

(19)日本国特許庁(JP)

(12) **公表特許公報(A)**

(11)公表番号

特表2023-507432

(P2023-507432A)

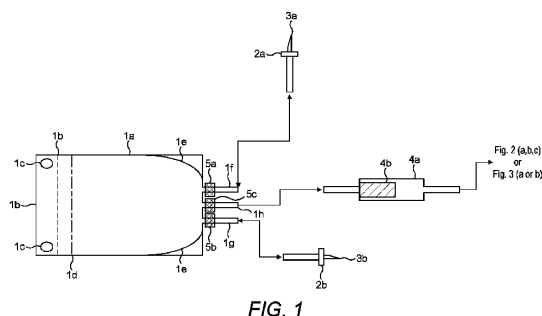
(43)公表日 令和5年2月22日(2023.2.22)

(51)国際特許分類		F I		テマコード (参考)	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783		4 B 0 2 9
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 B 0 6 5
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	Z	4 C 0 8 7
C 1 2 M	1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00	A	
C 1 2 M	3/00 (2006.01)	C 1 2 M	3/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全182頁)
(21)出願番号	特願2022-537513(P2022-537513)	(71)出願人	520272983		
(86)(22)出願日	令和2年12月18日(2020.12.18)		インスティル バイオ (ユーケイ) リ		
(85)翻訳文提出日	令和4年8月16日(2022.8.16)		ミテッド		
(86)国際出願番号	PCT/GB2020/053315		イギリス エム13 9エックスエックス		
(87)国際公開番号	WO2021/123832		マンチェスター グラフトン ストリート		
(87)国際公開日	令和3年6月24日(2021.6.24)		4 8		
(31)優先権主張番号	62/951,559	(74)代理人	100078282		
(32)優先日	令和1年12月20日(2019.12.20)		弁理士 山本 秀策		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100113413		
			弁理士 森下 夏樹		
(31)優先権主張番号	62/982,470	(74)代理人	100181674		
(32)優先日	令和2年2月27日(2020.2.27)		弁理士 飯田 貴敏		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181641		
			弁理士 石川 大輔		
(31)優先権主張番号	63/047,431	(74)代理人	230113332		
最終頁に続く		最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 腫瘍浸潤リンパ球を単離するためのデバイスおよび方法ならびにそれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を単離および凍結保存し、ＴＩＬの治療用集団を産生するための方法を提供し、これらの方法は、摘除された腫瘍をＴＩＬ集団の拡大の前に無菌脱凝集、富化および凍結保存するためのキットおよび半自動デバイスを使用することによる方法を含む。本発明は、ＴＩＬ、例えばＵＴＩＬの拡大および／または安定化のための方法、それを伴う組成物、ならびにそれを伴う処置方法も提供する。本発明では、相互接続されており、特異的な別個の機能を有する、容器のセットは、脱凝集および細胞化された腫瘍を処理するために、必要に応じて富化するしかし安定化するために、無菌閉鎖系を維持する。本質的に、本発明は、必要とされる時間ならびに摘除腫瘍の処理中の夾雑および操作員被曝のリスクを最小限に抑えるための急速予備滅菌環境を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の治療用集団を調製するための方法であって、

（a）対象から摘除した腫瘍を無菌で脱凝集させ、それによって脱凝集腫瘍産物を生じさせるステップであって、前記腫瘍が、前記脱凝集腫瘍産物を凍結保存することができるように十分に脱凝集される、ステップ；

（b）前記脱凝集腫瘍産物を好適な凍結保存温度に冷却するステップ；

（c）前記凍結保存された脱凝集腫瘍産物を、IL-2を含む細胞培養培地で培養することにより、第1の拡大を行って、TILの第1の集団を産生するステップ；

（d）追加のIL-2、OKT-3、および抗原提示細胞（APC）とともにTILの前記第1の集団を培養することにより、第2の拡大を行って、TILの第2の集団を産生するステップ；ならびに

（e）TILの前記第2の集団を回収および／または凍結保存するステップを含み、

前記脱凝集が、酵素的脱凝集および／または物理的脱凝集を含み、前記物理的脱凝集が、前記摘除腫瘍に印加される物理的圧力の繰り返しを含み；

前記ステップ（a）～（e）が閉鎖系で行われる、方法。

【請求項 2】

前記脱凝集が、最大 $6 \text{ N} / \text{cm}^2$ 、より好ましくは $3 \text{ N} / \text{cm}^2$ で毎分 120～360 回印加される物理的圧力の繰り返しを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記脱凝集腫瘍産物が、単一細胞浮遊液を含む、請求項 1 または 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4】

前記摘除腫瘍が、脱凝集の前に断片化されない、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

ステップ（a）が、酵素消化に好適な温度で行われる、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

ステップ（b）が、前記脱凝集腫瘍産物を前記凍結保存温度に直接冷却することを含む、請求項 1 から 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記脱凝集の期間が、90分もしくはそれ未満、または75分もしくはそれ未満、または60分もしくはそれ未満、または50分もしくはそれ未満である、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記脱凝集が、少なくとも1分間の間、継続または進行する、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記腫瘍が浸軟されない、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

定速で温度を低下させるようにプログラムされている温度制御されたデバイスにおいて前記脱凝集腫瘍産物を冷却するステップを含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記凍結保存温度が、 $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ であり、前記デバイスが、温度を $1^{\circ}\text{C} / \text{分}$ または $1.5^{\circ}\text{C} / \text{分}$ または $2^{\circ}\text{C} / \text{分}$ または $1^{\circ}\text{C} / \text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C} / \text{分}$ または $1^{\circ}\text{C} / \text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C} / \text{分}$ または $2^{\circ}\text{C} / \text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C} / \text{分}$ で低下させるようにプログラムされている、請求項 10 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 12】

前記 TIL が UTIL を含み、または前記 TIL が MTIL を含む、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 13】

TIL の前記第 1 の集団が、約 1,000,000 ~ 20,000,000 の TIL である、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 14】

ステップ (c) が、TIL を成長させて前記第 1 の集団を産生することを含み、ステップ (d) の前記第 2 の拡大が急速拡大を含む、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 15】

ステップ (c) が約 2 週間行われ、ステップ (d) が約 2 週間行われる、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

ステップ (c) および／またはステップ (d) における培養が、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、またはこれらの組合せを添加することを含む、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

摘除腫瘍組織を、脱凝集液が入っている可撓性容器に入れるステップ、前記容器を密封するステップ、前記腫瘍組織を物理的および／または酵素的脱凝集に付すステップ、ならびに脱凝集された腫瘍組織を凍結保存するステップを含む、請求項 1 から 16 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 18】

請求項 1 から 17 のいずれか一項に記載の方法により得られる、凍結保存された腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の治療用集団。

【請求項 19】

約 5×10^9 ~ 5×10^{10} の T 細胞を含む、請求項 18 に記載の治療用集団。

【請求項 20】

請求項 18 または 19 に記載の治療用集団の凍結保存バッグ。

【請求項 21】

静脈内注入に使用するための、請求項 20 に記載の凍結保存バッグ。

30

【請求項 22】

腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の治療用集団を調製するための方法であって、

(a) 対象から摘除した腫瘍を無菌で脱凝集させ、それによって脱凝集腫瘍産物を生じさせるステップであって、前記腫瘍が、前記脱凝集腫瘍産物を凍結保存することができるように十分に脱凝集される、ステップ；

(b) 凍結保存された脱凝集腫瘍産物を、IL-2 を含む細胞培養培地で培養することにより、第 1 の拡大を行って、TIL の第 1 の集団を産生するステップ；

(c) 追加の IL-2、OKT-3、および抗原提示細胞 (APC) とともに TIL の前記第 1 の集団を培養することにより、第 2 の拡大を行って、TIL の第 2 の集団を産生するステップ；ならびに

40

(d) TIL の前記第 2 の集団を回収および／または凍結保存するステップを含み、

前記脱凝集が、酵素的脱凝集および／または物理的脱凝集を含み、前記物理的脱凝集が、摘除腫瘍に印加される物理的圧力の繰り返しを含み；

前記ステップ (a) ~ (d) が閉鎖系で行われる、方法。

【請求項 23】

前記脱凝集が、最大 6 N/cm^2 、より好ましくは 3 N/cm^2 で毎分 120 ~ 360 回印加される物理的圧力の繰り返しを含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

50

前記脱凝集腫瘍産物が、単一細胞浮遊液を含む、請求項 22 または 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記摘除腫瘍が、脱凝集の前に断片化されない、請求項 22 から 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

ステップ (a) が、酵素消化に好適な温度で行われる、請求項 22 から 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

前記脱凝集の期間が、90 分もしくはそれ未満、または 75 分もしくはそれ未満、または 60 分もしくはそれ未満、または 50 分もしくはそれ未満である、請求項 22 から 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

前記脱凝集が、少なくとも 1 分の間、継続または進行する、請求項 22 から 27 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

前記腫瘍が浸軟されない、請求項 22 から 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

定速で温度を低下させるようにプログラムされている温度制御されたデバイスにおいて前記脱凝集腫瘍産物を冷却するステップを含む、請求項 22 から 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

前記凍結保存温度が、 $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ であり、前記デバイスが、温度を $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $2^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で低下させるようにプログラムされている、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記 TIL が UTIL を含み、または前記 TIL が MTIL を含む、請求項 22 から 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

TIL の前記第 1 の集団が、約 1,000,000 ~ 20,000,000 の TIL である、請求項 22 から 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

ステップ (b) が、TIL を成長させて前記第 1 の集団を産生することを含み、ステップ (c) の前記第 2 の拡大が急速拡大を含む、請求項 22 から 33 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 35】

ステップ (b) が約 2 週間行われ、ステップ (c) が約 2 週間行われる、請求項 22 から 34 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

ステップ (b) および／またはステップ (c) における培養が、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、またはこれらの組合せを添加することを含む、請求項 22 から 35 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

摘除腫瘍組織を、脱凝集液が入っている可撓性容器に入れるステップ、前記容器を密封するステップ、前記腫瘍組織を物理的および／または酵素的脱凝集に付すステップ、ならびに脱凝集された腫瘍組織を凍結保存するステップを含む、請求項 22 から 36 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

請求項 22 から 37 のいずれか一項に記載の方法により得られる、凍結保存された腫瘍

10

20

30

40

50

浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療用集団。

【請求項３９】

約 $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ のＴ細胞を含む、請求項３８に記載の治療用集団。

【請求項４０】

請求項３８または３９に記載の治療用集団の凍結保存バッグ。

【請求項４１】

静脈内注入に使用するための、請求項４０に記載の凍結保存バッグ。

【請求項４２】

閉鎖系で腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の治療用集団を調製するための方法であって、

（ａ）（ｉ）摘除腫瘍を凍結保存し、凍結保存された腫瘍を脱凝集させるステップ、または

10

（ｉｉ）摘除腫瘍を脱凝集させ、脱凝集された腫瘍を凍結保存するステップ、または

（ｉｉｉ）摘除腫瘍を凍結保存し、前記腫瘍を処理して複数の腫瘍断片にするステップ、または

（ｉｖ）摘除腫瘍を処理して複数の腫瘍断片にし、前記腫瘍断片を凍結保存するステップ；

（ｂ）凍結保存された脱凝集腫瘍産物を、ＩＬ－２を含む細胞培養培地で培養することにより、第１の拡大を行って、ＴＩＬの第１の集団を産生するステップ；

（ｃ）追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、および抗原提示細胞（ＡＰＣ）とともにＴＩＬの前記第１の集団を培養することにより、第２の拡大を行って、ＴＩＬの第２の集団を産生するステップ；ならびに

20

（ｄ）ＴＩＬの前記第２の集団を回収および／または凍結保存するステップを含む方法。

【請求項４３】

前記脱凝集が、物理的脱凝集、酵素的脱凝集、または物理的および酵素的脱凝集を含む、請求項４２に記載の方法。

【請求項４４】

前記脱凝集が、前記摘除腫瘍に印加される物理的圧力の繰り返しを含む、請求項４２または４３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４５】

前記脱凝集が、最大 $6 \text{ N} / \text{cm}^2$ 、より好ましくは $3 \text{ N} / \text{cm}^2$ で毎分 $120 \sim 360$ 回印加される物理的圧力の繰り返しを含む、請求項４２から４４のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項４６】

前記物理的脱凝集が、粉碎することおよび剪断することを含む、請求項４２から４５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４７】

凍結保存された脱凝集腫瘍が、単一細胞浮遊液を含む、請求項４２から４６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４８】

脱凝集させるステップが、酵素消化に好適な温度で行われる、請求項４２から４７のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項４９】

凍結保存するステップが、前記摘除または脱凝集腫瘍を設定凍結保存温度に直接冷却することを含む、請求項４２から４８のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５０】

定速で温度を低下させるようにプログラムされている温度制御されたデバイスにおいて前記摘除または脱凝集腫瘍を冷却するステップを含む、請求項４２から４９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５１】

50

前記凍結保存温度が、 $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ であり、前記デバイスが、温度を $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $2^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で低下させるようにプログラムされている、請求項50に記載の方法。

【請求項52】

対象から摘除した腫瘍組織からTILの治療用集団を単離するための方法であって、

(a) プログラム可能なプロセッサと使い捨ての無菌キットとを含む、腫瘍組織の半自動化無菌脱凝集のための自動化デバイスに摘除腫瘍組織を入れるステップであって、前記無菌キットが、閉鎖系を含み、前記無菌キットが、

腫瘍組織を含む材料の受け取りおよび処理のための脱凝集モジュールと、

脱凝集された固形組織材料の濾過ならびに脱凝集されていない組織および濾液の分離のための必要に応じた富化モジュールと、

脱凝集産物材料を必要に応じてさらに処理および／または保管するための安定化モジュールとを含む、

前記モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器を含み、前記容器が、それらの間の前記組織材料の流れを可能にするように適合された1つまたは複数の導管により接続されており、

前記モジュールの各々が、前記1つまたは複数の可撓性容器への培地および／または試薬の無菌投入を可能にするための1つまたは複数の口を含む、ステップ；

(b) 前記摘除腫瘍を無菌で脱凝集させ、それによって脱凝集腫瘍を生じさせるステップ；

(c) 前記脱凝集腫瘍を、IL-2を含む細胞培養培地で培養することにより、第1の拡大を行って、UTILの第1の集団を産生するステップ；

(d) 追加のIL-2、OKT-3、および抗原提示細胞(APC)とともにUTILの前記第1の集団を培養することにより、第2の拡大を行って、TILの第2の集団を産生するステップ；および

(f) UTILの第2の集団を回収および／または凍結保存するステップを含む方法。

【請求項53】

前記脱凝集が、前記摘除腫瘍に印加される物理的圧力の繰り返しを含む、請求項32に記載の方法。

【請求項54】

前記脱凝集が、最大 $6\text{ N}/\text{cm}^2$ 、より好ましくは $3\text{ N}/\text{cm}^2$ で毎分120～360回印加される物理的圧力の繰り返しを含む、請求項52または53のいずれか一項に記載の方法。

【請求項55】

前記摘除腫瘍が、脱凝集の前に断片化されない、請求項52から54のいずれか一項に記載の方法。

【請求項56】

前記腫瘍組織が浸軟されない、請求項52から55のいずれか一項に記載の方法。

【請求項57】

前記脱凝集が、90分間もしくはそれ未満、または75分間もしくはそれ未満、または60分間もしくはそれ未満、または50分間もしくはそれ未満行われる、請求項52から56のいずれか一項に記載の方法。

【請求項58】

ステップ(b)の後に、(b')前記脱凝集腫瘍を前記安定化モジュール内で凍結保存するステップを含む、請求項52から57のいずれか一項に記載の方法。

【請求項59】

ステップ(b')が、前記脱凝集腫瘍産物を凍結保存温度に直接冷却することを含む、

10

20

30

40

50

請求項 58 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 60】

前記凍結保存温度が、 $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ であり、前記デバイスが、温度を $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $2^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で低下させるようにプログラムされている、請求項 59 に記載の方法。

【請求項 61】

前記自動化デバイスが、
脱凝集プロセスが、前記必要に応じた富化モジュールへの脱凝集固形組織の移送の前に、前記脱凝集モジュールにおいて完了しているかどうかを認識することができるセンサー

10

；
前記脱凝集モジュール、前記富化モジュールおよび／もしくは前記安定化モジュールのうちの1つもしくは複数の容器内で必要とされる培地の量を決定し、それぞれの容器間の材料の移送を制御するための重量センサー；

前記脱凝集モジュール、前記富化モジュールおよび／もしくは前記安定化モジュールのうちの1つもしくは複数の容器内の温度を制御するためのセンサー；

前記モジュール内の各容器の投入口と排出口の間の培地の移送を制御するための少なくとも1つの気泡センサー；

前記投入口と前記排出口の間の培地の移送を制御するための少なくとも1つのポンプ、必要に応じて蠕動ポンプ；

20

前記富化モジュール内の圧力を評定するための圧力センサー；

前記富化モジュール内での接線流濾過プロセスを制御するための1つもしくは複数の弁；ならびに／または

各モジュールの前記投入口と前記排出口の間の培地の移送を制御するための1つもしくは複数のクランプ
のうちの1つまたは複数、任意の組合せでさらに含む、請求項 52 から 60 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 62】

前記プログラム可能なプロセッサが、前記固形組織材料の物理的および酵素的分解を可能にするように前記脱凝集モジュールを制御する、および／または前記プログラム可能なプロセッサが、富化された脱凝集固形組織を前記容器内で凍結保存するように前記安定化モジュールを制御する、請求項 52 から 61 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 63】

前記脱凝集モジュールが、前記腫瘍組織を最大 $6\text{ N}/\text{cm}^2$ 、より好ましくは $3\text{ N}/\text{cm}^2$ で毎分120～360回、繰り返し粉碎および剪断し、前記安定化モジュールが、前記脱凝集された腫瘍組織を $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ に冷却し、前記デバイスが、温度を $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $2^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で低下させるようにプログラムされている、請求項 52 から 62 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 64】

40

TILの治療用集団を単離するための閉鎖系での使用に好適な可撓性容器であって、組織を処理するために、

前記可撓性容器の少なくとも3つの縁部が製造中に密封される、密封可能なポリマーで作られた1つまたは複数の層と、

それを通して組織材料が使用中に挿入される、前記可撓性容器の開口縁部と、

前記可撓性容器をチューブによって少なくとも1つの要素に連結するように構成された1つまたは複数の継手と
を含み、

前記開口縁部に近接したセクションが、組織材料が前記可撓性容器内に配置された後に密封されてシールを形成する、可撓性容器。

50

【請求項 6 5】

前記シールが、ヒートシーラーを使用して、所定の圧力、所定の温度および所定の時間枠で操作して形成される、請求項 6 4 に記載の可撓性容器。

【請求項 6 6】

前記可撓性容器に入れられた組織材料を機械的に粉砕するデバイスで使用されるように構成されている、請求項 6 4 または 6 5 のいずれか一項に記載の可撓性容器。

【請求項 6 7】

最大 $6 \text{ N} / \text{cm}^2$ 、より好ましくは $3 \text{ N} / \text{cm}^2$ で毎分 120 ～ 360 回印加される物理的圧力の繰り返しに好適である、請求項 6 4 から 6 6 のいずれか一項に記載の可撓性容器。

10

【請求項 6 8】

腫瘍組織から TIL を抽出するためのシステムであって、

脱凝集可撓性容器、

安定化可撓性容器、および

組織の供給源、前記組織の状態、または識別子のうちの少なくとも 1 つを提供することができる、前記脱凝集可撓性容器または前記安定化可撓性容器の少なくとも一方の上に位置する少なくとも 1 つのインジケータタグを含むキットと；

脱凝集可撓性容器内の少なくとも一部の組織を処置して処理された流体を形成することができる脱凝集要素と；

20

前記処理された流体の少なくとも一部を富化して所望の材料を形成することができる富化要素と；

前記所望の材料の一部分を前記安定化可撓性容器内で保管することおよび必要に応じて凍結を制御することができる安定化要素と；

組織の供給源、または前記安定化要素における前記組織の状態の少なくとも一方を提供することができる、前記脱凝集要素または前記安定化要素の少なくとも一方の上に位置する少なくとも 1 つのインジケータタグリーダーとを含む、システム。

【請求項 6 9】

対象におけるがんを処置するための方法であって、

30

(a) 前記対象から摘除した腫瘍を無菌で脱凝集させ、それによって脱凝集腫瘍産物を生じさせるステップであって、前記腫瘍が、前記脱凝集腫瘍産物を凍結保存することができるように十分に脱凝集される、ステップ；

(b) 前記脱凝集腫瘍産物を好適な凍結保存温度に冷却するステップ；

(c) 凍結保存された脱凝集腫瘍産物を、IL-2 を含む細胞培養培地で培養することにより、第 1 の拡大を行って、TIL の第 1 の集団を産生するステップ；

(d) 追加の IL-2、OKT-3、および抗原提示細胞 (APC) とともに TIL の前記第 1 の集団を培養することにより、第 2 の拡大を行って、TIL の第 2 の集団を産生するステップ；

(e) TIL の前記第 2 の集団を回収および／または凍結保存するステップ；ならびに

40

(f) TIL の前記第 2 の集団を前記対象に投与するステップ

を含み、

前記脱凝集が、酵素的脱凝集および／または物理的脱凝集を含み、前記物理的脱凝集が、摘除腫瘍に印加される物理的圧力の繰り返しを含み；

前記ステップ (a) ～ (e) が閉鎖系で行われる、方法。

【請求項 7 0】

前記脱凝集が、最大 $6 \text{ N} / \text{cm}^2$ 、より好ましくは $3 \text{ N} / \text{cm}^2$ で毎分 120 ～ 360 回印加される物理的圧力の繰り返しを含む、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記脱凝集腫瘍産物が、単一細胞浮遊液を含む、請求項 6 9 または 7 0 のいずれか一項

50

に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記摘除腫瘍が、脱凝集の前に断片化されない、請求項 6 9 から 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 3】

ステップ (a) が、酵素消化に好適な温度で行われる、請求項 6 9 から 7 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 4】

ステップ (b) が、前記脱凝集腫瘍産物を前記凍結保存温度に直接冷却することを含む、請求項 6 9 から 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記脱凝集の期間が、90 分もしくはそれ未満、または 75 分もしくはそれ未満、または 60 分もしくはそれ未満、または 50 分もしくはそれ未満である、請求項 6 9 から 7 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記脱凝集が、少なくとも 1 分の間、継続または進行する、請求項 6 9 から 7 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 7】

前記腫瘍が浸軟されない、請求項 6 9 から 7 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 8】

定速で温度を低下させるようにプログラムされている温度制御されたデバイスにおいて前記脱凝集腫瘍産物を冷却するステップを含む、請求項 6 9 から 7 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 9】

前記凍結保存温度が、 $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ であり、前記デバイスが、温度を $1^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $2^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $1^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ または $2^{\circ}\text{C}/\text{分} \pm 0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で低下させるようにプログラムされている、請求項 7 8 に記載の方法。

【請求項 8 0】

前記 T I L が U T I L を含み、または前記 T I L が M T I L を含む、請求項 6 9 から 7 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 1】

T I L の前記第 1 の集団が、約 1,000,000 ~ 20,000,000 の T I L である、請求項 6 9 から 8 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 2】

ステップ (c) が、T I L を成長させて前記第 1 の集団を産生することを含み、ステップ (d) の前記第 2 の拡大が急速拡大を含む、請求項 6 9 から 8 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 3】

ステップ (c) が約 2 週間行われ、ステップ (d) が約 2 週間行われる、請求項 6 9 から 8 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 4】

ステップ (c) および／またはステップ (d) における培養が、I L 7、I L - 1 2、I L - 1 5、I L - 1 8、I L - 2 1、またはこれらの組合せを添加することを含む、請求項 6 9 から 8 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8 5】

摘除腫瘍組織を、脱凝集液が入っている可撓性容器に入れるステップ、前記容器を密封するステップ、前記腫瘍組織を物理的および／または酵素的脱凝集に付すステップ、ならびに脱凝集された腫瘍組織を凍結保存するステップを含む、請求項 6 9 から 8 4 のいずれか一項に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 86】

TILSの前記第2の集団が、約 $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ のT細胞を含む、請求項69から85のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 87】

前記がんが、膀胱がん、乳がん、ヒトパピローマウイルスにより引き起こされるがん、子宮頸がん、頭頸部がん（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、肺がん、黒色腫、卵巣がん、非小細胞肺癌（NSCLC）、腎がんまたは腎細胞癌である、請求項69から86のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願および参照による援用

本願は、2019年12月20日出願した米国特許仮出願第62/951,559号、2020年2月27日出願した米国特許仮出願第62/982,470号、2020年7月2日出願した米国特許仮出願第29/740,293号および2020年7月2日出願した米国特許仮出願第63/047,431号の優先権の利益を主張するものであり、前記仮出願の内容は、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

参照により本明細書に組み込まれる、2017年1月13日出願した英国特許出願第GB1700621.4号、2018年1月12日出願した欧州特許出願EP18701791.8、2018年1月12日出願し、2018年7月19日にPCT公開番号WO2018/130845として公開された、国際特許出願第PCT/GB2018/050088号、欧州特許公開EP3568459、および2019年12月20日出願した米国特許出願第62/951,559号を参照されたい。

【0003】

2019年3月1日出願した英国特許出願第GB1902763.0号、2019年3月27日出願した英国特許出願第GB1904249.8号、および2020年2月28日出願し、2020年9月10日にWO2020/177920として公開された国際特許出願第PCT/EP2020/000053号を参照されたい。

【0004】

上述出願、Biomarker Predictive of Tumour Infiltrating Lymphocyte Therapy and the Uses Thereof、WO2019145711A1 PCT/GB2019/050188、Tumor Infiltrating Lymphocyte Therapy and Uses Thereof USA、PCT/GB2020/051790および米国出願第62/878,001号、Receptors Providing Targeted Costimulation for Adoptive Cell Therapy WO2020/152451、米国出願第62/951,770号およびGB1900858.0、Cells Expressing Recombinant Growth Factor Receptors WO2017/103596A1、米国出願第16/061,435号、および欧州特許公開EP3390436、ならびにChimeric Growth Factor Receptors WO2019243835A1 PCT/GB2019/051745、ならびにそれらに引用されているまたはそれらの審査中の全ての文献（「出願引用文献」）および出願引用文献において引用または参照されている全ての文献、および本明細書において引用または参照されている全ての文献（「本明細書引用文献」）および本明細書引用文献において引用または参照されている全ての文献は、本明細書においてまたは参照により本明細書に組み込まれるあらゆる文献において言及されているあらゆる製品についてのあらゆる製造業者の使用説明書、説明、製品仕様書および製品シートとともに、これにより参照により本明細書に組み込まれ、本発明の実施の際に利用され得る。より具体的には、全ての参考文献は、各々の個々の文献が参照により本明細書に組み込まれると具体的かつ個々に示されている場合と同程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0005】

発明の分野

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を摘除腫瘍から腫瘍の半自動無菌組織処理によって単離および凍結し、それによってTILの治療用集団を産生するための方法およびデバイスを提供する。

【背景技術】

【0006】

発明の背景

T細胞は、骨髄内にある造血幹細胞から生じるが、その後、胸腺内に遊走し、そこで成熟する。成熟の過程で、T細胞が一連の選択事象を経ることによって、T細胞の多様なレパートリーが生じる。その後、これらの細胞は、末梢循環に放出されて、適応免疫系の一部としてのそれらの特異的機能を果たす。

10

【0007】

T細胞は、同種の細胞群ではなく多くの系統からなり、これらの主要なタイプは、2つのさらなる細胞マーカーの発現により定義される。CD4発現T細胞は、一般にヘルパー（Th）と呼ばれ、免疫系の多くの機能を、細胞間接触により、およびサイトカインと呼ばれるメディエーター分子の産生によって、編成すると考えられている。CD8 T細胞は、細胞傷害性（Tc）であると思われており、標的細胞の直接死滅させることを遂行する細胞であると考えられている。これらの活性は全て、T細胞受容体／抗原／MHC相互作用によって制御される—その結果として、標的細胞上のペプチド／MHCの認識に成功すると、CD4およびCD8細胞は、サイトカイン産生および細胞傷害活性によって、ウイルス感染細胞および腫瘍細胞をはじめとする標的細胞を消失させるように協調して機能する。

20

【0008】

T細胞は、無傷のタンパク質（抗原）を認識せず、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）と呼ばれる特異的タンパク質により標的細胞の表面に提示される短いタンパク質断片に応答する。成熟過程で、T細胞は、それらの細胞表面に抗原特異的T細胞受容体（TCR）を発現し、この抗原特異的T細胞受容体が、MHC分子により提示されるこれらの短いタンパク質（ペプチド）抗原を認識する。それ故、適正なペプチドが、適正なMHC分子と会合している標的細胞の表面に提示された場合にのみ、T細胞はその免疫機能を活性化することになる。その結果、腫瘍特異的T細胞の頻度が腫瘍内で高まるため、それが腫瘍特異的T細胞、すなわち腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、の理想的な供給源になる（Andersen et al., Cancer Res. 2012 Apr 1;72(7):1642-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2614. Epub 2012 Feb 6）。

30

【0009】

もちろん、これは、非常に単純化された見解であり、T細胞機能の簡潔な総括を示すものである。適応免疫応答は、単独で作用せず、様々な免疫および非免疫細胞との広範な相互作用を、必要な活性部位へのT細胞の効率的輸送を助長するために、適正な免疫応答を確実に開始させるために、および免疫応答を確実に制御し、それが必要とされた後に確実に停止させるために必要とする。したがって、製造されたTILが腫瘍に対する免疫応答を開始させる患者の場合であっても、その免疫応答は、患者自身の免疫系および腫瘍環境により支持されることもあり、または減弱されることもある。

40

【0010】

腫瘍特異的TILは、転移がんを有する患者の腫瘍から単離されたT細胞である。大部分のがん患者において、循環する腫瘍特異的T細胞を血液中でほとんど検出することができない。しかし、皮膚黒色腫などの、ある特定のがんは、腫瘍成長の自然な過程で抗腫瘍活性を有する有意な数のT細胞を、特に腫瘍領域内で、誘導する能力があるので、免疫原性であるようである（Muul et al., J Immunol. 1987 Feb 1;138(3):989-95）。「腫瘍に特異的なT細胞として選択される」腫瘍反応性T細胞を、腫瘍材料から単離し、ex vivoで拡大させて多数にすることができる。報告により、これらの細胞は、患者への再注入時に腫瘍破壊および臨床応答をもたらすことができる抗腫瘍反応性

50

を有することが示されている (Dudley et al., Science, 2002 Oct 25;298(5594):850-4. Epub 2002 Sep 19)。その後の試験で、T細胞特性の重要性が確認され、細胞が全く「特異性について選択されない」、「幼若の」急速に成長する細胞である「幼若TIL」の重要性が確認された。顕著なこととして、これは、TILまたはCD8選択TILにおいておよそ50%の卓越した応答率を生じさせる (Besser et al., Anticancer Res. 2009 Jan;29(1):145-54; Dudley et al., Clin Cancer Res. 2010 Dec 15;16(24):6122-31. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1297. Epub 2010 Jul 28)。

【0011】

Andersenらによる研究 (Cancer Res. 2012 Apr 1;72(7):1642-50. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2614. Epub 2012 Feb 6) は、黒色腫特異的T細胞 (公知がん抗原に対する) が末梢血中のT細胞と比較して腫瘍内に富化されることを特定した。これは、単離されたTIL集団が、末梢血から単離されて同様のレベルの単独でのIL2または静脈内IL-2で拡大されたT細胞を使用する黒色腫患者における早期試験と比較して、腫瘍特異的T細胞を多く含み、その結果、抗腫瘍活性が増強されることになる (LAK cells - Bordignon et al., Haematologica. 1999 Dec;84(12):1110-49) という定説を支持する。

【0012】

米国特許第10,398,734号は、TILの拡大およびTILの治療用集団の産生のための方法に関する。この「734特許の腫瘍は、バルク腫瘍として出荷され、バルク腫瘍内のTILは、急速に酸素欠乏となり、時が経つにつれて徐々に劣化する。」「734特許の腫瘍はまた、劣化した内部細胞集団を有する断片へとプロセッシングされる。さらに、製造に使用されるTILは、組織断片から拡大されたTILのみとなり、内部に保持されたいずれのTILでもないことになる。したがって、得られる細胞集団は、腫瘍環境の十分な多様性を表すことができない。

【0013】

TILの回収は、TIL集団の培養および拡大の前にバルク腫瘍としての固形組織の無菌脱凝集を必要とする。固形組織脱凝集中の条件および細胞の回収にかかる時間は、最終細胞化材料の生存率および回収率に対して大きな影響を与える。従来の方法を使用して得られる固形組織由来細胞浮遊液は、多くの場合、多種多様な異なる細胞型、脱凝集培地、組織デブリおよび／または液を含む。このため、例えば、再生医療薬の、養子細胞療法薬の、ATMPの、診断的in vitro検査のための、および／または科学研究のための製造の前に、細胞型の選択的標的化および／または単離の使用が必要となり得る。

【0014】

現在、選択または富化技法には、一般に、サイズ、形状、密度、接着、強いタンパク質間相互作用 (すなわち、抗体-抗原相互作用) のうちの1つが利用される。例えば、一部の事例では、選択は、成長支持環境を提供することにより、および培養条件、または磁性もしくは非磁性固相もしくは半固相基質への半永久的もしくは永久的連結に関連するより複雑な細胞マーカー相互作用を制御することにより、行われ得る。

【0015】

富化、単離または選択には、任意の選別技術、例えば、親和性クロマトグラフィー、または当技術分野において公知の任意の他の抗体依存性分離技法を使用することができる。当技術分野において公知の任意のリガンド依存性分離技法を、細胞の物理的特性に頼るポジティブ選択およびネガティブ選択の両方と併用することができる。特に有力な選別技術は、磁気細胞選別である。細胞を磁氣的に分離するための方法は、例えば、ThermoFisher、Miltenyi Biotech、Stemcell Technologies、Cellpro Seattle、Advanced Magnetics、Boston Scientific、またはQuad Technologiesから、市販されている。例えば、モノクローナル抗体を、Dynal M 450のような磁性ポリスチレン粒子、または類似の磁性粒子に直接連結させ、例えば細胞分離に、使用

することができる。Dynabeads技術は、カラムに基づくものではなく、その代わりに、細胞が結合したこれらの磁気ビーズは試料管内の液相動態を享受し、細胞は、試験管を磁気ラック上に置くことにより単離される。

【0016】

試料からの細胞の富化、選別および／または検出は、モノクローナル抗体を、例えば多糖類の、有機コーティングを有するコロイド状超常磁性微小粒子（例えば、磁気活性化細胞選別（MACS）技術（Miltenyi Biotec、Bergisch Gladbach、Germany））と併用することを含む。粒子（例えば、ナノビーズまたはMicroBeads）を、モノクローナル抗体に直接コンジュゲートすることができる、または抗免疫グロブリン、アビジン、もしくは抗ハプテン特異的MicroBeadsと組み合わせて使用することができ、または選択的結合特性を有する他の哺乳動物分子でコーティングすることができる。

10

【0017】

上で説明したものなどの磁気粒子選択技術は、特定の表面マーカーに対する抗体または他の部分がコーティングされた磁気ナノ粒子と細胞をインキュベートすることによって細胞のポジティブまたはネガティブ分離を可能にする。このインキュベーションは、このマーカーを発現する細胞を磁気ナノ粒子結合させる。その後、細胞溶液は、固体または可撓性容器内の強磁場に置かれる。このステップで、細胞は、ナノ粒子に結合し（マーカーを発現する）、カラム上に留まるが、他の細胞（マーカーを発現しない）は通過する。この方法を用いて、細胞を特定のマーカーに対してポジティブまたはネガティブ分離することができる。

20

【0018】

ポジティブ選択の場合、磁気カラムに結合した目的のマーカーを発現する細胞は、磁場からのカラムの除去後、別の器に洗い流される。

【0019】

ネガティブ選択の場合、使用される抗体または選択的部分は、目的のものではない細胞上に存在することが公知である表面マーカーに対するものである。細胞／磁気ナノ粒子溶液をカラムに適用すると、これらの抗原を発現する細胞は、カラムに結合し、通り抜ける画分は、目的の細胞を含有するので、回収される。これらの細胞は、ナノ粒子に連結された選択的抗体または部分により標識されていないので、それらは、「手付かず」である。公知の手動または半自動化固形組織処理ステップは、労働集約的であり、当技術分野における知識を必要とする。

30

【0020】

加えて、材料が治療目的で使用される場合、処理は、細胞培養物の取り扱い中の、例えば、脱凝集、酵素消化、および保管デバイスへの移送の一部としてのもしくはその前の組織処理中の、厳密に調節された環境条件、または脱凝集／細胞化および生体組織収率のためのインキュベーション条件を必要とする。典型的に、このプロセスは、複数の実験および組織処理器具と、同じ活動を安全に行うために、また夾雑のリスクを最小限に抑えるために、ハザード封じ込め環境または組織処理施設無菌環境のどちらかに含まれる危険な状態に関する科学技術のスキルおよび知識のある人材とを必要とすることになる。

40

【0021】

組織からの所望の産物の生存率および回収率は、組織収集中、脱凝集中、および細胞の回収中の条件による影響を受ける。本発明は、上に記載した未だ対処されていない要求を達成する改善された組織処理を、前記処理を実施する装置／デバイスを含めて、提供する必要性から生じたものである。

本願におけるいずれの文献の引用または特定も、そのような文献が本発明に対する先行技術として利用可能であることを認めるものではない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0022】

50

【非特許文献1】 Andersen et al., Cancer Res. 2012 Apr 1;72(7):1642-50.
【非特許文献2】 Muul et al., J Immunol. 1987 Feb 1;138(3):989-95
【非特許文献3】 Dudley et al., Science. 2002 Oct 25;298(5594):850-4
Epub 2002 Sep 19
【非特許文献4】 Besser et al., Anticancer Res. 2009 Jan;29(1):145-54
【非特許文献5】 Dudley et al., Clin Cancer Res. 2010 Dec 15;16(24):6122-31.

【非特許文献6】 Cancer Res. 2012 Apr 1;72(7):1642-50.

【非特許文献7】 LAK cells - Bordignon et al., Haematologica. 1999 Dec;84(12):1110-49

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0023】

発明の概要

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の治療用集団を単離するための方法であって、

（a）対象から腫瘍を摘除するステップ；

（b）摘除腫瘍を使い捨ての無菌キット内に保管するステップであって、無菌キットが

、
固形哺乳動物組織を含む材料の受け取りおよび処理のための脱凝集モジュールと、

脱凝集された固形組織材料の濾過ならびに脱凝集されていない組織および濾液の分離のための必要に応じた富化モジュールと、

脱凝集産物材料を必要に応じてさらに処理および／または保管するための安定化モジュールと

を含み、

モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器を含み、容器が、それらの間の組織材料の流れを可能にするように適合された1つまたは複数の導管により接続されており、

モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器への培地および／または試薬の無菌投入を可能にするための1つまたは複数の口を含む、ステップ；

（c）摘除腫瘍を脱凝集モジュール内で無菌で脱凝集させ、それによって脱凝集腫瘍を生じさせるステップ；

（d）脱凝集腫瘍を、IL-2を含む細胞培養培地で培養することにより、第1の拡大を行って、UTILの第1の集団を産生するステップ；

（e）追加のIL-2、OKT-3、および抗原提示細胞（APC）とともにUTILの第1の集団を培養することにより、第2の拡大を行って、TILの第2の集団を産生するステップ；

（f）UTILの第2の集団を回収および／または凍結保存するステップ

を含み得る方法に関する。一部の実施形態では、ステップa）は、必要に応じたものである。

【0024】

本発明は、凍結保存された腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の治療用集団を単離するための方法であって、

（a）対象から腫瘍を摘除するステップ；

（b）摘除腫瘍を使い捨ての無菌キット内に保管するステップであって、無菌キットが

、
固形哺乳動物組織を含む材料の受け取りおよび処理のための脱凝集モジュールと、

脱凝集された固形組織材料の濾過ならびに脱凝集されていない組織および濾液の分離のための必要に応じた富化モジュールと、

脱凝集産物材料を必要に応じてさらに処理および／または保管するための安定化モジュールと

10

20

30

40

50

を含み、

モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器を含み、これらの容器が、それらの間の組織材料の流れを可能にするように適合された1つまたは複数の導管により接続されており、

モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器への培地および／または試薬の無菌投入を可能にするための1つまたは複数の口を含む、ステップ；

(c) 摘除腫瘍を脱凝集モジュール内で無菌で脱凝集させ、それによって脱凝集腫瘍を生じさせるステップであって、摘除腫瘍が、それを最小限の細胞損傷で凍結保存することができれば、十分に脱凝集されている、ステップ；

(d) 脱凝集腫瘍を安定化モジュール内で凍結保存するステップ；

(e) 脱凝集腫瘍を、IL-2を含む細胞培養培地で培養することにより、第1の拡大を行って、UTILの第1の集団を産生するステップ；

(f) 追加のIL-2、OKT-3、および抗原提示細胞(APC)とともにUTILの第1の集団を培養することにより、第2の拡大を行って、TILの第2の集団を産生するステップ；

(g) UTILの第2の集団を回収および／または凍結保存するステップ
を含み得る方法に関する。一部の実施形態では、ステップa)は、必要に応じたものである。

【0025】

脱凝集は、物理的脱凝集、酵素的脱凝集、または物理的および酵素的脱凝集を含み得る。有利な実施形態では、脱凝集腫瘍は、細胞化または精製される。

【0026】

本発明では、相互接続されており、特異的な別個の機能を有する、容器のセットは、脱凝集および細胞化された腫瘍を処理するために、必要に応じて富化するしかし安定化するために、無菌閉鎖系を維持する。本質的に、本発明は、必要とされる時間ならびに摘除腫瘍の処理中の夾雑および操作員被曝のリスクを最小限に抑えるための急速予備滅菌環境を提供する。

【0027】

この無菌キットは、特に、プロセスが、組織採取／入手現場内で行われ、その最終ユーティリティのための最終細胞処理の前に保管を必要とする場合、標準的な非閉鎖型の組織処置と比較して最終細胞化産物の夾雑のリスクを排除する、閉鎖型の固形組織処理を可能にする。加えて、ウイルスなどの感染性生物を含有し得る生物学的に危険な材料との直接接触が低減されるため、操作員の安全性が増す。このキットによって、最終処理された細胞化材料の全てまたは一部分のどちらかを、その最終ユーティリティのために処理される前の輸送または保管どちらかのために安定化することが可能になる。

【0028】

本発明によって、採取手順にも細胞化腫瘍の生存率にも影響を与えることなく、切除腫瘍を摘除時にまたは必要に応じてその後に処理することが可能になる。

【0029】

一部の実施形態では、もはや必要とされない試薬、細胞デブリ、脱凝集されていない腫瘍組織および脂肪などの、不純物を低減させるために、ある種の物理的精製による必要に応じた富化を、利用することができる。無菌キットは、このために、安定化の前に必要に応じた富化モジュールを有することができる。単一細胞または少細胞数の凝集体を、脱凝集後の安定化のために、5 μ m未満の粒子および流体、あるいは直径で200 μ mの、もしくはおよそ200 μ mの、またはそれより大きい、不完全脱凝集材料を除外することによって富化することができるが、これは、組織および脱凝集効率によって変わることになり、脱凝集腫瘍の組織または最終ユーティリティに依存して組織特異的キットの形態の様々な実施形態を利用することができる。

【0030】

別の実施形態では、単一細胞浮遊液がステップ(c)の後に提供される。

【0031】

別の実施形態では、UTILの第1の集団は、約1,000,000~20,000,000のUTILを必要とする。

【0032】

別の実施形態では、ステップ(e)は、摘除腫瘍出発材料からのUTILの成長をさらに含むことができ、これにステップ(f)の急速拡大が続く。

【0033】

別の実施形態では、ステップ(e)を約2週間行うことができ、ステップ(f)を約2週間行うことができる。

【0034】

別の実施形態では、追加のステップ(h)は、UTILの第2の集団を浮遊させることを含む。浮遊させることは、緩衝食塩水、ヒト血清アルブミン、および／またはジメチルスルホキシド(DMSO)に浮遊させることであり得る。

【0035】

本発明は、本明細書で開示される方法のいずれかにより得られる凍結保存されたUTILの治療用集団も含み得る。治療用集団は、約 $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ のT細胞を含み得る。

【0036】

本発明は、本明細書で開示される治療用集団の凍結保存バッグも包含する。凍結保存バッグは、静脈内注入に使用するものであり得る。

【0037】

本発明は、がんを処置するための方法であって、本明細書で開示される治療用集団または本明細書で開示される凍結保存バッグを投与するステップを含み得る方法も包含する。本発明は、がんの処置に使用するための本明細書で開示される治療用集団、医薬組成物または凍結保存バッグも包含する。がんは、膀胱がん、乳がん、ヒトパピローマウイルスにより引き起こされるがん、子宮頸がん、頭頸部がん(頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)を含む)、肺がん、黒色腫、卵巣がん、非小細胞肺癌(NSCLC)、腎がん、または腎細胞癌であり得る。

【0038】

別の実施形態では、無菌キットの1つまたは複数の可撓性容器は、弾力性のある変形可能な材料を含む。

【0039】

別の実施形態では、無菌キットの脱凝集モジュールの1つまたは複数の可撓性容器は、1つまたは複数の密封可能な開口部を含む。脱凝集モジュールおよび／または安定化モジュールの1つまたは複数の可撓性容器は、ヒートシール可能な溶接部も含み得る。

【0040】

別の実施形態では、無菌キットの1つまたは複数の可撓性容器は、内側に丸められた縁部を含む。

【0041】

別の実施形態では、無菌キットの脱凝集モジュールの1つまたは複数の可撓性容器は、その中の固形腫瘍を機械的に粉碎および剪断するように適合された脱凝集面を含む。

【0042】

別の実施形態では、無菌キットの富化モジュールの1つまたは複数の可撓性容器は、細胞化された脱凝集固形腫瘍の保持液を保持するフィルターを含む。

【0043】

別の実施形態では、無菌キットの安定化モジュールの1つまたは複数の可撓性容器は、溶解状態のまたは凍結保存状態の生存細胞の保管用の培地配合物を含む。

【0044】

別の実施形態では、無菌キットは、さらに、デジタル、電子または電磁タグ識別子を含む。タグ識別子は、脱凝集および／または富化および／または安定化プロセスのタイプ；

10

20

30

40

50

速度制御された凍結に好適な必要に応じた凍結溶液を含む、前記プロセスで使用される培地の1つもしくは複数のタイプを定義する、特異的プログラムに関係し得る。

【0045】

別の実施形態では、同じ可撓性容器が、脱凝集モジュール、安定化モジュール、および必要に応じた富化モジュールのうちの1つまたは複数の部分を形成し得る。

【0046】

別の実施形態では、無菌キットの脱凝集モジュールは、処理される組織を受け取るための第1の可撓性容器を含む。

【0047】

別の実施形態では、無菌キットの脱凝集モジュールは、脱凝集用の培地を含む第2の可撓性容器を含む。

【0048】

別の実施形態では、無菌キットの必要に応じた富化モジュールは、第1の可撓性容器と、富化された濾液を受け取るための第3の可撓性容器とを含む。

【0049】

別の実施形態では、無菌キットの脱凝集モジュールと安定化モジュールの両方が第2の可撓性容器を含み、第2の可撓性容器は、消化培地および安定化培地を含む。

【0050】

別の実施形態では、無菌キットの安定化モジュールは、安定化培地を含む第4の可撓性容器を含む。

【0051】

別の実施形態では、無菌キットの安定化モジュールは、第1の可撓性容器、ならびに／または保管するためのおよび／もしくは凍結保存を経るための第3の可撓性容器を含む。

【0052】

本発明は、凍結保存されたU T I Lの治療用集団を単離するための方法であって、

(a) 対象から腫瘍を摘除するステップ；

(b) 摘除腫瘍を使い捨ての無菌キット内に保管するステップであって、無菌キットが

、固形哺乳動物組織を含む材料の受け取りおよび処理のための脱凝集モジュールと、

脱凝集された固形組織材料の濾過ならびに脱凝集されていない組織および濾液の分離のための必要に応じた富化モジュールと、

脱凝集産物材料を必要に応じてさらに処理および／または保管するための安定化モジュールと

を含み、

モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器を含み、これらの容器が、それらの間の組織材料の流れを可能にするように適合された1つまたは複数の導管により接続されており、

モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器への培地および／または試薬の無菌投入を可能にするための1つまたは複数の口を含む、ステップ；

(c) 摘除腫瘍を脱凝集モジュール内で無菌で脱凝集させ、それによって脱凝集腫瘍を生じさせるステップであって、摘除腫瘍が、それを細胞損傷なく凍結保存することができれば、十分に脱凝集されている、ステップ；

(d) 脱凝集腫瘍を安定化モジュール内で凍結保存するステップ；

(e) 脱凝集腫瘍を、I L - 2を含む細胞培養培地で培養することにより、第1の拡大を行って、U T I Lの第1の集団を産生するステップ；

(f) 追加のI L - 2、O K T - 3、および抗原提示細胞 (A P C) とともにU T I Lの第1の集団を培養することにより、第2の拡大を行って、T I Lの第2の集団を産生するステップ；

(g) U T I Lの第2の集団を回収および／または凍結保存するステップ

を含む方法も提供する。一部の実施形態では、ステップa) は、必要に応じたものである

10

20

30

40

50

。

【0053】

別の実施形態では、自動化デバイスは、無菌キットの認識のための無線自動識別タグリーダーをさらに含み、したがって、自動化処理、例えば本発明の実施形態における自動化デバイス内での自動化処理中に、それをスキャンし、認識することができる。極めて重要なこととして、タグが、自動処理を必要とする条件およびステップについての情報を提供するため、単にキットをスキャンすることによって、組織を処理するためにキットとともに使用する任意の自動化システムを、さらなる介入も夾雑も伴わずに実施することができる。組織試料を脱凝集モジュールに入れたら、それを、例えば、処理を始める前に手動でまたは自動的に密封することができる。

10

【0054】

自動化デバイスのプログラム可能なプロセッサもまた、タグによって無菌キットを認識することができ、そしてその後、脱凝集、富化および安定化プロセスのタイプ、ならびに速度制御された凍結に好適な必要に応じた凍結溶液を含む、前記プロセスに必要とされるそれぞれの培地のタイプを定義するキットプログラムを実行することができる。自動化デバイスのプログラム可能なプロセッサは、脱凝集モジュール、富化モジュールおよび／または安定化モジュールとの通信ならびにそれらの制御に適応できる。したがって、言い換えれば、キットは、腫瘍の処理するための特異的な全自動の方法を実行するために使用される自動化デバイスによって、そのようなデバイスに挿入されている場合、読取り可能である。

20

【0055】

自動化デバイスのプログラム可能なプロセッサは、固形組織材料の物理的および／または生物学的分解を可能にするように脱凝集モジュールを制御することができる。この分解は、固形組織材料の物理的分解であることもあり、または酵素的分解であることもある。固形組織材料の酵素的分解は、コラゲナーゼ、トリプシン、リパーゼ、ヒアルロニダーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、リペラーゼHⅠ、ペプシン、およびこれらの混合物からなる群から選択される1つまたは複数の酵素溶液によるものであり得る。

【0056】

別の実施形態では、プログラム可能なプロセッサは、固形組織を機械的に粉碎および剪断する、脱凝集可撓性容器内の脱凝集面を制御する。一部の実施形態では、脱凝集面は、機械式ピストンにより制御される。

30

【0057】

別の実施形態では、プログラム可能なプロセッサは、容器内の富化された脱凝集固形組織を凍結保存するための安定化モジュールを制御する。これは、プログラム可能温度設定を使用して果たすことができ、その条件は、デバイスに挿入されたキットのタグを読み取ることにより決定される。

【0058】

別の実施形態では、プロセスの異なる機能を実施するために、デバイスおよび／またはキットの追加の構成要素の1つまたは複数が提供され、任意の組合せで利用可能であり得る。これは、以下のものを含み得る：脱凝集プロセスが、必要に応じた富化モジュールへの脱凝集固形組織の移送の前に、脱凝集モジュールにおいて完了しているかどうかを認識することができるセンサー；脱凝集モジュール、富化モジュールおよび／もしくは安定化モジュールのうちの1つもしくは複数の容器内で必要とされる培地の量を決定するための、ならびにそれぞれの容器間の材料の移送を制御するための重量センサー；脱凝集モジュール、富化モジュールおよび／もしくは安定化モジュールのうちの1つもしくは複数の容器内の温度を制御するためのセンサー；モジュール内の各容器の投入口と排出口の間の培地の移送を制御するための少なくとも1つの気泡センサー；投入口と排出口間の培地の移送を制御するための少なくとも1つのポンプ、必要に応じて蠕動ポンプ；富化モジュール内の圧力を評定するための圧力センサー；富化モジュール内の接線流濾過プロセスを制御するための1つもしくは複数の弁；ならびに／または各モジュールの投入口と排出口間の

40

50

培地の移送を制御するための1つもしくは複数のクランプ。

【0059】

別の実施形態では、自動化デバイスのプログラム可能なプロセッサは、安定化モジュール内の最適な保管温度範囲を容器が除去されるまで維持するように適合されるか、または制御された凍結ステップを実行する。これは、U T I Lを、安定化モジュールで利用される安定化プロセスのタイプに依存してそれらの最終ユーティリティの前に短期間（数分から数日）保管することまたは長期間（複数日から複数年）保管することを可能にする。

【0060】

別の実施形態では、自動化デバイスは、ユーザーインターフェースをさらに含む。このインターフェースは、ユーザーを、パラメータを入力し、あらかじめプログラムされているステップ、エラーの警告、またはこれらの組合せを確認するように導く指示を表示するための、表示画面を含み得る。

【0061】

別の実施形態では、自動化デバイスは、輸送可能であるように適合され、したがって車輪、タイヤおよび／またはハンドルなどの、容易な操縦性を可能にするおよび／または移動を補助する特徴を有し得る。

【0062】

本発明は、凍結保存されたU T I Lの治療用集団を単離するための半自動無菌組織処理方法であって、

(a) 無菌処理キットに付随するデジタル、電子または電磁タグ識別子から無菌脱凝集組織処理ステップおよびそれらに関連する状態を自動的に判定するステップであって、無菌キットが、

固形哺乳動物組織を含む材料の受け取りおよび処理のための脱凝集モジュールと、

脱凝集された固形組織材料の濾過ならびに脱凝集されていない組織および濾液の離隔のための必要に応じた富化モジュールと、

脱凝集産物材料を必要に応じてさらに処理および／または保管するための安定化モジュールとを含み、

モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器を含み、これらの容器が、それらの間の組織材料の流れを可能にするように適合された1つまたは複数の導管により接続されており、

モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器への培地および／または試薬の無菌投入を可能にするための1つまたは複数の口を含む、ステップ；

(b) 対象から腫瘍を摘除するステップ；

(c) 腫瘍を無菌キットの脱凝集モジュールの可撓性プラスチック容器に入れるステップ；

(d) 腫瘍を処理するステップであって、

摘除腫瘍を無菌で脱凝集させ、それによって脱凝集腫瘍を生じさせる脱凝集モジュールであって、摘除腫瘍が、それを細胞損傷なく凍結保存することができれば、十分に脱凝集されている、脱凝集モジュール；

脱凝集腫瘍を濾過して、脱凝集された固形組織材料を除去し、脱凝集されていない組織および濾液を離隔する、必要に応じた富化モジュール；

脱凝集腫瘍を凍結保存する安定化モジュール

と通信し、これらのモジュールを制御することにより、1つまたは複数の組織処理ステップを自動的に実行することによる、ステップ；

(e) 脱凝集腫瘍を、I L-2を含む細胞培養培地で培養することにより、第1の拡大を行って、U T I Lの第1の集団を産生するステップ；

(f) 追加のI L-2、O K T-3、および抗原提示細胞（A P C）とともにU T I Lの第1の集団を培養することにより、第2の拡大を行って、T I Lの第2の集団を産生す

10

20

30

40

50

るステップ；

(g) U T I L の第 2 の集団を回収および／または凍結保存するステップを含む方法も提供する。一部の実施形態では、ステップ b) は、必要に応じたものである。

【 0 0 6 3 】

バッグなどの可撓性容器は、組織材料を処理するために使用され得る。処理は、組織を分離または分解することができる処置を含むことができ、例えば、物理的分解を撹拌、例えば、穏やかな撹拌を使用して果たすことができ、生物学的小および／または酵素的分解は、バッグ内での組織材料の酵素消化および／またはその構成成分の抽出を含み得る。

【 0 0 6 4 】

組織を処理するための可撓性容器、例えばバッグは、製造中に密封される可撓性容器の少なくとも 3 つの縁部と、使用中に組織材料が挿入される可撓性容器の開口縁部とを有する、密封可能なポリマーで作られた 1 つまたは複数の層を含み得る。1 つまたは複数の継手を使用して、可撓性容器をチューブによって少なくとも 1 つの要素に連結することができる。組織を可撓性容器に入れた後、開口縁部に近接した可撓性容器のセクションを密封または溶接してシールを形成することができる。シールは、少なくとも 3 mm の幅を有し、開口縁部と実質的に平行に配置され、可撓性容器の開口縁部から離れた位置に置かれ得る。一部の事例では、シールは、約 5 mm より大きい幅を有し得る。例えば、組織を内部に入れた後、バッグの開口縁部に近接した位置にある少なくとも 5 mm のシールを有するように、バッグを密封することができる。シールは、開口縁部と平行であり、バッグの開口縁部から離れた位置に置かれ得る。

【 0 0 6 5 】

突出部を有し、シールに近接した位置にあるが、可撓性容器の開口縁部からはシールよりさらに離間しているクランプを使用して、可撓性容器をさらに固定することができる。

【 0 0 6 6 】

一部の事例では、シールおよび可撓性容器は、使用中に可撓性容器に印加される 1 0 0 N の力に可撓性容器が耐えることができるように構築される。クランプとそのようなシールの併用は、使用される材料のタイプおよび／またはシールの構造に依存して一部の事例では有利であり得る。したがって、バッグなどの可撓性容器の使用中に、シールとクランプの組合せは、可撓性容器に印加される 1 0 0 N の力に耐えることが可能であり得る。

【 0 0 6 7 】

一部の事例では、シールおよび可撓性容器は、使用中に可撓性容器に印加される 7 5 N の力に可撓性容器が耐えることができるように構築される。クランプとそのようなシールの併用は、使用される材料のタイプおよび／またはシールの構造に依存して一部の事例では有利であり得る。したがって、バッグなどの可撓性容器の使用中に、シールとクランプの組合せは、可撓性容器に印加される 7 5 N の力に耐えることが可能であり得る。

【 0 0 6 8 】

可撓性容器は、組織材料の脱凝集などの処理中に組織を保持するために使用され得る。

【 0 0 6 9 】

一部の実施形態では、バッグなどの可撓性容器は、組織材料の脱凝集、脱凝集された組織材料の濾過、および／または脱凝集されていない組織および濾液の離隔のために使用され得る。

【 0 0 7 0 】

バッグなどの可撓性容器は、弾力性のある変形可能な材料から形成され得る。バッグなどの可撓性容器に使用するための材料は、密封性、例えば、熱溶接に起因する、または無線周波エネルギーの使用に起因する密封性；ガス透過性；可撓性、例えば、低温可撓性（例えば、 -150°C 、または -195°C での）；弾性、例えば、低温弾性；耐薬品性；光学的透明度；生体適合性、例えば、細胞傷害性；溶血作用；耐浸出性；少ない微粒子を有すること；特定のガス（例えば、酸素および／または二酸化炭素）についての高い透過速度；および／または法的な要求事項に準拠していることを含むがこれらに限定されない、

10

20

30

40

50

1つまたは複数の特性のために選択され得る。

【0071】

バッグなどの可撓性容器は、インジケーターを含み得る。インジケーターを使用して、試料、試料を得た患者を識別すること、および／または処置プロセスを通して特定の試料の進展を追跡することができる。一部の事例では、インジケーターを自動化または半自動化システムによりスキャンして試料の進展を追跡することができる。

【0072】

バッグなどの可撓性容器上のマークを使用して、バッグを置くべき、処置すべき、密封すべき場所、または組織を含むバッグに対して取られ得る任意の他の行動を識別することができる。各バッグは、密封用の複数のマークを含み得る。

【0073】

バッグの開口端部を、組織をバッグ内に挿入した後に密封することができる。所定の圧力、所定の温度、および所定の時間枠で操作して密封デバイス（例えば、ヒートシーラー）を使用することにより、任意のシールを形成することができる。

【0074】

一部の事例では、バッグなどの可撓性容器を、脱凝集デバイスも含み得る脱凝集要素の一部として使用するための脱凝集容器として使用することができる。一部の実施形態では、培地および／または酵素を、デバイスの脱凝集要素内のバッグに添加することができる。例えば、バッグを、可撓性容器に入れられた組織材料を機械的に粉碎するデバイスとともに使用することができる。

【0075】

一部の実施形態では、バッグなどの可撓性容器内の組織を、脱凝集中に剪断することができる。具体的には、この可撓性容器は、組織材料を剪断するように構成することができる。

【0076】

可撓性容器を、哺乳動物細胞または細胞凝集体の無菌脱凝集、安定化および／または必要に応じた富化のための半自動化または自動化プロセスで使用するすることができる。

【0077】

組織からの所望の材料の抽出のためのキットは、少なくとも一部の組織を処置して処理された流体を形成する脱凝集要素と；処理された流体の少なくとも一部を富化して所望の材料を形成することができる富化要素（例えば、フィルター）と；所望の材料の一部を保管することができる安定化要素と；組織の供給源、プロセスに関する組織の状態、または識別子のうちの少なくとも1つを提供することができる、脱凝集要素、富化要素または安定化要素のうちの少なくとも1つの上に位置するインジケータータグとを含み得る。

【0078】

所望の材料は、特定のサイズの生物材料または構成成分であり得る。例えば、所望の材料は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）であり得る。

【0079】

異なるタイプの培地を、脱凝集要素および安定化要素によって行われる様々なプロセスで使用するすることができる。例えば、凍結保存用培地をキットに供給し、安定化要素において凍結速度を制御するために使用することができる。

【0080】

脱凝集要素が第1の可撓性容器を含み得るおよび安定化要素が第2の可撓性容器を含み得るデバイスにおける使用のためのキット。

【0081】

哺乳動物固形組織からの細胞または細胞凝集体の半自動化無菌脱凝集および／または富化および／または安定化のための自動化デバイスは、プログラム可能なプロセッサと、本明細書に記載される可撓性容器を含むキットとを含み得る。自動化デバイスは、インジケータータグリーダーをさらに含み得る。例えば、インジケータータグリーダーは、いずれの要素（例えば、キット内の組織材料の脱凝集、富化、または安定化）に位置してもよ

10

20

30

40

50

い。

【0082】

一部の事例では、自動化デバイスは、キットにおける可撓性容器内の試料を認識するための無線自動識別タグリーダーをさらに含み得る。

【0083】

自動化デバイスは、QRコード（登録商標）などのインジケータータグを介して、バッグなどのキットの構成要素上に位置するインジケータを認識することができるプログラム可能なプロセッサを含み得る。どの試料がバッグの中にあるのかを決定した後、プログラム可能なプロセッサは、続いて脱凝集、富化および安定化プロセスのタイプを定義するプログラムを実行し、それらのプロセスに必要とされるそれぞれの培地を提供する。

10

【0084】

自動化デバイスにおいて使用するためのキットは、脱凝集可撓性容器またはバッグを含み得る。プログラム可能なプロセッサは、脱凝集要素および脱凝集可撓性容器を、固形組織の物理的および／または生物学的分解を可能にするように制御することができる。

【0085】

プログラム可能なプロセッサは、脱凝集可撓性容器に近接した位置にある脱凝集面が、脱凝集可撓性容器内の固形組織を機械的に粉碎および剪断することができるように、自動化デバイスの要素を制御することができ、必要に応じて、その脱凝集面は機械式ピストンである。

【0086】

システムの脱凝集要素を、脱凝集可撓性容器内の組織が固形組織の物理的および酵素的分解を可能にするように、プロセッサによって制御することができる。コラゲナーゼ、トリプシン、リパーゼ、ヒアルロニダーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、リベラーゼHI、ペプシン、およびこれらの混合物からなる群から選択される1つまたは複数の培地酵素溶液を脱凝集可撓性容器に供給して、組織の酵素的分解を補助することができる。

20

【0087】

システムは、脱凝集可撓性容器と安定化可撓性容器とプログラム可能なプロセッサとを含む、キットを含み得る。プログラム可能なプロセッサは、脱凝集要素、富化要素および安定化要素のうちの1つまたは複数の制御するように適合され得る。

【0088】

プログラム可能なプロセッサは、安定化要素を、安定化容器内の富化された脱凝集固形組織を凍結保存するように制御することができる。一部の実施形態では、所定の温度をプログラムすることができる。

30

【0089】

自動化デバイスは、追加の構成要素を多数の組合せで含むことができる。構成要素としては、脱凝集プロセスが、必要に応じた富化要素への脱凝集固形組織の移送の前に脱凝集モジュールにおいて完了しているかどうかを認識することができるセンサー；脱凝集要素、富化要素および／もしくは安定化要素のうちの1つもしくは複数の容器内で必要とされる培地の量を決定するため、ならびにそれぞれの容器間の材料の移送を制御するための重量センサー；脱凝集要素、富化要素および／もしくは安定化要素のうちの1つもしくは複数の容器内の温度を制御するためのセンサー；要素内の各容器の投入口と排出口の間の培地の移送を制御するための少なくとも1つの気泡センサー；投入口と排出口間の培地の移送を制御するための少なくとも1つのポンプ、必要に応じて蠕動ポンプ；富化要素内の圧力を評定するための圧力センサー；富化要素内の接線流濾過プロセスを制御するための1つもしくは複数の弁；ならびに／または各要素の投入口と排出口間の培地の移送を制御するための1つもしくは複数のクランプを挙げることができる。

40

【0090】

プログラム可能なプロセッサを含み得る自動化デバイスは、容器が除去されるまで安定化モジュール内の最適な保管温度範囲を維持するように適合される。ある実施形態では、プログラム可能なプロセッサは、制御された凍結ステップを実行することができる。

50

【0091】

一部の事例では、自動化デバイスは、ユーザーインターフェースを含み得る。自動化デバイスのインターフェースは、ユーザーを、パラメータを入力し、あらかじめプログラムされているステップ、エラーの警告、またはこれらの組合せを確認するように導く指示を表示するための、表示画面を含み得る。

【0092】

本明細書に記載の自動化デバイスは、輸送可能であるように適合され得る。

【0093】

自動組織処理方法は、キットの構成要素に付随するデジタル、電子または電磁タグインジケータから処理ステップの状態および関連する状態を自動的に判定するステップを含み得る。使用中に、組織試料を、少なくとも1つの開口縁部を有するキットの可撓性容器に入れることができる。可撓性容器内に組織を配置した後、開口端部を密封することができる。使用中に、インジケータに付随する情報の通信ならびに可撓性容器付近の状態および／または可撓性容器の位置の制御によって1つまたは複数の組織処理ステップを自動的に実行することにより、組織を処理することができる。さらに、キットへの材料の添加をインジケータに付随する情報に基づいて制御することができる。処理された組織の少なくとも一部を濾過することができ、その結果、濾過された流体が生成される。濾過された流体の少なくとも一部を凍結保存可撓性容器に供給して、濾過された流体中に存在する所望の材料を安定化することができる。

【0094】

本明細書に記載の処理は、可撓性容器内の組織試料の少なくとも一部分の攪拌、抽出および酵素消化を含み得る。一部の事例では、組織のこの処理によって、組織試料から所望の材料が抽出されることになり得る。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を組織試料から抽出することができる。

【0095】

本明細書に記載される方法に使用するためのバッグなどの可撓性容器は、ヒートシール可能な材料を含み得る。

【0096】

凍結保存キットを使用する組織処理および組織材料からの抽出によって、所望の材料が単離されることになり得る。具体的には、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）などの材料が、所望の材料であり得る。

【0097】

一部の事例では、本明細書に記載される凍結保存キットおよび／またはその構成要素は、細胞または細胞凝集体の脱凝集、富化および／または安定化のための自動化および／または半自動化プロセスにおいて使い捨てのものであり得る。一部の実施形態では、収集バッグなどの、凍結保存キットで使用するためのバッグは、一部の実施形態では複数のプロセスに使用され得る。例えば、収集バッグを異なる位置で繰り返し密封して、組織試料、例えば、生検試料および／または固形組織の処理するための別個の区画を作出することができる。

【0098】

本明細書に記載される本発明での使用のための可撓性容器、例えばバッグとしては、所定の材料、例えば、熱可塑性物質、ポリオレフィンポリマー、エチレン酢酸ビニル（EVA）、コポリマーなどのブレンド、例えば、酢酸ビニルとポリオレフィンのポリマーブレンド（すなわち、Origén、医用EVOフィルム）、EVAを含む材料、および／または密封可能なプラスチックの共押出層から製造された一部分を少なくとも含み得る、収集バッグおよび凍結保存バッグが挙げられる。本発明の組織収集バッグなどの、収集バッグは、エチレン酢酸ビニル（EVA）、および／またはEVAを含む材料などの、所定の材料から製造された、組織を受け取るためのバッグを含み得る。バッグに使用するための材料は、特定の特性について選択され得る。ある実施形態では、収集バッグをはじめとするバッグを、酢酸ビニルとポリオレフィンのポリマーブレンドから実質的に製造すること

10

20

30

40

50

ができる。例えば、収集バッグおよび／または付随するチューブなどの、凍結保存キット構成要素のための材料を選択するために使用され得る、目的の特性は、ヒートシールすることに関係し得る。

【0099】

バッグに使用するための材料は、特定の特性および／または特性、例えば、密封性、例えばヒートシール性、ガス透過性、可撓性、例えば低温可撓性、弾性、例えば低温弾性、耐薬品性、光学的透明度、生体適合性、例えば細胞傷害性、溶血作用、耐浸出性、少ない微粒子を有すること、の選択のために、選択され得る。

【0100】

一部の実施形態では、材料は、バッグの少なくとも一層を形成するための共押出材料に使用するために特定の特性について選択され得る。層を、構築されたときにバッグの内層が比較的生体適合性である、つまり、バッグの内面の材料が安定しており、バッグの内容物に浸出しないように、構築することができる。

【0101】

例えば、収集バッグ、凍結保存バッグ、および／または付随するチューブなどの、キット構成要素のための材料を選択するために使用され得る、目的の特性は、密封すること、例えば、ヒートシールすることに関係し得る。

【0102】

バッグ、例えば収集バッグおよび／または凍結保存バッグ、ならびに付随する任意のチューブは、一般に、クリア、透明、半透明、所望される任意の色、またはこれらの組合せであり得る。組織収集バッグおよび／またはチューブは、一般に、密閉および／または密封血液および／または凍結保存バッグならびに付随するチューブの作製に類似した方法で作製することができる。本発明におけるチューブは、ポリ塩化ビニル（PVC）を含むがこれに限定されない、任意の所望の材料から構築することができる。例えば、PVCは溶接および／または密封に有利であるので、PVCは望ましい材料であり得る。

【0103】

一部の実施形態では、収集バッグの少なくとも1つの端部は、組織を受け取るために開口していることがある。具体的には、ある実施形態では、組織試料、例えば、生検からの組織試料を、開口端部、例えば、頂端部經由でバッグに入れることができる。一部の場合には、生検試料は、動物（例えば、イヌもしくはネコなどの飼育動物）またはヒトからのがん性組織であり得る。

【0104】

組織をバッグ内に配置した後、バッグを密封することができ、そしてその後、処理することができる。処理は、バッグ内の組織の攪拌、例えば、穏やかな攪拌、抽出、および／または酵素消化を含み得る。組織処理および所望の材料、例えば、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の抽出は、閉鎖系の中での処理および抽出であり得る。有利なまたは好ましい実施形態は、組織を収集した患者を識別するためのインジケーター、ならびに／または収集バッグが締め付けられ得る、密封され得る、デバイスによる作用を受け得る、および／もしくは機器内の適所に取り付けられ得る場所を示すためのマークを含み得る。

