(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0003913
(43) 공개일자 2020년01월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/17 (2014.01) *A61K 31/519* (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 5/078 (2010.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/17 (2013.01)
A61K 31/519 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7036293
(22) 출원일자(국제) 2018년05월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년12월09일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/032109
(87) 국제공개번호 WO 2018/209115
국제공개일자 2018년11월15일
(30) 우선권주장
62/504,337 2017년05월10일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
이오반스 바이오테라퓨틱스, 인크.
미국 94070 캘리포니아주 샌 칼로스 스위트 150 스카이웨이 로드 999
(72) 발명자
카리암푸디, 라바쿠마르
미국 33602 플로리다주 탬파 아파트먼트 3105 사우스 모건 스트리트 124
파디스, 마리아
미국 94070 캘리포니아주 샌 칼로스 애버딘 드라이브 105
(74) 대리인
양영준, 이상남

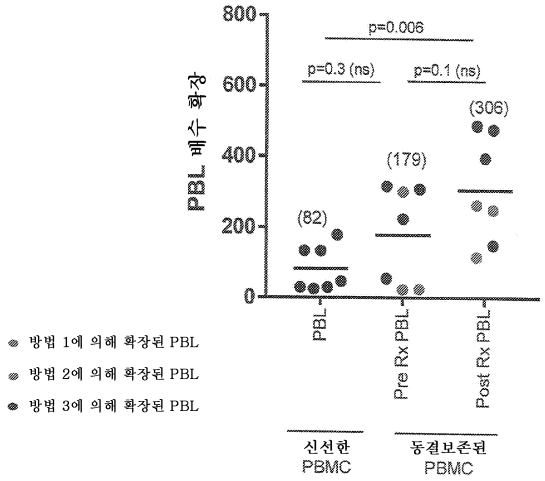
전체 청구항 수 : 총 126 항

(54) 발명의 명칭 **액상 종양으로부터의 종양 침윤 림프구의 확장 및 그의 치료 용도**

(57) 요 약

혈액 악성종양, 예컨대 액상 종양, 예를 들어 림프종 및 백혈병을 갖는 환자의 혈액 및/또는 골수로부터 말초 혈액 림프구 및 골수 침윤 림프구를 포함한 종양 침윤 림프구 (TIL)를 확장시키는 방법, 및 암 및 혈액 악성종양과 같은 질환의 치료에서 이러한 확장된 TIL의 용도가 본원에 개시된다.

대 표 도 - 도26



(52) CPC특허분류
A61K 38/2013 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 5/0634 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
C12N 2501/2302 (2013.01)
C12N 2501/51 (2013.01)
C12N 2501/515 (2013.01)
C12N 2502/11 (2013.01)
C12N 2502/30 (2013.01)

(30) 우선권주장
62/530,681 2017년07월10일 미국(US)
62/550,398 2017년08월25일 미국(US)
62/590,034 2017년11월22일 미국(US)
62/621,462 2018년01월24일 미국(US)
62/621,798 2018년01월25일 미국(US)
62/647,367 2018년03월23일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 임의로 이브루티닙을 포함하는 요법으로 환자를 사전-치료하는 단계;

(b) 액상 종양을 수득하는 단계;

(c) 임의로 종양을 단편화 또는 해리시켜 종양 단편을 수득하고 종양 단편을 제1 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계;

(d) 제1 세포 배양 배지에서 제1 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단의 초기 확장을 수행하여 제2 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제2 TIL 집단은 제1 TIL 집단보다 수가 적어도 5배 더 많고, 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함하고, 초기 확장은 21일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계;

(e) 제2 세포 배양 배지에서 제2 TIL 집단의 제2 확장을 수행하여 제3 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제3 TIL 집단은 제2 확장의 시작으로부터 7일 후 제2 TIL 집단보다 수가 적어도 10배 더 많고, 제2 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3 (항-CD3 항체) 및 조사된 동종 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함하고, 제2 확장은 14일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계;

(f) 제3 TIL 집단을 수거하는 단계; 및

(g) 암을 갖는 환자에게 치료 유효 분량의 제3 TIL 집단을 투여하는 단계

를 포함하며, 여기서 암은 혈액 악성종양인,

종양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 사용하여 환자에서 암을 치료하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, ITK 억제제의 첨가를 추가로 포함하며, 여기서 ITK 억제제는 임의로 ITK에 공유 결합하는 ITK 억제제인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, ITK 억제제를 단계 (d) 동안 제1 세포 배양 배지에 첨가하거나, 단계 (e) 동안 제2 세포 배양 배지에 첨가하거나, 또는 단계 (d) 동안 제1 세포 배양 배지 및 단계 (e) 동안 제2 세포 배양 배지 둘 다에 첨가하는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, ITK 억제제가 아미노티아졸-기재 ITK 억제제, 벤즈이미다졸-기재 ITK 억제제, 아미노피리미딘-기재 ITK 억제제, 3-아미노피리드-2-온-기재 ITK 억제제, 인돌릴인다졸-기재 ITK 억제제, 피라졸릴-인돌-기재 억제제, 티에노피라졸 억제제, 및 ATP 포켓 내의 시스테인-442를 표적화하는 ITK 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, ITK 억제제가 이브루티닙, 다사티닙, 보수티닙, 닐로티닙, 에를로티닙, BMS509744, CTA056, GSK2250665A, PF06465469 ((R)-3-(1-(1-아크릴로일피페리딘-3-일)-4-아미노-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-3-일)-N-(3-메틸-4-(1-메틸에틸))벤즈아미드), 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, ITK 억제제가 이브루티닙인 방법.

청구항 7

제2항에 있어서, ITK 억제제를 약 0.1 nM 내지 약 5 μM의 농도로 첨가하는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 초기 확장이 3일 내지 11일의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 제2 확장이 3일 내지 11일의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, IL-2가 제1 세포 배양 배지에 1000 IU/mL 내지 6000 IU/mL의 초기 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 제2 세포 배양 배지에 IL-2가 1000 IU/mL 내지 6000 IU/mL의 초기 농도로 존재하고 OKT-3 항체가 약 30 ng/mL의 초기 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 초기 확장이 기체 투과성 용기를 사용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 제2 확장이 기체 투과성 용기를 사용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 제1 세포 배양 배지가 IL-4, IL-7, IL-15, IL-21 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 시토카인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 제2 세포 배양 배지가 IL-4, IL-7, IL-15, IL-21 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 시토카인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 환자에게 제3 TIL 집단을 투여하기 전에 환자를 비-골수절제 림프구고갈 요법으로 치료하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 비-골수절제 림프구고갈 요법이 2일 동안 60 mg/m^2/일의 용량의 시클로포스파미드의 투여에 이어서 5일 동안 25 mg/m^2/일의 용량의 플루다라빈의 투여 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 환자에게 제3 TIL 집단을 투여한 다음 날에 시작하여 환자를 고용량 IL-2 요법으로 치료하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 고용량 IL-2 요법이 내성(tolerance)까지 8시간마다 15분 볼루스 정맥내 주입으로서 투여되는 600,000 또는 720,000 IU/kg의 알데스류킨 또는 그의 바이오시밀러 또는 변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 20

제1항에 있어서, 암이 급성 골수성 백혈병 (AML), 외투 세포 림프종 (MCL), 여포성 림프종 (FL), 미만성 대 B 세포 림프종 (DLBCL), 활성화된 B 세포 (ABC) DLBCL, 배 중심 B 세포 (GCB) DLBCL, 만성 림프구성 백혈병

(CLL), 소형 림프구성 백혈병 (SLL), 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 재발성 및/또는 불응성 호지킨 림프종, B 세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), 성숙 B-ALL, 버킷 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (WM), 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 골수섬유증, 만성 골수구성 백혈병, 여포 중심세포 림프종, 무통성 NHL, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 연관 B 세포 림프종, 및 엡스타인-바르 바이러스 (EBV) 연관 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 환자 집단이 이브루티닙-사전치료된 환자 집단인 방법.

청구항 22

(a) 종양을 단편화하는 단계;

(b) 제1 세포 배양 배지에서 제1 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단의 초기 확장을 수행하여 제2 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제2 TIL 집단은 제1 TIL 집단보다 수가 적어도 5배 더 많고, 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함하고, 초기 확장은 21일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계;

(c) 제2 세포 배양 배지에서 제2 TIL 집단의 제2 확장을 수행하여 제3 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제3 TIL 집단은 제2 확장의 시작으로부터 7일 후 제2 TIL 집단보다 수가 적어도 50배 더 많고, 제2 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3 (항-CD3 항체), 조사된 동종 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함하고, 제2 확장은 14일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계; 및

(d) 제3 TIL 집단을 수거하는 단계

를 포함하며, 여기서 종양은 액상 종양이고, 암은 혈액 악성종양인,

종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 제조하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 제1 TIL 집단이 종양 또는 그의 부분으로부터 수득되는 것인 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 종양 또는 그의 부분이 환자로부터 절제된 것인 방법.

청구항 25

제22항에 있어서, 초기 확장이 14일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

청구항 26

제22항에 있어서, 초기 확장이 11일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

청구항 27

제22항에 있어서, 제2 확장이 11일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

청구항 28

혈액 악성종양의 치료를 위한 TIL 집단의 제조에서의 액상 종양의 용도.

청구항 29

(a) 골수 또는 말초 혈액의 샘플로부터 제1 TIL 집단을 확인하는 단계;

(b) 제1 세포 배양 배지에서 제1 TIL 집단의 초기 확장을 수행하여 제2 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제2 TIL 집단은 제1 TIL 집단보다 수가 적어도 5배 더 많고, 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함하고, 초기 확장은 21일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계;

(c) 제2 세포 배양 배지에서 제2 TIL 집단의 제2 확장을 수행하여 제3 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제3 TIL 집단은 제2 확장의 시작으로부터 7일 후 제2 TIL 집단보다 수가 적어도 50배 더 많고, 제2 세포 배양

배지는 IL-2, OKT-3 (항-CD3 항체) 및 조사된 동종 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함하고, 제2 확장은 14일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계;

(d) 제3 TIL 집단을 수거하는 단계; 및

(e) 상기 환자에게 상기 제3 TIL 집단을 제공하는 단계

를 포함하는, 골수 또는 말초 혈액으로부터 수득된 TIL을 확장시키는 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 초기 확장이 11일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

청구항 31

제29항에 있어서, 제2 확장이 11일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

청구항 32

제29항에 있어서, IL-2가 제1 세포 배양 배지에 1000 IU/mL 내지 6000 IU/mL의 초기 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 33

제29항에 있어서, 제2 세포 배양 배지에 IL-2가 1000 IU/mL 내지 6000 IU/mL의 초기 농도로 존재하고 OKT-3 항체가 약 30 ng/mL의 초기 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 34

제29항에 있어서, 초기 확장이 기체 투과성 용기를 사용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 35

제29항에 있어서, 제2 확장이 기체 투과성 용기를 사용하여 수행되는 것인 방법.

청구항 36

제29항에 있어서, 제1 세포 배양 배지가 IL-4, IL-7, IL-15, IL-21 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 시토카인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 37

제29항에 있어서, 제2 세포 배양 배지가 IL-4, IL-7, IL-15, IL-21 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 시토카인을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 38

a. 말초 혈액으로부터 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 샘플을 수득하는 단계이며, 여기서 상기 샘플은 임의로 동결보존되는 것인 단계;

b. 상기 샘플로부터 CD19+ B 세포를 선택하고 제거함으로써 말초 혈액 림프구 (PBL)를 단리하는 단계;

c. 임의로 상기 PBL을 상기 CD19+ B 세포와 함께 공동-배양하는 단계;

d. 기체 투과성 용기에서 제1 세포 배양 배지 내에서 상기 PBL을 IL-2 및 항-CD3/항-CD28 항체로 약 2일 내지 약 6일의 기간 동안 자극시키는 단계;

e. 단계 (d)로부터의 PBL을 IL-2 및 항-CD3/항-CD28 항체와 함께 약 2일 내지 약 6일의 기간 동안 배양하는 단계;

f. 단계 (e)에서의 배양물로부터 항체-결합된 PBL을 단리하는 단계;

g. 단계 (e)에서 단리된 PBL로부터 항체를 제거하는 단계; 및

h. PBL을 수거하는 단계

를 포함하는, 말초 혈액으로부터 말초 혈액 림프구 (PBL)를 확장시키는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 제1 세포 배양 배지가 CM-2, CM-4 및 AIM-V로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 40

제38항에 있어서, 단계 (d) 후에, 추가의 IL-2를 첨가하고, 제1 세포 배양 배지를 제2 세포 배양 배지로 교체하는 것인 방법.

청구항 41

제38항에 있어서, 단계 (e) 후에, 추가의 IL-2를 첨가하고, 제2 배양 배지를 제3 세포 배양 배지로 교체하는 것인 방법.

청구항 42

제40항에 있어서, 제2 세포 배양 배지가 CM-2, CM-4 및 AIM-V로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 43

제41항에 있어서, 제3 세포 배양 배지가 CM-2, CM-4 및 AIM-V로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 44

제40항에 있어서, 제1 세포 배양 배지 및 제2 세포 배양 배지가 상이한 것인 방법.

청구항 45

제40항에 있어서, 제1 세포 배양 배지 및 제2 세포 배양 배지가 동일한 것인 방법.

청구항 46

제38항에 있어서, 단계 (c)에서의 B-세포 대 PBL의 비가 약 0.1:1 내지 약 10:1 (B-세포:PBL)인 방법.

청구항 47

제38항에 있어서, 단계 (c)에서의 B-세포 대 PBL의 비가 0.1:1, 1:1 및 10:1 (B-세포:PBL)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 48

제38항에 있어서, 단계 (d)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 약 $1x10^5$ 내지 약 $10x10^5$개 PBL이 존재하는 것인 방법.

청구항 49

제38항에 있어서, 단계 (d)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 약 $2.5x10^5$ 내지 $10x10^5$개 PBL이 존재하는 것인 방법.

청구항 50

제38항에 있어서, 단계 (d)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 $5x10^5$개 PBL이 존재하는 것인 방법.

청구항 51

제38항에 있어서, IL-2가 단계 (c) 및 (d)에서 1000 IU/ml 내지 6000 IL/ml의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, IL-2가 약 3000 IU/ml의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 53

제38항에 있어서, 항-CD3/항-CD28 항체가 비드 상에 코팅되고, PBL:비드 비가 각각의 단계 (c) 및 (d)에서 약 1:1인 방법.

청구항 54

제38항에 있어서, ITK 억제제의 첨가를 추가로 포함하는 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, ITK 억제제를 단계 (c), 단계 (d) 및 단계 (e) 중 적어도 하나 동안 첨가하는 것인 방법.

청구항 56

제54항에 있어서, ITK 억제제가 아미노티아졸-기재 ITK 억제제, 벤즈이미다졸-기재 ITK 억제제, 아미노피리미딘-기재 ITK 억제제, 3-아미노피리드-2-온-기재 ITK 억제제, 인돌릴인다졸-기재 ITK 억제제, 피라졸릴-인돌-기재 억제제, 티에노피라졸 억제제, 및 ATP 포켓 내의 시스테인-442를 표적화하는 ITK 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, ITK 억제제가 이브루티닙, 다사티닙, 보수티닙, 닐로티닙, 에를로티닙, BMS509744, CTA056, GSK2250665A, PF06465469 ((R)-3-(1-(1-아크릴로일피페리딘-3-일)-4-아미노-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-3-일)-N-(3-메틸-4-(1-메틸에틸))벤즈아미드), 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 58

제57항에 있어서, ITK 억제제가 이브루티닙인 방법.

청구항 59

제38항에 있어서, 폐쇄된 멸균 시스템에서 수행되는 방법.

청구항 60

a. 환자의 말초 혈액으로부터 PBMC 샘플을 수득하는 단계이며, 여기서 상기 샘플은 임의로 동결보존되고, 환자는 임의로 ITK 억제제로 사전치료되는 것인 단계;

b. 상기 샘플로부터 CD19+ B 세포를 선택하고 제거함으로써 말초 혈액 림프구 (PBL)를 단리하고, 임의로 상기 PBL을 0.1 nM 내지 200 nM 농도의 ITK 억제제로 사전처리하는 단계;

c. 상기 PBL을 상기 CD19+ B 세포와 함께 2 내지 5일의 기간 동안 공동-배양하는 단계;

d. 약 $2.5x10^5$ 내지 약 $5x10^5$개 세포를 기체-투과성 용기 내의 제1 세포 배양 배지에 첨가하고, 상기 PBL을 3000 IU/ml IL-2 및 비드 상에 고정화된 항-CD3/항-CD28 항체 및 임의로 0.1 nM 내지 200 nM 농도의 ITK 억제제로 3 내지 6일의 기간 동안 자극시키는 단계;

e. 제1 세포 배양 배지를 제2 세포 배양 배지 및 약 3000 IU/ml 농도의 추가의 IL-2 및 임의로 0.1 nM 내지 200 nM 농도의 ITK 억제제로 교체하는 단계;

f. 단계 (e)로부터의 PBL을 IL-2 및 비드 상에 고정화된 항-CD3/항-CD28 항체 및 임의로 0.1 nM 내지 200 nM 농도의 ITK 억제제와 함께 3 내지 6일의 추가의 기간 동안 배양하는 단계;

g. 제2 세포 배양 배지를 제3 세포 배양 배지로 교체하고, 3000 IU/mL 농도의 추가의 IL-2 및 임의로 0.1 nM 내지 200 nM 농도의 ITK 억제제를 첨가하고, 세포를 2 내지 5일의 추가의 기간 동안 배양하는 단계;

h. 단계 (g)에서의 배양물로부터 항체-결합된 PBL을 단리하는 단계;

i. 단계 (h)에서 단리된 PBL로부터 항체를 제거하는 단계; 및

j. PBL을 수거하는 단계

를 포함하며, 여기서 ITK 억제제는 ITK에 공유 결합하는 ITK 억제제인,

말초 혈액으로부터 말초 혈액 림프구 (PBL)를 확장시키는 방법.

청구항 61

a. 혈액 악성종양을 앓고 있는 환자의 말초 혈액으로부터 PBMC 샘플을 수득하는 단계;

b. 상기 샘플로부터 CD19+ B 세포를 선택하고 제거함으로써 PBL을 단리하는 단계;

c. 임의로 상기 PBL을 상기 CD19+ B 세포와 함께 공동-배양하는 단계;

d. 기체 투과성 용기에서 제1 세포 배양 배지 내에서 상기 PBL을 IL-2 및 항-CD3/항-CD28 항체로 약 2일 내지 약 6일의 기간 동안 자극시키는 단계;

e. 단계 (d)로부터의 PBL을 IL-2 및 항-CD3/항-CD28 항체와 함께 약 2일 내지 약 6일의 기간 동안 배양하는 단계;

f. 단계 (e)에서의 배양물로부터 항체-결합된 PBL을 단리하는 단계;

g. 단계 (f)에서 단리된 PBL로부터 항체를 제거하는 단계;

h. PBL을 수거하는 단계; 및

i. 환자에게 PBL을 치료 유효량으로 투여하여 상기 혈액 악성종양을 치료하는 단계

를 포함하는, 혈액 악성종양을 치료하는 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 환자가 PBMC 샘플을 수득하기 전에 ITK 억제제로 사전-치료되는 것인 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, ITK 억제제가 아미노티아졸-기재 ITK 억제제, 벤즈이미다졸-기재 ITK 억제제, 아미노피리미딘-기재 ITK 억제제, 3-아미노피리드-2-온-기재 ITK 억제제, 인돌릴인다졸-기재 ITK 억제제, 피라졸릴-인돌-기재 억제제, 티에노피라졸 억제제, 및 ATP 포켓 내의 시스테인-442를 표적화하는 ITK 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 64

제62항에 있어서, ITK 억제제가 이브루티닙, 다사티닙, 보수티닙, 닐로티닙, 에를로티닙, BMS509744, CTA056, GSK2250665A, PF06465469 ((R)-3-(1-(1-아크릴로일피페리딘-3-일)-4-아미노-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-3-일)-N-(3-메틸-4-(1-메틸에틸))벤즈아미드), 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, ITK 억제제가 이브루티닙인 방법.

청구항 66

제62항에 있어서, 환자가 적어도 3회의 이브루티닙 요법으로 사전-치료되는 것인 방법.

청구항 67

제61항에 있어서, 혈액 악성종양이 급성 골수성 백혈병 (AML), 외투 세포 림프종 (MCL), 여포성 림프종 (FL), 미만성 대 B 세포 림프종 (DLBCL), 활성화된 B 세포 (ABC) DLBCL, 배 중심 B 세포 (GCB) DLBCL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 백혈병 (SLL), 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 재발성 및/또는 불응성 호지킨 림프종, B 세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), 성숙 B-ALL, 버킷 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (WM), 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 골수섬유증, 만성 골수구성 백혈병, 여포 중심세포 림프종, 무통성 NHL, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 연관 B 세포 림프종, 및 엡스타인-바르 바이러스 (EBV) 연관 B 세포

림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 68

제61항에 있어서, 혈액 악성종양이 만성 림프구성 백혈병 (CLL)인 방법.

청구항 69

제61항에 있어서, 제1 세포 배양 배지가 CM-2, CM-4 및 AIM-V로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 70

제61항에 있어서, 단계 (d) 후에, 추가의 IL-2를 첨가하고, 세포 배양 배지를 제2 세포 배양 배지로 교체하는 것인 방법.

청구항 71

제70항에 있어서, 단계 (e) 후에, 추가의 IL-2를 첨가하고, 제2 세포 배양 배지를 제3 세포 배양 배지로 교체하는 것인 방법.

청구항 72

제70항에 있어서, 제2 세포 배양 배지가 CM-2, CM-4 및 AIM-V로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 73

제71항에 있어서, 제3 세포 배양 배지가 CM-2, CM-4 및 AIM-V로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 74

제70항에 있어서, 제1 세포 배양 배지 및 제2 세포 배양 배지가 상이한 것인 방법.

청구항 75

제70항에 있어서, 제1 세포 배양 배지 및 제2 세포 배양 배지가 동일한 것인 방법.

청구항 76

제61항에 있어서, 단계 (c)에서의 B-세포 대 PBL의 비가 약 0.1:1 내지 약 10:1 (B-세포:PBL)인 방법.

청구항 77

제61항에 있어서, 단계 (c)에서의 B-세포 대 PBL의 비가 0.1:1, 1:1 및 10:1 (B-세포:PBL)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 78

제61항에 있어서, 단계 (d)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 약 $1x10^5$ 내지 약 $10x10^5$개 PBL이 존재하는 것인 방법.

청구항 79

제61항에 있어서, 단계 (d)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 약 $2.5x10^5$ 내지 $10x10^5$개 PBL이 존재하는 것인 방법.

청구항 80

제61항에 있어서, 단계 (d)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 $5x10^5$개 PBL이 존재하는 것인 방법.

청구항 81

제61항에 있어서, IL-2가 단계 (d) 및 (e)에서 1000 IU/ml 내지 6000 IL/ml의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 82

제81항에 있어서, IL-2가 약 3000 IU/ml의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 83

제61항에 있어서, 항-CD3/항-CD28 항체가 비드 상에 코팅되고, PBL:비드 비가 각각의 단계 (d) 및 (e)에서 약 1:1인 방법.

청구항 84

제61항에 있어서, PBL이 약 $0.1x10^9$ 내지 약 $15x10^9$개 PBL의 양으로 투여되는 것인 방법.

청구항 85

a. 골수로부터 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 샘플을 수득하는 단계이며, 여기서 상기 샘플은 임의로 동결보존되는 것인 단계;

b. CD3+, CD33+, CD20+ 및 CD14+ 세포 분획 (골수-침윤 림프구 (MIL) 분획) 및 비-CD3+, 비-CD33+, 비-CD20+ 및 비-CD14+ 세포 분획 (AML 모세포 분획)을 분류하는 단계;

c. 임의로 AML 모세포 분획을 파괴하는 단계;

d. 임의로 파괴된 AML 모세포 분획을 MIL 세포 분획에 약 0.1:1 내지 약 10:1의 세포 수 비로 첨가하는 단계;

e. 기체 투과성 용기에서 IL-2를 포함하는 제1 세포 배양 배지 내에서 하나 또는 둘 다의 세포 분획을 배양하는 단계;

f. MIL을 항-CD3/항-CD28 항체로 자극시켜 MIL의 확장을 얻는 단계;

g. MIL을 IL-2 및 항-CD3/항-CD28 항체로 약 2 내지 약 6일의 추가의 기간 동안 재자극시키는 단계;

h. MIL을 추가의 IL-2와 함께 약 1 내지 약 3일의 추가의 기간 동안 배양하는 단계; 및

i. 상기 MIL을 수거하는 단계

를 포함하는, 골수로부터 골수-침윤 림프구 (MIL)를 확장시키는 방법.

청구항 86

제85항에 있어서, 제1 세포 배양 배지가 CM-2, CM-4 및 AIM-V로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 87

제85항에 있어서, 단계 (e)를 시작한 후에, 추가의 IL-2를 첨가하고, 제1 세포 배양 배지를 제2 세포 배양 배지로 교체하는 것인 방법.

청구항 88

제87항에 있어서, 제2 세포 배양 배지가 CM-2, CM-4 및 AIM-V로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 89

제87항에 있어서, 제1 세포 배양 배지 및 제2 세포 배양 배지가 상이한 것인 방법.

청구항 90

제87항에 있어서, 제1 세포 배양 배지 및 제2 세포 배양 배지가 동일한 것인 방법.

청구항 91

제85항에 있어서, 단계 (e)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 약 $2x10^4$ 내지 약 $5x10^5$개 MIL이 존재하는 것인 방법.

청구항 92

제85항에 있어서, 단계 (e)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 약 $2.8x10^4$ 내지 $3.4x10^5$개 MIL이 존재하는 것인 방법.

청구항 93

제85항에 있어서, 단계 (e)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 $5x10^5$개 MIL이 존재하는 것인 방법.

청구항 94

제85항에 있어서, IL-2가 단계 (d)에서 1000 IU/ml 내지 6000 IL/ml의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 95

제94항에 있어서, IL-2가 약 6000 IU/ml의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 96

제85항에 있어서, IL-2가 단계 (f)에서 약 3000 IU/ml의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 97

제85항에 있어서, 단계 (d)에서의 배양이 약 3일의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

청구항 98

제85항에 있어서, 단계 (e)에서의 자극이 약 4일의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

청구항 99

제85항에 있어서, 단계 (f)에서의 자극이 약 7일의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

청구항 100

제85항에 있어서, 단계 (g)에서의 추가의 IL-2가 약 3000 IU/ml의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 101

제85항에 있어서, 항-CD3/항-CD28 항체가 비드 상에 코팅되고, MIL:비드 비가 각각의 단계 (e) 및 (f)에서 약 1:1인 방법.

청구항 102

제85항에 있어서, 임의로 파괴된 세포 분획이 초음파처리, 볼텍싱, 진동 및 용해로 이루어진 군으로부터 선택된 방법을 사용하여 파괴되는 것인 방법.

청구항 103

제85항에 있어서, AML 모세포 분획 대 MIL 분획의 세포 수 비가 약 1:1인 방법.

청구항 104

제85항에 있어서, 폐쇄된 멸균 시스템에서 수행되는 방법.

청구항 105

a. 골수로부터 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 샘플을 수득하는 단계이며, 여기서 상기 샘플은 임의로 동결보존되는 것인 단계;

b. CD3+, CD33+, CD20+ 및 CD14+ 세포 분획 및 비-CD3+, 비-CD33+, 비-CD20+ 및 비-CD14+ 세포 분획을 분류하는 단계;

c. AML 모세포 분획을 파괴하고, 파괴된 AML 모세포 분획을 골수-침윤 림프구 (MIL) 세포 분획에 약 1:1의 세포 수 비로 첨가하는 단계;

d. 기체 투과성 용기에서 약 6000 IU/ml 농도의 IL-2를 포함하는 제1 세포 배양 배지 내에서 AML 모세포 분획 및 MIL 세포 분획을 약 3일의 기간 동안 배양하는 단계;

e. 비드 상에 고정화된 항-CD3/항-CD28 항체를 세포 배양물에 약 1:1 (MIL:비드)의 비로 첨가하고, MIL 및 항체를 약 1일의 기간 동안 배양하는 단계;

f. 제1 세포 배양 배지를 약 3000 IU/ml 농도의 추가의 IL-2를 포함하는 제2 세포 배양 배지로 교체하는 단계;

g. 항체 비드 및 MIL을 약 3일의 추가의 기간 동안 배양하는 단계;

h. MIL을 IL-2 및 비드 상에 고정화된 항-CD3/항-CD28 항체로 적어도 약 4일의 추가의 기간 동안 재자극시키는 단계;

i. 제2 세포 배양 배지를 약 3000 IU/ml 농도의 추가의 IL-2를 포함하는 제3 세포 배양 배지로 적어도 약 3일의 추가의 기간 동안 교체하는 단계; 및

j. 상기 MIL을 수거하는 단계

를 포함하는, 골수로부터 골수-침윤 림프구 (MIL)를 확장시키는 방법.

청구항 106

a. 골수로부터 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 샘플을 수득하는 단계이며, 여기서 상기 샘플은 임의로 동결보존되는 것인 단계;

b. CD3+, CD33+, CD20+ 및 CD14+ 세포 분획 (MIL 분획) 및 비-CD3+, 비-CD33+, 비-CD20+ 및 비-CD14+ 세포 분획 (AML 모세포 분획)을 분류하는 단계;

c. 임의로 AML 모세포 분획을 파괴하는 단계;

d. 임의로 파괴된 AML 모세포 분획을 MIL 세포 분획에 약 0.1:1 내지 약 10:1의 세포 수 비로 첨가하는 단계;

e. 기체 투과성 용기에서 IL-2를 포함하는 제1 세포 배양 배지 내에서 하나 또는 둘 다의 세포 분획을 배양하는 단계;

f. MIL을 항-CD3/항-CD28 항체로 자극시켜 MIL의 확장을 얻는 단계;

g. MIL을 IL-2 및 항-CD3/항-CD28 항체로 약 2 내지 약 6일의 추가의 기간 동안 재자극시키는 단계;

h. MIL을 추가의 IL-2와 함께 약 1 내지 약 3일의 추가의 기간 동안 배양하는 단계;

i. 상기 MIL을 수거하는 단계; 및

j. 환자에게 상기 MIL을 치료 유효량으로 투여하여 혈액 악성종양을 치료하는 단계

를 포함하는, 혈액 악성종양을 치료하는 방법.

청구항 107

제106항에 있어서, 혈액 악성종양이 급성 골수성 백혈병 (AML), 외투 세포 림프종 (MCL), 여포성 림프종 (FL), 미만성 대 B 세포 림프종 (DLBCL), 활성화된 B 세포 (ABC) DLBCL, 배 중심 B 세포 (GCB) DLBCL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 백혈병 (SLL), 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 재발성 및/또는 불응성 호지킨 림프종, B 세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), 성숙 B-ALL, 버킷 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (WM), 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 골수섬유증, 만성 골수구성 백혈병, 여포 중심세포 림프종, 무통성 NHL, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 연관 B 세포 림프종, 및 엡스타인-바르 바이러스 (EBV) 연관 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 108

제107항에 있어서, 혈액 악성종양이 급성 골수성 백혈병 (AML)인 방법.

청구항 109

제106항에 있어서, 제1 세포 배양 배지가 CM-2, CM-4 및 AIM-V로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 110

제106항에 있어서, 단계 (e)를 수행한 후에, 추가의 IL-2를 첨가하고, 제1 세포 배양 배지를 제2 세포 배양 배지로 교체하는 것인 방법.

청구항 111

제110항에 있어서, 제2 세포 배양 배지가 CM-2, CM-4 및 AIM-V로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 112

제110항에 있어서, 제1 세포 배양 배지 및 제2 세포 배양 배지가 상이한 것인 방법.

청구항 113

제110항에 있어서, 제1 세포 배양 배지 및 제2 세포 배양 배지가 동일한 것인 방법.

청구항 114

제106항에 있어서, 단계 (e)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 약 $2x10^4$ 내지 약 $5x10^5$개 MIL이 존재하는 것인 방법.

청구항 115

제106항에 있어서, 단계 (e)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 약 $2.8x10^4$ 내지 $3.4x10^5$개 MIL이 존재하는 것인 방법.

청구항 116

제106항에 있어서, 단계 (d)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 $5x10^5$개 MIL이 존재하는 것인 방법.

청구항 117

제106항에 있어서, IL-2가 단계 (d)에서 1000 IU/ml 내지 6000 IL/ml의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 118

제117항에 있어서, IL-2가 약 6000 IU/ml의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 119

제106항에 있어서, IL-2가 단계 (f)에서 약 3000 IU/ml의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 120

제106항에 있어서, 단계 (e)에서의 배양이 약 3일의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

청구항 121

제106항에 있어서, 단계 (f)에서의 자극이 약 4일의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

청구항 122

제106항에 있어서, 단계 (g)에서의 자극이 약 7일의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 방법.

청구항 123

제106항에 있어서, 단계 (f) 후에 수행되는 추가의 IL-2 보충 단계를 포함하는 방법.

청구항 124

제123항에 있어서, 추가의 IL-2가 약 3000 IU/ml의 농도로 존재하는 것인 방법.

청구항 125

제106항에 있어서, 항-CD3/항-CD28 항체가 비드 상에 코팅되고, 비드:MIL 비가 각각의 단계 (f) 및 (g)에서 약 1:1인 방법.

청구항 126

제106항에 있어서, MIL이 약 $4x10^8$ 내지 약 $2.5x10^9$개 MIL의 양으로 투여되는 것인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2017년 5월 10일에 출원된 미국 가출원 번호 62/504,337; 2017년 7월 10일에 출원된 미국 가출원 번호 62/530,681; 2017년 8월 25일에 출원된 미국 가출원 번호 62/550,398; 2017년 11월 22일에 출원된 미국 가출원 번호 62/590,034; 2018년 1월 24일에 출원된 미국 가출원 번호 62/621,462; 2018년 1월 25일에 출원된 미국 가출원 번호 62/621,798; 및 2018년 3월 23일에 출원된 미국 가출원 번호 62/647,367을 우선권 주장하며, 이들은 모두 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 혈액 악성종양, 예컨대 액상 종양, 예를 들어 림프종 및 백혈병을 갖는 환자의 혈액 및/또는 골수로부터 유래된 종양 침윤 림프구 (TIL)를 확장시키는 방법 및 그로부터 수득된 TIL 집단을 포함하는 조성물이 본원에 개시된다. 추가로, 혈액 악성종양, 예컨대 액상 종양을 갖는 환자의 혈액 또는 골수로부터 확장된 TIL의 치료 용도, 예를 들어 상기 혈액 악성종양의 치료에서의 용도가 본원에 개시된다.

배 경 기 술

[0005] 종양 침윤 림프구 (TIL)의 입양 자가 전달을 사용하여 거대 불응성 암을 치료하는 것은 불량한 예후를 갖는 환자를 위한 요법에 대한 강력한 접근법을 나타낸다. 문헌 [Gattinoni, et al., Nat. Rev. Immunol. 2006, 6, 383-393]. TIL은 T 세포가 우세하며, IL-2-기반 TIL 확장에 이은 "급속 확장 방법" (REP)은 그의 속도 및 효율로 인해 TIL 확장을 위한 바람직한 방법이 되었다. 문헌 [Dudley, et al., Science 2002, 298, 850-54; Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-57; Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-39; Riddell, et al., Science 1992, 257, 238-41; Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42]. 흑색종에서 TIL 요법에 대한 반응을 개선시키고 TIL 요법을 다른 종양 유형으로 확대시키기 위한 다수의 접근법이 제한적인 성공 하에 탐구되었으며, 그 분야는 도전과제로 남아있다. 문헌 [Goff, et al., J. Clin. Oncol. 2016, 34, 2389-97; Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-39; Rosenberg, et al., Clin. Cancer Res. 2011, 17, 4550-57]. B 세포 림프종으로부터의 TIL의 확장에 대한 초기 접근법은 TIL 성장에서의 12회 시도 중 2회만이 종양에 대한 잠재적 활성을 제공하는 불량한 결과를 가져왔다. 문헌 [Schwartzentruber, et al., Blood 1993, 82, 1204-1211]. 급성 골수성 백혈병 (AML) 및 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 포함한 많은 혈액 악성종양에서 보다 효과적인 요법을 제공하는 것이 시급히 필요하다.

[0006] 본 발명은 TIL 확장 방법이 혈액 악성종양, 예컨대 액상 종양, 예를 들어 림프종 또는 백혈병으로부터 수득된 효과적인 TIL 집단을 생성할 수 있다는 놀라운 발견을 제공한다.

발명의 내용

[0007] 한 실시양태에서, 본 발명은

[0008] (a) 임의로 적어도 1종의 키나제 억제제를 포함하는 요법으로 환자를 사전-치료하는 단계;

[0009] (b) 절제, 생검, 바늘 흡인 또는 분리반출술에 의해 환자로부터 종양을 수득하는 단계이며, 상기 종양은 제1 종

양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 포함하는 것인 단계;

[0010] (c) 임의로 종양을 단편화 또는 해리시켜 종양 단편을 수득하고 종양 단편을 제1 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계;

[0011] (d) 제1 세포 배양 배지에서 제1 TIL 집단의 초기 확장을 수행하여 제2 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제2 TIL 집단은 제1 TIL 집단보다 수가 적어도 5배 더 많고, 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함하고, 초기 확장은 21일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계;

[0012] (e) 제2 세포 배양 배지에서 제2 TIL 집단의 제2 확장을 수행하여 제3 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제3 TIL 집단은 제2 확장의 시작으로부터 7일 후 제2 TIL 집단보다 수가 적어도 50배 더 많고, 제2 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3 (항-CD3 항체) 및 조사된 동종 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함하고, 제2 확장은 14일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계;

[0013] (f) 제3 TIL 집단을 수거하는 단계; 및

[0014] (g) 암을 갖는 환자에게 치료 유효 분량의 제3 TIL 집단을 투여하는 단계

[0015] 를 포함하며, 여기서 종양은 액상 종양이고, 암은 혈액 악성종양인,

[0016] 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 사용하여 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0017] 한 실시양태에서, 본 발명은

[0018] (a) 임의로 적어도 1종의 키나제 억제제를 포함하는 요법으로 환자를 사전-치료하는 단계;

[0019] (b) 절제, 생검, 바늘 흡인 또는 분리반출술에 의해 환자로부터 종양을 수득하는 단계이며, 상기 종양은 제1 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 포함하는 것인 단계;

[0020] (c) 임의로 종양을 단편화 또는 해리시켜 종양 단편을 수득하고 종양 단편을 제1 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계;

[0021] (d) 제1 세포 배양 배지에서 제1 TIL 집단의 초기 확장을 수행하여 제2 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제2 TIL 집단은 제1 TIL 집단보다 수가 적어도 5배 더 많고, 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함하고, 초기 확장은 21일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계;

[0022] (e) 제2 세포 배양 배지에서 제2 TIL 집단의 제2 확장을 수행하여 제3 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제3 TIL 집단은 제2 확장의 시작으로부터 7일 후 제2 TIL 집단보다 수가 적어도 50배 더 많고, 제2 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3 (항-CD3 항체) 및 조사된 동종 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함하고, 제2 확장은 14일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계;

[0023] (f) 제3 TIL 집단을 수거하는 단계; 및

[0024] (g) 암을 갖는 환자에게 치료 유효 분량의 제3 TIL 집단을 투여하는 단계

[0025] 를 포함하며, 여기서 종양은 액상 종양이고, 암은 급성 골수성 백혈병 (AML), 외투 세포 림프종 (MCL), 여포성 림프종 (FL), 미만성 대 B 세포 림프종 (DLBCL), 활성화된 B 세포 (ABC) DLBCL, 배 중심 B 세포 (GCB) DLBCL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 백혈병 (SLL), 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 재발성 및/또는 불응성 호지킨 림프종, B 세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), 성숙 B-ALL, 버킷 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (WM), 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 골수섬유증, 만성 골수구성 백혈병, 여포 중심세포 림프종, 무통성 NHL, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 연관 B 세포 림프종, 및 엡스타인-바르 바이러스 (EBV) 연관 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 혈액 악성종양인,

[0026] 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 사용하여 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 ITK 억제제의 첨가를 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, ITK 억제제는 단계 (d) 및 (e) 중 적어도 하나 동안 세포 배양 배지에 첨가된다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 ITK에 공유적으로 및 비가역적으로 결합하는 공유 ITK 억제제이다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 ITK에 결합하는 알로스테릭 ITK 억제제이다. 또 다른 실시양태에서, ITK 억제제는 아미노티아졸-기재 ITK 억제제, 벤즈이미다졸-기재 ITK 억제제, 아미노피리미딘-기재 ITK 억제제, 3-아미노피리드-2-온-기재 ITK 억제제, 인돌릴인다졸-기재 ITK 억제제, 피라졸릴-인돌-기재 억제제, 티에노피라졸 억제제, 및 ATP 포켓 내의 시스테인-

442를 표적화하는 ITK 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, ITK 억제제는 이브루티닙, 다사티닙, 보수티닙, 닐로티닙, 에를로티닙, BMS509744, CTA056, GSK2250665A, PF06465469 ((R)-3-(1-(1-아크릴로일피페리딘-3-일)-4-아미노-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-3-일)-N-(3-메틸-4-(1-메틸에틸))벤즈아미드), 및 그의 조합이다. 또 다른 실시양태에서, ITK 억제제는 이브루티닙이다. 또 다른 실시양태에서, ITK 억제제는 (R)-3-(1-(1-아크릴로일피페리딘-3-일)-4-아미노-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-3-일)-N-(3-메틸-4-(1-메틸에틸))벤즈아미드이다. 상기 ITK 억제제는 토크리스 바이오사이언스, 인크.(Tocris Bioscience, Inc.) (미국 미네소타주 미네아폴리스), 셀레크켐, 인크.(Selleckchem, Inc.) (미국 텍사스주 휴스턴), 및 에이케이 사이언티픽, 인크.(AK Scientific, Inc.) (미국 캘리포니아주 유니온 시티)를 포함한 다양한 공급업체로부터 상업적으로 입수가능하다. 또 다른 실시양태에서, ITK 억제제는 약 0.1 nM 내지 약 5 μM의 농도로 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, ITK 억제제는 약 0.1 nM 내지 약 5 μM의 농도로 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, ITK 억제제는 약 0.1 nM 내지 약 100 nM의 농도로 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, ITK 억제제는 약 0.5 nM 내지 약 50 nM의 농도로 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, ITK 억제제는 약 1 nM 내지 약 10 nM의 농도로 첨가된다. 한 실시양태에서, ITK 억제제는 약 0.01 nM, 0.05 nM, 0.1 nM, 0.5 nM, 1 nM, 2 nM, 5 nM, 10 nM, 20 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 60 nM, 70 nM, 80 nM, 90 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM, 500 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM, 900 nM, 1 μM, 2 μM, 3 μM, 4 μM, 5 μM, 10 μM, 20 μM, 30 μM, 40 μM, 및 50 μM의 농도로 첨가된다.

[0028] 본 발명의 한 실시양태에서, 말초 혈액으로부터 말초 혈액 림프구 (PBL)를 확장시키는 방법은

[0029] a. 말초 혈액으로부터 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 샘플을 수득하는 단계이며, 여기서 상기 샘플은 임의로 동결보존되는 것인 단계;

[0030] b. 상기 샘플로부터 CD19+ B 세포를 선택하고 제거함으로써 PBL을 단리하는 단계;

[0031] c. 임의로 상기 PBL을 상기 CD19+ B 세포와 함께 공동-배양하는 단계;

[0032] d. 기체 투과성 용기에서 제1 세포 배양 배지 내에서 상기 PBL을 IL-2 및 항-CD3/항-CD28 항체로 약 2일 내지 약 6일의 기간 동안 자극시키는 단계;

[0033] e. 단계 (d)로부터의 PBL을 IL-2 및 항-CD3/항-CD28 항체와 함께 약 2일 내지 약 6일의 기간 동안 배양하는 단계;

[0034] f. 단계 (e)에서의 배양물로부터 항체-결합된 PBL을 단리하는 단계;

[0035] g. 단계 (e)에서 단리된 PBL로부터 항체를 제거하는 단계; 및

[0036] h. PBL을 수거하는 단계

[0037] 를 포함한다.

[0038] 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 단계 (d) 후에 IL-2를 첨가하고, 제1 배양 배지를 제2 세포 배양 배지로 교체하는 것을 추가로 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 단계 (e) 후에 IL-2를 첨가하고, 제2 배양 배지를 제3 배양 배지로 교체하는 것을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 제1 세포 배양 배지, 제2 세포 배양 배지 또는 제3 배양 배지는 CM-2, CM-4 및 AIM-V로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 세포 배양 배지는 동일하다. 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 세포 배양 배지는 상이하다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제1, 제2 및 제3 세포 배양 배지 중 하나 이상은 동일하다. 또 다른 실시양태에서, 제1, 제2 및 제3 세포 배양 배지는 모두 상이하다.

[0039] 한 실시양태에서, 상기 PBL과 상기 CD19+ B 세포의 임의적인 공동-배양은 1시간 내지 3일의 기간 동안 수행된다.

[0040] 본 발명의 한 실시양태에서, 단계 (c)에서 T-세포 대 B-세포의 비는 약 0.1:1 내지 약 10:1 (B-세포:T-세포)이다. 또 다른 실시양태에서, 단계 (c)에서 B-세포 대 T-세포의 비는 0.1:1, 1:1 및 10:1 (B-세포:T-세포)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0041] 본 발명의 한 실시양태에서, 단계 (d)의 시작시 PBL의 출발 세포 수는 적어도 약 $1x10^5$ 내지 약 $10x10^5$개 PBL이다. 또 다른 실시양태에서, 단계 (d)의 시작시 PBL의 출발 세포 수는 적어도 약 $2.5x10^5$ 내지 $10x10^5$개 PBL이다. 또 다른 실시양태에서, 단계 (d)의 시작시 PBL의 출발 세포 수는 $5x10^5$개 PBL이다.

[0042] 본 발명의 한 실시양태에서, 각각의 단계 (c) 및 (d)에서의 IL-2는 약 1000 IU/mL 내지 약 6000 IU/mL의 농도로 사용된다. 또 다른 실시양태에서, 각각의 단계 (c) 및 (d)에서의 IL-2는 약 3000 IU/mL의 농도로 사용된다.

[0043] 본 발명의 한 실시양태에서, 항-CD3/항-CD28 항체는 비드 상에 코팅된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항-CD3/항-CD28 항체는 디나비즈(DynaBeads)®이다. 한 실시양태에서, 방법은 각각의 단계 (c) 및 (d)에서 항-CD3/항-CD28 항체 비드를 PBL과 함께 약 1:1 비드:PBL 비로 공동-배양하는 것을 포함한다.

[0044] 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 ITK 억제제를 첨가하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, ITK 억제제는 단계 (c), (d) 및 (e) 중 적어도 하나 동안 첨가된다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 아미노티아졸-기재 ITK 억제제, 벤즈이미다졸-기재 ITK 억제제, 아미노피리미딘-기재 ITK 억제제, 3-아미노피리드-2-온-기재 ITK 억제제, 인돌릴인다졸-기재 ITK 억제제, 피라졸릴-인돌-기재 억제제, 티에노피라졸 억제제, 및 ATP 포켓 내의 시스테인-442를 표적화하는 ITK 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, ITK 억제제는 이브루티닙, 다사티닙, 보수티닙, 닐로티닙, 에를로티닙, BMS509744, CTA056, GSK2250665A, PF06465469, 및 그의 조합이다. 또 다른 실시양태에서, ITK 억제제는 이브루티닙이다.

[0045] 본 발명의 한 실시양태에서, PBL을 제조하기 위한 임의의 상기 방법은 폐쇄된 멸균 시스템에서 수행된다.

[0046] 본 발명의 한 실시양태에서, 말초 혈액으로부터 말초 혈액 림프구 (PBL)를 확장시키는 방법은

[0047] a. 말초 혈액으로부터 PBMC 샘플을 수득하는 단계이며, 여기서 상기 샘플은 임의로 동결보존되는 것인 단계;

[0048] b. 상기 샘플로부터 CD19+ B 세포를 선택하고 제거함으로써 PBL을 단리하는 단계;

[0049] c. 상기 PBL을 상기 CD19+ B 세포와 함께 4일의 기간 동안 공동-배양하는 단계;

[0050] d. 약 $2.5x10^5$ 내지 약 $5x10^5$개 세포를 기체-투과성 용기 내의 CM-2 세포 배양 배지에 첨가하고, 상기 PBL을 3000 IU/ml IL-2 및 비드 상에 고정화된 항-CD3/항-CD28 항체로 약 4일의 기간 동안 자극시키는 단계;

[0051] e. CM-2를 AIM-V 세포 배양 배지 및 약 3000 IU/ml의 추가의 IL-2로 교체하는 단계;

[0052] f. 단계 (e)로부터의 PBL을 IL-2 및 비드 상에 고정화된 항-CD3/항-CD28 항체와 함께 약 3일의 추가의 기간 동안 배양하는 단계;

[0053] g. 단계 (f)에서의 배양물로부터 항체-결합된 PBL을 단리하는 단계;

[0054] h. 단계 (g)에서 단리된 PBL로부터 항체를 제거하는 단계; 및

[0055] i. PBL을 수거하는 단계

[0056] 를 포함한다.

[0057] 본 발명의 한 실시양태에서, 혈액 악성종양을 치료하는 방법은

[0058] a. 혈액 악성종양을 앓고 있는 환자의 말초 혈액으로부터 PBMC 샘플을 수득하는 단계;

[0059] b. 상기 샘플로부터 CD19+ B 세포를 선택하고 제거함으로써 PBL을 단리하는 단계;

[0060] c. 임의로 상기 PBL을 상기 CD19+ B 세포와 함께 공동-배양하는 단계;

[0061] d. 기체 투과성 용기에서 제1 세포 배양 배지 내에서 상기 PBL을 IL-2 및 항-CD3/항-CD28 항체로 적어도 약 4일의 기간 동안 자극시키는 단계;

[0062] e. 단계 (d)로부터의 PBL을 IL-2 및 항-CD3/항-CD28 항체와 함께 3일의 기간 동안 배양하는 단계;

[0063] f. 단계 (e)에서의 배양물로부터 항체-결합된 PBL을 단리하는 단계;

[0064] g. 단계 (e)에서 단리된 PBL로부터 항체를 제거하는 단계;

[0065] h. PBL을 수거하는 단계; 및

[0066] i. 환자에게 PBL을 치료 유효량으로 투여하여 상기 혈액 악성종양을 치료하는 단계

[0067] 를 포함한다.

[0068] 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 ITK 억제제로 사전-치료된 환자로부터 PBMC 샘플을 수득하는 것을 추가로

포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 아미노티아졸-기재 ITK 억제제, 벤즈이미다졸-기재 ITK 억제제, 아미노피리미딘-기재 ITK 억제제, 3-아미노피리드-2-온-기재 ITK 억제제, 인돌릴인다졸-기재 ITK 억제제, 피라졸릴-인돌-기재 억제제, 티에노피라졸 억제제, 및 ATP 포켓 내의 시스테인-442를 표적화하는 ITK 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 이브루티닙, BMS509744, CTA056, GSK2250665A, PF06465469, 및 그의 조합이다. 또 다른 실시양태에서, ITK 억제제는 이브루티닙이다. 또 다른 실시양태에서, 환자는 적어도 3회의 이브루티닙 요법으로 사전-치료된다.

[0069] 본 발명의 한 실시양태에서, 혈액 악성종양은 급성 골수성 백혈병 (AML), 외투 세포 림프종 (MCL), 여포성 림프종 (FL), 미만성 대 B 세포 림프종 (DLBCL), 활성화된 B 세포 (ABC) DLBCL, 배 중심 B 세포 (GCB) DLBCL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 백혈병 (SLL), 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 재발성 및/또는 불응성 호지킨 림프종, B 세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), 성숙 B-ALL, 버킷 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (WM), 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 골수섬유증, 만성 골수구성 백혈병, 여포 중심세포 림프종, 무통성 NHL, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 연관 B 세포 림프종, 및 엡스타인-바르 바이러스 (EBV) 연관 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 혈액 악성종양은 만성 림프구성 백혈병 (CLL)이다. 본 발명의 한 실시양태에서, PBL은 약 $0.1x10^9$ 내지 약 $15x10^9$개 PBL의 양으로 투여된다.

[0070] 본 발명의 한 실시양태에서, 골수로부터 골수-침윤 림프구 (MIL)를 확장시키는 방법은

[0071] a. 골수로부터 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 샘플을 수득하는 단계이며, 여기서 상기 샘플은 임의로 동결보존되는 것인 단계;

[0072] b. CD3+, CD33+, CD20+ 및 CD14+ 세포 분획 (MIL 분획) 및 비-CD3+, 비-CD33+, 비-CD20+, 비-CD14+ 세포 분획 (AML 모세포 분획)을 분류하는 단계;

[0073] c. 임의로 AML 모세포 분획을 파괴하는 단계;

[0074] d. 임의로 파괴된 AML 모세포 분획을 MIL 분획에 약 0.1:1 내지 약 10:1의 세포 수 비로 첨가하는 단계;

[0075] e. 기체 투과성 용기에서 IL-2를 포함하는 제1 세포 배양 배지 내에서 하나 또는 둘 다의 세포 분획을 배양하는 단계;

[0076] f. MIL을 항-CD3/항-CD28 항체로 자극시켜 MIL의 확장을 얻는 단계;

[0077] g. MIL을 IL-2 및 항-CD3/항-CD28 항체로 약 2 내지 약 6일의 추가의 기간 동안 자극시키는 단계;

[0078] h. MIL을 추가의 IL-2와 함께 약 1 내지 약 3일의 추가의 기간 동안 배양하는 단계; 및

[0079] i. 상기 MIL을 수거하는 단계

[0080] 를 포함한다.

[0081] 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 단계 (e) 후에 IL-2를 첨가하고, 배양 배지를 제2 세포 배양 배지로 교체하는 것을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 제1 세포 배양 배지 및 제2 세포 배양 배지는 CM-2, CM-4 및 AIM-V로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 세포 배양 배지는 동일하다. 또 다른 실시양태에서, 제1 및 제2 세포 배양 배지는 상이하다.

[0082] 한 실시양태에서, 단계 (e)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 약 $2x10^4$ 내지 약 $5x10^5$개 MIL이 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 단계 (e)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 약 $2.8x10^4$ 내지 $3.4x10^5$개 MIL이 존재한다. 또 다른 실시양태에서, 단계 (e)의 시작시 기체 투과성 용기에 적어도 $5x10^5$개 MIL이 존재한다.

[0083] 본 발명의 한 실시양태에서, IL-2는 단계 (e)에서 1000 IU/ml 내지 6000 IL/ml의 농도로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, IL-2는 약 6000 IU/ml의 농도로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, IL-2는 단계 (g)에서 약 3000 IU/ml의 농도로 존재한다. 또 다른 실시양태에서, IL-2는 단계 (h)에서 약 3000 IU/ml의 농도로 존재한다.

[0084] 본 발명의 한 실시양태에서, 단계 (e)에서의 배양은 약 3일의 기간에 걸쳐 수행된다. 한 실시양태에서, 단계 (f)에서의 자극은 약 4일의 기간에 걸쳐 수행된다. 한 실시양태에서, 단계 (g)에서의 자극은 약 7일의 기간에 걸쳐 수행된다.

[0085] 본 발명의 한 실시양태에서, 임의로 파괴된 세포 분획은 초음파처리, 균질화, 볼텍싱, 진동 및 용해로 이루어진

군으로부터 선택된 방법을 사용하여 파괴된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 비-CD3+, 비-CD33+, 비-CD20+, 비-CD14+ 세포 분획 (AML 모세포 분획)은 고온 용해, 화학적 용해 (예컨대 유기 알콜), 효소 용해, 및 관련 기술분야에 공지된 다른 세포 용해 방법을 포함한 적합한 용해 방법을 사용하여 용해된다.

[0086] 본 발명의 한 실시양태에서, 항-CD3/항-CD28 항체는 비드 상에 코팅되고, MIL:비드 비는 각각의 단계 (f) 및 (g)에서 약 1:1이다.

[0087] 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 폐쇄된 멸균 시스템에서 수행된다.

[0088] 본 발명의 한 실시양태에서, 골수로부터 골수 침윤 림프구 (MIL)를 확장시키는 방법은

[0089] a. 골수로부터 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 샘플을 수득하는 단계이며, 여기서 상기 샘플은 임의로 동결보존되는 것인 단계;

[0090] b. CD3+, CD33+, CD20+ 및 CD14+ 세포 분획 (MIL 세포 분획) 및 비-CD3+, 비-CD33+, 비-CD20+, 비-CD14+ 세포 분획 (AML 모세포 분획)을 분류하는 단계;

[0091] c. AML 모세포 분획을 파괴하고, 파괴된 AML 모세포 분획을 MIL 세포 분획에 약 1:1의 세포 수 비로 첨가하는 단계;

[0092] d. 기체 투과성 용기에서 세포 분획을 약 6000 IU/ml의 IL-2를 포함하는 제1 세포 배양 배지와 함께 약 3일의 기간 동안 배양하는 단계;

[0093] e. 비드 상에 고정화된 항-CD3/항-CD28 항체를 세포 배양물에 약 1:1 (MIL:비드)의 비로 첨가하고, MIL 및 항체를 약 1일의 기간 동안 배양하는 단계;

[0094] f. 제1 세포 배양 배지를 약 3000 IU/ml의 추가의 IL-2를 포함하는 제2 세포 배양 배지로 교체하는 단계;

[0095] g. 항체 및 MIL을 약 3일의 추가의 기간 동안 배양하는 단계;

[0096] h. MIL을 IL-2 및 비드 상에 고정화된 항-CD3/항-CD28 항체로 적어도 약 4일의 추가의 기간 동안 재자극시키는 단계;

[0097] i. 제2 세포 배양 배지를 약 3000 IU/ml의 추가의 IL-2를 포함하는 제3 세포 배양 배지로 적어도 약 3일의 추가의 기간 동안 교체하는 단계; 및

[0098] j. 상기 MIL을 수거하는 단계

[0099] 를 포함한다.

