예컨대 질병 또는 병태에 특이적이고/거나 이와 관련된 것 외의 항원을 인식하는 - 이로써 질병 표적화 CAR을 통해 전달된 활성화 신호가 예를 들어 표적외 효과를 감소시키도록 이의 리간드에 대한 억제성 CAR의 결합에 의해 감소 또는 억제되는 - CAR을 추가로 포함한다.
- [0284] 일부 구현예에서, 2개의 수용체는 각각 세포에 활성화 및 억제 신호를 세포에 유도하여, 항원에 수용체 중 하나의 결합은 세포를 활성화하거나 반응을 유도하지만, 항원에 제2 억제성 수용체의 결합은 반응을 억제하거나 약화시키는 신호를 유도한다. 활성화 CAR 및 억제성 CAR(iCAR)을 조합하는 예가 있다. 예를 들어, 상기 전략은 활성화 CAR이 질병 또는 병태에서 발현되거나 정상 세포에서도 발현되는 항원에 결합하고 억제성 수용체는 정상 세포에서 발현되거나 질병 또는 병태의 세포에서는 발현되지 않는 별개의 항원에 결합하는 맥락에서 표적외 효과의 가능성을 감소시키는 데 사용될 수 있다.
- [0285] 일부 측면에서, 키메라 수용체는 억제성 CAR(예를 들어 iCAR)이거나 이를 포함하고 면역 반응, 예컨대 세포에서 ITAM- 및/또는 공자극-촉진 반응을 약화 또는 억제하는 세포내 성분을 포함한다. 상기 세포내 신호전달 성분은 PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, PGE2 수용체, A2AR을 포함한 EP2/4 아데노신 수용체를 포함한 면역 관련 분자에서 발견되는 것이다. 일부 측면에서, 조작된 세포는 상기 억제성 분자의 또는 이로부터 유래된 신호전달 도메인을 포함하는 억제성 CAR를 포함하여, 이것이 예를 들어, 활성화 및/또는 공자극 CAR에 의해 유도되는 세포의 반응을 약화시키는 역할을 한다.
- [0286] 일부 경우에, CAR은 제1, 제2 및/또는 제3 세대 CAR로 지칭된다. 일부 측면에서, 제1 세대 CAR은 항원 결합 시 CD3 사슬 유도 신호만을 제공하는 것이고; 일부 측면에서, 제2 세대 CAR은 상기 신호 및 공자극 신호, 예컨대 CD28 또는 CD137과 같은 공자극 수용체 유래 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 것을 제공하는 것이고; 일부 측면에서, 제3 세대 CAR은 상이한 공자극 수용체의 다중 공자극 도메인을 포함하는 것이다.
- [0287] 일부 구현예에서, CAR은 세포질 부분에 하나 이상의, 예를 들어 둘 이상의 공자극 도메인 및 활성화 도메인, 예를 들어 1차 활성화 도메인을 포함한다. 예시적인 CAR에는 CD3-제타, CD28 및 4-1BB의 세포내 성분들이 포함된다.
- [0288] 일부 구현예에서, 항원 수용체는 표지자 및/또는 CAR을 발현하는 세포를 더 포함하거나 또는 다른 항원 수용체는 세포 표면 표지자와 같은 대리 표지자를 더 포함하고, 이는 수용체를 발현하기 위한 세포의 형질도입 또는 조작을 확인하는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 표지자에는 CD34, NGFR, 또는 표피 성장 인자 수용체, 예컨대 상기 세포 표면 수용체의 절단 버전(예를 들어, tEGFR)의 전부 또는 일부(예를 들어, 절단 형태)가 포함된다.

다. 일부 구현예에서, 표지자를 암호화하는 핵산은 절단 가능한 링커 서열(예를 들어, T2A)과 같은 링커 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 표지자 및 선택적으로 링커 서열은 문헌 [특허 출원 번호 WO2014031687]에 개시된 바와 같은 어느 하나일 수 있다. 예를 들어, 표지자는 선택적으로 링커 서열, 예컨대 T2A 절단 가능한 링커 서열에 연결된 절단형 EGFR(tEGFR)일 수 있다.

[0289] 절단형 EGFR(예를 들어, tEGFR)에 대한 예시적인 폴리펩타이드는 서열 번호 7 또는 16에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 7 또는 16에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다. 예시적인 T2A 링커 서열은 서열 번호 6 또는 17에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호 6 또는 17에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0290] 일부 구현예에서, 표지자는 T 세포에서 자연적으로 발견되지 않거나 또는 T 세포 표면에서 자연적으로 발견되지 않는 분자(예를 들어, 세포 표면 단백질) 또는 이의 부분이다. 일부 구현예에서, 상기 분자는 비자기(non-self) 분자, 예를 들어 비자기 단백질, 즉 세포가 입양으로 전달될 숙주의 면역 시스템에 의해 “자기(self)”로 인식되지 않는 분자이다.

[0291] 일부 구현예에서, 표지자는 치료 기능을 하지 않고/거나 유전자 조작을 위한, 예를 들어 성공적으로 조작된 세포를 선택하기 위한 표지자로서 사용되는 것 외에 다른 효과를 생성하지 않는다. 다른 구현예에서, 표지자는 치료적 분자 또는 달리 일부 원하는 효과를 나타내는 분자, 예컨대 생체 내에서 세포가 조우하게 될 리간드, 예컨대 입양 전달 및 리간드와의 조우 시 세포의 반응을 강화하고/거나 약화시키는 공자극 또는 면역 관문 분자일 수 있다.

[0292] 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 본원에 기술된 항체 또는 단편을 함유하는 세포의 부분을 포함한다. 일부 측면에서, 키메라 항원 수용체는 본원에 기술된 항체 또는 단편을 함유하는 세포의 부분 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 단편은 scFv 또는 단일 도메인 V_H 항체를 포함하고, 세포내 도메인은 ITAM을 함유한다. 일부 측면에서, 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타(CD3 ζ) 사슬의 제타 사슬의 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CD3-제타 사슬은 인간의 CD3-제타 사슬이다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 영역은 CD3 제타 세포내 도메인에 연결된, CD28 및 CD137(4-1BB, TNFRSF9) 공자극 도메인을 더 포함한다. 일부 구현예에서, CD28는 인간 CD28이다. 일부 구현예에서, 4-1BB는 인간 4-1BB이다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 세포의 도메인과 세포내 신호전달 영역 사이에 배치된 막관통 도메인을 포함한다. 일부 측면에서, 막관통 도메인은 CD28의 막관통 부분을 함유한다. 세포의 도메인과 막관통은 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 도메인과 막관통은 본원에 기술된 임의의 것과 같은 스페이스에 의해 연결된다.

[0293] 일부 구현예에서, CAR은 항체(예를 들어, 항체 단편), CD28의 막관통 부분이거나 이를 함유하는 막관통 도메인 또는 이의 기능적 변이체, 및 CD28의 신호전달 부분 또는 이의 기능적 변이체와 CD3 제타의 신호전달 부분 또는 이의 기능적 변이체를 함유하는 세포내 신호전달 도메인을 함유한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, CAR은 예를 들어 임의의 상기 기술된 바와 같은 CD19에 특이적인 scFv를 포함한 항체 단편과 같은 항체, 스페이스, 예컨대 면역글로불린 분자의 부분, 예컨대 힌지 영역을 및/또는 중쇄 분자의 하나 이상의 불변 영역을 함유한 스페이스, 예컨대 Ig-힌지 함유 스페이스, CD28-유래 막관통 도메인의 전부 또는 일부를 함유한 막관통 도메인, CD28-유래 세포내 신호전달 도메인, 및 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다.

[0294] 일부 구현예에서, CAR은 항체(예를 들어, 항체 단편), CD28의 막관통 부분이거나 이를 함유하는 막관통 도메인 또는 이의 기능적 변이체, 및 4-1BB의 신호전달 부분 또는 이의 기능적 변이체와 CD3 제타의 신호전달 부분 또는 이의 기능적 변이체를 함유하는 세포내 신호전달 도메인을 함유한다. 일부 상기 구현예에서, 수용체는 Ig 분자, 예컨대 인간 Ig 분자의 일부, 예컨대 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지를 함유하는 스페이스, 예컨대 힌지 단독 스페이스를 더 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 항체 또는 예를 들어 임의의 전술한 바와 같은 CD19에 특이적인 scFv와 같은 단편, 임의의 Ig-힌지 함유 스페이스와 같은 스페이스, CD28 유래 막관통 도메인, 4-1BB 유래 세포내 신호전달 도메인, 및 CD3 제타 유래 신호전달 도메인을 포함한다.

[0295] 제공된 방법의 임의의 구체적인 구현예에서, 상기 CAR은 N-말단에서 C-말단으로: 서열 번호: 43에 제시된 scFv 인 세포의 항원 결합 도메인, 서열 번호: 1에 제시된 스페이스, 서열 번호: 8에 제시된 막관통 도메인, 서열 번호: 12에 제시된 4-1BB 공자극 신호전달 도메인, 및 서열 번호: 13에 제시된 CD3-제타 (CD3 ζ) 사슬의 신호전달

도메인을 순서대로 함유한다.

[0296] B. 유전자 조작을 위한 핵산, 벡터 및 방법

[0297] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, T 세포)는 재조합 수용체를 발현하도록 유전자 조작된다. 일부 구현예에서, 조작은 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 도입함으로써 수행된다. 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 핵산 및/또는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 벡터 또는 구조체가 또한 제공된다.

[0298] 일부 경우에, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열은 신호 펩타이드를 암호화하는 신호 서열을 함유한다. 일부 측면에서, 신호 서열은 천연 폴리펩타이드로부터 유래된 신호 펩타이드를 암호화할 수 있다. 다른 측면에서, 신호 서열은 서열 번호: 66에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되고 서열 번호: 65에 제시된 GMCSFR 알파 사슬의 예시적인 신호 펩타이드와 같은 이중 또는 비천연 신호 펩타이드를 암호화할 수 있다. 일부 경우에, 재조합 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 서열은 신호 펩타이드를 암호화하는 신호 서열을 함유한다. 신호 펩타이드의 비제한적인 예시적인 예에는 예를 들어, 서열 번호: 66에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화되고 서열 번호: 65에 제시된 GMCSFR 알파 사슬 신호 펩타이드 또는 서열 번호: 67에 제시된 CD8 알파 신호 펩타이드가 포함된다.

[0299] 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 재조합 수용체의 발현을 제어하도록 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터를 함유한다. 일부 예에서, 폴리뉴클레오타이드는 재조합 수용체의 발현을 제어하도록 작동 가능하게 연결된 2개, 3개 또는 그 이상의 프로모터를 함유한다.

[0300] 핵산 분자가 두 개 이상의 상이한 폴리펩타이드 사슬, 예를 들어, 재조합 수용체 및 표지자를 암호화하는 특정 경우에, 각각의 폴리펩타이드 사슬은 별도의 핵산 분자에 의해 암호화될 수 있다. 예를 들어, 두 개의 별도의 핵산이 제공되고, 각각은 세포 내 발현을 위해 세포 내로 개별적으로 전달되거나 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 및 표지자를 암호화하는 핵산은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결되고 선택적으로 내부 리보솜 유입점(internal ribosome entry site, IRES) 또는 자가 절단 펩타이드 또는 선택적으로 T2A, P2A, E2A 또는 F2A인 리보솜 스키피נג을 야기하는 펩타이드를 암호화하는 핵산에 의해 분리되어 있다. 일부 구현예에서, 표지자를 암호화하는 핵산 및 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 두 개의 상이한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 표지자를 암호화하는 핵산 및 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 세포의 계층 내의 상이한 위치에 존재하거나 삽입된다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 예컨대 레트로바이러스 형질도입, 형질주입 또는 형질전환에 의해, 배양된 세포를 함유하는 조성물 내로 도입된다.

[0301] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드가 제1 및 제2 핵산 서열을 함유하는 것과 같이, 각각의 상이한 폴리펩타이드 사슬을 암호화하는 코딩 서열은 동일하거나 상이할 수 있는 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 둘 이상의 상이한 폴리펩타이드 사슬의 발현을 구동하는 프로모터를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 핵산 분자는 다중 시스트론(이중 시스트론 또는 삼중 시스트론, 예를 들어, 문헌[미국 특허 번호 6,060,273] 참조)일 수 있다. 일부 구현예에서, 전사 단위는 단일 프로모터로부터의 메시지에 의해 (예를 들어, 표지자를 암호화하고 재조합 수용체를 암호화하는) 유전자 생성물의 공발현을 허용하는 IRES(내부 리보솜 유입점)를 함유하는 이중 시스트론 단위로서 조작될 수 있다. 대안적으로, 일부 경우에, 단일 프로모터는 단일 개방형 해독틀(open reading frame, ORF)에 자가-절단 펩타이드(예를 들어, 2A 서열) 또는 프로테아제 인식 부위(예를 들어, 퓨린)를 암호화하는 서열에 의해 서로 분리된, (예를 들어, 표지자를 암호화하고 재조합 수용체를 암호화하는) 두 개 또는 세 개의 유전자를 함유하는 RNA의 발현을 지시할 수 있다. 따라서, ORF는 번역 동안(2A의 경우) 또는 번역 후에 개별 단백질로 가공되는 단일 폴리펩타이드를 암호화한다. 일부 경우에, T2A와 같은 펩타이드는 리보솜이 2A 요소의 C-말단에서 펩타이드 결합의 합성을 건너뛰도록(리보솜 스키피נג) 유발할 수 있으며, 이는 2A 서열의 말단과 다음(next) 펩타이드 다운스트림 사이의 분리로 이어진다(예를 들어, 문헌[de Felipe, Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004) and de Felipe 등 Traffic 5:616-626 (2004)] 참조). 다양한 2A 요소가 알려져 있다. 본원에 개시된 방법 및 시스템에 사용될 수 있는 2A 서열의 예에는 문헌[미국 특허 공개 번호 20070116690]에 기술된 바와 같은 구제역 바이러스(F2A, 예를 들어, 서열 번호: 21), 말비염 A 바이러스(E2A, 예를 들어, 서열 번호: 20), 토세아 아시그나 바이러스(T2A, 예를 들어, 서열 번호: 6 또는 17) 및 돼지 테스코 바이러스-1(P2A, 예를 들어, 서열 번호: 18 또는 19)이 있으며, 하지만 이에 한정되지 않는다.

[0302] 본원에 기술된 재조합 수용체 중 어느 하나는 재조합 수용체를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열을 임의의 조합 또는 배열로 함유하는 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화될 수 있다. 예를 들어, 1개, 2개, 3개 또는 그 이

상의 폴리뉴클레오타이드는 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 상이한 폴리펩타이드, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나의 벡터 또는 구조체는 표지자를 암호화하는 핵산 서열을 함유하고, 별도의 벡터 또는 구조체는 재조합 수용체, 예를 들어, CAR을 암호화하는 핵산 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 표지자를 암호화하는 핵산 및 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 2개의 상이한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 표지자를 암호화하는 핵산의 다운스트림에 존재한다.

[0303] 일부 구현예에서, 벡터 백본은 하나 이상의 표지자를 암호화하는 핵산 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 표지자는 형질도입 표지자, 대리 표지자 및/또는 선택 표지자이다.

[0304] 일부 구현예에서, 표지자는 형질도입 표지자 또는 대리 표지자이다. 형질도입 표지자 또는 대리 표지자는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 도입된 세포를 검출하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 형질도입 표지자는 세포의 변형을 나타내거나 확인할 수 있다. 일부 구현예에서, 대리 표지자는 재조합 수용체(예를 들어, CAR)와 함께 세포 표면 상에 공발현되도록 만들어진 단백질이다. 구체적인 구현예에서, 상기과 같은 대리 표지자는 거의 또는 전혀 활성을 갖지 않도록 변형된 표면 단백질이다. 특정 구현예에서, 대리 표지자는 재조합 수용체를 암호화하는 동일한 폴리뉴클레오타이드 상에 암호화된다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열은, 선택적으로 내부 리보솜 유입점(IRES)에 의해 분리되는, 표지자를 암호화하는 핵산 서열에 또는 자가 절단 펩타이드 또는 T2A, P2A, E2A 또는 F2A와 같은 2A 서열과 같은 리보솜 스킵핑을 일으키는 펩타이드를 암호화하는 핵산에 작동 가능하게 연결된다. 외인성 표지 유전자는 일부 경우에 세포의 검출 또는 선택을 가능하게 하도록, 일부 경우에 또한 세포 자살을 촉진하도록, 조작된 세포와 관련하여 사용될 수 있다.

[0305] 예시적인 대리 표지자는, 비기능적이며 신호 또는 일반적으로 전장 형태의 세포 표면 폴리펩타이드에 의해 전달되는 신호를 전달할 수 없거나 전달하지 않고/거나 내재화될 수 없거나 내재화되지 않는 절단 형태와 같은, 세포 표면 폴리펩타이드의 절단 형태를 포함할 수 있다. 예시적인 절단형 세포 표면 폴리펩타이드는 절단된 인간 표피 성장 인자 수용체 2(tHER2), 절단된 표피 성장 인자 수용체(tEGFR, 서열 번호: 7 또는 16에 제시된 예시적인 tEGFR 서열) 또는 전립선-특이적 막 항원(PSMA) 또는 이의 변형된 형태와 같은 성장 인자 또는 다른 수용체의 절단 형태를 포함한다. tEGFR은 항체 제독시맙(Erbix®) 또는 다른 치료용 항-EGFR 항체 또는 결합 분자에 의해 인식되는 에피토프를 함유할 수 있으며, 이는 tEGFR 구조체 및 암호화된 외인성 단백질로 조작된 세포를 식별 또는 선택하기 위해 및/또는 암호화된 외인성 단백질을 발현하는 세포를 제거 또는 분리하기 위해 사용될 수 있다. 문헌[미국 특허 번호 8,802,374 및 Liu 등, Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434]을 참조한다. 일부 측면에서, 표지자(예를 들어, 대리 표지자)에는 CD34의 전부 또는 일부(예를 들어, 절단 형태), NGFR, CD19 또는 절단된 CD19(예를 들어, 절단된 비-인간 CD19), 또는 표피 성장 인자 수용체(예를 들어, tEGFR)가 포함된다.

[0306] 일부 구현예에서, 표지자는 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP), 강화된 녹색 형광 단백질(EGFP), 예컨대 슈퍼-폴드 GFP(super-fold GFP, sfGFP), 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP), 예컨대 tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed 또는 DsRed2, 시안 형광 단백질(cyan fluorescent protein, CFP), 청록 형광 단백질(blue green fluorescent protein, BFP), 강화된 청색 형광 단백질(EBFP) 및 노랑 형광 단백질(YFP) 및 형광 단백질의 중 변이체, 단량체 변이체, 및 코돈-최적화된 및/또는 강화된 변이체를 포함한 상기들의 변이체와 같은 형광 단백질이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 표지자는 루시페라아제, 대장균(*E. Coli*)의 lacZ 유전자, 알칼리 포스파타아제, 분비 배아 알칼리 포스파타아제(SEAP), 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제(CAT)와 같은 효소이거나 이를 포함한다. 예시적인 발광 리포터 유전자에는 루시페라아제(luc), β -갈락토시다아제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(CAT), β -글루쿠로니다아제(GUS) 또는 이들의 변이체가 포함된다.

[0307] 일부 구현예에서, 표지자는 선택 표지자이다. 일부 구현예에서, 선택 표지자는 외인성 체제 또는 약물에 대한 내성을 부여하는 폴리펩타이드이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 선택 표지자는 항생제 내성 유전자이다. 일부 구현예에서, 선택 표지자는 포유동물 세포에 대해 항생제 내성을 부여하는 항생제 내성 유전자이다. 일부 구현예에서, 선택 표지자는 퓨로마이신 내성 유전자, 하이그로마이신 내성 유전자, 블라스티사이드인 내성 유전자, 네오마이신 내성 유전자, 게네티신 내성 유전자 또는 제오신 내성 유전자 또는 이들의 변형된 형태이거나 이를 포함한다.

[0308] 일부 구현예에서, 상기 분자는 비자기(non-self) 분자, 예를 들어 비자기 단백질, 즉 세포가 입양으로 전달될

숙주의 면역 시스템에 의해 “자기(self)” 로 인식되지 않는 분자이다.

- [0309] 일부 구현예에서, 표지자는 치료 기능을 하지 않고/거나 유전자 조작을 위한, 예를 들어 성공적으로 조작된 세포를 선택하기 위한 표지자로서 사용되는 것 외에 다른 효과를 생성하지 않는다. 다른 구현예에서, 표지자는 치료적 분자 또는 달리 일부 원하는 효과를 나타내는 분자, 예컨대 생체 내에서 세포가 조우하게 될 리간드, 예컨대 입양 전달 및 리간드와의 조우 시 세포의 반응을 강화하고/거나 약화시키는 공자극 또는 면역 관문 분자일 수 있다.
- [0310] 일부 구현예에서, 표지자를 암호화하는 핵산은 절단 가능한 링커 서열(예를 들어, T2A)과 같은 링커 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 표지자 및 선택적으로 링커 서열은 문헌 [국제 특허 출원 공개 번호 W02014031687]에 개시된 바와 같은 어느 하나일 수 있다. 예를 들어, 표지자는 선택적으로 링커 서열, 예컨대 T2A 절단 가능한 링커 서열에 연결된 절단형 EGFR(tEGFR)일 수 있다. 절단형 EGFR(예를 들어, tEGFR)에 대한 예시적인 폴리펩타이드는 서열 번호: 7 또는 16에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호: 7 또는 16에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0311] 일부 구현예에서, 표지자는 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP), 강화된 녹색 형광 단백질(EGFP), 예컨대 슈퍼-폴드 GFP(super-fold GFP, sfGFP), 적색 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP), 예컨대 tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed 또는 DsRed2, 시안 형광 단백질(cyan fluorescent protein, CFP), 청록 형광 단백질(blue green fluorescent protein, BFP), 강화된 청색 형광 단백질(EBFP) 및 노랑 형광 단백질(YFP) 및 형광 단백질의 중 변이체, 단량체 변이체, 및 코돈-최적화된 및/또는 강화된 변이체를 포함한 상기들의 변이체와 같은 형광 단백질이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 표지자는 루시페라아제, 대장균(*E. Coli*)의 lacZ 유전자, 알칼리 포스파타아제, 분비 배아 알칼리 포스파타아제(SEAP), 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라아제(CAT)와 같은 효소이거나 이를 포함한다. 예시적인 발광 리포터 유전자에는 루시페라아제(luc), β -갈락토시다아제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(CAT), β -글루쿠로니다아제(GUS) 또는 이들의 변이체가 포함된다.
- [0312] 일부 구현예에서, 표지자는 선택 표지자이다. 일부 구현예에서, 선택 표지자는 외인성 제제 또는 약물에 대한 내성을 부여하는 폴리펩타이드이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 선택 표지자는 항생제 내성 유전자이다. 일부 구현예에서, 선택 표지자는 포유동물 세포에 대해 항생제 내성을 부여하는 항생제 내성 유전자이다. 일부 구현예에서, 선택 표지자는 퓨로마이신 내성 유전자, 하이그로마이신 내성 유전자, 블라스티사이드인 내성 유전자, 네오마이신 내성 유전자, 게네티신 내성 유전자 또는 제오신 내성 유전자 또는 이들의 변형된 형태이거나 이를 포함한다.
- [0313] 일부 구현예에서, 재조합 핵산은, 예를 들어, 시미안 바이러스 40(SV40), 아데노바이러스, 아데노 연관 바이러스(AAV)로부터 유래된 벡터와 같은 재조합 감염성 바이러스 입자를 사용하여 세포 내로 전달된다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터, 예컨대 감마-레트로바이러스 벡터를 사용하여 T 세포 내로 전달된다(예를 들어, 문헌[Koste 등 (2014) *Gene Therapy*, 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens 등 (2000) *Exp. Hematol.*, 28(10): 1137-46; Alonso-Camino 등 (2013) *Mol. Ther. Nucl. Acids.*, 2, e93; Park 등, *Trends Biotechnol.*, 2011 November 29(11): 550-557] 참조).
- [0314] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 아데노 연관 바이러스(AAV)이다.
- [0315] 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터는 긴 말단 반복 서열(long terminal repeat sequence, LTR), 예를 들어, 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMLV), 골수증식 육종 바이러스(myeloproliferative sarcoma virus, MPSV), 뮤린 배아 줄기세포 바이러스(murine embryonic stem cell virus, MESV), 뮤린 줄기세포 바이러스(murine stem cell virus, MSCV) 또는 비장 병소 형성 바이러스(spleen focus forming virus, SFFV)로부터 유래된 레트로바이러스 벡터를 갖는다. 대부분의 레트로바이러스 벡터는 뮤린 레트로바이러스로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 임의의 조류(avian) 또는 포유동물 세포 공급원으로부터 유래된 것을 포함한다. 레트로바이러스는 통상적으로 인간을 포함하여 몇몇 종의 숙주 세포를 감염시킬 수 있음을 의미하는, 암포트로픽(amphotropic)이다. 일 구현예에서, 발현될 유전자는 레트로바이러스의 gag(꺾), pol(폴) 및/또는 env(엔브) 서열을 대체한다. 다수의 예시적인 레트로바이러스 시스템이 문헌[예를 들어, 미국 특허 번호 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa 등 (1991) *Virology* 180:849-852; Burns 등 (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; and Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109]에 기술되어 있다.

- [0316] 렌티바이러스 형질도입 방법은 알려져 있다. 예시적인 방법이 예를 들어, 문헌[Wang 등 (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper 등 (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeyen 등 (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; 및 Cavalieri 등 (2003) Blood. 102(2): 497-505]에 기술되어 있다.
- [0317] 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 전기 천공법을 통해 T 세포 내로 전달된다(예를 들어, 문헌[Chicaybam *et al*, (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 and Van Tedeloo 등 (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437] 참조). 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 전위(transposition)를 통해 T 세포 내로 전달된다(예를 들어, 문헌[Manuri 등 (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma 등 (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; and Huang 등 (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126] 참조). 면역 세포에 유전 물질을 도입하고 발현시키는 다른 방법에는 인산칼슘 형질주입(예를 들어, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.]에 기재된 바와 같음), 원형질체 융합, 양이온성 리포솜-매개 형질주입; 텅스텐 입자 촉진 마이크로입자 충격(Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); 및 인산스트론튬 DNA 공동 침전(Brash 등, Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987))이 포함된다.
- [0318] 재조합 생성물을 암호화하는 핵산 전달을 위한 다른 접근법 및 벡터는 예를 들어, 문헌[국제 특허 출원 공개 번호: W02014055668 및 미국 특허 번호 7,446,190]에 기재된 것이다.
- [0319] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, T 세포)는 증폭 중 또는 증폭 후에 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR)로 형질주입될 수 있다. 원하는 수용체의 유전자 도입을 위한 상기 형질주입은 예를 들어 임의의 적합한 레트로바이러스 벡터로 수행될 수 있다. 이어서 유전자 변형 세포 집단은 초기 자극(예를 들어, 항-CD3/항-CD28 자극)으로부터 유리될 수 있으며, 후속적으로 제2 유형의 자극으로, 예를 들어 드노보(de novo) 도입된 수용체를 통해 자극될 수 있다. 상기 제2 유형의 자극은 새로운 수용체의 프레임워크 내에서 직접 결합하는(예를 들어, 수용체 내의 불변 영역을 인식함으로써) 유전자 도입된 수용체의 펩타이드/MHC 분자, 즉 동종(교차 결합) 리간드(예를 들어, CAR의 천연 리간드) 또는 임의의 리간드(예컨대, 항체) 형태의 항원 자극을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Cheadle *et al*, “Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy” *Methods Mol Biol*. 2012; 907:645-66 또는 Barrett 등, Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014)]을 참조한다.
- [0320] 일부 경우에, 세포(예를 들어, T 세포)가 활성화되는 것이 필요하지 않은 벡터를 사용할 수 있다. 상기 일부 경우에, 세포는 활성화되기 전에 선택 및/또는 형질도입될 수 있다. 따라서, 세포는 세포 배양 이전에 또는 이후에 조작될 수 있고, 일부 경우에는 배양의 적어도 일부와 동시에 또는 그 동안에 조작될 수 있다.
- [0321] 추가 핵산 중에서, 예를 들어 도입을 위한 유전자는, 예컨대 전달된 세포의 생존력 및/또는 기능을 촉진함으로써 요법의 효능을 개선하기 위한 유전자; 예컨대 생체 내 생존 또는 국소화를 평가하기 위한 세포의 선택 및/또는 평가를 위한 유전자 표지자를 제공하기 위한 유전자; 문헌[Lupton S. D. 등, *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); and Riddell 등, *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992)]에 기재된 바와 같이 예를 들어 생체 내에서 음성 선택에 세포를 예민하게 만들어 안정성을 개선하기 위한 유전자가 있으며; 또한 우성 양성 선택 가능한 표지자를 음성 선택 가능한 표지자와 융합시켜 유래된 2작용성 선택 가능한 융합 유전자의 용도를 기술하는 문헌[국제 출원 공보 PCT/US91/08442 및 PCT/US94/05601 by Lupton 등]을 참조한다. 예를 들어, 문헌[Riddell 등, 미국 특허 번호 6,040,177의 14-17열]을 참조한다.
- [0322] 유전자 조작을 위한 세포 및 세포 준비. 일부 구현예에서, 핵산은 이중 기원인데, 즉, 다른 유기체 또는 세포로부터 획득된 것과 같이 세포 또는 세포로부터 획득된 샘플에는 정상적으로 존재하지 않으며, 예를 들어, 이는 조작되는 세포 및/또는 그러한 세포가 유래된 유기체에서 보통 발견되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 핵산은 천연 발생이 아니고, 예컨대 다수의 상이한 세포 유형으로부터 다양한 도메인을 암호화하는 핵산의 키메라 조합을 포함하는 것을 포함해, 자연에서 발견되지 않는 핵산이다.
- [0323] 세포는 일반적으로 포유동물 세포와 같은 진핵 세포이며, 통상적으로 인간 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 혈액, 골수, 림프, 또는 림프성 기관으로부터 유래되며, 선천성 또는 적응성 면역 세포와 같은, 면역 계통의 세포, 예를 들어 림프구, 통상적으로 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함한 골수성 또는 림프성 세포이다. 다른 예시적인 세포에는 유도된 다능성 줄기세포(induced pluripotent stem cell: iPSC)를 포함한, 다분화능 및 다능성 줄기세포와 같은 줄기세포가 포함된다. 세포는 통상적으로 대상체로부터 직접 분리되고/거나 대상체로부터 분리되고 동결된 세포와 같은 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 세포에는 T 세포 또는 다른 세포 유형의 하나 이상의 서브세트, 예컨대 전체 T 세포 집단, CD4+ 세포, CD8+ 세포 및 이의 하위 집단, 예컨대 기능, 활성화 상태, 성숙도, 분화 가능성, 증폭, 재순환, 국소화 및/또는 지속성 용량, 항원 특이성, 항원 수용체 유형, 특정 기관 또

는 구획에의 존재, 표지자 또는 사이토카인 분비 프로파일 및/또는 분화 정도에 의해 정의되는 것이 포함된다. 치료될 대상체와 관련하여, 세포는 동종이계 및/또는 자가 조직일 수 있다. 상기 방법 중에는 기성 방법이 포함된다. 일부 측면에서, 예컨대 기성 기술에 대해, 세포는 유도된 다능성 줄기세포(iPSC)와 같은 줄기세포 등과 같은 다능성 및/또는 다분화능이다. 일부 구현예에서, 본 방법은 대상체로부터 세포를 단리하고, 세포를 제조, 가공, 배양 및/또는 조작하고, 냉동 보존 전 또는 후에 동일한 대상체에 이 세포를 재도입하는 것을 포함한다.

[0324] T 세포 및/또는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 아형 및 하위 집단 중에는 나이브 T(naive T, T_N) 세포, 효과기 T 세포(effector T cell, T_{EFF}), 기억 T 세포 및 이의 하위-유형, 예컨대 줄기세포 기억 T(stem cell memory T, T_{SCM}), 중심 기억 T(central memory T, T_{CM}), 효과기 기억 T(effector memory T, T_{EM}) 또는 말단 분화된 효과기 기억 T 세포, 종양 침윤성 림프구(tumor-infiltrating lymphocytes, TIL), 미성숙 T 세포, 성숙 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포 독성 T 세포, 점막 연관 불변 T(mucosa-associated invariant T, MAIT) 세포, 천연 발생 및 적응성 조절 T(regulatory 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.

[0325] 일부 구현예에서, 세포는 자연 살해(natural killer, NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 단핵구 또는 과립구, 예를 들어 골수성 세포, 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 비만 세포, 호산구 및/또는 호염기구이다.

[0326] 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작을 통해 도입된 하나 이상의 핵산을 포함하고, 이에 의해 상기 핵산의 재조합 또는 유전자 조작된 생성물을 발현한다. 일부 구현예에서, 핵산은 이중 기원인데, 즉, 다른 유기체 또는 세포로부터 수득된 것과 같이 세포 또는 세포로부터 수득된 샘플에는 정상적으로 존재하지 않으며, 예를 들어, 이는 조작되는 세포 및/또는 그러한 세포가 유래된 유기체에서 보통 발견되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 핵산은 천연 발생이 아니고, 예컨대 다수의 상이한 세포 유형으로부터 다양한 도메인을 암호화하는 핵산의 키메라 조합을 포함하는 것을 포함해, 자연에서 발견되지 않는 핵산이다.

[0327] 일부 구현예에서, 조작된 세포의 제조는 하나 이상의 배양 및/또는 제조 단계를 포함한다. CAR과 같은 형질전환 수용체(transgenic receptor)를 암호화하는 핵산의 도입을 위한 세포는, 생물학적 샘플, 예를 들어 대상체로부터 수득되거나 유래된 것과 같은 샘플로부터 단리될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포가 단리되는 대상체는 질병 또는 병태가 있거나 세포 요법이 필요하거나 또는 세포 요법이 투여될 대상체이다. 일부 구현예에서, 대상체는 세포가 단리, 가공 및/또는 조작되는 입양 세포 요법과 같은 특정한 치료적 개입이 필요한 인간이다.

[0328] 따라서, 일부 구현예에서 세포는 1차 세포, 예를 들어 1차 인간 세포이다. 샘플에는 대상체에서 직접 채취한 조직, 체액 및 기타 샘플뿐만 아니라 분리, 원심분리, 유전자 조작(예를 들어, 바이러스 벡터를 이용한 형질도입), 세척 및/또는 인큐베이션과 같은 하나 이상의 가공 단계에서 생성된 샘플이 포함된다. 생물학적 샘플은 생물학적 공급원으로부터 직접 수득된 샘플 또는 가공된 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플에는 혈액, 혈장, 혈청, 뇌척수액, 활액, 소변 및 땀과 같은 체액, 조직 및 기관 샘플(이들로부터 유래된 가공 샘플 포함)이 포함되나, 이에 한정되지 않는다.

[0329] 일부 측면에서, 세포가 유래되거나 단리된 샘플은 혈액 또는 혈액 유래 샘플이거나, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물이거나 이로부터 유래된다. 예시적인 샘플에는 전혈, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 백혈구, 골수, 흉선, 조직 생검, 종양, 백혈병, 림프종, 림프절, 장 관련 림프 조직, 점막 관련 림프 조직, 비장, 기타 림프 조직, 간, 폐, 위, 창자, 결장, 신장, 췌장, 유방, 뼈, 전립선, 자궁경부, 고환, 난소, 편도 또는 기타 기관 및/또는 이들로부터 유래된 세포가 포함된다. 샘플에는 세포 요법, 예를 들어, 입양 세포 요법의 맥락에서 자가 및 동종이계 공급원으로부터 유래된 샘플이 포함된다.

[0330] 일부 구현예에서, 세포는 세포주(예를 들어, T 세포주)로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 세포는 이중성 공급원으로부터, 예를 들어 마우스, 랫트, 비인간 영장류 및 돼지로부터 수득된다.

[0331] 일부 구현예에서, 세포의 단리는 하나 이상의 준비 단계 및/또는 비친화도 기반 세포 분리 단계를 포함한다. 일부 예에서, 세포는 예를 들어 원치 않는 성분의 제거, 원하는 성분의 농축, 특정 시약에 민감한 세포를 용해하거나 제거하기 위해, 하나 이상의 시약의 존재 하에 세척, 원심분리 및/또는 인큐베이션된다. 일부 예에서, 세포는 하나 이상의 특성, 예컨대 밀도, 부착 특성, 크기, 특정 성분에 대한 민감도 및/또는 내성에 기초하여 분리된다.

[0332] 일부 예에서, 대상체의 순환 혈액 유래 세포는 예를 들어 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술에 의해 수득된다. 일부 측면에서, 샘플은 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 유핵 백혈구, 적혈구 및/또는 혈소판을 포함한

림프구를 함유하고, 일부 측면에서 적혈구 및 혈소판 이외의 세포를 함유한다.

- [0333] 일부 구현예에서, 대상체로부터 채집된 혈액 세포는, 예를 들어 혈장 분획을 제거하고 후속 가공 단계를 위해 적절한 완충제 또는 배지에 세포를 배치하기 위해 세척된다. 일부 구현예에서, 세포는 인산염 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 세척된다. 일부 구현예에서, 세척 용액에는 칼슘 및/또는 마그네슘 및/또는 많은 또는 모든 2가 양이온이 결여되어 있다. 일부 측면에서, 세척 단계는 제조업체의 지침에 따라 반자동 “플로우-쓰루(flow-through)” 원심 분리기(예를 들어, Cobe 2991 세포 프로세서, Baxter)로 달성된다. 일부 측면에서, 세척 단계는 제조업체의 지침에 따라 접선 유동 여과(tangential flow filtration, TFF)에 의해 달성된다. 일부 구현예에서, 세포는 세척 후 다양한 생체 적합성 완충제, 예를 들어 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ 이 없는 PBS에 재현탁된다. 특정 구현예에서, 혈액 세포 샘플의 성분이 제거되고 이 세포는 배양 배지에서 직접 재현탁된다.
- [0334] 일부 구현예에서, 본 방법은 밀도 기반 세포 분리 방법, 예컨대 적혈구를 용해시켜 말초 혈액으로부터 백혈구의 준비 및 Percoll 또는 Ficoll 구배를 통한 원심분리를 포함한다.
- [0335] 일부 구현예에서, 단리 방법은 표면 표지자, 예를 들어, 표면 단백질, 세포내 표지자 또는 핵산과 같은 하나 이상의 특정 분자의 세포에서의 발현 또는 존재에 기초한 상이한 세포 유형의 분리를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 표지자에 기초한 분리를 위한 임의의 알려진 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 분리는 친화도- 또는 면역 친화도-기반 분리이다. 예를 들어, 일부 측면에서 단리에는 하나 이상의 표지자, 통상적으로 세포 표면 표지자의 세포 발현 또는 발현 수준에 기초하여, 예를 들어 상기 표지자에 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 파트너와의 인큐베이션 후 일반적으로 세척 단계 및 항체 또는 결합 파트너와 결합하지 않은 세포로부터 항체 또는 결합 파트너와 결합한 세포의 분리에 의한 세포 및 세포 집단의 분리가 포함된다.
- [0336] 상기 분리 단계는 시약에 결합된 세포가 추가 사용을 위해 유지되는 양성 선택 및/또는 항체 또는 결합 파트너에 결합하지 않은 세포가 유지되는 음성 선택에 기초할 수 있다. 일부 예에서, 두 분획 모두 추가 사용을 위해 유지된다. 일부 측면에서, 음성 선택은 이중 집단에서 세포 유형을 특이적으로 식별하는 항체가 이용 가능하지 않은 경우에 특히 유용할 수 있어서, 분리는 원하는 집단 이외의 세포에 의해 발현된 표지자에 기초하여 가장 잘 수행된다.
- [0337] 분리는 특정 표지자를 발현하는 특정 세포 집단 또는 세포의 100% 농축 또는 제거로 귀결될 필요는 없다. 예를 들어, 표지자를 발현하는 것과 같은 특정 유형의 세포에 대한 양성 선택 또는 농축은 상기 세포의 수 또는 백분율을 증가시키는 것을 지칭하나, 상기 표지자를 발현하지 않는 세포의 완전한 부재로 귀결될 필요는 없다. 마찬가지로, 표지자를 발현하는 것과 같은 특정 유형의 세포의 음성 선택, 제거 또는 고갈은 상기 세포의 수 또는 백분율을 감소시키는 것을 지칭하나, 상기 모든 세포의 완전한 제거로 귀결될 필요는 없다.
- [0338] 일부 예에서, 다수 라운드의 분리 단계가 수행되고, 여기서 한 단계에서 양성 또는 음성 선택된 분획은 후속 양성 또는 음성 선택과 같은 또 다른 분리 단계를 거친다. 일부 예에서, 단일 분리 단계는 예컨대 각각 음성 선택을 위해 표적화된 표지자에 대해 특이적인 다수의 항체 또는 결합 파트너와 세포를 인큐베이션함으로써 다수의 표지자를 발현하는 세포를 동시에 고갈시킬 수 있다. 마찬가지로, 다양한 세포 유형에서 발현되는 복수의 항체 또는 결합 파트너와 세포를 인큐베이션함으로써 다수의 세포 유형이 동시에 양성 선택될 수 있다.
- [0339] 예를 들어, 일부 측면에서, 예컨대 하나 이상의 표면 표지자를 높은 수준으로 발현하거나 양성인 세포와 같은 T 세포, 예를 들어 $\text{CD}28^+$, $\text{CD}62\text{L}^+$, $\text{CCR}7^+$, $\text{CD}27^+$, $\text{CD}127^+$, $\text{CD}4^+$, $\text{CD}8^+$, $\text{CD}45\text{RA}^+$ 및/또는 $\text{CD}45\text{RO}^+$ T 세포의 특정 하위 집단은 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 단리된다.
- [0340] 예를 들어, $\text{CD}3^+$, $\text{CD}28^+$ T 세포는 항- $\text{CD}3$ /항- $\text{CD}28$ 접합 자성 비드(예를 들어, DYNABEADS® M-450 $\text{CD}3/\text{CD}28$ T Cell Expander)를 사용하여 양성 선택될 수 있다.
- [0341] 일부 구현예에서, 단리는 양성 선택에 의한 특정 세포 집단에 대한 농축 또는 음성 선택에 의한 특정 세포 집단의 고갈에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 양성 또는 음성 선택은 각각 양성 또는 음성 선택된 세포 상에서 발현(표지자⁺)되거나 상대적으로 보다 높은 수준으로 발현(표지자^{high})된 하나 이상의 표면 표지자에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 다른 결합제와 세포를 인큐베이션함으로써 달성된다.
- [0342] 일부 구현예에서, T 세포는 B 세포, 단핵구 또는 다른 백혈구, 예컨대 $\text{CD}14$ 와 같은 비-T 세포 상에서 발현되는 표지자의 음성 선택에 의해 PBMC 샘플로부터 분리된다. 일부 측면에서, $\text{CD}4^+$ 또는 $\text{CD}8^+$ 선택 단계는 $\text{CD}4^+$ 헬퍼

및 CD8⁺ 세포독성 T 세포를 분리하는 데 사용된다. 상기 CD4⁺ 및 CD8⁺ 집단은, 하나 이상의 나이브(naive), 기억 및/또는 효과기(effector) T 세포 하위 집단 상에서 발현되거나 상대적으로 보다 높은 정도로 발현되는 표지자에 대한 양성 또는 음성 선택에 의해 하위 집단으로 추가 분류될 수 있다.

[0343] 일부 구현예에서, CD8⁺ 세포는 예컨대 각각의 하위 집단과 관련된 표면 항원에 기초한 양성 또는 음성 선택에 의해 나이브, 중심 기억, 효과기 기억 및/또는 중심 기억 줄기세포에 대해 추가로 농축되거나 고갈된다. 일부 구현예에서, 중심 기억 T(T_{CM}) 세포의 농축은 효능을 증가시키기 위해, 예컨대 투여 후의 장기간 생존, 증폭 및/또는 생착을 향상하기 위해 수행되며, 이는 일부 측면에서 상기 하위 집단에서 특히 견고하다. 문헌[Terakura 등 (2012) *Blood*, 1:72-82; Wang 등 (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701]을 참조한다. 일부 구현예에서, T_{CM}-농축 CD8⁺ T 세포 및 CD4⁺ T 세포의 조합은 효능을 더욱 향상시킨다.

[0344] 일부 구현예에서, 기억 T 세포는 CD8⁺ 말초 혈액 림프구의 CD62L⁺ 및 CD62L⁻ 서브세트 모두에 존재한다. PBMC는 예컨대 항-CD8 및 항-CD62L 항체를 사용하여 CD62L⁻CD8⁺ 및/또는 CD62L⁺CD8⁺ 분획에 대해 농축되거나 고갈될 수 있다.

[0345] 일부 구현예에서, 중심 기억 T(T_{CM}) 세포의 농축은 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 및/또는 CD127의 양성 또는 고도의 표면 발현에 기초하고; 일부 측면에서, 이는 CD45RA 및/또는 그랜자임 B를 발현하거나 고도로 발현하는 세포에 대한 음성 선택에 기초한다. 일부 측면에서, T_{CM} 세포에 대해 농축된 CD8⁺ 집단의 단리는 CD4, CD14, CD45RA를 발현하는 세포의 고갈 및 CD62L을 발현하는 세포에 대한 양성 선택 또는 농축에 의해 수행된다. 일 측면에서, 중심 기억 T(T_{CM}) 세포에 대한 농축은 CD4 발현에 기초하여 선택된 세포의 음성 분획부터 시작하여 수행되며, 이는 CD14 및 CD45RA의 발현에 기초한 음성 선택, 및 CD62L에 기초한 양성 선택을 거친다. 상기 선택은 일부 측면에서 동시에 수행되고 다른 측면에서 순차적으로 어떠한 순서로든 수행된다. 일부 측면에서, CD8⁺ 세포 집단 또는 하위 집단을 제조하는 데 사용된 동일한 CD4 발현 기반 선택 단계가 CD4⁺ 세포 집단 또는 하위 집단을 생성하는 데 또한 사용되어, CD4 기반 분리로부터 양성 및 음성 분획 모두가 유지되고, 선택적으로 하나 이상의 추가적인 양성 또는 음성 선택 단계 후에 본 방법의 후속 단계에서 사용된다.

[0346] 구체적인 예에서, PBMC 샘플 또는 다른 백혈구 샘플은, 음성 및 양성 분획 모두가 유지되는 CD4⁺ 세포의 선택을 거친다. 이어서 음성 분획은 CD14 및 CD45RA 또는 CD19의 발현에 기초한 음성 선택 및 CD62L 또는 CCR7과 같은 중심 기억 T 세포의 표지자 특성에 기초한 양성 선택을 거치고, 양성 및 음성 선택은 어느 순서로든 수행된다.

[0347] CD4⁺ T 헬퍼 세포는 세포 표면 항원을 갖는 세포 집단을 식별하여 나이브, 중심 기억 및 효과기 세포(effector cell)로 분류된다. CD4⁺ 림프구는 표준 방법으로 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 나이브 CD4⁺ T 림프구는 CD45RO⁻, CD45RA⁺, CD62L⁺, CD4⁺ T 세포이다. 일부 구현예에서, 중심 기억 CD4⁺ 세포는 CD62L⁺ 및 CD45RO⁻이다. 일부 구현예에서, 효과기 CD4⁺ 세포는 CD62L⁻ 및 CD45RO⁻이다.

[0348] 일 예에서, 음성 선택에 의해 CD4⁺ 세포를 농축하기 위해, 단클론 항체 콕테일은 통상적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 결합 파트너는 양성 및/또는 음성 선택을 위한 세포의 분리가 가능하도록 자성 비드 또는 상자성 비드와 같은 고체 지지체 또는 매트릭스에 결합된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 세포 및 세포 집단은 면역자성(또는 자성친화도) 분리 기법을 사용하여 분리되거나 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).

[0349] 일부 측면에서, 분리될 세포 샘플 또는 세포 조성물은 작고, 자화 가능한 또는 자성 반응성 물질, 예컨대 자성 반응성 입자 또는 마이크로입자, 예컨대 상자성 비드(예를 들어, Dynalbeads 또는 MACS 비드)와 함께 인큐베이션된다. 자성 반응성 물질(예를 들어, 입자)은 일반적으로 분리하기를 원하는, 예를 들어 음성 또는 양성 선택하기를 원하는 세포, 세포들 또는 세포 집단에 존재하는 분자(예를 들어, 표면 표지자)에 특이적으로 결합하는 결합 파트너(예를 들어, 항체)에 직접 또는 간접적으로 부착된다.

- [0350] 일부 구현예에서, 자성 입자 또는 비드는 항체 또는 다른 결합 파트너와 같은 특이적인 결합 멤버에 결합되는 자성 반응성 물질을 포함한다. 자성 분리 방법에 사용되는 널리 알려진 많은 자성 반응 물질이 있다. 적합한 자성 입자에는 본 명세서에 참조로 통합된 문헌[Molday, 미국 특허 번호 4,452,773 및 유럽 특허 명세서 EP 452342 B]에 기술된 것이 포함된다. 콜로이드 크기의 입자, 예컨대 문헌[Owen 미국 특허 번호 4,795,698 및 Liberti 등, 미국 특허 번호 5,200,084]에 기술된 것이 다른 예이다.
- [0351] 인큐베이션은 일반적으로 항체 또는 결합 파트너 또는 분자, 예컨대 자성 입자 또는 비드에 부착된 상기 항체 또는 결합 파트너에 특이적으로 결합하는 2차 항체 또는 다른 시약이 샘플 내의 세포 상에 존재하는 경우 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 조건하에서 수행된다.
- [0352] 일부 측면에서, 샘플은 자기장에 배치되고, 자성 반응성 또는 자화 가능 입자가 부착된 세포는 자석에 끌려당겨지고 표지되지 않은 세포로부터 분리될 것이다. 양성 선택의 경우, 자석에 끌려당겨진 세포가 유지되고; 음성 선택의 경우, 끌려당겨지지 않은 세포(비표지 세포)가 유지된다. 일부 측면에서, 양성 및 음성 선택의 조합이 동일한 선택 단계 동안 수행되며, 상기 양성 및 음성 분획은 유지되고 추가적으로 가공되거나 추가적인 분리 단계를 거친다.
- [0353] 특정 구현예에서, 자성 반응성 입자는 1차 항체 또는 다른 결합 파트너, 2차 항체, 렉틴, 효소 또는 스트렙타비딘으로 코팅된다. 특정 구현예에서, 자성 입자는 하나 이상의 표지자에 특이적인 1차 항체의 코팅을 통해 세포에 부착된다. 특정 구현예에서, 비드보다는 세포가 1차 항체 또는 결합 파트너로 표지되고, 이어서 세포 유형 특이적 2차 항체- 또는 다른 결합 파트너(예를 들어, 스트렙타비딘)-코팅된 자성 입자가 첨가된다. 특정 구현예에서, 스트렙타비딘 코팅된 자성 입자는 비오틴닐화 1차 또는 2차 항체와 함께 사용된다.
- [0354] 일부 구현예에서, 자성 반응성 입자는 후속적으로 인큐베이션, 배양 및/또는 조작될 세포에 부착되어 남아있고; 일부 측면에서, 상기 입자는 환자에게 투여하기 위한 세포에 부착되어 남아있다. 일부 구현예에서, 자화 가능 또는 자성 반응성 입자는 세포로부터 제거된다. 세포에서 자화 가능 입자를 제거하는 방법은 알려져 있고, 예를 들어 경쟁 비-표지 항체, 및 절단 가능한 링커에 접합된 자화 가능 입자 또는 항체 등의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 자화 가능 입자는 생분해성이다.
- [0355] 일부 구현예에서, 친화도 기반 선택은 자성 활성화 세포 분류(magnetic-activated cell sorting, MACS)(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)를 통한 것이다. 자성 활성화 세포 분류(MACS) 시스템은 자화된 입자가 부착되어 있는 세포를 고순도로 선택할 수 있다. 특정 구현예에서, MACS는 외부 자기장을 가한 후에 비 표적 종 및 표적 종(species)이 순차적으로 용리되는 방식으로 작동한다. 즉, 자화된 입자에 부착된 세포는 제자리에 유지되는 반면 부착되지 않은 종은 용리된다. 이어서, 이 제1 용리 단계가 완료된 후, 자기장에 포획되어 용리가 방지된 종들은 용리 및 회수될 수 있는 상당한 방식으로 해제된다. 특정 구현예에서, 비 표적 세포는 표지되고 이중 세포 집단으로부터 고갈된다.
- [0356] 특정 구현예에서, 단리 또는 분리는 본 방법의 단리, 세포 준비, 분리, 가공, 인큐베이션, 배양 및/또는 제형화 단계 중 하나 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 상기 단계 각각을 수행하는 데 사용된다. 일 예에서, 시스템은 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 W02009/072003, 또는 US 20110003380 A1]에 기술된 바와 같은 시스템이다.
- [0357] 일부 구현예에서, 시스템 또는 장치는 통합 또는 독립 언어 시스템 및/또는 자동화되거나 프로그램 가능한 방식으로 단리, 가공, 조작 및 제형화 단계 중 하나 이상, 예를 들어 모두를 수행한다. 일부 측면에서, 시스템 또는 장치는 사용자가 가공, 단리, 조작 및 제형화 단계의 결과를 프로그램, 제어, 평가하고/거나 가공, 단리, 조작 및 제형화 단계의 다양한 측면을 조정할 수 있게 하는, 상기 시스템 또는 장치와 통신하는 컴퓨터 및/또는 컴퓨터 프로그램을 포함한다.
- [0358] 일부 측면에서, 분리 및/또는 다른 단계는 예를 들어 폐쇄 및 멸균 시스템에서 임상 규모 수준으로 세포의 자동 분리를 위해 CliniMACS 시스템(Miltenyi Biotec)을 사용하여 수행된다. 구성 요소에는 통합 마이크로 컴퓨터, 자성 분리 유닛, 연동 펌프 및 다양한 핀치 밸브가 포함될 수 있다. 일부 측면에서, 통합 컴퓨터는 기기의 모든 구성 요소를 제어하고 시스템에 표준화된 순서로 반복된 절차를 수행하도록 지시한다. 일부 측면에서, 자성 분리 유닛은 이동 가능한 영구 자석 및 선택 컬럼을 위한 홀더를 포함한다. 연동 펌프는 튜빙 세트 전체의 유량을 제어하고, 핀치 밸브와 함께 시스템을 통한 완충체의 흐름 제어와 세포의 지속적인 현탁을 보장한다.
- [0359] 일부 측면에서, CliniMACS 시스템은 멸균, 비발열성 용액에 담겨 공급되는 항체 결합 자화 가능 입자를 사용한

다. 일부 구현예에서, 자성 입자로 세포를 표지한 후 세포를 세척하여 과량의 입자를 제거한다. 이어서, 세포 준비 백을 튜빙 세트에 연결하고, 이를 차례로 완충제를 함유한 백 및 세포 채집 백에 연결한다. 튜빙 세트는 전치 컬럼 및 분리 컬럼을 포함한 사전 조립된 멸균 배관으로 구성되며 일회용이다. 분리 프로그램이 시작된 후, 시스템은 세포 샘플을 분리 컬럼에 자동으로 적용한다. 표지된 세포는 컬럼 내에 유지되는 반면, 표지되지 않은 세포는 일련의 세척 단계에 의해 제거된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 표지되지 않고 컬럼에 유지되지 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 표지되고 컬럼에 유지된다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 자기장을 제거한 후 컬럼으로부터 용리되고, 세포 채집 백 내에 채집된다.

[0360] 특정 구현예에서, 분리 및/또는 다른 단계는 CliniMACS Prodigy 시스템(Miltenyi Biotec)을 사용하여 수행된다. 일부 측면에서, CliniMACS Prodigy 시스템에는 원심분리에 의한 세포의 자동 세척 및 분획화가 가능한 세포 가공 유닛이 구비되어 있다. CliniMACS Prodigy 시스템에는 공급원 세포 생성물의 거시적인 층을 식별하여 최적의 세포 분획화 중점을 결정하는 내장 카메라 및 이미지 인식 소프트웨어도 포함될 수 있다. 예를 들어, 말초 혈액은 적혈구, 백혈구 및 혈장 층으로 자동 분리된다. CliniMACS Prodigy 시스템에는 또한 예를 들어, 세포 분화 및 증폭, 항원 로딩 및 장기 세포 배양과 같은 세포 배양 프로토콜을 달성하는 통합 세포 배양 챔버가 포함될 수 있다. 입력 포트는 배지의 멸균 제거 및 보충을 가능하게 할 수 있고 통합 현미경을 사용하여 세포를 모니터링할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Klebanoff 등 (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura 등 (2012) *Blood*.1:72-82, and Wang 등 (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701]을 참조한다.

[0361] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 세포 집단은 유세포 분석을 통해 채집 및 농축(또는 고갈)되고, 여기서 다수의 세포 표면 표지자에 대해 염색된 세포는 유체 스트림으로 운반된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 세포 집단은 제조 규모(형광 활성화 세포 분류, FACS) 분류를 통해 채집 및 농축(또는 고갈)된다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 세포 집단은 FACS 기반 검출 시스템과 조합된 미세전자기계 시스템(microelectromechanical system, MEMS) 칩을 사용하여 채집 및 농축(또는 고갈)된다(예를 들어, 문헌[국제 출원 WO 2010/033140, Cho 등 (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; 및 Godin 등 (2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376] 참조). 두 경우 모두에서, 세포는 다수의 표지자로 표지될 수 있으며, 이는 고순도로 명확한 T 세포 서브세트의 단리를 가능하게 한다.

[0362] 일부 구현예에서, 항체 또는 결합 파트너는 하나 이상의 검출 가능한 표지자로 표지되어, 양성 및/또는 음성 선택을 위한 분리를 용이하게 한다. 예를 들어, 분리는 형광 표지 항체에 대한 결합에 기초할 수 있다. 일부 예에서, 하나 이상의 세포 표면 표지자에 특이적인 항체 또는 다른 결합 파트너의 결합에 기초한 세포의 분리는 예를 들어 유세포 분석 검출 시스템과 조합하여 예컨대 제조 규모(FACS) 및/또는 미세전자기계 시스템(MEMS) 칩을 포함하는 형광 활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting, FACS)에 의해 유체 스트림에서 수행된다. 상기 방법은 다수의 표지자에 기초하여 양성 및 음성 선택을 동시에 가능하게 한다.

[0363] 일부 구현예에서, 준비 방법은 단리, 인큐베이션 및/또는 조작 전이든 후이든 세포를 동결하는 단계, 예를 들어, 냉동 보존하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 동결 및 후속 해동 단계는 세포 집단에서 과립구 및 어느 정도 단핵구를 제거한다. 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어, 혈장 및 혈소판을 제거하기 위한 세척 단계 이후에 동결 용액에서 현탁된다. 일부 측면에서, 알려진 임의의 다양한 동결 용액 및 매개변수가 사용될 수 있다. 일 예는 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민(HSA)을 함유하는 PBS, 또는 다른 적합한 세포 동결 배지를 사용하는 것을 포함한다. 이어서, 상기를 DMSO 및 HSA의 최종 농도가 각각 10% 및 4%가 되도록 배지와 1:1로 희석시킨다. 이어서 세포를 일반적으로 분당 1°C의 속도로 -80°C까지 동결시키고 액체 질소 저장 탱크에 기체상(vapor phase)으로 저장한다.

[0364] 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작 전에 또는 그와 연계하여 인큐베이션 및/또는 배양된다. 인큐베이션 단계는 배양(culture), 육성(cultivation), 자극(stimulation), 활성화(activation) 및/또는 번식(propagation)을 포함할 수 있다. 인큐베이션 및/또는 조작은 배양 용기, 예컨대 유닛, 챔버, 웰(well), 컬럼, 튜브, 튜빙 세트, 맬브, 바이알(vial), 배양 접시, 백(bag) 또는 배양 또는 세포 육성을 위한 다른 용기에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물 또는 세포는 자극 조건 또는 자극제의 존재 하에 인큐베이션된다. 상기 조건은 집단에서 세포의 증식, 증폭, 활성화 및/또는 생존을 유도하고, 항원 노출을 모방하고, 및/또는 재조합 항원 수용체의 도입과 같은 유전자 조작을 위해 세포를 프라이밍하도록 설계된 것을 포함한다.

[0365] 상기 조건은 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 제제(agents), 예를 들어 영양소, 아미노산, 항생제, 이온 및/또는 자극 인자, 예컨대 사이토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 용해성 수용체 및 세포를 활성화시키기 위해 설계된 임의의 기타 제제 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

- [0366] 일부 구현예에서, 자극 조건 또는 제제는 TCR 복합체의 세포내 신호전달 도메인을 활성화 또는 자극할 수 있는 하나 이상의 제제(예를 들어, 리간드)를 포함한다. 일부 측면에서, 상기 제제는 T 세포에서 TCR/CD3 세포내 신호전달 계단식 다단계 반응을 작동시키거나 개시한다. 상기 제제는 항체, 예컨대 TCR에 특이적인 것, 예를 들어 항-CD3을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 자극 조건은 공자극 수용체, 예를 들어 항-CD28을 자극할 수 있는 하나 이상의 제제(예를 들어, 리간드)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제제 및/또는 리간드는 비드와 같은 고체 지지체 및/또는 하나 이상의 사이토카인에 결합될 수 있다. 선택적으로, 증폭 방법은 (예를 들어, 적어도 약 0.5ng/mL 이상의 농도로) 배양 배지에 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체를 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 자극제는 IL-2, IL-15 및/또는 IL-7을 포함한다. 일부 측면에서, IL-2 농도는 적어도 약 10단위/mL이다.
- [0367] 일부 측면에서, 인큐베이션은 예컨대 문헌[미국 특허 번호 6,040,177 Riddell 등, Klebanoff 등(2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura 등 (2012) *Blood*.1:72-82, 및/또는 Wang 등 (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701]에 기술된 기술에 따라 수행된다.
- [0368] 일부 구현예에서, T 세포는 배양-개시 조성물 배양보조 세포, 예컨대 비분할 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에 첨가하고(예를 들어, 생성된 세포의 집단은 증폭될 초기 집단 중 각각의 T 림프구에 대해 적어도 약 5, 10, 20 또는 40 이상의 PBMC 배양보조 세포를 함유하도록); 상기 배양물을 (예를 들어, T 세포 수를 증폭시키기에 충분한 시간 동안) 인큐베이션하여, 증폭된다. 일부 측면에서, 비분할 배양보조 세포는 감마-조사된(gamma-irradiated) PBMC 배양보조 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PBMC에 약 3000 내지 3600 라드(rad) 범위의 감마선을 조사하여 세포 분열을 방지한다. 일부 측면에서, 배양보조 세포는 T 세포 집단의 첨가 전에 배양 배지에 첨가된다.
- [0369] 일부 구현예에서, 자극 조건은 인간 T 림프구의 성장에 적합한 온도, 예를 들어, 적어도 약 25℃ 이상, 일반적으로 적어도 약 30℃ 이상 및 일반적으로 (약) 37℃를 포함한다. 선택적으로, 인큐베이션은 배양보조 세포로서 비분할 EBV 형질전환 림프아구 세포(LCL)를 첨가하는 것을 더 포함할 수 있다. LCL은 약 6,000 내지 10,000 라드 범위의 감마선으로 조사될 수 있다. 일부 측면에서, LCL 배양보조 세포는 임의의 적합한 양으로 제공되며, 예컨대 LCL 배양보조 세포 대 초기 T 림프구의 비가 적어도 약 10:1 이상으로 제공된다.
- [0370] 구현예에서, 항원 특이적 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포와 같은 항원 특이적 T 세포는 항원으로 나이트 또는 항원 특이적 T 림프구를 자극하여 획득된다. 예를 들어, 항원 특이적 T 세포주 또는 클론은 감염된 대상체로부터 T 세포를 분리하고 시험관 내에서 상기 세포를 동일한 항원으로 자극함으로써 시토메갈로 바이러스 항원에 대해 생성될 수 있다.
- [0371] **C. 조작된 세포 제조 방법**
- [0372] 구체적인 구현예에서, 조작된 세포는 하나 이상의 투입 조성물로부터 및/또는 단일 생물학적 샘플로부터 농축된 T 세포의 산출 조성물을 생성하는 프로세스에 의해 생산된다. 특정 구현예에서, 산출 조성물은 재조합 수용체, 예를 들어, CAR, 예컨대 항-CD19 CAR을 발현하는 세포를 함유한다. 구체적인 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 요법(예를 들어, 자가 세포 요법)으로서 대상체에 투여하기에 적합하다. 일부 구현예에서, 산출 조성물은 농축된 CD3+ T 세포, 또는 농축된 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 조성물이다. T 세포는 핵산이 세포의 게놈 내로 통합되는 조건 하에서 CAR(예를 들어, 항-CD19 CAR)을 암호화하는 핵산의 세포 내 도입을 수반하는 방법에 의해 조작된다. 일부 구현예에서, 조작 방법은 렌티바이러스 벡터 등의 바이러스 벡터를 이용한 형질도입을 포함한다. 구체적인 구현예에서, T 세포는 세포를 올리고머성 시약(예를 들어, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)과 접촉시킴으로써 활성화 또는 자극된다. 일부 구현예에서, 세포는 96시간 이하 내에 완료되는 올리고머성 시약(예를 들어, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)으로 세포를 자극하는 공정에 의해 조작된다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 상기 공정 동안 세포의 수를 증폭 또는 증가시키는 단계를 포함하지 않는다. 예시적인 제조 방법 및 그러한 방법에 의해 생산된 조작된 세포는 문헌[PCT/US2019/046062]에 개시되며, 이는 그 전체가 참조로 포함된다.
- [0373] 구체적인 구현예에서, 제공된 방법은 산출 세포 및/또는 조작된 T 세포의 산출 집단을 생성 또는 생산하기 위한 전체 공정, 예컨대 투입 집단 유래 세포를 자극하는 단계; 자극된 세포를 이종 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 CAR 등의 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 발현 또는 함유하도록 조작, 형질전환, 형질도입, 또는 형질주입하는 단계; 세포를 인큐베이션하고, 세포로부터 자극 시약을 제거 또는 분리하고, 세포를 수확 및 채집하여, 이에 의해 일부 측면에서 조작된 T 세포의 산출 집단을 생성하는

단계 중 일부 또는 전부를 포함하는 공정과 관련하여 사용된다.