【0105】

一部の実施形態では、バッグは、密封可能な材料から形成され得る。例えば、バッグは、脂肪族もしくは半芳香族ポリアミド（例えば、ナイロン）、エチレン-酢酸ビニル（EVA）およびそのブレンド、熱可塑性ウレタン（TPU）、ポリエチレン（PE）、酢酸ビニルとポリオレフィンのポリマーブレンド、および／またはポリマーの組合せをはじめとする合成ポリマーなどのポリマーを含むがこれらに限定されない材料から形成され得る。バッグの部分を、熱、無線周波エネルギー、高周波（HF）エネルギー、誘電エネルギーなどのエネルギー、および／または当技術分野において公知の任意の他の方法を用いて、密封および／または溶接することができる。

【0106】

収集バッグは、処理および／または脱凝集バッグとして使用することができる。収集バ

10

20

30

40

50

ッグは、約 4 c m ～ 約 1 2 c m までの範囲の幅および約 1 0 c m ～ 約 3 0 c m までの範囲の幅を有し得る。例えば、処理に使用するための収集バッグは、約 7 . 8 c m の幅および約 2 0 c m の長さを有し得る。具体的には、バッグ、例えば、E V A ポリマーもしくはそのブレンド、酢酸ビニルとポリオレフィンのポリマーブレンド、および／または 1 つもしくは複数のポリアミド（ナイロン）を使用するバッグは、ヒートシール可能であり得る。

【 0 1 0 7 】

インジケータは、コード、文字、言葉、名前、アルファベットコード、数、画像、バーコード、クイックレスポンス（Q R）コード（登録商標）、タグ、トラッカー、例えばスマートトラッカータグもしくはブルートゥース（登録商標）トラッカー、および／または当技術分野において公知の任意のインジケータを含み得るが、これらに限定されない。一部の実施形態では、インジケータをキットの構成要素の表面に印刷、エッチングおよび／または貼り付けることができる。インジケータを、接着剤を使用してバッグ上に配置することもでき、例えば、ステッカーまたはトラッカーをバッグおよび／または複数のバッグ上に位置付けることができる。収集バッグおよび／または凍結保存キットは、複数のインジケータ、例えば、数字コードおよび／または Q R コード（登録商標）を含み得る。

【 0 1 0 8 】

インジケータ、例えば、Q R コード（登録商標）、タグ、例えばスマートタグ、および／またはトラッカーを使用して、バッグ内の試料を識別することができ、ならびにデバイスが、凍結保存キット内で行われる脱凝集、富化および／または安定化プロセスのタイプに従って特定のプログラムを実行するように、デバイスのプロセッサに指示することができる。異なるタイプの培地、例えば、酵素培地、腫瘍消化培地、および／または制御された凍結速度を可能にし得る凍結保存用培地を、これらのプロセスで使用するすることができる。一部の実施形態では、凍結保存キットおよび／またはその構成要素は、自動化デバイスにより読取り可能であり得るインジケータを含み得る。したがって、デバイスは、そのようなデバイスへの挿入時に組織を処理するための特異的な全自動の方法を実行し得る。本発明は、試料の処理、特に自動化処理に、特に有用である。一部の事例では、本明細書に記載される凍結保存キットおよび／またはその構成要素は、細胞または細胞凝集体の脱凝集、富化および／または安定化のための自動化および／または半自動化プロセスにおいて使い捨てのものであり得る。一部の実施形態では、収集バッグなどの、凍結保存キットで使用するためのバッグは、一部の実施形態では複数のプロセスに使用され得る。例えば、収集バッグを異なる位置で繰り返し密封して、組織試料、例えば、生検試料および／または固形組織の処理するための別個の区画を作出することができる。

【 0 1 0 9 】

さらに、マークを組織収集バッグなどのバッグの様々な位置に付けて、バッグを密封、締め付ける、および／または物体に取り付けることができる場所を示すことができる。一部の実施形態では、バッグを締め付ける、密封する、および／または機器などの物体に取り付けることができる場所を示すマークを、使用前にバッグに配置することができる。例えば、1 つまたは複数のマークを製造中にバッグに配置することができる。

【 0 1 1 0 】

ポジショナーを使用して、バッグ内の組織材料を使用中に、例えば、機器に近接した位置に配置して、確実に正しく処置することができる。一部のシステムでは、ポジショナーは、本明細書に記載されるバッグの自動化システムにおける使用を容易にすることができる。具体的には、ポジショナーを使用して、自動化システムを通してバッグを移動させることができる。

【 0 1 1 1 】

Q R コード（登録商標）などのインジケータの使用は、特定の試料についての処理ステップの追跡を可能にし得、したがって、所与のプロセスを経る試料を追うことが可能である。

【 0 1 1 2 】

本発明は、下記の番号付きの段落で論じられるような治療用細胞集団を含み、提供する。

【0113】

したがって、本発明の目的は、一切の既知の製品、製品の製造プロセス、または製品の使用方法を本発明の範囲に包含することではなく、したがって、本出願人は、その権利を留保し、一切の既知の製品、プロセスまたは方法の放棄をこれにより開示する。本発明は、USPTO（合衆国法典第35巻第112条第1項）またはEPO（EPC第83条）の記述要件および実施可能要件を満たさない、一切の製品、プロセス、または製品の製造、または製品の使用方法を本発明の範囲に包含することを意図しておらず、したがって、本出願人は、その権利を留保し、一切の既知の製品、製品の製造プロセス、または製品の使用法の放棄をこれにより開示することに、さらに留意されたい。EPC第53条（c）ならびにEPC規則28（b）および（c）に準拠していることは、本発明の実施に際して有利であり得る。本願の系統におけるまたは一切の他の系統におけるまたは一切の第三者の一切の先に出願された出願における本出願人のいずれかの取得特許の対象である一切の実施形態を明示的に放棄する全ての権利は、明示的に留保される。見込みとみなすべきものは、本明細書にはない。

10

【0114】

本開示において、特に、特許請求の範囲および／または段落において、「含む（comprises）」、「含んだ（comprised）」、「含むこと（comprising）」などのような用語が米国特許法におけるそれに帰する意味を有し得ること、例えば、これらの用語が「含む（includes）」、「含んだ（included）」、「含むこと（including）」などを意味し得ること、ならびに「から本質的になること」および「から本質的になる」のような用語が米国特許法におけるそれに帰する意味を有し得ること、例えば、これらの用語が、明示的に列挙されていない要素を考慮に入れるが、先行技術に見られる要素または本発明の基本的もしくは新規特徴に影響を与える要素を除外することに、留意されたい。

20

【0115】

これらおよび他の実施形態が開示され、または以下の詳細な説明から明らかであり、以下の詳細な説明により包含される。

【0116】

本特許または出願のファイルは、カラーで製作された少なくとも1つの図面を含有する。カラーの図面（複数可）を伴う本特許または特許出願公開のコピーは、要請し、必要な料金を支払えば、特許庁により提供されるであろう。

30

【0117】

例として示され、本発明を記載されている特定の実施形態だけに限定することを意図するものではない以下の詳細な説明は、付属図と併せて最もよく理解され得る。

【図面の簡単な説明】

【0118】

【図1】図1は、固形組織材料の脱凝集および消化のための可撓性容器の概略図である。

【0119】

【図2-1】図2aは、消化された固形組織材料を次のモジュールまたは廃棄容器に方向付ける一連のフィルターモジュールの概略図である。

40

【0120】

【図2-2】図2bは、廃棄材料の消化および除去後に細胞を富化するための可撓性容器の概略図である。

【0121】

【図2-3】図2cは、廃棄材料の消化および除去後に細胞を富化するための可撓性容器の別の実施形態の概略図である。

【0122】

【図3-1】図3aは、固形組織材料の脱凝集および／または細胞の富化後に細胞を安定

50

化するための可撓性容器の概略図である。

【0123】

【図3-2】図3bは、固形組織材料の脱凝集および／または細胞の富化後に凍結保存によって細胞を安定化するための追加の可撓性容器との接続を含有する可撓性容器の別の実施形態の概略図である。

【0124】

【図4】図4は、無菌キットの概略図である。

【0125】

【図5】図5は、数秒間から数時間までにわたる種々の脱凝集時間にわたって観察された脱凝集プロセスから得られた細胞の集団における倍率変化を示す棒グラフである。

10

【0126】

【図6】図6は、脱凝集および安定化のために使用されるプロセスのモジュールの一部である、異なる出発溶液のための複数の可撓性容器を使用した半自動無菌組織処理方法を記載する図である。

【0127】

【図7】図7は、プロセスに使用される培地を含む可撓性容器をどのように無菌処理キットおよび方法のモジュール間で共有することができるかを記載する図である。

【0128】

【図8】図8は、TILを生成するための方法の一般的な概要を示す。

【0129】

20

【図9】図9は、腫瘍出発材料の収集および処理の概要を示す。

【0130】

【図10】図10は、TIL製造プロセスの概要を示す。

【0131】

【図11】図11Aは、組織材料の処理および保管のためのキットの実施形態の図を示す。

【0132】

図11Bは、組織材料の処理および保管のためのキットの実施形態の図を示す。

【0133】

図11Cは、組織材料の処理および保管のためのキットの実施形態の図を示す。

30

【0134】

図11Dは、組織材料の処理および保管のためのキットの実施形態の図を示す。

【0135】

【図12-1】図12Aは、収集バッグの実施形態の斜視図を示す。

【0136】

図12Bは、収集バッグの実施形態の斜視図を示す。

【0137】

図12Cは、収集バッグの実施形態の斜視図を示す。

【0138】

【図12-2】図12Dは、収集バッグの実施形態の斜視図を示す。

40

【0139】

図12Eは、収集バッグの実施形態の斜視図を示す。

【0140】

【図13-1】図13Aは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0141】

図13Bは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0142】

図13Cは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0143】

【図13-2】図13Dは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

50

【0144】

図13Eは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0145】

【図14】図14は、収集バッグの実施形態の背面図を示す。

【0146】

【図15】図15は、収集バッグの実施形態の側面図を示す。

【0147】

【図16】図16Aは、収集バッグの実施形態の上面図を示す。

【0148】

図16Bは、収集バッグの実施形態の底面図を示す。

10

【0149】

【図17】図17Aは、部分的に開口した、本発明の処理のために組織を中に入れて密封するための、密封された縁部を有する組織収集バッグの実施形態の上面図を示す。

【0150】

図17Bは、開口した、本発明の処理のために組織を中に入れて密封するための、密封された縁部を有する組織収集バッグの実施形態の底面図を示す。

【0151】

【図18】図18Aは、部分的に開口した、本発明の処理のために組織を中に入れて密封するための組織収集バッグの実施形態の上面図を示す。

【0152】

図18Bは、完全に開口した、本発明の処理のために組織を中に入れて密封するための組織収集バッグの実施形態の上面図を示す。

20

【0153】

【図19】図19Aは、部分的に開口した、本発明の処理のために組織を中に入れて密封するための、所定の幅を有する密封された縁部を有する組織収集バッグの実施形態の上面図を示す。

【0154】

図19Bは、完全に開口した、本発明の処理のために組織を中に入れて密封するための、所定の幅を有する密封された縁部を有する組織収集バッグの実施形態の上面図を示す。

【0155】

【図20-1】図20Aは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0156】

図20Bは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0157】

図20Cは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0158】

【図20-2】図20Dは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0159】

図20Eは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0160】

【図21-1】図21Aは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0161】

図21Bは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0162】

図21Cは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0163】

【図21-2】図21Dは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0164】

図21Eは、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0165】

40

50

【図 2 2 - 1】図 2 2 A は、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0 1 6 6】

図 2 2 B は、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0 1 6 7】

【図 2 2 - 2】図 2 2 C は、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0 1 6 8】

図 2 2 D は、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0 1 6 9】

【図 2 3】図 2 3 は、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0 1 7 0】

【図 2 4】図 2 4 は、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0 1 7 1】

【図 2 5】図 2 5 は、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0 1 7 2】

【図 2 6】図 2 6 は、チューブおよび口と連結した収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0 1 7 3】

【図 2 7】図 2 7 A は、使用前の収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0 1 7 4】

図 2 7 B は、例えば、材料をバッグ内に投入した後に密封された収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0 1 7 5】

【図 2 8】図 2 8 は、開口した収集バッグおよび凍結保存バッグを含む上向きの凍結保存キットの実施形態の上面図を示す。

【0 1 7 6】

【図 2 9】図 2 9 は、閉じる位置が示された収集バッグおよび凍結保存バッグを含む下向きの凍結保存キットの実施形態の上面図を示す。

【0 1 7 7】

【図 3 0】図 3 0 は、閉鎖収集バッグおよび凍結保存バッグを含む上向きの凍結保存キットの実施形態の上面図を示す。

【0 1 7 8】

【図 3 1】図 3 1 は、閉鎖収集バッグおよび凍結保存バッグを含む上向きの凍結保存キットの実施形態の側面図を示す。

【0 1 7 9】

【図 3 2】図 3 2 は、凍結保存キットの実施形態の端面図を示す。

【0 1 8 0】

【図 3 3】図 3 3 は、チューブと連結した、印を含む収集バッグの実施形態の上面図を示す。

【0 1 8 1】

【図 3 4】図 3 4 は、収集バッグ、フィルター、および凍結保存バッグを含む凍結保存キットの実施形態の正面図を示す。

【0 1 8 2】

【図 3 5】図 3 5 は、収集バッグ、フィルター、および凍結保存バッグを含む凍結保存キットの実施形態の正面図を示す。

【0 1 8 3】

【図 3 6】図 3 6 A は、収集バッグ、フィルター、および凍結保存バッグを含む凍結保存キットの実施形態の正面図を示す。

【0 1 8 4】

図 3 6 B は、使用中、収集バッグの表面に近接するように配置されたクランプ、ヒンジ、およびラッチならびに棒を使用して固定された収集バッグの実施形態の側面図を示す。

10

20

30

40

50

【0185】

図36Cは、収集バッグ上に配置されたクランプの分解組立図を示す。

【0186】

【図37】図37は、収集バッグ、フィルター、および凍結保存バッグを含む凍結保存キットの実施形態の正面図を示す。

【0187】

【図38】図38は、収集バッグ、フィルター、および凍結保存バッグを含む凍結保存キットの実施形態の正面図を示す。

【0188】

【図39】図39は、クランプによって固定された収集バッグの実施形態の正面図を示す。

10

【0189】

【図40】図40は、収集バッグの実施形態の正面図を示す。

【0190】

【図41】図41は、閉鎖試料容器内で組織を個々の細胞または細胞凝集塊に脱凝集させるための踏付けデバイスの正面図を示す。

【0191】

【図42】図42および図43は、2つの異なるそれぞれの操作上の位置にある、図41のデバイスを示す。

【図43】図42および図43は、2つの異なるそれぞれの操作上の位置にある、図41のデバイスを示す。

20

【図44】図44は、前の図に示されているデバイスの平面図を示す。

【0192】

【図45】図45は、デバイスの代替的な構造の別の平面図を示す。

【0193】

【図46】図46、47および48は、図41～45のデバイスでの使用に適した試料容器の3つの異なる構造を示す。

【図47】図46、47および48は、図41～45のデバイスでの使用に適した試料容器の3つの異なる構造を示す。

【図48】図46、47および48は、図41～45のデバイスでの使用に適した試料容器の3つの異なる構造を示す。

30

【0194】

【図49】図49は、使用のために調製されている試料バッグを示す。

【0195】

【図51-1】図51a、51b、および51cは、代替的な試料バッグの密封の仕方を示す。

【図51-2】図51a、51b、および51cは、代替的な試料バッグの密封の仕方を示す。

【0196】

【図52】図52、53および54は、バッグを使用のために調製するための器具および技法を示す。

40

【図53】図52、53および54は、バッグを使用のために調製するための器具および技法を示す。

【図54】図52、53および54は、バッグを使用のために調製するための器具および技法を示す。

【0197】

【図55】図55は、試料バッグまたは容器の踏付けデバイスへのローディングを示す。

【0198】

【図56】図56、57および58は、脱凝集された試料を分割するための器具を示す。

【図57】図56、57および58は、脱凝集された試料を分割するための器具を示す。

50

【図 5 8】図 5 6、5 7 および 5 8 は、脱凝集された試料を分割するための器具を示す。

【0 1 9 9】

【図 5 9】図 5 9、6 0 および 6 1 は、試料または分割された試料の温度を制御するための器具を示す。

【図 6 0】図 5 9、6 0 および 6 1 は、試料または分割された試料の温度を制御するための器具を示す。

【図 6 1】図 5 9、6 0 および 6 1 は、試料または分割された試料の温度を制御するための器具を示す。

【0 2 0 0】

【図 6 2】図 6 2～6 4 は、踏付けデバイスのさらなる実施形態を示す。

10

【図 6 3】図 6 2～6 4 は、踏付けデバイスのさらなる実施形態を示す。

【図 6 4】図 6 2～6 4 は、踏付けデバイスのさらなる実施形態を示す。

【0 2 0 1】

【図 6 5】図 6 5 は、腫瘍組織の収集、処理および凍結保存の例示的な流れ図である。

【0 2 0 2】

【図 6 6】図 6 6 は、処理され、凍結保存された腫瘍組織からの T I L 製造の例示的な流れ図である。

【0 2 0 3】

【図 6 7】図 6 7 は、凍結保存された脱凝集された細胞浮遊液と保存加工されていない脱凝集された細胞浮遊液の収量（図 6 7 A）、パーセント生存（図 6 7 B）、およびパーセント C D 3 + T 細胞（図 6 7 C）を比較する。

20

【0 2 0 4】

【図 6 8】図 6 8 A および 6 8 B は、市販の凍結保存剤（cryopreservant）を用いて凍結保存した P B M C の生存率を比較する。

【0 2 0 5】

【図 6 9】図 6 9 は、消化し、次いで、材料を 4℃で 10 分間保持し、その後温度を毎分 -1℃の速度で低下させるか、または、直接 35℃から -80℃まで毎分 -2℃の速度で低下させるプロトコルに従って凍結保存した P B M C の生存率を比較する。

【0 2 0 6】

【図 7 0】図 7 0 は、材料を 4℃で 10 分間保持し、その後温度を毎分 -1℃の速度で低下させるか、または、直接 35℃から -80℃まで毎分 -2℃の速度で低下させるプロトコル後に試料バッグから記録された温度を比較する。

30

【0 2 0 7】

【図 7 1 - 1】図 7 1 は、T I L 0 7 7 の脱凝集および凍結保存を示す：（A）脱凝集機スピード設定値；（B）脱凝集機スピード記録；（C）温度設定値（脱凝集）；（D）クライオプレート温度記録（脱凝集）；（E）温度設定値（凍結保存）；（F）温度記録（凍結保存）；（G）設定値冷却速度；（H）クライオプレート冷却速度記録。

【図 7 1 - 2】図 7 1 は、T I L 0 7 7 の脱凝集および凍結保存を示す：（A）脱凝集機スピード設定値；（B）脱凝集機スピード記録；（C）温度設定値（脱凝集）；（D）クライオプレート温度記録（脱凝集）；（E）温度設定値（凍結保存）；（F）温度記録（凍結保存）；（G）設定値冷却速度；（H）クライオプレート冷却速度記録。

40

【0 2 0 8】

【図 7 2 - 1】図 7 2 は、T I L 0 7 8 の T i s s - U - S t o r による脱凝集および凍結保存（2つのバッグのうちの1つ）を示す：（A）脱凝集機スピード設定値；（B）脱凝集機スピード記録；（C）温度設定値（脱凝集）；（D）クライオプレート温度記録（脱凝集）；（E）温度設定値（凍結保存）；（F）温度記録（凍結保存）；（G）設定値冷却速度；（H）クライオプレート冷却速度記録。

【図 7 2 - 2】図 7 2 は、T I L 0 7 8 の T i s s - U - S t o r による脱凝集および凍結保存（2つのバッグのうちの1つ）を示す：（A）脱凝集機スピード設定値；（B）脱凝集機スピード記録；（C）温度設定値（脱凝集）；（D）クライオプレート温度記録（

50

脱凝集) ; (E) 温度設定値 (凍結保存) ; (F) 温度記録 (凍結保存) ; (G) 設定値冷却速度 ; (H) クライオプレート冷却速度記録。

【0209】

【図73-1】図73は、連続的なプロセスにおけるTIL078のTiss-U-Storによる脱凝集および凍結保存を示す：(A) 脱凝集機スピード設定値 ; (B) 脱凝集機スピード記録 ; (C) 温度設定値 (脱凝集および凍結保存) ; (D) クライオプレート温度記録 (脱凝集および凍結保存) ; (E) 冷却速度設定値 (脱凝集および (凍結保存) ; (F) クライオプレート冷却速度記録 (脱凝集および (凍結保存)。

【図73-2】図73は、連続的なプロセスにおけるTIL078のTiss-U-Storによる脱凝集および凍結保存を示す：(A) 脱凝集機スピード設定値 ; (B) 脱凝集機スピード記録 ; (C) 温度設定値 (脱凝集および凍結保存) ; (D) クライオプレート温度記録 (脱凝集および凍結保存) ; (E) 冷却速度設定値 (脱凝集および (凍結保存) ; (F) クライオプレート冷却速度記録 (脱凝集および (凍結保存)。

10

【0210】

【図74】図74は、最良総合効果および腫瘍負荷のパーセント変化を示すウォーターフォールプロットを示す。CR、完全奏効 ; PD、進行疾患 ; PR、部分奏効 ; SD、安定疾患。腫瘍負荷は、標的病変の直径の合計と定義される ; 腫瘍負荷の変化は、ベースラインからベースライン後の最下点までの変化と定義される。CRが評定される来訪時に標的病変評価基準が報告されなかった (CT/MRIスキャンによって疾患または転移が観察されなかった) 両方のCR患者において、最小ベースライン後SLD、0を使用した。最良総合効果がPDであった対象1名では、いかなる処置後の標的病変評価基準 (新しい病変の観察によって決定される増悪) も報告されず、したがって、プロットには示されていない。

20

【0211】

【図75】図75は、全生存期間を示す。(A) 処置を受けた患者21名全員についての全生存 (OS) 期間の中央値は21.3カ月であった。(B) 定量的応答データを有した患者15名についてのOS期間の中央値は16カ月であった。(C) 非応答者 (N=7) についてのOS期間の中央値は6.5カ月であった。応答者 (定量的応答のみにつき、N=8) についてのOS期間の中央値は結論に達しなかった。

【0212】

【図76】図76は、製造されたTILの特徴を示す。(A) 全規模ITIL-168 GMPランのTILアウトグロース期 (ステージ1) の間の細胞計数。(B) 全規模ITIL-168 GMPランのTIL REP期 (ステージ2) の間の細胞計数。(C) 全規模ITIL-168 GMPランの間のパーセント生存 (%生存可能CD3+細胞)。

30

【発明を実施するための形態】

【0213】

発明の詳細な説明

別段の定義がない限り、本明細書で使用する全ての専門および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。

【0214】

用語「抗CD3抗体」は、成熟ヒトT細胞のT細胞抗原受容体におけるCD3受容体に対するヒト、ヒト化、キメラ、マウスまたは哺乳動物抗体を含む、抗体またはそのバリエーション、例えばモノクローナル抗体を指す。抗CD3抗体は、ムロモナブとしても公知のOKT-3を含む。抗CD3抗体は、T3およびCD3、イプシロンとしても公知の、UHC T1クローンも含む。他の抗CD3抗体としては、例えば、オテリキシズマブ、テプリズマブおよびビシリズマブが挙げられる。

40

【0215】

「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」が示されている場合、投与すべき本発明の組成物の正確な量は、患者 (対象) の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、および状態の個体差を考慮して医師により決定され得る。本明細書に記載

50

される腫瘍浸潤リンパ球（例えば、二次TILまたは遺伝子改変された腫瘍浸潤リンパ球）を含む医薬組成物を、 $10^4 \sim 10^{11}$ 細胞/kg体重（例えば、 $10^5 \sim 10^6$ 、 $10^5 \sim 10^{10}$ 、 $10^5 \sim 10^{11}$ 、 $10^6 \sim 10^{10}$ 、 $10^6 \sim 10^{11}$ 、 $10^7 \sim 10^{11}$ 、 $10^7 \sim 10^{10}$ 、 $10^8 \sim 10^{11}$ 、 $10^8 \sim 10^{10}$ 、 $10^9 \sim 10^{11}$ 、または $10^9 \sim 10^{10}$ 細胞/kg体重）の、これらの範囲内の全ての整数値を含む、用量で投与することができると、一般に述べることができる。腫瘍浸潤リンパ球（一部の場合には、遺伝子改変された細胞傷害性リンパ球を含む）組成物がこれらの投薬量で複数回投与されることもある。腫瘍浸潤リンパ球（一部の場合には、遺伝的に含む）は、免疫療法において一般に知られている注入技法を使用することにより投与することができる（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319: 1676, 1988を参照されたい）。特定の患者のための最適な投薬量および処置レジメンを、医療技術分野の当業者は、疾患の徴候のある患者をモニターし、相応じて処置を調整することによって容易に決定することができる。

10

【0216】

用語「併用投与」、「併用投与すること」、「と組み合わせて投与される」、「と組み合わせて投与すること」、「同時の」、および「併用の」は、本明細書で使用される場合、対象への2つまたはそれより多くの医薬品有効成分（本発明の好ましい実施形態では、例えば、複数のTILと組み合わせて少なくとも1つのカリウムチャンネルアゴニスト）の、両方の医薬品有効成分および／またはそれらの代謝物が対象体内に同時に存在するような投与を包含する。併用投与は、別個の組成物での同時投与、異なる時点における別個の組成物での投与、または2つもしくはそれより多くの医薬品有効成分が存在する組成物での投与を含む。別々の組成物での同時投与、および両方の薬剤が存在する組成物での投与が好ましい。

20

【0217】

「細胞化されたまたは細胞化」は、本明細書で使用される場合、固形組織により、複数の細胞系統／型で一般に構成される多細胞材料が少数の細胞に分解される、脱凝集のプロセスを指し、前記少数の細胞は、1個の細胞を含むがこれに限定されず、非常に少数の様々な系統または細胞型の複数の細胞、すなわち、細胞塊または細胞凝集塊であることもあり得る。

【0218】

「閉鎖系」は、本明細書で使用される場合、外部環境に対して閉鎖されているシステムを指す。細胞培養方法に適している任意の閉鎖系を本発明の方法とともに利用することができる。閉鎖系としては、例えば、密閉G-Rex容器または細胞培養バッグが挙げられるが、これらに限定されない。腫瘍セグメントが閉鎖系に添加されると、系は、TILに患者への投与の準備が整うまで、外部環境に対して開放されない。有利な実施形態では、閉鎖系は、PCT公開番号WO2018/130845に開示されている系である。

30

【0219】

「凍結保存用培地（複数）」または「凍結保存用培地（単数）」は、本明細書で使用される場合、細胞の凍結保存に使用され得る任意の培地を指す。そのような培地は、2%～10% DMSOを含む培地を含み得る。例示的な培地としては、CryoStor CS10、HypoThermosol、Bloodstor BS-55、およびこれらの組合せが挙げられる。

40

【0220】

用語「凍結保存TIL」とは、本明細書では、一次TIL、バルクTIL、または拡大されたTIL（REP TIL）のいずれかのTILが約 -190°C ～ -60°C の範囲で処置され保管されることを意味する。凍結保存のための一般的な方法も、実施例をはじめとする本明細書中の他の箇所で説明される。明確にするために、「凍結保存TIL」は、一次TILの供給源として使用され得る凍結された組織試料とは区別される。

【0221】

「枯渇」は、本明細書で使用される場合、固相に連結された1つのマーカー結合断片に

50

より標識されている望ましくない細胞から所望の細胞を分離するネガティブ選択プロセスを指す。

【0222】

「脱凝集（名詞）または脱凝集する（動詞）」は、本明細書で使用される場合、単一細胞または少細胞数の凝集体への固形組織の変換であって、単一細胞が、球状体として、5 μm 、6 μm 、7 μm 、8 μm 、9 μm 、10 μm 、20 μm 、30 μm 、40 μm 、50 μm 、60 μm 、70 μm 、80 μm 、90 μm 、100 μm の、またはそれより大きい範囲の直径を有し、この直径がより通常は7～20 μm の間である、変換を指す。

【0223】

用語「有効量」または「治療有効量」は、疾患処置を含むがこれに限定されない所期の用途を達成するために十分である、本明細書に記載の化合物または化合物の組合せの量を指す。治療有効量は、所期の用途（*in vitro*もしくは*in vivo*）、または処置されることになる対象および疾患状態（例えば、対象の体重、年齢および性別）、疾患状態の重症度、または投与方法によって変わり得る。この用語は、標的細胞における特定の応答（例えば、血小板接着および／または細胞遊走の低減）を誘導することになる用量にも適用される。具体的な用量は、選択される特定の化合物、従うべき投与レジメン、化合物が他の化合物と組み合わせて投与されるかどうか、投与のタイミング、それが投与される組織、および化合物が担持される物理的送達系によって、変わることになる。

【0224】

「操作された」は、本明細書で使用される場合、組織由来の細胞機能をそれらの当初の機能からその最終ユーティリティのための新たなまたは改善された機能へと変化させる、核酸材料または因子どちらかの付加を指す。

【0225】

「酵素培地」は、本明細書で使用される場合、コラゲナーゼ、トリプシン、リパーゼ、ヒアルロニダーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、リペラーゼHI、ペプシンまたはこれらの組合せなどの、酵素活性を有する培地を指す。

【0226】

「濾液」は、本明細書で使用される場合、フィルター、メッシュまたは膜を通過する材料を指す。

【0227】

「可撓性容器」は、本明細書で使用される場合、1つまたは複数の異なるタイプのフィルムを有する複数の形式の可撓性包装系を指す。各フィルムのタイプは、プロセスのステップに依存して、滅菌流体、細胞材料に由来する固形組織の、物理的、化学的および機能的特性、ならびに容器完全性を保つために、特定の特性が得られるように選択される。

【0228】

当分野では凍結保護物質とも呼ばれる「凍結溶液」または「凍結保存溶液」は、凍結防止添加剤を含有する溶液である。これらは、一般に、細胞が凍結中に曝露される物理的応力を、凍結損傷（すなわち、氷形成に起因する）を最小限に抑えるように変更する、浸透性、非毒性化合物であり、最も一般的には、次のうちの1つまたは複数に対する%体積／体積である：ジメチルスルホキシド（DMSO）、エチレングリコール、グリセロール、2-メチル-2,4-ペンタンジオール（MPD）、プロピレングリコール、スクロース、およびトレハロース。

【0229】

用語「血液悪性疾患」は、血液、骨髄、リンパ節およびリンパ系の組織を含むがこれらに限定されない、造血およびリンパ組織の、哺乳動物のがんおよび腫瘍を指す。血液悪性疾患は、「液性腫瘍」とも呼ばれる。血液悪性疾患は、急性リンパ性白血病（ALL）、慢性リンパ球性リンパ腫（CLL）、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性単球性白血病（AMoL）、ホジキンリンパ腫、および非ホジキンリンパ腫を含むが、これらに限定されない。用語「B細胞血液悪性疾患」は、B細胞を冒す血液悪性疾患を指す。

【0230】

用語「IL-2」（本明細書では「IL2」とも呼ばれる）は、インターロイキン-2として公知のT細胞増殖因子を指し、ヒトおよび哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換体、グリコフォーム、バイオシミラー、ならびにこれらのバリエーションを含む、全ての形態のIL-2を含む。IL-2は、例えば、Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88およびMalek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79に記載されており、これらの開示は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-2のアミノ酸配列は、表2（配列番号3）で与えられる。例えば、用語IL-2は、ヒト、組換え形態のIL-2、例えば、アルデスロイキン（使い捨てバイアル1本当たり22,000,000 IUで複数の供給業者から市販されているPROLEUKIN）、ならびにCellGenix, Inc.、Portsmouth, N. H.、USA（CELLGRO GMP）またはProSpec-Tany TechnoGene Ltd.、East Brunswick, N. J.、USA（カタログ番号CYT-209-b）により市販されている形態の組換えIL-2、および他の販売会社からの他の市販の等価物を包含する。アルデスロイキン（デス-アラニル-1、セリン-125ヒトIL-2）は、およそ15 kDaの分子量を有する、非グリコシル化ヒト組換え形態のIL-2である。用語IL-2は、Nektar Therapeutics、South San Francisco, Calif.、USAから入手可能なPEG化IL2プロドラッグNKTR-214を含む、本明細書に記載の、PEG化形態のIL-2も包含する。本発明での使用に好適なNKTR-214およびPEG化IL-2は、米国特許出願公開第US2014/0328791A1号および国際特許出願公開番号WO2012/065086A1号に記載されている。本発明での使用に好適な代替形態のコンジュゲートIL-2は、米国特許第4,766,106号、同第5,206,344号、同第5,089,261号および同第4902,502号に記載されている。本発明での使用に好適なIL-2の製剤は、米国特許第6,706,289号に記載されている。

【0231】

用語「IL-4」（本明細書では「IL4」とも呼ばれる）は、Th2 T細胞によりならびに好酸球、好塩基球およびマスト細胞により産生される、インターロイキン4として公知のサイトカインを指す。IL-4は、ナイーブヘルパーT細胞（Th0細胞）のTh2 T細胞への分化を調節する。Steinke and Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70。IL-4により活性化されると、Th2 T細胞は、その後、ポジティブフィードバックループで追加のIL-4を産生する。IL-4はまた、B細胞増殖およびクラスII MHC発現を刺激し、B細胞からのIgEおよびIgG1発現へのクラススイッチを誘導する。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-4は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.、East Brunswick, N. J.、USA（カタログ番号CYT-211）およびThermoFisher Scientific, Inc.、Waltham, Mass.、USA（ヒトIL-15組換えタンパク質、カタログ番号Gibco CTP0043）をはじめとする複数の供給業者から市販されている。

【0232】

用語「IL-7」（本明細書では「IL7」とも呼ばれる）は、間質および上皮細胞からならびに樹状細胞から得ることができる、インターロイキン7として公知のグリコシル化された組織由来のサイトカインを指す。Fry and Mackall, Blood 2002, 99, 3892-904。IL-7は、T細胞の発達を刺激することができる。IL-7は、IL-7受容体アルファと共通ガンマ鎖受容体とからなるヘテロ二量体であるIL-7受容体に結合し、これは、胸腺内でのT細胞の発達および末梢における生存にとって重要な一連のシグナルをもたらす。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-7は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.、East Brunswick, N. J.、USA（カタログ番号CYT-254）およびThermoFisher Scientific, Inc.、Waltham, Mass.、USA（ヒトIL-15組換えタ

ンパク質、カタログ番号 G i b c o P H C 0 0 7 1) をはじめとする複数の供給業者から市販されている。

【 0 2 3 3 】

用語「IL-12」(本明細書では「IL12」とも呼ばれる)は、インターロイキン-12として公知のT細胞増殖因子を指す。インターロイキン(IL)-12は、2つのジスルフィド結合グリコシル化タンパク質サブユニットから構成される分泌型ヘテロ二量体サイトカインであり、前記サブユニットは、それらの近似分子量のためp35およびp40と呼ばれる。IL-12は、主として抗原提示細胞により産生されるものであり、T細胞またはナチュラルキラー(NK)細胞の表面に提示される二本鎖受容体複合体に結合することによって細胞性免疫を駆動する。IL-12受容体ベータ-1(IL-12Rp1)鎖は、IL-12のp40サブユニットに結合し、IL-12とその受容体との一次相互作用をもたらす。しかし、細胞内シグナル伝達をもたらすのは、第2の受容体鎖であるIL-12RP2のIL-12p35ライゲーションである。抗原提示と同時に起こるIL-12シグナル伝達は、インターフェロンガンマ(IFN γ)産生を特徴とする、Th1細胞は、一部の細胞内病原体に対する免疫を促進し、補体結合抗体アイソタイプを生成し、腫瘍免疫監視に寄与すると考えられる。それ故、IL-12は、宿主防御免疫機構にとって重要な構成要素であると考えられる。IL-12は、IL-23、IL-27、IL-35、IL-39も含むサイトカインのIL-12ファミリーの一部である。

10

【 0 2 3 4 】

用語「IL-15」(本明細書では「IL15」とも呼ばれる)は、インターロイキン-15として公知のT細胞増殖因子を指し、ヒトおよび哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換体、グリコフォーム、バイオシミラー、ならびにこれらのバリエーションを含む、全ての形態のIL-15を含む。IL-15は、例えば、Fehniger and Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32に記載されており、この開示は、参照により本明細書に組み込まれる。IL-15は、 β および γ シグナル伝達受容体サブユニットをIL-2と共有する。組換えヒトIL-15は、114のアミノ酸(およびN末端メチオニン)を含有する一本の非グリコシル化ポリペプチド鎖であり、12.8kDaの分子量を有する。組換えヒトIL-15は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.、East Brunswick, N. J.、USA(カタログ番号CYT-230-b)およびThermoFisher Scientific, Inc.、Waltham, Mass.、USA(ヒトIL-15組換えタンパク質、カタログ番号34-8159-82)をはじめとする複数の供給業者から市販されている。

20

30

【 0 2 3 5 】

用語「IL-18」(本明細書では「IL18」とも呼ばれる)は、インターロイキン-15として公知のT細胞増殖因子を指す。インターロイキン-18(IL-18)は、その構造、受容体ファミリーおよびシグナル伝達経路に起因して、IL-1サイトカインファミリーに属する炎症性サイトカインである。関連サイトカインとしては、IL-36、IL-37、IL-38が挙げられる。

【 0 2 3 6 】

用語「IL-21」(本明細書では「IL21」とも呼ばれる)は、インターロイキン-21として公知の多機能サイトカインタンパク質を指し、ヒトおよび哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換体、グリコフォーム、バイオシミラー、ならびにこれらのバリエーションを含む、全ての形態のIL-21を含む。IL-21は、例えば、Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95に記載されており、この開示は、参照により本明細書に組み込まれる。IL-21は、主として、ナチュラルキラーT細胞および活性化ヒトCD4⁺T細胞により産生される。組換えヒトIL-21は、132のアミノ酸を含有する一本の非グリコシル化ポリペプチド鎖であり、15.4kDaの分子量を有する。組換えヒトIL-21は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.、East Brunswick, N. J.、USA(カタログ番号C

40

50

Y T - 4 0 8 - b) および T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c , I n c . 、 W a l t h a m , M a s s . 、 U S A (ヒ ト I L - 2 1 組 換 え タ ン パ ク 質 、 カ タ ロ グ 番 号 1 4 - 8 2 1 9 - 8 0) を は じ め と す る 複 数 の 供 給 業 者 か ら 市 販 さ れ て い る 。

【 0 2 3 7 】

用語「液性腫瘍」は、本来は流体である細胞の異常な塊を指す。液性腫瘍がんは、白血病、骨髄腫およびリンパ腫、ならびに他の血液悪性疾患を含むが、これらに限定されない。液性腫瘍から得られるTILは、本明細書では骨髄浸潤リンパ球(MIL)とも呼ばれ得る。

【 0 2 3 8 】

「磁性粒子」における「磁性」は、本明細書で使用される場合、当業者に周知の方法で調製することができる磁性粒子の全てのサブタイプ、特に、強磁性粒子、超常磁性粒子および常磁性粒子を指す。「強磁性」材料は、磁場の影響を強く受けやすく、磁場が除去されたときに磁性を保持することができる。「常磁性」材料は、弱い磁化率しか有さず、磁場が除去されるとそれらの弱い磁力をすぐに失う。「超常磁性」材料は、非常に磁力による影響を受けやすく、すなわち、それらは、磁場に置かれると強磁性になるが、常磁性材料と同様にそれらの磁力をすぐに失う。

【 0 2 3 9 】

「マーカー」は、本明細書で使用される場合、ある特定の細胞型により特異的に発現される細胞抗原を指す。優先的に、マーカーは細胞表面マーカーであり、したがって、生きている細胞の富化、単離および／または検出を行うことができる。

【 0 2 4 0 】

「マーカー結合断片」は、本明細書で使用される場合、細胞の所望の標的分子、すなわち抗原、に優先的に結合する任意の部分を含む。部分という用語は、例えば、抗体または抗体断片を含む。用語「抗体」は、本明細書で使用される場合、当業者に周知の方法により生成することができるポリクローナルまたはモノクローナル抗体を指す。抗体は、いずれの種、例えば、マウス、ラット、ヒツジ、ヒト、のものであってもよい。治療を目的として、非ヒト抗原結合断片を使用することになる場合、これらの断片を当技術分野において公知の任意の方法によりヒト化することができる。抗体はまた、改変抗体(例えば、オリゴマー、還元、酸化および標識抗体)であってもよい。用語「抗体」は、インタクト分子と、抗体断片、例えばFab、Fab'、F(ab')₂、Fvおよび一本鎖抗体の両方を含む。加えて、用語「マーカー結合断片」は、細胞の所望の標的分子に優先的に結合する、抗体または抗体断片以外の任意の部分を含む。好適な部分は、限定ではないが、所望の標的分子に結合するアプタマーとして公知のオリゴヌクレオチド(Hermann and Pantel, 2000: Science 289: 820-825)、炭水化物、レクチン、または任意の他の抗原結合タンパク質(例えば、受容体-リガンド相互作用)を含む。

【 0 2 4 1 】

「培地」は、細胞培養の技術分野、細胞の取り扱いの技術分野、および細胞死を低減させるために使用される安定化の技術分野において公知の様々な溶液を意味し、次の培地のうちの1つまたは複数を含むがそれらに限定されない：臓器保存溶液、選択的溶解溶液、PBS、DMEM、HBSS、DPBS、RPMI、イスコフ培地、X-VIVO(商標)、乳酸加リンゲル液、酢酸リンゲル液、食塩水、PLASMALYTE(商標)溶液、晶質液およびIV輸液、コロイド溶液およびIV輸液、水中5パーセントデキストロース(D5W)、ハルトマン溶液。培地は、上述の培地のような標準的な細胞培地であることもあり、あるいは例えば、一次ヒト細胞培養(例えば、内皮細胞、肝細胞もしくはケラチン産生細胞のための)または幹細胞(例えば、樹状細胞成熟、血球系拡大、ケラチン産生細胞、間葉系幹細胞もしくはT細胞拡大)のための特別な培地であることもある。培地は、当技術分野において周知のサプリメントまたは試薬、例えば、アルブミンおよび輸送タンパク質、アミノ酸およびビタミン、抗生物質、結合因子、増殖因子およびサイトカイン、ホルモン、代謝阻害剤または可溶化剤を有し得る。様々な培地が、例えば、ThermoFisher ScientificまたはSigma-Aldrichから、市販さ

10

20

30

40

50

れている。

【0242】

用語「微小環境」は、本明細書で使用される場合、固形もしくは血液系腫瘍微小環境を全体として指すこともあり、またはその微小環境内の細胞の個々のサブセットを指すこともある。腫瘍微小環境は、本明細書で使用される場合、Swartz, et al., Cancer Res., 2012, 72, 2473に記載されているような、「腫瘍性形質転換を促進し、腫瘍成長および浸潤を支持し、腫瘍を宿主免疫から保護し、治療抵抗性を助長し、生育するための優勢な転移のためにニッチを提供する、細胞と可溶性因子とシグナル伝達分子と細胞外マトリックスと機械的キュー」の複雑な混合物を指す。腫瘍は、T細胞により認識されるはずである抗原を発現するが、微小環境による免疫抑制のため、免疫系による腫瘍排除は稀である。

10

【0243】

用語「ネガティブ分離された」は、本明細書で使用される場合、固相に連結された1つのマーカー結合断片により結合される細胞の能動的分離を指し、これらの細胞は、必要な細胞集団ではない。

【0244】

「標識されていない」または「手付かずの」は、本明細書で使用される場合、固相に連結された1つのマーカー結合断片により結合されない細胞を指す。標識されていない、手付かずの細胞画分は、所望の標的細胞を含有する。

【0245】

「非標的細胞」は、本明細書で使用される場合、望ましくない細胞型を除去するために使用される固相に連結されている1つのマーカー結合断片が特異的に結合される細胞を指す。

20

【0246】

「OKT-3」（本明細書では「OKT3」とも呼ばれる）は、成熟T細胞のT細胞抗原受容体におけるCD3受容体に対するヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む、モノクローナル抗体またはそのバイオシミラーもしくはバリエーションを指し、市販の形態、例えば、OKT-3（30 ng/mL、MACS GMP CD3 pure、Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, Calif., USA）およびムロモナブまたはそのバリエーション、保存的アミノ酸置換体、グリコフォームもしくはバイオシミラーを含む。

30

【0247】

「粒子」は、本明細書で使用される場合、固相、例えば、コロイド状粒子、マイクロスフェア、ナノ粒子またはビーズを指す。そのような粒子の生成のための方法は、当技術分野において周知である。粒子は、磁性粒子であることもあり、または他の選択的特性を有することもある。粒子は、溶液もしくは懸濁液中にあることもあり、またはそれらは、本発明での使用の前に凍結乾燥状態であることもある。その場合、凍結乾燥粒子は、本発明に関連して処理される試料との接触の前に従来の緩衝剤で再構成される。

【0248】

用語「末梢血単核細胞」および「PBMC」は、リンパ球（T細胞、B細胞、NK細胞）および単球をはじめとする、円形核を有する末梢血細胞を指す。好ましくは、末梢血単核細胞は、被照射同種異系の末梢血単核細胞である。PBMCは、抗原提示細胞の一種である。

40

【0249】

用語「薬学的に許容される担体」または「薬学的に許容される賦形剤」は、任意のおよび全ての溶媒、分散媒、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤、ならびに不活性成分を含むように意図されている。医薬品有効成分のためのそのような薬学的に許容される担体または薬学的に許容される担体の使用は、当技術分野において周知である。任意の従来の薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤が、医薬品有効成分と不適合である場合を除いて、本発明の治療用組成物におけるその使用が企図さ

50

れる。追加の医薬品有効成分、例えば他の薬物も、記載される組成物および方法に組み込むことができる。

【0250】

用語「細胞の集団」（TILを含む）とは、本明細書では、共通の形質を共有するいくつかの細胞を意味する。通例、集団は、一般に、数が $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{12}$ の範囲であり、TIL集団が異なれば含む数も異なる。

【0251】

「ポジティブ分離された」は、本明細書で使用される場合、固相に連結された1つのマーカー結合断片により結合される細胞の能動的分離を指し、これらの細胞は、必要な細胞集団である。

【0252】

「ネガティブ分離された」は、本明細書で使用方法、固相に連結された1つのマーカー結合断片により結合される細胞の能動的分離を指し、これらの細胞は、必要な細胞集団ではない。

【0253】

「純度」は、本明細書で使用される場合、当初の固形組織からの所望される標的集団（単数または複数）のパーセンテージを指す。

【0254】

「急速拡大」は、抗原特異的TILの数の、一週間かけて少なくとも約3倍（または4、5、6、7、8もしくは9倍）の、より好ましくは、一週間かけて少なくとも約10倍（または20、30、40、50、60、70、800もしくは90倍）の、より好ましくは、一週間かけて少なくとも約100倍（または200、300、400、500、600、700、800もしくは900倍）の、または最も好ましくは、一週間かけて少なくとも約1000倍（もしくは2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000もしくは9000倍）の増加を意味する。いくつかの急速拡大プロトコルの概要が下で述べられる。

【0255】

「再生医療薬」、「養子細胞療法薬」または「先端医療医薬品」は、細胞材料の一部または全ての作用；適用後の哺乳動物のウェルビーイングを向上させる目的での細胞材料の一部または全ての支持作用、どちらかによる、1または複数の哺乳動物の治療を目的として使用される細胞材料を指すために、本明細書では同義で使用する。治療用細胞は、これらの作用を提供するために、直接使用されることもあり、またはさらなる処理、拡大および／もしくは操作を必要とすることもある。

【0256】

「試料」は、本明細書で使用される場合、任意の比で細胞を含有する試料を指す。優先的に、これらの細胞は、生存可能である。一部の事例では、これらの細胞はまた、後続の核酸またはタンパク質抽出に使用され得る固定または凍結された細胞であり得る。試料は、動物、特に、哺乳動物、例えば、マウス、ラットまたはヒトからのものであり得る。細胞を含有する任意の圧縮性固形組織を使用することができる。本発明は、主として、固形腫瘍組織からの造血およびがん細胞の単離によって例証される。しかし、本発明は、任意の哺乳動物固形組織からの幅広い細胞の単離のための方法に関する。

【0257】

「固相」は、本明細書で使用される場合、別の基質、例えば、粒子、フルオロフォア、ビオチンのようなハプテン、ポリマー、またはより大きい表面、例えば培養皿およびマイクロタイタープレートに結合される、マーカー結合断片、例えば抗体、の連結を指す。一部の場合には、例えば、抗原結合断片が、培養皿のより大きい表面に連結される場合、連結によって抗原結合断片が直接固定化されることになる。他の場合には、この連結によって間接的に固定化されることになり、例えば、磁気ビーズに直接または間接的に（例えば、ビオチンを介して）連結された抗原結合断片は、前記ビーズが磁場内に保持されると、固定化される。さらなる場合には、抗原結合断片の他の分子への連結によって直接固定化

10

20

30

40

50

されることになるのでも間接的に固定化されることにもなるのでもなく、本発明による細胞の富化、分離、単離および検出が可能になり、例えば、マーカー結合断片が化学的または物理的部分に連結された場合には、それによって、標識された細胞と標識されていない細胞の、例えば、FACS選別のようなフローサイトメトリー法、または蛍光顕微鏡法による、区別が可能になる。

【0258】

「固形組織」は、本明細書で使用される場合、1つまたは複数の動物由来の哺乳動物固形組織であって、その3つの寸法、すなわち、幾何学体としての長さ、幅および厚みに関して、複数の個々の細胞に基づく単位のサイズよりも大きく、多くの場合、組織の構造を構成する結合材料、例えばコラーゲンまたは他の同様のマトリックスを含有し、そのため、管を通して流れることも、シリンジまたは類似の小さい導管もしくは入れ物により収集されることもできない、すなわち、500 μm 、1 mm、2 mm、3 mm、4 mm、5 mm、1 cm、2 cm、3 cm、4 cm、5 cm、10 cm、20 cm、30 cm、またはそれを超える範囲の寸法を有する、固形組織を指す。

【0259】

「固形腫瘍」は、嚢胞も液体領域も通常は含有しない組織の異常な塊を指す。固形腫瘍は、良性であることもあり、または悪性であることもある。用語「固形腫瘍がん」は、悪性、新生物性、またはがん性固形腫瘍を指す。固形腫瘍がんは、肉腫、癌腫およびリンパ腫、例えば、肺、乳房、前立腺、結腸、直腸および膀胱のがんを含むが、これらに限定されない。固形腫瘍の組織構造は、実質細胞（がん細胞）と支持間質細胞とを含む相互依存性組織区画を含み、この区画にがん細胞が分散され、この区画が支持微小環境を提供し得る。一部の実施形態では、がんは、子宮頸がん、頭頸部がん（例えば、頭頸部扁平上皮癌 [HNSCC] を含む）、神経膠芽腫、卵巣がん、肉腫、膵臓がん、膀胱がん、乳がん、トリプルネガティブ乳がん、および非小細胞肺癌から選択される。固形腫瘍の組織構造は、実質細胞（がん細胞）と支持間質細胞とを含む相互依存性組織区画を含み、この区画にがん細胞が分散され、この区画が支持微小環境を提供し得る。

【0260】

「解凍された凍結保存TIL」とは、本明細書では、事前に凍結保存され、その後、室温またはそれより高い温度に戻すように処置された、TILの集団を意味し、前記温度は、細胞培養温度またはTILが患者に投与される温度を含むが、これらに限定されない。

【0261】

用語「処置」、「処置すること」、「処置する」などは、所望の薬理学的および／または生理的効果を得ることを指す。この効果は、疾患もしくはその症状を完全にもしくは部分的に防ぐ点で予防的であることもあり、ならびに／または疾患をおよび／もしくは疾患に起因する有害効果を部分的にもしくは完全に治癒させる点で治療的であることもある。

「処置」は、本明細書で使用される場合、哺乳動物、特にヒト、の疾患のあらゆる処置を包含し、(a) 疾患の素因を有する可能性があるがまだ疾患を有すると診断されていない対象において疾患が起こるのを防ぐこと、(b) 疾患を抑制すること、すなわち、その発症または進行を抑止すること、ならびに(c) 疾患を緩和すること、すなわち、疾患の退行を生じさせることおよび／または1つもしくは複数の疾患の症状を緩和することを含む。「処置」はまた、疾患または状態の非存在下であっても、薬理的効果をもたらすために薬剤を送達することを包含するように意図されている。例えば、「処置」は、例えばワクチンの場合、病的状態の非存在下で免疫応答を惹起することまたは免疫を付与することができる、組成物の送達を包含する。

【0262】

「腫瘍浸潤リンパ球」または「TIL」とは、本明細書では、対象の血流から出て腫瘍内に遊走した白血球としてそもそも得られた細胞集団を意味する。TILは、CD8⁺細胞傷害性T細胞（リンパ球）、Th1およびTh17 CD4⁺T細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、ならびにM1マクロファージを含むが、これらに限定されない。TILは、一次TILと二次TILの両方を含む。「一次TIL」は、本明細書で概要が示

されるような患者組織試料から得られる（「回収したての」と言われることもある）ものであり、「二次TIL」は、バルクTILおよび拡大されたTIL（「REP TIL」または「REP後のTIL」）を含むがこれらに限定されない、本明細書で論じられるように拡大または増殖された任意のTIL細胞集団である。TIL細胞集団は、遺伝子改変されたTILを含み得る。TILは、一般に、細胞表面マーカーを使用して、生化学的に定義され得るか、あるいは腫瘍に浸潤して処置をもたらすそれらの能力によって、機能的に定義され得る。TILは、一般に、次のバイオマーカーのうちの1つまたは複数を発現することによりカテゴリー分けされ得る：CD4、CD8、TCR $\alpha\beta$ 、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD62L、CD95、PD-1、およびCD25。加えておよびあるいは、TILは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤するそれらの能力によって機能的に定義され得る。TILSは、効力によってさらに特徴付けられ得る—例えば、TILSは、TCR会合に応答して、それらが、例えば、約50 pg/mLより多い、約100 pg/mLより多い、約150 pg/mLより多い、もしくは約200 pg/mLより多いインターフェロン（IFN）放出を生じさせる場合、効力があるまたは機能的であると見なすことができ、またはより好ましくは、個々の細胞は、フローサイトメトリーにより、TCRにより誘発される刺激後のCD137、CD107a、INF- γ 、TNF- α およびIL-2についての細胞内染色を通じて効力があり得る。

10

【0263】

「保持液」は、本明細書で使用される場合、フィルター、メッシュまたは膜を通過しない材料を指す。

20

【0264】

「最終ユーティリティー」は、本明細書で使用される場合、再生医療薬の、養子細胞療法薬の、ATMPの、診断的in vitro検査のための、もしくは科学研究のための製造、または再生医療薬、養子細胞療法薬、ATMP、診断的in vitro検査もしくは科学研究における直接使用を指す。

【0265】

本発明は、同じがん患者から生じ、その患者に戻された自己TILを含む、転移がん患者の腫瘍から単離され得る腫瘍浸潤リンパ球（TIL）、特に、未改変のTILS（UTIL）に関する。本発明はまた、凍結保存TILまたはUTILの治療用集団を単離するための方法に関し、ならびに本明細書に記載される方法による摘除腫瘍の処理のための使い捨ての無菌キットを含むデバイスの使用によって得られるまたは得ることができるTILおよびUTILに関する。

30

【0266】

通例、TILは、最初に、患者腫瘍試料（「一次TIL」）から得られ、次いで、本明細書に記載されるようなさらなる操作のためにより大きい集団に拡大され、凍結保存され、本明細書で概要が示されるように再刺激され、必要に応じて、TIL健康の指標としての表現型および代謝パラメータについて評価される。

【0267】

患者腫瘍試料は、当技術分野において公知の方法を使用して、一般には、外科的摘除、針生検、または腫瘍細胞とTIL細胞の混合物を含有する試料を得るための他の手段によって、得ることができる。通例、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍からのものであり得る。腫瘍試料はまた、血液悪性疾患から得られる腫瘍などの、液性腫瘍であり得る。固形腫瘍は、乳房、卵巣、子宮頸、膵臓、前立腺、結腸直腸、肺、脳、腎、胃および皮膚のものを含むがこれらに限定されない、任意のがん型（扁平上皮癌、基底細胞癌、および黒色腫を含むがこれらに限定されない）のものであり得る。一部の実施形態では、TILは、悪性黒色腫腫瘍から得られる。これらは、特に高レベルのTILを有すると報告されているからである。

40

【0268】

生産は、一般に、2段階プロセスを含む。段階1では、初期腫瘍材料を摘出し、脱凝集

50

モジュールを有する無菌キットに入れ、この脱凝集モジュールによって、その脱凝集モジュール内の腫瘍が酵素的に消化および／または断片化され、均質化されて単一細胞浮遊液が得られる。均質化された細胞を別の富化モジュールにおける無菌キット内でさらに精製して、もはや必要とされない試薬、細胞デブリ、脱凝集されていない腫瘍組織などの構成成分を除去することができるが、無菌キットの安定化モジュールにおいて細胞を直接凍結保存して、TIL製造用の出発材料を安定化し、段階2が必要とされるまで保管することができる。段階2は、一般に、摘除した腫瘍出発材料からのTILの成長（2週間）、続いて、TIL細胞の急速拡大プロセス（急速拡大プロトコル「REP」－2週間）を含む。最終産物を洗浄し、回収した後、緩衝食塩水、8.5% HASおよび10% DMSOに浮遊させ、凍結保存して固形無菌製品を形成し、これは、注入の前にさらなる改変なしに単回用量として解凍される。

10

【0269】

治療活性に寄与する可能性がある、処置のための3つの別個の要素がある。コア要素は、TIL、すなわち、腫瘍由来のT細胞であり、これらは、T細胞によりそれらの正常機能の一部として利用される様々な方法によって腫瘍細胞を標的とし、排除することができる。これらの方法は、直接的方法（すなわち、パーフォリン媒介性細胞傷害）および間接的方法（すなわち、サイトカイン産生）を含む。in vivo抗腫瘍効果にとって最も重要であるのがこれらの方法のどちらであるのかは明白であるが、マウスモデルは、インターフェロンガンマの産生が効果的な治療に必要な不可欠であることを示唆する。治療に寄与する2つの他の要素は、プレコンディショニング化学療法と高用量静脈内IL-2である。これら2つの要素は、最初に、競合および調節免疫細胞を除去するコンディショニング化学療法、続いてのT細胞の生存を支持するIL-2構成成分によって、注入後の患者におけるT細胞の生着を支持することにより、作用すると考えられる。

20

【0270】

細胞療法製品の構造は、酵素により消化された腫瘍塊から成長支持細胞培養培地およびT細胞支持増殖因子インターロイキン-2（IL-2）によって直接TILを成長させることにより作出される。これは、腫瘍特異的T細胞による腫瘍細胞混合物からの選択的生着および成長を可能にするが、腫瘍抗原を認識しないT細胞は、刺激されず、選択的に失われることになる。この製品は、T細胞を患者自身のがん細胞組織から採取し、急速に拡大させて、CD3表面マーカーにより定義される純粋なT細胞集団およびT細胞を形成した、自己T細胞に基づく製品を含む。

30

【0271】

手短に述べると、TIL、特にUTILを、腫瘍生検試料を出発材料として使用する2段階プロセスで産生することができる。段階1（一般に、2～3時間かけて行われる）：数日または数年後に行われ得る後続の製造および段階2のために出発材料を安定化するためのキットの安定化モジュールを使用して直接凍結保存することができる単一細胞浮遊液を生成するためのキットおよび半自動デバイスの使用による摘出、酵素消化および均質化を使用する腫瘍材料の最初の収集および処理。段階2は、4週間かけて行われ得るものであり、段階1の製品の解凍で出発し、腫瘍出発原料からのTILの成長（約2週間）、これに細胞の量およびしたがって用量を増加させるためのTIL細胞の急速拡大プロセス（約2週間）が続く、連続プロセスであり得る。TIL、特にUTILは、細胞の液体浮遊液としての製剤化の前に濃縮され、洗浄される。無菌薬物製品をバッグに入れて凍結保存することができ、それが静脈注入前にさらなる改変なしに単回用量として解凍されることになる。

40

【0272】

一実施形態では、本発明のバッグは、収集バッグおよび／または凍結保存バッグである。バッグおよび付随する任意のチューブは、一般に、クリア、透明、半透明、所望される任意の色、またはこれらの組合せであり得る。組織収集バッグおよび／またはチューブは、一般に、密閉および／または密封血液および／または凍結保存バッグならびに付随するチューブの作製に類似した方法で作製することができる。本発明におけるチューブは、ポ

50

リ塩化ビニル（PVC）を含むがこれに限定されない、任意の所望の材料から構築することができる。例えば、PVCは溶接および／または密封に有利であるので、PVCは望ましい材料であり得る。

【0273】

本発明の組織収集バッグなどの、収集バッグは、ポリオレフィンポリマー、エチレン酢酸ビニル（EVA）、コポリマー、例えば、酢酸ビニルとポリオレフィンのポリマーブレンド（すなわち、OriGen、医用EVOフィルム）、および／またはEVAを含む材料などの、所定の材料から製造された、組織を受け取るためのバッグの少なくとも一部分を含み得る。バッグに使用するための材料は、特定の特性および／または特性、例えば、密封性（salability）、例えばヒートシール可能性、ガス透過性、可撓性、例えば低温可撓性、弾性、例えば低温弾性、耐薬品性、光学的透明度、生体適合性、例えば細胞傷害活性、溶血作用、耐浸出性、少ない微粒子を有すること、の選択のために、選択され得る。

10

【0274】

使用中に、エネルギー、例えば、熱でシールを形成して、溶接ゾーンを作成することができる。使用中に形成されるシールは、約2.5mm～約7.5mmの範囲の幅を有し得る。一般に、シール140は、組織材料がバッグ140に入れられた後に形成され、約5mmの幅を有し得る。シールを、シール剥離試験（すなわち、ASTM F88／F88M）、および／または破損試験（すなわち、ASTM F1140／F1140MもしくはASTM F2051／F2054M）を使用して、強度について試験することができる。

20

【0275】

一部の実施形態では、バッグまたは可撓性容器は、適正に密封され、処置および／または処理のためのデバイス内への配置時にクランプでさらに固定された場合、使用中に100ニュートンの力に耐えることができる。バッグまたは可撓性容器実施形態は、適正に密封され、処置および／または処理のためのデバイス内への配置時にクランプでさらに固定された場合、使用中に75ニュートンの力に耐えるように構築され得る。

【0276】

可撓性容器、例えば、バッグ、例えば、収集バッグおよび／または凍結保存バッグへのシールまたは溶接部の形成時に、密封デバイスを使用して、バッグに使用される材料に依存して所定の温度、圧力および時間で熱および／または圧力を印加することができる。例えば、一部のヒートシーラーは、約8秒間の熱および圧力の印加を必要とし得る。8秒後、デバイスに対する熱を止めることができ、しかし、圧力をさらに2～3秒間印加することができる。

30

【0277】

一部の実施形態では、バッグは、約10cm～約50cmの範囲の長さを有し得る。具体的には、本明細書に記載される本発明で使用するためのバッグは、約15cm～約30cmの範囲の長さを有し得る。例えば、バッグは、約18cm～約22cmの範囲の長さを有し得る。

【0278】

チューブの一部は、溶接可能であり得る。溶接可能なチューブは、ポリマー材料、例えばポリ塩化ビニル（PVC）から製造され得る。

40

【0279】

無針弁を含むがこれに限定されない弁をチューブに沿って数箇所に使用することができる。一部の実施形態では、バッグは、約10cm～約40cmの範囲の長さを有し得る。具体的には、本明細書に記載される本発明で使用するためのバッグは、約15cm～約30cmの範囲の長さを有し得る。例えば、バッグは、約18cm～約22cmの範囲の長さを有し得る。

【0280】

凍結保存バッグは、ジメチルスルホキシド（「DMSO」）などの凍結保護物質での凍

50

結保存に好適である必要があり得る。一部の実施形態では、凍結保護バッグは、バッグが約5ml～約45mlの範囲の体積の材料を保持することができるように構築され得る。具体的には、凍結保存バッグは、約10ml～約35mlの範囲の体積の材料を収容することができる。例えば、一部の実施形態は、約15ml～約30mlの範囲の体積の保管される材料を収容することができる凍結保存バッグを含む。凍結保存バッグは、所望される所定の体積が得られるようなサイズにしたものであり得る。一部の実施形態では、凍結保存バッグは、約4cm～約11cmの範囲の幅、および約10cm～約18cmの範囲の長さを有し得る。例えば、凍結保存バッグは、約5.8cm～約9.8cmの範囲の幅、および約12cm～約16cmの範囲の長さを有し得る。具体的には、凍結保存バッグのある実施形態は、約7.8cmの幅および約14cmの長さを有し得る。

10

【0281】

使用の前に、凍結保存キットおよび／またはその特定の構成要素を滅菌することができる。バッグを形成するために使用される材料は、ヒートシール可能であり得る。バッグに使用するための材料としては、EVA、ポリアミド（例えば、ナイロン）およびこれらの組合せなどのポリマーを挙げることができるが、それらに限定されない。開口バッグは、シールおよび／またはクランプを使用してそのバッグを密閉した後、処理および／または脱凝集に使用することができる。

【0282】

フィルターは、インラインフィルター、血液フィルター、例えば血液投与フィルター、生物学的フィルター、および／またはインライン凝集塊除去フィルターであり得る。フィルターは、所望の材料を形成するために所定のサイズを超える材料を処理組織から除去するように構成され得る。例えば、フィルターを使用して脱凝集組織から組織の塊を分離することができる。具体的には、濾過された後にチューブに入る組織組成物は、所望の材料が形成されるように約200μm未満の平均サイズを有する構成物を有し得る。例えば、所望の材料は、約170μm未満の平均サイズを有するTIL（腫瘍浸潤リンパ球）を含み得る。

20

【0283】

フィルターは、チューブから入ってくる処理された組織組成物を富化することができるように、フィルターの後、安定化要素方向のチューブへの所望の材料の流れが、約15μm～約500μmの範囲のサイズを有する構成物を有するように、選択され得る。一部の実施形態では、フィルターは、濾過された後に安定化要素方向のチューブに入る組織組成物が、約50μm～約300μmの範囲のサイズを有する構成物を有するように、構成され得る。例えば、フィルターは、ある実施形態では、濾過された後にチューブに入る組織組成物が、約150μm～約200μmの範囲のサイズを有する構成物を有するように、構成され得る。

30

【0284】

一部の実施形態では、富化要素のフィルターは、処理された組織から約5μm～約200μmの所定のサイズ範囲外の材料を除去して、所望の材料を形成することができる。例えば、所望の材料は、約5μm～約200μmの範囲の平均サイズを有するTILを含み得る。弁を収集バッグから所定の距離に位置付けることができる。例えば、無針弁を収集バッグから約20cmに配置することができる。無針弁などの弁を使用して、材料を収集バッグに添加することができる。例えば、酵素培地を無針弁に挿入して、収集バッグに培地を添加することができる。弁経由で供給される材料としては、例えば、腫瘍消化培地ならびに／または凍結保護物質もしくは凍結保存培地、例えばDMSOおよび／もしくはその溶液、例えば、55%DMSOと5%デキストラン凍結保存培地（例えば、Blood Stor 55-5）が挙げられる。

40

【0285】

シリンジを使用して、それぞれ腫瘍消化培地ならびに55%DMSOなどの55%DMSO溶液および5%デキストラン凍結保存培地を、無針弁290、292を通して提供することができる。処理中、材料を選択的に凍結保存キットに所定の時間に提供することが

50

できる。さらに、クランプを使用して、収集バッグ、フィルター、および／または凍結保存バッグなどのデバイスに所定の時間に提供され得る腫瘍消化培地および／または DMSO 溶液などの凍結保護物質などの提供される材料の流れを制御することができる。

【0286】

一部の実施形態では、そのような弁の後ろに、凍結保存キットの追加の構成要素上に溶接するためのスペースを取るために所定量のチューブが存在し得る。例えば、いくつかの弁の後、次の要素の前に少なくとも十 (10) cm のチューブを配置することができる。チューブ 199 は、密封可能および／または溶接可能であり得る。例えば、チューブの材料としては、PVC (ポリ塩化ビニル)、および／または当技術分野において公知の他の材料を挙げることができるが、これらに限定されない。一部の実施形態では、チューブを、継手に合うサイズにすることができる。例えば、チューブは、約 1.5 mm ～ 約 4.5 mm の範囲の内径、および約 2.1 mm ～ 約 6.1 mm の範囲の外径を有し得る。例えば、凍結保存キットの実施形態は、約 2.9 mm ～ 約 3.1 mm の範囲の内径を有し、約 4.0 mm ～ 約 4.2 mm の範囲の外径を有する、チューブを含み得る。凍結保存キット 191 に使用されるチューブは、長さが様々であり得、個々のチューブ要素は、約 1 cm ～ 約 30 cm の範囲の長さを有する。

10

【0287】

クランプを使用して、フィルターへの酵素培地および／または消化された組織の移動を抑制および／または防止することができる。例えば、クランプを使用して、所望の濾過ステップより前のフィルターへの酵素培地および／または消化された組織の移動を抑制および／または防止することができる。別のクランプ 198 は、フィルターへの凍結保護剤の望ましくない移動を抑制および／または防止する。

20

【0288】

特定の実施形態では、2 つまたはそれより多くのバッグを連結させて、確実に脱凝集産物を適切に保管できるようにすることができる。

【0289】

一部の実施形態では、本発明は、組織、例えば固形哺乳動物組織、からの細胞および／または細胞凝集体の半自動化無菌脱凝集、富化および／または安定化のための自動化デバイスを含み得る。本発明とともに使用するための自動化デバイスは、プログラム可能なプロセッサおよび凍結保存キットを含み得る。一部の実施形態では、凍結保存キットは、使い捨てであり得る。本発明は、さらに、半自動無菌組織処理方法に関する。

30

【0290】

一部の実施形態では、収集バッグなどのバッグを収集キットで 사용할 ことができる。バッグは、組織試料などの試料の添加を可能にする開口端部を有する。継手は、バッグを収集キットのチューブに連結することができる。チューブ材料は、密封可能および／または溶接可能であり得る。例えば、チューブを、熱、無線周波などのようなエネルギーを使用して密封することができる。チューブ材料は、PVA から製造され得る。

【0291】

一部の実施形態では、チューブを弁に連結して、コラゲナーゼ、トリプシン、リパーゼ、ヒアルロニダーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、リベラーゼ HI、ペプシン、またはこれらの混合物を含むがそれらに限定されない、1 つまたは複数の培地酵素溶液の添加を可能にすることができる。例えば、弁は、無針弁であり得る。凍結保存キットに使用されるチューブは、約 3.0 mm ～ 約 5.0 mm の範囲の外径と約 2.0 mm ～ 約 4 mm の範囲のチューブ内径を有する、チューブを含み得る。具体的には、チューブは、4.1 + / - 0.1 mm の外径および約 3.0 + / - 0.1 mm の内径を有し得る。チューブの長さは、収集キットの構成に依存し得る。例えば、収集キットの実施形態は、約 10 cm ～ 約 20 cm の範囲の長さを有するチューブを含み得る。

40

【0292】

収集キットの一部の実施形態では、プロトタイプは、組織および／または酵素培地の移動を抑制および／または防止するために 1 つまたは複数のクランプを含み得る。具体的に

50

は、酵素培地および／または組織を濾過ステップの前にフィルターに移行させないようにすることができる。

【0293】

治療活性に寄与する可能性があり得る、処置のための3つの別個の要素がある。コア要素は、T細胞によりそれらの正常機能の一部として利用される様々な機構によって腫瘍細胞を排除する可能性がある、UTILなどのTILである。

【0294】

これらの機構は、[a] 緊密な会合により標的細胞に侵入して細胞死を誘導する細胞毒素（例えば、パーフォリン、グランザイム、およびグラニュライシン）を放出することによる、および[b] T細胞と標的との細胞表面相互作用、例えば、アポトーシスを誘導するFASリガンド結合媒介細胞傷害性による、直接的細胞傷害性；ならびに会合するためにおよび腫瘍細胞死を有するために二次エフェクター細胞を動員および刺激することができる、間接的方法（例えば、サイトカイン産生）を含む。

【0295】

TIL、特に、UTILは、自己産物であり、それ故、製造される各バッチは、特定の患者のための単回用量を提供する。サブバッチも、バッチのプーリングもない。薬物製品は、解凍後の単回静脈内注入のための、125～270mLの間の8.5%ヒト血清アルブミンと10%DMSOとを含有する食塩水ベースの溶液中の凍結保存されたT細胞（ $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ 個）の、小さい無菌調製バッチである。