[0100] 본 발명의 한 실시양태에서, 혈액 악성종양을 치료하는 방법은

[0101] a. 골수로부터 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 샘플을 수득하는 단계이며, 여기서 상기 샘플은 임의로 동결보존되는 것인 단계;

[0102] b. CD3+, CD33+, CD20+ 및 CD14+ 세포 분획 (MIL 분획) 및 비-CD3+, 비-CD33+, 비-CD20+, 비-CD14+ 세포 분획 (AML 모세포 분획)을 분류하는 단계;

[0103] c. 임의로 AML 모세포 분획을 파괴하는 단계;

[0104] d. 임의로 파괴된 AML 모세포 분획을 MIL 분획에 약 0.1:1 내지 약 10:1의 세포 수 비로 첨가하는 단계;

[0105] e. 기체 투과성 용기에서 IL-2를 포함하는 제1 세포 배양 배지 내에서 하나 또는 둘 다의 세포 분획을 배양하는 단계;

[0106] f. 상기 샘플을 항-CD3/항-CD28 항체로 자극시키는 단계;

[0107] g. MIL을 IL-2 및 항-CD3/항-CD28 항체로 적어도 약 4일의 추가의 기간 동안 재자극시키는 단계;

[0108] h. MIL을 추가의 IL-2로 적어도 약 3일의 추가의 기간 동안 배양하는 단계;

[0109] i. 상기 MIL을 수거하는 단계; 및

[0110] j. 환자에게 상기 MIL을 치료 유효량으로 투여하여 혈액 악성종양을 치료하는 단계

[0111] 를 포함한다.

[0112] 본 발명의 한 실시양태에서, 혈액 악성종양은 급성 골수성 백혈병 (AML), 외투 세포 림프종 (MCL), 여포성 림프종 (FL), 미만성 대 B 세포 림프종 (DLBCL), 활성화된 B 세포 (ABC) DLBCL, 배 중심 B 세포 (GCB) DLBCL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 백혈병 (SLL), 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 재발성 및/또는 불응성 호지킨 림프종, B 세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), 성숙 B-ALL, 버킷 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (WM), 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 골수섬유증, 만성 골수구성 백혈병, 여포 중심세포 림프종, 무통성 NHL, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 연관 B 세포 림프종, 및 엡스타인-바르 바이러스 (EBV) 연관 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 혈액 악성종양은 급성 골수성 백혈병 (AML)이다. 본 발명의 한 실시양태에서, MIL은 약 $4x10^8$ 내지 약 $2.5x10^9$개 MIL의 양으로 투여된다.

도면의 간단한 설명

[0113] 본 발명의 상기 개요 뿐만 아니라 하기 상세한 설명은 첨부 도면과 함께 읽을 경우 더 잘 이해될 것이다.

도 1은 림프종 종양에 대한 병리상태 정보를 예시한다.

도 2는 림프종 및 흑색종 TIL의 상이한 하위세트의 비교를 예시하며, 림프종 TIL에서의 이펙터 기억 (EM) 하위세트가 흑색종 TIL에서의 EM 하위세트보다 유의하게 더 높다는 것을 보여준다.

도 3은 림프종 및 흑색종 TIL의 상이한 하위세트의 비교를 예시하며, 림프종 TIL에서의 $CD28^+CD4^+$ 하위세트가 흑색종 TIL에서의 이들 하위세트보다 유의하게 더 높다는 것을 보여준다.

도 4는 분화 마커를 나타내는, 비-호지킨 림프종 TIL 및 흑색종 TIL의 $CD4^+$ T 세포 하위세트의 비교를 예시한다. 그래프에서의 적색 선은 중앙값을 나타낸다. CM은 중심 기억 T 세포를 지칭하고, EM은 이펙터 기억 T 세포를 지칭하고, TEMRA는 이펙터 기억 $CD45RA^+$ T 세포를 지칭한다.

도 5는 분화 마커를 나타내는, 비-호지킨 림프종 TIL 및 흑색종 TIL의 $CD8^+$ T 세포 하위세트의 비교를 예시한다. 그래프에서의 적색 선은 중앙값을 나타낸다. CM은 중심 기억 T 세포를 지칭하고, EM은 이펙터 기억 T 세포를 지칭하고, TEMRA는 이펙터 기억 $CD45RA^+$ T 세포를 지칭한다.

도 6은 소진 마커를 나타내는, 비-호지킨 림프종 TIL 및 흑색종 TIL의 $CD4^+$ T 세포 하위세트의 비교를 예시한다. 그래프에서의 적색 선은 중앙값을 나타낸다. LAG3은 림프구-활성화 유전자 3을 지칭하고, PD1은 프로그램화된 사멸 1을 지칭하고, TIGIT는 Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체를 지칭한다.

도 7은 소진 마커를 나타내는, 비-호지킨 림프종 TIL 및 흑색종 TIL의 $CD8^+$ T 세포 하위세트의 비교를 예시한다. 그래프에서의 적색 선은 중앙값을 나타낸다. LAG3은 림프구-활성화 유전자 3을 지칭하고, PD1은 프로그램화된 사멸 1을 지칭하고, TIGIT는 Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체를 지칭한다.

도 8은 비-호지킨 림프종 TIL과 흑색종 TIL 사이의 세포 유형의 비교를 예시한다. NK는 자연 킬러 세포를 지칭하고, TCRab는 알파 및 베타 쇄를 갖는 T 세포 수용체를 발현하는 세포를 지칭한다.

도 9는 생물발광 재지시 용해 검정 (BRLA) 결과를 예시한다.

도 10은 림프종 TIL 대 흑색종 TIL에 대한 인터페론-γ (IFN-γ) 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA) 결과를 예시한다.

도 11은 림프종 TIL에 대한 효소-연결 이뮤노스팟 (ELIspot) 검정 결과를 예시한다.

도 12는 흑색종 TIL에 대한 ELIspot 검정 결과를 예시한다.

도 13은 나노스트링 엔카운터(NANOSTRING NCOUNTER) 분석의 결과를 예시하며, 림프종 TIL이 흑색종 TIL과 비교하여 더 높은 수준의 RORC IL17A (TH17 표현형) 및 GATA3 (Th2 표현형)을 발현한다는 것을 보여준다. 각각의 유전자가 열 지도에서 적색 박스로 강조표시되어 있다.

도 14는 TIL 확장 및 처리 방법을 예시한다. 단계 1은 4개의 종양 단편을 10개의 지-렉스(G-Rex) 10 플라스크에 첨가하는 것을 나타낸다. 단계 2에서, 대략 40 x 10^6개 이상의 TIL이 수득된다. 단계 3에서 REP를 위해 36개의 지-렉스 100 플라스크로 분할이 이루어진다. 단계 4에서 원심분리에 의해 TIL이 수거된다. 대략 43일의

방법의 총 시간 후 단계 5에서 신선한 TIL 제품이 수득되고, 이 시점에서 TIL이 환자에게 주입될 수 있다.

도 15는 본 개시내용의 림프종으로부터 수득된 TIL로 사용하기 위한 치료 프로토콜을 예시한다. 수술 (및 종양 절제)은 시작시에 이루어지고, 림프구고갈 화학요법은 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 화학요법을 사용한 비-골수절제 림프구고갈을 지칭한다.

도 16은 하기 실시예 4에 기재된 바와 같은 표준 표현형 패널 DF2를 사용한 유동 세포측정 분석의 결과를 나타낸다. 림프종 및 흑색종 TIL을 실시예 4에 기재된 바와 같이 표준 표현형 패널 DF2를 사용하여 염색하였다. 제시된 데이터는 TIL에서의 총 CD4 및 CD8 T 세포의 상이한 하위집단을 나타낸다. 도 16A는 나이브 T-세포 하위세트에 대한; 도 16B는 중심 기억 T-세포 하위세트 (CM)에 대한; 도 16C는 이펙터 기억 T-세포 하위세트 (EM)에 대한; 및 도 16D는 말단 분화된 이펙터 기억 (TEMRA) T-세포 하위세트에 대한 CD4 및 CD8 세포의 비율을 나타낸다. 양측 만-휘트니 검정 (독립표본)을 사용하여 P-값을 계산하였다. 세포 하위세트의 평균 비율은 수평 막대에 의해 사전제시된다.

도 17은 하기 실시예 4에 기재된 바와 같은 표준 표현형 패널 DF1을 사용한 유동 세포측정 분석의 결과를 나타낸다. 림프종 및 흑색종 TIL을 실시예 4에 기재된 바와 같이 표준 표현형 패널 DF1을 사용하여 염색하였다. 제시된 데이터는 TIL에서의 총 CD4 및 CD9 T-세포의 상이한 CD27+ (도 17A) 및 CD28+ (도 17B) 하위집단을 나타내며, 이는 림프종 TIL에서 더 높은 비율의 공동자극 분자-CD28 발현 CD4 T-세포를 나타낸다. 양측 만-휘트니 검정 (독립표본)을 사용하여 P 값을 계산하였다.

도 18은 하기 실시예 4에 따라 수행된 인터페론-감마 (IFN-γ) 시험의 결과를 나타낸다. 도 18A는 ELIspot을 사용한 결과를 나타낸다. ELIspot 데이터는 10^6개 TIL당 IFN-γ 생산 세포로서 표현된다. 도 18B는 ELISA를 사용한 결과를 나타낸다. ELISA 데이터는 ELISA (로그 척도)에 의해 측정시 $5x10^5$개 TIL/웰의 TIL 배양물로부터의 상청액 중 IFN-γ 수준으로서 표현된다. 양측 만-휘트니 검정 (독립표본)을 사용하여 P 값을 계산하였다.

도 19는 TIL의 용해 잠재력을 나타낸다. 도 19A는 공동-배양물 (TIL 이펙터 세포와 GFP+P815 표적 세포) 중 4시간 (도 19A) 및 24시간 (도 19B)에서 10^6개 TIL에 대해 정규화된 표적 세포의 LU_{50}을 보여준다.

도 20은 동종 및 자가 종양 유형에 대한 상이한 TIL의 세포용해 활성을 나타낸다. 도 20A는 동종 526개 표적 세포에 대한 흑색종 TIL의 세포용해 활성을 보여준다. 도 20B는 7-AAD 흡수에 의해 결정된 자가 종양 세포에 대한 림프종 TIL의 세포용해 활성을 보여준다. 도 20A 및 도 20B에서의 데이터는 50:1 이펙터 세포:표적 세포 (E:T) 비를 갖는 공동-배양물 중 퍼센트 사멸 세포로서 제시된다. 도 20C는 흑색종 TIL에 의해 유도된 표적 세포의 퍼센트 사멸을 나타낸다. 도 20D는 상이한 E:T 비에서 림프종 TIL에 의해 유도된 표적 세포의 퍼센트 사멸을 나타낸다.

도 21은 림프종 및 흑색종 TIL의 유전자 발현 프로파일을 보여주는 열 지도이다. 나노스트링으로부터의 579 플렉스 엔카운터 GX 인간 면역학 V2 CSO 패널에 의해 발현 프로파일을 결정하였다. 열 지도는 흑색종 TIL과 비교하여 림프종 TIL에서 특정한 세트의 유전자의 발현의 배수 변화를 보여주고, 림프종-유래 TIL로부터의 IL-17A 및 RORC의 더 높은 발현을 시사한다. 이 도면에 제시된 암은 여포성 림프종 (FL), 미만성 대 B 세포 림프종 (DLBCL) 및 외투 세포 림프종 (MCL)을 포함한다.

도 22는 TIL을 제조하는 2A 방법, 수거 및 수송 스케줄을 나타내는 개략도이다.

도 23은 TIL을 제조하는 2A 방법을 나타내는 흐름도이다.

도 24는 말초 혈액 림프구 (PBL)를 확장시키기 위한 3가지 상이한 방법을 나타내는 흐름도이다.

도 25A-25C는 골수로부터의 골수 침윤 림프구 (MIL)를 확장시키기 위한 3가지 상이한 방법을 나타낸다.

도 26은 신선한 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 및 동결보존된 PBMC로부터 단리된 PBL에 대한 배수 확장의 그래프를 나타낸다. 동결보존된 PBMC는 이브루티닙 요법으로 치료되지 않은 CLL 환자로부터 유래되거나 (PreRx PBL) 또는 이브루티닙 요법으로 치료된 CLL 환자로부터 유래된다 (PostRx PBL). 각각의 도 26-34에 대해, 각각의 점은 1명의 환자이다. 적색 점은 PBL 방법 1을 사용하여 PBL을 확장시킨 환자이고; 녹색 점은 PBL 방법 2를 사용하여 PBL을 확장시킨 환자이고; 흑색 점은 PBL 방법 3을 사용하여 PBL을 확장시킨 환자이다.

도 27은 신선한 PBMC 및 동결보존된 PBMC로부터 단리된 PBL에 대한 IFN-γ 생산 세포의 그래프를 나타낸다. 동결보존된 PBMC 내에서, PreRx PBL 및 PostRx PBL이 또한 나타내어진다.

도 28은 비교자로서 흑색종 TIL을 사용하여, PreRx PBL 및 PostRx PBL 중 CD4+ 및 CD8+ T 세포 하위세트의 비율을 나타낸다.

도 29A-29D 및 도 30A-30D는 비교자로서 흑색종 TIL을 사용하여, PreRx PBL 및 PostRx PBL의 CD4 (도 29)와 CD8 (도 30) 기억 하위세트 사이의 비교를 나타낸다. 도 29A 및 30A는 나이브 (CCR7+/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여주고; 도 29B 및 30B는 중심 기억 t-세포 (CM) (CCR7+/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 29C 및 30C는 이펙터 기억 T-세포 (EM) (CCR7-/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 29D 및 30D는 말단 분화된 이펙터 기억 세포 (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여준다.

도 31A 및 31B는 비교자로서 흑색종 TIL을 사용하여, PreRx PBL 및 PostRx PBL에 대한 CD4 (도 31A) 및 CD8 (도 31B) 하위세트의 CD27 하위세트의 비교를 나타낸다.

도 32A 및 32B는 비교자로서 흑색종 TIL을 사용하여, PreRx PBL 및 PostRx PBL에 대한 CD4 (도 32A) 및 CD8 (도 32B) 하위세트의 CD28 하위세트의 비교를 나타낸다.

도 33A 및 33B는 PreRx PBL 및 PostRx PBL 둘 다에 대한 CD4 (도 33A) 및 CD8 (도 33B) 집단 내의 LAG3+ 하위세트의 비교를 나타낸다.

도 34A 및 34B는 PreRx PBL 및 PostRx PBL 둘 다에 대한 CD4 (도 34A) 및 CD8 (도 34B) 집단 내의 PD1+ 하위세트의 비교를 나타낸다.

도 35A 및 35B는 자가 종양 사멸 검정을 사용하여 측정된, PreRx PBL (도 35A) 및 PostRx PBL (도 35B)의 세포용해 활성의 결과를 보여준다. 세포독성은 LU_{50} (표적 세포의 50%를 사멸시키는데 필요한 PBL의 수)으로서 측정된다.

도 36A 및 36B는 AML 환자의 골수 (MIL) 또는 말초 혈액 (PBL)으로부터 단리된 MIL (도 36A) 및 PBL (도 36B)에 대한 배수 확장의 그래프를 나타낸다. MIL 1.1은 MIL 방법 1을 사용하여 확장시켰고, MIL1.2는 MIL 방법 2를 사용하여 확장시켰고, MIL1.3은 MIL 방법 3을 사용하여 확장시켰다. MIL2 및 MIL3은 MIL 방법 3을 사용하여 확장시켰다. 모든 PBL은 PBL 방법 3을 사용하여 확장시켰다. MIL1.3에 대한 출발 세포 수는 138,000개 세포였고, MIL2의 경우에는 62,000개였고, MIL3의 경우에는 28,000개 세포였다. PBL2에 대한 출발 세포 수는 338,000개였고, PBL3에 대한 세포 수는 336,000개였다.

도 37A 및 37B는 각각의 MIL (도 37A) 및 PBL (도 37B)에 대한 IFN-γ 생산 세포를 예시한다.

도 38A-38F는 AML 환자로부터 단리된 MIL (도 38A-38C) 및 PBL (도 38D-38F)에서의 T 세포 하위세트를 예시하는 그래프를 나타낸다. 도 38A 및 38D는 TCRαβ+ 하위세트를 예시하고, 도 38B 및 38E는 CD4+ 하위세트를 예시하고, 도 38C 및 38F는 CD8 하위세트를 예시한다. PBL은 제0일 및 제14일에서 제시된다.

도 39A-39D는 AML 환자로부터 단리된 MIL에 대한 CD4 기억 하위세트를 예시하는 그래프를 나타낸다. 도 39A는 나이브 (CCR7+/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여주고; 도 39B는 중심 기억 t-세포 (CM) (CCR7+/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 39C는 이펙터 기억 T-세포 (EM) (CCR7-/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 39D는 말단 분화된 이펙터 기억 세포 (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여준다.

도 40A-40D는 AML 환자로부터 단리된 PBL에 대한 CD4 기억 하위세트를 예시하는 그래프를 나타낸다. 도 40A는 나이브 (CCR7+/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여주고; 도 40B는 중심 기억 t-세포 (CM) (CCR7+/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 40C는 이펙터 기억 T-세포 (EM) (CCR7-/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 40D는 말단 분화된 이펙터 기억 세포 (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여준다.

도 41A-41D는 AML 환자로부터 단리된 MIL에 대한 CD8 기억 하위세트를 예시하는 그래프를 나타낸다. 도 41A는 나이브 (CCR7+/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여주고; 도 41B는 중심 기억 t-세포 (CM) (CCR7+/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 41C는 이펙터 기억 T-세포 (EM) (CCR7-/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 41D는 말단 분화된 이펙터 기억 세포 (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여준다.

도 42A-42D는 AML 환자로부터 단리된 PBL에 대한 CD8 기억 하위세트를 예시하는 그래프를 나타낸다. 도 42A는 나이브 (CCR7+/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여주고; 도 42B는 중심 기억 t-세포 (CM) (CCR7+/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 42C는 이펙터 기억 T-세포 (EM) (CCR7-/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 42D는 말단 분화된 이펙터 기억 세포 (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여준다.

도 43A 및 43B는 MIL (도 43A) 및 PBL (도 43B)에 대한 CD4 및 CD8 세포 집단의 CD27 하위세트를 예시하는 그래프를 나타낸다.

도 44A 및 44B는 MIL (도 44A) 및 PBL (도 44B)에 대한 CD4 및 CD8 세포 집단의 CD28 하위세트를 예시하는 그래프를 나타낸다.

도 45A 및 45B는 MIL (도 45A) 및 PBL (도 45B)에 대한 CD4 및 CD8 세포 집단의 PD1+ 하위세트를 예시하는 그래프를 나타낸다.

도 46A 및 46B는 MIL (도 46A) 및 PBL (도 46B)에 대한 CD4 및 CD8 세포 집단의 LAG3+ 하위세트를 예시하는 그래프를 나타낸다.

도 47은 PBL 방법 1 및 PBL 방법 3의 예시적인 실시양태를 예시하는 타임라인이다. 이 도면에서, IL-2의 첨가는 방법 동안 임의의 시점에서, 및 예시적인 실시양태에서는, 괄호쳐진 영역에 걸쳐 일어날 수 있다.

도 48은 MIL 방법 3의 예시적인 실시양태를 예시하는 타임라인이다. 이 도면에서, IL-2의 첨가는 방법 동안 임의의 시점에서, 및 예시적인 실시양태에서는, 괄호쳐진 영역에 걸쳐 일어날 수 있다.

서열 목록의 간단한 설명

서열식별번호: 1은 무로모납의 중쇄의 아미노산 서열이다.

서열식별번호: 2는 무로모납의 경쇄의 아미노산 서열이다.

서열식별번호: 3은 재조합 인간 IL-2 단백질의 아미노산 서열이다.

서열식별번호: 4는 알데스류킨의 아미노산 서열이다.

서열식별번호: 5는 재조합 인간 IL-4 단백질의 아미노산 서열이다.

서열식별번호: 6은 재조합 인간 IL-7 단백질의 아미노산 서열이다.

서열식별번호: 7은 재조합 인간 IL-15 단백질의 아미노산 서열이다.

서열식별번호: 8은 재조합 인간 IL-21 단백질의 아미노산 서열이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0114] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 과학 용어는 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 언급된 모든 특허 및 공개는 그 전문이 참조로 포함된다.

[0115] 정의

[0116] 본원에 사용된 용어 "공-투여", "공-투여하는", "와 조합되어 투여되는", "와 조합하여 투여하는", "동시" 및 "공동"은 대상체에 두 활성 제약 성분 및/또는 그의 대사물이 동시에 존재하도록 대상체에 대한 2종 이상의 활성 제약 성분의 투여를 포괄한다. 공-투여는 개별 조성물로의 동시 투여, 개별 조성물로의 상이한 시간에서의 투여, 또는 2종 이상의 활성 제약 성분이 존재하는 조성물로의 투여를 포함한다. 개별 조성물로의 동시 투여 및 두 작용제가 존재하는 조성물로의 투여가 바람직하다.

[0117] 용어 "생체내"는 포유동물 대상체의 신체에서 일어나는 사건을 지칭한다.

[0118] 용어 "생체외"는 인공 환경에서 포유동물 대상체의 신체 밖에서 일어나는 사건을 지칭한다.

[0119] 용어 "시험관내"는 시험 시스템에서 일어나는 사건을 지칭한다. 시험관내 검정은 살아있는 또는 사멸한 세포가 사용될 수 있는 세포-기반 검정을 포괄하고, 또한 어떠한 무손상 세포도 사용되지 않는 무세포 검정을 포괄할 수 있다.

[0120] 용어 "급속 확장"은 1주의 기간에 걸쳐 적어도 약 3배 (또는 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 또는 9배), 보다 바람직하게는 1주의 기간에 걸쳐 적어도 약 10배 (또는 20-, 30-, 40-, 50-, 60-, 70-, 80-, 또는 90배), 또는 보다 바람직하게는 1주의 기간에 걸쳐 적어도 약 100배의 항원-특이적 TIL 수의 증가를 의미한다. 다수의 급속 확장 프로토콜이 본원에 기재되어 있다.

[0121] 종양을 파괴하는 방법을 기재하기 위해 본원에 사용된 용어 "단편화", "단편" 및 "단편화된"은 기계적 단편화

방법, 예컨대 종양 조직의 분쇄, 슬라이싱, 분할 및 세절, 뿐만 아니라 종양 조직의 물리적 구조를 파괴하기 위한 임의의 다른 방법을 포함한다.

[0122] 용어 "말초 혈액 단핵 세포" 및 "PBMC"는 림프구 (T 세포, B 세포, NK 세포) 및 단핵구를 포함한, 둥근 핵을 갖는 말초 혈액 세포를 지칭한다. 임의로, 말초 혈액 단핵 세포는 조사된 동종 말초 혈액 단핵 세포이다. 항원 제시 세포. 용어 "PBL"은 말초 혈액 림프구를 지칭하고, 말초 혈액으로부터 확장된 T-세포이다. 용어 PBL 및 TIL은 본원에서 상호교환가능하게 사용된다.

[0123] 용어 "항-CD3 항체"는 성숙 T 세포의 T 세포 항원 수용체에서 CD3 수용체에 대해 지시되는, 인간, 인간화, 키메라 또는 뮤린 항체를 포함한 항체 또는 그의 변이체, 예를 들어 모노클로날 항체를 지칭한다. 항-CD3 항체는 무로모납으로도 또한 공지된 OKT-3, 및 UCHT-1을 포함한다. 다른 항-CD3 항체는, 예를 들어 오텔릭시주맙, 테플리주맙 및 비실리주맙을 포함한다.

[0124] 용어 "OKT-3" (또한 본원에서 "OKT3"으로도 지칭됨)은 성숙 T 세포의 T 세포 항원 수용체에서 CD3 수용체에 대해 지시되는, 인간, 인간화, 키메라 또는 뮤린 항체를 포함한 모노클로날 항체 또는 그의 바이오시밀러 또는 변이체를 지칭하고, 상업적으로 입수가능한 형태, 예컨대 OKT-3 (30 ng/mL, MACS GMP CD3 퓨어, 밀테니 바이오테크, 인크.(Miltenyi Biotech, Inc.), 미국 캘리포니아주 샌디에고) 및 무로모납 또는 그의 변이체, 보존적 아미노산 치환, 당형태 또는 바이오시밀러를 포함한다. 무로모납의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열은 표 1에 제공된다 (서열식별번호: 1 및 서열식별번호: 2). OKT-3을 생산할 수 있는 하이브리도마는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection)에 기탁되어 있고, ATCC 수탁 번호 CRL 8001이 배정되어 있다. 또한, OKT-3을 생산할 수 있는 하이브리도마는 유러피안 콜렉션 오브 어센티케이티드 셀 컬쳐스(European Collection of Authenticated Cell Cultures, ECACC)에 기탁되어 있고, 카탈로그 번호 86022706이 배정되어 있다.

[0125] 표 1. 무로모납의 아미노산 서열.

식별자	서열 (1-문자 아미노산 기호)	
SEQ ID NO:1 무로모납 중쇄	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 240 300 360 420 450
SEQ ID NO:2 무로모납 경쇄	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC	60 120 180 213

[0126]

[0127] 용어 "IL-2" (또한 본원에서 "IL2"로도 지칭됨)는 인터류킨-2로 공지된 T 세포 성장 인자를 지칭하고, 인간 및 포유동물 형태, 그의 보존적 아미노산 치환, 당형태, 바이오시밀러 및 변이체를 포함한 IL-2의 모든 형태를 포함한다. IL-2는, 예를 들어 문헌 [Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88 및 Malek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79] (이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-2의 아미노산 서열은 표 2에 제공된다 (서열식별번호: 3). 예를 들어, 용어 IL-2는 IL-2의 인간, 재조합 형태, 예컨대 알데스류킨 (프로류킨(PROLEUKIN), 단일 사용 바이알당 2천2백만 IU로 다수의 공급업체로부터 상업적으로 입수가능함), 뿐만 아니라 미국 뉴햄프셔주 포츠머스 소재 셀게닉스, 인크.(CellGenix, Inc.) (셀그로(CELLGRO) GMP) 또는 미국 뉴저지주 이스트 브런즈윅 소재 프로스펙-타니 테크노진 리미티드(ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.) (카탈로그 번호 CYT-209-b)에 의해 상업적으로 공급되는 재조합 IL-2의 형태 및 다른 판매업체로부터의 다른 상업적 등가물을 포괄한다. 알데스류킨 (데스-알라닐-1, 세린-125 인간 IL-2)은 대략 15 kDa의 분자량을 갖는 IL-2의 비글리코실화 인간 재조합 형태이다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 알데스류킨의 아미노산 서열은 표 2에 제공된다 (서열식별번호: 4). 용어 IL-2는 또한 미국 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 소재 넥타 테라퓨틱스(Nektar Therapeutics)로부터 입수가능한 PEG화 IL2 전구약물 NKTR-214를 포함한, 본원에 기재된 바와 같은 IL-2의 PEG화 형태를 포괄한다. NKTR-214 및 본 발명에서 사용하기에 적합한 PEG화 IL-2는 미국 특허 출원 공개 번호 US 2014/0328791 A1 및 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2012/065086 A1 (이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 접합된 IL-2의 대안적 형태는 미국 특허 번호 4,766,106, 5,206,344, 5,089,261 및 4,902,502 (이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 IL-2의 제제는 미국 특허 번호 6,706,289 (이의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0128] 표 2. 인터류킨의 아미노산 서열.

식별자	서열 (1-문자 아미노산 기호)	
SEQ ID NO:3 재조합 인간 IL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EEELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
SEQ ID NO:4 알데스류킨	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
SEQ ID NO:5 재조합 인간 IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
SEQ ID NO:6 재조합 인간 IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLQEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 153
SEQ ID NO:7 재조합 인간 IL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
SEQ ID NO:8 재조합 인간 IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMR QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

[0129]

[0130] 용어 "IL-4" (또한 본원에서 "IL4"로도 지칭됨)는 Th2 T 세포에 의해 및 호산구, 호염기구 및 비만 세포에 의해 생산되는, 인터류킨 4로 공지된 시토카인을 지칭한다. IL-4는 나이브 헬퍼 T 세포 (Th0 세포)의 Th2 T 세포로의 분화를 조절한다. 문헌 [Steinke and Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70]. IL-4에 의한 활성화시, Th2 T 세포는 후속적으로 양성 피드백 루프에서 추가의 IL-4를 생산한다. IL-4는 또한 B 세포 증식 및 부류 II MHC 발현을 자극시키고, IgE로의 부류 전환 및 B 세포로부터의 IgG_1 발현을 유도한다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-4는 미국 뉴저지주 이스트 브런즈윅 소재 프로스펙-타니 테크노진 리미티드 (카탈로그 번호 CYT-211) 및 미국 매사추세츠주 월섬 소재 써모피셔 사이언티픽, 인크.(ThermoFisher Scientific, Inc.) (인간 IL-15 재조합 단백질, 카탈로그 번호 깁코(Gibco) CTP0043)를 포함한 다수의 공급업체로부터 상업적으로 입수가능하다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-4의 아미노산 서열은 표 2에 제공된다 (서열식별번호: 5).

[0131] 용어 "IL-7" (또한 본원에서 "IL7"로도 지칭됨)은 기질 및 상피 세포로부터, 뿐만 아니라 수지상 세포로부터 수득될 수 있는, 인터류킨 7로 공지된 글리코실화 조직-유래 시토카인을 지칭한다. 문헌 [Fry and Mackall, Blood 2002, 99, 3892-904]. IL-7은 T 세포의 발생을 자극시킬 수 있다. IL-7은 IL-7 수용체 알파 및 공통 감마 쇄 수용체로 이루어진 이종이량체인 IL-7 수용체에 결합하며, 이는 일련의 신호에서 흉선 내 T 세포 발생 및 말초 내 생존에 중요하다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-7은 미국 뉴저지주 이스트 브런즈윅 소재 프로스펙-타니 테크노진 리미티드 (카탈로그 번호 CYT-254) 및 미국 매사추세츠주 월섬 소재 써모피셔 사이언티픽, 인크. (인간 IL-7 재조합 단백질, 카탈로그 번호 깁코 PHC0071)를 포함한 다수의 공급업체로부터 상업적으로 입수가능하다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-7의 아미노산 서열은 표 2에 제공된다 (서열식별번호: 6).

[0132] 용어 "IL-15" (또한 본원에서 "IL15"로도 지칭됨)는 인터류킨-15로 공지된 T 세포 성장 인자를 지칭하고, 인간 및 포유동물 형태, 그의 보존적 아미노산 치환, 당형태, 바이오시밀러 및 변이체를 포함한 IL-15의 모든 형태를 포함한다. IL-15는, 예를 들어 문헌 [Fehniger and Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32] (이의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다. IL-15는 IL-2와 β 및 γ 신호전달 수용체 서브유닛을 공유한다. 재조합 인간 IL-15는 12.8 kDa의 분자 질량을 갖는, 114개의 아미노산 (및 N-말단 메티오닌)을 함유하는 단일 비-글리코실화 폴리펩티드 쇄이다. 재조합 인간 IL-15는 미국 뉴저지주 이스트 브런즈윅 소재 프로스펙-타니 테크노진 리미티드 (카탈로그 번호 CYT-230-b) 및 미국 매사추세츠주 월섬 소재 써모피셔 사이언티픽, 인크. (인간 IL-15 재조합 단백질, 카탈로그 번호 34-8159-82)를 포함한 다수의 공급업체로부터 상업적으로 입수가능하다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-15의 아미노산 서열은 표 2에 제공된다 (서열식별번호: 7).

[0133] 용어 "IL-21" (또한 본원에서 "IL21"로도 지칭됨)은 인터류킨-21로 공지된 다면발현성 시토카인 단백질을 지칭하고, 인간 및 포유동물 형태, 그의 보존적 아미노산 치환, 당형태, 바이오시밀러 및 변이체를 포함한 IL-21의 모든 형태를 포함한다. IL-21은, 예를 들어 문헌 [Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95] (이의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다. IL-21은 주로 자연 킬러 T 세포 및 활성화된 인간 $CD4^+$ T 세포에 의해 생산된다. 재조합 인간 IL-21은 15.4 kDa의 분자 질량을 갖는, 132개의 아미노산을 함유하는 단일 비-글리코실화 폴리펩티드 쇄이다. 재조합 인간 IL-21은 미국 뉴저지주 이스트 브런즈윅 소재 프로스펙-타니 테크노진 리미티드 (카탈로그 번호 CYT-408-b) 및 미국 매사추세츠주 월섬 소재 써모피셔 사

이언티픽, 인크. (인간 IL-21 재조합 단백질, 카탈로그 번호 14-8219-80)를 포함한 다수의 공급업체로부터 상업적으로 입수가능하다. 본 발명에서 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-21의 아미노산 서열은 표 2에 제공된다 (서열식별번호: 8).

[0134] 용어 "제약상 허용되는 담체" 또는 "제약상 허용되는 부형제"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제, 및 불활성 성분을 포함하는 것으로 의도된다. 활성 제약 성분을 위한 이러한 제약상 허용되는 담체 또는 제약상 허용되는 부형제의 사용은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 임의의 통상적인 제약상 허용되는 담체 또는 제약상 허용되는 부형제가 활성 제약 성분과 비상용성인 경우를 제외하고는, 본 발명의 치료 조성물에서 그의 사용이 고려된다. 추가의 활성 제약 성분, 예컨대 다른 약물이 또한 기재된 조성물 및 방법에 포함될 수 있다.

[0135] 용어 "항체" 및 그의 복수 형태 "항체들"은 전체 이뮤노글로불린 및 임의의 항원-결합 단편 ("항원-결합 부분") 또는 그의 단일 쇄를 지칭한다. "항체"는 추가로 디술피드 결합에 의해 상호-연결된 적어도 2개의 중쇄 (H)와 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질, 또는 그의 항원-결합 부분을 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 V_H로 약기됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인, CH1, CH2 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 V_L로 약기됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 1개의 도메인, C_L로 구성된다. 항체의 V_H 및 V_L 영역은, 상보성 결정 영역 (CDR) 또는 초가변 영역 (HVR)으로 지칭되고 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는 보다 보존된 영역이 산재되어 있을 수 있는 초가변성의 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 V_H 및 V_L은 아미노-말단으로부터 카르복시-말단으로 하기 순서로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원 에피토프 또는 에피토프들과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포 (예를 들어, 이펙터 세포) 및 전형적 보체계의 제1 성분 (C1q)을 포함한 숙주 조직 또는 인자에 대한 이뮤노글로불린의 결합을 매개할 수 있다.

[0136] 용어 "항원"은 면역 반응을 유도하는 물질을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 항원은 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 의해 제시되는 경우 항체 또는 TCR에 의해 결합될 수 있는 분자이다. 본원에 사용된 용어 "항원"은 또한 T 세포 에피토프를 포괄한다. 항원은 추가적으로 면역계에 의해 인식될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원은 체액성 면역 반응 또는 세포성 면역 반응을 유도하여 B 림프구 및/또는 T 림프구의 활성화를 일으킬 수 있다. 일부 경우에, 이것은 항원이 Th 세포 에피토프를 함유하거나 이에 연결될 것을 필요로 할 수 있다. 항원은 또한 1개 이상의 에피토프 (예를 들어, B- 및/또는 T-에피토프)를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 항원은 바람직하게는, 전형적으로 고도 특이적 및 선택적 방식으로 그의 상응하는 항체 또는 TCR과 반응할 것이고, 다른 항원에 의해 유도될 수 있는 다수의 다른 항체 또는 TCR과는 그렇지 않을 것이다.

[0137] 용어 "모노클로날 항체", "mAb", "모노클로날 항체 조성물" 또는 그의 복수 형태는 단일 분자 조성의 항체 분자의 제제를 지칭한다. 모노클로날 항체 조성물은 특정한 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화도를 나타낸다. 특정 수용체에 특이적인 모노클로날 항체는 적합한 항원을 시험 대상체에 주사한 다음 목적하는 서열 또는 기능적 특징을 갖는 항체를 발현하는 하이브리도마를 단리하는 관련 기술분야의 지식 및 기술을 사용하여 제조될 수 있다. 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오티드 프로브를 사용하여) 용이하게 단리 및 서열분석된다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서의 역할을 한다. 단리되면, DNA를 발현 벡터 내로 배치할 수 있고, 이어서 이를 달리 이뮤노글로불린 단백질을 생산하지 않는 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이(*E. coli*) 세포, 원숭이 COS 세포, 차이니즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포 내로 형질감염시켜, 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체의 합성을 얻는다. 항체의 재조합 생산은 하기에 보다 상세하게 기재될 것이다.

[0138] 본원에 사용된 용어 항체의 "항원-결합 부분" 또는 "항원-결합 단편" (또는 간단히 "항체 부분" 또는 "단편")은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하고 있는 항체의 1개 이상의 단편을 지칭한다. 항체의 항원-결합 기능은 전장 항체의 단편에 의해 수행될 수 있는 것으로 밝혀졌다. 용어 항체의 "항원-결합 부분" 내에 포괄되는 결합 단편의 예는 (i) V_L, V_H, C_L 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인 Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 디술피드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인 F(ab')2 단편; (iii) V_H 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 V_L 및 V_H 도메인으로 이루어진 Fv 단편; (v) V_H 또는 V_L 도메인으로 이루어질 수 있는 도메인 항체 (dAb) 단편 (Ward et al., Nature, 1989, 341, 544-546); 및 (vi) 단리된 상보성

결정 영역 (CDR)을 포함한다. 추가로, Fv 단편의 2개의 도메인, V_L 및 V_H가 별개의 유전자에 의해 코딩되지만, 이들은 재조합 방법을 사용하여 이들을 단일 단백질 쇄로 만들 수 있게 하는 합성 링커에 의해 연결될 수 있으며, 여기서 V_L 및 V_H 영역은 쌍을 이루어 단일쇄 Fv (scFv)로 공지된 1가 분자를 형성한다; 예를 들어, 문헌 [Bird et al., Science 1988, 242, 423-426; 및 Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 5879-5883] 참조). 이러한 scFv 항체는 또한 용어 항체의 "항원-결합 부분" 또는 "항원-결합 단편" 내에 포괄되는 것으로 의도된다. 이들 항체 단편은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 통상적인 기술을 사용하여 수득되고, 단편은 무손상 항체와 동일한 방식으로 유용성에 대해 스크리닝된다.

[0139] 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 프레임워크 및 CDR 영역 둘 다가 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 것인 가변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 추가로, 항체가 불변 영역을 함유하는 경우에, 불변 영역은 또한 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된다. 본 발명의 인간 항체는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유동물 종, 예컨대 마우스의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그라프팅된 항체는 포함하지 않는 것으로 의도된다.

[0140] 용어 "인간 모노클로날 항체"는 프레임워크 및 CDR 영역 둘 다가 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 것인 가변 영역을 갖는 단일 결합 특이성을 디스플레이하는 항체를 지칭한다. 한 실시양태에서, 인간 모노클로날 항체는 불멸화 세포에 융합된 인간 중쇄 트랜스진 및 경쇄 트랜스진을 포함하는 게놈을 갖는 트랜스제닉 비-인간 동물, 예를 들어 트랜스제닉 마우스로부터 수득된 B 세포를 포함하는 하이브리도마에 의해 생산된다.

[0141] 본원에 사용된 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리되는 모든 인간 항체, 예컨대 (a) 인간 이뮤노글로불린 유전자에 대해 트랜스제닉 또는 트랜스크로모소말인 동물 (예컨대 마우스) 또는 그로부터 제조된 하이브리도마 (하기에 추가로 기재됨)로부터 단리된 항체, (b) 인간 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어 트랜스펙토마로부터 단리된 항체, (c) 재조합된 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 및 (d) 인간 이뮤노글로불린 유전자 서열을 다른 DNA 서열로 스플라이싱하는 것을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체를 포함한다. 이러한 재조합 인간 항체는 프레임워크 및 CDR 영역이 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 것인 가변 영역을 갖는다. 그러나, 특정 실시양태에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관내 돌연변이유발 (또는, 인간 Ig 서열에 대해 트랜스제닉인 동물이 사용되는 경우에, 생체내 체세포 돌연변이유발)에 적용될 수 있고, 따라서 재조합 항체의 V_H 및 V_L 영역의 아미노산 서열은, 인간 배선 V_H 및 V_L 서열로부터 유래되고 그와 관련되지만, 생체내 인간 항체 배선 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수도 있는 서열이다.

[0142] 본원에 사용된 "이소형"은 중쇄 불변 영역 유전자에 의해 코딩되는 항체 부류 (예를 들어, IgM 또는 IgG1)를 지칭한다.

[0143] 어구 "항원을 인식하는 항체" 및 "항원에 특이적인 항체"는 본원에서 용어 "항원에 특이적으로 결합하는 항체"와 상호교환가능하게 사용된다.

[0144] 용어 "인간 항체 유도체"는 인간 항체의 임의의 변형된 형태, 예를 들어 항체와 또 다른 활성 제약 성분 또는 항체의 접합체를 지칭한다. 용어 "접합체", "항체-약물 접합체", "ADC" 또는 "면역접합체"는 관련 기술분야에서 이용가능한 방법을 사용하여 본원에 기재된 항체에 접합될 수 있는 또 다른 치료 모이어티에 접합된 항체 또는 그의 단편을 지칭한다.

[0145] 용어 "인간화 항체", "인간화 항체들" 및 "인간화"는 또 다른 포유동물 종, 예컨대 마우스의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그라프팅된 항체를 지칭하는 것으로 의도된다. 인간 프레임워크 서열 내에서 추가의 프레임워크 영역 변형이 이루어질 수 있다. 비-인간 (예를 들어, 뮤린) 항체의 "인간화" 형태는 비-인간 이뮤노글로불린으로부터 유래된 최소 서열을 함유하는 키메라 항체이다. 대부분의 경우에, 인간화 항체는 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이며, 여기서 수용자의 초가변 영역으로부터의 잔기는 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비-인간 종 (공여자 항체), 예컨대 마우스, 래트, 토끼 또는 비인간 영장류의 15 초가변 영역으로부터의 잔기에 의해 대체된다. 일부 경우에, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기도 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 추가로, 인간화 항체는 수용자 항체 또는 공여자 항체에서 발견되지 않는 잔기를 포함할 수 있다. 이들 변형은 항체 성능을 추가로 정밀화하기 위해 이루어진다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개, 전형적으로는 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이고, 여기

서 모든 또는 실질적으로 모든 초가변 루프는 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 서열의 것이다. 인간화 항체는 또한 임의로 이뮤노글로불린 불변 영역(Fc), 전형적으로 인간 이뮤노글로불린의 불변 영역의 적어도 한 부분을 포함할 것이다. 추가의 세부사항에 대해서는, 문헌 [Jones, et al., Nature 1986, 321, 522-525; Riechmann, et al., Nature 1988, 332, 323-329; 및 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 1992, 2, 593-596]을 참조한다. 본원에 기재된 항체는 또한 이펙터 기능 및/또는 FcR 결합의 개선 (예를 들어, 감소)을 부여하는 것으로 공지된 임의의 Fc 변이체를 사용하도록 변형될 수 있다. Fc 변이체는, 예를 들어 국제 특허 출원 공개 번호 WO 1988/07089 A1, WO 1996/14339 A1, WO 1998/05787 A1, WO 1998/23289 A1, WO 1999/51642 A1, WO 99/58572 A1, WO 2000/09560 A2, WO 2000/32767 A1, WO 2000/42072 A2, WO 2002/44215 A2, WO 2002/060919 A2, WO 2003/074569 A2, WO 2004/016750 A2, WO 2004/029207 A2, WO 2004/035752 A2, WO 2004/063351 A2, WO 2004/074455 A2, WO 2004/099249 A2, WO 2005/040217 A2, WO 2005/070963 A1, WO 2005/077981 A2, WO 2005/092925 A2, WO 2005/123780 A2, WO 2006/019447 A1, WO 2006/047350 A2 및 WO 2006/085967 A2; 및 미국 특허 번호 5,648,260; 5,739,277; 5,834,250; 5,869,046; 6,096,871; 6,121,022; 6,194,551; 6,242,195; 6,277,375; 6,528,624; 6,538,124; 6,737,056; 6,821,505; 6,998,253; 및 7,083,784 (이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 아미노산 치환 중 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0146] 용어 "키메라 항체"는 가변 영역 서열이 하나의 종으로부터 유래되고 불변 영역 서열이 또 다른 종으로부터 유래된 것인 항체, 예컨대 가변 영역 서열이 마우스 항체로부터 유래되고 불변 영역 서열이 인간 항체로부터 유래된 것인 항체를 지칭하는 것으로 의도된다.

[0147] "디아바디"는 2개의 항원-결합 부위를 갖는 소형 항체 단편이다. 이러한 단편은 동일한 폴리펩티드 쇄 내의 경쇄 가변 도메인 (V_L)에 연결된 중쇄 가변 도메인 (V_H)을 포함한다 (V_H-V_L 또는 V_L-V_H). 동일한 쇄 상의 2개의 도메인 사이의 쌍형성을 허용하기에는 짧은 링커를 사용함으로써, 도메인은 또 다른 쇄의 상보적 도메인과 쌍형성하도록 강제되고 2개의 항원-결합 부위를 생성한다. 디아바디는, 예를 들어 유럽 특허 번호 EP 404,097, 국제 특허 공개 번호 WO 93/11161; 및 문헌 [Bolliger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 6444-6448]에 보다 상세하게 기재되어 있다.

[0148] 용어 "글리코실화"는 항체의 변형된 유도체를 지칭한다. 비-글리코실화 항체는 글리코실화가 결여되어 있다. 글리코실화를 변경하여, 예를 들어 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수 있다. 이러한 탄수화물 변형은, 예를 들어 항체 서열 내의 1개 이상의 글리코실화 부위를 변경시킴으로써 달성될 수 있다. 예를 들어, 1개 이상의 가변 영역 프레임워크 글리코실화 부위의 제거를 일으키는 1개 이상의 아미노산 치환이 이루어짐으로써 그 부위에서의 글리코실화가 제거될 수 있다. 비-글리코실화는 미국 특허 번호 5,714,350 및 6,350,861에 기재된 바와 같이, 항원에 대한 항체의 친화도를 증가시킬 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 변경된 유형의 글리코실화를 갖는 항체, 예컨대 푸코실 잔기의 양이 감소된 저푸코실화 항체 또는 이등분 GlcNac 구조가 증가된 항체를 만들 수 있다. 이러한 변경된 글리코실화 패턴은 항체의 능력을 증가시키는 것으로 입증되었다. 이러한 탄수화물 변형은, 예를 들어 변경된 글리코실화 기구를 갖는 숙주 세포에서 항체를 발현시킴으로써 달성될 수 있다. 변경된 글리코실화 기구를 갖는 세포는 관련 기술분야에 기재되어 있고, 본 발명의 재조합 항체를 발현함으로써 변경된 글리코실화를 갖는 항체를 생산하는 숙주 세포로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포주 Ms704, Ms705 및 Ms709는 푸코실트랜스퍼라제 유전자인 FUT8 (알파 (1,6) 푸코실트랜스퍼라제)이 결여되어 있어서, Ms704, Ms705 및 Ms709 세포주에서 발현된 항체는 그의 탄수화물에 푸코스가 결여되어 있다. Ms704, Ms705 및 Ms709 FUT8-/- 세포주는 2개의 대체 벡터를 사용하여 CHO/DG44 세포 내의 FUT8 유전자를 표적화 파괴시킴으로써 생성되었다 (미국 특허 공개 번호 2004/0110704 및 문헌 [Yamane-Ohnuki et al., Biotechnol. Bioeng., 2004, 87, 614-622] 참조). 또 다른 예로서, 유럽 특허 번호 EP 1,176,195는 푸코실 트랜스퍼라제를 코딩하는 FUT8 유전자가 기능적으로 파괴된 세포주를 기재하고 있으며, 이러한 세포주에서 발현된 항체는 알파 1,6 결합-관련 효소의 감소 또는 제거에 의해 저푸코실화를 나타낸다는 것을 기재하고, 또한 항체의 Fc 영역에 결합하는 N-아세틸글루코사민에 푸코스를 부가하는 효소 활성이 낮거나 또는 그러한 효소 활성을 갖지 않는 세포주, 예를 들어 래트 골수종 세포주 YB2/0 (ATCC CRL 1662)를 기재하고 있다. 국제 특허 공개 WO 03/035835는 Asn(297)-연결된 탄수화물에 푸코스를 부착시키는 능력이 감소된 변이체 CHO 세포주인 Lec 13 세포를 기재하고 있으며, 또한 이러한 숙주 세포에서 발현된 항체는 저푸코실화를 나타낸다는 것을 기재한다 (또한 문헌 [Shields, et al., J. Biol. Chem. 2002, 277, 26733-26740] 참조). 국제 특허 공개 WO 99/54342는 당단백질-변형 글리코실트랜스퍼라제 (예를 들어, 베타(1,4)-N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제 III (GnTIII))를 발현하도록 조작된 세포주를 기재하고 있으며, 이러한 조작된 세포주에서 발현된 항체는 증가된 이등분 GlcNac 구조를 나타내어 항체

의 증가된 ADCC 활성을 생성한다는 것을 기재한다 (또한 문헌 [Umana, et al., Nat. Biotech. 1999, 17, 176-180] 참조). 대안적으로, 항체의 푸코스 잔기는 푸코시다제 효소를 사용하여 절단될 수 있다. 예를 들어, 푸코시다제 알파-L-푸코시다제는 문헌 [Tarentino, et al., Biochem. 1975, 14, 5516-5523]에 기재된 바와 같이 항체로부터 푸코실 잔기를 제거한다.

[0149] "PEG화"는 1개 이상의 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 기가 항체 또는 항체 단편에 부착되는 조건 하에 전형적으로 PEG, 예컨대 PEG의 반응성 에스테르 또는 알데히드 유도체와 반응하는 변형된 항체 또는 그의 단편을 지칭한다. PEG화는, 예를 들어 항체의 생물학적 (예를 들어, 혈청) 반감기를 증가시킬 수 있다. 바람직하게는, PEG화는 반응성 PEG 분자 (또는 유사한 반응성 수용성 중합체)와의 아실화 반응 또는 알킬화 반응을 통해 수행된다. 본원에 사용된 용어 "폴리에틸렌 글리콜"은 다른 단백질을 유도체화하는데 사용된 임의의 형태의 PEG, 예컨대 모노 (C_1-C_{10}) 알콕시- 또는 아릴옥시-폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜-말레이미드를 포괄하는 것으로 의도된다. PEG화될 항체는 비-글리코실화 항체일 수 있다. PEG화 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 유럽 특허 번호 EP 0154316 및 EP 0401384 및 미국 특허 번호 5,824,778 (이들 각각의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이, 본 발명의 항체에 적용될 수 있다.

[0150] 용어 "융합 단백질" 또는 "융합 폴리펩티드"는 2종 이상의 개별 단백질의 특성을 조합한 단백질을 지칭한다. 이러한 단백질은 직접적으로 또는 아미노산 링커를 통해 공유 연결된 적어도 2종의 이종 폴리펩티드를 갖는다. 융합 단백질을 형성하는 폴리펩티드들은 전형적으로 C-말단 대 N-말단으로 연결되지만, C-말단 대 C-말단, N-말단 대 N-말단, 또는 N-말단 대 C-말단으로 연결될 수도 있다. 융합 단백질의 폴리펩티드는 임의의 순서로 존재할 수 있고, 구성성분 폴리펩티드 중 어느 하나 또는 둘 다 중 하나 초과를 포함할 수 있다. 이러한 용어는 보존적으로 변형된 변이체, 다형성 변이체, 대립유전자, 돌연변이체, 하위서열, 종간 상동체, 및 융합 단백질을 구성하는 항원의 면역원성 단편을 또한 지칭한다. 본 개시내용의 융합 단백질은 또한 성분 항원 또는 그의 면역원성 단편의 추가의 카피를 포함할 수 있다. 융합 단백질은, 함께 연결되고 추가로 Fc 도메인, 예컨대 IgG Fc 도메인에 연결된 1개 이상의 결합 도메인을 함유할 수 있다. 융합 단백질은 추가로 모노클로날 항체를 모방하고 6개 이상의 결합 도메인을 제공하기 위해 함께 연결될 수 있다. 융합 단백질은 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 재조합 방법에 의해 생산될 수 있다. 융합 단백질의 제조는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 국제 특허 출원 공개 번호 WO 1995/027735 A1, WO 2005/103077 A1, WO 2008/025516 A1, WO 2009/007120 A1, WO 2010/003766 A1, WO 2010/010051 A1, WO 2010/078966 A1, 미국 특허 출원 공개 번호 US 2015/0125419 A1 및 US 2016/0272695 A1, 및 미국 특허 번호 8,921,519 (이들 각각의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0151] 핵산 또는 단백질의 부분에 관해 사용되는 경우 용어 "이종"은 핵산 또는 단백질이 자연에서 서로에 대해 동일한 관계로 발견되지 않는 2개 이상의 하위서열을 포함한다는 것을 나타낸다. 예를 들어, 핵산은 전형적으로 새로운 기능적 핵산이 제조되도록 배열된 비관련 유전자들로부터의 2개 이상의 서열, 예를 들어 한 공급원으로부터의 프로모터 및 또 다른 공급원으로부터의 코딩 영역 또는 상이한 공급원으로부터의 코딩 영역을 갖도록 재조합적으로 생산된다. 유사하게, 이종 단백질은 단백질이 자연에서 서로에 대해 동일한 관계로 발견되지 않는 2개 이상의 하위서열을 포함한다는 것을 나타낸다 (예를 들어, 융합 단백질).

[0152] 용어 "보존적 아미노산 치환"은 항원에 대한 항체 또는 융합 단백질의 결합을 제거하지 않는 아미노산 서열 변형을 의미한다. 보존적 아미노산 치환은 한 부류의 아미노산을 동일한 부류의 아미노산에 의해 치환하는 것을 포함하며, 여기서 부류는 공통 물리화학적 아미노산 측쇄 특성, 및 예를 들어 표준 데이호프(Dayhoff) 빈도 교환 매트릭스 또는 BLOSUM 매트릭스에 의해 결정된 바와 같은, 자연에서 발견되는 동종 단백질에서의 높은 치환 빈도에 의해 정의된다. 아미노산 측쇄의 6가지 일반적 부류가 카테고리화되었고, 다음을 포함한다: 부류 I (Cys); 부류 II (Ser, Thr, Pro, Ala, Gly); 부류 III (Asn, Asp, Gln, Glu); 부류 IV (His, Arg, Lys); 부류 V (Ile, Leu, Val, Met); 및 부류 VI (Phe, Tyr, Trp). 예를 들어, Asp를 또 다른 부류 III 잔기, 예컨대 Asn, Gln 또는 Glu로 치환하는 것이 보존적 치환이다. 따라서, 항체 내의 예측되는 비필수 아미노산 잔기는 바람직하게는 동일한 부류의 또 다른 아미노산 잔기로 대체된다. 항원 결합을 제거하지 않는 아미노산 보존적 치환을 확인하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Brummell, et al., Biochemistry 1993, 32, 1180-1187; Kobayashi, et al., Protein Eng. 1999, 12, 879-884 (1999); 및 Burks, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1997, 94, 412-417] 참조).

[0153] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드와 관련하여 용어 "서열 동일성", "퍼센트 동일성" 및 "서열 퍼센트 동일성" (또는 그의 동의어, 예를 들어 "99% 동일한")은 최대 상응되도록 비교 및 정렬되었을 때 (필요하다면 갭이 도입

됨) 동일하거나, 또는 명시된 백분율의 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기를 갖는 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 지칭하고, 이때 임의의 보존적 아미노산 치환은 서열 동일성의 일부로 간주되지 않는다. 퍼센트 동일성은 서열 비교 소프트웨어 또는 알고리즘을 사용하여 또는 육안 검사에 의해 측정될 수 있다. 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열의 정렬을 수득하는데 사용될 수 있는 다양한 알고리즘 및 소프트웨어는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 퍼센트 서열 동일성을 결정하기 위한 적합한 프로그램은, 예를 들어 미국 정부의 국립 생물 정보 센터 BLAST 웹 사이트로부터 이용가능한 BLAST 프로그램 모음을 포함한다. 2개의 서열 사이의 비교는 BLASTN 또는 BLASTP 알고리즘을 사용하여 수행될 수 있다. BLASTN은 핵산 서열을 비교하는데 사용되고, 반면에 BLASTP는 아미노산 서열을 비교하는데 사용된다. ALIGN, ALIGN-2 (제넨테크(Genentech), 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코), 또는 DNASTAR로부터 이용가능한 메그얼라인(MegAlign)은 서열을 정렬하는데 사용될 수 있는 추가의 공중 이용가능한 소프트웨어 프로그램이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 특정한 정렬 소프트웨어에 의한 최대 정렬을 위해 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 특정 실시양태에서, 정렬 소프트웨어의 디폴트 파라미터가 사용된다.