- [0374] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 산출 세포 및/또는 조작된 T 세포의 산출 집단을 생성 또는 생산하기 위한 전체 공정, 예컨대 생물학적 샘플을 채집 또는 수득하는 단계; 생물학적 샘플로부터 투입 세포를 분리, 선택, 또는 농축하는 단계; 투입 세포를 동결 및 저장하고 이어서 해동하는 단계; 세포를 자극하는 단계; 자극된 세포를 재조합 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 CAR 등의 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 발현 또는 함유하도록 유전자 조작하는 단계; 산출 조성물 내에 조작된 세포를 제형화하는 단계; 및 제형화된 산출 세포를 세포가 대상체에 주입 및/또는 투여를 위해 방출될 때까지 동결 및 저장하는 단계 중 일부 또는 전부를 포함하는 공정과 관련하여 사용된다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은, 예컨대 세포가 투입 집단과 비교하여 세포의 양, 수준 또는 농도의 적어도 3, 4, 5배 또는 그 이상 배수인 임계 양으로 증폭되는 조건 하에 생물반응기에서 세포를 육성함으로써, 상기 공정 동안 세포의 수를 증폭 또는 증가시키는 단계를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 세포를 유전자 조작하는 단계는 예컨대 바이러스 입자의 존재 하에 세포를 회전 집중한 후 그 세포를 바이러스 입자가 존재하는 정적 조건 하에서 인큐베이션함으로써 바이러스 벡터로 세포를 형질도입하는 단계이거나 이를 포함한다.
- [0375] 특정 구현예에서, 자극의 개시부터 세포를 채집, 수확, 또는 제형화하기까지, 조작된 세포를 생성하는 제공된 공정의 총 기간은 (약) 36시간, 42시간, 48시간, 54시간, 60시간, 72시간, 84시간, 96시간, 108시간, 또는 120시간이거나 그 미만이다. 특정 구현예에서, 자극의 개시부터 세포를 채집, 수확, 또는 제형화하기까지, 조작된 세포를 생성하는 제공된 공정의 총 기간은 (약) 1.5일, 2일, 3일, 4일, 또는 5일이거나 그 미만이다. 일부 구현예에서, 자극의 개시부터 세포를 채집, 수확, 또는 제형화하기까지, 조작된 세포를 생성하는 제공된 공정의 총 기간은 (약) 36시간 내지 120시간, 48시간 내지 96시간, 또는 48시간 내지 72시간(수치 포함), 또는 (약) 1.5일 내지 5일, 2일 내지 4일, 또는 2일 내지 3일(수치 포함)이다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션의 개시부터 세포를 수확, 채집, 또는 제형화하기까지 측정된 제공된 공정을 완료하기 위한 시간량은 (약) 48시간, 72시간, 또는 96시간이거나 그 미만이거나 또는 (약) 2일, 3일, 또는 4일이거나 그 미만이다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션의 개시부터 세포를 수확, 채집, 또는 제형화하기까지 측정된 제공된 공정을 완료하기 위한 시간량은 48시간 ± 6시간, 72시간 ± 6시간, 또는 96시간 ± 6시간이다.
- [0376] 일부 구현예에서, 예를 들어 섹션 II-C-5에 개시된, 인큐베이션은 자극의 개시 이후 (약) 24시간 내지 120시간, 36시간 내지 108시간, 48시간 내지 96시간 또는 48시간 내지 72시간(수치 포함)에 완료된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시로부터 (약) 120시간, 108시간, 96시간, 72시간, 48시간, 또는 36시간에 또는 그 이내에 완료된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 24시간 ± 6시간, 48시간 ± 6시간 또는 72시간 ± 6시간 후에 완료된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시 이후 (약) 1일 내지 5일, 1.5일 내지 4.5일, 2일 내지 4일, 또는 2일 내지 3일(수치 포함)에 완료된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시로부터 (약) 5일, 4일, 3일, 2일, 또는 1.5일에 또는 그 이내에 완료된다.
- [0377] 일부 구현예에서, 전체 공정은 농축된 T 세포, 예를 들어 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 단일 집단으로 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 공정은 농축된 T 세포의 단일 산출 집단을 생성 또는 생산하는 공정 전에 및/또는 도중에 조합된 농축된 T 세포(예를 들어, CD4 및 CD8 세포)의 둘 이상의 투입 집단으로 수행된다. 일부 구현예에서, 농축된 T 세포는 조작된 T 세포, 예를 들어, 재조합 수용체를 발현하도록 형질도입된 T 세포이거나 이를 포함한다.
- [0378] 일부 구현예에서, 산출 집단, 예를 들어, 조작된 T 세포의 집단이 (i) (약) 18 내지 30시간(수치 포함) 동안 자극 조건에서 T 세포의 또는 이를 함유하는 투입 집단을 인큐베이션하는 단계, (ii) 재조합 수용체를 암호화하는 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 조작된 집단의 T 세포 내로 도입하는 단계, (iii) 그 세포를 인큐베이션하는 단계, 및 이어서 (iv) 인큐베이션된 세포를 채집 또는 수확하는 단계에 의해 생성된다.
- [0379] 일부 구현예에서, 상기 세포는 자극 조건 하에 인큐베이션이 개시된 후 36 내지 108시간 또는 1.5일 내지 4.5일 내에 채집 또는 수확된다. 구체적인 구현예에서, 상기 세포는 형질전환된(예를 들어, 유전자 조작된, 형질도입된, 또는 형질주입된) T 세포가 24 내지 48시간 또는 1 내지 2일의 기간 내에 20% 넘게 증가 또는 감소하지 않는 게놈 당 안정된 통합된 벡터 카피수(iVCN)를 달성한 후 48시간 또는 2일 내에 채집 또는 수확된다. 일부 구현예에서, 통합은 세포 집단의 측정된 iVCN이 집단 내 측정된 총 벡터 카피수(VCN)의 (약) 20%, 15%, 10%, 또는 5% 이내일 때 안정된 것으로 간주된다. 구체적인 구현예들은 안정된 통합을 달성하기 위해, 세포는 바이러스 벡터가 세포에 접촉 또는 도입된 후, (약) 또는 적어도 48시간, 60시간, 72시간, 또는 1일, 2일, 또는 3일 동안 인큐베이션되어야 함을 고려한다. 일부 구현예에서, 안정된 통합은 (약) 72시간 이내의 인큐베이션에서 이루어

진다. 일부 구현예에서, 세포는 형질전환된 T 세포의 총 수가 투입 집단의 세포의 총 수이거나 그 미만인 시점에 채집 또는 수확된다. 다양한 구현예에서, 세포는 투입 집단의 세포가 3회, 2회 또는 1회 넘게 배가되기 전 시점에 채집 또는 수확된다. VCN 및 iVCN 분석법을 위한 예시적인 방법 및 조성물은 문헌[PCT/US2019/046048]에 개시되며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0380] 특정 구현예에서, 산출 집단, 예를 들어, 조작된 T 세포의 집단이, (i) T 세포를 포함하는 투입 집단을 자극 시약, 예를 들어 본원에 예컨대 섹션 II-C-2에 기술된 자극 시약의 존재 하에, 18 내지 30시간(수치 포함) 동안 자극 조건에서 인큐베이션하는 단계; (ii) 예컨대 바이러스 벡터의 존재 하에 자극된 T 세포를 회전 집중함으로써, 제조합 수용체를 암호화하는 바이러스 벡터로, 자극된 T 세포를 형질도입하는 단계; (iii) 형질도입된 T 세포를 정적 조건에서 18시간 내지 96시간(수치 포함) 동안 인큐베이션하는 단계; 및 (iv) 형질전환된 집단의 T 세포를 자극 조건에서 인큐베이션이 개시된 후 (약) 36 내지 108시간 내에 수확하는 단계에 의해 생성된다.

[0381] 일부 구현예에서, 제공된 방법과 연관된 공정을 대체 공정과 비교한다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 본원의 제공된 방법을 세포를 증폭하는 단계를 포함하는 대체 공정과 비교한다. 구체적인 구현예에서, 대체 공정은 제공된 방법과 연관된 공정과 하나 이상의 구체적인 측면에서 다를 수 있지만, 그 외에 비슷한 또는 동일한 특징, 측면, 단계, 병기, 시약, 및/또는 조건을 포함한다. 일부 구현예에서, 대체 공정은 제공된 방법과 연관된 공정과 유사한데, 예를 들어, 증폭을 결여하거나 포함하지 않지만, 상이한 시약 및/또는 배지 유형; 인큐베이션, 형질도입, 형질주입, 및/또는 조작된 세포의 인큐베이션 동안 혈청의 존재; 투입 집단의 상이한 세포 구성, 예를 들어 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비; 상이한 자극 조건 및/또는 상이한 자극 시약; 상이한 자극 시약 대 세포의 비; 상이한 벡터 및/또는 형질도입 방법; 세포를 인큐베이션, 형질도입, 및/또는 형질주입하는 상이한 시기 또는 순서; 인큐베이션 또는 형질도입 동안 존재하는 하나 이상의 제조합 사이토카인의 부재 또는 차이(예를 들어, 상이한 사이토카인 또는 상이한 농도), 또는 세포를 수확 또는 채집하기 위한 상이한 시기; 중 하나 이상을 포함하나 이에 한정되지 않는 방식으로 상이하다.

[0382] 일부 구현예에서, 생물학적 샘플 유래 투입 세포(예를 들어, CD4+ 또는 CD8+ T 세포)의 단리, 농축, 및/또는 선택부터 산출 세포가 채집, 제형화, 및/또는 동결 보호되는 시점까지 측정했을 때, 제공된 공정을 완료하는 데 필요한 기간 또는 시간량은 (약) 48시간, 72시간, 96시간, 120시간, 2일, 3일, 4일, 5일, 7일, 또는 10일이거나 그 미만이다. 일부 구현예에서, 단리된, 선택된, 또는 농축된 세포는 자극 전에 동결 보호되지 않으며, 투입 세포의 단리, 농축, 및/또는 선택으로부터 산출 세포가 채집, 제형화, 및/또는 동결 보호되는 시점까지 측정했을 때, 제공된 공정을 완료하는 데 필요한 기간 또는 시간량은 (약) 48시간, 72시간, 96시간, 또는 120시간, 또는 2일, 3일, 4일, 또는 5일이거나 그 미만이다.

[0383] 특정 구현예에서, 제공된 공정들이 생물학적 샘플로부터 단리, 농축 또는 선택된 세포, 예를 들어 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 집단에 대해 수행된다. 일부 측면에서, 제공된 방법은 다른 방법 또는 공정과 비교하여 생물학적 샘플이 대상체로부터 채집되는 때로부터 단축된 시간량 내에 조작된 T 세포의 조성물을 생산하거나 생성할 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 생물학적 샘플, 또는 농축, 단리, 또는 선택된 세포가 자극 또는 형질도입 단계 전에 냉동 보존 및 저장되는 모든 시간을 포함하여, 생물학적 샘플이 대상체로부터 채집되고 조작된 T 세포가 채집, 수확, 또는 제형화될 때까지(예를 들어, 냉동 보존 또는 투여를 위해) (약) 10일, 9일, 8일, 7일, 6일, 5일, 4일, 3일, 또는 2일 내에 또는 (약) 120시간, 96시간, 72시간, 또는 48시간 내에, 조작된 T 세포를 생산 또는 생성할 수 있다. 구체적인 구현예에서, 제공된 방법은 생물학적 샘플, 또는 농축, 단리, 또는 선택된 세포가 자극 또는 형질도입 단계 전에 냉동 보존 및 저장되는 모든 시간을 포함하여 생물학적 샘플이 대상체로부터 채집되고 조작된 T 세포가 채집, 수확, 또는 제형화될 때까지 (약) 6일 내지 8일(수치 포함) 내에, 조작된 T 세포를 생산 또는 생성할 수 있다.

[0384] 특정 구현예에서, 제공된 방법은 산출 세포 및/또는 농축된 T 세포의 산출 집단을 생성 또는 생산하는 공정과 관련하여 사용된다. 구체적인 구현예에서, 산출 세포 및/또는 농축된 T 세포의 산출 집단은, 혈액 샘플 또는 백혈구 성분채집술 샘플 등의 생물학적 샘플로부터 채집, 수득, 단리, 선택, 및/또는 농축된; 자극 조건 하에서 인큐베이션된; 제조합 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 CAR과 같은 제조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 발현 또는 함유하도록 조작된(예를 들어, 형질도입된); 임계 세포 양 또는 밀도까지 인큐베이션된; 및/또는 제형화된 세포이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 산출 집단의 세포는, 예를 들어 공정의 하나 이상 단계 도중, 전에, 및/또는 후에, 이전에 동결 보호되고 해동된다. 일부 구현예에서, 산출 집단은 제조합 수용체(예를 들어, CAR)를 발현하는 T 세포(예를 들어, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포)를 함유한다.

[0385] 일부 구현예에서, 산출 집단의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도

60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는 상기 재조합 수용체를 발현한다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 적어도 50%는 상기 재조합 수용체를 발현한다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는 상기 재조합 수용체를 발현한다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 50%는 상기 재조합 수용체를 발현한다. 구체적인 구현예에서, 산출 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99%, 또는 99% 이상은 상기 재조합 수용체를 발현한다. 구체적인 구현예에서, 산출 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 50%는 상기 재조합 수용체를 발현한다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99%, 또는 99% 이상은 상기 재조합 수용체를 발현한다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 50%는 상기 재조합 수용체를 발현한다.

[0386] 구체적인 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 대체 공정, 예를 들어 하나 이상의 세포를 증폭하는 단계를 포함하는 공정에 의해 생산된 산출 세포와 비교하여 재조합 수용체에 의해 결합 및/또는 인식되는 항원을 발현하는 세포(예를 들어, 표적 세포)에 대해 향상된 세포 용해 활성을 가진다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포가 항원을 발현하는 세포(예를 들어, 표적 세포)에 노출되었을 때, 산출 조성물의 세포는 항원을 발현하는 세포의 (약) 또는 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%를 사멸시킨다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 비슷한 또는 동일한 조건 하에 대체 공정에 의해 생산된 산출 세포보다 적어도 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 또는 1배, 2배, 3배, 4배, 또는 5배 더 많은 양의 항원 발현 세포(예를 들어, 표적 세포)를 사멸시킨다.

[0387] 구체적인 구현예에서, 산출 집단의 세포는 대체 공정, 예를 들어, 하나 이상의 세포를 증폭하는 단계를 포함하는 공정에 의해 생산된 산출 세포와 비교하여 생체 내에서 향상된 항-종양 활성을 가진다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포가 대상체, 예를 들어, 종양 또는 암이 있는 대상체에 투여될 때, 산출 집단의 세포는 대상체에서 종양 세포, 예를 들어, 항원을 발현하는 암 또는 종양 세포의 (약) 또는 적어도 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%를 사멸시킨다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 비슷한 또는 동일한 조건 하에 대체 공정에 의해 생산된 산출 세포보다 생체 내에서 적어도 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, 또는 1배, 2배, 3배, 4배, 또는 5배 더 많은 양의 종양 세포를 사멸시킨다.

[0388] 구체적인 구현예에서, 산출 집단의 대부분의 세포는 나이브-유사, 중심 기억, 및/또는 효과기 기억 세포이다. 구체적인 구현예에서, 산출 집단의 대부분의 세포는 나이브-유사 또는 중심 기억 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 집단의 대부분의 세포는 CCR7 또는 CD27 발현의 하나 이상에 대해 양성이다. 특정 구현예에서, 산출 집단의 세포는 대체 공정, 예컨대 증폭을 수반하는 공정으로부터 생성된 산출 집단보다 더 많은 비율의 나이브-유사 또는 중심 기억 세포를 갖는다.

[0389] 특정 구현예에서, 산출 집단의 세포는 탈진된 및/또는 노화된 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 구체적인 구현예에서, 산출 집단의 세포는 탈진된 및/또는 노화된 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 집단의 세포의 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 또는 1% 미만은 탈진 및/또는 노화된다. 특정 구현예에서, 산출 집단의 세포의 25% 미만은 탈진 및/또는 노화된다. 특정 구현예에서, 산출 집단의 세포의 10% 미만은 탈진 및/또는 노화된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 낮은 비율을 갖는다.

[0390] 일부 구현예에서, 산출 집단의 세포는 CD27 및 CCR7 발현, 예를 들어, 표면 발현에 대해 음성인 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 구체적인 구현예에서, 산출 집단의 세포는 CD27- CCR7- 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 집단의 세포의 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 또는 1% 미만은 CD27- CCR7- 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 집단의 세포의 25% 미만은 CD27- CCR7- 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 집단의 세포의 10% 미만은 CD27- CCR7- 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 집단의 세포의 5% 미만은 CD27- CCR7- 세포이다.

[0391] 일부 구현예에서, 산출 집단의 세포는 CD27 및 CCR7 발현, 예를 들어, 표면 발현 중 하나 또는 둘 모두에 대해 양성인 세포를 높은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 집단의 세포는 CD27 및 CCR7 중 하나 또는 둘 모두에 대해 양성인 세포를 높은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 집단의 세포의

적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 이상은 CD27 및 CCR7 중 하나 또는 둘 모두에 대해 양성이다. 다양한 구현예에서, 산출 집단의 CD4+ CAR+ 세포의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 이상은 CD27 및 CCR7 중 하나 또는 둘 모두에 대해 양성이다. 일부 구현예에서, 산출 집단의 CD8+ CAR+ 세포의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 이상은 CD27 및 CCR7 중 하나 또는 둘 모두에 대해 양성이다.

[0392] 특정 구현예에서, 산출 집단의 세포는 CD27 및 CCR7 발현, 예를 들어, 표면 발현에 대해 양성인 세포를 높은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 집단의 세포는 CD27+ CCR7+ 세포를 높은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 집단의 세포의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 이상은 CD27+ CCR7+ 세포이다. 다양한 구현예에서, 산출 집단의 CD4+ CAR+ 세포의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 이상은 CD27+ CCR7+ 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 집단의 CD8+ CAR+ 세포의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 이상은 CD27+ CCR7+ 세포이다.

[0393] 특정 구현예에서, 산출 집단의 세포는 CCR7에 대해 음성 및 CD45RA 발현, 예를 들어, 표면 발현에 대해 양성인 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 집단의 세포는 CCR7-CD45RA+ 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 구체적인 구현예에서, 산출 집단의 세포의 40% 미만, 35% 미만, 30% 미만, 25% 미만, 20% 미만, 15% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 또는 1% 미만은 CCR7-CD45RA+ 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 집단의 세포의 25% 미만은 CCR7-CD45RA+ 세포이다. 구체적인 구현예에서, 산출 집단의 세포의 10% 미만은 CCR7-CD45RA+ 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 집단의 세포의 5% 미만은 CCR7-CD45RA+ 세포이다.

[0394] 구체적인 구현예에서, 세포는 세포 집단의 (약) 또는 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 8회, 10회, 20회, 또는 그 이상의 세포 배가, 예를 들어 인큐베이션 중에 일어나는 배가 전에 수확된다. 특정 구현예에서, 세포는 집단의 임의의 배가, 예를 들어 인큐베이션 동안 일어나는 배가 전에 수확된다. 일부 측면에서, 조작 공정 동안 일어날 수 있는 배가를 줄이는 것은 일부 구현예에서, 나이트-유사인 조작된 T 세포의 부분을 증가시킬 것이다. 일부 구현예에서, 조작 공정 도중 배가를 증가시키는 것은 조작 공정 동안 일어날 수 있는 T 세포 분화를 증가시킨다.

[0395] 일부 측면에서, 조작된 세포 조성물을 생성 또는 생산하는 공정에서, 공정 동안, 예를 들어 인큐베이션 동안 일어나는 증폭 또는 세포 배가를 줄이는 것은 결과로 생성되는 조작된 세포 조성물 중 나이트-유사 T 세포의 양 또는 부분을 증가시킨다. 구체적인 측면에서, 공정 도중 일어나는 증폭 또는 세포 배가를 증가시키는 것은 결과로 생성되는 조작된 세포 조성물 중 분화된 T 세포의 양 또는 부분을 증가시킨다. 일부 측면에서, 결과로 생성되는 조작된 세포 조성물에서 나이트-유사 세포의 부분을 증가시키거나 확대시키는 본원에 제공된 방법과 같은 공정은 조작된 세포 조성물의 효력, 효능, 및 지속성을, 예를 들어 투여 후 생체 내에서, 증가시킬 수 있는 것으로 고려된다.

[0396] 1. 유전자 조작을 위한 세포 및 세포 준비

[0397] 일부 구현예에서, 제공된 방법, 용도, 제조품 또는 조성물과 관련하여 사용되는 T 세포와 같은 세포는 본원에 기술된 재조합 수용체(예를 들어, CAR)를 발현하도록 유전자 조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 세포 요법, 예를 들어, 입양 세포 요법의 맥락에서 사용된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포와 같은 T 세포이다.

[0398] 구체적인 구현예에서, 제공된 방법은 농축된 세포(예를 들어, T 세포)의 하나 이상의 투입 집단을 생성하기 위해 생물학적 샘플에서 세포를 분리, 선택, 및/또는 농축하는 것과 관련하여 사용된다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 특정 질병 또는 병태를 갖거나 세포 요법이 필요하거나 세포 요법이 투여될 대상체 등의 대상체로부터 수득되거나 유래된 것과 같은 생물학적 샘플로부터 세포 또는 이의 집단의 분리를 포함한다. 일부 측면에서, 대상체는 입양 세포 요법(이를 위해 세포가 분리, 가공 및/또는 조작됨)과 같은 특정한 치료적 개입이 필요한 환자인 대상체와 같은 인간이다. 따라서, 일부 구현예에서 세포는 1차 세포, 예를 들어 1차 인간 세포이다. 샘플은 대상체에서 직접 채취한 조직, 체액 및 기타 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플은 생물학적 공급원으로부터 직접 수득된 샘플 또는 가공된 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플에는 혈액, 혈장, 혈청, 뇌척수액, 활액, 소변 및 땀과 같은 체액, 조직 및 기관 샘플(이들로부터 유래된 가공 샘플 포함)이 포함되나, 이에 한정되지 않는다.

- [0399] 일부 측면에서, 샘플은 혈액 또는 혈액 유래 샘플이거나 또는 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 생성물로부터 유래된다. 예시적인 샘플에는 전혈, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 백혈구, 골수, 흉선, 조직 생검, 종양, 백혈병, 림프종, 림프절, 장 관련 림프 조직, 점막 관련 림프 조직, 비장, 기타 림프 조직, 간, 폐, 위, 창자, 결장, 신장, 췌장, 유방, 뼈, 전립선, 자궁경부, 고환, 난소, 편도 또는 기타 기관 및/또는 이들로부터 유래된 세포가 포함된다. 샘플에는 세포 요법, 예를 들어, 입양 세포 요법의 맥락에서 자가 및 동종이계 공급원으로부터 유래된 샘플이 포함된다.
- [0400] 일부 예에서, 대상체의 순환 혈액 유래 세포는 예를 들어 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술에 의해 수득된다. 일부 측면에서, 샘플은 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 유핵 백혈구, 적혈구 및/또는 혈소판을 포함한 림프구를 함유하고, 일부 측면에서 적혈구 및 혈소판 이외의 세포를 함유한다.
- [0401] 일부 구현예에서, 대상체로부터 채집된 혈액 세포는, 예를 들어 혈장 분획을 제거하고 후속 가공 단계를 위한 적절한 완충제 또는 배지에 세포를 배치하기 위해 세척한다. 일부 구현예에서, 세포는 인산염 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS)로 세척된다. 일부 구현예에서, 세척 용액에는 칼슘 및/또는 마그네슘 및/또는 많은 또는 모든 2가 양이온이 결여되어 있다. 일부 측면에서, 세척 단계는 제조업체의 지침에 따라 반자동 “플로우-쓰루(flow-through)” 원심 분리기(예를 들어, Cobe 2991 세포 프로세서, Baxter)로 달성된다. 일부 측면에서, 세척 단계는 제조업체의 지침에 따라 접선 유동 여과(tangential flow filtration, TFF)에 의해 달성된다. 일부 구현예에서, 세포는 세척 후 다양한 생체 적합성 완충제, 예를 들어 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ 이 없는 PBS에 재현탁된다. 특정 구현예에서, 혈액 세포 샘플의 성분이 제거되고 이 세포는 배양 배지에서 직접 재현탁된다.
- [0402] 일부 구현예에서, 세포를 함유한 샘플(예를 들어, 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물)은 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 동안 첨가된, 해파린 같은 하나 이상의 항응고제를 제거하기 위해 세척된다.
- [0403] 일부 구현예에서, 세포를 함유한 샘플(예를 들어, 전혈 샘플, 연막 샘플, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 샘플, 비분획화 T 세포 샘플, 림프구 샘플, 백혈구 샘플, 성분채집술 생성물, 또는 백혈구 성분채집술 생성물)은 냉동 보존 및/또는 동결 보호되고(예를 들어, 동결되고) 이후 세포 집단을 단리, 선택, 활성화, 자극, 조작, 형질도입, 형질주입, 인큐베이션, 배양, 수확, 제형화하고/거나 제형화된 세포 집단을 대상체에 투여하는 임의의 단계들 전에 해동되며 선택적으로 세척된다.
- [0404] 일부 구현예에서, 대상체 유래의 자가 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 함유한 샘플은 제조를 위한 적절한 질을 보장하기에 적합한 방법으로 채집된다. 일 측면에서, PBMC를 함유한 샘플은 분획화 전혈로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 대상체 유래 전혈이 원심력을 사용하고 세포 표현형들 간 밀도 차이를 이용하는 백혈구 성분채집술에 의해 분획화되고, 이때 채집된 세포 조성물에서 자가 단핵 세포(MNC)는 우선적으로 농축되는 반면 적혈구 세포와 같은 다른 표현형들은 감소된다. 일부 구현예에서, 자가 혈장이 MNC 채집 동안 동시에 채집되고, 이는 일부 측면에서 백혈구 성분채집술 생성물의 안정성을 확장할 수 있다. 일 측면에서, 자가 혈장은 백혈구 성분채집술 생성물에 첨가되어 백혈구 성분채집술 생성물 매트릭스의 완충용량을 향상시킨다. 일부 측면에서, 백혈구 성분채집술 생성물을 생성하기 위해 가공되는 전혈의 총 부피는 (약) 2L, 4L, 6L, 8L, 10L, 12L, 14L, 16L, 18L, 또는 20L이거나 전술한 임의의 수치 사이의 임의의 값이다. 일부 구현예에서, 채집된 자가 혈장의 부피는 약 10mL, 50mL, 100mL, 150mL, 200mL, 250mL, 또는 300mL, 또는 그 이상이거나, 전술한 임의의 수치 사이의 부피이다. 일부 구현예에서, 백혈구 성분채집술 생성물은 백혈구 성분채집술 채집 완료 후 약 48시간 이내에 한 절차(예를 들어, 공정 내 냉동 보존을 위한 세척 및 제형화)를 거친다. 일부 구현예에서, 백혈구 성분채집술 생성물은, 예를 들어 백혈구 성분채집술 채집 완료 후 약 2시간, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간 또는 48시간 내에, 하나 이상의 세척 단계를 거친다. 일부 측면에서, 하나 이상의 세척 단계는 백혈구 성분채집술 채집 중의 항응고제, 백혈구 성분채집술 생성물에 축적됐을 수 있는 세포 폐기물, 잔류 혈소판 및/또는 세포 잔해를 제거한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 완충제 교환이 하나 이상의 세척 단계 동안 수행된다.
- [0405] 구체적인 구현예에서, 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 냉동 보존 및/또는 동결 보호되고(예를 들어, 동결되고) 이후 아래에 기술된 바와 같이 세포 선택 또는 단리 단계(예를 들어, T 세포 선택 또는 단리 단계)를 거치기 전에 해동된다. 일부 구현예에서, 냉동 보존 및/또는 동결 보호된 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물이 T 세포 선택 또는 단리 단계를 거친 후에, 후속 단계들, 예컨대 세포 집단을 단리, 선택, 활성화, 자극, 조작, 형질도입, 형질주입, 인큐베이션, 배양, 수확, 제형화하고/거나 제형화된 세포 집단을 대상체에 투여하는 단계들 도중 또는 사이에 추가적인 냉동 보존 및/또는 동결 보호 단계는 수행되지 않는다. 예를 들면, 냉동 보존 및/또는 동결 보호된 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물을 해동하여 선택된 T 세포는 다운스트림 공정, 예컨대 T 세포 활성화/자극 또는 형질도입을 위해 해동 및 선택적으로

세척되기 전에 다시 냉동 보존 및/또는 동결 보호되지 않는다.

[0406] 구체적 구현예에서, 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 냉동 보존 용액 또는 완충액 중 (약) 또는 적어도 5×10^6 개 세포/mL, 10×10^6 개 세포/mL, 20×10^6 개 세포/mL, 30×10^6 개 세포/mL, 40×10^6 개 세포/mL, 50×10^6 개 세포/mL, 60×10^6 개 세포/mL, 70×10^6 개 세포/mL, 80×10^6 개 세포/mL, 90×10^6 개 세포/mL, 100×10^6 개 세포/mL, 110×10^6 개 세포/mL, 120×10^6 개 세포/mL, 130×10^6 개 세포/mL, 140×10^6 개 세포/mL, 또는 150×10^6 개 세포/mL, 또는 전술한 임의의 수치 사이의 임의의 값의 밀도로 냉동 보존 및/또는 동결 보호된다(예를 들어, 동결된다). 일부 구현예에서, 냉동 보존 용액 또는 완충액은 선택적으로 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 기타 적합한 세포 동결 배지를 포함하는 DMSO 용액이거나 이를 함유한다.

[0407] 구체적 구현예에서, 냉동 보존 및/또는 동결 보호된 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 (예를 들어, 샘플을 동결시키기 전에 T 세포 선택 없이) 예치되며(banked), 이는 일부 측면에서, 후속 제조 단계들에 더 많은 유연성을 부여할 수 있다. 일부 측면에서, 냉동 보존 및/또는 동결 보호된 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 백(bag) 등과 같은 다수의 냉동 보존 용기 내로 분취되고, 이들은 각 개별로 또는 조합하여 생성물의 가공에 사용될 수 있다. 예를 들면, 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물 내 생존 세포의 총 수가 15×10^9 개 세포 미만일 때, 냉동 보존 및/또는 동결 보호된 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 백 등과 같은 4개의 냉동 보존 용기 내로 분취된다. 일부 구현예에서, 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물 내 생존 세포의 총 수가 $15-30 \times 10^9$ 개 세포일 때, 냉동 보존 및/또는 동결 보호된 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 백 등과 같은 8개의 냉동 보존 용기 내로 분취된다.

[0408] 일 측면에서, 선택 전에 세포를 예치(banking)하면 다운스트림 공정에 대한 세포 수율을 증가시키고, 세포를 더 일찍 예치(banking)하면 세포가 더 건강함을 의미할 수 있고 제조 성공 기준을 충족하기 더 쉬울 수 있다. 다른 측면에서, 일단 해동되면, 냉동 보존 및/또는 동결 보호된 성분채집술 생성물 또는 백혈구 성분채집술 생성물은 하나 이상의 상이한 선택 방법을 거칠 수 있다. 이 접근법의 이점은, 무엇 보더라도, 예컨대 샘플의 공여체 및/또는 다른 수용자에서, 대상체의 질병 또는 병태의 치료를 위한 세포 요법의 세포의 이용 가능성, 효능, 및/또는 다른 측면들을 향상시키는 것이다.

[0409] 일부 구현예에서, 샘플(예를 들어, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플)은 공여체가 질병 또는 병태로 진단된 후의 시점에, 사전 세포 선택 전에 또는 사전 세포 선택 없이(예를 들어, 크로마토그래피에 의한 선택과 같은 사전 T 세포 선택 없이) 채집되고 냉동 보존 및/또는 동결 보호된다. 일부 측면에서, 냉동 보존 시간은 또한 공여체가 질병 또는 병태에 대한 임의의 초기 치료, 질병 또는 병태에 대한 치료에 대해 표지된 임의의 표적화된 치료 또는 임의의 치료, 또는 방사선 및/또는 화학 요법 이외의 임의의 치료 중 하나 이상을 받기 전이다. 일부 구현예에서, 샘플은 질병에 대한 초기 치료 이후 질병의 첫 번째 재발 이후, 및 공여체 또는 대상체가 해당 질병에 대한 후속 치료를 받기 전에 채집된다. 초기 및/또는 후속 치료는 세포 요법 이외의 요법일 수 있다. 일부 구현예에서, 채집된 세포는 초기 및/또는 후속 치료 이후 세포 요법에 사용될 수 있다. 일 측면에서, 사전 세포 선택 없이 냉동 보존 및/또는 동결 보호된 샘플은 선행 비용, 예컨대 교차할 수 있고 나중에 치료를 필요로 할 수 있는 무작위 임상 시험에서 비-치료 환자와 연관된 비용을 줄이는 데 도움이 될 수 있다.

[0410] 일부 구현예에서, 샘플(예를 들어, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플)은 질병에 대한 제2선 치료 이후 질병의 두 번째 재발 이후 및 공여체 또는 대상체가 질병에 대한 후속 치료를 받기 이전 시점에, 사전 세포 선택 전에 또는 사전 세포 선택 없이(예를 들어, 크로마토그래피에 의한 선택 등과 같은 사전 T 세포 선택 없이) 채집되고 냉동 보존 및/또는 동결 보호된다. 일부 구현예에서, 환자들은 제2선 치료 이후, 예를 들어, 특정 위험 인자를 평가함으로써, 재발할 가능성이 있다고 식별된다. 일부 구현예에서, 위험 인자는 이중 유전자 이상 림프종, 원발성 불응성 암, 또는 활성화된 B-세포 림프종 등과 같은 질병 유형 및/또는 유전학에 기초한다. 일부 구현예에서, 위험 인자는 제1선 치료 후 초기 재발, 또는 치료 후 다른 불량한 예후 지표(예를 들어, IPI(국제 제 예후 지수) > 2) 등의 임상적 표현에 기초한다.

[0411] 일부 구현예에서, 샘플(예를 들어, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플)은 공여체 또는 대상체가 질병으로 진단되기 이전 시점에, 사전 세포 선택 전에 또는 사전 세포 선택 없이(예를 들어, 크로마토그래피에 의한 선택과 같은 사전 T 세포 선택 없이) 채집되고 냉동 보존 및/또는 동결 보호된다. 일부 측면에서, 공여체 또는 대상체는 질병이 발병할 위험이 있는 것으로 판정될 수 있다. 일부 측면에서, 공여체 또는 대상체는 건강한 대상체

일 수 있다. 특정한 경우에, 공여체 또는 대상체는 세포 요법이 삶의 말기 단계에서 요구되는 경우에, 질병이 발생할 위험이 있는 것으로 간주되지 않거나 또는 질병이 있는 것으로 진단되지 않은 상태에서, 세포를 예치하거나 저장하는 것을 선택할 수 있다. 일부 구현예에서, 공여체 또는 대상체는 유전자 돌연변이, 유전자 이상, 유전자 파괴, 가족력, 단백질 이상(단백질 생산 및/또는 가공과 관련한 결핍 등), 및 질병이 발생할 위험을 증가시킬 수 있는 생활방식 선택과 같은 인자에 기초하여 질병이 발생할 위험이 있는 것으로 간주될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 예방약으로서 채집된다.

[0412] 일부 구현예에서, 사전 세포 선택을 거치지 않은(예를 들어, 크로마토그래피에 의한 선택 등과 같은 사전 T 세포 선택 없이) 세포의 샘플과 같은 냉동 보존 및/또는 동결 보호된 세포의 샘플(예를 들어, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플)은 12시간, 24시간, 36시간, 또는 48시간 이상, 또는 0.5일, 1일, 1.5일, 또는 2일의 기간 동안, 저장 또는 예치된다. 일부 구현예에서, 샘플은 1주, 2주, 3주, 또는 4주 이상의 기간 동안 저장 또는 예치된다. 일부 구현예에서, 샘플은 장기 저장되거나 장기 예치된다. 일부 측면에서, 샘플은 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 11년, 12년, 13년, 14년, 15년, 16년, 17년, 18년, 19년, 20년, 25년, 30년, 35년, 40년, 또는 그 이상의 기간 동안 저장된다.

[0413] 일부 구현예에서, 공여체로부터 채취된 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플은 냉각된 환경에서 저장 또는 가공 시설로 수송되고, 및/또는 저장 시설에 극저온으로 저장되거나 가공 시설에서 가공된다. 일부 구현예에서, 수송 전에, 샘플은, 예를 들어, CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, 및/또는 CD8+ T 세포와 같은 T 세포를 선택함으로써, 가공된다. 일부 구현예에서, 이러한 가공은 수송 이후 및 극저온으로 샘플을 저장하기 전에 수행된다. 일부 구현예에서, 가공은 극저온으로 저장 이후 샘플을 해동한 후 수행된다.

[0414] 공여체, 따라서 그의 세포들이 질병에 대한 광범위한 치료를 받지 않고/거나 질병 또는 병태에 걸리거나 그 예후를 보이기 전 시기에 공여체가 자신의 세포를 저장할 수 있게 함으로써, 그러한 세포는 1회 또는 수회의 치료 후 수확된 세포와 비교하여 세포 요법에 사용하는 데 있어 특정 이점이 있을 수 있다. 예를 들면, 1회 이상의 치료 전에 수확된 세포는 수회의 치료를 거친 세포보다 더 건강할 수 있고/거나, 더 높은 수준의 특정 세포 활성을 나타낼 수 있고/거나, 더 빠르게 성장할 수 있고/거나, 유전자 조작에 더 수용적일 수 있다. 본원에 기술된 구현예들에 따른 이점의 다른 예는 편의성을 포함할 수 있다. 예를 들면, 공여체의 세포가 세포 요법에 필요하기 전에 그 세포를 채집하고, 선택적으로 가공하고, 저장함으로써, 그 세포는 수용자가 나중에 그 세포가 필요한 경우 및 필요할 때 용이하게 이용할 수 있다. 이는 성분채집술 실험실 역량을 증가시켜, 기술자에게 성분채집술 채집 공정 일정을 계획하는 데 더 큰 유연성을 제공할 수 있다.

[0415] 성분채집술 샘플과 같은 샘플 유래 세포의 극저온 저장 및 처리를 위한 예시적인 방법 및 시스템은 문헌 [W02018170188]에 기술된 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본 방법 및 시스템은 환자가 세포 요법을 필요로하기 전에 성분채집술 채집을 하고 이후 그 성분채집술 샘플을 나중에 재조합 수용체(예를 들어, CAR)로 세포(예를 들어, T 세포)를 조작하는 공정에 사용하기 위해 냉동 보존하는 것을 수반한다. 일부 경우에, 이러한 공정들은 본원에 기술된 공정들을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 성분채집술 샘플이 대상체로부터 채집되고 세포 집단의 후속적인 T 세포 선택, 활성화, 자극, 조작, 형질도입, 형질주입, 인큐베이션, 배양, 수확, 제형화, 및/또는 제형화된 세포 집단의 대상체 투여 전에 냉동 보존된다. 이러한 예들에서, 냉동 보존된 성분채집술 샘플은 샘플이 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 선택 단계를 거치기 전에 해동된다.

[0416] 일부 구현예에서, 사전 세포 선택을 거치지 않은(예를 들어, 크로마토그래피에 의한 선택과 같은 사전 세포 선택을 하지 않은) 세포의 샘플과 같은 세포의 냉동 보존 및/또는 동결 보호된 샘플(예를 들어, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플)은 세포 요법을 위한 세포 집단, 예를 들어, CAR+ T 세포를 함유한 T 세포 집단의 제조를 위한 다운스트림 공정들에 사용하기 전에 해동된다. 일부 구현예에서, 이러한 냉동 보존 및/또는 동결 보호된 세포의 샘플(예를 들어, 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플)은 CAR+ T 세포 요법과 같은 조작된 T 세포 요법을 위해 본원에 제공된 공정과 관련하여 사용된다. 구체적인 예에서, 수확/제형화 단계 전에 또는 도중에 추가적인 냉동 보존 단계는 수행되지 않는다.

[0417] 일부 구현예에서, 세포 또는 집단의 선택, 단리, 또는 농축은 하나 이상의 준비 단계 및/또는 비친화도 기반 세포 분리 단계를 포함한다. 일부 예에서, 세포는 예를 들어 원치 않는 성분의 제거, 원하는 성분의 농축, 특정 시약에 민감한 세포를 용해하거나 제거하기 위해, 하나 이상의 시약의 존재 하에 세척, 원심분리 및/또는 인큐베이션된다. 일부 예에서, 세포는 하나 이상의 특성, 예컨대 밀도, 부착 특성, 크기, 특정 성분에 대한 민감도 및/또는 내성에 기초하여 분리된다. 일부 구현예에서, 본 방법은 밀도 기반 세포 분리 방법, 예컨대 적혈구를

용해시켜 말초 혈액으로부터 백혈구의 준비 및 Percoll 또는 Ficoll 구배를 통한 원심분리를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, T 세포)는 친화성 크로마토그래피 또는 겔 투과 크로마토그래피를 포함한 컬럼 크로마토그래피 등과 같은 크로마토그래피 단리에 의해 분리, 선택, 또는 농축된다. 일부 구현예에서, 본 방법은 표적 세포, 예를 들어, 분리, 선택, 또는 농축될 세포의 표면 상에 위치하는 수용체 분자에 결합하는 수용체 결합 시약을 이용한다. 이러한 방법은 (무효적) 세포 친화성 크로마토그래피 기술(CATCH)로 기술될 수 있다. 특정 구현예에서, 분리, 선택, 및 농축을 위한 방법, 기술, 및 시약이 예를 들어 문헌[W02013124474 및 W0201516467 5]에 기술되어 있고, 이는 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

[0418]

세포 선택은 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼이 폐쇄 시스템에 포함된다. 일부 구현예에서, 폐쇄 시스템은, 예를 들어, 최소 입력이 필요하거나 사용자(예를 들어, 인간) 입력이 필요하지 않은, 자동화 폐쇄 시스템이다. 일부 구현예에서, 세포 선택은 순차적으로 수행된다(예를 들어, 순차적 선택 기술). 일부 구현예에서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼이 순차적으로 배열된다. 예를 들면, 제1 컬럼은 동 컬럼의 산출물(예를 들어, 용리액)이, 예를 들어 연결된 튜빙을 통해, 제2 크로마토그래피 컬럼에 공급되도록 배향될 수 있다. 일부 구현예에서, 복수의 크로마토그래피 컬럼이 순차적으로 배열될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 선택은 순차적인 양성 및 음성 선택 단계를 수행함으로써 달성될 수 있고, 후속 단계는 이전 단계의 음성 및/또는 양성 분획을 추가 선택하며, 여기서 전체 공정은 동일한 튜브 또는 튜빙 세트에서 수행된다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유한 샘플이 순차적 선택을 거치고, 여기서 제1 선택이 수행되어 CD4+ 또는 CD8+ 집단 중 하나를 농축시키고, 제1 선택으로부터 미선택된 세포는 CD4+ 또는 CD8+ 집단 중 다른 하나를 농축하기 위한 제2 선택을 위한 세포의 공급원으로서 사용된다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택들이 수행되어 CD4+ 또는 CD8+ 집단 중 하나 또는 둘 다의 하위-집단들, 예를 들어 중심 기억 T (T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 표지자, 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및/또는 CD45RO+에 대해 양성이거나 이를 높은 수준으로 발현하는 세포에 대해 농축된다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유한 샘플이 순차적 선택을 거치고, 여기서 제1 선택이 수행되어 CD3+ 집단에 대해 농축시키고, 선택된 세포는 CD3+ 집단에 대해 농축시키기 위한 제2 선택을 위한 세포의 공급원으로서 사용된다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유한 샘플이 순차적 선택을 거치고, 여기서 제1 선택이 수행되어 제1 정지상에(예를 들어, 제1 크로마토그래피 컬럼에서) CD3+ 집단에 대해 농축시키고, 비결합 세포를 함유한 통과액은 제2 정지상에(예를 들어, 제2 크로마토그래피 컬럼에서) CD3+ 집단에 대해 농축시키기 위한 제2 선택을 위한 세포의 공급원으로서 사용되며, 이때 제1 및 제2 정지상은 순차적으로 배열된다. 일부 구현예에서, 상기 선택은 (예를 들어, 세포 표면 CD3에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 사용함으로써) CD3+ T 세포에 대한 양성 선택이다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택들이 수행되어 CD3+ 집단의 하위-집단들, 예를 들어 중심 기억 T (T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 표지자, 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및/또는 CD45RO+에 대해 양성이거나 이를 높은 수준으로 발현하는 세포에 대해 농축될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유한 샘플이 순차적 선택을 거치고, 여기서 제1 선택이 수행되어 CD3+ 집단에 대해 농축시키고, 선택된 세포는 CD4+ 집단에 대해 농축시키기 위한 제2 선택을 위한 세포의 공급원으로서 사용된다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택들이 수행되어 CD3+CD4+ 집단의 하위-집단들, 예를 들어 중심 기억 T (T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 표지자, 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및/또는 CD45RO+에 대해 양성이거나 이를 높은 수준으로 발현하는 세포에 대해 농축될 수 있다. 일부 측면에서, 예컨대 하나 이상의 표면 표지자를 높은 수준으로 발현하거나 양성인 세포와 같은 T 세포(예를 들어, CD3+ 세포), 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+ T 세포의 특정 하위 집단들은 양성 또는 음성 순차적 선택 기술에 의해 선택된다. 일부 구현예에서, 세포 선택은 병렬로 수행된다(예를 들어, 병렬 선택 기술). 일부 구현예에서, 하나 이상의 크로마토그래피 컬럼이 병렬로 배열된다. 예를 들면, 2개 이상의 컬럼이, 샘플이 제1 컬럼을 통해 횡단할 필요없이 샘플이 각각의 컬럼에 적용될 수 있게 하는 튜빙을 통해 동시에 2개 이상의 컬럼 상에 샘플이 로딩되도록, 배열될 수 있다. 예를 들면, 병렬 선택 기술을 사용하여, 세포 선택은, 예를 들어 전체 공정이 동일한 튜브 또는 튜빙 세트에서 수행되는 폐쇄 시스템에서, 양성 및/또는

음성 선택 단계를 동시에 수행함으로써 달성될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유한 샘플이 병렬 선택을 거치고, 이 샘플은 2 개 이상의 크로마토그래피 컬럼에 로드되며, 여기서 각 컬럼은 세포 집단의 선택을 수행한다. 일부 구현예에서, 2개 이상의 크로마토그래피 컬럼이 CD3+, CD4+, 또는 CD8+ 집단의 선택을 개별적으로 수행한다. 일부 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 또는 겔 투과 크로마토그래피를 포함하는 2개 이상의 크로마토그래피 컬럼은 독립적으로 동일한 세포 집단의 선택을 수행한다. 예를 들면, 2개 이상의 크로마토그래피 컬럼은 CD3+ 세포의 선택을 수행할 수 있다. 일부 구현예에서, 친화성 크로마토그래피 또는 겔 투과 크로마토그래피를 포함하는 2개 이상의 크로마토그래피 컬럼은 독립적으로 상이한 세포 집단의 선택을 수행한다. 예를 들면, 2개 이상의 크로마토그래피 컬럼은 독립적으로 CD3+ 세포, CD4+ 세포, 및 CD8+ 세포의 선택을 수행할 수 있다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택들이 예를 들어 순차적 선택 기술을 사용하여 수행되어 병렬 선택을 통해 선택된 하나 또는 모든 세포 집단의 하위-집단들에 대해 농축시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 선택된 세포는 중심 기억 T (T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 표지자, 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및/또는 CD45RO+에 대해 양성이거나 이를 높은 수준으로 발현하는 세포에 대해 추가 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유한 샘플이 병렬 선택을 거치고, 병렬 선택이 수행되어 2개 이상의 컬럼 상에 CD3+ 집단에 대해 농축시킨다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택들이 수행되어 CD3+ 집단의 하위-집단들, 예를 들어 중심 기억 T (T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 표지자, 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및/또는 CD45RO+에 대해 양성이거나 이를 높은 수준으로 발현하는 세포에 대해 농축될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유한 샘플이 병렬 선택을 거치고, 선택이 수행되어 2개 이상의 컬럼 상에 독립적으로 CD3+ 집단 및 CD4+ 집단에 대해 농축시킨다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택들이 수행되어 CD3+ 및 CD4+ 집단의 하위-집단들, 예를 들어 중심 기억 T (T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 표지자, 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및/또는 CD45RO+에 대해 양성이거나 이를 높은 수준으로 발현하는 세포에 대해 농축될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유한 샘플이 병렬 선택을 거치고, 병렬 선택이 수행되어 CD4+ 집단 및 CD8+ 집단에 대해 농축시킨다. 일부 구현예에서, 추가 선택 또는 선택들이 수행되어 CD4+ 집단 및 CD8+ 집단의 하위-집단들, 예를 들어 중심 기억 T (T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 표지자, 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및/또는 CD45RO+에 대해 양성이거나 이를 높은 수준으로 발현하는 세포에 대해 농축될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포를 함유한 샘플이 병렬 선택을 거치고, 병렬 선택이 수행되어 CD4+ 집단 및 CD8+ 집단의 하위-집단들, 예를 들어 중심 기억 T (T_{CM}) 세포, 나이브 T 세포, 및/또는 하나 이상의 표면 표지자, 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및/또는 CD45RO+에 대해 양성이거나 이를 높은 수준으로 발현하는 세포에 대해 농축될 수 있다. 일부 측면에서, 예컨대 하나 이상의 표면 표지자를 높은 수준으로 발현하거나 양성인 세포와 같은 T 세포(예를 들어, CD3+, CD4+, CD8+ 세포), 예를 들어 CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+ 및/또는 CD45RO+ T 세포의 특정 하위 집단들은 양성 또는 음성 병렬 선택 기술에 의해 선택된다. 일부 구현예에서, 순차적 및 병렬 선택 기술은 조합하여 사용될 수 있다.

[0419] 2. 활성화/자극

[0420] 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작 전에 또는 그와 연계하여 인큐베이션 및/또는 배양된다. 인큐베이션 단계는 배양(culture), 자극(stimulation), 활성화(activation) 및/또는 번식(propagation)을 포함할 수 있다. 인큐베이션 및/또는 조작은 배양 용기, 예컨대 유닛, 챔버, 웰(well), 컬럼, 튜브, 튜빙 세트, 밸브, 바이알(vial), 배양 접시, 백(bag) 또는 배양을 위한 다른 용기에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물 또는 세포는 자극 조건 또는 자극체의 존재 하에 인큐베이션된다. 상기 조건은 집단에서 세포의 증식, 증폭, 활성화 및/또는 생존을 유도하고, 항원 노출을 모방하고, 및/또는 재조합 항원 수용체의 도입과 같은 유전자 조작을 위해 세포를 프라이밍하도록 설계된 것을 포함한다.

[0421] 구체적인 구현예에서, 자극 시약은 TCR 복합체의 세포내 신호전달 도메인을 활성화할 수 있는 하나 이상의 제제(예를 들어, 리간드)에 접합, 연결, 또는 부착된 올리고머성 시약(예를 들어, 스트렙타비딘 뮤테인 시약)을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 제제는 특정 결합 부위(예를 들어, 결합 부위 Z)에서 올리고머성 시약에 결합할 수 있는 부착된 결합 도메인 또는 결합 파트너(예를 들어, 결합 파트너 C)를 가진다. 일부 구현예에서, 복수의 제제가 올리고머성 시약에 가역적으로 결합된다. 다양한 구현예에서, 올리고머성 시약은 복수의 특정 결합 부위를 가지며, 이는 특정 구현예에서, 결합 도메인(예를 들어, 결합 파트너 C)에서 복수의 제제에

가역적으로 결합된다. 일부 구현예에서, 결합된 시약의 양은 경쟁 시약, 예를 들어, 특정 결합 부위(예를 들어, 결합 부위 Z)에 결합할 수 있는 시약의 존재 하에 줄어들거나 감소된다.

[0422] 일부 구현예에서, 자극 시약은 적어도 하나의 제제(예를 들어, T 세포와 같은 세포에서 신호를 생산할 수 있는 제제)가 올리고머성 시약과 회합된(예를 들어, 가역적으로 회합된) 가역적 시스템이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 시약은 제제에 결합(예를 들어, 가역적으로 결합)할 수 있는 복수의 결합 부위를 함유한다. 일부 경우에, 상기 시약은 T 세포와 같은 세포에서 신호를 생산할 수 있는 적어도 하나의 부착된 제제를 가진 올리고머성 입자 시약이다. 일부 구현예에서, 상기 제제는 분자의 에피토프 또는 영역에 특이적으로 결합할 수 있는 적어도 하나의 결합 부위(예를 들어, 결합 부위 B)를 함유하고, 또한 적어도 하나의 시약의 결합 부위(예를 들어, 시약의 결합 부위 Z)에 특이적으로 결합하는 결합 파트너(본원에서는 결합 파트너 C라고도 함)를 함유한다. 일부 구현예에서, 결합 파트너 C와 적어도 하나의 결합 부위 Z 사이의 결합 상호작용은 비공유적(non-covalent) 상호작용이다. 일부 경우에, 결합 파트너 C와 적어도 하나의 결합 부위 Z 사이의 결합 상호작용은 공유적(covalent) 상호작용이다. 일부 구현예에서, 결합 파트너 C와 적어도 하나의 결합 부위 Z 사이의 결합 상호작용, 예컨대 비공유적 상호작용은 가역적이다.

[0423] 이러한 가역적 시스템에서 올리고머성 시약으로서 사용될 수 있는 물질은 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌[미국 특허 번호 5,168,049; 5,506,121; 6,103,493; 7,776,562; 7,981,632; 8,298,782; 8,735,540; 9,023,604; 및 국제 공개 PCT 출원 번호 W02013/124474 및 W02014/076277]을 참조한다. 가역적 상호작용을 형성할 수 있는 시약 및 결합 파트너, 뿐만 아니라 이러한 결합을 역전시킬 수 있는 물질(예를 들어, 경쟁 시약)의 비제한적 예는 하기에 기술되어 있다.

[0424] 일부 구현예에서, 올리고머성 시약은 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인 또는 유사체, 아비딘, 아비딘 뮤테인 또는 유사체(예컨대, 뉴트라비딘) 또는 이들의 혼합물의 올리고머이며, 여기서 이러한 올리고머성 시약은 제제의 결합 도메인(예를 들어, 결합 파트너 C)과 가역적 회합을 위한 하나 이상의 결합 부위를 함유한다. 일부 구현예에서, 제제의 결합 도메인은 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체, 또는 스트렙타비딘-결합 펩타이드 또는 스트렙타비딘 뮤테인 또는 유사체, 아비딘 또는 아비딘 뮤테인 또는 유사체에 특이적으로 결합할 수 있는 다른 분자일 수 있다.

[0425] 특정 구현예에서, 하나 이상의 제제(예를 들어, T 세포와 같은 세포에서 신호를 생산할 수 있는 제제)는, 예컨대 올리고머성 시약 상에 존재하는 복수의 특정 결합 부위(예를 들어, 결합 부위 Z)를 통해, 올리고머성 시약과 회합한다(예컨대 가역적으로 결합된다). 일부 경우에, 이 결과로 제제는 서로 가깝게 배열되어 만일 제제에 의해 결합되는 또는 인식되는 세포 표면 분자(의 적어도 2개 카피)를 가진 표적 세포가 제제와 접촉하게 되면 결합력 효과(avidity effect)가 발생할 수 있다.

[0426] 일부 구현예에서, 올리고머성 시약은 스트렙타비딘 올리고머, 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머, 스트렙타비딘 유사체 올리고머, 아비딘 올리고머, 아비딘 뮤테인 또는 아비딘 유사체(예컨대, 뉴트라비딘)로 구성된 올리고머 또는 이들의 혼합물이다. 구체적인 구현예에서, 올리고머성 시약은 제제의 결합 도메인(예를 들어, 결합 파트너 C)에 결합할 수 있는 특정 결합 부위를 함유한다. 일부 구현예에서, 결합 도메인은 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체, 또는 스트렙타비딘-결합 펩타이드 또는 스트렙타비딘 뮤테인 또는 유사체, 아비딘 또는 아비딘 뮤테인 또는 유사체에 특이적으로 결합할 수 있는 다른 분자일 수 있다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘은 야생형 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 뮤테인 또는 유사체, 예컨대 스트렙타비딘-유사 폴리펩타이드일 수 있다. 마찬가지로, 일부 측면에서, 아비딘은 야생형 아비딘 또는 뮤테인 또는 뉴트라비딘과 같은 아비딘의 유사체, 통상적으로 보다 중성인 pI를 나타내고 천연 아비딘에 대한 대안으로서 이용 가능한 변형된 아르기닌을 갖는 탈글리코실화된 아비딘을 포함한다. 일반적으로, 아비딘의 탈글리코실화된 중성 형태는 예를 들어, 시그마 알드리치(Sigma Aldrich)를 통해 입수가 가능한 “엑트라비딘(Extravidin)” 또는 써모 사이언티픽(Thermo Scientific) 또는 인비트로젠(Invitrogen)으로부터 입수가 가능한 “뉴트라비딘(NeutrAvidin)”과 같은 상업적으로 입수가 가능한 형태를 포함한다.

[0427] 일부 구현예에서, 시약은 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 또는 유사체이다. 일부 구현예에서, 야생형 스트렙타비딘(wt-스트렙타비딘)은 문헌[Argarana et al, Nucleic Acids Res. 14 (1986) 1871-1882]에 개시된 아미노산 서열(서열 번호: 68)을 갖는다. 일반적으로, 스트렙타비딘은 자연적으로 4개의 동일한 서브유닛의 4량체로서 발생하며, 즉, 이는 호모-4량체이며, 여기서 각각의 서브유닛은 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체 또는 비오틴 모방체에 대한 단일 결합 부위를 함유한다. 스트렙타비딘 서브유닛의 예시적인 서열은 서열 번호: 68에 제시된 아미노산의 서열이지만, 이러한 서열은 또한 이의 동족체에 존재하는 다른 스트렙토마이세스 종 유래

의 서열을 포함할 수 있다. 특히, 스트렙타비딘의 각 서브유닛은 약 10^{-14} M의 해리 상수(K_d)로 비오틴에 대한 강한 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 일부 경우에, 스트렙타비딘은 4개의 결합 부위 중 하나만이 기능성인 1가 4량체(Howarth 등 (2006) Nat. Methods, 3:267-73; Zhang 등 (2015) Biochem. Biophys. Res. Commun., 463:1059-63)), 4개의 결합 부위 중 2개가 기능성인 2가 4량체(Fairhead 등 (2013) J. Mol. Biol., 426:199-214)로 존재하거나, 단량체 또는 2량체 형태(Wu 등 (2005) J. Biol. Chem., 280:23225-31; Lim 등 (2010) Biochemistry, 50:8682-91)로 존재할 수 있다.

[0428] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘은 임의의 형태, 예컨대 야생형 또는 비변형 스트렙타비딘, 예컨대 스트렙토마이세스 중 유래의 스트렙타비딘 또는 비오틴에 대한 결합 부위를 함유하는 적어도 하나의 기능적 서브유닛, 비오틴 유도체 또는 유사체 또는 비오틴 모방체를 포함하는, 예컨대 일반적으로 서열 번호: 68에 제시된 스트렙토마이세스 아비디니(*Streptomyces avidinii*) 유래의 야생형 스트렙타비딘의 적어도 하나의 기능적 서브유닛 또는 이의 기능적 활성 단편을 함유하는 이의 기능적 활성 단편일 수 있다. 예를 들면, 일부 구현예에서, 스트렙타비딘은 N- 및/또는 C-말단에서 단축된 야생형 스트렙타비딘의 단편을 포함할 수 있다. 이러한 최소 스트렙타비딘은 서열 번호: 68의 아미노산 위치 10 내지 16의 영역에서 N-말단으로 시작하고 서열 번호: 68의 아미노산 위치 133 내지 142의 영역에서 C-말단으로 끝나는 임의의 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘의 기능적 활성 단편은 서열 번호: 69에 제시된 아미노산의 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 서열 번호: 69에 제시된 바와 같은 스트렙타비딘은 서열 번호: 68에 제시된 넘버링을 갖는 Ala13에 상응하는 위치에 N-말단 메티오닌을 추가로 함유할 수 있다. 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인에서 잔기의 위치에 대한 참조는 서열 번호: 68에서 잔기의 넘버링을 참조하는 것이다.

[0429] 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인의 예는, 예를 들어, 문헌[WO 86/02077, DE 19641876 A1, US 6,022,951, WO 98/40396 또는 WO 96/24606]에 언급되어 있다. 스트렙타비딘 뮤테인의 예는 본 기술 분야에 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌[미국 특허 번호 5,168,049; 5,506,121; 6,022,951; 6,156,493; 6,165,750; 6,103,493; 또는 6,368,813; 또는 국제 공개 PCT 출원 번호 WO2014/076277]을 참조한다.

[0430] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 비변형 또는 야생형 스트렙타비딘의 일부가 아닌 아미노산을 함유할 수 있거나, 또는 야생형 또는 비변형 스트렙타비딘의 일부만을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 비변형 또는 야생형 스트렙타비딘의 서브유닛과 비교하여, 예컨대 서열 번호 68에 제시된 야생형 스트렙타비딘 서브유닛 또는 예를 들어 서열 번호: 69에 제시된 이의 기능적 활성 단편과 비교하여, 하나 이상의 아미노산 치환(대체)을 가질 수 있는 적어도 하나의 서브유닛을 함유한다.

[0431] 일부 구현예에서, 결합 도메인에 대한 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인의 결합 친화도, 예컨대 해리 상수(K_d)는 1×10^{-4} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M 또는 1×10^{-7} M 미만이지만, 일반적으로 1×10^{-13} M, 1×10^{-12} M 또는 1×10^{-11} M보다 크다. 예를 들면, 문헌[미국 특허 번호 5,506,121]에 개시된 것과 같은 펩타이드 서열(예를 들어, Strep-tag)은 비오틴 모방체로 작용할 수 있고, 예를 들어 대략 10^{-4} 내지 10^{-5} M의 K_d 로 스트렙타비딘에 대한 결합 친화도를 보여준다. 일부 경우에, 결합 친화도는 스트렙타비딘 분자 내에서 돌연변이를 만듦으로써 추가로 개선될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 6,103,493 또는 WO2014/076277 참조). 일부 구현예에서, 결합 친화도는 본원에 기술된 바와 같은 본 기술 분야에 알려진 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0432] 일부 구현예에서, 시약, 예컨대 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인은 펩타이드 리간드 결합 파트너에 대한 결합 친화도를 나타내며, 이 펩타이드 리간드 결합 파트너는 제제(예를 들어, 수용체-결합제 또는 선택제)에 존재하는 결합 파트너 C일 수 있다. 일부 구현예에서, 펩타이드 서열은 일반식(general formula) His-Pro-Xaa를 갖는 서열을 함유하며, 여기서 Xaa는 글루타민, 아스파라긴, 또는 메티오닌이고, 예컨대 서열 번호: 71에 제시된 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 펩타이드 서열은 서열 번호: 70에 제시된 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 펩타이드 서열은 서열 번호: 72에 제시된, 예컨대 서열 번호: 73에 제시된 일반식을 갖는다. 일 예에서, 펩타이드 서열은 Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly(서열 번호: 74에 제시된, Strep-tag®로도 불림)이다. 일 예에서, 펩타이드 서열은 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys(서열 번호: 75에 제시된, Strep-tag® II로도 불림)이다. 일부 구현예에서, 펩타이드 리간드는 적어도 2개의 스트렙타비딘-결합 모듈의 순차적 배열을 함유하며, 여기서 2개의 모듈 사이의 거리는 적어도 0개 및 50개 이하의 아미노산이고, 여기서 1개의 결합 모듈은 3 내지 8개의 아미노산을 갖고, 적어도 서열 His-Pro-Xaa를 함유하며, 여기서 Xaa는 글루타민, 아스파라긴 또는

메티오닌이고, 여기서 다른 결합 모듈은 서열 번호: 72에 제시된 바와 같은 동일하거나 상이한 스트렙타비딘 펩타이드 리간드를 갖는다(예를 들어, 문헌[국제 공개 PCT 출원 W002/077018; 미국 특허 번호 7,981,632] 참조). 일부 구현예에서, 펩타이드 리간드는 서열 번호: 76 또는 77 중 어느 하나에 제시된 화학식(formula)을 갖는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 펩타이드 리간드는 서열 번호: 78 내지 80, 및 81 내지 82 중 어느 하나에 제시된 아미노산의 서열을 갖는다. 대부분의 경우에, 이 모든 스트렙타비딘 결합 펩타이드는 동일한 결합 부위, 즉 스트렙타비딘의 비오틴 결합 부위에 결합한다. 이러한 스트렙타비딘 결합 펩타이드 중 하나 이상이 결합 파트너 C, 예를 들어 C1 및 C2로서 사용되면, 결합 파트너 C를 통해 하나 이상의 제제에 결합된 다량체화 시약 및/또는 올리고머성 입자 시약은 통상적으로 하나 이상의 스트렙타비딘 뮤테인으로 구성된다.

[0433] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 문헌[미국 특허 번호 6,103,493]에 기술된 바와 같은 돌연변이체이다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 스트렙타비딘의 아미노산 서열, 예컨대 서열 번호 68에 제시된 아미노산 서열을 기준으로 아미노산 위치 44 내지 53의 영역 내에 적어도 하나의 돌연변이를 함유한다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 하나 이상의 잔기 44, 45, 46 및/또는 47에 돌연변이를 함유한다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 야생형 스트렙타비딘의 위치 44의 Glu를 소수성 지방족 아미노산, 예를 들어 Val, Ala, Ile 또는 Leu, 위치 45의 임의의 아미노산, 지방족 아미노산, 예컨대 위치 46의 소수성 지방족 아미노산으로 치환 및/또는 위치 47의 Val을 염기성 아미노산, 예를 들어 Arg 또는 Lys, 예컨대 일반적으로 Arg로 치환을 함유한다. 일부 구현예에서, Ala는 위치 46에 있고/있거나 Arg는 위치 47에 있고/있거나 Val 또는 Ile는 위치 44에 있다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 돌연변이체는 서열 번호: 83 또는 서열 번호: 84 또는 85에 제시된 아미노산의 서열을 함유한 예시적인 스트렙타비딘 뮤테인에 제시된 바와 같은 잔기 Val44-Thr45-Ala46-Arg47을 함유한다(스트렙타비딘 돌연변이체 1, SAM1로도 알려짐). 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 서열 번호: 86, 87, 또는 59에 제시된 아미노산의 서열을 함유한 예시적인 스트렙타비딘 뮤테인에 제시된 바와 같은 잔기 Ile44-Gly45-Ala46-Arg47을 함유한다(SAM2로도 알려짐). 일부 경우에, 이러한 스트렙타비딘 뮤테인은 예를 들어 문헌[미국 특허 번호 6,103,493]에 기술되어 있고, 상표 Strep-Tactin®로 상업적으로 입수가능하다. 일부 구현예에서, 뮤테인 스트렙타비딘은 서열 번호: 88 또는 서열 번호: 89에 제시된 아미노산의 서열을 함유한다. 구체적인 구현예에서, 분자는 서열 번호: 69, 84, 87, 88, 90, 85 또는 59 중 임의의 것에 제시된 서열을 포함하는 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인의 4량체이며, 이는 4량체로서 단량체 당 1개의 N-말단 아민 및 4개의 리신을 포함하는 20개의 1차 아민을 함유하는 분자이다.

[0434] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 펩타이드 리간드(Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; 서열 번호: 74에 제시된, Strep-tag®로도 불림)에 대해 3.7×10^{-5} M 이하 및/또는 펩타이드 리간드(Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; 서열 번호: 75에 제시된, Strep-tag® II로도 불림)에 대해 7.1×10^{-5} M 이하 및/또는 서열 번호: 75, 76-77, 81-82, 78-80, 73, 74, 70, 72 중 임의의 것에 제시된 임의의 펩타이드 리간드에 대해 7.0×10^{-5} M, 5.0×10^{-5} M, 1.0×10^{-5} M, 5.0×10^{-6} M, 1.0×10^{-6} M, 5.0×10^{-7} M, 또는 1.0×10^{-7} M이지만 일반적으로 1×10^{-13} M, 1×10^{-12} M 또는 1×10^{-11} M보다 큰, 해리 상수(K_d)를 특징으로 하는 결합 친화도를 나타낸다.

[0435] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 뮤테인은 펩타이드 리간드(Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; 서열 번호: 74에 제시된, Strep-tag®로도 불림)에 대해 $2.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 이상 및/또는 펩타이드 리간드(Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; 서열 번호: 75에 제시된, Strep-tag® II로도 불림)에 대해 $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 이상 및/또는 서열 번호: 75, 76-77, 81-82, 78-80, 73, 74, 70, 72 중 임의의 것에 제시된 임의의 펩타이드 리간드에 대해 $1.43 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $1.67 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $3.33 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1.11 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1.25 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1.43 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1.67 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $3.33 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1.11 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1.25 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1.43 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1.67 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $3.33 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 이지만 일반적으로 $1 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, $1 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$ 또는 $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$ 보다 작은, 해리 상수(K_d)를 특징으로 하는 결합 친화도를 나타낸다.

