(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년07월24일
(11) 등록번호 10-2686794
(24) 등록일자 2024년07월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/078 (2010.01) *A01N 1/02* (2006.01)
A61K 31/675 (2006.01) *A61K 31/7076* (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01) *A61K 38/20* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0634 (2023.05)
A01N 1/0284 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7031407
(22) 출원일자(국제) 2018년01월05일
심사청구일자 2021년01월05일
(85) 번역문제출일자 2019년10월24일
(65) 공개번호 10-2019-0142342
(43) 공개일자 2019년12월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/012633
(87) 국제공개번호 WO 2018/182817
국제공개일자 2018년10월04일
(30) 우선권주장
62/478,506 2017년03월29일 미국(US)
(뒷면에 계속)
(56) 선행기술조사문헌
Clin Cancer Res (2010) 16 (9): 2646-2655.
US20120244133 A1*
WO2013057500 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
이오반스 바이오테라퓨틱스, 인크.
미국 94070 캘리포니아 샌 칼로스 인더스트리얼 로드 825 스위트 400
(72) 발명자
워델, 세스
미국 33620 플로리다주 탐파 유에스에프 홀리 드라이브 30204
벤더, 제임스
미국 92688 캘리포니아주 란초 산타 마가리타 클로버데일 3
롯체, 미셸, 티.
미국 15232 펜실베니아주 피츠버그 웨스트민스터 플레이스 5134
(74) 대리인
양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 19 항 심사관 : 이현지

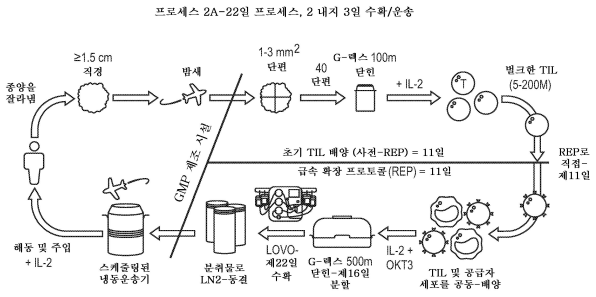
(54) 발명의 명칭 **종양 침윤 림프구의 제조 방법 및 면역요법에서의 그의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 감소된 미생물 오염 뿐만 아니라 감소된 비용을 허용하면서, 보다 짧은 기간에 개선된 효능, 개선된 표현형, 및 증가된 TIL의 대사적 건강을 발생시키는 닫힌 계에서 TIL 집단을 확장시키는 신규한 방법을 비롯한, TIL을 확장시키고, TIL의 치료 집단을 제조하는 개선된 및/또는 단축된 방법을 제공한다. 이러한 TIL은 치료적

(뒷면에 계속)

대 표 도



치료 처방에서 용도를 발견한다.

(52) CPC특허분류
A61K 31/675 (2013.01)
A61K 31/7076 (2013.01)
A61K 35/17 (2023.05)
A61K 38/2013 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C12N 5/0638 (2023.05)
C12N 2501/04 (2013.01)

(30) 우선권주장
62/539,410 2017년07월31일 미국(US)
62/548,306 2017년08월21일 미국(US)
62/554,538 2017년09월05일 미국(US)
62/559,374 2017년09월15일 미국(US)
62/567,121 2017년10월02일 미국(US)
62/577,655 2017년10월26일 미국(US)
62/582,874 2017년11월07일 미국(US)
62/596,374 2017년12월08일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

(a) 대상체로부터 얻어진 종양 샘플을 종양 소화물 또는 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 대상체로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

(b) 종양 소화물 또는 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계;

(c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 3일 내지 11일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

(d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 7일 내지 11일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위 집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

(e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

(f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남); 및

(g) 단계 (f)로부터의 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계

를 포함하는, 종양 침윤 림프구 (TIL)를 TIL의 치료 집단으로 확장시키는 방법.

청구항 24

(a) 대상체로부터 얻어진 종양 샘플을 종양 소화물 또는 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 대상체로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

(b) 종양 소화물 또는 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계;

(c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 3일 내지 11일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

(d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 7일 내지 11일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

(e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

(f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남); 및

(g) 단계 (f)로부터의 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계

를 포함하는, 종양 침윤 림프구 (TIL)를 TIL의 치료 집단으로 확장시키는 방법.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 제1 확장 및/또는 제2 확장에서의 배지에 인간 혈청이 없는 것인 방법.

청구항 26

제23항 또는 제24항에 있어서, 단계 (e)에서 수확된 TIL의 치료 집단이 대상체에게 치료 유효 투여량을 투여하는 데 사용하기 위한 충분한 TIL을 포함하는 것인 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 치료 유효 투여량을 투여하기 위한 충분한 TIL의 수가 1×10^{9}개 내지 9×10^{10}개인 방법.

청구항 28

제23항 또는 제24항에 있어서, APC가 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 단계 (e)에서 수확된 TIL의 치료 집단이 TIL의 제1 및/또는 제2 집단에 비해 CD8+ 세포의 증가된 하위집단을 나타내는 것인 방법.

청구항 30

제28항에 있어서, PBMC가 1:25 TIL:PBMC의 비로 보충되는 것인 방법.

청구항 31

제23항 또는 제24항에 있어서, 단계 (c)에서의 제1 확장 및 단계 (d)에서의 제2 확장이 각각 개별적으로 11일의 기간 내에 수행되는 것인 방법.

청구항 32

제23항 또는 제24항에 있어서, 단계 (a) 내지 (f)가 10일 내지 22일 내에 수행되는 것인 방법.

청구항 33

제23항 또는 제24항에 있어서, 단계 (a) 내지 (f)가 15일 내지 22일 내에 수행되는 것인 방법.

청구항 34

제23항 또는 제24항에 있어서, 단계 (a) 내지 (f)가 20일 내지 22일 내에 수행되는 것인 방법.

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

제23항 또는 제24항에 있어서, 제1 확장으로부터 얻어지는 TIL의 제2 집단이 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 큰 것인 방법.

청구항 69

제23항 또는 제24항에 있어서, 종양 소화물이 효소적 배지에서 대상체로부터 얻어진 종양의 샘플을 인큐베이션함으로써 제조된 것인 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 종양 소화물의 제조는 종양 샘플을 해리하기 위해 종양 샘플을 기계적으로 파괴하는 것을 포함하고, 밀도 구배 분리를 사용하여 해리된 종양 샘플을 정제하는 것을 추가로 포함할 수 있는 것인 방법.

청구항 71

제69항에 있어서, 효소적 배지가 DN아제 (DNase)를 포함하는 것인 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 효소적 배지가 30 유닛/mL의 DN아제 (DNase)를 포함하는 것인 방법.

청구항 73

제69항에 있어서, 효소적 배지가 콜라게나제를 포함하는 것인 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 효소적 배지가 1.0 mg/mL의 콜라게나제를 포함하는 것인 방법.

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호-참조**

[0002] 이 출원은 2017년 3월 29일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/478,506호, 2017년 7월 31일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/539,410호, 2017년 8월 21일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/548,306호, 2017년 9월 5일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/554,538호, 2017년 9월 15일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/559,374호, 2017년 10월 2일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/567,121호, 2017년 10월 26일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/577,655호, 2017년 11월 7일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/582,874호, 및 2017년 12월 8일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/596,374호에 대해 우선권을 주장하며, 이들은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되었으며, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2018년 1월 4일에 생성된 상기 ASCII 카피는 116983-5017_ST25.txt로 명명되며, 크기가 14 킬로바이트이다.

배 경 기 술

[0005] 종양 침윤 림프구 (TIL)의 입양 전달을 사용한 벌크한 난치성 암의 치료는 저조한 예후를 갖는 환자를 위한 요법에 대한 강력한 접근법을 나타낸다. Gattinoni, *et al.*, *Nat. Rev. Immunol.* **2006**, *6,* 383-393. 다수의 TIL은 성공적인 면역요법에 요구되며, 왕성하고 신뢰성 있는 프로세스는 상업화에 필요하다. 이는 세포 확장으로의 기술적, 물류적, 및 규제적 쟁점 때문에 달성하는 데 도전이었다. IL-2-기재 TIL 확장, 이어서 "급속 확장 프로세스" (REP)는 그의 속도 및 효율성 때문에 TIL 확장을 위한 바람직한 방법이 되었다. Dudley, *et al.*, *Science* **2002**, *298,* 850-54; Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23,* 2346-57; Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26,* 5233-39; Riddell, *et al.*, *Science* **1992**, *257,* 238-41; Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* **2003**, *26,* 332-42. REP는 14-일 기간에 걸쳐 TIL의 1,000배 확장을 발생시킬 수 있지만, 이는 종종 공급자 세포로서 다수의 공여자로부터의 방사선조사된 동종이형 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC, 단핵 세포 (MNC)로도 공지됨)의 상당한 과량 (예를 들어, 200배), 뿐만 아니라 항-CD3 항체 (OKT3) 및 고 용량의 IL-2를 요구한다. Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* **2003**, *26,* 332-42. REP 절차를 겪은 TIL은 흑색종을 갖는 환자에서 숙주 면역억제 후에 성공적인 입양 세포 요법을 생성하였다. 현재의 주입 허용 파라미터는 TIL의 조성의 판독 (예를 들어, CD28, CD8, 또는 CD4 양성) 및 REP 생성물의 배수 확장 및 생존력에 의존한다.

[0006] 현재의 TIL 제조 프로세스는 길이, 비용, 멸균성 문제, 및 본원에 기재된 다른 인자에 의해 제한되므로, 이러한 프로세스를 상업화하는 잠재성은 심각하게 제한되며, 이들 및 다른 이유로, 현 시점에서 상업적 프로세스는 이용가능하게 되지 않았다. 상업적 규모 제조 및 다수의 임상 기관에서 인간 환자에서 사용하기 위한 규제적 승인에 적절한 TIL 제조 프로세스 및 이러한 프로세스에 기초한 요법을 제공할 긴급한 필요가 있다.

발명의 내용

[0007] **발명의 간단한 요약**

[0008] 본 발명은 TIL을 확장시키고, TIL의 치료 집단을 제조하는 개선된 및/또는 단축된 방법을 제공한다.

[0009] 본 발명은

[0010] (a) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 환자로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0011] (b) 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계;

[0012] (c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0013] (d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0014] (e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0015] (f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남)

[0016] 를 포함하는, 종양 침윤 림프구 (TIL)를 TIL의 치료 집단으로 확장시키는 방법을 제공한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 방법은 단계 (f)에서의 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계를 더 포함한다.

[0018] 일부 실시양태에서, 냉동보존 프로세스는 1:1 비의 수확된 TIL 집단 대 냉동보존 배지를 사용하여 수행된다.

[0019] 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이다. 일부 실시양태에서, PBMC는 방사선조사되고, 동종이형이다. 일부 실시양태에서, PBMC는 단계 (d)에서 제9일 내지 제14일 중 임의의 날에 세포 배양물에 첨가된다. 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 인공 항원-제시 세포이다.

[0020] 일부 실시양태에서, 단계 (e)에서의 수확은 막-기재 세포 프로세싱 시스템을 사용하여 수행된다.

[0021] 일부 실시양태에서, 단계 (e)에서의 수확은 LOVO 세포 프로세싱 시스템을 사용하여 수행된다.

[0022] 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 4개 내지 약 50개의 단편을 포함하고, 각각의 단편은 약 27 mm^3의 부피를 갖는다.

[0023] 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1300 mm^3 내지 약 1500 mm^3의 총 부피를 갖는 약 30개 내지 약 60개의 단편을 포함한다.

[0024] 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1350 mm^3의 총 부피를 갖는 약 50개의 단편을 포함한다.

[0025] 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1 그램 내지 약 1.5 그램의 총 질량을 갖는 약 50개의 단편을 포함한다.

[0026] 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 G-용기 및 주리 (Xuri) 세포백으로 이루어진 군으로부터 선택되는 용기에 제공된다.

[0027] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서의 세포 배양 배지는 IL-15 및/또는 IL-21을 더 포함한다.

[0028] 일부 실시양태에서, IL-2 농도는 약 10,000 IU/mL 내지 약 5,000 IU/mL이다.

[0029] 일부 실시양태에서, IL-15 농도는 약 500 IU/mL 내지 약 100 IU/mL이다.

[0030] 일부 실시양태에서, IL-21 농도는 약 20 IU/mL 내지 약 0.5 IU/mL이다.

[0031] 일부 실시양태에서, 단계 (f)에서의 주입 백은 하이포써모솔 (HypoThermosol)-함유 주입 백이다.

[0032] 일부 실시양태에서, 냉동보존 배지는 디메틸술폭시드 (DMSO)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 냉동보존 배지는 7% 내지 10% 디메틸술폭시드 (DMSO)를 포함한다.

[0033] 일부 실시양태에서, 단계 (c)에서의 제1 기간 및 단계 (e)에서의 제2 기간은 각각 개별적으로 10일, 11일, 또는

12일의 기간 내에 수행된다.

[0034] 일부 실시양태에서, 단계 (c)에서의 제1 기간 및 단계 (e)에서의 제2 기간은 각각 개별적으로 11일의 기간 내에 수행된다.

[0035] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f)는 약 10일 내지 약 22일의 기간 내에 수행된다.

[0036] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f)는 약 20일 내지 약 22일의 기간 내에 수행된다.

[0037] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f)는 약 15일 내지 약 20일의 기간 내에 수행된다.

[0038] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f)는 약 10일 내지 약 20일의 기간 내에 수행된다.

[0039] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f)는 약 10일 내지 약 15일의 기간 내에 수행된다.

[0040] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f)는 22일 이하에 수행된다.

[0041] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f)는 20일 이하에 수행된다.

[0042] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f)는 15일 이하에 수행된다.

[0043] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f)는 10일 이하에 수행된다.

[0044] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f) 및 냉동보존은 22일 이하에 수행된다.

[0045] 일부 실시양태에서, 단계 (e)에서 수확된 TIL의 치료 집단은 TIL의 치료 유효 투여량을 위한 충분한 TIL을 포함한다.

[0046] 일부 실시양태에서, 치료 유효 투여량을 위한 충분한 TIL의 수는 약 2.3×1010개 내지 약 13.7×1010개이다.

[0047] 일부 실시양태에서, 단계 (b) 내지 (e)는 단일 용기에서 수행되며, 단일 용기에서 단계 (b) 내지 (e)를 수행하는 것은 1개 초과의 용기에서 단계 (b) 내지 (e)를 수행하는 것에 비해 절제된 종양 당 TIL 수득량의 증가를 발생시킨다.

[0048] 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 단계 (d)에서의 제2 기간 동안 계를 열지 않고 TIL에 첨가된다.

[0049] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서의 TIL의 제3 집단은 대상체에게 투여되는 경우 증가된 효능, 증가된 인터페론-감마 생산, 증가된 폴리클로날성, 증가된 평균 IP-10, 및/또는 증가된 평균 MCP-1을 제공한다.

[0050] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서의 TIL의 제3 집단은 대상체에게 투여되는 경우 적어도 5배 이상의 인터페론-감마 생산을 제공한다.

[0051] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서의 TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, TIL의 치료 집단에서의 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포, 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 CD27+의 발현, CD28+의 발현, 보다 긴 텔로미어, 증가된 CD57 발현, 및 감소된 CD56 발현으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 나타낸다.

[0052] 일부 실시양태에서, TIL의 제3 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 증가된 CD57 발현 및 감소된 CD56 발현을 나타낸다.

[0053] 일부 실시양태에서, 미생물 오염의 위험은 열린 계에 비해 감소된다.

[0054] 일부 실시양태에서, 단계 (g)로부터의 TIL은 환자 내로 주입된다.

[0055] 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 4개의 단편을 포함한다.

[0056] 본 발명은 또한

[0057] (a) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 대상체로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0058] (b) 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계;

[0059] (c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단

을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0060] (d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0061] (e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0062] (f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남);

[0063] (g) 임의로 단계 (f)로부터의 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계;

[0064] (h) 단계 (g)에서의 주입 백으로부터의 TIL의 제3 집단의 치료 유효 투여량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 확장된 종양 침윤 림프구 (TIL)를 투여하는 것을 포함하는 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0065] 일부 실시양태에서, 단계 (e)에서 수확된 TIL의 치료 집단은 단계 (h)에서의 TIL의 치료 유효 투여량을 투여하기 위한 충분한 TIL을 포함한다.

[0066] 일부 실시양태에서, 단계 (h)에서의 치료 유효 투여량을 투여하기 위한 충분한 TIL의 수는 약 2.3×1010개 내지 약 13.7×1010개이다.

[0067] 일부 실시양태에서, 항원 제시 세포 (APC)는 PBMC이다.

[0068] 일부 실시양태에서, PBMC는 단계 (d)에서 제9일 내지 제14일 중 임의의 날에 세포 배양물에 첨가된다.

[0069] 일부 실시양태에서, 단계 (h)에서 TIL 세포의 치료 유효 투여량을 투여하기 전에, 비-골수절제 림프구고갈 처방이 환자에게 투여되었다.

[0070] 일부 실시양태에서, 비-골수절제 림프구고갈 처방은 2일 동안 60 mg/m2/일의 용량으로 시클로포스파미드의 투여, 이어서 5일 동안 25 mg/m2/일의 용량으로 플루다라빈의 투여의 단계를 포함한다.