[0154] 본원에 사용된 용어 "변이체"는 참조 항체의 아미노산 서열 내 또는 그에 인접한 특정 위치에서의 1개 이상의 치환, 결실 및/또는 부가에 의해 참조 항체의 아미노산 서열과 상이한 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 융합 단백질을 포괄하나 이에 제한되지는 않는다. 변이체는 참조 항체의 아미노산 서열과 비교하여 그의 아미노산 서열에 1개 이상의 보존적 치환을 포함할 수 있다. 보존적 치환은, 예를 들어 유사하게 하전된 또는 비하전된 아미노산의 치환을 수반할 수 있다. 변이체는 참조 항체의 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 유지한다. 용어 변이체는 또한 PEG화 항체 또는 단백질을 포함한다.

[0155] 핵산 서열은 명시적으로 나타낸 서열 뿐만 아니라 그의 보존적으로 변형된 변이체 (예를 들어, 축중성 코돈 치환) 및 상보적 서열을 암시적으로 포괄한다. 구체적으로, 축중성 코돈 치환은 1개 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합된-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 것인 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다. 문헌 [Batzer, et al., Nucleic Acid Res. 1991, 19, 5081; Ohtsuka, et al., J. Biol. Chem. 1985, 260, 2605-2608; Rossolini, et al., Mol. Cell. Probes 1994, 8, 91-98]. 용어 핵산은 cDNA, mRNA, 올리고뉴클레오티드 및 폴리뉴클레오티드와 상호교환가능하게 사용된다.

[0156] 용어 "바이오시밀러"는 미국에서 허가된 참조 생물학적 제품과 임상 불활성 성분에서의 부차적 차이에도 불구하고 고도로 유사한, 모노클로날 항체 또는 융합 단백질을 포함한 생물학적 제품을 의미하며, 제품의 안전성, 순도 및 효력의 관점에서 생물학적 제품과 참조 제품 사이에 임상적으로 의미있는 차이가 존재하지 않는 것이다. 추가로, 유사한 생물학적 또는 "바이오시밀러" 의약은 이미 유럽 의약품청에 의해 사용에 대해 인가된 또 다른 생물학적 의약과 유사한 생물학적 의약이다. 용어 "바이오시밀러"는 또한 다른 국가 및 지역 규제 기관에 의해 동의어로 사용된다. 생물학적 제품 또는 생물학적 의약은 박테리아 또는 효모와 같은 생물학적 공급원에 의해 제조되거나 그로부터 유래된 의약이다. 이들은 비교적 작은 분자, 예컨대 인간 인슐린 또는 에리트로포이에틴, 또는 복잡한 분자, 예컨대 모노클로날 항체로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 참조 IL-2 단백질이 알데스류킨(프로류킨)인 경우에, 알데스류킨과 관련하여 약물 규제 기관에 의해 승인된 단백질은 알데스류킨에 대한 "바이오시밀러"이거나 또는 알데스류킨의 "바이오시밀러"이다. 유럽에서, 유사한 생물학적 또는 "바이오시밀러" 의약은 이미 유럽 의약품청 (EMA)에 의해 사용에 대해 인가된 또 다른 생물학적 의약과 유사한 생물학적 의약이다. 유럽에서의 유사한 생물학적 용도에 대한 관련 법적 기준은 개정된 규정 (EC) 번호 726/2004의 조항 6 및 명령 2001/83/EC의 조항 10(4)이고, 따라서 유럽에서, 바이오시밀러는 규정 (EC) 번호 726/2004의 조항 6 및 명령 2001/83/EC의 조항 10(4) 하에 인가되거나, 인가를 위해 승인되거나 또는 인가를 위한 용도의 대상일 수 있다. 이미 인가된 원래의 생물학적 의약품은 유럽에서 "참조 의약품"으로 지칭될 수 있다. 바이오시밀러로 간주되기 위한 제품에 대한 일부 요건은 유사 생물학적 의약품에 대한 CHMP 가이드라인에 약술되어 있다. 추가로, 모노클로날 항체 바이오시밀러와 관련된 가이드라인을 포함한 제품 특이적 가이드라인은 EMA에 의해 제품별로 제공되고 그의 웹사이트에 공개되어 있다. 본원에 기재된 바와 같은 바이오시밀러는 품질 특징, 생물학적 활성, 작용 메카니즘, 안전성 프로파일 및/또는 효능에 있어서 참조 의약품과 유사할 수 있다. 추가로, 바이오시밀러는 참조 의약품과 동일한 상태를 치료하기 위해 사용될 수 있거나 사용을 위해 의도될 수 있다. 따라서, 본원에 기재된 바와 같은 바이오시밀러는 참조 의약품과 유사하거나 고도로 유사한 품질 특징을 갖는 것으로 간주될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 본원에 기재된 바와 같은 바이오시밀러는 참조 의약품과 유사하거나 고도로 유사한 생물학적 활성을 갖는 것으로 간주될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 본원에 기재된 바와 같은 바이오시밀러는 참조 의약품과 유사하거나 고도로 유사한 안전성 프로파일을 갖는 것으로 간주될 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 본원에 기재된 바와 같은 바이오시밀러는 참조 의약품과 유사하거나 고도로 유사한 효능을 갖는 것으로 간주될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같이, 유럽에서의 바이오시밀러는 EMA에 의해

인가된 참조 의약품과 비교된다. 그러나, 일부 경우에, 바이오시밀러는 특정 연구에서 유럽 경제 지역 밖에서 인가된 생물학적 의약품 (비-EEA 인가된 "비교자")과 비교될 수 있다. 이러한 연구는, 예를 들어 특정 임상 및 생체내 비-임상 연구를 포함한다. 본원에 사용된 용어 "바이오시밀러"는 또한 비-EEA 인가된 비교자와 비교되었거나 비교될 수 있는 생물학적 의약품에 관한 것이다. 특정 바이오시밀러는 단백질, 예컨대 항체, 항체 단편 (예를 들어, 항원 결합 부분) 및 융합 단백질이다. 단백질 바이오시밀러는 폴리펩티드의 기능에 유의하게 영향을 미치지 않는 아미노산 구조에서의 부차적 변형 (예를 들어 아미노산의 결실, 부가 및/또는 치환을 포함함)을 갖는 아미노산 서열을 가질 수 있다. 바이오시밀러는 그의 참조 의약품의 아미노산 서열에 대해 97% 이상, 예를 들어 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 바이오시밀러는 참조 의약품의 번역후 변형과 상이한 1개 이상의 번역후 변형, 예를 들어 이에 제한되지는 않을지라도, 글리코실화, 산화, 탈아미드화 및/또는 말단절단을 포함할 수 있으며, 단 이러한 상이함이 의약품의 안전성 및/또는 효능에 변화를 일으키지 않는다. 바이오시밀러는 참조 의약품과 동일하거나 상이한 글리코실화 패턴을 가질 수 있다. 특히, 배타적인 것은 아닐지라도, 바이오시밀러는 상이한 글리코실화 패턴을 가질 수 있으며, 단 이러한 상이함이 참조 의약품과 연관된 안전성 우려를 해결하거나 해결하도록 의도된 경우에 그러한 패턴을 가질 수 있다. 추가적으로, 바이오시밀러는, 예를 들어 그의 강도, 제약 형태, 제제, 부형제 및/또는 제시에 있어서 참조 의약품을 벗어날 수 있으며, 단 의약품의 안전성 및 효능은 손상되지 않는다. 바이오시밀러는 참조 의약품과 비교하여, 예를 들어 약동학 (PK) 및/또는 약역학 (PD) 프로파일에 있어서의 차이를 포함할 수 있으나, 인가되거나 인가에 적합한 것으로 간주되도록 여전히 참조 의약품과 충분히 유사한 것으로 생각된다. 특정 상황에서, 바이오시밀러는 참조 의약품과 비교하여 상이한 결합 특징을 나타내며, 여기서 상이한 결합 특징은 유사한 생물학적 제품으로서의 인가를 위한 장벽이 되지 않는 것으로 EMA와 같은 규제 기관에 의해 간주된다. 용어 "바이오시밀러"는 또한 다른 국가 및 지역 규제 기관에 의해 동의어로 사용된다.

[0157] 용어 "혈액 악성종양"은 혈액, 골수, 림프절 및 림프계의 조직을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 포유동물의 조혈 및 림프 조직의 암 및 종양을 지칭한다. 혈액 악성종양은 "액상 종양"의 형성을 유발할 수 있다. 혈액 악성종양은 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 림프종 (CLL), 소림프구성 림프종 (SLL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수 백혈병 (CML), 급성 단핵구성 백혈병 (AMoL), 호지킨 림프종 및 비-호지킨 림프종을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 용어 "B 세포 혈액 악성종양"은 B 세포에 영향을 미치는 혈액 악성종양을 지칭한다.

[0158] 용어 "액상 종양"은 사실상 유체인 비정상적 세포 종괴를 지칭한다. 액상 종양 암은 백혈병, 골수종 및 림프종뿐만 아니라 다른 혈액 악성종양을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 골수에 상주하는 액상 종양을 포함한 액상 종양으로부터 수득된 TIL은 본원에서 골수 침윤 림프구 (MIL)로 또한 지칭될 수 있다. 말초 혈액에서 순환하는 액상 종양을 포함한 액상 종양으로부터 수득된 TIL은 본원에서 PBL로 또한 지칭될 수 있다. 용어 MIL, TIL 및 PBL은 본원에서 상호교환가능하게 사용되고, 세포가 유래되는 조직 유형에 기초해서만 상이하다.

[0159] 용어 "생검"은 골수 생검을 포함한, 암성 세포를 수득하기 위해 사용되는 임의의 의료 절차를 지칭한다.

[0160] 용어 "급성 골수성 백혈병" 또는 "AML"은 관련 기술분야에서 급성 골수 백혈병 및 급성 비림프구성 백혈병으로서 또한 공지된 골수 혈액 세포주의 암을 지칭한다. AML이 액상 종양이지만, 녹색종과 같은 골수외 징후를 포함한 AML의 일부 징후는 고형 종양의 특성을 나타내며, 그럼에도 불구하고 본원에서 액상 종양으로 분류된다.

[0161] 본원에 사용된 용어 "미세환경"은 전체로서의 고형 또는 혈액 종양 미세환경 또는 미세환경 내의 세포의 개별 하위세트를 지칭할 수 있다. 본원에 사용된 종양 미세환경은 문헌 [Swartz, et al., Cancer Res., 2012, 72, 2473]에 기재된 바와 같이, "신생물 형질전환을 촉진하고, 종양 성장 및 침습을 지지하고, 종양을 숙주 면역으로부터 보호하고, 치료 저항성을 조성하고, 우세한 전이가 번성하도록 틈을 제공하는 세포, 가용성 인자, 신호 전달 분자, 세포외 매트릭스 및 기계적 신호"의 복합 혼합물을 지칭한다. 종양이 T 세포에 의해 인식될 항원을 발현하지만, 미세환경에 의한 면역 억제 때문에 면역계에 의한 종양 클리어런스는 드물다.

[0162] 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 질환 치료를 포함하나 이제 제한되지는 않는 의도된 적용을 실시하기에 충분한 본원에 기재된 바와 같은 화합물 또는 화합물의 조합물의 양을 지칭한다. 치료 유효량은 의도된 적용 (시험관내 또는 생체내), 또는 치료될 대상체 및 질환 상태 (예를 들어, 대상체의 체중, 연령 및 성별), 질환 상태의 중증도, 또는 투여 방식에 따라 달라질 수 있다. 상기 용어는 또한 표적 세포에서의 특정한 반응 (예를 들어, 혈소판 부착 및/또는 세포 이동의 감소)을 유도할 용량에 적용된다. 구체적 용량은 선택된 특정한 화합물, 이어질 투여 요법, 화합물이 다른 화합물과 조합되어 투여되는지의 여부, 투여 시기, 투여될 조직, 및 화합물을 운반하는 물리적 전달 시스템에 따라 달라질 것이다.

[0163] 본원에 사용된 용어 "치료 효과"는 치료적 이익 및/또는 예방적 이익을 포괄한다. 예방적 효과는 질환 또는 상태 출현의 지연 또는 제거, 질환 또는 상태의 증상 발병의 지연 또는 제거, 질환 또는 상태 진행의 저속화, 중지 또는 역전, 또는 그의 임의의 조합을 포함한다.

[0164] 용어 "치료", "치료하는", "치료하다" 등은 목적하는 약리학적 및/또는 생리적 효과를 얻는 것을 지칭한다. 효과는 질환 또는 그의 증상을 완전히 또는 부분적으로 방지하는 관점에서 예방적일 수 있고/거나, 질환 및/또는 질환에 기인할 수 있는 유해 효과의 부분적 또는 완전한 치유의 관점에서 치료적일 수 있다. 본원에 사용된 "치료"는 포유동물에서, 특히 인간에서의 질환의 임의의 치료를 포괄하고, (a) 질환에 대한 소인이 있을 수 있지만 질환을 갖는 것으로 아직 진단되지는 않은 대상체에서 질환이 발생하지 않도록 방지하는 것; (b) 질환의 억제, 즉, 질환의 발생 또는 진행의 정지; 및 (c) 질환의 완화, 즉, 질환의 퇴행의 유발 및/또는 1종 이상의 질환 증상의 완화를 포함한다. "치료"는 또한, 심지어 질환 또는 상태의 부재 하에서도 약리학적 효과를 제공하기 위해 작용제를 전달하는 것을 포괄하는 것으로 의도된다. 예를 들어, "치료"는 면역 반응을 도출할 수 있거나 또는 질환 상태의 부재 하에, 예를 들어 백신의 경우에 면역을 부여할 수 있는 조성물의 전달을 포괄한다.

[0165] 용어 "QD", "qd" 또는 "q.d."는 매일(quaque die), 1일 1회 또는 매일 1회를 의미한다. 용어 "BID," "bid" 또는 "b.i.d."는 하루 두번(bis in die), 1일 2회 또는 매일 2회를 의미한다. 용어 "TID," "tid" 또는 "t.i.d."는 하루 세번(ter in die), 1일 3회 또는 매일 3회를 의미한다. 용어 "QID," "qid" 또는 "q.i.d."는 하루 네번(quater in die), 1일 4회 또는 매일 4회를 의미한다.

[0166] 본원에서의 "종양 침윤 림프구" 또는 "TIL"은 원래 대상체의 혈류를 떠나 종양으로 이동한 백혈구로서 수득되는 세포 집단을 의미한다. TIL은 $CD8^+$ 세포독성 T 세포 (림프구), Th1 및 Th17 $CD4^+$ T 세포, 자연 킬러 세포, 수지상 세포 및 M1 대식세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. TIL은 1차 및 2차 TIL 둘 다를 포함한다. "1차 TIL"은 본원에 약술된 바와 같은 환자 조직 샘플로부터 수득된 것 (때때로 "새로 수거된" 것으로 지칭됨)이고, "2차 TIL"은 벌크 TIL, 확장된 TIL ("REP TIL") 뿐만 아니라 본원에 논의된 바와 같은 "재REP(reREP) TIL"을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 본원에 논의된 바와 같이 확장 또는 증식된 임의의 TIL 세포 집단이다.

[0167] TIL은 일반적으로, 세포 표면 마커를 사용하여 생화학적으로, 또는 종양에 침윤하여 치료 작용을 하는 그의 능력에 의해 기능적으로 정의될 수 있다. TIL은 일반적으로 하기 바이오마커 중 하나 이상을 발현시키는 것에 의해 카테고리화될 수 있다: CD4, CD8, TCR αβ, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1 및 CD25. 추가적으로 및 대안적으로, TIL은 환자에게 재도입시 고형 종양에 침윤하는 그의 능력에 의해 기능적으로 정의수 있다. TIL은 효력에 의해 추가로 특징화될 수 있으며 - 예를 들어, TIL은 예를 들어 인터페론 (IFN) 방출이 약 50 pg/mL 초과, 약 100 pg/mL 초과, 약 150 pg/mL 초과 또는 약 200 pg/mL 초과인 경우에 강력한 것으로 간주될 수 있다.

[0168] 본원에서 "동결보존된 TIL" (또는 동결보존된 MIL 또는 PBL)은 1차, 벌크 또는 확장된 TIL (REP TIL)이 약 -150℃ 내지 -60℃의 범위에서 처리 및 저장되는 것을 의미한다. 동결보존을 위한 일반 방법은 실시예를 포함한 본원 다른 곳에 또한 기재되어 있다. 명확하게 하기 위해, "동결보존된 TIL"은 1차 TIL의 공급원으로서 사용될 수 있는 동결된 조직 샘플과 구별가능하다.

[0169] 본원에서 "해동된 동결보존된 TIL" (또는 해동된 MIL 또는 PBL)은 이전에 동결보존된 다음, 세포 배양 온도 또는 TIL이 환자에게 투여될 수 있는 온도를 포함하나 이에 제한되지는 않는 실온 이상의 온도로 복귀하도록 처리된 TIL 집단을 의미한다.

[0170] 본원에서의 "세포 집단" (TIL 포함)은 공통 특성을 공유하는 다수의 세포를 의미한다. 일반적으로, 집단은 수가 1×10^6 내지 1×10^{10}개의 범위이고, 상이한 TIL 집단은 상이한 수를 포함한다. 예를 들어, IL-2의 존재 하의 1차 TIL의 초기 성장은 대략 1×10^8개 세포의 벌크 TIL의 집단을 생성한다. REP 확장은 일반적으로 주입을 위해 1.5×10^9 내지 1.5×10^{10}개 세포 집단을 제공하도록 수행된다.

[0171] 일반적으로, TIL은 먼저 환자 종양 샘플로부터 수득되고 ("1차 TIL"), 이어서 본원에 기재된 바와 같이 추가의 조작을 위해 보다 큰 집단으로 확장되고, 임의로 동결보존되고, 본원에 약술된 바와 같이 재자극되고, 임의로 TIL 건강의 지표로서 표현형 및 대사 파라미터에 대해 평가된다.

[0172] 일반적으로, 수거된 세포 현탁액은 "1차 세포 집단" 또는 "새로 수거된" 세포 집단으로 불린다.

[0173] 일반적으로, 본원에서 논의되는 바와 같이, TIL은 먼저 본원에서 논의된 바와 같이 환자로부터 절제된 종양으로

부터 1차 TIL 집단을 수득함으로써 제조된다 ("1차 세포 집단" 또는 "제1 세포 집단"). 이후 세포를 IL-2와 함께 배양하는 것을 이용하는 초기 벌크 확장이 이어져 제2 세포 집단을 형성한다 (때때로 본원에서 "벌크 TIL 집단" 또는 "제2 집단"으로 지칭됨).

[0174] 용어 "세포독성 림프구"는 세포독성 T (CTL) 세포 ($CD8^+$ 세포독성 T 림프구 및 $CD4^+$ T-헬퍼 림프구 포함), 자연 킬러 T (NKT) 세포 및 자연 킬러 (NK) 세포를 포함한다. 세포독성 림프구는, 예를 들어 종양 연관 항원에 의해 활성화되고/거나 종양 특이적 키메라 항원 수용체 또는 T-세포 수용체에 의해 형질도입된 말초 혈액-유래 αβ TCR-양성 또는 γδ TCR-양성 T 세포, 및 종양-침윤 림프구 (TIL)를 포함할 수 있다.

[0175] 용어 "중심 기억 T 세포"는 인간에서 CD45RO+이고 CCR7 (CCR7h i) 및 CD62L (CD62 hi)을 구성적으로 발현하는 T 세포의 하위세트를 지칭한다. 중심 기억 T 세포의 표면 표현형은 또한 TCR, CD3, CD127 (IL-7R) 및 IL-15R을 포함한다. 중심 기억 T 세포에 대한 전사 인자는 BCL-6, BCL-6B, MBD2 및 BMII를 포함한다. 중심 기억 T 세포는 TCR 촉발 후 이펙터 분자로서 주로 IL-2 및 CD40L을 분비한다. 중심 기억 T 세포는 혈액 중 CD4 구획에서 우세하고, 인간에서는 림프절 및 편도에서 비례적으로 풍부화되어 있다.

[0176] 용어 "이펙터 기억 T 세포"는, 중심 기억 T 세포와 같이 CD45RO+이지만, CCR7의 구성적 발현을 상실하였고 (CCR7lo) CD62L 발현에 대해 불균질하거나 낮은 (CD62Llo) 인간 또는 포유동물 T 세포의 하위세트를 지칭한다. 중심 기억 T 세포의 표면 표현형은 또한 TCR, CD3, CD127 (IL-7R) 및 IL-15R을 포함한다. 중심 기억 T 세포에 대한 전사 인자는 BLIMP1을 포함한다. 이펙터 기억 T 세포는 항원 자극 후 인터페론-γ, IL-4 및 IL-5를 포함한 높은 수준의 염증성 시토카인을 신속하게 분비한다. 이펙터 기억 T 세포는 혈액 중 CD8 구획에서 우세하고, 인간에서는 폐, 간 및 장에서 비례적으로 풍부화되어 있다. CD8+ 이펙터 기억 T 세포는 다량의 퍼포린을 보유한다. 용어 "폐쇄 시스템"은 외부 환경으로 폐쇄되는 시스템을 지칭한다. 세포 배양 방법에 적절한 임의의 폐쇄 시스템이 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 폐쇄 시스템은, 예를 들어 폐쇄된 G-용기를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 종양 절편이 폐쇄 시스템에 첨가되면, 시스템은 TIL이 환자에게 투여될 준비가 될 때까지 외부 환경에 개방되지 않는다.

[0177] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 방법은, 종양 조직 또는 종양 조직으로부터의 세포를 표준 실험실 배지 (비제한적으로 RPMI를 포함함)에서 성장시키고, 시약, 예컨대 조사된 피더 세포 및 항-CD3 항체로 처리하여 목적하는 효과, 예컨대 TIL 수의 증가 및/또는 목적하는 세포 표면 마커 또는 다른 구조적, 생화학적 또는 기능적 특색을 함유하는 세포 집단의 풍부화를 달성하는 것인 "사전-REP" 단계를 추가로 포함한다. 사전-REP 단계는 실험실 등급 시약을 (실험실 등급 시약이 나중의 REP 단계 동안 희석된다는 가정 하에) 이용할 수 있으며, 이는 TIL 생산을 개선시키기 위한 대안적인 전략을 포함시키는 것을 보다 용이하게 할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 개시된 TLR 효능제 및/또는 펩티드 또는 펩티드모방체가 사전-REP 단계 동안 배양 배지에 포함될 수 있다. 사전-REP 배양은, 일부 실시양태에서, IL-2를 포함할 수 있다. 본 발명은 바람직한 측면에서, 본원에서 "재자극 급속 확장 프로토콜" 또는 "재REP"로도 지칭되는 1개 이상의 추가의 재자극 프로토콜로 REP를 증대시키는 신규 방법에 관한 관한 것이며, 이는 놀랍게도 기억 이펙터 T 세포 하위세트를 포함한 기억 T 세포 하위세트 확장, 및/또는 재자극된 TIL (때때로 본원에서 "재TIL(reTIL)"로 지칭됨)을 위해 새로 수거된 TIL 또는 해동된 동결보존된 TIL과 비교하여 당분해 호흡의 현저한 증진을 가져온다. 즉, 동결보존된 TIL에 대해 재REP 절차를 사용함으로써, 환자는 고도로 대사적으로 활성인 건강한 TIL을 받아, 보다 유리한 결과를 가져올 수 있다.

[0178] "항종양 유효량", "종양-억제 유효량" 또는 "치료량"이 나타나 있는 경우, 투여될 본 발명의 조성물의 정확한 양은 의사가 환자 (대상체)의 연령, 체중, 종양 크기, 감염 또는 전이 정도, 및 상태에서의 개별 차이를 고려하여 결정할 수 있다. 일반적으로 기재된 유전자 변형된 세포독성 림프구를 포함하는 제약 조성물은 10^4 내지 10^{11}개 세포/kg 체중 (예를 들어, 10^5 내지 10^6, 10^5 내지 10^{10}, 10^5 내지 10^{11}, 10^6 내지 10^{10}, 10^6 내지 10^{11},10^7 내지 10^{11}, 10^7 내지 10^{10}, 10^8 내지 10^{11}, 10^8 내지 10^{10}, 10^9 내지 10^{11}, 또는 10^9 내지 10^{10}개 세포/kg 체중) (이들 범위 내의 모든 정수 값 포함)의 투여량으로 투여될 수 있는 것으로 기재될 수 있다. 유전자 변형된 세포독성 림프구 조성물은 또한 이들 투여량으로 다수회 투여될 수 있다. 유전자 변형된 세포독성 림프구는 면역요법에 통상적으로 공지된 주입 기술을 사용함으로써 투여될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988] 참조). 특정한 환자에 대한 최적의 투여량 및 치료 요법은 의약 기술분야의 통상의 기술자가 환자를 질환의 징후에 대해 모니터링하고 이에 따라 치료를 조정함으로써 용이하게 결정할 수 있다.

[0179] 의심을 피하기 위해, 본 발명의 특정한 측면, 실시양태 또는 실시예와 관련하여 기재된 특정한 특색 (예를 들어

정수, 특징, 값, 용도, 질환, 화학식, 화합물 또는 군)은 본원에 기재된 임의의 다른 측면, 실시양태 또는 실시예와 비상용성이지 않은 한 그에 적용가능한 것으로 이해될 것으로 의도된다. 따라서 이러한 특색은 적절한 경우에 본원에 정의된 임의의 정의, 청구범위 또는 실시양태와 관련하여 사용될 수 있다. 본 명세서에 개시된 모든 특색 (임의의 첨부 청구범위, 요약서 및 도면 포함) 및/또는 그와 같이 개시된 임의의 방법 또는 과정의 모든 단계는, 이러한 특색 및/또는 단계 중 적어도 일부가 상호 배타적인 경우의 조합을 제외하고는, 임의의 조합으로 조합될 수 있다. 본 발명은 임의의 개시된 실시양태의 임의의 세부사항에 한정되지 않는다. 본 발명은 본 명세서 (임의의 첨부 청구범위, 요약서 및 도면 포함)에서 개시된 특색의 임의의 신규한 것 또는 신규한 조합, 또는 그와 같이 개시된 임의의 방법 또는 과정의 단계의 임의의 신규한 것 또는 임의의 신규한 조합으로 확대된다.

[0180] 용어 "약" 및 "대략"은 값의 통계적으로 의미있는 범위 내에 있다는 것을 의미한다. 이러한 범위는 주어진 값 또는 범위의 한 자릿수 이내, 바람직하게는 50% 이내, 보다 바람직하게는 20% 이내, 보다 더 바람직하게는 10% 이내, 및 보다 더 바람직하게는 5% 이내에 있을 수 있다. 용어 "약" 또는 "대략"에 의해 포괄되는 허용가능한 변동은 연구 하의 특정한 시스템에 좌우되고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 인지될 수 있다. 더욱이, 본원에 사용된 용어 "약" 및 "대략"은 치수, 크기, 제제, 파라미터, 형상 및 다른 양 및 특징이 정확하지 않고 정확할 필요는 없지만, 목적하는 바에 따라, 허용오차, 전환 인자, 반올림, 측정 오차 등 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 인자를 반영하면서, 대략적이고/거나 더 크거나 더 작을 수 있다는 것을 의미한다. 일반적으로, 치수, 크기, 제제, 파라미터, 형상 또는 다른 양 또는 특징은 그러하다고 명백히 언급되어 있든지 아니든지 간에 "약" 또는 "근사"이다. 매우 상이한 크기, 형상 및 치수의 실시양태가 기재된 배열을 사용할 수 있다는 것이 주목된다.

[0181] 원래 및 보정된 형태로 첨부된 청구범위에 사용될 때 과도적 용어 "포함하는", "본질적으로 이루어진" 및 "이루어진"은 언급되지 않은 추가의 청구항 요소 또는 단계가 (존재하는 경우) 청구범위의 범주로부터 배제되는 것과 관련하여 청구항 범주를 규정한다. 용어 "포함하는"은 포함적 또는 개방적인 것으로 의도되고, 임의의 추가의 언급되지 않은 요소, 방법, 단계 또는 물질을 배제하지 않는다. 용어 "이루어진"은 청구항에 명시된 것 이외의 임의의 요소, 단계 또는 물질을 배제하고, 후자의 경우에, 명시된 물질(들)과 통상적으로 연관된 불순물을 배제한다. 용어 "본질적으로 이루어진"은 청구항의 범주를 명시된 요소, 단계 또는 물질(들) 및 청구된 발명의 기초적이며 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것으로 제한한다. 본 발명을 구현하는 본원에 기재된 모든 조성물, 방법 및 키트는, 대안적 실시양태에서, 과도적 용어 "포함하는", "본질적으로 이루어진" 및 "이루어진" 중 어느 것에 의해 보다 구체적으로 정의될 수 있다.

[0182] 말초 혈액 (PBL) 및/또는 골수 (MIL)를 포함한 치료 T-세포를 확장시키는 방법의 실시양태

[0183] 말초 혈액으로부터 말초 혈액 림프구 (PBL)를 확장시키는 방법

[0184] PBL 방법 1. 본 발명의 한 실시양태에서, PBL은 본원에 기재된 방법을 사용하여 확장된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 전혈로부터 PBMC 샘플을 수득하는 것을 포함한다. 한 실시양태에서, 방법은 비-CD19+ 분획의 음성 선택을 사용하여 PBMC로부터 순수한 T-세포를 단리함으로써 T-세포를 풍부화시키는 것을 포함한다. 제0일에, 순수한 T-세포를 1:1 비 (비드:세포)로의 항CD3/항CD28 항체 (디나비즈®) 및 3000 IU/ml의 IL-2와 함께 배양한다. 제4일에, 추가의 IL-2를 3000 IU/ml로 배양물에 첨가한다. 제7일에, 배양물을 1:1 비 (비드:세포)로의 항-CD3/항CD28 항체 (디나비즈®)로 다시 자극시키고, 3000 IU/ml의 추가의 IL-2를 배양물에 첨가한다. PBL을 제14일에 수거하고, 비드를 제거하고, PBL을 계수하고 표현형결정한다. 한 실시양태에서, 방법은 비-CD19+ 분획의 자기 비드-기반 음성 선택을 사용하여 PBMC로부터 순수한 T-세포를 단리함으로써 T-세포를 풍부화시키는 것을 포함한다.

[0185] 본 발명의 한 실시양태에서, PBL 방법 1을 하기와 같이 수행한다: 제0일에, 동결보존된 PBMC 샘플을 해동시키고, PBMC를 계수한다. 인간 범 T-세포 단리 키트 및 LS 칼럼 (밀테니 바이오테크)을 사용하여 T-세포를 단리한다. 단리된 T 세포를 계수하고, 지렉스 24-웰 플레이트의 웰당 $5x10^5$개 세포로 시딩하고, 웰당 총 8ml의 CM2 배지 내에서 디나비즈® (항-CD3/항-CD28)와 함께 1:1 비로, 3000 IU/ml의 IL-2와 함께 공동-배양한다. 제4일에, 각각의 웰 내의 배지를 CM2에서 3000 IU/ml의 신선한 IL-2를 갖는 AIM-V로 교체한다. 제7일에, 확장된 세포를 수거하고, 계수한 다음, 3000 IU/ml의 IL-2 및 1:1 비 (비드:세포)로의 디나비즈®가 존재하는 지렉스 IOM 플라스크에서 플라스크당 $15x10^6$개 세포로 총 100ml AIM-V 배지 내에서 배양한다. 제11일에, 배지를 3000 IU/ml의 신선한 IL-2로 보충된 CM-4배지로 교체한다. 제14일에, 디나마그 자석 (디나마그(DynaMag)™-

15)을 사용하여 디나비즈®를 제거하고, 세포를 계수한다.

[0186] 본 발명의 한 실시양태에서, PBL 방법 1을 하기와 같이 수행한다: 제0일에, 동결보존된 PBMC 샘플을 해동시키고, PBMC를 계수한다. 인간 범 T-세포 단리 키트 및 LS 칼럼 (밀테니 바이오테크)을 사용하여 T-세포를 단리한다. 단리된 T 세포를 계수하고, 지렉스 24-웰 플레이트의 웰당 $5x10^5$개 세포로 시딩하고, 웰당 총 8ml의 CM2 배지 내에서 디나비즈® (항-CD3/항-CD28)와 함께 1:1 비로, 3000 IU/ml의 IL-2와 함께 공동-배양한다. 제4일에, 각각의 웰 내의 배지를 CM2에서 3000 IU/ml의 신선한 IL-2를 갖는 AIM-V로 교체한다. 제7일에, PBL을 수거하고, 계수한 다음, 3000 IU/ml의 IL-2 및 1:1 비 (비드:세포)로의 디나비즈®가 존재하는 새로운 지렉스-24 웰 플레이트의 웰당 1x106개 세포로 총 8ml AIM-V 배지 내에 재시딩한다. 제11일에, 배지를 3000 IU/ml의 신선한 IL-2로 보충된 CM-4배지로 교체한다. 제14일에, 디나마그 자석 (디나마그™-15)을 사용하여 디나비즈®를 제거하고, 세포를 계수한다.

[0187] PBL 방법 2. 본 발명의 한 실시양태에서, PBL은 전혈로부터 PBMC 샘플을 수득하는 것을 포함하는 PBL 방법 2를 사용하여 확장된다. PBMC를 37℃에서 적어도 3시간 동안 인큐베이션한 다음 비-부착 세포를 단리함으로써 PBMC로부터의 T-세포를 풍부화시킨다. 비-부착 세포를 PBL 방법 1과 유사하게 확장시키고, 즉, 제0일에, 비-부착 세포를 1:1 비 (비드:세포)로의 항-CD3/항CD28 항체 (디나비즈®) 및 3000 IU/ml의 IL-2와 함께 배양한다. 제4일에, 추가의 IL-2를 3000 IU/ml로 배양물에 첨가한다. 제7일에, 배양물을 1:1 비 (비드:세포)로의 항-CD3/항CD28 항체 (디나비즈®)로 다시 자극시키고, 3000 IU/ml의 추가의 IL-2를 배양물에 첨가한다. PBL을 제14일에 수거하고, 비드를 제거하고, PBL을 계수하고 표현형결정한다.

[0188] 본 발명의 한 실시양태에서, PBL 방법 2를 하기와 같이 수행한다: 제0일에, 동결보존된 PMBC 샘플을 해동시키고, PBMC 세포를 6 웰 플레이트에서 웰당 6백만개 세포로 CM-2 배지 내에 시딩하고, 37℃에서 3시간 동안 인큐베이션한다. 3시간 후, PBL인 비-부착 세포를 제거하고, 계수한다. PBL을 비드:세포 1:1 비로의 항-CD3/항-CD28 디나비즈® 및 3000 IU/ml의 IL-2와 함께 지렉스 24-웰 플레이트의 각각의 웰에서 웰당 $1x10^6$개 세포로 총 7ml의 CM-2 배지 내에서 배양한다. 제4일에, 각각의 웰 내의 배지를 AIM-V 배지 및 3000 IU/ml의 신선한 IL-2로 교체한다. 제7일에, 확장된 세포를 수거하고, 계수한 다음, 3000 IU/ml의 IL-2 및 1:1 비 (T-세포:비드)로의 디나비즈®가 존재하는 지렉스 IOM 플라스크에서 플라스크당 $15x10^6$개 세포로 총 100ml AIM-V 배지 내에서 배양한다. 제11일에, 배지를 CM-4 배지로 교체하고, 신선한 IL-2 (3000 IU/ml)로 보충한다. 제14일에, 디나마그™ 자석 (디나마그™-15)을 사용하여 디나비즈를 제거하고, 세포를 계수한다.

[0189] 본 발명의 한 실시양태에서, PBL 방법 2를 하기와 같이 수행한다: 제0일에, 동결보존된 PMBC 샘플을 해동시키고, PBMC 세포를 6 웰 플레이트에서 웰당 6백만개 세포로 CM-2 배지 내에 시딩하고, 37℃에서 3시간 동안 인큐베이션한다. 3시간 후, PBL인 비-부착 세포를 제거하고, 계수한다. PBL을 비드:세포 1:1 비로의 항-CD3/항-CD28 디나비즈® 및 3000 IU/ml의 IL-2와 함께 지렉스 24-웰 플레이트의 각각의 웰에서 웰당 $1x10^6$개 세포로 총 7ml의 CM-2 배지 내에서 배양한다. 제4일에, 각각의 웰 내의 배지를 AIM-V 배지 및 3000 IU/ml의 신선한 IL-2로 교체한다. 제7일에, 확장된 세포를 수거하고, 계수한 다음, 3000 IU/ml의 IL-2 및 1:1 비 (T-세포:비드)로의 디나비즈®가 존재하는 새로운 지렉스 24-웰 플레이트에서 웰당 $1x10^6$개 세포로 총 8ml AIM-V 배지 내에서 배양한다. 제11일에, 배지를 CM-4 배지로 교체하고, 신선한 IL-2 (3000 IU/ml)로 보충한다. 제14일에, 디나마그™ 자석 (디나마그™-15)을 사용하여 디나비즈를 제거하고, 세포를 계수한다.

[0190] PBL 방법 3. 본 발명의 한 실시양태에서, PBL은 말초 혈액으로부터 PBMC 샘플을 수득하는 것을 포함하는 PBL 방법 3을 사용하여 확장된다. CD19+ 선택을 사용하여 B-세포를 단리하고, PBMC 샘플의 비-CD19+ 분획의 음성 선택을 사용하여 T-세포를 선택한다. 제0일에, T-세포 및 B-세포를 1:1 비 (비드:세포)로의 항CD3/항CD28 항체 (디나비즈®) 및 3000 IU/ml의 IL-2와 공동-배양한다. 제4일에, 추가의 IL-2를 3000 IU/ml로 배양물에 첨가한다. 제7일에, 배양물을 1:1 비 (비드:세포)로의 항-CD3/항CD28 항체 (디나비즈®)로 다시 자극시키고, 3000 IU/ml의 추가의 IL-2를 배양물에 첨가한다. PBL을 제14일에 수거하고, 비드를 제거하고, PBL을 계수하고 표현형결정한다.

[0191] 본 발명의 한 실시양태에서, PBL 방법 3을 하기와 같이 수행한다: 제0일에, 말초 혈액으로부터 유래된 동결보존된 PBMC를 해동시키고, 계수한다. CD19 멀티소트 키트, 인간 (밀테니 바이오테크)을 사용하여 CD19+ B-세포를 분류한다. 비-CD19+ 세포 분획 중에서, 인간 범 T-세포 단리 키트 및 LS 칼럼 (밀테니 바이오테크)을 사용하여 T-세포를 정제한다. T-세포 (PBL) 및 B-세포를 24-웰 플레이트에서 약 8ml의 CM2 배지 내에서 약 3000IU/ml의

IL-2의 존재 하에 상이한 비로 공동-배양한다. B-세포:T-세포 비는 0.1:1; 1:1 및 10:1이다. T-세포/B-세포 공동-배양물을 1:1 비 (비드:세포)로의 항-CD3/항CD28 항체 (디나비즈®)로 자극시킨다. 제4일에, 배지를 CM2에서 AIM-V 배지로 교체하고, 추가의 IL-2를 3000 IU/ml로 배양물에 첨가한다. 제7일에, 세포를 수거하고, 계수하고, 새로운 지렉스 24-웰 플레이트에서 웰당 약 $1.5x10^5$내지 약 $4x10^5$개 세포 범위의 세포로 AIM-V 배지 내에 재-시딩하고, 1:1 비 (비드:세포)로의 항CD3/항CD28 항체 (디나비즈®)로, 3000 IU/ml의 추가의 IL-2로 자극한다. 제14일에, 디나마그™ 자석 (디나마그™-15)을 사용하여 디나비즈를 제거하고, 세포를 계수한다.

[0192] 한 실시양태에서, PBMC는 전혈 샘플로부터 단리된다. 한 실시양태에서, PBMC 샘플은 PBL을 확장시키기 위한 출발 물질로서 사용된다. 한 실시양태에서, 샘플은 확장 방법 전에 동결보존된다. 또 다른 실시양태에서, 신선한 샘플은 PBL을 확장시키기 위한 출발 물질로서 사용된다. 본 발명의 한 실시양태에서, T-세포는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 PBMC로부터 단리된다. 한 실시양태에서, T-세포는 인간 범 T-세포 단리 키트 및 LS 칼럼을 사용하여 단리된다. 본 발명의 한 실시양태에서, T-세포는 관련 기술분야에 공지된 항체 선택 방법, 예를 들어 CD19 음성 선택을 사용하여 PBMC로부터 단리된다.

[0193] 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일 또는 약 14일에 걸쳐 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 약 7일에 걸쳐 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 약 14일에 걸쳐 수행된다.

[0194] 본 발명의 한 실시양태에서, PBMC는 항CD3/항CD28 항체와 함께 배양된다. 한 실시양태에서, 임의의 입수가능한 항CD3/항CD28 제품이 본 발명에서 유용하다. 본 발명의 한 실시양태에서, 사용된 상업적으로 입수가능한 제품은 디나비즈®이다. 한 실시양태에서, 디나비즈®는 PBMC와 함께 1:1 (비드:세포)의 비로 배양된다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 PBMC와 함께 1.5:1, 2:1, 2.5:1, 3:1, 3.5:1, 4:1, 4.5:1 또는 5:1 (비드:세포)의 비로 배양된 디나비즈®이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항체 배양 단계 및/또는 세포를 항체로 재자극시키는 단계는 약 2 내지 약 6일, 약 3 내지 약 5일, 또는 약 4일의 기간에 걸쳐 수행된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항체 배양 단계는 약 2일, 3일, 4일, 5일 또는 6일의 기간에 걸쳐 수행된다.

[0195] 한 실시양태에서, PBMC 샘플은 IL-2와 함께 배양된다. 본 발명의 한 실시양태에서, PBMC로부터 PBL의 확장에 사용된 세포 배양 배지는 약 100 IU/mL, 약 200 IU/mL, 약 300 IU/mL, 약 400 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 500 IU/mL, 약 600 IU/mL, 약 700 IU/mL, 약 800 IU/mL, 약 900 IU/mL, 약 1,000 IU/mL, 약 1,100 IU/mL, 약 1,200 IU/mL, 약 1,300 IU/mL, 약 1,400 IU/mL, 약 1,500 IU/mL, 약 1,600 IU/mL, 약 1,700 IU/mL, 약 1,800 IU/mL, 약 1,900 IU/mL, 약 2,000 IU/mL, 약 2,100 IU/mL, 약 2,200 IU/mL, 약 2,300 IU/mL, 약 2,400 IU/mL, 약 2,500 IU/mL, 약 2,600 IU/mL, 약 2,700 IU/mL, 약 2,800 IU/mL, 약 2,900 IU/mL, 약 3,000 IU/mL, 약 3,100 IU/mL, 약 3,200 IU/mL, 약 3,300 IU/mL, 약 3,400 IU/mL, 약 3,500 IU/mL, 약 3,600 IU/mL, 약 3,700 IU/mL, 약 3,800 IU/mL, 약 3,900 IU/mL, 약 4,000 IU/mL, 약 4,100 IU/mL, 약 4,200 IU/mL, 약 4,300 IU/mL, 약 4,400 IU/mL, 약 4,500 IU/mL, 약 4,600 IU/mL, 약 4,700 IU/mL, 약 4,800 IU/mL, 약 4,900 IU/mL, 약 5,000 IU/mL, 약 5,100 IU/mL, 약 5,200 IU/mL, 약 5,300 IU/mL, 약 5,400 IU/mL, 약 5,500 IU/mL, 약 5,600 IU/mL, 약 5,700 IU/mL, 약 5,800 IU/mL, 약 5,900 IU/mL, 약 6,000 IU/mL, 약 6,500 IU/mL, 약 7,000 IU/mL, 약 7,500 IU/mL, 약 8,000 IU/mL, 약 8,500 IU/mL, 약 9,000 IU/mL, 약 9,500 IU/mL, 및 약 10,000 IU/mL로 이루어진 군으로부터 선택된 농도의 IL-2를 포함한다.

[0196] 본 발명의 한 실시양태에서, 확장 방법을 위한 PBMC의 출발 세포 수는 약 25,000 내지 약 1,000,000, 약 30,000 내지 약 900,000, 약 35,000 내지 약 850,000, 약 40, 000 내지 약 800,000, 약 45,000 내지 약 800,000, 약 50,000 내지 약 750,000, 약 55,000 내지 약 700,000, 약 60,000 내지 약 650,000, 약 65,000 내지 약 600,000, 약 70,000 내지 약 550,000개, 바람직하게는 약 75,000 내지 약 500,000, 약 80,000 내지 약 450,000, 약 85,000 내지 약 400,000, 약 90,000 내지 약 350,000, 약 95,000 내지 약 300,000, 약 100,000 내지 약 250,000, 약 105,000 내지 약 200,000, 또는 약 110,000 내지 약 150,000개이다. 본 발명의 한 실시양태에서, PBMC의 출발 세포 수는 약 138,000, 140,000, 145,000개 또는 그 초과이다. 또 다른 실시양태에서, PBMC의 출발 세포 수는 약 28,000개이다. 또 다른 실시양태에서, PBMC의 출발 세포 수는 약 62,000개이다. 또 다른 실시양태에서, PBMC의 출발 세포 수는 약 338,000개이다. 또 다른 실시양태에서, PBMC의 출발 세포 수는 약 336,000개이다.

[0197] 본 발명의 한 실시양태에서, 세포는 지렉스 24 웰 플레이트에서 성장된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 대등한 웰 플레이트가 사용된다. 한 실시양태에서, 확장을 위한 출발 물질은 웰당 약 $5x10^5$개 T-세포이다. 본 발명의

한 실시양태에서, 웰당 $1x10^6$개 세포가 존재한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 웰당 세포의 수는 웰에 시딩하고 T-세포를 확장시키기에 충분하다.

[0198] 본 발명의 한 실시양태에서, PBL의 배수 확장은 약 20% 내지 약 100%, 25% 내지 약 95%, 30% 내지 약 90%, 35% 내지 약 85%, 40% 내지 약 80%, 45% 내지 약 75%, 50% 내지 약 100%, 또는 25% 내지 약 75%이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 배수 확장은 약 25%이다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 배수 확장은 약 50%이다. 또 다른 실시양태에서, 배수 확장은 약 75%이다.

[0199] 본 발명의 한 실시양태에서, 추가의 IL-2는 방법 전반에 걸쳐 1일 이상에서 배양물에 첨가될 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 추가의 IL-2는 제4일에 첨가된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 추가의 IL-2는 제7일에 첨가된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 추가의 IL-2는 제11일에 첨가된다. 다른 실시양태에서, 추가의 IL-2는 제4일, 제7일 및/또는 제11일에 첨가된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 세포 배양 방법 전반에 걸쳐 1일 이상에서 교체될 수 있다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 방법의 제4일, 제7일 및/또는 제11일에 교체된다. 본 발명의 한 실시양태에서, PBL은 추가의 IL-2와 함께 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일 또는 14일의 기간 동안 배양된다. 본 발명의 한 실시양태에서, PBL은 IL-2의 각각의 첨가 후 3일의 기간 동안 배양된다.

[0200] 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 방법 동안 적어도 1회 교체된다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 추가의 IL-2가 첨가되는 동시에 교체된다. 또 다른 실시양태에서, 세포 배양 배지는 제1일, 제2일, 제3일, 제4일, 제5일, 제6일, 제7일, 제8일, 제9일, 제10일, 제11일, 제12일, 제13일 또는 제14일 중 적어도 하나에서 교체된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 방법 전반에 걸쳐 사용되는 세포 배양 배지는 동일하거나 상이할 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 CM-2, CM-4 또는 AIM-V이다.

[0201] 본 발명의 한 실시양태에서, T-세포는 14-일 확장 방법 전반에 걸쳐 1일 이상에서 항CD3/항CD28 항체로 재자극될 수 있다. 한 실시양태에서, T-세포는 제7일에서 재자극된다. 한 실시양태에서, 지렉스 10M 플라스크가 재자극 단계에 사용된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 대등한 플라스크가 사용된다.

[0202] 본 발명의 한 실시양태에서, 디나비즈®는 디나마그™ 자석을 사용하여 제거되고, 세포는 계수되고, 세포는 하기 실시예에 추가로 기재된 바와 같은 표현형 및 기능적 분석을 사용하여 분석된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항체는 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 PBL 또는 MIL로부터 분리된다. 임의의 상기 실시양태에서, TIL, PBL 또는 MIL의 자기 비드-기반 선택이 사용된다.

[0203] 본 발명의 한 실시양태에서, PBMC 샘플은 비-부착 세포를 확인하기에 효과적인 목적 온도에서 소정 기간 동안 인큐베이션된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 인큐베이션 시간은 약 3시간이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 온도는 약 37℃이다. 이어서 비-부착 세포는 상기 기재된 방법을 사용하여 확장된다.

[0204] 본 발명의 한 실시양태에서, PBMC는 이브루티닙 또는 또 다른 ITK 또는 키나제 억제제, 예컨대 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 ITK 및 키나제 억제제로 치료된 환자로부터 수득된다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 ITK에 공유적으로 및 비가역적으로 결합하는 공유 ITK 억제제이다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 ITK에 결합하는 알로스테릭 ITK 억제제이다. 본 발명의 한 실시양태에서, PBMC는 PBL 방법 1, PBL 방법 2 또는 PBL 방법 3을 포함한 임의의 상기 방법에 사용하기 위한 PBMC 샘플을 수득하기 전에, 이브루티닙 또는 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 ITK 억제제를 포함한 다른 ITK 억제제로 치료된 환자로부터 수득된다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제 치료는 적어도 1회, 적어도 2회 또는 적어도 3회 또는 그 초과로 투여되었다. 본 발명의 한 실시양태에서, 이브루티닙 또는 다른 ITK 억제제로 사전치료된 환자로부터 확장된 PBL은 이브루티닙 또는 다른 ITK 억제제로 사전치료되지 않은 환자로부터 확장된 것보다 더 적은 LAG3+, PD-1+ 세포를 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 이브루티닙 또는 다른 ITK 억제제로 사전치료된 환자로부터 확장된 PBL은 이브루티닙 또는 다른 ITK 억제제로 사전치료되지 않은 환자로부터 확장된 것보다 증가된 수준의 IFNγ 생산을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 이브루티닙 또는 다른 ITK 억제제로 사전치료된 환자로부터 확장된 PBL은 이브루티닙 또는 다른 ITK 억제제로 사전치료되지 않은 환자로부터 확장된 것보다 더 낮은 이펙터:표적 세포 비에서 증가된 용해 활성을 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 이브루티닙 또는 다른 ITK 억제제로 사전치료된 환자는 비치료 환자와 비교하여 더 높은 배수-확장을 갖는다.

[0205] 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 ITK 억제제를 세포 배양물에 첨가하는 단계를 포함한다. 한 실시양태에서, ITK 억제제는 방법의 제0일, 제1일, 제2일, 제3일, 제4일, 제5일, 제6일, 제7일, 제8일, 제9일, 제10일, 제11일, 제12일, 제13일 또는 제14일 중 하나 이상에서 첨가된다. 한 실시양태에서, ITK 억제제는 방법 동안

세포 배양 배지가 교체되는 날에 첨가된다. 한 실시양태에서, ITK 억제제는 제0일 및 세포 배양 배지가 교체될 때 첨가된다. 한 실시양태에서, ITK 억제제는 방법 동안 IL-2가 첨가될 때 첨가된다. 한 실시양태에서, ITK 억제제는 방법의 제0일, 제4일, 제7일 및 임의로 제11일에 첨가된다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 방법의 제0일 및 제7일에 첨가된다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 관련 기술분야에 공지된 것이다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 본원 다른 곳에 기재된 것이다.

[0206] 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 방법에서 약 0.1nM 내지 약 5uM의 농도로 사용된다. 한 실시양태에서, ITK 억제제는 방법에서 약 0.1nM, 0.5nM, 1nM, 5nM, 10nM, 20nM, 30nM, 40nM, 50nM, 60nM, 70nM, 80nM, 90nM, 100nM, 150nM, 200nM, 250nM, 300nM, 350nM, 400nM, 450nM, 500nM, 550nM, 600nM, 650nM, 700nM, 750nM, 800nM, 850nM, 900nM, 950nM, 1uM, 2uM, 3uM, 4uM 또는 5uM의 농도로 사용된다.

[0207] 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 PBMC가 ITK 억제제 치료, 예컨대 이브루티닙에 사전 노출되지 않은 환자로부터 유래된 경우 ITK 억제제를 첨가하는 단계를 포함한다.

[0208] 일부 실시양태에서, PBMC 샘플은 키나제 억제제 또는 ITK 억제제를 포함하는 요법으로 임의로 사전-치료된 대상체 또는 환자로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 종양 샘플은 키나제 억제제 또는 ITK 억제제를 포함하는 요법으로 사전-치료된 대상체 또는 환자로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, PBMC 샘플은 키나제 억제제 또는 ITK 억제제를 포함하는 요법으로 사전-치료되었고 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월 또는 1년 또는 그 초과 동안 치료를 받은 대상체 또는 환자로부터의 것이다. 또 다른 실시양태에서, PBMC는 현재 ITK 억제제 요법, 예컨대 이브루티닙을 받고 있는 환자로부터 유래된 것이다.

[0209] 일부 실시양태에서, PBMC 샘플은 키나제 억제제 또는 ITK 억제제를 포함하는 요법으로 사전-치료되었고 키나제 억제제 또는 ITK 억제제, 예컨대 이브루티닙을 사용한 치료에 대해 불응성인 대상체 또는 환자로부터의 것이다.

[0210] 일부 실시양태에서, PBMC 샘플은 키나제 억제제 또는 ITK 억제제를 포함하는 요법으로 사전-치료되었지만 더 이상 키나제 억제제 또는 ITK 억제제를 사용한 치료를 받고 있지 않는 대상체 또는 환자로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, PBMC 샘플은 키나제 억제제 또는 ITK 억제제를 포함하는 요법으로 사전-치료되었지만 더 이상 키나제 억제제 또는 ITK 억제제를 사용한 치료를 받고 있지 않고 적어도 1개월, 적어도 2개월, 적어도 3개월, 적어도 4개월, 적어도 5개월, 적어도 6개월 또는 적어도 1년 또는 그 초과 동안 치료를 받지 않은 대상체 또는 환자로부터의 것이다. 또 다른 실시양태에서, PBMC는 ITK 억제제에 사전 노출되었지만 적어도 3개월, 적어도 6개월, 적어도 9개월 또는 적어도 1년간 치료되지 않은 환자로부터 유래된 것이다.

[0211] 본 발명의 한 실시양태에서, 제0일에, 세포는 CD19+에 대해 선택되고 그에 따라 분류된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 선택은 항체 결합 비드를 사용하여 이루어진다. 본 발명의 한 실시양태에서, 순수한 T-세포는 PBMC로부터 제0일에 단리된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제0일에, CD19+ B 세포 및 순수한 T 세포는 최소 4일 동안 항CD3/항CD28 항체와 함께 공동-배양된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제4일에, IL-2가 배양물에 첨가된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제7일에, 배양물은 항CD3/항CD28 항체 및 추가의 IL-2로 재자극된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제14일에, PBL이 수거된다.

[0212] 본 발명의 한 실시양태에서, 이브루티닙 또는 다른 ITK 억제제로 사전-치료되지 않은 환자의 경우, 10-15ml의 버피 코트는 약 $5x10^9$개 PBMC를 생성할 것이고, 이는 차례로, 확장 방법의 종료시에 약 $5.5x10^7$개 출발 세포 물질 및 약 $11x10^9$개 PBL을 생성할 것이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 약 $54x10^6$개 PBMC는 약 $6x10^5$개 출발 물질 및 약 $1.2x10^8$개 MIL (약 205배 확장)을 생성할 것이다.

[0213] 본 발명의 한 실시양태에서, 이브루티닙 또는 다른 ITK 억제제로 사전-치료된 환자의 경우, 확장 방법은 약 $20x10^9$개 PBL을 생성할 것이다. 본 발명의 한 실시양태에서, $40.3x10^6$개 PBMC는 약 $4.7x10^5$개 출발 세포 물질 및 약 $1.6x10^8$개 PBL (약 338배 확장)을 생성할 것이다.

[0214] 본 발명의 한 실시양태에서, 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 갖는 환자의 경우 본 발명에 유용한 PBL의 임상 용량은 약 $0.1x10^9$ 내지 약 $15x10^9$개 PBL, 약 $0.1x10^9$ 내지 약 $15x10^9$개 PBL, 약 $0.12x10^9$ 내지 약 $12x10^9$개 PBL, 약 $0.15x10^9$ 내지 약 $11x10^9$개 PBL, 약 $0.2x10^9$ 내지 약 $10x10^9$개 PBL, 약 $0.3x10^9$ 내지 약 $9x10^9$개 PBL, 약 $0.4x10^9$ 내지 약 $8x10^9$개 PBL, 약 $0.5x10^9$ 내지 약 $7x10^9$개 PBL, 약 $0.6x10^9$ 내지 약 $6x10^9$개 PBL, 약 $0.7x10^9$ 내지 약 $5x10^9$개 PBL, 약 $0.8x10^9$ 내지 약 $4x10^9$개 PBL, 약 $0.9x10^9$ 내지 약 $3x10^9$개 PBL, 또는 약 $1x10^9$ 내지

약 $2x10^9$개 PBL이다.