【0296】

米国特許第10,398,734号（「734特許」）と比較して本発明にはいくつかの利点がある。734特許における第1のステップは、TILが培養される断片に腫瘍バルクを変換するステップである。対照的に、本発明は、摘除後に無菌キットにおいて無菌条件下で保存され、脱凝集された腫瘍からTILを遊離させ、それから細胞浮遊液を調製し、得られたTILを凍結することにより凍結保存する。本発明は、腫瘍内に存在する多様性を表す、TILの多様な集団を提供する。そしてそれらは均一浮遊液であるため、培養で拡大されるTILはその多様性を保持することになり、このことにより、腫瘍内に存在するがん細胞の多様な集団に取り組む最大の機会が得られる。

【0297】

対照的に、734特許の製造プロセスは、処理を開始する前の出荷およびあらゆるさらなる遅延中に内部細胞集団の劣化を既に経験している、組織の断片で出発する。加えて、製造に使用されるTILは、組織断片から拡大したTILのみとなり、内部に保持されたいずれのTILでもないことになり、したがって、得られる細胞集団は、腫瘍環境の完全な多様性を表すことができない。

【0298】

別の相違は、734特許のプロセスにおけるより本発明のプロセスにおけるほうが閉鎖型製造処理への移行がはるかに早く行われ、夾雑の機会が少ないことである。特に、腫瘍組織の破壊は、本願では、734特許により生物学的安全キャビネット内での開放型操作で行われると記載されている広範な断片化プロセスではなく、閉鎖型処理システムの中で行われる。

【0299】

本発明の出発材料は、無菌キット内に無菌条件下で保存されるため、凍結保存された腫瘍細胞浮遊物で実行され得る全製造プロセスのスケジュールを決め、それを大容量かつ高効率で実行することができる。対照的に、734特許は、未凍結組織で出発するため、断片化および「グロースアウト」ステップは、待機ベースで実行され、稼働率の効率がより低い。734特許での、この中間凍結ステップの除去は、製造プロセスを全体的に短縮するが、全プロセスが待機ベースで実行されることを意味し、これは、いかなる遅延もあり得ない場合、この製造ダウン時間を計画するために、プロセスの全ての製品を完成させ、新たな外科手術を停止させる必要があることを意味する。

10

20

30

40

50

【0300】

本出願のプロセスの利点は、摘除された腫瘍の形態で組織を、TIL療法に必要とされる前に収集すること、輸送すること、処理すること、凍結保存すること、および無菌キット内に保管することが、製造が必要とされるまで、およびされた場合にでき、そのため、早期疾患を有する患者を採取し、彼らが代替治療を受けている間、保管することができることである。結果として、腫瘍収集のタイミングまたはジオロケーションならびにその後の製造に対する影響は、ほとんどまたは全くない。その一方で、‘734特許では、これは不可能であり、細胞が凍結および保持され得る前に薬物製品の完全な製造が行われなければならない。

【0301】

上で述べたように、これらは、1,000,000~20,000,000（本発明）対25,000,000~200,000,000（‘734特許）という、REP培養物を播種するために必要とされる非常に異なる細胞数に反映されるように、REP培養を始める細胞の異なる集団を生じさせることになる非常に異なる培養プロセスである。本発明では、初期TILの拡大中、培養播種に、チャンクからのアウトグロース（すなわち、新生細胞）に対して、細胞浮遊液（すなわち、常在T細胞と新生T細胞の混合物となる、脱凝集され、凍結保存された細胞から成長する細胞）が使用され、これは、REPによって新生T細胞が播種されるだけではないことを意味する。加えて、本発明は、硬い密閉容器と可撓性密閉容器の両方を利用することができ、可撓性容器は、得られる腫瘍浮遊液の量[‘734特許で定義されているようないくつかのチャンクではなく]に基づいてより最適な環境を可能にする。

【0302】

転移性腫瘍材料は、外科手術室内で標準的な外科行為を使用して外科的に除去される。脱凝集の前に異物が除去され（すなわち、巨視的に定義して非腫瘍材料）、腫瘍材料が滅菌バッグに移入される。

【0303】

以下のことが腫瘍出発材料検収試験に関係し得る。第1に、供給源組織が腫瘍材料であることが確認される。第2に、脱凝集組織の代表試料が微生物量について評定され、存在する場合、抗生物質感受性が規定される（抗生物質に伴うリスクを冒して製造が行われ得る）が、最終材料は、微生物成長に対して陰性でなければならない。第3に、TILおよび腫瘍細胞の量および生存率がフローサイトメトリーにより評定され得る。

【0304】

本発明の方法は、対象から摘除した腫瘍を無菌で脱凝集させ、それによって脱凝集腫瘍を生じさせるステップを含み、摘除腫瘍は、それを細胞損傷なく凍結保存することができる、十分に脱凝集されている。有利な実施形態では、半自動デバイスのプログラム可能なプロセッサが脱凝集を制御し、それによって、脱凝集可撓性容器内の表面が固形組織を機械的に粉碎および剪断できるようになる（例えば、PCT公開番号WO2018/130845を参照されたい）。脱凝集面を、例えば機械式ピストンにより、制御することができる。

【0305】

酵素消化については、細胞浮遊液（T細胞と腫瘍細胞の両方を含有する）が、摘除された転移性腫瘍からDNase 1とコラゲナーゼ（IV型）の酵素混合物を使用して生成される。機械的圧縮の繰り返しの併用によって、酵素が接近するためのさらなる表面が露出され、酵素反応が、必要に応じた凍結保存の前に固形組織を細胞浮遊液に戻すプロセスを加速させる。一実施形態では、脱凝集ステップが完了すると、DMSOに基づく凍結保護物質が、速度制御された凍結サイクルの直前に添加される。一部の実施形態では、固形組織の酵素的分解は、コラゲナーゼ、トリプシン、リパーゼ、ヒアルロニダーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、リペラーゼHI、ペプシンまたはこれらの任意の混合物などの1つまたは複数の酵素溶液の選択および供給によるものであり得る。摘除された転移性腫瘍の酵素消化は、半自動デバイスの脱凝集可撓性容器内で行われ得る。

【0306】

例として、脱凝集プロセスが酵素消化で補足されることになる、本発明の方法の別の実施形態では、酵素消化用の培地配合物に、細胞間の境界の破壊を引き起こすタンパク質分解に役立つ酵素を補充しなければならない。

【0307】

細胞培養または細胞取り扱いの技術分野において公知の様々な液体配合物を、細胞脱凝集および固形組織の酵素消化に使用される液体配合物として使用することができ、そのような液体配合物としては、次の培地：臓器保存溶液、選択的溶解溶液、PBS、DMEM、HBSS、DPBS、RPMI、イスコフ培地、XVIVO（商標）、AIM-V（商標）、乳酸加リンゲル液、酢酸リンゲル液、食塩水、PLASMA LYTE（商標）溶液、晶質液およびIV輸液、コロイド溶液およびIV輸液、水中5パーセントデキストロース（D5W）、ハルトマン溶液、DMEM、HBSS、DPBS、RPMI、AIM-V（商標）、イスコフ培地、XVIVO（商標）のうちの1つまたは複数が挙げられるがこれらに限定されず、これらの各々に、細胞回収および生存または特異的細胞枯渇に役立つように、追加の細胞支持因子を、例えば、ウシ胎仔血清、ヒト血清もしくは代用血清または他の栄養素もしくはサイトカインを、必要に応じて補充することができる。培地は、上述の培地のような標準的な細胞培地であることもあり、あるいは例えば、一次ヒト細胞培養（例えば、内皮細胞、肝細胞もしくはケラチン産生細胞のための）または幹細胞（例えば、樹状細胞成熟、造血拡大、ケラチン産生細胞、間葉系幹細胞もしくはT細胞）のための特別な培地であることもある。培地は、当技術分野において周知のサプリメントまたは試薬、例えば、アルブミンおよび輸送タンパク質、アミノ酸およびビタミン、金属イオン、抗生物質、結合因子、脱結合因子、界面活性剤、増殖因子およびサイトカイン、ホルモンまたは可溶化剤を有し得る。様々な培地が、例えば、ThermoFisher、Lonza、もしくはSigma-Aldrich、または同様の培地製造業者および供給業者から市販されている。

【0308】

酵素消化に必要とされる液体配合物は、最適な範囲が2～7mM、理想的には5mMである、少なくとも0.1mM、最高50mMで存在する十分なカルシウムイオンを有さなければならない。

【0309】

消化されることになる固形組織を、脱凝集後、キレート剤EGTAおよびEDTAを含む液体配合物で洗浄して、接着因子および阻害タンパク質を除去し、その後、洗浄してEDTAおよびEGTAを除去し、その後、酵素消化に付すことができる。

【0310】

酵素消化に必要とされる液体配合物は、酵素安定性および活性に必要とされるカルシウムイオンを除去することにより酵素活性を厳密に阻害し得るキレート剤EGTAおよびEDTAが最小限であると、より最適である。加えて、他の公知阻害物質には、β-メルカプトエタノール、システイン、および8-ヒドロキシキノリン-5-スルホネートがある。

【0311】

摘出、酵素消化および均質化を使用する腫瘍材料の処理は、TIL、特にUTIL、の単一細胞浮遊液を生じさせ、これを直接凍結保存して、TIL、特にUTIL、の第1の集団を得るためのIL-2におけるTIL、特にUTIL、の細胞浮遊液の第1の拡大によるその後の処理のための出発材料を安定化することができる。

【0312】

方法は、脱凝集腫瘍、例えば細胞浮遊液、を凍結保存するステップも含む。脱凝集腫瘍の凍結保存は、対象から摘除した腫瘍を無菌で脱凝集させ、それによって脱凝集腫瘍を生じさせるステップを行うのと同じ日に行われ、摘除腫瘍は、それを細胞損傷なく凍結保存することができれば、十分に脱凝集されている。例えば、凍結保存は、腫瘍を脱凝集するステップの後、5、10、20、30、40、50、60、70、80もしくは90分間

、または2、4、6、8、10、12、14、16、18、20もしくは22時間、行われる。半自動デバイスの脱凝集モジュール内での酵素的脱凝集から得られた単一細胞浮遊液としての、脱凝集腫瘍の凍結保存は、8℃～最低-80℃の間またはそれ未満の温度で浮遊液を冷却および／または維持することにより行われる。脱凝集は、5分ほどの短時間であることもあり得るが、最も一般的には45分～1時間であり得、凍結保存は、60分ほどの短時間であることもあり、または最大150分であることもある。一実施形態では、方法は、凍結保存された脱凝集腫瘍を保管するステップを含む。好ましい実施形態で説明されるように、デバイスは、凍結保存のための少なくとも1つの容器を含み、この容器は、弾力性のある変形可能な材料から製造された可撓性容器である。デバイスのこの実施形態では、最終容器は、フリーザー-20～-190℃に直接移送されるか、またはより最適には、デバイスに付随するもしくは別途供給される（例えば、Planer ProductsもしくはAsymptote Ltdにより製造された）、速度制御された凍結装置であって、富化された脱凝集固形組織の容器を収容するために利用される凍結チャンバーおよび可撓性保管容器の温度が、冷却ガス（一般には窒素、例えばPlaner products）を注入することもしくは制御された冷却面から熱を取り除くことのもちからによって制御される、凍結装置内に配置される。両方の方法によって、凍結溶液および所望の産物生存率に基づいて凍結されることになる特定の細胞に必要な速度での凍結プロセスを1℃未満またはより好ましい0.1℃の誤差で正確に制御することができる。この凍結保存プロセスは、理想的には凍結溶液の融解温度にできる限り近い氷核生成温度を考慮に入れなければならない。続いて水溶液中で結晶が成長し、水が氷として系から除去され、残留未凍結溶液の濃度が上昇する。温度が低下するにつれて、より多くの氷が形成し、その結果、残留非凍結画分が減少し、それによって濃度がさらに上昇する。水溶液の場合、氷が濃縮水溶液と共存する大きい温度範囲が存在する。最終的には、温度が低下することによって溶液がガラス転移状態に達し、達した時点で凍結溶液および細胞は粘性溶液から固体様状態に移り、この温度より下では細胞がさらなる生物学的変化を受けることがないので、必要とされるまで何年間も安定しており、何十年間も安定している可能性もある。

10

20

30

40

50

【0313】

氷核生成および結晶成長は、凍結溶液および細胞微小環境への熱の放出を伴うので、凍結液が、相変化を受けている間の温度変化に耐える場合であっても、細胞および凍結溶液の冷却を維持することが望ましい。脱凝集が酵素的脱凝集を含むかどうかに依存して、および所与の酵素、酵素濃度および組織型についての酵素消化に最適な温度が何度なのかに依存して、凍結保存の開始時の温度は、限定ではないが、40℃、39℃、38℃、37℃、36℃、35℃、34℃、33℃、32℃、31℃、30℃、29℃、28℃、27℃、26℃、25℃、24℃、23℃、22℃、21℃および20℃、すなわち、哺乳動物の体温から室温までの範囲の温度を含み、より低い冷蔵温度、例えば、限定ではないが、10℃、8℃、6℃、5℃、4℃、3℃、および2℃をさらに含む。極低温冷却のための標的溫度は、限定ではないが、-60℃、-65℃、-70℃、-75℃、-80℃、-85℃、-90℃、およびこれらの間の温度、ならびに液体窒素蒸気保管温度（-195.79℃）に至るまでのより低い温度を含む。ある特定の実施形態では、本発明に従って使用される方法およびデバイスは、生理的溫度または消化溫度から凍結保管溫度への時間を最小限に抑えるように設計またはプログラムされる。ある特定の実施形態では、凍結保存のために本発明に従って使用される方法およびデバイスは、有利には、培地の結晶化時の細胞を含む環境への、その環境内への、その環境の周囲へ、またはその環境内での放熱が最小限に抑えられるまたは回避される条件下での冷却のために設計およびプログラムされる。ある特定の実施形態では、脱凝集溫度から極低温の標的溫度に至るまでの連続冷却のために、方法が設計され、および／またはデバイスがプログラムされる。例示的なプログラムされる冷却速度としては、限定ではないが、-0.5℃/分、-1℃/分、-1.5℃/分、-2℃/分、または-2.5℃/分が挙げられる。冷却速度は、プログラム標的であり、冷却サイクルとともに変化し得る。冷却速度は、例えば、±0.1℃/分、

± 0.2℃/分、± 0.3℃/分、± 0.4℃/分、または± 0.5℃/分、変化し得る。本発明のある実施形態では、凍結保存温度は、− 80℃± 10℃であり、デバイスは、温度を1℃/分または1.5℃/分または2℃/分または1℃/分± 0.5℃/分または1.5℃/分± 0.5℃/分または2℃/分± 0.5℃/分、低下させるようにプログラムされる。

【0314】

一部の実施形態では、本方法によって幼若TILが得られ、幼若TILは、対象／患者への投与時に複製サイクルの増加が可能であり、したがって、高齢TIL（すなわち、対象／患者への投与の前により多くの複製ラウンドをさらに経ているTIL）と比較して追加の治療利益を提供し得る。幼若TILの特徴は、文献、例えば、Donia, et al., Scandianavian 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); および Tran, et al., J Immunother, 31:742-751 (2008)に記載されており、これらの文献の全ては、それら全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0315】

TおよびBリンパ球の多様な抗原受容体は、限定された、しかし多数の、遺伝子セグメントの体細胞組換えにより産生される。これらの遺伝子セグメント：V（可変）、D（多様性）、J（結合）、およびC（定常）によって、免疫グロブリンおよびT細胞受容体（TCR）の結合特異性および下流の用途が決定される。本発明は、T細胞レパートリー多様性を示すおよび増大させるTILを生成するための方法を提供する。一部の実施形態では、本方法により得られるTILは、T細胞レパートリー多様性の増大を示す。一部の実施形態では、本方法により得られるTILは、回収したてのTIL、および／または提供するもの以外の他の方法を使用して調製されたTILと比較して、T細胞レパートリー多様性の増大を示す。一部の実施形態では、本方法により得られるTILは、回収したてのTILおよび／またはTILと比較してT細胞レパートリー多様性の増大を示す。一部の実施形態では、第1の増幅により得られるTILは、T細胞レパートリー多様性の増大を示す。一部の実施形態では、多様性の増大は、免疫グロブリン多様性および／またはT細胞レパートリー多様性の増大である。一部の実施形態では、多様性は、免疫グロブリン重鎖の多様性である。一部の実施形態では、多様性は、免疫グロブリン軽鎖の多様性である。一部の実施形態では、多様性は、T細胞受容体の多様性である。一部の実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマおよびデルタ受容体からなる群から選択されるT細胞受容体のうちの1つの多様性である。一部の実施形態では、T細胞受容体（TCR）アルファおよび／またはベータの発現の増加がある。一部の実施形態では、T細胞受容体（TCR）アルファの発現の増加がある。一部の実施形態では、T細胞受容体（TCR）ベータの発現の増加がある。一部の実施形態では、TCRa b（すなわち、TCRα/β）の発現の増加がある。

【0316】

本発明の方法は、脱凝集腫瘍を、IL-2を含む細胞培養培地で培養することにより、第1の拡大を行って、TIL、特にUTIL、の第1の集団を産生するステップも含む。上記のステップから得られる細胞は、腫瘍および他の細胞よりもTILの成長に有利に働く条件下で、IL-2を含有する血清中で培養される。一部の実施形態では、腫瘍消化物は、2mLウェルにおいて不活性化ヒトAB血清と6000IU/mLのIL-2を含む培地中でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般には3〜14日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞が得られる。一部の実施形態では、この一次細胞集団は、7〜14日間培養され、その結果、バル

クTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞が得られる。一部の実施形態では、この一次細胞集団は、10～14日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞が得られる。一部の実施形態では、この一次細胞集団は、約11日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞が得られる。

【0317】

好ましい実施形態では、TILの拡大は、下記のおよび本明細書に記載の最初のバルクTIL拡大ステップ、続いて、下記のおよび本明細書に記載の第2の拡大（急速拡大プロトコール（REP）ステップおよび続いての再刺激REPステップ）を使用して、行うことができる。

【0318】

有利な実施形態では、凍結乾燥された脱凝集腫瘍組織が解凍され、T細胞培地（次の添加剤：10% FBSおよび3000 IU/mLのIL-2を補充した、Immetacyteのために契約製造されたT細胞培養培地）に1：9で再浮遊され、その後、インライン100～270 μmフィルターによる濾過および50 mL遠心分離管での遠心分離が行われ、その後、20 mLへの再浮遊が行われる。試料をフローサイトメトリー分析のために採取して、HLA-A、B、CおよびCD58⁺、およびDRAQ7⁻細胞の数について定量することができる。一部の実施形態では、これを、代替マニュアル（例えば、これに限定されないが、血球計数器）、または代替自動化総生存細胞計数デバイス、例えば、これらに限定されないが、NucleoCounter（商標）、Guava（登録商標）、自動化血液分析および計数機、ピペットに基づく細胞計数機、例えば、これに限定されないが、Scepter（商標）を使用して、播種することができる。

【0319】

一実施形態では、再浮遊させた凍結乾燥脱凝集腫瘍組織は、腫瘍および他の細胞よりもTILの成長に有利に働く条件下で、IL-2を含有する血清中で培養される。一部の実施形態では、腫瘍消化物は、2 mLウェルにおいて6000 IU/mLのIL-2を有する不活性化ヒトAB血清を含む培地中で（または、本明細書に概要が示されるような一部の場合には、人工抗原提示[aAPC]細胞集団）インキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般には10～14日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞が得られる。一部の実施形態では、第1の拡大中の成長培地は、IL-2またはそのバリエーションを含む。一部の実施形態では、ILは、組換えヒトIL-2（rhIL-2）である。一部の実施形態では、IL-2原液は、1 mgバイアルについて20～30 × 10⁶ IU/mgの比活性を有する。一部の実施形態では、IL-2原液は、1 mgバイアルについて20 × 10⁶ IU/mgの比活性を有する。一部の実施形態では、IL-2原液は、1 mgバイアルについて25 × 10⁶ IU/mgの比活性を有する。一部の実施形態では、IL-2原液は、1 mgバイアルについて30 × 10⁶ IU/mgの比活性を有する。一部の実施形態では、IL-2原液は、4～8 × 10⁶ IU/mgのIL-2の最終濃度を有する。一部の実施形態では、IL-2原液は、5～7 × 10⁶ IU/mgのIL-2の最終濃度を有する。一部の実施形態では、IL-2原液は、6 × 10⁶ IU/mgのIL-2の最終濃度を有する。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約10,000 IU/mLのIL-2、約9,000 IU/mLのIL-2、約8,000 IU/mLのIL-2、約7,000 IU/mLのIL-2、約6,000 IU/mLのIL-2、または約5,000 IU/mLのIL-2を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約9,000 IU/mLのIL-2から約5000 IU/mLのIL-2を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約8,000 IU/mLのIL-2から約6000 IU/mLのIL-2を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約7,000 IU/mLのIL-2から約6000 IU/mLのIL-2を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約6,000 IU/mLのIL-2を含む。ある実施形態では、細胞培養培地は、IL-2をさらに含む。一部の実施形態では、細胞培養培地は、約3,000 IU/mLのIL-2を含む

10

20

30

40

50

。ある実施形態では、細胞培養培地は、IL-2をさらに含む。好ましい実施形態では、細胞培養培地は、約3,000 IU/mLのIL-2を含む。ある実施形態では、細胞培養培地は、約1,000 IU/mL、約1,500 IU/mL、約2,000 IU/mL、約2,500 IU/mL、約3,000 IU/mL、約3,500 IU/mL、約4,000 IU/mL、約4,500 IU/mL、約5,000 IU/mL、約5,500 IU/mL、約6,000 IU/mL、約6,500 IU/mL、約7,000 IU/mL、約7,500 IU/mL、または約8,000 IU/mLのIL-2を含む。ある実施形態では、細胞培養培地は、1,000~2,000 IU/mLの間、2,000~3,000 IU/mLの間、3,000~4,000 IU/mLの間、4,000~5,000 IU/mLの間、5,000~6,000 IU/mLの間、6,000~7,000 IU/mLの間、7,000~8,000 IU/mLの間、または約8,000 IU/mLのIL-2を含む。

10

【0320】

一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約500 IU/mLのIL-12、約400 IU/mLのIL-12、約300 IU/mLのIL-12、約200 IU/mLのIL-12、約180 IU/mLのIL-12、約160 IU/mLのIL-12、約140 IU/mLのIL-12、約120 IU/mLのIL-12、または約100 IU/mLのIL-12を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約500 IU/mLのIL-12から約100 IU/mLのIL-12を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約400 IU/mLのIL-12から約100 IU/mLのIL-12を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約300 IU/mLのIL-12から約100 IU/mLのIL-12を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約200 IU/mLのIL-12を含む。一部の実施形態では、細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-12を含む。ある実施形態では、細胞培養培地は、IL-12をさらに含む。好ましい実施形態では、細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-12を含む。

20

【0321】

一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約500 IU/mLのIL-15、約400 IU/mLのIL-15、約300 IU/mLのIL-15、約200 IU/mLのIL-15、約180 IU/mLのIL-15、約160 IU/mLのIL-15、約140 IU/mLのIL-15、約120 IU/mLのIL-15、または約100 IU/mLのIL-15を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約500 IU/mLのIL-15から約100 IU/mLのIL-15を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約400 IU/mLのIL-15から約100 IU/mLのIL-15を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約300 IU/mLのIL-15から約100 IU/mLのIL-15を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約200 IU/mLのIL-15を含む。一部の実施形態では、細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-15を含む。ある実施形態では、細胞培養培地は、IL-15をさらに含む。好ましい実施形態では、細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-15を含む。

30

【0322】

一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約500 IU/mLのIL-18、約400 IU/mLのIL-18、約300 IU/mLのIL-18、約200 IU/mLのIL-18、約180 IU/mLのIL-18、約160 IU/mLのIL-18、約140 IU/mLのIL-18、約120 IU/mLのIL-18、または約100 IU/mLのIL-18を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約500 IU/mLのIL-18から約100 IU/mLのIL-18を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約400 IU/mLのIL-18から約100 IU/mLのIL-18を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約300 IU/mLのIL-18から約100 IU/mLのIL-18を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約200 IU/mLのIL-18を含む。一部の実施形態では、細胞培養培地は、

40

50

、約180 IU/mLのIL-18を含む。ある実施形態では、細胞培養培地は、IL-18をさらに含む。好ましい実施形態では、細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-18を含む。

【0323】

一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約20 IU/mLのIL-21、約15 IU/mLのIL-21、約12 IU/mLのIL-21、約10 IU/mLのIL-21、約5 IU/mLのIL-21、約4 IU/mLのIL-21、約3 IU/mLのIL-21、約2 IU/mLのIL-21、約1 IU/mLのIL-21、または約0.5 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約20 IU/mLのIL-21から約0.5 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約15 IU/mLのIL-21から約0.5 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約12 IU/mLのIL-21から約0.5 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約10 IU/mLのIL-21から約0.5 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約5 IU/mLのIL-21から約1 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、第1の拡大培養培地は、約2 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、細胞培養培地は、約0.5 IU/mLのIL-21を含む。ある実施形態では、細胞培養培地は、IL-21をさらに含む。好ましい実施形態では、細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。

10

20

【0324】

培養培地については、IL-2、IL-12、IL-15、IL-18およびIL-21などの、しかしこれらに限定されない、インターロイキンの組合せも企図される。他のサイトカイン、例えば、IL-23、IL-27、IL-35、IL-39、IL-18、IL-36、IL-37、IL-38、IFN-アルファ、IFN-ベータ、IFN-ガンマ、またはこれらのIL-2、IL-12、IL-15、IL-18およびIL-21との組合せも企図される。抗体、例えば、Th2遮断試薬、例えば、これらに限定されないが、IL-4 (aIL4)、抗IL-4 (aIL4R)、抗IL-5R (aIL5R)、抗IL-5 (aIL5)、抗IL13R (aIL13R)、または抗IL13 (aIL13) も、企図される。

30

【0325】

一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、または14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、1日～14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、2日～14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、3日～14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、4日～14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、5日～14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、6日～14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、7日～14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、8日～14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、9日～14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、10日～14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、11日～14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、12日～14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、13日～14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、14日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、1日～11日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、2日～11日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、3日～11日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、4日～11日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、5日～11日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、6日～11日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、7日

40

50

～11日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、8日～11日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、9日～11日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、10日～11日間進行し得る。一部の実施形態では、第1のTIL拡大は、11日間進行し得る。

【0326】

一部の実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15および／またはIL-21の組合せは、第1の拡大中に組合せとして利用される。一部の実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15および／またはIL-21ならびにこれらの任意の組合せを第1の拡大中に含めることができる。一部の実施形態では、IL-2、IL-15およびIL-21の組合せが第1の拡大中に組合せとして利用される。

10

【0327】

一部の実施形態では、第1の拡大は、閉鎖系バイオリアクターで行われる。一部の実施形態では、閉鎖系は、本明細書に記載されるように、TIL拡大に利用される。一部の実施形態では、単一のバイオリアクターが利用される。一部の実施形態では、利用される単一のバイオリアクターは、例えば、G-REX-10、またはG-REX-100、または有利にはWO2018/130845のデバイスである。一部の実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【0328】

有利なことに、第2のTIL集団と呼ばれる、第1の拡大から得られたTIL集団を、第2の拡大（これは、REPと呼ばれることもある拡大を含み得る）に付すことができる。同様に、遺伝子改変されたTILが治療に使用されることになる場合には、第1のTIL集団（バルクTIL集団と呼ばれることもある）または第2のTIL集団（これは、一部の実施形態では、REP TIL集団と呼ばれる）を、拡大前に、または第1の拡大後かつ第2の拡大前に、好適な処置のために遺伝子改変に付すことができる。

20

【0329】

レンチウイルスは、分裂細胞と非分裂細胞の両方に形質導入するそれらの能力のため、効率的な遺伝子移入ビヒクルである。レンチウイルス遺伝子治療ベクターの精査された大部分は、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）1型であるが、HIV-2、SIV、ネコ免疫不全ウイルス（FIV）、ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）、ヤギ関節炎脳炎ウイルス（CAEV）、ビスナウイルス、およびジェンブラナ病ウイルス（JDV）をはじめとする、他の霊長類および非霊長類レンチウイルスに基づく遺伝子治療ベクターも、開発されている。

30

【0330】

複製欠損ウイルスベクターは、潜在的に致死性のウイルスによる患者の感染を防止する上で不可欠である。レンチウイルスベクターは、より安全かつより効率的になるように開発されてきた。最近の第三世代ベクターは、ビルレンスおよび病原性を助ける全てのアクセサリ遺伝子を除去し、さらに、3つのプラスミドにわたる導入遺伝子の発現に極めて重要である残りの遺伝子を分割したものである。例えば、米国特許出願公開第2006/0024274号明細書を参照されたい。

【0331】

EIAV遺伝子移入ベクターは、*in vitro*で形質導入、増殖、およびG₁停止細胞に有効であることが示された。Mitrophanous, et al., 1999. Stable gene transfer to the nervous system using a non-primate lentiviral vector. Gene Ther. 6: 1808-1818; Olsen, J. C., 1998, Gene transfer vectors derived from equine infectious anemia virus. Gene Ther. 5: 1481-1487; Olsen, J.C., 2001, EIAV, CAEV and Other Lentivirus Vector Systems, Somat Cell Mol Genet, Vol. 26, Nos. 1/6, 131-45。

40

【0332】

Heemskerk, B. et al., 2008, Adoptive cell therapy for patients

50

with melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered to secrete interleukin-2. Human gene therapy, 19(5), 496-510には、TIL生存を延長するためにIL-2を発現するように遺伝子操作されたTILが記載されている。患者TILが、第1の拡大中に、モロニー Maus 白血病ウイルス (MMLV) に基づくレンチウイルスベクターによってトランスフェクトされ、続いて、処置のための十分な数を得るための第2の拡大が行われた。

【0333】

要するに、5'長末端反復 (LTR) プロモーターの制御下にあるヒトIL-2遺伝子のcDNAコピーとモロニー Maus 白血病ウイルス (MMLV) 由来のMFGバックボーンを含有する、SBIL2ベクターが、テナガザル白血病ウイルス (GaLV) 外被タンパク質を提供するPG13パッケージング細胞系でシュードタイプ化された。レトロウイルスIL-2 DNAが組み込まれたDNAの3つのコピーを含有する、安定したプロデュースクロン (PG13SBIL2#3) が、生成された。臨床GMPグレードのSBIL2レトロウイルスの上清は、Indiana UniversityのNational Gene Vector Laboratory (Indianapolis, IN) により生産された。TIL形質導入のために、6ウェル非組織培養プレート (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) が、レトロネクチン (CH-296、リン酸緩衝食塩水 [PBS] 中25 µg/ml、GMPグレード; タカラバイオ株式会社、大津、日本) でコーティングされ、PBS-2%ヒト血清アルブミン (HSA) でブロックされ、それに、解凍したSBIL2ウイルス上清 (5 ml/ウェル) が4時間にわたって32℃および10% CO₂でプレローディングされた。TILが3 ml/ウェルで18~24時間にわたって37℃および5% CO₂で添加され、SBIL2ローディングプレートの第2のセットに移され、さらなる18~24時間にわたって培養され、その後、TILを回収され、新鮮培地に再浮遊された。

【0334】

Zhang, L. et al., 2015, Tumor-infiltrating lymphocytes genetically engineered with an inducible gene encoding interleukin-12 for the immunotherapy of metastatic melanoma, Clinical Cancer Research 21(10), 2278-2288.には、腫瘍部位で選択的にIL-12を分泌するように遺伝子操作されたTILが記載されている。TILに、活性化T細胞核内因子 (NFAT) のプロモーター、活性化T細胞のプロモーターにより駆動される一本鎖IL-12をコードする遺伝子を保有するMSGV1 γ-レトロウイルスベクターで、形質導入された。

【0335】

MSGV-1は、MSGVベクターに由来し、このベクターは、マウス幹細胞ウイルス長末端反復を利用し、伸長 gag 領域およびコザック配列を含有する。ヒト一本鎖IL-12をコードする遺伝子が、NFAT応答性プロモーターにより駆動される注文品IL-12 p40、リンカーG6SおよびIL-12 p35を用いて合成され、5'LTR方向とは逆のMSGV-1ベクターに挿入された。製造管理および品質管理に関する基準 (GMP) 条件下で、NCI Surgery Branch Vector Production Facility (Bethesda, MD) により、高力価のPG13細胞に基づく産生細胞系が生成され、レトロウイルス上清が生産された。このベクター上清は、試験され、臨床応用のための組換えガンマレトロウイルスベクターの生産について現在要求される全てのUS Food and Drug Administrationガイドラインに合格した。

【0336】

形質導入手順は、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を、30 ng/mlの抗CD3 mAb Orthoclone OKT3 (Centocor Ortho Biotech, Raritan, NJ)、3000 IU/mlの組換えヒトIL-12、およびTILごとにフィーダー細胞200の比での4 Gy照射同種異系PBMCフィーダー細胞で刺激することにより、開始された。レトロネクチン (CH-296; タカラバイオ株式会社、大津

、日本) がコーティングされた非組織培養 6 ウェルプレートを使用する 4 日目および／または 5 日目に形質導入のために、細胞が回収された。ベクター上清が 2000 g で 2 時間、32℃での遠心分離によりコーティングプレート上に「回転ローディング」された。レトロウイルスベクター上清がウェルから吸引され、 2×10^6 の刺激された TIL 細胞が各ウェルに添加され、続いて 1000 g で 10 分間の遠心分離が行われた。プレートが 37℃で一晩インキュベートされ、細胞が翌日の 2 回目の形質導入のために回収された。第 1 の 21 名の患者の細胞は、2 回の形質導入を受けた。患者 12 名の細胞は、1 回の形質導入しか受けなかった。

【0337】

Jones, S. et al., 2009, Lentiviral vector design for optimal T cell receptor gene expression in the transduction of peripheral blood lymphocytes and tumor-infiltrating lymphocytes. Human gene therapy, 20(6), 630-640 には、形質導入 T リンパ球において遺伝子を発現させるためにおよび有効な抗腫瘍 T 細胞を構築するためにレンチウイルスベクターにおいて使用するためのプロモーターの開発が記載されている。

【0338】

TIL は、外科検体から得られた。PBL が、-180℃で保管された凍結ストックから解凍され、AIM-V およびインターロイキン-2 (IL-2; Cetus, Emeryville, CA) 中の培養物に 300 IU/ml で入れられた。OKT3 刺激のために、細胞は、まず、50 ng/ml の抗 CD3 抗体、OKT3 (Ortho Biotech, Bridgewater, NJ) を有する培地に入れられ、または形質導入後、培養培地の最初の交換時に OKT3 培地に入れられた。PBL または TIL の形質導入のために、 1×10^6 細胞が、ウイルス上清およびポリブレン (最終濃度、8 µg/ml) で 24 ウェル組織培養処置プレートにおいて 1 ml の最終体積に調整された。プレートの 1.5 時間、1000 × g、32℃での遠心分離により、細胞に形質導入された。プレートが、一晩、37℃、加湿 5% CO₂ インキュベーター内に置かれ、翌日、培地を交換された。TIL は、OKT3 (50 ng/ml)、IL-2 (5000 IU/ml)、および 3 名の異なるドナーからの照射同種異系末梢血単核細胞 (TIL: フィーダー比、1:100) を使用して、前述の急速拡大プロトコール (REP) に付された。REP の 6 日後、TIL に、記載されているように形質導入され、それが培養に戻された。

【0339】

Beane, J. D. et al., 2015, Clinical Scale Zinc Finger Nuclease-mediated Gene Editing of PD-1 in Tumor Infiltrating Lymphocytes for the Treatment of Metastatic Melanoma. Molecular therapy: 23(8), 1380-1390 には、PD-1 特異的ジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) 媒介遺伝子編集をコードする mRNA の電気穿孔による PD-1 の臨床規模遺伝子編集が記載されている。

【0340】

養子細胞移入のために十分な数の形質導入 T 細胞を生成するために、TIL が、REP-46 を使用して増殖するように誘導された。手短に述べると、 1×10^7 の TIL が 1×10^9 の同種異系、照射 (5,000 ラド) 末梢血単核細胞 (PBMC) と併せられ、これらの細胞が、30 ng/ml の OKT3 を含有する 400 ml の T 細胞培地に浮遊された。細胞が、G-Rex 100 フラスコ内で、37℃および 5% CO₂ で培養された。5 日後、200 ml の培地が吸引され、交換された。REP の開始から 7 日後、TIL が回収され、Hyclone 電気穿孔緩衝剤 (Hyclone Laboratories, Logan, UT) で 2 回洗浄された。次いで、細胞が計数され、電気穿孔緩衝剤に 1×10^8 /ml の濃度で再浮遊された。次いで、細胞は、MaxCyte CL-2 処理アセンブリーに移され、120 µg/ml の PD-1 ZFN mRNA (または GFP がトランスフェクトされた TIL/GFP については GFP mRNA) と混合された。電気穿孔は、MaxCyte のプロトコールに従って行われた。電気穿孔後、TIL は、

処理アセンブリーから T-175 フラスコに移され、20 分間、37℃のインキュベーター内に置かれた。このインキュベーションステップの後、TIL は、AIM-V 培地に $1 \times 10^6 / \text{ml}$ の濃度で再浮遊された。次いで、細胞は、前述の一晚の低温インキュベーションのために 30℃に設定したインキュベーター内に置かれた。翌日、TIL は、37℃インキュベーターに移され、REP 10 日目（電気穿孔の 3 日後）までそのままにしておかれた。

【0341】

一部の実施形態では、第 1 の拡大から得られた TIL は、選択についての表現型判定まで保管される。一部の実施形態では、第 1 の拡大から得られた TIL は、保管されず、直接第 2 の拡大に進む。したがって、方法は、追加の IL-2、OKT-3、および抗原提示細胞 (APC) とともに TIL、特に UTIL、の第 1 の集団を培養することにより、第 2 の拡大を行って、TIL の第 2 の集団を産生するステップを含む。一部の実施形態では、第 1 の拡大から得られた TIL は、第 1 の拡大後かつ第 2 の拡大前に凍結保存されない。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された後、約 3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日、または 14 日目に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された後、約 3 日～21 日目に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された後、約 4 日～14 日目に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された後、約 4 日～10 日目に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された後、約 7 日～14 日目に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された後、約 14 日目に行われる。一部の実施形態では、REP 培養物の播種は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20 または 21 日後に行われる。

【0342】

一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された後、1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、10 日、11 日、12 日、13 日、または 14 日目に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された 1 日～14 日後に行われる。一部の実施形態では、第 1 の TIL 拡大は、2 日～14 日間進行し得る。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された 3 日～14 日後に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された 4 日～14 日後に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された 5 日～14 日後に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された 6 日～14 日後に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された 7 日～14 日後に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された 8 日～14 日後に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された 9 日～14 日後に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された 10 日～14 日後に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された 11 日～14 日後に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された 12 日～14 日後に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された 13 日～14 日後に行われる。一部の実施形態では、第 1 の拡大から第 2 の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解

凍された14日後に行われる。一部の実施形態では、第1の拡大から第2の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された1日～11日後に行われる。一部の実施形態では、第1の拡大から第2の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された2日～11日後に行われる。一部の実施形態では、第1の拡大から第2の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された3日～11日後に行われる。一部の実施形態では、第1の拡大から第2の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された4日～11日後に行われる。一部の実施形態では、第1の拡大から第2の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された5日～11日後に行われる。一部の実施形態では、第1の拡大から第2の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された6日～11日後に行われる。一部の実施形態では、第1の拡大から第2の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された7日～11日後に行われる。一部の実施形態では、第1の拡大から第2の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された8日～11日後に行われる。一部の実施形態では、第1の拡大から第2の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された9日～11日後に行われる。一部の実施形態では、第1の拡大から第2の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された10日～11日後に行われる。一部の実施形態では、第1の拡大から第2の拡大への移行は、凍結保存された脱凝集腫瘍組織が解凍された11日後に行われる。

10

【0343】

一部の実施形態では、TILは、第1の拡大後かつ第2の拡大前に保管されず、TILは、第2の拡大に直接進む。一部の実施形態では、移行は、本明細書に記載の閉鎖系で行われる。一部の実施形態では、第1の拡大からのTILである、TILの第2の集団は、移行期間なしで第2の拡大に直接進む。

20

【0344】

一部の実施形態では、第1の拡大から第2の拡大への移行は、閉鎖系バイオリアクターで行われる。一部の実施形態では、閉鎖系は、本明細書に記載されるように、TIL拡大に利用される。一部の実施形態では、単一のバイオリアクターが利用される。一部の実施形態では、利用される単一のバイオリアクターは、例えば、G-R E X-10、またはG-R E X-100、またはXur i W A V E バイオリアクターである。一部の実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

30

【0345】

一部の実施形態では、TIL細胞集団は、回収および最初のバルク処理後に数が拡大される。このさらなる拡大は、本明細書では第2の拡大と呼ばれ、当技術分野において急速拡大プロセスと一般に呼ばれる拡大プロセスを含み得る。第2の拡大は、一般に、フィーダー細胞、サイトカイン源、および抗CD3抗体をはじめとするいくつかの構成成分を含む培養培地を使用して、ガス透過性またはガス交換性容器内で果たされる。

【0346】

一部の実施形態では、TILの第2の拡大または第2のTIL拡大は、当業者が公知の任意のTIL培養フラスコまたは容器を使用して行うことができる。一部の実施形態では、第2のTIL拡大は、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、または14日間進行し得る。一部の実施形態では、第2のTIL拡大は、約7日～約14日間進行し得る。一部の実施形態では、第2のTIL拡大は、約8日～約14日間進行し得る。一部の実施形態では、第2のTIL拡大は、約9日～約14日間進行し得る。一部の実施形態では、第2のTIL拡大は、約10日～約14日間進行し得る。一部の実施形態では、第2のTIL拡大は、約11日～約14日間進行し得る。一部の実施形態では、第2のTIL拡大は、約12日～約14日間進行し得る。一部の実施形態では、第2のTIL拡大は、約13日～約14日間進行し得る。一部の実施形態では、第2のTIL拡大は、約14日間進行し得る。

40

【0347】

ある実施形態では、第2の拡大を、本開示の方法を使用してガス透過性容器内で行うこ

50

とができる。例えば、インターロイキン-2 (IL-2) またはインターロイキン-7 (IL-7) またはインターロイキン-15 (IL-15) ; IL-12 の存在下で非特異的T細胞受容体刺激を使用して、TILを急速に拡大することができる。非特異的T細胞受容体刺激剤としては、例えば、抗CD3抗体、例えば、約30 ng/mLのOKT3、マウスモノクローナル抗CD3抗体 (Ortho-McNeil、Raritan、N. JもしくはMiltenyi Biotech、Auburn、Calif. から市販されている) またはUHCT-1 (BioLegend、San Diego、Calif.、USAから市販されている) を挙げることができる。TILを、必要に応じて、T細胞増殖因子、例えば、300 IU/mLのIL-2またはIL-15の存在下で、ベクターから必要に応じて発現され得る、がんの、エピトープなどの、それらの抗原部分を含む1つまたは複数の抗原、例えば、ヒト白血球抗原A2 (HLA-A2) 結合ペプチド、例えば、0.3 μM MART-1:26-35 (27L) またはgp100:209-217 (210M) を、第2の拡大中に含めることによって、in vitroでTILのさらなる刺激を誘導するように、拡大することができる。他の好適な抗原としては、例えば、NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼがん抗原、MAGE-A3、SSX-2、およびVEGFR2、またはこれらの抗原性部分を挙げることができる。TILを、HLA-A2発現抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原での再刺激により、急速に拡大させることもできる。あるいは、TILを、例えば、例である、被照射自己リンパ球で、または被照射HLA-A2+同種異系リンパ球およびIL-2で、さらに再刺激することができる。一部の実施形態では、再刺激は、第2の拡大の一部として行われる。一部の実施形態では、第2の拡大は、被照射自己リンパ球の存在下で、または被照射HLA-A2+同種異系リンパ球およびIL-2を用いて、行われる。

10

20

30

40

50

【0348】

ある実施形態では、細胞培養培地は、IL-2をさらに含む。一部の実施形態では、細胞培養培地は、約3,000 IU/mLのIL-2を含む。ある実施形態では、細胞培養培地は、約100 IU/mL、約200 IU/mL、約300 IU/mL、約400 IU/mL、約500 IU/mL、約600 IU/mL、約700 IU/mL、約800 IU/mL、約900 IU/mL、1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL、または約8000 IU/mLのIL-2を含む。ある実施形態では、細胞培養培地は、1000~2000 IU/mLの間、2000~3000 IU/mLの間、3000~4000 IU/mLの間、4000~5000 IU/mLの間、5000~6000 IU/mLの間、6000~7000 IU/mLの間、7000~8000 IU/mLの間、または8000 IU/mLの間のIL-2を含む。

【0349】

ある実施形態では、細胞培養培地は、OKT3抗体を含む。一部の実施形態では、細胞培養培地は、約30 ng/mLのOKT3抗体を含む。ある実施形態では、細胞培養培地は、約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL、および約1 μg/mLのOKT3抗体を含む。ある実施形態では、細胞培養培地は、0.1 ng/mL~1 ng/mLの間、1 ng/mL~5 ng/mLの間、5 ng/mL~10 ng/mLの間、10 ng/mL~20 ng/mLの間、20 ng/mL~30 ng/mLの間、30 ng/mL~40 ng/mLの間、40 ng/mL~50 ng/mLの間、および50 ng/mL~100 ng/mLの間のOKT3抗体を含む。

【0350】

一部の実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15および／またはIL-21の組合せは、第2の拡大中に組合せとして利用される。一部の実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15および／またはIL-21ならびにこれらの任意の組合せを第2の拡大中に含めることができる。一部の実施形態では、IL-2、IL-15およびIL-21の組合せが第2の拡大中に組合せとして利用される。一部の実施形態では、IL-2、IL-15およびIL-21ならびにこれらの任意の組合せを含めることができる。

【0351】

一部の実施形態では、第2の拡大を、IL-2とOKT-3と抗原提示フィーダー細胞とを含む、補充された細胞培養培地で行うことができる。一部の実施形態では、第2の拡大は、補充された細胞培養培地で行われる。一部の実施形態では、補充された細胞培養培地は、IL-2、OKT-3、および抗原提示フィーダー細胞を含む。一部の実施形態では、第2の細胞培養培地は、IL-2、OKT-3、および抗原提示細胞（APC；抗原提示フィーダー細胞とも呼ばれる）を含む。一部の実施形態では、第2の拡大は、IL-2とOKT-3と抗原提示フィーダー細胞（すなわち、抗原提示細胞）とを含む細胞培養培地で行われる。

【0352】

一部の実施形態では、第2の拡大培養培地は、約500 IU/mLのIL-15、約400 IU/mLのIL-15、約300 IU/mLのIL-15、約200 IU/mLのIL-15、約180 IU/mLのIL-15、約160 IU/mLのIL-15、約140 IU/mLのIL-15、約120 IU/mLのIL-15、または約100 IU/mLのIL-15を含む。一部の実施形態では、第2の拡大培養培地は、約500 IU/mLのIL-15から約100 IU/mLのIL-15を含む。一部の実施形態では、第2の拡大培養培地は、約400 IU/mLのIL-15から約100 IU/mLのIL-15を含む。一部の実施形態では、第2の拡大培養培地は、約300 IU/mLのIL-15から約100 IU/mLのIL-15を含む。一部の実施形態では、第2の拡大培養培地は、約200 IU/mLのIL-15を含む。一部の実施形態では、細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-15を含む。ある実施形態では、細胞培養培地は、IL-15をさらに含む。好ましい実施形態では、細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-15を含む。

【0353】

一部の実施形態では、第2の拡大培養培地は、約20 IU/mLのIL-21、約15 IU/mLのIL-21、約12 IU/mLのIL-21、約10 IU/mLのIL-21、約5 IU/mLのIL-21、約4 IU/mLのIL-21、約3 IU/mLのIL-21、約2 IU/mLのIL-21、約1 IU/mLのIL-21、または約0.5 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、第2の拡大培養培地は、約20 IU/mLのIL-21から約0.5 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、第2の拡大培養培地は、約15 IU/mLのIL-21から約0.5 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、第2の拡大培養培地は、約12 IU/mLのIL-21から約0.5 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、第2の拡大培養培地は、約10 IU/mLのIL-21から約0.5 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、第2の拡大培養培地は、約5 IU/mLのIL-21から約1 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、第2の拡大培養培地は、約2 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。一部の実施形態では、細胞培養培地は、約0.5 IU/mLのIL-21を含む。ある実施形態では、細胞培養培地は、IL-21をさらに含む。好ましい実施形態では、細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。

【0354】

一部の実施形態では、抗原提示フィーダー細胞（APC）は、PBMCである。ある実施形態では、急速拡大および／または第2の拡大におけるTILのPBMCおよび／または抗原提示細胞に対する比は、約1対25、約1対50、約1対100、約1対125、

約1対150、約1対175、約1対200、約1対225、約1対250、約1対275、約1対300、約1対325、約1対350、約1対375、約1対400、または約1対500である。ある実施形態では、急速拡大および／または第2の拡大におけるTILのPBMCに対する比は、1対50～1対300の間である。ある実施形態では、急速拡大および／または第2の拡大におけるTILのPBMCに対する比は、1対100～1対200の間である。

【0355】

ある実施形態では、REPおよび／または第2の拡大は、150mLの培地中の100または200倍過剰の不活性化フィーダー細胞、30mg/mLのOKT3抗CD3抗体および3000IU/mLのIL-2と混合されたバルクTILを用いてフラスコ内で行われる。培地交換は、細胞が代替成長チャンバーに移されるまで行われる（一般に、吸引による新鮮培地との2/3培地交換）。代替成長チャンバーは、下でより十分に論じられるようなG-REXフラスコおよびガス透過性容器を含む。

10

【0356】

一部の実施形態では、第2の拡大（これは、REPプロセスと呼ばれるプロセスを含み得る）は、実施例で論じられるように、および図で説明されるように、7～14日に短縮される。一部の実施形態では、第2の拡大は、11日に短縮される。

【0357】

ある実施形態では、REPおよび／または第2の拡大を、T-175フラスコおよび以前に記載されたようなガス透過性バッグ（Tran, et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51; Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42）またはガス透過性の培養用製品（G-Rexフラスコ）を使用して行うことができる。一部の実施形態では、第2の拡大（急速拡大と呼ばれる拡大を含む）は、T-175フラスコで行われ、150mLの培地に浮遊している約 1×10^6 のTILを各T-175フラスコに添加することができる。TILを、mL当たり3000IUのIL-2とmL当たり30ngの抗CD3とを補充した、CMとAIM-V培地の1:1混合物中で培養することができる。T-175フラスコを、5%CO₂中、37℃でインキュベートすることができる。培地の半分を、5日目に、mL当たり3000IUのIL-2を有する50/50培地を使用して交換することができる。一部の実施形態では、7日目に、2つのT-175フラスコからの細胞を3Lバッグ内で併せることができ、5%ヒトAB血清とmL当たり3000IUのIL-2とを有する300mLのAIM-Vが、300mLのTIL浮遊液に添加された。各バッグ内の細胞の数が毎日または2日ごとに計数され、新鮮培地が、細胞計数を $0.5 \sim 2.0 \times 10^6$ 細胞/mLの間に保つために添加された。

20

30

【0358】

ある実施形態では、第2の拡大を、100cmのガス透過性シリコン底を有する容量500mLのガス透過性フラスコ（Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, Minn., USAから市販されているG-Rex 100）の中で行うことができ、 5×10^6 または 10×10^6 のTILを、5%ヒトAB血清とmL当たり3000IUのIL-2とmL当たり30ngの抗CD3（OKT3）とを補充した400mLの50/50培地で、PBMCとともに培養することができる。G-Rex 100フラスコを、5%CO₂中、37℃でインキュベートすることができる。5日目に、250mLの上清を除去し、遠心ボトルに入れ、1500rpm（491×g）で10分間、遠心分離することができる。5%ヒトAB血清、mL当たり3000IUのIL-2を有する、150mLの新鮮培地を用いてTILペレットを再浮遊させ、元のG-Rex 100フラスコに添加して戻すことができる。TILをG-Rex 100フラスコ内で連続的に拡大させる場合、7日目に、各G-Rex 100内のTILを、各フラスコ内に存在する300mLの培地に浮遊させることができ、細胞浮遊液を3つの100mLアリコートに分割することができ、それらを使用して3本のG-Rex 100フラスコに播種することができる。次いで、5%ヒトAB血清とmL当たり3000IUのIL-2とを有する150mLのAIM-Vを各フラスコ

40

50

に添加することができる。G-Rex 100 フラスコを、37℃で、5%CO₂中でインキュベートし、4日後、mL当たり3000IUのIL-2を有する150mLのAIM-Vを、各G-Rex 100 フラスコに添加することができる。細胞を培養14日目に回収することができる。

【0359】

ある実施形態では、第2の拡大（REPと呼ばれる拡大を含む）は、150mLの培地中の、100または200倍過剰の不活性化フィーダー細胞、30mg/mLのOKT3抗CD3抗体および3000IU/mLのIL-2と混合された、バルクTILを用いてフラスコ内で行われる。一部の実施形態では、培地交換は、細胞が代替成長チャンバーに移されるまで行われる。一部の実施形態では、培地2/3は、吸引により新鮮培地と交換される。一部の実施形態では、代替成長チャンバーは、G-Rex フラスコおよび下でより十分に論じられるようなガス透過性容器を含む。

10

【0360】

ある実施形態では、第2の拡大（REPと呼ばれる拡大を含む）が行われ、第2の拡大は、TILが優れた腫瘍反応性について選択されるステップをさらに含む。当技術分野において公知の任意の選択方法を使用することができる。例えば、米国特許出願公開第2016/0010058A1号に記載されている方法を、優れた腫瘍反応性についてのTILの選択に使用することができる。

【0361】

必要に応じて、第2の拡大（REP拡大と呼ばれる拡大を含む）の後、当技術分野において公知の標準的なアッセイを使用して細胞生存アッセイを行うことができる。例えば、死細胞を選択的に標識して生存率の評定を可能にするトリパンブルー排除アッセイを、バルクTILの試料に対して行うことができる。一部の実施形態では、Cellometer K2自動化細胞計数機（Nexcelom Bioscience、Lawrence、Mass.）を使用して、TIL試料を計数し、生存率を判定することができる。

20

【0362】

一部の実施形態では、TILの第2の拡大（REPと呼ばれる拡大を含む）を、T-175 フラスコおよび以前に記載されたようなガス透過性バッグ（Tran K Q, Zhou J, Durflinger K H, et al., 2008, J Immunother., 31:742-751、および Dudley M E, Wunderlich J R, Shelton T E, et al. 2003, J Immunother., 26:332-342）またはガス透過性G-Rex フラスコを使用して行うことができる。一部の実施形態では、第2の拡大は、フラスコを使用して行われる。一部の実施形態では、第2の拡大は、ガス透過性G-Rex フラスコを使用して行われる。一部の実施形態では、第2の拡大は、T-175 フラスコで行われ、約 1×10^6 のTILが、約150mLの培地に浮遊され、これが各T-175 フラスコに添加される。TILは、「フィーダー」細胞としての被照射（50Gy）同種異系PBMCとともに、1対100の比で培養され、細胞は、3000IU/mLのIL-2と30ng/mLの抗CD3とを補充した、CMとAIM-V培地の1:1混合物（50/50培地）中で培養された。T-175 フラスコは、5%CO₂中、37℃でインキュベートされる。一部の実施形態では、培地の半分は、5日目に、3000IU/mLのIL-2を有する50/50培地を使用して交換される。一部の実施形態では、7日目に、2つT-175 フラスコからの細胞が3Lバッグ内で併せられ、5%ヒトAB血清と3000IU/mLのIL-2とを有する300mLのAIM-Vが、300mLのTIL浮遊液に添加される。各バッグ内の細胞の数を毎日または2日ごとに計数することができ、新鮮培地を添加して、細胞計数を約 $0.5 \sim 2.0 \times 10^6$ 細胞/mLの間に保つことができる。

30

40

【0363】

一部の実施形態では、第2の拡大（REPと呼ばれる拡大を含む）は、100cm²のガス透過性シリコン底を有する容量500mLのフラスコ（G-Rex 100、Wilson Wolf）の中で行われ、約 5×10^6 または 10×10^6 のTILが、3000IU/mLのIL-2と30ng/mLの抗CD3とを補充した400mLの50/5

50

0 培地中で、被照射同種異系 P B M C とともに 1 対 1 0 0 の比で培養される。G - R e x 1 0 0 フラスコが、5 % C O ₂ 中、3 7 °C でインキュベートされる。一部の実施形態では、5 日目に、2 5 0 m L の上清が除去され、遠心ボトルに入れられ、1 5 0 0 r p m (4 9 1 g) で 1 0 分間、遠心分離される。次いで、T I L ペレットを、3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を有する 1 5 0 m L の新鮮 5 0 / 5 0 培地を用いて再浮遊させ、元の G - R e x 1 0 0 フラスコに添加して戻すことができる。T I L が G - R e x 1 0 0 フラスコ内で連続的に拡大される実施形態では、7 日目に、各 G - R e x 1 0 0 内の T I L が、各フラスコ内に存在する 3 0 0 m L の培地に浮遊され、細胞浮遊液が、3 本の G - R e x 1 0 0 フラスコに播種するために使用される 3 つの 1 0 0 m L アリコートに分割された。次いで、5 % ヒト A B 血清と 3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 とを有する 1 5 0 m L の A I M - V が各フラスコに添加される。G - R e x 1 0 0 フラスコは、3 7 °C で、5 % C O ₂ 中でインキュベートされ、4 日後、3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を有する 1 5 0 m L の A I M - V が各 G - R e x 1 0 0 フラスコに添加される。細胞が培養 1 4 日目に回収される。

10

【0364】

T および B リンパ球の多様な抗原受容体は、限定された、しかし多数の、遺伝子セグメントの体細胞組換えにより産生される。これらの遺伝子セグメント：V (可変) 、D (多様性) 、J (結合) 、および C (定常) は、免疫グロブリンおよび T 細胞受容体 (T C R) の結合特異性および下流の用途を決定する。本発明は、T 細胞レパートリー多様性を示すおよび増大させる T I L を生成するための方法を提供する。一部の実施形態では、本方法により得られる T I L は、T 細胞レパートリー多様性の増大を示す。一部の実施形態では、第 2 の増幅で得られる T I L は、T 細胞レパートリー多様性の増大を示す。一部の実施形態では、多様性の増大は、免疫グロブリン多様性および / または T 細胞受容体多様性の増大である。一部の実施形態では、多様性は、免疫グロブリン重鎖の多様性である。一部の実施形態では、多様性は、免疫グロブリン軽鎖の多様性である。一部の実施形態では、多様性は、T 細胞受容体の多様性である。一部の実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマおよびデルタ受容体からなる群から選択される T 細胞受容体のうちの 1 つの多様性である。一部の実施形態では、T 細胞受容体 (T C R) アルファおよび / またはベータの発現の増加がある。一部の実施形態では、T 細胞受容体 (T C R) アルファの発現の増加がある。一部の実施形態では、T 細胞受容体 (T C R) ベータの発現の増加がある。一部の実施形態では、T C R a b (すなわち、T C R α / β) の発現の増加がある。

20

30

【0365】

一部の実施形態では、第 2 の拡大培養培地 (例えば、C M 2 または第 2 の細胞培養培地と呼ばれることもある) は、I L - 2 、O K T - 3 、ならびに抗原提示フィーダー細胞 (A P C) を含む。

【0366】

一部の実施形態では、第 2 の拡大は、閉鎖系バイオリアクターで行われる。一部の実施形態では、閉鎖系は、本明細書に記載されるように、T I L 拡大に利用される。一部の実施形態では、単一のバイオリアクターが利用される。一部の実施形態では、利用される単一のバイオリアクターは、例えば、G - R E X - 1 0 、または G - R E X - 1 0 0 、または有利には W O 2 0 1 8 / 1 3 0 8 4 5 のデバイスである。一部の実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

40

【0367】

ある実施形態では、本明細書に記載される第 2 の拡大手順、ならびに R E P と呼ばれるものは、R E P T I L 拡大中に、および / または第 2 の拡大中に、過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な血液ドナーからの標準的な全血ユニットから得られる末梢血単核細胞 (P B M C) である。P B M C は、F i c o l l - P a q u e 勾配分離などの標準的な方法を使用して得られる。

【0368】

一般に、同種異系 P B M C は、照射または熱処置のどちらかによって不活性化され、被

50

照射同種異系 P B M C に複製能力がないことを評価するための例示的プロトコールを提供する R E P 手順で使用される。

【0369】

一部の実施形態では、P B M C は、14 日目の生存細胞の総数が、R E P の 0 日目および／または第 2 の拡大の 0 日目（すなわち、第 2 の拡大の開始日）の培養物に入れた最初の生存細胞数より少なかった場合、複製能力がないと見なされ、本明細書に記載される T I L 拡大手順での使用に許容される。

【0370】

一部の実施形態では、P B M C は、O K T 3 および I L - 2 の存在下で培養された生存細胞の総数が、7 日目および 14 日目に、R E P の 0 日目および／または第 2 の拡大の 0 日目（すなわち、第 2 の拡大の開始日）の培養物に入れた最初の生存細胞数から増加していなかった場合、複製能力がないと見なされ、本明細書に記載される T I L 拡大手順での使用に許容される。一部の実施形態では、P B M C は、30 ng / ml の O K T 3 抗体および 3000 I U / ml の I L - 2 の存在下で培養される。

【0371】

一部の実施形態では、P B M C は、O K T 3 および I L - 2 の存在下で培養された生存細胞の総数が、7 日目および 14 日目に、R E P の 0 日目および／または第 2 の拡大の 0 日目（すなわち、第 2 の拡大の開始日）の培養物に入れた最初の生存細胞数から増加していなかった場合、複製能力がないと見なされ、本明細書に記載される T I L 拡大手順での使用に許容される。一部の実施形態では、P B M C は、5 ~ 60 ng / ml の O K T 3 抗体および 1000 ~ 6000 I U / ml の I L - 2 の存在下で培養される。一部の実施形態では、P B M C は、10 ~ 50 ng / ml の O K T 3 抗体および 2000 ~ 5000 I U / ml の I L - 2 の存在下で培養される。一部の実施形態では、P B M C は、20 ~ 40 ng / ml の O K T 3 抗体および 2000 ~ 4000 I U / ml の I L - 2 の存在下で培養される。一部の実施形態では、P B M C は、25 ~ 35 ng / ml の O K T 3 抗体および 2500 ~ 3500 I U / ml の I L - 2 の存在下で培養される。

【0372】

一部の実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、P B M C である。一部の実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。ある実施形態では、第 2 の拡大における T I L の抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約 1 対 25、約 1 対 50、約 1 対 100、約 1 対 125、約 1 対 150、約 1 対 175、約 1 対 200、約 1 対 225、約 1 対 250、約 1 対 275、約 1 対 300、約 1 対 325、約 1 対 350、約 1 対 375、約 1 対 400、または約 1 対 500 である。ある実施形態では、第 2 の拡大における T I L の抗原提示フィーダー細胞に対する比は、1 対 50 ~ 1 対 300 の間である。ある実施形態では、第 2 の拡大における T I L の抗原提示フィーダー細胞に対する比は、1 対 100 ~ 1 対 200 の間である。

【0373】

ある実施形態では、本明細書に記載される第 2 の拡大手順は、約 2.5×10^9 フィーダー細胞対約 100×10^6 T I L の比を必要とする。別の実施形態では、本明細書に記載される第 2 の拡大手順は、約 2.5×10^9 フィーダー細胞対約 50×10^6 T I L の比を必要とする。さらに別の実施形態では、本明細書に記載される第 2 の拡大手順は、約 2.5×10^9 フィーダー細胞を約 25×10^6 T I L に対して必要とする。

【0374】

ある実施形態では、本明細書に記載される第 2 の拡大手順は、第 2 の拡大中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な血液ドナーからの標準的な全血ユニットから得られる末梢血単核細胞（P B M C）である。P B M C は、F i c o l l - P a q u e 勾配分離などの標準的な方法を使用して得られる。ある実施形態では、人工抗原提示（a A P C）細胞が P B M C の代わりに使用される。

【0375】

一般に、同種異系 P B M C は、照射または熱処置のどちらかによって不活性化され、T

10

20

30

40

50

IL 拡大手順で使用される。

【0376】

ある実施形態では、人工抗原提示細胞は、第2の拡大においてP B M Cの代替品として、またはP B M Cと組み合わせて使用される。

【0377】

本明細書に記載される拡大方法は、当技術分野において公知であるような、高用量のサイトカイン、特にIL-2、を有する培養培地を一般に使用する。

【0378】

あるいは、T I L Sの急速拡大およびまたは第2の拡大のためのサイトカインの組合せの使用は、これによりそれらの全体が参照により本明細書に明確に組み込まれる国際公開番号W O 2 0 1 5 / 1 8 9 3 5 6号およびW国際公開番号W O 2 0 1 5 / 1 8 9 3 5 7号に一般的に概要が示されているようなIL-2、IL-15およびIL-21のうちの2つまたはそれより多くについての組合せで、さらに可能である。したがって、可能な組合せとしては、IL-2とIL-15、IL-2とIL-21、IL-15とIL-21とIL-2、IL-15とIL-21が挙げられ、後述のものが多くの実施形態において特に使用される。サイトカインの組合せの使用は、リンパ球、具体的には本明細書に記載のT細胞、の生成に特に有利に働く。

【0379】

一部の実施形態では、本明細書に記載される拡大方法（R E Pと呼ばれるものを含む）に使用される培養培地は、抗C D 3も含む。IL-2との組合せでの抗C D 3抗体は、T細胞活性化およびT I L 集団の細胞分裂を誘導する。この効果は、完全長抗体ならびにF a bおよびF（a b'）2断片で見られ得るものであり、前述のものが一般に好ましい；例えば、これによりその全体が参照により本明細書に組み込まれるTsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719を参照されたい。

【0380】

当業者には理解されるであろうが、マウス、ヒト、霊長類、ラットおよびイヌ抗体を含むがこれらに限定されない、様々な哺乳動物からの抗ヒトC D 3ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を含む、本発明で使用されるいくつかの好適な抗ヒトC D 3抗体がある。特定の実施形態では、O K T 3抗C D 3抗体が使用される（O r t h o - M c N e i l , R a r i t a n , N . J . またはM i l t e n y i B i o t e c h , A u b u r n , C a l i f . から市販されている）。

【0381】

第2の拡大ステップ後、細胞を回収することができる。一部の実施形態では、T I L は、1、2、3、4またはそれより多くの拡大ステップ後に回収される。一部の実施形態では、T I L は、2拡大ステップ後に回収される。

【0382】

T I L は、例えば遠心分離による手法を含む、任意の適切な無菌的方法で回収することができる。T I L を回収するための方法は、当技術分野において周知であり、任意のそのような公知の方法を本プロセスとともに使用することができる。一部の実施形態では、T I L S は、自動化システムを使用して回収される。

【0383】

セルハーベスターおよび／または細胞処理システムは、例えば、F r e s e n i u s K a b i , T o m t e c L i f e S c i e n c e , P e r k i n E l m e r , およびI n o t e c h B i o s y s t e m s I n t e r n a t i o n a l , I n c . をはじめとする様々な供給元から市販されている。任意の細胞ベースのハーベスターを本発明の方法とともに用いることができる。一部の実施形態では、セルハーベスターおよび／または細胞処理システムは、膜に基づくセルハーベスターである。一部の実施形態では、細胞回収は、細胞処理システム、例えば、L O V Oシステム（F r e s e n i u s K a b i により製造されている）による。用語「L O V O細胞処理システム」は、細胞を含む溶液を無菌および／または閉鎖系環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィル

ターを通してポンピングすることができ、その結果、ペレット化を伴わずに上清または細胞培養培地を除去するための連続した流れおよび細胞処理が可能となる、任意の販売会社により製造されている任意の機器またはデバイスも指す。一部の実施形態では、セルハーベスターおよび／または細胞処理システムは、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮および／または他の細胞処理ステップを閉鎖された無菌システムで行うことができる。

【0384】

一部の実施形態では、回収は、閉鎖系バイオリアクターで行われる。一部の実施形態では、閉鎖系は、本明細書に記載されるように、TIL拡大に利用される。一部の実施形態では、単一のバイオリアクターが利用される。一部の実施形態では、利用される単一のバイオリアクターは、例えば、G-R E X-10、またはG-R E X-100、または有利

10

【0385】

細胞は、患者への投与に使用される容器に移される。一部の実施形態では、上記の拡大方法を使用して治療に十分な数のTILが得られると、それらは、患者への投与に使用される容器に移される。

【0386】

ある実施形態では、本開示のAPCを使用して拡大されたTILは、医薬組成物として患者に投与される。ある実施形態では、医薬組成物は、滅菌緩衝剤中のTILの浮遊液である。本開示のPBM Cを使用して拡大させたTILを当技術分野において公知の任意の好適な経路によって投与することができる。一部の実施形態では、T細胞は、好ましくは

20

【0387】

ある実施形態では、本開示の方法を使用して拡大されたTILは、医薬組成物として患者に投与される。ある実施形態では、医薬組成物は、滅菌緩衝剤中のTILの浮遊液である。本開示のPBM Cを使用して拡大させたTILを当技術分野において公知の任意の好適な経路によって投与することができる。一部の実施形態では、T細胞は、好ましくは

30

【0388】

TILの任意の好適な用量を投与することができる。一部の実施形態では、特にがんが黒色腫である場合、平均およそ 7.8×10^{10} のTILで、約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} のTILが投与される。ある実施形態では、約 1.2×10^{10} ～約 4.3×10^{10} のTILが投与される。一部の実施形態では、約 3×10^{10} ～約 12×10^{10} のTILが投与される。一部の実施形態では、約 4×10^{10} ～約 10×10^{10} のTILが投与される。一部の実施形態では、約 5×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILが投与される。一部の実施形態では、約 6×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILが投与される。一部の実施形態では、約 7×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILが投与される。一部の実施形態では、治療有効投薬量は、約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} である。一部の実施形態では、治療有効投薬量は、特に、がんが黒色腫である場合、約 7.8×10^{10} のTILである。一部の実施形態では、治療有効投薬量は、約 1.2×10^{10} ～約 4.3×10^{10} のTILである。一部の実施形態では、治療有効投薬量は、約 3×10^{10} ～約 12×10^{10} のTILである。一部の実施形態では、治療有効投薬量は、約 4×10^{10} ～約 10×10^{10} のTILである。一部の実施形態では、治療有効投薬量は、約 5×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILである。一部の実施形態では、治療有効投薬量は、約 6×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILである。一部の実施形態では、治療有効投薬量は、約 7×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILである。

40

【0389】

一部の実施形態では、本発明の医薬組成物で提供されるTILの数は、約 1×10^6 、

50

2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、および 9×10^{13} である。ある実施形態では、本発明の医薬組成物で提供される TIL の数は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、および $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲である。

【0390】

一部の実施形態では、本発明の医薬組成物で提供される TIL の濃度は、例えば、医薬組成物の 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% または 0.0001% w/w、w/v または v/v 未満である。

【0391】

一部の実施形態では、本発明の医薬組成物で提供される TIL の濃度は、医薬組成物の 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%、1.25%、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% または 0.0001% w/w、w/v、または v/v より高い。

【0392】

一部の実施形態では、本発明の医薬組成物で提供される TIL の濃度は、医薬組成物の

約 0.0001%～約 50%、約 0.001%～約 40%、約 0.01%～約 30%、約 0.02%～約 29%、約 0.03%～約 28%、約 0.04%～約 27%、約 0.05%～約 26%、約 0.06%～約 25%、約 0.07%～約 24%、約 0.08%～約 23%、約 0.09%～約 22%、約 0.1%～約 21%、約 0.2%～約 20%、約 0.3%～約 19%、約 0.4%～約 18%、約 0.5%～約 17%、約 0.6%～約 16%、約 0.7%～約 15%、約 0.8%～約 14%、約 0.9%～約 12% または 約 1%～約 10% w/w、w/v または v/v の範囲である。