[0071] 일부 실시양태에서, 방법은 단계 (h)에서 환자에의 TIL 세포의 투여 다음날에 시작하여 환자를 고-용량 IL-2 처방으로 치료하는 단계를 더 포함한다.

[0072] 일부 실시양태에서, 고-용량 IL-2 처방은 허용시까지 8시간마다 15-분 볼루스 정맥내 주입으로서 투여되는 600,000 내지 720,000 IU/kg을 포함한다.

[0073] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서의 TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, TIL의 치료 집단에서의 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포, 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 CD27+의 발현, CD28+의 발현, 보다 긴 텔로미어, 증가된 CD57 발현, 및 감소된 CD56 발현으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 나타낸다.

[0074] 일부 실시양태에서, TIL의 치료 집단에서의 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 증가된 CD57 발현 및 감소된 CD56 발현을 나타낸다.

[0075] 일부 실시양태에서, 암은 흑색종, 난소암, 자궁경부암, 비-소세포 폐암 (NSCLC), 폐암, 방광암, 유방암, 인간 유두종 바이러스에 의해 유발되는 암, 두경부암 (두경부 편평 세포 암종 (HNSCC)을 포함함), 신장암, 및 신세포 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0076] 일부 실시양태에서, 암은 흑색종, HNSCC, 자궁경부암, 및 NSCLC로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0077] 일부 실시양태에서, 암은 흑색종이다.

[0078] 일부 실시양태에서, 암은 HNSCC이다.

[0079] 일부 실시양태에서, 암은 자궁경부암이다.

[0080] 일부 실시양태에서, 암은 NSCLC이다.

[0081] 본 발명은 또한

[0082] (a) 환자로부터 절제된 종양으로부터 프로세싱된 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하여 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0083] (b) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (a)에서 단계 (b)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0084] (c) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0085] (d) 단계 (c)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0086] (e) 단계 (d)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 (e)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남)

[0087] 를 포함하는, 종양 침윤 림프구 (TIL)를 TIL의 치료 집단으로 확장시키는 방법을 제공한다.

[0088] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서 수확된 TIL의 치료 집단은 TIL의 치료 유효 투여량을 위한 충분한 TIL을 포함한다.

[0089] 일부 실시양태에서, 치료 유효 투여량을 위한 충분한 TIL의 수는 약 2.3×1010개 내지 약 13.7×1010개이다.

[0090] 일부 실시양태에서, 방법은 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계를 더 포함한다.

[0091] 일부 실시양태에서, 냉동보존 프로세스는 1:1 비의 수확된 TIL 집단 대 냉동보존 배지를 사용하여 수행된다.

[0092] 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이다.

[0093] 일부 실시양태에서, PBMC는 방사선조사되고, 동종이형이다.

[0094] PBMC가 단계 (c)에서 제9일 내지 제14일 중 임의의 날에 세포 배양물에 첨가되는 제68항에 따른 방법.

[0095] 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 인공 항원-제시 세포이다.

[0096] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서의 수확은 LOVO 세포 프로세싱 시스템을 사용하여 수행된다.

[0097] 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 4개 내지 약 50개의 단편을 포함하고, 각각의 단편은 약 27 mm^3의 부피를 갖는다.

[0098] 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1300 mm^3 내지 약 1500 mm^3의 총 부피를 갖는 약 30개 내지 약 60개의 단편을 포함한다.

[0099] 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1350 mm^3의 총 부피를 갖는 약 50개의 단편을 포함한다.

[0100] 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1 그램 내지 약 1.5 그램의 총 질량을 갖는 약 50개의 단편을 포함한다.

[0101] 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 4개의 단편을 포함한다.

[0102] 일부 실시양태에서, 제2 세포 배양 배지는 G-용기 및 주리 세포백으로 이루어진 군으로부터 선택되는 용기에 제공된다.

[0103] 일부 실시양태에서, 단계 (e)에서의 주입 백은 하이포써모솔-함유 주입 백이다.

[0104] 일부 실시양태에서, 단계 (b)에서의 제1 기간 및 단계 (c)에서의 제2 기간은 각각 개별적으로 10일, 11일, 또는 12일의 기간 내에 수행된다.

[0105] 일부 실시양태에서, 단계 (b)에서의 제1 기간 및 단계 (c)에서의 제2 기간은 각각 개별적으로 11일의 기간 내에 수행된다.

[0106] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e)는 약 10일 내지 약 22일의 기간 내에 수행된다.

[0107] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e)는 약 10일 내지 약 20일의 기간 내에 수행된다.

[0108] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e)는 약 10일 내지 약 15일의 기간 내에 수행된다.

[0109] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e)는 22일 이하에 수행된다.

[0110] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e) 및 냉동보존은 22일 이하에 수행된다.

[0111] 일부 실시양태에서, 단계 (b) 내지 (e)는 단일 용기에서 수행되며, 단일 용기에서 단계 (b) 내지 (e)를 수행하는 것은 1개 초과의 용기에서 단계 (b) 내지 (e)를 수행하는 것에 비해 절제된 종양 당 TIL 수득량의 증가를 발생시킨다.

[0112] 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 단계 (c)에서의 제2 기간 동안 계를 열지 않고 TIL에 첨가된다.

[0113] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서의 TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, TIL의 치료 집단에서 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포, 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 CD27+의 발현, CD28+의 발현, 보다 긴 텔로미어, 증가된 CD57 발현, 및 감소된 CD56 발현으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 나타낸다.

[0114] 일부 실시양태에서, TIL의 치료 집단에서 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포, 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 증가된 CD57 발현 및 감소된 CD56 발현을 나타낸다.

[0115] 일부 실시양태에서, 미생물 오염의 위험은 열린 계에 비해 감소된다.

[0116] 일부 실시양태에서, 단계 (e)로부터의 TIL은 환자 내로 주입된다.

[0117] 일부 실시양태에서, 닫힌 용기는 단일 생물반응기를 포함한다.

[0118] 일부 실시양태에서, 닫힌 용기는 G-렉스 (G-REX)-10을 포함한다.

[0119] 일부 실시양태에서, 닫힌 용기는 G-렉스-100을 포함한다.

[0120] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서 항원 제시 세포 (APC)는 25:1 내지 100:1의 APC:TIL 비로 TIL의 제2 집단의 세포 배양물에 첨가된다.

[0121] 일부 실시양태에서, 세포 배양물은 2.5×10^{9} APC 대 100×10^{6} TIL의 비를 갖는다.

[0122] 일부 실시양태에서, 단계 (c)에서 항원 제시 세포 (APC)는 25:1 내지 100:1의 APC:TIL 비로 TIL의 제2 집단의 세포 배양물에 첨가된다.

[0123] 일부 실시양태에서, 세포 배양물은 2.5×10^{9} APC 대 100×10^{6} TIL의 비를 갖는다.

[0124] 본 발명은 또한

[0125] (a) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 대상체로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0126] (b) 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계;

[0127] (c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0128] (d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 단힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0129] (e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0130] (f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남);

[0131] (g) 임의로 단계 (f)로부터의 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계

[0132] 를 포함하는 방법에 의해 수득가능한 TIL의 제3 집단인, 암을 갖는 대상체의 치료에 사용하기 위한 확장된 TIL의 집단을 제공한다.

[0133] 일부 실시양태에서, TIL의 집단은 상기 및 본원에 기재된 방법에 따라 암을 갖는 대상체를 치료하기 위해 사용하기 위한 것이며, 방법은 상기 및 본원에 언급된 특색 중 하나 이상을 더 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0134] **도 1:** 프로세스 2A, TIL 제조를 위한 22-일 프로세스의 실시양태의 도해를 나타낸다.

도 2: TIL 제조를 위한 1C 프로세스 및 2A 프로세스의 실시양태 사이의 비교를 나타낸다.

도 3: 1C 프로세스 시각표를 나타낸다.

도 4: 보다 높은 세포 카운트를 위한, 투여 및 공동-요법 단계를 포함하는 TIL 제조를 위한 프로세스 2A를 사용한 TIL 요법의 실시양태의 프로세스를 나타낸다.

도 5: 보다 낮은 세포 카운트를 위한, 투여 및 공동-요법 단계를 포함하는 TIL 제조를 위한 프로세스 2A를 사용한 TIL 요법의 실시양태의 프로세스를 나타낸다.

도 6: 2A 프로세스의 실시양태에 대한 상세한 개략도를 나타낸다.

도 7: 신선한 TIL 및 해동된 TIL 사이의 인터페론-감마 (IFN-γ) 발현을 비교함으로써 2A 프로세스의 실시양태를 사용하여 제조된 TIL의 특징규명을 나타낸다.

도 8: 신선한 TIL 대 해동된 TIL에서의 CD3 발현을 조사함으로써 2A 프로세스의 실시양태를 사용하여 제조된 TIL의 특징규명을 나타낸다.

도 9: 신선한 TIL 대 해동된 TIL에서의 회수를 조사함으로써 2A 프로세스의 실시양태를 사용하여 제조된 TIL의 특징규명을 나타낸다.

도 10: 신선한 TIL 대 해동된 TIL의 생존력을 조사함으로써 2A 프로세스의 실시양태를 사용하여 제조된 TIL의 특징규명을 나타낸다.

도 11: 냉동보존 단계를 포함하는 프로세스 2A의 실시양태의 주요 단계를 나타낸다.

도 12: 1C 프로세스 및 2A 프로세스의 실시양태로부터 얻어진 세포 카운트를 나타낸다.

도 13: 1C 프로세스 및 2A 프로세스의 실시양태로부터 얻어진 퍼센트 세포 생존력을 나타낸다.

도 14: 1C 프로세스 및 2A 프로세스의 실시양태에 대해 얻어진 TIL에 대한 유동 세포측정법에 의해 측정된 CD45 및 CD3 세포 (즉, T 세포)의 백분율을 나타낸다.

도 15: 도 80 및 98에서의 데이터를 생성하는 데 사용된 것과는 상이한 검정에 의해 측정된 바와 같은, 1C 프로세스 및 2A 프로세스의 실시양태에 대해 얻어진 IFN-γ 방출을 나타낸다.

도 16: 도 80 및 98에서의 데이터를 생성하는 데 사용된 것과는 상이한 검정에 의해 측정된 바와 같은, 1C 프로세스 및 2A 프로세스의 실시양태에 대해 얻어진 IFN-γ 방출을 나타낸다.

도 17: 1C 프로세스 및 2A 프로세스의 실시양태로부터 얻어진 TCR a/b 및 NK 세포의 백분율을 나타낸다.

도 18: 1C 프로세스 및 2A 프로세스의 실시양태에 의해 얻어진 TIL에 대한 유동 세포측정법에 의해 측정된 $CD8^+$ 및 $CD4^+$ 세포의 백분율, 뿐만 아니라 각각의 하위세트 사이의 비를 나타낸다.

도 19: 1C 프로세스 및 2A 프로세스의 실시양태로부터 얻어진 TIL에 대한 유동 세포측정법에 의해 측정된 기억 하위세트의 백분율을 나타낸다.

도 20: 1C 프로세스 및 2A 프로세스의 실시양태로부터 얻어진 TIL에 대한 유동 세포측정법에 의한 PD-1, LAG-3, 및 TIM-3 발현의 백분율을 나타낸다.

도 21: 1C 프로세스 및 2A 프로세스의 실시양태로부터 얻어진 TIL에 대한 유동 세포측정법에 의한 4-1BB, CD69, 및 KLRG1 발현의 백분율을 나타낸다.

도 22: 1C 프로세스 및 2A 프로세스의 실시양태로부터 얻어진 TIL에 대한 유동 세포측정법에 의한 TIGIT 발현의 백분율을 나타낸다.

도 23: 1C 프로세스 및 2A 프로세스의 실시양태로부터 얻어진 TIL에 대한 유동 세포측정법에 의한 CD27 및 CD28 발현의 백분율을 나타낸다.

도 24: 유동-FISH 텔로미어 길이 분석의 결과를 나타낸다.

도 25: 유동-FISH 텔로미어 길이 분석의 결과 (아웃라이어 데이터 점의 제거 후)를 나타낸다.

도 26: 프로세스 1C 및 프로세스 2A의 실시양태로 처리된 코호트를 포함하는 임상 시험 설계를 나타낸다.

도 27: 단계 A 내지 F의 개관을 제공하는 예시적인 프로세스 2A 차트.

도 28: 프로세스 2A의 프로세스 흐름도.

도 29: 프로세스 2A 데이터 수집 계획 (Data Collection Plan)에 대한 프로세스 흐름도

도 30: 신선한 대 해동된 TIL의 생존력

도 31: 재-REP 배양물에서의 신선한 및 해동된 TIL의 확장.

도 32: 혈액 대사물의 정상 실험실 값.

도 33: 프로세스 2A 사전-REP TIL의 대사물 분석.

도 34: 프로세스 2A 사전-REP TIL 세포 배양물에서의 IL-2의 정량화.

도 35: TIL의 항-CD3, 항-CD28 및 항-4-1BB 자극 시의 세포독성 시토카인 IFN-γ의 방출.

도 36: TIL의 항-CD3, 항-CD28, 및 항-4-1BB 자극 후의 그란자임 (Granzyme) B의 방출.

도 37: TCR αβ+ TIL. 대부분의 인간 CD3+ T-세포는 MHC 제한된 방식으로 항원을 인식하는 α 및 β 쇄에 의해 형성된 수용체를 발현한다. a) M1061에서를 제외하고, 신선한 및 해동된 TIL 생성물은 80% 이상의 TCR αβ+ 발현 TIL을 가졌다. 신선한 및 해동된 TIL은 둘 다 TCR αβ의 필적하는 발현을 가졌다 (p-값 = 0.9582). 재-REP 후의 TCR αβ+ 발현 TIL의 감소가 관찰되었지만, 이 감소는 재-REP TIL 내에서 유의하지 않았다 ($p = 0.24$). b) 각각 신선한 및 해동된 TIL에 비해 TCR αβ를 발현하는 신선한 및 해동된 재-REP TIL의 9.2% 및 15.7% 감소가 있었다.

도 38: TCRαβ-CD56+. 종양 침윤 자연 살해 (Natural Killer) (NK) 및 NKT-세포는 또한 MHC 발현 뿐만 아니라 CD1-제시된 지질 항원이 결여된 세포를 용해하고, 면역조절성 시토카인을 제공하는 능력을 갖는다. 그러나, 극심한 NK 세포 침윤은 진행된 질환과 연관되며, 암 발달을 용이하게 할 수 있다. 도 a는 M1063에서를 제외하고 모든 예에서, 신선한 TIL에 비해 해동된 TIL에서 NK 집단의 보통이지만 유의하지는 않은 감소가 있었음을 나타낸다 ($p = 0.27$). 재-REP TIL 집단 사이에 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ($p = 0.88$). 신선한 TIL, 신선한 재-REP TIL, 및 해동된 재-REP TIL은 도 b에 나타난 바와 같이 CD56의 유사한 발현을 입증한다. 해동된 TIL 생성물은 아마도 냉동-동결 절차의 결과로서 신선한 TIL (3.0 ± 2.2)보다 더 적은 (1.9 ± 1.3) NK-발현 세포를 가졌다.

도 39: CD4+ 세포. CD4 집단에서의 실질적 차이는 개별적 조건에서 관찰되지 않았다. 도 a는 각각의 조건에서

의 평균 CD4 집단을 나타낸다. 도 b에서의 표는 SD 및 SEM 값을 나타낸다. 대부분 EP11001T에서의 신선한 재-REP 집단에서의 CD4의 감소로 인한 것인 신선한 재-REP 집단에서의 CD4 집단의 약간의 감소가 있다.

도 40: CD8+ 세포. a) EP11001T를 제외하고 모두에서, 신선한 및 해동된 TIL 둘 다는 필적하는 CD8+ 집단을 나타내었다 (p=0.10, 유의한 차이 없음). 대부분의 실험에서, 신선한 재-REP TIL 생성물에서 CD8+ 발현 TIL의 약간의 감소가 있었다 (예외는 M1061T 및 M1065T이었음). 해동된 재-REP TIL에서 CD8+ 집단의 대략 10 내지 30 % 감소가 있었다. 신선한 및 해동된 TIL 둘 다로부터의 재-REP TIL의 비교는 유의한 차이를 나타내었다 ($p = 0.03$, 스튜던트 (Student) t-검정). 도 b는 모든 조건에서 CD8+ 발현 TIL의 평균 값을 나타낸다. 신선한 및 해동된 TIL 둘 다는 유사한 결과를 나타낸다. 그러나, 신선한 재-REP TIL에 비해 해동된 재-REP TIL 생성물에서 CD8+ 집단의 10.8% 감소가 있었다.

도 41: CD4+CD154+ 세포. CD40L로도 공지된 CD154는 활성화된 T-세포에 대한 마커이다. 도 a: CD4+CD154+ 집단에서의 실질적 차이는 상이한 조건에서 관찰되지 않았지만, 34.1%의 감소는 EP11001T 신선한 재-REP CD4+ TIL에서 관찰되었다. CD154 발현은 M1061T 및 M1062T에서 관찰되지 않았는데, 이는 이들 실험이 연장된 표현형 패널이 제자리에 있기 전에 수행되었기 때문이다. 도 b: 해동된 TIL 조건에서의 약간의 감소는 M1061T 및 M1062T에서 측정되지 않은 CD154에 기인할 수 있다. 모든 조건은 활성화된 CD4+ T 세포를 시사하는 CD4 집단에서의 매우 필적하는 CD154 발현을 나타낸다.