[0436] 구체적인 구현예에서, 복수의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 4량체로 구성되고/거나 이를 함유하는 올리고머성 입자 시약이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 올리고머성 입자 시약은 하나 이상의 제제(예를 들어, 자극제 및/또는 선택제)에 가역적으로 결합하거나 가역적으로 결합할 수 있는 복수의 결합 부위를 함유한다. 일부 구현예에서, 올리고머성 입자는 70nm 내지 125nm(수치 포함)의 반경, 예를 들어, 평균 반

경; $1 \times 10^7 \text{ g/mol}$ 내지 $1 \times 10^9 \text{ g/mol}$ (수치 포함)의 분자량; 및/또는 1,000 내지 5,000개 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 뮤테인 4량체(수치 포함)를 갖는다. 일부 구현예에서, 올리고머성 입자 시약은 세포의 표면 상에서 분자(예를 들어, 수용체)에 결합하는 제제와 같은 하나 이상의 제제에 결합된다(예를 들어, 가역적으로 결합된다). 특정 구현예에서, 하나 이상의 제제는 본원에, 예를 들어, 섹션 II-C-2에 기술된 제제이다. 일부 구현예에서, 제제는 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 예컨대 결합 파트너, 예를 들어, 스트렙타비딘 결합 펩타이드, 예를 들어, Strep-tag® II를 함유하는 항체 또는 이의 항체 단편이다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 제제는 세포 표면 수용체 및/또는 부속 분자에 결합하여 세포를 자극하고, TCR 복합체를 표적화하는 항체 또는 이의 성분, 공자극 분자를 표적화하는 항체, 항-CD3 항체, 항-CD28 항체, 또는 항-CD3 및/또는 항-CD28 Fab를 포함할 수 있고, 하나 이상의 제제는 결합 파트너, 예를 들어, 스트렙타비딘 결합 펩타이드, 예를 들어, Strep-tag® II를 함유한다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 제제는 Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 결합된 스트렙타비딘-기반 올리고머, 예컨대 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고머성 입자 시약은 문헌[W02015/158868 또는 W02018/197949]에 기술된 바와 같은 임의의 것이다.

[0437] 구체적인 구현예에서, 올리고머성 시약은 STREP-TACTIN® M2로 표기되는 예시적인 스트렙타비딘 뮤테인을 중합 시킴으로써 제조된다(예를 들어, 문헌[미국 특허 번호 6,103,493 및 Voss and Skerra (1997) Protein Eng., 1:975-982, 및 Argarana 등 (1986) Nucleic Acids Research, 1871-1882] 참조). 구체적인 구현예에서, 올리고머화를 위한 스트렙타비딘 뮤테인을 제조하기 위해, 하나 이상의 반응성 티올기를 함유하는 스트렙타비딘 뮤테인을 말레이미드 활성화된 스트렙타비딘 뮤테인과 함께 인큐베이션한다. 구체적인 구현예에서, 티올화된 스트렙타비딘 뮤테인을 제조하기 위해, 약 100mg의 스트렙타비딘 뮤테인을 2.6mL의 총 부피로 100mM 보레이트 완충제에서 24° C로 약 8.5의 pH에서 1:100의 몰비로 2-이미노티올레인 히드로클로라이드와 함께 1시간 동안 인큐베이션함으로써 티올화한다. 활성화 반응을 위해, 약 400mg의 스트렙타비딘 뮤테인을 숙신산이미딜-6-[(β-말레이미도프로피온아미도)헥사노에이트 (SMPH)와 1:2의 몰비로 pH 약 7.2에서 24° C에서 1시간 동안 인산나트륨 완충액 중 약 10.4mL의 총 부피로 인큐베이션한다. 티올화 및 활성화 반응은 거의 동시에 시작하도록 조정되고, 반응의 지속시간은 제어된다. 반응 후, PD-10 탈염 컬럼 (GE Healthcare)으로 샘플의 겔 여과를 개별적으로 수행함으로써 2-이미노티올레인 히드로클로라이드 및 SMPH를 샘플로부터 제거한다. 각각의 2.5 mL 부피의 샘플에 대해, 1 mL PD-10 컬럼을 평형화시키고, 티올화 뮤테인 스트렙타비딘 또는 말레이미드 뮤테인 스트렙타비딘으로 로딩하고, 3.5mL의 커플링 완충제(100mM NaH_2PO_4 , 150mM NaCl, 5mM EDTA, pH 7.2)를 첨가함으로써 용리를 수행한다. 말레이미드 뮤테인 스트렙타비딘의 겔 여과를 4개 컬럼 상에서 수행하여 > 10mL이 되도록 하고 용출액을 풀링한다. 활성화 및 티올화 반응의 타이밍 및 활성화 및 티올화 반응의 종료와 올리고머화 반응의 개시 사이의 타이밍이 제어된다. 일반적으로, 10분 이하가 겔 여과의 시작, 즉 활성화 및 티올화 반응의 종료부터 올리고머화 반응이 개시될 때까지 통과하도록 허용된다.

[0438] 구체적인 구현예에서, 이어서 말레이미드 스트렙타비딘 뮤테인 및 티올화된 스트렙타비딘 뮤테인 샘플을 약 17.5mL의 전체 부피로 합하고, 약 600 rpm의 교반 조건 하에 24° C, 7.2의 pH에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 2-이미노티올레인 히드로클로라이드보다 4-배 더 많은 스트렙타비딘 뮤테인이 SMPH와 함께 인큐베이션되었기 때문에, 티올화된 스트렙타비딘 뮤테인 및 말레이미드 스트렙타비딘 뮤테인의 몰비는 올리고머화 반응 동안 1:4이다. 반응 후, 올리고머화된 스트렙타비딘 뮤테인 시약의 나머지 SH 기는 교반하면서(약 600 rpm) 24° C에서 15분 동안 N-에틸말레이미드 (NEM)와 인큐베이션한 후, 4° C에서 추가로 16 내지 20시간 동안 인큐베이션함으로써 포화된다. NEM과 함께 인큐베이션한 후, 올리고머화된 스트렙타비딘 뮤테인을 함유하는 샘플을 원심분리하고, 상청액을 0.45 μm 막(Millex-HP 0.45 μm, Merck Millopore)을 통과시켜 여과한다. 이어서, 여과된 용액을 AKTA 익스플로러 크로마토그래피 시스템(GE Healthcare)을 갖는 크기 배제 크로마토그래피(SEC)용 컬럼(세파크릴 S-300 HR HiPrep 26/60, GE Healthcare)에 로딩한다. 1500mAU 이상의 밀리 흡광도 단위(mAU)를 갖는 분획을 풀링한다. 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인을 함유하는 풀링된 샘플을 실온에서 15분 동안 6.35의 pH에서 100mM 하이드록실아민으로 처리한다. 처리 후 하이드록실아민을 제거하기 위해, 샘플을 PD10 컬럼 (컬럼 당 2.5mL) 상에 로딩하고, 100mM NaH_2PO_4 , 140mM NaCl, 1mM EDTA, pH 7.2를 함유하는 3.5mL의 완충제로 용리한다. PD10 용출액을 풀링하고, 0.45 μm 필터로 멸균 여과하고 이어서 0.22 μm 필터로 멸균 여과한 다음, 샘플을 동결시키고, -80° C에서 저장한다. 동결 전에, 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인 시약의 최종 농도를 측정하고, 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인 시약의 크기를 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정한다.

[0439] 일부 구현예에서, 항-CD3 항체 및 항-CD28 Fab 항체와 같은 자극제를 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인 시약에 가역적으로 결합시킴으로써 다량체화하였다. 일부 구현예에서, 자극제, 예를 들어 항-CD3 및 항-CD28 Fab 단편

은 각각의 자극제, 예를 들어 각각의 Fab 단편에 융합된 스트렙타비딘 펩타이드-결합 파트너를 통해 스트렙타비딘-뮤테인 올리고머에 가역적으로 결합된다. 일부 구현예에서, 항-CD3 Fab 단편은 하이브리도마 세포주 OKT3(ATCC® CRL-8001™; 또한 미국 특허 번호 4,361,549 참조)에 의해 생산된 CD3 결합 단클론 항체로부터 유래되고, 문헌 [Arakawa 등, J Biochem 120, 657-662 (1996)]에 기술된 항-CD3 항체 OKT3의 중쇄 가변 도메인 및 경쇄 가변 도메인을 함유한다. 이 서열들은 서열 번호: 60 및 61에 각각 제시된다. 일부 구현예에서, 항-CD28 Fab 단편은 항체 CD28.3(GenBank 수탁 번호 AF451974.1 하에 합성 단일 사슬 Fv 구조체로서 기탁됨; 또한 문헌 [Vanhove 등, BLOOD, 15 July 2003, Vol. 102, No. 2, pages 564-570] 참조)으로부터 유래되고, 서열 번호: 62 및 63에 각각 제시된 항-CD28 항체 CD28.3의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인을 함유한다. 예시적인 펩타이드-태그된 Fab 단편에 대해서는, 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO 2013/011011 및 WO 2013/124474]을 참조한다.

[0440] 일부 구현예에서, 복수의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘-뮤테인 4량체로 구성되고/거나 이를 함유하는 올리고머성 입자 시약이 본원에 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 올리고머성 입자 시약은 하나 이상의 제제(예를 들어, 자극제 및/또는 선택제)에 가역적으로 결합하거나 가역적으로 결합할 수 있는 복수의 결합 부위를 함유한다. 일부 구현예에서, 올리고머성 입자는 80nm 내지 120nm(수치 포함)의 반경, 예를 들어, 평균 반경: 7.5×10^6 g/mol 내지 2×10^8 g/mol(수치 포함)의 분자량, 예를 들어, 평균 분자량; 및/또는 500 내지 10,000개 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘-뮤테인 4량체(수치 포함)의 양, 예를 들어, 평균 양을 갖는다. 일부 구현예에서, 올리고머성 입자 시약은 세포의 표면 상에서 분자(예를 들어, 수용체)에 결합하는 제제와 같은 하나 이상의 제제에 결합된다(예를 들어, 가역적으로 결합된다). 일부 구현예에서, 제제는 세포 표면 수용체 및/또는 부속 분자에 결합하여 세포를 자극하는 하나 이상의 제제를 포함한다(예를 들어, 예컨대 TCR 복합체 또는 이의 성분을 표적화하는 항체, 공자극 분자를 표적화하는 항체, 항-CD3 항체, 항-CD28 항체, 또는 항-CD3/항-CD28 Fab). 일부 구현예에서, 제제는 항-CD3 및/또는 항-CD28 Fab인데, 예컨대 결합 파트너, 예를 들어, 스트렙타비딘 결합 펩타이드, 예를 들어, Strep-tag® II를 함유하는 Fab이다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 제제는 결합 파트너, 예를 들어, 스트렙타비딘 결합 펩타이드, 예를 들어, Strep-tag® II를 함유하는 항-CD3 및/또는 항-CD28 Fab이다.

[0441] 일부 구현예에서, 세포는 10^6 개 세포 당 올리고머성 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab)에 접합된, 스트렙타비딘 기반 올리고머, 예컨대 스트렙타비딘-뮤테인 올리고머) (약) 또는 적어도 0.01 µg, 0.02 µg, 0.03 µg, 0.04 µg, 0.05 µg, 0.1 µg, 0.2 µg, 0.3 µg, 0.4 µg, 0.5 µg, 0.75 µg, 1 µg, 1.2 µg, 1.4 µg, 1.6 µg, 1.8 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg, 5 µg, 6 µg, 7 µg, 8 µg, 9 µg, 또는 10 µg의 존재 하에서 자극되거나 자극을 거친다. 일부 구현예에서, 세포는 10^6 개 세포 당 올리고머성 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab)에 접합된, 스트렙타비딘 기반 올리고머, 예컨대 스트렙타비딘-뮤테인 올리고머) (약) 4 µg의 존재 하에서 자극되거나 자극을 거친다. 구체적인 구현예에서, 세포는 10^6 개 세포 당 올리고머성 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab)에 접합된, 스트렙타비딘 기반 올리고머, 예컨대 스트렙타비딘-뮤테인 올리고머) (약) 1.2 µg의 존재 하에서 자극되거나 자극을 거친다. 구체적인 구현예에서, 세포는 10^6 개 세포 당 올리고머성 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab)에 접합된, 스트렙타비딘 기반 올리고머, 예컨대 스트렙타비딘-뮤테인 올리고머) (약) 0.8 µg의 존재 하에서 자극되거나 자극을 거친다. 구체적인 구현예에서, 세포는 10^6 개 세포 당 올리고머성 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab)에 접합된, 스트렙타비딘 기반 올리고머, 예컨대 스트렙타비딘-뮤테인 올리고머) (약) 1.8 µg의 존재 하에서 자극되거나 자극을 거친다. 특정 측면에서, 올리고머성 자극 시약 내에서, 올리고머성 입자와 부착된 제제 사이의 질량비는 약 3:1이다. 특정 측면에서, 올리고머성 자극 시약 내에서, 올리고머성 입자, 부착된 항-CD3 Fab, 및 부착된 항-CD28 Fab 사이의 질량비는 약 3:0.5:0.5이다. 특정 측면에서, 4 µg의 올리고머성 자극 시약은 3 µg의 올리고머성 입자 및 1 µg의 부착된 제제(예를 들어, 0.5 µg의 항-CD3 Fab 및 0.5 µg의 항-CD28 Fab)이거나 이를 포함한다. 다른 예에서, 10^6 개 세포 당 1.2 µg의 올리고머성 자극 시약은 10^6 개 세포 당 0.9 µg의 올리고머성 입자 및 0.3 µg의 부착된 제제(예를 들어, 0.15 µg의 항-CD3 Fab 및 0.15 µg의 항-CD28 Fab)이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 올리고머 자극 시약은 무혈청 배지에 첨가되고, 예를 들어 문헌[PCT/US2018/064627]에 기술된 바와 같이 무혈청 배지에서 자극이 수행된다.

- [0442] 구체적 구현예에서, 투입 집단의 (약) 900×10^6 개 T 세포(예를 들어, 900×10^6 개 CD3+ T 세포, 또는 450×10^6 개 CD4+ T 세포 및 450×10^6 개 CD8+ T 세포)의 양이 올리고머성 자극 시약(예를 들어, Strep-태그된 항-CD3 및 Strep-태그된 항-CD28 Fab에 접합된, 스트렙타비딘 기반 올리고머, 예컨대 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머)의 존재 하에 자극 조건 하에서 자극을 거친다(예를 들어, 배양된다). 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어, 투입 집단의 세포는 예컨대 (약) 또는 적어도 0.01×10^6 cells/mL, 0.1×10^6 cells/mL, 0.5×10^6 cells/mL, 1.0×10^6 cells/mL, 1.5×10^6 cells/mL, 2.0×10^6 cells/mL, 2.5×10^6 cells/mL, 3.0×10^6 cells/mL, 4.0×10^6 cells/mL, 5.0×10^6 cells/mL, 10×10^6 cells/mL, 또는 50×10^6 cells/mL의 밀도의 자극 시약의 존재 하에, 자극 조건에서 자극되거나 자극을 거친다(예를 들어, 배양된다). 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어, 투입 집단의 세포는 예컨대 (약) 또는 적어도 3.0×10^6 cells/mL의 밀도의 자극 시약의 존재 하에, 자극 조건에서 자극되거나 자극을 거친다(예를 들어, 배양된다).
- [0443] 일부 구현예에서, 산출 집단, 예를 들어, 조작된 T 세포의 집단은: T 세포의 또는 이를 함유하는 투입 집단을 올리고머성 자극 입자 시약, 예를 들어 본원에 기술된 올리고머-기반 자극 시약과 함께 (약) 18 내지 30시간 동안(수치 포함) 인큐베이션하는 것; 자극된 집단의 T 세포 내로 재조합 수용체를 암호화하는 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 도입하는 것, (iii) 세포를 정적 조건 하에 인큐베이션하는 것, (iv) 경쟁 시약을 첨가함으로써 세포로부터 자극 시약을 제거 또는 분리하는 것, 및 (v) 인큐베이션된 세포를 채집 또는 수확하는 것을 포함하는 단계들에 의해 생성된다.
- [0444] 특정 구현예에서, 산출 집단, 예를 들어, 조작된 T 세포의 집단은: T 세포를 포함하는 투입 집단을 자극 조건 하에 18 내지 30시간 동안(수치 포함), 세포 표면 수용체 및/또는 부속 분자에 결합하여 세포를 자극하는 하나 이상의 제제(예를 들어, 예컨대 TCR 복합체 또는 이의 성분을 표적화하는 항체, 공자극 분자를 표적화하는 항체, 항-CD3 항체, 항-CD28 항체, 또는 항-CD3/항-CD28 Fab)에 가역적으로 부착된 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머의 존재 하에, 인큐베이션하는 것; 예컨대 자극된 T 세포를 바이러스 벡터의 존재 하에 회전 접종함으로써, 자극된 T 세포를 재조합 수용체를 암호화하는 바이러스 벡터로 형질도입한 후, 형질도입된 T 세포를 정적 조건에서 (약) 42시간 내지 84시간 동안(수치 포함) 인큐베이션하는 것; 및 T 세포를 수확 또는 채집하는 것을 포함하는 단계들에 의해 생성된다.
- [0445] 일부 구현예에서, 조작된 세포의 집단을 생산하기 위한 제공된 방법은: 가역적으로 부착된 항-CD3/항-CD28 Fab를 갖는 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인의 존재 하에 T 세포의 투입 집단을, 재조합 IL-2, IL-7, 및 IL-15를 함유하는 무혈청 배지에서, 10^6 개 세포 당 (약) $0.4 \mu\text{g}$ 내지 $8 \mu\text{g}$ (수치 포함)의 양으로, 예를 들어, 10^6 개 세포 당 $1.2 \mu\text{g}$ 의 양으로, 18 내지 30시간 동안(수치 포함) 자극하는 단계; 먼저 693g의 힘에서 30분 동안 바이러스 벡터의 존재 하에 세포를 회전 접종함으로써 재조합 수용체를 암호화하는 바이러스 벡터로 세포를 형질도입하고 이어서 회전 접종된 세포를 바이러스 벡터와 약 24시간 내지 96시간 동안(수치 포함) 인큐베이션하는 단계; 가역적으로 부착된 항-CD3/항-CD28 Fab를 갖는 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인을 세포로부터 제거 또는 분리하기 위해 세포에 비오틴(예를 들어, D-비오틴)을 첨가하는 단계; 및 세포를 채집 또는 수확하는 단계 중 하나 이상을 포함한다.
- [0446] 일부 구현예에서, 세포는 자극의 개시로부터 (약) 36시간 내지 96시간(수치 포함) 사이에 수확 또는 채집된다. 다양한 구현예에서, 세포는 자극의 개시 이후 36시간 내지 108시간 또는 48시간 내지 96시간(수치 포함) 사이에 수확 또는 채집된다. 구체적 구현예에서, 가역적으로 부착된 항-CD3/항-CD28 Fab를 갖는 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인은 자극의 개시 이후 36시간 내지 96시간 또는 48시간 내지 72시간(수치 포함) 사이에 세포로부터 제거 또는 분리된다.
- [0447] 일부 구현예에서, 가역적으로 부착된 항-CD3/항-CD28 Fab를 갖는 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인은 자극의 개시로부터 (약) 48시간 후에, 예를 들어 48시간 ± 6 시간 후에, (예를 들어, 섹션 II-C-6에 기술된 바와 같이) 세포로부터 제거 또는 분리된다. 구체적 구현예에서, 가역적으로 부착된 항-CD3/항-CD28 Fab를 갖는 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인은 자극의 개시로부터 (약) 72시간 후에, 예를 들어, 72시간 ± 6 시간 후에 세포로부터 제거 또는 분리된다. 구체적 구현예에서, 가역적으로 부착된 항-CD3/항-CD28 Fab를 갖는 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인은 자극의 개시로부터 (약) 96시간 후에, 예를 들어, 96시간 ± 6 시간 후에 세포로부터 제거 또는 분리된다. 구체적 구현예에서, 가역적으로 부착된 항-CD3/항-CD28 Fab를 갖는 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인은 인큐베이션 이후에 세포로부터 제거 또는 분리되며, 세포는 비오틴 또는 비오틴 유사체의 첨가 이후에 채집 또는

수확된다. 특정 구현예에서, 가역적으로 부착된 항-CD3/항-CD28 Fab를 갖는 올리고머성 스트랩타비딘 뮤테인은 인큐베이션 동안 세포로부터 제거 또는 분리되며, 세포는 비오티ن 또는 비오티인 유사체의 첨가 후 인큐베이션으로 복귀된다.

[0448] 일부 구현예에서, 인큐베이션은 무혈청 배지에서 재조합 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL-7, 및 IL-15)의 존재 하에 수행된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 재조합 사이토카인의 부재 하에 수행된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 기본 배지의 존재 하에 수행된다. 특정 구현예에서, 기본 배지에서 인큐베이션은, 올리고머성 자극 시약으로 자극된 세포가 재조합 사이토카인을 함유하는 무혈청 배지의 존재 하에 인큐베이션되는 공정과 비교하여, 통합, 예를 들어 이중 또는 재조합 뉴클레오타이드의 안정한 통합을 증가시키거나, 재조합 수용체를 발현하는 세포의 백분율을 증가시키거나, 효능을 개선시키거나, 또는 세포의 분화를 감소시킨다.

[0449] 구체적인 구현예에서, 올리고머성 자극 시약, 예를 들어 가역적으로 부착된 항-CD3/항-CD28 Fab를 갖는 올리고머성 스트랩타비딘 뮤테인의, 예컨대 비오티인 또는 비오티인 유사체의 첨가에 의한, 제거는, 자극 시약이 세포로부터 분리 또는 제거될 때 발생할 수 있는 세포 손실의 양을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 올리고머성 자극 시약이 세포로부터 분리되거나 제거될 때, 세포의 (약) 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만이 세포 집단으로부터 손실되거나, 사멸되거나, 분리된다. 특정 구현예에서, 자극을 위해 올리고머성 자극 시약을 사용하는 공정들로부터 생성된 산출 집단은 항체 접합 상자성 비드와 같은 대체 자극 시약을 이용하는 공정들로부터 생성된 산출 집단보다 (약) 또는 적어도 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 더 많은 총 세포를 갖는다.

[0450] 3. 유전자 조작을 위한 벡터 및 방법

[0451] 일부 구현예에서, 제공된 방법, 용도, 제조품 또는 조성물과 관련하여 사용되는 T 세포와 같은 조작된 세포는 본원에 기술된 재조합 수용체(예를 들어, CAR)를 발현하도록 유전자 조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 재조합 수용체 및/또는 다른 분자를 암호화하는 핵산 서열의 도입, 전달 또는 전이에 의해 조작된다.

[0452] 일부 구현예에서, 조작된 세포를 생산하는 방법은 재조합 수용체(예를 들어, 항-CD19 CAR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 세포(예를 들어, 예컨대 자극된 또는 활성화된 세포)에 도입하는 것을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 재조합 단백질은 기술된 임의의 것과 같은 재조합 수용체이다. 세포에 재조합 수용체와 같은 재조합 단백질을 암호화하는 핵산 분자의 도입은 알려진 다수의 임의의 벡터를 사용하여 수행될 수 있다. 상기 벡터에는 렌티바이러스 및 감마레트로바이러스 시스템을 포함한 바이러스 및 비-바이러스 시스템뿐만 아니라 PiggyBac 또는 Sleeping Beauty 기반 유전자 전달 시스템과 같은 트랜스포손 기반 시스템이 포함된다. 예시적인 방법은 바이러스성(예를 들어, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스성) 형질도입, 트랜스포손 및 전기 천공법을 통한 것을 포함하여 수용체를 암호화하는 핵산의 전이를 위한 방법을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작은 하나 이상의 조작된 농축된 T 세포 조성물을 생산한다.

[0453] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 세포를 유전자 조작하는 것, 예를 들어 재조합 단백질을 암호화하는 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 도입하는 것을 포함한다. 상기 재조합 단백질은 섹션 II-A에 기술된 임의의 것과 같은 재조합 수용체를 포함할 수 있다. 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 T 세포와 같은 세포의 계통 내 통합을 초래할 수 있는 이중 또는 재조합 수용체를 도입하는 임의의 방법은 유전자 조작의 바이러스 및 비바이러스 방법을 포함하여, 사용될 수 있다. 세포에 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드)의 도입은 임의의 알려진 다수의 벡터를 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 벡터는 렌티바이러스 및 감마레트로바이러스를 포함하여 바이러스 시스템을 포함한다. 예시적인 방법은 바이러스성(예를 들어, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스성) 형질도입을 통한 것을 포함하여 수용체를 암호화하는 이중 폴리뉴클레오타이드의 전이를 위한 방법을 포함한다. 일부 구현예에서, 자극된 세포의 집단은, 예컨대 재조합 수용체를 암호화하는 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 도입하여 형질전환된 세포의 집단(본원에서 세포의 형질전환된 집단으로도 지칭됨)을 생성하도록, 유전자 조작된다.

[0454] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 세포를 유전자 조작하는 것, 예를 들어 비-바이러스 방법, 예컨대 전기 천공, 인산칼슘 형질주입, 원형질체 융합, 양이온성 리포솜-매개 형질주입, 나노입자, 예컨대 지질 나노입자, 텅스텐 입자 촉진 마이크로입자 충격, 인산 스트론튬 DNA 공동 침전, 및 예를 들어 문헌[W0 2014055668, 및 미국 특허 번호 7,446,190]에 기술된 다른 접근법을 사용하여, 재조합 단백질을 암호화하는 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 도입하는 것을 포함한다. 트랜스포손 기반 시스템 또한 고려된다.

[0455] 구체적인 구현예에서, 세포는, 세포가 자극 조건 하에, 예컨대 본원에, 예를 들어 섹션 II에, 제공된 임의의 방법에 의해 자극, 활성화 및/또는 인큐베이션된 후에 유전자 조작, 형질전환 또는 형질도입된다. 구체적인 구현

예에서, 하나 이상의 자극된 집단은 이전에 동결 보호 및 저장되었고, 세포를 유전자 조작, 형질전환, 형질주입, 또는 형질도입하기 전에 해동되고 선택적으로 세척된다.

[0456] 구체적인 구현예에서, 세포는 세포가 자극 조건에서 자극되거나 자극을 거치거나 배양된 후에 유전자 조작, 형질전환, 또는 형질도입된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 자극의 개시로부터 (약) 72시간, 60시간, 48시간, 36시간, 24시간, 또는 12시간에 또는 그 이내에(수치 포함) 유전자 조작, 형질전환, 또는 형질도입된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 자극의 개시로부터 (약) 3일, 2일, 또는 1일에 또는 그 이내에(수치 포함) 유전자 조작, 형질전환, 또는 형질도입된다. 특정 구현예에서, 세포는 자극의 개시 이후 (약) 12시간 내지 48시간, 16시간 내지 36시간, 또는 18시간 내지 30시간 사이에 유전자 조작, 형질전환, 또는 형질도입된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 자극의 개시 이후 (약) 18시간 내지 30시간 사이에 유전자 조작, 형질전환, 또는 형질도입된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 자극의 개시 이후 (약) 16시간, 18시간, 20시간, 22시간, 또는 24시간 후에 유전자 조작, 형질전환, 또는 형질도입된다.

[0457] 특정 구현예에서, 유전자 조작 방법은 재조합 단백질, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오타이드와 집단의 하나 이상의 세포를 접촉시키거나 도입함으로써 수행된다. 특정 구현예에서, 핵산 분자 또는 폴리뉴클레오타이드는 상기 세포에 대한 이중이다. 구체적인 구현예에서, 이중 핵산 분자 또는 이중 폴리뉴클레오타이드는 상기 세포에 대해 천연이 아니다. 특정 구현예에서, 이중 핵산 분자 또는 이중 폴리뉴클레오타이드는 상기 세포에 의해 천연으로 발현되지 않는 단백질(예를 들어, 재조합 단백질)을 암호화한다. 구체적인 구현예에서, 이중 핵산 분자 또는 이중 폴리뉴클레오타이드는 접촉 또는 도입 전에 세포에서 발견되지 않는 핵산 서열이거나 이를 함유한다.

[0458] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 자극된 세포)는 형질도입 보조제의 존재 하에 조작(예를 들어, 형질도입)된다. 예시적인 형질도입 보조제는 다가 양이온, 피브로넥틴 또는 피브로넥틴 유래 단편 또는 변이체, 및 레트로넥틴을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, 세포는 다가 양이온, 피브로넥틴 또는 피브로넥틴 유래 단편 또는 변이체, 및 레트로넥틴의 존재 하에 조작된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 폴리브렌, DEAE-덱스트란, 프로타민 황산염, 폴리-L-리신 또는 양이온성 리포솜인 다가 양이온의 존재 하에 조작된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 프로타민 황산염의 존재 하에 조작된다. 일부 구현예에서, 예를 들어 섹션 II-C-2에 기술된 바와 같은, 올리고머성 자극 시약의 존재는 형질도입 보조제로 작용할 수 있으며, 예를 들어, 본원에 참조로 포함되는 문헌[WO/2017/068419]을 참조한다.

[0459] 일부 구현예에서, 유전자 조작(예를 들어, 형질도입)은 무혈청 배지에서, 예를 들어, 본원에 또는 문헌[PCT/US2018/064627]에 기술된 바와 같이, 수행된다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 명확한 또는 아주 명확한 세포 배양 배지이다. 특정 구현예에서, 무혈청 배지는 억제제 및/또는 성장 인자를 제거하기 위해 처리된, 예를 들어 여과된 조절된 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 단백질을 함유한다. 특정 구현예에서, 무혈청 배지는 혈청 알부민, 가수 분해물, 성장 인자, 호르몬, 운반체 단백질, 및/또는 부착 인자를 함유할 수 있다.

[0460] 구체적인 구현예에서, 세포는 하나 이상의 사이토카인의 존재 하에서 조작된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 재조합 사이토카인이다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 T 세포에 대해 내인성이고/거나 T 세포에 의해 발현되는 수용체에 결합하고/거나 결합할 수 있다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 사이토카인의 4-알파-나선 번들 패밀리의 멤버이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인의 4-알파-나선 번들 패밀리의 멤버는 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-9(IL-9), 인터루킨 12(IL-12), 인터루킨15(IL-15), 과립구 집락 자극 인자(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), 및 과립구-대식세포 집락 자극 인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)를 포함하되 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IL-15이거나 이를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IL-7이거나 이를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2이거나 이를 포함한다.

[0461] 구체적인 구현예에서, 세포, 예를 들어 자극된 세포가 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 존재 하에 자극 조건에서 조작된다. 특정 구현예에서, IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15는 재조합형이다. 특정 구현예에서, IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15는 인간형이다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 세포는 재조합 IL-2, IL-7, 및 IL-15, 예컨대 재조합 인간 IL-2 (예를 들어, 100 IU/mL), 재조합 인간 IL-7(예를 들어, 600 IU/mL), 및/또는 재조합 인간 IL-15(예를 들어, 100

IU/mL)의 존재 하에 자극 조건에서 조작(예를 들어, 형질도입)된다.

- [0462] 일부 구현예에서, 세포는 자극 동안 존재하는 것과 동일하거나 유사한 배지의 존재 하에 유전자 조작되거나, 형질전환되거나, 또는 형질도입된다. 일부 구현예에서, 세포는 자극 동안 존재하는 배지와 동일한 사이토카인을 가진 배지에서 유전자 조작되거나, 형질전환되거나, 또는 형질도입된다. 특정 구현예에서, 세포는 자극 동안 존재하는 배지와 동일한 농도의 동일한 사이토카인을 가진 배지에서 유전자 조작되거나, 형질전환되거나, 또는 형질도입된다.
- [0463] 일부 구현예에서, 세포를 유전자 조작하는 것은 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드)를 형질도입에 의해 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 바이러스 벡터로 형질도입되거나 형질도입을 거친다. 구체적인 구현예에서, 세포는 바이러스 벡터로 형질도입되거나 형질도입을 거친다. 일부 구현예에서, 바이러스는 감마레트로바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터와 같은 레트로바이러스 벡터이다. 렌티바이러스 형질도입 방법은 알려져 있다. 예시적인 방법이 예를 들어, 문헌[Wang 등 (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper 등 (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeyen 등 (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; 및 Cavalieri 등 (2003) Blood. 102(2): 497-505]에 기술되어 있다.
- [0464] 일부 구현예에서, 형질도입은 재조합 단백질을, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 분자와 집단의 하나 이상의 세포를 접촉시킴으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 접촉은 회전 접촉(예를 들어, 원심분리 접촉)과 같은 원심분리로 달성될 수 있다. 이러한 방법은 문헌[국제 공개 번호 W02016/073602]에 기술된 바와 같은 임의의 것을 포함한다. 예시적인 원심분리 챔버는 Biosafe SA에 의해 생산 및 판매되는 챔버를 포함하며, Sepax® 및 Sepax® 2 시스템과 함께 사용하기 위한 챔버를 포함하고, A-200/F 및 A-200 원심분리 챔버 및 상기 시스템과 함께 사용하기 위한 다양한 키트를 포함한다. 예시적인 챔버, 시스템 및 가공 기기 및 캐비닛은 예를 들어 문헌[미국 특허 번호 6,123,655, 미국 특허 번호 6,733,433 및 미국 특허 출원 공개 번호 US 2008/0171951, 및 국제 특허 출원 공개 번호 W0 00/38762]에 기술되어 있고, 각각의 내용은 본원에 그 전체가 참조로 포함된다. 상기 시스템과 함께 사용하기 위한 예시적인 키트는 제품 이름 CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 또는 CS-900.2로 BioSafe SA에서 판매되는 일회용 키트를 포함하나 이에 한정되지는 않는다.
- [0465] 구체적인 구현예에서, 자극 조건에서 자극을 거친(예를 들어, 배양된) 조성물의 (약) 또는 적어도 50×10^6 , 100×10^6 , 150×10^6 , 200×10^6 , 250×10^6 , 300×10^6 , 350×10^6 , 400×10^6 , 450×10^6 , 500×10^6 , 550×10^6 , 600×10^6 , 700×10^6 , 800×10^6 , 900×10^6 , 또는 $1,000 \times 10^6$ 개 세포의 양이 유전자 조작(예를 들어, 형질도입)을 거친다. 구체적인 구현예에서, 자극을 거친 후 형질도입을 거친 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포 둘 다를 포함하는 세포, 예를 들어 생존 T 세포의 총 수는 (약) 50×10^6 개 세포, (약) 100×10^6 개 세포, (약) 150×10^6 개 세포, (약) 200×10^6 개 세포, (약) 250×10^6 개 세포, (약) 300×10^6 개 세포, (약) 350×10^6 개 세포, (약) 400×10^6 개 세포, (약) 450×10^6 개 세포, (약) 500×10^6 개 세포, (약) 550×10^6 개 세포, (약) 600×10^6 개 세포, (약) 700×10^6 개 세포, (약) 800×10^6 개 세포, (약) 900×10^6 개 세포, 또는 (약) $1,000 \times 10^6$ 개 세포, 또는 전술한 임의의 수치 사이의 임의의 값이다. 구체적인 구현예에서, 최대 900×10^6 개 세포의 투입 집단이 자극을 거치고, 자극을 거친 세포 중 (약) 또는 최대 600×10^6 개 세포의 양이 유전자 조작(예를 들어, 형질도입)을 거친다. 구체적인 구현예에서, 유전자 조작(예를 들어, 형질도입)을 거친 세포 조성물은 생존 CD4+ T 세포 및 생존 CD8+ T 세포를 1:10 내지 10:1, 1:5 내지 5:1, 4:1 내지 1:4, 1:3 내지 3:1, 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.25:1 내지 1:1.25, 1.2:1 내지 1:1.2, 1.1:1 내지 1:1.1, 또는 약 1:1의 비로 포함하거나, 또는 1:1 생존 CD4+ T 세포 대 생존 CD8+ T 세포를 포함한다.
- [0466] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 바이러스 벡터를 자극된 세포 집단의 (약) 300×10^6 개 또는 그 미만의 세포(예를 들어, 생존 T 세포) 내로 형질도입하는 것과 관련하여 사용된다. 특정 구현예에서, 자극된 세포 집단의 (약) 100×10^6 개 세포(예를 들어, 생존 T 세포)가 형질도입되거나 형질도입을 거친다.
- [0467] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 바이러스 벡터를 자극된 세포 집단의 (약) 600×10^6 개 또는 그 미만의 세포(예를 들어, 생존 T 세포) 내로 형질도입하는 것과 관련하여 사용된다. 특정 구현예에서, 자극된 세포 집단의 (약) 600×10^6 개 세포(예를 들어, 생존 T 세포)가

형질도입되거나 형질도입을 거친다. 일부 구현예에서, 최대 900×10^6 개 세포(예를 들어, 생존 CD3+ 세포 또는 혼합된 생존 CD4+ 및 생존 CD8+ 세포(예를 들어, (약) 1:1의 비로 혼합됨))가 자극을 거치고, 자극을 거친 (약) 또는 최대 600×10^6 개 세포가 형질도입을 거친다.

[0468] 일부 구현예에서, 형질도입은 무혈청 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 형질도입은 IL-2, IL-7, 및 IL-15의 존재 하에 수행된다. 일부 구현예에서, 형질도입을 위한 바이러스 벡터는 사용 전에 동결 및 해동되고, 해동된 바이러스 벡터는 무혈청 배지로 희석된다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터를 희석하기 위한 및 형질도입을 위한 무혈청 배지 본원에 또는 문헌[PCT/US2018/064627]에 기술된 바와 같다.

[0469] 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 하나 이상의 보충물(supplement)이 보충된 기본 배지(예를 들어, OpTmizer™ T-세포 증폭 기본 배지(ThermoFisher))를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 보충물은 무혈청이다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 세포(예를 들어, T 세포)의 유지보수, 증폭, 및/또는 활성화를 위해, 예컨대 추가 보충물(예를 들어, OpTmizer™ T-세포 증폭 보충물(ThermoFisher))에 의해 제공된, 하나 이상의 추가 성분이 보충된 기본 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 혈청 대체물 보충물, 예를 들어, 면역 세포 혈청 대체물, 예를 들어 ThermoFisher #A2596101, CTS™ 면역 세포 혈청 대체물, 또는 문헌[Smith 등 *Clin Transl Immunology*. 2015 Jan; 4(1): e31]에 기술된 면역 세포 혈청 대체물을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 유리 형태(free form)의 아미노산, 예컨대 L-글루타민을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 L-글루타민의 다이펩타이드 형태(예를 들어, L-알라닐-L-글루타민), 예컨대 *Glutamax*™ (ThermoFisher)에서 다이펩타이드를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 하나 이상의 제조합 사이토카인, 예컨대 제조합 인간 IL-2, 제조합 인간 IL-7, 및/또는 제조합 인간 IL-15를 더 포함한다.

[0470] 구체적인 구현예에서, 세포, 예를 들어 자극된 세포 집단의 세포는 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 세포인 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 형질도입 후 인큐베이션을 포함한 형질도입은 24 내지 48시간, 36 내지 12시간, 18 내지 30시간, 또는 (약) 24시간 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 형질도입 후 인큐베이션을 포함한 형질도입은 각각 (약) 24시간, 48시간 또는 72시간 동안 또는 (약) 1일, 2일 또는 3일 동안 수행된다. 구체적인 구현예에서, 형질도입 후 인큐베이션을 포함한 형질도입은 (약) 24시간 $\pm$ 6시간, 48시간 $\pm$ 6시간 또는 72시간 $\pm$ 6시간 동안 수행된다. 구체적인 구현예에서, 형질도입 후 인큐베이션을 포함한 형질도입은 (약) 72시간, 72 $\pm$ 4시간 동안 또는 (약) 3일 동안 수행된다.

[0471] 특정 구현예에서, 형질도입 단계는 인큐베이션, 예를 들어 자극 조건에서 인큐베이션의 시작 또는 개시의 2일 이내, 36시간 이내, 30시간 이내, 24시간 이내, 18시간 이내, 16시간 이내, 14시간 이내, 또는 12시간 이내에 개시된다. 특정 구현예에서, 형질도입 단계는 인큐베이션, 예를 들어 자극 조건에서 인큐베이션의 시작 또는 개시의 약 20시간에 개시된다. 특정 구현예에서, 형질도입 단계는 인큐베이션, 예를 들어 자극 조건에서 인큐베이션의 시작 또는 개시의 20 $\pm$ 4시간에 개시된다.

[0472] 일부 구현예에서, 시스템은 시스템에서 수행되는 형질도입 단계 및 하나 이상의 다양한 다른 가공 단계, 예를 들어 본원 또는 문헌[국제 공개 번호 W02016/073602]에 기술된 바와 같은 원심분리 챔버 시스템으로 수행되거나 이와 관련하여 수행될 수 있는 하나 이상의 가공 단계의 측면을 작동, 자동화, 제어 및/또는 모니터링하기 위한 기기를 포함하여 다른 기기와 공동으로 포함되고/거나 이와 공동으로 배치된다. 일부 구현예에서 상기 기기는 캐비닛 내에 포함되어 있다. 일부 구현예에서, 상기 기기에는 제어 회로, 원심분리기, 커버, 모터, 펌프, 센서, 디스플레이 및 사용자 인터페이스를 수용한 하우징을 포함한 캐비닛이 포함된다. 예시적인 디바이스가 문헌[미국 특허 번호 6,123,655, 미국 특허 번호 6,733,433 및 US 2008/0171951]에 기술되어 있다.

[0473] 일부 구현예에서, 시스템은 일련의 용기, 예를 들어 백, 튜빙, 스톱콕, 클램프, 커넥터 및 원심분리 챔버를 포함한다. 일부 구현예에서, 백과 같은 용기는 동일한 백 또는 별도의 백과 같은 동일한 용기 또는 별도의 용기에 형질도입된 세포 및 바이러스 벡터 입자를 함유하는 백과 같은 하나 이상의 용기를 포함한다. 일부 구현예에서, 시스템은 챔버 내로 들어오는 희석제 및/또는 세척 용액 및/또는 방법 중에 성분 및/또는 집단을 희석, 재현탁 및/또는 세척하기 위한 기타 성분 같은 배지를 함유하는, 백 같은 하나 이상의 용기를 추가로 포함한다. 용기는 시스템의 하나 이상의 위치에, 예컨대 입력 라인, 희석 라인, 세척 라인, 폐기물 라인 및/또는 산출 라인에 대응하는 위치에 연결될 수 있다.

[0474] 일부 구현예에서, 챔버는 예컨대 회전축 주위로 챔버를 회전시킬 수 있는 원심분리기와 결합되어 있다. 회전은 세포의 형질도입과 관련하여 및/또는 다른 가공 단계 중 하나 이상에서 인큐베이션 이전, 도중 및/또는 이후에 이루어질 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 하나 이상의 다양한 가공 단계는 예를 들어, 특정 힘으로 회전되

면서 수행된다. 챔버가 원심분리 중에 수직으로 위치하고 측벽과 축은 수직 또는 일반적으로 수직이며, 말단 벽은 수평 또는 일반적으로 수평이 되도록, 전형적으로 챔버는 수직 또는 일반적으로 수직 회전할 수 있다.

[0475] 일부 구현예에서, 세포를 함유하는 집단과 바이러스 벡터 입자를 함유하는 집단, 및 선택적으로 공기가 집단들을 공동에 제공하기 전에 조합되거나 혼합될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포를 함유하는 집단과 바이러스 벡터 입자를 함유하는 집단, 및 선택적으로 공기가 개별적으로 제공되고 동공에서 조합 및 혼합된다. 일부 구현예에서, 세포를 함유하는 집단과 바이러스 벡터 입자를 함유하는 집단, 및 선택적으로 공기가 임의의 순서로 내부 공동에 제공될 수 있다. 상기 임의의 일부 구현예에서, 세포 및 바이러스 벡터 입자를 함유하는 집단은, 이들이 원심분리 챔버 내부 또는 외부에서 조합 또는 혼합되든 및/또는 세포 및 바이러스 벡터 입자가 원심분리 챔버에 함께 또는 개별적으로, 예컨대 동시에 또는 순차적으로 제공되든, 함께 조합 또는 혼합된 투입 집단이다.

[0476] 일부 구현예에서, 형질도입 방법에서 공기와 같은 일정 부피의 기체의 흡입이 세포 및 바이러스 벡터 입자의 인큐베이션 전에 예컨대 회전 전에 일어난다. 일부 구현예에서, 형질도입 방법에서 공기와 같은 일정 부피의 기체의 흡입이 세포 및 바이러스 벡터 입자의 인큐베이션 동안에 예컨대 회전 동안에 일어난다.

[0477] 일부 구현예에서, 형질도입 집단을 구성하는 세포 또는 바이러스 벡터 입자의 액체 부피, 및 선택적으로 공기 부피는 미리 정해진 부피일 수 있다. 상기 부피는 시스템과 관련된 회로에 프로그램되고/거나 그 회로에 의해 제어되는 부피일 수 있다.

[0478] 일부 구현예에서, 형질도입 집단과, 선택적으로 공기 등의 기체의 흡입은 원하는 또는 미리 정해진 부피가 챔버의 내부 공동으로 들어갈 때까지 수동으로, 반자동으로 및/또는 자동으로 제어된다. 일부 구현예에서, 시스템과 관련된 센서는 원심분리 챔버에 흘러 들어가고 그로부터 나오는 액체 및/또는 기체를 예컨대 그 색상, 유속 및/또는 밀도를 통해 감지할 수 있고, 원하는 또는 미리 정해진 부피가 달성될 때까지 필요한 대로 흡입을 멈추거나 계속하도록 관련된 회로와 통신할 수 있다. 일부 측면에서, 시스템에서 기체(예를 들어, 공기)가 아닌 액체만 감지하도록 프로그램되거나 액체만 감지할 수 있는 센서는 시스템 내로 흡입을 멈추지 않고 기체(예컨대 공기)의 통과를 허용할 수 있도록 만들어질 수 있다. 일부 상기 구현예에서, 공기와 같은 기체 흡입이 필요한 동안 불투명 튜빙 조각을 센서 근처의 라인에 배치할 수 있다. 일부 구현예에서, 공기와 같은 기체의 흡입은 수동으로 제어될 수 있다.

[0479] 제공된 방법의 측면에서, 원심분리 챔버의 내부 공동은 고속 회전을 거친다. 일부 구현예에서, 회전은 액체 투입 집단과, 선택적으로 공기의 흡입 전에, 그와 동시에, 그 이후에 또는 간헐적으로 수행된다. 일부 구현예에서, 회전은 액체 투입 집단과, 선택적으로 공기의 흡입 이후에 수행된다. 일부 구현예에서, 회전은 내부 공동의 측벽의 내부 표면에 및/또는 세포의 표면층에 (약) 또는 적어도 (약) 200g, 300g, 400g, 500g, 600g, 700g, 800g, 1000g, 1100g, 1500g, 1600g, 1800g, 2000g, 2200g, 2500g, 3000g, 3200g, 3500g 또는 4000g의 상대 원심력으로 원심분리 챔버의 원심분리에 의해 이루어진다. 일부 구현예에서, 회전은 약 1100g 이상, 예컨대 약 1200g 이상, 약 1400g 이상, 약 1600g 이상, 약 1800g 이상, 약 2000g 이상, 약 2400g 이상, 약 2800g 이상, 약 3000g 이상 또는 약 3200g 이상의 힘으로 원심분리에 의해 이루어진다. 구체적인 구현예에서, 원심분리에 의한 회전은 600g 내지 800g 사이의 힘으로 이루어진다. 구체적인 구현예에서, 원심분리에 의한 회전은 (약) 693g의 힘으로 이루어진다. 일부 구현예에서, 회전은 (약) 1600g의 힘으로 원심분리에 의해 이루어진다.

[0480] 일부 구현예에서, 챔버의 공동 내의 기체(예컨대 공기)가 챔버로부터 배출된다. 일부 구현예에서, 공기 등의 기체는 원심분리 챔버와 폐쇄 시스템의 일부로서 작동 가능하게 연결된 용기로 배출된다. 일부 구현예에서, 용기는 비어있거나 비어 있는 용기이다. 일부 구현예에서, 챔버의 공동 내의 공기 등의 기체는 멸균 배관 라인을 통해 챔버의 내부 공동에 작동 가능하게 연결된 필터를 통해 배출된다. 일부 구현예에서, 공기는 수동, 반자동 또는 자동 공정을 이용해 배출된다. 일부 구현예에서, 공기는, 형질도입이 개시되었거나 세포가 바이러스 벡터로 형질도입된 세포 등의 인큐베이션된 세포 및 바이러스 벡터 입자를 함유한 산출 집단을 챔버의 공동으로부터 발현하기 전에, 그와 동시에, 간헐적으로, 또는 그 이후에 챔버로부터 방출된다.

[0481] 일부 구현예에서, 형질도입 및/또는 다른 인큐베이션은 연속 또는 반-연속 공정으로서 또는 그 일부로서 수행된다. 일부 구현예에서, 연속 공정은 세포 및 바이러스 벡터 입자, 예를 들어, 형질도입 조성물(단일 기존 조성물로서 또는 동일한 용기 예를 들어 공동으로 연속적으로 끌어 넣음으로서, 그렇게 하여 그 부분을 혼합하여)의 연속 흡입 및/또는 인큐베이션의 적어도 일부 동안, 예를 들어 원심분리하는 동안, 용기로부터 액체의 연속 발현 또는 방출, 및 선택적으로 기체(예를 들어, 공기)의 방출을 포함한다. 일부 구현예에서, 연속 흡입 및 연속 발현은 적어도 부분적으로 동시에 수행된다. 일부 구현예에서, 연속 흡입은 인큐베이션의 일부 중, 예를 들어 원심분리의 일부 중 일어나고, 연속 발현은 인큐베이션의 별도 일부 중 일어난다. 상기 둘은 교대로 될 수

있다. 따라서, 인큐베이션을 수행하는 중에, 연속 흡입 및 발현은 가공(예를 들어, 형질도입)될 샘플의 전체 부피를 더 크게 할 수 있다.

- [0482] 일부 구현예에서, 인큐베이션은 연속 공정의 일부이고, 상기 방법은 인큐베이션 중 적어도 일부 동안 상기 형질도입 조성물을 공동 내로 챔버의 회전 동안 연속 흡입되게 하는 것, 및 인큐베이션의 일부 동안, 챔버의 회전 동안 적어도 하나의 개구를 통해 공동으로부터 액체의 연속 발현이 되게 하는 것, 그리고 선택적으로 기체(예를 들어, 공기)를 방출하는 것을 포함한다.
- [0483] 일부 구현예에서, 반-연속 인큐베이션은 조성물을 공동 내로 흡입, 인큐베이션, 공동으로부터 예컨대 출력 용기로 액체의 발현, 및 선택적으로 공동으로부터 기체(예를 들어, 공기)의 방출 사이를 번갈아 하고, 그런 후 가공을 위한 추가적인 세포 및 다른 시약, 예를 들어 바이러스 벡터 입자를 함유한 후속(예를 들어, 제2, 제3 등) 조성물의 흡입 및 공정을 반복하여 수행된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 인큐베이션은 반-연속 공정의 일부이고, 상기 방법은 인큐베이션 전에 형질도입 조성물을 상기 적어도 하나의 개구를 통해 공동 내로 흡입을 실행하고, 인큐베이션 후에, 공동으로부터 유체의 발현을 실행하는 단계; 세포 및 바이러스 벡터 입자를 포함한 다른 형질도입 조성물을 상기 내부 공동 내로 흡입을 실행하는 단계; 및 상기 다른 형질도입 조성물 내 상기 세포가 상기 벡터로 형질도입되거나 형질도입을 거치는 조건에서 상기 내부 공동에서 상기 다른 형질도입 조성물을 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 상기 공정은 다수의 추가 라운드 동안 반복적인 방식으로 계속될 수 있다. 이와 관련하여, 반연속 또는 연속 방법은 훨씬 더 큰 부피 및/또는 수의 세포를 생산할 수 있다.
- [0484] 일부 구현예에서, 형질도입 인큐베이션의 일부는 원심분리 챔버에서 수행되고, 이는 회전 또는 원심분리를 포함하는 조건에서 수행된다.
- [0485] 구체적인 구현예에서, 바이러스 벡터로 세포의 형질도입은 세포 및 바이러스 입자를 함유하는 혼합물의 회전 접종, 예를 들어 원심분리이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 및 바이러스 입자를 함유하는 조성물을 일반적으로 상대적으로 작은 힘 또는 저속으로, 예컨대 세포를 펠릿화하기 위해 사용되는 것보다 더 낮은 속도, 예컨대 (약) 600rpm 내지 1700rpm(예를 들어 (약) 또는 적어도 600rpm, 1000rpm 또는 1500rpm 또는 1700rpm 이상)으로 회전시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 회전은 예를 들어 챔버 또는 공동의 내벽 또는 외벽에서 측정했을 때, (약) 100g 내지 4000g(예를 들어 (약) 또는 적어도 100g, 200g, 300g, 400g, 500g, 600g, 700g, 800g, 900g, 1000g, 1500g, 2000g, 2500g, 3000g 또는 3500g)의 힘, 예를 들어, 상대 원심력으로 수행된다.
- [0486] 일부 구현예에서, 세포는 바이러스 벡터로 (약) 100g 내지 4000g, 200g 내지 1,000g, 500g 내지 1200g, 1000g 내지 2000g, 600g 내지 800g, 1200g 내지 1800g, 또는 1500g 내지 1800g의 힘, 예를 들어 상대 원심력으로 회전 접종된다. 특정 구현예에서, 세포는 바이러스 벡터 입자로 (약) 또는 적어도 100g, 200g, 300g, 400g, 500g, 600g, 700g, 800g, 900g, 1000g, 1200g, 1500g, 1600g, 2000g, 2500g, 3000g, 3200g, 또는 3500g 동안 회전 접종된다. 일부 구현예에서, 세포는 바이러스 벡터로 (약) 692g 또는 693g의 힘으로 형질도입되거나 형질도입을 거친다. 구체적인 구현예에서, 세포는 바이러스 벡터로 (약) 1600g의 힘으로 형질도입되거나 형질도입을 거친다. 일부 구현예에서, 상기 힘은 내부 공동의 측벽의 내부 표면 및/또는 세포의 표면층에서의 힘이다.
- [0487] 특정 구현예에서, 세포가 회전 접종되며, 예를 들어 세포 및 바이러스 벡터를 함유하는 세포 조성물이 약 5분 이상, 예컨대 약 10분 이상, 약 15분 이상, 약 20분 이상, 약 30분 이상, 약 45분 이상, 약 60분 이상, 약 90분 이상 또는 약 120분 이상; 또는 (약) 5분 내지 120분, 30분 내지 90분, 15분 내지 60분, 15분 내지 45분, 30분 내지 60분 또는 45분 내지 60분 동안(각 수치 포함) 회전된다. 일부 구현예에서, 세포는 바이러스 벡터로 (약) 30분 동안 회전 접종된다. 특정 구현예에서, 세포는 바이러스 벡터로 (약) 60분 동안 회전 접종된다.
- [0488] 일부 구현예에서, 형질도입 방법은 원심분리 챔버에서 약 5분 이상, 예컨대 약 10분 이상, 약 15분 이상, 약 20분 이상, 약 30분 이상, 약 45분 이상, 약 60분 이상, 약 90분 이상 또는 약 120분 이상 동안 형질도입 조성물과 선택적으로 공기의 회전 접종, 예를 들어, 회전 또는 원심분리를 포함한다. 일부 구현예에서, 형질도입 조성물과, 선택적으로 공기는 원심분리 챔버에서 5분을 넘는 시간 동안 그러나 60분 이내, 45분 이내, 30분 이내 또는 15분 이내 동안 회전 또는 원심분리된다. 구체적인 구현예에서, 형질도입은 (약) 60분 동안 회전 또는 원심분리를 포함한다.
- [0489] 일부 구현예에서, 형질도입 방법은 원심분리 챔버에서 (약) 10분 내지 60분, 15분 내지 60분, 15분 내지 45분, 30분 내지 60분 또는 45분 내지 60분(각 수치 포함) 동안, 내부 공동의 측벽의 내부 표면 및/또는 세포의 표면층에 적어도 (약) 1000g, 1100g, 1200g, 1400g, 1500g, 1600g, 1800g, 2000g, 2200g, 2400g, 2800g, 3200g 또는 3600g의 힘으로, 형질도입 조성물과, 선택적으로 공기의 회전 또는 원심분리를 포함한다. 구체적인 구현예

서, 형질도입 방법은 (약) 1600g으로 (약) 60분 동안 형질도입 조성물(예를 들어, 세포 및 바이러스 벡터 입자)의 회전 또는 원심분리를 포함한다.

[0490] 4. 벡터 카피수(VCN)

[0491] 일부 구현예에서, 세포를 조작하기 위한 제공된 공정들 중 임의의 공정과 관련하여 생성된 세포에서 전이 유전자 서열, 예컨대 재조합 수용체(예를 들어, CAR)를 암호화하는 전이 유전자 서열의 게놈 통합이 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 통합된 카피수가 평가되며, 이는 세포의 염색체 DNA 또는 게놈 DNA에 통합된 전이 유전자 서열의 카피수이다.

[0492] 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열의 유전체 통합을 평가하는 방법은 하나 이상의 세포로부터 단리된 DNA로부터 (약) 10 킬로베이스(kb)보다 큰 DNA 종과 같은 디옥시리보핵산(DNA)의 고분자량 분획을 분리하는 단계를 수반한다. 일부 측면에서, 상기 분리는 펄스 필드 겔 전기영동(PFGE) 같은 방법으로 수행될 수 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 세포는 재조합 단백질을 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함하는 적어도 하나의 조작된 세포를 함유하거나 함유하는 것으로 의심된다. 일부 측면에서, 상기 방법은 예를 들어 정량적 중합효소연쇄반응(qPCR), 디지털 PCR(dPCR) 또는 액적 디지털 PCR(ddPCR)과 같은 정량적 방법으로, 하나 이상의 세포의 게놈에 통합된 전이 유전자 서열의 존재, 부재 또는 양을 알아내는 단계를 수반한다.

[0493] 일부 구현예에서, 고분자량 분획은 일차적으로 염색체 또는 게놈 DNA와 같은 큰 DNA를 함유하고, 플라스미드, 통합되지 않은 DNA 단편, 선형 상보적 DNA(cDNA), 자가통합체(autointegrant), 긴 말단 반복(LTR) 서클 또는 게놈에 통합되지 않은 기타 잔류 종 또는 분자와 같이 크기가 임계값보다 작은 저분자를 함유하거나 분자를 거의 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 고분자량 분획 내 전이 유전자 서열의 존재, 부재 또는 양을 알아냄으로써, 검출된 전이 유전자 서열은 조작된 세포의 게놈에 통합된 것을 나타내고, 통합되지 않은 전이 유전자 서열의 검출을 최소화한다.

[0494] 일부 구현예에서, 고분자량 분획은 크기가 (약) 10 킬로베이스(kb)보다 큰 DNA 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 고분자량 분획은 크기가 (약) 10, 11, 12, 12.5, 13, 14, 15, 16, 17, 17.5, 18, 19, 20, 25 또는 30 킬로베이스(kb) 또는 그 이상보다 큰 DNA 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, 고분자량 분획은 크기가 약 10, 12.5, 15, 17.5 또는 20 킬로베이스(kb) 또는 그 이상보다 큰 DNA 분자를 포함한다. 일부 측면에서, 고분자량 분획은 게놈 DNA 또는 게놈 DNA 단편을 함유하고, DNA 샘플에 존재할 수 있는 통합되지 않은 또는 잔류 핵산 종을 배제하거나 분리한다. 일부 측면에서, 고분자량 분획, 예를 들어, DNA 샘플은 크기가 약 10, 11, 12, 12.5, 13, 14, 15, 16, 17, 17.5, 18, 19, 20, 25 또는 30 킬로베이스(kb) 또는 그 이상과 같은 임계값 위이다. 일부 구현예에서, 임계값은 (약) 10, 12.5, 15, 17.5 또는 20 킬로베이스(kb) 또는 그 이상보다 크다.

[0495] 일부 구현예에서, 고분자량 분획은 전기영동-기반 방법을 사용하여 분리 또는 단리된다. 일부 측면에서, 전기영동은 전기장의 존재 하에 분리 매트릭스를 통한 이동성을 통해 전하 및/또는 크기에 의해 생체분자를 분리한다. 일부 구현예에서, 전기영동 시스템은 크기 또는 분자량에 기초하여 핵산 분자를 포함하여 특정 분석물을 분획, 분석 및 채집하는 데 사용될 수 있다. 일부 측면에서, 분획은 복수의 분자의 서브세트이거나 이를 포함한다. 일부 측면에서, 분획(fraction, 또는 분율)은 크기 또는 분자량에 의해, 또는 일부 측면에서, 전기장의 힘에 의한 본 개시 내용의 완충제 조성물을 통과해 이동하도록(즉, 전기영동 이동성) 구동될 때 다른 분자 또는 복수의 분획보다 더 빠르거나 느린 속도로 이동하게 하는 임의의 물리적 특성에 의해 정의 또는 확인될 수 있다.

[0496] 일부 구현예에서, 고분자량 분획은 펄스 필드 겔 전기영동(PFGE)을 사용하여 분리 또는 단리된다. 일부 측면에서, PFGE는 염색체 또는 게놈 DNA 같은 상대적으로 큰 핵산 분자의 분해능을 개선하기 위해 전기영동 시스템에 교류 전압 구배를 도입하는 것을 수반한다. 일부 측면에서, 전기영동 시스템의 전압은 세 방향 사이에서 주기적으로 전환되는데, 하나는 겔의 중심 축을 통과하여 흐르고 둘은 양쪽에서 60도 각도로 흐른다. 일부 측면에서, PFGE에 의해 핵산 분자를 분리 또는 단리하는 예시적인 시스템 및 방법은 예를 들어, 문헌[US 9599590; US 2017/0240882; 또는 US 2017/0254774]에 기술된 것을 포함한다.

[0497] 일부 측면에서, PFGE 등의 전기영동은 장치 또는 시스템을 사용하여 수행될 수 있다. 일부 측면에서, 상기 장치 또는 시스템은 자동화 시스템 또는 고처리량 시스템이다. PFGE를 수행하기 위한 예시적인 시스템으로는, 예를 들어, 문헌[US 9599590; US 2017/0240882; 또는 US 2017/0254774]에 기술된 것, 또는 Pippin Prep, Blue Pippin 또는 Pippin HT (Sage Science); CHEF Mapper® XA System, CHEF-DR® III Variable Angle System, CHEF-DR II System (Bio-Rad); 및 Biometra Rotaphor 8 System (Analytik Jena AG) 등을 들 수 있다.

[0498] 일부 측면에서, 평가의 예시적인 샘플로는 핵산, 올리고뉴클레오타이드, DNA 분자, RNA 분자 또는 이들의 임의

의 조합이 포함된다. 일부 측면에서, 상기 샘플에는 아미노산, 펩타이드, 단백질 또는 이들의 임의의 조합이 포함될 수 있다. 일부 측면에서, 상기 샘플은 전체 세포 용해물, 또는 세포 용해물의 DNA 또는 단백질 분획, 예컨대 입양 세포 요법을 위해 조작된 세포의 용해물일 수 있다.

[0499] 일부 구현예에서, 샘플의 핵산은 게놈 DNA, 이중 가닥 DNA(dsDNA), 단일 가닥 DNA(ssDNA), 부호화 DNA(또는 cDNA), 메신저 RNA(mRNA), 짧은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 마이크로RNA(miRNA), 단일 가닥 RNA, 이중 가닥 RNA(dsRNA), 모르폴리노, RNA 간섭(RNAi) 분자, 미토콘드리아 핵산, 염색체 핵산, 바이러스 DNA, 바이러스 RNA, 및 별도의 유전 물질을 가진 다른 세포기관을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 샘플의 핵산은 또한 변형된, 합성 또는 비자연 발생 뉴클레오타이드 또는 구조 요소 또는 이노신, 삽입제(미국 특허 번호 4,835,263) 및 작은 홈 바인더(미국 특허 번호 5,801,115) 등의 염기 유사물과 같은 다른 대안적인/변형된 핵산 화학적 성질을 함유하는 핵산 유사물을 포함할 수 있다.

[0500] 일부 구현예에서, 고분자량 분획 또는 저분자량 분획을 분리 또는 분리하기 전에, 샘플은 전기영동 시스템에서 평가 전에 순 음전하를 주거나, 펩타이드 또는 단백질을 변성시키거나, DNA나 RNA 분자를 소화시키는 시약과 결합할 수 있다. 일부 측면에서, 샘플은 검출 목적으로 샘플 또는 그 분획에 형광, 자성 또는 방사성 특성을 주는 제제(agents)와 결합될 수 있다. 일부 예에서, dsDNA 샘플이 브롬화 에티듐과 혼합되어 전기영동 카세트에 적용되며, 이 샘플의 분획은 아주 밝은 녹색 LED를 사용하여 검출된다.

[0501] 일부 측면에서, 전기영동 시스템과 같이 핵산 샘플을 분리 또는 분리하기 위한 시스템은 자동화되거나 및/또는 처리량이 높을 수 있다. 일부 측면에서, 전기영동 시스템은 전기영동 카세트와 같이 일회용의 소모품 또는 시약을 이용할 수 있다.

[0502] 일부 측면에서, 전이 유전자 서열의 존재, 부재 또는 양을 알아내는 단계는 핵산 서열의 존재, 부재 또는 양을 알아내는 방법을 사용하여 수행될 수 있다. 구체적으로, 정량적 중합효소연쇄반응(qPCR) 또는 관련 방법과 같은 핵산 서열을 정량화하는 데 사용되는 방법은 DNA를 함유하는 샘플로부터 분리 또는 분리된, DNA를 함유하는 샘플 내 또는 고분자량 분획과 같은 특정 분획 내 전이 유전자 서열의 카피수를 알아내는 데 채용될 수 있다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열의 존재, 부재 또는 양을 알아내는 단계는 예를 들어 핵산 분자를 정량화하기 위해 아래 예시적인 분석법 중 어느 하나를 사용하여 카피수를 알아내는 단계를 포함한다.

[0503] 일부 측면에서, 특정 서열의 존재, 부재 및/또는 양은 전이 유전자 서열의 전부 또는 일부에 특이적으로 결합하거나 이를 인식할 수 있는 프로브 또는 프라이머를 사용하여 검출할 수 있다. 일부 구현예에서, 카피수는 전이 유전자 서열의 일부를 특이적으로 검출할 수 있는 프로브 또는 전이 유전자 서열의 일부를 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 서열을 사용하여 알아낼 수 있다. 일부 측면에서, 상기 프로브 또는 프라이머 서열은 세포에 대해 이중성, 외인성 또는 전이 유전자를 가지는 전이 유전자 서열의 일부와 같은 전이 유전자 서열의 일부를 특이적으로 검출, 결합 또는 인식할 수 있다. 일부 구현예에서, qPCR 또는 다른 핵산 기반 방법에 사용되는 프라이머 또는 프로브는 재조합 단백질을 암호화하는 핵산, 및/또는 예를 들어 프로모터, 전사 및/또는 전사 후 조절 요소 또는 반응 요소, 또는 표지자(예를 들어, 대리 표지자) 등의 조절 요소를 포함한 플라스미드 및/또는 벡터의 기타 구성요소 또는 요소를 결합, 인식 및/또는 증폭하는 데 특이적이다. 일부 측면에서, 프로브 또는 프라이머는 정량적 PCR(qPCR), 디지털 PCR(dPCR) 또는 액적 디지털 PCR(ddPCR)과 같은, 전이 유전자 서열의 존재, 부재 및/또는 양을 알아내는 예시적인 방법에 사용될 수 있다.

[0504] 일부 측면에서, 존재, 부재 또는 양을 알아내는 단계는 하나 이상의 세포 내에서 또는 하나 이상의 세포를 함유하는 생물학적 샘플 내에서 전이 유전자 서열의 질량, 중량, 농도 또는 카피수를 알아내는 것과 같은 전이 유전자 서열의 양을 알아내는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 핵산 서열의 존재, 부재 또는 양을 알아내는 단계 또는 전이 유전자 서열의 질량, 중량, 농도 또는 카피수를 평가하는 단계는 세포의 집단의 일부 또는 생물학적 샘플의 일부에서 수행될 수 있으며, 전체 샘플 또는 전체 세포의 집단에서 존재, 부재 또는 양을 알아내기 위해 정규화하고, 평균을 내고 및/또는 추정할 수 있다.