【0393】

一部の実施形態では、本発明の医薬組成物で提供される TIL の濃度は、医薬組成物の約 0.001%～約 10%、約 0.01%～約 5%、約 0.02%～約 4.5%、約 0.03%～約 4%、約 0.04%～約 3.5%、約 0.05%～約 3%、約 0.06%～約 2.5%、約 0.07%～約 2%、約 0.08%～約 1.5%、約 0.09%～約 1%、約 0.1%～約 0.9% w/w、w/v または v/v の範囲である。

10

【0394】

一部の実施形態では、本発明の医薬組成物で提供される TIL の量は、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、もしくは 0.0001 g に等しい、またはそれ未満である。

20

【0395】

一部の実施形態では、本発明の医薬組成物で提供される TIL の量は、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 g、3 g、3.5 g、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、または 10 g より多い。

30

40

【0396】

本発明の医薬組成物で提供される TIL は、広い投薬量範囲にわたって有効である。正確な投薬量は、投与経路、化合物が投与される形態、処置される対象の性別および年齢、処置される対象の体重、ならびに担当医の選好および経験に依存することになる。TIL の臨床的に確立された投薬量も、適宜、使用することができる。本明細書における方法を使用して投与される医薬組成物の量、例えば、TIL の投薬量は、処置されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与率、医薬品有効成分の消失、および処方医師の自由裁量に依存することになる。

【0397】

一部の実施形態では、TIL を単回用量で投与することができる。そのような投与は、

50

注射、例えば、静脈内注射により得る。一部の実施形態では、T I Lは、複数回用量で投与することができる。投薬は、1年に1回、2回、3回、4回、5回、6回であることがあり、または6回より多いこともある。投薬は、月1回、2週間に1回、週1回、または1日おきであり得る。T I Lの投与は、必要な限り続き得る。

【0398】

一部の実施形態では、T I Lの有効投薬量は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、および 9×10^{13} である。一部の実施形態では、T I Lの有効投薬量は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、および $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲である。

【0399】

一部の実施形態では、T I Lの有効投薬量は、約 0.01 mg/kg ～約 4.3 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 3.6 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 3.2 mg/kg 、約 0.35 mg/kg ～約 2.85 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 2.85 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 2.15 mg/kg 、約 0.45 mg/kg ～約 1.7 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 1.3 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 1.15 mg/kg 、約 0.45 mg/kg ～約 1 mg/kg 、約 0.55 mg/kg ～約 0.85 mg/kg 、約 0.65 mg/kg ～約 0.8 mg/kg 、約 0.7 mg/kg ～約 0.75 mg/kg 、約 0.7 mg/kg ～約 2.15 mg/kg 、約 0.85 mg/kg ～約 2 mg/kg 、約 1 mg/kg ～約 1.85 mg/kg 、約 1.15 mg/kg ～約 1.7 mg/kg 、約 1.3 mg/kg ～約 1.6 mg/kg 、約 1.35 mg/kg ～約 1.5 mg/kg 、約 2.15 mg/kg ～約 3.6 mg/kg 、約 2.3 mg/kg ～約 3.4 mg/kg 、約 2.4 mg/kg ～約 3.3 mg/kg 、約 2.6 mg/kg ～約 3.15 mg/kg 、約 2.7 mg/kg ～約 3 mg/kg 、約 2.8 mg/kg ～約 3 mg/kg 、または約 2.85 mg/kg ～約 2.95 mg/kg の範囲である。

【0400】

一部の実施形態では、T I Lの有効投薬量は、約 1 mg ～約 500 mg 、約 10 mg ～約 300 mg 、約 20 mg ～約 250 mg 、約 25 mg ～約 200 mg 、約 1 mg ～約 50 mg 、約 5 mg ～約 45 mg 、約 10 mg ～約 40 mg 、約 15 mg ～約 35 mg 、約 20 mg ～約 30 mg 、約 23 mg ～約 28 mg 、約 50 mg ～約 150 mg 、約 60 mg ～約 140 mg 、約 70 mg ～約 130 mg 、約 80 mg ～約 120 mg 、約 90 mg ～約 110 mg 、または約 95 mg ～約 105 mg 、約 98 mg ～約 102 mg 、約 150 mg ～約 250 mg 、約 160 mg ～約 240 mg 、約 170 mg ～約 230 mg 、約 180 mg ～約 220 mg 、約 190 mg ～約 210 mg 、約 195 mg ～約 205 mg 、または約 $198 \sim 207 \text{ mg}$ の範囲である。

【0401】

T I L の有効量を、鼻腔内および経皮経路の投与、動脈内注射による投与、静脈内投与、腹腔内投与、非経口投与、筋肉内投与、皮下投与、局所投与、移植による投与、または吸入による投与を含む、同様の有用性を有する一般に認められた薬剤投与方法のいずれかにより、単回用量または複数回用量のどちらかで投与することができる。

【0402】

本発明は、本発明の T I L、特に U T I L、を使用する診断および予後予測アッセイの実施に有用なキットも含む。本発明のキットは、緩衝剤、サイトカイン、フラスコ、培地、製品容器、試薬および使用説明書を含み得る。

【0403】

腫瘍からの T I L の発生、急速拡大プロセスの設定、被照射 P B M C フィーダーが拡大されないことの確認、および静置培養物の W A V E バイオリアクター（例えば、<https://www.gelifesciences.com/en/us/shop/cell-culture-and-fermentation/rocking-bioreactors/consumables-and-accessories/single-use-readytoprocess-wave-cellbag-bioreactors-p-00346#overview>を参照されたい）への移送、ならびに製剤化および充填を入念に計画するために、非限定的なマルチステップ実施形態が下記に提示される。

【0404】

ステップ1（0日目）では、凍結乾燥された脱凝集腫瘍組織を解凍し、10% F B S と 3000 I U / m L の I L - 2 とを補充した T 細胞培地に 1 : 9 で再浮遊させ、その後、インライン 100 ~ 270 μ m フィルターによる濾過および 50 m L 遠心分離管での遠心分離を行い、その後、20 m L への再浮遊を行う。H L A - A、B、C および C D 58⁺、および D R A Q 7⁻ 細胞の数を定量するために、フローサイトメトリー分析 S O P - のための試料を採取する。

【0405】

次いで、ステップ2では、 $\geq 0.25 \times 10^6 \sim \leq 0.75 \times 10^6$ の H L A - A、B、C ならびに C D 58⁺ および D R A Q 7⁻ 細胞 / m L の細胞浮遊液を、細胞培養容器内の抗生物質と抗真菌剤（アンホテリシン B およびゲンタマイシン）とインターロイキン - 2（I L - 2）1000 I U / m l とを添加した C M - T（10% ウシ胎児血清を補充した T 細胞培地）に播種する。T 細胞を、5日目から C M - T 中で2週間にわたって成長させ、培地の半分を除去し、10% ウシ胎児血清と、アンホテリシン B およびゲンタマイシンと、I L - 2 とを補充した新鮮培地 C M - T と交換する。これを、5日目 ~ 10日目の間、2 / 3 日ごとに繰り返して、細胞を、確実に、 $\leq 0.1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ の C D 45⁺ C D 3⁺ アネキシン - V⁻ ^e D R A Q 7⁻ ^e 細胞 / m L で維持する。P H E u r 2.6.27 による T I L 培養上清の微生物検査試験（5 ~ 7日目）によって微生物成長がないことを確認する。フローサイトメトリー分析（7 ~ 10日目）によって C D 45⁺ C D 3⁺ アネキシン - V⁻ および D R A Q 7⁻ 細胞の濃度を定量する。

【0406】

ステップ3では、F i c o l l（密度 1.078 g / m l）を用いて複数の同種異系ドナー（健康な献血由来のバフィーコート）から 4×10^9 の被照射 P B M C（25 ~ 50 G y）を単離する。フローサイトメトリー分析によって C D 45⁺ アネキシン - V⁻、および D R A Q 7⁻ 細胞を定量する。被照射 P B M C の微生物検定試験によって微生物の成長を判定する。

【0407】

ステップ4では、急速拡大プロセスの開始に利用可能な T I L の量を定量する（12日目）。フローサイトメトリー分析によって C D 45⁺ C D 3⁺ アネキシン - V⁻、および D R A Q 7⁻ 細胞を定量する。

【0408】

ステップ5では、フィーダー（被照射フィコール単離 P B M C）の培養混合物を調製し、3 L の T 細胞混合培地中の成長サプリメントは、密閉静置細胞培養バッグ内の $\geq 3 \sim \leq 5 \times 10^9$ の被照射 P B M C - C D 45⁺ アネキシン - V⁻、および D R A Q 7⁻ 細胞と

、7～9%ヒトAB血清と、2000～4000 IU/mLのIL-2と、20～40 ng/mLのOKT-3抗体とを含有することになる。

【0409】

ステップ6では、フィーダー（被照射フィコール単離PBMC）の培養混合物の代表試料を、TILを添加する前に対照フラスコに採取する。

【0410】

ステップ7では、TILを、REP培養物： $\geq 1 \sim \leq 20 \times 10^6$ の腫瘍由来TIL-CD45⁺CD3⁺アネキシン-V⁻、およびDRAQ7⁻細胞に添加する。

【0411】

ステップ8では、静置培養物を、乾式インキュベーターにおいて3.5～6%二酸化炭素で35～38.5℃の間で6日間インキュベートする。被照射フィーダーが拡大されていないことを保証するために、TILを含まないREP混合物が入っている対照フラスコ（ステップ6で収集した）において14および18日目にCD45⁺アネキシン-V⁻、およびDRAQ7⁻細胞の数および生存率を評定する。フローサイトメトリー分析によってCD45⁺アネキシン-V⁻、およびDRAQ7⁻細胞を定量する。

【0412】

ステップ9では、WAVEバイオリアクターバッグを、7～9%ヒトAB血清と2000～4000 IU/mLのIL-2とを補充した1.7LのTCMで、1～2時間、35～38.5℃で、3.5～6%二酸化炭素で、プレコンディショニングする。

【0413】

ステップ10では、TILをWAVEバイオリアクターシステムに移し、拡大させる。

【0414】

ステップ11では、2000～4000 IU/mLのIL-2を補充した灌流供給1×TCM 10Lバッグを接続する。

【0415】

ステップ12（19～22日目）では、19日目～22日目の間の灌流速度を調整する。

【0416】

ステップ13（24日目）では、灌流を停止し、廃棄および供給の接続を切る。

【0417】

ステップ14では、TILを濃縮し、洗浄する。

【0418】

ステップ15では、総体積平均125～270mL輸注バッグ内の10%DMSOと8.5%HSAとを含有するPBSに浮遊した細胞で最終薬物製剤を作製する。

【0419】

ステップ16では、TILが入っている最終製品バッグの試料を、QCアッセイおよび保持試料用に採取する。作りたての薬物製品のQCアッセイは、微生物検査テストおよび可視粒子テストを含む。保持試料は、細胞用量、生存表現型および効力；微生物検査および内毒素分析のために調製する。

【0420】

ステップ17では、最終製品容器に最終製品ラベルと書いたラベルを貼り、重ねる。

【0421】

ステップ18では、-1℃/分～-60℃/分で凍結させる制御された速度による凍結保存、および $\leq -130^\circ\text{C}$ 保管への移行がある。凍結保存薬物製品のQCアッセイは、qPCRによるマイコプラズマテスト、T細胞用量および生存率テスト、カイネティック比色法LAL試験を使用して測定されるようなエンドトキシンテスト、および抗CD3断片を発現する細胞系との共培養後にCD137⁺、IFN- γ ⁺、TNF α ⁺またはCD107a⁺の組合せについてCD2⁺発現CD45⁺DRAQ7⁻を評定するための効力テストを含む。

10

20

30

40

50

【表 1】

表 1 - 静置培養バッグのみを使用する製造の要旨				
CTU - TIL # (性別)	第 1 の拡大から の腫瘍由来 TIL ($\times 10^7$)	第 2 の拡大にお ける生存 CD3+ 細胞($\times 10^7$)	拡大倍率*	最終結果 生存 CD3+ ($\times 10^{10}$)
1 (F)	2.1	1.5	690	1.0
3 (M)	3.8	2.0	1100	2.2
5 (M)	8.2	1.5	1281	2.0
平均 $\pm$ SD	6.0 $\pm$ 2.2	1.7 $\pm$ 0.23	1023 $\pm$ 303	1.7 $\pm$ 0.52
*- は、REP で使用された最終製造 TIL/TIL				

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2- 灌流バイオリアクターを使用する製造の要旨				
CTU - TIL # (性別)	第 1 の拡大から の腫瘍由来 TIL (x10 ⁷)	第 2 の拡大にお ける生存 CD3+ 細胞(x10 ⁷)	拡大倍率*	最終結果 生存 CD3+ (x10 ¹⁰)
12 (F)	5.4	2.0	1600	3.2
13 (M)	14.0	2.0	1010	2.02
14 (M)	5.8	2.0	2100	4.2
15(M)	5.1	2.0	3100	6.2
16 (M)	3.0	1.8	3000	5.4
19 (M)	7.6	2.0	3400	6.8
20 (M)	1.4	1.1	5409	5.95
21 (F)	1.4	1.4	3646	4.85
27(M)	5.1	2.0	1845	3.69
28 (F)	8.9	2.0	1590	3.18
32 (F)	34.0	2.0	1835	3.67
32 (F)	該当なし**	2.0	1985	3.97
35 (M)	8.6	2.0	3125	6.25
36 (M)	3.2	1.6	2050	3.28
37 (F)	4.0	2.0	1265	2.53
38 (M)	0.55	0.32	3969	1.27
39 (M)	0.83	0.83	1398	1.16
40 (F)	1.4	0.71	7444	5.3
41 (M)	9.0	2.0	1555	3.11
42 (M)	9.8	2.0	1965	3.93
43 (F)	25.0	2.0	2310	4.62
47 (F)	2.67	2.0	1450	2.9
48 (F)	2.73	2.0	1865	3.73
51 (M)	4.1	2.0	1780	3.56
54 (M)	27.5	2.0	395	7.9
57 (M)	2.3	1.5	764	1.13
60 (F)	3.1	1.1	1486	1.56
63 (M)	0.84	0.89	5842	5.24
64 (M)	0.72	0.72	2993	2.14
67 (M)	0.38	0.37	7526	2.82
平均±SD	6.61±8.2	1.56±0.61	2650±1770	3.52±1.69
*- は、REP で使用された最終製造 TIL/TIL				
**- 原発腫瘍由来 TIL を使用して 2 回処置された患者				

【 0 4 2 2 】

本発明は、脱凝集システムまたはデバイスを提供する。一部の実施形態では、脱凝集デバイスは、個々の細胞または細胞凝集塊への組織の脱凝集のための踏付けデバイスの形態のものである。一部の実施形態では、脱凝集デバイスは、脱凝集プロセス中の温度制御を提供する。一部の実施形態では、本発明は、凍結保存システムまたはデバイスを提供する。一部の実施形態では、脱凝集および凍結保存のためのデバイスが提供され、温度制御が提供される。別の態様では、本発明は、本発明の脱凝集／凍結保存システムまたはデバイスでの脱凝集、凍結保存、または脱凝集と凍結保存の両方に適応する１つもしくは複数の可撓性容器、またはそのような１つもしくは複数の可撓性容器を含む複数の容器を含むシ

ステムを提供する。一部の実施形態では、1つもしくは複数の容器、または複数の容器は、相互接続されており、閉鎖系での使用に好適である。上述の態様は、本明細書に添付の特許請求の範囲で示される。本発明の例を提供する下記の詳細な説明を考慮することによって、当業者には本発明のより多くの利点および利益がより容易に明らかになるであろう。

【0423】

ある特定の実施形態では、脱凝集装置は、1つまたは複数の可動面、例えば、プレートおよび／またはパドルを含み、組織試料に圧縮力および剪断力を印加するように設計されている。ある実施形態では、消化装置は、互いに連動して移動することができる、第1の表面と第2の表面を含む。ある特定の実施形態では、これらの表面は、試料に圧力を印加するように配置された対向面である。ある実施形態では、表面の少なくとも1つは、試料に圧力を印加するためにその表面の方向に対して垂直の方向に動かされる。ある実施形態では、表面は、平行に配列されており、試料を周期的に表面間で繰り返し圧縮して緩和するために反復的にまたは周期的に一緒に移動し、離れていくように設計されている。本発明の実施形態では、試料の圧縮および緩和は、試料内に剪断力を生じさせる。

10

【0424】

ある実施形態では、第1および第2の表面の一方は、静止状態で保持されるが、他方の表面は、動かされる。別の実施形態では、第1の表面と第2の表面の両方が動かされる。ある実施形態では、組織試料は、可撓性および／または弾性容器内に収容され、この容器は、組織試料および必要に応じて脱凝集液または溶液を収容する。ある特定の実施形態では、容器は、表面が移動するにつれての第1の表面と第2の表面の間の体積の変化に対応する。ある特定の実施形態では、容器は、弾性であり、組織試料および脱凝集液を対向面の及ぶ範囲内に閉じ込める。ある特定の実施形態では、容器は、可撓性であり、周囲の空気圧が、対向面の及ぶ範囲内への組織試料および脱凝集液の閉じ込めを支援する。ある特定の実施形態では、空気圧は、周囲圧力である。ある特定の実施形態では、空気圧が封入チャンバーに印加され、この圧力は、周囲圧力より大きい。

20

【0425】

ある特定の実施形態 (embodiments) では、脱凝集デバイスは、並んで配置された、対向面の2つまたはそれより多くのセットを含む。一部のそのような実施形態では、1つの表面は、セットに共通であり、例えば、必要に応じて静止状態で保持された、単一のプレートであるが、各セットの第2の表面は、並んで位置し、その静止面に圧力を印加する。第2の表面は、踏む動きで圧力を交互に印加することができる。ある特定のそのような実施形態では、容器の内容物が移動面の間を行きつ戻りつ流れられるようにしつつ静止面と移動面の間の空間内に組織試料および脱凝集液を閉じ込める、可撓性容器が利用される。ある特定の実施形態では、容器は、内容物のそのような行きつ戻りつの移動を制限または防止するように適合される。ある実施形態では、容器を横断するシールが、一方の側から他の側へ内容物の流れを遮断する。別の実施形態では、容器を横断するバッフルが、一方の側から他の側へ内容物の流れを制限する。

30

【0426】

踏面を任意の好適な機構により作動させることができる。可撓性容器に対して踏面を交互に動かすように設計された水平パーシシステムの一例が、デバイス100として本明細書で開示される。踏面は、ばねが付いており、ばねは、容器の厚みの変動および容器内での粒径変動を許容しつつ踏面を容器に押し付けるように設計されている。ある特定の実施形態では、ばねは、予荷重がかけられる。2つの踏面を特徴とするカムを作動設計の一例も、デバイス200として本明細書で開示される。デバイス200では、予荷重をかけられたばねが、踏面を可撓性容器に押し付け、カム機構が、一方の踏面、次いで他方の踏面を周期的に押し上げ、可撓性容器から遠ざける。別の実施形態では、1つまたは複数のロッカーアームまたはレバーが、踏面を持ち上げて容器から遠ざける。さらに別の実施形態では、踏面は、油圧によって上昇および下降される。さらに別の実施形態では、踏面は、空気圧によって上昇および下降される。200デバイスでは、脱凝集容器と交互に接触する

40

50

2つの踏面があるが、ある特定の実施形態では、作動機構によって、移動面の全てが、システムが静止しているときを含めて、同時に圧力を印加することが可能である。そのような特徴は、脱凝集プロセスの終了時に脱凝集容器の内容物を空にするのに有用である。例えば、踏面が、中間ピストンに位置するのでも、1つが上昇され、1つが下降されるのでもなく、全ての踏面が、脱凝集容器に対して下降され、その結果、その内容物が、付属チューブを通して絞り出され、必要に応じて濾過されて第2の受け容器、例えば、凍結保存容器に入る。

【0427】

本明細書で例示される完全密閉脱凝集および凍結保存システムには、特徴的な自動化脱凝集があり、これに、手動濾過、そしてシリンジおよびチューブの密封システムによる凍結保存容器への移送、そして自動化凍結保存が続く。有利には、脱凝集腫瘍組織は、脱凝集容器から凍結保存容器へと手動で移されるが、脱凝集および凍結保存ステップは、両方のステップを逐次的に管理するようにプログラムされた同じ自動化デバイスによって行われる。他の実施形態では、脱凝集手順は、終了時に脱凝集腫瘍組織が脱凝集容器から凍結保存容器へと自動的に移動されるように、設計される。ある特定の実施形態では、接続管と接触する蠕動ポンプおよび弁が、内容物の流れを制御する。ある特定の実施形態では、脱凝集装置の踏面は、弁が内容物の流れを制御して、脱凝集腫瘍溶液が脱凝集容器から、必要に応じてフィルターを通して、凍結保存容器へ押し出されるまたは絞り出されるように配置される。そのような実施形態では、閉鎖系での材料の任意の移送とともに脱凝集および凍結保存は、好ましくは、同じデバイスにより本明細書で例示されるように制御され、行われる。

【0428】

いくつかの脱凝集システムは、力、消化時間、および速度（RPMまたはサイクル毎分）を含む変数に関して試験され、最適化されている。いくつかの組織型を使用する結果および予測は、最大60Nおよびそれを超える力、最大60分およびそれを超える消化時間、ならびに最大240RPMおよびそれを超える速度を含む、力、時間および速度変数の組合せについて判定された。本発明のある特定の実施形態では、力は、20～200N、または30～120N、または30～90N、または40～60N、または10～20N、または20～30N、または30～40N、または40～50N、または40～45N、または45～50N、または50～55N、または55～60N、または60～65N、または65～70N、または70～75N、または75～80Nである。典型的な踏足部は、表面積約20～50cm²である。30cm²の踏面に基づき、踏圧は、0.5～6.5N/cm²、または1～4N/cm²、または1～3N/cm²、または1～2N/cm²、または1.5～2.5N/cm²、または2～3N/cm²、または2.5～3.5N/cm²、または1.5N/cm²±0.5N/cm²、または2N/cm²±0.5N/cm²、または2.5N/cm²±0.5N/cm²、または3N/cm²±0.5N/cm²、または4N/cm²±0.5N/cm²、または5N/cm²±0.5N/cm²である。呼び圧力は、圧力センサーを使用して、好ましくは、脱凝集容器の厚みについて補正して、測定され得る。ある特定の実施形態では、脱凝集デバイスは、圧力センサーを含む。本発明のある特定の実施形態では、消化時間は、90分もしくはそれ未満、または75分もしくはそれ未満、または60分もしくはそれ未満、または50分もしくはそれ未満、または5～120分、または15～100分、または30～90分、または40～60分、または5～10分、または10～20分、または20～30分、または30～40分、または40～45分、または45～50分、または50～60分、または60～65分、または65～70分、または40分±5分、または45分±5分、または50分±5分、または55分±5分、または60分±5分、または65分±5分、または70分±5分である。ある特定の実施形態では、脱凝集デバイスは、60～360RPM、または120～340RPM、または180～300RPM、または210～270RPM、80～160RPM、または120～200RPM、または160～240RPM、または200～280RPM、または240～320RPM、または280～360

RPM、または60RPM±20RPM、または80RPM±20RPM、または100RPM±20RPM、または120RPM±20RPM、または140RPM±20RPM、または160RPM±20RPM、または180RPM±20RPM、または200RPM±20RPM、または220RPM±20RPM、または240RPM±20RPM、または260RPM±20RPM、または280RPM±20RPM、または300RPM±20RPM、または320RPM±20RPM、または340RPM±20RPM、または360RPM±20RPMで動作する。

【0429】

ある特定の実施形態では、物理的脱凝集は、連続的である。ある特定の実施形態では、物理的脱凝集は、断続的または時折である。例えば、温度上昇が脱凝集試料において観察された場合、温度上昇を低減もしくは防止するために、または温度を設定点と平衡させるために、物理的脱凝集を短時間減速または停止させることは有利であり得る。理論により拘束されるものではないが、温度上昇は、脱凝集デバイスによる試料の物理的操作、デバイスの能動的な踏付け機構からの熱伝達、脱凝集プロセスが稼働しているときの試料から冷蔵ユニットへの物理的接触もしくは熱伝達の低減、または他の理由によって起こり得る。ある特定の実施形態では、断続的なまたは時折の脱凝集は、脱凝集デバイスに有益であり得る。本明細書に記載の、カム駆動デバイスでは、カムの回転方向を、時々、断続的に逆転させ、ひいては、カムの両側に摩耗を分散させることによってカムの寿命を延長することにより、カム機構の余命を延ばすことができる。本発明の実施形態では、物理的脱凝集の稼働期間としては、限定ではないが、15～30秒、20～40秒、30～60秒、45～75秒、60～90秒、少なくとも20秒、少なくとも30秒、少なくとも40秒、少なくとも1分、少なくとも1.5分、または少なくとも2分が、挙げられる。非稼働継続期間は、これらに限定されないが、1～10秒、10～20秒、20～30秒、30～40秒、40～60秒、5秒、10秒、20秒、30秒、40秒、60秒、90秒、120秒、またはこれらの間の継続期間であり得る。非稼働継続期間は、脱凝集デバイスが180度転換するのに必要であるほどの短い期間であることもある。

【0430】

一部の実施形態では、表面は、互いに対して横方向に移動するように配置された対向面である。ある特定のそのような実施形態では、横方向の動きは、直線的な横方向の動きを含む。ある特定のそのような実施形態では、横方向の動きは、環状の横方向の動きを含む。ある特定の実施形態では、直線的な横方向の動きと環状の横方向の動きの両方がある。

【0431】

ある実施形態では、対向面は、平坦である。ある実施形態では、表面のうちの少なくとも1つは、凸領域を含み、他方の面に対して揺動しながら移動するように配置される。凸面および揺動の1つの態様は、蠕動様動作をもたらすことである。

【0432】

本発明によれば、表面の移動は制御され、そのような制御は、速度、試料圧縮、システム圧、継続期間、およびサイクル頻度を含むがこれらに限定されない、表面移動の1つまたは複数の態様の制御を含む。ある特定の実施形態では、プレート移動の1つまたは複数の態様は、一定している。ある特定の実施形態では、プレート移動の1つまたは複数の態様は、脱凝集の状態に依存する。ある特定の実施形態では、脱凝集の状態は、例えば、1つまたは複数の予め定義されたステージ、例えば、初期、中期、後期、または時間、分および秒で測定されたより正確な期間などの、脱凝集手順の時期により定義される。ある特定の実施形態では、脱凝集の状態は、腫瘍片のサイズ分布により定義される。例えば、本発明のある実施形態では、圧力は、腫瘍片のサイズが低減されるにつれて上昇する。

【0433】

脱凝集デバイスの例および代替案

【0434】

図41を参照して、閉鎖された、少なくとも最初は無菌の、概して平坦な側面を有する、比較的薄い、試料容器バッグ10の中の、個々の細胞または細胞凝集塊への組織の脱凝

集のための、踏付けデバイス100が、示されている。デバイスは、制御された温度速度変化フリーザー、解凍器または保温器、例えば、Via Freeze（商標）として公知の市販のフリーザー、または図41に概略的に示され、本明細書で一般にフリーザー40と記載される、制御された速度の温度変化をもたらす任意の他のデバイスなどの、温度制御されたデバイスに除去可能に挿入され得る部品の組み立てから形成された筐体110を含む。実際には、筐体は、例示されていないが、カバーを含むことになる。使用中、デバイスおよびバッグは、組織、例えば、摘除腫瘍、摘除腫瘍の部分、または針生検試料を脱凝集させるための、そしてその後、得られた細胞浮遊液をバッグ10から脱凝集試料を移す必要なく後続の分析のために凍結保存するための、閉鎖系を提供する。

【0435】

筐体110は、10～300rpmの出力速度を有する電気モーターおよびギアボックスを含むモーターユニット114が取り付けられている、シャーシ112を有する。モーターおよびギアボックスの出力軸114は、クランク116を有し、このクランクは、連接棒118を駆動し、そしてまたこの連接棒は、踏付け機構120に巡回可能に接続されており、この機構は、クランク116の回転ごとに1の踏付けサイクル、すなわち0.2～6秒の間の踏付けサイクル、によって動かされることになる。より詳細には、この踏付け機構は、2本の対向する平行な水平バー126および128をそれぞれ巡回可能に取り付けるシャーシ112に強固に取り付けられた2つの離間している巡回軸122および124を含む、平行四辺形の4本のバーの連結部を有する。水平バーの各々は、これらに、平行四辺形の連結部と一緒に形成する巡回軸122および124の両側で1カ所ずつ巡回可能に接続されている、2本の平行な踏付けバー130および132を有する。連接棒118は、好都合に上部水平バーの伸長部に巡回可能に保持されており、したがって、その伸長部の移動によって踏付けバー130および132の周期的な上下動（示されている向きの）が生じる。踏付けバー130および132の各々に足部アセンブリー134および136が接続されており、これらの足部アセンブリーは、上述の周期的な動きによって、クランク116の動きに伴って逐次的に上下動することになる、すなわち、一方の足部が上がると他方は下がることになり、逆に、一方の足部が下がるると他方が上がることになる。

【0436】

足部アセンブリー134および136は各々、平坦面を有するソールプレート138および140を含み、各々のプレートは、金属製コイルばね146によって、上方足部枠142および144にそれぞればねで取り付けられている。上で説明された構成、または使用される場合には等価の構成で、ばね146に予荷重がかけられる。この場合、合わせた予荷重は、好ましくは40～80N、より好ましくは30～70N、足部ごとに好ましくは約60Nである。合わせたばね定数は、移動のmm当たり1～5N、好ましくはmm当たり約3Nであり、意図される足部移動は、約8～12mm、好ましくは約10mmである。加えて、各足部の表面積は、約20～50cm²、好ましくは約35cm²であるように意図される。これは、バッグに対してゼロ（足部がバッグから離昇したとき、または実質的に荷重がない場合）～最大約6N/cm²（約9psi）の間の想定圧力をもたらす。好ましい想定圧力は、約2N/cm²（約3psi）である。しかし、バッグが、踏付けプロセスの少なくとも開始時に、均質な材料を含有し得ないことを考えると、材料の凝集塊が存在することになり、加えられる力がそこに集中されることになるため、この圧力は、「想定（の）」と記述され、これは、例えば、踏付けプロセスの終わり頃にバッグ10の最小耐圧性を提供するために、理想状況である。

【0437】

シャーシの底部に、可撓性バッグ10の受入エリア148があり、受入エリア148に伝熱プレート150が隣接している。エリア148は、シャーシの前方（図41に示されている前方）経路でプレート150上へと摺動可能な試料処理バッグ10を受け入れるのに十分な大きさである。プレートは、バッグ10が載る上面151と、使用中に外部から影響を受ける加熱または冷却のために露出されている下面152とを含む。上面151は

10

20

30

40

50

、各足部のソールプレート138および140と概して平行であり、したがって、ソールプレートは、表面151に概して平行に移動する。言い換えれば、平坦なソールプレートは、表面151に対して概して垂直方向に移動し、これによって、機構120に対する有意な横力が防止される。プレート150は、金属、好ましくは、アルミニウムもしくは銅もしくは金もしくは銀、またはこれらの金属を含有する合金から形成される。熱コンダクタンスは、摂氏20度で測定して、好ましくは100W/mKより上、より好ましくは200W/mKより上である。プレート150の材料の厚みは、約3mmまたはそれ未満であり、プレートの反対側での温度変化に従うために低い熱質量、したがってバッグ10の内容物のより迅速な反応をもたらす。

【0438】

さらに図42および43を参照して、矢印Cにより示されているようにこの例では時計回りに、クランク116を駆動するために、デバイスは、モーターユニット114に電流を供給することにより操作される。このクランクが接続棒118に、上で説明された踏付け機構120を操作させる。最大の力を機構120に印加するクランクのストロークの上部および下部が足部アセンブリー134および136の最下位置と一致することに留意されたい。足部アセンブリーは、矢印UおよびDの方向に上下に移動して、試料バッグ10を連続的に揉み、したがって、バッグ10の内容物には、それぞれの踏足部から離れて片側に移動する可能性がある。バッグ内の潜在的の固形の組織試料は、踏足部から離れることができるので、また各々の足部のソールプレート138および140には、ばね荷重がかけられており、それらが、それらのストロークの下部にあるときであっても足部へのさらなる弾力的移動がもたらされるため、その結果、より大きい組織塊を脱凝集することが意図される場合に機構が動かなくなる可能性が低い。逐次的踏付け動作は、バッグ10が破裂する可能性も低くする。

【0439】

図44は、上で説明されたデバイス100の平面図であるが、この図には所定の位置にバッグ10がない。具体的には、足部アセンブリー134および136の相対的に隣り合う位置が見られ、これらは、間隔が空いており、図に見られる共有面積を有し、この面積は、平らに置いた場合のバッグ10の面積にほぼ等しいが、バッグ10の面積のプラスまたはマイナス約10%の面積の差には有用性がある。

【0440】

図45は、デバイス100'の別の平面図を示すものであり、これは、上で説明されたデバイス100と構造の点では同様であるが、この代替案では、モーターユニット114のモーター113は、90度ギアボックス115の使用により、そのギアボックス115の出力軸に対して横方向に配置されており、したがって、モーター113は、デバイス100'の後壁111を越えて突き出していない。したがって、このデバイス100'は、必要に応じて、より小さいフリーザー体積に収まり得る。

【0441】

上述の脱凝集処理中に、足部アセンブリー134および136により加えられる力に伝熱プレート150が反応する。これは、試料バッグ10が、処理中にプレート150の接触面151に押し付けられ、それによって、試料バッグ10とプレートの表面151の間の良好な表面接触が得られ、その結果として、熱エネルギー伝達の改善が得られることになることを意味する。

【0442】

図46、47および48は、上述の可撓性試料バッグ10の異なる実施形態を示す。使用されているバッグは、デバイス100または100'における受入エリア148内の位置へと摺動され、述べられた2つの足部134および136の下に着座する。したがって、バッグは、その中に組織試料を収めるために多少の追加の伸展性がある、約12mm以下の厚さの、概して平坦な構造を有する。図46から明らかなように、2層のプラスチック材料から形成され、それらの外縁14のみが、中央キャビティー12とキャビティー12への進入のためのポート16とを形成するために密封されている、バッグ10の1つの

構造が示されている。バッグは、EVAから形成され得る。使用に当たって、口16、またはそれらのうちの少なくとも1つは、必要に応じて小片に刻まれてシリンジによってバッグキャビティー12に入れられた試料を受け入れるのに十分なほど大きい、すなわち、直径約10mmであるかまたはそれより大きいことが、好ましい。しかし、大きい組織試料をバッグの中に入れることができ、そしてその後、バッグが再密封されるような、いわゆる「ジップロック」進入手段を口の反対側のバッグの末端に含むことも可能である。「ジップロック」を1回または複数回、折り重ねて、継ぎ目を弾力性のあるチャンネルの内部に折り畳まれた状態にすることができ、または別のクランプ（単数もしくは複数）（図示なし）によって漏出の可能性を低下させることができる。バッグ10を、代案として、開口し、組織を添加することができる。次いで、適所にその内容物があるバッグをヒートシールすることができる。バッグ10は、使用に当たってバッグをデバイス内に配置し、処置中にそれを適所に保持するために、角の開口部（corner apertures）18を含む。図面は、1つのキャビティー12を有するバッグ10を示すが、1つより多くのキャビティー、例えば、2、3、4または5つのキャビティーを有するバッグであって、例えば、複数のキャビティーの各々が、細長いものであり、最初は開口しているヒートシール可能な端部を有し、そのもう一方の端部に、脱凝集用酵素などの試薬の導入のための、および脱凝集が完了または実質的に完了した時点で脱凝集試料を取り出すための、密封可能な口を有する、バッグを提供することが可能であろう。

10

【0443】

図47は、位置決め枠20における角の開口部18に収まる、枠の上に留めくぎ24によって取り付けられた図46のバッグ10を示す。フレーム20は、デバイス100/100'内の適所にバッグ10を配置し、そこに保持する代替法である。枠20は、処置中にバッグを適所に配置し、そこに保持するためのデバイスと共働する、位置決め穴22を含む。この枠は、使用にキャビティー12ならびに踏足部134および136に対応するために、内側が開いている窓26と平滑な丸められた内縁23を有する。枠20は、バッグ10のデバイス100/100'へのローディングおよびそこからのアンローディングをより容易にする。

20

【0444】

図48は、各々が枠20の構造に似ている2つの概して対称な弁を有する、代替枠20'を示す。各々の枠の半分は、2つの弁がハマグリの貝殻のように一体となってバッグ10を包むように枠20'に成形された可撓性外殻30をさらに有する。上部および下部可撓性外殻は、バッグ10が使用中に内部で破裂した場合、堤防として機能する。この特徴は、特に、感染性組織試料に有用である。

30

【0445】

さらに別の代替案である、示されていない、単純なバッグインバッグ構成を、漏出物を収容するために利用することができるだろう。さらに別の代替案では、バッグは、例えば、下で説明するような凍結後に、全試料を使用せずに試料のアリコートを取り出すことができるように、弾力性のある（少なくとも室温で）別個の壁を有する基部を含むことができる。あるいは、密封可能なバッグをさらにヒートシールして、試料の分離を可能にするための複数の部分を作ることができる。

40

【0446】

バッグ10に入れられる試料の処理は、一例では、WO2018/130845に記載されているステップに主として準拠し得る。この構成では、組織を収容しているシールバッグ10は、口16経由でバッグ内に導入される組織の分解を加速させるために、コラーゲンおよびプロテアーゼなどの消化酵素を含有し得る水溶液中に吊される。バッグは、ここではプレート150上に置かれ、組織消化速度を加速させるために、例えば外部熱源から、およそ35°Cに温められる。1つの重要な相違は、単一の試料処理バッグが利用され、消化酵素が、脱凝集前または中にバッグ内に口16のうちの1つを経由して導入され得る点である。伝熱プレート150を使用して、プレートをその下面で加熱することによりバッグに熱エネルギーを導入して、酵素作用に望ましい温度をバッグ内にもたらすこ

50

とができる。その熱は、好都合には、電氣的に加熱された加熱プレートによってもたらされることもあり、またはプレート150内若しくは上の電気加熱要素によってもたらされることもある。脱凝集作用の量は、非常に多くのパラメータ、例えば、初期組織試料のサイズ、密度および弾性に依存することになり、そのため、脱凝集の時間および踏付け速度が有意に異なることになる。長すぎるまたは過度に激しい踏付けは、細胞生存率の低下をもたらすこともあり得る。したがって、モーターユニットの速度および脱凝集の期間は重要である。この問題に対処するための1つの選択肢は、同様の試料を脱凝集するために必要とされる時間および出力速度を含む、ルックアップテーブルに従って処理の時間を調整することである。別の選択肢は、脱凝集処理を行うために必要とされる瞬間電力もしくは電気エネルギーを経時的に測定すること、またはこの機構のプレート (pate) 150もしくは別の部分に加えられる力または応力を測定し、所定の閾値に達した後、停止し、試料が十分に脱凝集されていることを示すことである。パワー／力／応力が低下するほど、脱凝集は、より完了に近くなる。別の選択肢は、バッグによる光吸収度を測定することである。吸収度が大きいほど、試料が完全な脱凝集に近い。脱凝集が完了したら、バッグの内容物を移すことができ、目的の細胞または他の構成物を分離し、デバイス100／100'における凍結のために未使用のバッグに入れ直すことができる。あるいは、および好ましくは、脱凝集材料全体を凍結用のバッグまたはデバイス内に放置することができる。凍結保存物質は、口16を通してバッグに導入される。

10

【0447】

本発明の方法論とWO2018／130845に記載されているものとの別の相違は、凍結保護物質が導入されたら、バッグ内の脱凝集試料および凍結保護物質がデバイスに取り付けられ（またはその中に残存し）、デバイス全体が、上で説明されたようなフリーザー40内に載置されることである。フリーザーの基部は、低温であり、そのためバッグ10から熱エネルギーを伝熱プレート150経由で吸い取る。バッグが冷却されている間、氷の形成を制御し、試料の過冷却を防止するために、それを、足部134および136によって脱凝集の速度より遅い速度ではあるが上で説明された方法で揉んで、氷核生成を制御することができ、そのため解凍後の細胞の生存率を上昇させることができる。電気エネルギーをモーターユニット114に導線によって供給して、フリーザー、例えばフリーザー40（図41）、内の機構120の動きを維持することができる。

20

【0448】

デバイスは、フリーザーから取り外し可能であるので、使用後の清浄化を容易に行うことができる。

30

【0449】

使用のために必要とされる場合、バッグ10内の凍結された脱凝集試料を、デバイス100／100'において、プレート150のさらなる外部加熱により、および／または約37℃で維持された温水浴にデバイス100／100'を部分的に浸漬することにより、急速に解凍し、凍結保護物質を除去することができる。いずれの場合にも、バッグを回答中に揉むことができる。酵素が依然として存在する場合、必要に応じてそれらも、例えば濾過によって、除去することができる。一般に、それらの作用は低温で停止されるため、それらは、凍結保存中に細胞に対してほとんどまたは全く影響を与えないであろう。全てのプロセス操作、加温、脱凝集、冷却、凍結そしてその後の解凍は、同じ密封可撓性バッグ10内の試料で行われ、単一でデバイスで行われ得る。これは、時間および空間効率がいよばかりでなく、単一の記録による、処理中に試料に起こったあらゆること、例えば、温度、継続期間、脱凝集速度、凍結プロトコール、の収集を可能にもし、処理マシン間の無制御環境で過度の時間を費やす試料などの、エラーが起こる可能性を低下もさせる。

40

【0450】

組織試料処理および凍結に使用される装置および技法のより具体的な例が、下で与えられる。

【0451】

図49は、EVAまたはPVGフィルムなどの熱可塑性材料から形成されたバッグ10

50

であって、組織試料を受け入れるための開口部 11 を有するバッグ 10 の例を示す。バッグは、1 つまたは複数の口 16 (図 46) に取り付けられたチューブ 13 を含み、このチューブは、1 つまたは複数の分岐部 17、圧縮弁 19、および標準的なルアー型の継手 15 を含む。示されている単一チューブラインは、単に例示的なものである。バッグ 10 は、複数の口 16 を介して接続された追加の平行チューブを含むことがある。

【0452】

組織 T が、バッグ 10 の内部に入ったら、開口部 11 を、図 50 に密閉および密封して示されており、同じ図に一点鎖線で開放して示されている、機械的に締め付けるシール 9 により、および／または図 51a に示されているようなヒートシーリングマシン 50 を使用してヒートシーリングによって密封して、ヒートシールされた閉鎖ストリップ (例えば、複数の平行ストリップ) 8 を生じさせることができ、各々の方法によって密封されたキャビティー 12 (図 46、47 および 49) が形成される。

【0453】

バッグ 10 を密封するための代替手段または追加の手段が、図 51b および 51c に示されている。図 51c に示されているように、シール 8 におけるヒートシーリング後のバッグ 10 を、2 つのクランプ 60 で締め付けることができ、このクランプは、一對のねじ 66 によって強制的に一緒にされる上部バー 62 および下部バー 64 を含む。図 51b は、分解組立図で表された状態でのクランプ 60 を示すが、使用に当たってねじ 66 は、バッグ 10 の挿入の前に残りのクランプから完全に除去する必要はない。上部バー 62 は、締め付けられたときに相補的な V 字形の形成物 61 が収まるテーパ凹部 68 を有する。凹部および V 字形のものは、V 字形のもの 65 の頂端に締付力を集中させ、その結果、平坦な締付面によって達成され得るものより高度な締付力を頂端にもたらす。さらにいっそう大きい締付力のために、頂端 65 は、その先端に小さいチャンネル 67 を有し、使用中に、上部バーにおける相補的な山形の形成物 69 がこのチャンネルに対応する。ある特定の実施形態では、力は、ヒートシール 8 の必要性を打ち消すのに十分なものである。ある特定の実施形態では、ヒートシールまたは他のバッグ密封機構は、例えば、試料を収容しているバッグを脱凝集装置の外側で取り扱うことに備えるために、望ましい。ある特定の実施形態では、締付デバイスは、シールの完全性を確実にする。締付力は、容易に曲がらず、そのためねじ 66 により加えられる締付力を維持する上部および下部バーの厚みおよび剛性によって、さらに強化される。図 51c は、締付状態のクランプ 60 を示す。突出部 63 は、踏付けデバイス 100 / 100' または 200 (下で説明される通り) の、クランプの移動を抑制し、その結果として、締め付けられたバッグ 10 の踏付け中の移動を抑制する特徴をもたらす。クランプ 60 の外周および高さは、試料受入エリア 148 (または 248、図 62、以下参照) の相補的部分に合う、そのため、踏付け中に締め付けられているバッグ 10 のさらなる場所を提供する、サイズおよび形状のものである。例示されていないが、クランプ 60 は、図 47 および 48 に示されているような追加の枠 20、20' も含むことができ、その結果、クランプは、枠の一端に強固に取り付けられ、口 16 (図 46 および 49) は、枠の他端で支持される。

【0454】

図 52 を参照して、使用に当たって、密封すると、消化酵素 E を、キャビティー 12 にチューブ 13 経由で、例えば、分岐接続部 17 に取り付けられたシリンジ 5 を使用してバッグに酵素を注射することにより、導入することができる。直立方向でバッグ内に保持することにより、次いで、図 53 に示されているようにシリンジ 5 のピストンを引くことにより、空気をキャビティー 12 から除去することができる。酵素 E と組織 T の最初の混合は、図 54 に示されているように手で行うことができる。

【0455】

次いで、脱凝集用の踏付けデバイス 100 へのバッグ 10 のローディングを、図 55 に例示されているように、枠 20 / 20' およびバインディング (bundling) カバー 30 ありまたはなしで開始することができる。

【0456】

次いで、脱凝集プロセスが、上で説明されたように行われる。完了したら、これには、数分～数時間の間、例えば、およそ10分～7時間、好ましくは40分～1時間かかり得るが、脱凝集された液化試料を、例えば、上で説明されたバッグセット、および分岐部17に接続された、図56に示されているような追加の試料アリコートバッグ7を使用して、アリコートにさらに分割することができる。その事例では、シリンジ5は、バッグ10から矢印Fの方向に液化試料を引き出すために使用され、弁19aおよび19bは、開口しており、試料アリコートバッグ7に隣接する弁19cは、閉鎖されている。十分な試料がシリンジ5に取り出されたら、弁19bは閉鎖され、弁19aは開口したままであり、弁19cは開口される。次いで、シリンジは、液体を図57における矢印F方向で、試料アリコートバッグ7に押し込むために使用される。アリコートバッグ7のチューブ13をクランプヒートシールマシン55によってヒートシールすることができ、図58に示すことができる。そのプロセスを、十分なアリコートが得られるまで、または各区画の密封を行うようために既に部分的に分割されていることもあるバッグに残っている試料がなくなるまで、繰り返すことができる。

10

20

30

40

50

【0457】

上で説明されたように、試料バッグ10は、踏付けデバイス100（図55）内に残存することがあり、その場合、踏付けデバイスを制御された速度の温度変化デバイス、この場合は図59に示されているようなフリーザー40、にローディングすることができる。その技法は、踏付けを凍結中に継続させて氷晶形成を抑制するが、実施には、バッグ10を凍結前に除去することができ、その結果、フリーザー40は、踏付け中に伝熱プレートによって試料を冷却するためにだけ働く。代替案では、アリコート試料バッグ7は、試料バッグ10全体に取って代わり得る。別の代替案では、フリーザー40を使用して、図60に示されているように、フリーザー40の頂部に踏付けデバイス100を取り付け、その蓋を開けて基部150を冷却することによって、未処理または処理試料を摂氏おおよそ4度へと穏やかに冷却することができる。別の代替案では、基部150を除去し、それを、図61に示されているような適所にフリーザー蓋があるフリーザーに入れることが可能である。示されていないが、さらに別の代替案では、バッグ10、または7を、フリーザー40で直接凍結することができる。

【0458】

本発明を、上記の実施形態により限定されると見なすべきでなく、当業者には容易にわかるように添付の特許請求の範囲に記載の範囲内で変えることができる。例えば、上記の踏付け機構は、摺動面より低温条件で動かなくなる可能性の低い完全旋回式の機械的相互接続をもたらすため、好ましいが、この機構は、2つまたはそれより多くの足部の逐次的な踏付けのための任意の機械的に等価の手段に置き換えることができる。記載の平坦な足部を、踏む動きが上下ではなく左右であるローラー足部と交換することができる。記載の踏付け、またはその機械的等価事物は、好ましくは、脱凝集の最適化および細胞回収率の最大化のために足ごとに毎秒2または3回の踏付けの速度であり、一定した踏付けであるが、踏付けは、異なる細胞型については、より速くてもよく、またはより遅くてもよく、または断続的であってもよい。

【0459】

デバイス100／100'は、フリーザー内に置かれ、極低温（例えば、摂氏マイナス80度またはそれ未満）にさらされるように意図されているので、金属部品の使用、特に、ばね146のようなものの使用は、高分子部分が低温でよりいっそう剛性になるので、好ましい。また、ピストンおよびシリンダーのような、ぴったり合う部品は、極低温では、固定されて動かなくなることもまたはぴったり合わなくなることがあるため、記載の機構120のような単純な旋回可能な連結が好ましい。

【0460】

図62、63および64は、上で説明されたデバイス100とサイズおよび機能の点で同様である、代替踏付けデバイス200を示す。デバイス200は、下でより詳細に説明される、ある特定の相違を有する。

【0461】

図62を参照して、デバイス100とデバイス200との主な相違は、デバイス200が、デバイス100の機構120とは異なる踏付け機構220を有することである。踏む動きの速度をモニターし制御するコントローラ221（図63）にフィードバックを返す回転エンコーダーを有する電気モーターユニット214の一部である24ボルトDC電気モーター213（図63）による図42および43に示されている動きと同様の周期的な交互の踏む動きで駆動される2つの踏足部234、236。モーターは、歯付きベルト222によってカム軸224を駆動する。カム軸は、180度で相殺される一対のカム230、232を含み、この事例では、各々は、カム従動子の単純な調和した動きをもたらすようなサイクロイド形で輪郭が描かれている。各カムは、カム従動子アセンブリーを動かすことができ、このアセンブリーは、カムの輪郭に乗っている付随するエラストマー製従動輪225、227、ばね付きの従動キャリッジ226、228と力伝達関係にある従動輪軸221、223を含む。各キャリッジ226、228は、リニアガイド229内を摺動し、それぞれの足部234、236は、キャリッジに接続されている。その結果として、各アセンブリーは、それぞれのカムがモーターにより戻しばね231の付勢力に対して回転されると、カムの輪郭に乗って足部と一緒に踏付け状態から離れるので、従動輪のそれぞれ1つによって押し上げられる。カムがさらに回転され、カム輪郭が後退すると、各従動子アセンブリーに付随するばね231は、踏力に伴ってアセンブリーおよび足部を押し下げる。

10

【0462】

20

そのため、踏力は、付随する従動子アセンブリーばね231のばね定数に限定され、駆動モーターのパワーに限定されない。1. バッグに印加された力は、使用中は、機構が足部を上昇させ、ばねがそれらを押戻すため、バネにより制限される。これは、以下のことを確実にするようにする：

【0463】

- a. モーターは停止し得ない（腫瘍サイズまたはテクスチャーに関係なく）；

【0464】

- b. 試料は過剰な力で圧縮されず、バッグは裂けることにならない；

【0465】

- c. バッグに印加される最大圧力は、バッグ製造中に試験される圧力より低い；および

30

【0466】

d. 下で説明されるように、ヒンジで連結されたバッグ受入エリア248は、必ずしも足部を事前に配置しなくても、使用される試料バッグおよび任意のクランプを受け入れることができる。言い換えると、足部は、バッグを受け取るときにいずれの位置にあってもよい。なぜなら、ヒンジで連結された試料エリア248は、足部に対して閉鎖されており、そのとき、必要に応じて、ヒンジで連結されたエリアが足部に対して閉鎖されたままで任意の試料を足部により圧縮することができるからである。

【0467】

図63および64も参照して、デバイス200は、2つの足部234、236の上部にデバイス筐体210から伸びる可撓性封止膜241をさらに含み、この膜は、足部のソールと踏付け機構220の残部との間に流体抵抗性およびダストシールを提供する。この構成は、万一バッグが稼働中に裂けた場合、機構の夾雑を抑制する。膜241は好ましいが、足部は、膜220とバッグエリア248とを分け、機構の夾雑の同様の抑制を、それが万一必要とされた場合に達成する、パーティションに取り付けられたリップ付きシールなどの、シール内を摺動し得る。

40

【0468】

デバイス200は、伝熱プレート150と同じ機能を果たす伝熱プレート250をさらに含む。しかし、このプレート250は、踏み付けられるバッグ（図46、47および48に示されているような）の挿入および除去をより容易にするために、ハウジングの片側にヒンジ255で連結されている（図64）。伝熱プレート250は、温度センサー25

50

6をさらに含み、この温度センサーによって、プレート250およびバッグ受け取りエリア248をコントローラーにより品質管理のためにモニターおよび記録することが可能になる。プレート250は、上で説明された表面151および152と同じ機能を有する第1および第2の表面251および252を有する。

【0469】

各足部は、デバイス200の伝熱プレート250に対して高の調整が可能であり、移動の表示は、コントローラーによってもモニターされる。したがって、たとえ回転エンコーダーが、モーターが回転していることを示すことがあったとしても、それにもかかわらず、歯付きベルト222の故障などの機械の故障が、コントローラーにより検出されることがあり、警報を発することなどの好適な動作が実行され得る。

【0470】

デバイス200は、デバイス100と同じ外形寸法を有し、デバイスの筐体210は、上で説明したおよび図61に例示されているようなフリーザー蓋を有する制御された速度のフリーザー40の内部を摺動するように意図されている。

【0471】

便宜上、上方、下方、上および下などの用語、ならびに足部、踏み付けるおよび踏み付けることなどのより記述的な用語が、図面に示されている本発明を説明するために使用されているが、実際には、示されているデバイスは、それらの用語が、例えば、逆になる、またはその新しい方向では描写性が低くなるような、何らかの方法で方向付けられることもあり得る。したがって、方向に関して、そのような用語または等価の用語によって制限と解釈すべきものはない。

【0472】

本発明は、密閉された可撓性バッグ(10)内での組織試料の個々の細胞または細胞凝集塊への脱凝集のためのデバイス(100/100')であって、機械的脱凝集機構(120)と、組織試料バッグ受入エリア(148)とを含み、エリア(148)へのまたはからの熱エネルギーを伝達するための伝熱プレート(150)をさらに含み、前記プレートが、エリア(148)に隣接した第1のプレート表面(151)と、エリア(148)とは反対方向に面する、外部の熱的影響に曝露される対向面(152)とを有する、デバイスを提供する。

【0473】

収集時の腫瘍組織の凍結保存によって、製造と腫瘍収集を分離することができた。これは、UTIL製造を、腫瘍消化物の解凍から最終TIL回収洗浄、薬物製品の製剤化、濾過、標識および凍結保存まで単一の製造プロセスとして計画し、行うことができることを意味する。

【0474】

最終製品の凍結保存は、コンディショニング化学療法および患者処置の前に行われる全ての出荷試験を最終製品製造から離れた場所で行うことを可能にした。

【0475】

フローサイトメトリーを使用して、製造された製品を特徴付け、定量した。TILdは、出発材料の代表試料の病理評価により、転移製腫瘍に由来する培養された細胞表面マーカーCD3を発現するT細胞と定義した。生存率は、初期細胞死マーカーアネキシン-Vおよび/または生死判別色素DRAQ7(トリパンブルーまたはPIと等価)に結合しないCD3⁺細胞のパーセンテージに基づく。純度は、生存造血細胞集団(CD45⁺、アネキシン-V^{-ve}、およびDRAQ7^{-ve})内の生存T細胞(CD3⁺、アネキシン-V^{-ve}、およびDRAQ7^{-ve})のパーセンテージと定義される。

【0476】

急速拡大プロトコール(REP)の前の細胞の圧倒的多数は、CD3を発現するT細胞である。研究バッチはもちろん臨床バッチにおいても、CD3+CD8+およびCD3+CD4+TILの様々な分布が観察され、これらは、腫瘍反応性細胞を含有するサブセットから構成されるであろう。TILは、抗CD3を有するREPに発現されるので、最終

10

20

30

40

50

産物は、ほぼ排他的に生存CD3+T細胞(>94%)を含有する。

【0477】

理論的には、最終産物は、腫瘍細胞を依然として含有し得るが、T細胞成長とT細胞により媒介される腫瘍細胞死滅とを強くかつ選択的に促進する培養条件のため、この可能性は非常に低い。数百のTIL輸注剤の臨床データが、細胞診断により腫瘍細胞が存在しないことを示している。仕様を最終的に設定するためのデータを照合するために、起源IPCアッセイで造血性でなく、がんバイオマーカーの頻度についても試験することになる、全ての生存細胞物質を同定するための試験が、組み込まれた。

【0478】

TIL細胞薬物製品は、8.5%ヒト血清アルブミンと10%DMSOとを含有するおおよそ125~270mlの緩衝等張食塩水中の浮遊液である。存在する細胞の数は、培養条件および製造再現性と併せて、個々のTIL細胞各々を拡大できることに依存する。

【表3】

表3- 例示的薬物製品組成		
構成成分	量(輸液バッグ当たり)	機能
腫瘍由来T細胞	5x10 ⁹ ~ 5x10 ¹⁰ CD45 ⁺ 、CD3 ⁺ 、アネキシン-V ⁻ 、DRAQ7 ⁻ 細胞	活性
20%ヒト血清アルブミン	8.5% HSA W/V	吸着防止剤
リン酸緩衝食塩水	125~270 ml	等張性希釈剤
DMSO	10% V/V	凍結保護物質

【0479】

図1を参照して、デバイスの脱凝集モジュールが開示される。デバイスは、脱凝集、およびある実施形態では酵素消化を含む消化のための、可撓性容器1aを含み得る。開口端部1bは、固形腫瘍組織材料の容器1aへの移送を可能にする。吊り下げ穴1cは、容器1aを輸送または使用中に吊り下げることおよび支持することを可能にする。デバイスの無菌条件を維持するために、標的熱溶接位置1dは、熱溶接機13cまたは他の同等の手段を使用して容器1aを密封することを可能にする。容器1aは、図2a~cまたは図3aまたは図3bに例示されている例への移送の一部として起こり得る損失を低減させるために、容器1aの内面に丸められた縁部1eを有することができる。チューブ1fは、培地3aを滅菌フィルター2a経由で容器1aに移送できるようにする。滅菌フィルター2aは、培地3aの移送を助長するための後続のモジュールにおけるシールの穴開けを可能にするスパイクを含む。チューブ1gは、消化酵素3bを滅菌フィルター2b経由で容器1aに移送できるようにする。滅菌フィルター2bは、消化酵素3bの容器1aへの移送を助長するためのシールの穴開けを可能にするスパイクを含む。特に酵素消化を含む、固形腫瘍組織の脱凝集後、脱凝集混合物は、インキュベーション段階に入る前に、チューブ1hから出て、滅菌フィルター4bを含むフィルターユニット4a経由で移送される。フィルターユニット4aは、濾過プロセスの有用性に影響を与えることなく屈曲を可能にするために可撓性であり得る。フィルター4bは、脱凝集されていない組織を除去する。チューブクランプ5aは、培地3aが滅菌フィルター2a経由で可撓性容器1aに入ることを可能にする。酵素消化を含むある実施形態では、チューブクランプ5bは、酵素3bが滅菌フィルター2b経由で可撓性容器1aに入ることを可能にする。チューブクランプ5cは、可撓性容器1aの内容物が、図2a~cまたは図3aまたは図3bで特定される1つまたは複数の例にフィルターユニット4a経由で入ることを可能にする。

【0480】

図2aによれば、滅菌フィルター2cは、脱凝集腫瘍組織の凍結保存に必要とされる培

地 3 a および／または凍結溶液 3 c の導入を可能にする。フィルター 4 d は、細胞／組織凝集塊のさらなるサイズ離隔に必要とされ得る。フィルター 4 d は、濾過プロセスの有用性に影響を与えることなく屈曲を可能にするために可撓性であり得るフィルターユニット 4 c 内に封入される。ある実施形態では、フィルター 4 e は、細胞を保持するために、しかし培地および細胞断片の洗浄除去を可能にするために、必要とされ得る。フィルター 4 d は、同様にフィルターユニット 4 c 内に封入される。ある実施形態では、チューブクランプ 5 d は、フィルターユニット 4 a および 4 c を通過した容器 1 a からの材料が容器 1 a に戻るのを妨げるために適所に存在する。ある実施形態では、チューブクランプ 5 e は、フィルターユニット 4 a、4 c および 4 e を通過した容器 1 a からの廃棄材料が、廃棄物容器 6 a に入るのを可能にするために、しかし培地 3 a または 3 c が滅菌フィルター 2 c 経由で侵入するのを妨げるために、適所に存在する。チューブクランプ 5 f は、廃棄物がチューブクランプ 5 e 経由で廃棄物容器 6 a に入る前に、フィルターユニット 4 a、4 c および 4 e を通過した容器 1 a からの材料が、培地 3 a もしくは 3 c の供給源に戻ることも、図 3 a もしくは図 3 b に例示されている例の 1 つに移入することも妨げる。廃棄物が枯渇されると、チューブクランプ 5 e および 5 d は閉鎖され、チューブクランプ 5 f は、培地 3 a または 3 c が、フィルター 4 e 内の細胞を、図 3 a または図 3 b に例示されている例の 1 つに移入することを可能にする。廃棄物容器 6 a は、使用および／または輸送中に廃棄物容器 6 a を支持するための吊り下げ穴を有する。

10

【0481】

図 2 b は、デバイスの富化モジュールを例示する。チューブクランプ 5 g は、容器 1 a の内容物が、フィルターユニット 4 a 経由で富化モジュールの可撓性容器 7 a に入ることを可能にする。チューブクランプ 5 h は、容器 7 a の内容物がフィルターユニット 8 a を通過することを可能にし、その結果、細胞を保持し、富化する一方で、富化された細胞が開口チューブクランプ 5 i 経由で容器 7 a に戻る前に、廃棄物およびデブリがフィルター 8 b を通過して廃棄物容器 6 a に進むことを、弁 8 c により制御される圧力によって可能にする。チューブクランプ 5 i は、容器 7 a の内容物が開口チューブクランプ 5 h 経由でフィルターユニット 8 a を通過することを可能にし、その結果、細胞を保持し、富化する一方で、富化された細胞が容器 7 a に戻る前に廃棄物およびデブリがフィルター 8 b を通過することを弁 8 c により制御される圧力によって可能にする。細胞富化が行われた後、チューブクランプ 5 h は、閉鎖され、チューブクランプ 5 j は、容器 7 a の内容物が図 3 a または図 3 b で例示される例の 1 つに進むことを可能にするために、開口される。廃棄物容器 6 a は、使用および／または輸送中に廃棄物容器 6 a を支持するための吊り下げ穴 6 b を有する。富化モジュールの廃棄物容器 7 a は、使用および／または輸送中に容器 7 a を支持するための吊り下げ穴 7 b を有する。容器 7 a は、図 3 a または図 3 b に例示されている例への移送の一部として起こり得る損失を低減させるために、容器 7 a の内面に丸められた縁部 7 c を有することができる。チューブ 7 d は、容器 7 a が容器 1 a の内容物をフィルターユニット 4 a およびフィルターユニット 8 a 経由で受け取ることを可能にする。チューブ 7 e は、容器 7 a の内容物がフィルターユニット 8 a を通過することを可能にし、その結果、細胞を保持し、富化する一方で、富化された細胞が開口チューブクランプ 5 i 経由で容器 7 a に戻る前に、廃棄物およびデブリがフィルター 8 b を通過して廃棄物容器 6 a に進むことを、弁 8 c により制御される圧力によって可能にする。チューブ 7 f は、容器 7 a の内容物がフィルターユニット 8 a を通過することを可能にし、その結果、細胞を保持し、富化する一方で、富化された細胞が容器 7 a に戻る前に、廃棄物およびデブリがフィルター 8 b を通過して廃棄物容器 6 a に進むことを、弁 8 c により制御される圧力によって可能にする。

20

30

40

【0482】

図 2 c は、富化モジュールの別の実施形態を例示する。チューブクランプ 5 g は、容器 1 a の内容物が、フィルターユニット 4 a 経由で可撓性容器 7 a に入ることを可能にする。チューブクランプ 5 h は、容器 7 a の内容物がフィルターユニット 9 a を通過することを可能にし、その結果、細胞を保持し、富化する一方で、富化された細胞が開口チューブ

50

クランプ 5 i 経由で容器 7 a に戻る前に、廃棄物およびデブリがフィルター 9 b を通過して廃棄物容器 6 a に進むことを、弁 9 c により制御される圧力によって可能にする。チューブクランプ 5 i は、容器 7 a の内容物が開口チューブクランプ 5 h 経由でフィルターユニット 9 a を通過することを可能にし、その結果、細胞を保持し、富化する一方で、富化された細胞が容器 7 a に戻る前に廃棄物およびデブリがフィルター 9 b を通過することを弁 9 c により制御される圧力によって可能にする。細胞富化が行われた後、チューブクランプ 5 h は、閉鎖され、チューブクランプ 5 j は、容器 7 a の内容物が図 3 a または図 3 b で例示される例の 1 つに進むことを可能にするために、開口される。廃棄物容器 6 a は、使用および／または輸送中に廃棄物容器 6 a を支持するための吊り下げ穴 6 b を有する。富化モジュールの廃棄物容器 7 a は、使用および／または輸送中に容器 7 a を支持するための吊り下げ穴 7 b を有する。容器 7 a は、図 3 a または図 3 b に例示されている例への移送の一部として起こり得る損失を低減させるために、容器 7 a の内面に丸められた縁部 7 c を有することができる。チューブ 7 d は、容器 7 a が容器 1 a の内容物をフィルターユニット 4 a およびフィルターユニット 9 a 経由で受け取ることができる。チューブ 7 e は、容器 7 a の内容物がフィルターユニット 9 a を通過することを可能にし、その結果、細胞を保持し、富化する一方で、富化された細胞が開口チューブクランプ 5 i 経由で容器 7 a に戻る前に、廃棄物およびデブリがフィルター 9 b を通過して廃棄物容器 6 a に進むことを、弁 9 c により制御される圧力によって可能にする。チューブ 7 f は、容器 7 a の内容物がフィルターユニット 9 a を通過することを可能にし、その結果、細胞を保持し、富化する一方で、富化された細胞が容器 7 a に戻る前に、廃棄物およびデブリがフィルター 9 b を通過して廃棄物容器 6 a に進むことを、弁 9 c により制御される圧力によって可能にする。フィルターユニット 9 a は、富化された細胞が容器 7 a に戻る前の、廃棄培地およびデブリをフィルター 9 b によって廃棄物容器 6 a へと除去するための容器 7 a の内容物の濾過を、弁 9 c により制御される圧力によって助長する。細胞培地の精製の改善のために廃棄物が廃棄物容器 6 a に達する前に溶出しなければならない距離を増加させるように、しかし改善されたフィルター 9 b の輸送および保管を助長するように、フィルター 9 b を巻いてコイルにすることができる。

【0483】

図 3 a は、安定化モジュールの例を例示する。チューブクランプ 5 k は、フィルターユニット 4 a によって図 1 に例示されているような、もしくはフィルターユニット 4 c によって図 2 a に例示されているような、容器 1 a の内容物、またはフィルターユニット 8 a によって図 2 b に例示されているような、もしくはフィルターユニット 9 a によって図 2 c に例示されているような、容器 7 a の内容物を、安定化モジュールの容器 10 a に移送することを可能にする。安定化モジュールの容器 10 a は、使用および／または輸送中に容器 10 a を支持するための吊り下げ穴 10 b を有する。容器 10 a は、チューブ 10 e または 10 f からの移送の一部として起こり得る損失を低減させるために、容器 7 a の内面に丸められた縁部 10 c を有することができる。チューブ 10 e は、容器 10 a の内容物を継手 10 h によって取り出すことができるようにする。チューブ 10 f は、容器 10 a の内容物を取り出すことができるようにするための無菌カバー 10 g 経由で滅菌スパイクを導入できるようにするための可撓性膜を含有する。

【0484】

図 3 b は、安定化モジュールの別の実施形態を例示する。チューブクランプ 5 l は、フィルターユニット 4 a によって図 1 に例示されているような、もしくはフィルターユニット 4 c によって図 2 a に例示されているような、容器 1 a の内容物、またはフィルターユニット 8 a によって図 2 b に例示されているような、もしくはフィルターユニット 9 a によって図 2 c に例示されているような、容器 7 a の内容物を、安定化モジュールの容器 11 a に移送することを可能にする。安定化モジュールの容器 11 a は、使用および／または輸送中に容器 10 a を支持するための吊り下げ穴 11 b を有する。容器 10 a は、チューブ 11 f からの移送の一部として起こり得る損失を低減させるために、容器 7 a の内面に丸められた縁部 10 c を有することができる。チューブクランプ 5 m は、培地 3 c が滅

菌フィルター 2 c 経由で可撓性容器 1 1 a に入ることを可能にする。チューブクランプ 5 n は、容器 1 1 a の内容物が、チューブクランプ 5 o、5 p、5 q、5 r、5 s および 5 t の開口または閉鎖状態に依存して凍結保存容器 1 2 a の 1 つに入ることを可能にする。チューブクランプ 5 o、5 p、5 q、5 r、5 s および 5 t は、容器 1 1 a の内容物が凍結保存容器 1 2 a の 1 つに入ることを可能にする。チューブ 1 1 d は、容器 1 1 a が、フィルターユニット 4 a によって図 1 に例示されているような、もしくはフィルターユニット 4 c によって図 2 a に例示されているような、容器 1 a の内容物、またはフィルターユニット 8 a によって図 2 b に例示されているような、もしくはフィルターユニット 9 a によって図 2 c に例示されているような、容器 7 a の内容物を、受けることができるようにする。チューブ 1 1 e は、凍結保存媒体 3 c を容器 1 1 a に移送することを可能にする。チューブ 1 1 f は、単一細胞浮遊液としての最終脱凝集 U T I L 産物が急速拡大プロセスでの将来の使用のために保管される凍結保存容器 1 2 a に、容器 1 1 a の内容物を移送できるようにする。凍結保存容器 1 2 a は、凍結保存容器 1 2 a からの T I L の無菌移送を可能にするための取付具 1 2 b を有する。凍結保存容器 1 2 a は、保管される U T I L 細胞浮遊液の体積に好適である空間 1 2 c を有する。凍結保存容器 1 2 a は、チューブ 1 1 f を凍結保存容器 1 2 a に溶接するための標的位置 1 2 d も有する。

10

20

30

40

【0485】

図 4 は、デバイスおよびキットの別の例を例示する。留めくぎ 1 3 a は、培地 3 a、3 b および 3 c を吊り下げることができる。留めくぎ 1 3 b は、吊り下げ容器 1 a の重量センサーに接続されており、利用される実施形態に依存して容器 7 a、1 0 a および／または 1 1 a のうちの 1 つまたは複数を含み得る。重量センサーは、材料の自動化処理を制御するための決定段階を規定するために使用される。熱溶接機 1 3 c を使用して、容器 1 a を、摘除された固形腫瘍組織の容器 1 a への導入後に標的部位に密封することができる。脱凝集モジュール 1 3 d は、脱凝集できるようにするために閉鎖およびロックされ得る開口部を有し、消化酵素が固形腫瘍の組織の脱凝集に使用される消化を可能にするために温度を 1 °C の許容誤差で 0 °C ~ 4 0 °C の間に制御することができる。脱凝集モジュール 1 3 d は、数秒から数時間の期間にわたって行われる脱凝集プロセスの変化を特定することによって脱凝集プロセスの完了を特定するために、時間に対して光分布の変動を決定することにより固形組織の脱凝集レベル評定するための、内蔵型センサーも有する。脱凝集モジュール 1 3 d は、容器 1 a と直接接触し、脱凝集モジュール 1 3 d 封入容器の背部を押す、脱凝集面 1 3 f であって、脱凝集中および酵素が利用される消化中に閉鎖およびロックされ得る、脱凝集面 1 3 f も含み得る。最終配合モジュール 1 3 e は、利用される実施形態に依存して容器 1 0 a または 1 1 a のどちらかの温度制御を可能にする封入容器を有し、温度を 1 °C の許容誤差で 0 °C ~ 周囲環境温度の間に制御することができる。チューブクランプ 1 3 g および 1 3 j は、チューブロケータ 1 3 i 内に配置された投入および排出口として機能し、利用される実施形態に依存して容器 1 a、1 0 a または 1 1 a 間の脱凝集腫瘍産物の輸送を助長する。蠕動チューブポンプ 1 3 h は、投入および排出口として機能するチューブクランプ 1 3 g と 1 3 j 間の培地 3 a または 3 c の移送を制御する。チューブ弁 1 3 k は、図 2 b および 2 c に例示されているような富化モジュール内の弁 8 c および 9 c による圧力の制御を支援する。留めくぎ 1 3 l は、利用される実施形態に依存して廃棄物容器 6 a および／または凍結保存容器 1 2 a の取り扱いを可能にする。実施形態は、図 3 b に例示されているようなデバイスへの凍結保存容器 1 2 a の接続に必要とされるチューブ溶接機 1 3 m も含み得る。実施形態は、図 3 b に例示されているようなデバイスへの凍結保存容器 1 2 a の接続を切るためのチューブカッター 1 3 n も含み得る。速度制御された冷却モジュール 1 3 o は、凍結保存プロセスを支援するために 8 °C ~ 最低 - 8 0 °C の間の任意の温度に冷却することまたはその温度を維持することができる。