도 42a 내지 42b: CD8+CD154+ 세포. CD8+ TIL 상에 발현된 활성화 마커 CD154를 또한 분석하였다. a) 전체적으로, CD154 발현은 신선한 및 해동된 TIL 생성물에서 CD8+ 집단에서 더 낮았다. 이는 CD154가 활성화된 CD4+ T 세포에서 주로 발현되기 때문에 놀랍지 않다. CD154 발현이 신선한 및 해동된 TIL 생성물 둘 다에서 측정된 경우, CD154 발현의 차이가 해동된 TIL 생성물에서 관찰되지 않거나, 증가가 관찰되었다. 스튜던트 t-검정은 2가지 조건 사이에 유의한 차이가 없었음을 나타내었다. 신선한 재-REP에 비해 해동된 재-REP에서의 CD154 발현의 증가는 모든 실험에서 나타났다 ($p = 0.02$). b) CD154 발현의 증가는 그들의 대응물에 비해 해동된 TIL 및 해동된 재-REP TIL 생성물 둘 다에서 관찰되었다. 해동된 재-REP TIL은 신선한 재-REP TIL에 비해 CD154 발현의 29.1% 증가를 나타내었다.

도 43a 내지 43b: CD4+CD69+ 세포. CD69는 자극 또는 활성화 후의 T 세포에서의 초기 활성화 마커이다. a) EP11001T에서를 제외하고 모든 TIL에서, 신선한 및 해동된 재-REP 둘 다는 아마도 재-REP 길이로 인해 (11일이라기 보다는 7일), CD69 발현의 보통의 증가를 나타내었다. 신선한 및 해동된 TIL 사이에 차이는 관찰되지 않았다 ($p = 0.89$). 신선한 및 해동된 재-REP 사이의 차이는 또한 관찰되지 않았다 ($p = 0.82$). b) CD69 발현의 사소한 증가는 재-REP TIL 생성물에서 관찰된다. (주: CD69 염색은 M1061T 및 M1062T 해동된 TIL 생성물에 대해 수행되지 않았다. M1061T 신선한 TIL 생성물의 CD69 발현은 33.9%였다).

도 44a 내지 44b: CD8+CD69+ 세포. CD4+ 집단에 대해 관찰된 바와 같이, 도 a는 CD8+ 재-REP TIL에서 CD69 발현의 증가를 나타낸다. CD69 발현은 신선한 및 해동된 TIL ($p = 0.68$) 또는 신선한 및 해동된 재-REP TIL ($p = 0.76$) 사이에 유의한 차이를 나타내지 않았다. 도 b는 재-REP TIL 생성물에서 CD69 발현의 보통의 증가가 있다는 관찰을 지지한다.

도 45a 내지 45b: CD4+CD137+ 세포. CD137 (4-11313)은 TCR 활성화 시 유도되는 T-세포 공동자극성 수용체이다. 이는 CD4+ 및 CD8+ T 세포 상에서 활성화된다. a) CD137 발현은 자극의 7일 후에 재-REP TIL 집단에서 현저한 증가를 나타내었다. 그러나, 신선한 및 해동된 TIL 또는 신선한 및 해동된 재-REP TIL 사이에 차이는 관찰되지 않았다 ($p < 0.05$ 둘 다의 경우 도 b는 이 관찰을 지지함). 또한, 해동된 TIL은 CD137 발현의 보통의 감소를 나타내었다. 재-REP TIL에서의 CD137 발현의 증가는 7-일 재-REP의 자극의 제2 라운드에 기인할 수 있다.

도 46a 내지 46b: CD8+CD137+ 세포. a) CD8+ 집단은 재-REP 생성물에서 전체적인 증가를 나타내었다. b) 신선한 재-REP 생성물은 신선한 TIL 생성물에 비해 CD8+CD137+ 발현의 33.4% 증가를 가졌다. 해동된 재-REP 생성물은 또한 해동된 TIL에 비해 CD8+ 집단에서 CD137 발현의 33.15% 증가를 나타내었다. 신선한 및 해동된 재-REP TIL 사이에 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 유사한 관찰은 신선한 TIL을 해동된 TIL 생성물과 비교할 때 나타날 수 있다. 이 CD137 발현의 증가는 재-REP의 활성화의 제2 라운드에 기인할 수 있다. (CD137 발현이 실험 중 3개에 대해 관찰되지 않았기 때문에 단지 6개의 TIL이 분석에 사용되었음을 주목한다.)

도 47a 내지 47b: CD4+CM 세포. 중심 기억 (CM) 집단은 CD45RA- (음성) 및 CCR7+ (양성) 발현에 의해 정의된다. a) 재-REP 조건에서 CM 집단의 증가가 관찰되었다. M1063T 및 M1064T는 신선한 TIL 생성물에 비해 해동된

TIL로부터 얻어진 CD4+ 집단에서 CM 발현의 감소를 나타내었다. 신선한 및 해동된 TIL 생성물 (p = 0.1658)도, 신선한 재-REP 및 해동된 재-REP TIL (p = 0.5535)도 CM 집단에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. b) CM 집단의 14.4% 및 15.4% 증가가 각각 신선한 및 해동된 TIL에 비해 신선한 및 해동된 재-REP TIL에서 관찰되었다.

도 48a 내지 48b: CD8+CM 세포. a) CD8+ 집단에서, 신선한 TIL 생성물에서 CM 발현의 극적인 증가가 나타났으며, 이는 TIL 생성물에서 나타나지 않는 관찰이다. 이 증가는 유의성에 영향을 미치지 않았으며 (p = 0.3086), 신선한 및 해동된 TIL 사이의 차이가 없음을 시사한다. 유사한 경향이 재-REP TIL 생성물에서 또한 나타났다. 도 48b) 신선한 TIL에서 CM 집단의 전체적인 증가가 해동된 TIL에 비해 관찰되었다. 수는 신선한 TIL 및 재-REP TIL이 단지 약 2%의 차이를 가졌음을 나타내고; 신선한 TIL은 M1064T에 기인할 수 있는 매우 높은 표준 편차를 나타내었고; M1064T에서의 CM 발현을 제외한 것은 신선한 및 해동된 TIL 생성물 사이에 매우 유사한 CM 발현을 발생시켰다 (나타내지 않음).

도 49a 내지 49b: CD4+EM 세포. 이펙터 기억 (EM) 집단은 CCR7 및 CD45RA 발현의 결여에 의해 정의된다. a) 예상된 바와 같이, 신선한 및 해동된 TIL로부터의 CD4+ 집단은 높은 수준의 이펙터 기억 표현형을 가졌다. 이펙터 기억 발현의 급격한 감소가 M1056T 재-REP TIL 집단에서 발견되었다. 또한, 5회의 다른 실험은 신선한 및 해동된 재-REP TIL 둘 다에서 이펙터 기억 표현형의 감소를 나타내었다. b) 신선한 및 해동된 TIL 둘 다는 이펙터 기억 표현형의 유사한 발현을 나타내었다. 신선한 및 신선한 재-REP TIL의 비교는 후자에서 16% 감소를 나타내었다. 유사한 감소는 해동된 TIL과 비교할 경우 해동된 재-REP TIL (9%)에서 관찰되었다.

도 50a 내지 50b: CD8+EM 세포. a) 신선한 TIL에서 증가된 이펙터 기억의 유사한 패턴이 또한 CD8+ 집단에서 나타났다. 예외는 신선한 TIL이 단지 20% 이펙터 기억 프로파일을 가진 M1064T에서 주목되었으며; 이는 a 및 b에 기재된 바와 같이 CM 표현형을 갖는 이들 TIL의 73%에 기인한다. 재-REP 생성물로부터의 그들의 CD4+ TIL에서 이펙터 기억 집단의 감소를 나타내는 모든 샘플은 그들의 CD8+TIL에서의 동일한 경향을 따랐다. b) CD4+ TIL 집단과는 달리, CD8+ TIL은 신선한, 해동된 및 재-REP 생성물에서 유사한 이펙터 기억 표현형을 나타내었다. (M1064T 신선한에서 낮은 이펙터 기억 집단 및 M1061T 해동된 TIL 샘플에서 발현 없음에 기인한, 신선한 및 해동된 TIL에서 높은 표준 편차를 주목한다.)

도 51a 내지 51b: CD4+CD28+ 세포. CD28 발현은 연령에 따라 감소하는 신생 TIL과 상관된다. a) CM 집단의 증가가 재-REP TIL에서 관찰되었음에도 불구하고, CD28 발현의 감소는 CM-상태 단독이 TIL의 운명을 결정할 수 없음을 시사하는 경향으로서 나타났다. CD28 발현의 감소는 M1061T CD4+ TIL을 제외하고, -재-REP 생성물에서 관찰되었다. b) 신선한 TIL에서 8.89% 및 해동된 TIL에서 5.71%의 감소가 각각 신선한 및 해동된 TIL 생성물에 비해 나타났다.

도 52a 내지 52b: CD8+CD28+ 세포. a) CD8+ TIL 집단에서의 CD28 발현은 재-REP 생성물보다 신선한 및 해동된 TIL에서 더 높았다. 대부분의 경우, 해동된 재-REP TIL은 해동된 TIL 및 신선한 재-REP TIL과 비교할 경우 급격한 감소를 나타내었다. 그러나, 스튜던트 t-검정은 신선한 및 해동된 TIL 사이에 (p = 0.3668) 및 또한 신선한 및 해동된 재-REP 생성물 사이에 (p -=0.7940) 유의한 차이를 나타내지 않았다. b) CD4+ TIL 집단에서 나타난 바와 같이, 그들의 비-재자극된 대응물과 비교할 경우 신선한 재-REP (21.5%) 및 해동된 재-REP (18.2%)에서 CD8+CD28+ 집단의 감소가 있었다.

도 53a 내지 53b: CD4+PD-1+ 세포. TIL에서의 PD-1 발현은 항원 반응성 및 고갈된 T 세포과 상관된다. 따라서, 고갈된 표현형이 11일 동안 REP를 겪은 TIL에서 관찰되는 것은 놀랍지 않다. a) 이 고갈된 표현형은 해동된 TIL 생성물에서 유지되거나 증가된다 (구체적으로, EP11001T 및 M1056T). 신선한 및 해동된 TIL 생성물 사이에 유의한 차이는 나타나지 않았다 (p = 0.9809). 유사한 경향은 해동된 재-REP TIL에 비해 신선한에서 나타났다 (p = 0.0912). b) 신선한 재-REP는 CD4+ TIL 집단에서 PD-1 발현의 보통의 감소를 나타내었다. 모든 다른 조건은 필적하는 PD-1 발현 패턴을 유지하였다. PD-1 발현의 감소 또는 변화 없음은 모든 다른 조건에 비해 신선한 재-REP 생성물에서 관찰되었다. PD-1 발현의 증가는 해동된 재-REP 생성물에서 M1062T, M1063T (CD4+) 및 EP11001T (CD8+)에서 나타났다. 모든 다른 해동된 재-REP 생성물은 해동된 생성물과 필적하는 결과를 나타내었다.

도 54a 내지 54b: CD8+PD-1+ 세포. a) 신선한 TIL 생성물로부터의 CD8+ 집단은 증가된 PD-1 발현과 연관된 보다 고갈된 표현형을 나타내었다. 예외는 CD8+ 해동된 TIL 생성물이 신선한 TIL 생성물에 비해 PD-1 발현의 보통의 증가를 가진 EP11001T에서 관찰되었다. 해동된 TIL에 비해 신선한 TIL에서 PD-1 발현의 작지만, 비-유의한 차이가 있었다 (p = 0.3144). b) 신선한 TIL 생성물은 해동된 TIL에 비해 약간 증가, 그러나 비-유의한 PD-

1 발현을 나타내었으며 (6.74%, 또는 해동된 TIL보다 1.2배 더 높음), 이는 해동된 TIL 생성물이 표현형 패턴에 기초하여 필적하였음을 시사한다.

도 55a 내지 55b: CD4+LAG3+ 세포. 고갈된 T 세포는 PD-1과 함께 높은 수준의 억제성 수용체 LAG3을 발현한다. a) CD4+ 해동된 TIL은 신선한 TIL에 비해 약간 더 높지만, 비-유의한 수준의 LAG3 발현을 나타내었다 ($p = 0.52$). 예외는 M1063T에서 관찰되었다. CD4+ 신선한 및 신선한 재-REP TIL에서의 LAG3 발현이 측정된 실험에서, LAG3+ 발현의 감소는 신선한 TIL에 비해 신선한 재-REP 샘플에서 관찰되었다. b) 전체적으로, 신선한 재-REP TIL 생성물에서 LAG3 발현의 보통의 감소가 있다. 일관됨을 유지하는 도 B에 대해, M1061T, M1062T 및 M1064T는 LAG3 발현이 신선한 생성물에서 측정되지 않았기 때문에 제외되었음을 주목한다.

도 56a 내지 56b: CD8+LAG3+ 세포. a) CD8+ LAG3+ 발현 TIL은 실험에서 보통의 감소를 나타내었으며, 예외는 LAG3 발현의 현저한 감소가 신선한 재-REP TIL에서 나타난 M1063T이었다. 전체적으로, 해동된 재-REP TIL은 LAG3 발현에 대해 신선한 재-REP TIL에 비해 1.5배, 유의한 증가를 나타내었다 ($p = 0.0154$). 그러나, 신선한 TIL 및 해동된 TIL 생성물 사이에 유의한 차이는 관찰되지 않았다 ($p = 0.0884$). b) 신선한 재-REP로부터의 CD8+ TIL에서 LAG3 발현의 대략 30% 감소가 해동된 TIL 생성물에 비해 관찰되었다. 신선한 및 해동된 TIL 둘 다는 보통의 증가를 나타내는 해동된 TIL과 필적하였다. (이 도면에서, M1061T, M1062T 및 M1064T는 LAG3 발현이 신선한 또는 신선한 재-REP TIL 샘플에서 측정되지 않았기 때문에 생략되었다.)

도 57a 내지 57b: CD4+TIM-3+ 세포. a) PD-1 및 LAG3의 경우에서 이전에 관찰된 바와 같이, TIM-3 발현의 감소가 해동된 재REP TIL에 비해 신선한 재REP TIL에서 나타났다. 이와 무관하게, 신선한 및 해동된 재REP TIL 사이에 유의한 차이는 존재하지 않았다 ($p = 0.2007$). b) TIM-3 발현의 주요한 변화는 신선한, 해동된 및 해동된 재REP TIL 생성물 중에서 관찰되지 않았다. TIM-3 발현의 9.2%의 보통의 감소가 해동된 재REP 생성물에 비해 신선한 재REP TIL에서 관찰되었다.

도 58a 내지 58b: CD8+TIM-3+ 세포. a) CD4+ 집단에서 나타난 TIM-3 발현의 유사한 경향이 또한 CD8+ TIL에서 나타났다. 신선한 재-REP TIL은 낮은 TIM-3 발현을 갖는 가장 적은 고갈된 표현형을 가졌으며, 이는 해동된 재-REP TIL에 비해 유의한 차이를 나타낸다 ($p = 0.0147$). PD-1, LAG3 및 TIM-3의 비교는 신선한 재-REP TIL이 증가된 CM 표현형을 갖는 덜 고갈성 표현형을 가졌음을 시사한다. b) 해동된 재-REP TIL 생성물에 비해, 신선한 재-REP TIL은 TIM-3 발현의 유의한 22% 감소를 나타내었다. 신선한 및 해동된 TIL 둘 다는 유사한 TIM-3 발현 패턴을 나타낸다.

도 59: P815 표적 세포주에 대한 TIL의 세포독성 잠재성.

도 60a 내지 60f: 신선한 TIL, 신선한 재-REP TIL, 및 해동된 재-REP TIL의 대사 호흡 프로파일. 기저 (Basal) OCR (a), 명시적 (Overt) SRC (b), SRC2DG (c), 은신 (Covert) SRC (d), 기저 ECAR (e), 및 당분해 예비력 (Glycolytic Reserve) (f).

도 61a 내지 61b: 유동-FISH 기술을 사용하여 9가지 사후-REP 프로세스 2A 해동된 TIL 생성물에서 텔로미어 반복부의 평균 길이를 측정하였다. a) 데이터는 TIL을 1301 세포와 비교하는 qPCR에 의해 측정된 텔로미어 길이를 나타낸다. b) 데이터는 1301 세포에 비해 TIL의 유동 피쉬 (Flow Fish) 검정에 의해 측정된 텔로미어 길이를 나타낸다. 그래프에 사용된 데이터는 부록 섹션 10에서 표 형식 (표 25)으로 제공된다. 전체적으로, 2가지 텔로미어 길이 검정의 결과의 패턴에서 대략적 유사성이 있었지만, 실험은 어느 방법이 TIL의 실제 텔로미어 길이를 보다 정확하게 반영하는 지를 측정하기를 계속할 것이다. 이 기법은 텔로미어 길이 및 TIL 요법에 대한 환자 반응 사이의 관계를 측정하는 장래의 임상적 샘플에 적용될 수 있다.