[0505] 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열의 존재, 부재 또는 양을 알아내는 단계는 하나 이상의 세포 내에서 2배체 게놈 당 또는 세포 당 전이 유전자 서열의 질량, 중량, 농도 또는 카피수를 알아내는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 세포는 세포의 집단을 포함하고, 여기서 상기 집단의 복수의 세포는 재조합 단백질을 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 카피수는 세포의 집단 중에서 2배체 게놈 당 또는 세포 당 평균 카피수이다.

[0506] 일부 측면에서, 카피수를 알아내는 단계는 하나 이상의 세포 내 또는 생물학적 샘플 내 존재하는 전이 유전자

서열의 카피 수를 알아내는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 카피수는 평균 카피수로 표현될 수 있다. 일부 측면에서, 특정 통합된 전이 유전자의 카피수는 세포 당 (전이 유전자 서열을 함유하는) 구성 부분의 수를 포함한다. 일부 측면에서, 특정 통합된 전이 유전자의 카피수는 2배체 게놈 당 (전이 유전자 서열을 함유하는) 구성 부분의 수를 포함한다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열의 카피수는 세포 당 통합된 전이 유전자 서열의 수로 표현된다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열의 카피수는 2배체 게놈 당 통합된 전이 유전자 서열의 수로 표현된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 세포는 세포의 집단을 포함하고, 여기서 상기 집단의 복수의 세포는 재조합 단백질 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 카피수는 세포의 집단 중에서 2배체 게놈 당 또는 세포 당 평균 카피수이다.

[0507] 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열의 양을 알아내는 단계는 하나 이상의 세포 당, 선택적으로 CD3+, CD4+ 및/또는 CD8+ 세포 당, 및/또는 재조합 단백질을 발현하는 세포 당 전이 유전자 서열의 질량, 중량, 농도 또는 카피수를 평가하는 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 세포상에 발현되는 표면 표지자 또는 표현형은 유세포 분석 또는 면역 염색법에 의한 것과 같은 세포 기반 방법을 사용하여 알아낼 수 있다. 일부 측면에서, 재조합 단백질을 발현하는 세포는 유세포 분석 또는 예를 들어 항-이디오타입 항체 또는 대리 표지자 염색을 이용한 면역 염색법에 의한 것과 같은 세포 기반 방법을 사용하여 알아낼 수 있다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열의 양은 CD3+, CD4+ 및/또는 CD8+ 세포와 같은 특정 세포의 수로, 및/또는 재조합 단백질을 발현하는 세포 당으로, 또는 세포의 총 수 당으로, 예컨대 샘플 내 세포의 총 수 당으로 또는 조작 공정을 거친 세포의 총 수 당으로 정규화할 수 있다.

[0508] 일부 구현예에서, 알아낸 카피수는 정규화된 값으로 표현된다. 일부 구현예에서, 알아낸 카피수는 게놈 당 또는 세포 당 전이 유전자 서열의 카피 수로 정량화된다. 일부 측면에서, 게놈 당 값은, T 세포와 같은 통상적인 체 세포가 2배체 게놈을 함유하므로, 2배체 게놈 당 전이 유전자 서열의 카피(copy)로 표현된다. 일부 측면에서, 알아낸 카피수는 세포의 게놈 내 알려진 기준 유전자의 카피수에 대해 정규화할 수 있다. 일부 측면에서, 기준 유전자는 RRP30(리보뉴클레아제 P 단백질 서브유닛 p30을 암호화), 18S rRNA(18S 리보솜 RNA), 28S rRNA(28S 리보솜 RNA), TUBA(α -튜불린), ACTB(β -액틴), β 2M(β 2-마이크로글로불린), ALB(알부민), RPL32(리보솜 단백질 L32), TBP(TATA 서열 결합 단백질), CYCC(시클로필린 C), EF1A(신장 인자 1 α), GAPDH(글리세르알데하이드-3-인산 탈수소효소), HPRT(히포크산틴 포스포리보실 전달효소) 또는 RPII(RNA 중합효소 II)이다. 일부 구현예에서, 알아낸 카피수는 DNA의 마이크로그램 당 전이 유전자 서열의 카피(copy)로 정량화된다.

[0509] 일부 측면에서, 카피수는 복수의 세포 또는 세포의 집단, 예컨대 복수의 조작된 세포 또는 조작된 세포의 집단의 평균 또는 중간 카피수이다. 일부 측면에서, 카피수는 복수의 세포 또는 세포의 집단, 예컨대 복수의 조작된 세포 또는 조작된 세포의 집단의 평균 카피수이다. 일부 측면에서, 평균 카피수는 복수의 세포 또는 세포의 집단, 예컨대 조작 또는 제조 공정의 하나 이상의 단계를 거친 복수의 세포 또는 세포의 집단으로부터, 또는 대상체에 투여하기 위한 세포 조성물과 같은 세포 조성물로부터 알아낸다. 일부 측면에서, 정규화된 평균 카피수는 예를 들어 2배체 게놈 내 2개 카피에 존재하는 알려진 유전자와 같은 기준 유전자에 대해 정규화된 전이 유전자 서열의 평균 카피수로 결정된다. 일부 측면에서, 통상적으로 2배체 게놈 당 2개 카피에 존재하는 기준 유전자에 대한 정규화는 2배체 세포와 같은 세포 내 카피수에 해당할 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 정규화된 평균 카피수는 복수의 세포 또는 세포의 집단, 예를 들어, 통상적으로 2배체 게놈을 가진 T 세포들 중에서 검출된 전이 유전자 서열의 평균 카피수에 해당할 수 있다.

[0510] 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열의 존재, 부재 또는 양을 알아내는 단계는 중합효소연쇄반응(PCR)에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, PCR은 아래 기술되는 바와 같은 정량적 중합효소연쇄반응(qPCR), 디지털 PCR 또는 액적 디지털 PCR이다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열의 존재, 부재 또는 양은 액적 디지털 PCR에 의해 알아낸다. 일부 구현예에서, PCR은 전이 유전자 서열의 적어도 일부에 상보적이거나 적어도 일부에 특이적으로 증폭할 수 있는 하나 이상의 프라이머를 사용하여, 일부 경우에, 기준 유전자의 적어도 일부에 상보적이거나 적어도 일부를 특이적으로 증폭할 수 있는 하나 이상의 프라이머를 사용하여 수행된다.

[0511] 일부 측면에서, qPCR은 반응이 진행됨에 따라 측정된 증폭 생성물의 축적을 각 주기 후 생성물 정량화와 함께 실시간으로 검출하는 데 사용될 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, qPCR은 샘플 내 전이 유전자 서열과 같은 특정 핵산 서열의 카피수를 알아내는 데 사용할 수 있다. 일부 측면에서, qPCR은 각 반응 웰(well)에서 증가하는 생성물 DNA의 양과 함께 증가하는 형광을 산출하는 형광성 리포터 분자를 채용한다. 일부 측면에서, 채용된 형광의 화학적 성질은 DNA-결합 염료 및 형광 표지된 서열-특이적 프라이머 또는 프로브를 포함한다. 일부 측면에서, qPCR은 지정된 과정에서 각 샘플을 조명하고 여기된 형광단에 의해 방출된 형광을 검출하는 능력을 가진 특수 열 순환기를 채용한다. 일부 측면에서, 측정된 형광은 앰플리콘의 총량에 비례하고, 시간에 따른 형광의 변

화는 각 주기에 생산된 앰플리콘의 양을 계산하는 데 사용된다.

[0512] 일부 구현예에서, dPCR은 핵산을 검출하고 증폭하기 위한 방법이며, 표적 핵산 분자의 정확한 정량적 분석 및 높은 감도의 검출을 가능하게 한다. 일부 측면에서, dPCR은 연속적인 개별 PCR 반응(또는 분할)으로 DNA를 한계 희석하는 것을 수반한다. 일부 측면에서, 한계 희석은 평가할 주형 핵산, 예를 들어, 전이 유전자 서열의 무작위 분포에 기초하여 나노유체역학과 에멀션의 화학적 성질을 이용한 분할의 원칙과, 주어진 비율의 양성(positive) 분할에 대해 존재하는 DNA의 양(quantity)을 측정하기 위한 푸아송 통계를 채용할 수 있다. 일부 측면에서, dPCR은 일반적으로 선형이고, 민감하여 매우 적은 양의 DNA를 검출 또는 정량화할 수 있다. 일부 측면에서, dPCR은 표준 곡선 없이 단일 분자 계수법을 사용하여 DNA 샘플의 절대적 정량화를 가능하게 하며, 절대적 정량화는 웰(well) 당 단일 분할에 대한 PCR로부터 얻을 수 있다(문헌[Pohl 등, (2004) Expert Rev. Mol. Diagn. 4(1), 41-47] 참조).

[0513] dPCR을 위한 상업적으로 이용 가능한 예시적인 장치 또는 시스템으로는 Raindrop™ 디지털 PCR 시스템(Raindance™ Technologies); QX200™ Droplet Digital™ PCR 시스템(Bio-Rad); BioMark™ HD 시스템 및 qdPCR 37K™ IFC(Fluidigm Corporation) 및 QuantStudio™ 3D 디지털 PCR 시스템(Life Technologies™)(예를 들어, 문헌[Huggett 등 (2013) Clinical Chemistry 59: 1691-1693; Shuga, 등 (2013) Nucleic Acids Research 41(16): e159; Whale 등 (2013) PLoS One 3: e58177] 참조) 등을 들 수 있다.

[0514] 일부 구현예에서, 조작된 세포의 계놈 내로 통합하기 위한, 재조합 단백질을 암호화하는 전이 유전자 서열과 같은 전이 유전자 서열의 존재, 부재 또는 양은 액적 디지털 중합효소연쇄반응(ddPCR)을 사용하여 알아낸다. ddPCR은 디지털 PCR의 한 유형이며, 여기서 PCR 용액을 물-오일 에멀션 화학적 성질을 통해 더 작은 반응들로 나누거나 분할하여 수많은 액적을 생성한다. 일부 측면에서, 특정 계면활성제를 사용하여 유중수(water-in-oil)형 액적을 생성할 수 있다. (예를 들어, 문헌[Hindson 등, (2011) Anal Chem 83(22): 8604-8610; Pinheiro 등, (2012) Anal Chem 84, 1003-1011] 참조). 일부 측면에서, 각 개별 액적은 이후 개별 반응으로 실행된다. 일부 측면에서, PCR 샘플을 나노리터 크기 샘플로 분할하여 오일 액적으로 캡슐화한다. 일부 측면에서, 오일 액적은 웰들 각각에 진공을 가하는 액적 발생기를 사용하여 만들어진다. 예시적인 경우에, 20 µL 샘플 용량으로 개별 반응을 위한 대략 20,000개의 오일 액적을 만들 수 있다.

[0515] 일부 측면에서, 통합된 카피수를 평가하는 방법은 전이 유전자 서열이 도입된 세포의 계놈 내로 도입된 전이 유전자 서열의 통합과 같이 유전자 조작의 타이밍, 정도 또는 진행을 결정 및 비교하기 위해 여러 시점에서 수행될 수 있다. 일부 측면에서, 상기 방법은 조작된 세포 조성물을 위한 조작 또는 제조 공정, 예컨대 기술된 임의의 공정의 여러 단계에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 제공된 방법은 증폭 조작 공정 또는 비증폭 조작 공정의 여러 단계에서 수행될 수 있다.

[0516] 일부 측면에서, 제공된 방법에 의해 조작된 세포는 상기 기술된 벡터 카피수에 대한 분석법들을 사용하여 예컨대 재조합 수용체(예를 들어, CAR)를 암호화하는 전이 유전자 서열의 계놈 통합에 대해 평가된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 세포로부터 단리된 디옥시리보핵산(DNA)으로부터 (약) 10 킬로베이스(kb)보다 큰 고분자량 분획을 분리하는 단계—여기서 상기 분리하는 단계 전에, 세포는 세포의 계놈 내로 전이 유전자 서열을 통합하기 위한 조건에서, 예컨대 바이러스 형질도입에 의해, 전이 유전자 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 도입됨—; 및 고분자량 분획에서 전이 유전자 서열의 존재, 부재 또는 양을 알아내는 단계를 포함한다.

[0517] 5. 인큐베이션

[0518] 일부 구현예에서, 예를 들어 제공된 임의의 방법, 용도, 제품 또는 조성물에 따른 세포 요법을 위해, 조작된 세포를 생성하는 방법은 증식 및/또는 증폭을 촉진하지 않는 조건에서 세포를 인큐베이션하는 하나 이상의 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작 단계 이후에, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입에 의해 재조합 폴리펩타이드를 세포에 도입하는 단계 이후에 증식 및/또는 증폭을 촉진하지 않는 조건에서 인큐베이션된다. 구체적인 구현예에서, 세포가 자극 조건에서 인큐베이션되고 재조합 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로 형질도입되거나 형질주입된 후, 세포가 인큐베이션된다. 따라서, 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 재조합 폴리뉴클레오타이드로 형질도입 또는 형질주입에 의해 조작된 CAR-양성 T 세포의 조성물이 증식 및/또는 증폭을 촉진하지 않는 조건에서 인큐베이션된다.

[0519] 구체적인 구현예에서, 예컨대 바이러스 벡터로 세포를 형질전환(예를 들어, 형질도입)에 의한 유전자 조작은 바이러스 벡터로 세포에 도입 또는 접촉 후에 세포를 인큐베이션하는 하나 이상의 단계를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어, 형질전환된 세포 집단의 세포(“형질전환된 세포”로도 불림)는 바이러스 벡터를 세

포 내로 도입하기 위해 세포를 유전자 조작, 형질전환, 형질도입, 또는 형질주입하는 공정들 이후에 인큐베이션된다. 구체적인 구현예에서, 상기 인큐베이션은 인큐베이션된 세포의 집단(본원에서 인큐베이션된 세포 집단으로도 지칭됨)을 생성한다.

[0520] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질전환된 세포)는 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 바이러스 벡터 입자)의 도입이 수행된 후 세포의 추가 가공 없이 인큐베이션된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션하기 전에, 세포는 예컨대 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 바이러스 벡터 입자)를 암호화하는 외인성 또는 남은 폴리뉴클레오타이드, 예컨대 회전 접종 이후 유전자 조작 후에 배지에 남은 것을 제거 또는 실질적으로 제거하기 위해, 세척된다.

[0521] 일부 상기 구현예에서, 추가 인큐베이션이 바이러스 벡터가 하나 이상의 세포의 숙주 게놈으로 통합되는 조건에서 수행된다. 예를 들면, 추가 인큐베이션은 형질도입(예를 들어, 회전 접종) 이후 T 세포에 결합했을 수 있는 바이러스 벡터가 관심 유전자를 전달하기 위해 세포의 게놈 내에 통합될 시간을 제공한다. 일부 측면에서, 추가 인큐베이션은 세포(예를 들어, 형질전환된 세포)가 휴지하거나 회복되어 인큐베이션 동안 세포의 배양이 세포의 건강을 지원하거나 유지할 수 있도록 하는 조건에서 수행된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 정적 조건, 예컨대 배지의 원심분리, 흔들기, 회전, 요동, 또는 관류, 예를 들어 연속 또는 반연속 관류를 수반하지 않는 조건에서 인큐베이션된다.

[0522] 인큐베이션으로 인해 바이러스 벡터 입자가 숙주 게놈에 통합되었는지 평가하거나 알아내어 추가 배양을 위한 조건을 경험적으로 알아내는 것은 숙련된 기술자의 수준 내에 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터의 숙주 게놈으로의 통합은 인큐베이션 후 바이러스 벡터 입자의 게놈에 함유된 핵산에 의해 암호화되는 이중 단백질과 같은 재조합 단백질의 발현 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다. 친화도 기반 방법, 예를 들어, 세포 표면 단백질의 맥락에서, 면역 친화도 기반 방법에 의한, 예컨대 유세포 분석에 의한 검출과 같이 재조합 분자의 발현 수준을 평가하기 위한 다수의 잘 알려진 방법이 사용될 수 있다. 일부 예에서, 발현은 형질도입 표지자 및/또는 리포터 구조체의 검출에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 절단된 표면 단백질을 암호화하는 핵산이 벡터 내에 포함되고 발현 및/또는 이의 향상의 표지자로서 사용된다.

[0523] 특정 구현예에서, 인큐베이션은 정적 조건, 예컨대 배지의 원심분리, 흔들기, 회전, 요동, 또는 관류, 예를 들어 연속 또는 반연속 관류를 수반하지 않는 조건에서 수행된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션의 개시 전에 또는 얼마 후에, 예를 들어, 5분, 15분 또는 30분 내에, 세포는 백 또는 바이알과 같은 용기로 이관되고(예를 들어, 멸균 조건에서 이관되고) 인큐베이터 안에 배치된다.

[0524] 일부 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부는, 예컨대 문헌[국제 공개 번호 W02016/073602]에 기술된 바와 같이, 원심분리 챔버의 내부 공동에서 수행된다.

[0525] 일부 구현예에서, 이중 또는 재조합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 바이러스 벡터)로 도입된 세포는 인큐베이션을 위해 용기 내로 이관된다. 일부 구현예에서, 용기는 바이알(vial)이다. 구체적인 구현예에서, 용기는 백(bag)이다. 일부 구현예에서, 세포, 및 선택적으로 이중 또는 재조합 폴리펩타이드는 폐쇄 또는 멸균 조건에서 용기 내로 이관된다. 일부 구현예에서, 그런 후, 용기(예를 들어, 바이알 또는 백)는 인큐베이션의 전부 또는 일부 동안 인큐베이터 내에 배치된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이터는 (약) 또는 적어도 16° C, 24° C, 또는 35° C로 설정된다. 일부 구현예에서, 인큐베이터는 37° C, 약 37° C, 또는 37° C ± 2° C, ± 1° C, ± 0.5° C, 또는 ± 0.1° C로 설정된다.

[0526] 일부 측면에서, 인큐베이션을 위한 조건은 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 제제(agents), 예를 들어 영양소, 아미노산, 항생제, 이온 및/또는 자극 인자, 예컨대 사이토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 용해 단백질, 재조합 용해성 수용체 및 세포를 활성화시키기 위해 설계된 임의의 기타 제제 중 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0527] 일부 구현예에서, 인큐베이션은 무혈청 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 명확한 및/또는 아주 명확한 세포 배양 배지이다. 특정 구현예에서, 무혈청 배지는 억제제 및/또는 성장 인자를 제거하기 위해 처리된, 예를 들어 여과된 조절된 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 단백질을 함유한다. 특정 구현예에서, 무혈청 배지는 혈청 알부민, 가수 분해물, 성장 인자, 호르몬, 운반체 단백질, 및/또는 부착 인자를 함유할 수 있다.

[0528] 구체적인 구현예에서, 세포는 하나 이상의 사이토카인의 존재 하에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 재조합 사이토카인이다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 사

이토카인이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 T 세포에 대해 내인성이고/거나 T 세포에 의해 발현되는 수용체에 결합하고/거나 결합할 수 있다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 사이토카인의 4-알파-나선 번들 패밀리의 멤버이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인의 4-알파-나선 번들 패밀리의 멤버는 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-9(IL-9), 인터루킨 12(IL-12), 인터루킨15(IL-15), 과립구 집락 자극 인자(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), 및 과립구-대식세포 집락 자극 인자(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF)를 포함하되 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IL-15이거나 이를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 IL-7이거나 이를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2이거나 이를 포함한다.

[0529] 구체적인 구현예에서, 세포는 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 존재 하에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15는 재조합형이다. 특정 구현예에서, IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15는 인간형이다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 세포는 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 존재 하에서 인큐베이션된다.

[0530] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질전환된 세포)는 1 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 10 IU/mL 내지 50 IU/mL, 50 IU/mL 내지 100 IU/mL, 100 IU/mL 내지 200 IU/mL, 100 IU/mL 내지 500 IU/mL, 250 IU/mL 내지 500 IU/mL, 또는 500 IU/mL 내지 1,000 IU/mL 사이 농도의 사이토카인(예를 들어, 재조합 인간 사이토카인)과 함께 인큐베이션된다.

[0531] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질전환된 세포)는 1 IU/mL 내지 500 IU/mL, 10 IU/mL 내지 250 IU/mL, 50 IU/mL 내지 200 IU/mL, 50 IU/mL 내지 150 IU/mL, 75 IU/mL 내지 125 IU/mL, 100 IU/mL 내지 200 IU/mL, 또는 10 IU/mL 내지 100 IU/mL 사이 농도의 IL-2(예를 들어, 인간 재조합 IL-2)와 함께 인큐베이션된다. 구체적인 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질전환된 세포)는 (약) 50 IU/mL, 60 IU/mL, 70 IU/mL, 80 IU/mL, 90 IU/mL, 100 IU/mL, 110 IU/mL, 120 IU/mL, 130 IU/mL, 140 IU/mL, 150 IU/mL, 160 IU/mL, 170 IU/mL, 180 IU/mL, 190 IU/mL, 또는 100 IU/mL 농도의 재조합 IL-2와 함께 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질전환된 세포)는 (약) 100 IU/mL의 재조합 IL-2(예를 들어, 인간 재조합 IL-2)의 존재 하에서 인큐베이션된다.

[0532] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질전환된 세포)는 100 IU/mL 내지 2,000 IU/mL, 500 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 100 IU/mL 내지 500 IU/mL, 500 IU/mL 내지 750 IU/mL, 750 IU/mL 내지 1,000 IU/mL, 또는 550 IU/mL 내지 650 IU/mL 사이 농도의 재조합 IL-7(예를 들어, 인간 재조합 IL-7)과 함께 인큐베이션된다. 구체적인 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질전환된 세포)는 (약) 50 IU/mL, 100 IU/mL, 150 IU/mL, 200 IU/mL, 250 IU/mL, 300 IU/mL, 350 IU/mL, 400 IU/mL, 450 IU/mL, 500 IU/mL, 550 IU/mL, 600 IU/mL, 650 IU/mL, 700 IU/mL, 750 IU/mL, 800 IU/mL, 750 IU/mL, 750 IU/mL, 또는 1,000 IU/mL 농도의 재조합 IL-7과 함께 인큐베이션된다. 구체적인 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질전환된 세포)는 (약) 600 IU/mL의 재조합 IL-7의 존재 하에서 인큐베이션된다.

[0533] 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질전환된 세포)는 1 IU/mL 내지 500 IU/mL, 10 IU/mL 내지 250 IU/mL, 50 IU/mL 내지 200 IU/mL, 50 IU/mL 내지 150 IU/mL, 75 IU/mL 내지 125 IU/mL, 100 IU/mL 내지 200 IU/mL, 또는 10 IU/mL 내지 100 IU/mL 사이 농도의 재조합 IL-15(예를 들어, 인간 재조합 IL-15)와 함께 인큐베이션된다. 구체적인 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질전환된 세포)는 (약) 50 IU/mL, 60 IU/mL, 70 IU/mL, 80 IU/mL, 90 IU/mL, 100 IU/mL, 110 IU/mL, 120 IU/mL, 130 IU/mL, 140 IU/mL, 150 IU/mL, 160 IU/mL, 170 IU/mL, 180 IU/mL, 190 IU/mL, 또는 200 IU/mL 농도의 재조합 IL-15와 함께 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질전환된 세포)는 (약) 100 IU/mL의 재조합 IL-15(예를 들어, 인간 재조합 IL-15)의 존재 하에서 인큐베이션된다.

[0534] 구체적인 구현예에서, 세포(예를 들어, 형질전환된 세포)는 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 존재 하에서 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15는 재조합형이다. 특정 구현예에서, IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15는 인간형이다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15이거나 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 세포는 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 존재 하에서 인큐베이션된다.

[0535] 일부 구현예에서, 인큐베이션의(예를 들어, 비증폭 공정의) 전부 또는 일부는 기본 배지(예를 들어, CTS OpTmizer 기본 배지(Thermofisher)), 글루타민, 및 하나 이상의 사이토카인(예컨대, 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15)을 포함하는 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배지는 하나 이상의 추가 성분을 함유할 수 있다.

일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 성분은 L-글루타민의 다이펩타이드 형태(예를 들어, L-알라닐-L-글루타민)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 성분은 추가 보충물(예를 들어, OpTmizer® 보충물(Thermofisher))에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, 배지는 무혈청 배지이고 임의의 혈청 성분을 함유하지 않는다. 일부 측면에서, 배지는 하나 이상의 혈청 대체 단백질, 예컨대 알부민, 인슐린 또는 트랜스페린 중 하나 이상(예를 들어, CTS™ 면역 세포 혈청 대체물)을 함유할 수 있다.

[0536] 일부 구현예에서, 세포는, 예컨대 상기 기술된 자극의 방법 또는 공정과 관련하여 수행된, 세포의 자극 동안 존재했던 것과 동일한 또는 유사한 배지의 존재 하에서 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 세포는, 예컨대 상기 기술된 자극의 방법 또는 공정과 관련하여 수행된, 세포의 자극 동안 존재했던 배지와 동일한 사이토카인들을 갖는 배지에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는, 예컨대 상기 기술된 자극의 방법 또는 공정과 관련하여 수행된, 세포의 자극 동안 존재한 배지와 동일한 농도의 동일한 사이토카인들을 갖는 배지에서 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 세포는 재조합 사이토카인의 부재 하에서 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 사이토카인의 부재 하에서 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 세포는 본원에 기술된 모든 사이토카인의 부재 하에서 인큐베이션된다.

[0537] 일부 측면에서, 추가 인큐베이션이 세포가 휴지하거나 회복되어 자극 조건의 존재를 예를 들어 재조합 사이토카인 또는 다른 자극제의 형태로 포함하지 않도록 하는 조건에서 수행된다. 예를 들어, 인큐베이션은 인큐베이션 동안 세포의 건강한 배양을 지원 또는 유지하기에 충분한 회복 배지의 존재 하에서 수행된다.

[0538] 일부 구현예에서, 인큐베이션의 전부 또는 일부는 기본 배지, 예컨대 하나 이상의 재조합 사이토카인이 없거나 임의의 재조합 사이토카인이 없는 기본 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배지는 하나 이상의 재조합 사이토카인, 예컨대 재조합 인간 IL-2, 재조합 인간 IL-7, 및/또는 재조합 인간 IL-15를 포함하지 않는다. 일부 측면에서, 인큐베이션은 임의의 재조합 사이토카인 없이 수행된다. 특정 구현예에서, 기본 배지는 추가 첨가제가 보충된다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 임의의 추가 첨가제가 보충되지 않는다. 세포 배양 배지에 대한 첨가물에는 영양소, 설탕, 예를 들어 글루코스, 아미노산, 비타민, 또는 ATP 및 NADH 등의 첨가제가 포함될 수 있으나 이에 한정되지는 않는다. 다른 첨가제들 또한 첨가될 수 있지만 일반적으로 특정 첨가제들 및 양은 세포와 배지의 인큐베이션이 인큐베이션 동안 세포의 유지를 촉진하지만 세포의 대사 활성을 최소화하고/거나, 제한하고/거나 유도하지 않도록 하는 정도이다.

[0539] 구체적인 구현예에서, 배지는 하나 이상의 재조합 사이토카인을 함유하지 않고 혈청 성분을 함유하지 않는 기본 배지, 즉 무혈청 배지이지만, 하나 이상의 추가 성분을 함유할 수 있다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션의(예를 들어, 비중독 공정의) 전부 또는 일부에서 이러한 무혈청 배지의 사용은 세포의 유지를 제공하지만 세포를 활성화하거나 세포가 대사적으로 활성이 되게 하여 세포를 휴지 또는 정지 상태이거나 그 상태일 가능성이 있는 상태로 세포를 양성할 수 있는 특정 인자들을 포함하지 않는 회복 배지를 제공한다. 일부 측면에서, 이러한 무혈청 배지의 존재 하에서 인큐베이션은 자극 및 유전자 조작(예를 들어, 형질도입) 후에 세포가 회복되거나 휴지되도록 한다. 일부 측면에서, 이러한 무혈청 배지의 존재 하에서 인큐베이션은, 예를 들어 제조 공정 도중 또는 후에 및 수확된/제형화된 세포를 냉동 보존하고 이후 사용 바로 전에 해동할 때, 손상 또는 생존력의 손실에 덜 민감한 세포를 함유하는 산출 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 해동될 때 상기 산출 조성물 내 세포는 유사한 배지지만 하나 이상의 재조합 사이토카인, 혈청 또는 세포가 산출 조성물의 냉동 보존 시 더 대사적으로 활성이 되게 할 수 있는 다른 인자들을 함유한 배지에서 인큐베이션된 세포보다 더 낮은 수준의 카스파제 또는 다른 세포자멸사 표지자를 갖는다.

[0540] 일부 구현예에서, 기본 배지는 무기염, 설탕, 아미노산 및 선택적으로 비타민, 유기산 및/또는 완충제 또는 기타 잘 알려진 세포 배양 영양소의 혼합물을 함유한다. 영양소 외에 배지는 또한 pH와 오스몰 농도 유지를 돕는다. 일부 측면에서, 기본 배지 시약은 세포 성장, 증식 및/또는 증폭을 지원한다. 상업적으로 이용 가능한 다양한 기본 배지는 당업자에게 잘 알려져 있으며, DMEM(Dulbeccos' Modified Eagles Medium), RPMI(Roswell Park Memorial Institute Medium), Iscove modified Dulbeccos' 배지 및 Hams 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 Iscove's Modified Dulbeccos' Medium, RPMI-1640 또는 α -MEM이다.

[0541] 일부 구현예에서, 기본 배지는 균형 잡힌 염용액(예를 들어, PBS, DPBS, HBSS, EBSS)이다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), F-10, F-12, RPMI 1640, GMEM(Glasgow's Minimal Essential Medium), 알파 MEM(alpha Minimal Essential Medium), Iscove's Modified Dulbecco's Medium 및 M199로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 복합 배지(예를 들어, RPMI-1640, IMDM)이다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 OpTmizer™ CTS™ T 세포 증

폭 기본 배지(ThermoFisher)이다.

- [0542] 일부 구현예에서, 기본 배지는 단백질이 없다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 인간 단백질(예를 들어, 인간 혈청 단백질)이 없다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 혈청이 없다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 인간으로부터 유래된 혈청이 없다. 일부 구현예에서, 기본 배지에는 재조합 단백질이 없다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 인간 단백질과 재조합 단백질이 없다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상 또는 모든 사이토카인이 없다. 일부 구현예에서, 인큐베이션의(예를 들어, 비증폭 공정의) 전부 또는 일부는 임의의 추가 첨가제 또는 재조합 사이토카인 없는 기본 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 임의의 추가 첨가제 또는 재조합 사이토카인 없는 CTS OpTmizer 기본 배지(Thermofisher)이다.
- [0543] 일부 구현예에서, 인큐베이션의(예를 들어, 비증폭 공정의) 전부 또는 일부는 기본 배지 및 글루타민을 포함하는 배지(예를 들어, 글루타민과 CTS OpTmizer 기본 배지(Thermofisher)) 배지에서 수행된다.
- [0544] 일부 구현예에서, 인큐베이션의(예를 들어, 비증폭 공정의) 전부 또는 일부는 기본 배지(예를 들어, CTS OpTmizer 기본 배지(Thermofisher))를 포함하고 하나 이상의 사이토카인(예컨대, 재조합 인간 IL-2, 재조합 IL-7, 및/또는 재조합 IL-15)이 없는 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 배지는 하나 이상의 추가 비혈청 성분이 보충된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 보충물은 무혈청이다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 유리 형태(free form)의 아미노산, 예컨대 L-글루타민을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 혈청 대체 보충물을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 L-글루타민의 다이펩타이드 형태(예를 들어, L-알라닌-L-글루타민)를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 재조합 사이토카인을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 T 세포 보충물 및 유리 형태의 L-글루타민이 보충된 기본 배지를 포함하고, 면역 세포 혈청 대체물, L-글루타민의 다이펩타이드 형태, 또는 재조합 사이토카인을 함유하지 않는다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 기본 배지(예를 들어, OpTmizer™ T 세포 증폭 기본 배지), L-글루타민 및 보충물(예를 들어, OpTmizer™ T 세포 증폭 보충물)에 의해 제공되는 것과 같은 하나 이상의 추가 성분을 포함한다.
- [0545] 구체적인 구현예에서, 세포는 (약) 0.25×10^6 개 세포/mL, 0.5×10^6 개 세포/mL, 0.75×10^6 개 세포/mL, 1.0×10^6 개 세포/mL, 1.25×10^6 개 세포/mL, 1.5×10^6 개 세포/mL, 1.75×10^6 개 세포/mL, 또는 2.0×10^6 개 세포/mL 농도로 무혈청 배지에서 인큐베이션된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 (약) 0.75×10^6 개 세포/mL의 농도로 무혈청 배지에서 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 18 내지 30시간 동안 수행된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 24시간 동안 또는 (약) 1일 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 각각 (약) 48시간 또는 72시간 동안, 또는 (약) 2일 또는 3일 동안 수행된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 24시간 $\pm$ 6시간, 48시간 $\pm$ 6시간 또는 72시간 $\pm$ 6시간 동안 수행된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 72시간, 72시간 $\pm$ 4시간 동안, 또는 (약) 3일 동안 수행되고, 예를 들어, 그 시간 동안 세포는 (약) 0.75×10^6 개 세포/mL의 농도로 무혈청 배지에서 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션의 전부 또는 일부는 기본 배지(예를 들어, CTS OpTmizer 기본 배지(Thermofisher))를 포함하고 하나 이상의 사이토카인(예컨대, 재조합 인간 IL-2, 재조합 IL-7, 및/또는 재조합 IL-15)이 없는 무혈청 배지에서 수행된다. 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 L-글루타민 및/또는 하나 이상의 세포 보충물(예를 들어, OpTmizer™ T 세포 증폭 보충물)이 보충되지만, 면역 세포 혈청 대체물, L-글루타민의 다이펩타이드 형태, 또는 재조합 사이토카인을 함유하지 않는다.
- [0546] 구체적인 구현예에서, 세포는 사이토카인의 부재 하에서 인큐베이션된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 재조합 사이토카인의 부재 하에서 인큐베이션된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 하나 이상의 재조합 사이토카인, 예컨대 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 부재 하에서 인큐베이션된다.
- [0547] 일부 구현예에서, 기본 배지는 L-글루타민 등의 글루타민을 더 포함한다. 일부 측면에서, 글루타민은 L-글루타민 등의 유리 형태의 글루타민이다. 일부 구현예에서, 기본 배지 중 L-글루타민 등의 글루타민의 농도는 (약) 0.5mM-1mM, 0.5mM-1.5mM, 0.5mM-2mM, 0.5mM-2.5mM, 0.5mM-3mM, 0.5mM-3.5mM, 0.5mM-4mM, 0.5mM-4.5mM, 0.5mM-5mM, 1mM-1.5mM, 1mM-2mM, 1mM-2.5mM, 1mM-3mM, 1mM-3.5mM, 1mM-4mM, 1mM-4.5mM, 1mM-5mM, 1.5mM-2mM, 1.5mM-2.5mM, 1.5mM-3mM, 1.5mM-3.5mM, 1.5mM-4mM, 1.5mM-4.5mM, 1.5mM-5mM, 2mM-2.5mM, 2mM-3mM, 2mM-3.5mM, 2mM-4mM, 2mM-4.5mM, 2mM-5mM, 2.5mM-3mM, 2.5mM-3.5mM, 2.5mM-4mM, 2.5mM-4.5mM, 2.5mM-5mM, 3mM-3.5mM, 3mM-4mM, 3mM-4.5mM, 3mM-5mM, 3.5mM-4mM, 3.5mM-4.5mM, 3.5mM-5mM, 4mM-4.5mM, 4mM-5mM, 또는 4.5mM-5mM(각 수치 포함) 또는 그 미만이다. 일부 구현예에서, 기본 배지 중 L-글루타민 등의 글루타민의 농도는 적어도 약 0.5mM, 1mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM, 4mM, 4.5mM 또는 5mM이다. 일부 구현예에서, 기본 배지 중 L-글루타민 등의 글루타민의 농도는 최대 약 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM, 4mM, 4.5mM 또는 5mM이다. 일부 구현예에서, 기본

배지 중 L-글루타민 등의 글루타민의 농도는 약 2mM이다. 일부 구현예에서, 기본 배지는 단백질 또는 펩타이드를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 단백질은 비포유류 기원이 아니다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 단백질은 인간 또는 인간 유래 단백질이다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 단백질은 재조합형이다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 단백질은 알부민, 트랜스페린, 인슐린, 피브로넥틴, 아프로티닌 또는 페투인을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질은 알부민, 인슐린 또는 트랜스페린 중 하나 이상, 선택적으로 인간 또는 재조합 알부민, 인슐린 또는 트랜스페린 중 하나 이상을 포함한다.

[0548] 일부 구현예에서, 단백질은 알부민 또는 알부민 대체재이다. 일부 구현예에서, 알부민은 인간 유래 알부민이다. 일부 구현예에서, 알부민은 재조합 알부민이다. 일부 구현예에서, 알부민은 천연 인간 혈청 알부민이다. 일부 구현예에서, 알부민은 재조합 인간 혈청 알부민이다. 일부 구현예에서, 알부민은 비인간 공급원 유래 재조합 알부민이다. 알부민 대체재는 임의의 단백질 또는 폴리펩타이드 공급원일 수 있다. 상기 단백질 또는 폴리펩타이드 샘플의 예로는 소 뇌하수체 추출물, 식물 가수 분해물(예를 들어, 쌀 가수 분해물), 태아 송아지 알부민(페투인), 달걀 알부민, 인간 혈청 알부민(human serum albumin, HSA) 또는 다른 동물 유래 알부민, 병아리 추출물, 소 배아 추출물, AlbuMAX® I 및 AlbuMAX® II를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 단백질 또는 펩타이드는 트랜스페린을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 또는 펩타이드는 피브로넥틴(fibronectin)을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질 또는 펩타이드는 아프로티닌(aprotinin)을 포함한다. 일부 구현예에서, 단백질은 페투인(fetuin)을 포함한다.

[0549] 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 단백질은 기본 배지에 첨가되는 혈청 대체 보충물의 일부이다. 혈청 대체 보충물의 예로는 면역 세포 혈청 대체물(ThermoFisher, #A2598101) 또는 문헌[Smith 등 *Clin Transl Immunology*. 2015 Jan; 4(1): e31]에 기술된 것이 포함되나 이에 한정되지는 않는다.

[0550] 특정 구현예에서, 세포는 이종 또는 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 바이러스 벡터)의 도입 이후 (약) 또는 적어도 18시간, 24시간, 30시간, 36시간, 40시간, 48시간, 54시간, 60시간, 72시간, 84시간, 96시간 동안, 또는 96시간 넘게 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포는 이종 또는 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, 바이러스 벡터)의 도입 이후 (약) 또는 적어도 1일, 2일, 3일, 4일 동안, 또는 4일 넘게 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 유전자 조작 전 30분 내지 2시간, 1시간 내지 8시간, 6시간 내지 12시간, 12시간 내지 18시간, 16시간 내지 24시간, 18시간 내지 30시간, 24시간 내지 48시간, 24시간 내지 72시간, 42시간 내지 54시간, 60시간 내지 120시간, 96시간 내지 120시간, 90시간 내지, 1일 내지 7일, 3일 내지 8일, 1일 내지 3일, 4일 내지 6일, 또는 4일 내지 5일의 시간량 동안 수행된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 18 내지 30시간 동안 수행된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 24시간 동안 또는 (약) 1일 동안 수행된다.

[0551] 특정 구현예에서, 인큐베이션의 총 기간은 (약) 또는 적어도 12시간, 18시간, 24시간, 30시간, 36시간, 42시간, 48시간, 54시간, 60시간, 72시간, 84시간, 96시간, 108시간 또는 120시간이다. 특정 구현예에서, 인큐베이션의 총 기간은 (약) 또는 적어도 1일, 2일, 3일, 4일 또는 5일이다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 120시간, 108시간, 96시간, 84시간, 72시간, 60시간, 54시간, 48시간, 42시간, 36시간, 30시간, 24시간, 18시간 또는 12시간에 또는 그 이내에 완료된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 1일, 2일, 3일, 4일 또는 5일에 또는 그 이내에 완료된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션의 총 기간은 (약) 12시간 내지 120시간, 18시간 내지 96시간, 24시간 내지 72시간 또는 24시간 내지 48시간(수치 포함)이다. 일부 구현예에서, 인큐베이션의 총 기간은 (약) 1시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 8시간 내지 30시간 또는 12시간 내지 24시간(수치 포함)이다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 각각 (약) 24시간, 48시간 또는 72시간 동안 또는 (약) 1일, 2일 또는 3일 동안 수행된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 24시간 $\pm$ 6시간, 48시간 $\pm$ 6시간 또는 72시간 $\pm$ 6시간 동안 수행된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 각각 (약) 72시간 동안 또는 (약) 3일 동안 수행된다.

[0552] 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시 이후 (약) 또는 적어도 12시간, 18시간, 24시간, 30시간, 36시간, 42시간, 또는 48시간에 개시된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시 이후 (약) 또는 적어도 0.5일, 1일, 1.5일, 또는 2일에 개시된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시로부터 (약) 120시간, 108시간, 96시간, 84시간, 72시간, 60시간, 54시간, 48시간, 42시간, 36시간, 30시간, 24시간, 18시간 또는 12시간에 또는 그 이내에 개시된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시로부터 (약) 5일, 4일, 3일, 2일, 또는 0.5일에 또는 그 이내에 개시된다.

[0553] 일부 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시 이후 (약) 24시간 내지 120시간, 36시간 내지 108시간, 48시간 내지 96시간 또는 48시간 내지 72시간(수치 포함)에 완료된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시로부터

(약) 120시간, 108시간, 96시간, 72시간, 48시간, 또는 36시간에 또는 그 이내에 완료된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시로부터 (약) 5일, 4.5일, 4일, 3일, 2일, 또는 1.5일에 또는 그 이내에 완료된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 자극의 개시 이후 (약) 24시간 $\pm$ 6시간, 48시간 $\pm$ 6시간, 또는 72시간 $\pm$ 6시간 후에 완료된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 72시간 이후 또는 (약) 3일 이후 완료된다.

[0554] 일부 구현예에서, 인큐베이션은 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드가 계놈 내로 통합되기에 충분한 시간량 동안 수행된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 2배체 계놈 당 (약) 또는 적어도 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 또는 5 이상의 통합된 바이러스 카피수(iVCN)에 충분한 시간량 동안 수행된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 (약) 또는 적어도 0.5 또는 1의 iVCN에 충분한 시간량 동안 수행된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드가 계놈 내로 안정적으로 통합되기에 충분한 시간량 동안 수행된다. 구체적인 구현예에서, 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드는 2배체 계놈 당 iVCN이 일정 시간 동안, 예를 들어, 12, 24, 또는 48시간 동안 20%, 15%, 10%, 5%, 1%, 또는 0.1% 넘게 변하지 않을 때 안정적으로 통합되었다고 간주된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 안정적 통합 전에 완료된다.

[0555] 특정 구현예에서, 인큐베이션은 적어도 통합 백터가 계놈 내에서 검출될 때까지 수행된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 2배체 계놈 당 안정적 통합 백터 카피수(iVCN)를 달성하기 전에 완료된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 적어도 통합 백터가 계놈 내에서 검출될 때까지 하지만 2배체 계놈 당 안정적 iVCN을 달성하기 전까지 수행된다. 특정 구현예에서, 2배체 계놈 당 안정적 iVCN은 iVCN이 최고조에 달하고/거나 일정 기간 동안 변하지 않고 유지되거나 허용 오차 내에서 변하지 않고 유지될 때 달성된다. 일부 구현예에서, 허용 오차는 (약) $\pm 40\%$, $\pm 35\%$, $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$, 또는 $\pm 1\%$ 미만 또는 그 이내이다. 특정 구현예에서, 기간은 (약) 또는 적어도 2시간, 4시간, 6시간, 8시간, 12시간, 16시간, 18시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 또는 72시간이다. 특정 구현예에서, 기간은 (약) 또는 적어도 1일, 2일, 또는 3일이다. 특정 구현예에서, 2배체 계놈 당 안정적 iVCN은 iVCN이 최고조에 달하고 (약) 또는 적어도 24시간 또는 1일 이상의 일정 기간 동안 변하지 않고 유지되거나 허용 오차, 예를 들어, $\pm 25\%$ 내에서 변하지 않고 유지될 때 달성된다. 일부 구현예에서, 2배체 계놈 당 안정적 iVCN은 형질전환된 세포의 집단의 2배체 계놈 중 총 백터 카피수(VCN)에 대한 iVCN의 분율(fraction)이 평균적으로 (약) 또는 적어도 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 또는 1.5이거나, 이의 허용 오차, 예를 들어, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, 또는 $\pm 1\%$ 이내일 때 달성된다. 특정 구현예에서, 2배체 계놈 당 안정적 iVCN은 형질전환된 세포의 집단의 2배체 계놈 중 총 백터 카피수(VCN)에 대한 iVCN의 분율이 평균적으로 (약) 0.8이거나, 이의 허용 오차 이내일 때 달성된다. 일부 구현예에서, 2배체 계놈 당 안정적 iVCN은 형질전환된 세포의 집단의 2배체 계놈 중 총 백터 카피수(VCN)에 대한 iVCN의 분율이 평균적으로 (약) 1.0이거나, 이의 허용 오차 이내일 때 달성된다.

[0556] 일부 구현예에서, 인큐베이션은 iVCN이 2배체 계놈 당 (약) 또는 적어도 5.0, 4.0, 3.0, 2.5, 2.0, 1.75, 1.5, 1.25, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8, 0.75, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 또는 0.25개 카피에 도달하기 전에 완료된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 iVCN이 2배체 계놈 당 (약) 1.0개 카피에 도달하기 전에 완료된다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션은 iVCN이 2배체 계놈 당 (약) 0.5개 카피에 도달하기 전에 완료된다.

[0557] 특정 구현예에서, 세포는 세포 집단의 (약) 또는 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 8회, 10회, 20회, 또는 그 이상의 세포 배가, 예를 들어 인큐베이션 중에 일어나는 배가 전에 수확된다. 구체적인 구현예에서, 세포 배가의 양은 조작 공정의 여러 시점들에서, 예컨대 여러 시점들 또는 단계들에서 집단 내 생존 세포의 수를 측정하여 계산할 수 있다. 구체적인 구현예에서, 세포 배가는 한 시점의 생존 세포의 총 수 대 이전 시점에 존재하는 생존 세포의 총 수를 비교하여 계산할 수 있다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 세포는 세포 집단의 (약) 또는 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 8회, 10회, 20회, 또는 그 이상의 세포 배가, 예를 들어 인큐베이션 중에 일어나는 배가 전에 완료된다. 특정 측면에서, 세포 배가는 인큐베이션이 개시될 때와 인큐베이션이 완료될 때 총 유핵 세포 수(TNC)를 측정하고, 이어서 완료 시 TNC의 생성물의 자연 로그를 개시 시 TNC로 나눈 다음, 상기 생성물의 자연 로그를 2의 자연 로그로 나눔으로써 계산된다.

[0558] 일부 측면에서, 집단 내에서, 예를 들어 조작 공정 동안, 일어나는 배가 수는 다음 공식을 사용하여 결정된다:

$$1) \text{ 세포 배가} = \frac{\ln\left(\frac{\text{수확 시 TNC}}{3 \text{ 일 후 TNC} - \text{활성}}\right)}{\ln 2}$$

[0559]

[0560] 일부 측면에서, 집단 내에서, 예를 들어 조작 공정 동안, 일어나는 배가 수는 다음 공식을 사용하여 결정된다:

[0561]

$$2) \text{ 세포 배가} = \frac{\ln\left(\frac{\text{수확 시 TNC}}{\text{자극의 개시 시 TNC}}\right)}{\ln 2}$$

[0562] 특정 구현예에서, 집단 내에서, 예를 들어 조작 공정 동안, 일어나는 배가 수는 다음 공식을 사용하여 결정된다:

[0563]

$$3) \text{ 세포 배가} = \frac{\ln\left(\frac{\text{수확 시 TNC}}{\text{자극 후 TNC}}\right)}{\ln 2}$$

[0564] 다양한 구현예에서, 집단 내에서, 예를 들어 조작 공정 동안, 일어나는 배가 수는 다음 공식을 사용하여 결정된다:

[0565]

$$4) \text{ 세포 배가} = \frac{\ln\left(\frac{\text{수확 시 TNC}}{\text{형질도입 시 TNC}}\right)}{\ln 2}$$

[0566] 구체적인 구현예에서, 집단 내에서, 예를 들어 조작 공정 동안, 일어나는 배가 수는 다음 공식을 사용하여 결정된다:

[0567]

$$5) \text{ 세포 배가} = \frac{\ln\left(\frac{\text{수확 시 TNC}}{\text{인큐베이션의 개시 시 TNC}}\right)}{\ln 2}$$

[0568] 특정 구현예에서, 인큐베이션은 세포의 총 수, 예를 들어 인큐베이션된 세포 또는 인큐베이션을 거친 세포의 총 수가 투입 집단의 세포의 수, 예를 들어, 자극 시약과 접촉한 세포의 총 수의 (약) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20배보다 크거나 20배 이상보다 크게 되기 전에 완료된다. 다양한 구현예에서, 인큐베이션은 인큐베이션된 세포의 총 수가 형질전환, 형질도입, 또는 회전 접종된 세포의 총 수, 예를 들어, 바이러스 벡터와 접촉한 세포의 총 수의 (약) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20배보다 크거나 20배 이상보다 크게 되기 전에 완료된다. 특정 구현예에서, 세포는 T 세포, 생존 T 세포, CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, CAR 발현 T 세포, 또는 상기 중 임의의 것의 조합이다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 세포의 총 수가 투입 집단의 세포의 총 수보다 커지기 전에 완료된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 생존 CD3+ T 세포의 총 수가 투입 집단의 생존 CD3+ 세포의 총 수보다 커지기 전에 완료된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션은 세포의 총 수가 형질전환, 형질도입, 또는 회전 접종된 세포의 총 수보다 커지기 전에 완료된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 생존 CD3+ T 세포의 총 수가 형질전환, 형질도입, 또는 회전 접종된 세포의 생존 CD3+의 총 수보다 커지기 전에 완료된다.

[0569] 일부 구현예에서, 세포 집단의 총 세포 수 또는 총 생존 세포 수는 인큐베이션 동안 유사하게, 동일하게, 또는 본질적으로 동일하게 유지된다. 구체적인 구현예에서, 세포 집단의 총 세포 수 또는 총 생존 세포 수는 인큐베이션 동안 변하지 않는다. 일부 측면에서, 총 세포 수 또는 총 생존 세포 수는 인큐베이션 동안 감소한다. 구체적인 측면에서, 총 생존 세포 수는 자극의 개시 전에(예를 들어, 바로 전에) 또는 자극의 개시 시점에 투입 집단의 총 세포 수 또는 총 생존 세포 수의 (약) 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55% 또는 50%이거나

그 미만이다.

[0570] 6. 자극 시약의 제거

[0571] 일부 구현예에서, 인큐베이션된 T 세포의 집단은, 경쟁 제제 등의 물질이 T 세포에 첨가되어 자극제(들)의 신호 전달을 방해(예컨대 감소 및/또는 종결)하는, 본원에 제공된 임의의 방법에 따라 생산 또는 생성되었다. 일부 구현예에서, 인큐베이션된 T 세포의 집단은 경쟁 제제, 예를 들어, 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예를 들어 D-비오틴 등의 물질의 존재를 함유한다. 일부 구현예에서, 경쟁 제제, 예를 들어, 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예를 들어 D-비오틴 등의 물질은 이 물질이 인큐베이션 동안 외인성으로 첨가되지 않은 배양된 T 세포의 기준 집단 또는 조제품 내 이 물질의 양보다 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 100배, 적어도 1000배 또는 그 이상의 양으로 존재한다. 일부 구현예에서, 배양된 T 세포의 집단에서 경쟁 제제, 예를 들어, 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예를 들어 D-비오틴 등의 물질의 양은 (약) $10\ \mu\text{M}$ 내지 $100\ \mu\text{M}$, $100\ \mu\text{M}$ 내지 1mM , $100\ \mu\text{M}$ 내지 $500\ \mu\text{M}$ 또는 $10\ \mu\text{M}$ 내지 $100\ \mu\text{M}$ 이다. 일부 구현예에서, 세포 또는 세포 집단으로부터 올리고머성 자극 시약을 분리 또는 제거하기 위해 $10\ \mu\text{M}$ 또는 약 $10\ \mu\text{M}$ 의 비오틴 또는 비오틴 유사체(예를 들어, D-비오틴)가 세포 또는 세포 집단에 첨가된다.

[0572] 특정 구현예에서, 하나 이상의 제제(예를 들어, TCR 및/또는 공동 수용체를 자극 또는 활성화하는 제제들)는, 예컨대 올리고머성 시약 상에 존재하는 복수의 특정 결합 부위(예를 들어, 결합 부위 Z)를 통해, 올리고머성 시약과 회합한다(예컨대 가역적으로 결합된다). 일부 경우에, 이 결과로 제제는 서로 가깝게 배열되어 만일 제제에 의해 결합되는 또는 인식되는 세포 표면 분자(의 적어도 2개 카피)를 가진 표적 세포가 제제와 접촉하게 되면 결합력 효과(avidity effect)가 발생할 수 있다. 일부 측면에서, 수용체 결합 시약은 결합 부위 B에서 세포의 수용체 분자에 대해 낮은 친화도를 가져서, 수용체 결합 시약은 경쟁 시약의 존재 하에서 세포로부터 해리된다. 따라서, 일부 구현예에서, 제제들은 경쟁 시약의 존재 하에서 세포로부터 제거된다.

[0573] 일부 구현예에서, 올리고머성 자극 시약은 항-CD3 및 항-CD28 Fab가 가역적으로 부착된 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머이다. 일부 구현예에서, 부착된 Fab는 예를 들어 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머에 가역적으로 부착되도록 하는 스트렙타비딘 결합 도메인을 함유한다. 일부 경우에, 항-CD3 및 항-CD28 Fab는 CD3 및/또는 CD28을 발현하는 T 세포가 Fab가 가역적으로 부착된 올리고머성 자극 시약과 접촉하게 되면 결합활성 효과가 발생할 수 있도록 서로 가깝게 배열된다. 일부 측면에서, Fab는 CD3 및 CD28에 대해 낮은 친화도를 가져서, Fab는 경쟁 시약, 예를 들어, 비오틴 또는 비오틴 변이체 또는 유사체의 존재 하에서 세포로부터 해리된다. 따라서, 일부 구현예에서, Fab는 경쟁 시약(예를 들어, D-비오틴)의 존재 하에서 세포로부터 제거되거나 해리된다.

[0574] 일부 구현예에서, 올리고머성 자극 시약(예를 들어, 올리고머성 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약)은 세포를 채집, 수확, 또는 제형화하기 전에 세포 또는 세포 집단으로부터 제거되거나 분리된다. 일부 구현예에서, 올리고머성 자극 시약(예를 들어, 올리고머성 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약)은, 인큐베이션, 예를 들어 본원의 섹션 II-C-5에 기술된 인큐베이션 이후 또는 동안, 경쟁 시약, 예를 들어, 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예컨대 D-비오틴에 접촉 또는 노출시켜 세포 또는 세포 집단으로부터 제거되거나 분리된다. 특정 구현예에서, 인큐베이션 이후, 그러나 세포를 채집, 수확, 또는 제형화하는 단계 전에, 올리고머성 자극 시약(예를 들어, 올리고머성 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약)을 제거하기 위해 세포 또는 세포 집단을 경쟁 시약, 예를 들어, 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예컨대 D-비오틴에 접촉 또는 노출시킨다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션 이후, 올리고머성 자극 시약(예를 들어, 올리고머성 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약)을 제거하기 위해 세포 또는 세포 집단을 경쟁 시약, 예를 들어, 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예컨대 D-비오틴에 접촉 또는 노출시킨다. 일부 측면에서, 올리고머성 자극 시약(예를 들어, 올리고머성 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약)이 인큐베이션 동안, 예를 들어 경쟁 시약, 예를 들어, 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예컨대 D-비오틴에 접촉 또는 노출시켜 세포로부터 분리 또는 제거될 때, 세포는 인큐베이션의 나머지 기간 동안 분리 또는 제거 전에 동일한 인큐베이션 조건으로 복귀된다.

[0575] 일부 구현예에서, 세포로부터 올리고머성 자극 시약을 제거 또는 분리하기 위해 세포를 (약) 또는 적어도 $0.01\ \mu\text{M}$, $0.05\ \mu\text{M}$, $0.1\ \mu\text{M}$, $0.5\ \mu\text{M}$, $1\ \mu\text{M}$, $2\ \mu\text{M}$, $3\ \mu\text{M}$, $4\ \mu\text{M}$, $5\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$, $100\ \mu\text{M}$, $500\ \mu\text{M}$, $0.01\ \mu\text{M}$, 1mM , 또는 10mM 의 경쟁 시약과 접촉시킨다. 다양한 구현예에서, 세포로부터 항-CD3 및 항-CD28이 가역적으로 부착된 자극성 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머를 제거 또는 분리하기 위해 세포를 (약) 또는 적어도 $0.01\ \mu\text{M}$, $0.05\ \mu\text{M}$, $0.1\ \mu\text{M}$, $0.5\ \mu\text{M}$, $1\ \mu\text{M}$, $2\ \mu\text{M}$, $3\ \mu\text{M}$, $4\ \mu\text{M}$, $5\ \mu\text{M}$, $10\ \mu\text{M}$, $100\ \mu\text{M}$, $500\ \mu\text{M}$, $0.01\ \mu\text{M}$, 1mM , 또는 10mM 의 비오틴 또는 비오틴 유사체 예컨대 D-비오틴과 접촉시킨다. 다양한 구현예에서, 항-CD3 및 항-CD28 Fab가 가역적으로 부착된 올리고머성 자극 시약, 예컨대 스트렙타비딘 뮤테인 올리고머를 세포로부터 제거하기 위해, 세포를 (약) $100\ \mu\text{M}$ 및 10mM , 예를 들어, 1mM 의 비오틴 또는 비오틴 유사체 예컨대 D-비오틴과 접촉시킨다. 다양한 구현예에서, 세

포를 D-비오틴에 접촉 또는 노출 후 (약) 100 μ M 및 10mM, 예를 들어, 1mM의 비오틴 또는 비오틴 유사체 예컨대 D-비오틴과 (약) 2시간, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 30시간, 36시간, 42시간, 또는 48시간 동안 접촉시킨다.

[0576] 구체적인 구현예에서, 올리고머성 자극 시약(예를 들어, 올리고머성 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약)은 자극의 개시로부터 (약) 120시간, 108시간, 96시간, 84시간, 72시간, 60시간, 48시간, 36시간, 24시간, 또는 12시간 (수치 포함) 이내에 세포로부터 제거 또는 분리된다. 구체적인 구현예에서, 올리고머성 자극 시약(예를 들어, 올리고머성 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약)은 자극의 개시로부터 (약) 5일, 4일, 3일, 2일, 1일 또는 0.5일(수치 포함) 이내에 제거 또는 분리된다. 구체적인 구현예에서, 올리고머성 자극 시약(예를 들어, 올리고머성 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약)은 자극이 개시된 이후 (약) 48시간 또는 (약) 2일에 세포로부터 제거 또는 분리된다. 특정 구현예에서, 올리고머성 자극 시약(예를 들어, 올리고머성 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약)은 자극이 개시된 이후 (약) 72시간 또는 (약) 3일에 세포로부터 제거 또는 분리된다. 일부 구현예에서, 올리고머성 자극 시약(예를 들어, 올리고머성 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약)은 자극이 개시된 이후 (약) 96시간 또는 (약) 4일에 세포로부터 제거 또는 분리된다.

[0577] 특정 구현예에서, 자극이 개시된 후 (약) 48시간 또는 (약) 2일에, 예를 들어 본원의 섹션 II-C-5에 기술된 인큐베이션 도중 또는 이후, 올리고머성 자극 시약(예를 들어, 올리고머성 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약)을 제거하기 위해, 세포 또는 세포 집단을 경쟁 시약, 예를 들어, 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예컨대 D-비오틴에 접촉 또는 노출시킨다. 일부 측면에서, 올리고머성 자극 시약(예를 들어, 올리고머성 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약)이 인큐베이션 동안, 예를 들어 경쟁 시약, 예를 들어, 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예컨대 D-비오틴에 접촉 또는 노출시켜 세포로부터 분리 또는 제거될 때, 세포는 인큐베이션의 나머지 기간 동안 분리 또는 제거 전에 동일한 인큐베이션 조건으로 복귀된다. 다른 측면에서, 올리고머성 자극 시약(예를 들어, 올리고머성 자극 스트렙타비딘 뮤테인 시약)이 인큐베이션 이후, 예를 들어 경쟁 시약, 예를 들어, 비오틴 또는 비오틴 유사체, 예컨대 D-비오틴에 접촉 또는 노출시켜 세포로부터 분리 또는 제거되면, 세포를 접촉 또는 경쟁 시약에 노출 후 (약) 2시간, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 30시간, 36시간, 42시간, 또는 48시간 동안 추가로 인큐베이션한다. 일부 구현예에서, D-비오틴 처리된 형질도입 세포를 D-비오틴 첨가 후 (약) 48시간 동안 추가로 인큐베이션한다.

[0578] 7. 세포의 수확, 채집, 또는 제형화

[0579] 일부 구현예에서, 세포를 수확 또는 채집한다. 구체적인 구현예에서, 세포는 인큐베이션 완료 후 채집 또는 수확한다. 특정 구현예에서, 채집 또는 수확된 세포는 산출 집단의 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 집단은 생존한, CD3+, CD4+, CD8+인 및/또는 재조합 수용체(예를 들어, CAR+)에 대해 양성인 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 수확된 CD4+ T 세포 및 제형화된 CD8+ T 세포는 산출 CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포이다. 구체적인 구현예에서, 제형화된 세포 집단, 예를 들어, 농축된 CD4+ 및 CD8+ 세포의 제형화된 집단은 산출 세포 집단, 예를 들어, 농축된 CD4+ 및 CD8+ 세포의 산출 집단이다.

[0580] 일부 구현예에서, 수확, 채집, 또는 제형화된 세포 또는 세포 집단은 증폭, 예를 들어, 세포가 인큐베이션 또는 육성 동안 생존 세포의 양을 증가시키는 조건에서 인큐베이션 또는 육성되는 조건을 거치지 않았다. 예를 들면, 일부 측면에서, 수확된 세포는 인큐베이션 또는 육성의 시작 시 총 생존 세포의 수와 비교하여 인큐베이션 또는 육성의 종료 시에 총 생존 세포의 양이 증가되는 인큐베이션 또는 육성을 거치지 않았다. 일부 구현예에서, 수확된 세포는 상기 인큐베이션 또는 육성 공정의 시작 시와 비교하여 인큐베이션 또는 육성 공정의 종료 시에 생존 세포의 총 수를 증가(예를 들어, 증폭)시킬 목적으로 명시적으로 인큐베이션 또는 육성 단계를 거치지 않았다. 일부 구현예에서, 세포는 증폭을 초래할 수 있는 조건 하에 인큐베이션되지만, 인큐베이션 조건은 세포 집단을 증폭시키기 위한 목적으로 수행되지 않는다. 일부 구현예에서, 수확된 세포는 증폭 단계를 포함하지 않는 공정에서 제조되었다 하더라도 증폭을 거쳤을 수 있다. 일부 구현예에서, 증폭 단계를 포함하지 않는 제조 공정을 비증폭 또는 최소 증폭 공정이라 한다. “비증폭(non-expanded)” 공정 또한 “최소 증폭(minimally expanded)” 공정이라 할 수도 있다. 일부 구현예에서, 비증폭 또는 최소 증폭 공정은 그 공정이 증폭을 위한 단계를 포함하지 않음에도 불구하고 증폭을 거친 세포가 나올 수 있다. 일부 구현예에서, 수확된 세포는 세포 집단 전체의 증폭을 감소, 억제, 최소화 또는 제거하도록 설계된 배지 조성을 포함하는 인큐베이션 또는 육성 단계를 거쳤을 수 있다. 일부 구현예에서, 채집된, 수확된, 또는 제형화된 세포는 이전에 생물반응기에서, 또는 세포가 인큐베이션 또는 배양의 전부 또는 일부 동안 요동, 회전, 흔들림, 또는 관류되는 조건 하에 수행된 인큐베이션 또는 육성을 거치지 않았다. 예시적인 제조의 비증폭 공정 및 그러한 공정에 의해 생산된 조작된 세포

는 문헌[PCT/US2019/046062]에 개시되며, 이는 그 전체가 참조로 포함된다.