[0215] 임의의 상기 실시양태에서, PBMC는 전혈 샘플로부터, 분리반출술에 의해, 버피 코트로부터, 또는 PBMC를 수득하기 위한 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 방법으로부터 유래될 수 있다.

[0216] 골수로부터 유래된 PBMC로부터 골수 침윤 림프구 (MIL)를 확장시키는 방법

[0217] MIL 방법 1. 본 발명의 한 실시양태에서, 골수로부터 유래된 PBMC로부터 MIL을 확장시키는 방법이 기재된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 14일에 걸쳐 수행된다. 한 실시양태에서, 방법은 골수 PBMC를 수득하고 PBMC를 동결보존하는 것을 포함한다. 제0일에, PBMC를 1:1 비 (비드:세포)로의 항CD3/항CD28 항체 (디나비즈®) 및 3000 IU/ml의 IL-2와 함께 배양한다. 제4일에, 추가의 IL-2를 3000 IU/ml로 배양물에 첨가한다. 제7일에, 배양물을 1:1 비 (비드:세포)로의 항-CD3/항CD28 항체 (디나비즈®)로 다시 자극시키고, 3000 IU/ml의 추가의 IL-2를 배양물에 첨가한다. MIL을 제14일에 수거하고, 비드를 제거하고, MIL을 임의로 계수하고 표현형결정한다.

[0218] 본 발명의 한 실시양태에서, MIL 방법 1을 하기와 같이 수행한다: 제0일에, 골수로부터 유래된 동결보존된 PBMC 샘플을 해동시키고, PBMC를 계수한다. PBMC를 지렉스 24-웰 플레이트에서 웰당 $5x10^5$개 세포로 웰당 약 8ml의 CM-2 세포 배양 배지 (RPMI-1640, 인간 AB 혈청, l-글루타민, 2-메르캅토에탄올, 겐타미신 술페이트, AIM-V 배지로 구성됨) 내에서 3000IU/ml의 IL-2의 존재 하에 항-CD3/항-CD28 항체 (디나비즈®)와 함께 1:1 비로 공동-배양한다. 제4일에, 세포 배양 배지를 3000IU/ml의 추가의 IL-2로 보충된 AIM-V로 교체한다. 제7일에, 확장된 MIL을 계수한다. 웰당 $1x10^6$개 세포를 새로운 지렉스 24-웰 플레이트로 옮기고, 웰당 약 8ml의 AIM-V 배지 내에서 3000IU/ml의 IL-2의 존재 하에 항-CD3/항-CD28 항체 (디나비즈®)와 함께 1:1 비로 배양한다. 제11일에, 세포 배양 배지를 AIM-V에서 CM-4 (AIM-V 배지, 2mM 글루타맥스 및 3000IU/ml IL2로 구성됨)로 교체한다. 제14일에, 디나마그 자석 (디나마그™15)을 사용하여 디나비즈®를 제거하고, MIL을 계수한다.

[0219] MIL 방법 2. 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 7일에 걸쳐 수행된다. 한 실시양태에서, 방법은 골수로부터 유래된 PMBC를 수득하고 PBMC를 동결보존하는 것을 포함한다. 제0일에, PBMC를 3:1 비 (비드:세포)로의 항CD3/항CD28 항체 (디나비즈®) 및 3000 IU/ml의 IL-2와 함께 배양한다. MIL을 제7일에 수거하고, 비드를 제거하고, MIL을 임의로 계수하고 표현형결정한다.

[0220] 본 발명의 한 실시양태에서, MIL 방법 2를 하기와 같이 수행한다: 제0일에, 동결보존된 PBMC 샘플을 해동시키고, PBMC를 계수한다. PBMC를 지렉스 24-웰 플레이트에서 웰당 $5x10^5$개 세포로 웰당 약 8ml의 CM-2 세포 배양 배지 (RPMI-1640, 인간 AB 혈청, l-글루타민, 2-메르캅토에탄올, 겐타미신 술페이트, AIM-V 배지로 구성됨) 내에서 3000IU/ml의 IL-2의 존재 하에 항-CD3/항-CD28 항체 (디나비즈®)와 함께 1:1 비로 공동-배양한다. 제7일에, 디나마그 자석 (디나마그™15)을 사용하여 디나비즈®를 제거하고, MIL을 계수한다.

[0221] MIL 방법 3. 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 골수로부터 PBMC를 수득하는 것을 포함한다. 제0일에, PBMC를 CD3+/CD33+/CD20+/CD14+에 대해 선택하고, 분류하고, 비-CD3+/CD33+/CD20+/CD14+ 세포 분획을 초음파처리하고, 초음파처리된 세포 분획의 한 부분을 선택된 세포 분획에 다시 첨가한다. IL-2를 3000 IU/ml로 세포 배양물에 첨가한다. 제3일에, PBMC를 1:1 비 (비드:세포)로의 항CD3/항CD28 항체 (디나비즈®) 및 3000 IU/ml의 IL-2와 함께 배양한다. 제4일에, 추가의 IL-2를 3000 IU/ml로 배양물에 첨가한다. 제7일에, 배양물을 1:1 비 (비드:세포)로의 항-CD3/항CD28 항체 (디나비즈®)로 다시 자극시키고, 3000 IU/ml의 추가의 IL-2를 배양물에 첨가한다. 제11일에, IL-2를 3000 IU/ml로 배양물에 첨가한다. MIL을 제14일에 수거하고, 비드를 제거하고, MIL을 임의로 계수하고 표현형결정한다.

[0222] 본 발명의 한 실시양태에서, MIL 방법 3을 하기와 같이 수행한다: 제0일에, PBMC의 동결보존된 샘플을 해동시키고 PBMC를 계수한다. 세포를 CD3, CD33, CD20 및 CD14 항체로 염색하고, S3e 세포 분류기 (바이오-라드(Bio-Rad))를 사용하여 분류한다. 세포를 다음 2개의 분획으로 분류한다 - 면역 세포 분획 (또는 MIL 분획) (CD3+CD33+CD20+CD14+) 및 AML 모세포 분획 (비-CD3+CD33+CD20+CD14+). 지렉스 24-웰 플레이트 상에 시딩될 면역 세포 분획 (또는 MIL 분획)으로부터의 세포 수와 거의 동일한 수의 AML 모세포 분획으로부터의 세포를 100ul의 배지 중에 현탁시키고 초음파처리한다. 본 실시예에서, AML 모세포 분획으로부터 약 $2.8x10^4$ 내지 약 $3.38x10^5$개 세포를 취하고, 100ul의 CM2 배지 중에 현탁시킨 다음, 30초 동안 초음파처리한다. 100ul의 초음파처리된 AML 모세포 분획을 지렉스 24-웰 플레이트 내의 면역 세포 분획에 첨가한다. 면역 세포는 웰당 약

$2.8x10^4$ 내지 약 $3.38x10^5$개 세포의 양으로 웰당 약 8ml의 CM-2 세포 배양 배지 내에서 6000IU/ml의 IL-2의 존재 하에 존재하고, AML 모세포 분획의 부분과 함께 약 3일 동안 배양된다. 제3일에, 항-CD3/항-CD28 항체 (디나비즈®)를 1:1 비로 각각의 웰에 첨가하고, 약 1일 동안 배양한다. 제4일에, 세포 배양 배지를 3000IU/ml의 추가의 IL-2로 보충된 AIM-V로 교체한다. 제7일에, 확장된 MIL을 계수한다. 웰당 약 $1.5x10^5$ 내지 $4x10^5$개 세포를 새로운 지렉스 24-웰 플레이트로 옮기고, 웰당 약 8ml의 AIM-V 배지 내에서 3000IU/ml의 IL-2의 존재 하에 항-CD3/항-CD28 항체 (디나비즈®)와 함께 1:1 비로 배양한다. 제11일에, 세포 배양 배지를 AIM-V에서 CM-4 (3000IU/ml의 IL-2로 보충됨)로 교체한다. 제14일에, 디나마그 자석 (디나마그™15)을 사용하여 디나비즈®를 제거하고, MIL을 임의로 계수한다.

[0223] 본 발명의 한 실시양태에서, PBMC는 골수로부터 수득된다. 한 실시양태에서, PBMC는 골수로부터 분리반출술, 흡인, 바늘 생검 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 유사한 수단을 통해 수득된다. 한 실시양태에서, PBMC는 신선하다. 또 다른 실시양태에서, PBMC는 동결보존된다.

[0224] 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일 또는 약 14일에 걸쳐 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 약 7일에 걸쳐 수행된다. 또 다른 실시양태에서, 방법은 약 14일에 걸쳐 수행된다.

[0225] 본 발명의 한 실시양태에서, PBMC는 항CD3/항CD28 항체와 함께 배양된다. 한 실시양태에서, 임의의 입수가능한 항CD3/항CD28 제품이 본 발명에서 유용하다. 본 발명의 한 실시양태에서, 사용된 상업적으로 입수가능한 제품은 디나비즈®이다. 한 실시양태에서, 디나비즈®는 PBMC와 함께 1:1 (비드:세포)의 비로 배양된다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 PBMC와 함께 1.5:1, 2:1, 2.5:1, 3:1, 3.5:1, 4:1, 4.5:1 또는 5:1 (비드:세포)의 비로 배양된 디나비즈®이다. 임의의 상기 실시양태에서, 면역 세포 분획 (또는 MIL 분획) (CD3+CD33+CD20+CD14+) 또는 AML 모세포 분획 (비-CD3+CD33+CD20+CD14+)의 자기 비드-기반 선택이 사용된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항체 배양 단계 및/또는 세포를 항체로 재자극시키는 단계는 약 2 내지 약 6일, 약 3 내지 약 5일, 또는 약 4일의 기간에 걸쳐 수행된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 항체 배양 단계는 약 2일, 3일, 4일, 5일 또는 6일의 기간에 걸쳐 수행된다.

[0226] 본 발명의 한 실시양태에서, AML 모세포 분획으로부터의 세포 수 대 면역 세포 분획 (또는 MIL 분획)으로부터의 세포 수의 비는 약 0.1:1 내지 약 10:1이다. 또 다른 실시양태에서, 비는 약 0.1:1 내지 약 5:1, 약 0.1:1 내지 약 2:1, 또는 약 1:1이다. 본 발명의 한 실시양태에서, AML 모세포 분획은 세포 응집을 파괴하기 위해 임의로 파괴된다. 한 실시양태에서, AML 모세포 분획은 초음파처리, 균질화, 세포 용해, 볼텍싱 또는 진동을 사용하여 파괴된다. 또 다른 실시양태에서, AML 모세포 분획은 초음파처리를 사용하여 파괴된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 비-CD3+, 비-CD33+, 비-CD20+, 비-CD14+ 세포 분획 (AML 모세포 분획)은 고온 용해, 화학적 용해 (예컨대 유기 알콜), 효소 용해, 및 관련 기술분야에 공지된 다른 세포 용해 방법을 포함한 적합한 용해 방법을 사용하여 용해된다.

[0227] 본 발명의 한 실시양태에서, AML 모세포 분획으로부터의 세포는 100uL당 약 $0.2x10^5$ 내지 약 $2x10^5$개 세포의 농도로 현탁되고, 면역 세포 분획이 존재하는 세포 배양물에 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 농도는 100uL당 약 $0.5x10^5$ 내지 약 $2x10^5$개 세포, 100uL당 약 $0.7x10^5$ 내지 약 $2x10^5$개 세포, 100uL당 약 $1x10^5$ 내지 약 $2x10^5$개 세포, 또는 100uL당 약 $1.5x10^5$ 내지 약 $2x10^5$개 세포이다.

[0228] 한 실시양태에서, PBMC 샘플은 IL-2와 함께 배양된다. 본 발명의 한 실시양태에서, MIL의 확장에 사용된 세포 배양 배지는 약 100 IU/mL, 약 200 IU/mL, 약 300 IU/mL, 약 400 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 500 IU/mL, 약 600 IU/mL, 약 700 IU/mL, 약 800 IU/mL, 약 900 IU/mL, 약 1,000 IU/mL, 약 1,100 IU/mL, 약 1,200 IU/mL, 약 1,300 IU/mL, 약 1,400 IU/mL, 약 1,500 IU/mL, 약 1,600 IU/mL, 약 1,700 IU/mL, 약 1,800 IU/mL, 약 1,900 IU/mL, 약 2,000 IU/mL, 약 2,100 IU/mL, 약 2,200 IU/mL, 약 2,300 IU/mL, 약 2,400 IU/mL, 약 2,500 IU/mL, 약 2,600 IU/mL, 약 2,700 IU/mL, 약 2,800 IU/mL, 약 2,900 IU/mL, 약 3,000 IU/mL, 약 3,100 IU/mL, 약 3,200 IU/mL, 약 3,300 IU/mL, 약 3,400 IU/mL, 약 3,500 IU/mL, 약 3,600 IU/mL, 약 3,700 IU/mL, 약 3,800 IU/mL, 약 3,900 IU/mL, 약 4,000 IU/mL, 약 4,100 IU/mL, 약 4,200 IU/mL, 약 4,300 IU/mL, 약 4,400 IU/mL, 약 4,500 IU/mL, 약 4,600 IU/mL, 약 4,700 IU/mL, 약 4,800 IU/mL, 약 4,900 IU/mL, 약 5,000 IU/mL, 약 5,100 IU/mL, 약 5,200 IU/mL, 약 5,300 IU/mL, 약 5,400 IU/mL, 약 5,500 IU/mL, 약 5,600 IU/mL, 약 5,700 IU/mL, 약 5,800 IU/mL, 약 5,900 IU/mL, 약

6,000 IU/mL, 약 6,500 IU/mL, 약 7,000 IU/mL, 약 7,500 IU/mL, 약 8,000 IU/mL, 약 8,500 IU/mL, 약 9,000 IU/mL, 약 9,500 IU/mL, 및 약 10,000 IU/mL로 이루어진 군으로부터 선택된 농도의 IL-2를 포함한다.

[0229] 본 발명의 한 실시양태에서, 추가의 IL-2는 방법 전반에 걸쳐 1일 이상에서 배양물에 첨가될 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 추가의 IL-2는 제4일에 첨가된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 추가의 IL-2는 제7일에 첨가된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 추가의 IL-2는 제11일에 첨가된다. 또 다른 실시양태에서, 추가의 IL-2는 제4일, 제7일 및/또는 제11일에 첨가된다. 본 발명의 한 실시양태에서, MIL은 추가의 IL-2와 함께 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일 또는 14일의 기간 동안 배양된다. 본 발명의 한 실시양태에서, MIL은 IL-2의 각각의 첨가 후 3일의 기간 동안 배양된다.

[0230] 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 방법 동안 적어도 1회 교체된다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 추가의 IL-2가 첨가되는 동시에 교체된다. 또 다른 실시양태에서, 세포 배양 배지는 제1일, 제2일, 제3일, 제4일, 제5일, 제6일, 제7일, 제8일, 제9일, 제10일, 제11일, 제12일, 제13일 또는 제14일 중 적어도 하나에서 교체된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 방법 전반에 걸쳐 사용되는 세포 배양 배지는 동일하거나 상이할 수 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 CM-2, CM-4 또는 AIM-V이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 제11일에서의 세포 배양 배지 교체 단계는 임의적이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 확장 방법을 위한 PBMC의 출발 세포 수는 약 25,000 내지 약 1,000,000, 약 30,000 내지 약 900,000, 약 35,000 내지 약 850,000, 약 40,000 내지 약 800,000, 약 45,000 내지 약 800,000, 약 50,000 내지 약 750,000, 약 55,000 내지 약 700,000, 약 60,000 내지 약 650,000, 약 65,000 내지 약 600,000, 약 70,000 내지 약 550,000개, 바람직하게는 약 75,000 내지 약 500,000, 약 80,000 내지 약 450,000, 약 85,000 내지 약 400,000, 약 90,000 내지 약 350,000, 약 95,000 내지 약 300,000, 약 100,000 내지 약 250,000, 약 105,000 내지 약 200,000, 또는 약 110,000 내지 약 150,000개이다. 본 발명의 한 실시양태에서, PBMC의 출발 세포 수는 약 138,000, 140,000, 145,000개 또는 그 초과이다. 또 다른 실시양태에서, PBMC의 출발 세포 수는 약 28,000개이다. 또 다른 실시양태에서, PBMC의 출발 세포 수는 약 62,000개이다. 또 다른 실시양태에서, PBMC의 출발 세포 수는 약 338,000개이다. 또 다른 실시양태에서, PBMC의 출발 세포 수는 약 336,000개이다.

[0231] 본 발명의 한 실시양태에서, MIL의 배수 확장은 약 20% 내지 약 100%, 25% 내지 약 95%, 30% 내지 약 90%, 35% 내지 약 85%, 40% 내지 약 80%, 45% 내지 약 75%, 50% 내지 약 100%, 또는 25% 내지 약 75%이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 배수 확장은 약 25%이다. 본 발명의 또 다른 실시양태에서, 배수 확장은 약 50%이다. 또 다른 실시양태에서, 배수 확장은 약 75%이다.

[0232] 본 발명의 한 실시양태에서, MIL은 10-50 ml의 골수 흡인물로부터 확장된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 10ml의 골수 흡인물이 환자로부터 수득된다. 또 다른 실시양태에서, 20ml의 골수 흡인물이 환자로부터 수득된다. 또 다른 실시양태에서, 30ml의 골수 흡인물이 환자로부터 수득된다. 또 다른 실시양태에서, 40ml의 골수 흡인물이 환자로부터 수득된다. 또 다른 실시양태에서, 50ml의 골수 흡인물이 환자로부터 수득된다.

[0233] 본 발명의 한 실시양태에서, 약 10-50ml의 골수 흡인물로부터 생성된 PBMC의 수는 약 $5x10^7$ 내지 약 $10x10^7$개 PBMC이다. 또 다른 실시양태에서, 생성된 PMBC의 수는 약 $7x10^7$개 PBMC이다.

[0234] 본 발명의 한 실시양태에서, 약 $5x10^7$ 내지 약 $10x10^7$개 PBMC는 약 $0.5x10^6$ 내지 약 $1.5x10^6$개 확장 출발 세포 물질을 생성한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 약 $1x10^6$개 확장 출발 세포 물질이 생성된다.

[0235] 본 발명의 한 실시양태에서, 확장 기간의 종료시에 수거된 MIL의 총수는 약 $0.01x10^9$ 내지 약 $1x10^9$, 약 $0.05x10^9$ 내지 약 $0.9x10^9$, 약 $0.1x10^9$ 내지 약 $0.85x10^9$, 약 $0.15x10^9$ 내지 약 $0.7x10^9$, 약 $0.2x10^9$ 내지 약 $0.65x10^9$, 약 $0.25x10^9$ 내지 약 $0.6x10^9$, 약 $0.3x10^9$ 내지 약 $0.55x10^9$, 약 $0.35x10^9$ 내지 약 $0.5x10^9$, 또는 약 $0.4x10^9$ 내지 약 $0.45x10^9$개이다.

[0236] 본 발명의 한 실시양태에서, 골수 흡인물로부터 유래된 $12x10^6$개 PBMC는 대략 $1.4x10^5$개 출발 세포 물질을 생성하고, 이는 확장 방법의 종료시에 약 $1.1x10^7$개 MIL을 생성한다.

[0237] 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 기재된 MIL 방법 3을 사용하여 골수 PBMC로부터 확장된 MIL은 MIL 방법 1 또는 MIL 방법 2를 사용하여 확장된 MIL과 비교하여 높은 비율의 CD8+ 세포 및 더 낮은 수의 LAG3+ 및 PD1+ 세포

를 포함한다. 본 발명의 한 실시양태에서, 상기 기재된 MIL 방법 3을 사용하여 혈액 PBMC로부터 확장된 PBL은 MIL 방법 1 또는 MIL 방법 2를 사용하여 확장된 PBL과 비교하여 높은 비율의 CD8+ 세포 및 증가된 수준의 IFNγ 생산을 포함한다.

[0238] 본 발명의 한 실시양태에서, 급성 골수성 백혈병 (AML)을 갖는 환자에 유용한 MIL의 임상 용량은 약 $4x10^8$ 내지 약 $2.5x10^9$개 MIL 범위이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 MIL의 수는 $9.5x10^8$개 MIL이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 MIL의 수는 $4.1x10^8$개이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 MIL의 수는 $2.2x10^9$개이다.

[0239] 임의의 상기 실시양태에서, PBMC는 전혈 샘플로부터, 골수로부터, 분리반출술에 의해, 버피 코트로부터, 또는 PBMC를 수득하기 위한 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 방법으로부터 유래될 수 있다.

[0240] "2A 방법"을 사용하는 TIL의 확장 방법

[0241] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명은 골수 및/또는 말초 혈액으로부터 유래된 T 세포를 확장시키는 장치 및 방법을 제공한다. 본 발명의 한 실시양태에서, T 세포는 폴리클로날이지만 고도로 종양 특이적인 방식으로 골수 미세환경으로부터 고조된 종양 특이성을 갖는다. 한 실시양태에서, 골수 미세환경은 T-세포를 지속 및 확장시키는데 사용된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 7-일 또는 14-일 확장 방법에서 TIL의 대략 25 내지 100배 확장이 이루어진다. 한 실시양태에서, TIL의 배수 확장은 약 30-90배이다. 한 실시양태에서, 배수 확장은 약 35-85배이다. 한 실시양태에서, 배수 확장은 약 40-80배이다. 한 실시양태에서, 배수 확장은 약 45-75배이다. 또 다른 실시양태에서, 배수 확장은 약 40-70배이다. 또 다른 실시양태에서, 배수 확장은 약 45-65배이다. 또 다른 실시양태에서, 배수 확장은 약 25배, 약 30배, 약 35배, 약 40배, 약 45배, 및 50배, 약 55배, 약 60배, 약 65배, 약 70배, 약 75배, 약 80배, 약 85배, 약 90배, 약 95배 또는 약 100배 확장이다.

[0242] 본 발명의 한 실시양태에서, T-세포 제조 방법은 종양 특이성을 선택하기 위해 어떠한 개입도 필요로 하지 않는다. 본 발명의 한 실시양태에서, T-세포 제조 방법은 T-세포 확장 시점에 골수 및/또는 말초 혈액 내에 종양의 존재를 필요로 하지 않는다. 한 실시양태에서, T-세포는 거의 완전한 골수의 존재 하에 확장된다.

[0243] 한 실시양태에서, 본 발명은 실시예, 특히 본원에 참조로 포함된 WO2010/062742에 제시된 실시예 21에 기재된 바와 같이 골수 및/또는 말초 혈액으로부터 T-세포를 추출하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명은, 예를 들어 본원에 참조로 포함된 문헌 [Noonan, et al., 2005, Cancer Res. 65:2026-2034]에 기재된 바와 같이 골수 및/또는 말초 혈액으로부터 T-세포를 추출하는 방법을 제공한다.

[0244] 한 실시양태에서, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 골수 및/또는 말초 혈액을 수득하는 방법이 본 발명에 유용하다. 본 발명의 한 실시양태에서, 골수 및/또는 말초 혈액은 바늘 흡인을 사용하여 수득된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 환자로부터의 골수는 헤파린-함유 시린지 내로 흡인되고, 실온에서 밤새 저장된다. 본 발명의 한 실시양태에서, 저장 후에, 시린지의 내용물은 함께 멸균 용기 내로 풀링되고, 품질 시험된다. 림프구 분리 배지 (LSM)를 사용하여 골수에서 단핵 세포 (MNC)를 풍부화시키고, COBE 스펙트라에 의해 원심분리한다. 구배 하의 세포들을 적혈구까지 수집하고, HBSS를 사용하여 세척한다. 2% HSA 및 5% DMSO로 보충된 헤타스타치-기반 동결보호제를 사용하여 MNC를 동결보존시키고, MNC의 일부는 품질 관리를 위해 보존한다. QC 바이알을 해동하여 MNC 생성물의 $CD3^+$ 및 $CD38^+/138^+$ 세포 함량을 결정한다. 골수의 수집은 본 발명에 대한 제한이 아니라는 것을 주목하는 것이 중요하다.

[0245] 본 발명의 한 실시양태에서, 골수는 림프구 분리 배지 밀도 구배에서 흡인 및 분획화되고, 세포는 거의 적혈구 펠릿의 수준으로 수집된다. 한 실시양태에서, 이러한 분획화 방법은 실질적으로 적혈구 및 호중구를 제거하여 거의 완전한 골수를 제공한다. 한 실시양태에서, 생성된 분획화된 물질은 T-세포 및 종양 세포이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 방법은 T-세포 특이적 분리 단계 없이 및 종양 세포 분리 단계 없이, 예컨대, 예를 들어, 항체 또는 다른 세포-유형 특이적 검출가능한 표지로 T-세포를 표지하지 않고 형광 활성화 세포 분류 (FACS)를 사용하여 분류하지 않으면서 실시될 수 있다.

[0246] 본 발명의 한 실시양태에서, 수득된 골수는 피콜처리되거나 또는 말초 혈액은 200uL/웰의 AIM-V 배지 내에서 1 x 10^6개 세포/mL로 무혈청 조건 하에 현탁된다.

[0247] 본 발명의 한 실시양태에서, 골수는 완전 완화 상태가 아닌 대상체로부터 수집된다. 본 발명의 한 실시양태에

서, 골수는 완전 완화 상태에 있는 대상체로부터 수집된다.

[0248] 본 발명의 한 실시양태에서, 골수는 수득되고 동결될 수 있다. 한 실시양태에서, 골수는 수득되고 즉시 T-세포를 추출하는데 사용될 수 있다.

[0249] 추가 실시양태에서 및 상기 중 어느 것에 따라, 본 발명은 액상 종양으로부터 수득된 적어도 1개의 TIL을 포함하는 TIL 집단을 접촉시키는 것을 포함하는, TIL을 확장시키는 방법을 제공한다. 본원에서 TIL을 확장시키는 모든 논의는 골수, 말초 혈액 및/또는 액상 종양을 포함한 혈액 악성종양으로부터 수득된 TIL의 확장에 적용가능하다.

[0250] 한 실시양태에서, 본 발명은

[0251] (a) 단편화된 종양을 제1 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계;

[0252] (b) 제1 세포 배양 배지에서 제1 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단의 초기 확장 (사전-REP)을 수행하여 제2 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제2 TIL 집단은 제1 TIL 집단보다 수가 적어도 5배 더 많고, 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함하는 것인 단계;

[0253] (c) 제2 세포 배양 배지에서 제2 TIL 집단의 제2 확장을 수행하여 제3 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제3 TIL 집단은 제2 확장의 시작으로부터 7일 후 제2 TIL 집단보다 수가 적어도 50배 더 많고, 제2 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3 (항-CD3 항체), 조사된 동종 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함하고, 제2 확장은 14일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계; 및

[0254] (d) 제3 TIL 집단을 수거하는 단계

[0255] 를 포함하며, 여기서 종양은 액상 종양이고, 암은 혈액 악성종양인,

[0256] 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 제조하는 방법을 제공한다.

[0257] 한 실시양태, 본 발명은 먼저 사전-급속 확장 (사전-REP) 방법 및 이어서 제2 확장 방법 (이는 급속 확장 방법 - REP일 수 있음)을 포함하며, 여기서 확장에 사용된 세포 배양 배지는 100 IU/mL 내지 10,000 IU/mL, 200 IU/mL 내지 5,000 IU/mL, 300 IU/mL 내지 4,800 IU/mL, 400 IU/mL 내지 4,600 IU/mL, 500 IU/mL 내지 4,400 IU/mL, 600 IU/mL 내지 4,200 IU/mL, 700 IU/mL 내지 4,000 IU/mL, 800 IU/mL 내지 3,800 IU/mL, 900 IU/mL 내지 3,600 IU/mL, 1,000 IU/mL 내지 3,400 IU/mL, 1,100 IU/mL 내지 3,200 IU/mL, 1,200 IU/mL 내지 3,000 IU/mL, 1,300 IU/mL 내지 2,800 IU/mL, 1,400 IU/mL 내지 2,600 IU/mL, 1,500 IU/mL 내지 2,400 IU/mL, 1,600 IU/mL 내지 2,200 IU/mL, 1,700 IU/mL 내지 2,000 IU/mL, 5,500 IU/mL 내지 9,500 IU/mL, 6,000 IU/mL 내지 9,000 IU/mL, 6500 IU/mL 내지 8,500 IU/mL, 7,000 IU/mL 내지 8,000 IU/mL, 및 7,500 IU/mL 내지 8,000 IU/mL로 이루어진 군으로부터 선택된 농도의 IL-2를 포함하는 것인, TIL 집단을 확장시키는 방법을 제공한다.

[0258] 한 실시양태에서, 본 발명은 사전-급속 확장 (사전-REP) 방법 및 급속 확장 방법 (REP)을 포함하며, 여기서 확장에 사용된 세포 배양 배지는 약 100 IU/mL, 약 200 IU/mL, 약 300 IU/mL, 약 400 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 100 IU/mL, 약 500 IU/mL, 약 600 IU/mL, 약 700 IU/mL, 약 800 IU/mL, 약 900 IU/mL, 약 1,000 IU/mL, 약 1,100 IU/mL, 약 1,200 IU/mL, 약 1,300 IU/mL, 약 1,400 IU/mL, 약 1,500 IU/mL, 약 1,600 IU/mL, 약 1,700 IU/mL, 약 1,800 IU/mL, 약 1,900 IU/mL, 약 2,000 IU/mL, 약 2,100 IU/mL, 약 2,200 IU/mL, 약 2,300 IU/mL, 약 2,400 IU/mL, 약 2,500 IU/mL, 약 2,600 IU/mL, 약 2,700 IU/mL, 약 2,800 IU/mL, 약 2,900 IU/mL, 약 3,000 IU/mL, 약 3,100 IU/mL, 약 3,200 IU/mL, 약 3,300 IU/mL, 약 3,400 IU/mL, 약 3,500 IU/mL, 약 3,600 IU/mL, 약 3,700 IU/mL, 약 3,800 IU/mL, 약 3,900 IU/mL, 약 4,000 IU/mL, 약 4,100 IU/mL, 약 4,200 IU/mL, 약 4,300 IU/mL, 약 4,400 IU/mL, 약 4,500 IU/mL, 약 4,600 IU/mL, 약 4,700 IU/mL, 약 4,800 IU/mL, 약 4,900 IU/mL, 약 5,000 IU/mL, 약 5,100 IU/mL, 약 5,200 IU/mL, 약 5,300 IU/mL, 약 5,400 IU/mL, 약 5,500 IU/mL, 약 5,600 IU/mL, 약 5,700 IU/mL, 약 5,800 IU/mL, 약 5,900 IU/mL, 약 6,000 IU/mL, 약 6,500 IU/mL, 약 7,000 IU/mL, 약 7,500 IU/mL, 약 8,000 IU/mL, 약 8,500 IU/mL, 약 9,000 IU/mL, 약 9,500 IU/mL, 및 약 10,000 IU/mL로 이루어진 군으로부터 선택된 농도의 IL-2를 포함하는 것인, TIL 집단을 확장시키는 방법을 제공한다.

[0259] 한 실시양태에서, 본 발명은 사전-급속 확장 (사전-REP) 방법을 포함하는 TIL 집단을 확장시키는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 액상 종양으로부터 수득된 TIL 집단을 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 1000 IU/mL 내지 6000 IU/mL의 초기 농도의 IL-2를 추가로 포함하는 것인,

TIL 집단을 확장시키는 사전-REP 방법을 제공한다.

[0260] 한 실시양태에서, 본 발명은 액상 종양으로부터 수득된 TIL 집단을 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 세포 배양 배지는 약 6000 IU/mL의 초기 농도의 IL-2를 추가로 포함하는 것인, TIL 집단을 확장시키는 사전-REP 방법을 제공한다.

[0261] 한 실시양태에서, REP는 임의의 적합한 방법에 의해 본 개시내용에 따른 액상 종양으로부터 수득된 TIL을 사용하여 기체 투과성 용기에서 수행될 수 있다. 예를 들어, TIL은 인터류킨-2 (IL-2) 또는 인터류킨-15 (IL-15)의 존재 하에 비-특이적 T 세포 수용체 자극을 사용하여 급속하게 확장될 수 있다. 비-특이적 T 세포 수용체 자극은, 예를 들어 약 30 ng/mL의 모노클로날 항-CD3 항체인 OKT-3 (뉴저지주 라리탄 소재 오르토-맥네일(Ortho-McNeil) 또는 캘리포니아주 오번 소재 밀테니 바이오테크로부터 상업적으로 입수가능함)을 포함할 수 있다. 임의로 T-세포 성장 인자, 예컨대 300 IU/mL IL-2 또는 IL-15의 존재 하에, 임의로 벡터로부터 발현될 수 있는 암의 1종 이상의 항원 (그의 항원 부분, 예컨대 에피토프(들) 포함), 예컨대 인간 백혈구 항원 A2 (HLA-A2) 결합 펩티드, 예를 들어 0.3 μM MART-1 :26-35 (27 L) 또는 gp1 00:209-217 (210M)에 의한 시험관내 TIL의 추가 자극에 의해 TIL을 급속히 확장시킬 수 있다. 다른 적합한 항원은, 예를 들어 NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, 티로시나제 암 항원, MAGE-A3, SSX-2 및 VEGFR2, 또는 그의 항원 부분을 포함할 수 있다. 또한, HLA-A2-발현 항원-제시 세포 상으로 펄스된 암의 동일한 항원(들)에 의한 재자극에 의해 TIL을 급속히 확장시킬 수 있다. 대안적으로, 예를 들어 조사된 자가 림프구 또는 조사된 HLA-A2+ 동종 림프구 및 IL-2에 의해 TIL을 추가로 재자극시킬 수 있다.

[0262] 한 실시양태에서, TIL을 확장시키는 방법은 약 5000 mL 내지 약 25000 mL의 세포 배양 배지, 약 5000 mL 내지 약 10000 mL의 세포 배양 배지 또는 약 5800 mL 내지 약 8700 mL의 세포 배양 배지를 사용하는 것을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, TIL을 확장시키는 방법은 약 1000 mL 내지 약 2000 mL의 세포 배지, 약 2000 mL 내지 약 3000 mL의 세포 배양 배지, 약 3000 mL 내지 약 4000 mL의 세포 배양 배지, 약 4000 mL 내지 약 5000 mL의 세포 배양 배지, 약 5000 mL 내지 약 6000 mL의 세포 배양 배지, 약 6000 mL 내지 약 7000 mL의 세포 배양 배지, 약 7000 mL 내지 약 8000 mL의 세포 배양 배지, 약 8000 mL 내지 약 9000 mL의 세포 배양 배지, 약 9000 mL 내지 약 10000 mL의 세포 배양 배지, 약 10000 mL 내지 약 15000 mL의 세포 배양 배지, 약 15000 mL 내지 약 20000 mL의 세포 배양 배지 또는 약 20000 mL 내지 약 25000 mL의 세포 배양 배지를 사용하는 것을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, TIL의 수를 확장시키는 것은 1종 이하 유형의 세포 배양 배지를 사용한다. 임의의 적합한 세포 배양 배지, 예를 들어 AIM-V 세포 배지 (L-글루타민, 50 μM 스트렙토마이신 술페이트 및 10 μM 겐타미신 술페이트) 세포 배양 배지 (인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아주 칼스배드)가 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 방법은 유리하게는 TIL의 수를 확장시키는데 필요한 배지의 양 및 배지의 유형의 수를 감소시킨다. 한 실시양태에서, TIL의 수를 확장시키는 것은 3일마다 또는 4일마다보다 더 빈번하지 않게 세포를 공급하는 것을 포함할 수 있다. 기체 투과성 용기에서 세포의 수를 확장시키는 것은 세포를 확장시키는데 필요한 공급 빈도를 감소시킴으로써 세포의 수를 확장시키는데 필요한 절차를 단순화시킨다.

[0263] 한 실시양태에서, 제2 확장은 기체 투과성 용기를 사용하여 수행된다. 이러한 실시양태는 세포 집단이 약 5 x 10^5개 세포/cm^2에서 10 x 10^6 내지 30 x 10^6개 세포/cm^2로 확장되게 한다. 한 실시양태에서, 이러한 확장은 공급 없이 일어난다. 한 실시양태에서, 이러한 확장은 배지가 기체-투과성 플라스크 내 약 10 cm의 높이에 있는 한 공급 없이도 일어난다. 한 실시양태에서 이것은 공급은 없으나 1종 이상의 시토카인의 첨가가 있다. 한 실시양태에서, 시토카인은 시토카인과 배지를 혼합할 어떠한 필요성도 없이 볼루스로 첨가될 수 있다. 이러한 용기, 장치 및 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, TIL을 확장시키는데 사용되었으며, 미국 특허 출원 공개 번호 US 2014/0377739 A1, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2014/210036 A1, 미국 특허 출원 공개 번호 US 2013/0115617 A1, 국제 공개 번호 WO 2013/188427 A1, 미국 특허 출원 공개 번호 US 2011/0136228 A1, 미국 특허 번호 8,809,050, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2011/072088 A2, 미국 특허 출원 공개 번호 US 2016/0208216 A1, 미국 특허 출원 공개 번호 US 2012/0244133 A1, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2012/129201 A1, 미국 특허 출원 공개 번호 US 2013/0102075 A1, 미국 특허 번호 8,956,860, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2013/173835 A1 및 미국 특허 출원 공개 번호 US 2015/0175966 A1 (이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 것을 포함한다. 이러한 방법은 또한 문헌 [Jin, et al., J. Immunotherapy 2012, 35, 283-292] (이의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0264] 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 지-렉스 10 플라스크 (윌슨 울프 매뉴팩처링 코포레이션(Wilson Wolf Manufacturing Corporation), 미국 미네소타주 뉴 브라이톤)이다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 10

cm^2 기체 투과성 배양 표면을 포함한다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 40 mL 세포 배양 배지 용량을 포함한다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 2회의 배지 교체 후에 1 내지 3억개의 TIL을 제공한다.

[0265] 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 지-렉스 100 플라스크 (윌슨 울프 매뉴팩처링 코포레이션, 미국 미네소타주 뉴 브라이톤)이다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 100 cm^2 기체 투과성 배양 표면을 포함한다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 450 mL 세포 배양 배지 용량을 포함한다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 2회의 배지 교체 후에 10 내지 30억개의 TIL을 제공한다.

[0266] 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 지-렉스 100M 플라스크 (윌슨 울프 매뉴팩처링 코포레이션, 미국 미네소타주 뉴 브라이톤)이다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 100 cm^2 기체 투과성 배양 표면을 포함한다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 1000 mL 세포 배양 배지 용량을 포함한다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 배지 교체 없이 10 내지 30억개의 TIL을 제공한다.

[0267] 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 지-렉스 100L 플라스크 (윌슨 울프 매뉴팩처링 코포레이션, 미국 미네소타주 뉴 브라이톤)이다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 100 cm^2 기체 투과성 배양 표면을 포함한다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 2000 mL 세포 배양 배지 용량을 포함한다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 배지 교체 없이 10 내지 30억개의 TIL을 제공한다.

[0268] 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 지-렉스 24 웰 플레이트 (윌슨 울프 매뉴팩처링 코포레이션, 미국 미네소타주 뉴 브라이톤)이다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 웰을 갖는 플레이트를 포함하며, 여기서 각각의 웰은 2 cm^2 기체 투과성 배양 표면을 포함한다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 웰을 갖는 플레이트를 포함하며, 여기서 각각의 웰은 8 mL 세포 배양 배지 용량을 포함한다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 2회의 배지 교체 후에 웰당 2 내지 6천만개의 세포를 제공한다.

[0269] 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 지-렉스 6 웰 플레이트 (윌슨 울프 매뉴팩처링 코포레이션, 미국 미네소타주 뉴 브라이톤)이다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 웰을 갖는 플레이트를 포함하며, 여기서 각각의 웰은 10 cm^2 기체 투과성 배양 표면을 포함한다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 웰을 갖는 플레이트를 포함하며, 여기서 각각의 웰은 40 mL 세포 배양 배지 용량을 포함한다. 한 실시양태에서, 기체 투과성 용기는 2회의 배지 교체 후에 웰당 1 내지 3억개의 세포를 제공한다.

[0270] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 기체 투과성 용기 내 세포 배지는 비여과된다. 비여과 세포 배지의 사용은 세포의 수를 확장시키는데 필요한 절차를 단순화시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 기체 투과성 용기 내 세포 배지는 베타-메르캅토에탄올 (BME)이 결여되어 있다.

[0271] 한 실시양태에서, 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 수득하는 단계; 안에 세포 배지를 함유하는 제1 기체 투과성 용기에서 종양 조직 샘플을 배양하는 단계; 종양 조직 샘플로부터 TIL을 수득하는 단계; 안에 세포 배지를 함유하는 제2 기체 투과성 용기에서 TIL의 수를 확장시키는 단계를 포함하는 방법의 지속기간은 약 14 내지 약 42일, 예를 들어 약 28일의 지속기간이다.

[0272] 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 IL-2를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 3000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 1000 IU/mL, 약 1500 IU/mL, 약 2000 IU/mL, 약 2500 IU/mL, 약 3000 IU/mL, 약 3500 IU/mL, 약 4000 IU/mL, 약 4500 IU/mL, 약 5000 IU/mL, 약 5500 IU/mL, 약 6000 IU/mL, 약 6500 IU/mL, 약 7000 IU/mL, 약 7500 IU/mL, 또는 약 8000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 1000 내지 2000 IU/mL, 2000 내지 3000 IU/mL, 3000 내지 4000 IU/mL, 4000 내지 5000 IU/mL, 5000 내지 6000 IU/mL, 6000 내지 7000 IU/mL, 7000 내지 8000 IU/mL, 또는 8000 IU/mL의 IL-2를 포함한다.

[0273] 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 OKT-3 항체를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 30 ng/mL의 OKT-3 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 0.1 ng/mL, 약 0.5 ng/mL, 약 1 ng/mL, 약 2.5 ng/mL, 약 5 ng/mL, 약 7.5 ng/mL, 약 10 ng/mL, 약 15 ng/mL, 약 20 ng/mL, 약 25 ng/mL, 약 30 ng/mL, 약 35 ng/mL, 약 40 ng/mL, 약 50 ng/mL, 약 60 ng/mL, 약 70 ng/mL, 약 80 ng/mL, 약 90 ng/mL, 약 100 ng/mL, 약 200 ng/mL, 약 500 ng/mL, 및 약 1 μg/mL의 OKT-3 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 0.1 ng/mL 내지 1 ng/mL, 1 ng/mL 내지 5 ng/mL, 5 ng/mL 내지 10 ng/mL, 10 ng/mL 내지 20 ng/mL, 20 ng/mL 내지 30 ng/mL, 30 ng/mL 내지 40 ng/mL, 40 ng/mL 내지 50 ng/mL, 및 50 ng/mL 내지 100

ng/mL의 OKT-3 항체를 포함한다.

[0274] 한 실시양태에서, TIL은 기체-투과성 용기에서 확장된다. 기체-투과성 용기는 미국 특허 출원 공개 번호 2005/0106717 A1 (이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 것을 포함한, 관련 기술분야에 공지된 방법, 조성물 및 장치를 사용하여 PBMC를 사용하여 TIL을 확장시키는데 사용되었다. 한 실시양태에서, TIL은 기체-투과성 백에서 확장된다. 한 실시양태에서, TIL은 기체 투과성 백에서 TIL을 확장시키는 세포 확장 시스템, 예컨대 수리(Xuri) 세포 확장 시스템 W25 (지이 헬스케어(GE Healthcare))를 사용하여 확장된다. 한 실시양태에서, TIL은 기체 투과성 백에서 TIL을 확장시키는 세포 확장 시스템, 예컨대 수리 세포 확장 시스템 W5 (지이 헬스케어)로도 또한 공지되어 있는 웨이브(WAVE) 생물반응기 시스템을 사용하여 확장된다. 한 실시양태에서, 세포 확장 시스템은 약 100 mL, 약 200 mL, 약 300 mL, 약 400 mL, 약 500 mL, 약 600 mL, 약 700 mL, 약 800 mL, 약 900 mL, 약 1 L, 약 2 L, 약 3 L, 약 4 L, 약 5 L, 약 6 L, 약 7 L, 약 8 L, 약 9 L, 약 10 L, 약 11 L, 약 12 L, 약 13 L, 약 14 L, 약 15 L, 약 16 L, 약 17 L, 약 18 L, 약 19 L, 약 20 L, 약 25 L, 및 약 30 L로 이루어진 군으로부터 선택된 부피를 갖는 기체 투과성 세포 백을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 확장 시스템은 50 내지 150 mL, 150 내지 250 mL, 250 내지 350 mL, 350 내지 450 mL, 450 내지 550 mL, 550 내지 650 mL, 650 내지 750 mL, 750 내지 850 mL, 850 내지 950 mL, 및 950 내지 1050 mL로 이루어진 군으로부터 선택된 부피 범위를 갖는 기체 투과성 세포 백을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 확장 시스템은 1 L 내지 2 L, 2 L 내지 3 L, 3 L 내지 4 L, 4 L 내지 5 L, 5 L 내지 6 L, 6 L 내지 7 L, 7 L 내지 8 L, 8 L 내지 9 L, 9 L 내지 10 L, 10 L 내지 11 L, 11 L 내지 12 L, 12 L 내지 13 L, 13 L 내지 14 L, 14 L 내지 15 L, 15 L 내지 16 L, 16 L 내지 17 L, 17 L 내지 18 L, 18 L 내지 19 L, 및 19 L 내지 20 L로 이루어진 군으로부터 선택된 부피 범위를 갖는 기체 투과성 세포 백을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 확장 시스템은 0.5 L 내지 5 L, 5 L 내지 10 L, 10 L 내지 15 L, 15 L 내지 20 L, 20 L 내지 25 L, 및 25 L 내지 30 L로 이루어진 군으로부터 선택된 부피 범위를 갖는 기체 투과성 세포 백을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 확장 시스템은 약 30분, 약 1시간, 약 2시간, 약 3시간, 약 4시간, 약 5시간, 약 6시간, 약 7시간, 약 8시간, 약 9시간, 약 10시간, 약 11시간, 약 12시간, 약 24시간, 약 2일, 약 3일, 약 4일, 약 5일, 약 6일, 약 7일, 약 8일, 약 9일, 약 10일, 약 11일, 약 12일, 약 13일, 약 14일, 약 15일, 약 16일, 약 17일, 약 18일, 약 19일, 약 20일, 약 21일, 약 22일, 약 23일, 약 24일, 약 25일, 약 26일, 약 27일, 및 약 28일의 요동 시간을 이용한다. 한 실시양태에서, 세포 확장 시스템은 30분 내지 1시간, 1시간 내지 12시간, 12시간 내지 1일, 1일 내지 7일, 7일 내지 14일, 14일 내지 21일, 및 21일 내지 28일의 요동 시간을 이용한다. 한 실시양태에서, 세포 확장 시스템은 약 2회 요동/분, 약 5회 요동/분, 약 10회 요동/분, 약 20회 요동/분, 약 30회 요동/분, 및 약 40회 요동/분의 요동 속도를 이용한다. 한 실시양태에서, 세포 확장 시스템은 2회 요동/분 내지 5회 요동/분, 5회 요동/분 내지 10회 요동/분, 10회 요동/분 내지 20회 요동/분, 20회 요동/분 내지 30회 요동/분, 및 30회 요동/분 내지 40회 요동/분의 요동 속도를 이용한다. 한 실시양태에서, 세포 확장 시스템은 약 2°, 약 3°, 약 4°, 약 5°, 약 6°, 약 7°, 약 8°, 약 9°, 약 10°, 약 11°, 및 약 12°의 요동 각도를 이용한다. 한 실시양태에서, 세포 확장 시스템은 2° 내지 3°, 3° 내지 4°, 4° 내지 5°, 5° 내지 6°, 6° 내지 7°, 7° 내지 8°, 8° 내지 9°, 9° 내지 10°, 10° 내지 11°, 및 11° 내지 12°의 요동 각도를 이용한다.

[0275] 한 실시양태에서, 액상 종양으로부터 수득된 TIL을 확장시키는 방법은 TIL이 우수한 종양 반응성을 위해 선택되는 단계를 추가로 포함한다. 관련 기술분야에 공지된 임의의 선택 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2016/0010058 A1 (이의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 방법이 우수한 종양 반응성을 위한 TIL의 선택에 사용될 수 있다.

[0276] 한 실시양태에서, 본 발명은 문헌 [Jin, et al., J. Immunotherapy 2012, 35, 283-292] (이의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같은 단계를 포함하는, 액상 종양으로부터 TIL 집단을 확장시키는 방법을 제공한다. 예를 들어, 종양 또는 그의 부분을 효소 배지에 배치하고, 대략 1분 동안 기계적으로 해리시킬 수 있다. 이어서, 혼합물을 5% CO_2 하에 37℃에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 대략 1분 동안 다시 기계적으로 파괴시킬 수 있다. 5% CO_2 하에 37℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 종양 또는 그의 부분을 대략 1분 동안 3번째로 기계적으로 파괴시킬 수 있다. 3번째 기계적 파괴 후에, 큰 조직 조각이 존재하는 경우, 5% CO_2 하에 37℃에서 30분 추가의 인큐베이션을 수행하거나 또는 수행하지 않으면서, 1 또는 2회의 추가의 기계적 해리를 샘플에 적용할 수 있다. 최종 인큐베이션의 종료 후에, 세포 현탁액이 다수의 적혈구 또는 사멸 세포를 함유하는 경우, 피콜을 사용하는 밀도 구배 분리를 수행하여 이들 세포를 제거할 수 있다. TIL 배양을 24-웰 플레이트 (코스타(Costar) 24-웰 세포 배양 클러스터, 편평 바닥; 코닝 인코포레이티드(Corning Incorporated), 뉴욕주 코닝)에서 개시하였으며, 각각의 웰을 IL-2 (6000 IU/mL; 키론 코포레이션(Chiron Corp.), 캘리포니아주 에머리

빌)를 갖는 2 mL의 완전 배지 (CM) 내에 1x10^{6}개의 종양 소화 세포 또는 대략 1 내지 8 mm^3 크기의 1개의 종양 단편으로 시딩할 수 있다. CM은 10% 인간 AB 혈청, 25 mM Hepes 및 10 mg/mL 겐타미신으로 보충된, 글루타맥스를 갖는 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 (RPMI) 1640 완충제를 포함한다. 40 mL 용량 및 10 cm^2 기체-투과성 규소 바닥을 갖는 기체-투과성 플라스크 (지-렉스 10; 윌슨 울프 매뉴팩처링, 뉴 브라이톤)에서 배양을 개시할 수 있고, 각각의 플라스크에 IL-2를 갖는 10-40 mL의 CM 내에 10-40x10^{6}개 생존 종양 소화 세포 또는 5-30개 종양 단편을 로딩할 수 있다. 지-렉스 10 및 24-웰 플레이트를 5% CO_2 하에 37℃에서 가습 인큐베이터 내에서 인큐베이션할 수 있고, 배양 개시 5일 후에, 배지의 절반을 제거하고 신선한 CM 및 IL-2로 대체할 수 있고, 제5일 후 배지의 절반을 2-3일마다 교체할 수 있다. TIL의 제2 확장 프로토콜 (REP)은 본 개시내용의 액상 종양으로부터 수득된 TIL을 사용하여, 본원 다른 곳에 기재된 바와 같이 T-175 플라스크 및 기체-투과성 백 또는 기체-투과성 지-렉스 플라스크를 사용하여 수행될 수 있다. T-175 플라스크에서의 REP의 경우, 1x10^{6}개 TIL을 각각의 플라스크 내의 150 mL의 배지 중에 현탁시킬 수 있다. TIL을 3000 IU/mL의 IL-2 및 30 ng/mL의 항-CD3 항체 (OKT-3)로 보충된 CM 및 AIM-V 배지 (50/50 배지)의 1 대 1 혼합물 내에서 배양할 수 있다. T-175 플라스크를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션할 수 있다. 배지의 절반을 제5일에 3000 IU/mL의 IL-2를 갖는 50/50 배지를 사용하여 교체할 수 있다. 제7일에, 2개의 T-175 플라스크로부터의 세포를 3L 백에서 합할 수 있고, 5% 인간 AB 혈청 및 3000 IU/mL의 IL-2를 갖는 300 mL의 AIM-V를 300 mL의 TIL 현탁액에 첨가할 수 있다. 각각의 백 내 세포의 수를 매일 또는 2일마다 계수할 수 있고, 신선한 배지를 첨가하여 세포 수가 0.5 내지 2.0x10^{6}개 세포/mL를 유지하도록 할 수 있다. 100 cm^2 기체-투과성 규소 바닥을 갖는 500 mL 용량 플라스크 (예를 들어, 본원 다른 곳에 기재된 바와 같은 지-렉스 100, 윌슨 울프 매뉴팩처링)에서의 REP를 위해, 5x10^6 또는 10x10^{6}개의 TIL을 3000 IU/mL의 IL-2 및 30 ng/mL의 항-CD3 항체 (OKT-3)로 보충된 400 mL의 50/50 배지 내에서 배양할 수 있다. 지-렉스100 플라스크를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션할 수 있다. 제5일에, 250 mL의 상청액을 분리해내고, 원심분리 병에 넣고, 10분 동안 1500 rpm (491 g)으로 원심분리할 수 있다. 수득한 TIL 펠릿을 3000 IU/mL의 IL-2를 갖는 150 mL의 신선한 50/50 배지에 재현탁시키고, 다시 지-렉스 100 플라스크에 첨가할 수 있다. TIL이 지-렉스100 플라스크에서 연속적으로 확장될 때, 제7일에 각각의 지-렉스100에서의 TIL을 각각의 플라스크에 존재하는 300 mL의 배지 중에 현탁시키고, 세포 현탁액을 3개의 100 mL 분취물로 분할할 수 있고, 이를 사용하여 3개의 지-렉스100 플라스크에 시딩할 수 있다. 이어서, 5% 인간 AB 혈청 및 3000 IU/mL의 IL-2를 갖는 약 150 mL의 AIM-V를 각각의 플라스크에 첨가할 수 있다. 이어서, 지-렉스 100 플라스크를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션할 수 있고, 4일 후에 3000 IU/mL의 IL-2를 갖는 150 mL의 AIM-V를 각각의 지-렉스 100 플라스크에 첨가할 수 있다. 이 후에, 배양 제14일에 세포를 수거함으로써 REP를 완료할 수 있다.

[0277] 한 실시양태에서, 확장 방법 또는 암 치료 방법은 환자 종양 샘플로부터 TIL을 수득하는 단계를 포함한다. 환자 종양 샘플은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 수득할 수 있다. 예를 들어, TIL을 효소적 종양 소화물 및 예적박리에 의한 종양 단편 (약 1 내지 약 8 mm^3 크기)으로부터 배양할 수 있다. 이러한 종양 소화물은 효소 배지 (예를 들어, 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 (RPMI) 1640 완충제, 2 mM 글루타메이트, 10 mcg/mL 겐타미신, 30 단위/mL의 DNase 및 1.0 mg/mL의 콜라게나제)에서의 인큐베이션, 이어서 기계적 해리 (예를 들어, 조직 해리기를 사용하여)에 의해 생성될 수 있다. 종양 소화물은 종양을 효소 배지에 배치하고, 종양을 대략 1분 동안 기계적으로 해리시키고, 이어서 5% CO_2 하에 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하고, 이어서 단지 작은 조직 조각이 존재할 때까지 상기 조건 하에서 기계적 해리 및 인큐베이션의 반복된 주기를 수행하여 생성될 수 있다. 이 과정의 종료시에, 세포 현탁액이 다수의 적혈구 또는 사멸 세포를 함유하는 경우, 피콜 분지형 친수성 폴리사카라이드를 사용하는 밀도 구배 분리를 수행하여 이들 세포를 분리해낼 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 대안적 방법, 예컨대 미국 특허 출원 공개 번호 2012/0244133 A1 (이의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 것이 사용될 수 있다. TIL을 확장시키는 방법 또는 암을 치료하는 방법에 대한 본원에 기재된 임의의 실시양태에서 임의의 상기 방법을 사용할 수 있다.

[0278] 한 실시양태에서, TIL에 대한 제2/REP 확장 방법은 이전에 기재된 바와 같은 T-175 플라스크 및 기체 투과성 백 (Tran, et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51; Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42) 또는 기체 투과성 배양용기 (미국 미네소타주 뉴 브라이톤 소재 윌슨 울프 매뉴팩처링 코포레이션으로부터 상업적으로 입수가능한 지-렉스 플라스크)를 사용하여 수행될 수 있다. T-175 플라스크에서의 TIL 확장을 위해, 150 mL

의 배지 중에 현탁된 1 x 10^6개 TIL을 각각의 T-175 플라스크에 첨가할 수 있다. TIL을 mL당 3000 IU (국제 단위)의 IL-2 및 ml당 30 ng의 항-CD3 항체 (예를 들어, OKT-3)로 보충된 CM 및 AIM-V 배지의 1 대 1 혼합물 내에서 배양할 수 있다. T-175 플라스크를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션할 수 있다. 배지의 절반을 제5일에 mL당 3000 IU의 IL-2를 갖는 50/50 배지를 사용하여 교체할 수 있다. 제7일에, 2개의 T-175 플라스크로부터의 세포를 3 L 백에서 합할 수 있고, 5% 인간 AB 혈청 및 mL당 3000 IU의 IL-2를 갖는 300 mL의 AIM V를 300 ml의 TIL 현탁액에 첨가하였다. 각각의 백 내 세포의 수를 매일 또는 2일마다 계수하였고, 신선한 배지를 첨가하여 세포 수가 0.5 내지 2.0 x 10^6개 세포/mL를 유지하도록 하였다.