도 62a 내지 62b: 혈청 무함유 배지 (Serum Free Media) 공급업자 (혈청 대체물)의 선택. 각각의 단편을 G-렉스 24 웰 플레이트의 단일 웰에서 사중으로 배양하였다. 제11일에, REP를 2A 프로세스를 모방하는 10^6개의 공급자를 갖는 4^5개의 TIL을 사용하여 개시하였다. a) 각각의 조건에 대해 제11일 (사전REP)에 기록된 평균 생존 세포 카운트를 나타내는 막대 그래프. b) 제22일 (사후REP)에 기록된 평균 생존 세포 카운트를 나타내는 막대 그래프. P 값을 스튜던트 't' 검정을 사용하여 계산하였다. 각각 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

도 63a 내지 63b: 혈청 무함유 배지 공급업자 (혈소판 용해물 혈청)의 선택. 각각의 단편을 G-렉스 24 웰 플레이트의 단일 웰에서 삼중으로 배양하였다. 제11일에, REP를 2A 프로세스를 모방하는 10e6개의 공급자를 갖는 4e5개의 TIL을 사용하여 개시하였다. a) 각각의 조건에 대해 제11일 (사전REP)에 기록된 평균 생존 세포 카운트를 나타내는 막대 그래프. b) 제22일 (사후REP)에 기록된 평균 생존 세포 카운트를 나타내는 막대 그래프.

P 값을 스튜던트 't' 검정을 사용하여 계산하였다. 각각 * P <0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. '#' 충분하지 않은 종양 단편.

도 64a 내지 64b: CTS 옵티마이저 (CTS Optimizer)의 효능을 미니 스케일 2A 프로세스 (G-렉스 5M)를 사용한 표준 조건과 비교한다. 2개의 단편 / G-렉스 5M을 삼중으로 배양하고, REP를 2A 프로세스를 모방하는 50^{6}개의 공급자를 갖는 2^{6}개의 TIL을 사용하여 개시하였다. 상기 제시된 막대는 제11일 (a) 또는 제22일 (b)에 얻어진 평균 생존 세포 카운트였다.

도 65a 내지 65c: 표준 조건 및 CTS 옵티마이저를 비교하는 추정된 사전 및 사후 TIL 확장의 요약. a) 사전 REP. b) 사후REP. c) 전체 스케일 실행에 대해 추정된 TIL 확장의 요약 (표준 대 CTS 옵티마이저 +SR).

도 66: CD8+를 살아있는 세포에 대해 게이팅하였다. 9가지 종양 중 7가지는 CTS+SR 조건을 갖는 절대 CD8+ 집단의 증가를 나타낸다.

도 67: 인터페론-감마 비교가능성. 인터페론-감마 ELISA (콴티킨 (Quantikine)). IFN-γ의 생산을 알앤디 시스템즈 (R&D systems)에 의한 콴티킨 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다. CTS+SR은 본 발명자들의 표준 조건과 비교할 경우 필적하는 양의 IFN-γ를 생산하였다.

도 68: 급속 확장 프로토콜 (Rapid Expansion Protocol) (REP)의 예시적인 실시양태에 대한 개략도. 도착 시, 종양을 단편화하고, 11일 동안 TIL 확장 (사전-REP 확장)을 위해 IL-2를 갖는 G-렉스 플라스크 내로 정치한다. 삼중 칵테일 연구를 위해, IL-2/IL-15/IL-21을 사전-REP의 개시 시에 첨가한다. 급속 확장 프로토콜 (REP)을 위해, TIL을 추가의 11일 동안 REP 확장을 위해 공급자 및 OKT3과 함께 배양한다.

도 69: 흑색종 (n=4), 및 폐 (n=7)로부터 유래된 TIL을 사전-REP 후 유동 세포측정법을 사용하여 CD4+ 및 CD8+ 세포에 대해 표현형적으로 평가하였다. *P-값은 스튜던트 독립표본 t 검정을 사용한 CD8+ 세포에서의 IL-2 및 IL-12/IL-15/IL-21 사이의 차이를 나타낸다.

도 70: 흑색종 (n=4), 및 폐 (n=7)로부터 유래된 TIL을 사전-REP 후 유동 세포측정법을 사용하여 CD4+ 및 CD8+ 세포에서 CD27+ 및 CD28+에 대해 표현형적으로 평가하였다.

도 71a 내지 71b: TIL을 흑색종 (n=4) (a) 및 폐 (n=8) (b)에서 CD8+ 세포 및 CD4+ (데이터는 나타내지 않음)에서 이펙터/기억 하위세트 (CD45RA 및 CCR7)에 대해 표현형적으로 평가하였다. CXCR3 발현을 흑색종 및 폐에서 평가하였다. 모든 표현형적 발현을 사전-REP 후 유동 세포측정법을 사용하여 평가하였다. TCM=중심 기억, TSCM= 줄기 세포 기억, TEMRA (이펙터 T 세포), TEM=이펙터 기억.

도 72a 내지 72c: (a) 흑색종 (n=4) 및 (b) 폐 (n=5)로부터 유래된 TIL을 유동 세포측정법에 의해 CD4+ 및 CD8+ 세포에서 4시간 동안 PMA 자극에 반응하는 CD107a+ 발현에 대해 평가하였다. (c) 사전-REP TIL (n=5)을 가용성 OKT3 (30 ng/ml)으로 24시간 동안 자극하고, 상청액을 ELISA에 의해 IFNγ에 대해 평가하였다.

도 73a 내지 73b: TCRvβ 레퍼토리 (24가지 특이성)를 유동 세포측정법을 위한 베크만 쿨터 (Beckman Coulter) 키트를 사용하여 흑색종 (a) 및 폐 (b)로부터 유래된 TIL에서 평가하였다.

도 74: 냉동보존된 TIL 예시적인 제조 프로세스 (약 22일).

도 75a 내지 75b: 제22일에, 부피 감소된 세포 생성물을 풀링하고, 샘플링하여 세척 및 제형화 전에 배양 성능을 측정한다. 샘플을 이전에 기재된 바와 같이 NC-200 자동화 세포 카운터 상에서 분석한다. 총 생존 세포 밀도를 4개의 독립적 샘플로부터 이중 카운트의 전체 평균에 의해 측정한다. 2세대 (Generation 2) (Gen 2) 프로세스는 1세대 (Generation 1) (Gen 1)와 유사한 용량의 TIL 생성물을 생성한다 (Gen 1 평균 = 4.10×10^{10}개 ± 2.92×10^{10}, Gen 2 평균 = 3.12×10^{10} ± 2.19×10^{10}개). b) 배수 확장을 초기 생존 TIL 시딩 밀도에 비한 최종 생존 세포 밀도의 몫으로서의 REP 단계에 대해 계산한다. Gen 2 TIL 생성물은 Gen 1에 비해 더 낮은 배수 확장을 갖는다 (Gen 1 평균 =1.40×10^{3} ± 9.86×10^{2}개, Gen 2 평균 = 5.11×10^{2} ± 2.95×10^{2}개).

도 76: 신선한 제형화된 약물 생성물을 방출을 위한 유동 세포측정법에 의해 정체성에 대해 검정하였다. Gen 1 및 Gen 2 프로세스는 CD45, CD3 이중 양성 표현형에 의해 정의된 바와 같은 고 순도 T-세포 배양물을 생성한다 (Gen1 # ± SD, Gen 2 # ± SD). P-값을 만-휘트니 (Mann-Whitney) 't' 검정을 사용하여 계산하였다.

도 77: 제형화된 약물 생성물의 냉동 보존된 위성 바이알을 해동시키고, 이전에 기재된 바와 같이 유동 세포측정법에 의해 연장된 표현형에 대해 검정하였다. Gen 1 및 Gen 2 생성물은 유사한 비의 CD8 대 CD4 T-세포 하위유형을 발현한다. P-값을 만-휘트니 't' 검정을 사용하여 계산하였다.

도 78: 제형화된 약물 생성물의 냉동 보존된 위성 바이알을 해동시키고, 이전에 기재된 바와 같이 유동 세포측정법에 의해 연장된 표현형에 대해 검정하였다. Gen 1 및 Gen 2 생성물은 T-세포 하위세트 상에 유사한 수준의 공동자극성 분자 CD27 및 CD28을 발현한다. P 값을 만-휘트니 't' 검정을 사용하여 계산하였다. 공동자극성 분자, 예컨대 CD27 및 CD28은 T-세포 수용체 진입 시 이펙터 세포 증식에 필요한 2차 및 3차 신호화를 공급하는 데 요구된다.

도 79: 유동-FISH 기술을 사용하여 이전에 기재된 바와 같이 텔로미어 반복부의 평균 길이를 측정하였다. 상기 RTL 값은 Gen 1 (프로세스 1C의 실시양태)에서의 염색체/게놈 당 평균 텔로미어 형광이 # % ± SD%이고, Gen 2가 대조군 세포주 (1301 백혈병 세포주)에서의 염색체/게놈 당 텔로미어 형광의 #% ± SD%임을 지시한다. 데이터는 Gen 2 생성물이 평균적으로 Gen 1 생성물과 적어도 필적하는 텔로미어 길이를 가짐을 지시한다. 텔로미어 길이는 생체외 세포 배양물의 길이의 대리 척도이다.

도 80: Gen 2 (프로세스 2A의 실시양태) 약물 생성물은 Gen 1 약물 생성물에 비해 IFN-γ를 생산하는 증가된 능력을 나타낸다. 재활성화되고, 시토카인을 분비하는 약물 생성물의 능력은 HLA의 맥락에서 동족 항원에의 TCR 결합 시 생체내 기능의 대리 척도이다.

도 81: T-세포 수용체 다양성: Gen 1 (프로세스 1C의 실시양태) 및 Gen 2 (프로세스 2A의 실시양태) 약물 생성물로부터의 10×10^6개의 TIL로부터의 RNA를 검정하여 각각의 생성물에 존재하는 고유한 CDR3 서열의 총 수 및 빈도를 측정하였다. a) 각각의 생성물에 존재하는 고유한 CDR3 서열의 총 수 (Gen 1 n=#, 평균 ± SD, Gen 2 n =#, 평균 ± SD). b) 고유한 CDR3 서열을 각각의 생성물에서의 빈도에 대해 인덱싱하여 생성물에서의 T-세포 수용체의 상대적 다양성을 대표하는 점수를 수득하였다. 둘 다의 프로세스로부터의 TIL 생성물은 상이한 항원 특이성 및 결합력을 갖는 T-세포의 폴리클로날 집단으로 구성된다. 총 T-세포 레퍼토리의 폭은 종양 세포 상의 작용가능한 에피토프의 수의 지표일 수 있다.

도 82: 프로세스 2A의 실시양태, TIL 제조를 위한 22-일 프로세스의 도해를 나타낸다.

도 83: 프로세스 1C 및 프로세스 2A의 예시적인 실시양태로부터의 단계 A 내지 F의 비교 표.

도 84: 프로세스 1C의 실시양태 및 프로세스 2A의 실시양태의 상세한 비교.

도 85: TIL 요법 프로세스의 실시양태의 상세한 개략도.

도 86a 내지 86c: 10-색상 유동 세포측정법 검정을 사용한 TIL 생성물의 표현형적 특징규명. (a) T-세포 및 비-T-세포 하위세트의 백분율은 각각 $CD45^+CD3^+$ 및 CD45-(비-림프구)/$CD45^+CD3^-$ (비-T-세포 림프구)에 의해 정의된다. 전체적으로, 시험된 TIL 생성물의 >99%는 T-세포 ($CD45^+CD3^+$)로 이루어졌다. TIL 생성물의 평균이 나타내어진다 (n=10). (b) $CD45^+CD3^+CD8^+$ (청색 비어있는 원) 및 $CD45^+CD3^+CD4^+$ (분홍색 비어있는 원)를 포함하는 2가지 T-세포 하위세트의 백분율. 둘 다의 하위세트의 백분율의 통계적 차이는 스튜던트 독립표본 T 검정을 사용하여 관찰되지 않는다 (P=0.68). (c) 비-T-세포 집단을 1) 비-림프구 ($CD45^-$), 2) NK 세포 ($CD45^+CD3^-CD16^+/56^+$), 3) B-세포 ($CD45^+CD19^+$), 및 4) 비-NK/B-세포 ($CD45^+CD3^-CD16^-CD56^-CD19^-$)를 포함하는 4가지 상이한 하위세트에 대해 특징규명하였다.

도 87a 내지 87b: CD45+CD3+CD4+ 및 CD45+CD3+CD8+ 세포 집단에서의 T-세포 하위세트의 특징규명. 나이브, 중심 기억 (TCM), 이펙터 기억 (TEF), 및 이펙터 기억 RA+(EMRA) T-세포 하위세트를 CD45RA 및 CCR7을 사용하여 정의하였다. 도면은 CD4+ (a), 및 CD8+ (b) 세포 집단 둘 다에서의 10가지 최종 TIL 생성물로부터의 대표적인 T-세포 하위세트를 나타낸다. 이펙터 기억 T-세포 하위세트 (청색 비어있는 원)는 TIL 최종 생성물의 CD4+ 및 CD8+ 하위세트 둘 다에서의 주요한 집단 (>93%)이다. TIL 생성물 세포의 7% 미만은 중심 기억 하위세트 (분홍색 비어있는 원)이다. EMRA (회색 비어있는 원) 및 나이브 (흑색 비어있는 원) 하위세트는 TIL 생성물에서 거의 검출되지 않는다 (<0.02%). p 값은 스튜던트 독립표본 t 검정을 사용한 EM 및 CM 사이의 차이를 나타낸다.

도 88a 내지 88b: 흑색종 종양 세포에서의 MCSP 및 EpCAM 발현의 검출. 흑색종 종양 세포주 (WM35, 526, 및

888), 환자-유래된 흑색종 세포주 (1028, 1032, 및 1041), 및 결장직장 선암종 세포주 (음성 대조군으로서 HT29)를 MCSP (흑색종-연관된 콘드로이틴 술페이트 프로테오글리칸) 및 EpCAM (상피 세포 부착 분자) 마커에 대해 염색함으로써 특징규명하였다. (a) 흑색종 종양 세포의 평균 90%는 MCSP를 발현한다. (b) EpCAM 발현은 양성 대조군 HT29, EpCAM+ 종양 세포주에 비해 흑색종 종양 세포주에서 검출되지 않았다.

도 89a 내지 89b: 종양 검출 정확도의 측정을 위한 스파이킹 대조군의 검출. 검정을 공지된 양의 종양 세포를 PBMC 현탁액 (n=10) 내로 스파이킹함으로써 수행하였다. MCSP+526 흑색종 종양 세포를 1:10, 1:100, 및 1:1,000의 비로 희석한 후, PBMC와 혼합하고, 항-MCSP 및 항-CD45 항체 및 살아있는/죽은 염료로 염색하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. (a) 대략 3000개, 300개, 및 30개의 세포를 각각 1:10, 1:100, 및 1:1000의 희석에서 검출하였다. (b) 각각의 조건에서 획득된 세포의 평균 (AV) 및 표준 편차 (SD)를 사용하여 참조 상한 및 하한을 정의하였다.

도 90a 내지 90b: 스파이킹 대조군에서의 상한 및 하한의 반복성 연구. 3회의 독립적 실험을 삼중으로 수행하여 스파이킹 검정의 반복성을 측정하였다. (a) $MCSP^+$ 검출된 종양 세포의 수는 일관되게 참조 상한 및 하한의 범위 내에 있었다. (b) 선형 회귀 플롯은 $MCSP^+$ 세포 및 스파이킹 희석액 사이의 상관관계를 입증하며 (R^2=0.99), 흑색 실선은 최량 적합을 나타낸다. 녹색 및 회색 파선은 각각 표준 곡선 및 샘플에서의 95% 예측 한계를 나타낸다 (Exp#1 내지 3).

도 91a 내지 91b: TIL 생성물에서의 잔류의 흑색종 종양의 검출. TIL 생성물을 개발된 검정을 사용하여 잔류의 종양 오염에 대해 평가하였다 (n=15). (a 및 b) 검출가능한 MCSP+ 사건의 중위 수 및 백분율은 각각 2 및 0.0002%였다.

도 92: T-세포 활성화 후의 TIL 생성물의 효능 평가. TIL 생성물에서의 항-CD3/CD28/CD137로의 재-자극 후의 IFNɣ 분비를 ELISA에 의해 이중으로 평가하였다 (n=5). TIL 생성물에 의한 IFNɣ 분비는 윌콕슨 (Wilcoxon) 부호 순위 검정을 사용하여 비자극된 대조군보다 유의하게 더 컸으며 (P=0.02), 일관되게 >1000 pg/ml이었다. IFNɣ 분비 >200 pg/ml는 강력한 것으로 간주된다. p 값 <0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주된다.

도 93: 냉동보존된 TIL 제조 프로세스 (22일)의 실시양태의 묘사.

도 94: Gen 1에서 Gen 2로의 프로세스 개선의 표.

도 95a 내지 95c: 총 생존 세포, 성장 속도, 및 생존력. 제22일에, 부피 감소된 세포 생성물을 풀링하고, 샘플링하여 세척 및 제형화 전에 배양 성능을 측정한다. (a) 샘플을 이전에 기재된 바와 같이 NC-200 자동화 세포 카운터 상에서 분석한다. 총 생존 세포 밀도를 4개의 독립적 샘플로부터의 이중 카운트의 전체 평균에 의해 측정한다. Gen 2 프로세스는 Gen 1과 유사한 용량의 TIL 생성물을 생성한다 (Gen 1 평균 = 4.10×10^{10} ± 2.8×10^{10}개, Gen 2 평균 = 4.12×10^{10} ± 2.5×10^{10}개). (b) 성장 속도를 $gr = ln(N(t)/N(0))/t$로서 REP 단계에 대해 계산한다. (c) 세포 생존력을 이전에 기재된 바와 같이 셀로미터 (Cellometer) K2를 사용하여 9개의 프로세스 발달 로트로부터 평가하였다. 세포 생존력의 유의한 감소는 제형화된 생성물의 단일 동결-해동 사이클 후에 관찰되지 않았다. 해동 및 샘플링 시의 생존력의 평균 감소는 2.19%이다.