- [0581] 일부 구현예에서, 세포 선택, 단리, 분리, 농축, 및/또는 정제 단계가 세포 또는 세포 집단이 수확, 채집, 또는 제형화되기 전에 수행된다. 일부 구현예에서, 세포 선택, 단리, 분리, 농축, 및/또는 정제 단계는 본원에 개시된 바와 같은 크로마토그래피를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, T 세포 형질도입 이후에 그러나 세포를 수확하기 전에, 채집하기 전에, 및/또는 제형화하기 전에 크로마토그래피에 의한 T 세포 선택 단계가 수행된다. 일부 구현예에서, 세포를 수확하기 바로 전에 크로마토그래피에 의한 T 세포 선택 단계가 수행된다.
- [0582] 특정 구현예에서, 자극의 개시부터 세포를 채집, 수확, 또는 제형화하기까지 시간량은 (약) 36시간, 42시간, 48시간, 54시간, 60시간, 72시간, 84시간, 96시간, 108시간, 또는 120시간이거나 그 미만이다. 특정 구현예에서, 자극의 개시부터 세포를 채집, 수확, 또는 제형화하기까지 시간량은 (약) 1.5일, 2일, 3일, 4일, 또는 5일이거나 그 미만이다. 일부 구현예에서, 자극의 개시부터 세포를 채집, 수확, 또는 제형화하기까지 시간량은 (약) 36시간 내지 120시간, 48시간 내지 96시간, 또는 48시간 내지 72시간(수치 포함), 또는 (약) 1.5일 내지 5일, 2일 내지 4일, 또는 2일 내지 3일(수치 포함)이다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션의 개시부터 세포를 수확, 채집, 또는 제형화하기까지 시간량은 (약) 48시간, 72시간, 또는 96시간이거나 그 미만이다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션의 개시부터 세포를 수확, 채집, 또는 제형화하기까지 시간량은 (약) 2일, 3일 또는 4일이거나 그 미만이다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션의 개시부터 세포를 수확, 채집, 또는 제형화하기까지 시간량은 48시간 $\pm$ 6시간, 72시간 $\pm$ 6시간, 또는 96시간 $\pm$ 6시간이다. 구체적인 구현예에서, 인큐베이션의 개시부터 세포를 수확, 채집, 또는 제형화하기까지 시간량은 (약) 96시간 또는 4일이거나 그 미만이다.
- [0583] 구체적인 구현예에서, 세포는 본원에 또는 본원에 참조로 포함된 문헌[PCT/US2018/064627]에 기술된 것과 같은 무혈청 배지에서 수확, 채집, 또는 제형화된다. 일부 구현예에서, 세포는 인큐베이션 동안 사용된 것과 동일한 무혈청 배지 내로 수확, 채집, 또는 제형화된다.
- [0584] 구체적인 구현예에서, 세포는 하나 이상의 제조합 사이토카인을 함유하지 않고 혈청 성분을 함유하지 않는 기본 배지, 즉 무혈청 배지에서 수확, 채집 또는 제형화되지만, 하나 이상의 추가 성분을 함유할 수 있다. 구체적인 구현예에서, 이러한 무혈청 배지의 사용은 세포의 유지를 제공하지만 세포를 활성화하거나 세포가 대사적으로 활성이 되게 하여 세포를 휴지 또는 정지 상태이거나 그 상태일 가능성이 있는 상태로 세포를 양성할 수 있는 특정 인자들을 포함하지 않는 회박 배지를 제공한다. 일부 측면에서, 이러한 무혈청 배지의 존재 하에서 인큐베이션은 자극 및 유전자 조작 (예를 들어, 형질도입) 후에 세포가 회복되거나 휴지되도록 한다. 일부 측면에서, 이러한 무혈청 배지의 존재 하에서 세포를 수확, 채집, 또는 제형화하면, 예를 들어, 수확된/제형화된 세포를 냉동 보존하고 이후 사용 바로 전에 해동할 때, 손상 또는 생존력의 손실에 덜 민감한 세포를 함유하는 산출 조성물의 제형화를 초래한다. 일부 구현예에서, 해동될 때 상기 산출 조성물 내 세포는 유사한 배지지만 하나 이상의 제조합 사이토카인, 혈청 또는 세포가 산출 조성물의 냉동 보존 시 더 대사적으로 활성이 되게 할 수 있는 다른 인자들을 함유한 배지에서 인큐베이션된 세포보다 더 낮은 수준의 카스파제 또는 다른 세포자멸사 표지자를 갖는다.
- [0585] 특정 구현예에서, 하나 이상의 농축된 T 세포 집단이 제형화된다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 농축된 T 세포 집단이 하나 이상의 집단이 조작 및/또는 인큐베이션된 후에 제형화된다. 구체적인 구현예에서, 하나 이상의 집단은 투입 집단이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 투입 집단은 이전에 동결 보호 및 저장되었다가, 인큐베이션 전에 해동된다.
- [0586] 특정 구현예에서, 세포는 적어도 통합 벡터가 게놈 내에서 검출될 때 수확 또는 채집된다. 일부 구현예에서, 세포는 2배체 게놈 당 안정적 통합 벡터 카피수(iVCN) 전에 수확 또는 채집된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 통합 벡터가 게놈 내에서 검출된 후에 하지만 2배체 게놈 당 안정적 iVCN이 달성되기 전에 수확 또는 채집된다.
- [0587] 일부 구현예에서, 세포는 iVCN이 2배체 게놈 당 (약) 또는 적어도 5.0, 4.0, 3.0, 2.5, 2.0, 1.75, 1.5, 1.25, 1.2, 1.1, 1.0, 0.9, 0.8, 0.75, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 또는 0.25개 카피에 도달하기 전에 수확 또는 채집된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 iVCN이 2배체 게놈 당 (약) 1.0개 카피에 도달하기 전에 수확 또는 채집된다. 일부 구현예에서, 세포는 iVCN이 2배체 게놈 당 (약) 0.5개 카피에 도달하기 전에 채집 또는 수확된다.
- [0588] 특정 구현예에서, 세포는 세포 집단의 (약) 또는 적어도 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 8회, 10회, 20회, 또는 그 이상의 세포 배가, 예를 들어 인큐베이션 중에 일어나는 배가 전에 수확된다.
- [0589] 구체적인 구현예에서, 세포는 세포의 총 수, 예를 들어 인큐베이션된 세포 또는 인큐베이션을 거친 세포의 총

수가 투입 집단의 세포의 수, 예를 들어, 자극 시약과 접촉한 세포의 총 수의 (약) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20배보다 크거나 20배 이상보다 크게 되기 전 시점에 수확 또는 채집된다. 일부 구현예에서, 세포는 인큐베이션 된 세포의 총 수가 형질전환, 형질도입, 또는 회전 집중된 세포의 총 수, 예를 들어, 바이러스 벡터와 접촉한 세포의 총 수의 (약) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20배보다 크거나 20배 이상보다 크게 되기 전 시점에 수확 또는 채집된다. 특정 구현예에서, 세포는 T 세포, 생존 T 세포, CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, CAR 발현 T 세포, 또는 상기 중 임의의 것의 조합이다. 구체적인 구현예에서, 세포는 세포의 총 수가 투입 집단의 세포의 총 수보다 커지기 전 시점에 수확 또는 채집된다. 다양한 구현예에서, 세포는 생존 CD3+ T 세포의 총 수가 투입 집단의 생존 CD3+ 세포의 총 수보다 커지기 전 시점에 수확 또는 채집된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 세포의 총 수가 형질전환, 형질도입, 또는 회전 집중된 세포의 총 수보다 커지기 전 시점에 수확 또는 채집된다. 다양한 구현예에서, 세포는 생존 CD3+ T 세포의 총 수가 형질전환, 형질도입, 또는 회전 집중된 생존 CD3+ 세포의 총 수보다 커지기 전 시점에 수확 또는 채집된다. 다양한 구현예에서, 세포는 생존 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포의 총 수가 투입 집단의 생존 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포의 총 수보다 커지기 전 시점에 수확 또는 채집된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 세포의 총 수가 형질전환, 형질도입, 또는 회전 집중된 세포의 총 수보다 커지기 전 시점에 수확 또는 채집된다. 다양한 구현예에서, 세포는 생존 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포의 총 수가 형질전환, 형질도입, 또는 회전 집중된 세포의 생존 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포의 총 수보다 커지기 전 시점에 수확 또는 채집된다.

[0590] 특정 구현예에서, 본 공정은 수확 또는 채집 동안 또는 후에, 예를 들어, 필터(예를 들어, 40 μ m 필터)를 사용하여, 예를 들어 큰 미립자를 제거하기 위해, 세포 조성물을 여과하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 여과하는 단계는 세포가 수확 또는 채집되는 동안 수행된다. 예를 들면, 필터는 형질도입 후 인큐베이션되는 세포 및 수확/채집 디바이스, 예컨대 Sepax® 또는 Sepax 2® 세포 처리 시스템들 사이에서 인-라인될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 수확 또는 채집되고 이어서 여과된 조성물이 선택적으로 세척되기 전에 여과된다. 특정 구현예에서, 세포는 수확 또는 채집되고, 세척되고 세척된 세포 조성물이 여과된다.

[0591] 특정 구현예에서, 제형화된 세포는 산출 세포이다. 일부 구현예에서, 농축된 T 세포의 제형화된 집단은 농축된 T 세포의 산출 집단이다. 구체적인 구현예에서, 제형화된 CD4+ T 세포 및 제형화된 CD8+ T 세포는 산출 CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포이다. 구체적인 구현예에서, 제형화된 세포 집단, 예를 들어, 농축된 CD4+ 및 CD8+ 세포의 제형화된 집단은 산출 세포 집단, 예를 들어, 농축된 CD4+ 및 CD8+ 세포의 산출 집단이다.

[0592] 일부 구현예에서, 세포는 백(bag)이나 바이알 같은 용기 내로 제형화될 수 있다. 일부 구현예에서, 바이알은 주입 바이알일 수 있다. 일부 구현예에서, 바이알은 조각된 세포의 단일 단위 용량으로, 예컨대 주어진 용량 또는 이의 분획으로 투여하기 위한 세포의 수를 포함하여 제형화된다.

[0593] 일부 구현예에서, 세포는 약학적으로 허용 가능한 완충제로 제형화되며, 이는 일부 측면에서, 약학적으로 허용 가능한 운반체 또는 부형제를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 가공은 대상체에 투여하기에 약학적으로 허용 가능하거나 바람직한 배지 또는 제형 완충제로 배지를 교환하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 가공 단계는 하나 이상의 선택적인 약학적으로 허용 가능한 운반체 또는 부형제를 포함할 수 있는 약학적으로 허용 가능한 완충제에서 세포를 교체하기 위해 형질도입 및/또는 증폭된 세포를 세척하는 것을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 운반체 또는 부형제를 포함한 상기 약학적 형태의 예시는 대상체에 세포 및 조성물을 투여하기에 허용 가능한 형태와 함께 아래에 기재된 임의의 것일 수 있다. 일부 구현예에서 약학 조성물은 치료적 유효량 또는 예방적 유효량과 같이 질병 또는 병태를 치료 또는 예방하기에 효과적인 양으로 세포를 함유한다.

[0594] “약학적으로 허용 가능한 운반체(pharmaceutically acceptable carrier)”는 활성 성분 외의 약학적 제형 안에 있는 성분을 지칭하고, 이는 대상체에 무독성이다. 약학적으로 허용 가능한 운반체는 완충제, 부형제, 안정제 또는 보존제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0595] 일부 측면에서, 운반체의 선택은 특정 세포 및/또는 투여 방법에 의해 부분적으로 결정된다. 따라서, 적합한 제형이 다양하게 존재한다. 예를 들어, 약학 조성물은 보존제를 함유할 수 있다. 적합한 보존제는 예를 들어, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 벤조산 나트륨 및 염화 벤잘코늄을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 둘 이상의 보존제의 혼합물이 사용된다. 보존제 또는 이의 혼합물은 통상적으로 전체 조성물의 약 0.0001 중량% 내지 약 2 중량%의 양으로 존재한다. 운반체는, 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기술되어 있다. 약학적으로 허용 가능한 운반체는 사용된 용량 및 농도에서 일반적으로 수용자(recipient)에게 무독성이며, 인산염, 구연산염 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제(예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 염화 벤잘코

늄; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로 헥사놀; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩타이드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코스, 마노스 또는 텍스트린을 포함하는 당당류, 이당류 및 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 솔비톨과 같은 설탕; 나트륨과 같은 염 형성 반대 이온; 금속 복합체(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온 계면활성제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0596] 일부 측면에서 완충제가 조성물에 포함된다. 적합한 완충제에는 예를 들어, 구연산, 구연산 나트륨, 인산, 인산 칼륨 및 다양한 다른 산 및 염이 포함된다. 일부 측면에서, 둘 이상의 완충제의 혼합물이 사용된다. 완충제 또는 이의 혼합물은 통상적으로 전체 조성물의 약 0.001 중량% 내지 약 4 중량%의 양으로 존재한다. 투여 가능한 약학 조성물의 조제 방법은 알려져 있다. 예시적인 방법이 예를 들어, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)]에 보다 상세하게 기술되어 있다.

[0597] 제형에는 수용액이 포함될 수 있다. 제형 또는 조성물은 또한 세포, 바람직하게는 세포에 상보적인 활성을 가진 것으로 치료될 특정 증상, 질병 또는 병태에 유용한 하나 이상의 활성 성분을 함유할 수 있으며, 여기서 각각의 활성이 서로 악영향을 미치지 않는다. 상기 활성 성분은 의도된 목적에 효과적인 양으로 조합하여 적합하게 존재한다. 따라서, 일부 구현예에서, 약학 조성물은 화학 요법제, 예를 들어, 아스파라기나아제, 부설판, 카보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 겐시타빈, 히드록시우레아, 메토타렉세이트, 파클리탁셀, 리톡시맵, 빈블라스틴 및/또는 빈크리스틴 등과 같은 다른 약학적 활성제 또는 약물을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 제제 또는 세포는 염, 예를 들어, 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 투여된다. 적합한 약학적으로 허용 가능한 산 부가 염은 염산, 브롬화 수소산, 인산, 메타인산, 질산 및 황산과 같은 무기산, 및 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 말산, 락트산, 푸마르산, 벤조산, 글리콜산, 글루콘산, 숙신산 및 아릴술폰산, 예를 들어 p-톨루엔술폰산과 같은 유기산으로부터 유래된 것을 포함한다.

[0598] 일부 구현예에서 약학 조성물은 치료적 유효량 또는 예방적 유효량과 같이 질병 또는 병태를 치료 또는 예방하기에 효과적인 양으로 제제 또는 세포를 함유한다. 일부 구현예에서 치료적 또는 예방적 효능은 치료받은 대상체의 주기적인 평가에 의해 모니터링된다. 병태에 따라 며칠 또는 그 이상에 걸쳐 반복 투여되는 경우, 질병 증상의 원하는 억제가 발생할 때까지 치료가 반복된다. 그러나, 다른 투여량 요법이 유용할 수 있고 결정될 수 있다. 바람직한 투여량이 조성물의 단일 볼루스 투여, 조성물의 다중 볼루스 투여 또는 조성물의 지속적인 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0599] 제제 또는 세포는, 임의의 적합한 수단, 예를 들어 볼루스 주입, 주사, 예를 들어 정맥내 또는 피하 주사, 안구내(intraocular) 주사, 안구주위(periocular) 주사, 망막하(subretinal) 주사, 유리체내(intravitreal) 주사, 중격-경유성(trans-septal) 주사, 공막하(subscleral) 주사, 맥락막내(intrachoroidal) 주사, 전방내(intracameral) 주사, 결막하 주사(subconjunctival injection, subconjunctival injection), 서브 테논(sub-Tenon) 주사, 안구뒤(retrobulbar) 주사, 안구주위(peribulbar) 주사 또는 후부 점막 주사(posterior juxtascleral) 전달에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 이들은 비경구, 폐내 및 비강내 및 국소 치료가 바람직한 경우 병변내 투여에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 주어진 용량이 세포 또는 제제의 단일 볼루스 투여에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 이는 예를 들어, 3일 이내의 기간에 걸쳐 세포 또는 제제의 다중 볼루스 투여에 의해, 또는 세포 또는 제제의 지속적인 주입 투여에 의해 투여된다.

[0600] 질병의 예방 또는 치료를 위한, 적절한 투여량은 치료될 질병의 유형, 제제의 유형, 세포 또는 재조합 수용체의 유형, 질병의 중증도 및 진행 경과, 제제 또는 세포가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지, 선행 요법, 대상체의 임상 이력과 제제 또는 세포에 대한 반응, 및 주치의의 재량에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서 조성물은 한 번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 대상체에 적합하게 투여된다.

[0601] 세포 또는 제제는 표준 투여 기술, 제형 및/또는 디바이스를 사용하여 투여될 수 있다. 조성물의 저장 및 투여를 위해 주사기 및 바이알과 같은 제형 및 디바이스가 제공된다. 세포에 관하여, 투여는 자가 조직 또는 이종 기원일 수 있다. 예를 들어, 면역 반응성 세포 또는 전구체(progenitor)는 하나의 대상체로부터 획득될 수 있고, 동일한 대상체 또는 상이하고, 양립 가능한 대상체에 투여될 수 있다. 말초 혈액 유래 면역 반응성 세포 또는 이의 자손(예를 들어, 생체 내, 생체 외 또는 시험관 내 유래)은 카테터 투여, 전신 주사, 국소 주사, 정

맥 주사 또는 비경구 투여를 포함하는 국소 주사를 통해 투여될 수 있다. 치료용 조성물(예를 들어, 신경 독성의 증상을 치료 또는 개선하는 유전자 변형 면역 반응성 세포 또는 제제를 함유하는 약학 조성물)을 투여할 때, 일반적으로 이는 주사 가능한 단위 투여량 형태(용액, 현탁액, 에멀션)로 제형화될 것이다.

[0602] 제형에는 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강내, 볼, 설하 또는 좌약 투여를 위한 것이 포함된다. 일부 구현예에서, 제제 또는 세포 집단은 비경구적으로 투여된다. 본원에서 사용되는 용어 “비경구(parenteral)”는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질 및 복강내 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 제제 또는 세포 집단은 정맥내, 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초 진신 전달을 사용하여 대상체에 투여된다.

[0603] 일부 구현예에서 조성물은 멸균 액체 제제로서, 예를 들어, 등장성 수용액, 현탁액, 에멀션, 분산액 또는 점성 조성물로 제공되며, 이는 일부 측면에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 조제품은 일반적으로 겔, 다른 점성 조성물 및 고체 조성물보다 조제하기가 보다 용이하다. 또한, 액체 조성물은 특히 주사에 의해 투여하기가 다소 더 편리하다. 반면에, 점성 조성물은 적절한 점도 범위 내에서 제형화되어 특정 조직과의 보다 긴 접촉 기간을 제공할 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은 예를 들어, 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜) 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 배지일 수 있는 운반체를 포함할 수 있다.

[0604] 멸균 주사용 용액은 적합한 멸균수, 생리 식염수, 포도당, 텍스트로스 등과 같은 부형제, 운반체 또는 희석제와 혼합하는 것과 같이 용매에 제제 또는 세포를 통합함으로써 제조될 수 있다.

[0605] 생체 내 투여에 사용될 제형은 일반적으로 멸균된다. 멸균은 예를 들어, 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.

[0606] 일부 구현예에서, 투여되는 세포의 용량은 냉동 보존된 조성물 내에 있다. 일부 측면에서, 조성물은 냉동 보존된 조성물을 해동한 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 해동 후 (약) 30분, 45분, 60분, 90분, 120분, 150분 또는 180분 내에 투여된다. 일부 구현예에서, 조성물은 해동 후 (약) 120분 내에 투여된다.

[0607] 일부 구현예에서, 세포의 용량은 주사기로 투여된다. 일부 구현예에서, 주사기는 (약) 0.5, 1, 2, 2.5, 3, 4, 5, 7.5, 10, 20 또는 25 mL, 또는 전술한 수치 중 임의의 것에 의해 정의되는 범위의 부피를 갖는다.

[0608] 재조합 수용체를 발현하는 조작된 세포 또는 이의 조성물을 함유하는 제조품 및 키트, 및 선택적으로 사용 지침, 예를 들어, 제공된 방법에 따라 투여하기 위한 지침이 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 지침은 제공된 임의의 방법에 따른 요법을 위한 대상체의 선택 또는 식별을 위한 기준을 명시한다.

[0609] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 임의의 조작된 세포의 치료적 유효량을 포함하는 조성물을 포함하는 제조품 및/또는 키트, 및 질병 또는 병태를 치료하기 위해 대상체에 투여하기 위한 지침이 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 지침은 본원에 제공되는 방법의 구성요소 중 일부 또는 전부를 명시할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 지침은 세포 요법을 위한 세포의 투여를 위한 특정 지침, 예를 들어, 투여할 용량, 시기, 대상체의 선택 및/또는 식별 및 투여 조건을 명시한다. 일부 구현예에서, 제조품 및/또는 키트는 하나 이상의 추가 요법제, 예를 들어, 림프구 고갈 요법 및/또는 병용 요법, 예컨대 본원에 기술된 임의의 것을 더 포함하고 선택적으로 추가 요법제를 투여하기 위한 지침을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 제조품 및/또는 키트는 림프구 고갈 요법제를 더 포함하고, 선택적으로 림프구 고갈 요법을 투여하기 위한 지침을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 지침은 투여용 조성물에 첨부되는 라벨 또는 포장 삽입물로 포함될 수 있다.

[0610] 항균 보존제, 항산화제, 킬레이트제 및 완충제를 포함한, 조성물의 안정성 및 멸균성을 향상시키는 다양한 첨가제가 첨가될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항균 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀 및 소르브산에 의해 보장될 수 있다. 주사용 약학적 형태의 장기간 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 초래될 수 있다.

[0611] 일부 구현예에서, 제형 완충제는 냉동 보존제를 함유한다. 일부 구현예에서, 세포는 1.0% 내지 30% DMSO 용액, 예컨대 5% 내지 20% DMSO 용액 또는 5% 내지 10% DMSO 용액을 함유하는 냉동 보존 용액으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 냉동 보존 용액은 예를 들어, 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 기타 적합한 세포 동결 배지를 함유하는 PBS이거나 이를 함유한다. 일부 구현예에서, 냉동 보존 용액은 예를 들어 적어도 또는 약 7.5% DMSO이거나 이를 함유한다. 일부 구현예에서, 가공 단계는 냉동 보존 용액에서 세포를 교체하기 위해 형질도입된 및/또는 증폭된 세포를 세척하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 최종 농도가 (약) 12.5%, 12.0%, 11.5%, 11.0%, 10.5%, 10.0%, 9.5%, 9.0%, 8.5%, 8.0%, 7.5%, 7.0%, 6.5%, 6.0%, 5.5%, 또는 5.0% DMSO, 또는 1% 내지 15%, 6% 내지 12%, 5% 내지 10%, 또는 6% 내지 8% DMSO인 배지 및/또는 용액에서 동결(예

를 들어, 동결 보호 또는 냉동 보존)된다. 구체적인 구현예에서, 세포는 최종 농도가 (약) 5.0%, 4.5%, 4.0%, 3.5%, 3.0%, 2.5%, 2.0%, 1.5%, 1.25%, 1.0%, 0.75%, 0.5%, 또는 0.25% HSA, 또는 0.1% 내지 -5%, 0.25% 내지 4%, 0.5% 내지 2%, 또는 1% 내지 2% HSA인 배지 및/또는 용액에서 동결(예를 들어, 동결 보호 또는 냉동 보존)된다.

[0612] 구체적인 구현예에서, 농축된 T 세포, 예를 들어 자극된, 조작된 및/또는 인큐베이션된 T 세포의 조성물은 제형화되고, 동결 보호된 후 일정 시간량 동안 저장된다. 특정 구현예에서, 제형화된 동결 보호된 세포는 세포가 주입을 위해 방출될 때까지 저장된다. 구체적인 구현예에서, 제형화된 동결 보호된 세포는 1일 내지 6개월, 1개월 내지 3개월, 1일 내지 14일, 1일 내지 7일, 3일 내지 6일, 6개월 내지 12개월 동안 또는 12개월을 초과하여 저장된다. 일부 구현예에서, 세포는 동결 보호되고 (약) 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일 동안 또는 그 미만 동안 저장된다. 특정 구현예에서, 세포는 저장 후 해동되고 대상체에 투여된다. 특정 구현예에서, 세포는 (약) 5일 동안 저장된다. 일부 구현예에서, 제형화된 세포는 냉동 보존되지 않는다.

[0613] 일부 구현예에서, 제형화는 세포를 세척, 희석 또는 농축시키는 것을 포함하는 하나 이상의 가공 단계를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 가공은 주어진 용량 또는 이의 분획으로 투여를 위한 세포의 수를 포함하는 단위 용량 형태 조성물과 같은 원하는 농도 또는 수로 세포의 희석 또는 농축을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 가공 단계는 부피 감소를 통해 원하는 대로 세포의 농도를 증가시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 가공 단계는 부피 추가를 통해 원하는 대로 세포의 농도를 감소시키는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 가공은 형질도입된 및/또는 인큐베이션된 세포에 일정 부피의 제형 완충제를 추가하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제형 완충제의 부피는 (약) 10mL 내지 1000mL, 예컨대 적어도 또는 적어도 (약) 50mL, 100mL, 200mL, 300mL, 400mL, 500mL, 600mL, 700mL, 800mL, 900mL 또는 1000mL이다.

[0614] 일부 구현예에서, 세포 조성물을 제형화하기 위한 상기 가공 단계는 폐쇄 시스템에서 수행된다. 예시적인 상기 가공 단계는 Sepax® 또는 Sepax 2® 세포 처리 시스템과 함께 사용하기 위한 것을 포함하여 Biosafe SA에 의해 생산 및 판매되는 원심분리 챔버와 같은 세포 처리 시스템과 관련된 하나 이상의 시스템 또는 키트와 함께 원심분리 챔버를 사용하여 수행될 수 있다. 예시적인 시스템 및 공정이 문헌[국제 공개 번호 W02016/073602]에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, 본 방법은 기재된 바와 같이, 상기 구현예 중 어느 하나에서 제형 완충제, 예컨대 약학적으로 허용 가능한 완충제에서 제형화된 세포의 생성된 조성물인 제형화된 조성물을 원심분리 챔버의 내부 공동으로부터 발현을 달성하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제형화된 조성물의 발현은 원심분리 챔버를 가진 폐쇄 시스템의 일부로서 작동 가능하게 연결된 용기, 예컨대 백으로 이루어진다. 일부 구현예에서, 백 등의 용기는 시스템의 출력 라인 또는 출력 위치에 연결된다.

[0615] 일부 구현예에서, 예컨대 원심분리 챔버 또는 세포 처리 시스템에 결합된, 폐쇄 시스템은, 하나 또는 다수의 용기가 제형화된 조성물의 발현을 위해 연결될 수 있는 포트를 가진 튜브 라인의 각 끝에 결합된 다방향 튜브 매니폴드를 함유하는 다중 포트 출력 키트를 포함한다. 일부 측면에서, 원하는 수 또는 다수의 출력 용기(예를 들어, 백)는 다중 포트 출력 중 하나 이상, 일반적으로 둘 이상, 예컨대 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8 이상의 포트에 평균적으로 연결될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 하나 이상의 용기(예를 들어, 백)는 포트들에 또는 모든 포트 수 미만 포트에 부착될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 시스템은 다수의 산출 백 내로 산출 조성물의 발현을 달성할 수 있다.

[0616] 일부 측면에서, 세포는 다수의 산출 백들 중 하나 이상에 예컨대 단일 단위 투여량 투여 또는 다수 투여량 투여를 위해, 투여량 투여를 위한 용량으로, 발현될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 산출 백은 주어진 용량 또는 이의 분획으로 투여하기 위한 세포의 수를 함유할 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 각 백은 투여를 위한 단일 단위 용량을 함유할 수 있거나 다수의 산출 백 중 하나보다 많은 수가, 예컨대 산출 백들 중 둘이, 또는 산출 백들 중 셋이 함께 투여를 위한 용량을 구성하도록 원하는 용량의 분획을 함유할 수 있다.

[0617] 따라서, 용기(예를 들어, 산출 백)는 일반적으로 투여될 세포, 예를 들어, 이의 하나 이상의 단위 용량을 함유한다. 단위 용량(unit dose)은 대상체에게 투여될 세포의 양 또는 수이거나 또는 투여될 세포의 수의 두배(또는 그 이상)일 수 있다. 이는 대상체에게 투여될 세포의 최저 용량 또는 가능한 최저 용량일 수 있다.

[0618] 일부 구현예에서, 용기(예를 들어, 백)의 각각은 개별적으로 세포의 단위 용량을 포함한다. 따라서 일부 구현예에서, 각 용기는 동일한 또는 대략 또는 실질적으로 동일한 수의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 각 단위 용량은 적어도 또는 약 적어도 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 또는 1×10^8 개의 조작된 세포, 종 세포, T 세포, 또는 PBMC를 함유한다. 일부 구현예에서, 각 백 내 제형화된 세포 조성물의 부피는 10mL 내지

100mL, 예컨대 (약) 적어도 20mL, 30mL, 40mL, 50mL, 60mL, 70mL, 80mL, 90mL 또는 100mL이다.

[0619] 일부 구현예에서, 본 방법에 의해 생산된 상기 세포 또는 상기 세포를 포함하는 조성물은 질병 또는 병태를 치료하기 위해 대상체에게 투여된다.

[0620] III. 조성물 및 제형

[0621] 제공된 방법 및 용도는 키메라 항원 수용체(CAR), 예를 들어, 인간 CD19를 표적화하는 CAR 등의 항-CD19 CAR을 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물의 조작된 세포의 용량의 사용 또는 투여를 수반한다. 특정 구현예에서, 조성물은 T 세포가 농축된 치료용 조성물, 예를 들어, 산출 조작된 세포 및/또는 본원에 예를 들어 섹션 II-C에 개시된 조작된 T 세포를 포함하는 산출 조성물을 생성 또는 생산하기 위한 공정을 사용하여 제조된, CD3+ T 세포가 농축된 조성물 또는 CD4+ 및 CD8+ T 세포가 농축된 조성물이다. 일부 구현예에서, 조작된 T 세포는 조작성물, 제형, 또는 용량으로, 예컨대 약학 조성물, 제형 또는 용량으로 제공된다. 상기 조성물, 제형 또는 용량은 제공된 방법 또는 용도, 및/또는 제공된 제조품 또는 조성물에 부합되게, 예컨대 질병, 병태 및 장애의 예방 또는 치료에, 또는 검출, 진단, 및 예후 방법에 사용될 수 있다.

[0622] 구체적인 구현예에서, 항-CD19 CAR을 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물은 CD3+ T 세포가 농축되어 있다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 세포, 총 생존 세포, 총 살아있는 세포, 총 T 세포, 총 생존 T 세포, 총 살아있는 T 세포, 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 적어도 또는 약 50%, 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 96%, 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+, 예를 들어, CD3+ T 세포 또는 CAR+CD3+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 세포, 총 생존 세포, 총 살아있는 세포, 총 T 세포, 총 생존 T 세포, 총 살아있는 T 세포, 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 (약) 75% 내지 80%, (약) 80% 내지 85%, (약) 85% 내지 90%, (약) 90% 내지 95%, (약) 95% 내지 99%는 CD3+, 예를 들어, CD3+ T 세포 또는 CAR+CD3+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 (약) 80%, (약) 81%, (약) 82%, (약) 83%, (약) 84%, (약) 85%, (약) 86%, (약) 87%, (약) 88%, (약) 89%, (약) 90%, (약) 91%, (약) 92%, (약) 93%, (약) 94%, (약) 95%, (약) 96%, (약) 97%, (약) 98%, 또는 (약) 99%는 CD3+, 예를 들어, CD3+ T 세포 또는 CAR+CD3+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 약 80% 내지 100%, 약 85% 내지 99%, 약 88% 내지 98%, 약 96% 내지 99%, 또는 약 97% 내지 99%는 CD3+, 예를 들어, CD3+ T 세포 또는 CAR+CD3+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 조성물은 CD3+ T 세포로 구성되거나 이를 필수적으로 포함하여 구성된다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 80%는 CD3+ T 세포이고 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 40%, 적어도 또는 약 50%, 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 90%, 또는 적어도 또는 약 95%는 항-CD19 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 98% 또는 적어도 또는 약 99%는 CD3+이고 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 40% 또는 적어도 또는 약 50%는 항-CD19 CAR을 발현한다.

[0623] 일부 구현예에서, 조성물 중 총 세포, 총 생존 세포, 총 살아있는 세포, 총 T 세포, 총 생존 T 세포, 총 살아있는 T 세포, 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 (약) 2.5% 미만, (약) 2% 미만, (약) 1.5% 미만, (약) 1% 미만, (약) 0.5% 미만, (약) 0.4% 미만, (약) 0.3% 미만, (약) 0.2% 미만, (약) 0.1% 미만, (약) 0.05% 미만, 또는 (약) 0%는 NK 세포 표지자의 발현에 대해 양성이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 세포, 총 생존 세포, 총 살아있는 세포, 총 T 세포, 총 생존 T 세포, 총 살아있는 T 세포, 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 (약) 2.5% 내지 (약) 2%, (약) 2% 내지 (약) 1.5%, (약) 1.5% 내지 (약) 1%, (약) 1% 내지 (약) 0.5%, (약) 0.5% 내지 (약) 0.4%, (약) 0.4% 내지 (약) 0.3%, (약) 0.3% 내지 (약) 0.2%, (약) 0.2% 내지 (약) 0.1%, (약) 0.1% 내지 (약) 0.05%, (약) 0.05% 미만, 또는 (약) 0%는 NK 세포이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 (약) 1.5% 내지 (약) 0%, 또는 (약) 0.5% 내지 (약) 0%는 NK 세포이다. 일부 구현예에서, 조성물은 NK 세포 또는 NK 세포 표지자의 발현에 대해 양성인 세포가 없거나 본질적으로 없다.

[0624] 일부 구현예에서, 조성물 중 총 세포, 총 생존 세포, 총 살아있는 세포, 총 T 세포, 총 생존 T 세포, 총 살아있는 T 세포, 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 (약) 0.2% 미만, (약) 0.15% 미만, (약) 0.1% 미만, (약) 0.05% 미만, (약) 0.01% 미만, 또는 (약) 0%는 CD19+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 세포,

총 생존 세포, 총 살아있는 세포, 총 T 세포, 총 생존 T 세포, 총 살아있는 T 세포, 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 (약) 0.2% 내지 0.15%, (약) 0.15% 내지 0.1%, (약) 0.1% 내지 0.05%, (약) 0.05% 내지 0.01%, (약) 0.01% 미만, 또는 (약) 0%는 CD19+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 (약) 0.1% 내지 (약) 0%, 또는 (약) 0.05% 내지 (약) 0%는 CD19+이다. 일부 구현예에서, 조성물은 CD19+ 세포가 없거나 본질적으로 없다.

[0625] 일부 구현예에서, 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 적어도 또는 약 80%는 CD3+이고, 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 40%는 항-CD19 CAR을 발현하고, 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 약 1.5% 미만은 NK 세포 또는 NK 세포 표지자의 발현에 대해 양성인 세포이고, 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 약 0.1% 미만은 CD19+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 적어도 또는 약 96%는 CD3+이고, 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 50%는 항-CD19 CAR을 발현하고, 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 약 0.5% 미만은 NK 세포 또는 NK 세포 표지자의 발현에 대해 양성인 세포이고, 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 약 0.05% 미만은 CD19+이다.

[0626] 구체적인 구현예에서, 항-CD19 CAR을 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물은 CD4+ 및 CD8+ T 세포가 농축되어 있다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 세포, 총 생존 세포, 총 살아있는 세포, 총 T 세포, 총 생존 T 세포, 총 살아있는 T 세포, 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 적어도 또는 약 50%, 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 96%, 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 CD4+ 또는 CD8+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 세포, 총 생존 세포, 총 살아있는 세포, 총 T 세포, 총 생존 T 세포, 총 살아있는 T 세포, 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 (약) 75% 내지 80%, (약) 80% 내지 85%, (약) 85% 내지 90%, (약) 90% 내지 95%, 또는 (약) 95% 내지 (약) 99%는 CD4+ 또는 CD8+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 (약) 80%, (약) 81%, (약) 82%, (약) 83%, (약) 84%, (약) 85%, (약) 86%, (약) 87%, (약) 88%, (약) 89%, (약) 90%, (약) 91%, (약) 92%, (약) 93%, (약) 94%, (약) 95%, (약) 96%, (약) 97%, (약) 98%, 또는 (약) 99%는 CD4+ 또는 CD8+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 약 80% 내지 100%, 약 85% 내지 99%, 약 88% 내지 98%, 약 96% 내지 99%, 또는 약 97% 내지 99%는 CD4+ 또는 CD8+이다. 일부 구현예에서, 조성물은 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포로 구성되거나 이를 필수적으로 포함하여 구성된다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 80%는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포이고 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 40%, 적어도 또는 약 50%, 적어도 또는 약 60%, 적어도 또는 약 70%, 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 90%, 또는 적어도 또는 약 95%는 항-CD19 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 적어도 또는 약 80%, 적어도 또는 약 85%, 적어도 또는 약 90%, 적어도 또는 약 95%, 적어도 또는 약 96%, 적어도 또는 약 97%, 적어도 또는 약 98% 또는 적어도 또는 약 99%는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포이고 조성물 중 총 세포의 적어도 또는 약 40% 또는 적어도 또는 약 50%는 항-CD19 CAR을 발현한다.

[0627] 구체적인 구현예에서, CD3+CD4+ 세포는 조성물 중 총 세포, 총 생존 세포, 총 살아있는 세포, 총 T 세포, 총 생존 T 세포, 총 살아있는 T 세포, 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 적어도 또는 약 50%, 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 96%, 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. 구체적인 구현예에서, CD3+CD4+ 세포는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 (약) 50% 내지 (약) 70%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, (약) 60% 내지 (약) 65%, 또는 (약) 65% 내지 (약) 70%를 차지한다.

[0628] 구체적인 구현예에서, CD3+CD8+ 세포는 조성물 중 총 세포, 총 생존 세포, 총 살아있는 세포, 총 T 세포, 총 생존 T 세포, 총 살아있는 T 세포, 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 35%, 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 96%, 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. 구체적인 구현예에서, CD3+CD8+ 세포는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 (약) 30% 내지 (약) 50%, (약) 30% 내지 (약) 35%, (약) 35% 내지 (약) 40%, (약) 40% 내지 (약) 45%, 또는 (약) 45% 내지 (약) 50%를 차지한다.

다.

- [0629] 구체적인 구현예에서, CD3+CD4+ 세포는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 약 55% 내지 약 65%를 차지하고, CD3+CD8+ 세포는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 약 35% 내지 45%를 차지한다. 구체적인 구현예에서, CD3+CD4+ 세포는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 약 60%를 차지하고, CD3+CD8+ 세포는 약 40%를 차지한다.
- [0630] 구체적인 구현예에서, CAR+CD3+ 세포(예를 들어, 항-CD19 CAR을 발현하는 CD3+ 세포)는 조성물 중 총 세포, 총 생존 세포, 총 살아있는 세포, 총 T 세포, 총 생존 T 세포, 총 살아있는 T 세포, 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 적어도 또는 약 20%, 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 40%, 적어도 또는 약 50%, 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 96%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 99.5%, 적어도 또는 약 99.9%, 100%, 또는 약 100%를 차지한다. 구체적인 구현예에서, CAR+CD3+ 세포(예를 들어, 항-CD19 CAR을 발현하는 CD3+ 세포)는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 (약) 40% 내지 (약) 100%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, (약) 60% 내지 (약) 65%, (약) 65% 내지 (약) 70%, (약) 70% 내지 (약) 75%, (약) 75% 내지 (약) 80%, (약) 80% 내지 (약) 85%, (약) 85% 내지 (약) 90%, (약) 90% 내지 (약) 95%, 또는 (약) 95% 내지 (약) 99%를 차지한다.
- [0631] 구체적인 구현예에서, CAR+CD4+ 세포(예를 들어, 항-CD19 CAR을 발현하는 CD4+ 세포)는 조성물 중 총 세포, 총 생존 세포, 총 살아있는 세포, 총 T 세포, 총 생존 T 세포, 총 살아있는 T 세포, 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 적어도 또는 약 20%, 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 40%, 적어도 또는 약 50%, 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 96%, 적어도 또는 약 98%, 적어도 또는 약 99%, 적어도 또는 약 99.5%, 적어도 또는 약 99.9%, 100%, 또는 약 100%를 차지한다. 구체적인 구현예에서, CAR+CD4+ 세포(예를 들어, 항-CD19 CAR을 발현하는 CD4+ 세포)는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 (약) 20% 내지 (약) 60%, (약) 20% 내지 (약) 25%, (약) 25% 내지 (약) 30%, (약) 30% 내지 (약) 35%, (약) 35% 내지 (약) 40%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, 또는 (약) 55% 내지 (약) 60%를 차지한다.
- [0632] 구체적인 구현예에서, CAR+CD8+ 세포(예를 들어, 항-CD19 CAR을 발현하는 CD8+ 세포)는 조성물 중 총 세포, 총 생존 세포, 총 살아있는 세포, 총 T 세포, 총 생존 T 세포, 총 살아있는 T 세포, 총 살아있는 CD45+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 적어도 또는 약 10%, 적어도 또는 약 20%, 적어도 또는 약 30%, 적어도 또는 약 35%, 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 96%, 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. 구체적인 구현예에서, CAR+CD8+ 세포(예를 들어, 항-CD19 CAR을 발현하는 CD8+ 세포)는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 (약) 5% 내지 (약) 35%, (약) 5% 내지 (약) 10%, (약) 10% 내지 (약) 15%, (약) 15% 내지 (약) 20%, (약) 20% 내지 (약) 25%, (약) 25% 내지 (약) 30%, 또는 (약) 30% 내지 (약) 35%를 차지한다.
- [0633] 구체적인 구현예에서, CAR+CD3+ 세포(예를 들어, 항-CD19 CAR을 발현하는 CD3+ 세포)는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 약 35% 내지 약 65%를 차지한다. 구체적인 구현예에서, CAR+CD4+ 세포(예를 들어, 항-CD19 CAR을 발현하는 CD4+ 세포)는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 약 25% 내지 약 55%를 차지하고, CAR+CD8+ 세포(예를 들어, 항-CD19 CAR을 발현하는 CD8+ 세포)는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 약 10% 내지 30%를 차지한다. 구체적인 구현예에서, 항-CD19 CAR을 발현하는 CD3+ 세포는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 약 50%를 차지한다. 구체적인 구현예에서, CAR+CD4+ 세포는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 약 30%를 차지하고, CAR+CD8+ 세포는 약 20%를 차지한다. 구체적인 구현예에서, 항-CD19 CAR을 발현하는 CD3+ 세포는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 약 60%를 차지한다. 구체적인 구현예에서, CAR+CD4+ 세포는 조성물 중 총 살아있는 CD45+ 세포의 약 40%를 차지하고, CAR+CD8+ 세포는 약 20%를 차지한다.
- [0634] 구체적인 구현예에서, 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 비율 함유한다. 일부 구현예에서, 세포의 조성물은 (약) 3:1, (약) 2.8:1, (약) 2.5:1, (약) 2.25:1, (약) 2:1, (약) 1.8:1, (약) 1.7:1, (약) 1.6:1, (약) 1.5:1, (약) 1.4:1, (약) 1.3:1, (약) 1.2:1, (약) 1.1:1, (약)

1:1, (약) 1:1.1, (약) 1:1.2, (약) 1:1.3, (약) 1:1.4, (약) 1:1.5, (약) 1:1.6, (약) 1:1.7, (약) 1:1.8, (약) 1:2, (약) 1:2.25, (약) 1:2.5, (약) 1:2.8, 또는 (약) 1:3의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 갖는다.

[0635] 일부 구현예에서, 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, 항-CD19 CAR)를 발현하는 CD4+ T 세포 대 재조합 수용체(예를 들어, 항-CD19 CAR)를 발현하는 CD8+ T 세포의 비를 함유한다. 일부 구현예에서, 산출 조성물 중 재조합 수용체(예를 들어, 항-CD19 CAR)를 발현하는 CD4+ T 세포 대 재조합 수용체(예를 들어, 항-CD19 CAR)를 발현하는 CD8+ T 세포의 비는 (약) 3:1, (약) 2.8:1, (약) 2.5:1, (약) 2.25:1, (약) 2:1, (약) 1.8:1, (약) 1.7:1, (약) 1.6:1, (약) 1.5:1, (약) 1.4:1, (약) 1.3:1, (약) 1.2:1, (약) 1.1:1, (약) 1:1, (약) 1:1.1, (약) 1:1.2, (약) 1:1.3, (약) 1:1.4, (약) 1:1.5, (약) 1:1.6, (약) 1:1.7, (약) 1:1.8, (약) 1:2, (약) 1:2.25, (약) 1:2.5, (약) 1:2.8, 또는 (약) 1:3이다.

[0636] 구체적인 구현예에서, 조성물은 약 2.5:1 내지 약 1:2 또는 약 2:1 내지 약 1:1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 함유한다. 일부 구현예에서, 세포의 조성물은 (약) 1.5:1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 갖는다. 구체적인 구현예에서, 조성물은 약 3:1 내지 약 1:1의 CAR+CD4+ T 세포 대 CAR+CD8+ T 세포의 비를 함유한다. 구체적인 구현예에서, 조성물은 약 2.5:1 내지 약 1.5:1의 CAR+CD4+ T 세포 대 CAR+CD8+ T 세포의 비를 함유한다. 일부 구현예에서, 세포의 조성물은 (약) 2:1의 CAR+CD4+ T 세포 대 CAR+CD8+ T 세포의 비를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포의 조성물은 (약) 1.5:1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 갖고, (약) 2:1의 CAR+CD4+ 세포 대 CAR+CD8+ 세포의 비를 갖는다.

[0637] 구체적인 구현예에서, 조성물은 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%의 생존 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 조성물은 적어도 (약) 75%의 생존 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 조성물은 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%의 생존 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 조성물은 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%의 생존 CD3+ T 세포를 함유한다. 구체적인 구현예에서, 조성물은 적어도 (약) 75%의 생존 CD3+ T 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 조성물은 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%의 생존 CD3+ T 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 조성물은 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%의 생존 CD4+ T 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 조성물은 적어도 (약) 75%의 생존 CD4+ T 세포를 함유한다. 구체적인 구현예에서, 조성물은 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%의 생존 CD4+ T 세포를 함유한다. 구체적인 구현예에서, 조성물은 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%의 생존 CD8+ T 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 조성물은 적어도 (약) 75%의 생존 CD8+ T 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 조성물은 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%의 생존 CD8+ T 세포를 함유한다.

[0638] 구체적인 구현예에서, 조성물은 세포자멸사를 겪는 및/또는 조제된, 프라이밍된, 및/또는 진입하는 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 구체적인 구현예에서, 조성물은 세포자멸 표지자에 양성인 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 조성물의 세포의 (약) 40% 미만, (약) 35% 미만, (약) 30% 미만, (약) 25% 미만, (약) 20% 미만, (약) 15% 미만, (약) 10% 미만, (약) 5% 미만, 또는 (약) 1% 미만은 세포자멸 표지자를 발현하고, 함유하고 및/또는 이에 대해 양성이다. 특정 구현예에서, 조성물의 세포의 (약) 25%는 세포자멸사의 표지자를 발현하고, 함유하고 및/또는 이에 대해 양성이다. 특정 구현예에서, 조성물의 세포의 (약) 10%는 세포자멸 표지자를 발현하고, 함유하고 및/또는 이에 대해 양성이다.

[0639] 구체적인 구현예에서, 조성물의 항-CD19 CAR 발현 T 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%는 생존 세포, 예를 들어, 카스파제(예를 들어, 활성화된 카스파제-3) 등의 세포자멸 표지자에 대해 음성인 세포이다. 특정 구현예에서, 조성물의 항-CD19 CAR 발현 T 세포의 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%는 카스파제(예를 들어, 활성화된 카스파제-3) 등의 세포자멸 표지자에 대해 음성이다. 일부 구현예에서, 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%는 생존 세포, 예를 들어, 카스파제(예를 들어, 활성화된 카스파제-3) 등의 세포자멸 표지자에 대해 음성인 세포이다. 특정 구현예에서, 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%는 카스파제(예를 들어, 활성화된 카스파제-3) 등의 세포자멸 표지자에 대해 음성이다. 일부 구현예에서, 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%는 생존 세포, 예를 들어, 카스파제(예를 들어, 활성화된 카스파제-3) 등의 세포자멸 표지자에 대해 음성인 세포이다.

99%, 또는 적어도 (약) 99.9%는 생존 세포, 예를 들어, 카스파제(예를 들어, 활성화된 카스파제-3) 등의 세포자멸 표지자에 대해 음성인 세포이다. 특정 구현예에서, 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%는 카스파제(예를 들어, 활성화된 카스파제-3) 등의 세포자멸 표지자에 대해 음성이다. 구체적인 구현예에서, 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 (약) 90%는 생존 세포, 예를 들어, 카스파제(예를 들어, 활성화된 카스파제-3) 등의 세포자멸 표지자에 대해 음성인 세포이다. 일부 구현예에서, 조성물의 CAR+CD3+ T 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%는 생존 세포, 예를 들어, 카스파제(예를 들어, 활성화된 카스파제-3) 등의 세포자멸 표지자에 대해 음성인 세포이다. 구체적인 구현예에서, 조성물의 항-CD19 CAR 발현 CD3+ T 세포의 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%는 생존 세포, 예를 들어, 카스파제(예를 들어, 활성화된 카스파제-3) 등의 세포자멸 표지자에 대해 음성인 세포이다.

[0640] 일부 구현예에서, 조성물 중 총 세포, 총 T 세포, 총 CD45+ 세포, 총 CD3+ 세포, 총 CD4+ 및 CD8+ 세포 또는 그의 CAR-발현 세포의 (약) 30% 미만, (약) 25% 미만, (약) 20% 미만, (약) 15% 미만, (약) 10% 미만, 또는 (약) 5% 미만은 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현한다. 일부 구현예에서, 조성물 중 총 세포, 총 T 세포, 총 CD45+ 세포, 총 CD3+ 세포, 총 CD4+ 및 CD8+ 세포, 또는 그의 CAR-발현 세포의 (약) 30% 내지 25%, (약) 25% 내지 20%, (약) 20% 내지 15%, (약) 15% 내지 10%, (약) 10% 내지 5%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현한다. 일부 구현예에서, 조성물 중 CD3+ 세포의 (약) 6%, (약) 8%, (약) 10%, (약) 12%, (약) 14%, (약) 16%, (약) 18%, (약) 20%, (약) 22%, (약) 24%, (약) 26%, (약) 28%, (약) 30%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현한다.

[0641] 일부 구현예에서, 항-CD19 CAR을 발현하는 것은 세포막 및/또는 세포 표면에 국소화된 하나 이상의 재조합 수용체 단백질을 갖는 것, 검출 가능한 양의 재조합 수용체 단백질을 갖는 것, 재조합 수용체를 암호화하는 검출 가능한 양의 mRNA를 갖는 것, 재조합 수용체를 암호화하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 갖거나 함유하는 것, 및/또는 재조합 수용체 발현에 대한 대리 표지자인 mRNA 또는 단백질을 갖거나 함유하는 것을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0642] 일부 구현예에서, 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% 이상은 재조합 수용체(예를 들어, 항-CD19 CAR)를 발현한다. 특정 구현예에서, 조성물의 세포의 적어도 또는 약 50%는 항-CD19 CAR을 발현한다. 특정 구현예에서, 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% 이상은 항-CD19 CAR을 발현한다. 일부 구현예에서, 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 또는 약 50%는 항-CD19 CAR을 발현한다. 특정 구현예에서, 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% 이상은 항-CD19 CAR을 발현하는 CD3+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 조성물의 세포의 적어도 또는 약 50%는 항-CD19 CAR을 발현하는 CD3+ T 세포이다.

[0643] 일부 구현예에서, 조성물은 적어도 또는 약 0.2×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 0.3×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 0.4×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 0.5×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 0.6×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 0.7×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 0.8×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 0.9×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 1×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.1×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.2×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.3×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.4×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.5×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.6×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.7×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.8×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.9×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 2×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.1×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.2×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.3×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.4×10^6 개 CD3+CAR+ 세

포/mL, 2.5×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.6×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.7×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.8×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.9×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 3×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.1×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.2×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.3×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.4×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.5×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.6×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.7×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.8×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.9×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 4×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.1×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.2×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.3×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.4×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.5×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.6×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.7×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.8×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.9×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 5×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.1×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.2×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.3×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.4×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.5×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.6×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.7×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.8×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.9×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL, 또는 6×10^6 개 CD3+CAR+ 세포/mL(각 수치 포함)을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 적어도 또는 적어도 약 0.2×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 0.3×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 0.4×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 0.5×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 0.6×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 0.7×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 0.8×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 0.9×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 1×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.1×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.2×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.3×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.4×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.5×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.6×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.7×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.8×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 1.9×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 2×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.1×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.2×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.3×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.4×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.5×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.6×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.7×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.8×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 2.9×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 3×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.1×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.2×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.3×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.4×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.5×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.6×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.7×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.8×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 3.9×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 4×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.1×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.2×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.3×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.4×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.5×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.6×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.7×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.8×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 4.9×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 5×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.1×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.2×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.3×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.4×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.5×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.6×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.7×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.8×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 5.9×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL, 또는 6×10^6 개 생존 CD3+CAR+ 세포/mL(각 수치 포함)을 포함한다.

[0644]

구체적인 구현예에서, 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% 이상은 재조합 수용체(예를 들어, 항-CD19 CAR)를 발현한다. 구체적인 구현예에서, 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 또는 약 50%는 재조합 수용체(예를 들어, 항-CD19 CAR)를 발현한다. 일부 구현예에서, 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% 이상은 재조합 수용체(예를 들어, 항-CD19 CAR)를 발현한다. 특정 구현예에서, 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 또는 약 50%는 재조합 수용체(예를 들어, 항-CD19 CAR)를 발현한다.

[0645] 일부 구현예에서, 조성물 중 살아있는 CD45+ 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% 이상은 CD3+CAR+(예를 들어, 항-CD19 CAR을 발현하는 CD3+ T 세포), CD4+CAR+(예를 들어, 항-CD19 CAR을 발현하는 CD4+ T 세포), 및/또는 CD8+CAR+(예를 들어, 항-CD19 CAR을 발현하는 CD8+ T 세포)이다. 특정 구현예에서, 조성물 중 살아있는 CD45+ 세포의 적어도 또는 약 50%는 항-CD19 CAR을 발현하는 CD3+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 조성물 중 살아있는 CD45+ 세포의 (약) 60% 내지 (약) 65%는 항-CD19 CAR을 발현하는 CD3+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 조성물 중 살아있는 CD45+ 세포의 (약) 35% 내지 (약) 45%, (약) 35% 내지 (약) 40%, 또는 (약) 40% 내지 (약) 45%는 항-CD19 CAR을 발현하는 CD4+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 조성물 중 살아있는 CD45+ 세포의 (약) 15% 내지 (약) 25%, (약) 15% 내지 (약) 20%, 또는 (약) 20% 내지 (약) 25%는 항-CD19 CAR을 발현하는 CD8+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 조성물 중 살아있는 CD45+ 세포의 적어도 또는 약 60%는 항-CD19 CAR을 발현하는 CD3+ T 세포이고, 적어도 또는 약 40%는 항-CD19 CAR을 발현하는 CD4+ T 세포이고, 그리고 적어도 또는 약 20%는 항-CD19 CAR을 발현하는 CD8+ T 세포이다.

[0646] 임의의 선행 구현예에서, 조성물은 하나 이상의 용기 예컨대 바이알에 약 또는 적어도 약 10×10^6 , 약 또는 적어도 약 20×10^6 , 약 또는 적어도 약 25×10^6 , 약 또는 적어도 약 50×10^6 , 약 또는 적어도 약 100×10^6 , 약 또는 적어도 약 200×10^6 , 약 또는 적어도 약 400×10^6 , 약 또는 적어도 약 600×10^6 , 약 또는 적어도 약 800×10^6 , 약 또는 적어도 약 1000×10^6 , 약 또는 적어도 약 1200×10^6 , 약 또는 적어도 약 1400×10^6 , 약 또는 적어도 약 1600×10^6 , 약 또는 적어도 약 1800×10^6 , 약 또는 적어도 약 2000×10^6 , 약 또는 적어도 약 2500×10^6 , 약 또는 적어도 약 3000×10^6 , 또는 약 또는 적어도 약 4000×10^6 개의 총 세포(예를 들어, 총 생존 세포)를 포함할 수 있다. 임의의 선행 구현예에서, 조성물의 부피는 1.0mL 내지 10mL(수치 포함), 선택적으로 (약) 2mL, 3mL, 4mL, 5mL, 6mL, 7mL, 8mL, 9mL, 또는 10mL, 또는 전술한 임의의 수치 사이의 임의의 값일 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 복수의 용기에, 예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 바이알에 담긴다. 임의의 선행 구현예에서, 조성물은 단위 용기 당 예컨대 바이알 당 약 또는 적어도 약 5×10^6 , 약 또는 적어도 약 10×10^6 , 약 또는 적어도 약 20×10^6 , 약 또는 적어도 약 25×10^6 , 약 또는 적어도 약 50×10^6 , 약 또는 적어도 약 100×10^6 , 약 또는 적어도 약 150×10^6 , 약 또는 적어도 약 200×10^6 , 약 또는 적어도 약 250×10^6 , 약 또는 적어도 약 300×10^6 , 약 또는 적어도 약 350×10^6 , 약 또는 적어도 약 400×10^6 , 약 또는 적어도 약 450×10^6 , 약 또는 적어도 약 500×10^6 , 약 또는 적어도 약 550×10^6 , 또는 약 또는 적어도 약 600×10^6 개의 총 세포(예를 들어, 총 생존 세포)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 용기 내 조성물의 세포는 용액 또는 완충액에 예를 들어 냉동 보존 용액 또는 완충액에 (약) 또는 적어도 5×10^6 개 세포/mL, 10×10^6 개 세포/mL, 20×10^6 개 세포/mL, 30×10^6 개 세포/mL, 40×10^6 개 세포/mL, 50×10^6 개 세포/mL, 60×10^6 개 세포/mL, 70×10^6 개 세포/mL, 80×10^6 개 세포/mL, 90×10^6 개 세포/mL, 100×10^6 개 세포/mL, 110×10^6 개 세포/mL, 120×10^6 개 세포/mL, 130×10^6 개 세포/mL, 140×10^6 개 세포/mL, 또는 150×10^6 개 세포/mL, 또는 전술한 임의의 수치 사이의 임의의 값의 밀도로 존재한다. 일부 구현예에서, 약 또는 최대 약 900×10^6 개 세포(예를 들어, 생존 CD4+ T 세포 및 생존 CD8+ T 세포, 또는 생존 CD3+ T 세포)가 자극을 거치고, 여기서 자극된 조성물의 약 또는 최대 약 600×10^6 개 세포(예를 들어, 생존 CD4+ T 세포 및 생존 CD8+ T 세포, 또는 생존 CD3+ T 세포)는, 예를 들어, 형질도입에 의해, 바이러스 벡터로 유전자 조작을 거치거나 비바이러스 방법의 유전자 조작을 거치고 이어서 약 72시간 또는 약 3일 동안 재조합 사이토카인 없이 무혈청 기본 배지(예를 들어, 하나 이상의 보충물이 보충됨)에서 인큐베이션을 거친다. 일부 구현예에서, 생산된 산출 조성물은 하나

이상의 용기 예컨대 바이알에 약 100×10^6 내지 약 1400×10^6 개의 총 세포(예를 들어, 총 생존 세포)를 포함한다.

[0647] 구체적인 구현예에서, 조성물의 대부분의 세포는 나이브 또는 나이브-유사 세포, 중심 기억 세포, 및/또는 효과기 기억 세포이다. 구체적인 구현예에서, 조성물의 대부분의 세포는 나이브-유사 또는 중심 기억 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 대부분의 세포는 중심 기억 세포이다. 일부 측면에서, 덜 분화된 세포, 예를 들어 중심 기억 세포는 수명이 더 길고 덜 빨리 탈진되어 지속성과 내구성이 증가한다. 일부 측면에서, 세포 요법, 예컨대 CAR-T 세포 요법에 대한 반응자는 중심 기억 유전자의 발현이 증가했다. 예를 들어, 문헌 [Fraiotta 등 (2018) Nat Med. 24(5):563-571]을 참조한다.

[0648] 특정 구현예에서, 조성물의 세포는 높은 비율 및/또는 빈도의 나이브-유사 T 세포 또는 나이브-유사 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 표면 양성인 T 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 조성물의 세포는 대체 공정들, 예컨대 증폭을 수반하는 공정들(예를 들어, 증폭 단위 조작을 포함하고/거나 세포의 증폭을 일으킬 의도의 단계들을 포함하는 공정들)로부터 생성된 조성물보다 더 큰 비율 및/또는 빈도의 나이브-유사 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 T 세포는 다양한 분화 상태의 세포를 포함할 수 있고 특정 세포 표지자의 양성 또는 고 발현(예를 들어, 표면 발현 또는 세포내 발현) 및/또는 다른 세포 표지자의 음성 또는 저 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 고 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 저 발현을 특징으로 한다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 T 세포 또는 나이브-유사 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포는 CCR7+CD45RA+이고, 여기서 상기 세포들은 CD27+ 또는 CD27-이다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 T 세포 또는 나이브-유사 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포는 CD27+CCR7+이고, 여기서 상기 세포들은 CD45RA+ 또는 CD45RA-이다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 T 세포 또는 나이브-유사 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포는 CD62L-CCR7+이다.

[0649] 구체적인 구현예에서, 조성물의 세포는 CCR7+ 세포가 농축되어 있다. CCR7은 림프절로의 T 세포 진입에 관여하는 케모카인 수용체이다. 구체적인 측면에서, CCR7은 나이브 또는 나이브-유사 T 세포(예를 들어, CCR7+CD45RA+ 또는 CCR7+CD27+) 및 중심 기억 T 세포(CCR7+CD45RA-)에 의해 발현된다. 일부 구현예에서, 제공된 방법에 의해 생산된 제공된 조작된 T 세포 조성물은, 집단의 T 세포의 (약) 50% 초과, (약) 55% 초과, (약) 60% 초과, (약) 65% 초과, (약) 70% 초과, (약) 75% 초과, (약) 80% 초과, (약) 85% 초과, 또는 (약) 90% 초과가 중심 기억 및 나이브-유사 T 세포인, T 세포의 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 방법에 의해 생산된 제공된 조작된 T 세포 조성물은, 집단의 T 세포의 (약) 50% 초과, (약) 55% 초과, (약) 60% 초과, (약) 65% 초과, (약) 70% 초과, (약) 75% 초과, (약) 80% 초과, (약) 85% 초과, 또는 (약) 90% 초과가 CCR7+ T 세포인, T 세포의 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 방법에 의해 생산된 제공된 조작된 T 세포 조성물은, 집단의 T 세포의 (약) 50% 초과, (약) 55% 초과, (약) 60% 초과, (약) 65% 초과, (약) 70% 초과, (약) 75% 초과, (약) 80% 초과, (약) 85% 초과, 또는 (약) 90% 초과가 CCR7+CD27+인, T 세포의 집단을 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 방법에 의해 생산된 제공된 조작된 T 세포 조성물은, 집단의 T 세포의 (약) 50% 초과, (약) 55% 초과, (약) 60% 초과, (약) 65% 초과, (약) 70% 초과, (약) 75% 초과, (약) 80% 초과, (약) 85% 초과, 또는 (약) 90% 초과가 CCR7+CD45RA-인, T 세포의 집단을 포함한다.

[0650] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 높은 비율 및/또는 빈도의 중심 기억 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 대체 공정들, 예컨대 증폭을 수반하는 공정들(예를 들어, 증폭 단위 조작을 포함하고/거나 세포의 증폭을 일으킬 의도의 단계들을 포함하는 공정들)로부터 생성된 산출 조성물보다 더 큰 비율 및/또는 빈도의 중심 기억 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 중심 기억 T 세포는 다양한 분화 상태의 세포를 포함할 수 있고 특정 세포 표지자의 양성 또는 고 발현(예를 들어, 표면 발현) 및/또는 다른 세포 표지자의 음성 또는 저 발현(예를 들어, 표면 발현)을 특징으로 할 수 있다. 일부 측면에서, 중심 기억 T 세포는 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3, 및/또는 CD127의 양성 또는 고 발현을 특징으로 한다. 일부 측면에서, 중심 기억 T 세포는 CD45RA 및/또는 그랜자임 B의 음성 또는 저 발현을 특징으로 한다. 특정 구현예에서, 중심 기억 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포는 CCR7+CD45RA-이다.

[0651] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 대체 공정들, 예컨대 증폭을 수반하는 공정들(예를 들어, 증폭 단위 조작을 포함하고/거나 세포의 증폭을 일으킬 의도의 단계들을 포함하는 공정들)로부터 생성된 산출 조성물보다 더

큰 비율 및/또는 빈도의 나이브-유사 세포 및 중심 기억 세포를 갖는다.

[0652] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 낮은 비율 및/또는 빈도의 효과기 기억 및/또는 효과기 기억 RA T 세포 또는 효과기 기억 및/또는 효과기 기억 RA T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 대체 공정들, 예컨대 증폭을 수반하는 공정들(예를 들어, 증폭 단위 조작을 포함하고/거나 세포의 증폭을 일으킬 의도의 단계들을 포함하는 공정들)로부터 생성된 산출 조성물보다 더 낮은 비율 및/또는 빈도의 효과기 기억 및/또는 효과기 기억 RA T 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 효과기 기억 및/또는 효과기 기억 RA T 세포는 다양한 분화 상태의 세포를 포함할 수 있고 특정 세포 표지자의 양성 또는 고 발현(예를 들어, 표면 발현 또는 세포내 발현) 및/또는 다른 세포 표지자의 음성 또는 저 발현(예를 들어, 표면 발현 또는 세포내 발현)을 특징으로 할 수 있다. 특정 구현예에서, 효과기 기억 T 세포 또는 효과기 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포는 CCR7-CD45RA-이다. 특정 구현예에서, 효과기 기억 RA T 세포 또는 효과기 기억 RA T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포는 CCR7-CD45RA+이다.

[0653] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 대체 공정들, 예컨대 증폭을 수반하는 공정들(예를 들어, 증폭 단위 조작을 포함하고/거나 세포의 증폭을 일으킬 의도의 단계들을 포함하는 공정들)로부터 생성된 산출 조성물보다 더 낮은 비율 및/또는 빈도의 효과기 기억 T 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 대체 공정들, 예컨대 증폭을 수반하는 공정들(예를 들어, 증폭 단위 조작을 포함하고/거나 세포의 증폭을 일으킬 의도의 단계들을 포함하는 공정들)로부터 생성된 산출 조성물보다 더 낮은 비율 및/또는 빈도의 효과기 기억 RA T 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 대체 공정들, 예컨대 증폭을 수반하는 공정들(예를 들어, 증폭 단위 조작을 포함하고/거나 세포의 증폭을 일으킬 의도의 단계들을 포함하는 공정들)로부터 생성된 산출 조성물보다 더 큰 비율 및/또는 빈도의 나이브-유사 세포 및 중심 기억 세포 및 더 낮은 비율 및/또는 빈도의 효과기 기억 및 효과기 기억 RA T 세포를 갖는다.

[0654] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 나이브-유사 및/또는 중심 기억 세포를 높은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 중심 기억 세포 세포를 높은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 적어도 또는 (약) 30%, 적어도 또는 (약) 40%, 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 60%, 적어도 또는 (약) 70%, 적어도 또는 (약) 75%, 적어도 또는 (약) 80%, 적어도 또는 (약) 85%, 적어도 또는 (약) 90%, 적어도 또는 (약) 95%, 또는 95% 이상은 기억 표현형, 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형, 또는 나이브-유사 또는 중심 기억 T 세포, 또는 중심 기억 T 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 55%, 적어도 또는 (약) 60%, 또는 적어도 또는 (약) 65%는 나이브-유사 또는 중심 기억 T 세포, 또는 중심 기억 T 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 또는 (약) 30%, 적어도 또는 (약) 40%, 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 60%, 적어도 또는 (약) 70%, 적어도 또는 (약) 75%, 적어도 또는 (약) 80%, 적어도 또는 (약) 85%, 적어도 또는 (약) 90%, 적어도 또는 (약) 95%, 또는 95% 이상은 나이브-유사 또는 중심 기억 CD4+ T 세포, 또는 중심 기억 CD4+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD4+ T 세포의 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%는 나이브-유사 또는 중심 기억 CD4+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 CD4+CAR+ T 세포의 적어도 또는 (약) 30%, 적어도 또는 (약) 40%, 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 60%, 적어도 또는 (약) 70%, 적어도 또는 (약) 75%, 적어도 또는 (약) 80%, 적어도 또는 (약) 85%, 적어도 또는 (약) 90%, 적어도 또는 (약) 95%, 또는 95% 이상은 나이브-유사 또는 중심 기억 CD4+CAR+ T 세포, 또는 중심 기억 CD4+CAR+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD4+CAR+ T 세포의 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%는 나이브-유사 또는 중심 기억 CD4+CAR+ T 세포, 또는 중심 기억 CD4+CAR+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 또는 (약) 30%, 적어도 또는 (약) 40%, 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 60%, 적어도 또는 (약) 70%, 적어도 또는 (약) 75%, 적어도 또는 (약) 80%, 적어도 또는 (약) 85%, 적어도 또는 (약) 90%, 적어도 또는 (약) 95%, 또는 95% 이상은 나이브-유사 또는 중심 기억 CD8+ T 세포, 또는 중심 기억 CD8+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 55%, 적어도 또는 (약) 60%, 또는 적어도 또는 (약) 65%는 나이브-유사 또는 중심

기억 CD8+ T 세포, 또는 중심 기억 CD8+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD8+ T 세포의 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%는 나이브-유사 또는 중심 기억 CD8+ T 세포, 또는 중심 기억 CD8+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 CD8+CAR+ T 세포의 적어도 또는 (약) 30%, 적어도 또는 (약) 40%, 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 60%, 적어도 또는 (약) 70%, 적어도 또는 (약) 75%, 적어도 또는 (약) 80%, 적어도 또는 (약) 85%, 적어도 또는 (약) 90%, 적어도 또는 (약) 95%, 또는 95% 이상은 나이브-유사 또는 중심 기억 CD8+CAR+ T 세포, 또는 중심 기억 CD8+CAR+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD8+CAR+ T 세포의 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 55%, 적어도 또는 (약) 60%, 또는 적어도 또는 (약) 65%는 나이브-유사 또는 중심 기억 CD8+CAR+ T 세포, 또는 중심 기억 CD8+CAR+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD8+CAR+ T 세포의 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%는 나이브-유사 또는 중심 기억 CD8+CAR+ T 세포, 또는 중심 기억 CD8+CAR+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 CAR+ T 세포(예를 들어, CD4+CAR+ T 세포 및 CD8+CAR+ T 세포)의 적어도 또는 (약) 30%, 적어도 또는 (약) 40%, 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 60%, 적어도 또는 (약) 70%, 적어도 또는 (약) 75%, 적어도 또는 (약) 80%, 적어도 또는 (약) 85%, 적어도 또는 (약) 90%, 적어도 또는 (약) 95%, 또는 95% 이상은 나이브-유사 또는 중심 기억 T 세포, 또는 중심 기억 T 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CAR+ T 세포(예를 들어, CD4+CAR+ T 세포 및 CD8+CAR+ T 세포)의 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 55%, 적어도 또는 (약) 60%, 또는 적어도 또는 (약) 65%는 나이브-유사 또는 중심 기억 T 세포, 또는 중심 기억 T 세포이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 CAR+ T 세포의 적어도 또는 (약) 30%, 적어도 또는 (약) 40%, 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 60%, 적어도 또는 (약) 70%, 적어도 또는 (약) 75%, 적어도 또는 (약) 80%, 적어도 또는 (약) 85%, 적어도 또는 (약) 90%, 적어도 또는 (약) 95%, 또는 95% 이상은 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, 그랜자임 B-, 및/또는 CD127+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 CAR+ T 세포의 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 55%, 적어도 또는 (약) 60%, 또는 적어도 또는 (약) 65%는 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, 그랜자임 B-, 및/또는 CD127+이다.