[0279] 한 실시양태에서, 100 cm^2 기체-투과성 규소 바닥을 갖는 500 mL 용량 기체 투과성 플라스크 (미국 미네소타주 뉴 브라이톤 소재 윌슨 울프 매뉴팩처링으로부터 상업적으로 입수가능한 지-렉스 100)에서의 제2/REP TIL 확장을 위해, 5 x 10^6 또는 10 x 10^6개 TIL을, 5% 인간 AB 혈청, mL당 3000 IU의 IL-2 및 mL당 30 ng의 항-CD3 (OKT-3)으로 보충된 400 mL의 50/50 배지 내에서 배양할 수 있다. 지-렉스 100 플라스크를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션할 수 있다. 제5일에, 250 mL의 상청액을 분리해내고, 원심분리 병에 넣고, 10분 동안 1500 rpm (분당 회전수; 491 x g)으로 원심분리할 수 있다. TIL 펠릿을 5% 인간 AB 혈청, mL당 3000 IU의 IL-2를 갖는 150 mL의 신선한 배지에 재현탁시키고, 다시 원래 지-렉스 100 플라스크에 첨가할 수 있다. TIL이 지-렉스 100 플라스크에서 연속적으로 확장될 때, 제7일에 각각의 지-렉스 100 플라스크에서의 TIL을 각각의 플라스크에 존재하는 300 mL의 배지 중에 현탁시킬 수 있고, 세포 현탁액을 3개의 100 mL 분취물로 분할할 수 있고, 이를 사용하여 3개의 지-렉스 100 플라스크에 시딩할 수 있다. 이어서, 5% 인간 AB 혈청 및 mL당 3000 IU의 IL-2를 갖는 150 mL의 AIM-V를 각각의 플라스크에 첨가할 수 있다. 지-렉스 100 플라스크를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션할 수 있고, 4일 후에 mL당 3000 IU의 IL-2를 갖는 150 mL의 AIM-V를 각각의 지-렉스 100 플라스크에 첨가할 수 있다. 배양 제14일에 세포를 수거할 수 있다.

[0280] 한 실시양태에서, TIL은 하기와 같이 제조될 수 있다. 2 mM 글루타민 (미디어테크, 인크.(Mediatech, Inc.), 버지니아주 마나사스), 100 U/mL 페니실린 (인비트로젠 라이프 테크놀로지스(Invitrogen Life Technologies)), 100 μg/mL 스트렙토마이신 (인비트로젠 라이프 테크놀로지스), 5% 열-불활성화 인간 AB 혈청 (밸리 바이오메디칼, 인크.(Valley Biomedical, Inc.), 버지니아주 윈체스터) 및 600 IU/mL rhIL-2 (키론, 캘리포니아주 에머리빌)로 보충된 AIM-V 배지 (인비트로젠 라이프 테크놀로지스, 캘리포니아주 칼스배드)로 구성된 완전 배지 (CM) 내에서 2 mm^3 종양 단편을 배양한다. 액상 종양의 효소적 소화를 위해, 종양 시편을 RPMI-1640 내로 다이싱하고, 세척하고, 15-22℃에서 5분 동안 800 rpm으로 원심분리하고, 효소적 소화 완충제 (RPMI-1640 중 0.2 mg/mL 콜라게나제 및 30 단위/ml의 DNase) 중에 재현탁시키고, 이어서 실온에서 밤새 회전시킨다. 단편으로부터 확립된 TIL을 CM 내에서 3-4주 동안 성장시키고 새로 확장시킬 수 있거나 또는 10% 디메틸술폭시드 (DMSO)를 갖는 열-불활성화 HAB 혈청 중에 동결보존시키고 연구 시까지 -180℃에서 저장할 수 있다. 복수 수집물로부터 수득한 종양 연관 림프구 (TAL)를 24 웰 플레이트의 웰당 3 x 10^6개 세포/웰로 CM 내에 시딩하였다. TIL 성장을 저전력 도립 현미경을 사용하여 약 격일로 검사하였다.

[0281] TIL 제조 방법 ("2A 방법")의 예시적인 실시양태

[0282] 방법 2A로 공지된 예시적인 TIL 제조/확장 방법은 도 22에 개략적으로 예시되어 있다. 특정 측면에서, 본 방법은 대상체/환자에 대한 투여시 복제 주기가 증가될 수 있는 TIL을 생산하고 이에 따라 더 오래된 TIL (즉, 대상체/환자에 대한 투여 전 더 많은 회차의 복제를 추가로 겪은 TIL)에 비해 추가의 치료 이익을 제공할 수 있다. 더 어린 TIL의 특색은 문헌, 예를 들어 [Donia, et al., Scandinavian Journal of Immunology, 75: 157-167 (2012); Dudley et al., Clin Cancer Res, 16:6122-6131 (2010); Huang et al., J Immunother, 28(3):258-267 (2005); Besser et al., Clin Cancer Res, 19(17):OF1-OF9 (2013); Besser et al., J Immunother 32:415-423 (2009); Robbins, et al., J Immunol 2004; 173:7125-7130; Shen et al., J Immunother, 30: 123-129 (2007); Zhou, et al., J Immunother, 28:53-62 (2005); 및 Tran, et al., J Immunother, 31:742-751 (2008)] (이들 모두는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재되었다.

[0283] 본원에 논의된 바와 같이, 본 발명은 동결보존된 TIL을 재자극시켜 그의 대사 활성 및 이에 따른 상대 건강을 증가시킨 후 환자 내로 이식하는 것과 관련된 단계, 및 상기 대사 건강을 시험하는 방법을 포함할 수 있다. 일반적으로 본원에 약술된 바와 같이, 일반적으로 TIL을 환자 샘플로부터 취하고 그의 수를 확장시키도록 조작한

후에 환자 내로 이식한다. 일부 실시양태에서, TIL은 임의로 하기 논의된 바와 같이 유전자 조작될 수 있다.

[0284] 일부 실시양태에서, TIL은 동결보존될 수 있다. 해동되었을 때, 이들을 또한 재자극시켜 그의 대사를 증가시킨 후에 환자 내로 주입할 수 있다.

[0285] 일부 실시양태에서, 하기 세부사항 뿐만 아니라 실시예 및 도면에 논의된 바와 같이, 제1 확장 (사전REP로 지칭되는 방법 포함)은 통상적인 확장 방법과 비교하여 7-14일로 단축되고, 제2 확장 (REP로 지칭되는 방법 포함)은 7-14일로 단축된다.

[0286] 도 23은 예시적인 2A 방법을 예시한다. 도 23에 예시되고 하기 세부사항에 추가로 설명된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 제1 확장 (단계 B)은 11일로 단축되고, 제2 확장 (단계 D)은 11일로 단축된다. 일부 실시양태에서, 본원에 상세하게 논의된 바와 같이, 제1 및 제2 확장 (단계 B 및 단계 D)의 조합은 22일로 단축된다. 인지되는 바와 같이, 도 23에 예시되고 하기에 기재된 방법은 예시적이고, 본원에 기재된 방법은 기재된 단계에 대한 변경 및 추가 뿐만 아니라 임의의 조합을 포괄한다. 본 방법의 예시적인 실시양태는 PCT 출원 번호 PCT/US2018/012633 (이는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0287] A. 단계 A: 환자 종양 샘플 수득

[0288] 일반적으로, TIL은 먼저 환자 종양 샘플로부터 수득되고 ("1차 TIL"), 이어서 본원에 기재된 바와 같이 추가의 조작을 위해 보다 큰 집단으로 확장되고, 임의로 동결보존되고, 본원에 약술된 바와 같이 재자극되고, 임의로 TIL 건강의 지표로서 표현형 및 대사 파라미터에 대해 평가된다.

[0289] 환자 종양 샘플은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여, 일반적으로 외과적 절제, 바늘 생검, 분리반출술 또는 종양과 TIL 세포의 혼합물을 함유하는 샘플을 수득하기 위한 다른 수단을 통해 수득될 수 있다. 일반적으로, 종양 샘플은 원발성 종양, 침습성 종양 또는 전이성 종양을 포함한 임의의 고형 종양으로부터의 것일 수 있다. 종양 샘플은 또한 액상 종양, 예컨대 혈액 악성종양으로부터 수득된 종양일 수 있다. 고형 종양은 유방암, 췌장암, 전립선암, 결장직장암, 폐암, 뇌암, 신장암, 위암 및 피부암 (편평 세포 암종, 기저 세포 암종 및 흑색종을 포함하나 이에 제한되지는 않음)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 암 유형일 수 있다. 일부 실시양태에서, 유용한 TIL은 악성 흑색종 종양으로부터 수득되며, 이들이 특히 높은 수준의 TIL을 갖는 것으로 공지된 바 있다. 일부 실시양태에서, 종양은 약 1.5 cm 초과 약 4 cm 미만이다. 일부 실시양태에서, 종양은 4 cm 미만이다.

[0290] 수득되었을 때, 종양 샘플은 일반적으로 예적박리를 사용하여 1 내지 약 8 mm^3의 작은 조각으로 단편화되며, 약 2-3 mm^3이 특히 유용하다. TIL은 효소적 종양 소화물을 사용하여 이들 단편으로부터 배양된다. 이러한 종양 소화물은 효소 배지 (예를 들어, 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 (RPMI) 1640 완충제, 2 mM 글루타메이트, 10 mcg/mL 겐타미신, 30 단위/mL의 DNase 및 1.0 mg/mL의 콜라게나제)에서의 인큐베이션, 이어서 기계적 해리 (예를 들어, 조직 해리기를 사용하여)에 의해 생성될 수 있다. 종양 소화물은 종양을 효소 배지에 배치하고, 종양을 대략 1분 동안 기계적으로 해리시키고, 이어서 5% CO_2 하에 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하고, 이어서 단지 작은 조직 조각이 존재할 때까지 상기 조건 하에서 기계적 해리 및 인큐베이션의 반복된 주기를 수행하여 생성될 수 있다. 이 과정의 종료시에, 세포 현탁액이 다수의 적혈구 또는 사멸 세포를 함유하는 경우, 피콜 분지형 친수성 폴리사카라이드를 사용하는 밀도 구배 분리를 수행하여 이들 세포를 분리해낼 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 대안적 방법, 예컨대 미국 특허 출원 공개 번호 2012/0244133 A1 (이의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 것이 사용될 수 있다. TIL을 확장시키는 방법 또는 암을 치료하는 방법에 대한 본원에 기재된 임의의 실시양태에서 임의의 상기 방법을 사용할 수 있다.

[0291] 일반적으로, 수거된 세포 현탁액은 "1차 세포 집단" 또는 "새로 수거된" 세포 집단으로 불린다.

[0292] 한 실시양태에서, TIL은 먼저 환자로부터 수득된 효소적 종양 소화물 및 종양 단편으로부터 배양될 수 있다.

[0293] 일부 실시양태에서, TIL은 종양 단편으로부터 수득된다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 예적박리로부터 수득된다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 1 mm^3 내지 10 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 1 mm^3 내지 8 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 1 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 2 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 3 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 4 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 5 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 6 mm^3이다. 일부 실시양태에서,

종양 단편은 약 7 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 8 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 9 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 10 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 8-27 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 10-25 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 15-25 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 8-20 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 15-20 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 8-15 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 8-10 mm^3이다.

[0294] 일부 실시양태에서, 종양 단편의 수는 약 40 내지 약 50개의 종양 단편이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편의 수는 약 40개의 종양 단편이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편의 수는 약 50개의 종양 단편이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편 크기는 약 8-27 mm^3이고, 약 50개 미만의 종양 단편이 존재한다.

[0295] 일부 실시양태에서, TIL은 종양 소화물로부터 수득된다. 일부 실시양태에서, 종양 소화물을 효소 배지, 예를 들어 이에 제한되지는 않지만 RPMI 1640, 2mM 글루타맥스, 10 mg/mL 겐타미신, 30 U/mL DNase 및 1.0 mg/mL 콜라게나제에서의 인큐베이션, 이어서 기계적 해리 (젠틀맥스(GentleMACS), 캘리포니아주 오번 소재 밀테니 바이오테크)에 의해 생성하였다. 종양을 효소 배지에 배치한 후, 종양을 대략 1분 동안 기계적으로 해리시킬 수 있다. 이어서 용액을 5% CO_2 하에 37℃에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 대략 1분 동안 다시 기계적으로 파괴시킬 수 있다. 5% CO_2 하에 37℃에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 종양을 대략 1분 동안 3번째로 기계적으로 파괴시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 3번째 기계적 파괴 후에, 큰 조직 조각이 존재하는 경우, 5% CO_2 하에 37℃에서 30분 추가의 인큐베이션을 수행하거나 또는 수행하지 않으면서, 1 또는 2회의 추가의 기계적 해리를 샘플에 적용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 최종 인큐베이션의 종료 시에, 세포 현탁액이 다수의 적혈구 또는 사멸 세포를 함유하는 경우, 피콜을 사용하는 밀도 구배 분리를 수행하여 이들 세포를 제거할 수 있다.

[0296] B. 단계 B: 제1 확장

[0297] 단계 A에서의 종양 단편의 박리 또는 소화 후에, 생성된 세포를 종양 및 다른 세포에 비해 TIL의 성장을 유리하게 하는 조건 하에 IL-2를 함유하는 혈청 중에서 배양한다. 일부 실시양태에서, 종양 소화물을 2 mL 웰 내 6000 IU/mL의 IL-2를 갖는 불활성화된 인간 AB 혈청을 포함하는 배지에서 인큐베이션한다. 상기 1차 세포 집단을 소정 기간의 일수 동안, 일반적으로 3 내지 14일 동안 배양하여 벌크 TIL 집단, 일반적으로 약 1 x 10^8개의 벌크 TIL 세포를 생성시킨다. 일부 실시양태에서, 이러한 1차 세포 집단을 7 내지 14일의 기간 동안 배양하여, 벌크 TIL 집단, 일반적으로 약 1 x 10^8개의 벌크 TIL 세포를 생성시킨다. 일부 실시양태에서, 이러한 1차 세포 집단을 10 내지 14일의 기간 동안 배양하여, 벌크 TIL 집단, 일반적으로 약 1 x 10^8개의 벌크 TIL 세포를 생성시킨다. 일부 실시양태에서, 이러한 1차 세포 집단을 약 11일의 기간 동안 배양하여, 벌크 TIL 집단, 일반적으로 약 1 x 10^8개의 벌크 TIL 세포를 생성시킨다. 일부 실시양태에서, 이러한 1차 세포 집단을 약 11일의 기간 동안 배양하여, 벌크 TIL 집단, 일반적으로 약 200x10^6개의 벌크 TIL 집단을 생성시킨다.

[0298] 바람직한 실시양태에서, TIL의 확장은 하기 및 본원에 기재된 바와 같은 초기 벌크 TIL 확장 단계 (사전-REP로서 지칭되는 방법을 포함할 수 있는, 도 23에 도시된 바와 같은 단계 B), 이어서 하기 단계 D 하 및 본원에 기재된 바와 같은 제2 확장 단계 (급속 확장 프로토콜 (REP) 단계로 지칭되는 방법을 포함하는 단계 D), 이어서 임의적인 동결보존, 및 이어서 하기 및 본원에 기재된 바와 같은 제2 단계 D (재자극 REP 단계로 지칭되는 방법을 포함함)를 사용하여 수행될 수 있다. 이러한 방법으로부터 수득된 TIL은 본원에 기재된 바와 같은 표현형 특징 및 대사 파라미터에 대해 임의로 특징화될 수 있다.

[0299] 24-웰 플레이트에서, 예를 들어 코스타 24-웰 세포 배양 클러스터, 편평 바닥 (코닝 인코포레이티드, 뉴욕주 코닝)을 사용하여 TIL 배양을 개시하는 실시양태에서, 각각의 웰에 IL-2 (6000 IU/mL; 키론 코포레이션, 캘리포니아주 에머리빌)를 갖는 2mL의 완전 배지 (CM) 내에 1 x 10^6개의 종양 소화 세포 또는 1개의 종양 단편을 시딩할 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 1 mm^3 내지 10 mm^3이다.

[0300] 일부 실시양태에서, 단계 B에 대한 CM은 10% 인간 AB 혈청, 25mM HEPES 및 10 mg/mL 겐타미신으로 보충된 글루타맥스를 갖는 RPMI 1640으로 이루어진다. 40 mL 용량 및 10cm^2 기체-투과성 규소 바닥을 갖는 기체-투과성 플라스크 (예를 들어, 지-렉스10; 윌슨 울프 매뉴팩처링, 미네소타주 뉴 브라이톤)에서 배양을 개시하는 실시양태

에서 (도 1), 각각의 플라스크에서 IL-2를 갖는 10-40 mL의 CM 내에 10-40 x 10^6개의 생존 종양 소화 세포 또는 5-30개의 종양 단편을 로딩할 수 있다. 지-렉스10 및 24-웰 플레이트 둘 다를 5% CO_2 하에 37℃에서 가습 인큐베이터 내에서 인큐베이션할 수 있고, 배양 개시 5일 후에, 배지의 절반을 제거하고 신선한 CM 및 IL-2로 대체할 수 있고, 제5일 후 배지의 절반을 2-3일마다 교체할 수 있다.

[0301] 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 IL-2를 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 3000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 1000 IU/mL, 약 1500 IU/mL, 약 2000 IU/mL, 약 2500 IU/mL, 약 3000 IU/mL, 약 3500 IU/mL, 약 4000 IU/mL, 약 4500 IU/mL, 약 5000 IU/mL, 약 5500 IU/mL, 약 6000 IU/mL, 약 6500 IU/mL, 약 7000 IU/mL, 약 7500 IU/mL, 또는 약 8000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 1000 내지 2000 IU/mL, 2000 내지 3000 IU/mL, 3000 내지 4000 IU/mL, 4000 내지 5000 IU/mL, 5000 내지 6000 IU/mL, 6000 내지 7000 IU/mL, 7000 내지 8000 IU/mL, 또는 8000 IU/mL의 IL-2를 포함한다.

[0302] 일부 실시양태에서, 실시예 및 도면에 논의된 바와 같이, 제1 확장 방법 (사전-REP로 지칭되는 방법 포함; 단계 B)은 3-14일로 단축된다. 일부 실시양태에서, 실시예에 논의되고 도 4 및 5에 제시된 바와 같이, 단계 B의 제1 확장은 7-14일로 단축된다. 일부 실시양태에서, 실시예에 논의된 바와 같이, 단계 B의 제1 확장은 10-14일로 단축된다. 일부 실시양태에서, 실시예에 논의된 바와 같이, 단계 B의 제1 확장은 11일로 단축된다.

[0303] 일부 실시양태에서, IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-21 뿐만 아니라 그의 조합은 본원에 기재된 바와 같은 단계 B 방법 동안 포함될 수 있다.

[0304] 일부 실시양태에서, 단계 B는 폐쇄 시스템 생물반응기에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 폐쇄 시스템이 본원에 기재된 바와 같은 TIL 확장을 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, 단일 생물반응기가 사용된다. 일부 실시양태에서, 사용된 단일 생물반응기는, 예를 들어 지렉스-10 또는 지렉스-100이다.

[0305] C. 단계 C: 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행

[0306] 일부 실시양태에서, 단계 B로부터의 벌크 TIL 집단은 관련 기술분야에 공지되고 본원에 기재된 방법을 사용하여 즉시 동결보존될 수 있다. 대안적으로, 벌크 TIL 집단은 제2 확장 (REP)에 적용된 다음, 하기 논의된 바와 같이 동결보존될 수 있다.

[0307] 일부 실시양태에서, 단계 B TIL은 저장되지 않고, 단계 B TIL은 바로 단계 D로 진행된다. 일부 실시양태에서, 본원에 추가로 기재된 바와 같이 이행은 폐쇄 시스템에서 발생한다.

[0308] D. 단계 D: 제2 확장

[0309] 일부 실시양태에서, TIL 세포 집단은 수거 및 초기 벌크 프로세싱 후에 (즉, 단계 A 및 단계 B 후에) 수가 확장된다. 이것은 제2 확장으로 본원에서 지칭되며, 이는 일반적으로 관련 기술분야에서 급속 확장 방법 (REP)으로 지칭되는 확장 방법을 포함할 수 있다. 제2 확장은 일반적으로 기체-투과성 용기에서 피더 세포, 시토카인 공급원 및 항-CD3 항체를 포함한 다수의 성분을 포함하는 배양 배지를 사용하여 달성된다. 일부 실시양태에서, 제2 확장은 제2 확장에서 수득된 TIL의 수를 증가시키기 위해 규모-확대를 포함할 수 있다.

[0310] 한 실시양태에서, REP 및/또는 제2 확장은 본 개시내용의 방법을 사용하여 기체 투과성 용기에서 수행될 수 있다. 예를 들어, TIL은 인터류킨-2 (IL-2) 또는 인터류킨-15 (IL-15)의 존재 하에 비-특이적 T-세포 수용체 자극을 사용하여 급속하게 확장될 수 있다. 비-특이적 T-세포 수용체 자극은, 예를 들어 약 30 ng/ml의 마우스 모노클로날 항-CD3 항체인 OKT3 (뉴저지주 라리탄 소재 오르토-맥네일 또는 캘리포니아주 오번 소재 밀테니 바이오테크로부터 상업적으로 입수가능함)을 포함할 수 있다. 임의로 T-세포 성장 인자, 예컨대 300 IU/mL IL-2 또는 IL-15의 존재 하에, 임의로 벡터로부터 발현될 수 있는 암의 1종 이상의 항원 (그의 항원 부분, 예컨대 에피토프(들) 포함), 예컨대 인간 백혈구 항원 A2 (HLA-A2) 결합 펩티드, 예를 들어 0.3 μM MART-1 :26-35 (27 L) 또는 gp1 00:209-217 (210M)에 의한 시험관내 TIL의 추가 자극에 의해 TIL을 급속히 확장시킬 수 있다. 다른 적합한 항원은, 예를 들어 NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, 티로시나제 암 항원, MAGE-A3, SSX-2 및 VEGFR2, 또는 그의 항원 부분을 포함할 수 있다. 또한, HLA-A2-발현 항원-제시 세포 상으로 펄스된 암의 동일한 항원(들)에 의한 재자극에 의해 TIL을 급속히 확장시킬 수 있다. 대안적으로, 예를 들어 조사된 자가 림프구 또는 조사된 HLA-A2+ 동종 림프구 및 IL-2에 의해 TIL을 추가로 재자극시킬 수 있다.

[0311] 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 IL-2를 추가로 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 3000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 1000 IU/mL, 약 1500 IU/mL, 약 2000

IU/mL, 약 2500 IU/mL, 약 3000 IU/mL, 약 3500 IU/mL, 약 4000 IU/mL, 약 4500 IU/mL, 약 5000 IU/mL, 약 5500 IU/mL, 약 6000 IU/mL, 약 6500 IU/mL, 약 7000 IU/mL, 약 7500 IU/mL, 또는 약 8000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 1000 내지 2000 IU/mL, 2000 내지 3000 IU/mL, 3000 내지 4000 IU/mL, 4000 내지 5000 IU/mL, 5000 내지 6000 IU/mL, 6000 내지 7000 IU/mL, 7000 내지 8000 IU/mL, 또는 8000 IU/mL의 IL-2를 포함한다.

[0312] 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 OKT3 항체를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 30 ng/mL의 OKT3 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 0.1 ng/mL, 약 0.5 ng/mL, 약 1 ng/mL, 약 2.5 ng/mL, 약 5 ng/mL, 약 7.5 ng/mL, 약 10 ng/mL, 약 15 ng/mL, 약 20 ng/mL, 약 25 ng/mL, 약 30 ng/mL, 약 35 ng/mL, 약 40 ng/mL, 약 50 ng/mL, 약 60 ng/mL, 약 70 ng/mL, 약 80 ng/mL, 약 90 ng/mL, 약 100 ng/mL, 약 200 ng/mL, 약 500 ng/mL, 및 약 1 μg/mL의 OKT3 항체를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 0.1 ng/mL 내지 1 ng/mL, 1 ng/mL 내지 5 ng/mL, 5 ng/mL 내지 10 ng/mL, 10 ng/mL 내지 20 ng/mL, 20 ng/mL 내지 30 ng/mL, 30 ng/mL 내지 40 ng/mL, 40 ng/mL 내지 50 ng/mL, 및 50 ng/mL 내지 100 ng/mL의 OKT3 항체를 포함한다.

[0313] 일부 실시양태에서, IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-21 뿐만 아니라 그의 조합은 본원에 기재된 바와 같은 단계 D 방법에서의 제2 확장 동안 포함될 수 있다.

[0314] 일부 실시양태에서, 제2 확장은 IL-2, OKT-3 및 항원-제시 피더 세포를 포함하는 보충된 세포 배양 배지에서 수행될 수 있다.

[0315] 일부 실시양태에서 항원-제시 피더 세포 (APC)는 PBMC이다. 한 실시양태에서, 급속 확장 및/또는 제2 확장에서의 TIL 대 PBMC 및/또는 항원-제시 세포의 비는 약 1 대 25, 약 1 대 50, 약 1 대 100, 약 1 대 125, 약 1 대 150, 약 1 대 175, 약 1 대 200, 약 1 대 225, 약 1 대 250, 약 1 대 275, 약 1 대 300, 약 1 대 325, 약 1 대 350, 약 1 대 375, 약 1 대 400, 또는 약 1 대 500이다. 한 실시양태에서, 급속 확장 및/또는 제2 확장에서의 TIL 대 PBMC의 비는 1 대 50 내지 1 대 300이다. 한 실시양태에서, 급속 확장 및/또는 제2 확장에서의 TIL 대 PBMC의 비는 1 대 100 내지 1 대 200이다.

[0316] 한 실시양태에서, REP 및/또는 제2 확장은 150 ml 배지 중 벌크 TIL이 100- 또는 200배 과량의 불활성화 피더 세포, 30 mg/mL OKT3 항-CD3 항체 및 3000 IU/mL IL-2와 혼합되어 있는 플라스크에서 수행된다. 배지 교체는 세포가 대안적 성장 챔버로 옮겨질 때까지 수행된다 (일반적으로 신선한 배지로 호흡을 통해 2/3 배지 교체). 대안적 성장 챔버는 하기에 보다 상세히 논의된 바와 같은 지렉스 플라스크 및 기체 투과성 용기를 포함한다.

[0317] 일부 실시양태에서, 실시예 및 도면에 논의된 바와 같이, 제2 확장 (또한 REP 방법으로도 지칭됨)은 7-14일로 단축된다. 일부 실시양태에서, 제2 확장은 11일로 단축된다.

[0318] 한 실시양태에서, REP 및/또는 제2 확장은 이전에 기재된 바와 같은 T-175 플라스크 및 기체 투과성 백 (Tran, et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51; Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42) 또는 기체 투과성 배양용기 (지-렉스 플라스크)를 사용하여 수행될 수 있다. T-175 플라스크에서의 TIL 급속 확장 및/또는 제2 확장을 위해, 150 mL의 배지 중에 현탁된 1 x 10^6개 TIL을 각각의 T-175 플라스크에 첨가할 수 있다. TIL을 mL당 3000 IU의 IL-2 및 ml당 30 ng의 항-CD3 항체로 보충된 CM 및 AIM-V 배지의 1 대 1 혼합물 내에서 배양할 수 있다. T-175 플라스크를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션할 수 있다. 배지의 절반을 제5일에 mL당 3000 IU의 IL-2를 갖는 50/50 배지를 사용하여 교체할 수 있다. 제7일에, 2개의 T-175 플라스크로부터의 세포를 3 L 백에서 합할 수 있고, 5% 인간 AB 혈청 및 mL당 3000 IU의 IL-2를 갖는 300 mL의 AIM V를 300 ml의 TIL 현탁액에 첨가하였다. 각각의 백 내 세포의 수를 매일 또는 2일마다 계수하였고, 신선한 배지를 첨가하여 세포 수가 0.5 내지 2.0 x 10^6개 세포/mL를 유지하도록 하였다.

[0319] 한 실시양태에서, 100 cm 기체-투과성 규소 바닥을 갖는 500 mL 용량 기체 투과성 플라스크 (미국 미네소타주 뉴 브라이톤 소재 윌슨 울프 매뉴팩처링 코포레이션으로부터 상업적으로 입수가능한 지-렉스 100)에서 REP 및/또는 제2 확장을 수행할 수 있다. 5 x 10^6 또는 10 x 10^6개 TIL을, 5% 인간 AB 혈청, mL당 3000 IU의 IL-2 및 ml당 30 ng의 항-CD3 (OKT3)으로 보충된 400 mL의 50/50 배지에서 PBMC와 함께 배양할 수 있다. 지-렉스 100 플라스크를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션할 수 있다. 제5일에, 250 mL의 상청액을 분리해내고, 원심분리병에 넣고, 10분 동안 1500 rpm (491 x g)으로 원심분리할 수 있다. TIL 펠릿을 5% 인간 AB 혈청, mL당 3000 IU의 IL-2를 갖는 150 mL의 신선한 배지에 재현탁시키고, 다시 원래 지-렉스 100 플라스크에 첨가할 수 있다.

TIL이 지-렉스 100 플라스크에서 연속적으로 확장될 때, 제7일에 각각의 지-렉스 100에서의 TIL을 각각의 플라스크에 존재하는 300 mL의 배지 중에 현탁시킬 수 있고, 세포 현탁액을 3개의 100 mL 분취물로 분할할 수 있고, 이를 사용하여 3개의 지-렉스 100 플라스크에 시딩할 수 있다. 이어서, 5% 인간 AB 혈청 및 mL당 3000 IU의 IL-2를 갖는 150 mL의 AIM-V를 각각의 플라스크에 첨가할 수 있다. 지-렉스 100 플라스크를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션할 수 있고, 4일 후에 mL당 3000 IU의 IL-2를 갖는 150 mL의 AIM-V를 각각의 지-렉스 100 플라스크에 첨가할 수 있다. 배양 제14일에 세포를 수거할 수 있다.

[0320] 한 실시양태에서, REP 및/또는 제2 확장은 150 ml 배지 중 벌크 TIL이 100- 또는 200배 과량의 불활성화 피더 세포, 30 mg/mL OKT3 항-CD3 항체 및 3000 IU/mL IL-2와 혼합되어 있는 플라스크에서 수행된다. 배지 교체는 세포가 대안적 성장 챔버로 옮겨질 때까지 수행된다 (일반적으로 신선한 배지로 호흡을 통해 2/3 배지 교체). 대안적 성장 챔버는 하기에 보다 상세히 논의된 바와 같은 지렉스 플라스크 및 기체 투과성 용기를 포함한다.

[0321] 한 실시양태에서, REP 및/또는 제2 확장이 수행되며, 이는 TIL이 우수한 종양 반응성을 위해 선택되는 단계를 추가로 포함한다. 관련 기술분야에 공지된 임의의 선택 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2016/0010058 A1 (이의 개시내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 방법이 우수한 종양 반응성을 위한 TIL의 선택에 사용될 수 있다.

[0322] TIL의 REP 및/또는 제2 확장은 이전에 기재된 바와 같은 T-175 플라스크 및 기체 투과성 백 (Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, et al., 2008, J Immunother., 31:742-751, 및 Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, J Immunother., 26:332-342) 또는 기체 투과성 지-렉스 플라스크를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, REP 및/또는 제2 확장은 플라스크를 사용하여 수행된다. 일부 실시양태에서, REP는 기체-투과성 지-렉스 플라스크를 사용하여 수행된다. T-175 플라스크에서의 TIL REP 및/또는 제2 확장을 위해, 약 1 x 10^6개 TIL을 약 150 mL의 배지 중에 현탁시키고, 이를 각각의 T-175 플라스크에 첨가한다. TIL을 "피더" 세포로서 조사된 (50 Gy) 동종 PBMC와 함께 1 대 100의 비로 배양하고, 세포를 3000 IU/mL의 IL-2 및 30 ng/mL의 항-CD3으로 보충된, CM 및 AIM-V 배지의 1 내지 1 혼합물 (50/50 배지) 내에서 배양하였다. T-175 플라스크를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션한다. 일부 실시양태에서, 배지의 절반을 제5일에 3000 IU/mL의 IL-2를 갖는 50/50 배지를 사용하여 교체한다. 일부 실시양태에서, 제7일에, 2개의 T-175 플라스크로부터의 세포를 3 L 백에서 합하고, 5% 인간 AB 혈청 및 3000 IU/mL의 IL-2를 갖는 300 mL의 AIM-V를 300 mL의 TIL 현탁액에 첨가한다. 각각의 백 내 세포의 수를 매일 또는 2일마다 계수할 수 있고, 신선한 배지를 첨가하여 세포 수가 약 0.5 내지 약 2.0 x 10^6개 세포/mL를 유지하도록 할 수 있다.

[0323] 100 cm^2 기체-투과성 규소 바닥을 갖는 500 mL 용량 플라스크 (지-렉스100, 윌슨 울프)에서의 TIL REP 및/또는 제2 확장을 위해, 약 5 x 10^6 또는 10 x 10^6개 TIL을 3000 IU/mL의 IL-2 및 30 ng/mL의 항-CD3으로 보충된 400 mL의 50/50 배지에서, 조사된 동종 PBMC와 함께 1 대 100의 비로 배양한다. 지-렉스100 플라스크를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션한다. 일부 실시양태에서, 제5일에, 250mL의 상청액을 분리해내고, 원심분리 병에 넣고, 10분 동안 1500 rpm (491g)으로 원심분리한다. 이어서 TIL 펠릿을 3000 IU/mL의 IL-2를 갖는 150 mL의 신선한 50/50 배지에 재현탁시키고, 다시 원래 지-렉스100 플라스크에 첨가할 수 있다. TIL이 지-렉스 100 플라스크에서 연속적으로 확장되는 실시양태에서, 제7일에 각각의 지-렉스100에서의 TIL을 각각의 플라스크에 존재하는 300mL의 배지 중에 현탁시키고, 세포 현탁액을 3개의 100mL 분취물로 분할하고, 이를 사용하여 3개의 지-렉스100 플라스크에 시딩한다. 이어서, 5% 인간 AB 혈청 및 3000 IU/mL의 IL-2를 갖는 150 mL의 AIM-V를 각각의 플라스크에 첨가한다. 지-렉스100 플라스크를 5% CO_2 하에 37℃에서 인큐베이션하고, 4일 후에 3000 IU/mL의 IL-2를 갖는 150 mL의 AIM-V를 각각의 지-렉스100 플라스크에 첨가한다. 배양 제14일에 세포를 수거한다.

[0324] 1. 피더 세포 및 항원 제시 세포

[0325] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 제2 확장 절차 (REP를 포함하는 단계 D)는 REP TIL 확장 동안 및/또는 제2 확장 동안 과량의 피더 세포를 요구한다. 많은 실시양태에서, 피더 세포는 건강한 혈액 공여자로부터의 표준 전혈 단위로부터 수득된 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이다. PBMC는 표준 방법, 예컨대 피콜-파크 구배 분리를 사용하여 수득된다.

[0326] 일반적으로, 동종 PBMC는 또한 조사 또는 열 처리를 통해 불활성화되고, 실시예, 특히 조사된 동종 PBMC의 복제

비적격을 평가하기 위한 예시적인 프로토콜을 제공하는 실시예 14에 기재된 바와 같이, REP 절차에 사용된다.

[0327] 일부 실시양태에서, PBMC는 제14일에서의 총 생존 세포 수가 REP의 제0일 및/또는 제2 확장의 제0일 (즉, 제2 확장의 시작 일)에서 배양에 투입된 초기 생존 세포 수보다 더 적은 경우에 복제 비적격으로 간주되고 본원에 기재된 TIL 확장 절차에 사용하기 위한 것으로 허용된다.

[0328] 일부 실시양태에서, PBMC는 제7일 및 제14일에서 OKT3 및 IL-2의 존재 하에 배양된 총 생존 세포 수가 REP의 제0일 및/또는 제2 확장의 제0일 (즉, 제2 확장의 시작 일)에서 배양에 투입된 초기 생존 세포 수로부터 증가되지 않은 경우에 복제 비적격으로 간주되고 본원에 기재된 TIL 확장 절차에 사용하기 위한 것으로 허용된다. 일부 실시양태에서, PBMC는 30ng/ml OKT3 항체 및 3000 IU/ml IL-2의 존재 하에 배양된다.

[0329] 일부 실시양태에서, PBMC는 제7일 및 제14일에서 OKT3 및 IL-2의 존재 하에 배양된 총 생존 세포 수가 REP의 제0일 및/또는 제2 확장의 제0일 (즉, 제2 확장의 시작 일)에서 배양에 투입된 초기 생존 세포 수로부터 증가되지 않은 경우에 복제 비적격으로 간주되고 본원에 기재된 TIL 확장 절차에 사용하기 위한 것으로 허용된다. 일부 실시양태에서, PBMC는 5-60 ng/ml OKT3 항체 및 1000-6000 IU/mL IL-2의 존재 하에 배양된다. 일부 실시양태에서, PBMC는 10-50 ng/ml OKT3 항체 및 2000-5000 IU/ml IL-2의 존재 하에 배양된다. 일부 실시양태에서, PBMC는 20-40 ng/ml OKT3 항체 및 2000-4000 IU/ml IL-2의 존재 하에 배양된다. 일부 실시양태에서, PBMC는 25-35 ng/ml OKT3 항체 및 2500-3500 IU/ml IL-2의 존재 하에 배양된다.

[0330] 한 실시양태에서, 인공 항원 제시 세포는 PBMC에 대한 대체물로서 또는 그와의 조합으로 REP 단계에 사용된다.

[0331] 2. 시토카인

[0332] 본원에 기재된 확장 방법은 일반적으로 관련 기술분야에 공지된 바와 같이 고용량의 시토카인, 특히 IL-2를 갖는 배양 배지를 사용한다.

[0333] 대안적으로, TIL의 급속 확장 및/또는 제2 확장을 위해 시토카인의 조합을 사용하는 것이 추가적으로 가능하며, 미국 특허 출원 공개 번호 US 2017/0107490 A1, 국제 공개 번호 WO 2015/189356, 미국 특허 출원 공개 번호 US 2017/0107490 A1, 및 국제 공개 번호 WO 2015/189357 (이들 각각은 그 전문이 본원에 명백히 참조로 포함됨)에 일반적으로 약술된 바와 같이 IL-2, IL-15 및 IL-21 중 2종 이상의 조합을 사용한다. 따라서, 가능한 조합은 IL-2와 IL-15, IL-2와 IL-21, IL-15와 IL-21, 및 IL-2, IL-15와 IL-21을 포함하며, 마지막 경우 많은 실시양태에서 특정한 용도가 발견된다. 시토카인의 조합의 사용은 구체적으로 림프구 및 특히 본원에 기재된 바와 같은 T-세포의 생성을 유리하게 한다.

[0334] 3. 항-CD3 항체

[0335] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 확장 방법 (REP 포함)에 사용된 배양 배지는 또한 항-CD3 항체를 포함한다. IL-2와 조합된 항-CD3 항체는 TIL 집단에서 T 세포 활성화 및 세포 분열을 유도한다. 이러한 효과는 전장 항체 뿐만 아니라 Fab 및 F(ab')2 단편에서도 관찰될 수 있으며, 전자가 일반적으로 바람직하다; 예를 들어 문헌 [Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719] (그 전문이 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다.

[0336] 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 인지되는 바와 같이, 뮤린, 인간, 영장류, 래트 및 개 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 포유동물로부터의 항-인간 CD3 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 비롯한, 본 발명에서 용도가 발견되는 다수의 적합한 항-인간 CD3 항체가 존재한다. 특정한 실시양태에서, OKT3 항-CD3 항체가 사용된다 (뉴저지 라리탄 소재 오르토-맥네일 또는 캘리포니아주 오번 소재 밀테니 바이오테크로부터 상업적으로 입수가능함).

[0337] E. 단계 E: TIL 수거

[0338] 제2 확장 단계 후에, 세포가 수거될 수 있다. 일부 실시양태에서 TIL은 1, 2, 3, 4개 또는 그 초과의 제2 확장 단계 후에 수거된다.

[0339] TIL은, 예를 들어 원심분리에 의한 것을 포함한, 임의의 적절한 멸균 방식으로 수거될 수 있다. TIL 수거 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고, 임의의 이러한 공지된 방법이 본 발명의 방법에 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL은 자동화 시스템을 사용하여 수거된다. 일부 실시양태에서, TIL은 반-자동화 시스템을 사용하여 수거된다. 일부 실시양태에서, TIL은 반-자동화 시스템을 사용하여 수거된다. 일부 실시양태에서, 제2 확장으로부터의 TIL은 반-자동화 기계를 사용하여 수거된다. 일부 실시양태에서, LOVO 시스템이 사용된다 (예를 들어, 벤치마크 일렉트로닉스(Benchmark Electronics)로부터 상업적으로 입수가능함). 일부 실시양태에

서, 수거 단계는 TIL을 세척하는 것, TIL을 제제화하는 것 및/또는 TIL을 분취하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 수거 후 또는 수거의 일부로 임의로 동결된다.

[0340] F. 단계 F: 최종 제제화/ 주입 백으로의 전달

[0341] 단계 A에서 E가 완료된 후, 세포는 환자에 대한 투여에 사용하기 위해 용기로 옮겨진다.

[0342] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 APC를 사용하여 확장된 TIL은 제약 조성물로서 환자에게 투여된다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 멸균 완충제 중 TIL의 현탁액이다. 본 개시내용의 PBMC를 사용하여 확장된 TIL은 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, T-세포는 단일 동맥내 또는 정맥내 주입으로서 투여되며, 이는 바람직하게는 대략 30 내지 60분 지속된다. 다른 적합한 투여 경로는 복강내, 척수강내 및 림프내를 포함한다.

[0343] G. 추가의 확장 단계

[0344] 인지되는 바와 같이, 상기 기재된 단계 A 내지 F 중 임의의 단계는 임의의 횟수로 반복될 수 있고, 추가로 상기에 기재된 것과 상이한 순서로 수행될 수 있다.

[0345] 일부 실시양태에서, 확장 단계 중 1개 이상은 최종 제제화 단계 F 전에 반복될 수 있다. 이러한 추가의 확장 단계는 상기 기재된 제1 및/또는 제2 확장 단계의 요소를 포함할 수 있다 (예를 들어, 기재된 성분을 세포 배양 배지에 포함함). 추가의 확장 단계는 추가의 확장 단계 전 및/또는 그 동안 세포 배양 배지 내로 보충된 세포 배양 배지 내의 추가의 성분을 포함한 추가의 요소를 추가로 포함할 수 있다.

[0346] 추가 실시양태에서, 도 23 및 상기 단락에 기재된 확장 단계 중 임의의 단계에 선행하여 또는 후속하여, 확장 단계 동안 생산된 세포가 제조/확장 방법의 나머지 단계에 필요할 때까지 저장되도록 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 보존되는 동결보존 단계가 존재할 수 있다.

[0347] TIL, MIL 및 PBL에 대한 제약 조성물, 투여량 및 투여 요법

[0348] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 방법을 사용하여 확장된 TIL은 제약 조성물로서 환자에게 투여된다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 멸균 완충제 중 TIL의 현탁액이다. 본 개시내용의 방법을 사용하여 확장된 TIL은 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 바람직하게는, TIL은 단일 동맥내 또는 정맥내 주입으로서 투여되며, 이는 바람직하게는 대략 30 내지 60분 지속된다. 다른 적합한 투여 경로는 복강내, 척수강내 및 림프내 투여를 포함한다.

[0349] TIL의 임의의 적합한 용량이 투여될 수 있다. 바람직하게는, 특히 암이 혈액 악성종양인 경우, 약 $2.3x10^{10}$ 내지 약 $13.7x10^{10}$개의 TIL, 평균 약 $7.8x10^{10}$개의 TIL이 투여된다. 한 실시양태에서, 약 $1.2x10^{10}$ 내지 약 $4.3x10^{10}$개의 TIL이 투여된다.

[0350] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 TIL의 수는 약 $1x10^{6}$, $2x10^{6}$, $3x10^{6}$, $4x10^{6}$, $5x10^{6}$, $6x10^{6}$, $7x10^{6}$, $8x10^{6}$, $9x10^{6}$, $1x10^{7}$, $2x10^{7}$, $3x10^{7}$, $4x10^{7}$, $5x10^{7}$, $6x10^{7}$, $7x10^{7}$, $8x10^{7}$, $9x10^{7}$, $1x10^{8}$, $2x10^{8}$, $3x10^{8}$, $4x10^{8}$, $5x10^{8}$, $6x10^{8}$, $7x10^{8}$, $8x10^{8}$, $9x10^{8}$, $1x10^{9}$, $2x10^{9}$, $3x10^{9}$, $4x10^{9}$, $5x10^{9}$, $6x10^{9}$, $7x10^{9}$, $8x10^{9}$, $9x10^{9}$, $1x10^{10}$, $2x10^{10}$, $3x10^{10}$, $4x10^{10}$, $5x10^{10}$, $6x10^{10}$, $7x10^{10}$, $8x10^{10}$, $9x10^{10}$, $1x10^{11}$, $2x10^{11}$, $3x10^{11}$, $4x10^{11}$, $5x10^{11}$, $6x10^{11}$, $7x10^{11}$, $8x10^{11}$, $9x10^{11}$, $1x10^{12}$, $2x10^{12}$, $3x10^{12}$, $4x10^{12}$, $5x10^{12}$, $6x10^{12}$, $7x10^{12}$, $8x10^{12}$, $9x10^{12}$, $1x10^{13}$, $2x10^{13}$, $3x10^{13}$, $4x10^{13}$, $5x10^{13}$, $6x10^{13}$, $7x10^{13}$, $8x10^{13}$, 및 $9x10^{13}$개이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 TIL의 수는 $1x10^{6}$ 내지 $5x10^{6}$, $5x10^{6}$ 내지 $1x10^{7}$, $1x10^{7}$ 내지 $5x10^{7}$, $5x10^{7}$ 내지 $1x10^{8}$, $1x10^{8}$ 내지 $5x10^{8}$, $5x10^{8}$ 내지 $1x10^{9}$, $1x10^{9}$ 내지 $5x10^{9}$, $5x10^{9}$ 내지 $1x10^{10}$, $1x10^{10}$ 내지 $5x10^{10}$, $5x10^{10}$ 내지 $1x10^{11}$, $5x10^{11}$ 내지 $1x10^{12}$, $1x10^{12}$ 내지 $5x10^{12}$, 및 $5x10^{12}$ 내지 $1x10^{13}$개의 범위이다. 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 TIL의 수는 약 $4x10^{8}$ 내지 약 $2.5x10^{9}$개의 범위이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 TIL의 수는 $9.5x10^{8}$개이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 TIL의 수는 $4.1x10^{8}$개이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 TIL의 수는 $2.2x10^{9}$

개이다.

[0351] 본 발명의 한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 TIL의 수는 약 $0.1x10^9$ 내지 약 $15x10^9$개 TIL, 약 $0.1x10^9$ 내지 약 $15x10^9$개 TIL, 약 $0.12x10^9$ 내지 약 $12x10^9$개 TIL, 약 $0.15x10^9$ 내지 약 $11x10^9$개 TIL, 약 $0.2x10^9$ 내지 약 $10x10^9$개 TIL, 약 $0.3x10^9$ 내지 약 $9x10^9$개 TIL, 약 $0.4x10^9$ 내지 약 $8x10^9$개 TIL, 약 $0.5x10^9$ 내지 약 $7x10^9$개 TIL, 약 $0.6x10^9$ 내지 약 $6x10^9$개 TIL, 약 $0.7x10^9$ 내지 약 $5x10^9$개 TIL, 약 $0.8x10^9$ 내지 약 $4x10^9$개 TIL, 약 $0.9x10^9$ 내지 약 $3x10^9$개 TIL, 또는 약 $1x10^9$ 내지 약 $2x10^9$개 TIL의 범위이다.

[0352] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 TIL의 농도는, 예를 들어 제약 조성물의 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002% 또는 0.0001% w/w, w/v 또는 v/v 미만이다.

[0353] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 TIL의 농도는 제약 조성물의 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19.75%, 19.50%, 19.25% 19%, 18.75%, 18.50%, 18.25% 18%, 17.75%, 17.50%, 17.25% 17%, 16.75%, 16.50%, 16.25% 16%, 15.75%, 15.50%, 15.25% 15%, 14.75%, 14.50%, 14.25% 14%, 13.75%, 13.50%, 13.25% 13%, 12.75%, 12.50%, 12.25% 12%, 11.75%, 11.50%, 11.25% 11%, 10.75%, 10.50%, 10.25% 10%, 9.75%, 9.50%, 9.25% 9%, 8.75%, 8.50%, 8.25% 8%, 7.75%, 7.50%, 7.25% 7%, 6.75%, 6.50%, 6.25% 6%, 5.75%, 5.50%, 5.25% 5%, 4.75%, 4.50%, 4.25%, 4%, 3.75%, 3.50%, 3.25%, 3%, 2.75%, 2.50%, 2.25%, 2%, 1.75%, 1.50%, 125%, 1%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002% 또는 0.0001% w/w, w/v 또는 v/v 초과이다.

[0354] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 TIL의 농도는 제약 조성물의 약 0.0001% 내지 약 50%, 약 0.001% 내지 약 40%, 약 0.01% 내지 약 30%, 약 0.02% 내지 약 29%, 약 0.03% 내지 약 28%, 약 0.04% 내지 약 27%, 약 0.05% 내지 약 26%, 약 0.06% 내지 약 25%, 약 0.07% 내지 약 24%, 약 0.08% 내지 약 23%, 약 0.09% 내지 약 22%, 약 0.1% 내지 약 21%, 약 0.2% 내지 약 20%, 약 0.3% 내지 약 19%, 약 0.4% 내지 약 18%, 약 0.5% 내지 약 17%, 약 0.6% 내지 약 16%, 약 0.7% 내지 약 15%, 약 0.8% 내지 약 14%, 약 0.9% 내지 약 12% 또는 약 1% 내지 약 10% w/w, w/v 또는 v/v의 범위이다.

[0355] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 TIL의 농도는 제약 조성물의 약 0.001% 내지 약 10%, 약 0.01% 내지 약 5%, 약 0.02% 내지 약 4.5%, 약 0.03% 내지 약 4%, 약 0.04% 내지 약 3.5%, 약 0.05% 내지 약 3%, 약 0.06% 내지 약 2.5%, 약 0.07% 내지 약 2%, 약 0.08% 내지 약 1.5%, 약 0.09% 내지 약 1%, 약 0.1% 내지 약 0.9% w/w, w/v 또는 v/v의 범위이다.

[0356] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 TIL의 양은 10 g, 9.5 g, 9.0 g, 8.5 g, 8.0 g, 7.5 g, 7.0 g, 6.5 g, 6.0 g, 5.5 g, 5.0 g, 4.5 g, 4.0 g, 3.5 g, 3.0 g, 2.5 g, 2.0 g, 1.5 g, 1.0 g, 0.95 g, 0.9 g, 0.85 g, 0.8 g, 0.75 g, 0.7 g, 0.65 g, 0.6 g, 0.55 g, 0.5 g, 0.45 g, 0.4 g, 0.35 g, 0.3 g, 0.25 g, 0.2 g, 0.15 g, 0.1 g, 0.09 g, 0.08 g, 0.07 g, 0.06 g, 0.05 g, 0.04 g, 0.03 g, 0.02 g, 0.01 g, 0.009 g, 0.008 g, 0.007 g, 0.006 g, 0.005 g, 0.004 g, 0.003 g, 0.002 g, 0.001 g, 0.0009 g, 0.0008 g, 0.0007 g, 0.0006 g, 0.0005 g, 0.0004 g, 0.0003 g, 0.0002 g, 또는 0.0001 g 이하이다.

[0357] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 TIL의 양은 0.0001 g, 0.0002 g, 0.0003 g, 0.0004 g, 0.0005 g, 0.0006 g, 0.0007 g, 0.0008 g, 0.0009 g, 0.001 g, 0.0015 g, 0.002 g, 0.0025 g, 0.003 g, 0.0035 g, 0.004 g, 0.0045 g, 0.005 g, 0.0055 g, 0.006 g, 0.0065 g, 0.007 g, 0.0075 g, 0.008 g, 0.0085 g, 0.009 g, 0.0095 g, 0.01 g, 0.015 g, 0.02 g, 0.025 g, 0.03 g, 0.035 g, 0.04 g, 0.045 g, 0.05 g, 0.055 g, 0.06 g, 0.065 g, 0.07 g, 0.075 g, 0.08 g, 0.085 g, 0.09 g, 0.095 g, 0.1 g, 0.15 g, 0.2 g, 0.25 g, 0.3 g, 0.35 g, 0.4 g, 0.45 g, 0.5 g, 0.55 g, 0.6 g, 0.65 g, 0.7 g, 0.75 g, 0.8 g, 0.85 g, 0.9 g, 0.95 g, 1 g, 1.5 g, 2 g, 2.5, 3 g, 3.5, 4 g, 4.5 g, 5 g, 5.5 g, 6 g, 6.5 g, 7 g, 7.5 g, 8 g, 8.5 g, 9 g, 9.5 g, 또는 10 g 초과이다.

[0358] 본 발명의 제약 조성물에 제공된 TIL은 폭넓은 투여량 범위에 걸쳐 효과적이다. 정확한 투여량은 투여 경로, 화합물이 투여되는 형태, 치료될 대상체의 성별 및 연령, 치료될 대상체의 체중, 및 담당 의사의 선호도 및 경

험에 좌우될 것이다. 또한 적절한 경우 TIL의 임상적으로-확립된 투여량이 사용될 수 있다. 본원의 방법을 사용하여 투여된 제약 조성물의 양, 예컨대 TIL의 투여량은 치료될 인간 또는 포유동물, 장애 또는 상태의 중증도, 투여의 경로, 활성 제약 성분의 배치 및 처방 의사의 판단에 의존할 것이다.

[0359] 일부 실시양태에서, TIL은 단일 용량으로 투여될 수 있다. 이러한 투여는 주사, 예를 들어 정맥내 주사에 의할 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL은 다중 용량으로 투여될 수 있다. 투여는 1년에 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 또는 6회 초과일 수 있다. 투여는 1개월 1회, 2주마다 1회, 1주 1회, 또는 격일 1회일 수 있다. TIL의 투여는 필요한 만큼 길게 계속될 수 있다.

[0360] 일부 실시양태에서, TIL의 유효 투여량은 약 $1x10^6$, $2x10^6$, $3x10^6$, $4x10^6$, $5x10^6$, $6x10^6$, $7x10^6$, $8x10^6$, $9x10^6$, $1x10^7$, $2x10^7$, $3x10^7$, $4x10^7$, $5x10^7$, $6x10^7$, $7x10^7$, $8x10^7$, $9x10^7$, $1x10^8$, $2x10^8$, $3x10^8$, $4x10^8$, $5x10^8$, $6x10^8$, $7x10^8$, $8x10^8$, $9x10^8$, $1x10^9$, $2x10^9$, $3x10^9$, $4x10^9$, $5x10^9$, $6x10^9$, $7x10^9$, $8x10^9$, $9x10^9$, $1x10^{10}$, $2x10^{10}$, $3x10^{10}$, $4x10^{10}$, $5x10^{10}$, $6x10^{10}$, $7x10^{10}$, $8x10^{10}$, $9x10^{10}$, $1x10^{11}$, $2x10^{11}$, $3x10^{11}$, $4x10^{11}$, $5x10^{11}$, $6x10^{11}$, $7x10^{11}$, $8x10^{11}$, $9x10^{11}$, $1x10^{12}$, $2x10^{12}$, $3x10^{12}$, $4x10^{12}$, $5x10^{12}$, $6x10^{12}$, $7x10^{12}$, $8x10^{12}$, $9x10^{12}$, $1x10^{13}$, $2x10^{13}$, $3x10^{13}$, $4x10^{13}$, $5x10^{13}$, $6x10^{13}$, $7x10^{13}$, $8x10^{13}$, 및 $9x10^{13}$개이다. 일부 실시양태에서, TIL의 유효 투여량은 $1x10^6$ 내지 $5x10^6$, $5x10^6$ 내지 $1x10^7$, $1x10^7$ 내지 $5x10^7$, $5x10^7$ 내지 $1x10^8$, $1x10^8$ 내지 $5x10^8$, $5x10^8$ 내지 $1x10^9$, $1x10^9$ 내지 $5x10^9$, $5x10^9$ 내지 $1x10^{10}$, $1x10^{10}$ 내지 $5x10^{10}$, $5x10^{10}$ 내지 $1x10^{11}$, $5x10^{11}$ 내지 $1x10^{12}$, $1x10^{12}$ 내지 $5x10^{12}$, 및 $5x10^{12}$ 내지 $1x10^{13}$개의 범위이다.

[0361] 본 발명의 한 실시양태에서, 급성 골수성 백혈병 (AML)을 갖는 환자에 유용한 MIL의 임상 용량은 약 $4x10^8$ 내지 약 $2.5x10^9$개 MIL의 범위이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 MIL의 수는 $9.5x10^8$개 MIL이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 MIL의 수는 $4.1x10^8$개이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에 제공된 MIL의 수는 $2.2x10^9$개이다.