도 96a 내지 96c: Gen 2 생성물은 Gen 1과 필적하는 수준으로 공동자극성 분자를 발현하는 매우 순수한 T-세포 배양물이다. (a) 신선한 제형화된 약물 생성물을 방출을 위한 유동 세포측정법에 의해 정체성에 대해 검정하였다. Gen 1 및 Gen 2 프로세스는 CD45+,CD3+ (이중 양성) 표현형에 의해 정의된 바와 같은 고 순도 T-세포 배양물을 생성한다. (b 및 c) 제형화된 약물 생성물의 냉동보존된 위성 바이알을 해동시키고, 이전에 기재된 바와 같이 유동 세포측정법에 의해 연장된 표현형에 대해 검정하였다. Gen 1 및 Gen 2 생성물은 T-세포 하위세트 상에 유사한 수준의 공동자극성 분자 CD27 및 CD28을 발현한다. 공동자극성 분자, 예컨대 CD27 및 CD28은 T-세포 수용체 진입 시 이펙터 세포 증식에 필요한 2차 및 3차 신호화를 공급하는 데 요구된다. P-값을 만-휘트니 't' 검정을 사용하여 계산하였다.

도 97: Gen 2 생성물은 유사한 텔로미어 길이를 나타낸다. 그러나, 일부 TIL 집단은 보다 긴 상대적 텔로미어에 대한 경향성이 있을 수 있다.

도 98: Gen 2 약물 생성물은 CD3, CD28, 및 CD137 진입에 반응하여 IFNɣ를 분비한다.

도 99a 내지 99b: T-세포 수용체 다양성. (a) 고유한 CDR3 서열을 각각의 생성물에서의 빈도에 대해 인덱싱하

여 생성물에서의 T-세포 수용체의 전체적인 다양성을 대표하는 점수를 수득하였다. (b) 각각의 주입 생성물에 존재하는 고유한 CDR3 서열의 평균 총 수.

도 100: 본 발명의 TIL 제조 프로세스의 실시양태.

도 101: 다수의 종양 조직학에서의 IL-2/IL-15/IL-21로의 사전-REP 동안의 확장의 향상.

도 102a 내지 102b: IL-2/IL-15/IL-21은 폐 암종에서 CD8+ 세포의 백분율을 향상시켰지만, 흑색종에서는 그렇지 않았다. (a) 흑색종 (n=4), 및 (b) 폐 (n=7)로부터 유래된 TIL을 사전-REP 후 유동 세포측정법을 사용하여 CD4+ 및 CD8+ 세포에 대해 표현형적으로 평가하였다.

도 103a 내지 103b: CD27의 발현은 IL-2/IL-15/IL-21로 처리된 배양물에서 CD8+ 세포에서 약간 향상되었다. (a) 흑색종 (n=4), 및 (b) 폐 (n=7)로부터 유래된 TIL을 사전-REP 후 유동 세포측정법을 사용하여 CD4+ 및 CD8+ 세포에서 CD27+ 및 CD28+에 대해 표현형적으로 평가하였다.

도 104a 내지 104b: T 세포 하위세트는 IL-15/IL-21의 첨가로 변경되지 않았다. TIL을 사전-REP 후 유동 세포측정법을 통해 (a) 흑색종 (n=4), 및 (b) 폐 (n=8)로부터의 CD8+ 및 CD4+ (데이터는 나타내지 않음) 세포에서 이펙터/기억 하위세트 (CD45RA 및 CCR7)에 대해 표현형적으로 평가하였다.

도 105a 내지 105c: TIL의 기능적 용량은 IL-2/IL-15/IL-21로 차등적으로 향상되었다. (a) 흑색종 (n=4) 및 (b) 폐 (n=5)로부터 유래된 TIL을 유동 세포측정법에 의해 CD4+ 및 CD8+ 세포에서 4시간 동안 PMA 자극에 반응하는 CD107a+ 발현에 대해 평가하였다. (c) 흑색종 및 폐로부터 유래된 사전-REP TIL을 가용성 항-CD3 항체로 24시간 동안 자극하고, 상청액을 ELISA에 의해 IFNɣ에 대해 평가하였다.

도 106a 내지 106b: TCRvβ 레퍼토리 (24가지 특이성)를 유동 세포측정법을 위한 베크만 쿨터 키트를 사용하여 (a) 흑색종 및 (b) 폐 종양으로부터 유래된 TIL에서 평가하였다.

도 107: Gen 2 냉동보존된 LN-144 제조 프로세스의 개략도.

도 108: 전이성 흑색종을 갖는 환자에게 투여된 신규한 냉동보존된 TIL의 다기관 2상 임상 시험의 연구 설계의 개략도.

도 109: 코호트 1 (ASCO 2017) 대 코호트 2로부터의 비교 환자 특징을 예시하는 표.

도 110: 치료 긴급 유해 사건 (≥30%)을 예시하는 표.

도 111: 주입 생성물 및 TIL 요법의 효능.

도 112: SD 또는 보다 양호한 반응을 갖는 반응 평가가능한 환자의 임상적 상태.

도 113: 직경의 합계의 퍼센트 변화.

도 114: HMGB1 수준의 증가가 TIL 치료 시 관찰되었다.

도 115: 바이오마커 IL-10의 증가가 LN-144 주입 후 관찰되었다.

도 116: 제2 데이터 컷으로부터의 전이성 흑색종에서의 2상 임상 시험의 코호트 2에 대한 갱신된 환자 특징 (N = 17 환자).

도 117: 제2 데이터 컷으로부터의 코호트 2에 대한 치료 긴급 유해 사건 (≥30%) (N = 17 환자).

도 118: 제2 데이터 컷으로부터의 코호트 2에서의 평가가능한 환자 (안정한 질환 또는 보다 양호)에 대한 반응까지의 시간 (N = 17 환자). 효능 세트에서의 10명의 환자 중에서, 1명의 환자 (환자 10)는 도면에 제시되지 않은 제1 종양 평가 전의 흑색종-관련된 사망으로 인해 평가가능하지 않았다.

도 119: 제2 데이터 컷으로부터의 코호트 2에 대한 갱신된 효능 데이터 (N = 17 환자). 주입된 TIL의 평균 수는 34×10^9개이다. 사전 요법의 중위 수는 4.5였다. BRAF 돌연변이를 갖는 환자 뿐만 아니라 야생형 BRAF를 갖는 환자는 반응하였다 (*는 BRAF 돌연변이를 갖는 환자를 지칭함). 1명의 환자 (환자 10)는 제1 종양 평가 전의 흑색종-관련된 사망으로 인해 평가가능하지 않았지만, 여전히 효능 세트에 있는 것으로 간주되었다. 약어: PR, 부분적 반응; SD, 안정한 질환; PD, 진행성 질환.

도 120: 제2 데이터 컷으로부터의 코호트 2로부터의 평가가능한 환자에 대한 갱신된 효능 데이터 (N = 17 환

자). *는 제1 평가에 도달하지 않은 비-평가가능한 환자를 지시한다. 모든 효능-평가가능한 환자는 사전 항-PD-1 및 항-CTLA-4 검사점 억제제 요법을 받았다.

도 121: 코호트 2, 제2 데이터 컷으로부터의 PR을 갖는 환자 (003-015)의 대표적인 컴퓨터 단층촬영 스캔.

도 122: 주입 전의 TIL 생성물에 의한 IFN-γ 유도와 TIL 주입 후 제42일에 종양 크기의 임상적 감소의 상관관계.

도 123: Gen 2 TIL 생성물의 실시양태의 주입전 및 주입후 IP-10 (CXCL10) 수준 (pg/mL, $\log_{10}$). IP-10은 세포 부착 및 귀소의 마커이다.

도 124: Gen 1 TIL 생성물의 실시양태의 주입전 및 주입후 IP-10 (CXCL10) 수준 (pg/mL, $\log_{10}$).

도 125: Gen 2 TIL 생성물의 실시양태의 주입전 및 주입후 MCP-1 수준 (pg/mL, $\log_{10}$). MCP-1은 세포 부착 및 귀소의 마커이다.

도 126: Gen 1 TIL 생성물의 실시양태의 주입전 및 주입후 MCP-1 수준 (pg/mL, $\log_{10}$).

도 127: 자궁경부 암종 및 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC)에서의 2상 연구로부터의 데이터. SD = 안정한 질환. PR = 진행성 질환. PR = 부분적 반응.

서열 목록의 간단한 설명

서열식별번호 (SEQ ID NO): 1은 무로모납의 중쇄의 아미노산 서열이다.

서열식별번호: 2는 무로모납의 경쇄의 아미노산 서열이다.

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

서열식별번호: 4는 알데스루킨의 아미노산 서열이다.

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

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

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

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

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0135] **발명의 상세한 설명**

[0136] **I. 도입**

[0137] 급속 확장 프로토콜 (REP)에 의해 생체외에서 배양된 TIL을 이용한 입양 세포 요법은 흑색종을 갖는 환자에서 숙주 면역억제 후 성공적인 입양 세포 요법을 생성하였다. 현재의 주입 허용 파라미터는 TIL의 조성 (예를 들어, CD28, CD8, 또는 CD4 양성)의 판독 및 REP 생성물의 확장 및 생존력의 수치적 배수에 의존한다.

[0138] 현재의 REP 프로토콜은 환자 내로 주입될 TIL의 건강에 통찰을 거의 주지 않는다. T 세포는 나이브에서 이펙터 T 세포로의 그들의 성숙의 과정 동안 현저한 대사적 이동을 겪는다 (문헌 [Chang, *et al.*, *Nat. Immunol.* **2016,** *17,* 364] 참조 그 전문이 명백하게 본원에 포함됨, 및 특히 혐기성 및 호기성 대사의 논의 및 마커에 대해). 예를 들어, 나이브 T 세포는 ATP를 생성하기 위해 미토콘드리아 호흡에 의존하는 반면, 성숙한 건강한 이펙터 T 세포, 예컨대 TIL은 매우 당분해적이며, 이는 이들이 증식, 이동, 활성화, 및 항-종양 효능을 요구하는 생체에너지 기질을 제공하는 호기성 당분해에 의존한다.

[0139] 이전의 논문은 전달 전에 TIL에서 당분해를 제한하고, 미토콘드리아 대사를 촉진시키는 것은 당분해에 강하게 의존하고 있는 세포가 대다수의 전달된 세포가 죽는 것을 초래하는 입양 전달 시 영양소 박탈을 겪을 것이기 때문에 바람직하다고 보고한다. 따라서, 관련 기술은 미토콘드리아 대사를 촉진시키는 것이 생체내 장수를 촉진시킬 수 있음을 교시하며, 사실 면역 반응의 유도 전에 당분해의 억제제를 사용하는 것을 시사한다. 문헌 [Chang et al. (Chang, et al., Nat. Immunol. 2016, 17(364)]을 참조한다.

[0140] 본 발명은 또한 일부 실시양태에서 이 대사적 건강의 증가를 평가하고, 정량화하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 당분해의 속도 및 양, 산화적 인산화, 예비 호흡 용량 (SRC), 및 당분해 예비력을 포함하나 이에 제한되지는 않는 대사의 하나 이상의 일반적 평가를 사용하여 TIL 집단의 상대적 건강을 검정하는 방법을 제공한다.

[0141] 더욱이, 본 발명은 또한 일부 실시양태에서 이 대사적 건강의 증가를 평가하고, 정량화하는 방법에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 당분해의 속도 및 양, 산화적 인산화, 예비 호흡 용량 (SRC), 및 당분해 예비력을 포함하나 이에 제한되지는 않는 대사의 하나 이상의 일반적 평가를 사용하여 TIL 집단의 상대적 건강을 검정하는 방법을 제공한다.

[0142] 또한, 임의적인 추가의 평가는 ATP 생산, 미토콘드리아 질량 및 글루코스 흡수를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0143] **II. 정의**

[0144] 달리 정의되지 않는다면, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 이 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 언급된 모든 특허 및 간행물은 그 전문이 참조로 포함된다.

[0145] 용어 "생체내에서"는 대상체의 신체에서 일어나는 사건을 지칭한다.

[0146] 용어 "시험관내에서"는 대상체의 신체 외부에서 일어나는 사건을 지칭한다. 시험관내 검정은 살아있거나 죽은 세포가 채용되는 세포-기재 검정을 포괄하며, 또한 무손상 세포가 채용되지 않는 무세포 검정을 포괄할 수 있다.

[0147] 용어 "생체외에서"는 대상체의 신체로부터 제거된 세포, 조직 및/또는 기관에 대해 처리하거나 절차를 수행하는 사건을 지칭한다. 적절하게는, 세포, 조직 및/또는 기관은 수술 또는 치료의 방법에서 대상체의 신체로 복귀될 수 있다.

[0148] 용어 "급속 확장"은 1주의 기간에 걸쳐 적어도 약 3배 (또는 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9배), 보다 바람직하게는 1주의 기간에 걸쳐 적어도 약 10배 (또는 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 또는 90배), 또는 가장 바람직하게는 1주의 기간에 걸쳐 적어도 약 100배의 항원-특이적 TIL의 수의 증가를 의미한다. 다수의 급속 확장 프로토콜은 하기에 개요된다.

[0149] 본원에서 "종양 침윤 림프구" 또는 "TIL"이란 대상체의 혈류를 떠났고, 종양 내로 이동된 백혈구로서 원래 얻어진 세포의 집단을 의미한다. TIL은 $CD8^+$ 세포독성 T 세포 (림프구), Th1 및 Th17 $CD4^+$ T 세포, 자연 살해 세포, 수지상 세포 및 M1 대식세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. TIL은 1차 및 2차 TIL 둘 다를 포함한다. "1차 TIL"은 본원에 개요된 바와 같이 환자 조직 샘플로부터 얻어진 것들 (때때로 "신선하게 수확된"으로 지칭됨)이고, "2차 TIL"은 벌크한 TIL 및 확장된 TIL ("REP TIL" 또는 "사후-REP TIL")을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 본원에서 논의된 바와 같이 확장되거나 증식된 임의의 TIL 세포 집단이다. TIL 세포 집단은 유전적으로 변형된 TIL을 포함할 수 있다.

[0150] 본원에서 "세포의 집단" (TIL을 포함함)이란 공통적인 특성을 공유하는 다수의 세포를 의미한다. 일반적으로, 집단은 일반적으로 수에 있어서 1×10^6 내지 1×10^{10}개의 범위이며, 상이한 TIL 집단은 상이한 수를 포함한다. 예를 들어, IL-2의 존재 하에서의 1차 TIL의 초기 성장은 대략 1×10^8개의 세포의 벌크한 TIL의 집단을 발생시킨다. REP 확장은 일반적으로 주입을 위한 1.5×10^9 내지 1.5×10^{10}개의 세포의 집단을 제공하기 위해 수행된다.

[0151] 본원에서 "냉동보존된 TIL"이란 1차, 벌크한, 또는 확장된 (REP TIL) 중 어느 하나인 TIL이 약 -150℃ 내지 -60℃의 범위에서 처리되고, 저장되는 것을 의미한다. 냉동보존을 위한 일반적 방법은 또한 실시예에서를 비롯한 본원의 다른 곳에 기재되어 있다. 명확성을 위해, "냉동보존된 TIL"은 1차 TIL의 공급원으로서 사용될 수 있는 동결된 조직 샘플과는 구별된다.

[0152] 본원에서 "해동된 냉동보존된 TIL"이란 이전에 냉동보존된 후, 세포 배양 온도 또는 TIL이 환자에게 투여될 수 있는 온도를 포함하나 이에 제한되지는 않는 실온 이상으로 복귀되도록 처리된 TIL의 집단을 의미한다.

[0153] TIL은 일반적으로 세포 표면 마커를 사용하여 생화학적으로, 또는 종양을 침윤시키고 치료를 실행하는 그들의

능력에 의해 기능적으로 정의될 수 있다. TIL은 일반적으로 하기 바이오마커 중 1종 이상을 발현함으로써 범주화될 수 있다: CD4, CD8, TCR αβ, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1, 및 CD25. 추가적으로 및 대안적으로, TIL은 환자 내로의 재도입 시 고형 종양을 침윤시키는 그들의 능력에 의해 기능적으로 정의될 수 있다.

[0154] 용어 "냉동보존 배지들" 또는 "냉동보존 배지"는 세포의 냉동보존에 사용될 수 있는 임의의 배지를 지칭한다. 이러한 배지는 7% 내지 10% DMSO를 포함하는 배지를 포함할 수 있다. 예시적인 배지로는 크리오스토르(CryoStor) CS10, 하이퍼써마솔 (Hyperthermasol), 뿐만 아니라 이들의 조합을 들 수 있다. 용어 "CS10"은 스템셀 테크놀로지즈 (Stemcell Technologies)로부터 또는 바이오라이프 솔루션즈 (Biolife Solutions)로부터 얻어진 냉동보존 배지를 지칭한다. CS10 배지는 상표명 "크리오스토르® CS10"에 의해 지칭될 수 있다. CS10 배지는 DMSO를 포함하는 혈청-무함유, 동물 성분-무함유 배지이다.