【0486】

本発明の方法は、以下のプロセスに従って例示される。方法の本質的特徴以外の、本明細書に列挙される様々な必要に応じたステップは、試料採取のタイプおよび達成される結果に関連する妥当な技術的利点を達成するために独立して組み合わせることができると、

50

明確に述べられる。

【0487】

半自動無菌組織処理方法は、無菌処理キットに付随するデジタル識別子から無菌脱凝集組織処理ステップおよび1つまたは複数のさらなる組織処理ステップならびにそれらに関連する状態を、必要に応じて、本明細書に記載されるキットに従って、自動的に判定するステップと；組織試料を無菌処理キットの可撓性プラスチック容器に入れるステップと；脱凝集モジュール、必要に応じた富化モジュールおよび安定化モジュールと通信し、これらのモジュールを制御することにより、1つまたは複数の組織処理ステップを自動的に実行することによって、組織試料を処理するステップとを含む。

【0488】

本質的に、プロセスは、生検／組織試料、好ましくは摘除された腫瘍、を受け取ることになる端部開口バッグ（脱凝集モジュールの一部である第1の可撓性容器）を使うステップであって、生検試料の添加時に、端部開口バッグが、

【0489】

I. 消化媒体が入っている単一の容器（脱凝集モジュールの一部である第2の可撓性容器）であって、安定化溶液が入っている（同じ第2の可撓性容器が、安定化モジュールの一部でもある）または入っていない単一の容器

【0490】

II. 消化溶液が入っている1つの容器（脱凝集モジュールの一部である第2の可撓性容器）、および安定化溶液が入っている別の容器（第4の可撓性容器が、安定化モジュールの一部である）

【0491】

に、1つもしくは複数の導管によって既に接続されている、または手動で操作員により制御される無菌の接続によって接続され得る、ステップ；ならびに消化媒体が導管または無菌接続部（導管／口 請求項1）経由で添加され得る端部開口バッグであって、組織材料が処理され得る端部開口バッグを、密封するステップを含み得る。

【0492】

消化の完了時、その時点で組織は既に単一または少数の凝集した細胞の浮遊液であり、これらの細胞を、必要に応じて、ステップ4の前に濾過することができる（濾過のための必要に応じた富化モジュールは、試料を収容する第1の可撓性容器を含み、前記試料は、濾過されて、富化された濾液を受け取るための第3の容器に行く）。

【0493】

安定化培地が同じ可撓性容器内に存在しない場合、完了される、取り付けられた導管または手動で操作員により制御される無菌接続部の開口により、容器に安定化溶液が添加され、開口される前記接続部によって、両方の場合、プロセスが継続する前に安定化溶液を添加できるようになる。

【0494】

元の可撓性容器内の、または複数の保管安定化溶液に必要に応じてさらに分割され得る、単一または少数の凝集した細胞の浮遊液は、その後、安定した状態でデバイスにおいて維持され、ならびに／または輸送前、保管前およびもしくはそれらの最終ユーティリティにおける使用の前に凍結保存を経ることになる。安定化モジュールは、保管／凍結／保管に使用されるような第1または第3の容器も含み得る。

【0495】

プロセスの1つのさらなる非限定的な例では：

【0496】

a) 必要とされる組織材料を収集するための生検または外科手術などの別個の手順（本発明の一部でない）による組織試料の収集物を最初の可撓性プラスチック容器に入れる（例えば、図1、容器1aを参照されたい）。

【0497】

b) 重量センサー（例えば、図1、モジュール13dの一部としての13bを参照され

10

20

30

40

50

たい)などの機構が、操作員直接入力または固形組織の重量のどちらかにより決定された添加すべき培地の必要量を評定する、本発明の後続の実施例のうちの1つもしくは複数を使用して脱凝集の前に、培地(例えば、図1、培地3aを参照されたい)を脱凝集チャンバーに移送する、または一例では、培地が同じく入り、酵素(例えば、図1、酵素3bを参照されたい)を収集する。

【0498】

c)使い捨て可撓性脱凝集容器と、固形組織と、培地と、一例では酵素とを、物理的脱凝集プロセス中に可視変化がなくなるまで最低数秒、最大数時間、合わせ、この固形組織の分解に必要とされる最適な時間は、1~10分の間である(図5および表1を参照されたい)。脱凝集デバイスを、脱凝集にかかった時間および脱凝集モジュール(図1、13dを参照されたい)内のセンサーによるフィードバックに依存して可変速度および時間を使用して組織を圧縮するように設計する。

10

【0499】

d)酵素が存在する一実施形態では、これは、最低で0℃、最大40℃であり得るが30~37℃の間の最適な温度で、15~45分がより好ましいが少なくとも1分~数時間のインキュベーション期間を必要とすることになる。

【0500】

e)ステップcおよび一実施形態では酵素ステップd)を、脱凝集モジュール(図1、13dを参照されたい)内のセンサーによりモニターして、組織が変化しなくなるかまたは参照例が液体細胞浮遊液へと脱凝集されてしまうかどうか早いほうまで繰り返すことができる。

20

【0501】

f)一実施形態では、以下の実施形態の1つまたは複数を使用して脱凝集組織および培地を送ることにより、不完全に脱凝集された組織、付随する材料および不純物を除去することによって、細胞浮遊液の富化を可能にする：

【0502】

i.少なくとも $>0.1\mu\text{m}$ ~ $1000\mu\text{m}$ 、しかし最も好ましくは $50\sim250\mu\text{m}$ の間、より好ましくは $100\mu\text{m}$ ~ $200\mu\text{m}$ の穴を有する1つもしくは複数のメカニカルフィルター(図2aに例示されている)の直接通過。

【0503】

ii.細胞アラインメント密度保持溶液(例えば、Ficoll-paque GE Healthcare)を用いるまたは用いない遠心分離および/または沈降を使用する、密度に基づく分離。

30

【0504】

iii.流体の流れおよび流れを妨げられる材料が、サイズおよび形状に基づいて細胞および夾雑物の分解および分別を増進する、流体力学的濾過。

【0505】

iv.印加された場(例えば、流れの場、電場、重力場、遠心力場)が、選択された流れに対して垂直または逆方向に作用する、フィールドフローフラクショネーション(例えば、接線流濾過、ホローファイバ流濾過、非対称流濾過、遠心流濾過)。この場合、力に対する応答性が最も高い細胞または夾雑物は、流れが最も少ない壁に追い込まれ、それ故、長い滞留時間となるが、力に対する応答性が最も低い細胞または夾雑物は、流れに対して層状のままであり、急速に溶出する(図2bおよびcに例示されている接線流濾過)。

40

【0506】

v.細胞または不純物の集団に同調または調和した1つまたは複数の音響周波数を使用して、必要な細胞または夾雑物を入力ストリームに対して接線方向の進路に追いやる、音響泳動。

【0507】

g)一実施形態では、脱凝集富化組織産物を、以下のものなどの、新鮮培地(培地3a

50

を使用する図 2 a) に再浮遊させることになる：

【0508】

i. 前に説明したような独立した標的化富化を経るための細胞富化培地。

【0509】

ii. 直接細胞培養または冷却保管用培地（例えば、BioLife Solutions からの HypoThermosoL（登録商標））。

【0510】

h) g) で利用した実施形態では、再懸濁された脱凝集された固形組織由来の産物を、その最終ユーティリティに使用される前に数時間から数日にわたって保管するための実施形態最終製品容器（図 3 a に例示されている）の 1 つに移す。

【0511】

i) そうでなければステップ f) の後、脱凝集された固形組織由来の産物が、BioLife Solution からの CryoStor（登録商標）凍結溶液などの、数日～数年間の脱凝集固形組織由来の産物の保管のための凍結溶液である、凍結保護物質（図 3 b、培地 3 c）に再浮遊される、実施形態を適用する（図 3 b に例示されている）。

【0512】

j) この段階で、脱凝集された固形組織由来の産物を、凍結溶液に再浮遊させ（図 4、モジュール 13 e）、1 つまたは複数の可撓性凍結保存容器（図 3 a、容器 12 a で例示される）に移し、デバイスの一実施形態では、制御された速度の凍結プロセス（図 4、モジュール 13 o）がある。

【0513】

k) この後、バッグを、独立した保管または分配のためにデバイスおよび無菌処理キットから分離することができる。

【0514】

さらなる実施形態では、本発明のディスポーザブルキットを、組織試料の半自動無菌処理のための自動デバイスとともに使用することができる。図 6 および 7 は、本発明のディスポーザブルキットを描示する。

【0515】

図 6 は、脱凝集および安定化に使用されるプロセスのモジュールの一部である、異なる出発溶液のための複数の可撓性容器を使用する、半自動無菌組織処理方法を描示する。

【0516】

プロセスステップ 1 – ユーザーは、デバイスにログインし、デバイスを使用して無菌キットのタグをスキャンして、使用される自動処理ステップを伝達する。デバイスプロセッサは、タグを認識し、その実際のキットに関連する特定の処理指示を実行するために必要な情報を提供する。

【0517】

プロセスステップ 2 – 消化媒体を収容している可撓性バッグ（脱凝集モジュールの一部）、および凍結／安定化溶液を収容している可撓性バッグ（安定化モジュールの一部）を、各々、デバイスに吊す、または固定する。

【0518】

プロセスステップ 3 – 処理用の生検または組織試料を、開口端部経由で無菌キットの可撓性容器（両方のモジュールの一部）に入れる。

【0519】

プロセスステップ 4 – 次いで、試料を含む可撓性容器を、熱溶接を使用して密封して、開口端部（最初の処理中に試料を添加するために使用された）を密閉する。

【0520】

プロセスステップ 5 – 次いで、ユーザーは、プロセッサのユーザーインターフェースと交信して、組織試料が存在することを確認し、必要に応じて任意のさらなる組織材料特異的情報を入力することができる。

【0521】

プロセスステップ6－消化培地および凍結／安定化溶液用可撓性容器を、試料を収容している可撓性容器と接続し、その後、それを自動処理のためのデバイスに入れることができる。

【0522】

プロセスステップ7－デバイスが、キット情報に従ってサイクルを実行し、試料の脱凝集および得られた細胞の安定化／凍結保存を実施する。

【0523】

プロセスステップ8－安定化／凍結されたら、接続を切り、キットの使用済みの培地および凍結／安定化容器を廃棄する。可撓性容器内の単一または多細胞溶液に処理された組織の接続を、その組織の最終利用の前に保管または輸送容器に移入する前に切る。

10

【0524】

別の実施形態での図7は、プロセスで使用される培地を含む可撓性容器を無菌処理キットおよび方法のモジュール間で共有することができることを図示する。

【0525】

プロセスステップ1－ユーザーは、デバイスにログインし、デバイスを使用して無菌キットのタグをスキャンして、使用される自動処理ステップを伝達する。

【0526】

プロセスステップ2－培地と凍結／安定化溶液の両方を含む可撓性バッグ（脱凝集／安定化モジュールの一部）をデバイスに吊すかまたは別様に固定する。

【0527】

プロセスステップ3－処理用の生検または組織試料を、開口端部経由で無菌キットのさらなる可撓性容器（両方のモジュールの一部）に入れることができる。

20

【0528】

プロセスステップ4－次いで、試料を含む可撓性容器を、熱溶接を使用して密封して、開口端部を密閉することができる。

【0529】

プロセスステップ5－次いで、ユーザーは、プロセッサのユーザーインターフェースと交信して、

【0530】

組織試料が存在することを確認し、必要に応じて任意の組織材料特異的情報を入力することができる。

30

【0531】

プロセスステップ6－消化培地および凍結／安定化溶液用可撓性容器を、試料を収容している可撓性容器と接続し、その後、それを自動処理のためのデバイスに入れる。

【0532】

プロセスステップ7－デバイスが、試料の脱凝集、および必要に応じて凍結保存経由での、得られた細胞の安定化を可能にするためにサイクリングする。

【0533】

プロセスステップ8－凍結／安定化が完了したら、ユーザーは、接続を切り、キットの使用済み可撓性容器を廃棄する。残りの可撓性容器内の単一または多細胞溶液に処理された組織の接続を、その組織の最終利用の前に保管または輸送容器に移入する前に切る。

40

【0534】

例として、脱凝集プロセスが酵素消化で補足されることになる、本発明の方法の別の実施形態では、酵素消化用の培地配合物に、上で説明したような細胞間の境界の破壊を引き起こすタンパク質分解を助ける酵素を補充しなければならない。

【0535】

細胞培養または細胞取り扱いの技術分野において公知の様々な液体配合物を、細胞脱凝集および固形組織の酵素消化に使用される液体配合物として使用することができ、そのような液体配合物としては、次の培地：臓器保存溶液、選択的溶解溶液、PBS、DMEM、HBSS、DPBS、PMI、イスコフ培地、XVIVO（商標）、AIM-V（商

50

標)、乳酸加リンゲル液、酢酸リンゲル液、食塩水、P L A S M A L Y T E (商標) 溶液、晶質液および I V 輸液、コロイド溶液および I V 輸液、水中 5 パーセントデキストロース (D 5 W)、ハルトマン溶液、D M E M、H B S S、D P B S、R P M I、A I M - V (商標)、イスコフ培地、X V I V O (商標) のうちの 1 つまたは複数が挙げられるがこれらに限定されず、これらの各々に、細胞回復および生存または特定の細胞枯渇を助けるための追加の細胞支持因子を、例えば、ウシ胎仔血清、ヒト血清もしくは代用血清または他の栄養素もしくはサイトカインを、さらに補充することができる。培地は、上述の培地のような標準的な細胞培地であることもあり、あるいは例えば、一次ヒト細胞培養 (例えば、内皮細胞、肝細胞もしくはケラチン産生細胞のための) または幹細胞 (例えば、樹状細胞成熟、造血拡大、ケラチン産生細胞、間葉系幹細胞もしくは T 細胞) のための特別な培地であることもある。培地は、当技術分野において周知のサプリメントまたは試薬、例えば、アルブミンおよび輸送タンパク質、アミノ酸およびビタミン、金属イオン、抗生物質、結合因子、脱結合因子、界面活性剤、増殖因子およびサイトカイン、ホルモンまたは可溶化剤を有し得る。様々な培地が、例えば、T h e r m o F i s h e r、L o n z a、もしくは S i g m a - A l d r i c h、または同様の培地製造業者および供給業者から市販されている。

10

【0536】

酵素消化に必要とされる液体配合物は、最適な範囲が 2 ~ 7 m M、理想的には 5 m M である、少なくとも 0 . 1 m M、最高 5 0 m M で存在する十分なカルシウムイオンを有さなければならない。

20

【0537】

消化されることになる固形組織を、脱凝集後、キレート剤 E G T A および E D T A を含有する液体配合物で洗浄して、接着因子および阻害タンパク質を除去し、その後、洗浄して E D T A および E G T A を除去し、その後、酵素消化に付すことができる。

【0538】

酵素消化に必要とされる液体配合物は、酵素安定性および活性に必要とされるカルシウムイオンを除去することにより酵素活性を厳密に阻害し得るキレート剤 E G T A および E D T A が最小限であると、より最適である。加えて、他の公知阻害物質には、b - メルカプトエタノール、システイン、および 8 - ヒドロキシキノリン - 5 - スルホネートがある。

30

【0539】

好ましい実施形態で説明されるように、凍結保存のための最終細胞容器は、弾力性のある変形可能な材料から製造された可撓性容器である。デバイスのこの実施形態では、最終容器は、- 2 0 ~ - 1 9 0 ° C またはそれより低い温度のフリーザーに直接移送されるか、またはより最適には、デバイスに付随するもしくは別途供給される (例えば、P l a n e r P r o d u c t s もしくは A s y m p t o t e L t d により製造された)、速度制御された凍結装置であって、富化された脱凝集固形組織の容器を収容するために利用される凍結チャンバーおよび可撓性保管容器の温度が、冷却ガス (一般には窒素、例えば P l a n e r p r o d u c t s) を注入することもしくは制御された冷却面から熱を取り除くことのどちらかによって制御される、凍結装置内に配置される。両方の方法によって、凍結溶液および所望の産物生存率に基づいて凍結されることになる特定の細胞に必要な速度での凍結プロセスを 1 ° C 未満またはより好ましい 0 . 1 ° C の誤差で正確に制御することができる。この凍結保存プロセスは、理想的には凍結溶液の融解温度にできる限り近い氷核生成温度を考慮に入れなければならない。続いて水溶液中で結晶が成長し、水が氷として系から除去され、残留未凍結溶液の濃度が上昇する。温度が低下されるにつれて、より多くの氷が形成し、その結果、残留非凍結画分が減少し、それによって濃度がさらに上昇する。水溶液の場合、氷が濃縮水溶液と共存する大きい温度範囲が存在する。最終的には、温度が低下することによって溶液がガラス転移状態に達し、達した時点で凍結溶液および細胞は粘性溶液から固体様状態に移り、この温度より下では細胞がさらなる生物学的変化を受けることがないので、必要とされるまで何年間も安定しており、何十年間も安定し

40

50

ている可能性もある。

【0540】

本発明の方法により達成される脱凝集細胞産物を、当業者に公知のあらゆる方法に従って培養および／または分析する（特徴付ける）ことができる。

【0541】

本明細書で開示される方法により得ることができるTILを、当業者に公知の研究、診断、組織バンク、バイオバンク、薬理学または臨床応用などの、後続のステップに使用することができる。次いで、IL-2、IL-7、IL-15、IL-21などの増殖因子をこれらに限定されないが通常は含有する、この応用のために最適化された培地、例えば、T cell Mixed Media (Cellular Therapeutic s)、または刺激条件、例えば、抗体がコーティングされたプレートまたはポリスチレンビーズを使用する培養に、TILを取り入れることができる。本発明では、単離された細胞は、培養容器に播種され、当業者により標準的に使用されている手順、例えば、1～40℃の間の温度、通常は37℃で、数週間の、加湿雰囲気（1～20%、通常は5% CO₂、80～99%、通常は95% 空気）、ならびに10% FBSおよび3000 IU/mLのIL-2が補充される、添加され得るサプリメントを使用して、維持された。

10

【0542】

富化されたTILを、培養前および／または後に医薬組成物として治療、例えば細胞療法、または疾患の予防に使用することができるだろう。医薬組成物を、哺乳動物への医薬組成物の薬学的に有効な量の投与を恐らく含む、哺乳動物、特にヒト、における疾患の処置および／または予防に使用することができる。

20

【0543】

そのようなTIL培養物は、様々ながんの処置のための薬物製品として製剤化されることに加えて、例えば、細胞機能、腫瘍細胞死滅、細胞シグナル伝達、バイオマーカー、細胞経路、核酸、およびドナー、組織、細胞または核酸状態を同定するために使用され得る他の細胞または組織関連因子を研究するために、使用され得る。

【0544】

疾患は、固形組織由来の細胞の存在によって、および／または関連のある場所、すなわち、腫瘍もしくは疾患部位、において／その場所で関連細胞の濃度を上昇させることによって、処置および／または予防することができる、任意の疾患であり得る。処置されるおよび／または予防的に処置される疾患は、任意の障害、例えば、がんまたは変性障害であり得る。処置は、富化された、操作されたもしくは拡大された細胞またはこれらの任意の組合せの移植であり得、関連体部に投与されることもあり、または全身的に供給されることもある。

30

【0545】

本開示の医薬組成物は、処置（または予防）すべき疾患に適している方法で投与することができる。投与の量および頻度は、患者の状態、ならびに患者の疾患のタイプおよび重症度などの因子により決定されることになるが、適切な投薬量は、臨床試験により決定され得る。

【0546】

本明細書に記載されるように、本発明は、組織、特に哺乳動物組織、などの材料の受け取り、処理、保管および／または単離を可能にするキットを提供する。さらに、本発明は、キットの構成要素、例えば、可撓性容器、例えばバッグ、フィルター、弁、ブラケット、継手、および／または導管、例えばチューブを提供する。具体的には、バッグを、凍結保存キットの様々な構成要素間の組織材料の流れを可能にするように適合された1つもしくは複数のチューブのまたはチューブのセクションに連結させることができる。

40

【0547】

凍結保存キットおよび／または収集バッグを使用する組織の細胞への処理は、自動化および／または半自動化デバイスおよび方法を含み得る。

【0548】

50

さらに、当技術分野における通常の技能と併せて、本明細書に記載されるバッグ、キット、デバイスおよびプロセスを利用することにより、本開示のさらなる実施形態を容易に特定することができる。当業者は、既知の変形形態を容易に理解するであろう。

【0549】

意匠特許出願番号 29 / 740, 293 は、組織収集に好適な組織収集バッグを提供している。本発明の組織収集バッグの上部は、組織、例えば、組織生検試料、例えば、動物（例えば、イヌもしくはネコなどの飼育動物）またはヒトがん性組織を受け取るために、開口している。組織収集バッグは、収集組織を中に入れて密封されることになり、そのようその中に密封された組織は、その中で処理されることになり、例えば、処理は、攪拌および／または圧縮、例えば、穏やかな攪拌および／もしくは圧縮、ならびに／またはその中の組織の酵素消化を含み得る。有利には、その中での、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）などの、所望の材料からの組織処理および抽出は、閉鎖系の中での処理および抽出であり得る。有利なまたは好ましい実施形態は、組織が収集された患者を示す印；および／または攪拌を適用するために収集バッグを機器内に締め付けるもしくは取り付けることができる適所がどこかを示す印；ならびに／または収集バッグを、例えば、ヒートシーリングにより、密封することができる場所（これは、処理のための機器の一部であり得る）を示す印を含み得る。有利には、処理の適用の前に、収集バッグは、処理用の機器に締め付けられ、または取り付けられ、ならびに／または密封、例えば、ヒートシールされる。ある特定の説明図では、チューブは、本発明の設計の一部とは必ずしも見なされないことを示すために点線または点刻で示され得るが、ある特定の実施形態では、本発明の設計の一部と見なされ得る。点線または点刻は、チューブが存在することまたは非存在であることもあり、どちらかまたは両方として特許請求の範囲に記載され得ると、すなわち、図面を通して、チューブが本発明の設計の一部を形成し得る（および必ずしも本発明の設計の一部でないこともある）と、解釈すべきである。加えて、ある特定の説明図は、印；試料を採取した患者を示し得る印；試料を採取した患者、および組織収集バッグを締め付けることまたは取り付けることができる機器内の場所を示し得る印；ならびに試料を採取した患者、組織収集バッグを締め付けることまたは取り付けることができる機器内の場所、および組織収集バッグを密封することができる、例えば、ヒートシールすることができる場所を示し得る印を示さないが、本発明の設計は、その変形形態を含み得ること、例えば、本発明の設計が、試料を採取した患者、および組織収集バッグをヒートシールすることができる場所を示し得る印を、組織収集バッグを締め付けることまたは取り付けることができる機器内の場所を示す印なしでも、含み得ること、および本発明の設計が、組織収集バッグをヒートシールすることができる場所を示し得る印、および／または組織収集バッグを締め付けることまたは取り付けることができる機器内の場所を示す印を、試料を採取した患者を示す印なし（患者印が組織収集バッグ上にそれが使用されることになると刻印されることがある場合を含むが、締付または取付またはヒートシーリングについての印が、組織収集バッグに使用されることになる前に既に存在することもある）であるが、含み得ることを、理解されたい。任意の付随するチューブを含む組織収集バッグは、一般に、クリア、または透明、または半透明、または所望される任意の色であり得る。任意の付随するチューブを含む組織収集バッグは、一般に、密閉または密封、採血、組織培養、バイオ処理または凍結保存バッグならびに付随するチューブの作製に類似した方法で作製することができる。本発明での付随するチューブを任意の所望の材料から構成することができ、ポリ塩化ビニル（PVC）、またはPVCを含む材料は、それが溶接および／または密封に有利であるので、所望の材料として用いられる。組織を受け取るための本発明の組織収集バッグの一部分を任意の所望の材料から製造することができ、エチレン酢酸ビニル（EVA）、またはEVAを含む材料は、それがヒートシーリングに有利であるので、所望材料として用いられる。

【0550】

図 11A に示されているような、組織の処置、例えば、組織の脱凝集、富化および／または安定化のための、キット 2 についての実施形態。処置されることになる組織としては

、固形真核生物、特に哺乳動物組織、例えば、試料および生検試料からの組織を挙げることができる。キット2は、バッグ4、6、例えば、収集バッグ4および凍結保存バッグ6などの、構成要素を含む。図11A～Dに描示されているようなキットは、処置のための自動または半自動デバイスで使用され得る。

【0551】

一部の実施形態では、キット構成要素は、インジケータ、例えば、コード、文字、言葉、名前、アルファベットコード、数、画像、バーコード、クイックレスポンス（QR）コード（登録商標）、トラッカー、例えばスマートトラッカータグおよび／またはブルートゥース（登録商標）トラッカー、タグ、例えば無線タグおよび／または他のデジタル認識可能表示タグを、それを、本発明の実施形態での自動化デバイス内などでの自動化および／または半自動化処置中にスキャンおよび認識することができるように、含むことができる。例えば、タグは、自動的に処置する必要がある状態および／またはステップについての情報を提供することができる。例えば、バッグなどのキット構成要素をスキャンすることによって、キットとともに使用される自動化システムは、さらなる介入および／またはは複雑なしに、組織を処置することが可能になり得る。具体的には、デバイスの脱凝集要素内での処置のために収集バッグに入れられた組織試料。収集バッグを、処置が始まる前に密封することができる。一部の実施形態では、収集バッグを、処置が始まる前に、熱、無線周波エネルギー、高周波（HF）エネルギー、誘電エネルギーなどのエネルギー、および／または当技術分野において公知の任意の他の方法を使用して、手動でおよび／または自動的に密封することができる。

10

20

【0552】

一部の実施形態では、加熱バーを有するヒートシーラー（例えば、Van der Staehl MS-350、Uline H-190 Impulse Sealer、または当技術分野において公知の同様のシーラー）。このバーを使用して、バッグにシーラーを生成することができる。

【0553】

特定の実施形態では、ヒートシーラーを使用する場合、約100℃未満の温度で、約0.8バール～約2.8バールの範囲の圧力で、シーラーを形成するのが有利であり得る。この高温および高圧を約8秒間印加することができ、その後、温度を低下させることができるが、圧力を一部の実施形態では約2～3秒間、印加し続ける。温度、圧力および時間の値は、バッグを形成する材料、特に、シーラーを形成する材料の配合に基づいて変わり得る。例えば、別の材料には、シーラーが、最低約3秒間、約210°F（98.9℃）より上の温度に達することが求められ、その後、加熱バーを5秒間放置して冷却した後、加熱バーを除去することができる。

30

【0554】

密封されることになる材料の位置決めは、形成されるシーラーの強度にとって重要であり得る。例えば、密封されることになる材料の不完全なシーラー、折り目、チャネル、および／またはずれは、シーラーの強度を低下させ得る。

【0555】

シーラーを、シーラー剥離試験（すなわち、ASTM F88／F88M）、および／または破損試験（すなわち、ASTM F1140／F1140MもしくはASTM F2051／F2054M）を使用して、強度について試験することができる。

40

【0556】

一部の実施形態では、バッグまたは可撓性容器は、適正に密封され、処置および／または処理のためのデバイス内への配置時にクランプでさらに固定された場合、使用中に100ニュートンの力に耐えることができる。バッグまたは可撓性容器実施形態は、適正に密封され、処置および／または処理のためのデバイス内への配置時にクランプでさらに固定された場合、使用中に75ニュートンの力に耐えるように構築され得る。

【0557】

図11Aに示されているように、キット2は、収集バッグ5が処置され得る脱凝集要素

50

4と、フィルター9が配置され得る富化要素8と、凍結保存バッグ7が所望の材料を保存するために使用される安定化要素6とを含む。収集バッグ5などの、キット2の構成要素において、組織が処置される。例えば、収集バッグ5は、真核細胞に由来する固形組織の脱凝集に使用され得る。組織は、処理後に得られた組織の大多数が単一細胞および／または少細胞数の凝集体であり得るような方法で、処置され得る。さらに、処理は、キット内で、および／または特に収集バッグ内で行われ得る。

【0558】

処置された組織の富化は、富化要素8においてフィルター9で行われ得る。フィルター9は、チューブ11に入る濾過された組成物（すなわち、所望の材料）が、所定のサイズを有する構成物を有することができるように、選択され得る。フィルター9は、チューブ11に入る所望の材料が、約200 μ m未満の平均サイズを有する腫瘍浸潤リンパ球（TIL）などの構成成分を有し得るように、選択され得る。具体的には、ある実施形態では、所望の材料は、約170 μ m未満の平均サイズを有する腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を含み得る。

10

【0559】

一部の実施形態では、所望の材料は、約15 μ m～約500 μ mの範囲の腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を含み得る。例えば、フィルター9は、ある実施形態では、チューブ11に入る組織組成物が、約200 μ m未満の平均サイズを有する構成物を有するように、構成され得る。具体的には、濾過された後にフィルターを出てチューブ11に入る所望の材料は、約170 μ m未満の平均サイズを有する構成物を有し得る。

20

【0560】

一部の実施形態では、フィルター9は、チューブ11に入る濾過された組成物が、約50 μ m～約300 μ mの範囲のサイズを有する構成物を有するように、構成される。例えば、フィルター9は、ある実施形態では、チューブ11に入る組織組成物が、約150 μ m～約200 μ mの範囲の平均サイズを有する構成物を有するように、構成され得る。

【0561】

図11Aに示されているように、組織を処置するためのシステムの安定化要素6は、凍結保存バッグ7が、保管および／または輸送のために組織組成物を安定化するために使用され得る場所である。

【0562】

図11Bは、弁12、13を有するキット2を描示する。弁は、無針弁であり得る。弁12、13を使用して、酵素培地、例えば腫瘍消化培地、凍結保存物質、および／または凍結保存用培地を供給することができる。具体的には、弁12を使用して、酵素培地をチューブ10に供給することができる。酵素培地は、収集バッグ4に移動して、バッグ5に入れられた組織の処理を助けることができる。

30

【0563】

弁13を使用して、DMSO溶液などの凍結保護物質を、DMSO溶液が凍結保存バッグ7に移動することができるように、チューブ11に供給することができる。一部の実施形態では、DMSO溶液などの凍結保護物質は、チューブ11に入る濾過された材料と混ぜることができる、その結果、DMSO溶液と濾過された材料の合わさった組成物が、凍結保存バッグ7に入る。チューブ11に入る濾過された材料は、所定の平均サイズを有する腫瘍浸潤リンパ球（TIL）などの構成成分を含み得る。例えば、一部の実施形態では、濾過された組成物中の構成成分の平均サイズは、約200 μ m未満であり得る。

40

【0564】

一部の実施形態では、図11Cに示されているように、キット2は、弁12、13を通じて供給される材料が、フィルター9に流入するのを確実に抑制および／または防止するために、フィルター9の周辺にクランプ14を含む。弁13を使用して凍結保護物質をチューブ11に供給することができ、その結果、凍結保護物質は、フィルター9からチューブ11に入る濾過された材料と混ざり得る。例えば、クランプ14を、フィルター9の方向への凍結保存物質の流れを抑制および／または防止するように、配置することができる

50

。一部の実施形態では、濾過された溶液が、フィルター 9 から流れ始めた後、クランプ 14 が開放され、その結果、凍結保護物質と濾過された材料の合わさった組成物が、安定化要素 6 の凍結保存バッグ 7 に入る。チューブ 11 に入る濾過された材料は、所定の平均サイズを有する腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) などの構成成分を含み得る。例えば、一部の実施形態では、濾過された組成物中の構成成分の平均サイズは、約 200 μm 未満であり得る。

【0565】

キット 2 の実施形態は、図 11D に示されているように、凍結保存バッグ 7 上に口 16 を含み得る。口を使用して、材料を凍結保存バッグ 7 に添加することおよび／または材料を凍結保存バッグ 7 から除去することができる。例えば、試験試料を凍結保存バッグから除去することができる。

10

【0566】

図 12A は、キットで使用するためのバッグ 22 の実施形態の透視図を示す。バッグ 22 は、継手 24、開口セクション 26、密封セクション 21、およびポジショナー 23 を含み得る。継手 24 を使用して、バッグ 22 をチューブ 25 に連結させることができる。ポジショナー 23 は、バッグ 22 における開口部であり得る。

【0567】

バッグ、例えば収集バッグおよび／または凍結保存バッグ、ならびに付随する任意のチューブは、一般に、クリア、透明、半透明、所望される任意の色、またはこれらの組合せであり得る。バッグ、例えば、収集バッグおよび／もしくは凍結保存バッグは、ならびに／またはチューブは、一般に、密閉および／または密封血液および／または凍結保存バッグならびに付随するチューブの作製に類似した方法で作製することができる。

20

【0568】

本明細書に記載される本発明での使用のためのバッグとしては、所定の材料、例えば、熱可塑性物質、ポリオレフィンポリマー、エチレン酢酸ビニル (EVA)、コポリマーなどのブレンド、例えば、酢酸ビニルとポリオレフィンのポリマーブレンド (すなわち、Origén、医用 EVO フィルム)、EVA を含む材料、および／または密封可能なプラスチックの共押出層から製造された一部分を少なくとも含み得る、収集バッグおよび凍結保存バッグが挙げられる。

【0569】

バッグに使用するための材料は、特定の特性および／または特性、例えば、密封性、例えば、熱溶接に起因する、または無線周波エネルギーの使用に起因する、密封性；ガス透過率；可撓性、例えば、低温可撓性 (例えば、 -150°C 、または -195°C での)；弾性、例えば、低温弾性；耐薬品性；光学的透明度；生体適合性、例えば、細胞傷害性；溶血作用；耐浸出性；少ない微粒子を有すること；特定のガス (例えば、酸素および／または二酸化炭素) についての高い透過速度；および／または法的な要求事項に準拠していること、の選択のために、選択され得る。例えば、バッグに使用される材料は、ASTM D-638 に概要が示されている引張強度についての試験法に従って試験されたときに約 2500 psi (172 バール) を超える引張強度を有するものが選択され得る。具体的には、バッグなどの可撓性容器の実施形態は、ASTM D-638 に概要が示されている引張強度についての試験法に従って試験されたときに約 2800 psi (193 バール) を超える引張強度を有する使用材料を有する。

30

40

【0570】

一部の実施形態では、材料は、バッグの少なくとも一層を形成するための共押出材料に使用するために特定の特性について選択され得る。層を、構築されたときにバッグの内層が比較的生体適合性であるように、つまり、バッグの内面の材料が安定しており、バッグの内容物に浸出しないように、構築することができる。

【0571】

例えば、収集バッグ、凍結保存バッグ、および／または付随するチューブなどの、キット構成要素のための材料を選択するために使用され得る、目的の特性は、密封すること、

50

例えば、ヒートシールすることに関係し得る。

【0572】

シールを、シール剥離試験（すなわち、ASTM F88／F88M）、および／または破損試験（すなわち、ASTM F1140／F1140MもしくはASTM F2051／F2054M）を使用して、強度について試験することができる。

【0573】

一部の実施形態では、バッグまたは可撓性容器は、適正に密封され、処置および／または処理のためのデバイス内への配置時にクランプでさらに固定された場合、使用中に100ニュートンの力に耐えることができる。バッグまたは可撓性容器実施形態は、適正に密封され、処置および／または処理のためのデバイス内への配置時にクランプでさらに固定された場合、使用中に75ニュートンの力に耐えるように構築され得る。

10

【0574】

バッグ、具体的には、収集バッグおよび／または保存バッグ、の寸法は、処置および／または処理を行うために使用されるデバイスに固有のものであり得る。処置を行うために使用されるデバイスの構成および／またはサイズに基づいて、バッグサイズを調整すべきである。バッグの縁を越えて伸びる任意の構成要素、例えば、口、継手などについての配置および／またはサイズには、細心の注意を払うべきである。口などの構成要素は、処置および／または処理を行うために使用されるデバイスの操作に干渉し得る。さらに、バッグの厚さが、特に、製造シールなどのシール材料に関して、マシンの要件に確実に適合するように、注意を払うべきである。

20

【0575】

本発明におけるチューブは、ポリ塩化ビニル（PVC）を含むがこれに限定されない、任意の所望の材料から構築することができる。例えば、PVCは溶接および／または密封に有利であるので、PVCは望ましい材料であり得る。

【0576】

一部の実施形態では、図12A～12E、13A～13E、14、20A～20E、21A～21E、22A～22D、27A、28、33および34に図示されているように、収集バッグの少なくとも一方の端部は、組織を受け取るために開口していることがある。具体的には、ある実施形態では、組織試料、例えば、生検からの組織試料を、開口端部、例えば、頂端部経由でバッグに入れることができる。一部の場合には、生検試料は、動物（例えば、イヌもしくはネコなどの飼育動物）またはヒトからのがん性組織であり得る。

30

【0577】

図12Aに示されているように、バッグ22を組織収集バッグとして使用することができる。例えば、組織をバッグ内に配置した後、バッグを密封することができ、そしてその後、処理することができる。処理は、バッグ内の組織の攪拌、例えば、穏やかな攪拌、抽出、および／または酵素消化を含み得る。組織処理およびそこからの所望の材料、例えば、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の抽出は、閉鎖系の中での処理および抽出であり得る。有利なまたは好ましい実施形態は、組織を収集した患者を示すためのインジケーター、ならびに／または収集バッグが締め付けられ得る、密封され得る、デバイスによる作用を受け得る、および／もしくは機器内の適所に取り付けられ得る場所を示すためのマークを含み得る。

40

【0578】

一部の実施形態では、バッグ22は、密封可能な材料から形成され得る。例えば、バッグ22は、脂肪族もしくは半芳香族ポリアミド（例えば、ナイロン）、エチレン-酢酸ビニル（EVA）およびそのブレンド、酢酸ビニルとポリオレフィンのポリマーブレンド、熱可塑性ウレタン（TPU）、ポリエチレン（PE）、および／またはポリマーの組合せをはじめとする合成ポリマーなどのポリマーを含むがこれらに限定されない材料から形成され得る。バッグの部分を、熱、無線周波エネルギー、高周波（HF）エネルギー、誘電エネルギーなどのエネルギー、および／または当技術分野において公知の任意の他の方法

50

を用いて、密封および／または溶接することができる。

【0579】

収集バッグは、処理および／または脱凝集バッグとして使用することができる。収集バッグは、約4cm～約12cmまでの範囲の幅および約10cm～約30cmまでの範囲の幅を有し得る。

【0580】

例えば、処理に使用するための収集バッグは、約7.8cmの幅および約20cmの長さを有し得る。具体的には、バッグ、例えば、EVAポリマーおよびそのブレンド、酢酸ビニルとポリオレフィンのポリマーブレンド、および／または1つもしくは複数のポリアミド（ナイロン）を使用するバッグは、ヒートシール可能であり得る。

10

【0581】

図12Aに示されている通り、バッグ22は、本発明の処理のために組織を中に入れて密封するための組織収集バッグとして使用することができる。

【0582】

図12Bは、組織収集バッグとして使用するためのバッグ22の実施形態の斜視図を示す。組織をバッグに入れて密封し、次いで、処理することができる。図12Bに示されているバッグ22に組織試料または生検材料の取得または入手元の患者を識別することができる患者識別子などのインジケータ27、28で印をつけることができる。

【0583】

インジケータとしては、これだけに限定されないが、コード、文字、単語、名称、英数字コード、数字、画像、バーコード、クイックレスポンス（QR）コード（登録商標）、タグ、スマートトラッカータグもしくはブルートゥース（登録商標）トラッカーなどのトラッカー、および／または当技術分野で公知の任意のインジケータを挙げることができる。一部の実施形態では、インジケータは、キットの構成要素の表面に印刷する、エッチングする、および／または付着させることができる。例えば、図12Bに示されている通り、インジケータをキットのうちの少なくとも1つの構成要素の表面に直接印刷することができる。インジケータはまた、接着剤を使用してバッグ上に配置することもでき、例えば、ステッカーまたはトラッカーをある1つのバッグおよび／または複数のバッグに置くことができる。例えば、図12Bに示されている通り、バッグ22は、複数のインジケータ28（数値コード）、27（QRコード（登録商標））を含む。

20

30

【0584】

図12Cは、組織収集バッグとして使用するためのバッグの斜視図を示す。組織を処理のためにバッグ22に挿入することができる。組織試料および／または生検材料の取得または入手元の患者を識別するためにインジケータを使用することができる。図12Cに示されている通り、インジケータ27、28は、プロセスにおいて試料を追跡する、試料を特定の位置に置く、および／または試料の状態を追跡するために使用するQRコード（登録商標）および識別番号を含む。例えば、一部の実施形態では、インジケータを使用して、試料を、実験室内の任意の所定の位置に置くことができる。インジケータは、バッグに使用前および／または使用中に位置させることができ、例えば、バッグが試料との使用のために取り出されている時に、患者インジケータをバッグに刷り込むことができる。さらに、バッグ22は、マーク29を含み得る。マークは、密封、クランプ、および／または器具を配置すべき箇所を示すために使用することができる。

40

【0585】

インジケータ、例えば、QRコード（登録商標）、スマートタグなどのタグ、および／またはトラッカーを、バッグ内の試料を識別するため、ならびに、デバイスが凍結保存キットで行われる脱凝集、富化、および／または安定化プロセスの型に応じて特定のプログラムを走らせるようデバイスのプロセッサに指示するために使用することができる。これらのプロセスにおいて、異なる型の培地、例えば、酵素培地、腫瘍消化培地および／または凍結の速度制御を可能にし得る凍結保存培地を使用することができる。一部の実施形態では、凍結保存キットおよび／またはその構成要素は、自動化デバイスによって読み

50

取ることができるインジケータを含み得る。次いで、デバイスが、組織がそのようなデバイスに挿入されたら組織を処理するための特定の全自動方法を実行することができる。本発明は、試料の処理、特に自動化処理に特に有用である。

【0586】

一部の場合では、本明細書に記載の凍結保存キットおよび／またはその構成要素は、使い捨てであり得る。凍結保存キットおよび／またはその構成要素を、細胞または細胞凝集体の脱凝集、富化、および／または安定化のための自動化および／または半自動化プロセスにおいて使用することができる。一部の実施形態では、凍結保存キットで使用するためのバッグ、例えば収集バッグなどを、一部の実施形態では、複数のプロセスに使用することができる。例えば、収集バッグを異なる位置で繰り返し密封して、生検試料および／または固形組織などの組織試料を処理するための別々の区画を創出することができる。

10

【0587】

さらに、組織収集バッグなどのバッグ上の種々の位置にマークを付して、バッグの、密封、クランプ、および／または物体への取り付けを行うことができる箇所を示すことができる。一部の実施形態では、バッグの、クランプ、密封、および／または器具などの物体への取り付けを行うことができる箇所を示すマークは、バッグ上に使用前に配置することができる。例えば、製造中にバッグ上に1つまたは複数のマークを配置することができる。

【0588】

使用中にエネルギー、例えば熱を用いてシールを形成して溶接ゾーンを創出することができる。使用中に形成されるシールは、約2.5 mmから約7.5 mmまでにわたる幅を有し得る。一般に、シール140は、組織材料がバッグ140に入れられた後に形成され、約5 mmの幅を有し得る。

20

【0589】

シールを強度について剥離試験（すなわち、ASTM F88／F88M）、および／または破裂試験（すなわち、ASTM F1140／F1140MまたはASTM F2051／F2054M）を使用して試験することができる。

【0590】

一部の実施形態では、バッグまたは可撓性容器は、適切に密封され、処置および／または処理のためにデバイス内に配置された時にクランプでさらに固定されていれば、使用中に100ニュートンの力に抵抗し得る。バッグまたは可撓性容器実施形態は、適切に密封され、処置および／または処理のためにデバイス内に配置された時にクランプでさらに固定されていれば使用中に75ニュートンの力に抵抗するように構築することができる。

30

【0591】

バッグ、例えば、収集バッグおよび／または凍結保存バッグなどの可撓性容器上にシールまたは溶接部を形成する場合、シーリングデバイスを使用して、熱および／または圧力を、バッグに使用される材料に応じて所定の温度、圧力、および時間量で印加することができる。例えば、いくつかのヒートシーラーでは、熱および圧力を約8秒間印加する必要がある。8秒後、デバイスへの熱を止めることができるが、圧力をさらに2～3秒間印加することができる。

40

【0592】

図12Dは、本発明の処理のために組織を中に入れて密封するための組織収集バッグの実施形態の斜視図を示す。インジケータ27、28がバッグ22上に、使用中に使用者が患者を容易に識別することができるように配置されている。さらに、これらのインジケータを、バッグ内の材料を識別するため、ならびにバッグ内の材料に対する特定の処置方法の間に進行を追跡するために使用することができる。一部の実施形態では、バッグは、処置中、バッグ内の培地の体積を約0.1 mlから約25 mlまでの範囲内に保持し、組織の体積を約0.1 mlから約10 mlまでの範囲内に保持する。処置中のバッグ内の培地の体積の組織の体積に対する比は、約1.0から約2.5までの範囲に入るべきである。一部の実施形態では、培地の体積の組織の体積に対する比は、約1.7から約2.3

50

までの範囲内である。具体的には、培地の体積の組織の体積に対する比は約 2.0 から約 2.2 までの範囲内である。

【0593】

図 12D に示されている通り、マーク 29 は、バッグ 22 の開放端 26 に近接して配置される。マーク 29 を、バッグ上に、使用中に、組織試料および／または生検試料を処置するために使用される方法に基づいて配置することができる。マークを、バッグ上に、使用中に、例えば、使用されているもしくは使用される処理方法および／または使用される機器に基づいて位置付けることができる。一部の実施形態では、マークを、バッグ上に、製造中に配置することができる。例えば、シールおよび／またはクランプの位置に対するマークの配置は処理方法および／または処置される組織の体積に基づいて変動し得る。

10

【0594】

図 12E は、組織収集バッグの斜視図を示す。組織をバッグ 22 処理内に入れて密封することができる。継手 24 はバッグへのアクセスをもたらすことができる。示されている通り、継手 24 を他のデバイス、例えば、フィルター、バッグなどにチューブ 25 を使用して接続することができる。口 20 は、使用中、バッグ 22 から試料を取り出すため、および／またはバッグ 22 から材料を提供するために使用することができる。

【0595】

図 13A は、組織収集のために使用されるバッグの正面図を示す。使用中に組織をバッグ内に入れて密封することができる。密封された縁部 31 を有するバッグ 30 を製造することができる。図 13A に示されている通り、密封された縁部 31 が 3 つの縁部に位置し得、第 4 の縁部は開口セクション 36 を含み得る。

20

【0596】

バッグ 30 上のポジショナー 33 を使用してバッグを配置することができる。例えば、1 つまたは複数のポジショナーを使用して、バッグが使用中に適切に処置され得ることを確実にする、例えば、器具に近接して配置することができる。一部のシステムでは、ポジショナーは、自動化システムにおける本明細書に記載のバッグの使用を容易にすることができる。具体的には、ポジショナーを使用して自動化システムによってバッグを移動させることができる。

【0597】

図 13B に示されている通り、バッグ 30 は、試料を識別するために使用されるインジケータ 36、37、例えば、組織試料または生検材料の取得または入手元の患者を識別するインジケータを有し得る。QRコード（登録商標）などのインジケータ 37 の使用により、特定の試料についてプロセスステップを追跡することが可能になり得、したがって、所与のプロセスを通して試料を追うことが可能である。

30

【0598】

図 13C は、組織収集バッグの正面図を示す。組織をバッグ内に入れて密封し、その中で処置および／または処理することができる。バッグ 30 は、試料を識別するために使用されるインジケータ 37、38、例えば、組織試料または生検材料の取得または入手元の患者を識別するインジケータを有し得る。QRコード（登録商標）などのインジケータ 37 の使用により、特定の試料についてプロセスステップを追跡することが可能になり得、したがって、所与のプロセスを通して試料を追うことが可能である。ポジショナー 33 を使用してバッグ 30 を処置のために配置することができる。継手 34 は、組織、処置された組織などを他のデバイスとチューブ 35 を通じて連結することを可能にし得る。

40

【0599】

図 13D は、試料を識別するために使用されるインジケータ 37、38 を有する組織収集バッグの正面図を示す。QRコード（登録商標）などのインジケータ 37 の使用により、特定の試料についてプロセスステップを追跡することが可能になり得、したがって、所与のプロセスを通して試料を追うことが可能である。マーク 39 および／またはポジショナー 33 を使用して、処理および／または処置中のバッグの配置を制御することができる。マークは、使用中にバッグを配置、シールおよび／またはクランプする箇所を示す

50

ために、開放端に近接して位置付けられる。密封された縁部 31 を有するバッグ 30 を製造することができる。図 13D に示されている通り、密封された縁部 31 が 3 つの縁部に位置し得、第 4 の縁部は開口セクション 36 を含み得る。

【0600】

図 13E は、その中に組織を入れた後に密封することができる組織収集バッグの正面図を示す。継手 34 および口 32 はバッグへのアクセスをもたらすことができる。培地および／もしくは試薬の投入ならびに／またはバッグからの試料の抽出が可能になるように、収集バッグ上に 1 つまたは複数の口を配置することができる。

【0601】

示されている通り、継手 34 は、他のデバイス、例えば、フィルター、バッグなどと、チューブ 35 を使用して連結することができる。使用に応じて、マークおよびインジケータをバッグの 1 つまたは複数の側面に位置付けることができる。具体的には、図 13E に示されている通り、ポジショナー 33、マーク 39、および／またはインジケータ 37、38 を使用して、バッグ 30 を、攪拌の適用、密封、例えばヒートシーリングによるもの（処理のための器具の一部であり得る）、処理および／または抽出のための材料の添加などの処理のために配置することができる。有利に、処理の適用前に、収集バッグを処理のために器具にクランプするもしくは取り付けるとともに密封する、例えば、ヒートシールする。

【0602】

図 14 は、組織収集のためのバッグの背面図を示す。具体的には、バッグ 40 を、その中に組織を配置して密封し、処理することができる。シールは開放端 46 に近接して、それと実質的に平行に配置することができる。示されている通り、継手 44 を他のデバイス、例えば、フィルター、バッグなどにチューブ 46 を使用して接続することができる。密封された縁部 41 を有するバッグ 40 を製造することができる。図 14 に示されている通り、密封された縁部 41 が 3 つの縁部に位置し得、第 4 の縁部は開口セクション 46 を含み得る。ポジショナー 43 を製造された密封された縁部 41 で囲むことができる。

【0603】

図 15 は、その中に組織を入れて密封することができ、バッグの使用中に組織を処理することを可能にする、組織収集に使用するためのバッグ 50 の側面図を示す。バッグ 50 をチューブ 54 に継手 52 によって連結することができる。

【0604】

図 16A は、密封されていない組織収集バッグの上面図を示す。バッグ 60 は、密封された部分 66 と開口部分 64 とを含み得る。継手 62 がバッグ 60 を通して見える。組織をバッグに入れた後、バッグ 60 の上部の開口部分を密封することができる。

【0605】

図 16B は、処理のためにその中に組織を入れて密封するための密封された縁部 66 を有する組織収集バッグ 60 の底面図を示す。継手 62 がバッグ 60 上に見える。

【0606】

図 17A は、部分的に開口したバッグの上面図を示す。バッグ 70 は、密封された部分 76 と開口部分 74 とを含み得る。継手 72 がバッグ 70 を通して見える。組織をバッグに入れた後、バッグ 70 の上部の開口部分を密封することができる。

【0607】

図 17B は、処理のためにその中に組織を入れて密封するための組織収集バッグの底面図を示す。継手 72 がバッグ 70 上に見える。

【0608】

図 18A は、部分的に開口したバッグの上面図を示す。組織をバッグ 80 の開放端 84 を通じて挿入することができる。バッグ 80 の底部に配置された継手 82 が示されている。

【0609】

図 18B は、組織を収集および／または処理するための、完全に開口したバッグの上面

10

20

30

40

50

図を示す。バッグ 80 の開放端 84 は、処置、単離、および／または分離などの処理のために組織を受け取ることができる。密封された縁部 86 は製造中に創出することができる。

【0610】

図 19A は、バッグの側面に密封された縁部 96 を有する部分的に開口したバッグ 90 の上面図を示す。示されている通り、組織をバッグ 90 の開放端 94 を通じて挿入することができる。バッグ 90 の底部に配置された継手 92 が示されている。

【0611】

図 19B は、組織を収集および／または処理するための、バッグの側面に密封された縁部 96 を有する完全に開口したバッグの上面図を示す。バッグ 90 の開放端 94 は、処置、単離、および／または分離などの処理のために組織を受け取ることができる。バッグ 94 の底部に配置された継手 92 が示されている。

【0612】

図 20A～20E は、組織収集バッグの実施形態の正面図を示す。図 20A に示されている通り、密封された縁部 101 と開放端 102 とを有するバッグ 100 をデバイス（描かれていない）にチューブ 105 および／または継手 104 によって接続することができる。例えば、継手 104 をバッグ 100 内に配置し、一方、y 形継手 106 をチューブに沿って配置することができる。図 20B は、インジケータ 107、108 を含み、したがって、使用者が組織試料または生検材料の取得または入手元の患者を識別することができるさらなるバッグ 100 の実施形態を示す。

【0613】

さらに、マーク 109 およびインジケータ 107、108 を含むバッグ 100 の実施形態が図 20C に示されている。ポジションナー 103 の使用により、バッグの一貫した配置が可能になり得、それにより、バッグ内での組織の一貫した処理が可能になる。インジケータ 107、108 は、試料および／または患者の情報のいずれかで試料を識別するものである。一部の場合では、インジケータを使用して、組織試料および／または生検試料などの試料を識別および／または追跡することができる。図 20D は、複数のインジケータ 107、108 およびマーク 109 を有するバッグ 100 を示す。マークは、バッグ 100 が密封される箇所を示し得る。例えば、マーク 109 は、バッグ 100 が密封される、クランプされる、および／または別のデバイスと連結されるべき箇所を示し得る。密封のためのマークは、バッグの開口縁部に近接して配置することができ、例えば、そのようなマークを、開口縁部から所定の距離に配置することができる。一部の実施形態では、密封のためのマークは、開口縁部と実質的に平行であり得る。示されている通り、バッグ 100 は、継手 104 およびチューブ 105 を含み得る。

【0614】

図 20E に示されている実施形態では、バッグ 100 は、口 110 および継手 104 を含む。口は、材料の添加および／または試料からの材料の取り出しを可能にし得る。例えば、組織の処理中、処理全体を通して試料を複数回取り出すことができる。さらに、口 110 は、バッグ 100 への培地および／または試薬の無菌での投入を可能にし得る。

【0615】

図 21A は、組織を収集および／または処理するためのバッグ 100 の正面図を示す。組織をバッグ 100 に開放端 102 を通じて入れることができる。継手 104 を使用してバッグ 100 をチューブ 105、およびクランプ 112 と連結することができる。

【0616】

図 21B～21E は、さらなるバッグ 100 の実施形態の正面図を示す。図 21B～21D は、インジケータ 107、108 および／またはマーク 109 を含む種々の構成を示す。バッグは、インジケータ、例えば、コード、文字、単語、名称、英数字コード、数、画像、バーコード、クイックレスポンス（QR）コード（登録商標）、タグ、スマートトラッカータグもしくはブルートゥース（登録商標）トラッカーなどのトラッカー、および／または当技術分野で公知の任意のインジケータなどを含み得る。一部の実施形態

では、インジケータは、キットの構成要素の表面に印刷する、エッチングする、および／または付着させることができる。インジケータは接着剤を使用してバッグ上に配置することもでき、例えば、ステッカーまたはトラッカーをある1つのバッグおよび／または複数のバッグに置くことができる。収集バッグおよび／または凍結保存キットは、数値コードおよび／またはQRコード（登録商標）などの複数のインジケータを含み得る。

【0617】

インジケータ、例えば、QRコード（登録商標）、スマートタグなどのタグ、および／またはトラッカーを、バッグ内の試料を識別するため、ならびに、デバイスが凍結保存キットで行われる脱凝集、富化、および／または安定化プロセスの型に応じて特定のプログラムを走らせるようデバイスのプロセッサに指示するために使用することができる。

10

【0618】

図21Eは、材料を収集、処理、処置、および／または単離するために使用されるバッグ100の別の実施形態の正面図を示す。処置される組織をバッグ100内に入れて密封することができる。チューブ105はバッグ100を継手104によってクランプ112に連結することができる。口114は、投入および／またはバッグ100からの取り出しを可能にし得る。例えば、口は、試料採取を可能にし得る、および／または凍結保存キットのバッグなどの可撓性容器への培地および／もしくは試薬の無菌での投入を可能にし得る。

【0619】

図22Aは、処理のためにその中に組織を入れて密封するための密封された縁部121を有する組織収集バッグ120の別の実施形態の正面図を示す。バッグ120は、チューブ125と連結したポジショナー123および継手124を含む。

20

【0620】

図22Bは、密封された縁部121と開放端122とを有する組織収集バッグ120の正面図を示す。インジケータ127、128は、自動化システムによって容易にアクセスできるようにバッグ120上に配置することができる。開口部を規定するポジショナー123を密封された縁部121で囲むことができる。インジケータを使用して、組織試料または生検材料の取得または入手元の患者を識別することができる。

【0621】

図22Cに示されている通り、バッグ120は、インジケータ127、128およびマーク129を含む。図22Dは、複数のマーク129を有する収集バッグ120を示す。密封のためのマークは、バッグの開口縁部に近接して配置することができる。そのようなマークを、開口縁部から所定の距離に配置することができる。一部の実施形態では、密封のためのマークは、開口縁部と実質的に平行であり得る。

30

【0622】

図23は、バッグ130の底部がページの上部に見え、チューブ135が継手134から出てくるように配置された、密封されたバッグ130の正面図を示す。バッグ130は、バッグ130の密封された部分131上にインジケータ137を含む。密封された部分上のインジケータは、バッグ130を密封している間および／またはその後に配置することができる。一般に、バッグは、組織が提供された後に密封される。バッグ130の表面上のインジケータ138はバーコードであり得る。ポジショナー133を継手134に近接して配置することができる。

40

【0623】

収集バッグおよび／または凍結保存バッグなどのバッグならびに任意の付随するチューブは、一般に、クリア、透明、半透明、所望の任意の色、またはこれらの組合せであり得る。組織収集バッグおよび／またはチューブは、一般に、閉鎖および／または密封された血液および／または凍結保存バッグならびに付随するチューブの製作と類似したやり方で製作することができる。本発明のチューブは、これだけに限定されないが、ポリ塩化ビニル（PVC）を含めた任意の所望の材料から構築することができる。例えば、PVCは溶接および／または密封に有利であるので、PVCが所望の材料であり得る。

50

【0624】

本発明の組織収集バッグなどの収集バッグは、ポリオレフィンポリマー、エチレン酢酸ビニル（EVA）、酢酸ビニルとポリオレフィンのポリマーブレンド（すなわち、Origin Biomedical EVOフィルム）などの共重合体、および／またはEVAを含む材料などの所定の材料で製造された組織の受け取りのためのバッグの少なくとも一部分を含み得る。バッグに使用するための材料は、特定の性質および／または性質の選択、例えば、密封可能性、例えばヒートシール可能性、気体透過性、可撓性、例えば低温可撓性、弾性、例えば低温弾性、耐薬品性、光学的透明度、生体適合性、例えば細胞傷害性、溶血活性、浸出に対する抵抗性、低粒子を有することに関して選択することができる。

10

【0625】

図24に示されている通り、バッグ140は、複数のマーク141、142を含み得、これらは、マークを含む領域が密封された時に、バッグ140内に区画143が形成され得るように位置付けられている。バッグ140は、使用中の試料区画の形成に使用することができる、バッグの製造中に形成される予め溶接されたセクション145を有する。図24は、複数の区画を有するように形成することができる収集バッグの実施形態を示す。複数のシールおよび／または溶接部（例えば、ヒートシールされる）を位置付けることにより、バッグ内に各区画を形成することができる。例えば、腫瘍浮遊液を収集バッグに入れた後、開放端を溶接して閉じ、溶接線142などの追加のマーク141を熱などのエネルギーを使用して溶接して区画を形成することができる。

20

【0626】

バッグ140上のポジショナー143により、バッグがRFヒートシーラーのようなシーリングデバイスおよび／または注射器などの器具に対して正確に配置されることが確実になる。

【0627】

使用中にエネルギー、例えば熱を用いてシールを形成して溶接ゾーンを創出することができる。使用中に形成されるシールは、約2.5mmから約7.5mmまでにわたる幅を有し得る。一般に、シール140は、組織材料がバッグ140に入れられた後に形成され、約5mmの幅を有し得る。

【0628】

シールを強度についてシール剥離試験（すなわち、ASTM F88／F88M）、および／または破裂試験（すなわち、ASTM F1140／F1140MまたはASTM F2051／F2054M）を使用して試験することができる。

30

【0629】

一部の実施形態では、バッグまたは可撓性容器は、適切に密封され、処置および／または処理のためにデバイス内に配置された時にクランプでさらに固定されていれば、使用中に100ニュートンの力に抵抗し得る。バッグまたは可撓性容器実施形態は、適切に密封され、処置および／または処理のためにデバイス内に配置された時にクランプでさらに固定されていれば使用中に75ニュートンの力に抵抗するように構築することができる。

【0630】

バッグ、例えば、収集バッグおよび／または凍結保存バッグなどの可撓性容器上にシールまたは溶接部を形成する場合、シーリングデバイスを使用して、熱および／または圧力をバッグに使用される材料に応じて所定の温度、圧力、および時間量で印加することができる。例えば、いくつかのヒートシーラーでは、熱および圧力を約8秒間印加する必要がある。8秒後、デバイスへの熱を止めることができるが、圧力をさらに2～3秒間印加することができる。

40

【0631】

一部のシステムでは、ポジショナーは、自動化システムにおける本明細書に記載のバッグの使用を容易にすることができる。したがって、バッグ140に入れられた組織を別々の区画144、146、147に分けることができる。示されている通り、各区画144

50

、146、147は、それぞれ口148、149、150を含む。各口は、区画内への直接アクセスを可能にし得る。これにより、試料の個別化された添加、バンキング、および／または試験が可能になり得る。例えば、密封された収集バッグは、TILのバンキングならびに適合性および／または複合試料の微生物学的性質についての試験を容易にすることができる。この型の試験には消化された材料の少量の一定分量を収集バッグ内に入れて凍結させることが必要であり得るので、したがって、消化された材料の少量の一定分量を別々に解凍することができる。一部の実施形態では、図24に示されているバッグ140を収集バッグおよび／または凍結保存バッグとして使用することができる。

【0632】

図25は、収集バッグの実施形態の正面図を示す。この実施形態では、収集バッグ152は約150mm（すなわち、15cm）の長さおよび約90mm（すなわち、9cm）の幅を有する。バッグ152は、ポジショナー160の働きをする開口部を含む。使用中にバッグが処理および／または処置のために適切に配置されること、例えば、器具に近接して配置することを確実にするために、1つまたは複数のポジショナーを使用してバッグの配置方向を制御することができる。一部のシステムでは、ポジショナーは、自動化システムにおける本明細書に記載のバッグの使用を容易にすることができる。具体的には、ポジショナーを使用して自動化システムによってバッグを移動させることができる。シール156は約5mmである。シールを使用中にエネルギー、例えば熱を使用して形成して、溶接ゾーンを創出することができる。シールの幅は約2.5mmから約7.5mmまでの範囲内であり得る。一般に、シール156は組織材料がバッグ152に入れられた後に形成される。図25に示されている通り、バッグ152は、バッグの製造中に形成される予め溶接されたセクション158を有する。

【0633】

図26に示されている通り、収集バッグをチューブおよび弁に連結することができる。一部の実施形態では、バッグは、約10cmから約50cmまでの範囲の長さを有し得る。具体的には、本明細書に記載の発明に使用するためのバッグは、約15cmから約30cmまでの範囲の長さを有し得る。例えば、バッグは、約18cmから約22cmまでの範囲の長さを有し得る。図26に示されているバッグ162は、約20cmの長さを有する。本明細書に記載の通り使用するための収集バッグは、約6.8cmから約8.8cmまでの範囲の幅を有し得る。図26に示されている通り、収集バッグ162は、約7.8cmの幅を有する。これだけに限定されないが無針弁を含めた弁をチューブに沿った点で 사용할ことができる。例えば、無針弁164を、チューブ166によって連結したバッグ162からおよそ20cmのところに配置する。チューブ166は無針弁164から別の要素または構成要素が付加される少なくとも10cm手前まで伸長する。

【0634】

図27Aに示されている通り、開口バッグ170を使用前にチューブ172、174、176に連結する。バッグ170は、密封可能な材料から構築することができる。具体的には、バッグは、例えばペンチトップヒートシーリングデバイスなどのヒートシーラーを使用して密封可能なものであり得る。一部のチューブ、例えば、チューブ174は、溶接可能でないものであり得る。これだけに限定されないが無針弁を含めた弁をチューブに沿った点で 사용할ことができる。例えば、無針弁178をチューブ174、176の末端に配置する。

【0635】

一部の実施形態では、バッグは、約10cmから約50cmまでの範囲の長さを有し得る。具体的には、本明細書に記載の発明に使用するためのバッグは、約15cmから約30cmまでの範囲の長さを有し得る。例えば、バッグは、約18cmから約22cmまでの範囲の長さを有し得る。図27Aに示されているバッグ170は、約20cmの長さを有する。

【0636】

図27Bは、例えば、材料をバッグ内に投入した後に密封された収集バッグの実施形態

の正面図を示す。バッグ180は密封可能な材料から構築される。具体的には、バッグは、例えばベンチトップヒートシーリングデバイスなどのヒートシーラーを使用して密封可能なものであり得る。シールは、バッグの開口縁部に近接して配置することができる一部の 경우에는、マークを、開口縁部から所定の距離に配置することができる。一部の実施形態では、シールは開口縁部と実質的に平行であり得る。

【0637】

一部のチューブ、例えば、チューブ182、184、186は、溶接可能なものであり得る。溶接可能なチューブは、ポリマー材料、例えば、ポリ塩化ビニル（PVC）で製造されたものであり得る。

【0638】

これだけに限定されないが無針弁を含めた弁をチューブに沿った点で 사용할 ことができる。例えば、無針弁188をチューブ184、186の末端に配置する。一部の実施形態では、バッグは、約10cmから約40cmまでの範囲の長さを有し得る。具体的には、本明細書に記載の発明に使用するためのバッグは、約15cmから約30cmまでの範囲の長さを有し得る。例えば、バッグは、約18cmから約22cmまでの範囲の長さを有し得る。図27Aに示されているバッグ180は、約20cmの長さを有する。

【0639】

図28に示されている通り、凍結保存キットの実施形態が上向きに示されており、開口バッグ190および凍結保存バッグ192が含まれる。示されている通り、凍結保存バッグ192は、インジケータ193、194を含み得る。凍結保存バッグは、ジメチルスルホキシド（「DMSO」）などの凍結保護物質を用いた凍結保存に好適であることが必要であり得る。一部の実施形態では、凍結保存バッグは、バッグが材料の体積を約5mlから約45mlまでの範囲内に保持し得るように構築することができる。具体的には、凍結保存バッグは、約10ml～約35mlの範囲の体積の材料を収容することができる。例えば、一部の実施形態は、約15ml～約30mlの範囲の体積の保管される材料を収容することができる凍結保存バッグを含む。凍結保存バッグ192は、所望の所定の体積が実現されるようなサイズにされたものであり得る。一部の実施形態では、凍結保存バッグは、約4cmから約11cmまでの範囲の幅、および約10cmから約18cmまでの範囲の長さを有し得る。例えば、凍結保存バッグは、約5.8cmから約9.8cmまでの範囲の幅、および約12cmから約16cmまでの範囲の長さを有し得る。具体的には、図28に示されている凍結保存バッグの実施形態は、約7.8cmの幅および約14cmの長さを有し得る。

【0640】

凍結保存キットおよび／またはその特定の構成要素を使用前に滅菌することができる。例えば、バッグ190、192を滅菌することができる。バッグ190、192を形成するために使用される材料は、ヒートシール可能なものであり得る。バッグに使用する材料としては、これだけに限定されないが、EVA、ポリアミド（例えば、ナイロン）およびこれらの組合せなどのポリマーを挙げることができる。開口バッグ190は、シールおよび／またはクランプ（示されていない）を使用してバッグを閉じた後、処理および／または脱凝集のために使用することができる。

【0641】

キット191は、弁195、196、クランプ197、198、チューブ199、およびフィルター200をさらに含む。フィルター200は、インラインフィルター、血液投与フィルターなどの血液フィルター、生物学的フィルター、および／またはインライン凝集塊除去フィルターであり得る。フィルターは、所定のサイズを上回る材料を処理された組織から除去して所望の材料を形成するように構成することができる。例えば、組織の塊を脱凝集された組織からフィルターを使用して分離することができる。具体的には、濾過された後にチューブに入る組織組成物は、平均サイズが約200μm未満の構成物を有し得、したがって、所望の材料が形成される。例えば、所望の材料は、平均サイズが約170μm未満のTIL（腫瘍浸潤リンパ球）を含み得る。

10

20

30

40

50

【0642】

フィルターは、チューブから入ってくる処理された組織組成物を富化することができ、したがって、フィルターの後に、約15 μm から約500 μm までの範囲のサイズを有する構成物を有する所望の材料がチューブ中に安定化要素の方向に流れ込むように選択することができる。一部の実施形態では、フィルターを、濾過された後に安定化要素の方向にチューブに入る組織組成物が、約50 μm から約300 μm までの範囲のサイズを有する構成物を有するように構成することができる。例えば、ある実施形態では、フィルターを、濾過された後にチューブに入る組織組成物が、約150 μm から約200 μm までの範囲のサイズを有する構成物を有するように構成することができる。

【0643】

一部の実施形態では、富化要素のフィルターにより、約5 μm から約200 μm までにわたる所定のサイズから外れる材料を処理された組織から除去して所望の材料を形成することができる。例えば、所望の材料は、平均約5 μm から約200 μm までの範囲のサイズを有するTIL（腫瘍浸潤リンパ球）を含み得る。弁195、196を収集バッグから所定の距離に位置付けることができる。例えば、無針弁195を収集バッグ190から約20 cmのところに配置することができる。無針弁などの弁を使用して材料を収集バッグ190に添加することができる。例えば、酵素培地を収集バッグ190に添加するために、当該培地を無針弁195に挿入することができる。

【0644】

一部の実施形態では、そのような弁の後に、凍結保存キットの追加の構成要素上での溶接のための空間を可能にするために所定量のチューブが存在し得る。例えば、一部の弁の後、次の要素の前に少なくとも10 cmのチューブを配置することができる。チューブ199は密封可能および／または溶接可能であり得る。例えば、チューブの材料としては、これだけに限定されないが、PVC（ポリ塩化ビニル）、および／または当技術分野で公知の他の材料を挙げることができる。一部の実施形態では、チューブを、継手に合うサイズにすることができる。例えば、チューブは、約1.5 mmから約4.5 mmまでの範囲の内径、および約2.1 mmから約6.1 mmまでの範囲の外径を有し得る。例えば、凍結保存キットの実施形態は、約2.9 mmから約3.1 mmまでの範囲の内径、および約4.0 mmから約4.2 mmまでの範囲の外径を有するチューブを含み得る。凍結保存キット191に使用されるチューブは長さが変動し得、個々のチューブ要素は約1 cmから約30 cmまでの範囲の長さを有する。例えば、図28に示されている通り、個々のチューブ要素の長さは約5 cmから約20 cmまで変動し得る。