[0362] 일부 실시양태에서, TIL의 유효 투여량은 약 0.01 mg/kg 내지 약 4.3 mg/kg, 약 0.15 mg/kg 내지 약 3.6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3.2 mg/kg, 약 0.35 mg/kg 내지 약 2.85 mg/kg, 약 0.15 mg/kg 내지 약 2.85 mg/kg, 약 0.3 mg 내지 약 2.15 mg/kg, 약 0.45 mg/kg 내지 약 1.7 mg/kg, 약 0.15 mg/kg 내지 약 1.3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1.15 mg/kg, 약 0.45 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 0.55 mg/kg 내지 약 0.85 mg/kg, 약 0.65 mg/kg 내지 약 0.8 mg/kg, 약 0.7 mg/kg 내지 약 0.75 mg/kg, 약 0.7 mg/kg 내지 약 2.15 mg/kg, 약 0.85 mg/kg 내지 약 2 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 1.85 mg/kg, 약 1.15 mg/kg 내지 약 1.7 mg/kg, 약 1.3 mg/kg mg 내지 약 1.6 mg/kg, 약 1.35 mg/kg 내지 약 1.5 mg/kg, 약 2.15 mg/kg 내지 약 3.6 mg/kg, 약 2.3 mg/kg 내지 약 3.4 mg/kg, 약 2.4 mg/kg 내지 약 3.3 mg/kg, 약 2.6 mg/kg 내지 약 3.15 mg/kg, 약 2.7 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 2.8 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 또는 약 2.85 mg/kg 내지 약 2.95 mg/kg의 범위이다.

[0363] 일부 실시양태에서, TIL의 유효 투여량은 약 1 mg 내지 약 500 mg, 약 10 mg 내지 약 300 mg, 약 20 mg 내지 약 250 mg, 약 25 mg 내지 약 200 mg, 약 1 mg 내지 약 50 mg, 약 5 mg 내지 약 45 mg, 약 10 mg 내지 약 40 mg, 약 15 mg 내지 약 35 mg, 약 20 mg 내지 약 30 mg, 약 23 mg 내지 약 28 mg, 약 50 mg 내지 약 150 mg, 약 60 mg 내지 약 140 mg, 약 70 mg 내지 약 130 mg, 약 80 mg 내지 약 120 mg, 약 90 mg 내지 약 110 mg, 또는 약 95 mg 내지 약 105 mg, 약 98 mg 내지 약 102 mg, 약 150 mg 내지 약 250 mg, 약 160 mg 내지 약 240 mg, 약 170 mg 내지 약 230 mg, 약 180 mg 내지 약 220 mg, 약 190 mg 내지 약 210 mg, 약 195 mg 내지 약 205 mg, 또는 약 198 내지 약 207 mg의 범위이다.

[0364] TIL의 유효량은 단일 또는 다중 용량으로, 비내 및 경피 경로, 동맥내 주사에 의해, 정맥내로, 복강내로, 비경구로, 근육내로, 피하로, 국소적으로, 종양 내로의 이식 또는 직접 주사에 의해 또는 흡입에 의해를 비롯한, 유사한 유용성을 갖는 작용제의 허용되는 투여 방식 중 임의의 방식에 의해 투여될 수 있다.

[0365] 암을 치료하는 방법

[0366] 상기 기재된 TIL, PBL 및/또는 MIL (및 그의 집단)의 조성물 및 조합물은 과다증식성 장애를 치료하는 방법에 사용될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 이들은 암을 치료하는데 사용하기 위한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 혈액 악성종양, 예컨대 액상 종양인 암을 치료하는 방법을 제공한다. 바람직한 실시양태에서,

본 발명은 급성 골수성 백혈병 (AML), 외투 세포 림프종 (MCL), 여포성 림프종 (FL), 미만성 대 B 세포 림프종 (DLBCL), 활성화된 B 세포 (ABC) DLBCL, 배 중심 B 세포 (GCB) DLBCL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 백혈병 (SLL), 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 재발성 및/또는 불응성 호지킨 림프종, B 세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), 성숙 B-ALL, 버킷 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (WM), 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 골수섬유증, 만성 골수구성 백혈병, 여포 중심세포 림프종, 무통성 NHL, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 연관 B 세포 림프종, 및 엡스타인-바르 바이러스 (EBV) 연관 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 혈액 악성종양인 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0367] 한 실시양태에서, 본 발명은 펨브롤리주맙, 니볼루맙, 두르발루맙, 아벨루맙 또는 아테졸리주맙을 포함한 PD-1 및/또는 PD-L1 억제제를 사용한 요법에 반응하는 혈액 악성종양인 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0368] 한 실시양태에서, 본 발명은

[0369] (a) 절제, 생검, 바늘 흡인 또는 분리반출술에 의해 환자로부터 종양을 수득하는 단계이며, 상기 종양은 제1 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 포함하는 것인 단계;

[0370] (b) 임의로 종양을 단편화 또는 해리시켜 종양 단편을 수득하고 종양 단편을 제1 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계;

[0371] (c) 제1 세포 배양 배지에서 제1 TIL 집단의 초기 확장을 수행하여 제2 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제2 TIL 집단은 제1 TIL 집단보다 수가 적어도 5배 더 많고, 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함하는 것인 단계;

[0372] (d) 제2 세포 배양 배지에서 제2 TIL 집단의 제2 확장을 수행하여 제3 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제3 TIL 집단은 제2 확장의 시작으로부터 7일 후 제2 TIL 집단보다 수가 적어도 50배 더 많고, 제2 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3 (항-CD3 항체) 및 조사된 동종 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함하고, 제2 확장은 14일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계;

[0373] (e) 제3 TIL 집단을 수거하는 단계; 및

[0374] (f) 암을 갖는 환자에게 치료 유효 분량의 제3 TIL 집단을 투여하는 단계

[0375] 를 포함하며, 여기서 종양은 액상 종양이고, 암은 혈액 악성종양인,

[0376] 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 사용하여 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0377] 한 실시양태에서, 본 발명은

[0378] (a) 절제, 생검, 바늘 흡인 또는 분리반출술에 의해 환자로부터 종양을 수득하는 단계이며, 상기 종양은 제1 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 포함하는 것인 단계;

[0379] (b) 임의로 종양을 단편화 또는 해리시켜 종양 단편을 수득하고 종양 단편을 제1 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계;

[0380] (c) 제1 세포 배양 배지에서 제1 TIL 집단의 초기 확장을 수행하여 제2 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제2 TIL 집단은 제1 TIL 집단보다 수가 적어도 5배 더 많고, 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함하는 것인 단계;

[0381] (d) 제2 세포 배양 배지에서 제2 TIL 집단의 제2 확장을 수행하여 제3 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제3 TIL 집단은 제2 확장의 시작으로부터 7일 후 제2 TIL 집단보다 수가 적어도 50배 더 많고, 제2 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3 (항-CD3 항체) 및 조사된 동종 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함하고, 제2 확장은 14일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계;

[0382] (e) 제3 TIL 집단을 수거하는 단계; 및

[0383] (f) 암을 갖는 환자에게 치료 유효 분량의 제3 TIL 집단을 투여하는 단계

[0384] 를 포함하며, 여기서 종양은 액상 종양이고, 암은 급성 골수성 백혈병 (AML), 외투 세포 림프종 (MCL), 여포성 림프종 (FL), 미만성 대 B 세포 림프종 (DLBCL), 활성화된 B 세포 (ABC) DLBCL, 배 중심 B 세포 (GCB) DLBCL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 백혈병 (SLL), 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 재발성 및/또는 불응성 호지킨 림프종, B 세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), 성숙 B-ALL, 버킷 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (WM), 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 골수섬유증, 만성 골수구성 백혈병, 여포 중심세포 림프종, 무통성 NHL, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 연관 B 세포 림프종, 및 엡스타인-바르 바이러스 (EBV)

연관 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 혈액 악성종양인,

[0385] 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 사용하여 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0386] 한 실시양태에서, 본 발명은

[0387] (a) 키나제 억제제 또는 ITK 억제제를 포함하는 요법으로 환자를 사전-치료하는 단계;

[0388] (b) 절제, 생검, 바늘 흡인 또는 분리반출술에 의해 환자로부터 종양을 수득하는 단계이며, 상기 종양은 제1 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 포함하는 것인 단계;

[0389] (c) 임의로 종양을 단편화 또는 해리시켜 종양 단편을 수득하고 종양 단편을 제1 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계;

[0390] (d) 제1 세포 배양 배지에서 제1 TIL 집단의 초기 확장을 수행하여 제2 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제2 TIL 집단은 제1 TIL 집단보다 수가 적어도 5배 더 많고, 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함하는 것인 단계;

[0391] (e) 제2 세포 배양 배지에서 제2 TIL 집단의 제2 확장을 수행하여 제3 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제3 TIL 집단은 제2 확장의 시작으로부터 7일 후 제2 TIL 집단보다 수가 적어도 50배 더 많고, 제2 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3 (항-CD3 항체) 및 조사된 동종 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함하고, 제2 확장은 14일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계;

[0392] (f) 제3 TIL 집단을 수거하는 단계; 및

[0393] (g) 암을 갖는 환자에게 치료 유효 분량의 제3 TIL 집단을 투여하는 단계

[0394] 를 포함하며, 여기서 종양은 액상 종양이고, 암은 혈액 악성종양인,

[0395] 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 사용하여 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0396] 한 실시양태에서, 본 발명은

[0397] (a) 키나제 억제제 또는 ITK 억제제를 포함하는 요법으로 환자를 사전-치료하는 단계;

[0398] (b) 절제, 생검, 바늘 흡인 또는 분리반출술에 의해 환자로부터 종양을 수득하는 단계이며, 상기 종양은 제1 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 포함하는 것인 단계;

[0399] (c) 임의로 종양을 단편화 또는 해리시켜 종양 단편을 수득하고 종양 단편을 제1 세포 배양 배지와 접촉시키는 단계;

[0400] (d) 제1 세포 배양 배지에서 제1 TIL 집단의 초기 확장을 수행하여 제2 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제2 TIL 집단은 제1 TIL 집단보다 수가 적어도 5배 더 많고, 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함하는 것인 단계;

[0401] (e) 제2 세포 배양 배지에서 제2 TIL 집단의 제2 확장을 수행하여 제3 TIL 집단을 수득하는 단계이며, 여기서 제3 TIL 집단은 제2 확장의 시작으로부터 7일 후 제2 TIL 집단보다 수가 적어도 50배 더 많고, 제2 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3 (항-CD3 항체) 및 조사된 동종 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함하고, 제2 확장은 14일 이하의 기간에 걸쳐 수행되는 것인 단계;

[0402] (f) 제3 TIL 집단을 수거하는 단계; 및

[0403] (g) 암을 갖는 환자에게 치료 유효 분량의 제3 TIL 집단을 투여하는 단계

[0404] 를 포함하며, 여기서 종양은 액상 종양이고, 암은 급성 골수성 백혈병 (AML), 외투 세포 림프종 (MCL), 여포성 림프종 (FL), 미만성 대 B 세포 림프종 (DLBCL), 활성화된 B 세포 (ABC) DLBCL, 배 중심 B 세포 (GCB) DLBCL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 백혈병 (SLL), 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 재발성 및/또는 불응성 호지킨 림프종, B 세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), 성숙 B-ALL, 버킷 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (WM), 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 골수섬유증, 만성 골수구성 백혈병, 여포 중심세포 림프종, 무통성 NHL, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 연관 B 세포 림프종, 및 엡스타인-바르 바이러스 (EBV) 연관 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 혈액 악성종양인,

[0405] 종양 침윤 림프구 (TIL) 집단을 사용하여 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0406] 본 발명의 한 실시양태에서, TIL은 MIL 방법 1을 사용하여 확장되고 본 발명에 따라 환자에게 투여된다.

[0407] 본 발명의 한 실시양태에서, TIL은 MIL 방법 2를 사용하여 확장되고 암을 치료하기 위해 본 발명에 따라 환자에게 투여된다.

[0408] 본 발명의 한 실시양태에서, TIL은 MIL 방법 3을 사용하여 확장되고 암을 치료하기 위해 본 발명에 따라 환자에게 투여된다.

[0409] 본 발명의 한 실시양태에서, MIL 방법 1, MIL 방법 2 또는 MIL 방법 3을 사용하여 확장된 TIL은 AML을 치료하기 위해 본 발명에 따라 환자에게 투여된다.

[0410] 본 발명의 한 실시양태에서, TIL은 PBL 방법 2를 사용하여 확장되고 암을 치료하기 위해 본 발명에 따라 환자에게 투여된다.

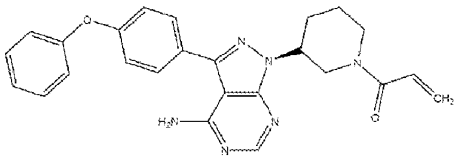
[0411] 본 발명의 한 실시양태에서, TIL은 PBL 방법 2를 사용하여 확장되고 암을 치료하기 위해 본 발명에 따라 환자에게 투여된다.

[0412] 본 발명의 한 실시양태에서, TIL은 PBL 방법 2를 사용하여 확장되고 암을 치료하기 위해 본 발명에 따라 환자에게 투여된다.

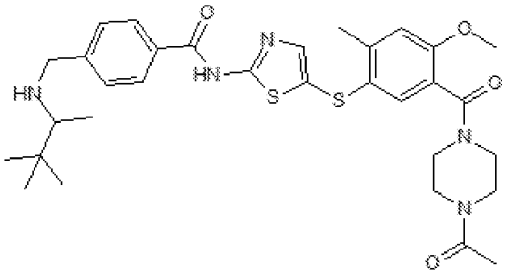
[0413] 본 발명의 한 실시양태에서, PBL 방법 1, PBL 방법 2 또는 PBL 방법 3을 사용하여 확장된 TIL은 CLL을 치료하기 위해 본 발명에 따라 환자에게 투여된다.

[0414] 본 발명의 임의의 상기 실시양태에서, 키나제 억제제를 사용한 사전-치료가 기재되어 있다. 한 실시양태에서, 키나제 억제제는 이마티닙, 다사티닙, 이브루티닙, 보수티닙, 닐로티닙, 에를로티닙, 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 키나제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 또는 세린/트레오닌 키나제 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 키나제 억제제를 사용한 사전-치료 요법은 관련 기술분야에 공지된 바와 같고/거나 의사에 의해 처방된 바와 같다.

[0415] 본 발명의 임의의 상기 실시양태에서, IL-2-유도성 T-세포 키나제 (ITK) 억제제를 사용한 사전-치료가 기재되어 있다. 인터류킨-2-유도성 T 세포 키나제 (ITK)는 T-세포에서 발현되는 비-수용체 티로신 키나제이고, 다양한 경로를 조절한다. 관련 기술분야에 공지된 임의의 ITK 억제제가 본 발명의 실시양태에서 사용될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Lo, et al., Expert Opinion on Therapeutic Patents, 20:459-469 (2010); Vargas, et al., Scandinavian Journal of Immunology, 78(2):130-139 (2013)]; WO2015112847; WO2016118951; WO2007136790, US20120058984A1, 및 미국 특허 번호 9,531,689 및 9,695,200을 참조하며; 이들 모두는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다). 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 ITK에 공유적으로 및 비가역적으로 결합하는 공유 ITK 억제제이다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 ITK에 결합하는 알로스테릭 ITK 억제제이다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 아미노티아졸-기재 ITK 억제제, 5-아미노메틸벤즈이미다졸-기재 ITK 억제제, 3-아미노피리드-2-온-기재 ITK 억제제, (4 또는 5-아릴)피라졸릴-인돌-기재 ITK 억제제, 벤즈이미다졸-기재 ITK 억제제, 아미노벤즈이미다졸-기재 ITK 억제제, 아미노피리미딘-기재 ITK 억제제, 아미노피리딘-기재 ITK 억제제, 디아졸로디아진-기재 ITK 억제제, 트리아졸-기재 ITK 억제제, 3-아미노피리드-2-온-기재 ITK 억제제, 인돌릴인다졸-기재 ITK 억제제, 인돌-기재 ITK 억제제, 아자-인돌-기재 ITK 억제제, 피라졸릴-인돌-기재 억제제, 티에노피라졸-기재 ITK 억제제, 헤테로시클릭 ITK 억제제, 및 ATP 포켓 내의 시스테인-442를 표적화하는 ITK 억제제 (예컨대 이브루티닙), 아자-벤즈이미다졸-기재 ITK 억제제, 벤조티아졸-기재 ITK 억제제, 인돌-기재 ITK 억제제, 피리돈-기재 ITK 억제제, 술폭시민-치환된 피리미딘 ITK 억제제, 아릴피리디논-기재 ITK 억제제, 및 관련 기술분야에 공지된 임의의 다른 ITK 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제를 사용한 사전-치료 요법은 관련 기술분야에 공지된 바와 같고/거나 의사에 의해 처방된 바와 같다. 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 하기로 이루어진 군으로부터 선택된다:

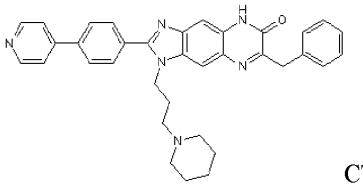


이브루티닙,

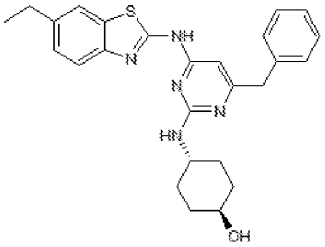


BMS509744,

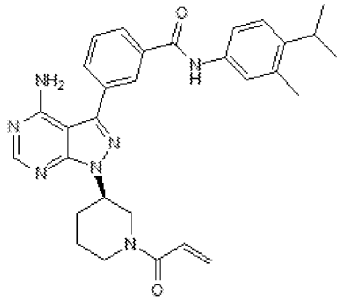
[0416]



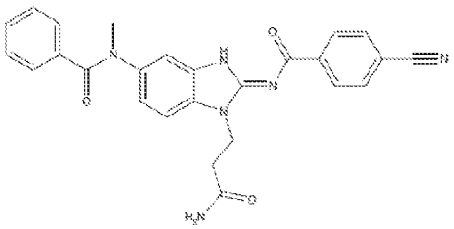
CTA056,

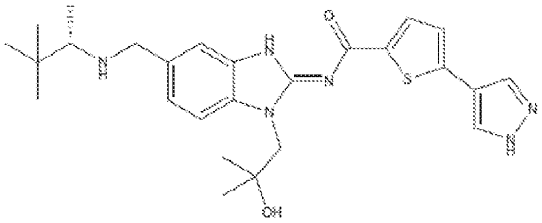


GSK2250665A,

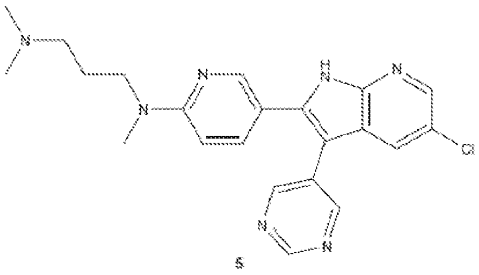


PF06465469,

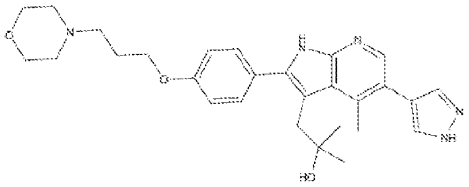


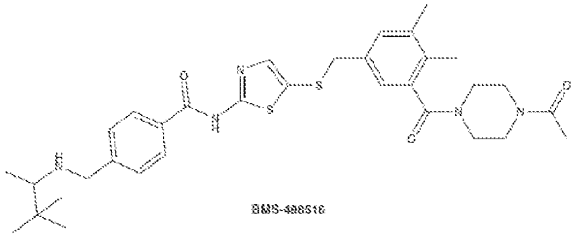


[0417]

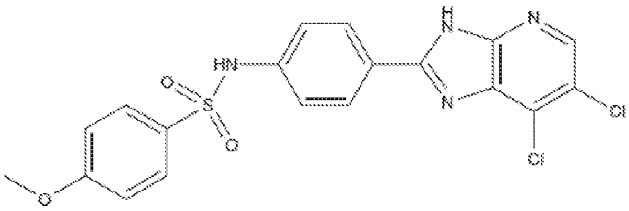


5

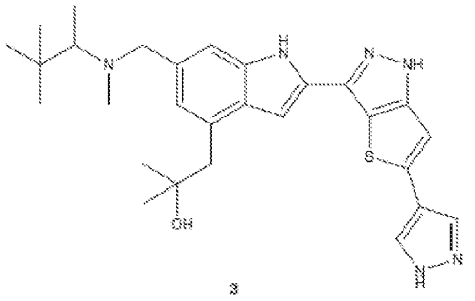


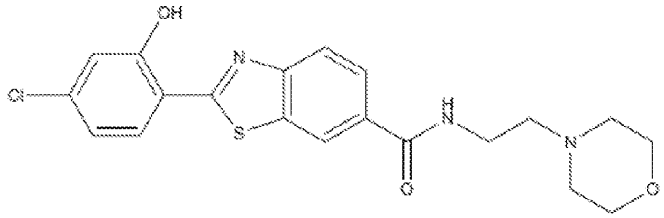


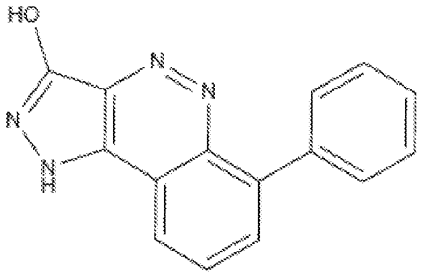
BMS-488516



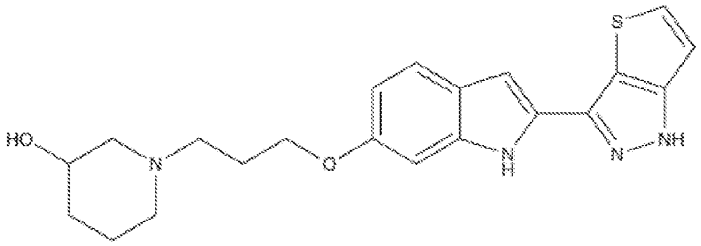
[0418]

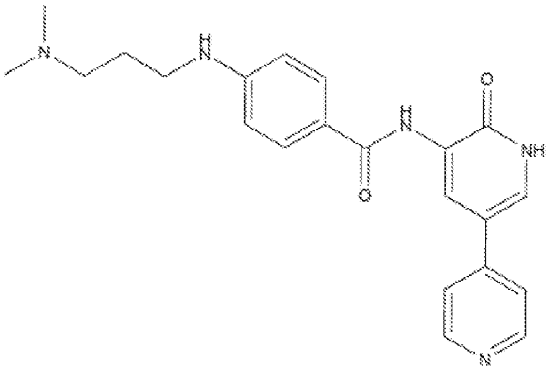


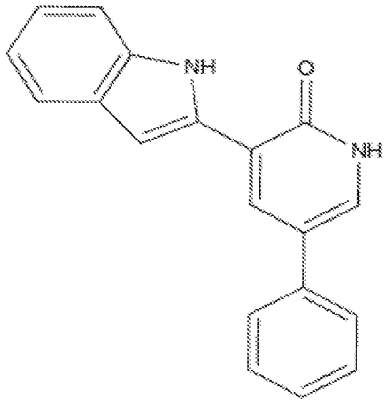




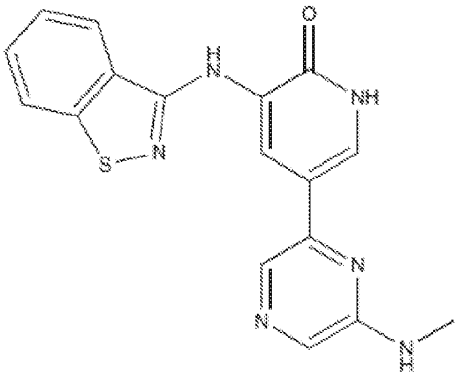
[0419]

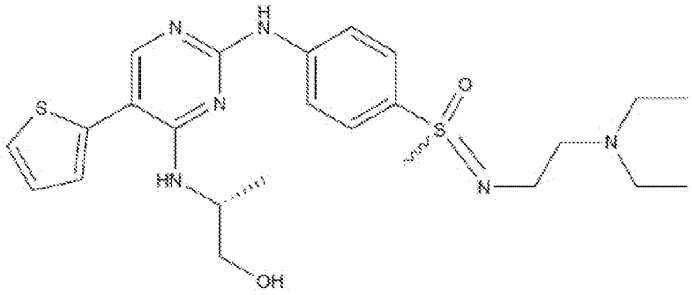


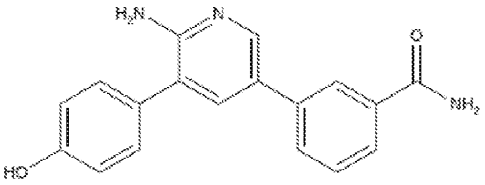




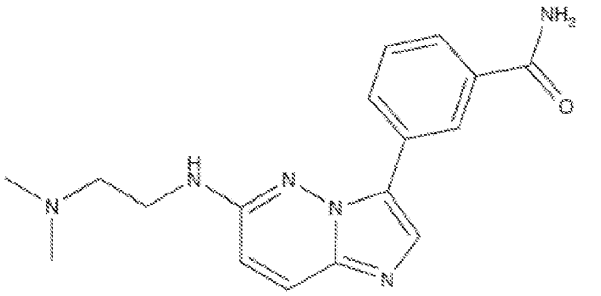
[0420]

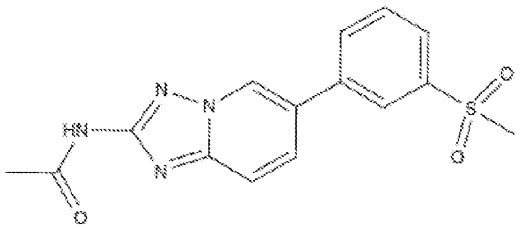


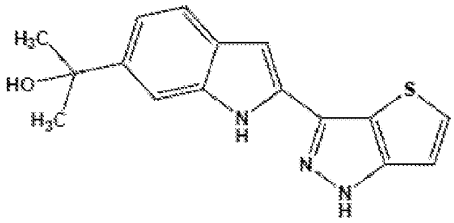




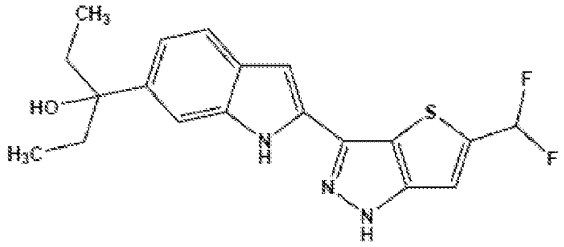
[0421]

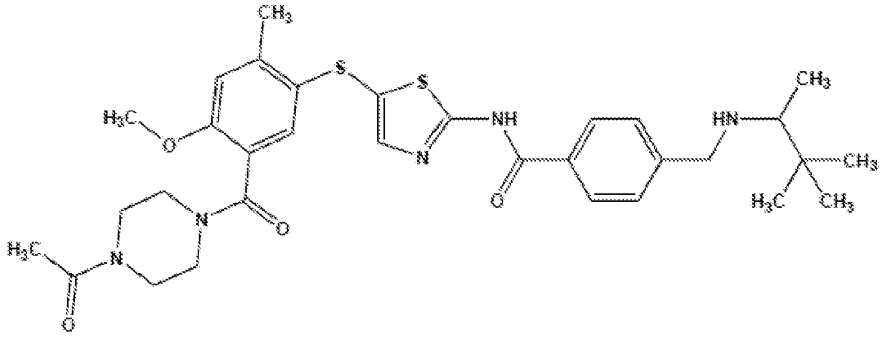


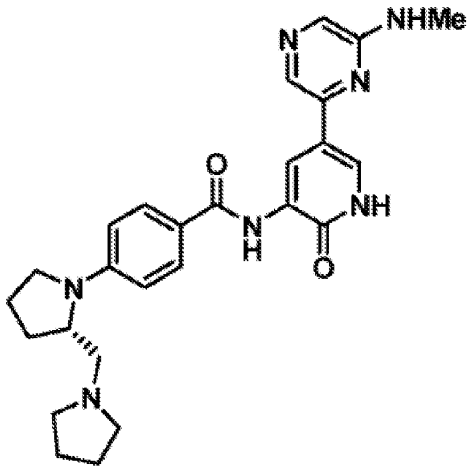




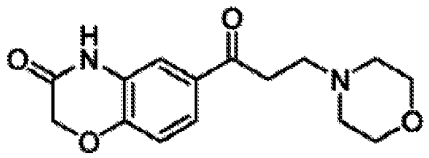
[0422]

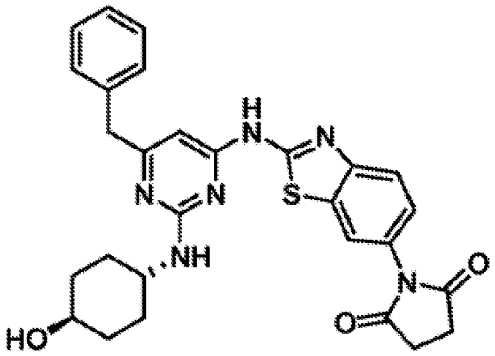






[0423]





[0424]

[0425] 및 이들의 조합.

[0426] 본 발명의 한 실시양태에서, ITK 억제제는 이마티닙, 다사티닙 (BMS-354825), 스프리셀 [N-(2-클로로-6-메틸페닐)-2-(6-(4-(2-히드록시에틸)-피페라진-1-일)-2-메트-일피리미딘-4-일아미노)티아졸-5-카르복스아미드), 이브루티닙 ((1-{(3R)-3-[4-아미노-3-(4-페녹시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]피페리딘-1-일}프로프-2-엔-1-온), 보수티닙, 닐로티닙, 에를로티닙, 1H-피라졸로[4,3-c]신놀린-3-올, CTA056 (7-벤질-1-(3-(피페리딘-1-일)프로필)-2-(4-(피리딘-4-일)페닐)-1H-이미다조[4,5-g]퀴녹살린-6(5H)-온), 화합물 10 (베링거 잉겔하임(Boehringer Ingelheim), 문헌 [Moriarty, et al., Bioorg Med Chem Lett, 18:5537-40 (2008)]), 화합물 19 (베링거 잉겔하임, 문헌 [Moriarty, et al., Bioorg Med Chem Lett., 18:5537-40 (2008)]), 화합물 27 (베링거 잉겔하임, 문헌 [Moriarty, et al., Bioorg Med Chem Lett., 18:5537-40 (2008)]), 화합물 26 (베링거 잉겔하임, 문헌 [Winters, et al., Bioorg Med Chem Lett., 18:5541-4 (2008)]), 화합물 37 (베링거 잉겔하임, 문헌 [Cook, et al., Bioorg Med Chem Lett., 19:773-7 (2009)]), 화합물 41 (베링거 잉겔하임, 문헌 [Cook, et al., Bioorg Med Chem Lett., 19:773-7 (2009)]), 화합물 48 (베링거 잉겔하임, 문헌 [Cook, et al., Bioorg Med Chem Lett., 19:773-7 (2009)]), 화합물 51 (베링거 잉겔하임, 문헌 [Cook, et al., Bioorg Med Chem Lett., 19:773-7 (2009)]), 화합물 10n (베링거 잉겔하임, 문헌 [Riethe, et al., . Bioorg Med Chem Lett., 19:1588-91 (2009)]), 화합물 10o (베링거 잉겔하임, 문헌 [Riethe, et al., Bioorg Med Chem Lett., 19:1588-91 (2009)]), 화합물 7v (버텍스(Vertex), 문헌 [Charrier, et al., J Med Chem., 54:2341-50 (2011)]), 화합물 7w (버텍스, 문헌 [Charrier, et al., J Med Chem., 54:2341-50 (2011)]), 화합물 7x (버텍스, 문헌 [Charrier, et al., J Med Chem., 54:2341-50 (2011)]), 화합물 7y (버텍스, 문헌 [Charrier, et al., J Med Chem., 54:2341-50 (2011)]), 화합물 44 (바이엘 쉐링 파마(Bayer Schering Pharma), 문헌 [vonBonin, et al., Exp Dermatol., 20:41-7 (2011)]), 화합물 13 (니코메드(Nycomed), 문헌 [Velankar, et al., Bioorg Med Chem., 18:4547-59 (2010)]), 화합물 24 (니코메드, 문헌 [Velankar, et al., Bioorg Med Chem., 18:4547-59 (2010)]), 화합물 34 (니코메드, 문헌 [Velankar, et al., Bioorg Med Chem., 18:4547-59 (2010)]), 화합물 10o (니코메드, 문헌 [Herdemann, et al., Bioorg Med Chem Lett., 21:1852-6 (2011)]), 화합물 3 (사노피 유에스(Sanofi US), 문헌 [McLean, et al., Bioorg Med Chem Lett., 22:3296-300 (2012)]), 화합물 7 (사노피 유에스, 문헌 [McLean, et al., Bioorg Med Chem Lett., 22:3296-300 (2012)]), 및/또는 관련 기술분야에 공지된 다른 키나제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 또는 세린/트레오닌 키나제 억제제, 뿐만 아니라 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0427] 임의의 상기 실시양태에서, 이브루티닙 (임브루비카(IMBRUVICA)로서 상업적으로 입수가능하고, 화학명 1-[(3R)-3-[4-아미노-3-(4-페녹시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]-1-피페리디닐]-2-프로펜-1-온을 갖는 것)을 포함하는 사전-치료 요법은 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월 또는 6개월의 지속기간 동안 1개의 140 mg 캡슐을 q.d. 경구로 투여하는 것,

2개의 140 mg 캡슐을 q.d. 경구로 투여하는 것, 3개의 140 mg 캡슐을 q.d. 경구로 투여하는 것, 또는 4개의 140 mg 캡슐을 q.d. 경구로 투여하는 것을 포함할 수 있다. 상기 실시양태에서, 이브루티닙을 포함하는 사전-치료 요법은 또한 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg, 150 mg, 175 mg, 200 mg, 225 mg, 250 mg, 275 mg, 300 mg, 325 mg, 350 mg, 375 mg, 400 mg, 425 mg, 450 mg 및 500 mg으로 이루어진 군으로부터 선택된 이브루티닙 용량을 경구로 투여하는 것을 포함할 수 있으며, 여기서 투여는 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회 또는 1일 4회 이루어지고, 투여 지속기간은 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월 및 6개월로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0428] 임의의 상기 실시양태에서, 치료될 암은 급성 골수성 백혈병 (AML), 외투 세포 림프종 (MCL), 여포성 림프종 (FL), 미만성 대 B 세포 림프종 (DLBCL), 활성화된 B 세포 (ABC) DLBCL, 배 중심 B 세포 (GCB) DLBCL, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 소형 림프구성 백혈병 (SLL), 비-호지킨 림프종 (NHL), 호지킨 림프종, 재발성 및/또는 불응성 호지킨 림프종, B 세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), 성숙 B-ALL, 버킷 림프종, 발덴스트롬 마크로글로불린혈증 (WM), 다발성 골수종, 골수이형성 증후군, 골수섬유증, 만성 골수구성 백혈병, 여포 중심세포 림프종, 무통성 NHL, 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 연관 B 세포 림프종, 및 엡스타인-바르 바이러스 (EBV) 연관 B 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된 혈액 악성종양이다.

[0429] 나타낸 질환 또는 장애를 치료, 예방 및/또는 관리하는데 있어서 본원에 기재된 방법 및 조성물의 효능은 관련 기술분야에 공지된 다양한 동물 모델을 사용하여 시험될 수 있다.

[0430] 화학요법에 의한 비-골수절제 림프구고갈

[0431] 한 실시양태에서, 본 발명은 환자가 본 개시내용에 따른 TIL의 주입 전 비-골수절제 화학요법으로 사전-치료되는 것인, TIL의 집단으로 암을 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 비-골수절제 화학요법은 1종 이상의 화학요법제이다. 한 실시양태에서, 비-골수절제 화학요법은 2일 동안 (TIL 주입 전 제27일 및 제26일) 시클로포스파미드 60 mg/kg/일 및 5일 동안 (TIL 주입 전 제27일 내지 제23일) 플루다라빈 25 mg/m^2/일이다. 한 실시양태에서, 비-골수절제 화학요법 및 본 개시내용에 따른 TIL 주입 (제0일에) 후에, 환자는 생리적 내성까지 8시간마다 720,000 IU/kg으로 정맥내로 IL-2의 정맥내 주입을 받는다.

[0432] 실험적 소견은 종양-특이적 T 림프구의 입양 전달 전 림프구고갈이 조절 T 세포 및 면역계의 경쟁 요소의 제거 ("시토카인 싱크")에 의해 치료 효능을 증진시키는데 주요 역할을 하는 것으로 나타낸다. 따라서, 본 발명의 일부 실시양태는 본 발명의 TIL의 도입 전에 환자에 대한 림프구고갈 단계 (때때로 "면역억제 컨디셔닝"으로도 또한 지칭됨)를 이용한다.

[0433] 일반적으로, 림프구고갈은 플루다라빈 또는 시클로포스파미드 (활성 형태는 마포스파미드로 지칭됨) 및 그의 조합의 투여를 사용하여 달성된다. 이러한 방법은 문헌 [Gassner, et al., Cancer Immunol. Immunother. 2011, 60, 75-85, Muranski, et al., Nat. Clin. Pract. Oncol., 2006, 3, 668-681, Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-5239, 및 Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-2357] (이들 모두는 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0434] 일부 실시양태에서, 플루다라빈은 0.5 μg/mL -10 μg/mL 플루다라빈의 농도로 투여된다. 일부 실시양태에서, 플루다라빈은 1 μg/mL 플루다라빈의 농도로 투여된다. 일부 실시양태에서, 플루다라빈 치료는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일 또는 그 초과 동안 투여된다. 일부 실시양태에서, 플루다라빈은 10 mg/kg/일, 15 mg/kg/일, 20 mg/kg/일 , 25 mg/kg/일, 30 mg/kg/일, 35 mg/kg/일, 40 mg/kg/일, 또는 45 mg/kg/일의 투여량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 플루다라빈 치료는 35 mg/kg/일로 2-7일 동안 투여된다. 일부 실시양태에서, 플루다라빈 치료는 35 mg/kg/일로 4-5일 동안 투여된다. 일부 실시양태에서, 플루다라빈 치료는 25 mg/kg/일로 4-5일 동안 투여된다.

[0435] 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드의 활성 형태인 마포스파미드는 시클로포스파미드의 투여에 의해 0.5 μg/mL -10 μg/mL의 농도로 수득된다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드의 활성 형태인 마포스파미드는 시클로포스파미드의 투여에 의해 1 μg/mL의 농도로 수득된다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드 치료는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일 또는 7일 또는 그 초과 동안 투여된다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드는 100 mg/m^2/일, 150 mg/m^2/일, 175 mg/m^2/일 , 200 mg/m^2/일, 225 mg/m^2/일, 250 mg/m^2/일, 275 mg/m^2/일, 또는 300 mg/m^2/일의 투여량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드는 정맥내로 (즉, i.v.) 투여된다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드 치료는 35 mg/kg/일로 2-7일 동안 투여된다. 일부 실시양태에서, 시클로

포스파미드 치료는 250 mg/m^2/일 i.v.로 4-5일 동안 투여된다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드 치료는 250 mg/m^2/일 i.v.로 4일 동안 투여된다.

[0436] 일부 실시양태에서, 림프구고갈은 환자에게 플루다라빈 및 시클로포스파미드를 함께 투여함으로써 수행된다. 일부 실시양태에서, 4일에 걸쳐 플루다라빈은 25 mg/m^2/일 i.v.로 투여되고 시클로포스파미드는 250 mg/m^2/일 i.v.로 투여된다.

[0437] 한 실시양태에서, 림프구고갈은 2일 동안 60 mg/m^2/일의 용량으로의 시클로포스파미드의 투여에 이어서 5일 동안 25 mg/m^2/일의 용량으로의 플루다라빈의 투여에 의해 수행된다. 골수 또는 말초 혈액으로부터 수득된 TIL을 확장시키는 여러 방법이 본원에 기재되어 있다. 본 발명의 한 실시양태에서, 림프구고갈은 2일 동안 60 mg/m^2/일의 용량의 시클로포스파미드의 투여에 이어서 5일 동안 25 mg/m^2/일의 용량의 플루다라빈의 투여에 의해 수행된다. 골수 또는 말초 혈액으로부터 수득된 TIL을 확장시키는 여러 방법이 본원에 기재되어 있다.

[0438] 실시예

[0439] 본원에 포괄된 실시양태는 하기 실시예를 참조하여 이제 기재된다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로만 제공되고, 본원에 포괄된 개시내용은 결코 이들 실시예에 제한되는 것으로 해석되어서는 안되며, 오히려 본원에 제공된 교시의 결과로서 명백해지는 임의의 및 모든 변형을 포괄하는 것으로 해석되어야 한다.

[0440] 실시예 1 - 비-호지킨 림프종으로부터의 TIL의 확장

[0441] 도 1에 제공된 병리상태를 갖는 5개의 비-호지킨 림프종 종양 (1개의 외투 세포 림프종 종양, 3개의 여포성 림프종 종양 및 1개의 ABC-형 미만성 대 B 세포 림프종 종양)으로부터, 사전-REP 단계에서 11 내지 14일 동안 IL-2를 사용하고, 이어서 후속 REP에서 14일 동안 IL-2, 유사분열촉진 항-CD3 항체 및 조사된 동종 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 피더를 사용하여 TIL을 확장시켰다. TIL은 다른 방법을 사용하여 이전에 관찰된 경우보다 유의하게 더 높은 680배의 최대 확장 지수로, 모든 5개의 림프종 종양으로부터 성공적으로 생성되었다. 문헌 [Schwartzentruber, et al., Blood 1993, 82, 1204-1211]. 추가로, 평균 $CD3^+$ T 세포 집단은 95% (문헌 [Schwartzentruber, et al., Blood 1993, 82, 1204-1211]의 방법을 사용한 경우 75%에 비해)였다.

[0442] 벡톤, 디킨슨 앤드 캄파니(Becton, Dickinson & Co., BD) FACS 칸토 II 시스템을 사용하여 세포 분류 및 유동 세포측정을 수행하였다. 흑색종 TIL에서의 경우와 대등한 이펙터 기억 세포의 현저한 상대 증가가 유동 세포측정 분석에 의해 관찰되었다 (도 2). 흑색종 TIL 배양물과 비교하여 림프종에서 이펙터 기억 $CD45RA^+$ (TEMRA) 세포 ($p=0.0013$; CD4, CD8) 및 CD28+CD4+ ($p=0.008$) 하위세트의 유의한 증가가 관찰되었다 (도 3).

[0443] $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 하위세트에서 T 세포 분화의 표현형 마커의 비교가 각각 도 4 및 도 5에 제시된다. $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 하위세트에서 T 세포 소진의 표현형 마커의 비교가 각각 도 6 및 도 7에 제시된다.

[0444] 도 8은 비-호지킨 림프종 TIL과 흑색종 TIL 사이의 세포 유형의 비교를 예시한다. 흑색종 TIL과 비교하여 림프종 TIL에서 $CD4^+$ T 세포 수의 증가하는 경향이 나타난다.

[0445] 도 9는 생물발광 재지시 용해 검정 (BRLA) 결과를 예시한다. 4시간에 BRLA에 의해 측정된 $LU_{50}/10^6$개로서의 TIL의 최소 세포용해 활성은 흑색종 TIL (11-75 LU_{50}, 4시간)과 비교하여 림프종 TIL에서 <1-6 LU_{50} 내지 24시간에 1-39 LU_{50} 범위였다.

[0446] 도 10은 림프종 TIL 대 흑색종 TIL에 대한 인터페론-γ (IFN-γ) 효소-연결 면역흡착 검정 (ELISA) 결과를 예시한다. 대등한 결과를 나타낸다. 림프종 TIL에 대한 ELIspot 검정 결과가 도 11에 제시되고, 도 12에서 흑색종 TIL에 대한 동일한 검정의 결과와 비교된다. ELIspot 검정에서, 포르볼 12-미리스테이트 13-아세테이트/이오노마이신, 항-CD3 항체, 또는 CD3/CD28/4-1BB 비드에 의한 자극시 림프종 TIL에 의한 광범위한 IFN-γ 생산이 관찰되었고, 이들 조건 하에 일부 림프종 TIL에 의해 생산된 IFN-γ는 흑색종 TIL에 의해 생산된 IFN-γ와 대등하였으며, 여러 경우에 림프종 TIL에서의 IFN-γ 생산이 훨씬 더 높았다.

[0447] 도 13은 나노스트링 엔카운터 분석 (워싱턴주 시애틀 소재 나노스트링 테크놀로지스, 인크.(Nanostring Technologies, Inc.))의 결과를 예시하며, 림프종 TIL이 흑색종 TIL과 비교하여 더 높은 수준의 RORC IL17A

(TH17 표현형) 및 GATA3 (Th2 표현형)을 발현한다는 것을 보여준다. 이러한 발견은 림프종-반응성 T 세포가 주로 TH2 및 TH17이라는 관찰과 일치한다.

[0448] 종합하면, 결과는 TIL 세포 요법이 림프종을 갖는 환자를 치료하는데 사용될 수 있다는 증거를 제공한다.

[0449] 실시예 2 - AML 환자의 골수로부터 성장된 골수 침윤 림프구 (MIL) 및 AML 환자의 말초 혈액으로부터 성장된 말초 혈액 림프구 (PBL)의 표현형 및 기능적 특징화

[0450] 골수 샘플 및 이용가능한 경우 관련 혈액 샘플을, 적어도 3회의 이브루티닙 (1-[(3R)-3-[4-아미노-3-(4-페녹시페닐)-1H-피라졸로[3,4-d]피리미딘-1-일]-1-피페리디닐]-2-프로펜-1-온)을 포함하는 요법으로 사전-치료된 환자를 포함한 급성 골수성 백혈병 (AML) 환자로부터, 환자의 연령, 성별, 병기, 종양 유형, 암 부위, 치료 이력, 식별방지 병리 보고서 및 수행된 임의의 분자 시험 (예를 들어, MSI 발현 및 Raf/Ras 발현)에 관한 정보와 함께 입수하였다. MIL 방법 1, MIL 방법 2 또는 MIL 방법 3, 또는 PBL 방법 1, PBL 방법 2 또는 PBL 방법 3 중 하나를 사용하여 MIL 및 PBL을 확장시키고, MIL 및 PBL을 표현형적으로 및 기능적으로 특징화하였다.

[0451] 도 36A 및 36B는 MIL 및 PBL에 대한 배수 확장을 예시한다. 도 36A는 3명의 환자 (MIL1, MIL2, MIL3)에 대한 배수 확장을 보여주고, 도 36B는 환자 2 및 3에 대해 매칭되는 PBL (PBL2, PBL3)에 대한 배수 확장을 보여준다. MIL1.1은 MIL 방법 1을 사용하여 확장시켰고, MIL1.2는 MIL 방법 2를 사용하여 확장시켰고, MIL1.3은 MIL 방법 3을 사용하여 확장시켰고, PBL은 PBL 방법 3을 사용하여 확장시켰다. MIL1 배수 확장은 MIL1 내의 각각의 샘플에 대해 25배 (MIL1.1), 50배 (MIL1.2) 및 75배 (MIL1.3) 증가를 보여준다. 이것은 MIL 방법 3이 바람직한 확장 방법일 수 있다는 것을 예비적으로 입증한다. MIL2 및 MIL3 배수 확장 데이터는, 아마도 낮은 출발 세포 수로 인해 불량한 것으로 보인다. 비교를 위해, 환자 MIL1의 샘플 3 (MIL1.3)에 대한 출발 세포 수는 138,000개 세포였고, 한편 MIL2 및 MIL3에 대한 출발 세포 수는 각각 62,000 및 28,000개였다. MIL2 및 MIL3에 대해 도 36B에 제시된 PBL 배수 확장은 유사한 출발 세포 수 (PBL2에 대해 338,000개 및 PBL3에 대해 336,000개)에서 각각 약 10배 및 40배였다.

[0452] 도 37A 및 37B는 MIL (도 37A) 및 매칭되는 PBL (도 37B)에 대한 IFN-γ 생산 세포의 수를 예시한다. MIL1.3, MIL2 및 MIL3은 IFN-γ 분비의 유의한 증가를 보여주며, 이는 MIL 방법 3이 바람직한 확장 방법이라는 것을 나타낸다. PBL에 대한 데이터는 결정적이지 않다.

[0453] 도 38A-38F는 MIL 및 PBL에 대한 TCRαβ+, CD4+ 및 CD8+ 하위세트를 보여준다. 도 38A 및 38D는 모든 3가지 방법 (MIL1.1, MIL1.2, MIL1.3)을 사용하여 확장된 MIL (도 38A) 및 PBL 방법 3을 사용하여 확장된 PBL (도 38D)에 대한 TCRab+ 하위세트를 보여준다. 데이터는 TCRαβ+ 하위세트가 모든 MIL 및 PBL에 대해 거의 100%라는 것을 보여주며, 이는 확장 방법이 거의 모든 T-세포를 확장시키는데 성공적이었다는 것을 나타낸다. 도 38B 및 38E는 MIL 방법 3에 의해 확장된 MIL에 대해 CD4 하위세트가 감소된다는 것을 보여준다 (이는 도 38C에서의 CD8 하위세트의 증가와 상관관계가 있음). 도 38E 및 38F에서의 PBL 데이터는 MIL1.3 데이터와 일치하는 것처럼 보인다.

[0454] 도 39A-D 및 40A-D는 MIL (도 39) 및 PBL (도 40)에서의 CD4 하위세트에 대한 데이터를 보여준다. 도 39A 및 40A는 나이브 (CCR7+/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여주고; 도 39B 및 40B는 중심 기억 t-세포 (CM) (CCR7+/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 39C 및 40C는 이펙터 기억 T-세포 (EM) (CCR7-/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 39D 및 40D는 말단 분화된 이펙터 기억 세포 (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여준다. MIL 방법 3 (MIL1.3) 및 PBL 방법 3 (PBL2 및 PBL3)을 사용하여 확장된 모든 샘플은 비교자인 흑색종 TIL에서의 CD4 하위세트와 일치한다.

[0455] 도 41A-D 및 42A-D는 MIL (도 41) 및 PBL (도 42)에서의 CD8 하위세트에 대한 데이터를 보여준다. 도 41A 및 42A는 나이브 (CCR7+/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여주고; 도 41B 및 42B는 중심 기억 t-세포 (CM) (CCR7+/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 41C 및 42C는 이펙터 기억 T-세포 (EM) (CCR7-/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 41D 및 42D는 말단 분화된 이펙터 기억 세포 (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여준다. MIL 방법 3 (MIL1.3)을 사용하여 확장된 샘플은 비교자인 흑색종 TIL에서의 CD4 하위세트와 일치한다. PBL2 및 PBL3에 대한 데이터를 대조군으로서 사용하였다.

[0456] 도 43A 및 43B는 MIL (도 43A) 및 PBL (도 43B)에 대한 CD4CD27 및 CD8CD27 하위세트에 대한 데이터를 보여준다. 도 44A 및 44B는 MIL (도 44A) 및 PBL (도 44B)에 대한 CD4CD28 및 CD8CD28 하위세트에 대한 데이터를 보여준다. PBL에 대한 데이터는 흑색종 TIL과 비교하여 각각의 샘플에 대한 확장 방법의 제0일 및 제14일에 대해 제시된다. MIL에 대한 데이터는 흑색종 TIL과 비교하여 MIL1.3에 대해서만 제0일 및 제14일에서 제시된다.

MIL 및 PBL에서의 CD28 하위세트는 흑색종 TIL과 유사하다.

[0457] 도 45A 및 45B는 MIL (도 45A) 및 PBL (도 45B)에 대한 각각의 CD4 및 CD8 하위세트 내의 PD1+ 세포의 비교를 나타낸다. 도 46A 및 46B는 MIL (도 46A) 및 PBL (도 46B)에 대한 각각의 CD4 및 CD8 하위세트 내의 LAG3+ 세포의 비교를 나타낸다. PD1+ 및 LAG3+ 둘 다에 대한 데이터는 MIL1.3 샘플의 경우 제0일 측정에 비해 실질적인 감소를 나타내고, 한편 MIL1.1 및 MIL1.2는 PD1 및 LAG3 둘 다가 제0일에 비해 증가하는 경향이 있는 것으로 보였다. PBL 데이터를 대조군으로서 사용하였다.

[0458] 본 실시예로부터의 실험은 MIL 방법 3으로 확장된 MIL이 더 높은 배수 확장을 가졌고, 고도로 기능적이었고, 더 높은 비율의 CD8 하위세트를 가졌고, 더 적은 LAG3+ 및 PD1+ T 세포 하위세트를 가졌다는 것을 입증한다. 데이터는 또한 기억 하위세트가 흑색종 TIL과 유사하였다는 것을 나타냈다. 데이터는 또한 동결보존된 샘플이 신선한 샘플과 비교하여 더 높은 배수 확장을 갖는 것으로 보였다는 것을 나타냈다. PBL 샘플에 대한 대다수의 데이터는, 아마도 작은 샘플 크기에 기초하여 결정적이 아닌 것으로 보인다.

[0459] 실시예 3 - TIL을 확장시키고 확장된 TIL로 암을 치료하는 방법

[0460] 바늘 흡인을 사용하여 골수를 수득한다. 골수 샘플을 헤파린-함유 시린지 내로 흡인시키고, 실온에서 밤새 저장한다. 저장 후에, 시린지의 내용물을 함께 멸균 용기 내로 풀링하고, 품질을 시험한다. 림프구 분리 배지 (LSM)를 사용하여 골수에서 단핵 세포 (MNC)를 풍부화시키고, COBE 스펙트라에 의해 원심분리한다. 구배 하의 세포들을 적혈구까지 수집하고, HBSS를 사용하여 세척한다. 2% HSA 및 5% DMSO로 보충된 헤타스타치-기반 동결보호제를 사용하여 MNC를 동결보존시키고, MNC의 일부는 품질 관리를 위해 보존한다. QC 바이알을 해동하여 MNC 생성물의 $CD3^+$ 및 $CD38^+/138^+$ 세포 함량을 결정한다.

[0461] 골수를 흡인시키고, 림프구 분리 배지 밀도 구배 상에서 분획화하고, 세포를 거의 적혈구 펠릿의 수준까지 수집한다. 이러한 분획화 방법은 실질적으로 적혈구 및 호중구를 제거하여 거의 완전한 골수를 제공한다. 생성된 분획화된 물질은 T-세포 및 종양 세포이다. 골수를 피콜처리하고, TIL을 관련 기술분야에 공지된 방법 및 본원에 기재된 임의의 방법을 사용하여 확장시킨다. 예를 들어, TIL을 확장시키기 위한 예시적인 방법이 도 14에 도시된다. TIL을 확장시키고 확장된 TIL로 암 환자를 치료하는 예시적인 방법이 도 15에 제시된다.

[0462] 실시예 4 - 비-호지킨 림프종 종양으로부터 성장된 종양 침윤 림프구 (TIL)의 표현형 및 기능적 특징화

[0463] 본 실시예에 기재된 실험의 목표는 치료 잠재력을 갖는 TIL이 NHL 종양으로부터 단리 및 배양될 수 있는지 여부를 결정하고, NHL-유래 TIL의 특징을 흑색종-유래 TIL과 비교하는 것을 포함한다.

[0464] 환자로부터의 TIL의 추출 및 확장을 위한 물질 및 방법은 본원에 기재된 바와 같다. 환자의 TIL을 병변, 본 경우에 림프 조직의 외과적 절제에 의해 억제성 종양 미세환경으로부터 추출하였다. 본원에 개시된 확장 방법을 사용하여 TIL을 확장시켜 10^9 내지 10^{11}개 TIL을 수득하였다.

[0465] NHL-유래 TIL (1개의 외투 세포 림프종 (MCL), 3개의 여포성 림프종 (FL), 3개의 미만성 대 B 세포 림프종 (DLBCL))을 흑색종-유래 TIL에 대한 분화 마커에 대해 유동 세포측정법을 사용하여 분석하였다. TIL을 항-CD56, 항-TCRab, 항-CD3, 항-CD4, 항-CD8, 항-CD27 및 항-CD28 항체에 대해 분석하였다. 이들 항체를 분화 패널 1 (DF1)로서 사용하였다. 항-CD3, 항-CD4, 항-CD9, 항-CD38, 및 항-HLA-DR, 항-CCR7, 및 항-CD45RA 항체를 분화 패널 2 (DF2)로서 사용하였다. DF2를 사용하여 하기 T-세포 하위세트를 확인하였다: 나이브 (CCR7+/CD45RA+); 중심 기억 t-세포 (CM) (CCR7+/CD45RA-); 이펙터 기억 T-세포 (EM) (CCR7-/CD45RA-); 및 말단 분화된 이펙터 기억 세포 (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+).