[0155] 용어 "중심 기억 T 세포"는 인간에서 CD45RO+이고, CCR7 ($CCR7^{hi}$) 및 CD62L ($CD62^{hi}$)을 구성적으로 발현하는 T 세포의 하위세트를 지칭한다. 중심 기억 T 세포의 표면 표현형은 또한 TCR, CD3, CD127 (IL-7R), 및 IL-15R을 포함한다. 중심 기억 T 세포에 대한 전사 인자는 BCL-6, BCL-6B, MBD2, 및 BMI1을 포함한다. 중심 기억 T 세포는 TCR 촉발 후에 이펙터 분자로서 주로 IL-2 및 CD40L을 분비한다. 중심 기억 T 세포는 혈액에서 CD4 구획에 우세하며, 인간에서 림프절 및 편도에 비례적으로 풍부하다.

[0156] 용어 "이펙터 기억 T 세포"는 중심 기억 T 세포와 같이, CD45RO+이지만, CCR7 ($CCR7^{lo}$)의 구성적 발현을 소실하였고, CD62L 발현 ($CD62L^{lo}$)에 대해 이질성이거나 낮은 인간 또는 포유동물 T 세포의 하위세트를 지칭한다. 중심 기억 T 세포의 표면 표현형은 또한 TCR, CD3, CD127 (IL-7R), 및 IL-15R을 포함한다. 중심 기억 T 세포에 대한 전사 인자는 BLIMP1을 포함한다. 이펙터 기억 T 세포는 항원 자극 후, 인터페론-γ, IL-4, 및 IL-5를 비롯한 높은 수준의 염증성 시토카인을 급속하게 분비한다. 이펙터 기억 T 세포는 혈액에서 CD8 구획에 우세하며, 인간에서 폐, 간, 및 장에 비례적으로 풍부하다. CD8+ 이펙터 기억 T 세포는 다량의 퍼포린을 운반한다.

[0157] 용어 "닫힌 계"는 환경 외부에 대해 닫힌 계를 지칭한다. 세포 배양 방법에 적절한 임의의 닫힌 계는 본 발명의 방법으로 채용될 수 있다. 닫힌 계로는 예를 들어, 닫힌 G-용기를 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 종양 절편이 닫힌 계에 첨가되면, 계는 TIL이 환자에게 투여되도록 준비될 때까지 외부 환경에 대해 열리지 않는다.

[0158] 종양을 파괴하는 프로세스를 기재하기 위한 본원에 사용된 바와 같은 용어 "단편화", "단편", 및 "단편화된"은 기계적 단편화 방법, 예컨대 종양을 으깨기, 슬라이스하기, 나누기, 및 세절하기, 뿐만 아니라 종양 조직의 물리적 구조를 파괴하는 임의의 다른 방법을 포함한다.

[0159] 용어 "말초 혈액 단핵 세포" 및 "PBMC"는 림프구 (T 세포, B 세포, NK 세포) 및 단핵구를 비롯한 둥근 핵을 갖는 말초 혈액 세포를 지칭한다. 바람직하게는, 말초 혈액 단핵 세포는 방사선조사된 동종이형 말초 혈액 단핵 세포이다. PBMC는 항원-제시 세포의 유형이다.

[0160] 용어 "항-CD3 항체"는 성숙한 T 세포의 T 세포 항원 수용체에서의 CD3 수용체에 대해 지정된 인간, 인간화, 키메라 또는 뮤린 항체를 비롯한 항체 또는 그의 변이체, 예를 들어, 모노클로날 항체를 지칭한다. 항-CD3 항체는 무로모납으로도 공지된 OKT-3을 포함한다. 항-CD3 항체는 또한 T3 및 CD3ε으로도 지칭되는 UHCT1 클론을 포함한다. 다른 항-CD3 항체로는 예를 들어, 오텔릭시주맙, 테플리주맙, 및 비실리주맙을 들 수 있다.

[0161] 용어 "OKT-3" (본원에서 "OKT3"으로도 지칭됨)은 성숙한 T 세포의 T 세포 항원 수용체에서의 CD3 수용체에 대해 지정된 인간, 인간화, 키메라, 또는 뮤린 항체를 비롯한 모노클로날 항체 또는 그의 바이오시밀러 또는 변이체를 지칭하며, 시판되는 형태, 예컨대 OKT-3 (30 ng/mL, MACS GMP CD3 순수, 밀테니 바이오테크, 인크. (Miltenyi Biotech, Inc.), 미국 캘리포니아주 샌 디에고) 및 무로모납 또는 그의 변이체, 보존적 아미노산 치환, 글리코형, 또는 바이오시밀러를 포함한다. 무로모납의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열은 표 1 (서열식별번호: 1 및 서열식별번호: 2)에 주어진다. OKT-3을 생산할 수 있는 하이브리도마는 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션 (American Type Culture Collection)에 기탁되어 있으며, ATCC 수탁 번호 CRL 8001이 할당되어 있다. OKT-3을 생산할 수 있는 하이브리도마는 또한 유러피안 콜렉션 오브 오텐티케이티드 셀 컬쳐즈 (European Collection of Authenticated Cell Cultures) (ECACC)에 기탁되어 있으며, 카탈로그 번호 86022706으로 할당되어 있다.

[0162] <표 1>

[0163] 무로모납의 아미노산 서열.

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

[0164]

[0165] 용어 "IL-2" (본원에서 "IL2"로도 지칭됨)는 인터루킨-2로 공지된 T 세포 성장 인자를 지칭하며, 인간 및 포유동물 형태, 그의 보존적 아미노산 치환, 글리코형, 바이오시밀러, 및 변이체를 비롯한 IL-2의 모든 형태를 포함한다. IL-2는 예를 들어, 문헌 [Nelson, *J. Immunol.* **2004,** *172,* 3983-88] 및 [Malek, *Annu. Rev. Immunol.* **2008,** *26,* 453-79]에 기재되어 있으며, 이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. 본 발명에 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-2의 아미노산 서열은 표 2 (서열식별번호: 3)에 주어진다. 예를 들어, 용어 IL-2는 IL-2의 인간, 재조합 형태, 예컨대 알데스루킨 (프로루킨 (PROLEUKIN), 단일 사용 바이알 당 2200만 IU에서 다중 공급자로부터 시판됨), 뿐만 아니라 미국 뉴햄프셔주 포츠마우스에 소재하는 셀제닉스, 인크. (CellGenix, Inc.) (셀그로 지엠피 (CELLGRO GMP) 또는 미국 뉴저지주 이스트 브룬스위크에 소재하는 프로스펙-타니 테크노진 리미티드 (ProSpec-Tany TechnoGene Ltd.) (카탈로그 번호 CYT-209-b)에 의해 상업적으로 공급되는 재조합 IL-2의 형태 및 다른 판매자로부터의 다른 상업적 등가물을 포괄한다. 알데스루킨 (데스-알라닐-1, 세린-125 인간 IL-2)은 대략 15 kDa의 분자량을 갖는 IL-2의 비글리코실화된 인간 재조합 형태이다. 본 발명에 사용하기에 적합한 알데스루킨의 아미노산 서열은 표 2 (서열식별번호: 4)에 주어진다. 용어 IL-2는 또한 미국 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코에 소재하는 넥타 테라퓨틱스 (Nektar Therapeutics)로부터 이용가능한 페길화된 IL2 프로드러그 NKTR-214를 비롯한 본원에 기재된 바와 같은 IL-2의 페길화된 형태를 포괄한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 NKTR-214 및 페길화된 IL-2는 미국 특허 출원 공개 제US 2014/0328791 A1호 및 국제 특허 출원 공개 제WO 2012/065086 A1호에 기재되어 있으며, 이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. 본 발명에 사용하기에 적합한 접합된 IL-2의 대안적 형태는 미국 특허 제4,766,106호, 제5,206,344호, 제5,089,261호 및 제4902,502호에 기재되어 있으며, 이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. 본 발명에 사용하기에 적합한 IL-2의 제형은 미국 특허 제6,706,289호에 기재되어 있으며, 그의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0166] <표 2>

[0167] 인터루킨의 아미노산 서열.

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

[0168]

[0169] 용어 "IL-4" (본원에서 "IL4"로도 지칭됨)는 Th2 T 세포에 의해 및 호산구, 호염기구, 및 비만 세포에 의해 생산되는 인터루킨 4로 공지된 시토카인을 지칭한다. IL-4는 나이브 헬퍼 T 세포 (Th0 세포)의 Th2 T 세포로의 분화를 조절한다. Steinke and Borish, *Respir. Res.* **2001,** *2,* 66-70. IL-4에 의한 활성화 시, Th2 T 세포는 후속적으로 양성 피드백 루프에서 추가의 IL-4를 생산한다. IL-4는 또한 B 세포 증식 및 부류 II MHC 발현을 자극하며, B 세포로부터 IgE 및 IgG_1 발현으로의 부류 스위칭을 유도한다. 본 발명에 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-4는 미국 뉴저지주 이스트 브룬스위크에 소재하는 프로스펙-타니 테크노진 리미티드 (카탈로그 번호

CYT-211) 및 미국 매사추세츠주 월텀에 소재하는 써모피셔 사이언티픽, 인크. (ThermoFisher Scientific, Inc.) (인간 IL-15 재조합 단백질, 카탈로그 번호 지브코 (Gibco) CTP0043)를 비롯한 다수의 공급자로부터 시판된다. 본 발명에 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-4의 아미노산 서열은 표 2 (서열식별번호: 5)에 주어진다.

[0170] 용어 "IL-7" (본원에서 "IL7"로도 지칭됨)은 기질 및 상피 세포로부터, 뿐만 아니라 수지상 세포로부터 얻어질 수 있는 인터루킨 7로 공지된 글리코실화된 조직-유래된 시토카인을 지칭한다. Fry and Mackall, *Blood* **2002**, *99*, 3892-904. IL-7은 T 세포의 발달을 자극할 수 있다. IL-7은 IL-7 수용체 알파 및 공통 감마 쇄 수용체로 이루어진 이종이량체인 IL-7 수용체에 결합하며, 이는 흉선 내에서의 T 세포 발달 및 말초부 내에서의 생존에 중요한 일련의 신호이다. 본 발명에 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-7은 미국 뉴저지주 이스트 브룬스위크에 소재하는 프로스펙-타니 테크노진 리미티드 (카탈로그 번호 CYT-254) 및 미국 매사추세츠주 월텀에 소재하는 써모피셔 사이언티픽, 인크. (인간 IL-15 재조합 단백질, 카탈로그 번호 지브코 PHC0071)를 비롯한 다수의 공급자로부터 시판된다. 본 발명에 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-7의 아미노산 서열은 표 2 (서열식별번호: 6)에 주어진다.

[0171] 용어 "IL-15" (본원에서 "IL15"로도 지칭됨)은 인터루킨-15로 공지된 T 세포 성장 인자를 지칭하며, 인간 및 포유동물 형태, 그의 보존적 아미노산 치환, 글리코형, 바이오시밀러, 및 변이체를 비롯한 IL-2의 모든 형태를 포함한다. IL-15는 예를 들어, 문헌 [Fehniger and Caligiuri, *Blood* **2001**, *97*, 14-32]에 기재되어 있으며, 그의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. IL-15는 IL-2와 β 및 γ 신호화 수용체 서브유닛을 공유한다. 재조합 인간 IL-15는 12.8 kDa의 분자 질량을 갖는 114개의 아미노산 (및 N-말단 메티오닌)을 함유하는 단일, 비-글리코실화된 폴리펩티드 쇄이다. 재조합 인간 IL-15는 미국 뉴저지주 이스트 브룬스위크에 소재하는 프로스펙-타니 테크노진 리미티드 (카탈로그 번호 CYT-230-b) 및 미국 매사추세츠주 월텀에 소재하는 써모피셔 사이언티픽, 인크. (인간 IL-15 재조합 단백질, 카탈로그 번호 34-8159-82)를 비롯한 다수의 공급자로부터 시판된다. 본 발명에 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-15의 아미노산 서열은 표 2 (서열식별번호: 7)에 주어진다.

[0172] 용어 "IL-21" (본원에서 "IL21"로도 지칭됨)은 인터루킨-21로 공지된 다면발현성 시토카인 단백질을 지칭하며, 인간 및 포유동물 형태, 그의 보존적 아미노산 치환, 글리코형, 바이오시밀러, 및 변이체를 비롯한 IL-21의 모든 형태를 포함한다. IL-21은 예를 들어, 문헌 [Spolski and Leonard, *Nat. Rev. Drug. Disc.* **2014**, *13*, 379-95]에 기재되어 있으며, 그의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. IL-21은 주로 자연 살해 T 세포 및 활성화된 인간 $CD4^+$ T 세포에 의해 생산된다. 재조합 인간 IL-21은 15.4 kDa의 분자 질량을 갖는 132개의 아미노산을 함유하는 단일, 비-글리코실화된 폴리펩티드 쇄이다. 재조합 인간 IL-21은 미국 뉴저지주 이스트 브룬스위크에 소재하는 프로스펙-타니 테크노진 리미티드 (카탈로그 번호 CYT-408-b) 및 미국 매사추세츠주 월텀에 소재하는 써모피셔 사이언티픽, 인크. (인간 IL-21 재조합 단백질, 카탈로그 번호 14-8219-80)를 비롯한 다수의 공급자로부터 시판된다. 본 발명에 사용하기에 적합한 재조합 인간 IL-21의 아미노산 서열은 표 2 (서열식별번호: 8)에 주어진다.

[0173] "항-종양 유효량", "종양-억제 유효량", 또는 "치료량"이 지시되는 경우, 투여되는 본 발명의 조성물의 정확한 양은 환자 (대상체)의 연령, 중량, 종양 크기, 감염 또는 전이의 정도, 및 상태에 있어서의 개별적 차이를 고려하여 의사에 의해 결정될 수 있다. 일반적으로 본원에 기재된 종양 침윤 림프구 (예를 들어 2차 TIL 또는 유전적으로 변형된 세포독성 림프구)를 포함하는 제약 조성물은 10^4 내지 10^{11}개의 세포/kg 체중 (예를 들어, 10^5 내지 10^6, 10^5 내지 10^{10}, 10^5 내지 10^{11}, 10^6 내지 10^{10}, 10^6 내지 10^{11},10^7 내지 10^{11}, 10^7 내지 10^{10}, 10^8 내지 10^{11}, 10^8 내지 10^{10}, 10^9 내지 10^{11}, 또는 10^9 내지 10^{10}개의 세포/kg 체중)의 투여량 (그들 범위 내의 모든 정수 값을 포함함)으로 투여될 수 있다고 언급될 수 있다. 종양 침윤 림프구 (일부의 경우, 유전적으로 변형된 세포독성 림프구를 포함함) 조성물은 또한 이들 투여량에서 다수회 투여될 수 있다. 종양 침윤 림프구 (일부의 경우, 유전적으로를 포함함)는 면역요법에서 통상적으로 공지된 주입 기법을 사용함으로써 투여될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Rosenberg et al., *New Eng. J. of Med.* 319: 1676, 1988] 참조). 특정 환자에 대한 최적 투여량 및 치료 처방은 환자를 질환의 징후에 대해 모니터링하고, 그에 따라 치료를 조정함으로써 의학의 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0174] 용어 "혈액학적 악성종양"은 혈액, 골수, 림프절, 및 림프계를 포함하나 이에 제한되지는 않는 조혈 및 림프 조직의 포유동물 암 및 종양을 지칭한다. 혈액학적 악성종양은 또한 "액상 종양"으로 지칭된다. 혈액학적 악성종양으로는 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 림프종 (CLL), 소 림프구성 림프종 (SLL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 단핵구성 백혈병 (AMoL), 호지킨 림프종, 및 비-호지킨 림프

종을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 용어 "B 세포 혈액학적 악성종양"은 B 세포에 영향을 미치는 혈액학적 악성종양을 지칭한다.

[0175] 용어 "고형 종양"은 통상적으로 낭종 또는 액상 영역을 함유하지 않는 조직의 비정상적 덩어리를 지칭한다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 용어 "고형 종양 암"은 악성, 신생물성, 또는 암성 고형 종양을 지칭한다. 고형 종양 암으로는 육종, 암종, 및 림프종, 예컨대 폐, 유방, 전립선, 결장, 직장, 및 방광의 암을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 고형 종양의 조직 구조는 실질 (암 세포) 및 암 세포가 분산되고, 지지 미세환경을 제공할 수 있는 지지 기질 세포를 포함하는 상호의존적 조직 구획을 포함한다.

[0176] 용어 "액상 종양"은 자연에서 유체인 세포의 비정상적 덩어리를 지칭한다. 액상 종양 암으로는 백혈병, 골수종, 및 림프종, 뿐만 아니라 다른 혈액학적 악성종양을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 액상 종양으로부터 얻어진 TIL은 또한 본원에서 골수 침윤 림프구 (MIL)로 지칭될 수 있다.