【0645】

図28に記載されているクランプ197、198を使用して、酵素培地および／または消化された組織がフィルター内に移動することを阻害および／または防止することができる。例えば、クランプ197を使用して、所望の濾過ステップの前に酵素培地および／または消化された組織がフィルター内に移動することを阻害および／または防止することができる。クランプ198により、凍結保護剤のフィルター内への望ましくない移動を阻害および／または防止することができる。

【0646】

図29は、図28に示されているキット191と同様の凍結保存キットの実施形態の上面図を示すが、キット201は下向きである。図29は、収集バッグ202を閉じることができる箇所を示す。

【0647】

図30は、閉鎖収集バッグ206および凍結保存バッグ208を含む上向きの凍結保存キットの実施形態の上面図を示す。一部の実施形態では、凍結保存バッグ208は、試料採取を可能にし、凍結保存バッグへの培地および／または試薬の無菌での投入を可能にする口215、216を含み得る。凍結保存キット205は、フィルター214、弁209、210、クランプ211、212およびチューブ222を含み得る。

【0648】

フィルター 214 は、インラインフィルター、生物学的フィルター、血液投与フィルターなどの血液フィルターおよび／またはインライン凝集塊除去フィルターであり得る。フィルターは、所定のサイズを上回る材料を除去するように構成することができる。例えば、組織の塊を脱凝集された組織からフィルターを使用して分離することができる。フィルターは、フィルターの後にチューブに入る組織組成物が、約 15 μm から約 500 μm までの範囲のサイズを有する構成物を有し得るように選択することができる。一部の実施形態では、フィルターを、濾過された後にチューブに入る組織組成物が、約 50 μm から約 300 μm までの範囲のサイズを有する構成物を有するように構成することができる。例えば、ある実施形態では、フィルターを、濾過された後にチューブに入る組織組成物が、平均約 150 μm から約 200 μm までの範囲のサイズを有する構成物を有するように構成することができる。具体的には、濾過された後にチューブに入る組織組成物は、平均サイズが約 170 μm 未満の構成物を有し得る。

10

【0649】

弁 209、210 は、収集バッグから所定の距離に位置付けることができる。例えば、無針弁 209 を収集バッグ 206 から約 20 cm のところに配置することができる。無針弁などの弁を使用して材料を収集バッグ 206 に添加することができる。例えば、酵素培地を収集バッグ 206 に添加するために当該培地を無針弁 209 に挿入することができる。

【0650】

一部の実施形態では、そのような弁の後に、凍結保存キットの追加の構成要素上での溶接のための空間を可能にするために所定量のチューブが存在し得る。例えば、一部の弁の後、次の要素の前に少なくとも 10 cm のチューブを配置することができる。チューブ 222 は密封可能および／または溶接可能であり得る。例えば、チューブの材料としては、これだけに限定されないが、PVC および／または当技術分野で公知の他の材料を挙げることができる。一部の実施形態では、チューブを、継手に合うサイズにすることができる。例えば、チューブは、約 1.5 mm から約 4.5 mm までの範囲の内径、および約 2.1 mm から約 6.1 mm までの範囲の外径を有し得る。例えば、凍結保存キットの実施形態は、約 2.9 mm から約 3.1 mm までの範囲の内径、および約 4.0 mm から約 4.2 mm までの範囲の外径を有するチューブを含み得る。凍結保存キット 205 に使用されるチューブは長さが変動し得、個々のチューブ要素は約 1 cm から約 30 cm までの範囲の長さを有する。例えば、図 30 に記載されている通り、個々のチューブ要素の長さは約 5 cm から約 20 cm まで変動し得る。

20

30

【0651】

図 30 に示されているクランプ 211、212 を使用して、酵素培地および／または消化された組織がフィルター内に移動することを阻害および／または防止することができる。例えば、クランプ 211 を使用して、所望の濾過ステップの前に培地酵素溶液および／または消化された組織がフィルター内に移動することを阻害および／または防止することができる。クランプ 212 により、凍結保護剤のフィルター内への望ましくない移動を阻害および／または防止することができる。

【0652】

図 31 は、閉鎖収集バッグ 226 および凍結保存バッグ 228 を含む上向きの凍結保存キットの実施形態の側面図を示す。凍結保存バッグ 228 は、口 242 を含み得る。口 242 は、凍結保存バッグ 228 へのアクセスをもたらす。弁 232、238 およびクランプ 234、236 は、フィルター 230 の周囲に配置し、凍結保存キット 224 内の流体の移動を制御するために使用することができる。

40

【0653】

図 32 は、凍結保存キットの実施形態の端面図を示す。密封されたバッグ 226 およびフィルター 230 を見ることができる。密封されたバッグ 226 をフィルター 230 に、チューブ、弁、および／またはクランプを使用して連結することができる。

【0654】

50

図 3 3 は、収集バッグの実施形態の上面図を示す。バッグ 2 3 2 は、開口として示されており、インジケータ 2 3 4、2 3 6 およびマーク 2 3 8、2 4 0 を含む。マークを使用して、バッグのどこ部分を密封および／またはクランプすべきかを示すことができる。密封のためのマークは、バッグの開口縁部に近接して配置することができる。そのようなマークを、開口縁部から所定の距離に配置することができる。一部の実施形態では、密封のためのマークは、開口縁部と実質的に平行であり得る。

【0 6 5 5】

バッグ 2 3 2 は、ポジショナー 2 4 4 および継手 2 4 6 を含む。継手 2 4 6 は、バッグ 2 3 2 をチューブ 2 4 8 に連結する。継手 2 4 6 は、チューブ 2 4 8 を、クランプ 2 5 4、2 5 6 および／または口 2 5 8、2 6 0 を含むチューブ 2 5 0、2 5 2 に分けることを可能にし得る。

【0 6 5 6】

図 3 4 は、収集バッグ 2 6 4、クランプ 2 6 6、2 6 8、フィルター 2 7 0、チューブ 2 7 2、口 2 7 4、2 7 6、弁 2 7 8、継手 2 8 0、および凍結保存バッグ 2 8 2 を含む凍結保存キットの実施形態の正面図を示す。収集バッグおよび付随するチューブは少なくとも一部 EVA 材料を使用して形成することができる。一部の実施形態では、収集バッグおよび／またはチューブを EVA から形成することができる。クランプ 2 6 6、2 6 8 はピンチクランプであり得る。継手 2 8 0 は 4 方向継手であり、フィルター 2 7 0 からのチューブを弁 2 7 8、例えば無針弁に、ならびに、凍結保存バッグ 2 8 2 と連結したチューブに連結するために使用することができる。

【0 6 5 7】

図 3 5 は、収集バッグ 2 8 4、口 2 8 6、クランプ 2 8 8、2 9 6、弁 2 9 0、2 9 2、フィルター 2 9 8、および凍結保存バッグ 2 9 4 を含む凍結保存キットの実施形態の正面図を示す。示されている通り、弁 2 9 0、2 9 2 は、処理中に、キットで使用するための材料を受け取ることができる無針弁であり得る。例えば、弁 2 9 0、2 9 2 を介して提供される材料としては、例えば、腫瘍消化培地および／またはジメチルスルホキシド（「DMSO」）および／もしくは 5 5 % DMSO などのその溶液および 5 % デキストラン凍結保存培地（例えば、Blood Stor 5 5 - 5）などの凍結保護物質もしくは凍結保存培地が挙げられる。シリンジ 3 0 0、3 0 2 を使用して、それぞれ腫瘍消化培地ならびに 5 5 % DMSO などの 5 5 % DMSO 溶液および 5 % デキストラン凍結保存培地を、無針弁 2 9 0、2 9 2 を通して提供することができる。処理中、材料を選択的に凍結保存キットに所定の時間に提供することができる。さらに、クランプを使用して、収集バッグ、フィルター、および／または凍結保存バッグなどのデバイスに所定の時間に提供される腫瘍消化培地および／または DMSO 溶液などの凍結保護物質などの提供される材料の流れを制御することができる。

【0 6 5 8】

図 3 6 A は、消化装置などのデバイスに固定することができる凍結保存キットの実施形態の正面図を示す。示されている通り、使用中、収集バッグ 3 0 4 がブラケット 3 0 6 に少なくとも部分的に囲まれている。ブラケットにより、処理が効率的に行われるように収集バッグ 3 0 4 を配置することができる。図 3 6 A は、溶接 3 1 0 を有し、使用中、溶接 3 1 0 に近接するクランプ 3 1 2 を利用して溶接 3 1 0 に対する圧力を低下させる収集バッグ 3 0 4 を示す。使用中に導入される組織は収集バッグ 3 0 4 内に実質的に一様に分布し得、したがって、デバイスでパドル 3 1 4、3 1 6 を使用して組織を処置することができる。凍結保存バッグ 3 3 0 は複数のセクション 3 3 2 を有し、各々がそれら独自の口 3 3 4 を有する。

【0 6 5 9】

ブラケットを使用して固定された収集バッグの実施形態の側面図が図 3 6 B に示されている。ブラケット 3 3 6 を使用して収集バッグを固定することができる。ブラケット 3 3 6 は、ヒンジ 3 3 8、上部側面 3 4 0、底部側面 3 4 2、クランプ 3 4 4、突出部 3 4 6 およびラッチ 3 4 8 を含む。使用中、クランプ 3 4 4 は、収集バッグ上の溶接部に近接し

10

20

30

40

50

て配置することができる（図 3 6 A）。ブラケット 3 3 6 上の突出部 3 4 6 は、使用中、収集バッグの表面に近接して配置され、収集バッグ内に突出するように構築する。一部の実施形態では、突出部 3 4 6 により、使用中の組織および／または培地の移動を低減および／または阻害して、組織の処理が収集バッグの長さに沿って実質的に同様になることを確実にすることができる。例えば、突出部は、組織がパドル（図 3 6 A に示されている）の間を滑ることを低減および／または阻害するように構築することができる。ブラケット 3 3 6 は、収集バッグが固定されることを確実にするために、ラッチ 3 4 8 も含み得る。

【0 6 6 0】

図 3 6 C は、収集バッグで使用するための隆起 3 5 0 を含むクランプ 3 4 4 の分解組立図を示す。具体的には、使用中、クランプ 3 4 4 を収集バッグ上の溶接部に近接して配置して、溶接および／または密封の失敗のリスクを低減することができる。

10

【0 6 6 1】

図 3 7 は、収集バッグ 3 5 4、フィルター 3 5 6、弁 3 6 2、3 6 4、クランプ 3 5 8、3 6 0、チューブ 3 6 8、および凍結保存バッグ 3 6 6 を含む凍結保存キットの実施形態の上面図を示す。凍結保存キット 3 5 2 の種々の構成要素間のチューブの長さは変動し得る。

【0 6 6 2】

図 3 8 は、収集バッグ 3 5 4、フィルター 3 5 6、弁 3 6 2、3 6 4、クランプ 3 5 8、3 6 0、チューブ 3 6 8、および凍結保存バッグ 3 6 6 を含む、下向きに配置された凍結保存キットの実施形態の図を示す。

20

【0 6 6 3】

特定の実施形態では、2 つまたはそれよりも多くのバッグを連結して、脱凝集産物が適切に保管され得ることを確実にすることができる。

【0 6 6 4】

一部の実施形態では、本発明は、組織、例えば哺乳動物の固形組織からの細胞および／または細胞凝集体の半自動化無菌脱凝集、富化、および／または安定化のための自動化デバイスを含み得る。本発明で使用するための自動化デバイスは、プログラム可能なプロセッサおよび凍結保存キットを含み得る。一部の実施形態では、凍結保存キットは、使い捨ての無菌キットであり得る。本発明は、さらに、半自動無菌組織処理方法に関する。

【0 6 6 5】

一部の実施形態では、収集バッグなどのバッグを収集キットに使用することができる。バッグは、組織試料などの試料の添加を可能にする開放端を有する。収集キットにおいて、継手によりバッグをチューブに連結することができる。チューブ材料は密封可能および／または溶接可能であり得る。例えば、チューブを熱、無線周波数などのエネルギーを使用して密封することができる。チューブ材料は P V A で製造されたものであり得る。

30

【0 6 6 6】

一部の実施形態では、チューブを弁に連結して、これだけに限定されないが、コラゲナーゼ、トリプシン、リパーゼ、ヒアルロニダーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、L i b e r a s e H I、ペプシン、またはそれらの混合物を含めた 1 つまたは複数の培地酵素溶液の添加を可能にすることができる。例えば、弁は無針弁であり得る。

40

【0 6 6 7】

凍結保存キットに使用されるチューブは、約 3 . 0 mm から約 5 . 0 mm までの範囲の外径を有するチューブを含み得、チューブは内径が約 2 . 0 mm から約 4 mm までの範囲である。具体的には、チューブは、4 . 1 + / - 0 . 1 mm の外径および約 3 . 0 + / - 0 . 1 mm の内径を有し得る。チューブの長さは、収集キットの構成に依存し得る。例えば、収集キットのある実施形態は、約 1 0 c m から約 2 0 c m までの範囲の長さを有するチューブを含み得る。

【0 6 6 8】

収集キットの一部の実施形態では、プロトタイプは、組織および／または酵素培地の移動を阻害および／または防止するための 1 つまたは複数のクランプを含み得る。具体的に

50

は、酵素培地および／または組織が濾過ステップの前にフィルター内に移動することを阻害することができる。

【0669】

本発明を以下の番号を付したパラグラフによってさらに記載する：

【0670】

1. 哺乳動物の固形組織を含む材料の受け取りおよび処理のための脱凝集モジュールと、脱凝集固形組織材料の濾過ならびに脱凝集されていない組織および濾液の離隔のための必要に応じた富化モジュールと、脱凝集産物を必要に応じてさらに処理および／または保管するための安定化モジュールとを含む使い捨ての無菌キットであって、前記モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器を含み、1つまたは複数の可撓性容器が、それらの間の組織材料の流れを可能にするように適合された1つまたは複数の導管により接続されており、前記モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器への培地および／または試薬の無菌での投入を可能にするための1つまたは複数の口を含む、使い捨ての無菌キット。

10

【0671】

2. 1つまたは複数の可撓性容器が、弾性の変形可能な材料を含む、パラグラフ1の使い捨ての無菌キット。

【0672】

3. 脱凝集モジュールの1つまたは複数の可撓性容器が、1つまたは複数の密封可能な開口部を含む、パラグラフ1または2の使い捨ての無菌キット。

20

【0673】

4. 脱凝集モジュールの可撓性容器が、ヒートシール可能な溶接部を含む、パラグラフ3の使い捨ての無菌キット。

【0674】

5. 1つまたは複数の可撓性容器が、内側に曲がった縁部を含む、前述のパラグラフのいずれかの使い捨ての無菌キット。

【0675】

6. 脱凝集モジュールの1つまたは複数の可撓性容器が、その中で固形組織を機械的に粉碎および剪断するように適合された脱凝集表面を含む、前述のパラグラフのいずれかの使い捨ての無菌キット。

30

【0676】

7. 富化モジュールの1つまたは複数の可撓性容器が、個々の細胞になった脱凝集固形組織の保持液を保持するフィルターを含む、前述のパラグラフのいずれかの使い捨ての無菌キット。

【0677】

8. 安定化モジュールの1つまたは複数の可撓性容器が、生存細胞を溶液内にまたは凍結保存された状態で保管するための培地配合物を含む、前述のパラグラフのいずれかの使い捨ての無菌キット。

【0678】

9. デジタル、電子または電磁気タグインジケータをさらに含む、前述のパラグラフのいずれかの使い捨ての無菌キット。

40

【0679】

10. タグインジケータが、脱凝集および／または富化および／または安定化プロセスの型、これらのプロセスにおいて使用される1つまたは複数の型の培地を、速度制御凍結に適した必要に応じた凍結溶液を含めて規定する特定のプログラムに関する、パラグラフ9の使い捨ての無菌キット。

【0680】

11. 同じ可撓性容器が1つまたは複数の脱凝集モジュール、安定化モジュールおよび必要に応じた富化モジュールの一部を形成し得る、前述のパラグラフのいずれかの使い捨ての無菌キット。

50

【0681】

12. 脱凝集モジュールが、処理される組織の受け取りのための第1の可撓性容器を含む、前述のパラグラフのいずれかの使い捨ての無菌キット。

【0682】

13. 脱凝集モジュールが、脱凝集用の培地を含む第2の可撓性容器を含む、前述のパラグラフのいずれかの使い捨ての無菌キット。

【0683】

14. 必要に応じた富化モジュールが、第1の可撓性容器、および富化された濾液の受け取りのための第3の可撓性容器を含む、前述のパラグラフのいずれかの使い捨ての無菌キット。

10

【0684】

15. 脱凝集モジュールおよび安定化モジュールの両方が第2の可撓性容器を含み、第2の容器が消化培地および安定化培地を含む、前述のパラグラフのいずれかの使い捨ての無菌キット。

【0685】

16. 安定化モジュールが、安定化培地を含む第4の可撓性容器を含む、前述のパラグラフのいずれかの使い捨ての無菌キット。

【0686】

17. 安定化モジュールが、保管および／または凍結保存のための第1の可撓性容器および／または第3の可撓性容器も含む、前述のパラグラフのいずれかの使い捨ての無菌キット。

20

【0687】

18. 哺乳動物細胞または細胞凝集体の無菌脱凝集、安定化および必要に応じた富化のための半自動化プロセスにおける、前述のパラグラフのいずれかによる使い捨ての無菌キットの使用。

【0688】

19. 哺乳動物の固形組織由来の細胞または細胞凝集体の半自動化無菌脱凝集および／または富化および／または安定化のための自動化デバイスであって、プログラム可能なプロセッサと、パラグラフ1～17のいずれかの使い捨ての無菌キットとを含む、デバイス。

30

【0689】

20. 使い捨てのキットを認識するための無線周波数識別タグリーダーをさらに含む、パラグラフ19の自動化デバイス。

【0690】

21. プログラム可能なプロセッサが、タグによって使い捨ての無菌キットを認識することができ、その後、脱凝集、富化および安定化プロセスの型ならびにこれらのプロセスに必要なそれぞれの培地型を規定するキットプログラムを実行する、パラグラフ19または20の自動化デバイス。

【0691】

22. プログラム可能なプロセッサが、脱凝集モジュール、富化モジュール、および安定化モジュールのうちの1つまたは複数と通信し、それを制御するように適合されている、前述のパラグラフのいずれかの自動化デバイス。

40

【0692】

23. プログラム可能なプロセッサが、固形組織材料の物理的および／または生物学的分解を可能にするように脱凝集モジュールを制御する、パラグラフ22の自動化デバイス。

【0693】

24. プログラム可能なプロセッサが、固形組織材料の物理的および酵素的分解を可能にするように脱凝集モジュールを制御する、パラグラフ23の自動化デバイス。

【0694】

50

25. 固形組織材料の酵素的分解が、コラゲナーゼ、トリプシン、リパーゼ、ヒアルロニダーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、L i b e r a s e H I、ペプシン、またはそれらの混合物から選択される1つまたは複数の培地酵素溶液によるものである、パラグラフ24の自動化デバイス。

【0695】

26. プログラム可能なプロセッサが、固形組織を機械的に粉砕および剪断する脱凝集可撓性容器内の脱凝集表面を制御し、必要に応じて、脱凝集表面が機械的ピストンである、パラグラフ19～25のいずれか1つの自動化デバイス。

【0696】

27. プログラム可能なプロセッサが、富化された脱凝集固形組織を必要に応じてプログラム可能な温度を使用して容器内で凍結保存するように安定化モジュールを制御する、パラグラフ19～25のいずれか1つの自動化デバイス。

10

【0697】

28. 以下の追加の構成要素：脱凝集プロセスが、必要に応じた富化モジュールへの脱凝集固形組織の移送の前に、脱凝集モジュールにおいて完了しているかどうかを認識することができるセンサー；脱凝集モジュール、富化モジュール、および／もしくは安定化モジュールのうちの1つもしくは複数の容器内で必要とされる培地の量を決定し、それぞれの容器間の材料の移送を制御するための重量センサー；脱凝集モジュール、富化モジュール、および／もしくは安定化モジュールのうちの1つもしくは複数の容器内の温度を制御するためのセンサー；モジュール内の各容器の投入口と排出口の間の培地の移送を制御するための少なくとも1つの気泡センサー；投入口と排出口の間の培地の移送を制御するための少なくとも1つのポンプ、必要に応じて蠕動ポンプ；富化モジュール内の圧力を評定するための圧力センサー；富化モジュール内での接線流濾過プロセスを制御するための1つもしくは複数の弁；ならびに／または各モジュールの投入口と排出口の間の培地の移送を制御するための1つもしくは複数のクランプ、のうちの1つまたは複数を含む、前述のパラグラフのいずれかの自動化デバイス。

20

【0698】

29. プログラム可能なプロセッサが、容器が取り出されるまで安定化モジュール内の最適な保管温度範囲を維持するように適合されている；または制御された凍結ステップを実行する、前述のパラグラフのいずれかの自動化デバイス。

30

【0699】

30. ユーザーインターフェースをさらに含む、前述のパラグラフのいずれかの自動化デバイス。

【0700】

31. インターフェースが、使用者がパラメータを入力する、予めプログラムされたステップを確認する、エラーを通知する、またはこれらの組合せを行うことをガイドする指示を表示するための表示画面を含む、パラグラフ23の自動化デバイス。

【0701】

32. 自動化デバイスが、可搬型になるように適合されている、前述のパラグラフのいずれかの自動化デバイス。

40

【0702】

33. 無菌脱凝集組織処理ステップおよびそれらの関連する条件を、無菌処理キット、必要に応じてパラグラフ1～17のいずれかによるキットに付随するデジタル、電子または電磁気タグインジケータから自動的に決定するステップ；組織試料を無菌処理キットの脱凝集モジュールの可撓性プラスチック容器に入れるステップ；ならびに、脱凝集モジュール、必要に応じた富化モジュール、および安定化モジュールと通信し、それを制御することにより1つまたは複数の組織処理するステップを自動的に実行することによって組織試料を処理するステップを含む、半自動無菌組織処理方法。

【0703】

腫瘍材料の収集、凍結保存、およびT I L製造の手順

50

【0704】

T I L 製造の出発材料は、自己 T I L および適格患者由来の腫瘍細胞を含有する、脱凝集させ、凍結保存した細胞浮遊液である。腫瘍出発材料の収集および処理についての例示的な流れ図を提供する（図 6 5）。

【0705】

腫瘍を外科的に摘除し、次いで、トリミングして、明らかに壊死性の組織、明らかに健康な（非がん性）組織、脂肪組織、および過剰な血液を除去する。トリミングした腫瘍の重量は 2 グラムよりも大きいと等しいものであるべきである（ ≥ 2 グラム）。重量が 7 g を超える腫瘍はより小さな部分に分け、個別に脱凝集させることができる。

【0706】

各腫瘍断片を、培地、コラゲナーゼおよび D N A s e を含有する個々の滅菌バッグに入れる。例示的な試薬を以下の表に示す：

【表 4】

表 4 - 脱凝集培地			
原料	動物/ヒト由来のものであるか	供給者	入手可能な証明書
リン酸緩衝食塩水	いいえ	Life Technologies Ltd	CoA
2mM の塩化カルシウム	いいえ	Sigma-Aldrich	CoA
DNAse 1 (ドルナーゼアルファ)	米国において承認された医薬品	Roche Products Ltd	CoA
コラゲナーゼ IV 型	ウシ	Nordmark Arzneimittel GmbH & Co KG	CoA, CoO, TSE/BSE ステートメント
BloodStor 55-5 (55% DMSO)	いいえ	BioLife Solutions	CoA

【0707】

次いで、バッグをヒートシールし、その内容物を脱凝集させて、腫瘍および T I L を含有する均一な細胞浮遊液を生成する。脱凝集は、物理的加圧事象の規定数の繰り返しを規定された圧縮圧力で規定された持続時間にわたって送達して酵素の腫瘍組織への接近を確実にすることによって酵素的消化を加速するためのプログラムを走らせる本明細書に記載の T i s s - U - S t o r デバイスなどのデバイスによって行う。個々の腫瘍それぞれについてサイクルの数、圧力、温度、および持続時間を記録する。

【0708】

次いで、ホモジナイズされた細胞浮遊液を、200 μ m のフィルター（B a x t e r 、R M C 2 1 5 9）を使用して無菌で濾過し、濾液を凍結保存バッグに無菌で移す。B l o o d S t o r 5 5 - 5（B i o l i f e S o l u t i o n s 、B o t h e l l 、W A）を無菌で添加して 5 % D M S O を得る。次いで、細胞浮遊液を、T i s s - U - S t o r デバイスを使用し、規定された冷却プログラムを用いて凍結保存し、各腫瘍部分に由来する個々の細胞浮遊液それぞれについて測定された温度プロファイルを記録する。凍結保存された細胞浮遊液を液体窒素の気相中で保管する。

【0709】

凍結保存された細胞浮遊液の推奨される保管条件は $\leq -130^{\circ}\text{C}$ である。

【0710】

細胞浮遊液を臨床現場から G M P 細胞療法薬製造現場に、凍結保存された細胞浮遊液が確実に $\leq -130^{\circ}\text{C}$ で維持されることが確認された容器内にパッケージングして特定の必要条件を満たしたクーリエサービスで輸送する。

【0711】

(T i s s - u - S t o r)

【0712】

摘除した腫瘍を重量および状態について評価する。各腫瘍断片について、外来材料を除去し、断片を秤量する。CS50Nバッグを開け、最大約7gの腫瘍を添加し、次いで、バッグを密封する。EDM消化培地15mlを、EDM 1ml当たり2μlのゲンタマイシン／アンホテリシンを伴うバッグにシリンジによって無針口を介して添加し、その後、バッグからシリンジ中に空気を抜く。

【0713】

脱凝集バッグに入った腫瘍組織および脱凝集培地を温度制御された組織脱凝集器に入れる。温度を周囲温度から35℃まで毎分1.5℃の速度で上昇させ、合計で約45分間35℃に維持し、その間、脱凝集器を毎分240サイクルで動作させる。

10

【0714】

脱凝集したら、腫瘍材料を、インラインフィルターを通して二次凍結バッグ内に濾過する。Blood stor (DMSO) 1.5mlを、無針口を介して注入し、空気を抜く。

【0715】

浮遊液2mlを試験のために抜き取る。

【0716】

必要に応じた凍結保存のために、サイロバッグを凍結カセットにローディングし、凍結カセットをVia freezeに入れる。次いで、Via freezeを-80℃まで、好ましくは35℃から直接-80℃まで毎分-2℃の速度で冷却する。

20

【0717】

次いで、凍結したサイロバッグを液体窒素での保管に移す。

【0718】

T I L 製造

【0719】

英国 (UK) において培養のために使用される自己組織は、HTA-GD-20、英国のHuman Tissue Authorityによって好適な同意のもと確立されたGuide to Quality and Safety Assurance for Human Tissue and Cells for Patient Treatment、Chain of Identity、Chain of Custody、ならびにドナーがB型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、HIV-1 & 2、HTLV-1 & 2、および梅毒について陰性であることを確認するためのスクリーニングに従うべきである。

30

【0720】

製造は、TILおよび摘除した腫瘍に由来する腫瘍細胞を含有する凍結保存された細胞浮遊液からのアウトグロースおよび拡大を伴う。腫瘍が約7gよりも大きい場合、摘除プロセスにより複数の凍結保存された細胞浮遊液を生成し、その場合、各細胞浮遊液を2~7gの腫瘍断片から引き出す。典型的には、1つのTILアウトグロースのためには細胞浮遊液を1つのみ解凍する必要がある、残りの凍結保存された細胞浮遊液はGMP制御下のまま、推奨される保管条件（液体窒素の気相）で保持される。

40

【0721】

ある特定の実施形態では、細胞浮遊液は、脱凝集後、凍結保存の前に濾過されたものである。例示的な製造手順を図66に示す。例示的な製造原料を以下の表に提供する：

【表 5】

表5 - 原料調達			
原料	ヒト/動物由来のものであるか	供給者	入手可能な証明書
T細胞培地	ヒトおよび動物	ThermoFisher Scientific	CoA, CoO
ウシ胎仔血清(FBS)	動物	Life Technologies	CoA, CoO
ゲンタマイシン/アムホテリシンB, 500x	いいえ	Life Technologies	CoA
IL-2 (アルデスロイキン)	利用不可	Clinigen	CoA
ヒトA B血清	ヒト	Valley Biomedical	原産地付きCoA
MACS GMP CD3 OKT3抗体	いいえ	Miltenyi Biotec	CoA
照射処理済バフィーコート	ヒト	SNBTS	CoA
リン酸緩衝食塩水	いいえ	Life Technologies	CoA
アルブミン(ヒト) 20%	ヒト	OctaPharma	原産地付きCoA
CryoSure-DMSO	いいえ	WAK - Chemie Medical GmbH	CoA, TSE

10

20

30

40

50

【0722】

T細胞培地(TCM)は、アルブミン(ヒト)、ヒトHolo Transferrin、および動物起源のコレステロールを含有する。アルブミンおよびトランスフェリンの製造に使用する供給源の血漿はUSAから調達し、ドナーを外来因子について検査する。

【0723】

コレステロールは、海綿状脳症(TSE)伝染例が報告されている国からの反芻動物起源の材料を禁止するUSDA規制に従って、オーストラリア/ニュージーランドを起源とするヒツジ羊毛脂から調達する。

【0724】

ウシ胎仔血清(FBS)は、海綿状脳症(TSE)伝染例が報告されている国からの反芻動物起源の材料を禁止するUSDA規制に従って、オーストラリア/ニュージーランドから調達する。FBSを21 CFR part 113.47に従って検査し、具体的には以下を含む：ブルータングウイルス、ウシアデノウイルス、ウシパルボウイルス、ウシ呼吸器合胞体ウイルス、ウシウイルス性下痢ウイルス、狂犬病ウイルス、レオウイルス、細胞変性因子、血球吸着因子。FBSを56℃で30分にわたって熱失活させ、三重0.1μm濾過して2つの直交性ウイルス除去ステップをもたらした。

【0725】

ヒトA B血清は、FDA登録機関(1121958)であるValley Biomedicalから調達する。各ドナー単位を、B型肝炎表面抗原(HBsAg)、B型肝炎ウイルス(HBV)核酸増幅検査(NAT)、1型および2型抗ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、HIV-1 NAT、抗C型肝炎ウイルス(HCV)、HCV NAT、およびFDAに認可された方法による梅毒の検査について検査する。血清を56℃で30分にわたって熱失活させ、0.1μmで濾過する。

【0726】

照射処理したバフィーコートの調達、調製、輸送および保管：Scottish National Blood Transfusion Service(SNBTS)により、ドナーのスクリーニング、血液成分の採取、バフィーコートの調製および照射処理が行われる。SNBTSは、血液、血液成分および組織の入手、処理、検査、保管および

分配のための Blood, Safety and Quality Regulations (2005) に従って英国の Human Tissue Authority により認可を受けている (認可番号 11018)。

【0727】

健常ドナーのスクリーニングは、英国に住むドナーは例外として、United States Code of Federal Regulations (CFR) Title 21 Part 1271.75 に記載の要件を満たすかまたはそれを超える。これにより散发性クロイツフェルト・ヤコブ病 (sCJD) または異型クロイツフェルト・ヤコブ病 (vCJD) の理論的リスクが示されるが、英国は頑強な国家サーベイランスプログラムを有する。1990年5月～2018年12月31日までを包含する最新の年間報告 (National CJD Research & Surveillance Unit, 2018) により、英国における sCJD の発生率が、牛海綿状脳症 (BSE) が認められていない国を含めた世界の他の場所において観察されるものと同等であることが確認される。vCJD の症例は 2017 年から 2020 年 4 月 5 日まで報告されておらず、全国的に 2012 年 1 月 1 日から 2 件の症例のみ同定されている (NCJDRSU Monthly Report, 2020)。この厳密なサーベイランスネットワークにより輸血伝達 vCJD 感染症が排除されており、2007 年から当該感染症は報告されていない (National CJD Research & Surveillance Unit, 2018)。例示的な適格ドナー検査 (表 7) は、21 CFR Part 1271.85 の要件を満たし、また、求められていない E 型肝炎検査が追加されている。

【表 6】

表 6 - 例示的なドナースクリーニング(NHSBT)		
病原体	規格	必要性
B型、C型およびE型肝炎ウイルス	検出されず/陰性	全ての供与時
1型および2型ヒト免疫不全ウイルス(HIV)	検出されず/陰性	全ての供与時
梅毒	検出されず/陰性	全ての供与時
1型および2型ヒトTリンパ増殖性ウイルス(HTLV)	検出されず/陰性	最初の供与時および選択されたその後の供与時
マラリア	検出されず/陰性	ドナーの個々の状況に応じて検査を行う
<i>T. cruzi</i>	検出されず/陰性またはIgG陽性	
西ナイルウイルス	検出されず/陰性	
サイトメガロウイルス (CMV)	検出されず/陰性またはIgG陽性	

【0728】

認可された血液機関で、重症好中球減少症を有する患者を処置するために好適な臨床グレードの照射処理済バフィーコートを開製する。バフィーコートを調製するために、血液を遠心分離して3つの層：赤血球層、バフィーコート層および血漿層を形成する。10名のドナー由来のバフィーコートに25～50 Gyの放射線照射を用いた照射処理を行って、細胞成長を静止させる。臨床グレードの照射処理済バフィーコートを調製し、温度モニターを含む温度制御シッパーを使用して翌日配達便によってGMP製造施設に輸送する。輸送は製造プロセスに使用する前日に行う。

【0729】

受け取ったら、バフィーコートを製造に使用するまで15～30℃で保持する。

【0730】

照射処理済フィーダー細胞の調製

【0731】

最大10名の唯一のドナー由来のバフィーコートプールし、次いで、フィコール勾配密度遠心分離によって遠心分離して末梢血単核細胞（PBMC）を回収する。およそ 4×10^9 個の生存可能な白血球を、閉鎖静置細胞培養バッグ内、およそ8%ヒトAB血清、3000 IU/mLのIL-2および30 ngのOKT-3を補充したTCM中に再浮遊させる。PBMCを規格に従って放出する。

【表7】

表7- 同種PBMCストック規格		
特質	試験方法	判定基準
外観	目視検査	IDラベル
同一性	フローサイトメトリー	生存可能なCD45+細胞が $\geq 85\%$
生存率	フローサイトメトリー	報告結果
生存可能な白血球の総含有量	フローサイトメトリー	$2 \sim 4 \times 10^9$

10

【0732】

PBMCを無菌性およびマイコプラズマについても試験する。ステップ3の開始直前（12日目、図C）に、培地、IL-2およびOKT3を含む製剤化されたフィーダー細胞の試料を取り出す。この試料をインキュベートし、13日目、17日目および18日目に分析して、フィーダー細胞が拡大しないことを確認する。

20

【0733】

ヒト血清アルブミン（HSA）としても公知のアルブミン（ヒト）をUSDナーから調達する。全ての供与血漿が個別に検査され、HBsAg、抗HIV1、抗HIV2、および抗HCV抗体に対して非反応性のものである。各血漿プールを検査し、NATによりHBsAg、抗HIV1、抗HIV2、およびHCV-RNAについて陰性であることを見いだす。HSA製品は米国薬局方およびヨーロッパ薬局方の生産および検査基準を満たすGMP規制に従って製造される。

30

【0734】

TILアウトグロース

【0735】

細胞浮遊液を、10% FBS、 $0.25 \mu\text{g/mL}$ のアンホテリシンBと $10 \mu\text{g/mL}$ のゲンタマイシン（Life Technologies、Grand Island、NY）、およびインターロイキン-2（IL-2；アルデスロイキン）3000 IU/mL（Clinigen、Nurnberg、Germany）を補充したTCMに1 mL当たりおよそ $0.25 \times 10^6 \sim 0.75 \times 10^6$ 個の生存細胞で播種し、標準の細胞培養条件（37℃、5% CO₂）で培養する。

40

【0736】

5日目に、培地の半分を除去し、10% FBS、 $0.50 \mu\text{g/mL}$ のアンホテリシンB、 $20 \mu\text{g/mL}$ のゲンタマイシンおよび6000 IU/mLのIL-2を補充したTCMで置き換える。

【0737】

7日目に、細胞濃度が1 mL当たり 1.5×10^6 個の生存細胞よりも高ければ、TILアウトグロース培養物を体積の3倍に希釈して、1 mL当たりおよそ $0.1 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 個の生存細胞を維持する。細胞濃度が1 mL当たり 1.5×10^6 個の生存細胞以下であれば、培地の半分を置き換える。いずれの選択肢でも、培地は、10% FBS、 $0.50 \mu\text{g/mL}$ のアンホテリシンB、 $20 \mu\text{g/mL}$ のゲンタマイシンおよび

50

6000 IU/mL の IL-2 を補充した TCM である。

【0738】

10 日目に、細胞濃度が 1 mL 当たり 1.5×10^6 個の生存細胞よりも高ければ、TIL アウトグロース培養物を体積の 3 倍に希釈して、1 mL 当たりおよそ $0.1 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ 個の生存細胞を維持する。細胞濃度が 1 mL 当たり 1.5×10^6 個の生存細胞以下であれば、培地の半分を置き換える。いずれの選択肢でも、添加される培地は、10% FBS、 $0.50 \mu\text{g/mL}$ のアンホテリシン B、 $20 \mu\text{g/mL}$ のゲンタマイシンおよび 6000 IU/mL の IL-2 を補充した TCM である。

【0739】

TIL 活性化

10

【0740】

TIL を、抗 CD3 抗体 (OKT3) を使用して活性化して、同種末梢血単核細胞 (PBMC) 由来の照射処理済フィーダー細胞の FC 受容体と結合した際の CD3 特異的刺激をもたらす。フィーダーにより添加された抗 CD3 (OKT-3) を支持するための追加の共刺激の天然の供給源がもたらされる。

【0741】

12 日目に、TIL アウトグロースステップ 2 からの生存可能な T 細胞 $1 \sim 20 \times 10^6$ 個を生存可能な照射処理済フィーダー細胞 $2.0 \sim 4.0 \times 10^9$ 個 (セクション 8.1.4.4) におよそ $30 \pm 10 \text{ ng/mL}$ の OKT3、およそ 8% ヒト AB 血清および $3000 \pm 1000 \text{ IU/mL}$ の IL-2 を使用して添加する。TIL 活性化培養物を標準の細胞培養条件で 6 日間インキュベートする。

20

【0742】

TIL 拡大

【0743】

18 日目に、およそ 8% ヒト AB 血清および 3000 IU/mL の IL-2 を補充した T 細胞培地を含有するバイオリアクターに活性化された TIL 細胞浮遊液を無菌で添加することにより、活性化された TIL の拡大を継続する。

【0744】

19 日目に、TIL 拡大に、 3000 IU/mL の IL-2 を補充した T 細胞培地を回収するまで連続的に供給する。

30

【0745】

TIL を、SEFIA (商標) を使用して細胞を洗浄することによって回収する。細胞を遠心分離によって濃縮し、次いで、1% ヒト血清アルブミン (HSA) を補充したリン酸緩衝食塩水 (PBS) を使用して 2~4 回洗浄する。次いで、細胞を PBS + 1% HSA 中におよそ 50~60 mL まで再浮遊させる。

【0746】

洗浄し濃縮した細胞をサイロバッグに無菌で移し、ロットリリース試験および試料保持のために一部を取り出す。凍結保護物質を添加して、PBS 中およそ 10% の DMSO および 8.5% の HSA に $\geq 5 \times 10^9$ 個の生存細胞が浮遊している、製剤化された製品を得る。ロットリリース試験および試料保持のために一部を取り出す。サイロバッグを -80°C まで冷却する。

40

【0747】

TIL 製造プロセス

【0748】

以下の表は、プロセスのバリエーションの例を示す。

【表 8 - 1】

表 8 - 製造プロセス				
プロセスバージョン	v1.0	v1.1	v1.2	ITIL-168
腫瘍脱凝集	手動での脱凝集	手動での脱凝集	Tiss-U-Stor による脱凝集	Tiss-U-Stor による脱凝集
出発材料	保存加工されていないもの	凍結保存されたもの	凍結保存されたもの	凍結保存されたもの
TIL アウトグロース	1～3 週間	1～3 週間	12 日間	12 日間
中間保持ステップ	凍結保存	凍結保存	該当なし	該当なし
TIL 回収	3 日間	3 日間	該当なし	該当なし
急速拡大相	12 日間	12 日間	12 日間	12 日間
培養延長	0～2 日間	0～2 日間	該当なし	該当なし
最終製品	保存加工されていないもの	保存加工されていないもの	凍結保存されたもの	凍結保存されたもの

10

【 0 7 4 9 】

20

以下の表は、医薬製品データを示す。

30

40

50

【表 8 - 2】

表 8 - 薬物製品データ				
製品ロット	プロセスバージョン	収量(x10 ¹⁰)	生存率	パーセント CD3+細胞
TIL001	1.0	1.1	82	N/A
TIL003	1.0	2.2	94	98
TIL005	1.0	2.0	96	N/A
TIL012	1.0	3.2	95	98
TIL013	1.0	2.1	80	92
TIL014	1.0	4.4	91	95
TIL015	1.0	6.4	91	97
TIL016	1.0	5.5	93	96
TIL027	1.0	3.8	95	97
TIL032	1.0	3.7	92	99
TIL035	1.0	6.4	96	90
TIL037	1.0	2.6	92	97
TIL038	1.0	1.3	83	98
TIL039	1.1	1.2	80	93
TIL040	1.0	5.3	93	97
TIL041	1.0	3.2	93	98
TIL043	1.0	4.8	93	98
TIL054	1.1	0.82	86	91
TIL065	1.1	3.4	94	97
TIL067	1.2	3.0	91	97
TIL073	1.0	5.4	92	98
TIL077	1.2	1.0	91	97
TIL078	1.2	3.4	99	98
E2	1.2	3.5	86	97
E3	1.2	1.8	80	96
E4	1.2	1.0	88	93
E5	1.2	4.1	98	100

【0750】

凍結保存された細胞浮遊液と保存加工されていない細胞浮遊液を比較すると、代表的な収量は、同様の原薬収量（図 67A）、生存率（図 67B）、およびパーセント T 細胞（図 67C）によって実証される通り、一致した。

【0751】

凍結保存の最適化－腫瘍材料の代理として、単離された PBMC を、T i s s - U - S t o r プロセスおよび材料を使用して消化する。市販の凍結保存剤（CPA）を様々な条件にわたって評価して、いずれの試薬で解凍後生存率が最大化されるかを決定した（図 68）。2つの CPA、Cryos tor 10 および Stem Cell Banker DMSO free の解凍後生存率は同様であった。次いで、CryoStor ベースの

DMSOを、DMSOベースの凍結保存剤（cryopreservative）であるBloodstor 55-5と比較し、高濃度のBloodstor製品がより濃縮度が高く、したがって、サイロバッグをより小さいものにすることが可能になるので、これを選択した。次いで、凍結保存を、材料を4℃で10分間保持し、その後温度を毎分-1℃の速度で低下させるか、または、直接35℃から-80℃まで毎分-2℃の速度で低下させるプロトコルの後に比較した。解凍後生存率は使用した2つの凍結保存プロトコルの間で同様であった（図69）。

【0752】

冷却の間、氷核生成により熱が放出される。放出された熱により溶液が温められていると思われる現象である不十分な冷却が、解凍後回収率が低いことに関連付けられる。両方のプロトコルを使用した凍結保存の間に試験物からの温度データを記録した（図70）。毎分-1℃プロトコルを使用した独立したランの両方で不十分な冷却が観察されたが、一方、毎分-2℃の冷却プロトコルでは不十分な冷却事象は一度も記録されず、第2の独立したランでは、不十分な冷却事象が観察されて、代替プロトコルと比べて少ない熱が放出された（図70）。

【0753】

凍結保存したDPを、 $\leq -130^{\circ}\text{C}$ での保管およびトランスポートのために気相LN2に移す。

【0754】

試料の無菌性を試験し、保持された試料をCoolcell（登録商標）（Biovision、Larkspur、CA）を使用して-80℃で凍結させ、次いで、保管のために気相LN2に移す。

【0755】

本発明およびその利点が詳細に記載されているが、添付の特許請求の範囲において定義される本発明の主旨および範囲から逸脱することなく本明細書において種々の変化、置換および変更をなすことができることが理解されるべきである。

【0756】

本発明およびその利点が詳細に記載されているが、添付の特許請求の範囲において定義される本発明の主旨および範囲から逸脱することなく本明細書において種々の変化、置換および変更をなすことができることが理解されるべきである。

【0757】

本発明を以下の実施例においてさらに例示する。以下の実施例は単に例示のために提示され、本発明をいかようにも限定するものではない。

【実施例】

【0758】

（実施例1）

図39は、使用中のバッグ400の実施形態を示す。示されている通り、バッグ400は、トレイ406などのデバイス404内にクランプ402などの固定要素によって固定されている。組織408がバッグ400の透明の側面を通して見える。チューブ410がバッグ400と連結されている。

（実施例2）

【0759】

図40は、本明細書に記載の発明において使用するためのバッグ420の実施形態を示す。示されている通り、バッグ420はデバイスおよびトレイ424からの固定要素422によって固定されている。組織材料424がバッグ420の透明の側面を通して見える。チューブ426がバッグ420と連結されている。示されている通り、トレイ406内のバッグ400の位置が固定要素428、具体的にはテープを使用してさらに固定されている。組織424がバッグ420の透明の側面を通して見える。図40に示されている通り、バッグは、バッグの内部および／または組織424にアクセスするための口430を含み得る。

(実施例 3)

脱凝集および凍結保存

【0760】

T I L 0 7 5 を転移性黒色腫の腫瘍片（試料）から製造した。腫瘍試料を秤量し、以下の通り処理した。S 1 = 1 . 4 g。S 1 を自動化手順によって脱凝集させた。S 2 = 1 9 . 4 g。S 2 を分割し、1つの部分（約 7 . 7 g）を自動化手順によって脱凝集させ、第 2 の部分（約 1 2 g）を手動で脱凝集させた。

【0761】

手動での脱凝集：腫瘍試料を 2 ~ 4 mm³ の小片に切り、抗生物質を伴う消化培地 8 0 m l を含有するビンに添加した。ビンを振とう機に入れ、3 7 °C で一晚（約 1 4 時間）脱凝集させた。次いで、消化物を、ネットウェルおよび 1 0 0 μ M の細胞濾過器を通して濾過して F a l c o n 5 0 管に入れた。濾過された消化物の 1 0 % を無菌試験のために取り分けた。残りを遠心分離し、C S 1 0 1 2 m l に再浮遊させ、クライオバイアル 1 2 個に分割した。

【0762】

T i s s - U - S t o r による脱凝集：2つの C S 5 0 N バッグを、滅菌はさみを用い、口を有さない方の端を切って開けた。S 1 1 . 4 g m の試料および S 2 の 7 . 7 g m 部分を C S 5 0 N バッグに入れ、バッグを密封した。脱凝集培地 1 5 m l および抗生物質 3 0 μ l を合わせ、密封されたバッグの各々に、シリンジを使用してバッグの無針口を通じて添加した。バッグを V i a F r e e z e にローディングした T i s s u e D i s a g g r e g a t o r に移し、脱凝集プロトコルを開始した。脱凝集プロトコルには、周囲温度から 3 5 °C まで毎分 1 . 5 °C の速度で温度を上昇させること、脱凝集器が動作している間、温度を 3 5 °C に保持することが必要であった。脱凝集器のスピードは毎分 2 4 0 サイクルに設定した。V i a F r e e z e の温度をその後、凍結保存ステップまで 3 5 °C のままにした。

【0763】

バッグのセットアップは、インラインフィルターを通して二次サイロバッグへのチューブによる直接接続を含む。C S 5 0 バッグ内の脱凝集された材料を濾過してサイロバッグ内に入れ、チューブ接続を密封した。B l o o d - s t o r (D M S O) 1 . 5 m l をサイロバッグの無針口を通じてゆっくりと添加し、バッグを最適な熱伝達のために設計されたカセットに入れ、カセットを脱凝集器ではなく V i a F r e e z e に戻した。

【0764】

脱凝集後の凍結保存プロトコルが必要であった。凍結サイクルでは、V i a F r e e z e の温度を 3 5 °C から - 8 0 °C まで毎分 - 2 °C で低下させた。凍結したバッグを液体窒素での保管に移した。

(実施例 4)

脱凝集および凍結保存

【0765】

T I L 0 7 7 を転移性黒色腫の腫瘍片（試料）から製造した。腫瘍試料を秤量し、以下の通り処理した。S 1 = 4 . 6 g。S 2 = 4 . 6 g。

【0766】

T i s s - U - S t o r による脱凝集：2つの C S 5 0 N バッグを、滅菌はさみを用い、口を有さない方の端を切って開けた。S 1 = 4 . 6 g m の試料および S 2 = 4 . 6 g m の試料を C S 5 0 N バッグに入れ、バッグを密封した。脱凝集培地 1 5 m l および抗生物質 3 0 μ l を合わせ、密封されたバッグの各々に、シリンジを使用してバッグの無針口を通じて添加した。バッグを V i a F r e e z e にローディングした T i s s u e D i s a g g r e g a t o r に移し、脱凝集プロトコルを開始した。脱凝集プロトコルには、周囲温度から 3 5 °C まで毎分 1 . 5 °C の速度で温度を上昇させること、脱凝集器が動作している間、温度を 3 5 °C に保持することが必要であった。脱凝集器のスピードは毎分 2 4 0 サイクルに設定した。V i a F r e e z e の温度をその後、凍結保存ステップまで 3

5℃のままにした。図71は、脱凝集の記録を示す。

【0767】

バッグのセットアップは、インラインフィルターを通して二次サイロバッグへのチューブによる直接接続を含む。CS50バッグ内の脱凝集された材料を濾過してサイロバッグ内に入れ、チューブ接続を密封した。Blood-stor (DMSO) 1.5mlをサイロバッグの無針口を通じてゆっくりと添加し、バッグを最適な熱伝達のために設計されたカセットに入れ、カセットを脱凝集器ではなくVia Freezeに戻した。

【0768】

脱凝集後の凍結保存プロトコルが必要であった。凍結サイクルでは、Via Freezeの温度を35℃から-80℃まで毎分-2℃で低下させた。図71は、凍結保存の記録を示す。凍結したバッグを液体窒素での保管に移した。

10

(実施例5)

脱凝集および凍結保存

【0769】

TIL078を転移性黒色腫の腫瘍片(試料)から製造した。腫瘍試料を秤量し、以下の通り処理した。S1=11g。S2=2g。

【0770】

Tiss-U-Storによる脱凝集: 2つのCS50Nバッグを、滅菌はさみを用い、口を有さない方の端を切って開けた。腫瘍材料を分割し、試料6.4gmを2つのCS50Nバッグの各々に入れ、バッグを密封した。脱凝集培地15mlおよび抗生物質30μlを合わせ、密封されたバッグの各々に、シリンジを使用してバッグの無針口を通じて添加した。バッグをVia FreezeにローディングしたTissue Disaggregatorに移し、脱凝集プロトコルを開始した。脱凝集プロトコルには、周囲温度から35℃まで毎分1.5℃の速度で温度を上昇させること、脱凝集器が動作している間、温度を35℃に保持することが必要であった。脱凝集器のスピードは毎分240サイクルに設定した。Via Freezeの温度をその後、凍結保存ステップまで35℃のままにした。図72は、凍結保存の記録を示す。

20

【0771】

バッグのセットアップは、インラインフィルターを通して二次サイロバッグへのチューブによる直接接続を含む。CS50バッグ内の脱凝集された材料を濾過してサイロバッグ内に入れ、チューブ接続を密封した。Blood-stor (DMSO) 1.5mlをサイロバッグの無針口を通じてゆっくりと添加し、バッグを最適な熱伝達のために設計されたカセットに入れ、カセットを脱凝集器ではなくVia Freezeに戻した。

30

【0772】

脱凝集後の凍結保存プロトコルが必要であった。凍結サイクルでは、Via Freezeの温度を35℃から-80℃まで毎分-2℃で低下させた。図72は、凍結保存の記録を示す。凍結したバッグを液体窒素での保管に移した。

(実施例6)

脱凝集および凍結保存

【0773】

TIL081を転移性黒色腫の腫瘍片(試料)から製造した。ソフトウェアを更新して、脱凝集および凍結保存を単一のプロトコルに含めた。図73は、脱凝集および凍結保存の記録を示す。前の実施例と同様に、脱凝集器は約53分間動作した。(図73A、73B)。脱凝集された組織を脱凝集バッグからフィルターを通してサイロバッグに移し、凍結保存のために、極低温冷却を開始した時点である脱凝集プロセスの開始から約90分以内にVia Freezeに戻した。

40

(実施例7)

バイアルからの製造

50

【表 9】

表 9 - 細胞の凍結保存および解凍		
試薬/材料		
試薬	製造者	カタログ番号
細胞型に応じた培地	NA	NA
DPBS	Sigma	D8537-500ML
15 mL 遠心管	VWR	339650
Stripette 10mL	Corning	CLS4101
Stripette 25 mL	Corning	CLS4251
Stripette 5 mL	Corning	CLS4051
Tips 1000 μ L 濾過済み	StarLabs	S1182-1730
トリパンブルー	Sigma	T8154-100ML

10

【表 10】

表 10 - 機器			
説明	製造者	品番	製造番号/資産番号
Powerpette pro 1-100 mL	VWR	452-8344	NA
Pipette ErgoOne 100-1000 μ L	Star Labs	S7110-1000	NA
Megafuge 40R Centrifuge	Hereus	75004518	41536283
Hemocytometer	Hawksley	HC002	NA
Water Bath 12L	VWR	462-0557	BP1912001
IncuSafe CO ₂ Incubator	PHCBI	MCO-170AIC-PE	NA

20

【0774】

クライオバイアルを液体窒素から取り出し、細胞浮遊液がちょうど融解するまで 37℃ のウォーターバスに入れた。細胞浮遊液を 15 mL のファルコンに入れ、10 mL になるまで PBS を追加し、400 g で 10 分間遠心分離した。上清をデカントした。

30

【0775】

細胞培養のために、細胞ペレットを、最初に小さな体積、すなわち 2～3 mL の予め温めた培地に再浮遊させた。付着細胞株（すなわち、腫瘍株、HEK293）を以下の表に従って培地を伴う組織フラスコに添加した。非付着細胞株（すなわち、T細胞、TIL、ジャーカット細胞）を 1 mL 当たり $0.5 \sim 1 \times 10^6$ 個の細胞の密度でプレーティングした。フラスコを加湿した 37℃ のインキュベーターに入れ、培地を 2～3 日ごとに交換した。

【表 11】

表 11 - 異なる容器への付着細胞の細胞播種密度		
容器/フラスコ型	播種密度	培地体積 mL
24 ウェル	0.1×10^6	0.5～1
6 ウェル	0.5×10^6	2～4
T 25	0.7×10^6	4～6
T 75	2.1×10^6	12～15
T 150	4.4×10^6	25～30

40

50

(実施例 8)

凍結保存された脱凝集腫瘍からの製造

【0776】

製造プロセス

【0777】

解凍出発材料

【0778】

VIA Thaw CB1000 Thawing systemを使用して、クライオバッグ内に保管された凍結保存された試料の加熱を制御した。凍結保存された細胞浮遊液を解凍し、次いで、Life Technologies (Paisley, United Kingdom) によって製造されたT細胞培地 (TCM) に希釈した。TCMは、80%ロズウェルパーク記念研究所 (Rosewell Park Memorial Institute) (RPMI) 1640培地および20%AIM Vを含有する。細胞浮遊液を70 μ m~100 μ mのフィルターを通して濾過し、遠心分離し、上清を除去した。細胞ペレットを、10%照射処理済ウシ胎仔血清 (FBS) (Life Technologies, Auckland, New Zealand) を補充したTCMに再浮遊した。

【0779】

Origin CS50バッグに入った、脱凝集された凍結保存された腫瘍 (約16.5ml) をVIA Thaw CB1000 Thawing Systemの解凍トレーに載せ、約0℃まで温めた。

(実施例 9)

効力

【0780】

共培養に基づく効力法により、OKT3を発現する標的細胞株によって活性化されるT細胞のパーセンテージを定量化する。in vivoにおけるTIL製品作用機序には、in vivoでTCRに結合するpMHC-HLAによるTILペプチド提示が伴う。効力アッセイでは、OKT3抗原結合性ドメインを発現するK562細胞株と共培養することによって特異的に活性化させた場合の、CD137、IFN- γ 、TNF α 、またはCD107aのいずれかについて陽性の生存可能なT細胞を生存可能なT細胞の総数で割ったものと定義される強力なT細胞のパーセンテージを数量化する。T細胞の効力を定量化するために使用されるマーカーとしては、DRAQ7、CD45、CD2、CD107a、CD137、TNF- α 、およびIFN- γ が挙げられる。

【0781】

効力を測定するために、ITIL-168 DS細胞を、3種の細胞株のうち1種を使用しておよそ5時間にわたって共培養した：条件1-刺激なし-バックグラウンド細胞活性；条件2-K562細胞株-バックグラウンドTCR非依存性反応性；条件3-OKT-3に対するScFvを発現するK562細胞株-TCRにより誘導されるT細胞刺激。

【0782】

培養細胞をフローサイトメトリーによって分析し、生存可能な白血球に対してゲーティングして、4つの活性化マーカーのうちの少なくとも1つを発現するT細胞を定量化する。安定性試験のために、凍結保存されたDP細胞を解凍し、洗浄し、一晚静置した。

【0783】

ITIL-168 TCRの効力を以下の通り算出する：ステップ1) 非特異的刺激に起因する効力の%を条件2から得る；ステップ2) CD3特異的および非特異的刺激に起因する効力の%を条件3から得る；ステップ3) CD3特異的刺激に起因する効力の%を条件3-条件2として算出する。

【0784】

条件2および条件3のどちらについても、効力の%の結果は、100%からCD137- / IFN- γ - / TNF α - / CD107a - である全てのT細胞のパーセンテージ (

10

20

30

40

50

すなわち、バックグラウンド)を引いたものである。この集団は少なくとも1つのマーカーを産生しない。

(実施例10)

TILアウトグロースおよび急速拡大

【0785】

TIL製造プロセスは、腫瘍摘除、脱凝集、凍結保存、および必要に応じたパッケージングおよび輸送の後に開始される。特定の必要条件を満たしたシッパー中に入れて、制御された条件下での輸送パッケージング、およびTumour Processing HubからInstilの製造施設への輸送。凍結保存された腫瘍およびT細胞を、制御された条件を使用して解凍し、10% FBS、アンホテリシンB、ゲンタマイシン、バンコマイシン、およびIL-2 (本明細書ではICMTと称される)を補充した、80%ロズウェルパーク記念研究所(Roswell Park Memorial Institute) (RPMI) 1640培地および20% AIM Vで構成されるT細胞培地(TCM)中に希釈した。

10

【0786】

細胞を閉鎖バッグ内で遠心分離することによって洗浄し、ICMT中に再浮遊させ、細胞計数用の試料を取得した。細胞浮遊液を、1mL当たり 0.25×10^6 個の生存細胞を標的とするICMTを伴う培養バッグに播種し、プロセスの8日目まで制御された条件下でインキュベートする。8日目に、細胞計数用の試料を取得し、等体積のICMTを培養バッグに添加し、制御された条件下でインキュベートする。11日目に、細胞計数を得し、等体積のICMTを培養バッグに添加し、制御された条件下でインキュベートする。13日目に、細胞計数を得し、バッグ内で遠心分離することによってTILを濃縮して、 1×10^6 個~ 20×10^6 個の生存可能なT細胞をもたらす。

20

【0787】

同じく13日目に、 1×10^6 個~ 20×10^6 個の生存可能なアウトグロースしたTILを、8%ヒトAB血清およびIL-2を含有するTCMを伴う抗CD3および照射処理済フィーダー細胞(同種PBMC)(本明細書ではWTCTMと称される)を使用して活性化する。TIL活性化培養物を、静置培養バッグ内、制御された条件下で最大6日間インキュベートする。インキュベーションの19日目に、細胞計数を行い、活性化されたTILを、WTCTMを含有するバイオリアクターに播種する。細胞を制御された条件下で最大6日間インキュベートする。20日目に、プロセスの27日目の前またはそれまでに回収標的用量に達するまで、TIL拡大にIL-2を補充したTCMの連続的な供給を行った。

30

【0788】

回収用量に達したら、細胞を計数し、洗浄し、1%ヒト血清アルブミン(HSA)を補充したリン酸緩衝食塩水(PBS)中、遠心分離によって濃縮する。次いで、薬物製品(DP)バッグ内に入れたTILを2~8℃まで冷却し、16% HSAおよび20% DMSOを含有する凍結保護物質を用いて1:1で製剤化して、8.5% HSAおよび10% DMSOを含有するPBS中、DPの最終製剤をもたらす。ロットリリース試験、参照およびバックアップ試料用の試料体積を取り出す。

40

【0789】

製剤化されたDPをCRF中、所定のプログラムを使用し、製品が指定温度に達するまで凍結保存する。次いで、凍結保存したDPを液体窒素での保管に移した後、投与のために診療所まで-130℃以下で輸送する。

【表 1 2】

表 12 - 器具		
器具/用品	製造者	モデルまたはカタログ 番号
Leukosep ficoll tubes	Greiner Bio-One Lrd	227288
PermaLife Cell Culture Bag, 325 ml	Origen Biomeical Inc	PL325-2G
細胞培養拡大バッグ	Charter Medical Ltd.	EXP-1L
WAVE 10L バッグ	Cytiva	29-1084-43
CT800.1 Sefia kit	Cytiva	20001

10

【表 1 3】

表 13 - 試薬				
試薬	製造者	カタログ番号	ロット番号	使用期限
T 細胞培地	Life Technologies	04196658P	2021537	2020/8/31
ガンマ線照射処理済 FBS	Life Technologies	01190005H- RESERVE 2- 2YBT2DS	2225231RP	2024/5/31
Proleukin メーカーバ イアル(IL-2)	Clinigen Group PLC	Proleukin	801313T	2020/12/31
一定分量の IL-2 スト ック	N/A	N/A	CTU- IL2/02/09/2019	2020/8/31
ゲンタマイシン/アム ホテリシン溶液 (500x)	Life Technologies	R01510	2217613	2021/3/30
バンコマイシンメー カーバイアル	Bowmed Ibisqus	N/A	90260	2021/2/28
バンコマイシン一定 分量(50 mg/ml)	N/A	N/A	CTU-12-06-2020	2021/2/28
ガンマ線照射処理済 ヒト AB 血清	Gemini Bio- Products LLC	100-812G	H12Y00K	2020/9/30
OKT-3 メーカーバイ アル(1 g/ml)	Miltenyi Biotec Ltd	170-076-116	6200108211	2020/10/17
一定分量の OKT-3	N/A	N/A	CYU- OKT3/05/05/2020	2020/10/17
20%ヒト血清アルブ ミン	Nova Biologics Inc	68982-0633-02	M848B6661	2021/11/27
CryoSure DMSO	WAK-Chemie Medical GmbH	WAK-DMSO-50	USP8C1S	2022/2/28

20

30

40

(実施例 1 1)

【0 7 9 0】

全規模ランを GMP 条件下で行った。これらのランに使用した I T I L - 1 6 8 プロセスには、T I L アウトグロース期（ステージ 1）に播種する 1 m L 当たり 0 . 2 5 × 1 0⁶ 個の生存細胞の標的である凍結保存された腫瘍消化物の使用、T I L アウトグロースか

50

ら T I L 急速拡大相 (R E P) までの連続的な処理、および最終製品の自動化製剤化および最終薬物製品の凍結保存が含まれた。

【 0 7 9 1 】

I T I L - 1 6 8 は、少なくとも 1 つの以前のラインの治療から再発したかまたはそれに不応性である、進行した黒色腫を有する成人患者を処置するための腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) 治療である。I T I L - 1 6 8 は、患者のがん組織から単離し、e x - v i v o で拡大させ、静脈内に投与する自己 T 細胞の単回注入からなる。プロセスの改善が同定され、経時的に実行されており、改善されたプロセスは I T I L - 1 6 8 と称される。表にプロセスのバリエーションを要約する。

【表 1 4】

表 14 - 製造プロセス開発の要約					
プロセス ステップ	単位操作 /変化	MS v1.0	MS v1.1	UTIL-01	ITIL-168 プロセス
腫瘍消化物 調製	腫瘍脱凝集	ビン中での手 動での脱凝集	ビン中での手 動での脱凝集	バッグ中での 自動化された 脱凝集(Tiss-u- stor デバイス を使用)	バッグ中での自動化 された脱凝集(Tiss-u- stor デバイスを使用)
	腫瘍消化物製 剤化	凍結保存せず	凍結保存せず	凍結保存	凍結保存
TIL アウト グロース	腫瘍消化用の 培養容器	プレート中での オープンプロ セス	プレート中での オープンプロ セス	プレート中での オープンプロ セス	バッグ中でのクロ ーズドプロセス
	播種密度	1mL 当たり 1 ×10 ⁶ 個の生 存可能な細胞 の標的	1mL 当たり 1 ×10 ⁶ 個の生 存可能な細胞 の標的	1mL 当たり 0.5 ×10 ⁶ 個の生 存可能な細胞 の標的	1mL 当たり 0.25×10 ⁶ 個の生存可能な細胞 の標的
	細胞計数試験 法	血球計数器	フローサイト メトリー	フローサイト メトリー	フローサイトメトリ ー
	材料	ゲンタマイシ ン&アムホテ リシン B	ゲンタマイシ ン&アムホテ リシン B	ゲンタマイシ ン&アムホテ リシン B	ゲンタマイシン、アム ホテリシン B&バンコ マイシン
	材料	熱失活させ、 0.1μm で濾過 した FBS	熱失活させ、 0.1μm で濾過 した FBS	熱失活させ、 0.1μm で濾過 した FBS	熱失活させ、0.1μm で濾過した照射処理 済 FBS
TIL REP	材料	熱失活させ、 0.1μm で濾過 したヒト AB ドナー	熱失活させ、 0.1μm で濾過 したヒト AB ドナー	熱失活させ、 0.1μm で濾過 したヒト AB ドナー	熱失活させ、0.1μm で濾過した照射処理 済ヒト AB ドナー
REP までの TIL アウト グロース	TIL アウトグ ロース後、凍 結保存、解凍/ 洗浄および回 収	凍結保存を用 いた保持ステ ップ および 解凍の 1~3 日後の回収	凍結保存を用 いた保持ステ ップ および 解凍の 1~3 日後の回収	凍結保存を伴 わない連続的 な処理	凍結保存を伴わない 連続的な処理
薬物製品の 製剤化のため の回収	薬物製品	Haemonetics Cell Saver 5 (270mL までの 手動での製 剤化)	Haemonetics Cell Saver 5 (270mL までの 手動での製 剤化)	Haemonetics Cell Saver 5 (270mL までの 手動での製 剤化)	Cytiva Sefia S-2000 (110mL までの自動化 された製剤化)
薬物製品の 製剤化	薬物製品	凍結保存せず	凍結保存せず	凍結保存	凍結保存

10

20

30

40

50

【0792】

2つのプロセス開発ランに使用したITIL-168製造プロセスの概要を表15に示す。ラン1 (TIL065) およびラン2 (Biopartners9251) と表示される2つのプロセス開発ランを全規模、GMP条件下で行い、それぞれ、患者から集められた過剰量の腫瘍、およびベンダー-Biopartnersから調達した腫瘍を使用した。

【0793】

これらの2つのプロセス開発ランは、主にプロセス改善後の製造プロセスの性能および製品の品質を評価することを意図するものであったこと、ならびに、プロセス検証ランの前のGMP条件下での製造オペレーターの訓練ランとしての役割を果たすものであったことから、これらのランの間にバイオバーデンおよび最終製品の無菌性、内毒素、マイコプラズマおよび外観検査についてのプロセス内検査は行わなかった。

10

20

30

40

50

【表 15】

表 15 - ITIL-168 製造プロセスのプロセス流れ図

プロセスステップ	日	単位操作	プロセス管理	説明
受け取りおよび放出		凍結保存された腫瘍消化物の受け取り、検査および放出		凍結保存された腫瘍消化物の受け取り、検査、および放出
TIL アウトグロス		↓		
	1	凍結保存された腫瘍消化物 解凍および洗浄		腫瘍消化物の解凍、洗浄、および FBS、IL-2、および抗菌試薬を補充した培地への希釈
	1	TIL アウトグロス播種	細胞計数	培養バッグ(複数可)中、FBS、IL-2、および抗菌試薬を補充した培地への洗浄した細胞の播種
	1	TIL アウトグロスインキュベーション		洗浄した細胞の、培養バッグ(複数可)中、FBS、IL-2、および抗菌試薬を補充した培地での最大 12 日間のインキュベーション
	8	TIL アウトグロス培地添加	細胞計数	FBS、IL-2、および抗菌試薬を補充した培地での TIL の連続的な拡大
	11	TIL アウトグロス培地添加	細胞計数	FBS、IL-2、および抗菌試薬を補充した培地での TIL の連続的な拡大
TIL 急速拡大相	13	TIL アウトグロス濃縮	細胞計数	バッグ(複数可)での遠心分離による TIL 濃縮
	↓			
	13	TIL 活性化	細胞計数	- 培養バッグ(複数可)中、最大 6 日間のヒト A B 血清および IL-2 を含有する培地での抗 CD3 および照射処理済フィーダー細胞を用いた TIL 活性化 - 可能な場合、過剰量の TIL を凍結保存する
	↓			
	19	バイオリアクターへの TIL 播種	細胞計数	最大 8 日間にわたる、バイオリアクター中、ヒト A B 血清および IL-2 を補充した培地への TIL 播種
	20-27	バイオリアクターでの TIL 拡大 (灌流)	細胞計数	IL-2 を補充した培地の連続的な供給を伴うバイオリアクターバッグ中での TIL 拡大
回収	X ¹	回収洗浄および濃縮	細胞計数	洗浄して不純物を減少させ、TIL を濃縮する
薬物製品製剤化	X ¹	薬物製品の製剤化	細胞計数、用量、生存率、同一性/純度、効力	凍結保護物質を用いた TIL 製剤化
凍結保存	X ¹	薬物製品の凍結保存	温度	薬物製品の速度制御凍結
放出および輸送		薬物製品の保管、パッケージング、およびトランスポート	温度	- 製品を-130°C 以下で保管し、放出する - 診療所/注入センターへの輸送

【0794】

TIL アウトグロスおよび REP を、表 12 および表 13 に示されている材料を使用し、実施例 10 と同様に行った。

【0795】

両方のラン（ラン 1 およびラン 2）について、総 CD3 + 細胞計数を、TIL アウトグロス期またはステージ 1 については 1 日目、8 日目、11 日目および 13 日目に、TIL 急速拡大相（REP）またはステージ 2 については 13 日目、19 日目、22 日目および 25 日目に、バッチ製造記録（BMR）毎に測定した。図 76A および 76B は、2 つのランについての、それぞれ TIL アウトグロス期（ステージ 1）および TIL RE

10

20

30

40

50

P期（ステージ2）全体を通した総CD3+細胞計数を示す。図76Bに示されているデータから、両方のランについて、REP期の最後に $>1 \times 10^{10}$ 個のCD3+細胞が実現され、それにより、両方のロットが $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ 個のCD3+細胞という用量判定基準を満たしたことが実証される。

【0796】

生存率（生存可能なCD3+細胞のパーセンテージ）も両方のランについて1日目、8日目、11日目、13日目および25日目に測定した。図76Cは、生存率が製造プロセスの間に、REP期の最後に向かって上昇し、両方のランで $>70\%$ の最終製品基準が満たされたことを示す。

【0797】

急速拡大相（REP）の拡大倍率を2つのランについて細胞計数データから算出した。さらに、最終製品の、用量、生存率、効力、T細胞表現型およびT細胞サブセットなどの品質特性も2つのプロセス開発ランについて評価した。

【0798】

表16に提示されているデータから、プロセス改善後に、ITIL-168製造プロセスの性能が歴史的プロセスと同様であり、規格要件を満たす最終製品の品質特性がもたらされることが実証される。