[0466] 도 16은 상이한 암 유형에서의 상이한 세포 하위집단에서의 CD4 및 CD8 T-세포를 보여준다. 흑색종 (흑색), 외투 세포 림프종 (적색), 미만성 대 B 세포 림프종 (청색) 및 여포성 림프종 (자주색) 암 유형을 시험하였다. 도 16A-16D는 일반적으로 림프종 TIL이 흑색종 TIL과 비교하여 더 고도로 증식성이고 따라서 더 높은 항종양 활성을 갖는 경향을 입증한다. 마찬가지로, 도 17B는 CD4/CD28 발현 림프종 T-세포가 CD4/CD28 발현 흑색종 T-세포보다 더 높은 증식 능력을 갖는다는 것을 보여준다.

[0467] TIL에 의한 인터페론 감마 (IFNγ) 생산을, TIL을 mAB-코팅된 디나비즈™ (CD3, CD28 및 CD137)로 자극시키고, 이어서 ELIspot™ (이뮤노스팟 CTL)을 사용함으로써 측정하고, 이뮤노스팟™ S6 엔트리 분석기를 사용하고, 또한 듀오세트(DuoSet)™ ELISA 키트 (알앤디 시스템즈(R&D systems))를 제조업체의 지침에 따라 사용하는 ELISA에 의해 계수하였다.

[0468] 도 18A 및 18B는 NHL TIL 및 흑색종 TIL에 의한 IFNɣ 생산이 유사하다는 것을 입증하며, 이는 2가지 TIL 유형 사이의 유사한 세포독성 기능성을 나타낸다.

[0469] 생물발광 재지시 용해 검정 (BRLA)을 사용하여 TIL의 용해 잠재력을 결정하였다. eGFP 및 반딧불이 루시페라제를 코딩하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 P815 세포를 표적 세포로서 사용하였다. TIL 및 표적 세포를 OKT3의 존재 하에 4시간/24시간 동안 공동배양하였다. 이어서 루시페린을 첨가하고, 세포를 5분 동안 인큐베이션하였다. 발광측정기를 사용하여 생물발광을 측정하였다. 퍼센트 생존 및 퍼센트 세포독성을 하기와 같이 계산하였다:

[0470] % 생존 = (실험 생존 - 최소) / (최대 신호 - 최소 신호) x 100

[0471] % 세포독성 = 100 - (% 생존)

[0472] TIL의 용해 잠재력을 용해 단위 LU50으로서 표현하였으며, 이는 이펙터 세포에 의해 유도된 표적 세포의 50 퍼센트 세포독성을 나타낸다.

[0473] TIL을 검정하여 자가 종양 및 동종 종양 둘 다에 대한 그의 종양-사멸 능력을 결정하였다. TIL을 자가 림프종 세포 또는 동종 흑색종 세포주 (526 흑색종 세포주)와 상이한 이펙터 세포 대 표적 세포 비 (E:T 비) - 10:1, 20:1, 50:1 또는 100:1로 혼합하였다. 종양 세포를 공동배양 전에 셀트레이스 바이올렛 염료 (써모피셔)로 표지하였다. 24시간 후에, 세포를 7-AAD로 염색하여 세포 사멸을 결정하였다. TIL에 의해 사멸된 종양 세포의 비율을, 림프종 세포의 경우 CD19에 비해 셀트레이스 바이올렛 염료에서 게이팅된, 및 흑색종 세포의 경우 MCSP에 비해 셀트레이스 바이올렛 염료에서 게이팅된 7-AAD 양성 종양 세포로서 나타내었다.

[0474] 도 19는 NHL TIL 및 흑색종 TIL이 4시간 (도 19A) 및 24시간 (도 19B)에서 동종 및 자가 종양 둘 다에 대해 유사한 세포독성 기능성을 갖는다는 것을 보여준다.

[0475] 또한 엔카운터 GX 인간 면역학 V2 패널 (나노스트링, 시애틀)을 사용하여 TIL에 대한 유전자 발현 분석을 수행하였다. 총 100ng RNA를 제조업체의 지침에 따라 검정하였다. 각각의 샘플에 대해 내장된 대조군 유전자 프로브의 기하 평균을 사용한 스케일링에 의해 데이터를 정규화하였다. 데이터를 흑색종 유전자 발현에 대하여 맵핑하고 그와 비교하였다.

[0476] 도 21은 유전자 발현 분석의 결과를 나타낸다. 열 지도는 흑색종 TIL에 비해 유전자 발현의 배수 변화를 보여준다. 림프종-유래 TIL로부터의 IL17A 및 RORC 발현은 흑색종-유래 TIL과 비교하여 더 높은 발현을 가졌다.

[0477] 종합하면, 이러한 실험의 결과는 림프종-유래 TIL의 기능적 특징이 흑색종-유래 TIL과 유사하다는 것을 입증하였으며, 이는 림프종-유래 TIL의 사용이 림프종 암을 치료하는데 성공적일 것임을 나타낸다.

[0478] 실시예 5 - 만성 림프구성 백혈병 (CLL)을 갖는 환자의 말초 혈액으로부터 성장된 말초 혈액 림프구 (PBL)의 표현형 및 기능적 특징화

[0479] 3회의 이브루티닙을 사용한 치료 전 및 후의 CLL 환자로부터 PBMC를 수집하였다.

[0480] 도 24 및 본원 다른 곳에 기재된 바와 같이, 3가지 상이한 방법인 PBL 방법 1, PBL 방법 2 및 PBL 방법 3을 사용하여 T-세포를 확장시켰다. 특정 샘플은 신선한 PBMC로부터 유래되었고, 특정 샘플은 동결보존된 PBMC로부터 유래되었다. 세포를 확장시키고 수거한 후, 이들을 상기 실시예 4 및 본원 다른 곳에 기재된 방법을 사용하여 표현형결정하고 기능적으로 특징화하였다. 본 실시예의 목표는 PBL에 대한 최적 확장 방법을 결정하고, 이브루티닙 치료된 샘플로부터 확장된 PBL이 비치료 샘플로부터 확장된 PBL보다 더 강력한지 여부를 결정하는 것이었다.

[0481] PBL 배수 확장이 도 26에 제시된다. PBL 방법 1, PBL 방법 2 및 PBL 방법 3을 사용하여 확장된 PBL에 대한 결과가 제시된다. 비치료 PBL (PreRx PBL)은 평균 179배 확장을 나타냈고, 이브루티닙 치료된 PBL (PostRx PBL)은 평균 306배 확장을 나타냈다. 신선한 PBMC로부터 유래된 PBL (PBL)은 단지 평균 82배 확장을 나타냈다. PBL과 PostRx PBL 사이, p=0.006. PBL과 PreRx PBL 사이, p=0.3, 및 PreRx PBL과 PostRx PBL 사이, p=0.1. 종합하면, PBL 및 PreRx PBL 둘 다에서의 모든 군에 비해 모든 PostRx PBL 군에 대해 평균 배수-확장의 증가가 관찰된다.

[0482] 도 27은 PBL, PreRx PBL 및 PostRx PBL에서의 인터페론-감마 (IFN-ɣ) 생산 세포를 나타낸다. PBL의 경우, IFN-ɣ 생산 세포의 평균 수는 약 1864개였다. PreRx PBL의 경우, IFN-g 생산 세포의 평균 수는 약 7530개였고, PostRx PBL의 경우, IFN-ɣ 생산 세포의 평균 수는 약 11984개였다. PBL과 PostRx PBL 사이,

p=0.006. PBL과 PreRx PBL 사이, p=0.006, 및 PreRx PBL과 PostRx PBL 사이, p=0.01. 종합하면, PBL 및 PreRx PBL 둘 다에서의 모든 군에 비해 모든 PostRx PBL 군에 대해 IFN-γ 생산 세포의 평균 수의 유의한 증가가 관찰된다.

[0483] 각각의 샘플에 대해 표현형 특징화를 수행하였다. 도 28은 PreRx PBL 및 PostRx PBL에서의 CD4+ 및 CD8+ T 세포 하위세트의 비율을 나타내고, 비교자로서 흑색종 TIL을 사용한다. 여기서, 데이터는 세포를 확장시키기 위해 어떤 방법이 사용되었는지와 상관없이, PreRx PBL과 PostRx PBL 둘 다간에 CD4 하위세트 (좌측에 제시됨)가 대등하였다는 것을 나타낸다. PreRx PBL 및 PostRx PBL에서의 CD4 하위세트는 흑색종 TIL보다 더 많은 것으로 나타났다 (각각의 경우 p=0.0006). 세포를 확장시키는데 사용된 방법에 상관없이, PreRx PBL과 PostRx PBL 둘 다에서 CD8 하위세트 (우측에 제시됨)는 더 적었다. PreRx PBL 및 PostRx PBL에서의 CD8 하위세트는 흑색종 TIL보다 더 적은 것으로 나타났다 (각각의 경우 p=0.0006). 더 적은 CD8 하위세트는 단지 암의 유형으로부터 비롯된 것으로 가정된다 (즉, CLL에서, CD4 하위세트는 전형적으로 확장됨).

[0484] 도 29A-29D는 비교자로서 흑색종 TIL을 사용하여, PreRx PBL 및 PostRx PBL의 CD4 기억 하위세트 사이의 비교를 나타낸다. 도 29A는 나이브 (CCR7+/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여주고; 도 29B는 중심 기억 t-세포 (CM) (CCR7+/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 29C는 이펙터 기억 T-세포 (EM) (CCR7-/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 29D는 말단 분화된 이펙터 기억 세포 (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여준다. 도 29는 PreRx PBL 및 PostRx PBL에 대한 CD4 기억 하위세트가 흑색종 TIL에 대해 관찰된 것과 대등하다는 것을 나타낸다.

[0485] 도 30A-30D는 비교자로서 흑색종 TIL을 사용하여, PreRx PBL 및 PostRx PBL의 CD8 기억 하위세트 사이의 비교를 나타낸다. 도 30A는 나이브 (CCR7+/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여주고; 도 30B는 중심 기억 t-세포 (CM) (CCR7+/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 30C는 이펙터 기억 T-세포 (EM) (CCR7-/CD45RA-)에 대한 데이터를 보여주고; 도 30D는 말단 분화된 이펙터 기억 세포 (TEMRA) (CCR7-/CD45RA+)에 대한 데이터를 보여준다. 도 30은 PreRx PBL 및 PostRx PBL에 대한 CD8 기억 하위세트가 흑색종 TIL에 대해 관찰된 것과 대등하다는 것을 나타낸다.

[0486] 도 31A 및 31B는 비교자로서 흑색종 TIL을 사용하여, CD4 세포 (도 31A) 및 CD8 세포 (도 31B)의 CD27 하위세트의 비교를 나타낸다. CD4CD27 세포 하위세트는 흑색종 TIL과 비교하여 PreRx PBL (p=0.03) 및 PostRx PBL (p=0.02) 둘 다에서 유의하게 더 높았다. CD8CD27 세포 하위세트는 흑색종 TIL과 비교하여 PreRx PBL (p=0.002) 및 PostRx PBL (p=0.001) 둘 다에서 유의하게 더 높았다.

[0487] 도 32A 및 32B는 비교자로서 흑색종 TIL을 사용하여, CD4 세포 (도 30A) 및 CD8 세포 (도 30B)의 CD28 하위세트의 비교를 나타낸다. CD4CD28 세포 하위세트 및 CD8CD28 세포 하위세트는 흑색종 TIL과 비교하여 PreRx PBL 및 PostRx PBL 둘 다에서 대등한 것으로 나타났다.

[0488] 도 33A 및 33B는 PreRx PBL 및 PostRx PBL에 대한 CD4+ (도 33A) 및 CD8+ (도 33B) 집단 내의 LAG3+ 하위세트의 비교를 나타낸다. 데이터는 PostRx PBL에서 CD4+ (p=0.06) 및 CD8+ (p=0.01) 두 집단 내의 LAG3+ 하위세트의 유의한 평균 감소를 나타낸다.

[0489] 도 34A 및 34B는 PreRx PBL 및 PostRx PBL에 대한 CD4+ (도 34A) 및 CD8+ (도 34B) 집단 내의 PD1+ 하위세트의 비교를 나타낸다. 데이터는 PostRx PBL에서 CD4+ 및 CD8+ 두 집단 내의 PD1+ 하위세트의 평균 감소를 나타내지만, 감소가 유의하지는 않았다.

[0490] 도 35A 및 35B는 생물발광 재지시 용해 검정 (BRLA)을 사용하여 측정된 PreRx PBL (도 35A) 및 PostRx PBL (도 35B)의 세포용해 활성의 결과를 보여준다. 셀트레이스™ 바이올렛 세포 증식 키트 (인비트로젠)를 사용하여 하기와 같이 검정을 수행하였다: PBL인 이펙터 세포를 카르복시플루오레세인 숙신이미딜 에스테르 (CFSE)로 표지하였다. 표적 세포 (자가 CD19+ 종양 세포)를 미토신 C와 함께 인큐베이션한 다음, 셀트레이스 바이올렛 세포 증식 키트 지침에 따라 셀트레이스™ 바이올렛 (CTV)으로 표지하였다. 이펙터 및 표적 세포를 2:1, 5:1 및 20:1 (E:T 세포)의 비로 24시간 동안 인큐베이션하였다. 카운트브라이트 비드를 첨가하고, 세포를 아넥신 V - PI로 염색한 다음, CTV+/아넥신-V PI+ 세포에 대해 분석하였다 (이는 사멸 세포의 수를 제공함). PostRx PBL은 표적 종양 세포의 50%를 사멸시키는데 더 적은 세포가 요구되기 때문에 더 강력한 것으로 보인다 (즉, LU_{50}이 PreRx PBL에 대해서보다 PostRx PBL에 대해 더 낮음).

[0491] 본 실시예에서 수행된 실험은 하기 결과를 입증하였다: 신선한 CLL PBMC로부터 확장된 PBL이 동결보존된 PBMC로부터 확장된 PBL (PreRx PBL 및 PostRx PBL)과 비교하여 더 낮은 배수 확장 및 유의하게 더 적은 IFN-γ 생산을

나타냈고; PostRx PBL은 PreRx PBL과 비교하여 일관되게 더 높은 배수 확장 및 IFN-γ 생산의 유의한 증가를 나타냈고; PostRx PBL이 PreRx PBL보다 더 낮은 LU_{50}을 가졌지만, PreRx PBL 및 PostRx PBL 둘 다가 자가 (CD19+) 종양 세포에 대하여 용해 활성을 나타냈다.

[0492] 상기 제시된 실시예는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 조성물, 시스템 및 방법의 실시양태를 제조 및 사용하는 방법에 관한 완전한 개시내용 및 설명을 제공하기 위해 주어지고, 본 발명자들이 본 발명으로 간주하는 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에 명백한 상기 기재된 본 발명의 수행 방식에 대한 변형은 하기 청구범위의 범주 내에 있는 것으로 의도된다. 본 명세서에서 언급된 모든 특허 및 공개는 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 기술자의 수준을 나타낸다.

[0493] 모든 표제 및 섹션 명칭은 명확성 및 참조 목적을 위해서만 사용되고 어떠한 방식으로도 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다. 예를 들어, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 본 발명의 취지 및 범주에 따라 적절하게 상이한 표제 및 섹션으로부터 다양한 측면을 조합하는 유용성을 인지할 것이다.

[0494] 본원에 인용된 모든 참고문헌은, 각각의 개별 공개 또는 특허 또는 특허 출원이 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함되는 것이라고 구체적으로 및 개별적으로 표시된 것과 동일한 정도로, 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

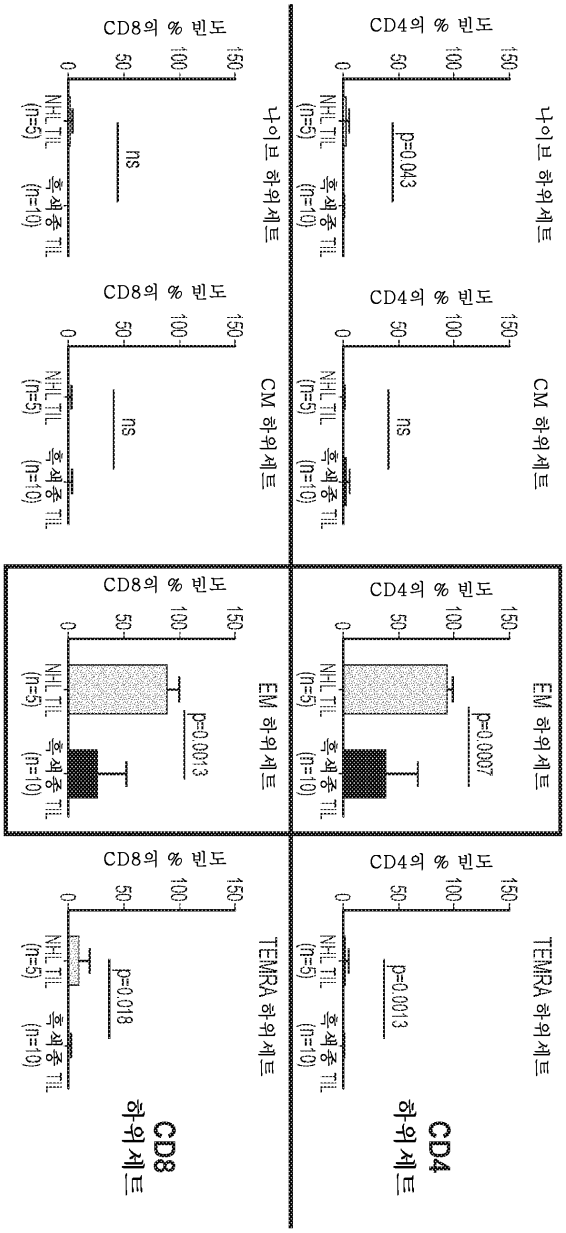
[0495] 본 출원의 많은 변형 및 변경은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 분명할 것이므로 본 취지 및 범주를 벗어나지 않고 이루어질 수 있다. 본원에 기재된 특정 실시양태 및 실시예는 단지 예로서 제공되고, 본 출원은 첨부된 청구범위가 부여하는 등가물의 전체 범주와 함께, 청구범위의 측면에서만 제한될 것이다.

도면

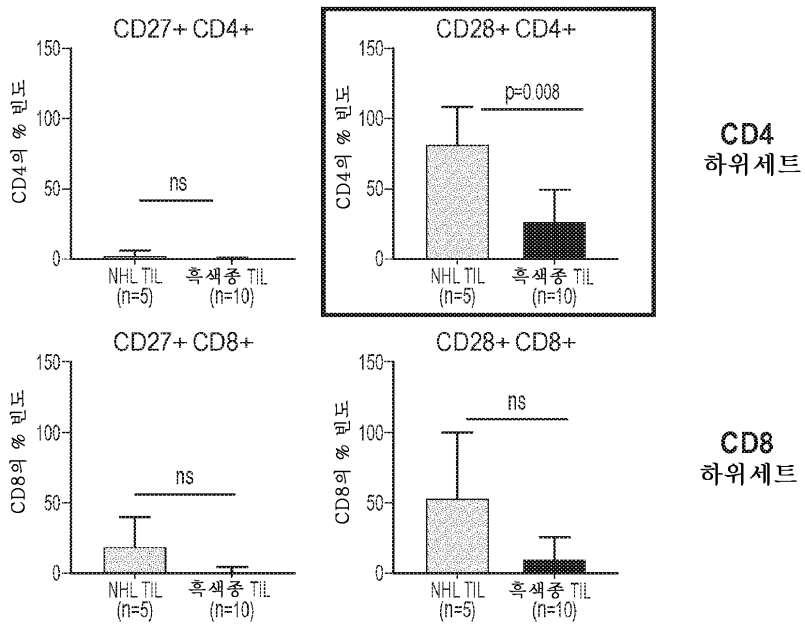
도면1

NHL	샘에어세 번호	성별	연령	조직학 하위유형	등급	양성 마커	부위
NHL17001	530-A992	M	75	여포성 림프종 (MCL)	공격성이 아닌 형	CD19, CD20, CD5, CYCLIN-D+	좌측 사타구니
NHL17002	530-A993	F	55	여포성 림프종 (FL)	1	CD20, CD10, BCL2	우측 팔 (연부 조직 종괴)
NHL17003	850-8104	M	63	여포성 림프종 (FL)	3 중 1-2	BCL-1, BCL-2, BCL-6, CD3, CD5, CD10, CD20, CD21, CD43, PAX5	우측 수준 II 종괴, 우측 후방 종괴 (겉계)
NHL17004	310-6799	M	62	여포성 림프종 (FL)	설명되지 않음	CD3, CD5, CD10, CD15, CD20, CD30, CD45, Pax-5, Ki-67	
NHL17005	850-8327	F	33	미만성 대 B-세포 림프종 (DLBCL)	고등급 대 B 세포 림프종	BCL1, BCL2, BCL6, CD3, CD20, C-MYC, CD30, MUM-1	종격 종괴

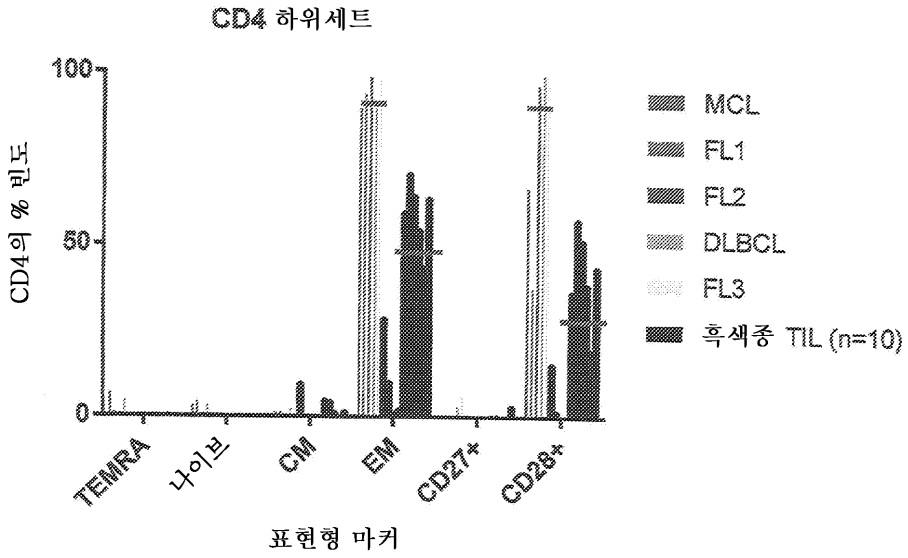
도면2


CD4의 % 빈도
CD8의 % 빈도
나이브 하위세트
CM 하위세트
EM 하위세트
TEMRA 하위세트
NHL TIL (n=5)
흑색종 TIL (n=10)
p=0.043
ns
p=0.0007
p=0.0013
p=0.018
CD4 하위세트
CD8 하위세트

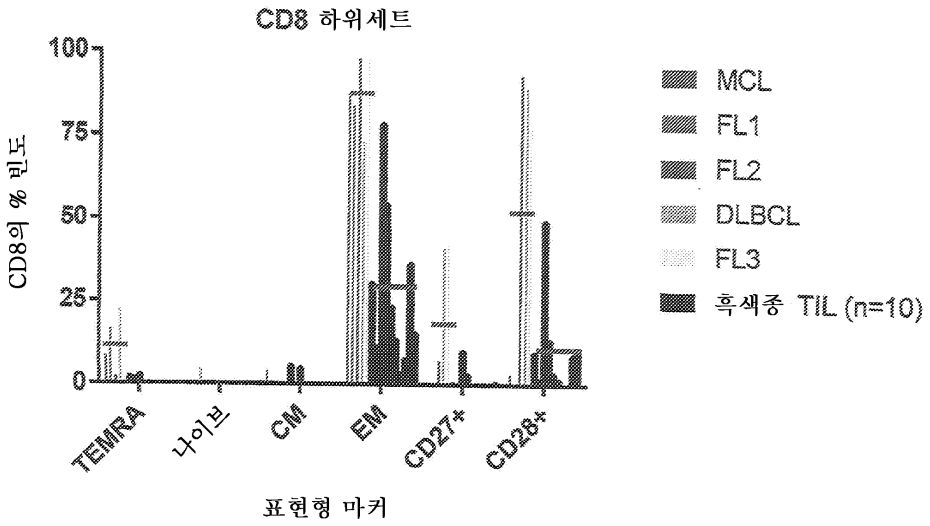
도면3


CD27+ CD4+
CD28+ CD4+
CD27+ CD8+
CD28+ CD8+
CD4의 % 빈도
CD8의 % 빈도
150
100
50
0
ns
p=0.008
NHL TIL (n=5)
흑색종 TIL (n=10)
CD4 하위세트
CD8 하위세트

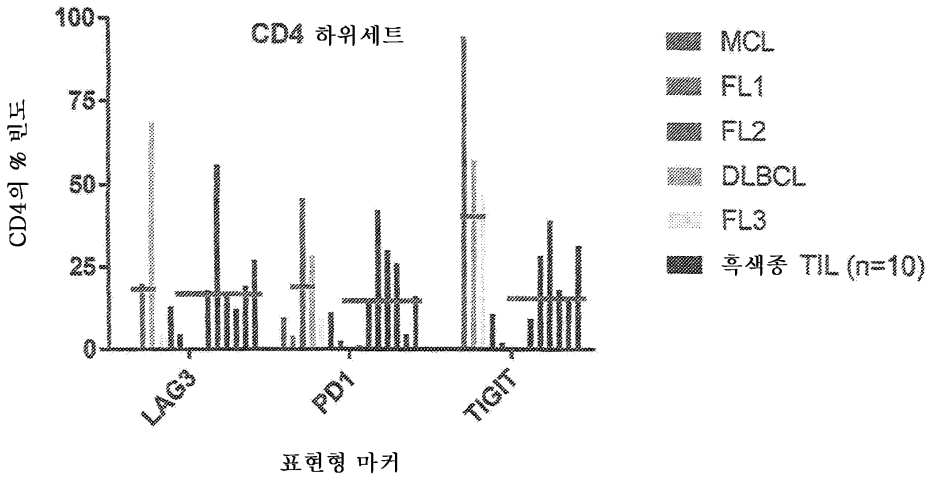
도면4


CD4 하위세트
CD4의 % 빈도
100
50
0
TEMRA
나이브
CM
EM
CD27+
CD28+
표현형 마커
MCL
FL1
FL2
DLBCL
FL3
흑색종 TIL (n=10)

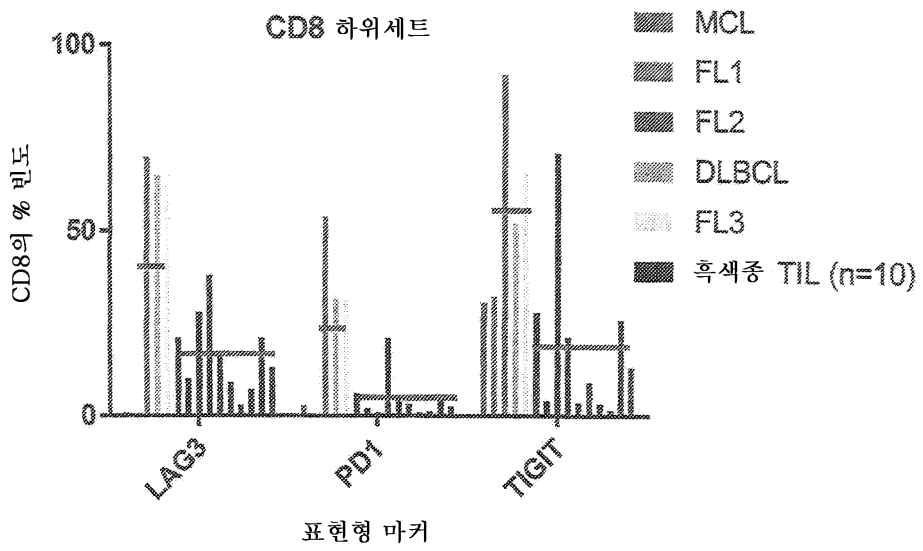
도면5


CD8 하위세트
CD8의 % 빈도
100
75
50
25
0
TEMRA
나이브
CM
EM
CD27+
CD28+
표현형 마커
MCL
FL1
FL2
DLBCL
FL3
흑색종 TIL (n=10)

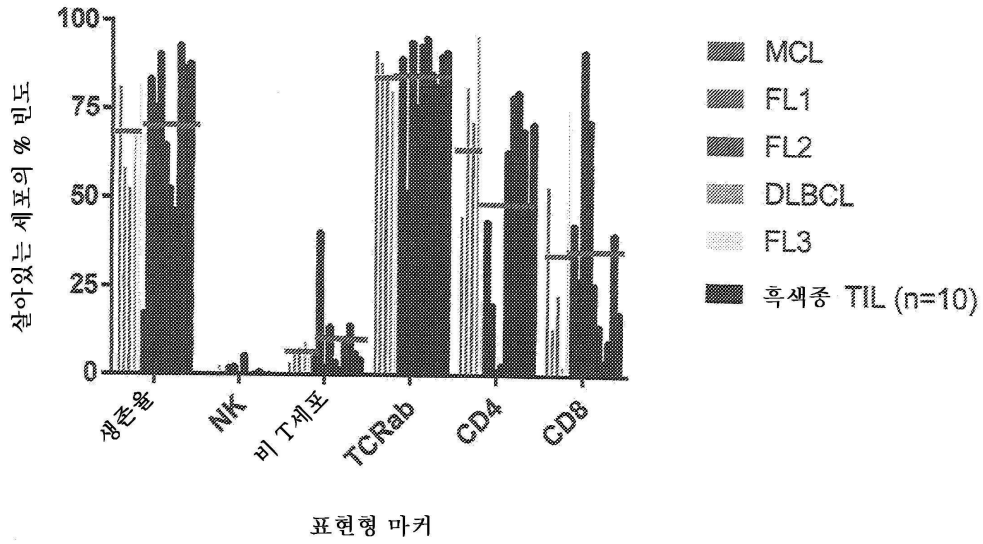
도면6


CD4 하위세트
CD4의 % 빈도
100
75
50
25
0
LAG3
PD1
TIGIT
표현형 마커
MCL
FL1
FL2
DLBCL
FL3
흑색종 TIL (n=10)

도면7


CD8 하위세트
CD8의 % 빈도
100
50
0
LAG3
PD1
TIGIT
표현형 마커
MCL
FL1
FL2
DLBCL
FL3
흑색종 TIL (n=10)

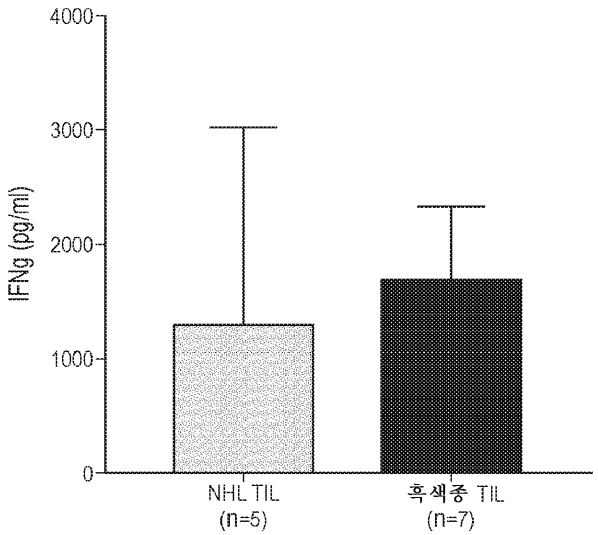
도면8


살아있는 세포의 % 빈도
100
75
50
25
0
생존율
NK
비 T세포
TCRab
CD4
CD8
표현형 마커
MCL
FL1
FL2
DLBCL
FL3
흑색종 TIL (n=10)

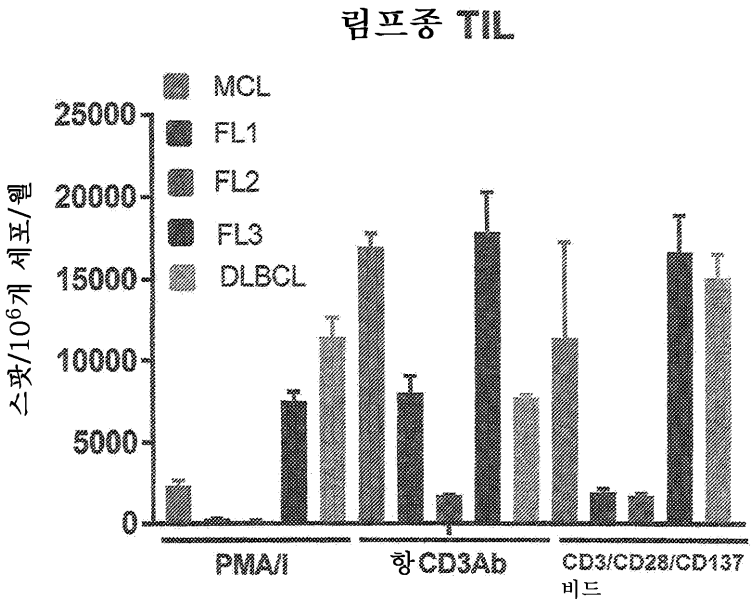
도면9

TIL 유형		LU50	
		4시간	24시간
흑색종 TIL	TIL 1	15	ND
	TIL 2	40.4	ND
	TIL 3	46	ND
	TIL 4	75.2	ND
	TIL 5	10.6	ND
	TIL 6	13.5	ND
	TIL 7	17.9	ND
림프종 TIL	TIL 1 (MCL)	6	24
	TIL 2 (FL)	<1	2
	TIL 3 (FL)	ND	ND
	TIL 4 (FL)	8	39
	TIL 5 (DLBCL)	<1	1.4

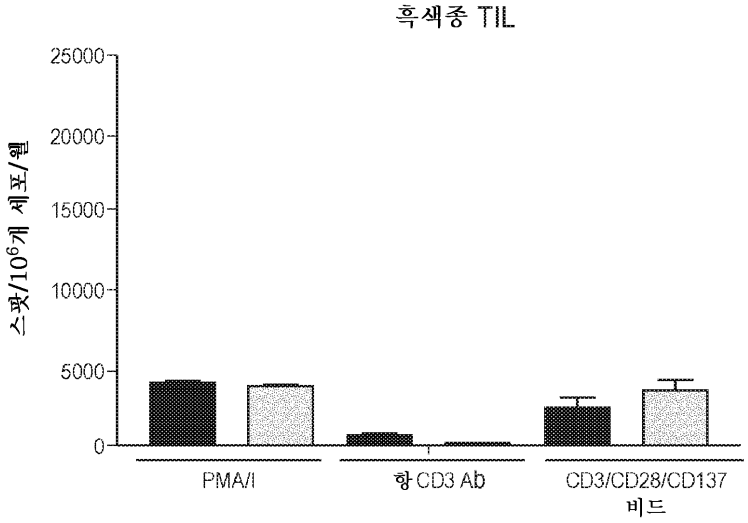
도면10



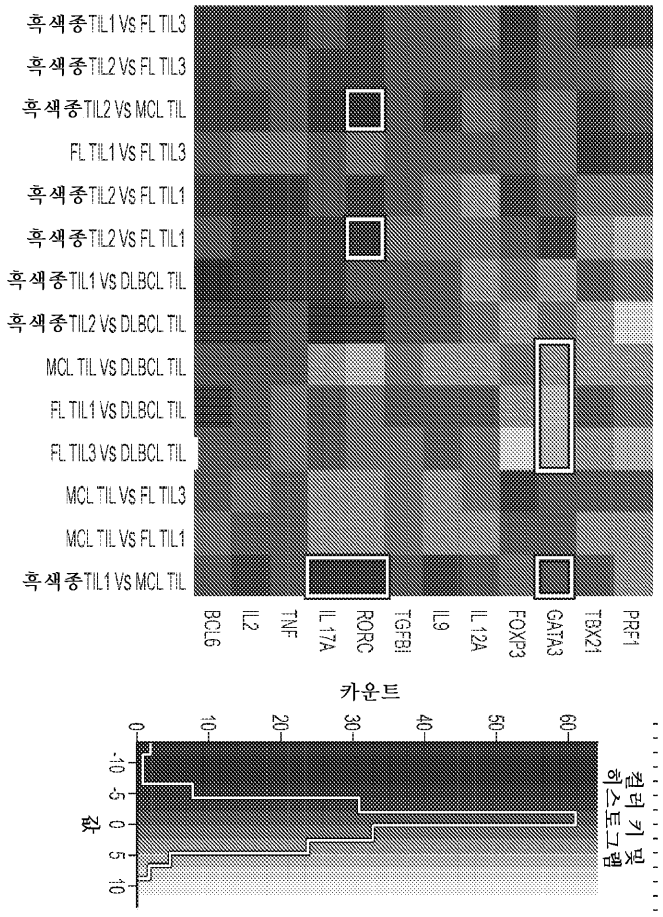
도면11


림프종 TIL
MCL
FL1
FL2
FL3
DLBCL
25000
20000
15000
10000
5000
0
스팟/10⁶개 세포/웰
PMA/I
항CD3Ab
CD3/CD28/CD137 비드

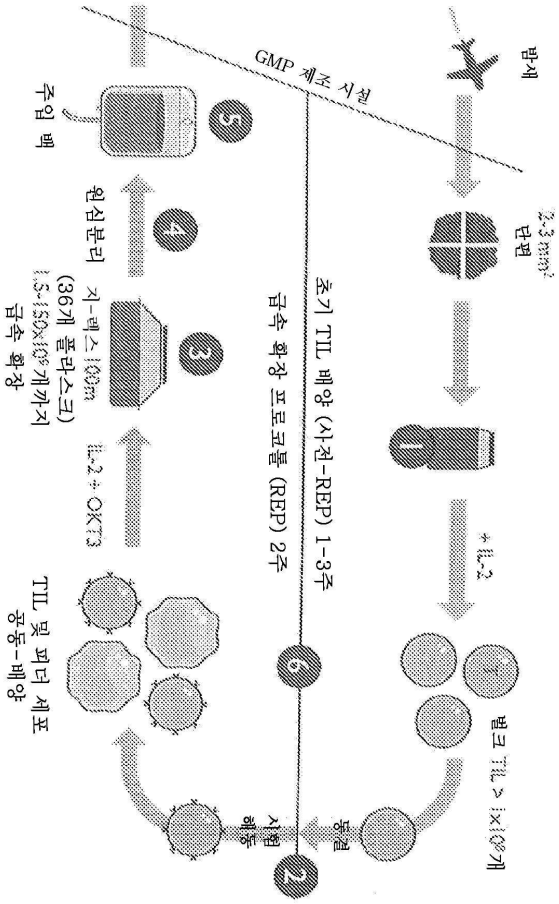
도면12


흑색종 TIL
25000
20000
15000
10000
5000
0
스팟/10⁶개 세포/웰
PMA/I
항CD3 Ab
CD3/CD28/CD137 비드

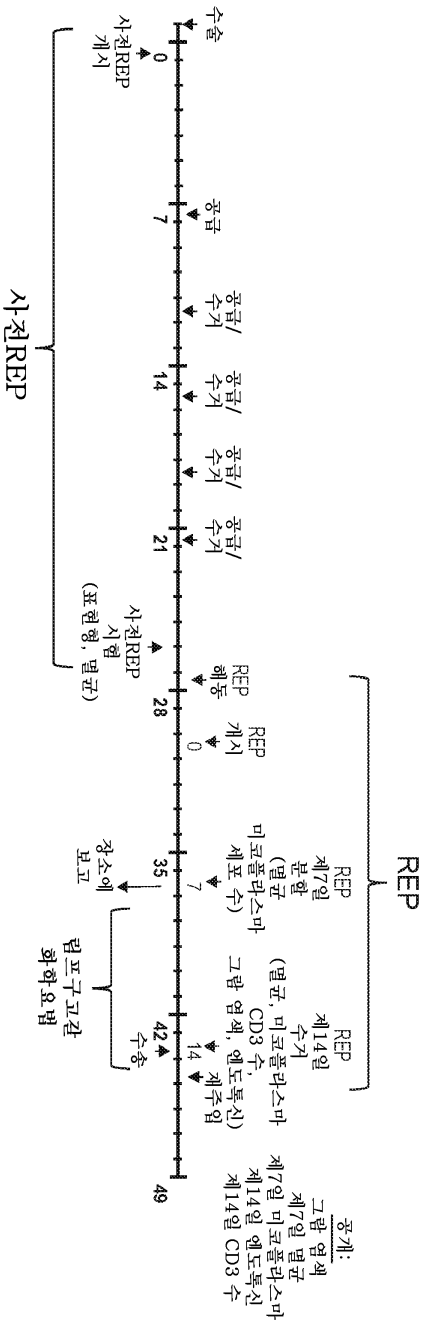
도면13


흑색종TIL1 Vs FL TIL3
흑색종TIL2 Vs FL TIL3
흑색종TIL2 Vs MCL TIL
FL TIL1 Vs FL TIL3
흑색종TIL2 Vs FL TIL1
흑색종TIL2 Vs FL TIL1
흑색종TIL1 Vs DLBCL TIL
흑색종TIL2 Vs DLBCL TIL
MCL TIL Vs DLBCL TIL
FL TIL1 Vs DLBCL TIL
FL TIL3 Vs DLBCL TIL
MCL TIL Vs FL TIL3
MCL TIL Vs FL TIL1
흑색종TIL1 Vs MCL TIL
BCL6
IL2
TNF
IL 17A
RORC
TGFBi
IL9
IL 12A
FOXP3
GATA3
TBX21
PRF1
카운트
0
10
20
30
40
50
60
값
-10
-5
0
5
10
컬러 키 및 히스토그램

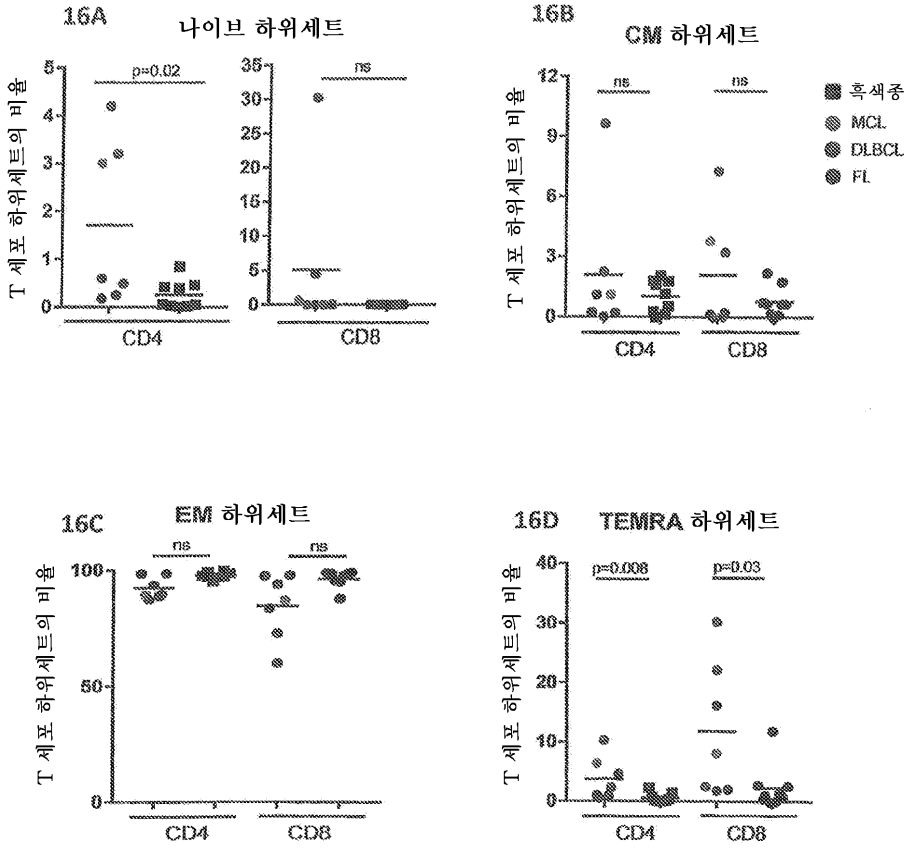
도면14


GMP 제조 시설
방세
2-3 mm³
단편
+IL-2
벌크 TIL > 1x10⁹개
동결
시험
해동
초기 TIL 배양 (사전-REP) 1-3주
급속 확장 프로코틀 (REP) 2주
TIL 및 피더 세포
공동-배양
IL-2 + OKT3
원심분리
자-렉스 100ml
(36개 플라스크)
1.5x10⁹개까지
급속 확장
주입 백

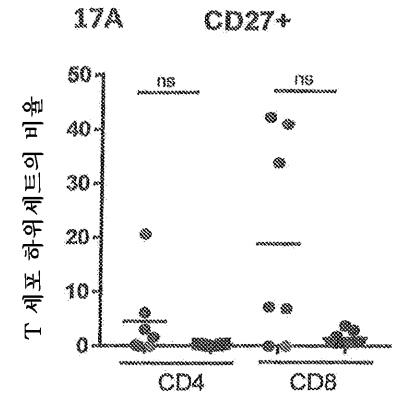
도면15

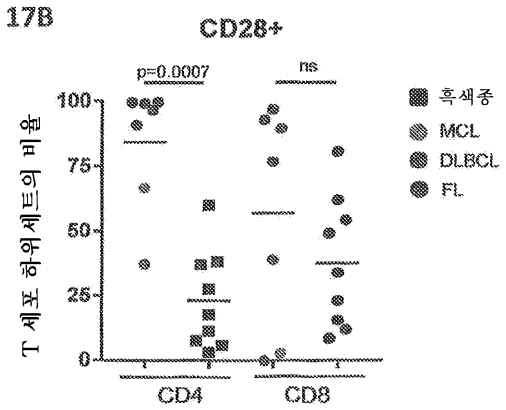

REP
사전REP
수술
사전REP 개시
공급
공급/수거
공급/수거
공급/수거
공급/수거
사전REP 시험 (표현형, 멸균)
REP 해동
REP 개시
REP 제7일 분할 (멸균 미코플라스마 세포 수)
REP 제14일 수거 (멸균, 미코플라스마 CD3 수, 그람 염색, 엔도톡신)
장소에 보고
수송
렙프구고갈 화학요법
0
7
14
21
28
35
42
49
0
7
14
공개:
그람 염색
제7일 멸균
제7일 미코플라스마
제14일 엔도톡신
제14일 CD3 수

도면16


16A
나이브 하위세트
T 세포 하위세트의 비율
p=0.02
ns
CD4
CD8
16B
CM 하위세트
ns
ns
흑색종
MCL
DLBCL
FL
CD4
CD8
16C
EM 하위세트
ns
ns
CD4
CD8
16D
TEMRA 하위세트
p=0.008
p=0.03
CD4
CD8

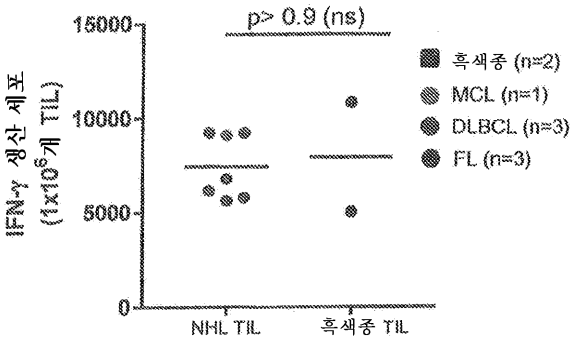
도면17


17A
CD27+
T 세포 하위세트의 비율
50
40
30
20
10
0
ns
ns
CD4
CD8

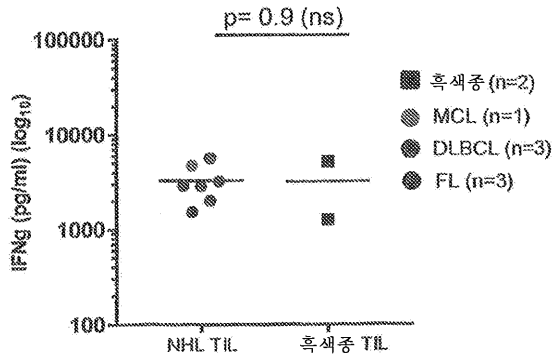

17B
CD28+
T 세포 하위세트의 비율
100
75
50
25
0
p=0.0007
ns
CD4
CD8
흑색종
MCL
DLBCL
FL

도면18

18A

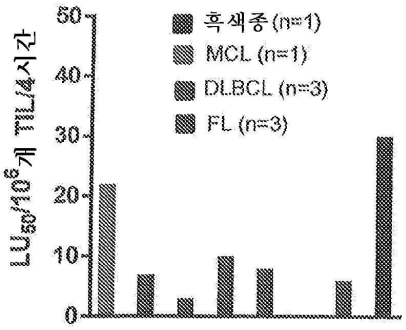

p> 0.9 (ns)
IFN-γ 생산 세포
(1x10^6개 TIL)
15000
10000
5000
0
NHL TIL
흑색종 TIL
흑색종 (n=2)
MCL (n=1)
DLBCL (n=3)
FL (n=3)

18B

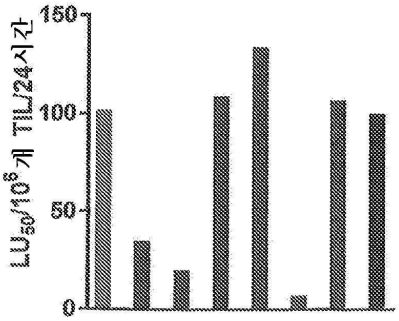

p= 0.9 (ns)
IFNg (pg/ml) (log10)
100000
10000
1000
100
NHL TIL
흑색종 TIL
흑색종 (n=2)
MCL (n=1)
DLBCL (n=3)
FL (n=3)

도면19

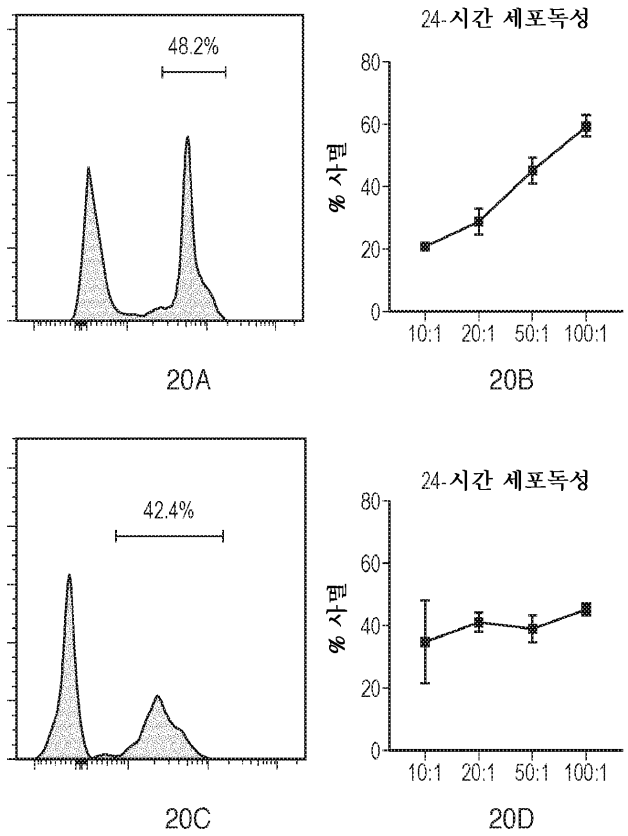
19A


흑색종 (n=1)
MCL (n=1)
DLBCL (n=3)
FL (n=3)
$LU_{50}/10^6$개 TIL/4시간
50
40
30
20
10
0

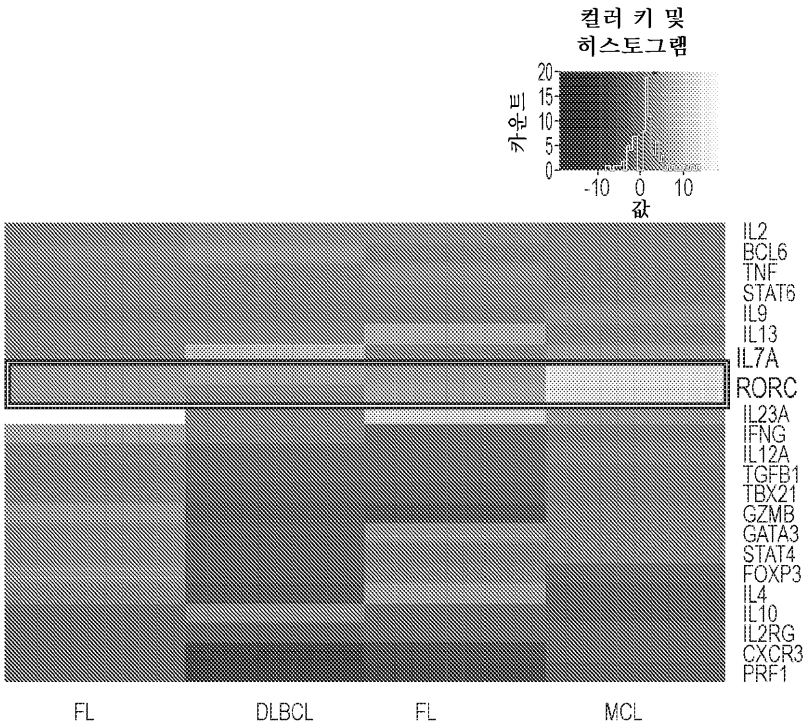
19B


$LU_{50}/10^6$개 TIL/24시간
150
100
50
0

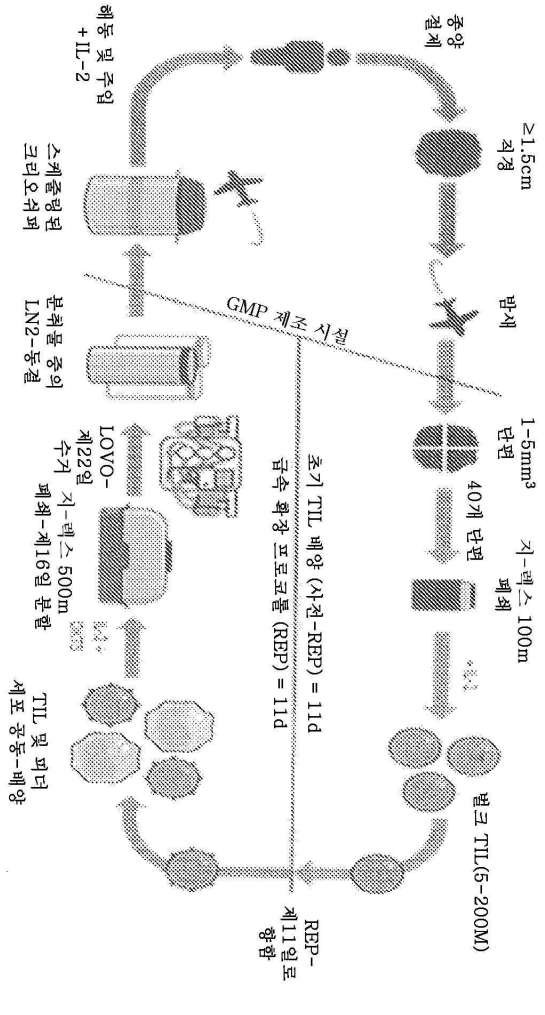
도면20


48.2%
24-시간 세포독성
% 사멸
80
60
40
20
0
10:1
20:1
50:1
100:1
20A
20B
42.4%
24-시간 세포독성
% 사멸
80
60
40
20
0
10:1
20:1
50:1
100:1
20C
20D

도면21


컬러 키 및
히스토그램
카운트
20
15
10
5
0
-10
0
10
값
IL2
BCL6
TNF
STAT6
IL9
IL13
IL7A
RORC
IL23A
IFNG
IL12A
TGFB1
TBX21
GZMB
GATA3
STAT4
FOXP3
IL4
IL10
IL2RG
CXCR3
PRF1
FL
DLBCL
FL
MCL

도면22


방법 2A-22일 방법, 2-3일 수거/수송
종양 절제
≥1.5cm 직경
해동 및 주입 + IL-2
밤새
1-5mm³ 단편
지-렉스 100m 페쇄
스케줄링된 크리오쉬퍼
GMP 제조 시설
40개 단편
분취물 중의 LN2-동결
초기 TIL 배양 (사전-REP) = 11d
급속 확장 프로코톨 (REP) = 11d
LOVO-수거 제22일
지-렉스 500m 페쇄-제16일 분할
벌크 TIL(5-200M)
TIL 및 피더 세포 공동-배양
REP-제11일로 향함

도면23

방법 2A: 단계 A - E로부터의 약 22일

1. 단계 A

환자 종양 샘플 수득

2. 단계 B

단편화 및 제1 확장

3일 내지 14일

3. 단계 C

제1 확장에서 제2 확장으로의 이행

저장 및 폐쇄 시스템 부재

4. 단계 D

제2 확장

IL-2, OKT-3, 및 항원-제시 피더 세포

폐쇄 시스템

5. 단계 E

단계 D로부터의 TIL 수거

폐쇄 시스템

6. 단계 F

최종 제제화 및/또는 주입 백으로의 전달

(임의로 동결보존)

도면24i

24A
방법 1
PBMC 샘플 (동결보존)
T 세포 풍부화 (방법 1)
순수한 T 세포 (음성 선택)
세포를 항-CD3/CD28 비드와 함께 배양
{IL-2}
IL-2
항-CD3/CD28 비드로 재자극
{IL-2}
IL-2
제0일
제4일
제7일
제11일
제14일
24B
방법 2
PBMC 샘플 (동결보존)
T 세포 풍부화 (방법 2)
PBMC를 37℃에서 3시간 동안 인큐베이션
비-부착 세포 제거
세포를 항-CD3/CD28 비드와 함께 배양
{IL-2}
IL-2
항-CD3/CD28 비드로 재자극
{IL-2}
IL-2