[0655] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 적어도 또는 (약) 85%는 나이브-유사 또는 중심 기억 표현형, 또는 나 이브-유사 또는 중심 기억 T 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 15% 또는 그 미만은 효과 기 또는 효과기 RA 표현형, 또는 효과기 또는 효과기 RA T 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 탈진된 및/또는 노화된 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 구체적인 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 탈진된 및/또는 노화된 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 40% 미만, (약) 35% 미만, (약) 30% 미만, (약) 25% 미만, (약) 20% 미만, (약) % 15 미만, (약) % 10 미만, (약) 5% 미만, 또는 (약) 1% 미만은 탈진 및/또는 노화된다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 25% 미만은 탈진 및/또는 노화된다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 10% 미만은 탈진 및/또는 노화된다.

[0656] 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 CD27 및 CD28 발현, 예를 들어, 표면 발현에 대해 음성인 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 구체적인 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 CD27-CD28- 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 40% 미만, (약) 35% 미만, (약) 30% 미만, (약) 25% 미만, (약) 20% 미만, (약) % 15 미만, (약) % 10 미만, (약) 5% 미만, 또는 (약) 1% 미만은 CD27-CD28- 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 25% 미만은 CD27-CD28- 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 10% 미만은 CD27-CD28- 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 5% 미만은 CD27-CD28- 세포이다.

[0657] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 CD27 및 CD28 발현, 예를 들어, 표면 발현에 대해 양성인 세포를 높은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 CD27+ CD28+ 세포를 높은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 또는 (약) 95% 이상은 CD27+CD28+ 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 25% 미만은 CD27-CD28- 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 적어도 (약) 50%는 CD27+CD28+ 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 적어도 (약) 75%는 CD27+CD28+ 세포이다.

[0658] 구체적인 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 T_{EMRA} 세포인 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 구체적인 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 T_{EMRA} 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 조성물

의 세포의 (약) 40% 미만, (약) 35% 미만, (약) 30% 미만, (약) 25% 미만, (약) 20% 미만, (약) % 15 미만, (약) % 10 미만, (약) 5% 미만, 또는 (약) 1% 미만은 T_{EMRA} 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 25% 미만은 T_{EMRA} 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 10% 미만은 T_{EMRA} 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 5% 미만은 T_{EMRA} 세포이다.

[0659] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 CCR7에 대해 음성 및 CD45RA 발현, 예를 들어, 표면 발현에 대해 양성인 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 CCR7-CD45RA+ 세포를 낮은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 구체적인 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 40% 미만, (약) 35% 미만, (약) 30% 미만, (약) 25% 미만, (약) 20% 미만, (약) % 15 미만, (약) % 10 미만, (약) 5% 미만, 또는 (약) 1% 미만은 CCR7-CD45RA+ 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 25% 미만은 CCR7-CD45RA+ 세포이다. 구체적인 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 10% 미만은 CCR7-CD45RA+ 세포이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 5% 미만은 CCR7-CD45RA+ 세포이다.

[0660] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 높은 비율 및/또는 빈도의 초기 분화 단계의 T 세포 또는 초기 분화 단계의 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 대체 공정들, 예컨대 증폭을 수반하는 공정들(예를 들어, 증폭 단위 조작을 포함하고/거나 세포의 증폭을 일으킬 의도의 단계들을 포함하는 공정들)로부터 생성된 산출 조성물보다 더 큰 비율 및/또는 빈도의 초기 분화 단계의 T 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 초기 분화 단계의 T 세포는 특정 세포 표지자의 양성 또는 고 발현(예를 들어, 표면 발현 또는 세포내 발현) 및/또는 다른 세포 표지자의 음성 또는 저 발현(예를 들어, 표면 발현 또는 세포내 발현)을 특징으로 할 수 있다. 일부 측면에서, 초기 분화 단계의 T 세포는 CCR7 및/또는 CD27의 양성 또는 고 발현을 특징으로 한다. 특정 구현예에서, 초기 분화 단계의 T 세포 또는 초기 분화 단계의 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포는 CCR7+CD27+이다.

[0661] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 낮은 비율 및/또는 빈도의 중간 분화 단계의 T 세포 또는 중간 분화 단계의 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 대체 공정들, 예컨대 증폭을 수반하는 공정들로부터 생성된 산출 조성물보다 더 낮은 비율 및/또는 빈도의 중간 분화 단계의 T 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 중간 분화 단계의 T 세포는 특정 세포 표지자의 양성 또는 고 발현(예를 들어, 표면 발현 또는 세포내 발현) 및/또는 다른 세포 표지자의 음성 또는 저 발현(예를 들어, 표면 발현 또는 세포내 발현)을 특징으로 할 수 있다. 특정 구현예에서, 중간 분화 단계의 T 세포 또는 중간 분화 단계의 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포는 CCR7+CD27-이다. 특정 구현예에서, 중간 분화 단계의 T 세포 또는 중간 분화 단계의 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포는 CCR7-CD27+이다. 특정 구현예에서, 중간 분화 단계의 T 세포 또는 중간 분화 단계의 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포는 CCR7+CD27-인 세포 및 CCR7-CD27+인 세포를 포함한다.

[0662] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 낮은 비율 및/또는 빈도의 고도로 분화된 T 세포 또는 고도로 분화된 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 대체 공정들, 예컨대 증폭을 수반하는 공정들로부터 생성된 산출 조성물보다 더 낮은 비율 및/또는 빈도의 고도로 분화된 T 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 고도로 분화된 T 세포는 특정 세포 표지자의 양성 또는 고 발현(예를 들어, 표면 발현 또는 세포내 발현) 및/또는 다른 세포 표지자의 음성 또는 저 발현(예를 들어, 표면 발현 또는 세포내 발현)을 특징으로 할 수 있다. 일부 측면에서, 고도로 분화된 T 세포는 CCR7 및/또는 CD27의 음성 또는 저 발현을 특징으로 한다. 특정 구현예에서, 고도로 분화된 T 세포 또는 고도로 분화된 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 T 세포는 CCR7-CD27-이다.

[0663] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 대체 공정들, 예컨대 증폭을 수반하는 공정들로부터 생성된 산출 조성물보다 더 큰 비율 및/또는 빈도의 초기 분화 단계의 T 세포(예를 들어, CCR7+CD27+인 세포), 더 낮은 비율 및/또는 빈도의 중간 분화 단계의 T 세포(예를 들어, CCR7+CD27-인 세포 및/또는 CCR7-CD27+인 세포), 및 더 낮은 비율 및/또는 빈도의 고도로 분화된 T 세포(예를 들어, CCR7-CD27-인 세포)를 갖는다.

[0664] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 대체 공정들, 예컨대 증폭을 수반하는 공정들로부터 생성된 산출 조성물보다 더 큰 비율 및/또는 빈도의 나이브-유사 세포 및 중심 기억 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 세포 및 중심 기억 세포는 초기 분화 단계의 T 세포(예를 들어, CCR7+CD27+인 세포)를 포함하여 다양한 분화 단계의 세포를 포함한다.

[0665] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 CCR7 및 CD27 발현, 예를 들어, 표면 발현에 대해 양성인 세포를 높은

비율 및/또는 빈도로 갖는다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포는 CCR7+ CD27+ 세포를 높은 비율 및/또는 빈도로 갖는다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 (약) 5% 미만, (약) 10% 미만, (약) 15% 미만, (약) 20% 미만, (약) 25% 미만, 또는 (약) 30% 미만은 CCR7- 또는 CD27- 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 세포의 적어도 또는 (약) 30%, 적어도 또는 (약) 40%, 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 60%, 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%, 또는 98% 이상은 CCR7+CD27+이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 55%, 적어도 또는 (약) 60%, 또는 적어도 또는 (약) 65%는 CCR7+CD27+이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 또는 (약) 30%, 적어도 또는 (약) 40%, 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 60%, 적어도 또는 (약) 70%, 적어도 또는 (약) 75%, 적어도 또는 (약) 80%, 적어도 또는 (약) 85%, 적어도 또는 (약) 90%, 적어도 또는 (약) 95%, 또는 95% 이상은 CCR7+CD27+이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 55%, 적어도 또는 (약) 60%, 또는 적어도 또는 (약) 65%는 CCR7+CD27+이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD4+ T 세포의 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%는 CCR7+CD27+이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 CD4+CAR+ T 세포의 적어도 또는 (약) 30%, 적어도 또는 (약) 40%, 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 60%, 적어도 또는 (약) 70%, 적어도 또는 (약) 75%, 적어도 또는 (약) 80%, 적어도 또는 (약) 85%, 적어도 또는 (약) 90%, 적어도 또는 (약) 95%, 또는 95% 이상은 CCR7+CD27+이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD4+CAR+ T 세포의 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 55%, 적어도 또는 (약) 60%, 또는 적어도 또는 (약) 65%는 CCR7+CD27+ CAR+이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD4+CAR+ T 세포의 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%는 CCR7+CD27+이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 또는 (약) 30%, 적어도 또는 (약) 40%, 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 60%, 적어도 또는 (약) 70%, 적어도 또는 (약) 75%, 적어도 또는 (약) 80%, 적어도 또는 (약) 85%, 적어도 또는 (약) 90%, 적어도 또는 (약) 95%, 또는 95% 이상은 CCR7+CD27+이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 55%, 적어도 또는 (약) 60%, 또는 적어도 또는 (약) 65%는 CCR7+CD27+이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD8+ T 세포의 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%는 CCR7+CD27+이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 CD8+CAR+ T 세포의 적어도 또는 (약) 30%, 적어도 또는 (약) 40%, 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 60%, 적어도 또는 (약) 70%, 적어도 또는 (약) 75%, 적어도 또는 (약) 80%, 적어도 또는 (약) 85%, 적어도 또는 (약) 90%, 적어도 또는 (약) 95%, 또는 95% 이상은 CCR7+CD27+이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD8+CAR+ T 세포의 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 55%, 적어도 또는 (약) 60%, 또는 적어도 또는 (약) 65%는 CCR7+CD27+ CAR+이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CD8+CAR+ T 세포의 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%는 CCR7+CD27+이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 CAR+ T 세포 (예를 들어, CD4+CAR+ T 세포 및 CD8+CAR+ T 세포)의 적어도 또는 (약) 30%, 적어도 또는 (약) 40%, 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 60%, 적어도 또는 (약) 70%, 적어도 또는 (약) 75%, 적어도 또는 (약) 80%, 적어도 또는 (약) 85%, 적어도 또는 (약) 90%, 적어도 또는 (약) 95%, 또는 95% 이상은 CCR7+CD27+이다. 특정 구현예에서, 산출 조성물의 CAR+ T 세포(예를 들어, CD4+CAR+ T 세포 및 CD8+CAR+ T 세포)의 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 55%, 적어도 또는 (약) 60%, 또는 적어도 또는 (약) 65%는 CCR7+CD27+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 CAR+ T 세포의 적어도 또는 (약) 30%, 적어도 또는 (약) 40%, 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 60%, 적어도 또는 (약) 70%, 적어도 또는 (약) 75%, 적어도 또는 (약) 80%, 적어도 또는 (약) 85%, 적어도 또는 (약) 90%, 적어도 또는 (약) 95%, 또는 95% 이상은 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, 그랜자임 B-, 및/또는 CD127+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 CAR+ T 세포의 적어도 또는 (약) 50%, 적어도 또는 (약) 55%, 적어도 또는 (약) 60%, 또는 적어도 또는 (약) 65%는 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, 그랜자임 B-, 및/또는 CD127+이다.

[0666] 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 CD3+ T 세포를 포함하고/거나 CD3+ T 세포가 농축된 치료용 T 세포 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조성물 중 총 수용체⁺/CD3⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD27+CCR7+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%, 적어도 또는 적어도 약 85%, 적어도 또는 적어도 약 90%, 적어도 또는 적어도 약 95%, 적어도 또는 적어도 약 96%, 적어도 또는 적어도 약 97%, 적어도 또는 적어도 약 98%, 적어도 또는 적어도 약 99%, 약 100%, 또는 100%는 CD3+ T 세포이다. 일부

구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 90%는 CD3⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD3⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD27+CCR7+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 95%는 CD3⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD3⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD27+CCR7+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 98%는 CD3⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD3⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD27+CCR7+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD3⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 50%는 CD27+CCR7+이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 50%는 CD27+CCR7+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 90%는 CD3⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD27+CCR7+이며, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD27+CCR7+이다.

[0667] 일부 구현예에서, 제조합 수용체를 발현하는 CD3⁺ T 세포를 포함하고/거나 CD3⁺ T 세포가 농축된 치료용 T 세포 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조성물 중 총 수용체⁺/CD3⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%, 적어도 또는 적어도 약 85%, 적어도 또는 적어도 약 90%, 적어도 또는 적어도 약 95%, 적어도 또는 적어도 약 96%, 적어도 또는 적어도 약 97%, 적어도 또는 적어도 약 98%, 적어도 또는 적어도 약 99%, 약 100%, 또는 100%는 CD3⁺ T 세포이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 90%는 CD3⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD3⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 95%는 CD3⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD3⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 98%는 CD3⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD3⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD3⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 50%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이며, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 50%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 90%는 CD3⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이며, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다.

[0668] 일부 구현예에서, 제조합 수용체를 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포를 포함하고/거나 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포가 농축된 치료용 T 세포 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 및 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD27+CCR7+이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%, 적어도 또는 적어도 약 85%, 적어도 또는 적어도 약 90%, 적어도 또는 적어도 약 95%, 적어도 또는 적어도 약 96%, 적어도 또는 적어도 약 97%, 적어도 또는 적어도 약 98%, 적어도 또는 적어도 약 99%, 약 100%, 또는 100%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이다.

[0669] 일부 구현예에서, 제조합 수용체를 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포를 포함하고/거나 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포가 농축된 치료용 T 세포 조성물이 본원에 제공되며, 여기서 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 및 총 수용체⁺/CD8⁺ T 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부

구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%, 적어도 또는 적어도 약 85%, 적어도 또는 적어도 약 90%, 적어도 또는 적어도 약 95%, 적어도 또는 적어도 약 96%, 적어도 또는 적어도 약 97%, 적어도 또는 적어도 약 98%, 적어도 또는 적어도 약 99%, 약 100%, 또는 100%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 90%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체+/CD4⁺ 및 수용체+/CD8⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 95%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체+/CD4⁺ 및 수용체+/CD8⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 50%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이며, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 50%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 적어도 90%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이며, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포이거나 또는 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다.

[0670] 특정 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 재조합 수용체를 발현하는 CD8⁺ T 세포를 포함하는 치료용 T 세포 조성물이 본원에 개시되며, 여기서 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD27+CCR7+이고 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD27+CCR7+이고, 여기서 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%, 적어도 또는 적어도 약 85%, 적어도 또는 적어도 약 90%, 적어도 또는 적어도 약 95%, 적어도 또는 적어도 약 96%, 적어도 또는 적어도 약 97%, 적어도 또는 적어도 약 98%, 적어도 또는 적어도 약 99%, 약 100%, 또는 100%는 CD3⁺ T 세포이다. 특정 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 CD4⁺ T 세포 및 재조합 수용체를 발현하는 CD8⁺ T 세포를 포함하는 치료용 T 세포 조성물이 본원에 개시되며, 여기서 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD27+CCR7+이고 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 CD27+CCR7+이고, 여기서 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%, 적어도 또는 적어도 약 85%, 적어도 또는 적어도 약 90%, 적어도 또는 적어도 약 95%, 적어도 또는 적어도 약 96%, 적어도 또는 적어도 약 97%, 적어도 또는 적어도 약 98%, 적어도 또는 적어도 약 99%, 약 100%, 또는 100%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이다. 일부 측면에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 90%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 60%는 CD27+CCR7+이며, 치료용 T 세포 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 40%는 CD27+CCR7+이다. 일부 측면에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 95%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 65%는 CD27+CCR7+이며, 치료용 T 세포 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 45%는 CD27+CCR7+이다. 일부 측면에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 98%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 70%, 적어도 또는 적어도 약 75%, 적어도 또는 적어도 약 80%, 또는 적어도 또는 적어도 약 85%는 CD27+CCR7+이며, 치료용 T 세포 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%, 적어도 또는 적어도 약 55%, 적어도 또는 적어도 약 60%, 또는 적어도 또는 적어도 약 65%는 CD27+CCR7+이다. 일부 측면에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 98%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺

T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 75%는 CD27+CCR7+이며, 치료용 T 세포 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 55%는 CD27+CCR7+이다. 일부 측면에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 98%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 CD27+CCR7+이며, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 60%는 CD27+CCR7+이다. 일부 측면에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 98%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 85%는 CD27+CCR7+이며, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 65%는 CD27+CCR7+이다. 일부 측면에서, 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 98%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 90%는 CD27+CCR7+이며, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 또는 적어도 약 70%는 CD27+CCR7+이다. 일부 측면에서, 조성물 중 세포의 적어도 90%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 60%는 CD27+CCR7+이며, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 40%는 CD27+CCR7+이다. 일부 측면에서, 조성물 중 세포의 적어도 90%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 70%는 CD27+CCR7+이며, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 50%는 CD27+CCR7+이다. 일부 측면에서, 조성물 중 세포의 적어도 90%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 70%는 CD27+CCR7+이며, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 60%는 CD27+CCR7+이다. 일부 측면에서, 조성물 중 세포의 적어도 95%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 70%는 CD27+CCR7+이며, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 70%는 CD27+CCR7+이다. 일부 측면에서, 조성물 중 세포의 적어도 95%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이고, 조성물 중 총 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 80%는 CD27+CCR7+이며, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 세포의 적어도 80%는 CD27+CCR7+이다.

[0671] 임의의 선행 구현예에서, 세포 집단 또는 조성물 내에서 하나 이상의 표지자(예를 들어, CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CCR7, 또는 CD45RA 등)에 대해 양성/음성인 세포의 백분율은 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 복수의 산출 조성물의 평균 또는 중간 백분율일 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 집단 또는 조성물 내에서 하나 이상의 표지자에 대해 양성인 세포의 백분율은 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 복수의 산출 조성물의 백분율들의 평균이다. 일부 구현예에서, 복수의 산출 조성물은, 동일한 생물학적 샘플 또는 상이한 생물학적 샘플들(예를 들어, PBMC 또는 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 샘플), 예를 들어, 동일한 공여체 또는 상이한 공여체들로부터 기원할 수 있는, 복수의 투입 조성물로부터 본원에 개시된 방법에 의해 생산된다. 일부 측면에서, 평균은 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 복수의 약 또는 적어도 약 5, 약 또는 적어도 약 10, 약 또는 적어도 약 15, 약 또는 적어도 약 20, 약 또는 적어도 약 25, 약 또는 적어도 약 30, 약 또는 적어도 약 35, 약 또는 적어도 약 40, 약 또는 적어도 약 45, 약 또는 적어도 약 50, 약 또는 적어도 약 55, 약 또는 적어도 약 60, 약 또는 적어도 약 100개, 또는 약 100개 이상의 산출 조성물에 기초한다.

[0672] 일부 구현예에서, 평균적으로 본 방법에 의해 생산된 복수의 산출 조성물(예를 들어, 약 또는 적어도 약 5개)에서, 조성물 중 T 세포의 총 수 또는 조성물 중 재조합 단백질을 발현하는 T 세포의 총 수의 적어도 (약), 또는 (약) 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%는 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포이다. 일부 구현예에서, 평균적으로 본 방법에 의해 생산된 복수의 산출 조성물(예를 들어, 약 또는 적어도 약 5개)에서, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 및 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 나이브-유사 T 세포이거나 나이브-유사 T 세포(예를 들어, CD27+CCR7+ 세포) 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 복수의(예를 들어, 약 또는 적어도 약 5개) 산출 조성물은, 평균적으로, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 및 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포를 포함하거나, 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 복수의(예를 들어, 약 또는 적어도 약 5개) 산출 조성물은, 평균적으로, 조성물 중 총 수용체⁺/CD4⁺ 및 수용체⁺/CD8⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% CD27+CCR7+ 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 복수의(예를 들어, 약 또는

적어도 약 5개) 산출 조성물은, 평균적으로, 적어도 또는 적어도 약 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% CD3⁺ T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 복수의(예를 들어, 약 또는 적어도 약 5개) 산출 조성물은, 평균적으로, 조성물 중 총 수용체⁺/CD3⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 나이브-유사 T 세포를 포함하거나, 나이브-유사 T 세포(예를 들어, CD27+CCR7⁺ 세포) 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 복수의(예를 들어, 약 또는 적어도 약 5개) 산출 조성물은, 평균적으로, 조성물 중 총 수용체⁺/CD3⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포를 포함하거나, 나이브-유사 T 세포 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성이다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법에 의해 생산된 복수의(예를 들어, 약 또는 적어도 약 5개) 산출 조성물은, 평균적으로, 조성물 중 총 수용체⁺/CD3⁺ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% CD27+CCR7⁺ 세포를 포함한다.

[0673] 일부 구현예에서, 조성물은 T 세포 계능 내로 통합된 항-CD19 CAR을 암호화하는 이중 또는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 갖는 T 세포를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 조성물 중 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는, 평균적으로, 2배체 계능 당 약 또는 적어도 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5개 또는 5개 이상이다. 구체적인 구현예에서, 조성물 중 CAR⁺ 세포의 iVCN은 평균적으로 (약) 2배체 계능 당 0.4개 카피 내지 2배체 계능 당 3.0개 카피(수치 포함)이다. 구체적인 구현예에서, 조성물 중 CAR⁺ 세포의 iVCN은 평균적으로 2배체 계능 당 약 0.4, 약 0.5, 약 0.6, 약 0.7, 약 0.8, 약 0.9, 약 1.0, 약 1.1, 약 1.2, 약 1.3, 약 1.4, 약 1.5, 약 1.6, 약 1.7, 약 1.8, 약 1.9, 약 2.0, 약 2.1, 약 2.2, 약 2.3, 약 2.4, 약 2.5, 약 2.6, 약 2.7, 약 2.8, 약 2.9, 또는 약 3.0개 카피이다.

[0674] 특정 구현예에서, 형질전환된 세포의 집단의 2배체 계능 중 총 벡터 카피수(VCN)에 대한 iVCN의 분율은 평균적으로 (약) 0.9 미만이고, 예를 들어, 적어도 또는 약 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9이거나, 이의 허용 오차, 예를 들어, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, 또는 $\pm 1\%$ 이내이다. 특정 구현예에서, 형질전환된 세포의 집단의 2배체 계능 중 총 벡터 카피수(VCN)에 대한 iVCN의 분율은 평균적으로 (약) 0.8이거나, 이의 허용 오차 이내이다.

[0675] 일부 구현예에서, 조성물 중 세포의 총 벡터 카피수(VCN)는 평균적으로 (약) 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2개 카피(수치 포함) 미만이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 CD3⁺ 세포의 총 벡터 카피수(VCN)는 평균적으로 (약) 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2개 카피(수치 포함) 미만이다. 일부 구현예에서, 조성물 중 CD3⁺CAR⁺ 세포의 총 벡터 카피수(VCN)는 평균적으로 (약) 20, 18, 16, 14, 12, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 또는 2개 카피(수치 포함) 미만이다.

[0676] 일부 구현예에서, 조성물은 잔류 자극 시약, 예를 들어, 섹션 II-C-6에 기술된 임의의 방법에 따라 제거되지 않은 자극 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 잔류 자극 시약은 섹션 II-C-2에 기술된 올리고머성 자극 시약 중 임의의 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 잔류 자극 시약은 섹션 II-C-2에 기술된 올리고머성 스트렙타비딘 유테인 시약 중 임의의 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 조성물은 (약) 50 내지 2000ng/mL, 예컨대 (약) 50 내지 1900 ng/mL, 50 내지 1800 ng/mL, 50 내지 1700 ng/mL, 50 내지 1600 ng/mL, 50 내지 1500 ng/mL, 50 내지 1400 ng/mL, 50 내지 1300 ng/mL, 50 내지 1200 ng/mL, 50 내지 1100 ng/mL, 50 내지 1000 ng/mL, 50 내지 900 ng/mL, 50 내지 800 ng/mL, 50 내지 700 ng/mL, 50 내지 600 ng/mL, 50 내지 500 ng/mL, 50 내지 400 ng/mL, 50 내지 300 ng/mL, 50 내지 200 ng/mL, 50 내지 100 ng/mL, 100 내지 2000 ng/mL, 100 내지 1900 ng/mL, 100 내지 1800 ng/mL, 100 내지 1700 ng/mL, 100 내지 1600 ng/mL, 100 내지 1500 ng/mL, 100 내지 1400 ng/mL, 100 내지 1300 ng/mL, 100 내지 1200 ng/mL, 100 내지 1100 ng/mL, 100 내지 1000 ng/mL, 100 내지 900 ng/mL, 100 내지 800 ng/mL, 100 내지 700 ng/mL, 100 내지 600 ng/mL, 100 내지 500 ng/mL, 100 내지 400 ng/mL, 100 내지 300 ng/mL, 100 내지 200 ng/mL, 200 내지 2000 ng/mL, 200 내지 1900 ng/mL, 200 내지 1800 ng/mL, 200 내지 1700 ng/mL, 200 내지 1600 ng/mL, 200 내지 1500 ng/mL, 200 내지 1400 ng/mL, 200 내지 1300 ng/mL, 200 내지 1200 ng/mL, 200 내지 1100 ng/mL, 200 내지 1000 ng/mL, 200 내지 900 ng/mL, 200 내지 800 ng/mL, 200 내지 700 ng/mL, 200 내지 600 ng/mL, 200 내지 500 ng/mL, 200 내지 400 ng/mL, 200 내지 300 ng/mL, 300 내지 2000 ng/mL, 300 내지 1900 ng/mL, 300 내지 1800 ng/mL, 300 내지 1700 ng/mL, 300 내지 1600 ng/mL, 300 내지 1500 ng/mL, 300 내지 1400 ng/mL, 300 내지 1300 ng/mL, 300 내지 1200 ng/mL, 300 내지 1100 ng/mL, 300 내지 1000 ng/mL, 300 내지 900 ng/mL, 300 내지 800 ng/mL, 300 내지 700 ng/mL, 300 내지 600 ng/mL, 300 내지 500 ng/mL, 300 내지 400 ng/mL, 400 내지 2000 ng/mL, 400 내지 1900 ng/mL, 400 내지 1800 ng/mL, 400 내지 1700 ng/mL, 400 내지 1600 ng/mL, 400 내지 1500 ng/mL, 400 내지 1400

ng/mL, 400 내지 1300 ng/mL, 400 내지 1200 ng/mL, 400 내지 1100 ng/mL, 400 내지 1000 ng/mL, 400 내지 900 ng/mL, 400 내지 800 ng/mL, 400 내지 700 ng/mL, 400 내지 600 ng/mL, 400 내지 500 ng/mL, 500 내지 2000 ng/mL, 500 내지 1900 ng/mL, 500 내지 1800 ng/mL, 500 내지 1700 ng/mL, 500 내지 1600 ng/mL, 500 내지 1500 ng/mL, 500 내지 1400 ng/mL, 500 내지 1300 ng/mL, 500 내지 1200 ng/mL, 500 내지 1100 ng/mL, 500 내지 1000 ng/mL, 500 내지 900 ng/mL, 500 내지 800 ng/mL, 500 내지 700 ng/mL, 500 내지 600 ng/mL, 600 내지 2000 ng/mL, 600 내지 1900 ng/mL, 600 내지 1800 ng/mL, 600 내지 1700 ng/mL, 600 내지 1600 ng/mL, 600 내지 1500 ng/mL, 600 내지 1400 ng/mL, 600 내지 1300 ng/mL, 600 내지 1200 ng/mL, 600 내지 1100 ng/mL, 600 내지 1000 ng/mL, 600 내지 900 ng/mL, 600 내지 800 ng/mL, 600 내지 700 ng/mL, 700 내지 2000 ng/mL, 700 내지 1900 ng/mL, 700 내지 1800 ng/mL, 700 내지 1700 ng/mL, 700 내지 1600 ng/mL, 700 내지 1500 ng/mL, 700 내지 1400 ng/mL, 700 내지 1300 ng/mL, 700 내지 1200 ng/mL, 700 내지 1100 ng/mL, 700 내지 1000 ng/mL, 700 내지 900 ng/mL, 700 내지 800 ng/mL, 800 내지 2000 ng/mL, 800 내지 1900 ng/mL, 800 내지 1800 ng/mL, 800 내지 1700 ng/mL, 800 내지 1600 ng/mL, 800 내지 1500 ng/mL, 800 내지 1400 ng/mL, 800 내지 1300 ng/mL, 800 내지 1200 ng/mL, 800 내지 1100 ng/mL, 800 내지 1000 ng/mL, 800 내지 900 ng/mL, 900 내지 2000 ng/mL, 900 내지 1900 ng/mL, 900 내지 1800 ng/mL, 900 내지 1700 ng/mL, 900 내지 1600 ng/mL, 900 내지 1500 ng/mL, 900 내지 1400 ng/mL, 900 내지 1300 ng/mL, 900 내지 1200 ng/mL, 900 내지 1100 ng/mL, 900 내지 1000 ng/mL, 1000 내지 2000 ng/mL, 1000 내지 1900 ng/mL, 1000 내지 1800 ng/mL, 1000 내지 1700 ng/mL, 1000 내지 1600 ng/mL, 1000 내지 1500 ng/mL, 1000 내지 1400 ng/mL, 1000 내지 1300 ng/mL, 1000 내지 1200 ng/mL, 1000 내지 1100 ng/mL, 1100 내지 2000 ng/mL, 1100 내지 1900 ng/mL, 1100 내지 1800 ng/mL, 1100 내지 1700 ng/mL, 1100 내지 1600 ng/mL, 1100 내지 1500 ng/mL, 1100 내지 1400 ng/mL, 1100 내지 1300 ng/mL, 1100 내지 1200 ng/mL, 1200 내지 2000 ng/mL, 1200 내지 1900 ng/mL, 1200 내지 1800 ng/mL, 1200 내지 1700 ng/mL, 1200 내지 1600 ng/mL, 1200 내지 1500 ng/mL, 1200 내지 1400 ng/mL, 1200 내지 1300 ng/mL, 1300 내지 2000 ng/mL, 1300 내지 1900 ng/mL, 1300 내지 1800 ng/mL, 1300 내지 1700 ng/mL, 1300 내지 1600 ng/mL, 1300 내지 1500 ng/mL, 1300 내지 1400 ng/mL, 1400 내지 2000 ng/mL, 1400 내지 1900 ng/mL, 1400 내지 1800 ng/mL, 1400 내지 1700 ng/mL, 1400 내지 1600 ng/mL, 1400 내지 1500 ng/mL, 1500 내지 2000 ng/mL, 1500 내지 1900 ng/mL, 1500 내지 1800 ng/mL, 1500 내지 1700 ng/mL, 1500 내지 1600 ng/mL, 1600 내지 2000 ng/mL, 1600 내지 1900 ng/mL, 1600 내지 1800 ng/mL, 1600 내지 1700 ng/mL, 1700 내지 2000 ng/mL, 1700 내지 1900 ng/mL, 1700 내지 1800 ng/mL, 1800 내지 2000 ng/mL, 1800 내지 1900 ng/mL, 또는 1900 내지 2000 ng/mL(각 수치 포함)의 잔류 자극 시약을 함유한다.

[0677] B 세포 비호지킨 림프종(B 세포 NHL)을 치료하는 방법이 본원에 또한 개시되고, 상기 방법은 B-세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 CAR을 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 투여되는 조성물은 미리 정해진 특징을 나타내는 산출 조성물을 생산하기 위한 제조 공정에 의해 생산되고, 여기서 상기 제조 공정의 반복은 복수의 상이한 개별 대상체에서 수행될 때, 선택적으로 인간 생물학적 샘플로부터, 복수의 산출 조성물을 생산하고, 상기 복수의 산출 조성물 중 산출 조성물의 미리 정해진 특징은 CD3+ 세포의 백분율, CD4+/CD8+ 또는 CD4CAR+/CD8+CD8+ 세포의 비, 세포자멸사 표지자를 발현하는 세포의 백분율, 덜 분화된 세포의 백분율, 및 iVCN 및 iVCN/VCN 값들을 포함하여 섹션 III에 개시된 조성물들의 특징들로부터 임의의 조합으로 선택된다.

[0678] IV. 정의

[0679] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어, 표기법 및 다른 기술 및 과학 용어 또는 전문 용어는 청구된 주제가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 의도된다. 일부 경우에, 일반적으로 이해되는 의미를 갖는 용어는 명확성 및/또는 용이한 참조를 위해 본원에서 정의되며, 본원에 상기 정의를 포함하는 것이 본 기술 분야에서 일반적으로 이해되는 것과 실질적인 차이를 나타내는 것으로 반드시 해석되는 것은 아니다.

[0680] 용어 “폴리펩타이드(polypeptide)” 및 “단백질(protein)”은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하기 위해 상호 교환적으로 사용되며, 최소 길이로 제한되지 않는다. 제공된 수용체 및 다른 폴리펩타이드(예를 들어, 링커 또는 펩타이드)를 포함하는 폴리펩타이드는 천연 및/또는 비천연 아미노산 잔기를 포함하는 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 상기 용어들은 또한 폴리펩타이드의 발현 후 변형, 예를 들어 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화, 및 인산화를 포함한다. 일부 측면에서, 폴리펩타이드는 단백질이 원하는 활성을 유지하는 한 천연 또는 자연 서열에 대한 변형을 함유할 수 있다. 상기 변형은 부위-지정 돌연변이 유발을 통한 것과 같이 의도적일 수 있거나, 단백질을 생성하는 숙주의 돌연변이 또는 PCR 증폭으로 인한 오류를 통한 것과 같이 우발적일 수 있다.

- [0681] 본원에서 사용될 때, “대상체(subject)”는 인간 또는 다른 동물과 같은 포유동물이며, 통상적으로 인간이다. 일부 구현예에서, 제제 또는 제제들, 세포, 세포 집단, 또는 조성물이 투여되는 대상체(예를 들어, 환자)는 포유동물이며, 통상적으로 인간 등의 영장류이다. 일부 구현예에서, 영장류는 원숭이 또는 유인원이다. 대상체는 남성(수컷) 또는 여성(암컷)일 수 있으며, 유아, 소아, 청소년, 성인 및 노인 대상체를 포함한 임의의 적합한 연령일 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 설치류와 같은 비영장류 포유동물이다.
- [0682] 본원에서 사용될 때, “치료(treatment, treat, treating)”는 질병 또는 병태 또는 장애 또는 이와 관련된 증상, 역효과 또는 결과 또는 표현형의 완전한 또는 부분적인 개선 또는 감소를 지칭한다. 치료의 바람직한 효과는 질병의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 완화, 질병의 직접적 또는 간접적인 병리적 결과 중 어느 하나의 감소, 전이 예방, 질병 진행의 속도 감소, 질병 상태의 개선 또는 완화 및 관해(remission) 또는 향상된 예후를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 용어들은 질병의 완전한 치료 또는 임의의 증상의 완전한 제거 또는 모든 증상 또는 결과에 대한 효과(들)를 의미하지 않는다.
- [0683] 본원에서 사용될 때, “질병의 발병 지연(delaying development of a disease)”은 질병(예컨대 암)의 발병을 미룸, 방해, 늦춤, 지연, 안정화, 억제 및/또는 연기하는 것을 의미한다. 상기 지연은 치료 중인 개체 및/또는 질병의 이력에 따라 다양한 시간의 길이일 수 있다. 일부 구현예에서, 충분하거나 유의미한 지연은 개체에 질병이 발병하지 않는다는 점에서 사실상 예방을 포함할 수 있다. 예를 들면, 전이의 발병과 같이 말기 단계 암이 지연될 수 있다.
- [0684] 본원에서 사용될 때, “예방(preventing)”은 질병에 걸릴 성향을 가질 수 있으나 아직 질병으로 진단되지 않은 대상체에서 질병의 발생 또는 재발과 관련하여 예방을 제공하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 세포 및 조성물은 질병의 발병을 지연시키거나 질병의 진행을 늦추는 데 사용된다.
- [0685] 본원에서 사용될 때, 기능 또는 활성을 “억제(suppress)”한다는 것은 다른 조건과 비교하여 또는 대안적으로 관심 조건 또는 매개변수를 제외하고 달리 동일한 조건과 비교할 때 기능 또는 활성을 감소시키는 것이다. 예를 들어, 종양 성장을 억제하는 세포는 그 세포의 부재 시에 종양의 성장 속도에 비해 종양의 성장 속도를 감소시킨다.
- [0686] 제제, 예를 들어 약학적 제형, 세포 또는 조성물의 “유효량(effective amount)”은 투여의 맥락에서, 치료적 또는 예방적 결과와 같은 원하는 결과를 달성하기 위해 투여량/양에서와 필요한 기간 동안의 효과적인 양을 지칭한다.
- [0687] 제제, 예를 들어 약학적 제형 또는 세포의 “치료적 유효량(therapeutically effective amount)”은 예컨대 질병, 병태 또는 장애의 치료 및/또는 치료의 약동학적 또는 약력학적 효과를 위해 원하는 치료적 결과를 달성하기 위해 필요한 투여량에서와 기간 동안의 효과적인 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 대상체의 질병 상태, 연령, 성별 및 체중 및 투여된 세포의 집단과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 세포 및/또는 조성물을 유효량, 예를 들어 치료적 유효량으로 투여하는 것을 포함한다.
- [0688] “예방적 유효량(prophylactically effective amount)”은 원하는 예방적 결과를 달성하기 위해 필요한 투여량에서와 시간 동안의 효과적인 양을 지칭한다. 반드시는 아니나 통상적으로, 예방적 용량이 질병 이전 또는 초기 단계의 대상체에서 사용되기 때문에, 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 적을 것이다. 더 낮은 종양 부담의 맥락에서, 예방적 유효량은 일부 측면에서 치료적 유효량보다 더 많을 것이다.
- [0689] 본원에서 사용될 때, 용어 “약(about)”은 본 기술 분야의 당업자에게 용이하게 알려진 각각의 값에 대한 일반적인 오차 범위를 지칭한다. 본원에서 “약(about)”의 값 또는 매개변수에 대한 언급은 상기 값 또는 매개변수 자체에 관한 구현예를 포함(및 기술)한다.
- [0690] 본원에서 사용될 때, 단수 형태(“a”, “an” 및 “the”)는 문맥상 명백하게 다르게 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다. 예를 들어, 단수 형태(“a” 또는 “an”)는 “적어도 하나(at least one)” 또는 “하나 이상(one or more)”을 의미한다.
- [0691] 본 개시 내용 전체에서, 청구된 주제의 다양한 측면이 범위 형식으로 제시된다. 범위 형식의 기재는 단지 편의 및 간결성을 위한 것이며 청구된 주제의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안된다는 것을 이해해야 한다. 따라서, 범위의 기재는 모든 가능한 하위 범위 및 상기 범위 내의 개별 수치들 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 값의 범위가 제공되는 경우, 상기 범위의 상한 내지 하한 사이 각각의 사이에 오는 값과 상기 언급된 범위에서 임의의 다르게 언급되거나 사이에 오는 값은 청구된 주제 내에 포함되는 것

으로 이해된다. 상기 더 작은 범위의 상한 내지 하한은 독립적으로 더 작은 범위에 포함될 수 있고, 또한 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 배제된 한계를 조건으로, 청구된 주제 내에 포함된다. 언급된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 모두를 포함하는 경우, 상기 포함된 한계 중 하나 또는 둘 모두를 제외한 범위도 청구된 주제에 포함된다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.

[0692] 본원에서 사용될 때, 조성물(composition)은 세포를 포함하여 둘 이상의 생성물, 물질 또는 화합물의 임의의 혼합물을 지칭한다. 이는 용액, 현탁액, 액체, 분말, 페이스트, 수성, 비수성 또는 이들의 임의의 조합물일 수 있다.

[0693] 본원에서 사용될 때, 하나 이상의 특정 세포 유형 또는 세포 집단을 지칭할 때 “농축(enriching)”은 예를 들어 조성물에서 세포의 총 수 또는 조성물의 부피와 비교하여, 또는 다른 세포 유형에 대비하여, 예컨대 집단 또는 세포에 의해 발현되는 표지자에 기초한 양성 선택에 의해, 또는 고갈될 세포 집단 또는 세포에 존재하지 않는 표지자에 기초한 음성 선택에 의해 세포 유형 또는 집단의 수 또는 백분율을 증가시키는 것을 지칭한다. 상기 용어는 조성물로부터 다른 세포, 세포 유형, 또는 집단의 완전한 제거가 필요하지 않으며 농축된 조성물에서 세포가 100% 또는 거의 100%로 존재하도록 농축될 필요는 없다.

[0694] 본원에서 사용될 때, 세포 또는 세포 집단이 특정 표지자에 대해 “양성(positive)”이라는 진술은 특정 표지자, 통상적으로 표면 표지자가 세포 상에 또는 세포 내에 검출 가능하게 존재함을 지칭한다. 표면 표지자를 언급할 때, 상기 용어는 유세포 분석에 의해, 예를 들어, 이 표지자에 특이적으로 결합하는 항체로 염색하고 상기 항체를 검출함으로써 검출된 바와 같은 표면 발현의 존재를 지칭하며, 이 염색은 달리 동일한 조건 하에서 동종형-매칭된 대조군으로 또는 형광 마이너스 1(FMO) 게이팅 대조군으로 같은 절차를 수행하여 검출된 염색보다 실질적으로 상위 수준에서 및/또는 표지자에 대해 양성인 것으로 알려진 세포에 대한 것과 실질적으로 유사한 수준에서 및/또는 표지자에 대해 음성인 것으로 알려진 세포에 대한 것보다 실질적으로 더 높은 수준에서 유세포 분석에 의해 검출 가능하다.

[0695] 본원에서 사용될 때, 세포 또는 세포 집단이 특정 표지자에 대해 “음성(negative)”이라는 진술은 특정 표지자, 통상적으로 표면 표지자가 세포 상에 또는 세포 내에 실질적으로 검출 가능하게 존재하지 않음을 지칭한다. 표면 표지자를 언급할 때, 상기 용어는 유세포 분석에 의해, 예를 들어, 이 표지자에 특이적으로 결합하는 항체로 염색하고 상기 항체를 검출함으로써 검출된 바와 같은 표면 발현의 부재를 지칭하며, 이 염색은 달리 동일한 조건 하에서 동종형-매칭된 대조군으로 또는 형광 마이너스 1(FMO) 게이팅 대조군으로 같은 절차를 수행하여 검출된 염색보다 실질적으로 상위 수준에서 및/또는 표지자에 대해 양성인 것으로 알려진 세포에 대한 것보다 실질적으로 더 낮은 수준에서 및/또는 표지자에 대해 음성인 것으로 알려진 세포에 대한 것과 비교하여 실질적으로 유사한 수준에서 유세포 분석에 의해 검출되지 않는다.

[0696] 본원에서 사용될 때, 용어 “벡터(vector)”는 이에 연결된 다른 핵산을 변형시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 상기 용어는 자가-복제 핵산 구조로서의 벡터 및 이것이 도입된 숙주 세포의 게놈 내로 편입된 벡터를 포함한다. 특정 벡터는 자신이 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터를 본원에서 “발현 벡터(expression vector)”로 지칭한다.

[0697] V. 예시적인 구현예

[0698] 제공된 구현예 중에는 하기가 있다:

[0699] 1. B 세포 비호지킨 림프종(B 세포 NHL)을 치료하는 방법으로서,

[0700] 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되,

[0701] 상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 $CD8^{+}$ T 세포를 포함하고;

[0702] 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 25×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고; 그리고

[0703] 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $CD3^{+}$ 세포인 것을 특징으로 하는, 방법.

[0704] 2. B 세포 비호지킨 림프종(B 세포 NHL)을 치료하는 방법으로서,

[0705] 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체

(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되,

- [0706] 상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 $CD8^{+}$ T 세포를 약 1:2.5 내지 약 2.5:1의 비로 포함하고;
- [0707] 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 100×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고;
- [0708] 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 90%는 $CD3^{+}$ 세포인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0709] 3. B 세포 비호지킨 림프종(B 세포 NHL)을 치료하는 방법으로서,
- [0710] 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되,
- [0711] 상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 $CD8^{+}$ T 세포를 약 1:1 내지 약 2.5:1의 비로 포함하고;
- [0712] 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 50×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고; 그리고
- [0713] 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $CD3^{+}$ 세포인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0714] 4. B 세포 비호지킨 림프종(r/r B 세포 NHL)을 치료하는 방법으로서,
- [0715] 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되,
- [0716] 상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 $CD8^{+}$ T 세포를 포함하고;
- [0717] 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 100×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고;
- [0718] 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $CD3^{+}$ 세포이며, 그리고
- [0719] 상기 조성물 중 CAR^{+} T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0720] 5. B 세포 비호지킨 림프종(r/r B 세포 NHL)을 치료하는 방법으로서,
- [0721] 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되,
- [0722] 상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 $CD8^{+}$ T 세포를 포함하고;
- [0723] 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 100×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고;
- [0724] 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $CD3^{+}$ 세포이며, 그리고
- [0725] 상기 조성물 중 $CD4^{+}CAR^{+}$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는 $CD27^{+}CCR7^{+}$ 이고/거나 상기 조성물 중 $CD8^{+}CAR^{+}$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는 $CD27^{+}CCR7^{+}$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0726] 6. B 세포 비호지킨 림프종(B 세포 NHL)을 치료하는 방법으로서,
- [0727] 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되,
- [0728] 상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 $CD4^{+}$ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 $CD8^{+}$ T 세포를 포함하고;

- [0729] 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 50×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고;
- [0730] 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 96%는 $CD3^+$ 세포이며, 그리고
- [0731] 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0732] 7. B 세포 비호지킨 림프종(r/r B 세포 NHL)을 치료하는 방법으로서,
- [0733] 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되,
- [0734] 상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 포함하고;
- [0735] 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 100×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고;
- [0736] 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $CD3^+$ 세포이며, 그리고
- [0737] 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수(iVCN)의 분율(fraction)은 평균적으로 (약) 0.9 미만인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0738] 8. B 세포 비호지킨 림프종(r/r B 세포 NHL)을 치료하는 방법으로서,
- [0739] 상기 방법은 B 세포 NHL이 있거나 있는 것으로 의심되는 대상체에게 CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하되,
- [0740] 상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 포함하고;
- [0741] 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 100×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하고;
- [0742] 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $CD3^+$ 세포이며, 그리고
- [0743] 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적으로 2배체 게놈 당 (약) 0.4개 카피 내지 2배체 게놈 당 3.0개 카피인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0744] 9. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 약 1:2 내지 약 2:1, 약 1:1.5 내지 약 1.5:1, 또는 (약) 1:1의 비로 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0745] 10. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 상기 CAR을 발현하는 $CD4^+$ T 세포 및 상기 CAR을 발현하는 $CD8^+$ T 세포를 약 1:1 내지 약 2.5:1, 약 1.5:1 내지 약 2:1, (약) 1.5:1, 또는 (약) 2:1의 비로 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0746] 11. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 10×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0747] 12. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 (약) 10×10^6 개의 CAR-발현 T 세포 내지 (약) 25×10^6 개의 CAR-발현 T 세포(수치 포함)를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0748] 13. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.

- [0749] 14. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 (약) 10×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0750] 15. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 (약) 25×10^6 개의 CAR-발현 T 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0751] 16. 구현예 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 세포의 적어도 또는 적어도 약 91%, 적어도 또는 적어도 약 92%, 적어도 또는 적어도 약 93%, 적어도 또는 적어도 약 94%, 적어도 또는 적어도 약 95%, 또는 적어도 또는 적어도 약 96%는 $CD3^+$ 세포인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0752] 17. 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 5% 내지 (약) 30%, 선택적으로 (약) 5% 내지 (약) 30%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0753] 18. 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 10% 내지 (약) 15%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0754] 19. 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 15% 내지 (약) 20%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0755] 20. 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 20% 내지 (약) 25%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0756] 21. 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 25% 내지 (약) 30%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0757] 22. 구현예 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 5%, (약) 10%, (약) 15%, (약) 20%, (약) 25%, 또는 (약) 30%는 세포자멸사의 표지자, 선택적으로 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3을 발현하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0758] 23. 구현예 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 80% 내지 (약) 85%는 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0759] 24. 구현예 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 85% 내지 (약) 90%는 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0760] 25. 구현예 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 90% 내지 (약) 95%는 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0761] 26. 구현예 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 95% 내지 (약) 99%는 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0762] 27. 구현예 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 85%, (약) 90%, (약) 95%, 또는 (약) 99%는 나이트-유사 또는 중심 기억 표현형인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0763] 28. 구현예 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 나이트-유사 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 표지자에 대해 표면 양성인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0764] 29. 구현예 28에 있어서, 나이트-유사 또는 중심 기억 T 세포 상에서 발현되는 상기 표지자는 CD45RA, CD27, CD28, 및 CCR7로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0765] 30. 구현예 1 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $CCR7^+CD45RA^+$, $CD27^+CCR7^+$, 및/또는 $CD62L^-CCR7^+$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.

- [0766] 31. 구현예 1 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 80% 내지 (약) 85%, (약) 85% 내지 (약) 90%, (약) 90% 내지 (약) 95%, 또는 (약) 95% 내지 (약) 99%는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^+$, $\text{CD27}^+\text{CCR7}^+$, 및/또는 $\text{CD62L}^-\text{CCR7}^+$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0767] 32. 구현예 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 80%, (약) 85%, (약) 90%, (약) 95%, 또는 (약) 99%는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^+$, $\text{CD27}^+\text{CCR7}^+$, 및/또는 $\text{CD62L}^-\text{CCR7}^+$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0768] 33. 구현예 1 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR^+ T 세포의 (약) 80%, (약) 85%, (약) 90%, (약) 95%, 또는 (약) 99%는 $\text{CD27}^+\text{CCR7}^+$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0769] 34. 구현예 1 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 $\text{CD4}^+\text{CAR}^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^+$ 또는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^-$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0770] 35. 구현예 1 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 $\text{CD4}^+\text{CAR}^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 60%는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^+$ 또는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^-$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0771] 36. 구현예 1 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 $\text{CD4}^+\text{CAR}^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 70%는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^+$ 또는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^-$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0772] 37. 구현예 1 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 $\text{CD4}^+\text{CAR}^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^+$ 또는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^-$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0773] 38. 구현예 1 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 $\text{CD4}^+\text{CAR}^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 85%는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^+$ 또는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^-$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0774] 39. 구현예 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 $\text{CD4}^+\text{CAR}^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는 $\text{CD27}^+\text{CCR7}^+$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0775] 40. 구현예 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 $\text{CD4}^+\text{CAR}^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 60%는 $\text{CD27}^+\text{CCR7}^+$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0776] 41. 구현예 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 $\text{CD4}^+\text{CAR}^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 70%는 $\text{CD27}^+\text{CCR7}^+$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0777] 42. 구현예 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 $\text{CD4}^+\text{CAR}^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 $\text{CD27}^+\text{CCR7}^+$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0778] 43. 구현예 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 $\text{CD4}^+\text{CAR}^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 85%는 $\text{CD27}^+\text{CCR7}^+$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0779] 44. 구현예 1 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 $\text{CD8}^+\text{CAR}^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^+$ 또는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^-$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0780] 45. 구현예 1 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 $\text{CD8}^+\text{CAR}^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 60%는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^+$ 또는 $\text{CCR7}^+\text{CD45RA}^-$ 인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0781] 46. 구현예 1 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 $\text{CD8}^+\text{CAR}^+$ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 70%는

CCR7⁺CD45RA⁺ 또는 CCR7⁺CD45RA⁻인 것을 특징으로 하는, 방법.

- [0782] 47. 구현예 1 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CD8⁺CAR⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 CCR7⁺CD45RA⁺ 또는 CCR7⁺CD45RA⁻인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0783] 48. 구현예 1 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CD8⁺CAR⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 85%는 CCR7⁺CD45RA⁺ 또는 CCR7⁺CD45RA⁻인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0784] 49. 구현예 1 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CD8⁺CAR⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 50%는 CD27⁺CCR7⁺인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0785] 50. 구현예 1 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CD8⁺CAR⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 60%는 CD27⁺CCR7⁺인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0786] 51. 구현예 1 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CD8⁺CAR⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 70%는 CD27⁺CCR7⁺인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0787] 52. 구현예 1 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CD8⁺CAR⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 80%는 CD27⁺CCR7⁺인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0788] 53. 구현예 1 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CD8⁺CAR⁺ T 세포의 적어도 또는 적어도 약 85%는 CD27⁺CCR7⁺인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0789] 54. 구현예 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수 (iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.9 내지 (약) 0.8인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0790] 55. 구현예 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수 (iVCN)의 분율(fraction)은 평균적으로 (약) 0.8 미만인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0791] 56. 구현예 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수 (iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.8 내지 (약) 0.7인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0792] 57. 구현예 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수 (iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.7 내지 (약) 0.6인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0793] 58. 구현예 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수 (iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.6 내지 (약) 0.5인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0794] 59. 구현예 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 총 VCN에 대한 통합 벡터 카피수 (iVCN)의 분율은 평균적으로 (약) 0.5 내지 (약) 0.4인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0795] 60. 구현예 1 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적으로 2배체 게놈 당 (약) 0.8개 카피 내지 2배체 게놈 당 2.0개 카피인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0796] 61. 구현예 1 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적으로 2배체 게놈 당 (약) 0.8개 카피 내지 2배체 게놈 당 1.0개 카피인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0797] 62. 구현예 1 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적으로 2배체 게놈 당 (약) 1.0개 카피 내지 2배체 게놈 당 1.5개 카피인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0798] 63. 구현예 1 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물 중 CAR⁺ T 세포의 통합 벡터 카피수(iVCN)는 평균적

으로 2배체 게놈 당 (약) 1.5개 카피 내지 2배체 게놈 당 2.0개 카피인 것을 특징으로 하는, 방법.

- [0799] 64. 구현예 1 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포 NHL은: 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 선택적으로 DLBCL NOS(달리 명시되지 않음; 드노보(de novo) 또는 예를 들어 여포성 림프종 또는 변연부 림프종으로부터 형질전환된 DLBCL 포함); 고등급 B 세포 림프종(HGBCL), 선택적으로 MYC와 BCL2 및/또는 BCL6 재배열을 갖고 DLBCL 조직 구조를 갖는 HGBCL; 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종(PMBCL); 및 여포성 림프종(FL), 선택적으로 3b 등급 여포성 림프종(FL3B)으로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0800] 65. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 r/r B 세포 NHL은 미만성 거대 B 세포 림프종인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0801] 66. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 r/r B 세포 NHL은 미만성 거대 B 세포 림프종 NOS(달리 명시되지 않음)인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0802] 67. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 r/r B 세포 NHL은 드노보(de novo) 미만성 거대 B 세포 림프종인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0803] 68. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 r/r B 세포 NHL은 여포성 림프종으로부터 형질전환된 미만성 거대 B 세포 림프종인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0804] 69. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 r/r B 세포 NHL은 변연부 림프종으로부터 형질전환된 미만성 거대 B 세포 림프종인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0805] 70. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 r/r B 세포 NHL은 고등급 B 세포 림프종(HGBCL)인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0806] 71. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 r/r B 세포 NHL은 MYC와 BCL2 및/또는 BCL6 재배열을 갖고 고등급 B 세포 림프종인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0807] 72. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 r/r B 세포 NHL은 DLBCL 조직 구조를 갖는 고등급 B 세포 림프종인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0808] 73. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 r/r B 세포 NHL은 이중 유전자 이상 림프종 또는 삼중 유전자 이상 림프종인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0809] 74. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 r/r B 세포 NHL은 원발성 종격동 거대 B 세포 림프종인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0810] 75. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 r/r B 세포 NHL은 여포성 림프종인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0811] 76. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 r/r B 세포 NHL은 3b 등급 여포성 림프종인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0812] 77. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 r/r B 세포 NHL은 조직학적으로 확인된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0813] 78. 구현예 1 내지 77 중 어느 하나에 있어서, 상기 조작된 T 세포의 조성물의 투여 시점에 또는 투여 시점 직전에, 상기 대상체는 (i) R/ 상기 B 세포 NHL에 대한 둘 이상의 선행 요법 및/또는 (ii) 자가 줄기세포 이식(ASCT) 요법을 이용해 치료 후 관해된 이후에 재발했거나, 이에 대해 불응성이 된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0814] 79. 구현예 78에 있어서, 상기 조작된 T 세포의 조성물의 투여 시점에 또는 투여 시점 직전에, 상기 대상체는, 상기 r/r B 세포 NHL에 대한 둘 이상의 선행 요법을 이용해 치료 후 관해된 이후에 재발했거나, 이에 대해 불응성이 된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0815] 80. 구현예 78에 있어서, 상기 조작된 T 세포의 조성물의 투여 시점에 또는 투여 시점 직전에, 상기 대상체는, 상기 r/r B 세포 NHL에 대한 셋 이상의 선행 요법을 이용해 치료 후 관해된 이후에 재발했거나, 이에 대해 불응성이 된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0816] 81. 구현예 78 내지 80 중 어느 하나에 있어서, 상기 r/r B 세포 NHL에 대한 상기 둘 이상의 선행 요법은 CAR을 발현하는 세포의 또 다른 용량을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.

- [0817] 82. 구현예 78 내지 81 중 어느 하나에 있어서, 상기 둘 이상의 선행 요법은 안트라사이클린 및 CD20-표적화 제제를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0818] 83. 구현예 78 내지 82 중 어느 하나에 있어서, 상기 둘 이상의 선행 요법은 선행 무통성 림프종에 대해 제공된 것들을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0819] 84. 구현예 78 내지 83 중 어느 하나에 있어서, 상기 둘 이상의 선행 요법은 무통성 DLBCL에 대해 주어진 안트라사이클린을 포함하지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0820] 85. 구현예 78 내지 84 중 어느 하나에 있어서, 상기 둘 이상의 선행 요법은 CD20-표적화 제제를 포함하고, 상기 둘 이상의 선행 요법은 안트라사이클린이 선행 무통성 림프종에 주어진 경우 안트라사이클린을 배제할 수 있는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0821] 86. 구현예 82 내지 85 중 어느 하나에 있어서, 상기 CD20-표적화 제제는 항-CD20 단클론 항체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0822] 87. 구현예 82 내지 86 중 어느 하나에 있어서, 상기 CD20-표적화 제제는 리툭시마를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0823] 88. 구현예 1 내지 77 중 어느 하나에 있어서, 상기 조작된 T 세포의 조성물의 투여 시점에 또는 투여 시점 직전에, 상기 대상체는 자가 줄기세포 이식(ASCT) 요법을 이용해 치료 후 관해된 이후에 재발했거나, 이에 대해 불응성이 된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0824] 89. 구현예 88에 있어서, 상기 대상체는 재발성 및/또는 불응성 DLBCL을 가진 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0825] 90. 구현예 88 또는 89에 있어서, 상기 ASCT는 객관적 반응(부분 반응(PR) 또는 더 나아짐) 달성에 실패하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0826] 91. 구현예 78 내지 90 중 어느 하나에 있어서, 상기 ASCT 이후에 상기 대상체의 질병은 진행된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0827] 92. 구현예 1 내지 91 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 조성물의 투여시 또는 그 전에, 상기 대상체는 공격성 질병 또는 고위험 질병을 가졌거나 불량한 예후를 가진 것으로 확인된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0828] 93. 구현예 1 내지 92 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 조성물의 투여시 또는 그 전에, 상기 대상체는 화학요법 이후 화학 요법 불응성 질병을 가졌거나 지속성 또는 재발성 질병을 가진 것으로 확인된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0829] 94. 구현예 1 내지 93 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상체는 악성 종양에 의한 병리학적으로 확인된 2차 중추신경계(CNS) 침습을 가진 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0830] 95. 구현예 1 내지 94 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상체는 악성 종양에 의한 중추신경계(CNS)-단독 침습을 가지고 있지 않은 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0831] 96. 구현예 1 내지 95 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상체는 선행 CAR T 세포 또는 유전자 변형 T 세포 요법을 받지 않은 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0832] 97. 구현예 1 내지 96 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상체는 항-CD19 단클론 항체 또는 이중특이성 항체 등의 선행 CD19-표적화 요법을 받지 않은 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0833] 98. 구현예 1 내지 97 중 어느 하나에 있어서,
- [0834] 상기 조작된 T 세포의 조성물을 제조하기 위해 상기 대상체로부터 백혈구 성분채집술 샘플을 수득하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [0835] 99. 구현예 98에 있어서, 상기 대상체는 코르티코스테로이드의 치료 용량을, 선택적으로 상기 백혈구 성분채집술의 시점 전 (약) 14일 이내에, 받지 않은 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0836] 100. 구현예 98 또는 99에 있어서, 상기 대상체는 상기 백혈구 성분채집술 시점 전 (약) 7일 이내에, 림프 독성 화학 요법제 또는 경막내 요법이 아닌 세포독성 화학 요법제를 받지 않은 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0837] 101. 구현예 98 내지 100 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상체는 상기 백혈구 성분채집술의 시점 전 (약) 4주

이내에, 림프 독성 화학 요법제를 받지 않은 것을 특징으로 하는, 방법.

- [0838] 102. 구현예 98 내지 101 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상체는 상기 백혈구 성분채집술의 시점 전 (약) 4주 이내에, 면역 억제 요법을 받지 않은 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0839] 103. 구현예 98 내지 102 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상체는 상기 백혈구 성분채집술의 시점 전 (약) 6주 이내에, 방사선을 받지 않은 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0840] 104. 구현예 98 내지 103 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상체는 상기 백혈구 성분채집술의 시점 전 (약) 3주 이내에, 자가 줄기세포 이식을 받지 않은 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0841] 105. 구현예 1 내지 104 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상체는 선행 요법에 반응하여 완전 관해(CR)를 달성하지 못한 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0842] 106. 구현예 1 내지 105 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상체는 선행 요법에 반응하여 객관적 반응(부분 반응(PR) 또는 더 나아짐)을 달성하지 못한 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0843] 107. 구현예 1 내지 106 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 조성물의 투여시 또는 그 전에, 상기 대상체는 중추신경계(CNS) 침습과 연관되거나 이를 수반하는 림프종 또는 2차 CNS 림프종에 대해 평가되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0844] 108. 구현예 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 조성물의 투여 시 또는 그 전에, 상기 대상체는:
- [0845] 적절한 심장 기능, 선택적으로 (약) 40%, 40% 초과, 또는 약 40% 초과 좌심실 박출물(LVEF)을 보임; 및/또는
- [0846] 적절한 신장 기능, 선택적으로 (약) 45mL/분, 45mL/분 초과, 또는 약 45mL/분 초과 계산된 크레아틴 청소율을 보임; 및/또는
- [0847] 적절한 간 기능, 선택적으로 ULN(정상 상한)의 2.5배 이하의 아스파르트산 아미노기 전달효소(AST) 및 알라닌 아미노기 전달효소(ALT) 및 ULN의 1.5배 미만의 빌리루빈을 보임; 및/또는
- [0848] 적절한 폐 기능, 선택적으로 $\leq$ CTCAE 등급 1 호흡곤란 및 실내 공기 상의 포화 산소(예를 들어, $\text{SaO}_2 \geq 92\%$)를 보임;을 가진 것으로 확인되거나 확인되었음을 특징으로 하는, 방법.
- [0849] 109. 구현예 1 내지 108 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 조성물의 투여 시 또는 그 전에, 상기 대상체는 성장 인자 지원 없이 (약) 1.0×10^9 개 세포/L, 1.0×10^9 개 세포/L 초과, 또는 약 1.0×10^9 개 세포/L 초과 절대 호중구 수(ANC)를 가진 것으로 확인되거나 확인된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0850] 110. 구현예 1 내지 109 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 조성물의 투여 시 또는 그 전에, 상기 대상체는 수혈 없이 (약) 50×10^9 개 세포/L, 50×10^9 개 세포/L 초과, 또는 약 50×10^9 개 세포/L 초과 혈소판을 가진 것으로 확인되거나 확인된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0851] 111. 구현예 1 내지 110 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 조성물의 투여 시 또는 그 전에, 상기 대상체는 상기 조작된 T 세포의 조성물을 생산하기 위한 백혈구 성분채집술의 시점과 상기 조작된 세포의 조성물의 상기 투여 사이에 가교 화학 요법을 받은 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0852] 112. 구현예 1 내지 111 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 조성물의 투여시 또는 그 전에, 상기 대상체는 선행 요법 후 질병 통제를 위해 가교 화학 요법을 받은 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0853] 113. 구현예 1 내지 112 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상체는 0 또는 1의 ECOG PS(Eastern Cooperative Oncology Group 수행도)를 가진 것으로 확인되거나 확인된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0854] 114. 구현예 1 내지 113 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 조성물의 투여시 또는 그 전에, 상기 대상체는 수직 직경들의 곱의 합(SPD)로 측정했을 때 높은 기준선 종양 부담, 또는 높은 혈청 젖산 탈수소효소(LDH), 예컨대 $\text{LDH} \geq 500\text{U/L}$ 을 가진 것으로 확인되거나 확인된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0855] 115. 구현예 1 내지 114 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 조성물의 투여 시 또는 그 전에, 상기 대상체는 양전자 방사 단층 촬영(PET)-양성 질병을 가진 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0856] 116. 구현예 1 내지 115 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 조성물의 투여 전에, 상기 세포의 조성물의 투여를 위해 상기 대상체를 식별 또는 선택하는 단계를 더 포함하는, 방법.