【表16】

表 16 - ITIL-168 製造プロセスの性能および製品品質特性				
ラン	REP の間の拡大倍率(絶対的)	用量 (生存可能なCD3+細胞の総数)	生存率 (%)	効力 ¹ (%)
判定基準/規格要件	NA	$5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$	≥ 70	≥ 40
観察された歴史的範囲	395 – 7526 (n = 22)	$7.90 \times 10^9 \sim 6.25 \times 10^{10}$ (n=23)	80 – 99 (n = 23)	試験されるプロセスにおける歴史的保持
ラン 1	1350	3×10^{10}	90	63.2
ラン 2	1700	2×10^{10}	88	65.2

¹効力は、CD137、CD107a、TNF- α およびIFN- γ のうちの1つまたは複数について陽性である全ての生存可能なCD2+細胞の頻度として算出される

（実施例12）

投与

【0799】

治療

【0800】

対象は、シクロホスファミドおよびフルダラビンのリンパ球枯渇化学療法レジメンを受けた。この治療は、調節性T細胞などの抑制性細胞の影響を低減するため、およびリンパ球成長促進サイトカイン（例えば、IL-7およびIL-15）の発現を増大させるために設計される。リンパ球枯渇化学療法の前、およびその間に水分補給レジメンを開始した。抗菌薬および抗真菌薬による予防法をリンパ球枯渇化学療法の開始前に開始した。発熱および好中球減少を評定し、管理した。非ステロイド制吐薬による治療をリンパ球枯渇化学療法の前に開始し、必要に応じて継続した。

【0801】

リンパ球枯渇化学療法を以下の通り施行した。投与するシクロホスファミドおよびフル

ダラビンの用量をベースライン来訪時に取得した体重の評定に基づいて算出した。肥満の対象（肥満度指数＞35）に関しては、実質的な体重を使用した。シクロホスファミドの用量は体重に基づき、フルダラビンの用量は体表面積に基づく。用量は、用量バンディングの実施に従って切り上げるまたは切り捨てることができる。以下の表は、推奨用量、投与経路、注入体積、および持続時間を示す：

【表 17】

表 17 - リンパ球枯渇化学療法レジメン				
日	薬物	用量	経路	投与
-7	フルダラビン	25 mg/m ²	IV	0.9% NaCl 10～100ml 中、およそ 30 分かけて
	シクロホスファミド	60 mg/kg	IV	0.9% NaCl 500ml 中、およそ 1 時間かけて
-6	フルダラビン	25 mg/m ²	IV	0.9% NaCl 10～100ml 中、およそ 30 分かけて
	シクロホスファミド	60 mg/kg	IV	0.9% NaCl 500ml 中、およそ 1 時間かけて
-5	フルダラビン	25 mg/m ²	IV	0.9% NaCl 10～100ml 中、およそ 30 分かけて
-4	フルダラビン	25 mg/m ²	IV	0.9% NaCl 10～100ml 中、およそ 30 分かけて
-3	フルダラビン	25 mg/m ²	IV	0.9% NaCl 10～100ml 中、およそ 30 分かけて
-2	休薬日			
-1	休薬日			

10

20

【表 18】

表 18 - フルダラビン用量調整	
クレアチニンクリアランス(コッククロフト・ゴールト式によって測定)	フルダラビン用量
≥ 70 mL/分	25 mg/m ²
51～69 mL/分	20 mg/m ²

30

【0802】

対象に、TIL 注入前に抗ヒスタミン薬およびアセトアミノフェンを前投薬した。注入バッグの内容物は、非リンパ球枯渇フィルター（例えば、≥ 170 ミクロンのインライン／チューブフィルター）を使用して注入した。対象は、注入後サポートとして静脈内 IL-2 の投薬を最大 8 回受けた。IL-2 の投与は TIL 注入の完了後、0 日目に開始し、4 日目まで継続した。

40

（実施例 13）

処置の結果

【0803】

合計 44 名の転移性皮膚黒色腫の患者が腫瘍摘除を受け、TIL アウトグロース製造（ステージ 1）を開始した。これらの 44 名の患者のうち、42 名分の個々の患者ロットがステージ 1 を完了し、2 名分の試みが失敗した。31 名分の患者ロットを REP 製造（ステージ 2）に進めた。1 ロットが TIL アウトグロースステージ 1 製造で失敗し、修正ス

50

テージ 1 製造プロセスを実行し、これにより、上首尾のステージ 2 製造が可能になった。その後、患者を処置した。残りの 12 ロットは以下の理由で R E P 開始の選択がなされなかった：8 ロットは、患者を T I L 治療に対して不適切にする患者の状態の介入性臨床的悪化に起因し、うち 2 名の患者は他の治療での臨床的改善に起因してもはや T I L が必要なくなり、1 名の患者は処置のための財源を確保することができなくなり、1 ロットは摘除された検体に腫瘍組織が欠如していたことに起因して製造が失敗した。4 名分の患者ロットは首尾よく製造されたが、患者が T I L 治療に対して臨床的に不適切であるとみなされ、したがって処置を受けなかった。

【0804】

摘除された 44 名分の腫瘍のうち、2 名分が製造失敗し、95% の製造成功率が得られた。27 名の患者が標準の製造プロセスを利用して作製された T I L 製品を用いた処置を受けた。T I L 製造完了時に、これらの患者のうち 6 名が完全な処置レジメンには臨床的に不適切であるとみなされ、コンディショニング化学療法および注入後 I L - 2 を著しく低い用量で受け、したがって、解析からは除外された。1 名の患者は、腫瘍摘除が標準の T I L アウトグロス製造ステップ（ステージ 1）を開始するための基準を満たさなかった。したがって、改変ステージ 1 を開始し、これにより、急速拡大プロトコル（ステージ 2）、および、最終的な細胞用量が非常に低いものであったが（ 1.7×10^9 ）、最終製品の製剤化が可能になった。この製品は改変製造プロセスを使用して作製され、得られた細胞は低用量であったので、M S 認可プロセスを代表するものとはみなされず、したがって、臨床データは解析から除外された。

【0805】

残りの 21 名の患者の人口統計、ベースラインの患者の特徴、処置の詳細および性質、ならびに臨床的有効性および安全性アウトカムを収集し、解析した。解析カットオフ日まで、これらの患者の潜在的なフォローアップ期間の中央値は T I L 注入日から 52.2 カ月（範囲：4.6 カ月、98.8 カ月）であった。

【0806】

これらの 21 名の患者の中で、大多数（71%）が男性であり、T I L による処置時の年齢の中央値は 45 歳（範囲：16 歳、68 歳）であった。ベースラインにおいて、患者全員がステージ I V 転移性皮膚黒色腫を有し、黒色腫の最初の診断からの中央値は 39 カ月（範囲：8 カ月、177 カ月）であった。患者の大多数（67%）が、3 カ所よりも多くの疾患部位において報告される病変を有し、これには、T I L による処置時に、実証された脳転移を有した 7 名（33%）が含まれた。以前の全身性治療の回数の中央値は 2 回（範囲：1 回、9 回）であった。患者の 52 パーセント（52%）が B R A F 突然変異を有し、そのうち全員が、M E K 阻害薬を伴ってまたは伴わずに B R A F 阻害薬を受け、進行していた。2 名を除いて全員の患者（90%）が少なくとも 1 つの以前のチェックポイント阻害薬を有し、12 名（57%）が P D - 1 阻害薬（ニボルマブまたはペムブロリズマブのいずれか）を受けていた。さらに、8 名（38%）がイピリムマブおよびニボルマブまたはペムブロリズマブのいずれかを順次受けており、4 名（19%）がイピリムマブおよびニボルマブを同時に受けていた。T I L 産生のための腫瘍摘除前に、20 名（95%）が再発したかまたは不応性の進行性黒色腫を有しており、1 名（5%）が不耐容性に起因して T I L 治療前に処置を停止した。

【0807】

T I L を受ける直前に、患者 10 名（48%）が血清中ラクトースデヒドロゲナーゼ（L D H）レベルの上昇を有しており、7 名（33%）が正常範囲上限（U L N）の 1 倍から 2 倍の間であり、3 名（14%）が U L N の 2 倍よりも高かった。標的病変の、病変の寸法の合計（S L D）として測定されるベースライン腫瘍負荷が 20 名の患者について入手可能であった；ベースライン S L D の中央値は 100 mm（範囲：13 mm、281 mm）であった。

T I L による処置

【0808】

21名の患者全員が、TIL注入前のコンディショニング化学療法としてシクロホスファミドの投薬を2回、およびフルダラビンの投薬を5回受けた。注入されたTIL細胞の総数の中央値は、 31.9×10^9 個（範囲： 7.9×10^9 個、 62.5×10^9 個）であった。IL-2投薬の総回数の中央値は8回（範囲：4回、11回）であった。患者は、10日間の中央値（範囲：7日間、15日間）で病院に留まった。3名の患者（14%）が処置期間中ICUに入院した。

【0809】

TILによる処置期間中に臨床的に有意なAEが報告された。コンディショニング化学療法期間中に報告された一般的なAE（ $\geq 10\%$ ）には、好中球減少（43%）および悪心（19%）が含まれ、これらの化学療法剤の副作用プロファイルと広範に一致した。

10

【0810】

TIL注入後に発症した一般的なAEには、血小板減少（62%）、発熱（57%）、悪寒（43%）、頻脈（29%）、好中球減少（29%）、肺水腫（24%）、血管漏出（24%）、皮疹（19%）、心房細動（14%）、心血管系の不安定性（14%）、胸部感染（14%）、および水腫（14%）が含まれた（表19）。これらのAEは、他のTIL試験において報告されているものと一致する（Dafni et al, 2019; Rohaan et al, 2018）。

【0811】

製造プロセスがステージ1で失敗したが、改変製造プロセスで生成された製品を用いた処置を受けた患者はTIL治療の6日後に、腎不全、水分過負荷およびおそらく敗血症によって悪化した広範囲にわたる腫瘍負荷に起因して死亡した。

20

30

40

50

【表 19】

表 19. TIL 注入後に発症した AE (処置を受けた対象全員)

AE 用語- n (%)	処置を受けた対象全員 (N=21)
血小板減少	13 (61.9)
発熱	12 (57.1)
悪寒	9 (42.9)
好中球減少	6 (28.6)
頻脈	6 (28.6)
肺水腫	5 (23.8)
血管漏出	5 (23.8)
皮疹	4 (19.0)
心房細動	3 (14.3)
心血管系の不安定性	3 (14.3)
胸部感染	3 (14.3)
水腫	3 (14.3)
錯乱	2 (9.5)
低カリウム血症	2 (9.5)
低血圧	2 (9.5)
神経学的欠損	2 (9.5)
腎機能障害	2 (9.5)
呼吸器敗血症	2 (9.5)
発作	2 (9.5)
敗血症	2 (9.5)
白斑	2 (9.5)
体重増加	2 (9.5)
喘鳴	2 (9.5)
咳	1 (4.8)
下痢	1 (4.8)
不全失語症	1 (4.8)
生着症候群	1 (4.8)
幻覚	1 (4.8)
嗜眠	1 (4.8)
PICC ライン感染	1 (4.8)
胸水	1 (4.8)
肺炎	1 (4.8)
肺臓炎	1 (4.8)
呼吸障害	1 (4.8)
頻呼吸	1 (4.8)

10

20

30

【0812】

処置期間中、末梢血球計算を測定した。コンディショニング化学療法の開始時に、好中球、血小板、リンパ球、白血球数、およびヘモグロビンが減少する傾向が観察された。血液細胞計数およびヘモグロビンレベルは、概して、TIL 注入の1～4日後にそれらの最下点に達した。TIL 注入日からおよそ7日後に血球数のベースラインレベルまでの回復が一般に観察された。

40

【0813】

頑強性を改善し、製造を集中させた多施設臨床試験を可能にするために、製造プロセスの新しい変化を実行した。この更新では、消化された腫瘍材料を凍結保存して安定性を長引かせる。重要なことに、前もって凍結保存で作製された製品を用いた処置を受けた4名の患者において観察されたAEプロファイルは、処置を一連で受けた他の患者（表20）および他のTIL製品の臨床試験において報告されたものと広範に一致した。

50

【表 2 0】

表 20. TIL 注入後に発症した AE(Cryo-in 製品を用いた処置を受けた対象)

AE 用語- n (%)	処置を受けた対象全員 (N=4)
血小板減少	4 (100)
発熱	2 (50.0)
皮疹	2 (50.0)
悪寒	2 (50.0)
低血圧	1 (25.0)
腎機能障害	1 (25.0)
血管漏出	1 (25.0)
白斑	1 (25.0)

10

【0 8 1 4】

21名の患者のうち15名は、標的病変の放射線学的測定を含む連続CTおよび／またはMRIスキャンによる疾患評価を受けた。これらの患者の中で、定量的奏効率（応答の確認は必要ない）は53%であり、これには、CRが実現された患者2名（13%）およびPRが実現された患者6名（40%）が含まれる（表21）。

【表 2 1】

表 21. 最良総合効果の要約(有効性評価解析セット)

	有効性評価解析セット (N=15)
最良総合効果	
完全奏功 (CR)	2 (13.3)
95% CI (クロッパー・ピアソン法)	1.7, 40.5
部分奏功 (PR)	6 (40.0)
95% CI (クロッパー・ピアソン法)	16.3, 67.7
安定疾患 (SD)	3 (20.0)
95% CI (クロッパー・ピアソン法)	4.3, 48.1
進行疾患 (PD)	4 (26.7)
95% CI (クロッパー・ピアソン法)	7.8, 55.1
奏効率 (CR + PR)	8 (53.3)
95% CI (クロッパー・ピアソン法)	26.6, 78.7
疾患制御率 (CR + PR + SD)	11 (73.3)
95% CI (クロッパー・ピアソン法)	44.9, 92.2

20

30

【0 8 1 5】

患者全員を含めた定量的応答および定性的応答の両方に基づいた奏効率は57%であり、これには、CRが実現された患者3名（14%）およびPRが実現された患者9名（43%）が含まれる。2名の追加の患者にBRAf阻害薬であるダブラフェニブに対する耐性が発生し、TILによる処置に関して照会される前の治療で疾患進行が生じた。ダブラフェニブをTIL治療の直前に停止し、ダブラフェニブ中止に付随することも多い急速な腫瘍成長を防止するためにTILのおよそ1～2週間後に再開した。これらの2名の患者の各々でTIL後に定性的応答が実現された（1名は長続きするCRおよび1名はPR）。どちらの患者も、その後、TIL後に応答してダブラフェニブを1回中止した。これらの患者はどちらもダブラフェニブに対して不応性になった疾患を有していたので、これら

40

50

の患者が T I L 後に経験した臨床的有用性は T I L に起因するものであり、ダブラフェニブの一過性の再開に起因するものではないと結論づけることが合理的である。したがって、応答の感受性解析を、これらの患者を応答者として含めて行った。この感受性解析では、奏効率は 14 / 21 (67%) であり、4 名 (19%) が完全応答者であり、10 名 (48%) が部分応答者であった (表 22)。

【表 22】

表 22 - 最良総合効果の要約、感受性解析(処置を受けた対象全員)

処置を受けた対象全員 (N=21)	
最良総合効果	
完全奏功 (CR)	4 (19.0)
95% CI (クロツパー・ピアソン法)	5.4, 41.9
部分奏功 (PR)	10 (47.6)
95% CI (クロツパー・ピアソン法)	25.7, 70.2
安定疾患 (SD)	4 (19.0)
95% CI (クロツパー・ピアソン法)	5.4, 41.9
進行疾患 (PD)	3 (14.3)
95% CI (クロツパー・ピアソン法)	3.0, 36.3
奏効率 (CR + PR)	14 (66.7)
95% CI (クロツパー・ピアソン法)	43.0, 85.4
疾患制御率 (CR + PR + SD)	18 (85.7)
95% CI (クロツパー・ピアソン法)	63.7, 97.0

10

20

【0816】

応答は、年齢、疾患部位の数、以前の治療ラインの数、以前の B R A F 阻害薬、以前の P D - 1 阻害薬、ベースライン脳転移、およびベースライン腫瘍負荷を含めた重要なベースラインおよび疾患特徴ごとのサブグループにわたって一般に一致した。注目すべきことに、I T I L - 168 のものと最も類似した製造プロセスを用いた処置を受けた患者 4 名では、全奏効率 (75%) および C R 率 (25%) がより広範な集団と一致した。C T および / または M R I スキャンに基づいて定量的応答を有した患者 15 名のうち、14 名が詳細な腫瘍測定値を有し、ベースラインからの腫瘍縮小の最大パーセンテージをウォーターフォールプロットに示した (図 74)。1 名の患者は P D の最良総合効果を有したが、いかなる処置後の標的病変評価基準 (新しい病変の観察によって決定される進行) も報告されておらず、したがってプロットには示されていない。

30

【0817】

定量的応答データ (N = 15) に従った無進行生存 (P F S) 期間の中央値は 6.7 カ月であり、4 名の患者が継続している応答を有し (C R が 2 名および P R が 2 名)、解析カットオフ時にいかなるその後の治療も伴わなかった。定量的応答データおよび定性的応答データ (N = 21) の両方に基づいた P F S 期間の中央値は 6.7 カ月であり、5 名の対象が継続している応答を有し (C R が 3 名および P R が 2 名)、いかなるその後の治療も伴わなかった。処置を受けた患者 21 名全員についての全生存 (O S) 期間の中央値は 21.3 カ月であった (図 75 A)。定量的応答データを有した患者 15 名の O S 期間の中央値は 16 カ月であった (図 75 B)。しかし、応答者 (定量的応答のみにつき、N = 8) の O S 期間の中央値は結論に達せず、一方、非応答者 (N = 7) についての O S 期間の中央値は 6.5 カ月であった (図 75 C)。

40

(実施例 14)

遺伝子改変された T I L

50

【表 2 3】

表 23 - 試薬および機器		
試薬	製造者	カタログ番号
15mL のポリプロピレン遠心管	Appleton Woods	AB031
50mL のポリプロピレン遠心管	Appleton Woods	AB028
ダルベッコリン酸緩衝食塩水	Sigma-Aldrich	D8537-24X500ML
ウシ胎仔血清(熱失活)	Sigma-Aldrich	F9665-500ML
TCM- CT4834/GIBCO CUSTOM P158718	Gibco	
ペニシリン-ストレプトマイシン	Sigma-Aldrich	P0781-100ML
TC 6 ウェルプレート	StarLab	CC7682-7506
滅菌 1.5mL Eppendorf	StarLab	S1615-5510
非 TC 平底 96 ウェルプレート	Falcon	353072
96 ウェル U 底プレート	Falcon	351177
FACS 管	SLS	352063
TC 24 ウェルプレート	StarLab	CC7682-7524
懸濁培養用マイクロプレート、96 ウェル、F 底	Grenier, Bio-One	655185
T cell TransACT (商標)、ヒト	Miltenyi	130-111-160
ゲンタマイシンアンホテリシン	Invitrogen (ThermoFisher Scientific)	10184583
Proleukin (アルデスロイキン) IL-2	Novartis	PL-00101/0936
Heraeus Megafuge 40R, Refrigerated Centrifuge	Thermo Scientific	75004518
IncuSafe CO2 Incubator	PHCBI	MCO-170AIC-PE
NovoCyte 3005 Flow Cytometer System (CE-IVD)	Agilent Technologies	2010064D
NovoExpress Software	Agilent Technologies	

【0 8 1 8】

腫瘍消化物クライオバイアルを液体窒素での保管から取り出し、37℃のウォーターバス中、細胞浮遊液がちょうど融解するまで解凍する(D1)。細胞浮遊液を取り出して15mLのファルコンに入れ、10mLになるまでPBSを追加し、400gで5分間遠心分離し、上清をデカントする。

【0 8 1 9】

細胞ペレットを予め温めた適切なT細胞培地中に再浮遊させ、トリパンプルーを使用して細胞計数を行って生存率を決定する。細胞を1mL当たり 1×10^6 個の細胞の密度で再浮遊させる。

【0 8 2 0】

活性化せずに培養する細胞を1mL当たり 0.5×10^6 個の細胞で再浮遊させ、2mL(細胞 1×10^6 個)をIL-2(3000IU/mL)を伴う24ウェル組織培養プレートのウェルに入れる。細胞を加湿した37℃のインキュベーター中、形質導入を行うまで、2～3日ごとにIL-2(3000IU/mL)を添加しながら培養する。

【0 8 2 1】

D3およびD4に形質導入を行う細胞に対して、細胞の活性化をD1に行う。D7およびD8に形質導入を行う細胞に対して、細胞の活性化をD5に行う。

【0 8 2 2】

10

20

30

40

50

T I L 活性化のために、1 m L 当たり 0.5×10^6 個の細胞を 3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を伴う 2 4 ウェル組織培養プレートに入れる。T I L 浮遊液の細胞 1×10^6 個当たり 1 0 μ L の T c e l l T r a n s A C T (商標) を添加し (1 : 1 の比)、細胞を 3 7 $^{\circ}$ C のインキュベーターで 4 8 時間インキュベートする。

【0823】

形質導入初日 (D 3 または D 7)

【0824】

細胞を 2 4 ウェルプレートから収集して 1 5 m L のファルコン管に入れ、T C M 1 0 m L を追加し、4 0 0 g で 5 分間高速回転させる。トリパンプルーを使用して細胞を計数し、1 m L 当たり細胞 1×10^6 個で再浮遊させる。

【0825】

9 6 ウェル平底プレートのウェル当たり 1×10^5 個の細胞 (1 0 0 μ L) を各形質導入法に使用する。2 4 ウェルプレートにおける形質導入の場合、ウェル当たり 1×10^6 個の細胞 (5 0 0 μ L) を入れる。6 ウェルプレートにおける形質導入の場合、ウェル当たり 5×10^6 個の細胞 (2 m L) を入れる。

【0826】

レンチウイルス (M O I 5) および I L - 2 (3 0 0 0 I U / m L) のマスターミックスを、T C M 中に最終的に条件当たり細胞 10^5 個当たり 1 0 0 μ L (または 2 4 ウェルプレートおよび 6 ウェルプレートに適した密度および体積) まで再浮遊させることによって調製する。ピペット操作による減りのためにマスターミックス体積をウェルの数 + 1 に調製する。

【0827】

N T 細胞 (模擬) に関しては、T C M および I L - 2 (3 0 0 0 I U / m L) のマスターミックスを 9 6 ウェル平底プレート中、1 0 0 μ L 当たりで調製する。2 4 ウェルプレートおよび 6 ウェルプレートについては、模擬 T 細胞をそれぞれ 5 0 0 μ L および 2 m L に I L - 2 (3 0 0 0 I U / m L) とともに再浮遊させる。

【0828】

細胞から上清を取り出して E p p e n d o r f または 1 5 m L のファルコン管に入れ、細胞を、条件に応じて、 1×10^5 個の細胞当たり適切な 1 0 0 μ L のマスターミックス (または 2 4 ウェルプレートおよび 6 ウェルプレートに適した密度および体積) に再浮遊させる。

【0829】

各条件で適切に再浮遊させ、細胞を非 T C 平底 9 6 ウェルプレート、2 4 ウェルプレートまたは 6 ウェルプレートに適宜入れる。

【0830】

9 6 ウェルプレートでの形質導入に関しては、蒸発を防ぐために P B S 2 0 0 μ L を周囲のウェルに添加する。

【0831】

細胞を加湿した 3 7 $^{\circ}$ C のインキュベーター中で一晚インキュベートする。

【0832】

形質導入 2 日目 (D 4 または D 8)

【0833】

細胞を、9 6 ウェル平底プレートから上下に再浮遊させることによって収集し、9 6 ウェル U 底プレートに移す (2 4 ウェルプレートまたは 6 ウェルプレートからの収集を 1 5 m L のファルコン中に行う)。プレートを 4 0 0 g で 5 分間高速回転させ、細胞を T C M で洗浄する。

【0834】

各形質導入法について、9 6 ウェル平底プレートにおいてウェル当たり 1×10^5 個の細胞 (1 0 0 μ L) を使用する。2 4 ウェルプレートにおける形質導入の場合、ウェル当たり 1×10^6 個の細胞 (5 0 0 μ L) を入れる。6 ウェルプレートにおける形質導入の

10

20

30

40

50

場合、ウェル当たり 5×10^6 個の細胞 (2 mL) を入れる。

【0835】

レンチウイルス (MOI 5) および IL-2 (3000 IU/mL) のマスターミックスを、TCM 中に、最終的に条件当たり細胞 10^5 個当たり 100 μ L (または 24 ウェルプレートおよび 6 ウェルプレートに適した密度および体積) まで再浮遊させることによって調製する。ピペット操作による減りのためにウェルの数 + 1 にマスターミックス体積を調製する。

【0836】

NT 細胞 (模擬) に関しては、TCM および IL-2 (3000 IU/mL) のマスターミックスを、96 ウェル平底プレートについては 100 μ L 当たりで調製する。24 ウェルプレートおよび 6 ウェルプレートについては、模擬 T 細胞をそれぞれ 500 μ L および 2 mL に IL-2 (3000 IU/mL) とともに再浮遊させる。

【0837】

細胞から上清を取り出して Eppendorf またはファルコン管に入れ、細胞を、条件に応じて、 1×10^5 個の細胞当たり (または 24 ウェルプレートおよび 6 ウェルプレートに適した密度および体積) 適切な 100 μ L のマスターミックスに再浮遊させる。

【0838】

各条件で適切に再浮遊させ、細胞を非 TC 平底 96 ウェルプレート、24 ウェルプレートまたは 6 ウェルプレートに適宜入れる。96 ウェルプレートでの形質導入に関して、蒸発を防ぐために PBS 200 μ L を周囲のウェルに添加する。細胞を加湿した 37°C のインキュベーター中で一晩インキュベートする。

【0839】

翌日、細胞を新しい 96 ウェル丸底プレート、24 ウェルプレートまたは 6 ウェルプレート中、IL-2 (3000 IU/mL) を伴う新たな培地に移し、加湿した 37°C のインキュベーター中で 72 時間インキュベートする。

【0840】

96 ウェルプレートについての最終体積はウェル当たり 200 μ L であり、24 ウェルプレートについての最終体積はウェル当たり 2 mL であり、6 ウェルプレートについての最終体積はウェル当たり 5 mL である。IL-2 (3000 IU/mL) を 2 ~ 3 日ごとに添加する。

【0841】

形質導入効率に関して、D3 + D4 形質導入については D8 に、および D7 + D8 形質導入については D12 に細胞を染色する。

【0842】

TILS のアウトグロース

【0843】

模擬および形質導入細胞を REP に入るまで 96 ウェル U 底プレート中で維持する。

【0844】

細胞維持のために、2 ~ 3 日ごとに培地の半分を除去し、新たな TCM および IL-2 (3000 IU/mL) で置き換える。96 ウェルプレートについては、培地 100 μ L を除去し、置き換えて最終体積を 200 μ L にする。24 ウェルプレートについては、培地 1 mL を除去し、置き換えて最終体積を 2 mL にする。6 ウェルプレートについては、培地 1 mL を除去し、置き換えて最終体積を 2 mL にする。

【0845】

REP を D13 に開始する (12 日間のアウトグロース)。

【0846】

本発明を以下の番号を付したパラグラフによってさらに記載する：

【0847】

1. 凍結保存された改変されていない腫瘍浸潤リンパ球 (UTIL) の治療用集団を単離するための方法であって、(a) 対象から摘除した腫瘍を無菌で脱凝集させ、それによ

10

20

30

40

50

って脱凝集腫瘍を生じさせるステップであって、腫瘍が、細胞浮遊液を凍結保存することができるように十分に脱凝集される、ステップ；（b）脱凝集腫瘍を、ステップ（a）と同日に、冷却することまたは低温で維持することによって凍結保存するステップ；（c）必要に応じて、凍結保存された脱凝集腫瘍を保管するステップ；（d）脱凝集腫瘍を、IL-2を含む細胞培養培地で培養することにより、第1の拡大を行って、UTILの第1の集団を産生するステップ；（e）追加のIL-2、OKT-3、および抗原提示細胞（APC）とともにUTILの第1の集団を培養することにより、第2の拡大を行って、第2のUTILの集団を産生するステップ；ならびに（f）UTILの第2の集団を回収および／または凍結保存するステップを含む、方法。

【0848】

10

2．脱凝集が、物理的脱凝集、酵素的脱凝集、または物理的かつ酵素的脱凝集を含む、パラグラフ1の方法。

【0849】

3．冷却が、制御された速度でなされる、パラグラフ1または2の方法。

【0850】

4．速度制御凍結が、毎分約-2℃～約-60℃である、パラグラフ3の方法。

【0851】

5．脱凝集腫瘍が、個々の細胞になっている、パラグラフ1～5のいずれか1つの方法

。

【0852】

20

6．脱凝集腫瘍が、精製される、パラグラフ1～5のいずれか1つの方法。

【0853】

7．ステップ（a）の後に単一細胞浮遊液がもたらされる、パラグラフ1～6のいずれか1つの方法。

【0854】

8．UTILの第1の集団が、約100～2000万個のUTILである、パラグラフ1～7のいずれか1つの方法。

【0855】

9．ステップ（d）が、腫瘍出発材料からUTILを成長させることをさらに含み、その後、ステップ（e）における急速拡大を行う、パラグラフ1～8のいずれか1つの方法

。

30

【0856】

10．ステップ（d）が約2週間行われ、ステップ（e）が約2週間行われる、パラグラフ9の方法。

【0857】

11．ステップ（d）および／またはステップ（e）が、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、またはこれらの組合せを添加することをさらに含む、パラグラフ1～10のいずれか1つの方法。

【0858】

12．（g）UTILの第2の集団を浮遊させるステップをさらに含む、パラグラフ1～11のいずれか1つの方法。

40

【0859】

13．浮遊が、緩衝食塩水、ヒト血清アルブミンおよびジメチルスルホキシド（DMSO）中への浮遊である、パラグラフ12の方法。

【0860】

14．ステップ（f）が凍結保存であり、UTILを解凍する最終的なステップをさらに含む、パラグラフ1～13のいずれか1つの方法。

【0861】

15．解凍されたUTILが、さらなる改変を伴わずに単回投薬として注入する準備ができている、パラグラフ14の方法。

50

【0862】

16. パラグラフ1～15のいずれか1つの方法によって得られる、凍結保存された改変されていない腫瘍浸潤リンパ球（UTIL）の治療用集団。

【0863】

17. 約 $5 \times 10^9 \sim 5 \times 10^{10}$ 個のT細胞を含む、パラグラフ16の治療用集団。

【0864】

18. パラグラフ16または17の治療用集団の凍結保存されたバッグ。

【0865】

19. 静脈内注入に使用するための、パラグラフ18の凍結保存されたバッグ。

【0866】

20. パラグラフ14もしくは15の治療用集団またはパラグラフ18もしくは19の凍結保存されたバッグを投与することを含む、がんを処置するための方法。

【0867】

21. がんが、膀胱がん、乳がん、ヒトパピローマウイルスにより引き起こされるがん、子宮頸がん、頭頸部がん（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む、肺がん、黒色腫、卵巣がん、非小細胞肺がん（NSCLC）、腎がんまたは腎細胞癌である、パラグラフ20の方法。

【0868】

本発明を以下の番号を付したパラグラフによってさらに記載する：

【0869】

1. 凍結保存された改変されていない腫瘍浸潤リンパ球（UTIL）の治療用集団を単離するための方法であって、（a）対象から腫瘍を摘除するステップ；（b）摘除腫瘍を使い捨ての無菌キットに保管するステップであって、無菌キットが、哺乳動物の固形組織を含む材料の受け取りおよび処理のための脱凝集モジュールと、脱凝集固形組織材料の濾過ならびに脱凝集されていない組織および濾液の離隔のための必要に応じた富化モジュールと、脱凝集産物を必要に応じてさらに処理および／または保管するための安定化モジュールとを含み、モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器を含み、1つまたは複数の可撓性容器が、それらの間の組織材料の流れを可能にするように適合された1つまたは複数の導管により接続されており、モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器への培地および／または試薬の無菌での投入を可能にするための1つまたは複数の口を含む、ステップ；（c）摘除腫瘍を脱凝集モジュール内で無菌で脱凝集させる、それによって脱凝集腫瘍を生じさせるステップであって、摘除腫瘍が、細胞損傷を伴わずに凍結保存することができるのであれば、十分に脱凝集される、ステップ；（d）脱凝集腫瘍を安定化モジュールにおいて凍結保存するステップ；（e）脱凝集腫瘍を、IL-2を含む細胞培養培地で培養することにより、第1の拡大を行って、UTILの第1の集団を産生するステップ；（f）追加のIL-2、OKT-3、および抗原提示細胞（APC）とともにUTILの第1の集団を培養することにより、第2の拡大を行って、第2のTILの集団を産生するステップ；（g）UTILの第2の集団を回収および／または凍結保存するステップを含む、方法。一部の実施形態では、ステップa）は必要に応じたものである。

【0870】

2. 脱凝集が、物理的脱凝集、酵素的脱凝集、または物理的かつ酵素的脱凝集を含む、パラグラフ1の方法。

【0871】

3. 脱凝集腫瘍が、個々の細胞になっている、パラグラフ1または2の方法。

【0872】

4. ステップ（c）の後に単一細胞浮遊液がもたらされる、パラグラフ1～3のいずれか1つの方法。

【0873】

5. UTILの第1の集団が、約100～2000万個のUTILである、パラグラフ1～4のいずれか1つの方法。

10

20

30

40

50

【0874】

6. ステップ (e) が、摘除腫瘍出発材料から U T I L を成長させることをさらに含み、その後、ステップ (f) の急速拡大を行う、パラグラフ 1 ~ 5 のいずれか 1 つの方法。

【0875】

7. ステップ (e) が約 2 週間行われ、ステップ (f) が約 2 週間行われる、パラグラフ 6 の方法。

【0876】

8. ステップ (e) および／またはステップ (f) が、I L - 7、I L - 12、I L - 15、I L - 18、I L - 21、またはこれらの組合せを添加することをさらに含む、パラグラフ 1 ~ 7 のいずれか 1 つの方法。

【0877】

9. (h) U T I L の第 2 の集団を浮遊させるステップをさらに含む、パラグラフ 1 ~ 7 のいずれか 1 つの方法。

【0878】

10. 浮遊が、緩衝食塩水、ヒト血清アルブミン、およびジメチルスルホキシド (D M S O) 中への浮遊である、パラグラフ 9 の方法。

【0879】

11. ステップ (g) が、凍結保存であり、U T I L を解凍する最終的なステップをさらに含む、パラグラフ 1 ~ 9 のいずれか 1 つの方法。

【0880】

12. 解凍された U T I L が、さらなる改変を伴わずに単回投薬として注入する準備ができていて、パラグラフ 10 の方法。

【0881】

13. パラグラフ 1 ~ 11 のいずれか 1 つの方法によって得られる、凍結保存された U T I L の治療用集団。

【0882】

14. 約 5×10^9 ~ 5×10^{10} 個の T 細胞を含む、パラグラフ 13 の治療用集団。

【0883】

15. パラグラフ 13 または 14 の治療用集団の凍結保存されたバッグ。

【0884】

16. 静脈内注入に使用するための、パラグラフ 15 の凍結保存されたバッグ。

【0885】

17. パラグラフ 13 もしくは 14 の治療用集団またはパラグラフ 15 もしくは 16 の凍結保存されたバッグを投与することを含む、がんを処置するための方法。

【0886】

18. がんが、膀胱がん、乳がん、ヒトパピローマウイルスにより引き起こされるがん、子宮頸がん、頭頸部がん (頭頸部扁平上皮癌 [H N S C C] を含む)、肺がん、黒色腫、卵巣がん、非小細胞肺がん (N S C L C)、腎がんまたは腎細胞癌である、パラグラフ 17 の方法。

【0887】

19. 無菌キットの 1 つまたは複数の可撓性容器が、弾性の変形可能な材料を含む、パラグラフ 1 の方法。

【0888】

20. 無菌キットの脱凝集モジュールの 1 つまたは複数の可撓性容器が、1 つまたは複数の密封可能な開口部を含む、パラグラフ 1 の方法。

【0889】

21. 無菌キットの脱凝集モジュールの可撓性容器が、ヒートシール可能な溶接部を含む、パラグラフ 20 の方法。

【0890】

22. 無菌キットの 1 つまたは複数の可撓性容器が、内側に曲がった縁部を含む、パラ

10

20

30

40

50

グラフ 1 の方法。

【 0 8 9 1 】

2 3 . 無菌キットの脱凝集モジュールの 1 つまたは複数の可撓性容器が、その中で固形組織を機械的に粉碎および剪断するように適合された脱凝集表面を含む、パラグラフ 1 の方法。

【 0 8 9 2 】

2 4 . 無菌キットの富化モジュールの 1 つまたは複数の可撓性容器が、個々の細胞になった脱凝集固形組織の保持液を保持するフィルターを含む、パラグラフ 1 の方法。

【 0 8 9 3 】

2 5 . 無菌キットの安定化モジュールの 1 つまたは複数の可撓性容器が、生存細胞を溶液内にまたは凍結保存された状態で保管するための培地配合物を含む、パラグラフ 1 の方法。

【 0 8 9 4 】

2 6 . 無菌キットが、デジタル、電子、または電磁気タグ識別子をさらに含む、パラグラフ 1 の方法。

【 0 8 9 5 】

2 7 . 無菌キットのタグ識別子が、脱凝集および／または富化および／または安定化プロセスの型、前記プロセスに使用される 1 つまたは複数の型の培地を、速度制御凍結に適した必要に応じた凍結溶液を含めて規定する特定のプログラムに関する、パラグラフ 2 6 の方法。

【 0 8 9 6 】

2 8 . 同じ可撓性容器が脱凝集モジュール、安定化モジュール、および必要に応じた富化モジュールのうちの 1 つまたは複数の一部を形成し得る、パラグラフ 1 の方法。

【 0 8 9 7 】

2 9 . 無菌キットの脱凝集モジュールが、処理される組織の受け取りのための第 1 の可撓性容器を含む、パラグラフ 1 の方法。

【 0 8 9 8 】

3 0 . 無菌キットの脱凝集モジュールが、脱凝集用の培地を含む第 2 の可撓性容器を含む、パラグラフ 1 の方法。

【 0 8 9 9 】

3 1 . 無菌キットの必要に応じた富化モジュールが、第 1 の可撓性容器および富化された濾液の受け取りのための第 3 の可撓性容器を含む、パラグラフ 1 の方法。

【 0 9 0 0 】

3 2 . 無菌キットの脱凝集モジュールおよび安定化モジュールの両方が第 2 の可撓性容器を含み、第 2 の容器が消化培地および安定化培地を含む、パラグラフ 1 の方法。

【 0 9 0 1 】

3 3 . 無菌キットの安定化モジュールが、安定化培地を含む第 4 の可撓性容器を含む、パラグラフ 1 の方法。

【 0 9 0 2 】

3 4 . 無菌キットの安定化モジュールが、保管および／または凍結保存のための第 1 の可撓性容器および／または第 3 の可撓性容器も含む、パラグラフ 1 の方法。

【 0 9 0 3 】

3 5 . 凍結保存された改変されていない腫瘍浸潤リンパ球 (U T I L) の治療用集団を単離するための方法であって、 (a) 対象から腫瘍を摘除するステップ ; (b) 摘除腫瘍を、プログラム可能なプロセッサと使い捨ての無菌キットとを含む、哺乳動物の固形組織由来の細胞または細胞凝集体の半自動化無菌脱凝集および／または富化および／または安定化のための自動化デバイスに保管するステップであって、無菌キットが、哺乳動物の固形組織を含む材料の受け取りおよび処理のための脱凝集モジュールと、脱凝集固形組織材料の濾過ならびに脱凝集されていない組織および濾液の離隔のための必要に応じた富化モジュールと、脱凝集産物を必要に応じてさらに処理および／または保管するための安定

10

20

30

40

50

化モジュールとを含み、モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器を含み、1つまたは複数の可撓性容器が、それらの間の組織材料の流れを可能にするように適合された1つまたは複数の導管により接続されており、モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器への培地および／または試薬の無菌での投入を可能にするための1つまたは複数の口を含む、ステップ；（c）摘除腫瘍を無菌で脱凝集させ、それによって脱凝集腫瘍を生じさせるステップであって、摘除腫瘍が、細胞損傷を伴わずに凍結保存することができるのであれば、十分に脱凝集される、ステップ；（d）脱凝集腫瘍を安定化モジュールにおいて凍結保存するステップ；（e）脱凝集腫瘍を、IL-2を含む細胞培養培地で培養することにより、第1の拡大を行って、UTILの第1の集団を産生するステップ；（f）追加のIL-2、OKT-3、および抗原提示細胞（APC）とともにUTILの第1の集団を培養することにより、第2の拡大を行って、第2のTILの集団を産生するステップ；（g）UTILの第2の集団を回収および／または凍結保存するステップを含む、方法。一部の実施形態では、ステップa）は必要に応じたものである。

10

【0904】

36．自動化デバイスが、無菌キットを認識するための無線周波数識別タグリーダーをさらに含む、パラグラフ35の方法。

【0905】

37．自動化デバイスのプログラム可能なプロセッサが、タグによって無菌キットを認識することができ、その後、脱凝集、富化、および安定化プロセスの型、ならびに前記プロセスに必要なそれぞれの培地型を規定するキットプログラムを実行する、パラグラフ36の方法。

20

【0906】

38．自動化デバイスのプログラム可能なプロセッサが、脱凝集モジュール、富化モジュール、および安定化モジュールのうちの1つまたは複数と通信し、それを制御するように適合されている、パラグラフ35の方法。

【0907】

39．自動化デバイスのプログラム可能なプロセッサが、固形組織材料の物理的および／または生物学的分解を可能にするように脱凝集モジュールを制御する、パラグラフ38の方法。

【0908】

40．プログラム可能なプロセッサが、固形組織材料の物理的および酵素的分解を可能にするように脱凝集モジュールを制御する、パラグラフ39の方法。

30

【0909】

41．固形組織材料の酵素的分解が、コラゲナーゼ、トリプシン、リパーゼ、ヒアルロニダーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、Liberase HI、ペプシン、およびそれらの混合物からなる群から選択される1つまたは複数の培地酵素溶液によるものである、パラグラフ40の方法。

【0910】

42．プログラム可能なプロセッサが、固形組織を機械的に粉碎および剪断する脱凝集可撓性容器内の脱凝集表面を制御し、必要に応じて、脱凝集表面が機械的ピストンである、パラグラフ35の方法。

40

【0911】

43．プログラム可能なプロセッサが、富化された脱凝集固形組織を必要に応じてプログラム可能な温度を使用して容器内で凍結保存するように安定化モジュールを制御する、パラグラフ35の方法。

【0912】

44．自動化デバイスが、以下；脱凝集プロセスが、必要に応じた富化モジュールへの脱凝集固形組織の移送の前に、脱凝集モジュールにおいて完了しているかどうかを認識することができるセンサー；脱凝集モジュール、富化モジュール、および／もしくは安定化モジュールのうちの1つもしくは複数の容器内で必要とされる培地の量を決定し、それぞ

50

れの容器間の材料の移送を制御する重量センサー；脱凝集モジュール、富化モジュール、および／もしくは安定化モジュールのうちの1つもしくは複数の容器内の温度を制御するためのセンサー；モジュール内の各容器の投入口と排出口の間の培地の移送を制御するための少なくとも1つの気泡センサー；投入口と排出口の間の培地の移送を制御するための少なくとも1つのポンプ、必要に応じて蠕動ポンプ；富化モジュール内の圧力を評定するための圧力センサー；富化モジュール内での接線流濾過プロセスを制御するための1つもしくは複数の弁；ならびに／または各モジュールの投入口と排出口の間の培地の移送を制御するための1つもしくは複数のクランプ、のうちの1つまたは複数の任意の組合せでさらに含む、パラグラフ35の方法。

【0913】

45．自動化デバイスのプログラム可能なプロセッサが、容器が取り出されるまで安定化モジュール内の最適な保管温度範囲を維持するように適合されている；または制御された凍結ステップを実行する、パラグラフ35の方法。

【0914】

46．自動化デバイスが、ユーザーインターフェースをさらに含む、パラグラフ35の方法。

【0915】

47．インターフェースが、使用者がパラメータを入力する、予めプログラムされたステップを確認する、エラーを通知する、またはこれらの組合せを行うことをガイドする指示を表示するための表示画面を含む、パラグラフ46の方法。

【0916】

48．自動化デバイスが、可搬型になるように適合されている、パラグラフ35の方法。

【0917】

49．U T I Lの治療用集団を単離するための半自動無菌組織処理方法であって、（a）無菌脱凝集組織処理ステップおよびそれらの関連する条件を無菌処理キットに付随するデジタル、電子、または電磁気タグ識別子から自動的に決定するステップであって、無菌キットが、哺乳動物の固形組織を含む材料の受け取りおよび処理のための脱凝集モジュールと、脱凝集固形組織材料の濾過ならびに脱凝集されていない組織および濾液の離隔のための必要に応じた富化モジュールと、脱凝集産物を必要に応じてさらに処理および／または保管するための安定化モジュールとを含み、モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器を含み、1つまたは複数の可撓性容器が、それらの間の組織材料の流れを可能にするように適合された1つまたは複数の導管により接続されており、モジュールの各々が、1つまたは複数の可撓性容器への培地および／または試薬の無菌での投入を可能にするための1つまたは複数の口を含む、ステップ；（b）対象から腫瘍を摘除するステップ；（c）腫瘍を無菌キットの脱凝集モジュールの可撓性プラスチック容器に入れるステップ；（d）摘除腫瘍を無菌で脱凝集させ、それによって脱凝集腫瘍を生じさせるモジュールであって、摘除腫瘍が細胞損傷を伴わずに凍結保存することができるのであれば十分に脱凝集される、脱凝集モジュール；脱凝集腫瘍が濾過されて、脱凝集固形組織材料が取り出され、脱凝集されていない組織および濾液が離隔される、必要に応じた富化モジュール；脱凝集腫瘍が凍結保存される、安定化モジュールと通信し、それを制御することにより1つまたは複数の組織処理するステップを自動的に実行することによって腫瘍を処理するステップ；（e）脱凝集腫瘍を、I L-2を含む細胞培養培地で培養することにより、第1の拡大を行って、U T I Lの第1の集団を産生するステップ；（f）追加のI L-2、O K T-3、および抗原提示細胞（A P C）とともにU T I Lの第1の集団を培養することにより、第2の拡大を行って、第2のT I Lの集団を産生するステップ；ならびに（g）U T I Lの第2の集団を回収および／または凍結保存するステップを含む、方法。

【0918】

本発明を以下の番号を付したパラグラフによってさらに記載する：

【0919】

1. 組織を処理するための可撓性容器であって、可撓性容器の少なくとも3つの縁部が製造中に密封される、密封可能なポリマーで作られた1つまたは複数の層と、それを通して組織材料が使用中に挿入される、可撓性容器の開口縁部と、可撓性容器をチューブによって少なくとも1つの要素に連結するように構成された1つまたは複数の継手とを含み、開口縁部に近接したセクションが、組織材料が可撓性容器内に配置された後に密封されてシールを形成する、可撓性容器。

【0920】

2. シールが、可撓性容器の開口縁部と平行しており、開口縁部から間隔が空いた、少なくとも幅3mmの領域を含む、パラグラフ1の可撓性容器。

【0921】

3. 突出部を有し、シールに近接して、かつ、可撓性容器の開口縁部からシールよりもさらに間隔を空けて配置されたクランプをさらに含む、パラグラフ1の可撓性容器。

【0922】

4. シールとクランプの組合せが、使用中に、可撓性容器に印加される100Nの力に抵抗するように構成されている、パラグラフ3の可撓性容器。

【0923】

5. シールとクランプの組合せが、使用中に、可撓性容器に印加される75Nの力に抵抗するように構成されている、パラグラフ3の可撓性容器。

【0924】

6. シールが、可撓性容器の開口縁部と平行しており、開口縁部から間隔が空いた少なくとも幅5mmの領域を含む、パラグラフ1の可撓性容器。

【0925】

7. 組織材料の脱凝集に使用される、パラグラフ1の可撓性容器。

【0926】

8. 組織材料の脱凝集、脱凝集された組織材料の濾過、ならびに脱凝集されていない組織および濾液の離隔のために使用される、パラグラフ1の可撓性容器。

【0927】

9. 弾性の変形可能な材料をさらに含む、パラグラフ1の可撓性容器。

【0928】

10. 1つまたは複数のインジケータをさらに含む、パラグラフ1の可撓性容器。

【0929】

11. 1つまたは複数のマークをさらに含む、パラグラフ1の可撓性容器。

【0930】

12. シールが、ヒートシーラーを使用して、所定の圧力、所定の温度、および所定の時間枠で操作して形成される、パラグラフ1の可撓性容器。

【0931】

13. 可撓性容器に入れられた組織材料を機械的に粉砕するデバイスで使用されるように構成されている、パラグラフ1の可撓性容器。

【0932】

14. 組織材料を剪断するように構成されている、パラグラフ1の可撓性容器。

【0933】

15. 哺乳動物細胞または細胞凝集体の無菌脱凝集、安定化および必要に応じた富化のための半自動化または自動化プロセスにおける、パラグラフ1による可撓性容器の使用。

【0934】

16. 所望の材料を組織から抽出するためのシステムであって、脱凝集可撓性容器；安定化可撓性容器；および組織の供給源、組織の状態、または識別子のうちのうちの少なくとも1つを提供することができる、脱凝集可撓性容器または安定化可撓性容器の少なくとも一方の上に位置する少なくとも1つのインジケータタグを含むキットと；脱凝集可撓性容器内の少なくとも一部の組織を処置して処理された流体を形成することができる脱凝集要素と；処理された流体の少なくとも一部を富化して所望の材料を形成することができ

10

20

30

40

50

る富化要素と；所望の材料の一部を安定化可撓性容器内で保管することができる安定化要素と；組織の供給源、または安定化要素における組織の状態の少なくとも一方を提供することができる、脱凝集要素または安定化要素の少なくとも一方の上に位置する少なくとも1つのインジケータータグリーダーとを含む、システム。

【0935】

17. 所望の材料が、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を含む、パラグラフ15のシステム。

【0936】

18. 脱凝集要素および安定化要素によるプロセスにおいて1つまたは複数の型の培地が使用される、パラグラフ15のシステム。

【0937】

19. 速度制御凍結を行うことができる安定化要素に使用するための、凍結保存培地をさらに含む、パラグラフ15のシステム。

【0938】

20. 脱凝集可撓性容器が、使用中に密封される開口縁部を有する脱凝集バッグを含み、安定化可撓性容器が安定化バッグである、パラグラフ15のシステム。

【0939】

21. 哺乳動物の固形組織由来の細胞または細胞凝集体の半自動化無菌脱凝集および／または富化および／または安定化のための自動化デバイスであって、プログラム可能なプロセッサと、パラグラフ1～15のいずれかの可撓性容器のうちの少なくとも1つを脱凝集可撓性容器として含むキットとを含む、自動化デバイス。

【0940】

22. インジケータータグリーダーをさらに含む、パラグラフ21の自動化デバイス。

【0941】

23. キットの構成要素を認識するための無線周波数識別タグリーダーをさらに含む、パラグラフ21の自動化デバイス。

【0942】

24. プログラム可能なプロセッサが、タグによってキットの構成要素を認識することができ、その後、脱凝集、富化および安定化プロセスの型ならびにこれらのプロセスに必要なそれぞれの培地型を規定するプログラムを実行する、パラグラフ21の自動化デバイス。

【0943】

25. プログラム可能なプロセッサが、脱凝集可撓性容器における固形組織の物理的および／または生物学的分解を可能にするように自動化デバイスの脱凝集要素を制御する、パラグラフ21の自動化デバイス。

【0944】

26. プログラム可能なプロセッサが、脱凝集可撓性容器に配置された固形組織を機械的に粉碎および剪断する、脱凝集可撓性容器に近接した脱凝集表面を制御し、必要に応じて、脱凝集表面が機械的ピストンである、パラグラフ25の自動化デバイス。

【0945】

27. プログラム可能なプロセッサが、脱凝集可撓性容器における固形組織の物理的および酵素的分解を可能にするように自動化デバイスの脱凝集要素を制御する、パラグラフ21の自動化デバイス。

【0946】

28. 固形組織の酵素的分解が、コラゲナーゼ、トリプシン、リパーゼ、ヒアルロニダーゼ、デオキシリボヌクレアーゼ、L i b e r a s e H I、ペプシン、またはそれらの混合物から選択される1つまたは複数の培地酵素溶液によるものである、パラグラフ27の自動化デバイス。

【0947】

29. デバイスが、脱凝集要素；富化要素；および安定化要素のうちの少なくとも2つ

10

20

30

40

50

を含み、プログラム可能なプロセッサが、脱凝集要素；富化要素；および安定化要素のうちの1つまたは複数と通信し、それを制御するように適合されている、パラグラフ 2 1 の自動化デバイス。

【0948】

30. プログラム可能なプロセッサが、必要に応じてプログラム可能な温度を使用して富化された脱凝集固形組織を凍結保存容器内に凍結保存するように安定化要素を制御する、パラグラフ 2 9 のいずれか 1 つの自動化デバイス。

【0949】

31. 以下の追加の構成要素：脱凝集固形組織を必要に応じた富化要素に移送する前に、脱凝集要素における脱凝集プロセスが完了しているかどうかを認識することができるセンサー；脱凝集要素、富化要素、および／もしくは安定化要素のうちの1つもしくは複数の容器内で必要とされる培地の量を決定し、それぞれの容器間の材料の移送を制御するための重量センサー；脱凝集要素、富化要素、および／もしくは安定化要素のうちの1つもしくは複数の容器内の温度を制御するためのセンサー；要素内の各容器の投入口と排出口の間の培地の移送を制御するための少なくとも1つの気泡センサー；投入口と排出口の間の培地の移送を制御するための少なくとも1つのポンプ、必要に応じて蠕動ポンプ；富化要素内の圧力を評定するための圧力センサー；富化要素内の接線流濾過プロセスを制御するための1つもしくは複数の弁；ならびに／または各要素の投入口と排出口の間の培地の移送を制御するための1つもしくは複数のクランプ、のうちの1つまたは複数を任意の組合せでさらに含む、パラグラフ 2 9 のいずれか 1 つの自動化デバイス。

【0950】

32. プログラム可能なプロセッサが、容器が取り出されるまで安定化要素内の最適な保管温度範囲を維持するように適合されている；または制御された凍結ステップを実行する、パラグラフ 2 9 の自動化デバイス。

【0951】

33. ユーザーインターフェースをさらに含む、前述のパラグラフのいずれかの自動化デバイス。

【0952】

34. インターフェースが、使用者がパラメータを入力する、予めプログラムされたステップを確認する、エラーを通知する、またはこれらの組合せを行うことをガイドする指示を表示するための表示画面を含む、パラグラフ 2 6 の自動化デバイス。

【0953】

35. 自動化デバイスが、可搬型になるように適合されている、パラグラフ 2 1 の自動化デバイス。

【0954】

36. 処理するステップのための条件およびそれらの関連する条件をキットに付随するデジタル、電子または電磁気タグインジケータから自動的に決定するステップ；組織試料をキットの可撓性容器に入れるステップ；および

【0955】

可撓性容器の少なくとも1つの縁部を密封するステップ；インジケータと通信し、可撓性容器を制御することにより1つまたは複数の組織処理するステップを自動的に実行することによって組織試料を処理するステップ；および処理された組織試料の少なくとも一部分を濾過して、濾過された流体を生成するステップ；および濾過された流体の少なくとも一部を凍結保存可撓性容器にもたらすステップを含む、自動組織処理方法。

【0956】

37. 処理が、可撓性容器内の組織試料の少なくとも一部分の攪拌、抽出、および酵素的消化を含む、パラグラフ 3 1 の方法。

【0957】

38. 処理が、可撓性容器内の組織試料の少なくとも一部分の攪拌、抽出、および酵素的消化を含み、その結果、所望の材料の抽出がもたらされる、パラグラフ 3 1 の方法。

【０９５８】

３９．処理が、可撓性容器内の組織試料の少なくとも一部分の攪拌、抽出、および酵素的消化を含み、その結果、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）の抽出がもたらされる、パラグラフ３１の方法。

【０９５９】

４０．可撓性容器が、ヒートシール可能な材料を含む、パラグラフ３１の方法。

【０９６０】

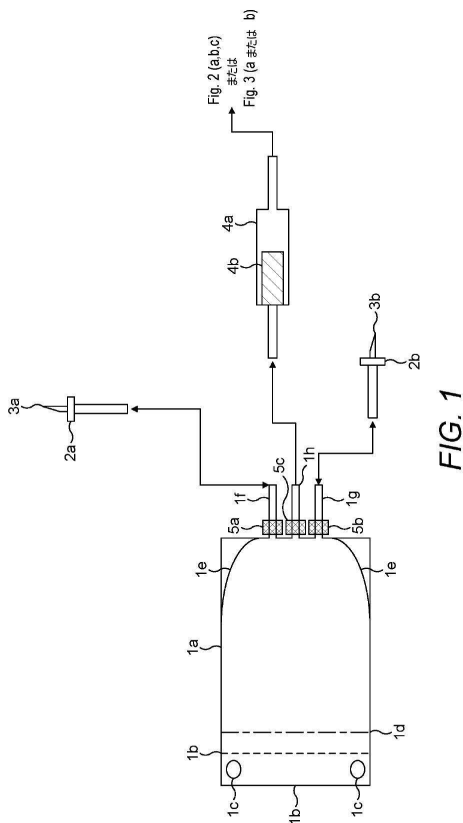
４１．可撓性容器が、ＥＶＡ、酢酸ビニルとポリオレフィンのポリマーブレンド、またはポリアミドのうちの少なくとも１つを含む、パラグラフ３１の方法。

【０９６１】

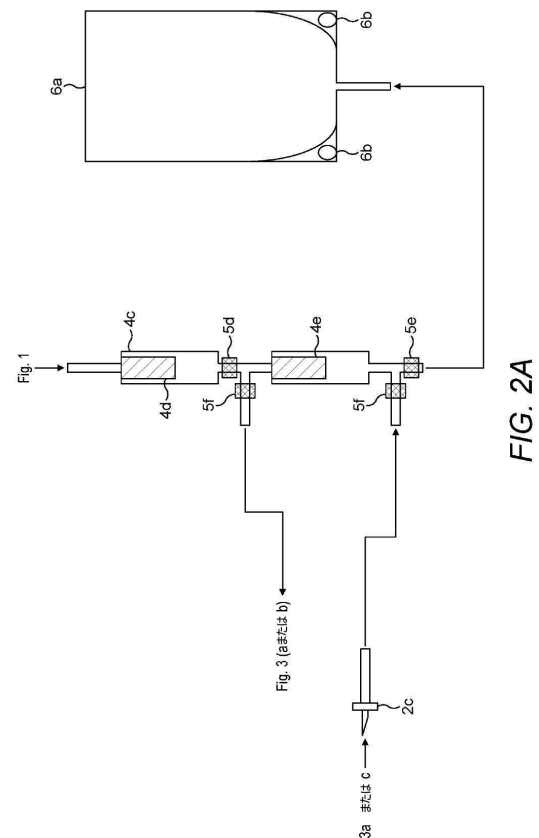
このように本発明の好ましい実施形態を詳細に記載したが、上記のパラグラフによって定義される本発明は、上記の説明に記載されている特定の詳細の多くの明白な変形形態が本発明の主旨または範囲から逸脱することなく可能であるので、これらの特定の詳細に限定されるべきではないことが理解されるべきである。