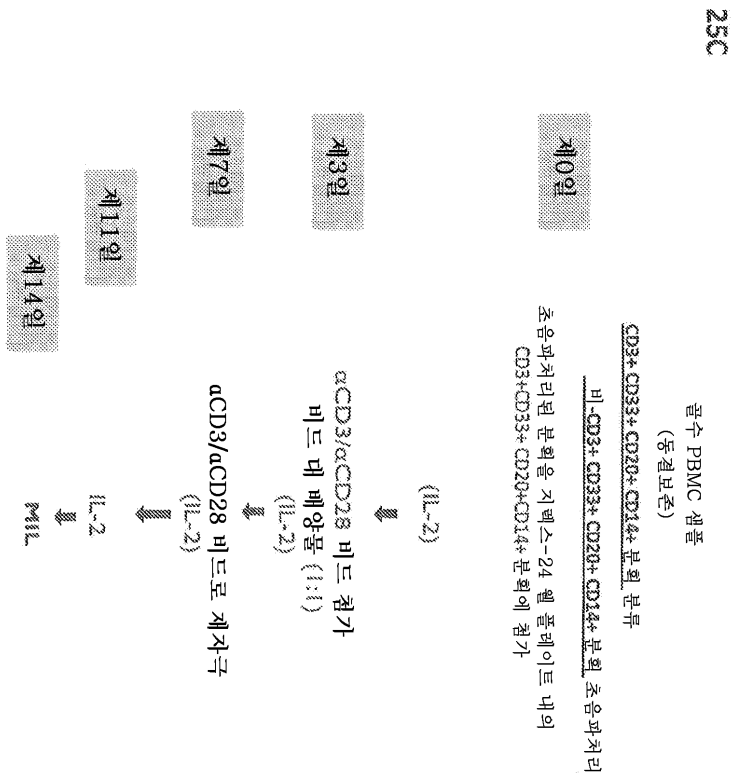
도면24ii

24C
방법 3
제0일
동결보존된 PBMC 세포
비드에 의한 CD19+ 세포 단리 (양성 선택)
순수한 T 세포 단리 (비-CD19 분획의 음성 선택)
TCB 세포 (공동배양)
세포를 αCD3/αCD28 비드와 함께 배양
(IL-2)
제4일
IL-2
제7일
항-CD3/CD28 비드로 재자극
(IL-2)
제14일
수거

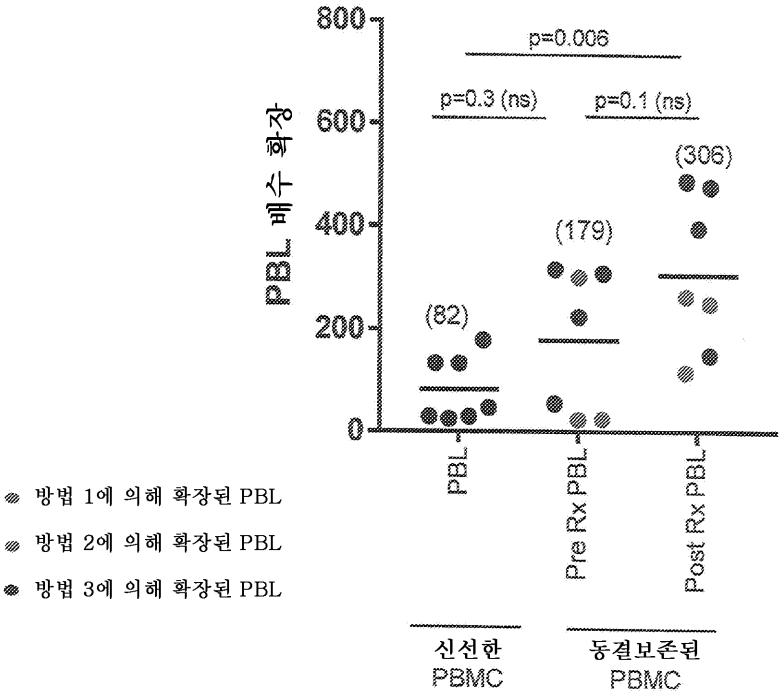
도면25i

25A
방법 1
골수 PBMC 샘플
(동결보존)
제0일 세포 (총 PBMC)를 aCD3/aCD28 비드와 함께 배양
비드 대 T 세포 비{1:1}
{IL-2}
제1일
IL-2
제7일
aCD3/aCD28 비드로 재자극
{IL-2}
MIL 1.1
제14일
• 세포 수거
• 비드 제거
• 세포 계수
• 표현형 및 기능적 분석
25B
방법 2
골수 PBMC 샘플
(동결보존)
제0일 세포 (총 PBMC)를 aCD3/aCD28 비드와 함께 배양
비드 대 T 세포 비{3:1}
{IL-2}
MIL 1.2
제7일

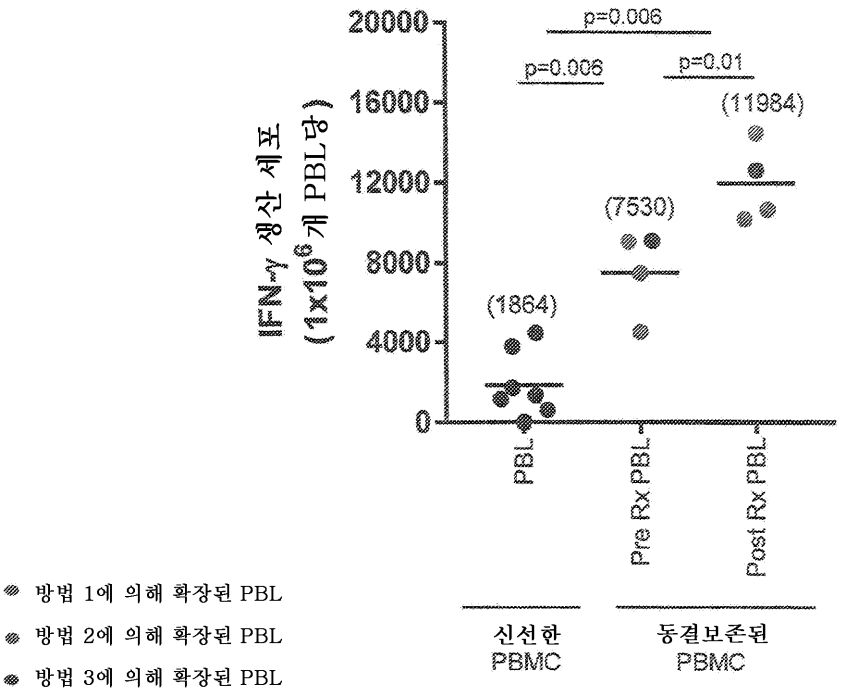
도면25ii


25C
방법 3
골수 PBMC 샘플
(동결보존)
CD3+ CD33+ CD20+ CD14+ 분획 분류
비-CD3+ CD33+ CD20+ CD14+ 분획 초음파처리
초음파처리된 분획을 지멕스-24 웰 플레이트 내의
CD3+CD33+ CD20+CD14+ 분획에 첨가
제0일
(IL-2)
제3일
αCD3/αCD28 비드 첨가
비드 대 배양물 (1:1)
(IL-2)
제7일
αCD3/αCD28 비드로 재자극
(IL-2)
제11일
IL-2
제14일
MIL

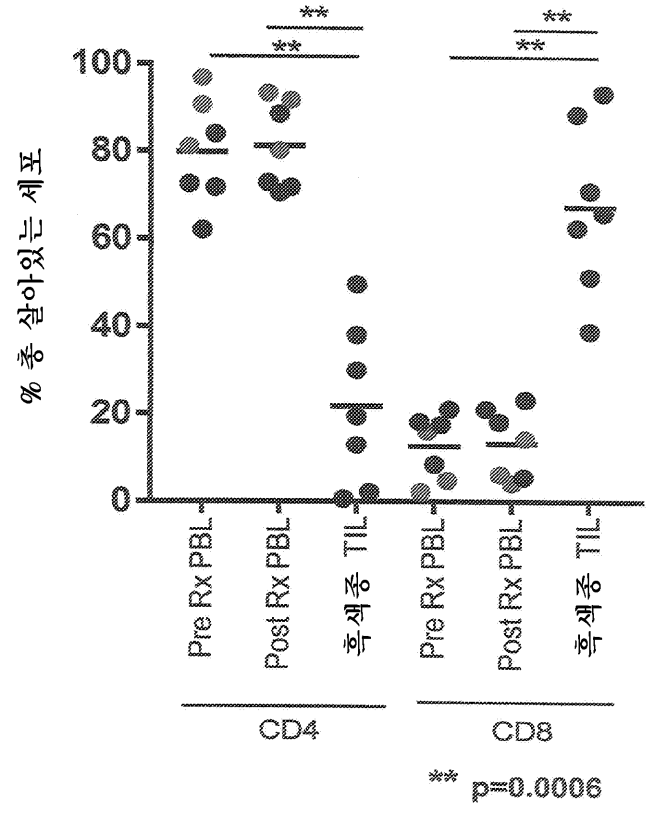
도면26


PBL 배수 확장
800
600
400
200
0
p=0.006
p=0.3 (ns)
p=0.1 (ns)
(82)
(179)
(306)
PBL
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
신선한 PBMC
동결보존된 PBMC
방법 1에 의해 확장된 PBL
방법 2에 의해 확장된 PBL
방법 3에 의해 확장된 PBL

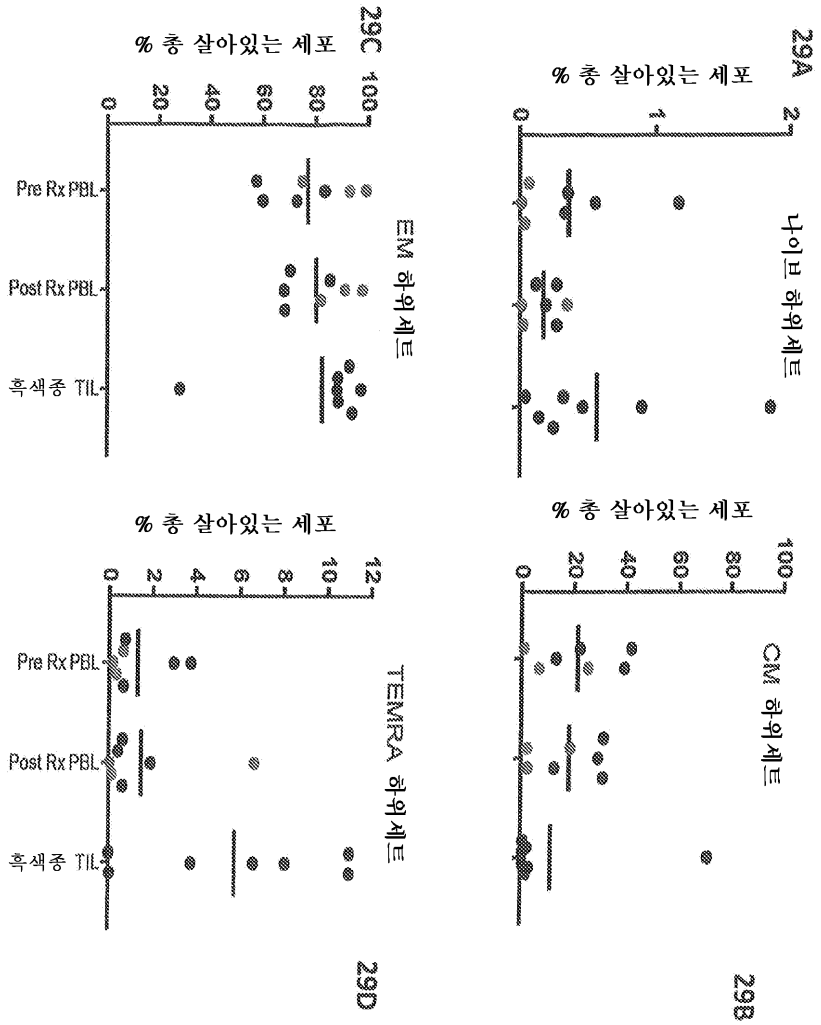
도면27


IFN-γ 생산 세포
(1x10^6개 PBL당)
20000
16000
12000
8000
4000
0
p=0.006
p=0.006
p=0.01
(1864)
(7530)
(11984)
PBL
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
신선한
PBMC
동결보존된
PBMC
방법 1에 의해 확장된 PBL
방법 2에 의해 확장된 PBL
방법 3에 의해 확장된 PBL

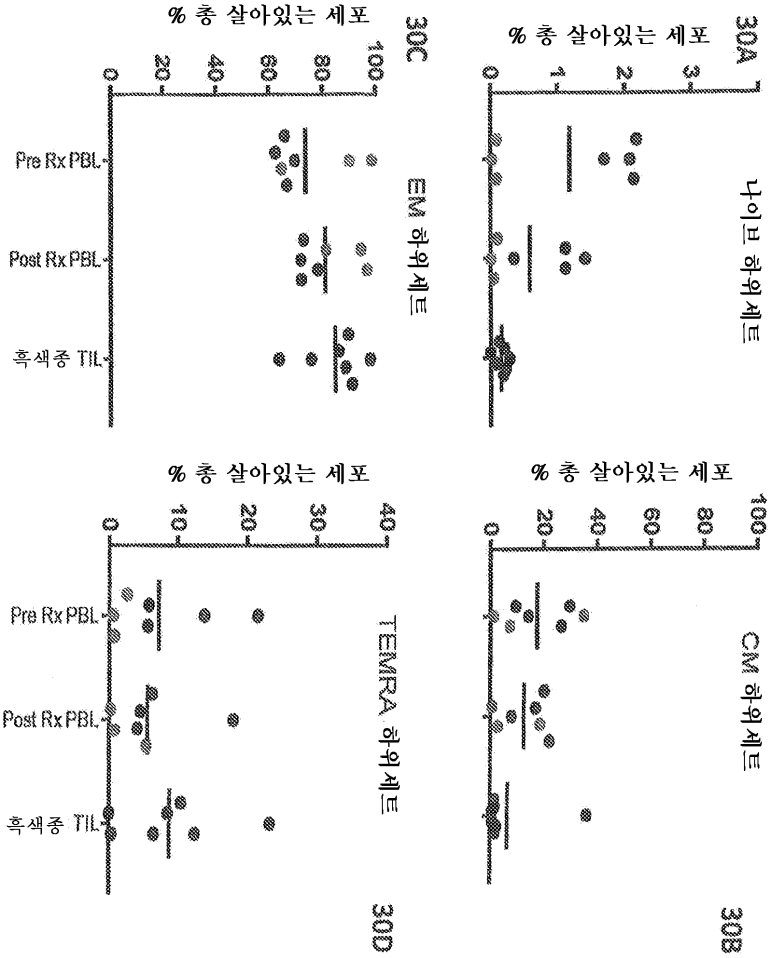
도면28


% 총 살아있는 세포
100
80
60
40
20
0
**
**
**
**
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
흑색종 TIL
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
흑색종 TIL
CD4
CD8
** p=0.0006

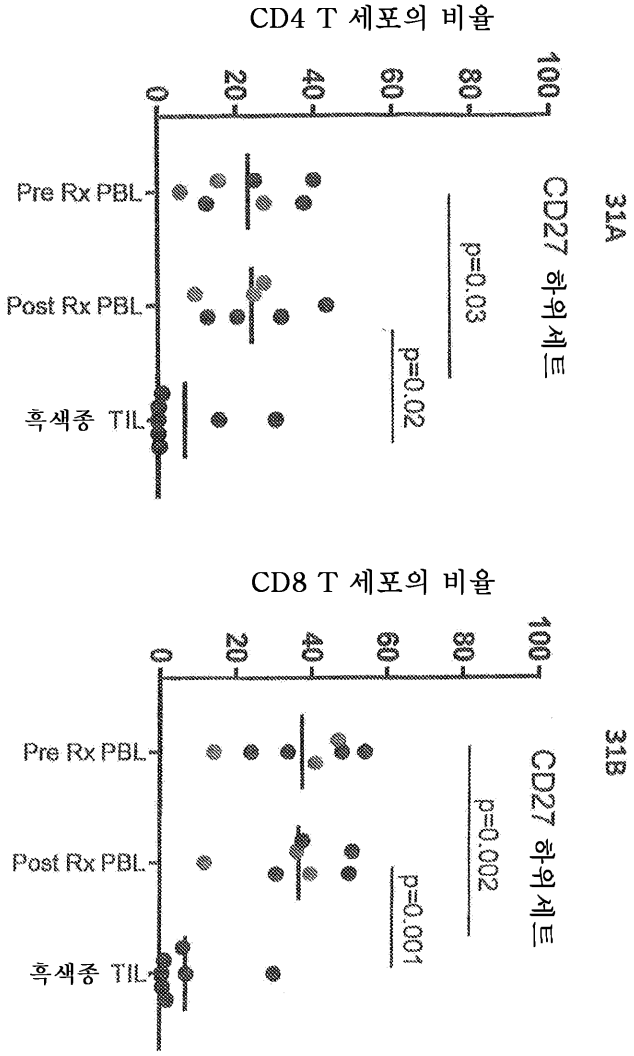
도면29


29A
% 총 살아있는 세포
0
1
2
나이브 하위세트
29B
% 총 살아있는 세포
0
20
40
60
80
100
CM 하위세트
29C
% 총 살아있는 세포
0
20
40
60
80
100
EM 하위세트
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
흑색종 TIL
29D
% 총 살아있는 세포
0
2
4
6
8
10
12
TEMRA 하위세트
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
흑색종 TIL

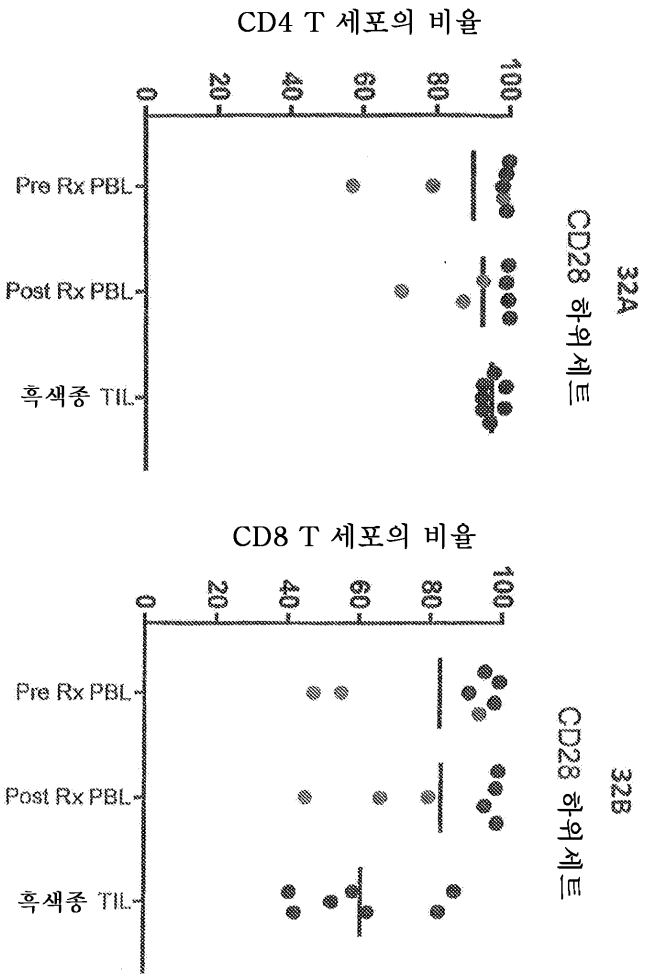
도면30


30A
% 총 살아있는 세포
0
1
2
3
나이브 하위세트
30B
% 총 살아있는 세포
0
20
40
60
80
100
CM 하위세트
30C
% 총 살아있는 세포
0
20
40
60
80
100
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
흑색종 TIL
EM 하위세트
30D
% 총 살아있는 세포
0
10
20
30
40
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
흑색종 TIL
TEMRA 하위세트

도면31

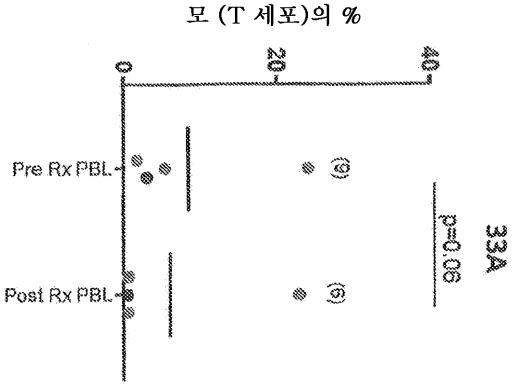

CD4 T 세포의 비율
0
20
40
60
80
100
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
흑색종 TIL
p=0.03
p=0.02
CD27 하위세트
31A
CD8 T 세포의 비율
0
20
40
60
80
100
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
흑색종 TIL
p=0.002
p=0.001
CD27 하위세트
31B

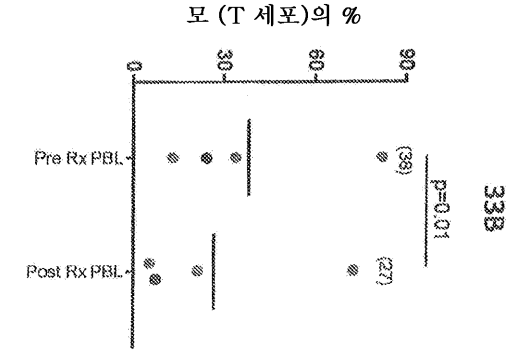
도면32


CD4 T 세포의 비율
0
20
40
60
80
100
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
흑색종 TIL
CD28 하위세트
32A

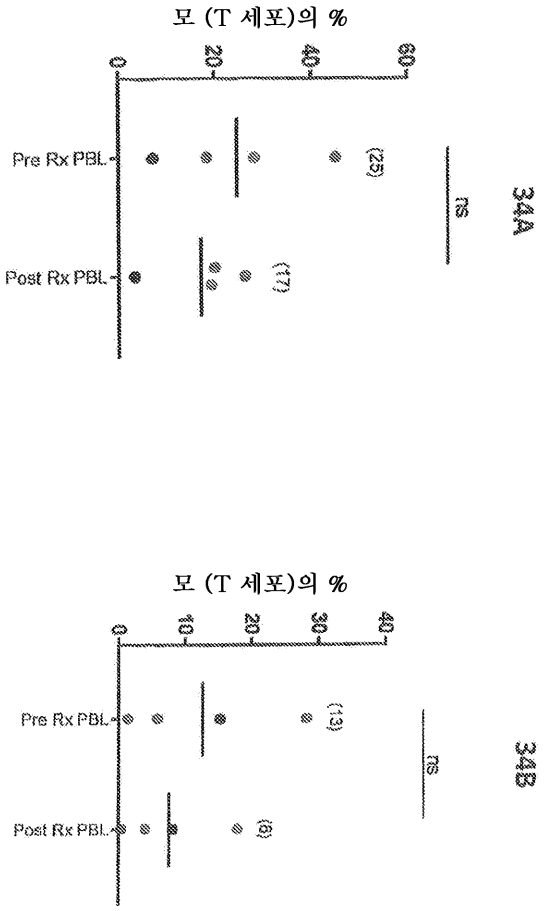
CD8 T 세포의 비율
0
20
40
60
80
100
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
흑색종 TIL
CD28 하위세트
32B

도면33

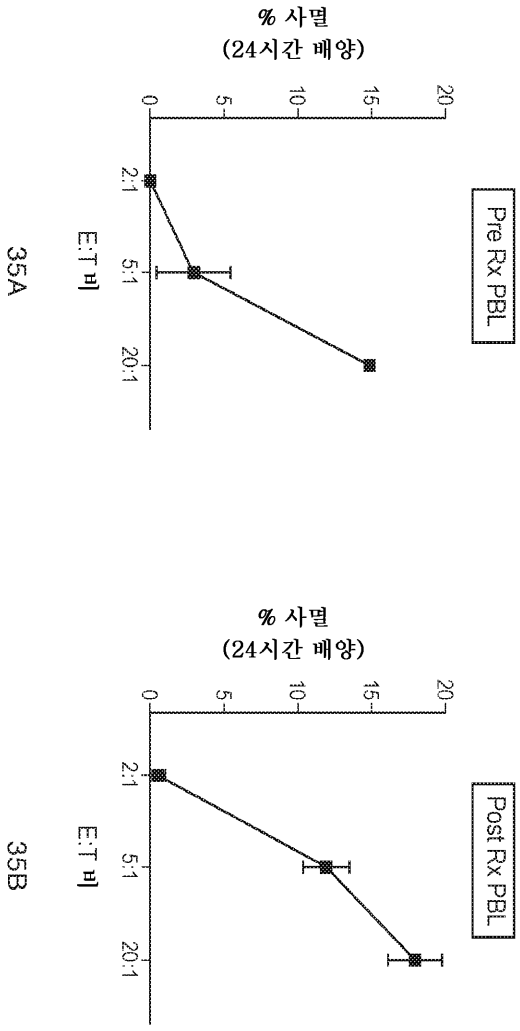

모 (T 세포)의 %
0
20
40
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
(9)
(9)
p=0.06
33A


모 (T 세포)의 %
0
30
60
90
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
(58)
(27)
p=0.01
33B

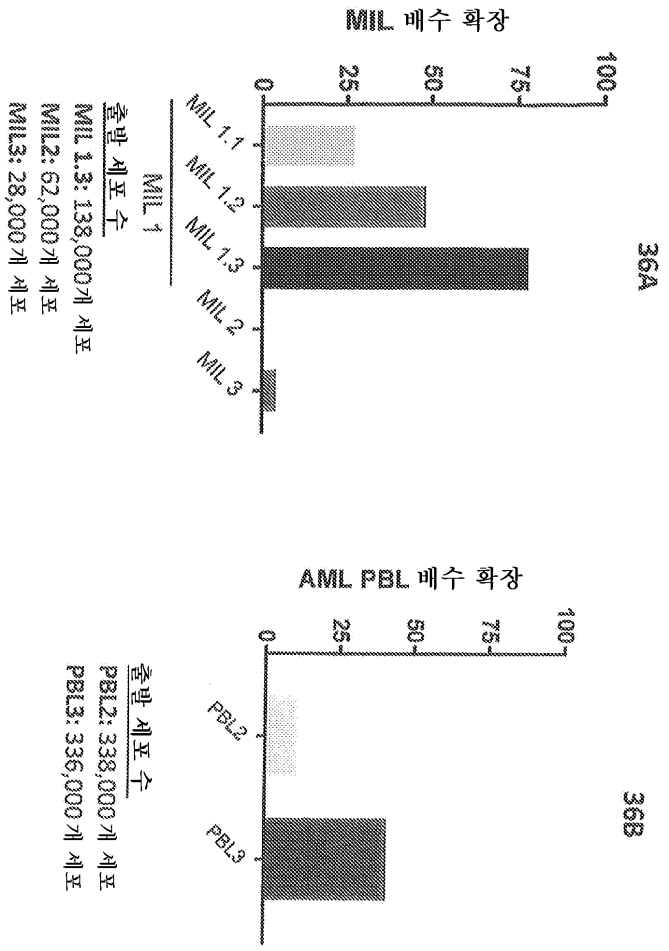
도면34


모 (T 세포)의 %
0
20
40
60
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
(25)
(17)
ns
34A
모 (T 세포)의 %
0
10
20
30
40
Pre Rx PBL
Post Rx PBL
(13)
(6)
ns
34B

도면35

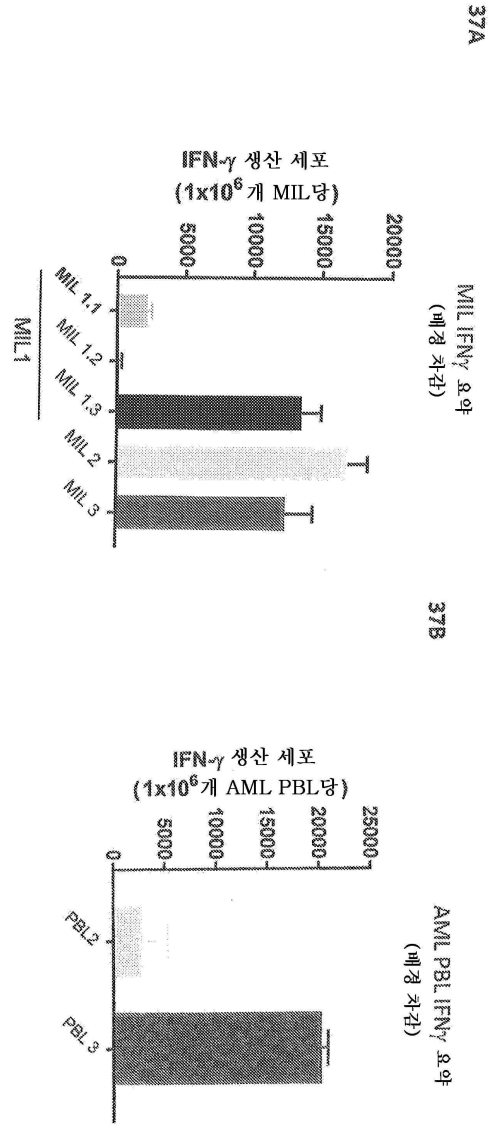

% 사멸
(24시간 배양)
0
5
10
15
20
2:1
5:1
20:1
E:T 비
Pre Rx PBL
35A
% 사멸
(24시간 배양)
0
5
10
15
20
2:1
5:1
20:1
E:T 비
Post Rx PBL
35B

도면36

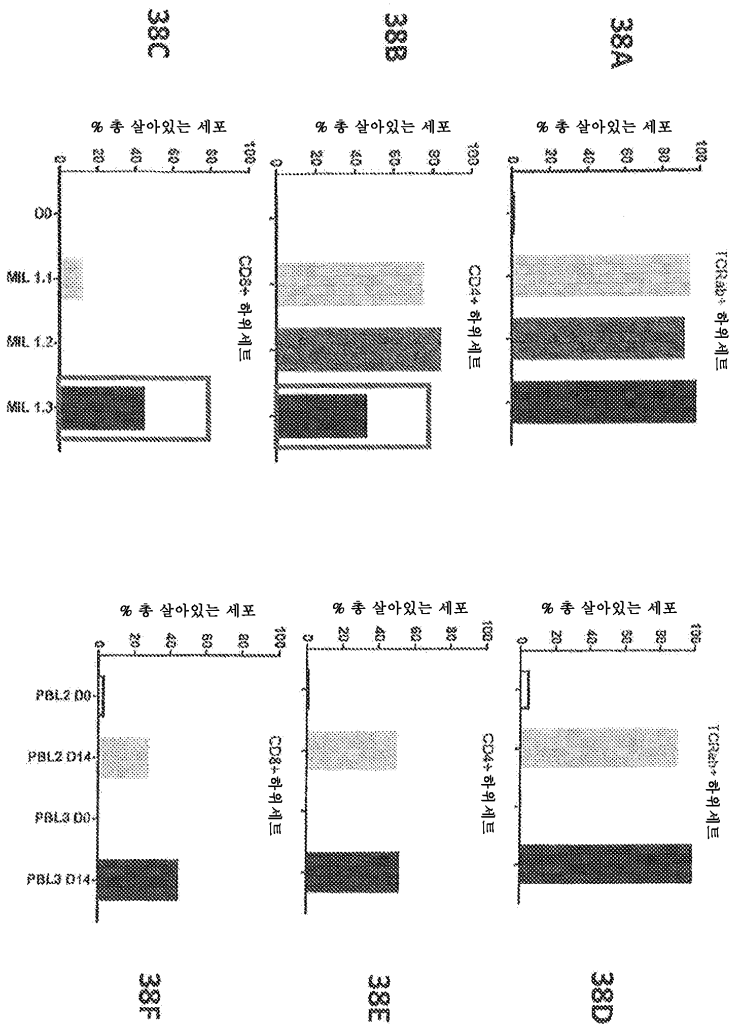

MIL 배수 확장
0
25
50
75
100
MIL 1.1
MIL 1.2
MIL 1.3
MIL 2
MIL 3
MIL 1
출발 세포 수
MIL 1.3: 138,000개 세포
MIL2: 62,000개 세포
MIL3: 28,000개 세포
36A

AML PBL 배수 확장
0
25
50
75
100
PBL2
PBL3
출발 세포 수
PBL2: 338,000개 세포
PBL3: 336,000개 세포
36B

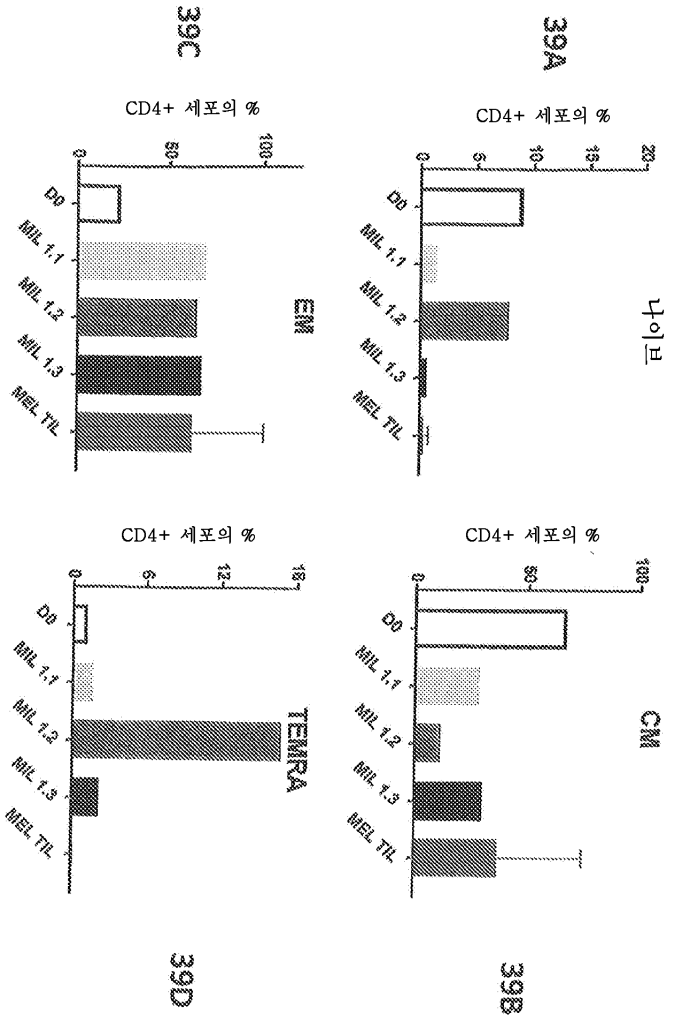
도면37


37A
IFN-γ 생산 세포
(1x10^6개 MIL당)
0
5000
10000
15000
20000
MIL 1.1
MIL 1.2
MIL 1.3
MIL 2
MIL 3
MIL1
MIL IFNγ 요약
(폐경 차감)
37B
IFN-γ 생산 세포
(1x10^6개 AML PBL당)
0
5000
10000
15000
20000
25000
PBL2
PBL 3
AML PBL IFNγ 요약
(폐경 차감)

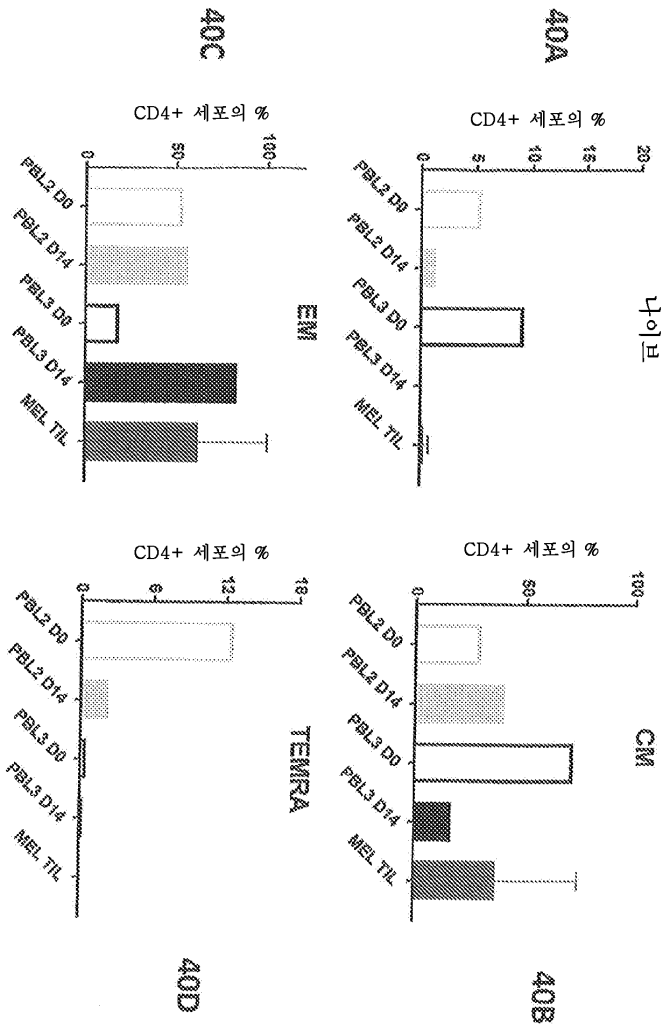
도면38


38A
38B
38C
38D
38E
38F
% 총 살아있는 세포
0
20
40
60
80
100
TCRαβ+ 하위세트
CD4+ 하위세트
CD8+ 하위세트
D0
MIL 1.1
MIL 1.2
MIL 1.3
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14

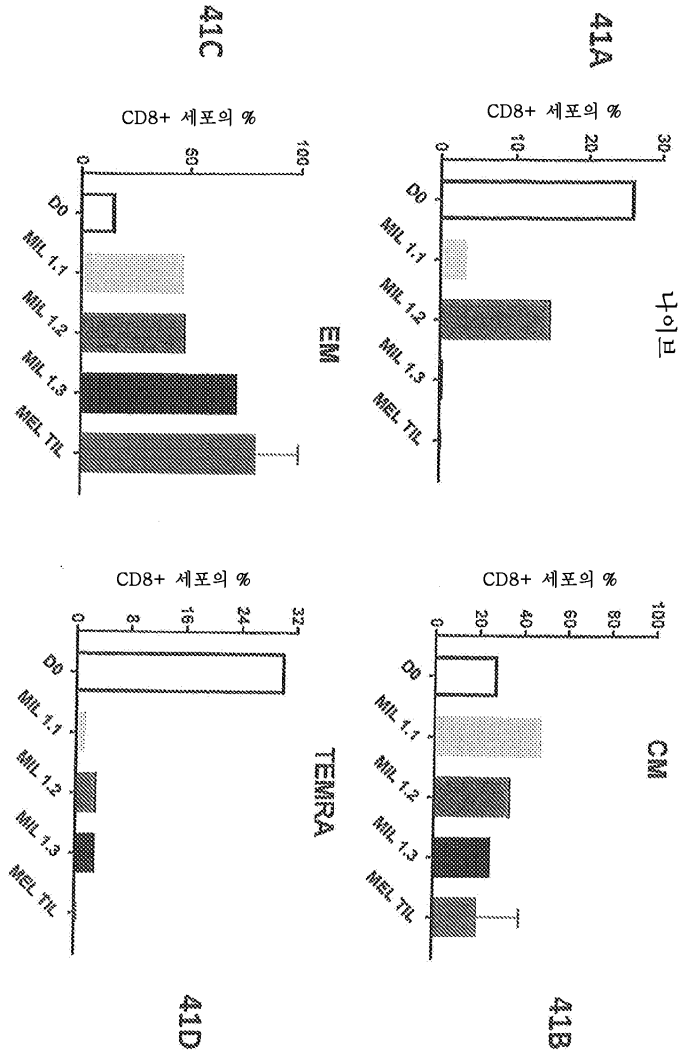
도면39


39C
CD4+ 세포의 %
0
50
100
DO
MIL 1:1
MIL 1:2
MIL 1:3
MEL TIL
EM
39A
CD4+ 세포의 %
0
5
10
15
20
DO
MIL 1:1
MIL 1:2
MIL 1:3
MEL TIL
naive
CD4+ 세포의 %
0
6
12
18
DO
MIL 1:1
MIL 1:2
MIL 1:3
MEL TIL
TEMRA
39D
CD4+ 세포의 %
0
50
100
DO
MIL 1:1
MIL 1:2
MIL 1:3
MEL TIL
CM
39B

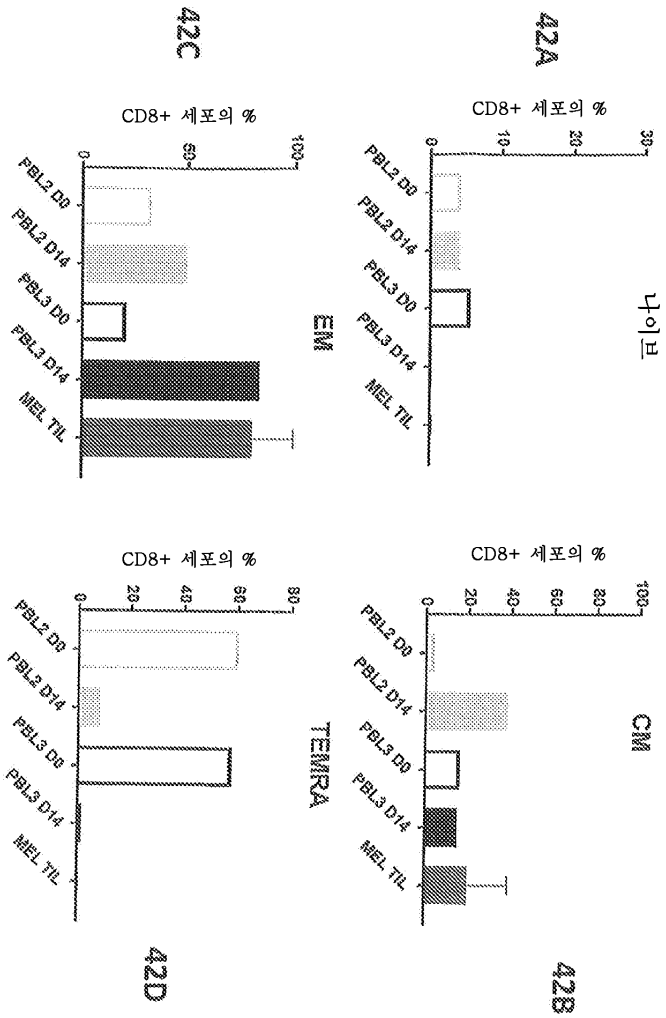
도면40


40A
CD4+ 세포의 %
0
5
10
15
20
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
MEL TIL
나이브
40B
CD4+ 세포의 %
0
50
100
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
MEL TIL
CM
40C
CD4+ 세포의 %
0
50
100
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
MEL TIL
EM
40D
CD4+ 세포의 %
0
6
13
18
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
MEL TIL
TEMRA

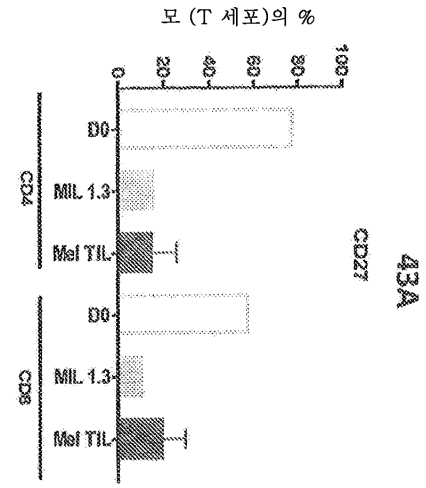
도면41


41A
CD8+ 세포의 %
0
10
20
30
D0
MIL 1.1
MIL 1.2
MIL 1.3
MEL TIL
나이브
41B
CD8+ 세포의 %
0
20
40
60
80
100
D0
MIL 1.1
MIL 1.2
MIL 1.3
MEL TIL
CM
41C
CD8+ 세포의 %
0
60
100
D0
MIL 1.1
MIL 1.2
MIL 1.3
MEL TIL
EM
41D
CD8+ 세포의 %
0
8
16
24
32
D0
MIL 1.1
MIL 1.2
MIL 1.3
MEL TIL
TEMRA

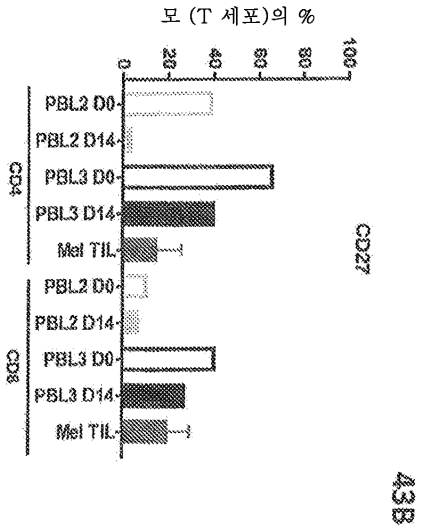
도면42


42A
CD8+ 세포의 %
0
10
20
30
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
MEL TIL
naive
42C
CD8+ 세포의 %
0
50
100
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
MEL TIL
EM
42B
CD8+ 세포의 %
0
20
40
60
80
100
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
MEL TIL
CM
42D
CD8+ 세포의 %
0
20
40
60
80
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
MEL TIL
TEMRA

도면43

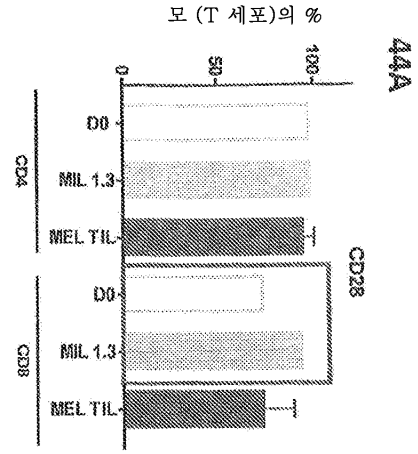

모 (T 세포)의 %
0
20
40
60
80
100
CD4
D0
MIL 1.3
Mel TIL
CD8
D0
MIL 1.3
Mel TIL
CD27

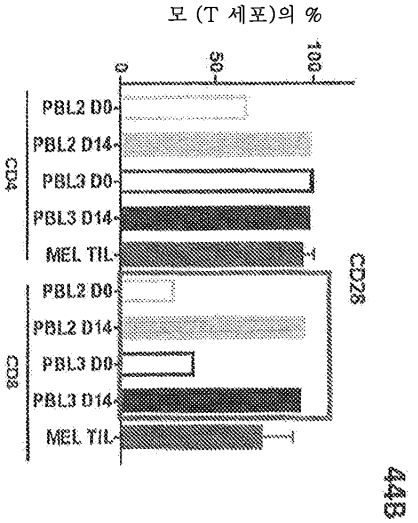
43A


모 (T 세포)의 %
0
20
40
60
80
100
CD4
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
Mel TIL
CD8
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
Mel TIL
CD27

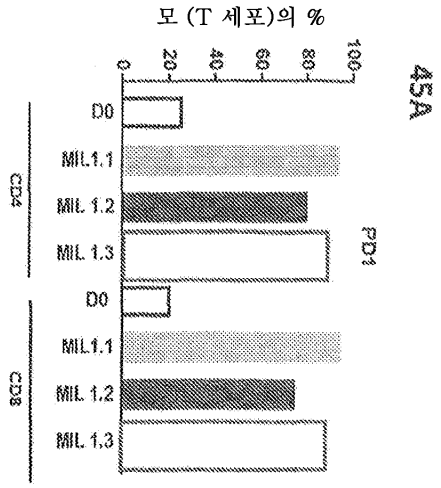
43B

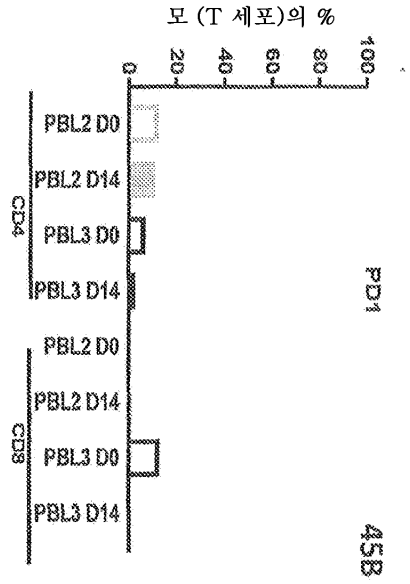
도면44


모 (T 세포)의 %
0
50
100
CD4
D0
MIL 1.3
MEL TIL
CD8
D0
MIL 1.3
MEL TIL
CD28
44A

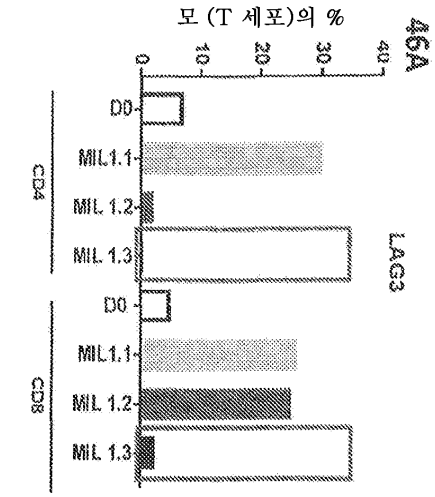

모 (T 세포)의 %
0
50
100
CD4
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
MEL TIL
CD8
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
MEL TIL
CD28
44B

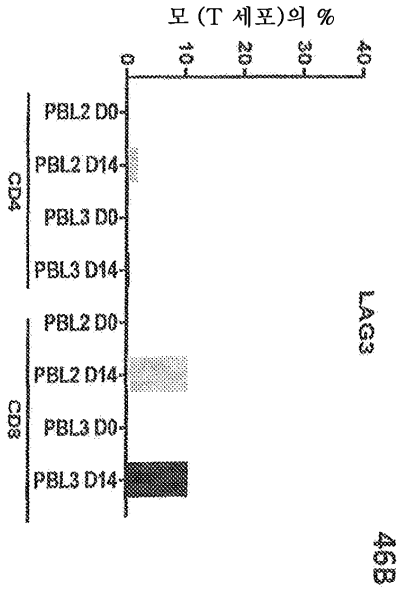
도면45


모 (T 세포)의 %
0
20
40
60
80
100
D0
MIL1.1
MIL 1.2
MIL 1.3
D0
MIL1.1
MIL 1.2
MIL 1.3
CD4
CD8
PD1
45A

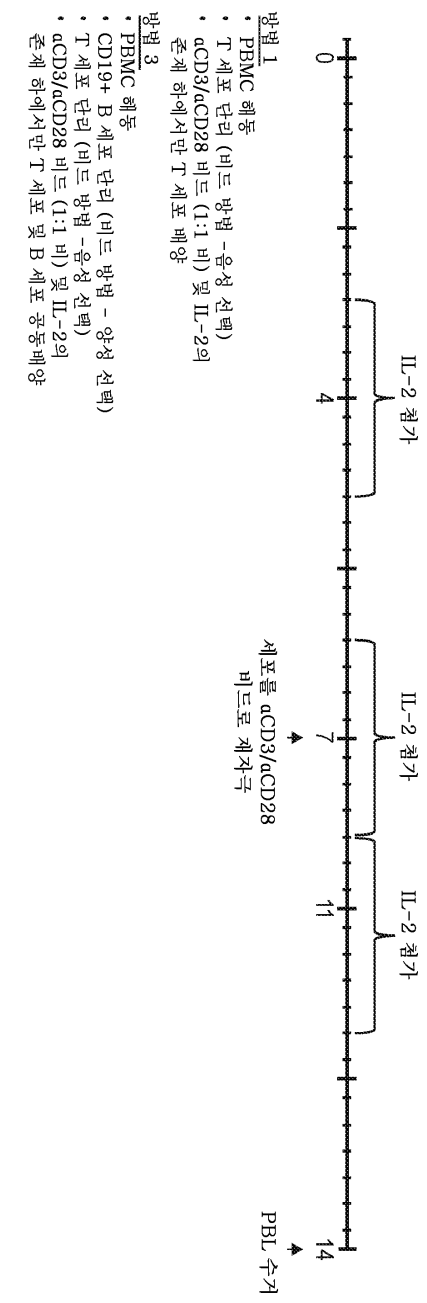

모 (T 세포)의 %
0
20
40
60
80
100
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
CD4
CD8
PD1
45B

도면46

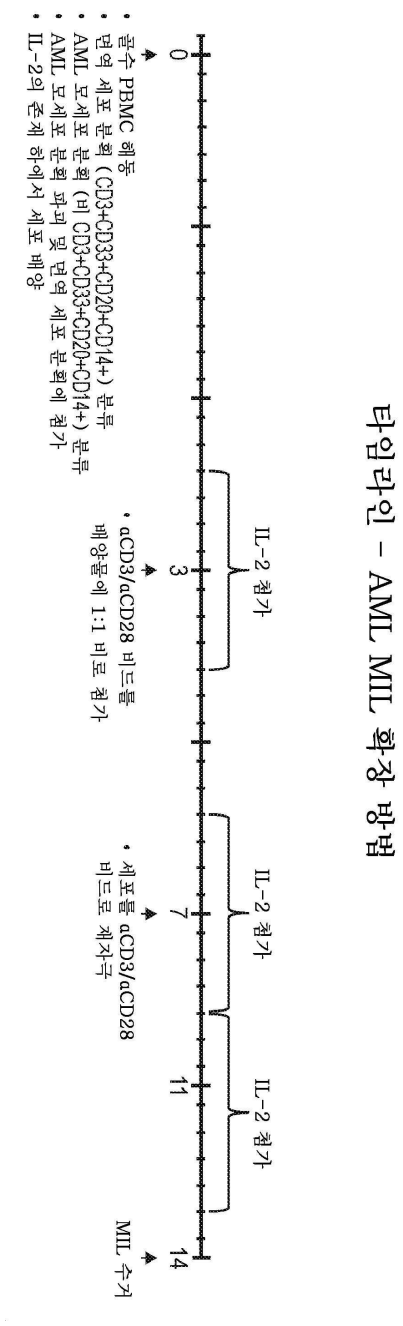

모 (T 세포)의 %
0
10
20
30
40
CD4
D0
MIL1.1
MIL 1.2
MIL 1.3
CD8
D0
MIL1.1
MIL 1.2
MIL 1.3
LAG3
46A


모 (T 세포)의 %
0
10
20
30
40
CD4
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
CD8
PBL2 D0
PBL2 D14
PBL3 D0
PBL3 D14
LAG3
46B

도면47


타임라인 - CLL PBL 확장 방법
0
4
7
11
14
IL-2 첨가
IL-2 첨가
IL-2 첨가
세포를 aCD3/aCD28
비드로 재자극
PBL 수거
방법 1
• PBMC 해동
• T 세포 단리 (비드 방법 -음성 선택)
• aCD3/aCD28 비드 (1:1 비) 및 IL-2의
존재 하에서만 T 세포 배양
방법 3
• PBMC 해동
• CD19+ B 세포 단리 (비드 방법 - 양성 선택)
• T 세포 단리 (비드 방법 -음성 선택)
• aCD3/aCD28 비드 (1:1 비) 및 IL-2의
존재 하에서만 T 세포 및 B 세포 공동배양

도면48



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Iovance Biotherapeutics, Inc.

<120> EXPANSION OF TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTES FROM LIQUID TUMORS AND THERAPEUTIC USES THEREOF

<130> 116983-5030-WO

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Muromonab heavy chain

<400> 1

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
180 185 190

Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
195 200 205

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

210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

245 250 255

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

260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His

275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg

290 295 300

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

305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu

325 330 335

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

340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

435 440 445

Gly Lys

450

<210> 2

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Muromonab light chain

<400> 2

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr

85 90 95

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

100 105 110

Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly

115 120 125

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

130 135 140

Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn

145 150 155 160

Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser

165 170 175

Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr

180 185 190

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

195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys

210

<210> 3

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant human IL-2

<400> 3

Met Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu

1 5 10 15

His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr

20 25 30

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro

35 40 45

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu

50 55 60

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His

65 70 75 80

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu

85 90 95

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr

100 105 110

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser

115 120 125

Ile Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 4

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> aldesleukin

<400> 4

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15
Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn

20 25 30
Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
35 40 45
Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
50 55 60
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65 70 75 80
Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

85 90 95
Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
100 105 110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
115 120 125
Ser Thr Leu Thr
130

<210> 5

<211> 130

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant human IL-4

<400> 5

Met His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn

1 5 10 15
Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp
20 25 30
Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg
35 40 45

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

50 55 60

Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu

65 70 75 80

Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly

85 90 95

Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn

100 105 110

Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys

115 120 125

Ser Ser

130

<210> 6

<211> 153

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant human IL-7

<400> 6

Met Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val

1 5 10 15

Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly

20 25 30

Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys

35 40 45

Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu

50 55 60

Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu

65 70 75 80

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

85 90 95

Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys

100 105 110

Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp

115 120 125

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

130 135 140

Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His

145 150

<210> 7

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant human IL-15

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Asn Thr Ser

115

<210> 8

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-21

<400> 8

Met Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val
1 5 10 15

Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro
20 25 30

Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys
35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg
50 55 60

Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr
65 70 75 80

Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp
85 90 95

Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser
100 105 110

Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly
115 120 125

Ser Glu Asp Ser
130