- [0857] 117. 구현예 1 내지 116 중 어느 하나에 있어서, 상기 투여 전에, 상기 대상체는 림프구 고갈 요법으로 사전 조절된 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0858] 118. 구현예 1 내지 117 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 상기 세포의 용량의 투여 직전에, 상기 대상체에 플루다라빈 및/또는 시클로포스파미드의 투여를 포함하는 림프구 고갈 요법을 투여하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [0859] 119. 구현예 117 또는 118에 있어서, 상기 세포의 조성물 및/또는 상기 림프구 고갈 요법의 투여는, 예를 들어 비-3차 의료 센터에서, 통원 전달을 통해 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0860] 120. 구현예 117 내지 119 중 어느 하나에 있어서, 상기 림프구 고갈 요법은 3일 동안 매일 $30\text{mg}/\text{m}^2$ (상기 대상체의 체표면적)의 플루다라빈 및 매일 $300\text{mg}/\text{m}^2$ (상기 대상체의 체표면적)의 시클로포스파미드의 투여를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0861] 121. 구현예 117 내지 120 중 어느 하나에 있어서, 상기 조작된 T 세포의 조성물은 상기 림프구 고갈 요법의 완료 후, (약) 48시간 내지 (약) 9일(수치 포함) 사이에 투여되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0862] 122. 구현예 117 내지 121 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상체는 상기 림프구 고갈 요법을 받을 때 적어도 또는 적어도 약 $30\text{mL}/\text{분}$ 의 크레아틴 청소율을 가진 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0863] 123. 구현예 1 내지 122 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 조성물의 투여 개시 전에, 상기 대상체는 신경 독성 및/또는 사이토카인 방출 증후군 또는 이의 위험의 치료 또는 예방 또는 감소 또는 약화를 위한 제제 또는 치료제를 투여받지 않은 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0864] 124. 구현예 1 내지 123 중 어느 하나에 있어서, 신경 독성 및/또는 사이토카인 방출 증후군 또는 이의 위험의 치료 또는 예방 또는 감소 또는 약화를 위한 제제 또는 치료제를 상기 대상체에 투여하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [0865] 125. 구현예 123 또는 124에 있어서, 상기 제제는 항-IL-6 항체, 항-IL-6 수용체 항체 또는 스테로이드이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0866] 126. 구현예 123 내지 125 중 어느 하나에 있어서, 상기 제제는 토실리주맙 또는 메틸프레드니솔론이거나 이를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0867] 127. 구현예 1 내지 126 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포는 대상체로부터 수득된 1차 T 세포인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0868] 128. 구현예 1 내지 127 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포는 상기 대상체에 대해 자가(autoologous)인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0869] 129. 구현예 1 내지 128 중 어느 하나에 있어서,
- [0870] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 35%, 적어도 40% 또는 적어도 50%는 완전 반응(CR)을 달성하고;
- [0871] CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 또는 6개월 이상 동안 지속되는 CR을 나타내고; 및/또는
- [0872] 1개월까지 및/또는 3개월까지 CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 상기 CR을 달성한 후 3개월 이상 및/또는 6개월 이상 및/또는 9개월 이상 동안 반응을 유지하고, CR을 유지하고, 및/또는 생존하거나 진행 없이 생존하고; 및/또는
- [0873] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 50%, 적어도 60% 또는 적어도 70%는 객관적 반응(OR)을 달성하고;
- [0874] OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 또는 6개월 이상 동안 지속되는 OR을 나타내고; 및/또는
- [0875] OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 35%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%는 상기 OR을 달성한 후 3개월 이상 동안 및/또는 6개월 이상 동안 반응을 유지하거나 생존하는 것을 특징으로 하는, 방법.

- [0876] 130. 구현예 1 내지 129 중 어느 하나에 있어서,
- [0877] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 50%는 완전 반응(CR)을 달성하고;
- [0878] CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%는 6개월 이상 동안 지속되는 CR을 나타내고; 및/또는
- [0879] 1개월까지 및/또는 3개월까지 CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%는 상기 CR을 달성한 후 6개월 이상 동안 반응을 유지하고, CR을 유지하고, 및/또는 생존하거나 진행 없이 생존하고; 및/또는
- [0880] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 70%는 객관적 반응(OR)을 달성하고;
- [0881] OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%는 6개월 이상 동안 지속되는 OR을 나타내고; 및/또는
- [0882] OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 50%는 상기 OR을 달성한 후 6개월 이상 동안 반응을 유지하거나 생존하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0883] 131. 구현예 129 또는 130에 있어서,
- [0884] 상기 CR 또는 상기 OR은 3개월 넘게 또는 6개월 넘게 지속되고; 및/또는
- [0885] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 35%, 적어도 40% 또는 적어도 50%는 3개월 넘게 또는 6개월 넘게 지속되는 CR을 달성하고; 및/또는
- [0886] 상기 방법으로 치료를 받고 CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 또는 6개월 이상 또는 9개월 이상 동안 CR을 유지하거나 반응을 유지하거나 생존을 유지하고; 및/또는
- [0887] 상기 방법으로 치료를 받고 1개월까지 및/또는 3개월까지 CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 및/또는 6개월 이상 및/또는 9개월 이상 동안 반응을 유지하고, CR을 유지하고, 및/또는 생존하거나 진행 없이 생존하고; 및/또는
- [0888] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 50%, 적어도 60% 또는 적어도 70%는 객관적 반응(OR)을 달성하고;
- [0889] OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 또는 6개월 이상 동안 지속되는 OR을 달성하고; 및/또는
- [0890] 상기 방법으로 치료를 받고 OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 35%, 적어도 40%, 또는 적어도 50%는 3개월 이상 동안 및/또는 6개월 이상 동안 반응을 유지하거나 생존하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0891] 132. 구현예 1 내지 131 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 상기 대상체에 대해 자가(autologous)이고,
- [0892] 성분채집술을 위한 최소 절대 림프구 수(ALC)는 요법의 생산을 위해 요구 및/또는 명시되지 않고; 및/또는
- [0893] 상기 세포는, 상기 질병 또는 병태를 가진 대상체들의 또는 대상체들의 선택된 집단의 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%에 대해, 상기 방법에 따른 투여를 위한 세포 생성물을 생성할 수 있는 공정에 의해 생산되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0894] 133. 구현예 1 내지 132 중 어느 하나에 있어서,
- [0895] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 35%, 적어도 40% 또는 적어도 50%는 CNS 질병의 완전 반응(CR) 또는 관해를 달성하고;
- [0896] CR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 또는 6개월 이상 동안 CR을 유지하고; 및/또는
- [0897] 1개월까지 및/또는 3개월까지 CNS 질병의 CR 또는 관해를 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 및/또는 6개월 이상 및/또는 9개월 이상 동안 반응을 유지하고, CR을 유지하고, 및/또는 생존하거나 진행 없이 생존하고; 및/또는
- [0898] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 50%, 적어도 60% 또는 적어도 70%는 CNS 질병의 객관적 반응(OR) 또는 관해를 달성하고;
- [0899] 상기 OR을 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 또는 6개월 이상 동안 지속되고; 및/또는

- [0900] CNS의 OR 또는 관해를 달성하는 대상체들 중 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%는 3개월 이상 및/또는 6개월 이상 동안 반응을 유지하거나 생존하고; 및/또는
- [0901] 뇌 병변은 크기 또는 부피가 (약) 25%, 50%, 75% 또는 그 이상 감소되고; 및/또는
- [0902] CNS 질병의 감소 또는 관해 또는 제거는 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 35%, 적어도 40% 또는 적어도 50%에서 달성되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0903] 134. 구현예 1 내지 133 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 50%, (약) 60%, (약) 70%, 또는 (약) 80% 넘는 대상체가 3급 이상의 사이토카인 방출 증후군(CRS)을 나타내지 않고/거나 3급 이상의 신경 독성을 나타내지 않고/거나 40% 또는 50% 또는 55% 넘는 대상체가 신경 독성 또는 CRS의 어느 것도 나타내지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0904] 135. 구현예 1 내지 134 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 80% 넘는 대상체가 3급 이상의 사이토카인 방출 증후군(CRS)을 나타내지 않고/거나 3급 이상의 신경 독성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0905] 136. 구현예 1 내지 135 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 95% 넘는 대상체가 3급 이상의 CRS를 나타내지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0906] 137. 구현예 1 내지 136 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 85% 넘는 대상체가 3급 이상의 신경 독성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0907] 138. 구현예 1 내지 137 중 어느 하나에 있어서,
- [0908] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 30%, (약) 35%, (약) 40%, 또는 (약) 50% 넘는 대상체가 사이토카인 방출 증후군(CRS) 또는 신경 독성의 어느 등급도 나타내지 않고/거나;
- [0909] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 (약) 45%, 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는 상기 투여의 개시 이후 3일보다 이전에 CRS의 개시를 나타내지 않고/거나 상기 투여의 개시 이후 5일보다 이전에 신경 독성의 개시를 나타내지 않고/거나;
- [0910] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 신경 독성의 중앙값 개시는 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들에서 CRS의 중앙값 피크 또는 그 이후, 또는 CRS의 분해능까지의 중앙값 시간이고/거나, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 신경 독성의 중앙값 개시는 (약) 8, 9, 10, 또는 11일보다 큰 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0911] 139. 구현예 1 내지 138 중 어느 하나에 있어서,
- [0912] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 50% 넘는 대상체가 사이토카인 방출 증후군(CRS) 또는 신경 독성의 어느 등급도 나타내지 않고/거나;
- [0913] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 (약) 45%는 상기 투여의 개시 이후 3일보다 이전에 CRS의 개시를 나타내지 않고/거나 상기 투여의 개시 이후 5일보다 이전에 신경 독성의 개시를 나타내지 않고/거나;
- [0914] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 신경 독성의 중앙값 개시는 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들에서 CRS의 중앙값 피크 또는 그 이후, 또는 CRS의 분해능까지의 중앙값 시간이고/거나, 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 신경 독성의 중앙값 개시는 (약) 8일보다 큰 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0915] 140. 구현예 1 내지 139 중 어느 하나에 있어서,
- [0916] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 50%는 완전 반응(CR)을 달성하고;
- [0917] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 적어도 70%는 객관적 반응(OR)을 달성하고;
- [0918] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 50% 넘는 대상체가 사이토카인 방출 증후군(CRS) 또는 신경 독성의 어느 등급도 나타내지 않고;
- [0919] 상기 방법에 따라 치료를 받은 대상체들 중 (약) 80% 넘는 대상체가 3급 이상의 사이토카인 방출 증후군(CRS)을 나타내지 않고/거나 3급 이상의 신경 독성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0920] 141. 구현예 1 내지 140 중 어느 하나에 있어서,
- [0921] 상기 CAR은 상기 항원에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 선택적으로 4-1BB인 공자극 분자로

부터 유래된 세포질 신호전달 도메인, 및 선택적으로 CD3제타인 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인을 포함하거나;

- [0922] 상기 CAR은 상기 항원에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 공자극 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인, 및 1차 신호전달 ITAM-함유 분자로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인을 순서대로 포함하거나;
- [0923] 상기 CAR은 상기 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 항원 인식 도메인, 막관통 도메인, 및 CD3-제타(CD3 ζ) 사슬을 포함하는 세포내 신호전달 도메인 및 4-1BB의 신호전달 도메인인 공자극 신호전달 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0924] 142. 구현예 1 내지 141 중 어느 하나에 있어서, 상기 CAR은 CD19에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인, 막관통 도메인, 4-1BB로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인, 및 CD3제타로부터 유래된 세포질 신호전달 도메인을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0925] 143. 구현예 142에 있어서, 상기 항원 결합 도메인은 scFv인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0926] 144. 구현예 143에 있어서, 상기 scFv는 RASQDISKYLN(서열 번호: 35)의 아미노산 서열, SRLHSGV(서열 번호: 36)의 아미노산 서열, 및/또는 GNTLPYTFG(서열 번호: 37)의 아미노산 서열 및/또는 DYGV(서열 번호: 38)의 아미노산 서열, VIWGSETTYNSALKS(서열 번호: 39)의 아미노산 서열, 및/또는 YAMDYWG(서열 번호: 40)의 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 상기 scFv는 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 FMC63의 가변 경쇄 영역 및/또는 FMC63의 CDRL1 서열, FMC63의 CDRL2 서열, FMC63의 CDRL3 서열, FMC63의 CDRH1 서열, FMC63의 CDRH2 서열, 및 FMC63의 CDRH3 서열을 포함하거나 전술한 것 중 어느 하나와 동일한 에피토프에 결합하거나 결합을 위해 경쟁하고; 선택적으로 상기 scFv는 VH, 선택적으로 서열 번호: 24를 포함하는 링커, 및 VL을 순서대로 포함하고/하거나 상기 scFv는 가요성 링커를 포함하고/하거나 서열 번호: 43으로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0927] 145. 구현예 143 또는 144에 있어서, 상기 scFv는 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 FMC63의 가변 경쇄 영역을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0928] 146. 구현예 141 내지 145 중 어느 하나에 있어서, 상기 공자극 신호전달 영역은 4-1BB의 신호전달 도메인인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0929] 147. 구현예 141 내지 146 중 어느 하나에 있어서, 상기 공자극 도메인은 서열 번호: 12 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0930] 148. 구현예 141 내지 147 중 어느 하나에 있어서, 상기 1차 신호전달 도메인은 CD3제타 신호전달 도메인인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0931] 149. 구현예 141 내지 148 중 어느 하나에 있어서, 상기 1차 신호전달 도메인은 서열 번호: 13, 14 또는 15 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0932] 150. 구현예 141 내지 149 중 어느 하나에 있어서, 상기 CAR은 상기 막관통 도메인과 상기 scFv 사이에 스페이서를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0933] 151. 구현예 150에 있어서, 상기 스페이서는 면역글로불린 힌지 또는 이의 변형된 버전, 선택적으로 IgG4 힌지 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성된 폴리펩타이드 스페이서인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0934] 152. 구현예 150 또는 151에 있어서, 상기 스페이서는 (약) 12개의 아미노산 길이인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0935] 153. 구현예 150 내지 152 중 어느 하나에 있어서,
- [0936] 상기 스페이서는 서열 번호: 1의 서열, 서열 번호: 2에 의해 암호화된 서열, 서열 번호: 30, 서열 번호: 31, 서열 번호: 32, 서열 번호: 33, 서열 번호: 34, 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 상기 중 어느 하나의 변이체를 포함하거나 이로 구성되고/거나;

- [0937] 상기 스페이서는 화학식 X_1PPX_2P 를 포함하거나 이로 구성되고, 여기서 X_1 은 글리신, 시스테인 또는 아르기닌이고 X_2 는 시스테인 또는 트레오닌인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0938] 154. 구현예 150 내지 153 중 어느 하나에 있어서,
- [0939] 상기 스페이서는 (a) 면역글로불린 힌지 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성되거나, 약 15개 이하의 아미노산을 포함하고, CD28 세포의 영역 또는 CD8 세포의 영역을 포함하지 않거나; (b) 면역글로불린 힌지, 선택적으로 IgG4 힌지, 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성되고/거나, 약 15개 이하의 아미노산을 포함하고, CD28 세포의 영역 또는 CD8 세포의 영역을 포함하지 않거나; (c) (약) 12개의 아미노산 길이고/거나 면역글로불린 힌지, 선택적으로 IgG4, 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성되거나; (d) 서열 번호: 1의 서열, 서열 번호: 2에 의해 암호화된 서열, 서열 번호: 30, 서열 번호: 31, 서열 번호: 32, 서열 번호: 33, 서열 번호 34, 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 상기 중 어느 하나의 변이체를 갖거나 이로 구성되거나; 또는 (e) 화학식 X_1PPX_2P (여기에서 X_1 은 글리신, 시스테인 또는 아르기닌이고 X_2 는 시스테인 또는 트레오닌임)을 포함하거나 이로 구성되는; 폴리펩타이드 스페이서이고/거나;
- [0940] 상기 공자극 도메인은 서열 번호: 12 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하고/거나;
- [0941] 상기 1차 신호전달 도메인은 서열 번호: 13, 14 또는 15 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하고/거나;
- [0942] 상기 scFv는 RASQDISKYLN(서열 번호: 35)의 아미노산 서열, SRLHSGV(서열 번호: 36)의 아미노산 서열, 및/또는 GNTLPYTFG(서열 번호: 37)의 아미노산 서열 및/또는 DYGV(서열 번호: 38)의 아미노산 서열, VIWGSETTYNSALKS(서열 번호: 39)의 아미노산 서열, 및/또는 YAMDYWG(서열 번호: 40)의 아미노산 서열을 포함하거나; 또는 상기 scFv는 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 FMC63의 가변 경쇄 영역 및/또는 FMC63의 CDRL1 서열, FMC63의 CDRL2 서열, FMC63의 CDRL3 서열, FMC63의 CDRH1 서열, FMC63의 CDRH2 서열, 및 FMC63의 CDRH3 서열을 포함하거나 전술한 것 중 어느 하나와 동일한 에피토프에 결합하거나 결합을 위해 경쟁하고; 선택적으로 상기 scFv는 VH, 선택적으로 서열 번호: 24를 포함하는 링커, 및 VL을 순서대로 포함하고/하거나 상기 scFv는 가요성 링커를 포함하고/하거나 서열 번호: 43으로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0943] 155. 구현예 150 내지 154 중 어느 하나에 있어서,
- [0944] 상기 스페이서는 서열 번호: 1의 서열을 포함하는 폴리펩타이드 스페이서이고; 상기 공자극 도메인은 서열 번호: 12를 포함하고; 상기 1차 신호전달 도메인은 서열 번호: 13, 14 또는 15를 포함하고; 상기 항원 결합 도메인은 FMC63의 가변 중쇄 영역 및 FMC63의 가변 경쇄 영역을 포함하는 scFv를 포함하는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0945] 156. 구현예 1 내지 155 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 조성물은 비경구적으로, 선택적으로 정맥내 투여되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0946] 157. 구현예 1 내지 156 중 어느 하나에 있어서, 상기 대상체는 인간 대상체인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0947] 158. 구현예 1 내지 157 중 어느 하나에 있어서, 조작된 T 세포를 포함하는 상기 조성물은 1차 T 세포를 포함하는 투입 조성물을 복수의 아비딘, 스트렙타비딘, 아비딘 뮤테인, 또는 스트렙타비딘 뮤테인 분자들을 포함하는 올리고머성 입자 시약을 포함하는 자극 시약과 T 세포를 자극하는 조건에서 노출시키고, 이에 의해 자극된 집단을 생성하는 단계를 포함하는 제조 공정에 의해 생산되고, 여기서 상기 자극 시약은 TCR 복합체의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및 하나 이상의 공자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화할 수 있는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0948] 159. 구현예 158에 있어서, 상기 제조 공정은 상기 자극된 집단의 T 세포 내로 CD19를 표적화하는 CAR을 암호화하는 이중 폴리뉴클레오타이드를 도입하고, 그에 의해 형질전환된 세포의 집단을 생성하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [0949] 160. 구현예 159에 있어서, 상기 제조 공정은 상기 형질전환된 세포의 집단을 최대 96시간 동안 인큐베이션하는

단계를 더 포함하는, 방법.

- [0950] 161. 구현예 160에 있어서, 상기 인큐베이션하는 단계는 하나 이상의 재조합 사이토카인이 결합된 기본 배지에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0951] 162. 구현예 159 또는 161에 있어서, 상기 제조 공정은 상기 형질전환된 집단의 T 세포를 수확하고, 이에 의해 조작된 세포의 조성물을 생산하는 단계를 더 포함하는, 방법.
- [0952] 163. 구현예 162에 있어서, 상기 수확은 상기 자극 시약에 노출이 개시된 후 24 내지 120시간 시점에(수치 포함) 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0953] 164. 구현예 162 또는 163에 있어서, 상기 수확은 상기 자극 시약에 노출이 개시된 후 48 내지 120시간 시점에(수치 포함) 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0954] 165. 구현예 162 내지 164 중 어느 하나에 있어서, 상기 수확은 상기 계놈에서 통합 벡터가 검출되는 시점에 하지만 2배체 계놈 당 안정적 통합 벡터 카피수(iVCN)를 달성하기 전에 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0955] 166. 구현예 162 내지 165 중 어느 하나에 있어서, 상기 수확은 수확 시 생존 세포의 총 수가 상기 자극된 집단의 총 생존 세포의 수의 (약) 3배를 넘기 전 시점에 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0956] 167. 구현예 166에 있어서, 상기 수확은 수확 시 생존 세포의 총 수가 상기 자극된 집단의 총 생존 세포의 수의 (약) 3배이거나, (약) 2배이거나, 동일하거나 거의 동일한 시점에 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0957] 168. 구현예 162 내지 167 중 어느 하나에 있어서, 상기 수확은 상기 $CD27^+CCR7^+$ 세포의 백분율이 상기 총 T 세포, 상기 집단에서 총 $CD3^+$ T 세포, 상기 집단에서 총 $CD4^+$ T 세포, 상기 집단에서 총 $CD8^+$ T, 또는 상기 집단에서 CAR-발현 세포 중 (약) 50%보다 큰 시점에 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0958] 169. 구현예 162 내지 168 중 어느 하나에 있어서, 상기 수확은 상기 $CD45RA^+CCR7^+$ 및 $CD45RA^-CCR7^+$ 세포의 백분율이 상기 집단에서 총 T 세포, 상기 집단에서 총 $CD3^+$ T 세포, 상기 집단에서 총 $CD4^+$ T 세포, 상기 집단에서 총 $CD8^+$ T, 또는 상기 집단에서 CAR-발현 세포 중 (약) 60%보다 큰 시점에 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0959] 170. 구현예 1 내지 169 중 어느 하나에 있어서, 상기 투여된 조성물 내 세포는 미리 정해진 특징을 나타내는 산출 조성물을 생산하는 제조 공정에 의해 생산되고,
- [0960] 여기서 상기 제조 공정의 반복은, 복수의 상이한 개별 대상체들 사이에서 수행될 때, 선택적으로 인간 생물학적 샘플로부터, 복수의 상기 산출 조성물을 생산하고, 상기 복수의 산출 조성물 중 상기 산출 조성물의 상기 미리 정해진 특징은:
- [0961] 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물 내 기억 표현형의 세포의 평균 백분율;
- [0962] 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물 내 중심 기억 표현형의 세포의 평균 백분율;
- [0963] 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물 내 $CD27^+$, $CD28^+$, $CCR7^+$, $CD45RA^-$, $CD45RO^+$, $CD62L^+$, $CD3^+$, $CD95^+$, 그랜자임 B-, 및/또는 $CD127^+$ 인 세포의 평균 백분율;
- [0964] 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물 내 $CCR7^+/CD45RA^-$ 또는 $CCR7^+/CD45RO^+$ 인 세포의 평균 백분율;
- [0965] 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물의 상기 조작된 $CD4^+$ T 세포, 선택적으로 $CAR+CD4^+$ T 세포 내 중심 기억 $CD4^+$ T 세포의 평균 백분율;
- [0966] 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물의 상기 조작된 $CD8^+$ T 세포, 선택적으로 $CAR+CD8^+$ T 세포 내 중심 기억 $CD8^+$ T 세포의 평균 백분율; 및/또는

- [0967] 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인, 상기 복수의 산출 조성물의 상기 조작된 T 세포, 선택적으로 CAR+ T 세포 내 중심 기억 T 세포, 선택적으로 CD4+ 중심 기억 T 세포 및 CD8+ 중심 기억 T 세포의 평균 백분율에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0968] 171. 구현예 170에 있어서, 상기 투여되는 조성물은, 미리 정해진 특징, 선택적으로 산출 조성물에서 CAR을 발현하는 세포의 임계 수,를 복수의 상이한 개별 대상체 중에 수행되는 상기 인간 생물학적 샘플들의 적어도 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 97%, 약 99%, 약 100%, 또는 100%에서 나타내는 산출 조성물을 생산하는 제조 공정에 의해 생산되는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0969] 172. 구현예 158 내지 171 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작된 세포를 포함하는 상기 조성물은 상기 제조 공정으로부터 유래된 잔류 비드를 함유하지 않는 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0970] 173. 구현예 1 내지 172 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포 NHL은 재발성 및/또는 불응성 B 세포 비호지킨 림프종(B 세포 NHL)인 것을 특징으로 하는, 방법.
- [0971] 174. CD19를 표적화하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 유전자 조작된 세포를 포함하는 조성물, 및 구현예 1 내지 173 중 어느 하나의 방법에 따라 상기 세포의 조성물을 투여하기 위한 설명서를 포함하는, 제품.
- [0972] **VI. 실시예**
- [0973] 하기 실시예들은 예시적인 목적으로만 포함되며 본 발명의 범위를 한정하려는 의도가 있는 것은 아니다.
- [0974] **실시예 1: 비증폭 공정을 사용하여 생성된 CAR+ T 세포를 함유하는 T 세포 조성물.**
- [0975] 항-CD19 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 T 세포를 함유하는 1차 T 세포의 조작된 조성물을, 바이러스 벡터로 형질도입하기 전에 T 세포를 활성화시키기 위해 항-CD3/항-CD28 Fab 접합된 올리고머성 시약으로 구성된 자극 시약을 이용하지만 형질도입된 세포의 증폭을 위한 후속 단계를 포함하지 않는 공정에 의해 생산하였다. 비증폭 공정 A 및 비증폭 공정 B로 표기되는 2개의 유사한 비증폭 공정을 사용하여 CAR+ T 세포 조성물을 생성하였다. 비증폭 공정은 육성 단계의 시작과 비교하여 육성 단계의 끝에서 생존 세포의 총 수를 증가(예를 들어, 증폭)시키기 위한 목적으로 형질도입 후 육성 단계를 포함하지 않았다. 인큐베이션 조건이 세포 집단을 증폭시키기 위해 수행되지 않았지만, 수확된 조성물은 인큐베이션의 시작과 비교하여 증폭을 겪었거나 세포 수의 증가를 나타낼 수 있다. 비교를 위해, 동일한 공여체 유래의 T 세포를 형질도입 후 증폭을 위해 세포를 육성하는 공정에 의해 조작하였다. 생성된 CD19-표적화된 CAR 치료용 T 세포 조성물을 표현형 및 활성에 대해 평가하였다.
- [0976] 모든 공정은 동일한 CD19-표적화된 CAR로 T 세포를 조작하는 것을 포함한다. 상기 CAR은 항-CD19 scFv, 면역글로불린 유래 스페이스, CD28로부터 유래된 막관통 도메인, 4-1BB로부터 유래된 공자극 영역, 및 CD3-제타 세포 내 신호전달 도메인을 함유하였다. 상기 바이러스 벡터는 또한, T2A 리보솜 스킵 서열에 의해 CAR 서열로부터 분리된, CAR 발현에 대한 대리 표지자 기능을 하는 절단형 수용체를 암호화하는 서열을 함유하였다.
- [0977] **A. CD19-표적화된 CAR T 세포 조성물의 생성.**
- [0978] 비증폭 공정 A에서, 백혈구 성분채집술 샘플들을 인간 공여체들로부터 채집하고, 세척하고, CD4+ 및 CD8+ T 세포 조성물에 대한 면역 친화도-기반 선택을 거쳤다. 선택 후, 별개의 CD4+ 및 CD8+ T 세포 조성물을 극저온 동결시킨 후, 해동시키고, 생존 CD4+ T 세포 대 생존 CD8+ T 세포(약 300×10^6 개 CD4+ 및 300×10^6 개 CD8+ 세포)를 대략 1:1의 비로 혼합한 후, 재조합 IL-2(100 IU/mL), 재조합 IL-7(600 IU/mL) 및 재조합 IL-15(100 IU/mL)를 함유하는 무혈청 완전 배지 중에서 항-CD3/항-CD28 Fab 접합된 올리고머성 스트렙타비딘 뮤테인 시약과 함께 18 내지 30시간 동안 인큐베이션함으로써 자극하였다. 자극 후, 세포를 항-CD19 CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 회전 접종에 의해 형질도입시켰다. 회전 접종 후, 세포를 세척하고, 재조합 사이토카인의 첨가 없이 기본 무혈청 배지에 재현탁시키고, 인큐베이터에서 약 37.0° C에서 인큐베이션하였다. 이후, 자극의 개시 후 약 48시간 후에, D-비오틴을 첨가하고 세포와 함께 혼합하여 올리고머성 스트렙타비딘 시약으로부터 항-CD3 및 항-CD28 Fab 시약을 해리시켰다. 세포를 48시간 동안(자극 개시 후 약 4일까지) 더 인큐베이션한 후, 동결보호제로 제형화하였다.
- [0979] 비증폭 공정 B에서, 백혈구 성분채집술 샘플들을 인간 공여체들로부터 채집하고, 세척하고, 냉동 보존하였다. 냉동 보존된 샘플들을 해동시킨 후, CD4+ 및 CD8+ 세포의 개별 조성물을 면역 친화도-기반 선택에 의해 각각의 샘플로부터 선택하였다. 선택한 CD4+ 및 CD8+ T 세포 조성물을 최대 900×10^6 개 총 생존 세포 CD4+ 및 CD8+ T

세포로 그리고 통상적으로 대략 1:1의 비로 혼합한 후, 재조합 IL-2(100 IU/mL), 재조합 IL-7(600 IU/mL) 및 재조합 IL-15(100 IU/mL)를 함유하는 무혈청 완전 배지 중에서 항-CD3/항-CD28 Fab 접합된 올리고머성 스트랩타비딘 뮤테인 시약과 함께 16 내지 24시간 동안 자극 인큐베이션하였다. 자극 후, 세포를 항-CD19 CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 회전 접종에 의해 형질도입시켰다. 회전 접종 후, 세포를 세척하고, 재조합 사이토카인의 첨가 없이 기본 무혈청 배지에 재현탁시키고, 인큐베이터에서 약 37.0° C에서 인큐베이션하였다. 이후, 자극의 개시 후 약 48시간 후에, D-비오틴을 첨가하고 세포와 함께 혼합하여 올리고머성 스트랩타비딘 시약으로부터 항-CD3 및 항-CD28 Fab 시약을 해리시켰다. 세포를 48시간 동안(자극 개시 후 약 4일까지) 더 인큐베이션한 후, 동결보호제로 제형화하였다.

[0980] 증폭 공정에서, 동일한 항-CD19 CAR을 각각 발현하는 조작된 CD4+ T 세포 및 조작된 CD8+ T 세포를, 농축된 CD4+ 및 농축된 CD8+ 세포 집단을 개별적으로, 개별 선택, 냉동 보존, 자극, 형질도입, 증폭, 및 수확 단계를 포함하는 공정 단계들을 거치는 것을 포함하는 공정에 의해 생산하였다. 백혈구 성분채집술 샘플들을 인간 공여체들로부터 채집하고, 세척하고, CD4+ 및 CD8+ T 세포 조성물에 대한 면역 친화도-기반 선택을 거쳤다. 선택 후, 개별 CD4+ 및 CD8+ T 세포 조성물을 재조합 IL-2 및 재조합 IL-15(및 추가로 CD4+ T 세포 조성물을 위한 재조합 IL-7)를 함유하는 무혈청 완전 배지 중에서 항-CD3/항-CD28 상자성 비드로 활성화시킨 다음, 항-CD19 CAR을 암호화하는 벡터를 사용하여 렌티바이러스 형질도입을 개별적으로 거쳤다. 상자성 비드를 제거한 후, 형질도입된 집단을 재조합 IL-2 및 재조합 IL-14(및 추가로 CD4+ T 세포 조성물을 위한 재조합 IL-7)의 존재 하에 개별적으로 인큐베이션하고, 세포 증폭을 위해, 예컨대 증폭 개시로부터 9일 내지 13일에 증폭 임계값에 도달할 때까지 요동 운동 생물반응기에서 육성하였다. 이어서 세포를 개별적으로 수확하고, 제형화하고, 극저온 동결하였다.

[0981] **B. 조작된 T 세포 조성물의 순도.**

[0982] 도 1에 도시된 바와 같이, 비증폭 조작 공정들로부터 생산된 T 세포 조성물을 CD3, NK 세포 표지자, 및 CD19를 포함하는 표면 표지자를 인식하는 항체로 염색하고, 유세포 분석으로 정량화하였다. 모의 형질도입된 T 세포 조성물을 생성하고, 대조군으로서 사용하였다. 비증폭 공정을 사용하여 생성된 세포 조성물은 일반적으로 높은 백분율(>96%)의 CD3+ T 세포를 나타냈고, NK 세포 및 CD19+ 세포의 백분율은 낮았다.

[0983] **C. CD4/CD8 빈도 및 CD4/CD8 비.**

[0984] 도 2 및 도 3에 도시된 바와 같이, 증폭 및 비증폭 조작 공정들로부터 생산된 T 세포 조성물을 CD3, CD4, 및 CD8를 포함하는 표면 표지자를 인식하는 항체로 염색하고, 유세포 분석으로 정량화하였다. 모의 형질도입된 T 세포 조성물을 생성하고, 대조군으로서 사용하였다. 증폭 공정은 개별 CD4 및 CD8 조성물을 생성하였기 때문에, CD4+ 또는 CD8+ T 세포 각각은 이 공정에 의해 생성된 각각의 조성물 중에 ~100%로 존재하였다.

[0985] **D. 세포 생존력.**

[0986] 비증폭 조작 공정들로부터 생산된 T 세포 조성물을, 세포 건강의 척도로서 아넥신 V 또는 활성화된 카스파제 3(aCas3)으로의 표면 염색 및 CD3을 포함하는 표면 표지자를 인식하는 항체로 표면 염색과 같이, 세포자멸사를 나타내는 인자의 발현에 대해 염색하였다. 도 4는 모의 형질도입된 T 세포 조성물과 비교하여 비증폭 조작 공정들로부터 생산된 세포 조성물의 CD3+ 세포 중 aCas3+ 세포의 백분율을 도시한다.

[0987] **E. CAR의 벡터 카피수 및 표면 발현.**

[0988] 본 실시예에 기재된 바와 같이 본질적으로 비증폭 및 증폭 조작 공정으로부터 생성된 T 세포 조성물을, 표준 벡터 카피수(VCN) 분석법 및 펄스 필드 겔 전기영동(PFGE)에 의한 고분자량 및 저분자량 DNA 종의 분리를 포함하는 통합 벡터 카피수(iVCN) 분석법을 사용하여 분석하였다. VCN 및 iVCN 분석법에 의해 측정된 CAR의 벡터 카피수는 또한 CAR의 표면 발현과 상관관계가 있었다. VCN 및 iVCN 분석법을 위한 예시적인 방법 및 조성물은 문헌 [PCT/US2019/046048]에 개시되며, 이는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0989] 구체적으로, 게놈 DNA를 세포로부터 제조하고, (1) 자동 PFGE (예를 들어, PippinHT (Sage Science, Beverly, MA) 디바이스)에 의해 분리가 수행되는, 15kb의 임계값 미만의 저분자량 비염색체 종으로부터 >15kb 더 높은 분자량 DNA 종의 분리에 대한 임계값을 사용하는 iVCN 방법(“iVCN”), 또는 (2) 게놈 DNA가 PFGE에 의해 먼저 분리되지 않는 표준 VCN 방법(“VCN”) 중 어느 하나에 의한 전이 유전자 서열 카피수의 평가를 진행하였다. 두 분석법에서, 전이 유전자 카피수를 전이 유전자에 고유한 서열에 특이적인 프라이머(예를 들어, 재조합 단백질의 조절 요소에 특이적인 프라이머)를 사용하는 ddPCR에 의해 측정하였고, 기준 유전자(예를 들어, 알부민(ALB)

유전자)에 특이적인 프라이머를 사용하여 측정되는 2배체 계놈으로 정규화하였다.

[0990] 결과는 VCN 분석법을 사용하여 평가된 전이 유전자 카피수는 iVCN에 의해 평가된 전이 유전자 카피수와 일반적으로 상관관계가 있다는 것을 보여주었다(도 5a). 하지만, 비증폭 공정을 사용해 제조된 세포의 경우, VCN에 의해 수득된 값이, 비증폭 공정을 사용하여 생성된 세포를 함유한 샘플에 존재할 수 있는 통합되지 않은 전이 유전자 서열을 검출하는 VCN 분석법과 일치하는, iVCN에 의해 수득된 값보다 더 높았다. 이와는 대조적으로, 증폭 공정을 사용하여 제조된 세포의 경우, VCN과 iVCN에 의해 수득된 값이 거의 동일하였다(VCN = iVCN 선 근처). 이 차이들은 증폭 공정과 비교하여 더 짧은 비증폭 공정에서 샘플 내 더 많은 양의 유리된 통합되지 않은 전이 유전자 서열 카피의 존재 때문일 가능성이 있다. 이 결과들은 고분자량 및 저분자량 DNA 모두를 검출할 수 있는 표준 VCN 분석법이, 특히 유리된 통합되지 않은 전이 유전자 서열 카피가 여전히 샘플 내에 존재할 수 있는, 전이 유전자 도입 후 초기에 세포를 평가하는 데 사용할 때, iVCN 분석법과 비교하여 한계가 있다는 관찰과 일치한다.

[0991] CAR의 표면 발현에 대한 iVCN 또는 VCN 분석법의 상관관계 정도를 평가하기 위해, 비증폭 또는 증폭 공정으로부터 얻은 세포 샘플을 CD3, CD45 및 CAR의 발현에 대해 유세포 분석에 의해 평가하여 생존 CD45+ 세포 중에 CD3+CAR+ 세포의 백분율을 측정하였다. 도 5b에 도시된 바와 같이, VCN 분석법은 비증폭 공정에 의한 것보다 증폭 공정에 의해 조작된 샘플에 대한 CAR+ 세포의 백분율에 더 나은 상관관계를 보였으며, 이는 표면 CAR 발현에 기여하지 않은 통합되지 않은 CAR DNA 서열의 존재 때문일 가능성이 있다. 도 5c에 도시된 바와 같이, iVCN은 비증폭 또는 증폭 공정에 의해 조작된 세포들 중에서 CAR의 발현에 대해 비슷한 상관관계를 보였다. 모든 샘플에 대해, CAR 발현과 세포 당 카피수의 상관관계는 VCN 분석법($R^2 = 0.5903$)에 의해 측정된 바와 같은 세포 당 카피수와 비교하여 iVCN 분석법($R^2 = 0.8952$)에 의한 것이 더 높았다.

[0992] F. T 세포 조성물의 기억 프로파일.

[0993] 증폭 및 비증폭 조작 공정들로부터 생산된 T 세포 조성물을 활성화된 카스파제 3(aCas3)에 대해 그리고 CD4, CD8, CCR7, CD27 및 CD45RA를 포함하는 표면 표지자를 인식하는 항체로 염색하였다. 나이브/나이브-유사 T 세포(CD45RA+CCR7+), 중심 기억(CD45RA-CCR7+), 효과기 기억(CD45RA-CCR7-; T_E+EM) 및 효과기 기억 CD45RA+ 세포(CCR7-CD45RA+; T_{EMRA})를 나타낸 T 세포의 백분율을 측정하였다. 도 6a에 도시된 바와 같이, 조작된 조성물은 중심 기억/나이브-유사 T 세포가 농축된다.

[0994] CCR7 및 CD27 염색 모두에 대해 양성인 aCas- T 세포 중에서 CD4+CAR+ 및 CD8+CAR+ T 세포의 백분율이 도 6b에 도시된다. 도시된 바와 같이, 조작된 조성물은 CCR7+CD27+ 세포에 대해 농축된다.

[0995] 이러한 결과들은 비증폭 공정으로부터 생성된 조작된 세포 조성물이 증폭 공정으로부터 생성된 세포 조성물보다 덜 분화된 나이브-유사 표현형을 갖는 세포를 더 많은 비율로 갖는다는 것을 뒷받침한다.

[0996] 실시예 2: 비증폭 공정을 사용하여 생성된 T 세포 조성물의 시험관 내 활성화.

[0997] 항-CD19 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 T 세포를 함유하는 1차 T 세포의 조작된 T 세포 조성물들을 조작된 T 세포를 제조하기 위한 비증폭 및 증폭 공정을 사용하여 매칭된 공여체들로부터 생산하고, 세포 조성물들의 속성을 비교하였다.

[0998] 1명의 건강한 공여체 및 비호지킨 림프종(NHL)이 있는 3명의 환자(2명의 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL)이 있는 환자; 및 1명의 외투 세포 림프종(MCL)이 있는 환자)로부터 백혈구 성분채집술 샘플을 채집하고, 제조 실행을 수행하여 실시예 1의 공정 A에 실질적으로 기재된 바와 같은 비증폭 공정을 사용하여 항-CD19 CAR을 갖는 T 세포를 조작하였다. 조작된 T 세포 조성물을 실시예 1에 기재된 바와 같은 증폭 공정을 사용하여 공여체-매칭된 공정 실행으로부터 생산된 T 세포 조성물과 비교하였다. 상기 항-CD19 CAR은 항-CD19 scFv, 면역글로불린 유래 스페이스, CD28로부터 유래된 막관통 도메인, 4-1BB로부터 유래된 공자극 영역, 및 CD3-제타 세포내 신호전달 도메인을 함유하였다. 상기 바이러스 벡터는 또한, T2A 리보솜 스킵 서열에 의해 CAR 서열로부터 분리된, CAR 발현에 대한 대리 표지자 기능을 하는 절단형 수용체를 암호화하는 서열을 함유하였다.

[0999] 1) 기억 프로파일.

[1000] 비증폭 및 증폭 공정에 의해 매칭된 공여체들로부터 생성된 조작된 T 세포 조성물의 세포를 항-CD19 CAR에 대한 작용성 항-이디오타입 항체와 접합된 마이크로비드의 존재 하에 9 내지 14일 동안 연속 인큐베이션하여 CAR-의 존성 자극을 제공하는 것을 포함하는 장기간 자극 분석법으로 분석하였다. 이 분석법은 투여 시에 생체 내에서

일어날 수 있는 바와 같이 항원에 장기간 노출 시에 생존하는 세포의 적합성 및 능력을 모방한다. 구체적으로, 세포를, CD4, CD8, CCR7, CD27, CD45RA를 포함하는 표면 표지자, 및 CAR(대리 표지자+ 또는 항-이디오타입+)에 대해, 장기간 CAR-의존적 자극(1차) 전 및 장기간 CAR-의존적 자극(2차) 후에 유세포 분석에 의해 평가하였다. 세포를 CAR 발현에 대해 이중-양성인 살아있는 CD3+ 세포 상에서 게이팅하였다. 이어서, CAR+ 세포를 기억 아형 분류(memory subtyping) 전에 CD4+(도 7a 및 도 7c) 또는 CD8+(도 7b 및 도 7d) 세포로서 게이팅하였다.

[1001] CAR-특이적 자극(1차) 전에, 비증폭 공정을 사용하여 생성된 세포 조성물은 증폭 공정을 사용하여 생성된 세포 조성물과 비교하여 나이브-유사 및 중심 기억 T 세포의 더 높은 비율 및 효과기 기억 아형의 더 낮은 비율을 나타내었다(도 7a 및 도 7b). 비증폭 공정 사용하여 생성된 조성물은 증폭 공정을 사용하여 생성된 조성물과 비교하여 더 높은 비율의 초기의 덜 분화된 CD4+ 및 CD8+ CAR T 세포, 더 낮은 비율의 중간-분화된 CD4+ 및 CD8+ CAR T 세포, 및 더 낮은 비율의 후기의 더 분화된 CD4+ CAR T 세포를 가졌다(도 7c 및 도 7d).

[1002] 만성 CAR-특이적 자극(2차) 후, 비증폭 공정 및 증폭 공정으로부터 생성된 조성물 둘 모두는 증폭 후 덜-분화된 나이브-유사(예를 들어, CD45RA+CCR7+), 중심 기억(예를 들어, CD45RA-CCR7+), 또는 초기(CD27+CCR7+) 세포가 더 적게 존재한다는 점에서 더 분화되었다(도 7a-7d). 비증폭 공정으로부터 생성된 조성물은 증폭 공정으로부터 생성된 조성물과 비교하여, 생체내 2차 림프 조직으로의 트래피킹에 관여하고 기능 연장에 대한 가능성을 시사할 수 있는 케모카인 수용체(CCR7)의 보다 우수한 보유를 포함하여 자극 후 덜-분화된 기억 아형의 보존을 나타냈다.

[1003] **2) 증식 능력.**

[1004] 10일 동안 상기 기재된 바와 같은 항-CD19 CAR에 특이적인 항-ID 항체로 장기 CAR-의존적 자극 후 증식 능력을 평가하였다. 장기 자극 후, 조성물 중의 살아있는 세포를 분석하였다. 도 8a-8f에 도시된 바와 같이, 항-CD19 비증폭된 세포 생성물의 세포는 공여체-매칭된 증폭된 세포 생성물에서 조작된 세포와 비교하여 실질적으로 증진된 증식 능력(2 내지 7.4배)을 나타냈다. 이 결과들은 비증폭된 세포 생성물이 중심 기억 및 줄기세포 기억 T 세포와 유사한 특성을 유지하는 세포를 포함하여, 보다 높은 상대적 비율의 덜 분화된 T 세포를 함유하고, 따라서 CAR을 통한 신호전달에 반응하여 추가의 분화 라운드를 겪는 능력을 갖는다는 관찰과 일치한다.

[1005] **3) 세포 용해 활성.**

[1006] 세포 용해 잠재력의 평가를 위해, 비증폭 또는 증폭 공정에서 상기 기재된 바와 같이 조작된 항-CD19 CAR T 세포를 CAR에 특이적인 항-ID 항체로 10 내지 14일 동안 자극하고, 증폭 데이터를 10일에 걸쳐 관찰된 증식에 기초하여 요약하였다. CD19를 발현하도록 형질도입된 K562 세포(K562-CD19)를 현미경 검사법에 의한 추적을 허용하도록 NucLight Red(NLR)로 표지하였다. 장기간 자극 전 또는 후에 비증폭 또는 증폭 공정으로부터 조작된 CAR-T 세포 조성물을 K562-CD19와 낮은 효과기 대 표적 세포(E:T) 비 0.5:1로 공동 배양하였다. 적색 형광 신호(Essen Bioscience의 IncuCyte® Live Cell Analysis System 사용)에 의해 결정된 바와 같이 약 96시간 동안의 기간에 걸쳐 생존 표적 세포의 손실을 측정하여 세포 용해 활성을 평가하였다. 데이터를 개별 공여체/공정별 또는 제조 공정별 비교를 위해 곡선 하 면적(AUC)으로 변환하였다.

[1007] 제조 직후 및 만성 자극 전(도 9a), 비증폭 공정을 사용하여 생성된 조작된 CAR-T 세포 조성물은 증폭 공정을 사용하여 생성된 T 세포 조성물과 비교하여 더 우수하거나 유사한 세포 용해 활성을 나타냈다. 그러나, 만성 자극 분석법에서 증폭 후(도 9b), 비증폭 공정을 사용하여 생성된 조성물은 증폭 공정을 사용하여 생성된 조성물(만-휘트니 시험; * $p < 0.05$)과 비교하여, 낮은 효과기 대 표적 비(0.5:1)에서 기능적 세포 용해 활성을 유지하는 능력을 더 우수하게 나타냈다.

[1008] **4) 사이토카인 생산.**

[1009] 사이토카인 생산의 평가를 위해, 비증폭 또는 증폭 공정에서 상기 기재된 바와 같이 조작된 항-CD19 CAR T 세포를 CAR에 특이적인 항-ID 항체로 9 내지 14일 동안 자극하였다. 장기간 자극 전 또는 후에 비증폭 또는 증폭 공정으로부터 조작된 CAR-T 세포 조성물을 플레이트-결합된 항-ID 상에서 5시간 동안 인큐베이션하고, 사이토카인 생산을 유세포 분석으로 측정하였다. CD4+CAR+ 및 CD8+CAR+ 세포에서 3개의 사이토카인(IL-2, IFN γ 및 TNF α)의 동시 생산에 기초한 다기능성 점수를 세포 당 기준으로 삼중-양성 세포의 불리언 로직 게이팅(Boolean logic gating)에 의해 결정하였다. 통계적 유의성을 만-휘트니, * $p < 0.05$ 로 평가하였다. 비증폭 공정으로부터 생성된 세포는 2차 항원 자극 후, 증폭 공정으로부터 생성된 세포보다 더 큰 다기능성을 나타냈다(도 10).

[1010] **실시예 3: 비증폭 공정을 사용하여 생성된 T 세포 조성물의 생체 내 항-종양 활성.**

[1011] 1) CD19+ Nalm-6 백혈병 모델.

[1012] 비증폭 및 증폭 매칭된-공여체 조작 공정으로부터 생성된 항-CD19 CAR-T 세포 조성물을 Nalm-6 급성 림프성 백혈병(ALL) 종양 모델에서 평가하였다. NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL-2rg^{tm1Wjl}/SzJ 마우스에 5.0×10^5 Nalm-6 반딧불이 루시페라아제-녹색 형광 단백질(FfLuc-GFP) 림프성 백혈병 세포를 정맥내 주사하고, 3일 후, 종양 부담의 균형을 맞추기 위해 마우스를 그룹으로 무작위 배정하였다. 이 모델은 CAR-T 세포를 투여하지 않은 마우스에서 마우스가 대략 24일 내지 26일까지 말기 질병에 도달하는 서서히 성장하는 종양 모델이다. 생착 후 4일째에, CAR-T 세포를 마우스에 정맥내 투여하였다. Nalm-6 FfLuc-양성 생체발광(BLI)을 이미지화하여 파종성 종양 성장을 평가하였다.

[1013] 도 11a는 증폭 조작 공정 공정으로부터 생성된 조작된 CAR-T 세포로 치료한 마우스에서, CAR-T 세포 주사 후 약 10일까지 종양 부담이 검출 가능하게 증가되었음을 보여준다. 그에 반해서, 종양 부담의 감소는 비증폭 조작 공정으로부터 생산된 CAR-T 세포로 치료한 마우스에서 약 15일까지 지속되었다. 이는 5일째와 20일째 사이에, 비증폭 공정으로부터 생산된 CD19 CAR-T 세포는 증폭 공정으로부터 생성된 세포와 비교하여 마우스에서 순환 CAR-T 세포의 감소를 보인다는 관찰에도 불구하고 그러했다(도 11b).

[1014] 2) CD19+ Raji 버킷 림프종 모델.

[1015] 비증폭 및 증폭 매칭된-공여체 조작 공정으로부터 생성된 항-CD19 CAR-T 세포 조성물을 Raji 버킷 림프종 모델에서 평가하였다. NOD.Cg-Prkdc^{scid} IL-2rg^{tm1Wjl}/SzJ 마우스에 5.0×10^5 Raji 반딧불이 루시페라아제-녹색 형광 단백질(FfLuc-GFP) 버킷 림프종 세포를 정맥내 주사하고, 6일 후, 종양 부담의 균형을 맞추기 위해 마우스를 그룹으로 무작위 배정하였다(그룹 당 n=8). 다음 날 (종양 생착 후 7일째), 마우스를 매개체 또는 항-CD19 키메라 항원 수용체(CAR) 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포로 마우스 당 1.0×10^6 개 세포의 고용량으로(도 12, 좌측 패널) 또는 2.5×10^5 개 세포의 저용량으로(도 12, 우측 패널) 정맥내로 치료하였다. 비증폭 공정 및 증폭 공정을 사용하여 1명의 건강한 공여체(HD1), 미만성 거대 B 세포 림프종(DP1, DP2)이 있는 2명의 환자, 또는 외투 세포 림프종(MP1)이 있는 1명의 환자로부터 T 세포를 사용하여 항-CD19 CAR T 세포를 생산하였다. 대조군 마우스는 치료를 받지 않았다(종양 단독). Raji FfLuc-양성 생체발광(BLI)을 이미지화하여 파종성 종양 성장을 평가하였다.

[1016] Raji 버킷 림프종 모델은 CAR-T 세포를 투여하지 않은 마우스에서 종양 생착 후 18일째 내지 20일째에 발생하는 뒷다리 마비를 특징으로 하는 말기 질환을 갖는 급속하게 성장하는 종양이다. 종양 생착 후 7일째에, CAR-T 치료가 제공되었을 때 마우스는 중간 정도의 종양 부담을 가졌다. 비증폭 공정을 사용하여 생성된 조성물로 치료한 마우스는 CAR-T 세포 투여 후 약 40일째에 최고 종양 역제가 발생하는 지연된 반응을 보였다(도 12a, 단계 1). 그에 반해서, 이 모델에서 전형적으로 준-치료적인 용량에서 증폭 공정을 사용하여 생성된 조성물로 한 치료는 50일 후 감소하기 시작하는 초기 항종양 효과를 초래하였다(도 12a, 단계 2). 순환 CAR-T 세포의 수는 치료 후 5일째에 증폭 공정을 사용하여 생성된 조성물로 치료한 마우스에서 더 높았다. 그러나, 5일째를 넘으면, 비증폭 공정을 사용하여 생성된 조성물로 치료한 마우스는 증폭 조성물과 비교하여 CAR-T 세포의 더 큰 증폭을 나타냈는데, 평균적으로 10 내지 15배 더 높은 증폭을 나타냈고, 일부 시점에서는 30배만큼 높은 증폭에 도달했다(도 12b).

[1017] 효과기 기억 표현형을 갖는 CAR-T 세포는 신속한 종양 제거를 매개할 수 있는 반면, 덜 분화된 나이브-유사 및 중심 기억 T 세포는 장기간 항종양 활성 및 기억 형성을 매개할 가능성이 있다(Gattinoni 등, Nat Med. 2017, 23(1):18-27; Klebanoff 등, Trends Immunol. 2005, 26(2):111-117). 비증폭 공정 조성물의 CAR-T 세포의 더 느린 초기 증폭 속도는 덜 분화된 표현형 및 가능하게는 지연된 증폭 동역학으로 인한 것일 수 있는 한편, 장기간 지속성에 기여한다. 치료시 더 높은 종양 부담 및 Raji 종양 모델의 공격적 성장 속도는 초기에 비증폭 공정 조성물의 CAR-T 세포의 효과기 세포로의 생체 내 분화를 증가하여, 항-종양 기능의 지연을 초래할 수 있다. 반대로, 치료시 더 낮은 종양 부담을 갖는 더 느리게 성장하는 Nalm-6 종양 모델에서, 비증폭 공정 조성물의 CAR-T 세포는 증폭 공정 조성물의 CAR-T 세포보다 더 큰 항-종양 효능을 보이는 경향을 가졌다. 종합하면, 이들 생체 내 데이터는 인간에서 향상된 항-종양 활성의 지표일 수 있는 비증폭 공정 조성물의 CAR-T 세포의 더 큰 증식 능력 및 효능과 일치한다.

[1018] 실시예 4: 재발성 또는 불응성 B-세포 비호지킨 림프종을 가진 대상체에 항-CD19 CAR-발현 세포의 투여.

[1019] CD4+ CAR-발현 T 세포 조성물 및 CD8+ CAR-발현 T 세포 조성물을 함유하는 항-CD19 CAR-발현 치료용 T 세포 조성물을 재발성 또는 불응성 B-세포 비호지킨 림프종(r/r B 세포 NHL)을 가진 대상체에 투여하였다.

- [1020] r/r B 세포 NHL이 있는 대상체는 조직학적으로 확인된 DLBCL NOS(달리 명시되지 않음), MYC와 BCL2 및/또는 BCL6 재배열을 갖고 DLBCL 조직 구조를 갖는 고등급 B 세포 림프종(HGBCL), 여포성(tFL) 또는 변연부 림프종(tMZL)으로부터 형질전환된 DLBCL, 원발성 종격동 B 세포 림프종(PMBCL), 또는 FL 등급 3b(FL3B)를 가진 대상체를 포함하여 등록되었다. 대상체는 적어도 1종의 안트라사이클린 및 리톡시맵(또는 다른 항-CD20 단클론 항체)을 포함하는 적어도 2 라인의 전신 요법 후 재발성 및/또는 불응성 질환을 가졌고/거나, 대상체는 자가 줄기세포 이식(ASCT) 치료에 실패한 재발성 및/또는 불응성 DLBCL을 가졌다.
- [1021] 투여된 항-CD19 CAR-발현 치료용 T 세포 조성물은 세포가 세포를 증폭(증식)시킬 목적의 육성 단계를 거치지 않은 공정에 의해 생성되었고, 이는 덜 분화된 높은 비율의 세포 유형을 함유하는 표현형 프로파일을 갖는 CAR T 세포 생성물을 생성하였다. 상기 공정은 치료될 개별 대상체 유래의 이전에 냉동 보존된 백혈구 성분채집술 샘플의 CD4+ 및 CD8+ 세포의 면역친화성-기반(예를 들어, 면역 자기성 선택) 농축을 포함하였다.
- [1022] 선택한 CD4+ 및 CD8+ T 세포 조성물을 최대 900×10^6 개 총 생존 세포 CD4+ 및 CD8+ T 세포로 그리고 통상적으로 대략 1:1의 비로 혼합한 후, 재조합 IL-2(100 IU/mL), 재조합 IL-7(600 IU/mL) 및 재조합 IL-15(100 IU/mL)를 함유하는 무혈청 완전 배지 중에서 항-CD3/항-CD28 Fab 접합된 올리고머성 스트랩타비딘 뮤테인 시약과 함께 16 내지 24시간 동안 자극 인큐베이션하였다. 자극 후, 세포를 항-CD19 CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 회전 접종에 의해 형질도입시켰다. 상기 CAR은 항-CD19 scFv, 면역글로불린 유래 스페이스, CD28로부터 유래된 막관통 도메인, 4-1BB로부터 유래된 공자극 영역, 및 CD3-제타 세포내 신호전달 도메인을 함유하였다. 상기 바이러스 벡터는 또한, T2A 리보솜 스킵 서열에 의해 CAR 서열로부터 분리된, CAR 발현에 대한 대리 표지자 기능을 하는 절단형 수용체를 암호화하는 서열을 함유하였다.
- [1023] 회전 접종 후, 세포를 세척하고, 재조합 사이토카인의 첨가 없이 기본 무혈청 배지에 재현탁시키고, 인큐베이터에서 약 37.0° C에서 인큐베이션하였다. 이후, 자극의 개시 후 약 48시간 후에, D-비오틴을 첨가하고 세포와 함께 혼합하여 올리고머성 스트랩타비딘 시약으로부터 항-CD3 및 항-CD28 Fab 시약을 해리시켰다. 세포를 48시간 동안(자극 개시 후 약 4일까지) 더 인큐베이션한 후, 동결보존제로 제형화하였다. 상기 공정은 형질도입된 세포의 증폭을 위한 후속 단계를 수반하지 않았고, 일반적으로 형질도입된 세포의 증폭을 수반하는 공정보다 더 짧았다. 상기 공정은, 80% 넘는 세포가 출발 샘플과 비교하여 및 형질도입된 세포를 증폭시키는 것을 목적으로 하는 육성 단계를 수반하는 제조 공정을 사용하여 생성된 세포 조성물과 비교하여, 중심 기억 표현형에 대해 농축된 CD4+CAR+ 및 CD8+CAR+ T 세포 둘 다를 함유하는 T 세포인, 세포 조성물을 생성하였다.
- [1024] CD4+CAR+ 및 CD8+CAR+ T 세포 둘 모두를 함유하는 냉동 보존된 세포 조성물을 정맥내 투여 전에 해동시켰다. CAR+ T 세포 주입 전에, 대상체는 3일 동안 신장 기능이 감소된 대상체를 위해 용량을 감소시켜 플루다라빈(flu, 30mg/m²/일) IV 및 시클로포스파미드(Cy, 300mg/m²/일) IV로 림프구 고갈 화학 요법을 받았다.
- [1025] 대상체는 림프구 고갈의 완료 후 2 내지 7일에 CAR 발현 T 세포를 받았다. 각 대상체에 10×10^6 개 총 CAR-발현 T 세포의 단일 용량을 투여하였다. 본 연구에서 대상체는 다음 용량 레벨들 중의 용량으로 투여받는 것으로 고려된다: 5×10^6 개 총 CAR+ T 세포, 10×10^6 개 총 CAR+ T 세포, 25×10^6 개 총 CAR+ T 세포, 50×10^6 개 총 CAR+ T 세포, 및 100×10^6 개 총 CAR+ T 세포. 각각의 용량은 CD3+CAR+ T 세포($\geq 80\%$ CD3+ 세포; $\geq 10\%$ CD3+CAR+ 세포)를 함유하였다.
- [1026] 치료 전 기준선에서 그리고 치료 후 여러 시점에 양전자 방사 단층 촬영(PET) 및/또는 컴퓨터 단층 촬영(CT) 및/또는 자기 공명 영상(MRI) 스캔에 의한 방사선 종양 평가에 기초하여(예를 들어, Lugano 분류법에 기초하여, 예를 들어 문헌[Cheson 등, (2014) JCO 32(27):3059-3067] 참조) 치료에 대한 반응을 평가하였다.
- [1027] 본 발명은 본 발명의 다양한 측면을 설명하기 위해, 예를 들어 제공되는 특정 개시된 구현예로 범위를 제한하려는 의도가 있는 것은 아니다. 기술된 조성물 및 방법에 대한 다양한 변형은 본원의 기재 및 가르침에서 명백해질 것이다. 상기 변형은 본 개시 내용의 진정한 범위와 정신에서 벗어나지 않고 실시될 수 있으며, 본 개시 내용의 범위에 속하도록 의도된다.