【図面】

【図１】



【図２－１】



10

20

30

40

50

【図 4】

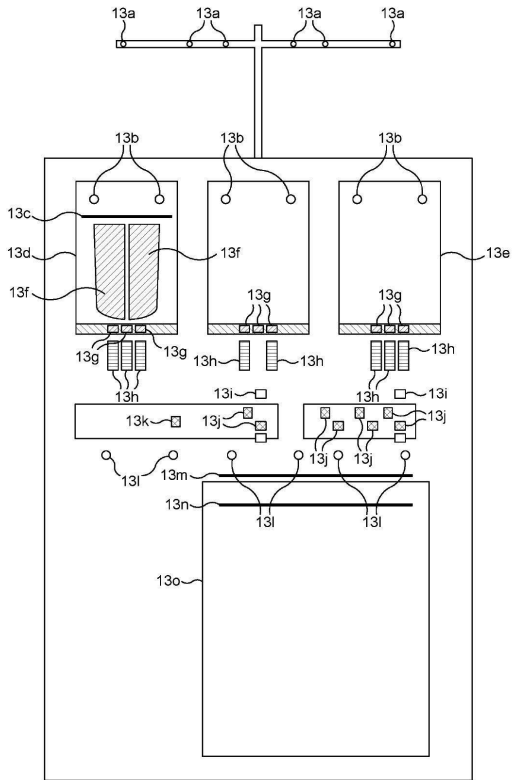


FIG. 4

【図 5】

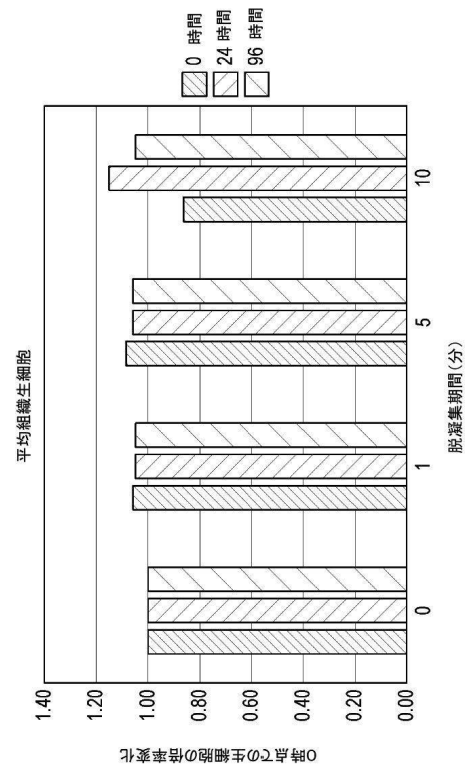


FIG. 5

【図 6】

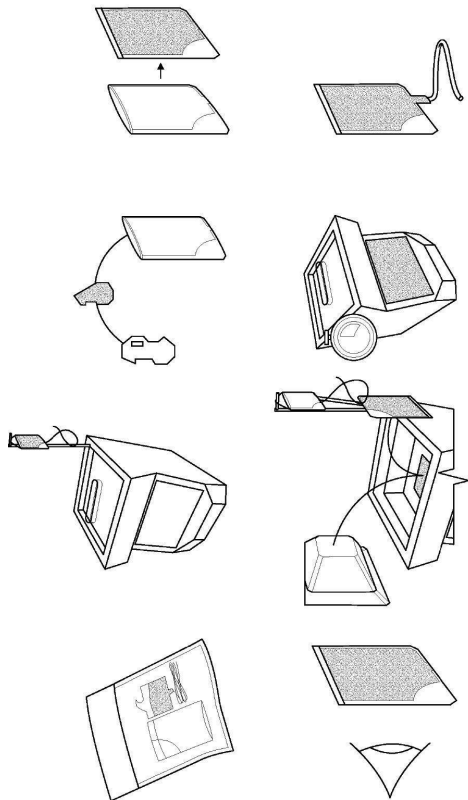


FIG. 6

【図 7】

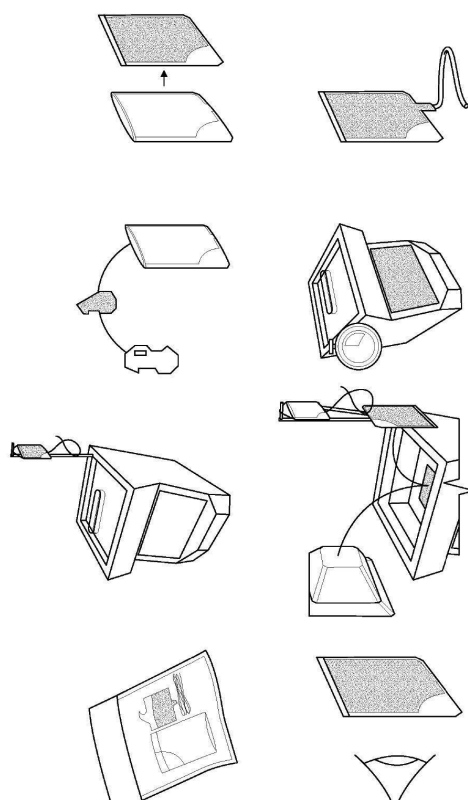


FIG. 7

10

20

30

40

50

【図 12 - 1】

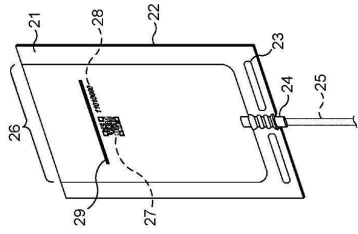


FIG. 12A

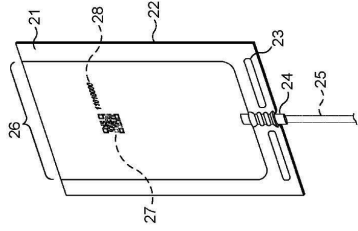


FIG. 12B

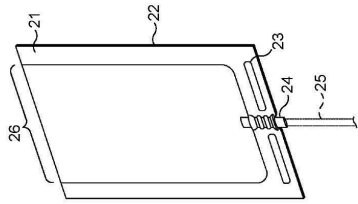


FIG. 12C

【図 12 - 2】

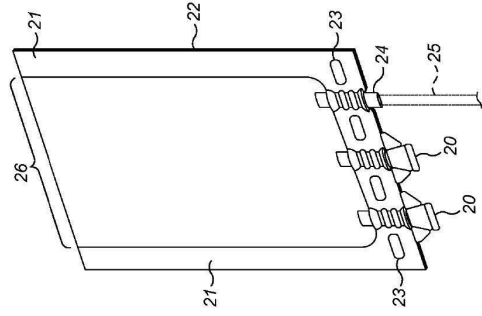


FIG. 12D

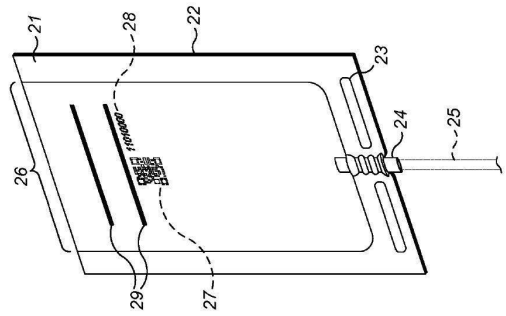


FIG. 12E

【図 13 - 1】

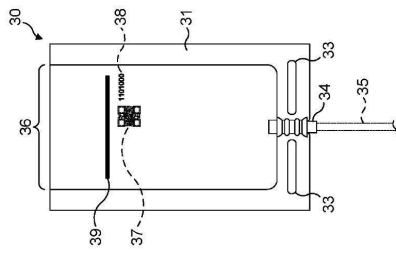


FIG. 13A

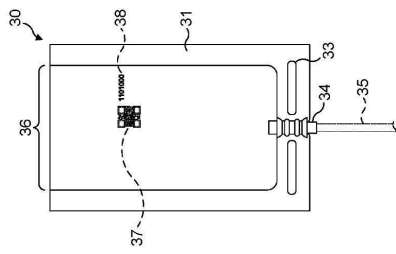


FIG. 13B

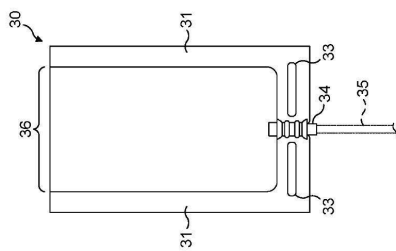


FIG. 13C

【図 13 - 2】

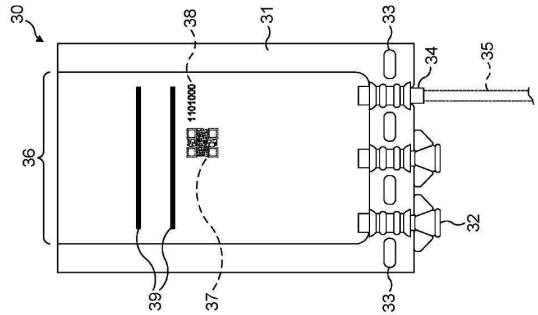


FIG. 13D

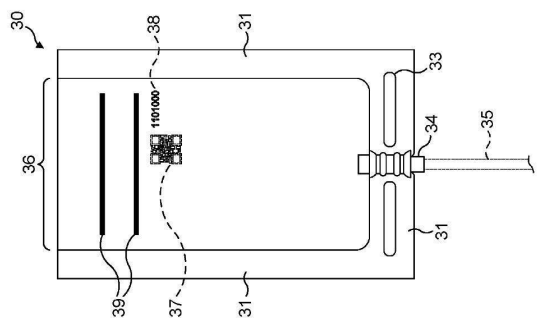


FIG. 13E

10

20

30

40

50

【図 14】

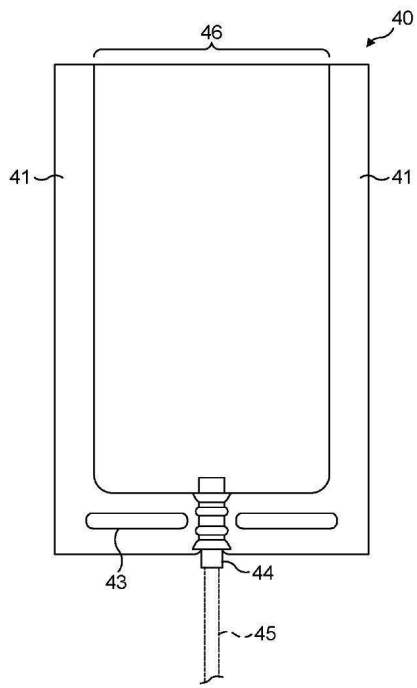


FIG. 14

【図 15】

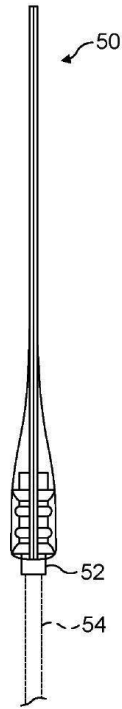


FIG. 15

【図 16】

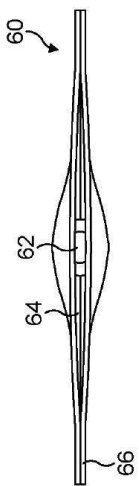


FIG. 16A

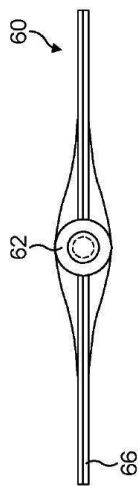


FIG. 16B

【図 17】

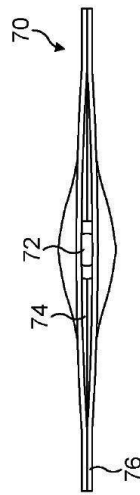


FIG. 17A

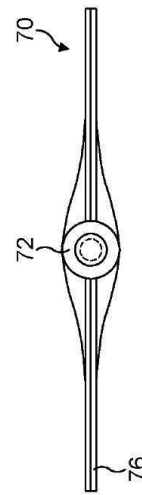


FIG. 17B

10

20

30

40

50

【図 18】

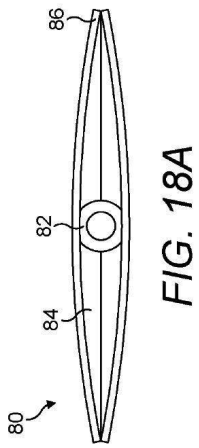


FIG. 18A

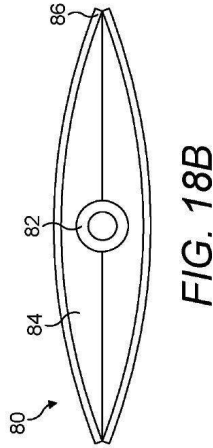


FIG. 18B

【図 19】

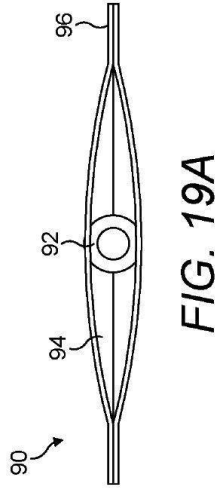


FIG. 19A

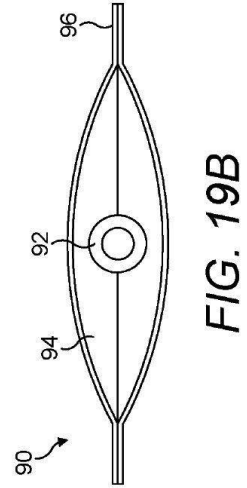


FIG. 19B

【図 20 - 1】

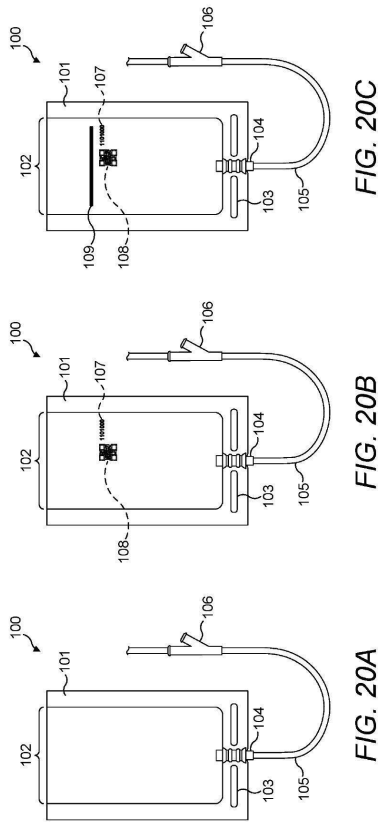


FIG. 20A

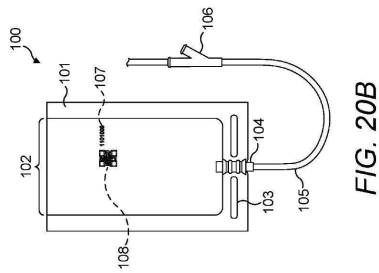


FIG. 20B

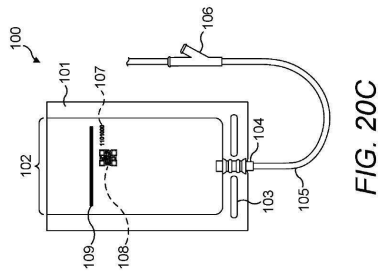


FIG. 20C

【図 20 - 2】

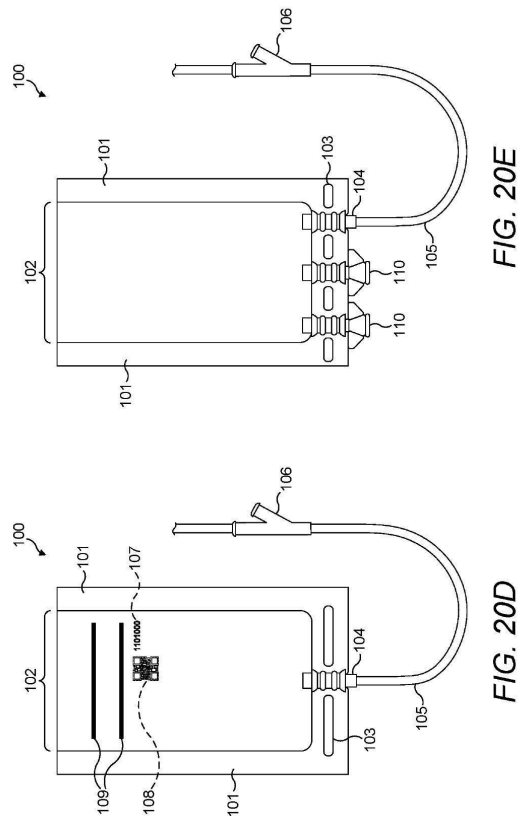


FIG. 20D

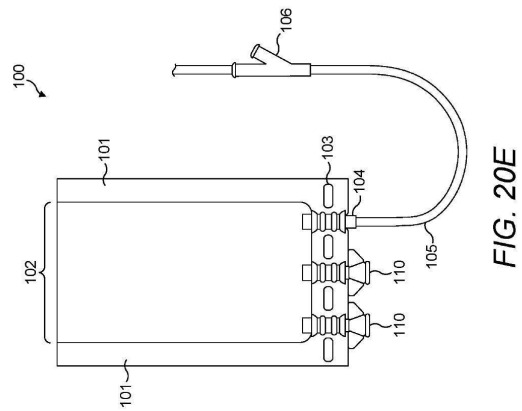


FIG. 20E

10

20

30

40

50

【図 2 1 - 1】

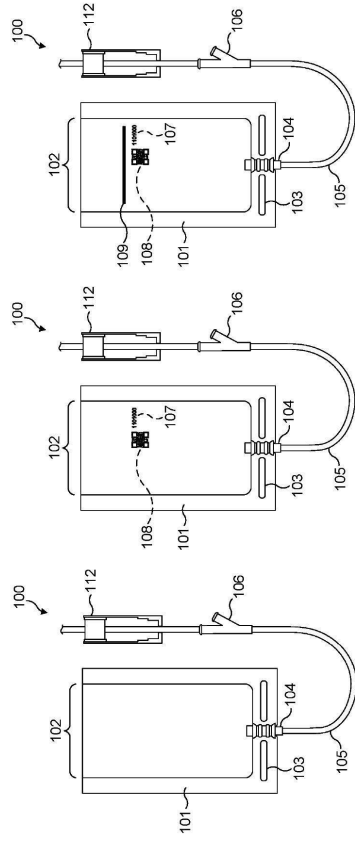


FIG. 21C

FIG. 21B

FIG. 21A

【図 2 1 - 2】

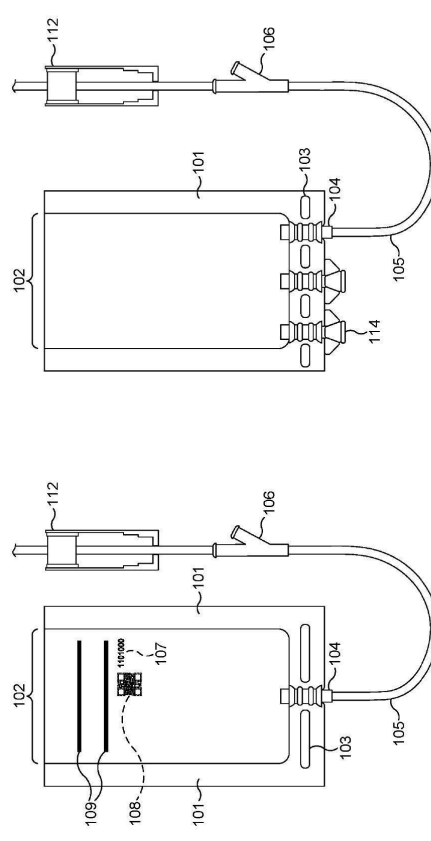


FIG. 21E

FIG. 21D

【図 2 2 - 1】

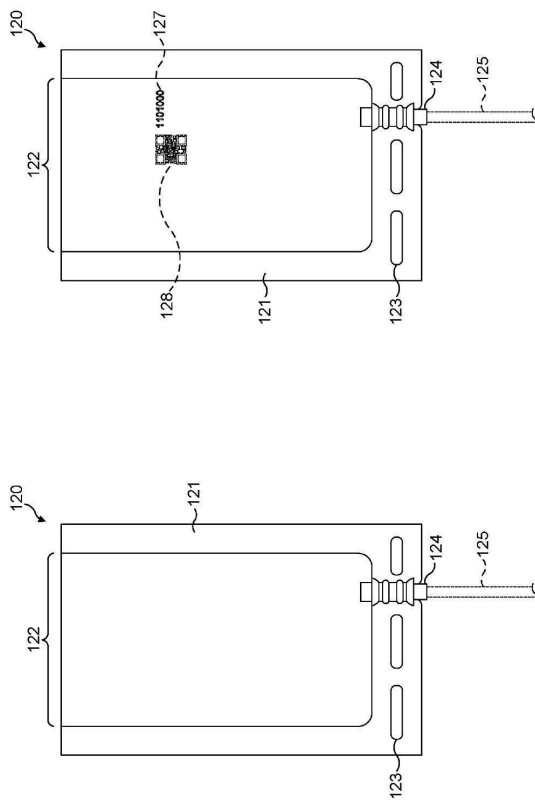


FIG. 22B

FIG. 22A

【図 2 2 - 2】

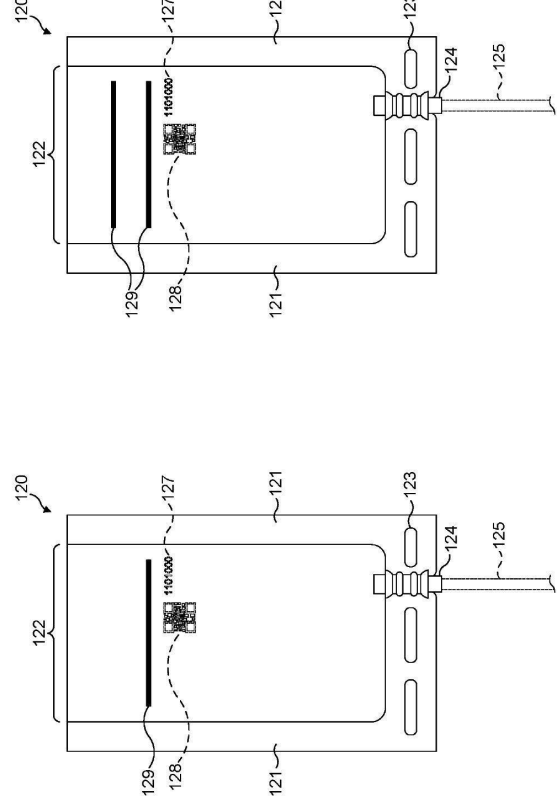


FIG. 22D

FIG. 22C

10

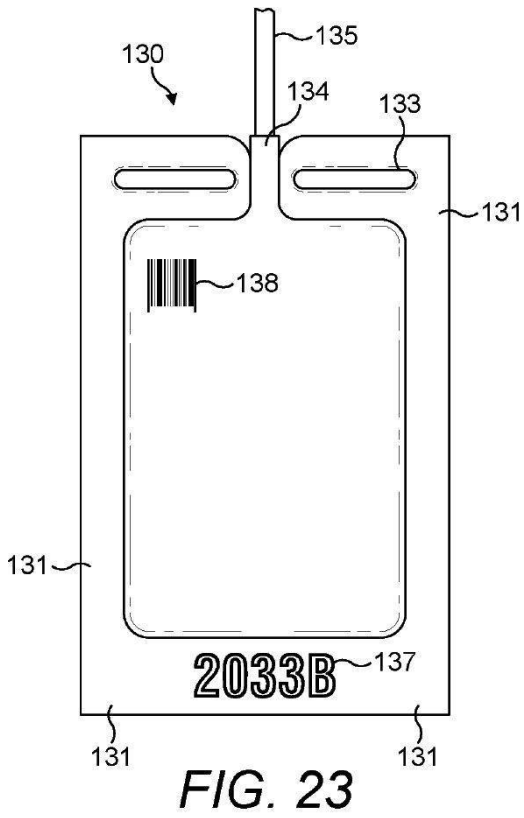
20

30

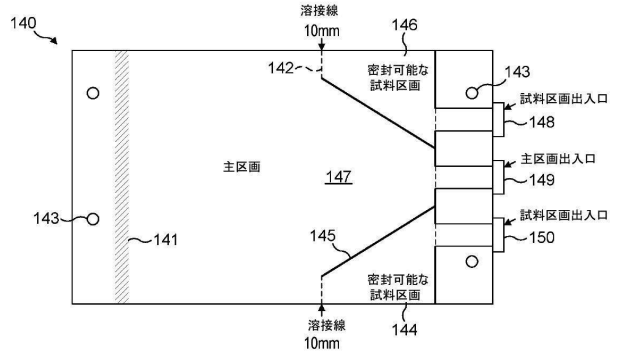
40

50

【図 2 3】



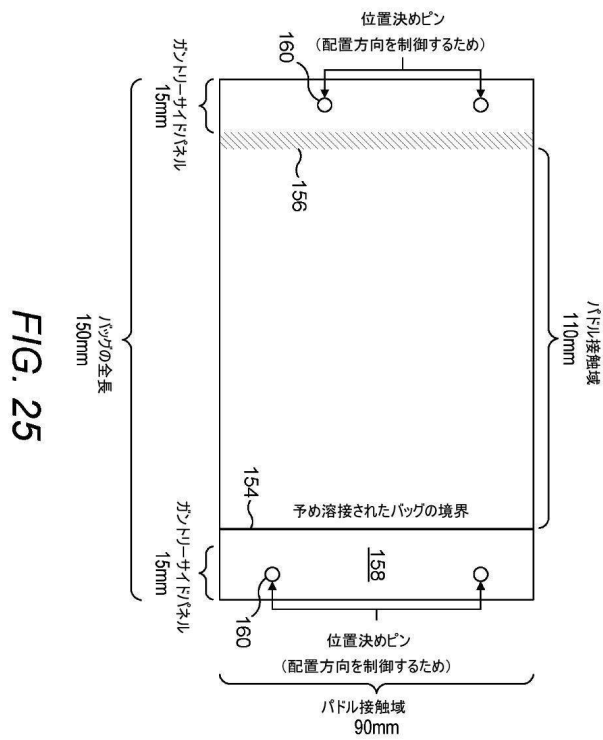
【図 2 4】



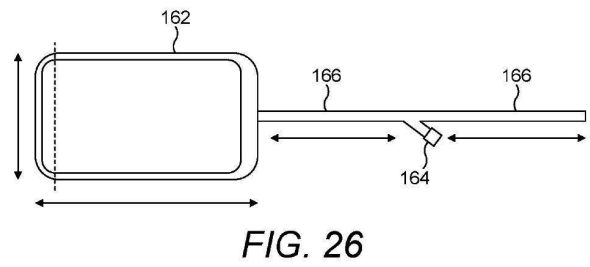
10

20

【図 2 5】



【図 2 6】

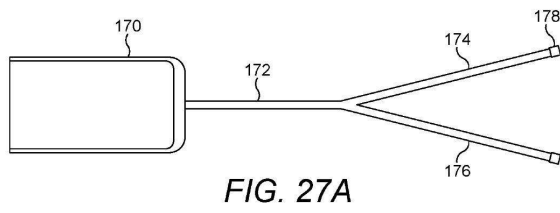


30

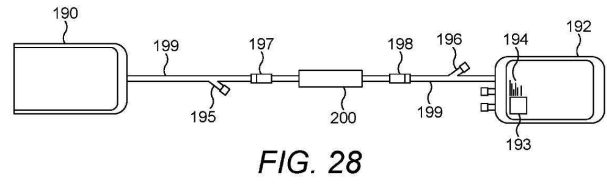
40

50

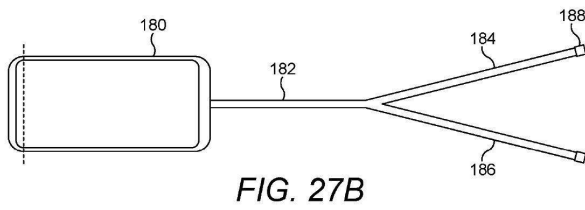
【図 27】



【図 28】

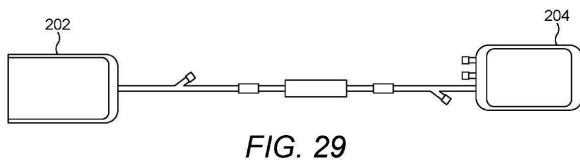


10

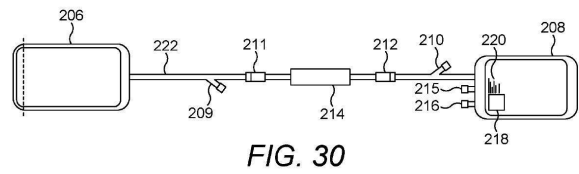


20

【図 29】



【図 30】



30

40

50

【図 3 1】

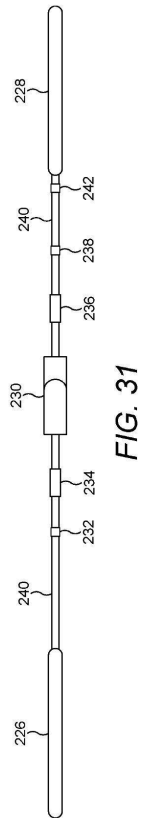


FIG. 31

【図 3 2】

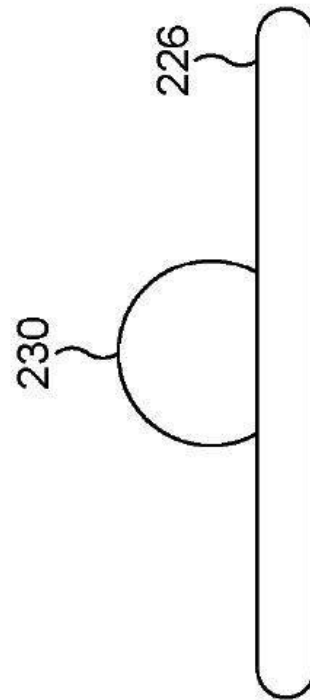


FIG. 32

【図 3 3】

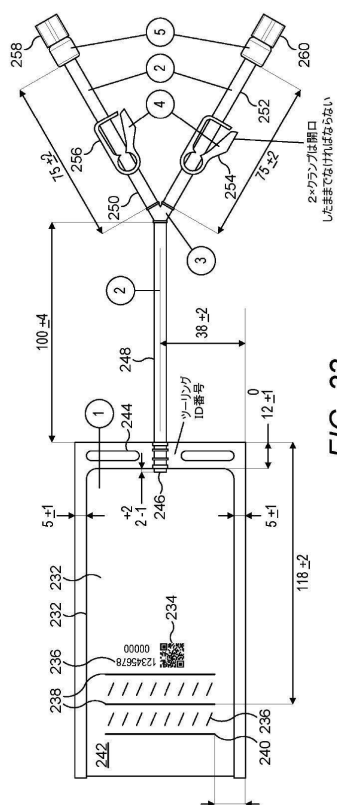


FIG. 33

【図 3 4】

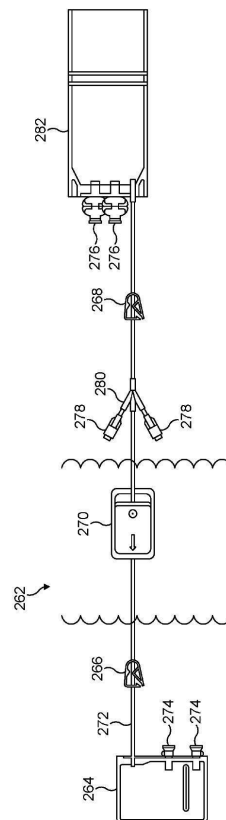


FIG. 34

10

20

30

40

50

【図 35】

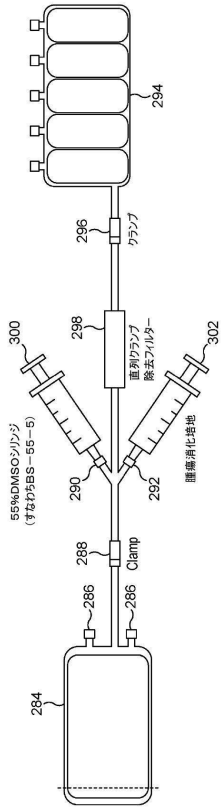


FIG. 35

【図 36】

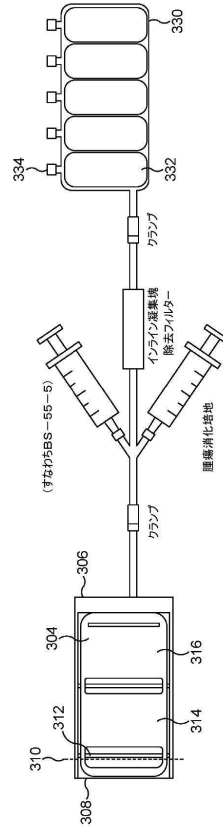


FIG. 36A

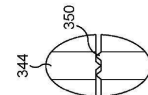


FIG. 36C

【図 37】

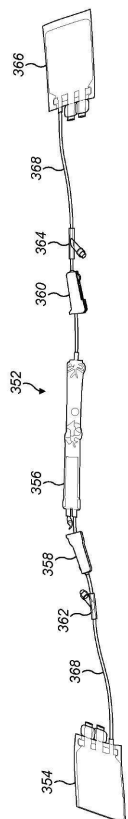


FIG. 37

【図 38】



FIG. 38

10

20

30

40

50

【図 39】

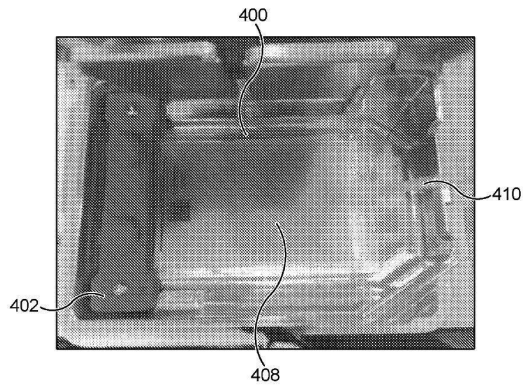


FIG. 39

【図 40】

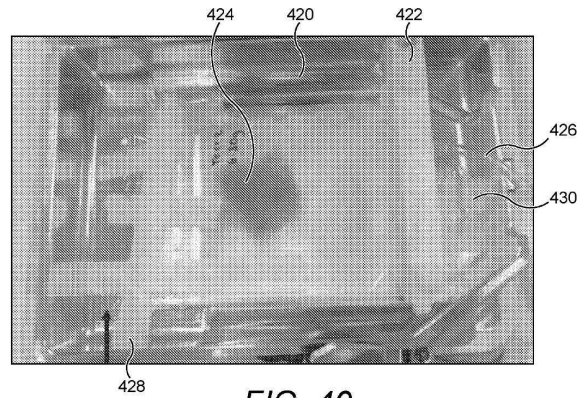


FIG. 40

【図 41】

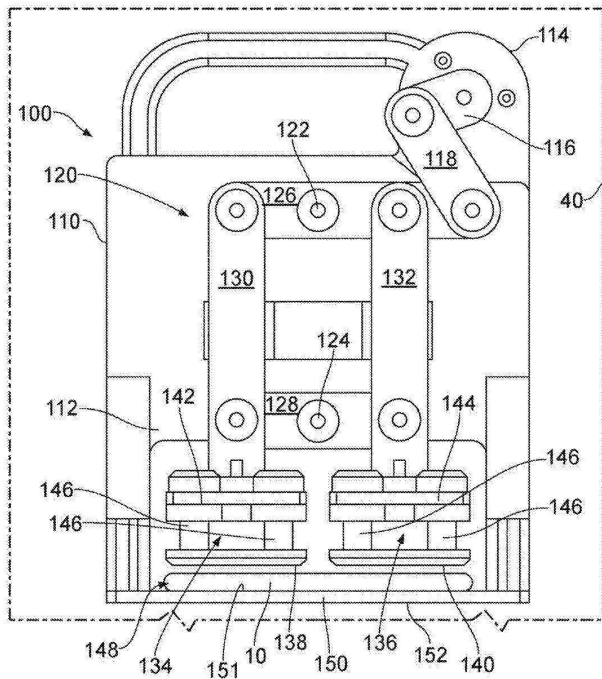


FIG. 41

【図 42】

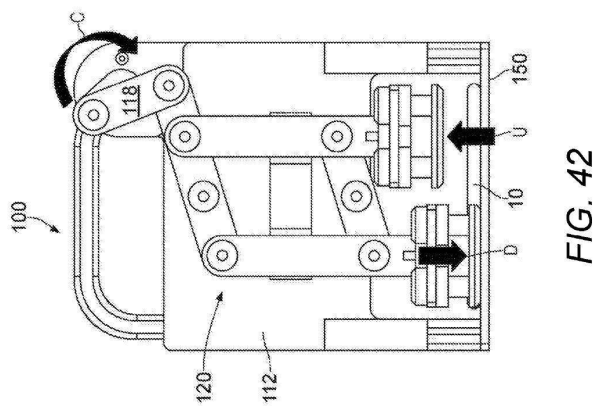


FIG. 42

10

20

30

40

50

【図 4 3】

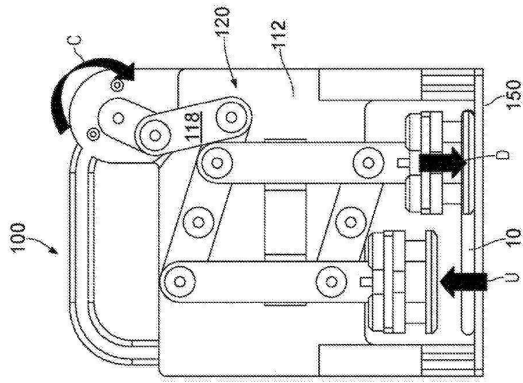


FIG. 43

【図 4 4】

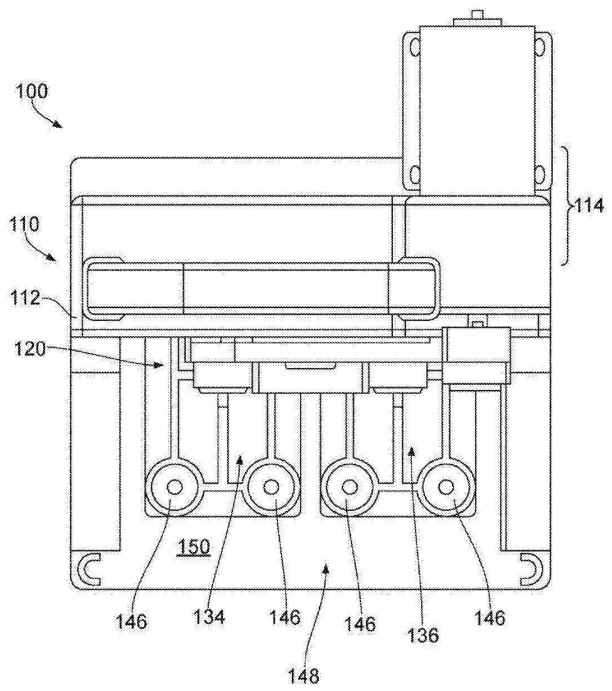


FIG. 44

【図 4 5】

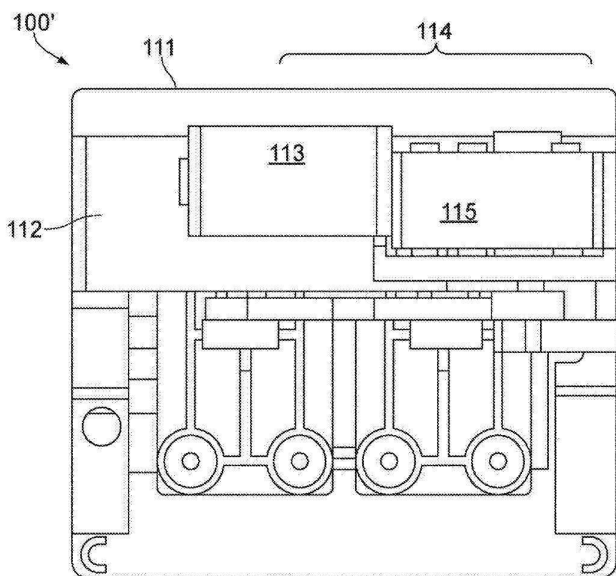


FIG. 45

【図 4 6】

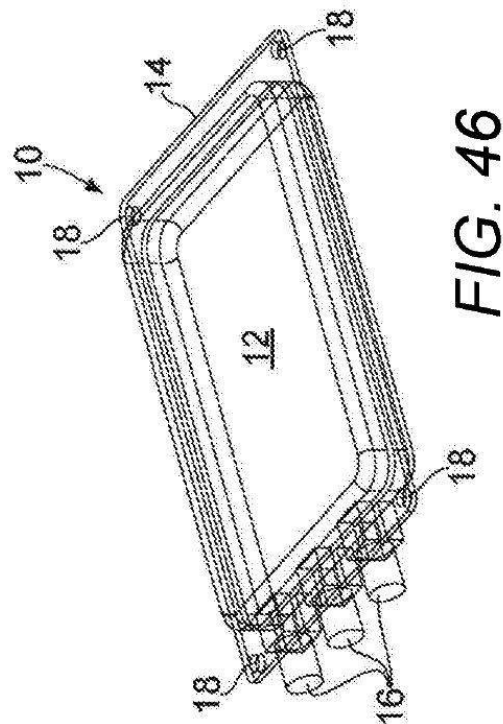


FIG. 46

10

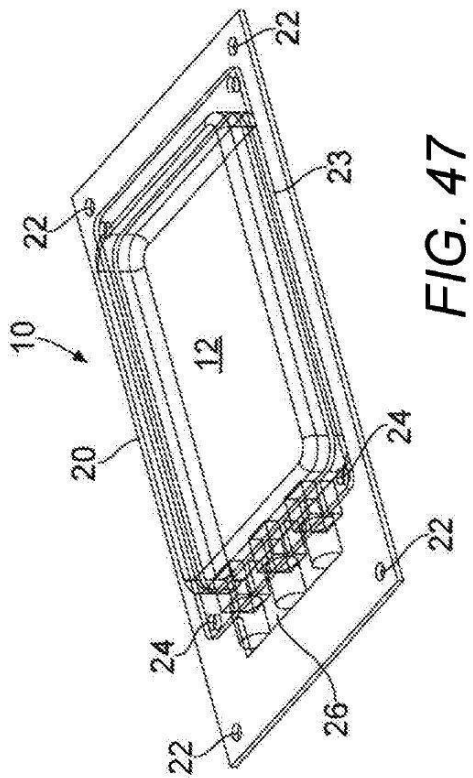
20

30

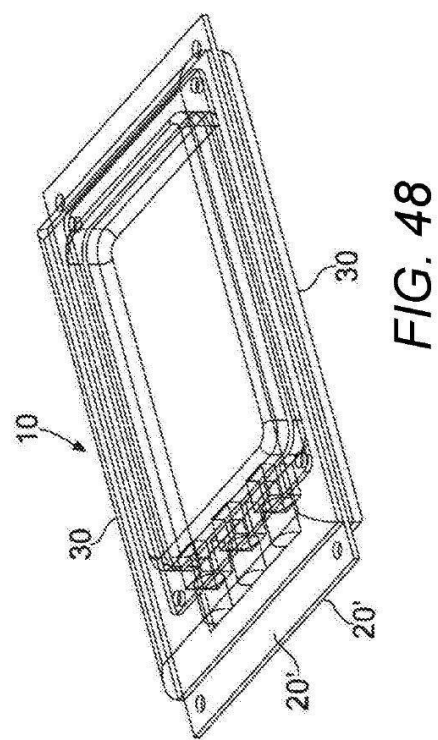
40

50

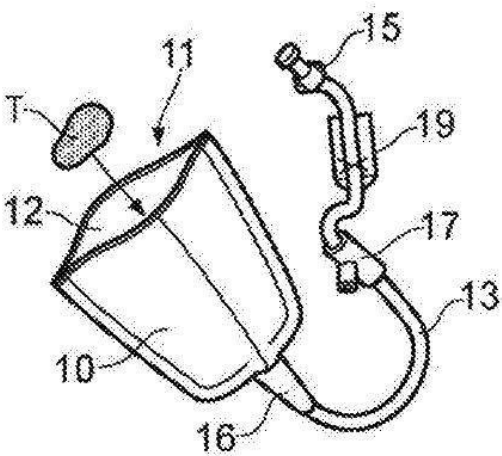
【図 47】



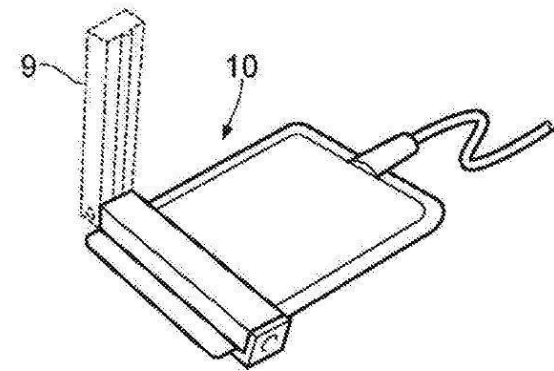
【図 48】



【図 49】



【図 50】



10

20

30

40

50

【図 51-1】

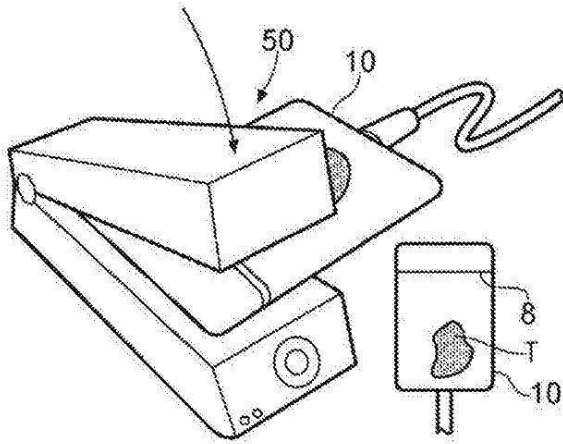


FIG. 51A

【図 51-2】

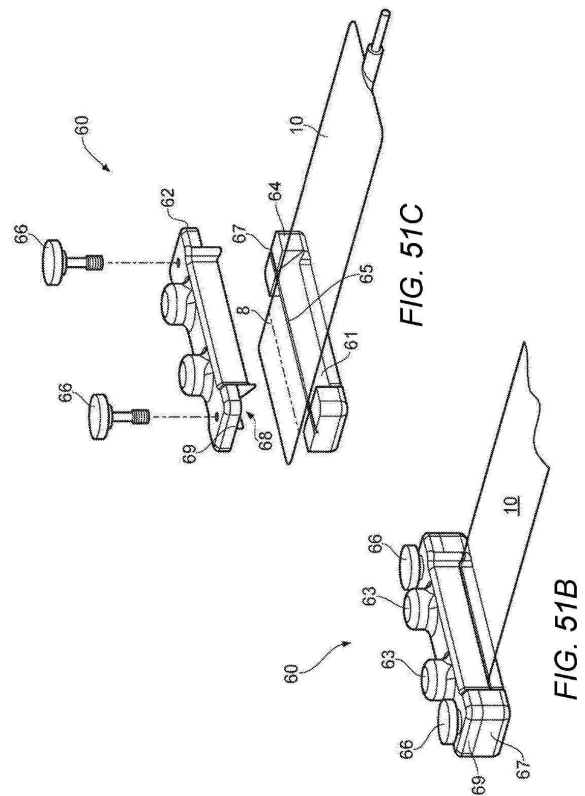


FIG. 51C

FIG. 51B

【図 52】

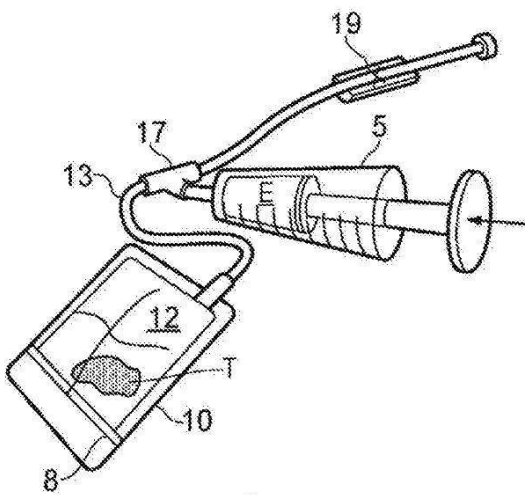


FIG. 52

【図 53】

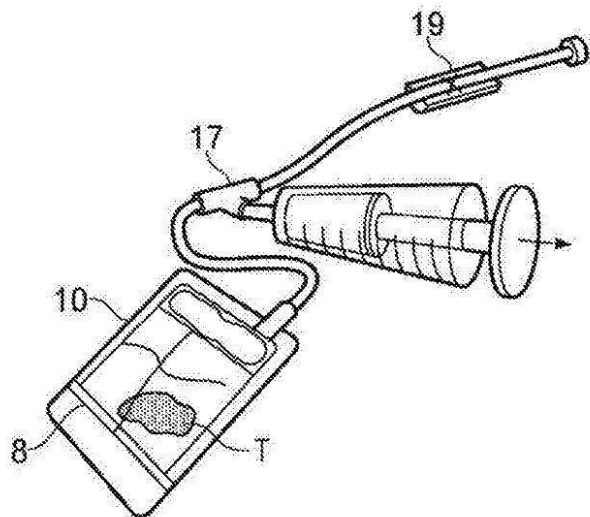


FIG. 53

10

20

30

40

50

【図 5 4】

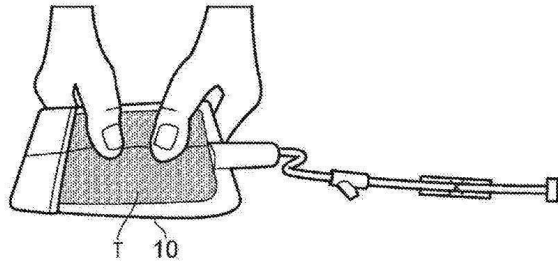


FIG. 54

【図 5 5】

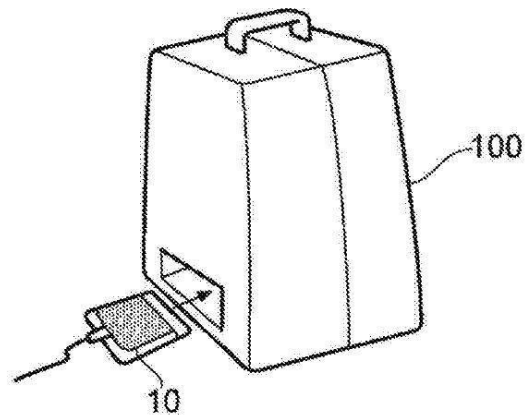


FIG. 55

【図 5 6】

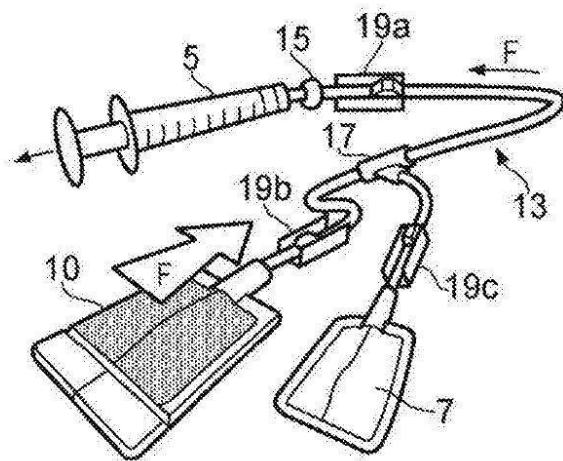


FIG. 56

【図 5 7】

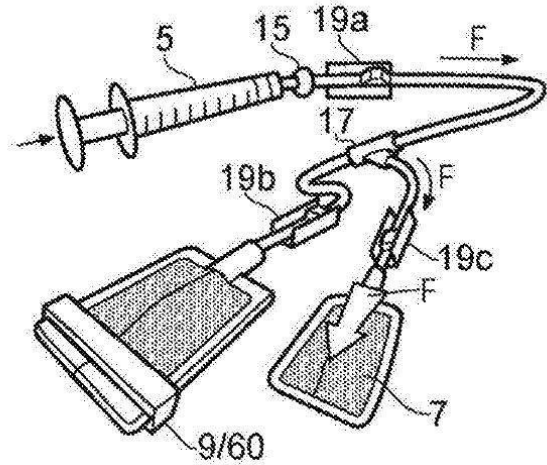


FIG. 57

10

20

30

40

50

【図 58】

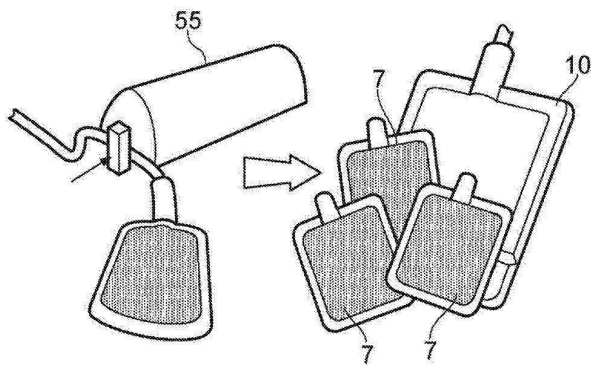


FIG. 58

【図 59】

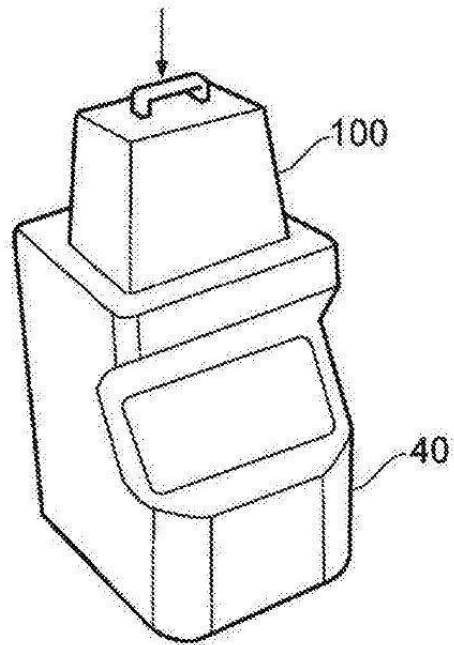


FIG. 59

10

20

【図 60】

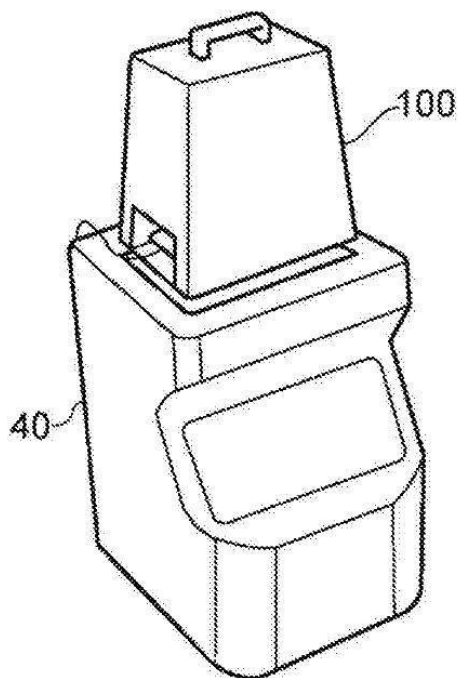


FIG. 60

【図 61】

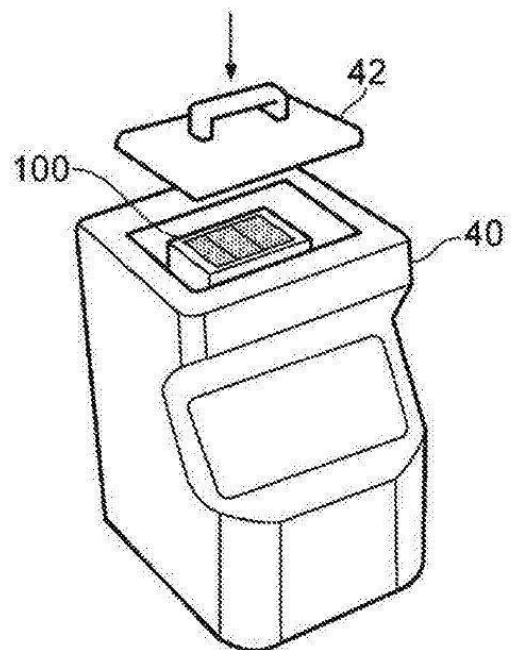


FIG. 61

30

40

50

【図 6 2】

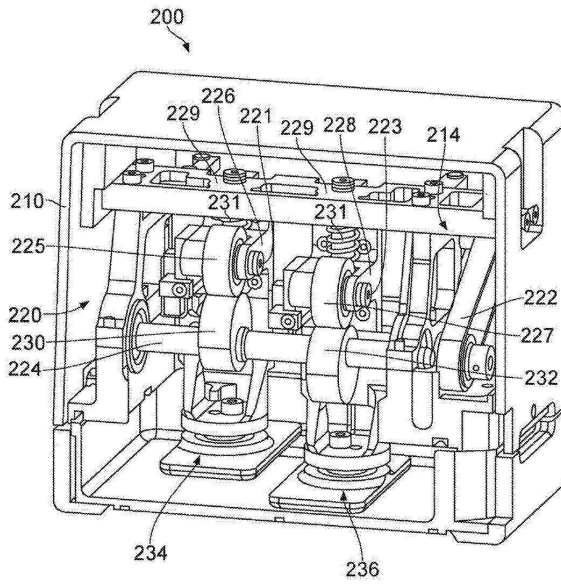


FIG. 62

【図 6 3】

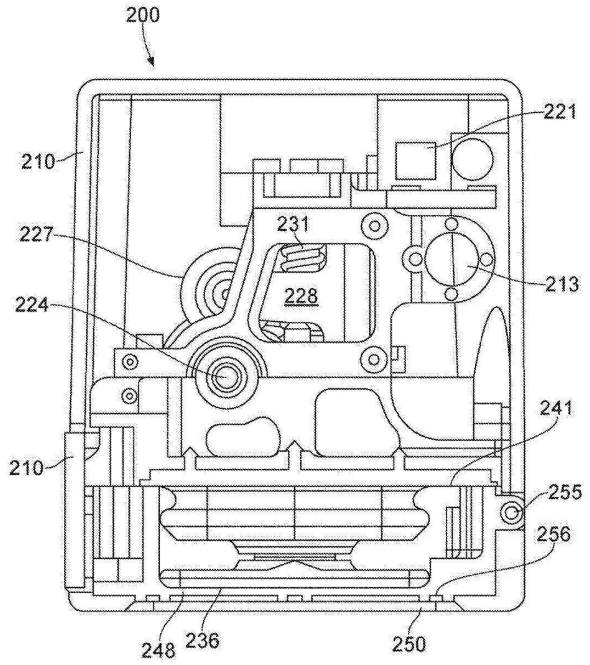


FIG. 63

【図 6 4】

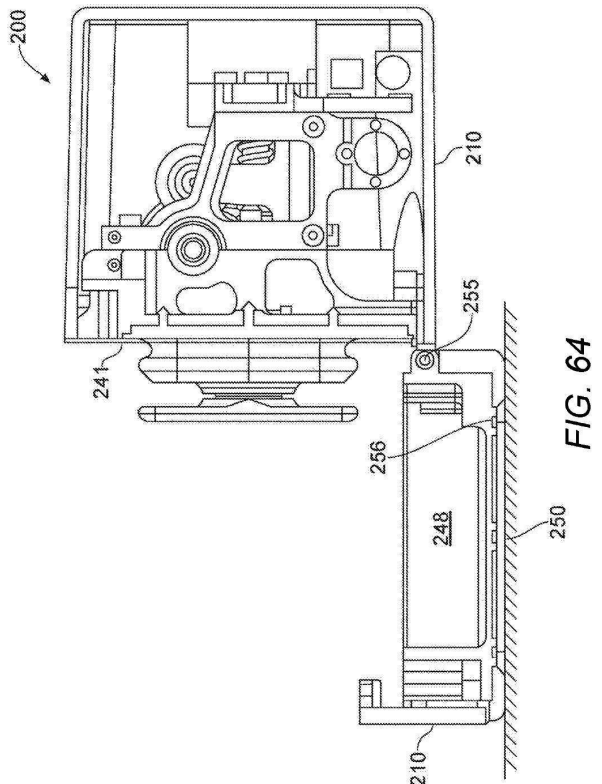


FIG. 64

【図 6 5】

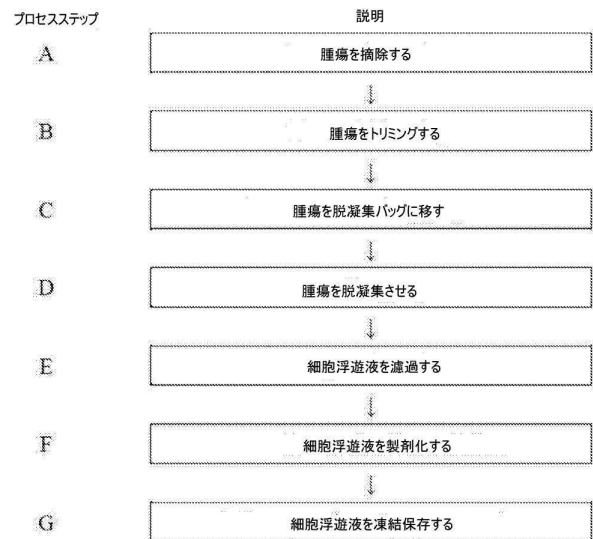


FIG. 65

10

20

30

40

50

【図 66】

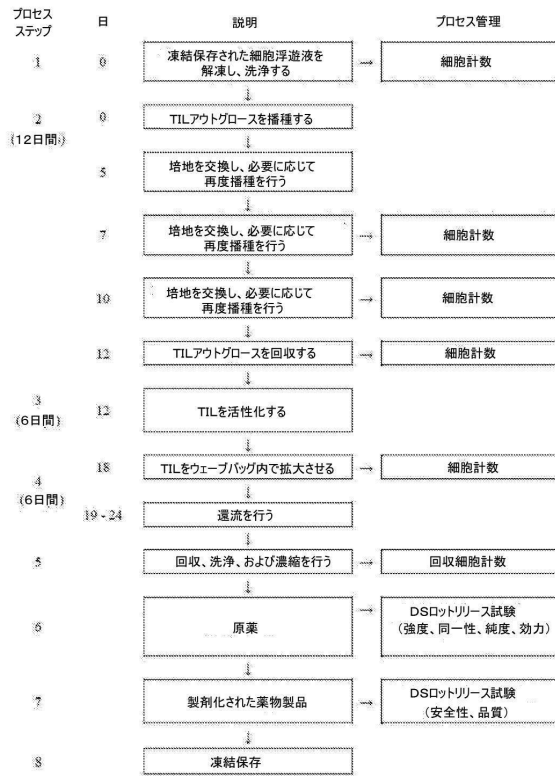


FIG. 66

【図 67】

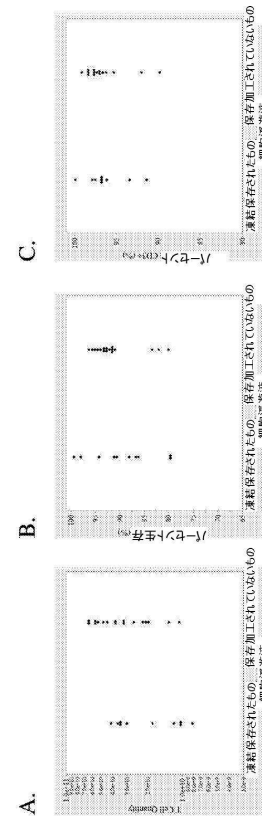


FIG. 67

【図 68】

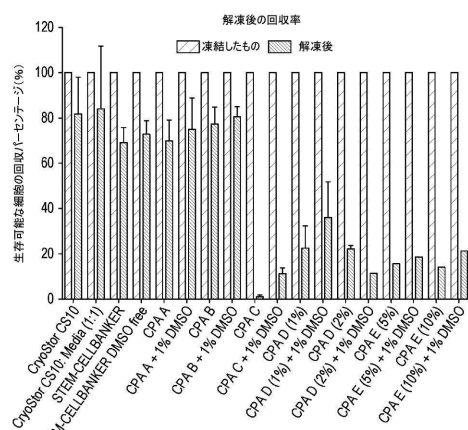


FIG. 68A

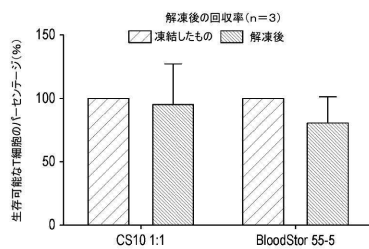


FIG. 68B

【図 69】

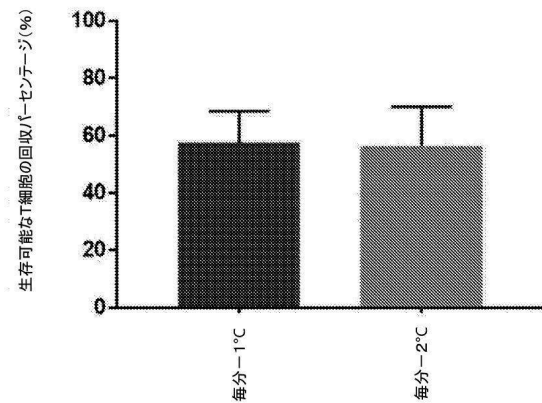


FIG. 69

10

20

30

40

50

【図 70】

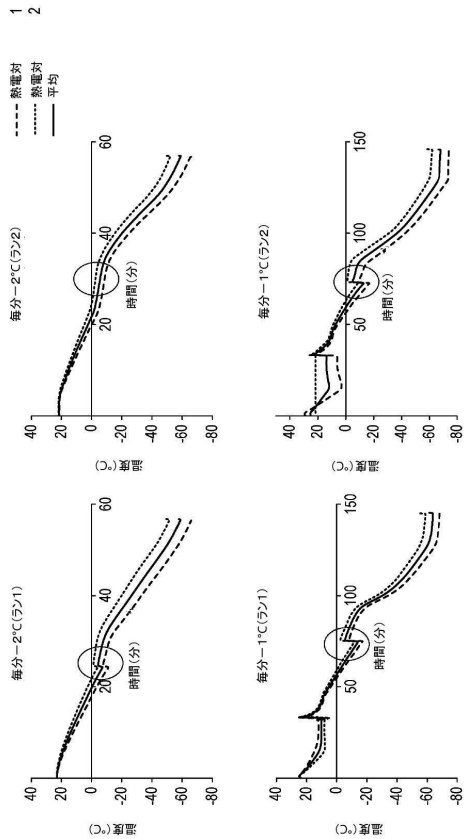


FIG. 70

【図 71-1】

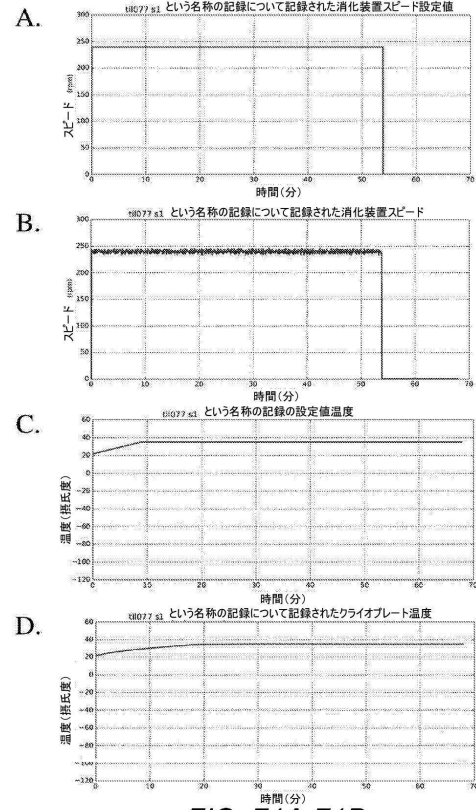


FIG. 71A-71D

【図 71-2】

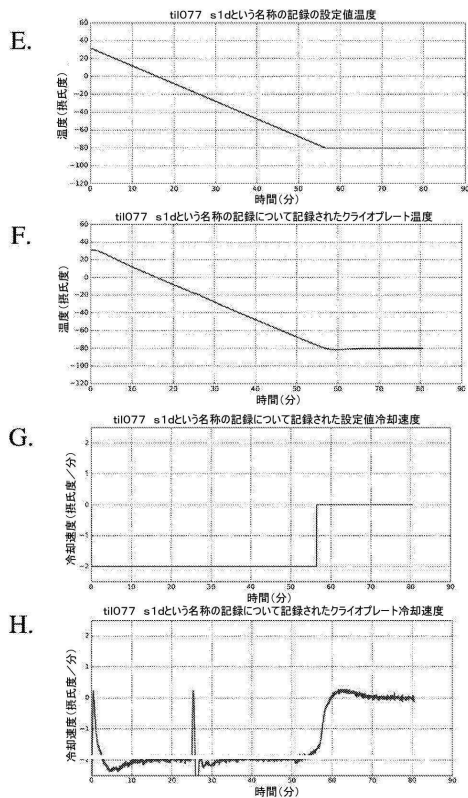


FIG. 71E-71H

【図 72-1】

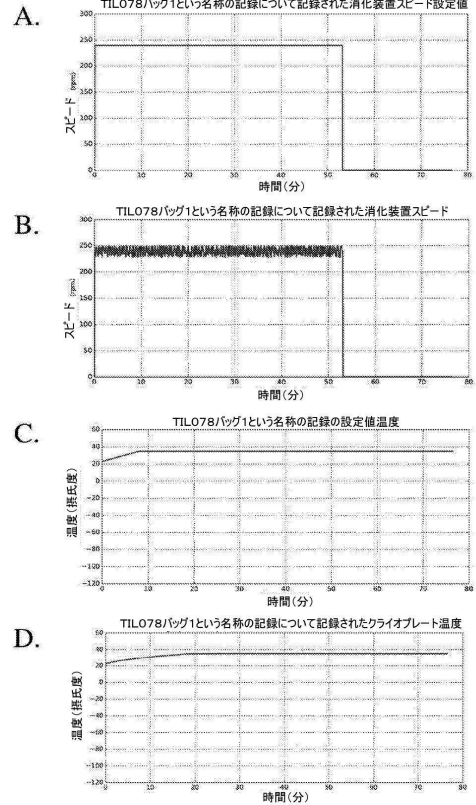


FIG. 72A-72D

10

20

30

40

50

【図 7 2 - 2】

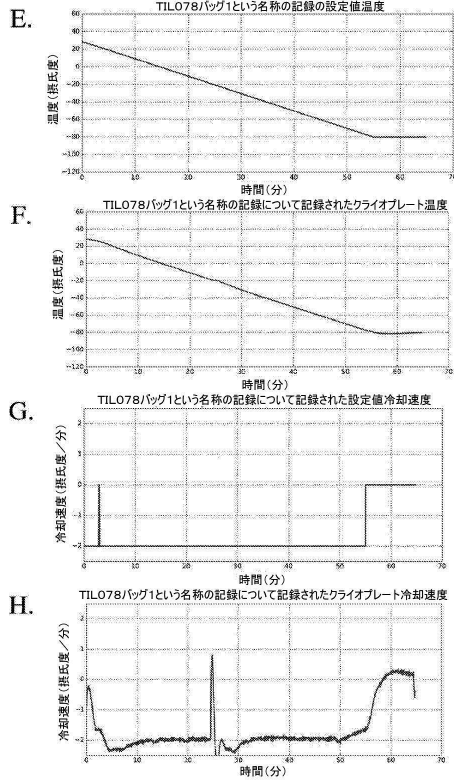


FIG. 72E-72H

【図 7 3 - 1】

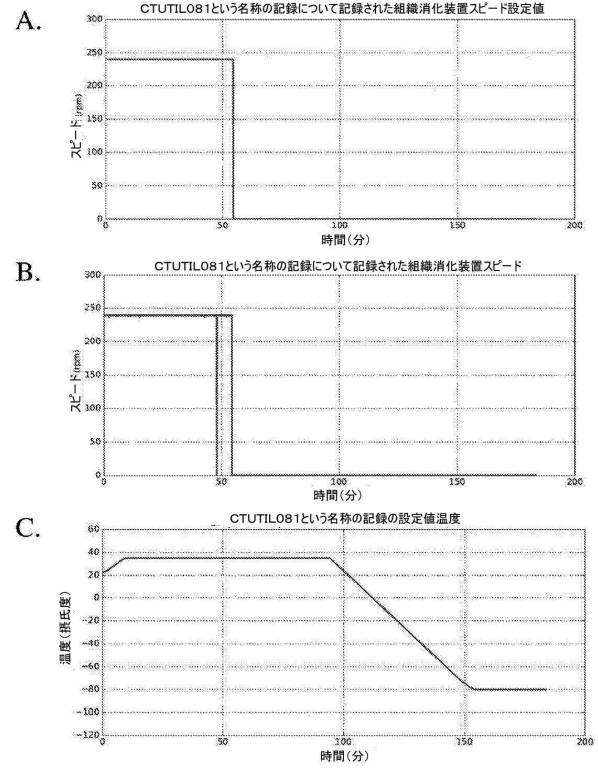


FIG. 73A-73C

【図 7 3 - 2】

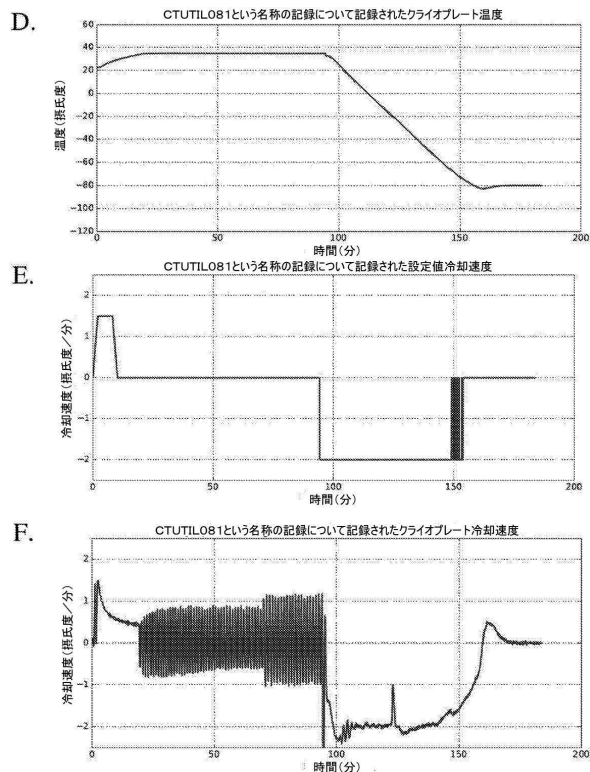


FIG. 73D-73F

【図 7 4】

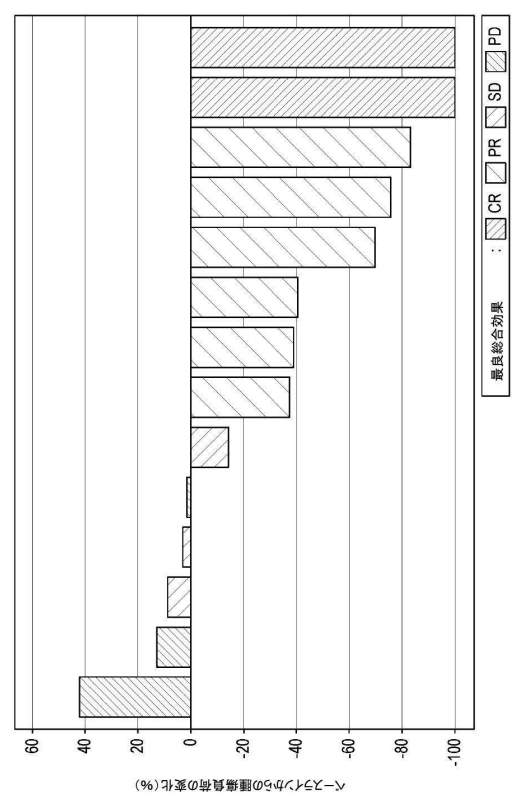


FIG. 74

10

20

30

40

50

【図 75】

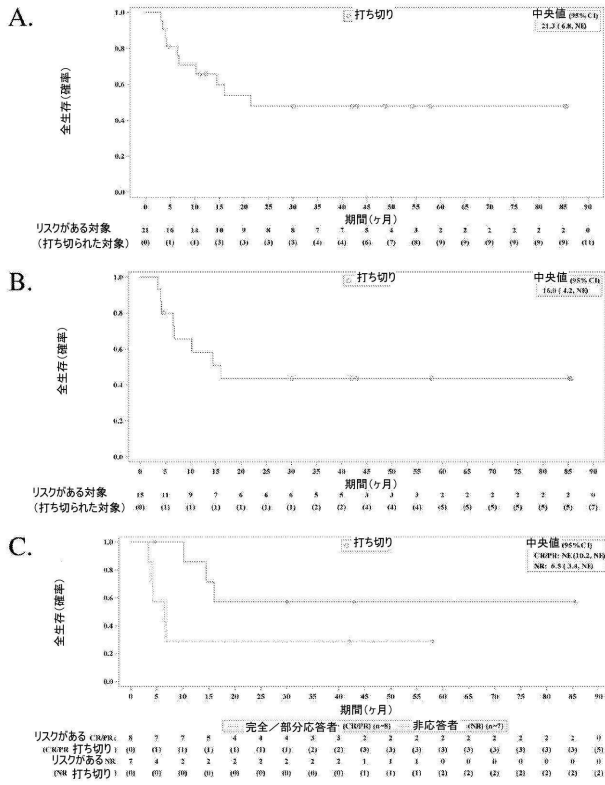


FIG. 75A-75C

【図 76】

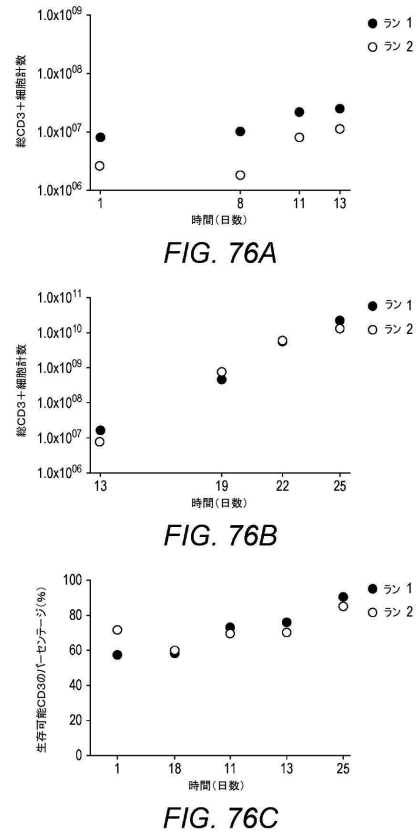


FIG. 76A

FIG. 76B

FIG. 76C

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2020/053315

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0783
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2019/210131 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 31 October 2019 (2019-10-31) paragraph [0545] - paragraph [0554]; claims 1, 65, 159 paragraphs [0543], [0585] ----- -/--	18-21, 38-41 1-51, 69-87

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 April 2021

Date of mailing of the international search report

03/05/2021

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Offermann, Stefanie

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2020/053315

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JACOB A. KLAPPER ET AL: "Single-pass, closed-system rapid expansion of lymphocyte cultures for adoptive cell therapy", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS., vol. 345, no. 1-2, 1 June 2009 (2009-06-01), pages 90-99, XP055568010, NL ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/j.jim.2009.04.009	18,19, 38,39
Y	the whole document	1-51, 69-87
X	----- MAGALHAES ISABELLE ET AL: "Facing the future: challenges and opportunities in adoptive T cell therapy in cancer", EXPERT OPINION ON BIOLOGICAL THERAPY, vol. 19, no. 8, 30 April 2019 (2019-04-30), pages 811-827, XP055782256, ISSN: 1471-2598, DOI: 10.1080/14712598.2019.1608179 Retrieved from the Internet: URL:https://tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/14712598.2019.1608179>	18,19, 38,39
Y	the whole document	1-51, 69-87
X	----- WO 2018/130845 A1 (CELLULAR THERAPEUTICS LTD [GB]) 19 July 2018 (2018-07-19)	64-68
Y	claim 1	1-87
Y	----- US 2019/247433 A1 (KALRA MAMTA [US] ET AL) 15 August 2019 (2019-08-15) paragraph [0180]; example 5	1-87
Y	----- WO 99/23199 A1 (BAXTER INT [US]) 14 May 1999 (1999-05-14) claim 1	1-87
Y	----- OWENS GEMMA L ET AL: "Ex vivo expanded tumour-infiltrating lymphocytes from ovarian cancer patients release anti-tumour cytokines in response to autologous primary ovarian cancer cells", CANCER IMMUNOLOGY, IMMUNOTHERAPY, SPRINGER, BERLIN/HEIDELBERG, vol. 67, no. 10, 23 July 2018 (2018-07-23), pages 1519-1531, XP036604159, ISSN: 0340-7004, DOI: 10.1007/s00262-018-2211-3 [retrieved on 2018-07-23] the whole document	1-87
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2020/053315

Q(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2010/279405 A1 (PETERSON ALVIN [US] ET AL) 4 November 2010 (2010-11-04) paragraph [0077]; figure 1 -----	52-68
Y	Brauner Janina ET AL: "Workflow automation and parallelization improves the isolation and analysis of tumor-infiltrating immune cell subpopulations", 1 January 2017 (2017-01-01), pages 1-1, XP055782110, Retrieved from the Internet: URL:https://www.miltenyibiotec.com/Resources/Persistent/b2de22d3cb3607966b5954dd713db9c9cf240061/Workflow%20automation%20and%20parallelization%20improves%20the%20isolation%20and%20analysis%20of%20tumor-infiltrating%20immune%20cell%20subpopulations.pdf [retrieved on 2021-03-04] the whole document -----	52-68
X,P	WO 2020/061429 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 26 March 2020 (2020-03-26) paragraph [0780]; example 6 -----	1-51, 69-87
X,P	WO 2020/177920 A2 (ASYMPTOTE LTD [GB]) 10 September 2020 (2020-09-10) claims 1-21 -----	64-68

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2020/053315

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ GB2020/ 053315

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-51, 69-87

methods for preparing a population of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) from a cryopreserved disaggregated tumor in a closed system

2. claims: 52-68

means and methods for isolating a population of TILs from tumor tissue wherein the disaggregation of the tissue is done in a specific closed device which is defined by particular structural features

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2020/053315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019210131 A1	31-10-2019	AU 2019257749 A1 BR 112020021660 A2 CA 3098303 A1 CN 112368003 A EP 3784254 A1 KR 20210005138 A SG 11202010319R A TW 202014195 A WO 2019210131 A1	22-10-2020 02-02-2021 31-10-2019 12-02-2021 03-03-2021 13-01-2021 27-11-2020 16-04-2020 31-10-2019
WO 2018130845 A1	19-07-2018	EP 3568459 A1 US 2020032197 A1 WO 2018130845 A1	20-11-2019 30-01-2020 19-07-2018
US 2019247433 A1	15-08-2019	AU 2019218093 A1 CA 3090416 A1 CN 111684062 A EP 3749753 A1 KR 20200119840 A SG 11202007543T A TW 202002995 A US 2019247433 A1 US 2021030803 A1 WO 2019157298 A1	10-09-2020 15-08-2019 18-09-2020 16-12-2020 20-10-2020 29-09-2020 16-01-2020 15-08-2019 04-02-2021 15-08-2019
WO 9923199 A1	14-05-1999	NONE	
US 2010279405 A1	04-11-2010	AU 2010242780 A1 AU 2016204537 A1 BR PI1009981 A2 CA 2760574 A1 CN 102458302 A EP 2424463 A1 EP 3150166 A1 ES 2625893 T3 HK 1169301 A1 JP 5917392 B2 JP 2012525157 A KR 20120020143 A KR 20160091454 A MX 339769 B US 2010279405 A1 US 2015353891 A1 WO 2010127310 A1 ZA 201108756 B	01-12-2011 21-07-2016 15-03-2016 04-11-2010 16-05-2012 07-03-2012 05-04-2017 20-07-2017 25-01-2013 11-05-2016 22-10-2012 07-03-2012 02-08-2016 08-06-2016 04-11-2010 10-12-2015 04-11-2010 26-02-2014
WO 2020061429 A1	26-03-2020	AU 2019342749 A1 CA 3112599 A1 TW 202028457 A WO 2020061429 A1	18-03-2021 26-03-2020 01-08-2020 26-03-2020
WO 2020177920 A2	10-09-2020	NONE	

フロントページの続き

(32)優先日 令和2年7月2日(2020.7.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,T,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. ジップロック

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ゲスト, ライアン

イギリス国 エム13 9エックスエックス マンチェスター, グラフトン ストリート 48, インスティル バイオ (ユーケイ) リミテッド 気付

(72)発明者 マカフリー, ジョアン

イギリス国 エム13 9エックスエックス マンチェスター, グラフトン ストリート 48, インスティル バイオ (ユーケイ) リミテッド 気付

F ターム (参考) 4B029 AA02 AA09 BB11 HA05

4B065 AA94X AC20 BB19 BD09

4C087 AA01 AA02 AA03 BB43 BB64 CA04 MA66 NA14 ZB26