[0177] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "미세환경"은 전체로서의 고형 또는 혈액학적 종양 미세환경 또는 미세환경 내의 세포의 개별적 하위세트를 지칭할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 종양 미세환경은 문헌 [Swartz, *et al.*, *Cancer Res.*, **2012**, *72*, 2473]에 기재된 바와 같이, "신생물성 변형을 촉진시키고, 종양 성장 및 침습을 지지하고, 숙주 면역으로부터 종양을 보호하고, 치료 저항성을 조성하고, 우세한 전이가 번성하는 니치를 제공하는 세포, 가용성 인자, 신호화 분자, 세포외 매트릭스, 및 기계적 신호"의 복합 혼합물을 지칭한다. 종양은 T 세포에 의해 인식되어야 하는 항원을 발현하지만, 면역계에 의한 종양 청소는 미세환경에 의한 면역 억제 때문에 드물다.

[0178] 한 실시양태에서, 본 발명은 환자가 본 발명에 따른 TIL의 주입 전에 비-골수절제 화학요법으로 사전-치료되는, TIL의 집단으로 암을 치료하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 환자가 본 발명에 따른 TIL의 주입 전에 비골수절제 화학요법으로 사전-치료되는 TIL의 집단이 제공될 수 있다. 한 실시양태에서, 비-골수절제 화학요법은 2일 동안 (TIL 주입 전 제27일 및 제26일) 시클로포스파미드 60 mg/kg/일 및 5일 동안 (TIL 주입 전 제27일 내지 제23일) 플루다라빈 25 mg/m2/일이다. 한 실시양태에서, 본 발명에 따른 비-골수절제 화학요법 및 TIL 주입 (제0일에) 후에, 환자는 생리학적 허용시까지 8시간마다 720,000 IU/kg으로 정맥내로 IL-2의 정맥내 주입을 받는다.

[0179] 실험적 발견은 종양-특이적 T 림프구의 입양 전달 전의 림프구고갈이 조절성 T 세포를 제거하고, 면역계의 요소 ("시토카인 싱크")를 경쟁함으로써 치료 효능을 향상시키는 데 있어서 핵심적 역할을 함을 지시한다. 따라서, 본 발명의 일부 실시양태는 본 발명의 rTIL의 도입 전에 환자에 대한 림프구고갈 단계 (때때로 "면역억제 컨디셔닝"으로도 지칭됨)를 이용한다.

[0180] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "공동-투여", "공동-투여하는", "와 조합으로 투여되는", "와 조합으로 투여하는", "동시", 및 "공동"은 둘 다의 활성 제약 성분 및/또는 그들의 대사물이 동시에 대상체에 존재하도록, 대상체에의 2종 이상의 활성 제약 성분 (본 발명의 바람직한 실시양태에서, 예를 들어, 복수의 TIL과 조합으로 적어도 1종의 칼륨 채널 효능제)의 투여를 포괄한다. 공동-투여는 별개의 조성물에서의 동시 투여, 별개의 조성물에서의 상이한 시간에서의 투여, 또는 2종 이상의 활성 제약 성분이 존재하는 조성물에서의 투여를 포함한다. 별개의 조성물에서의 동시 투여 및 둘 다의 작용제가 존재하는 조성물에서의 투여가 바람직하다.

[0181] 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 질환 치료를 포함하나 이에 제한되지는 않는 의도된 적용을 실행하는 데 충분한 본원에 기재된 바와 같은 화합물 또는 화합물의 조합의 양을 지칭한다. 치료 유효량은 의도된 적용 (시험관내 또는 생체내), 또는 치료되는 대상체 및 질환 상태 (예를 들어, 대상체의 중량, 연령 및 성별), 질환 상태의 중증도, 또는 투여의 방식에 따라 다양할 수 있다. 상기 용어는 또한 표적 세포에서의 특정 반응 (예를 들어, 혈소판 부착 및/또는 세포 이동의 감소)을 유도할 용량에 적용된다. 구체적인 용량은 선택된 특정 화합물, 이어지는 투여 처방, 화합물이 다른 화합물과 조합으로 투여되는지 여부, 투여의 시기, 그것이 투여되는 조직, 및 화합물이 운반되는 물리적 전달 시스템에 따라 다양할 것이다.

[0182] 용어 "치료", "치료하는", "치료하다" 등은 바람직한 약리학적 및/또는 생리적 효과를 얻는 것을 지칭한다. 효과는 질환 또는 그의 증상을 완전하게 또는 부분적으로 예방하는 관점에서 예방적일 수 있고/거나, 질환 및/또는 질환에 기인하는 유해 효과에 대한 부분적 또는 완전한 치료의 관점에서 치료적일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "치료"는 포유동물에서, 특히 인간에서 질환의 임의의 치료를 커버하며, (a) 질환에 걸릴 성향이 있을 수 있지만, 그것을 갖는 것으로 아직 진단되지 않은 대상체에서 질환이 발생하는 것을 방지하는 것; (b) 질

환을 억제하는 것, 즉, 그의 발달 또는 진행을 정지시키는 것; 및 (c) 질환을 완화시키는 것, 즉, 질환의 퇴행을 유발하고/거나, 1종 이상의 질환 증상을 완화시키는 것을 포함한다. "치료"는 또한 심지어 질환 또는 상태의 부재 하에서도, 약리학적 효과를 제공하기 위한 작용제의 전달을 포괄하는 것을 의미한다. 예를 들어, "치료"는 질환 상태의 부재 하에서, 예를 들어, 백신의 경우, 면역 반응을 유발하거나, 면역성을 부여할 수 있는 조성물의 전달을 포괄한다.

[0183] 핵산 또는 단백질의 부분에 관하여 사용되는 경우 용어 "이종"은 핵산 또는 단백질이 자연에서 서로에 대해 동일한 관계에서 발견되지 않는 2개 이상의 하위서열을 포함하는 것을 지시한다. 예를 들어, 새로운 기능적 핵산을 제조하도록 배열된 비관련된 유전자로부터의 2개 이상의 서열, 예를 들어, 하나의 공급원으로부터의 프로모터 및 또다른 공급원으로부터의 코딩 영역, 또는 상이한 공급원으로부터의 코딩 영역을 갖는 핵산은 전형적으로 재조합적으로 생성된다. 유사하게, 이종 단백질은 자연에서 서로에 대해 동일한 관계에서 발견되지 않는 2개 이상의 하위서열을 포함하는 단백질 (예를 들어, 융합 단백질)을 지시한다.

[0184] 2개 이상의 핵산 또는 폴리펩티드의 맥락에서 용어 "서열 동일성", "퍼센트 동일성", 및 "서열 퍼센트 동일성" (또는 그의 동의어, 예를 들어, "99% 동일한")은 임의의 보존적 아미노산 치환을 서열 동일성의 일부로서 고려하지 않고, 최대 상응성에 대해 비교하고, 정렬한 경우 (필요에 따라, 갭을 도입함), 동일하거나, 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기의 명시된 백분율을 갖는 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 지칭한다. 퍼센트 동일성은 서열 비교 소프트웨어 또는 알고리듬을 사용하여 또는 육안 검사에 의해 측정될 수 있다. 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열의 정렬을 얻는 데 사용될 수 있는 다양한 알고리듬 및 소프트웨어는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 퍼센트 서열 동일성을 측정하는 적합한 프로그램으로는 예를 들어 미국 정부의 국립 생명공학 정보 센터 (National Center for Biotechnology Information) BLAST 웹 사이트로부터 이용가능한 BLAST 프로그램의 조를 들 수 있다. 2개의 서열 사이의 비교는 BLASTN 또는 BLASTP 알고리듬 중 어느 하나를 사용하여 수행될 수 있다. BLASTN은 핵산 서열을 비교하는 데 사용되는 반면, BLASTP는 아미노산 서열을 비교하는 데 사용된다. ALIGN, ALIGN-2 (제넨테크 (Genentech), 미국 캘리포니아주 사우스 샌 프란시스코) 또는 DNASTAR로부터 이용가능한 멕얼라인 (MegAlign)은 서열을 정렬하는 데 사용될 수 있는 추가의 공개적으로 이용가능한 소프트웨어 프로그램이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 특정 정렬 소프트웨어에 의해 최대 정렬을 위한 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 특정 실시양태에서, 정렬 소프트웨어의 디폴트 파라미터가 사용된다.

[0185] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "변이체"는 참조 항체의 아미노산 서열 내의 또는 그에 인접한 특정 위치에 1개 이상의 치환, 결실 및/또는 부가에 의해 참조 항체의 아미노산 서열과는 상이한 아미노산 서열을 포함하는 항체 또는 융합 단백질을 포괄하나, 이에 제한되지는 않는다. 변이체는 참조 항체의 아미노산 서열에 비해 그의 아미노산 서열에 1개 이상의 보존적 치환을 포함할 수 있다. 보존적 치환은 예를 들어, 유사하게 하전되거나 비하전된 아미노산의 치환을 포함할 수 있다. 변이체는 참조 항체의 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유한다. 용어 변이체는 또한 페길화된 항체 또는 단백질을 포함한다.

[0186] 본원에서 "종양 침윤 림프구" 또는 "TIL"이란 대상체의 혈류를 떠났고, 종양 내로 이동한 백혈구로서 원래 얻어진 세포의 집단을 의미한다. TIL은 $CD8^+$ 세포독성 T 세포 (림프구), Th1 및 Th17 $CD4^+$ T 세포, 자연 살해 세포, 수지상 세포 및 M1 대식세포를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. TIL은 1차 및 2차 TIL 둘 다를 포함한다. "1차 TIL"은 본원에 개요된 바와 같이 환자 조직 샘플로부터 얻어진 것들 (때때로 "신선하게 수확된"으로 지칭됨)이고, "2차 TIL"은 본원에서 논의된 바와 같은 벌크한 TIL 및 확장된 TIL ("REP TIL") 뿐만 아니라 "재REP TIL"을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 본원에서 논의된 바와 같이 확장되거나 증식된 임의의 TIL 세포 집단이다. 재REP TIL은 예를 들어 제2 확장 TIL 또는 제2 추가의 확장 TIL (예컨대, 예를 들어, 재REP TIL로 지칭되는 TIL을 비롯한, 도 27의 단계 D에 기재된 것들)을 포함할 수 있다.

[0187] TIL은 일반적으로 세포 표면 마커를 사용하여 생화학적으로, 또는 종양을 침윤시키고, 치료를 실행하는 그들의 능력에 의해 기능적으로 정의될 수 있다. TIL은 일반적으로 하기 바이오마커 중 1종 이상을 발현함으로써 범주화될 수 있다: CD4, CD8, TCR αβ, CD27, CD28, CD56, CCR7, CD45Ra, CD95, PD-1, 및 CD25. 추가적으로, 및 대안적으로, TIL은 환자 내로 재도입 시 고형 종양을 침윤시키는 그들의 능력에 의해 기능적으로 정의될 수 있다. TIL은 효능에 의해 추가로 특징규명될 수 있다 - 예를 들어, TIL은 예를 들어, 인터페론 (IFN) 방출이 약 50 pg/mL 초과, 약 100 pg/mL 초과, 약 150 pg/mL 초과, 또는 약 200 pg/mL 초과인 경우 강력한 것으로 간주될 수 있다.

[0188] 용어 "제약학적으로 허용되는 담체" 또는 "제약학적으로 허용되는 부형제"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 코팅, 항박테리아제 및 항진균제, 등장성제 및 흡수 지연제, 및 불활성 성분을 포함하는 것으로 의도된다. 활

성 제약 성분을 위한 이러한 제약학적으로 허용되는 담체 또는 제약학적으로 허용되는 부형제의 사용은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 임의의 통상적인 제약학적으로 허용되는 담체 또는 제약학적으로 허용되는 부형제가 활성 제약 성분과 비혼화성인 한을 제외하고는, 본 발명의 치료 조성물에서의 그의 사용은 고려된다. 추가의 활성 제약 성분, 예컨대 다른 약물은 또한 기재된 조성물 및 방법 내로 혼입될 수 있다.

[0189] 용어 "약" 및 "대략"은 값의 통계적으로 유의미한 범위 내를 의미한다. 이러한 범위는 주어진 값 또는 범위의 자릿수 내, 바람직하게는 50% 내, 보다 바람직하게는 20% 내, 보다 바람직하게는 여전히 10% 내, 보다 더 바람직하게는 5% 내일 수 있다. 용어 "약" 또는 "대략"에 의해 포괄되는 허용가능한 변이는 연구 하의 특정 계에 의존하며, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 이해될 수 있다. 더욱이, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약" 및 "대략"은 치수, 크기, 제형, 파라미터, 형상 및 다른 양 및 특징이 정확하지 않고, 정확할 필요가 없지만, 바람직한 경우, 내성, 전환 인자, 라운딩 오프, 측정 오차 등, 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 인자를 반영하는 대략적 및/또는 더 크거나 더 작을 수 있음을 의미한다. 일반적으로, 치수, 크기, 제형, 파라미터, 형상 또는 다른 양 또는 특징은 명백하게 이렇게 언급되든지 그렇지 않든지 "약" 또는 "대략"이다. 매우 상이한 크기, 형상 및 치수의 실시양태는 기재된 배열을 채용할 수 있음이 주목된다.

[0190] 원래 및 보정된 형태로 첨부된 청구범위에 사용되는 경우 전이적 용어 "포함하는", "로 본질적으로 이루어진" 및 "로 이루어진"은 존재하는 경우, 비인용된 추가의 청구항 요소 또는 단계가 청구항(들)의 범위로부터 배제되는 것에 관하여 청구항 범위를 한정한다. 용어 "포함하는"은 포함적 또는 개방-말단인 것으로 의도되며, 임의의 추가의, 비인용된 요소, 방법, 단계 또는 물질을 배제하지 않는다. 용어 "로 이루어진"은 청구항에 명시된 것들 외의 임의의 요소, 단계 또는 물질, 및 후자의 예에서 명시된 물질(들)과 연관된 통상적인 불순물을 배제한다. 용어 "로 본질적으로 이루어진"은 청구항의 범위를 명시된 요소, 단계 또는 물질(들) 및 청구된 발명의 기본적이고 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 것들로 제한한다. 본 발명을 구현하는 본원에 기재된 모든 조성물, 방법, 및 키트는 대안적인 실시양태에서 전이적 용어 "포함하는", "로 본질적으로 이루어진", 및 "로 이루어진" 중 임의의 것에 의해 보다 구체적으로 정의될 수 있다.

[0191] **III. TIL 제조 프로세스**

[0192] 이들 특색 중 일부를 함유하는 프로세스 2A로서 공지된 예시적인 TIL 프로세스를 도 1에 나타내고, 프로세스 1C에 비한 본 발명의 이 실시양태의 이점의 일부를 도 2에 기재하며, 도 84도 마찬가지이다. 프로세스 1C는 도 3에서 비교를 위해 나타낸다. 프로세스 2A에 기초한 TIL 요법에 대한 2가지 대안적인 시각표를 도 4 (보다 높은 세포 카운트) 및 도 5 (보다 낮은 세포 카운트)에 나타낸다. 프로세스 2A의 실시양태를 도 6 뿐만 아니라 도 27에 나타낸다. 도 83 및 84는 예시적인 1C 프로세스에 비해 예시적인 2A 프로세스를 추가로 제공한다.

[0193] 본원에서 논의된 바와 같이, 본 발명은 환자 내로의 이식 전에 그들의 대사적 활성 및 따라서 상대적 건강을 증가시키기 위한 냉동보존된 TIL의 재자극과 관련된 단계, 및 상기 대사적 건강을 시험하는 방법을 포함할 수 있다. 본원에 일반적으로 개요된 바와 같이, TIL은 일반적으로 환자 샘플로부터 취해지며, 환자 내로의 이식 전에 그들의 수를 확장시키도록 조작된다. 일부 실시양태에서, TIL은 하기 논의된 바와 같이 임의로 유전적으로 조작될 수 있다.

[0194] 일부 실시양태에서, TIL은 냉동보존될 수 있다. 일단 해동되면, 이들은 또한 환자 내로의 주입 전에 그들의 대사를 증가시키기 위해 재자극될 수 있다.

[0195] 일부 실시양태에서, 하기 뿐만 아니라 실시예 및 도면에서 상세히 논의된 바와 같이, 제1 확장 (사전REP로 지칭되는 프로세스 뿐만 아니라 도 27에서 단계 A로 나타내어진 프로세스를 포함함)은 3 내지 14일로 단축되고, 제2 확장 (REP로 지칭되는 프로세스 뿐만 아니라 도 27에서 단계 B로 나타내어진 프로세스를 포함함)은 7 내지 14일로 단축된다. 일부 실시양태에서, 실시예에서 논의되고, 도 4, 5 및 27에 나타내어진 바와 같이, 제1 확장 (예를 들어, 도 27에서 단계 B로서 기재된 확장)은 11일로 단축되고, 제2 확장 (예를 들어, 도 27에서 단계 D로서 기재된 확장)은 11일로 단축된다. 일부 실시양태에서, 하기 및 실시예 및 도면에서 상세히 논의된 바와 같이, 제1 확장 및 제2 확장 (예를 들어, 도 27에서 단계 B 및 단계 D로서 기재된 확장)의 조합은 22일로 단축된다.

[0196] 하기 "단계" 명칭 A, B, C 등은 도 27에 관한 및 본원에 기재된 특정 실시양태에 관한 것이다. 하기 및 도 27에서의 단계의 순서는 예시적이며, 단계의 임의의 조합 또는 순서, 뿐만 아니라, 추가의 단계, 단계의 반복, 및/또는 단계의 생략은 본 출원 및 본원에 개시된 방법에 의해 고려된다.