[1028] 서열

서열 번호	서열	설명
1	ESKYGPPCPPCP	스페이서 (IgG4힌지) (aa) 호모 사피엔스
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT	스페이서 (IgG4힌지) (nt) 호모 사피엔스
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLK	힌지-CH3 스페이서 호모 사피엔스
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQK SLSLGLK	힌지-CH2-CH3 스페이서 호모 사피엔스
5	RWPESPKAQASSVPTAQQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEK KKEKEKEEQEERETKTECPSTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATF TCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNGSQSQH SRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKL SLNLLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGF APARPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRT LLNASRSLEVSIVTDH	IgD-힌지-Fc 호모 사피엔스
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A 인공적

[1029]

7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHF KNCTSIISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLI QAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGOQFSLAVVSLNITSLGLRSL KEISDGDVVISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSC KATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGECVDKCNLL EGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYID GPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGC TGPGLGECPTNGPKIPSIATGMVGALLLLVVALGIGLFM	tEGFR 인공적
8	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (수탁 번호 P10747의 아미노산 153- 179) 호모 사피엔스
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPGPSKPFWVLVV GGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (수탁 번호 P10747의 아미노산 114- 179) 호모 사피엔스
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28 (P10747의 아미노산 180- 220) 호모 사피엔스
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS	CD28(LL이 GG로) 호모 사피엔스
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1의 아미노산 214- 255) 호모 사피엔스

[1030]

13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 제타 호모 사피엔스
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPE MGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGH DGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 제타 호모 사피엔스
15	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 제타 호모 사피엔스
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTISGDLHILPVAFRGDS FTHTPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRG RTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNLCYANTI NWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPE PRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLP QAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTL VWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPGPKIPSIATG MVGALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR 인공적
17	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A 인공적
18	GSATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	PGGG-(SGGGG)5-P- 여기서 P 는 프롤린, G 는 글리신 및 S 는 세린	링커
23	GSADDAKKDAAKKGKS	링커
24	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	링커

[1031]

25	gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgccagcctggcgaccg ggtgaccatcagctgccggccagccagacatcagcaagtacctaactggt atcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccggc tgacagcgccgctgccagccggtttagcggcagcggtccggcaccgactac agcctgacctctcaacctggaacaggaagatatgccacctacttttgcagca gggcaacacactgccctacaccttggcgccggaacaaagctggaatcaccg gcagcacctccggcagcggaagcctggcagcgccgagggcagcaccaagg gcgaggtgaagctgcaggaaagcgccctggcctggtggccccagccagag cctgagcgtgacctgcaccgtgagcggcgtgagcctgccgactacggcgtga gctggatccggcagccccaggaaggcctggaatggctggcgctgactctg gggcagcgagaccactactacaacagcgccctgaagagccggctgacctca tcaaggacaacagcaagagccaggtgttcctgaagatgaacagcctgcagacc gacgacaccccatctactactgcgccaagcactactactacggcgagctacg ccatggactactggggccagggcaccagcgtgaccgtgagcagc	scFv 를 암호화하는 서열
26	X ₁ PPX ₂ P X ₁ 은 글리신, 시스테인 또는 아르기닌이다 X ₂ 는 시스테인 또는 트레오닌이다	한지
27	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro	한지
28	Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro	한지
29	ELKTPLGDTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP EPKSCDTPPPCPRCP	한지
30	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro	한지
31	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	한지
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	한지
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	한지
34	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	한지
35	RASQDISKYN	CDR L1
36	SRLHSGV	CDR L2
37	GNTLPYTFG	CDR L3
38	DYGVS	CDR H1

[1032]

39	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
40	YAMDYWG	CDR H3
41	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGL EWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDT AIYYCAKHYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	VH
42	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWYQQKPDGTV KLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQG NTLPYTFGGGKLEIT	VL
43	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYNWYQQKPDGTV KLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQG NTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLV APSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETT YNSALKSRLTIKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYYCAKHYYG GSYAMDYWGQGTSTVTVSS	scFv
44	KASQNVGTNVA	CDR L1
45	SATYRNS	CDR L2
46	QQYNRYPYT	CDR L3
47	SYWMN	CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
49	KTISSVDFYFDY	CDR H3
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKRPGQ GLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLT SEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTSTVTVSS	VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQS PKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQ QYNRYPYTSGGGKLEIKR	VL
52	GGGGSGGGSGGGGS	링커

[1033]

53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQG GLEWIGQIYPGDGDTNNGKFKGQATLTADKSSSTAYMQLSGLT SEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGGQTTVTSSGGGGSGGGG SGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQ QKPGQSPKPLIYSATYRNSGVDPDRFTGSGSGDTFTLTITNVQSKD LADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	scFv
54	HYYYGGSYAMDY	CDR H3
55	HTSRLHS	CDR L2
56	QQGNTLPYT	CDR L3
57	ACACGGCCTCGTGTATTACTGT	IGH 프라이머
58	ACCTGAGGAGACGGTGACC	IGH 프라이머
59	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT YIGARG NAESRYVL TGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYV GGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	뮤테인 스트렙타비딘 Ile ⁴⁴ -Gly ⁴⁵ -Ala- 46-Arg ⁴⁷ 종: 스트렙토마이세 스 아비디니(Strept omyces avidinii)
60	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	항-CD3 항체 OKT3 의 가변 중쇄

[1034]

61	Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn	항-CD3 항체 OKT3 의 가변 경쇄
62	Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Thr Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Arg Asp Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Ala Leu Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val	항-CD28 항체 CD28.3 의 가변 중쇄
63	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	항-CD28 항체 CD28.3 의 가변 경쇄
64	SAWSHPQFEKGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	트윈-Strep-tag
65	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFR 알파 사슬 신호 서열
66	atgcttcctcgtgtgacaagcctctgctctgtgagttaccacccagcattcctcc tgatccca	GMCSFR 알파 사슬 신호 서열
67	MALPVTALLPLALLLHA	CD8 알파 신호 펩타이드

[1035]

68	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	스트렙타비딘 종: 스트렙토마이세스 아비디니(Streptomyces avidinii) UniProt 번호 P22629
69	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	미량의 스트렙타비딘 종: 스트렙토마이세스 아비디니(Streptomyces avidinii)
70	His-Pro-Gln-Phe	스트렙타비딘-결합 펩타이드
71	His-Pro-Xaa	스트렙타비딘-결합 펩타이드 Xaa 는 Gln, Asp, 및 Met 에서 선택된다

[1036]

72	Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa	스트렙타비딘-결합 펩타이드 Oaa 는 Trp, Lys 또는 Arg 이고; Xaa 는 임의의 아미노산이고; Yaa 는 Gly 또는 Glu 이고; Zaa 는 Gly, Lys 또는 Arg 이다
73	-Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-	스트렙타비딘-결합 펩타이드 Xaa 는 임의의 아미노산이고; Yaa 는 Gly 또는 Glu 이고; Zaa 는 Gly, Lys 또는 Arg 이다
74	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	스트렙타비딘-결합 펩타이드, Strep-tag®
75	WSHPQFEK	Strep-tag® II

[1037]

76	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa)n-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	스트렙타비딘-결합 펩타이드의 순차적 모듈들 Xaa 는 임의의 아미노산이고; n 은 8 또는 12 이다
77	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer)n-Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	스트렙타비딘-결합 펩타이드의 순차적 모듈들 n 은 2 또는 3 이다
78	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	트윈-Strep-tag
79	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	트윈-Strep-tag
80	WSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	트윈-Strep-tag
81	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	트윈-Strep-tag
82	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK	트윈-Strep-tag
83	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT V TAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNA HSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDT FTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	뮤테인 스트렙타비딘 Val44-Thr45-Ala46-Arg47 중: 스트렙토마이세스 아비디니(Streptomyces avidinii)

[1038]

84	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT VT ARGNAESRYVLT GRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVG GAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	뮤테인 스트렙타비딘 Val44-Thr45- Ala46-Arg47 종: 스트렙토마이세 스 아비디니(Strept omyces avidinii)
85	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT VT ARGNAESRYVL TGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYV GGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	뮤테인 스트렙타비딘 Val44-Thr45- Ala46-Arg47 종: 스트렙토마이세 스 아비디니(Strept omyces avidinii)
86	DPSKDSKAQVSAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT I G ARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNA HSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDT FTKVKPSAASIDAACKAGVNNGNPLDAVQQ	뮤테인 스트렙타비딘 Ile44-Gly45- Ala-46-Arg47 종: 스트렙토마이세 스 아비디니(Strept omyces avidinii)

[1039]

87	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT YIG ARGNAESRYVLTG RYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGG AEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	뮤테인 스트렙타비딘 Ile44-Gly45- Ala-46-Arg47 종: 스트렙토마이세 스 아비디니(Strept omyces avidinii)
88	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT V TARGNAESRYVLT GRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVG GAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	뮤테인 스트렙타비딘 Val44-Thr45- Ala46-Arg47 및 Glu117, Gly120, Try121 (뮤테인 m1-9) 종: 스트렙토마이세 스 아비디니(Strept omyces avidinii)

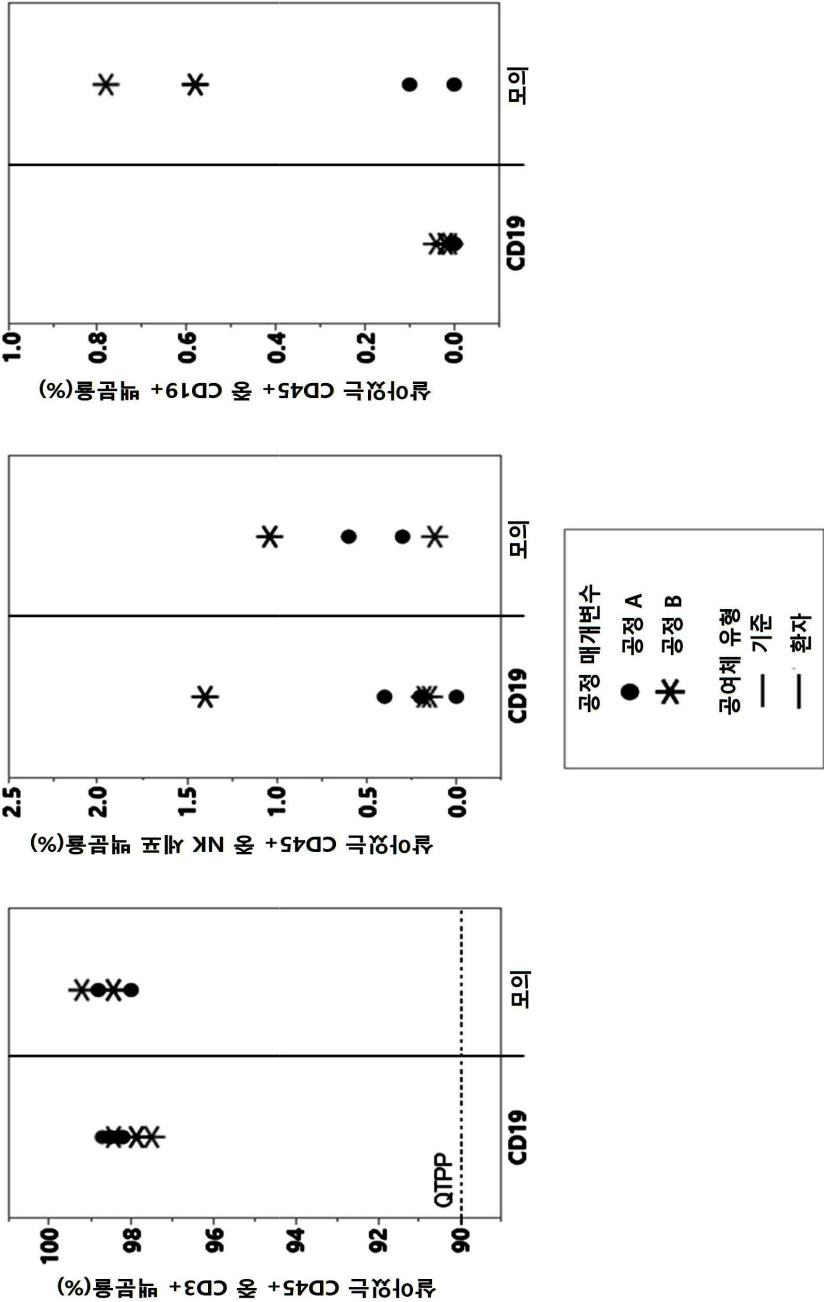
[1040]

89	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGT YV T ARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNA HSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTF TKVKPSAAS	뮤테인 스트렙타비딘 Val44-Thr45- Ala46-Arg47 및 Glu117, Gly120, Try121 (뮤테인 m1-9) 종: 스트렙토마이세 스 아비디니(Strept omyces avidinii)
90	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVL TGRYDSAPATDGS GTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYV GGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	미량의 스트렙타비딘 종: 스트렙토마이세 스 아비디니(Strept omyces avidinii)

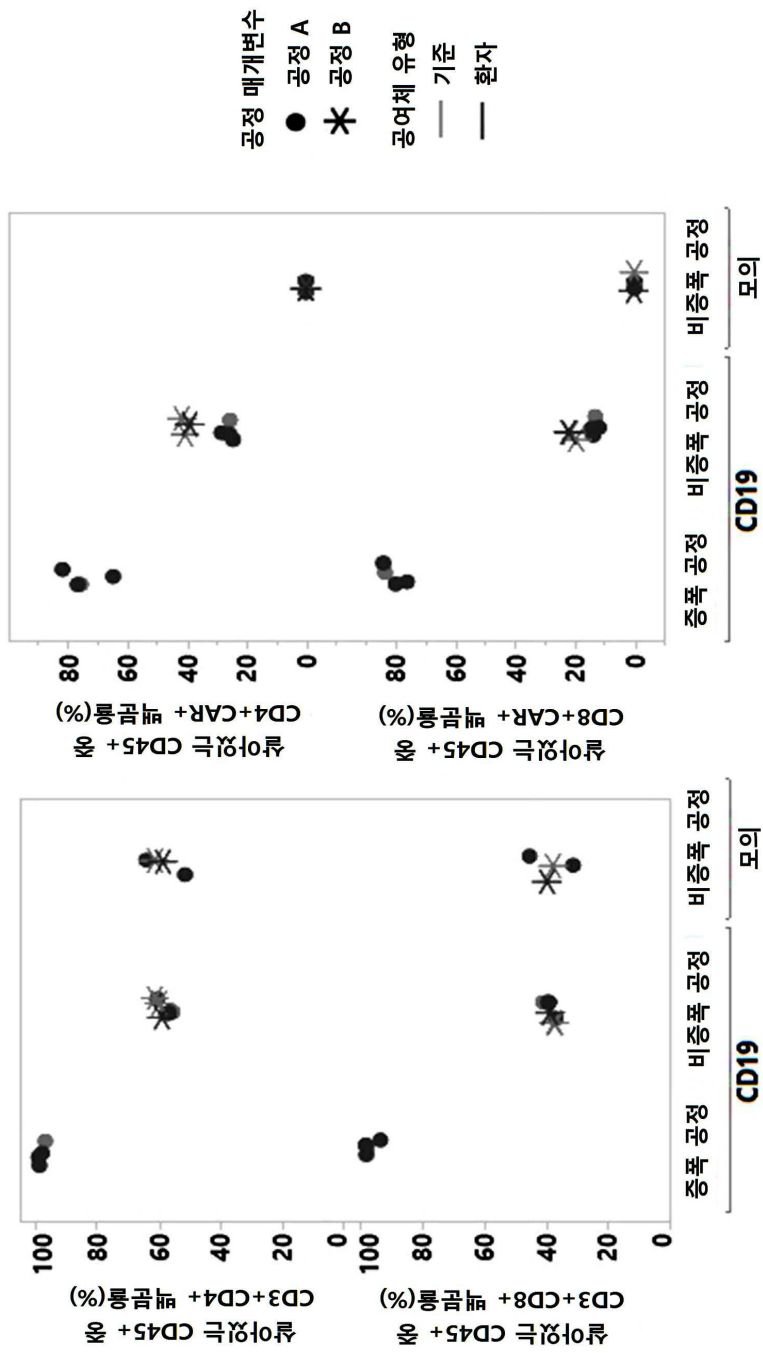
[1041]

도면

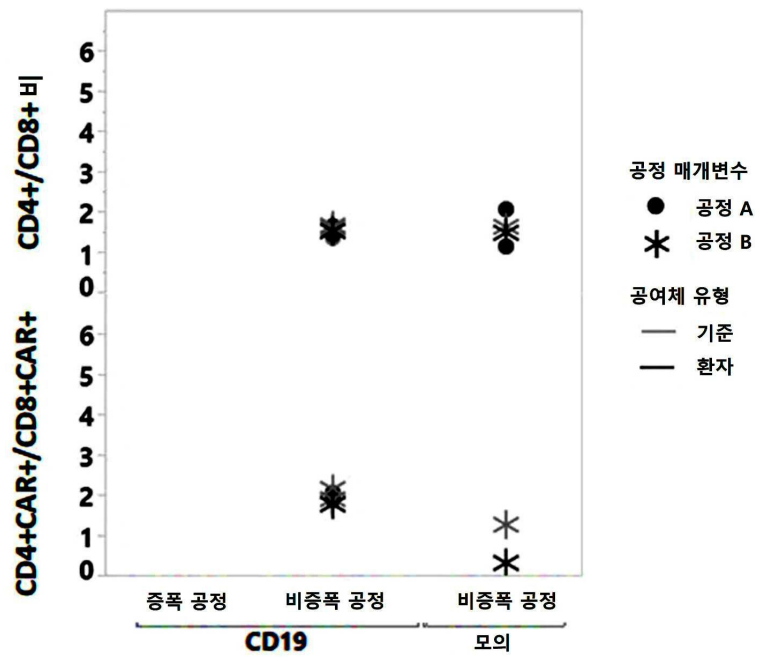
도면1



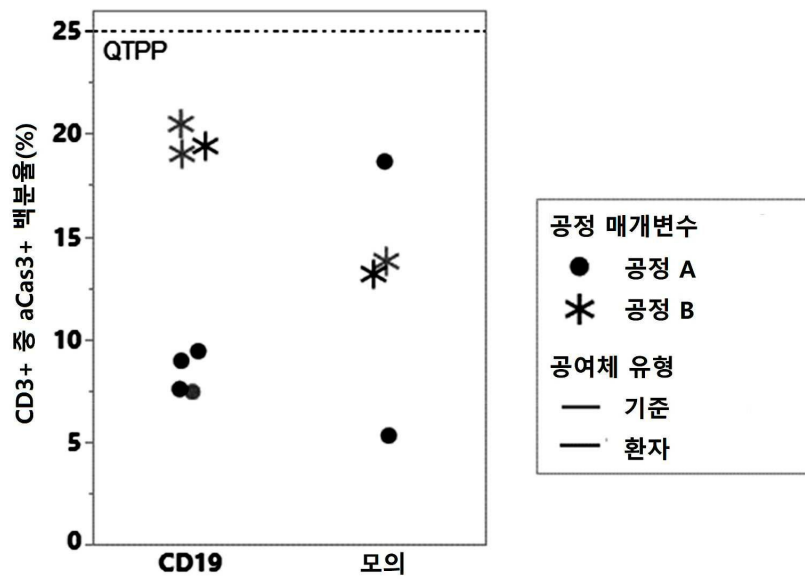
도면2



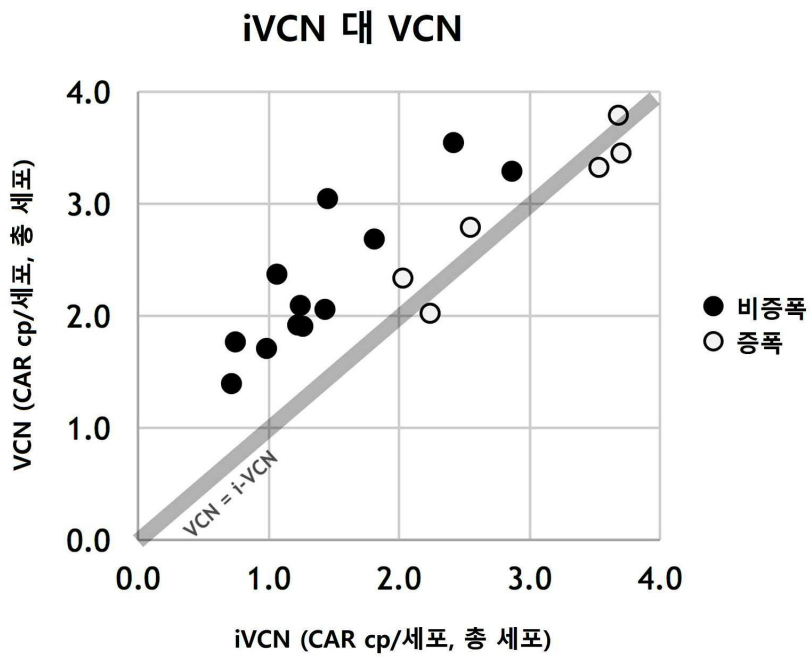
도면3



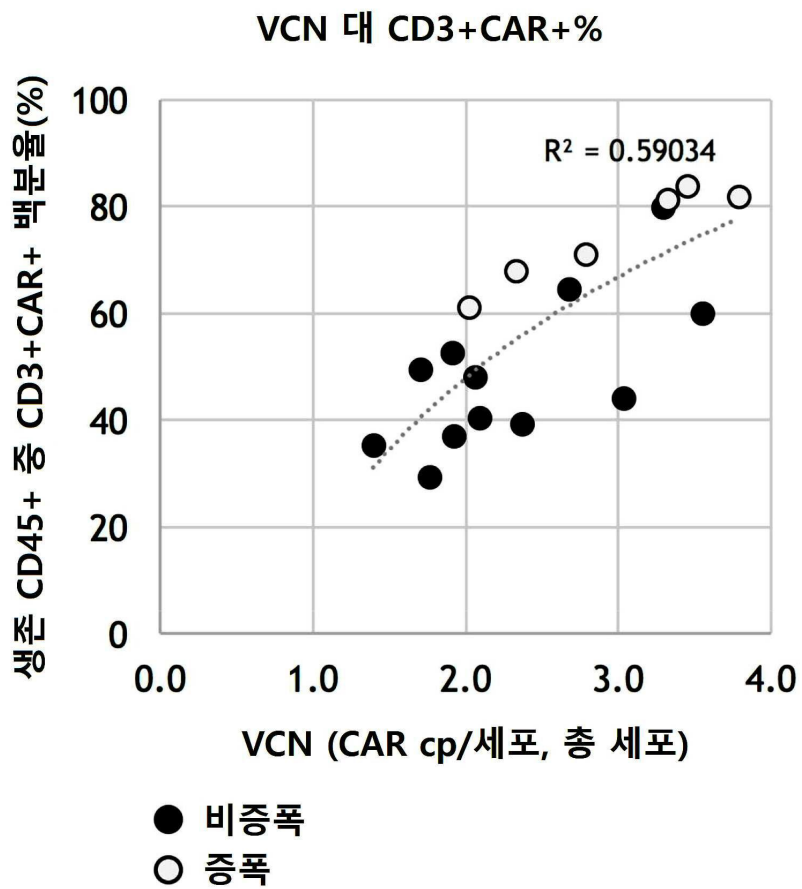
도면4



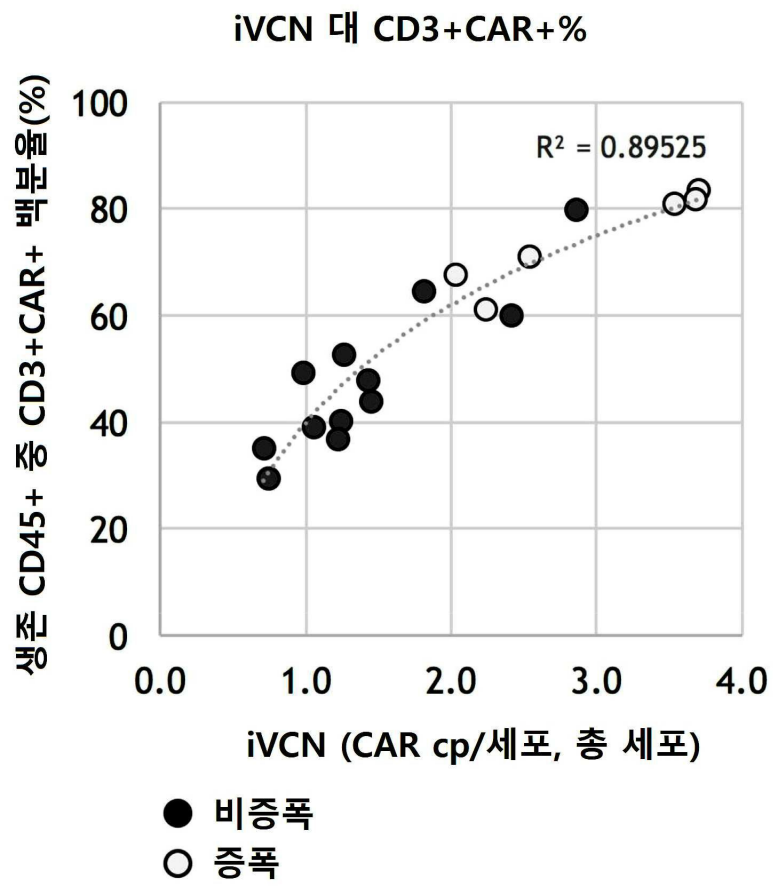
도면5a



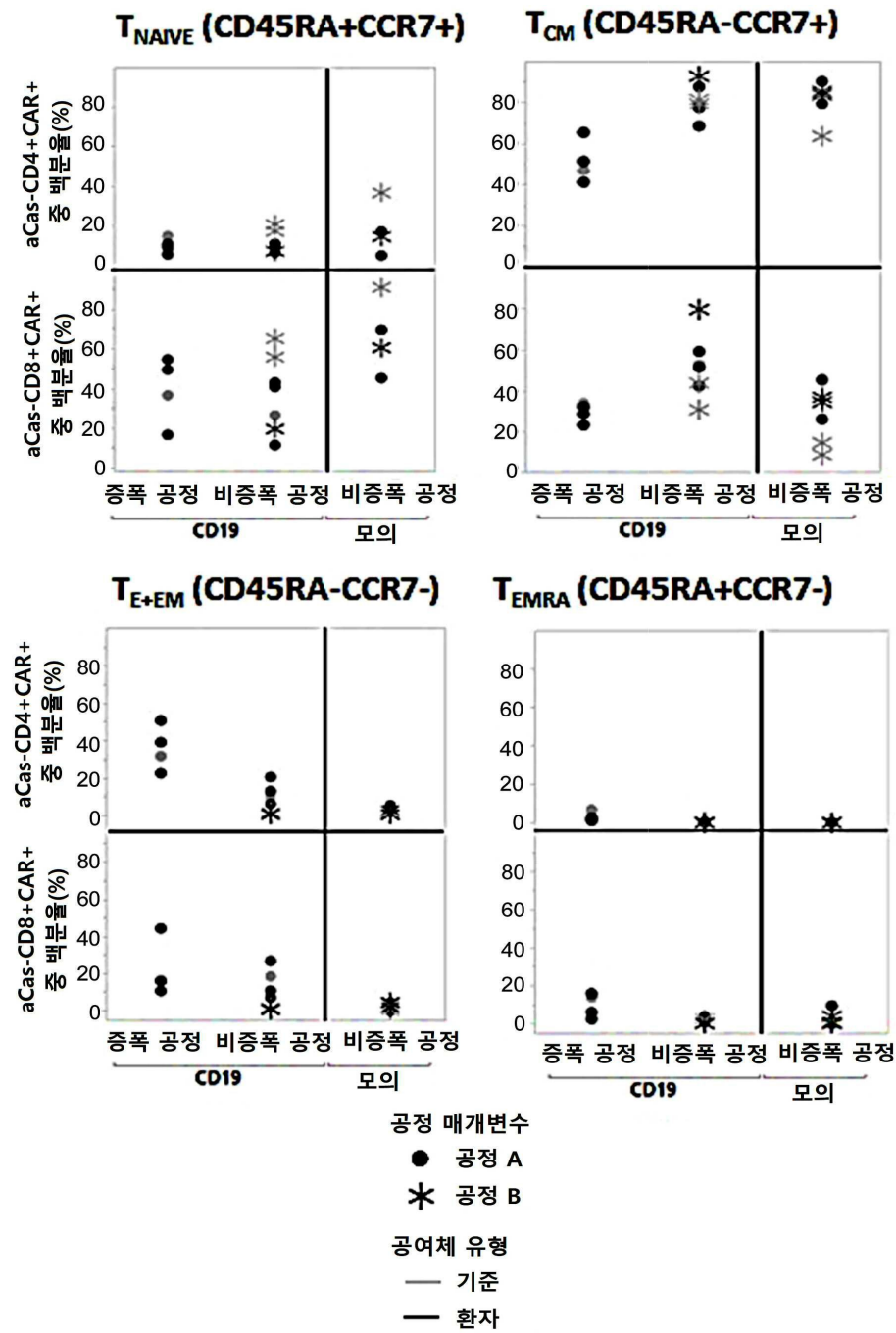
도면5b



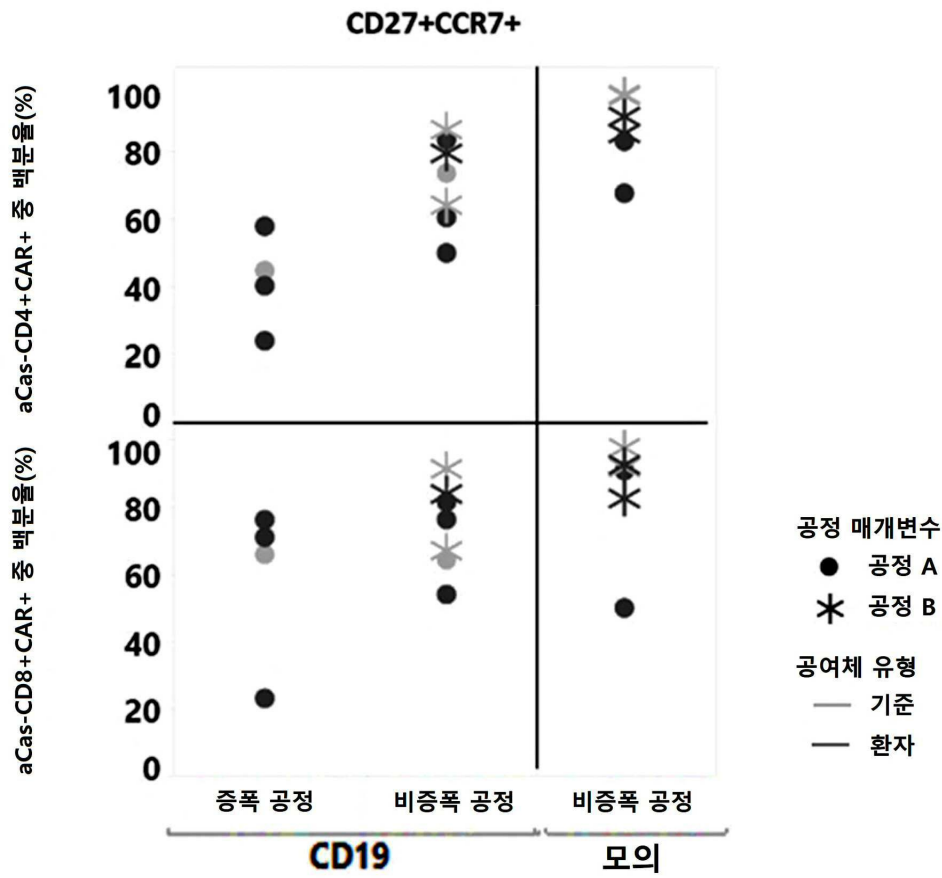
도면5c



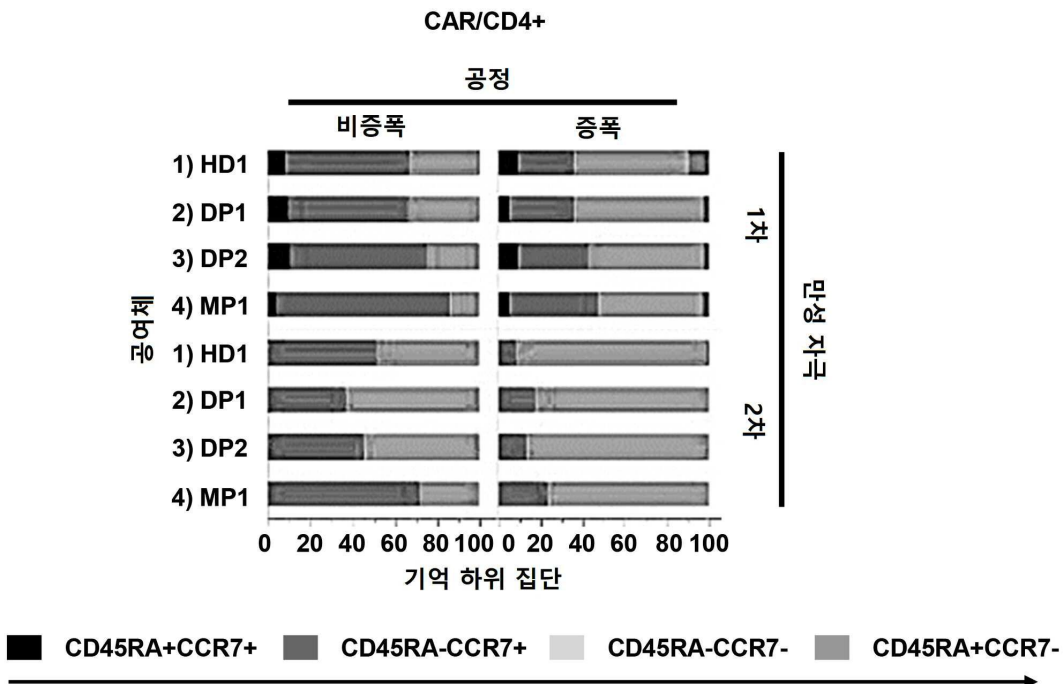
도면6a



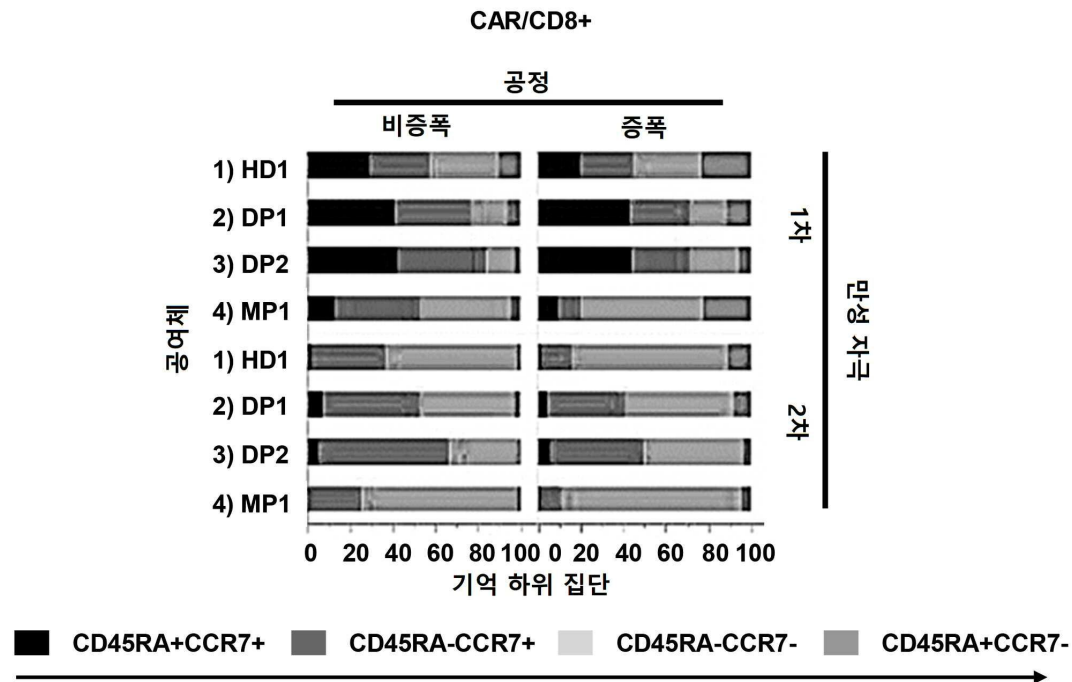
도면6b



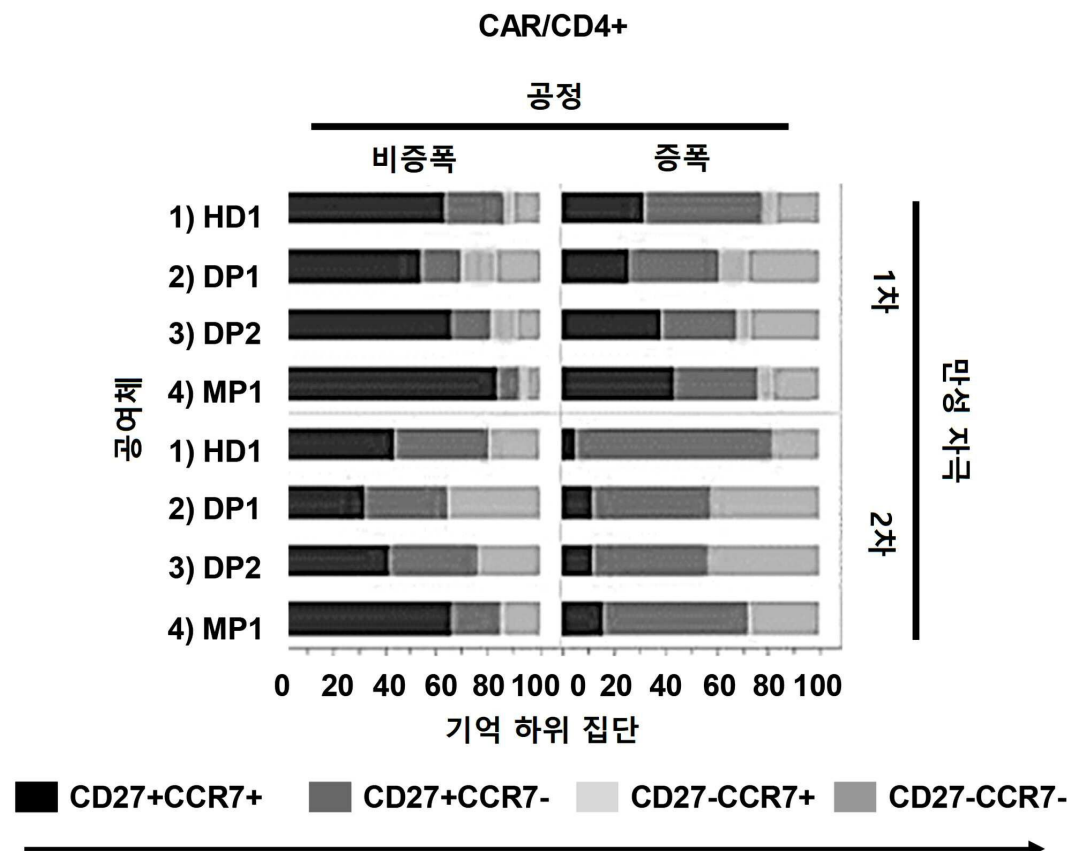
도면7a



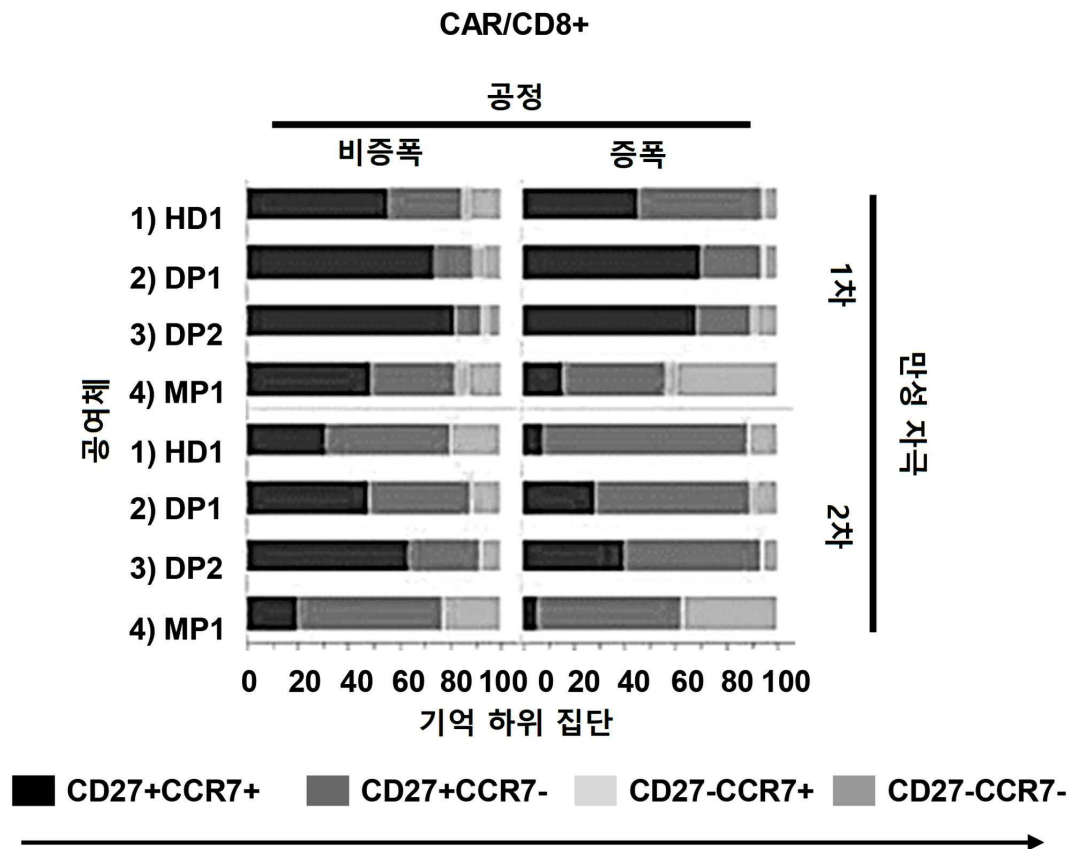
도면7b



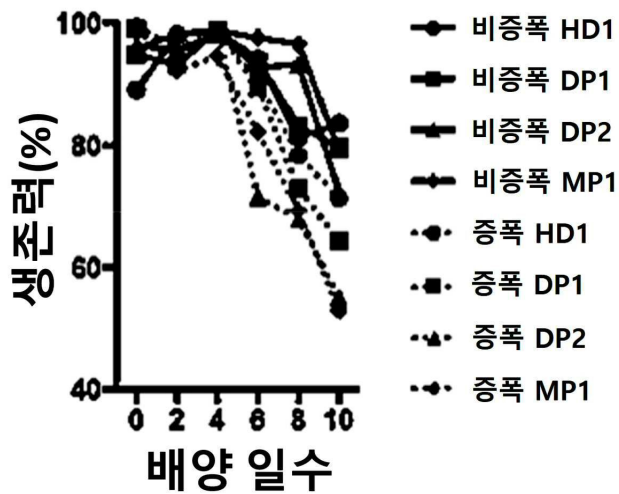
도면7c



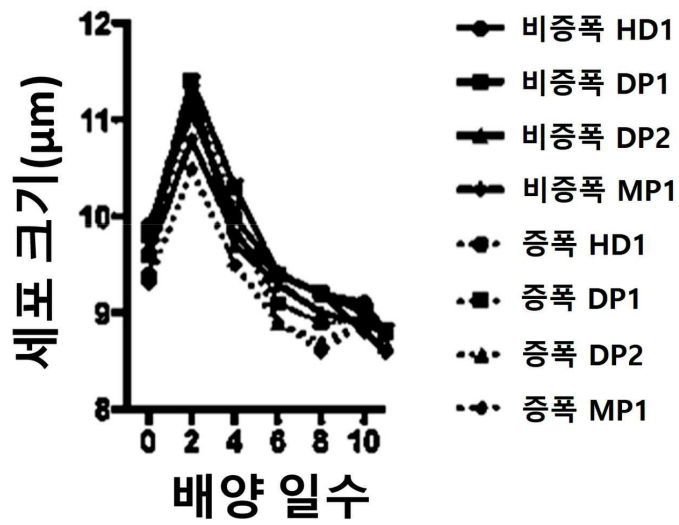
도면7d



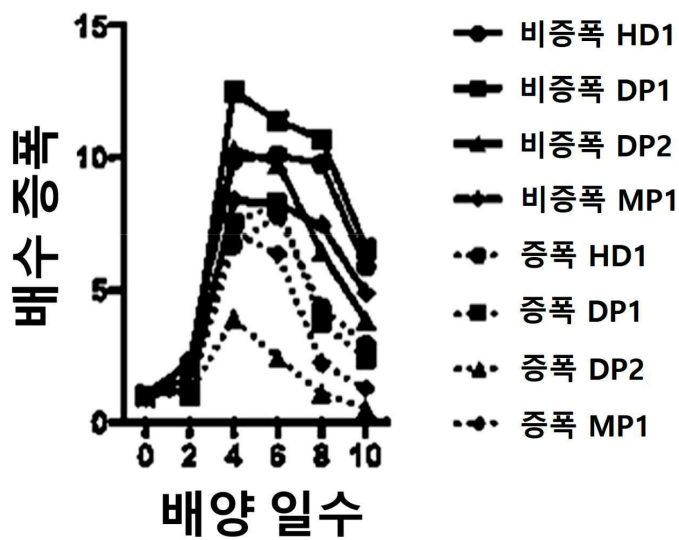
도면8a



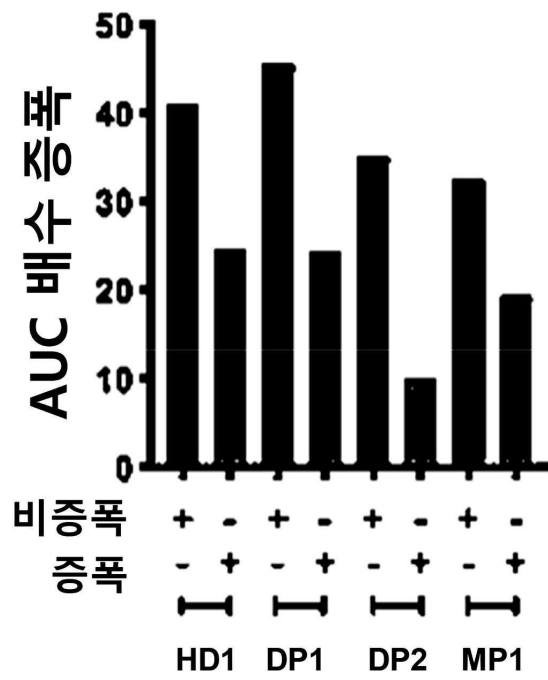
도면8b



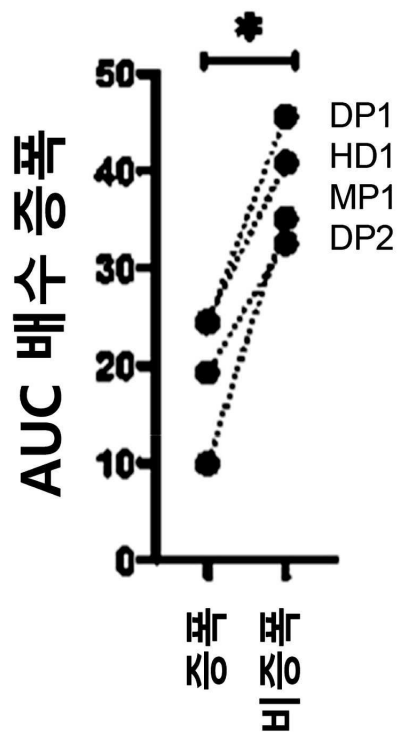
도면8c



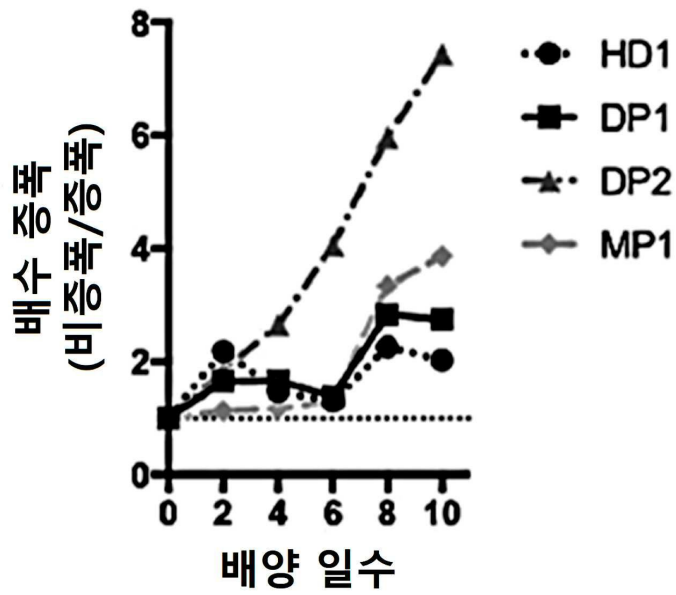
도면8d



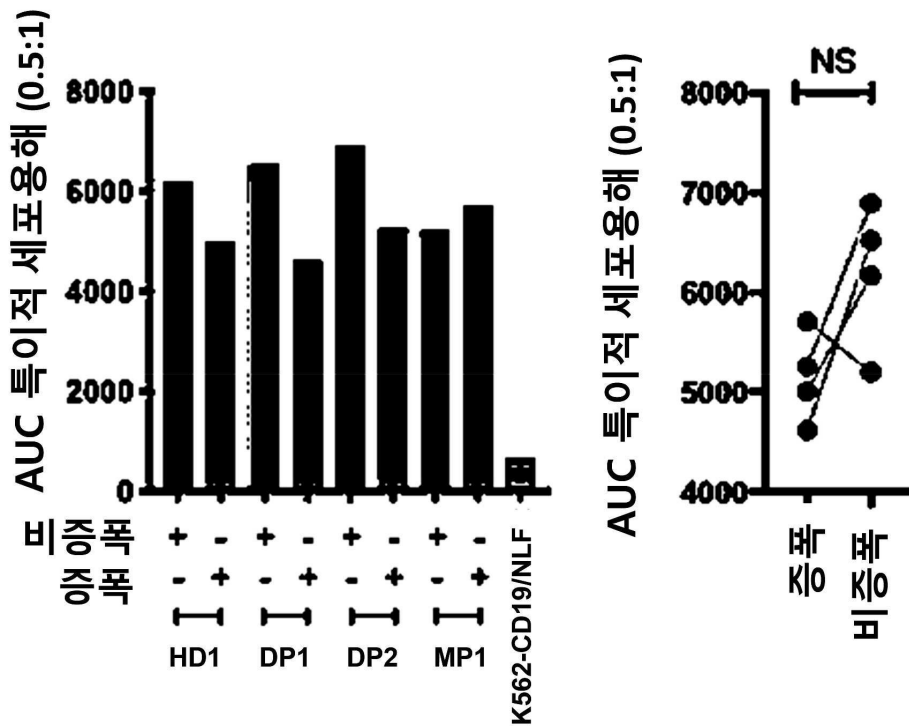
도면8e



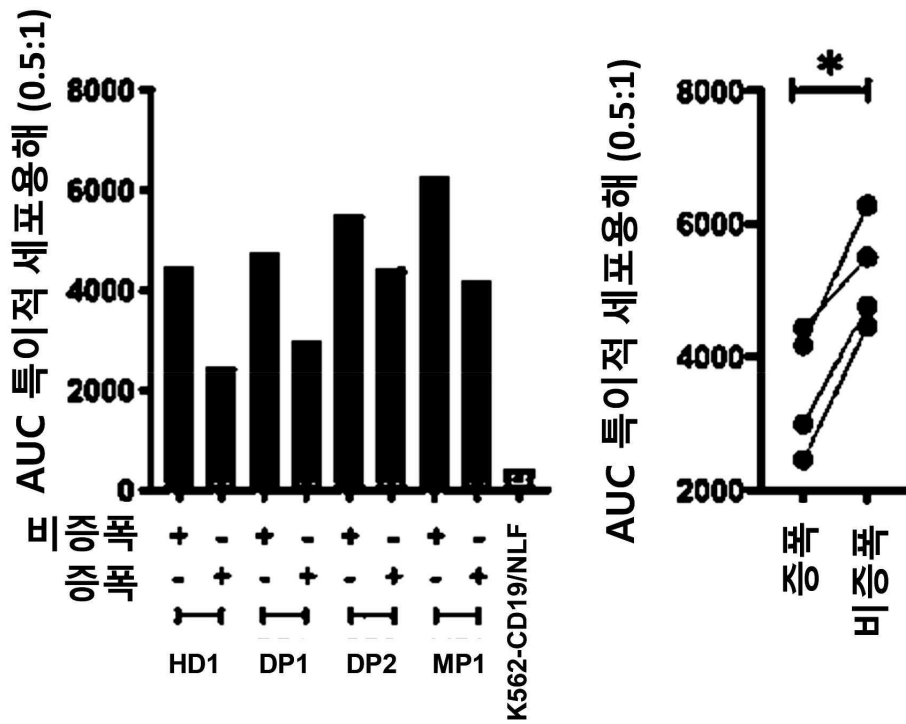
도면8f



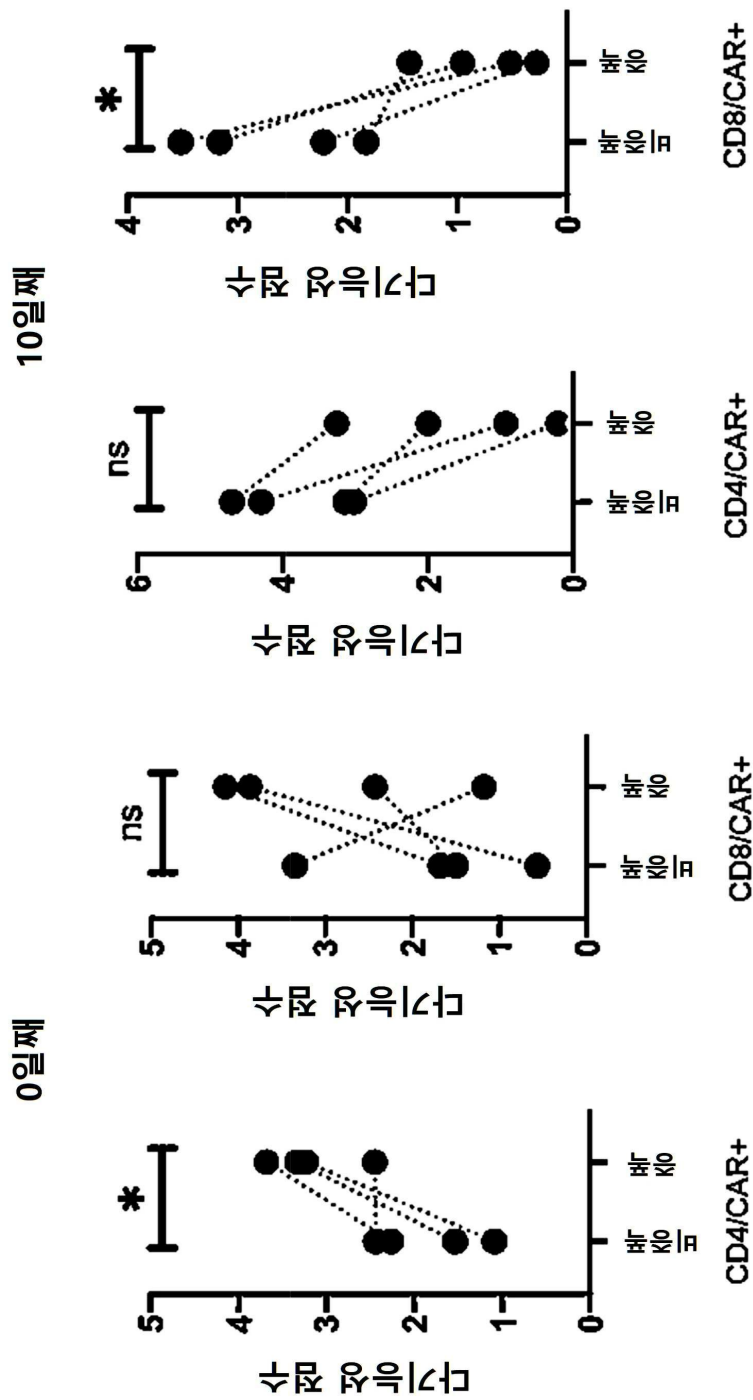
도면9a



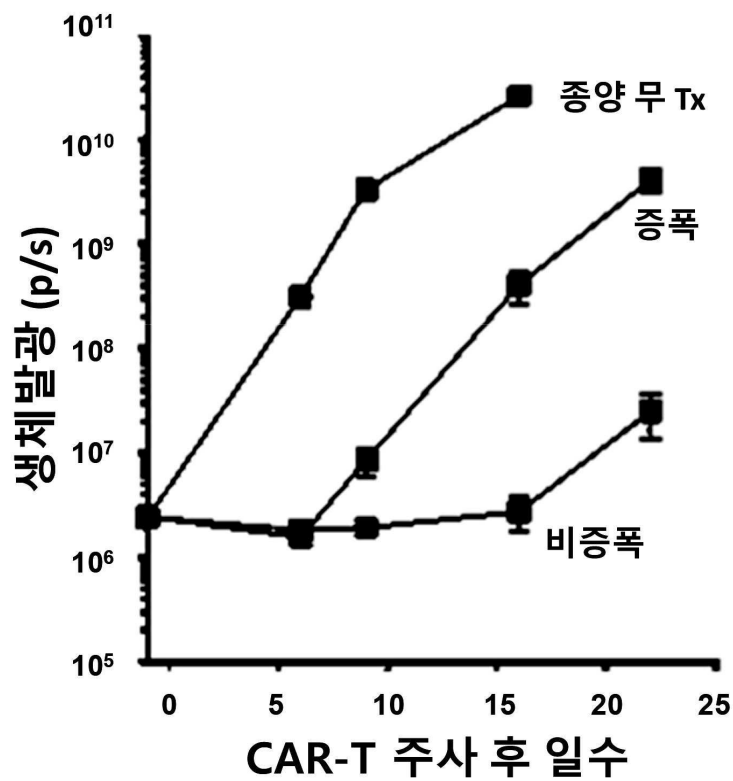
도면9b



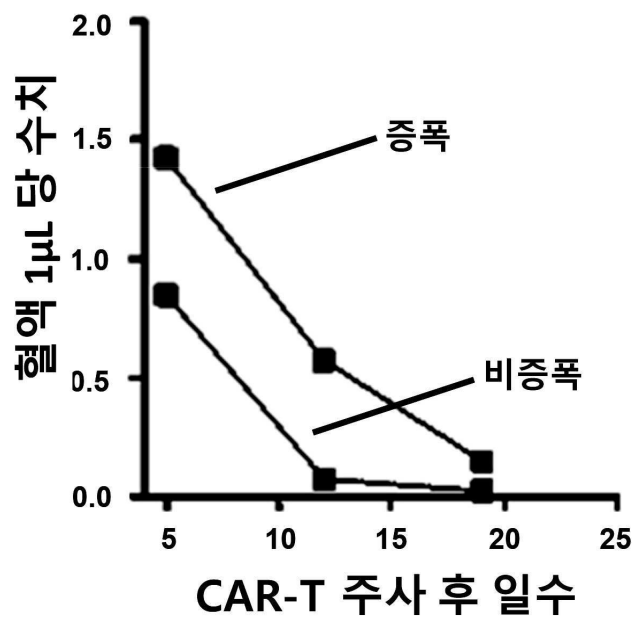
도면10



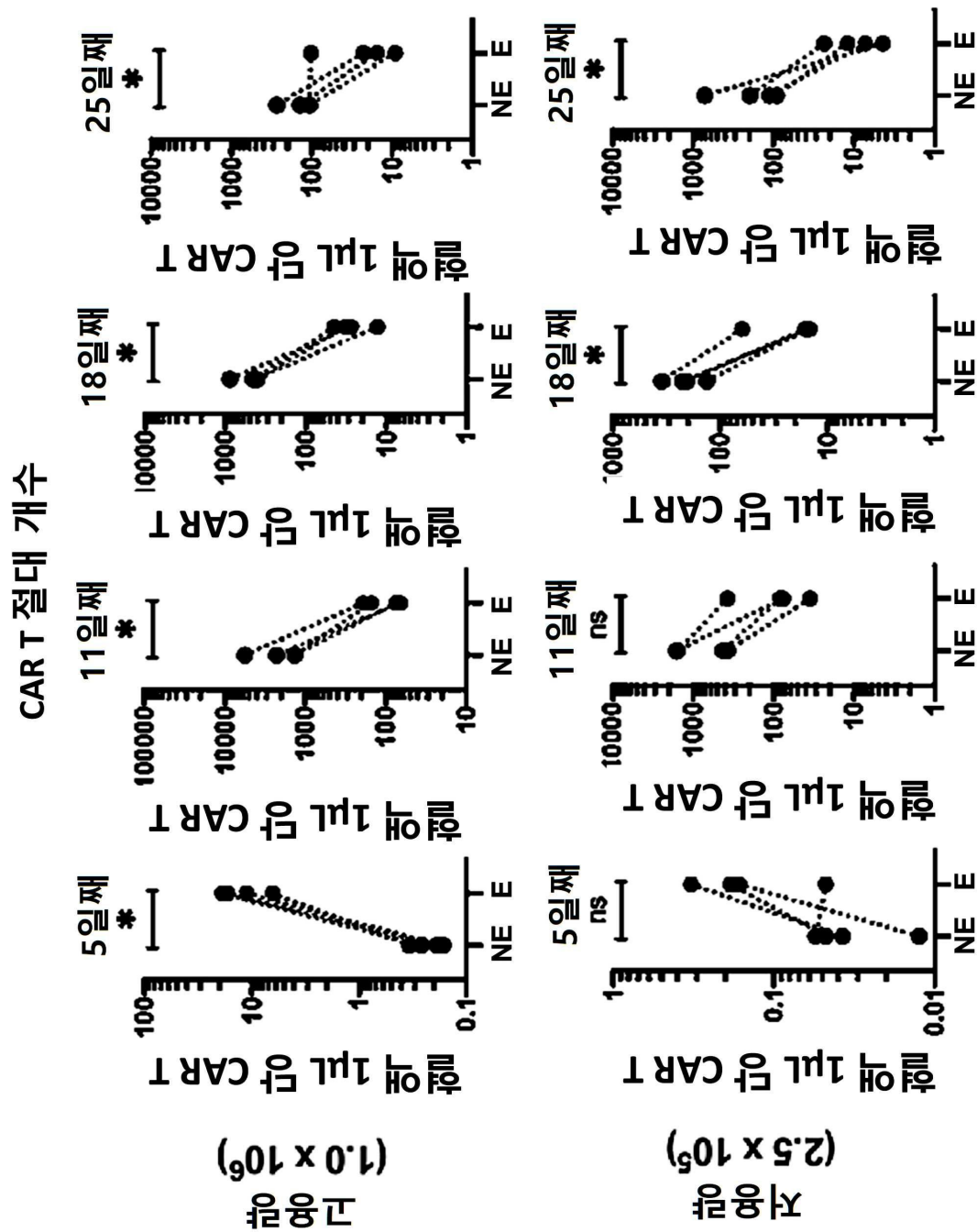
도면11a



도면11b



도면12b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Juno Therapeutics, Inc.

<120> CD19-DIRECTED CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR

T CELL COMPOSITIONS AND METHODS AND USES THEREOF

<130> 735042022740

<140> Not yet assigned

<141> Concurrently herewith

<150> US 62/975,724

<151> 2020-02-12

<160> 90

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> spacer (IgG4hinge)

<400> 1

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> spacer (IgG4hinge)

<400> 2

gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcct 36

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hinge-CH3 spacer

<400> 3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg

1 5 10 15

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

20 25 30

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 35 40 45
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
 50 55 60
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
 65 70 75 80
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 85 90 95

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 100 105 110
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 115

<210> 4

<211> 229

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hinge-CH2-CH3 spacer

<400> 4

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 1 5 10 15
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 5

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IgD-hinge-Fc

<400> 5

Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
 1 5 10 15
 Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala
 20 25 30
 Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys
 35 40 45

Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
 50 55 60

Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln
65 70 75 80
Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly
85 90 95
Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val
100 105 110
Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly
115 120 125
Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn
130 135 140
Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro
145 150 155 160
Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys
165 170 175
Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser
180 185 190
Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu
195 200 205
Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro
210 215 220
Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser
225 230 235 240
Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
245 250 255
Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg
260 265 270
Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His
275 280

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T2A

<400> 6

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp

1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg

20

<210> 7

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> tEGFR

<400> 7

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
 145 150 155 160
 Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
 165 170 175

Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
 180 185 190
 Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
 195 200 205
 Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
 210 215 220
 Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
 225 230 235 240

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

Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
 305 310 315 320
 Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala
 325 330 335
 Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly
 340 345 350
 Ile Gly Leu Phe Met
 355

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28 (amino acids 153-179 of Accession No. P10747)

<400> 8

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 9

<211> 66

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28 (amino acids 114-179 of Accession No. P10747)

<400> 9

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu

20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

35 40 45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

50 55 60

Trp Val

65

<210> 10

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28 (amino acids 180-220 of P10747)

<400> 10

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
35 40

<210> 11

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28 (LL to GG)

<400> 11

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 12

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 4-1BB (amino acids 214-255 of Q07011.1)

<400> 12

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 13

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 14

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 15

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 16

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> tEGFR

<400> 16

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu

1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile

20 25 30

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe

35 40 45

Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr

50 55 60

Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn

65 70 75 80

Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg

85 90 95

Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala Val Val Ser Leu Asn Ile

100 105 110

Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu Ile Ser Asp Gly Asp Val

115 120 125

Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr Ala Asn Thr Ile Asn Trp

130 135 140

Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys Thr Lys Ile Ile Ser Asn

145 150 155 160

Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly Gln Val Cys His Ala Leu

165 170 175

Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu Pro Arg Asp Cys Val Ser

180 185 190

Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys Val Asp Lys Cys Asn Leu

195 200 205

Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln

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

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

 325 330 335
 <210> 17
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> T2A
 <400> 17
 Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
 1 5 10 15
 Gly Pro

<210> 18
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> P2A
 <400> 18

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P2A

<400> 19

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> E2A

<400> 20

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
20

<210> 21

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> F2A

<400> 21

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<220>

<221> REPEAT

<222> (5)...(9)

<223> SGGGG is repeated 5 times

<400> 22

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro

1 5 10

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 23

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 24

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 24

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 25

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence encoding scFv

<400> 25

gacatccaga tgaccagac cacctccagc ctgagcgcca gcctgggcga cggggtgacc 60
atcagctgcc gggccagcca ggacatcagc aagtacctga actggtatca gcagaagccc 120
gacggcaccg tcaagctgct gatctaccac accagccggc tgcacagcgg cgtgcccagc 180
cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagcctga ccatctcaa cctggaacag 240
gaagatatcg ccacctactt ttgccagcag ggcaacacac tgccttacac ctttggcggc 300
ggaacaaaagc tggaaatcac cggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcgag 360

ggcagcacca agggcgaggt gaagctgcag gaaagcggcc ctggcctggt ggccccccagc 420
cagagcctga gcgtgacctg caccgtgagc ggcgtagacc tgcccgaacta cggcgtgagc 480
tggatccggc agccccccag gaagggcctg gaatggctgg gcgtgatctg gggcagcgag 540
accacctact acaacagcgc cctgaagagc cggctgacca tcataagga caacagcaag 600
agccaggtgt tcctgaagat gaacagcctg cagaccgacg acaccgcat ctactactgc 660
gccaagcact actactacgg cggcagctac gccatggact actggggcca gggcaccagc 720
gtgaccgtga gcagc 735

<210> 26

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa is glycine, cysteine or arginine

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa is cysteine or threonine

<400> 26

Xaa Pro Pro Xaa Pro

1 5

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 27

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

1 5 10 15

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 28

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 29

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 29

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 30

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223>

> Hinge

<400> 31

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 32

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 33

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213>

> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 34

Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L1

<400> 35

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L2

<400> 36

Ser Arg Leu His Ser Gly Val

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L3

<400> 37

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly

1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H1

<400> 38

Asp Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H2

<400> 39

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H3

<400> 40

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

1 5

<210> 41

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH

<400> 41

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 42

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln

65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr

100 105

<210> 43

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 43

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

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L1

<400> 44

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L2

<400> 45

Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L3

<400> 46

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H1

<400> 47

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H2

<400> 48

Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H3

<400> 49

Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 50

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH

<400> 50

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 51

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 51

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 52

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

1 5 10 15

<210> 53

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 53

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser

130 135 140

Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys

145 150 155 160

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys

165 170 175
 Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn
 180 185 190
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205

Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe
 210 215 220
 Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Leu Glu Ile Lys Arg
 245

<210> 54

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H3

<400> 54

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L2

<400> 55

His Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L3

<400> 56

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 57

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IGH primer

<400> 57

acacggcctc gtgtattact gt 22

<210> 58

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> IGH primer

<400> 58

acctgaggag acggtgacc 19

<210> 59

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47

<400> 59

Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile

20 25 30

Gly Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr

35 40 45
 Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr
 50 55 60
 Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp
 65 70 75 80
 Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp
 85 90 95

 Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu
 100 105 110
 Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 115 120 125
 <210> 60
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Variable Heavy chain of anti-CD3 antibody OKT3
 <400> 60
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115

<210> 61

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable Light chain of anti-CD3 antibody OKT3

<400> 61

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

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

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

<210> 62

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable Heavy chain of anti-CD28 antibody CD28.3

<400> 62

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

1	5	10	15
---	---	----	----

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Ile Ile His
 20 25 30
 Trp Ile Lys Leu Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe
 35 40 45
 Tyr Pro Gly Ser Asn Asp Ile Gln Tyr Asn Ala Lys Phe Lys Gly Lys
 50 55 60
 Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu
 65 70 75 80

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

<210> 63

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable Light chain of anti-CD28 antibody CD28.3

<400> 63

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Asn Glu Asn Ile Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Thr His Leu Val Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Thr Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Cys

85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105
<210> 64
<211> 30
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Twin-Strep-tag
<400> 64
Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15
Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
20 25 30
<210> 65
<211> 22
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> GMCSFR alpha chain signal sequence
<400> 65
Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
1 5 10 15
Ala Phe Leu Leu Ile Pro
20
<210> 66
<211> 66
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> GMCSFR alpha chain signal sequence
<400> 66
atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccaccg attcctcctg 60

atccca

66

<210> 67

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD8 alpha signal peptide

<400> 67

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu

1 5 10 15

His Ala

<210> 68

<211> 159

<212> PRT

<213> Streptomyces avidinii

<220>

<223> Streptomyces avidinii (UniProt No. P22629)

<400> 68

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly

1 5 10 15

Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr

20 25 30

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

35 40 45

Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro

50 55 60

Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys

65 70 75 80

Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr

85 90 95

Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser

100 105 110

Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp

115 120 125

Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys

130 135 140

Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln

145 150 155

<210> 69

<211> 126

<212> PRT

<213> Streptomyces avidinii

<220>

<223> Minimal streptavidin

<400> 69

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp

35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val

50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser

65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu

85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val

100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

115 120 125

<210> 70

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Streptavidin-binding peptide

<400> 70

His Pro Gln Phe

1

<210> 71

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Streptavidin-binding peptide

<

220>

<221> VARIANT

<222> (3)...(3)

<223> Xaa is selected from Gln, Asp, and Met

<400> 71

His Pro Xaa

1

<210> 72

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Streptavidin-binding peptide

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa is Trp, Lys or Arg

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa is any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa is Gly or Glu

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa is Gly, Lys or Arg

<400> 72

Xaa Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa

1 5

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Streptavidin-binding peptide

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa is any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa is Gly or Glu

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa is Gly, Lys or Arg

<400> 73

Trp Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa

1 5

<210> 74

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Streptavidin-binding peptide, Strep-tag

<400> 74

Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly

1 5

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Streptavidin-binding peptide, Strep-tag II

<400> 75

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 76

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequential modules of streptavidin-binding peptide

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)...(9)

<223> Xaa is any amino acid

<220>

<221> REPEAT

<222> (9)...(9)

<223> Xaa is repeated 8 or 12 times

<400> 76

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Xaa Trp Ser His Pro Gln Phe Glu

1 5 10 15

Lys

<210> 77
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Sequential modules of streptavidin-binding peptide
 <220>
 <221> REPEAT
 <222> (9)...(12)
 <223>
 > GlyGlyGlySer is repeated two or three times
 <400> 77
 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro
 1 5 10 15
 Gln Phe Glu Lys
 20
 <210> 78
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Twin-Strep-tag
 <400> 78
 Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 20 25
 <210> 79
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Twin-Strep-tag

<400> 79

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20

<210> 80

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Twin-Strep-tag

<400> 80

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25

<210> 81

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Twin-Strep-tag

<400> 81

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25 30

<210> 82

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Twin-Strep-tag

<400> 82

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys
 20 25 30

<210> 83

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47

<400> 83

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 20 25 30
 Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly
 35 40 45
 Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 50 55 60
 Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 65 70 75 80
 Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 85 90 95
 Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 100 105 110
 Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 115 120 125
 Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys

130 135 140
 Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
 145 150 155

<210> 84

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47

<400> 84

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr

20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp

35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val

50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser

65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu

85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val

100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

115 120 125

<210> 85

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47

<400> 85

Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val
 20 25 30
 Thr Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr
 35 40 45
 Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr
 50 55 60
 Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp

 65 70 75 80
 Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp
 85 90 95
 Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu
 100 105 110
 Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 115 120 125
 <210> 86
 <211> 159
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Mutein Streptavidin Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47
 <400> 86
 Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 20 25 30
 Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly Ala Arg Gly
 35 40 45
 Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro

 50 55 60
 Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 65 70 75 80
 Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr

85 90 95
Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
100 105 110
Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp

115 120 125
Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
130 135 140
Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
145 150 155

<210> 87

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47

<400> 87

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

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

65 70 75 80
Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
85 90 95
Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
100 105 110
Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
115 120 125

<210> 88

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47 and

Glu117, Gly120, Try121 (mutein m1-9)

<400> 88

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr

20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp

35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val

50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser

65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu

85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val

100 105 110

Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser

115 120 125

<210> 89

<211> 139

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47 and

Glu117, Gly120, Try121 (mutein m1-9)

<400> 89

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

Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly
 35 40 45
 Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 50 55 60
 Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 65 70 75 80
 Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 85 90 95

Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 100 105 110
 Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 115 120 125
 Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 130 135

<210> 90

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Minimal streptavidin

<400> 90

Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu
 20 25 30

Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr
 35 40 45
 Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr

50							55						60						
Val	Ala	Trp	Lys	Asn	Asn	Tyr	Arg	Asn	Ala	His	Ser	Ala	Thr	Thr	Trp				
65							70						75						80
Ser	Gly	Gln	Tyr	Val	Gly	Gly	Ala	Glu	Ala	Arg	Ile	Asn	Thr	Gln	Trp				
							85						90						95
Leu	Leu	Thr	Ser	Gly	Thr	Thr	Glu	Ala	Asn	Ala	Trp	Lys	Ser	Thr	Leu				
							100						105						110
Val	Gly	His	Asp	Thr	Phe	Thr	Lys	Val	Lys	Pro	Ser	Ala	Ala	Ser					
							115						120						125