[0197] **A. 단계 A: 환자 종양 샘플을 얻기**

[0198] 일반적으로, TIL은 초기에 환자 종양 샘플로부터 얻어지고 ("1차 TIL"), 그 후 본원에 기재된 바와 같은 추가의

조작을 위해 보다 큰 집단으로 확장되고, 임의로 냉동보존되고, 본원에 개요된 바와 같이 재자극되고, 임의로 TIL 건강의 지표로서 표현형 및 대사적 파라미터에 대해 평가된다.

[0199] 환자 종양 샘플은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여, 일반적으로 외과적 절제, 바늘 생검 또는 종양 및 TIL 세포의 혼합물을 함유하는 샘플을 얻기 위한 다른 수단을 통해 얻어질 수 있다. 일반적으로, 종양 샘플은 1차 종양, 침습성 종양 또는 전이성 종양을 비롯한 임의의 고형 종양으로부터의 것일 수 있다. 종양 샘플은 또한 액상 종양, 예컨대 혈액학적 악성종양으로부터 얻어진 종양일 수 있다. 고형 종양은 유방, 췌장, 전립선, 결장직장, 폐, 뇌, 신장, 위, 및 피부 (편평 세포 암종, 기저 세포 암종, 및 흑색종을 포함하나 이에 제한되지는 않음)를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 암 유형의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, 유용한 TIL은 이들이 TIL의 특히 높은 수준을 갖는 것으로 보고되었기 때문에 악성 흑색종 종양으로부터 얻어진다.

[0200] 용어 "고형 종양"은 통상적으로 낭종 또는 액상 영역을 함유하지 않는 조직의 비정상적 덩어리를 지칭한다. 고형 종양은 양성 또는 악성일 수 있다. 용어 "고형 종양 암"은 악성, 신생물성, 또는 암성 고형 종양을 지칭한다. 고형 종양 암으로는 육종, 암종, 및 림프종, 예컨대 폐, 유방, 삼중 음성 유방암, 전립선, 결장, 직장, 및 방광의 암을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 암은 자궁경부암, 두경부암 (예를 들어, 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC)을 포함함), 교모세포종, 난소암, 육종, 췌장암, 방광암, 유방암, 삼중 음성 유방암, 및 비-소세포 폐 암종으로부터 선택된다. 고형 종양의 조직 구조는 실질 (암 세포) 및 암 세포가 분산되고, 지지 미세환경을 제공할 수 있는 지지 기질 세포를 포함하는 상호의존적 조직 구획을 포함한다.

[0201] 용어 "혈액학적 악성종양"은 혈액, 골수, 림프절, 및 림프계의 조직을 포함하나 이에 제한되지는 않는 조혈 및 림프 조직의 포유동물 암 및 종양을 지칭한다. 혈액학적 악성종양은 또한 "액상 종양"으로 지칭된다. 혈액학적 악성종양으로는 급성 림프모구성 백혈병 (ALL), 만성 림프구성 림프종 (CLL), 소 림프구성 림프종 (SLL), 급성 골수성 백혈병 (AML), 만성 골수성 백혈병 (CML), 급성 단핵구성 백혈병 (AMoL), 호지킨 림프종, 및 비-호지킨 림프종을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 용어 "B 세포 혈액학적 악성종양"은 B 세포에 영향을 미치는 혈액학적 악성종양을 지칭한다.

[0202] 일단 얻어지면, 종양 샘플은 일반적으로 샤프한 절개를 사용하여 1 내지 약 8 mm^3의 작은 조각으로 단편화되며, 약 2 내지 3 mm^3가 특히 유용하다. TIL은 효소적 종양 소화물을 사용하여 이들 단편으로부터 배양된다. 이러한 종양 소화물은 효소적 배지 (예를 들어, 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 (Roswell Park Memorial Institute) (RPMI) 1640 완충제, 2 mM 글루타메이트, 10 mcg/mL 겐타미신, 30 유닛/mL의 DN아제 및 1.0 mg/mL의 콜라게나제)에서의 인큐베이션, 이어서 기계적 해리 (예를 들어, 조직 해리기를 사용하여)에 의해 생성될 수 있다. 종양 소화물은 종양을 효소적 배지에 정치하고, 종양을 대략 1분 동안 기계적으로 해리하고, 이어서 37 ℃에서 5% CO_2에서 30분 동안 인큐베이션하고, 이어서 단지 작은 조직 조각이 존재할 때까지 상기 조건 하에서 기계적 해리 및 인큐베이션의 반복된 사이클을 함으로써 생성될 수 있다. 이 프로세스의 종료 시에, 세포 현탁액이 다수의 적혈구 또는 죽은 세포를 함유하는 경우, 피콜 (FICOLL) 분지형 친수성 다당류를 사용한 밀도 구배 분리를 수행하여 이들 세포를 제거할 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 대안적인 방법, 예컨대 미국 특허 출원 공개 제2012/0244133 A1호에 기재된 것들이 사용될 수 있으며, 그의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. 상기 방법 중 임의의 것은 TIL을 확장시키는 방법 또는 암을 치료하는 방법을 위해 본원에 기재된 실시양태 중 임의의 것에서 사용될 수 있다.

[0203] 일반적으로, 수확된 세포 현탁액은 "1차 세포 집단" 또는 "신선하게 수확된" 세포 집단으로 지칭된다.

[0204] 일부 실시양태에서, 단편화는 예를 들어, 절개 뿐만 아니라 소화를 비롯한 물리적 단편화를 포함한다. 일부 실시양태에서, 단편화는 물리적 단편화이다. 일부 실시양태에서, 단편화는 절개이다. 일부 실시양태에서, 단편화는 소화에 의한 것이다. 일부 실시양태에서, TIL은 초기에 효소적 종양 소화물 및 환자로부터 얻어진 종양 단편으로부터 배양될 수 있다. 한 실시양태에서, TIL은 초기에 효소적 종양 소화물 및 환자로부터 얻어진 종양 단편으로부터 배양될 수 있다.

[0205] 일부 실시양태에서, 종양이 고형 종양인 경우, 종양은 종양 샘플이 예를 들어, 단계 A (도 27에서 제공된 바와 같음)에서 얻어진 후에 물리적 단편화를 겪는다. 일부 실시양태에서, 단편화는 냉동보존 전에 일어난다. 일부 실시양태에서, 단편화는 냉동보존 후에 일어난다. 일부 실시양태에서, 단편화는 종양을 얻은 후에 및 임의의 냉동보존의 부재 하에서 일어난다. 일부 실시양태에서, 종양은 단편화되고, 10, 20, 30, 40개 이상의 단편 또는 조각은 제1 확장을 위해 각각의 용기에 정치된다. 일부 실시양태에서, 종양은 단편화되고, 30 또는 40개의 단편 또는 조각은 제1 확장을 위해 각각의 용기에 정치된다. 일부 실시양태에서, 종양은 단편화되고, 40개의

단편 또는 조각은 제1 확장을 위해 각각의 용기에 정치된다. 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 4개 내지 약 50개의 단편을 포함하며, 각각의 단편은 약 27 mm^3의 부피를 갖는다. 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1300 mm^3 내지 약 1500 mm^3의 총 부피를 갖는 약 30개 내지 약 60개의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1350 mm^3의 총 부피를 갖는 약 50개의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1 그램 내지 약 1.5 그램의 총 질량을 갖는 약 50개의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 4개의 단편을 포함한다.

[0206] 일부 실시양태에서, TIL은 종양 단편으로부터 얻어진다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 샤프한 절개에 의해 얻어진다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 1 mm^3 내지 10 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 1 mm^3 내지 8 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 1 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 2 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 3 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 4 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 5 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 6 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 7 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 8 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 9 mm^3이다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 10 mm^3이다.

[0207] 일부 실시양태에서, TIL은 종양 소화물로부터 얻어진다. 일부 실시양태에서, 종양 소화물은 예를 들어 효소 배지, RPMI 1640, 2 mM 글루타맥스 (GlutaMAX), 10 mg/mL 겐타미신, 30 U/mL DN아제, 및 1.0 mg/mL 콜라게나제 (그러나 이에 제한되지는 않음)에서의 인큐베이션, 이어서 기계적 해리 (젠틀맥스 (GentleMACS), 밀테니 바이오테크 (Miltenyi Biotec), 미국 캘리포니아주 오번)에 의해 생성되었다. 종양을 효소 배지에 정치한 후, 종양은 대략 1분 동안 기계적으로 해리될 수 있다. 그 후, 용액을 37 ℃에서 5% CO_2에서 30분 동안 인큐베이션하고, 그 후, 이를 다시 대략 1분 동안 기계적으로 파괴할 수 있다. 37 ℃에서 5% CO_2에서 30분 동안 다시 인큐베이션한 후, 종양을 대략 1분 동안 세번째로 기계적으로 파괴할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제3 기계적 파괴 후, 조직의 큰 조각이 존재한 경우, 1 또는 2회의 추가의 기계적 해리를 37 ℃에서 5% CO_2에서 추가의 30분의 인큐베이션과 함께 또는 없이 샘플에 적용하였다. 일부 실시양태에서, 최종 인큐베이션의 종료 시에, 세포 현탁액이 다수의 적혈구 또는 죽은 세포를 함유한 경우, 피콜을 사용한 밀도 구배 분리를 수행하여 이들 세포를 제거할 수 있다.

[0208] 일부 실시양태에서, 제1 확장 단계 전에 수확된 세포 현탁액은 "1차 세포 집단" 또는 "신선하게 수확된" 세포 집단으로 지칭된다.

[0209] 일부 실시양태에서, 세포를 샘플 수확 후에 임의로 동결하고, 단계 B에 기재된 확장 내로의 도입 전에 동결 저장할 수 있으며, 이는 하기에 더 상세히 기재될 뿐만 아니라 도 27에 예시된다.

[0210] **B. 단계 B: 제1 확장**

[0211] 1. 신생 TIL

[0212] 일부 실시양태에서, 본 방법은 대상체/환자에의 투여 시 증가된 복제 사이클이 가능하며, 따라서, 보다 노령의 TIL (즉, 대상체/환자에의 투여 전에 보다 많은 라운드의 복제를 추가로 겪은 TIL)에 비해 추가의 치료 유익을 제공할 수 있는 신생 TIL을 얻는 것을 제공한다. 신생 TIL의 특색은 문헌, 예를 들어 문헌 [Donia, et al., *Scandinavian Journal of Immunology,* 75:157-167 (2012)]; [Dudley et al., *Clin Cancer Res,* 16:6122-6131 (2010)]; [Huang et al., *J Immunother*, 28(3):258-267 (2005)]; [Besser et al., *Clin Cancer Res*, 19(17):OF1-OF9 (2013)]; [Besser et al., *J Immunother* 32:415-423 (2009)]; [Robbins, et al., *J Immunol* 2004; 173:7125-7130]; [Shen et al., J Immunother, 30:123-129 (2007)]; [Zhou, et al., *J Immunother*, 28:53-62 (2005)]; 및 [Tran, et al., J Immunother, 31:742-751 (2008)]에 기재되었으며, 이들 모두는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0213] T 및 B 림프구의 다양한 항원 수용체는 제한된, 그러나 다수의 유전자 절편의 체세포적 재조합에 의해 생산된다. 이들 유전자 절편: V (가변), D (다양성), J (연결), 및 C (불변)은 이뮤노글로불린 및 T-세포 수용체 (TCR)의 결합 특이성 및 하류 적용을 결정한다. 본 발명은 T-세포 레퍼토리 다양성을 나타내고 증가시키는 TIL을 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 방법에 의해 얻어진 TIL은 T-세포 레퍼토리 다양성의

증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본 방법에 의해 얻어진 TIL은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들과는 다른 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 비해 T-세포 레퍼토리 다양성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본 방법에 의해 얻어진 TIL은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 도 83에 예시된 바와 같은 프로세스 1C로 지칭되는 방법을 사용하여 제조된 TIL에 비해 T-세포 레퍼토리 다양성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 얻어진 TIL은 T-세포 레퍼토리 다양성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 다양성의 증가는 이뮤노글로불린 다양성 및/또는 T-세포 수용체 다양성의 증가이다. 일부 실시양태에서, 다양성은 이뮤노글로불린에 있고, 이뮤노글로불린 중쇄에 있다. 일부 실시양태에서, 다양성은 이뮤노글로불린에 있고, 이뮤노글로불린 경쇄에 있다. 일부 실시양태에서, 다양성은 T-세포 수용체에 있다. 일부 실시양태에서, 다양성은 알파, 베타, 감마, 및 델타 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 T-세포 수용체 중 하나에 있다. 일부 실시양태에서, T-세포 수용체 (TCR) 알파 및/또는 베타의 발현의 증가가 있다. 일부 실시양태에서, T-세포 수용체 (TCR) 알파의 발현의 증가가 있다. 일부 실시양태에서, T-세포 수용체 (TCR) 베타의 발현의 증가가 있다. 일부 실시양태에서, TCRab (즉, TCRα/β)의 발현의 증가가 있다.

[0214] 예를 들어 예컨대 도 27의 단계 A에 기재된 종양 단편의 절개 또는 소화 후, 생성된 세포를 종양 및 다른 세포에 비해 TIL의 성장에 호의적인 조건 하에서 IL-2를 함유하는 혈청에서 배양한다. 일부 실시양태에서, 종양 소화물을 6000 IU/mL의 IL-2를 갖는 불활성화된 인간 AB 혈청을 포함하는 배지에서 2 mL 웰에서 인큐베이션한다. 이 1차 세포 집단을 수 일의 기간, 일반적으로 3 내지 14일 동안 배양하여, 벌크한 TIL 집단, 일반적으로 약 1 × 10^8개의 벌크한 TIL 세포를 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 이 1차 세포 집단을 7 내지 14일의 기간 동안 배양하여, 벌크한 TIL 집단, 일반적으로 약 1 × 10^8개의 벌크한 TIL 세포를 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 이 1차 세포 집단을 10 내지 14일의 기간 동안 배양하여, 벌크한 TIL 집단, 일반적으로 약 1 × 10^8개의 벌크한 TIL 세포를 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 이 1차 세포 집단을 약 11일의 기간 동안 배양하여, 벌크한 TIL 집단, 일반적으로 약 1 × 10^8개의 벌크한 TIL 세포를 발생시킨다.

[0215] 바람직한 실시양태에서, TIL의 확장은 하기 및 본원에 기재된 바와 같은 초기 벌크한 TIL 확장 단계 (예를 들어 예컨대 사전-REP로 지칭되는 프로세스를 포함할 수 있는, 도 27의 단계 B에 기재된 것들), 이어서 하기에 단계 D 하에 및 본원에 기재된 바와 같은 제2 확장 (단계 D, 급속 확장 프로토콜 (REP) 단계로 지칭되는 프로세스를 포함함), 이어서 임의적 냉동보존, 및 이어서 하기 및 본원에 기재된 바와 같은 제2 단계 D (재자극 REP 단계로 지칭되는 프로세스를 포함함)를 사용하여 수행될 수 있다. 이 프로세스로부터 얻어진 TIL은 임의로 본원에 기재된 바와 같이 표현형적 특징 및 대사적 파라미터에 대해 특징규명될 수 있다.

[0216] TIL 배양이 24-웰 플레이트에서, 예를 들어, 평저의 코스타 (Costar) 24-웰 세포 배양 클러스터 (코닝 인코포레이티드 (Corning Incorporated), 미국 뉴욕주 코닝)를 사용하여 개시되는 실시양태에서, 각각의 웰을 IL-2 (6000 IU/mL; 키론 코포레이션 (Chiron Corp.), 미국 캘리포니아주 에머리빌)를 갖는 2 mL의 완전 배지 (CM)에서 1 × 10^6개의 종양 소화물 세포 또는 1개의 종양 단편으로 시딩할 수 있다. 일부 실시양태에서, 종양 단편은 약 1 mm^3 내지 10 mm^3이다.

[0217] 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 배양 배지에 대한 약어인 "CM"으로 지칭된다. 일부 실시양태에서, 단계 B를 위한 CM은 10% 인간 AB 혈청, 25 mM 헤페스 (Hepes), 및 10 mg/mL 겐타미신으로 보충된 글루타맥스를 갖는 RPMI 1640으로 이루어진다. 배양이 40 mL 용량 및 10 cm^2 기체-투과성 규소 바닥을 갖는 기체-투과성 플라스크 (예를 들어, G-렉스10; 윌슨 울프 매뉴팩처링 (Wilson Wolf Manufacturing), 미국 미네소타주 뉴 브링톤)에서 개시되는 실시양태 (도 1)에서, 각각의 플라스크를 IL-2를 갖는 10 내지 40 mL의 CM에서 10 내지 40 × 10^6개의 생존 종양 소화물 세포 또는 5 내지 30개의 종양 단편으로 로딩하였다. G-렉스10 및 24-웰 플레이트 둘 다를 습화된 인큐베이터에서 37℃에서 5% CO_2에서 인큐베이션하고, 배양 개시의 5일 후에, 배지의 반을 제거하고, 신선한 CM 및 IL-2로 대체하고, 제5일 후에, 배지의 반을 2 내지 3일마다 교환하였다.

[0218] 종양 단편의 제조 후, 생성된 세포 (즉, 단편)를 종양 및 다른 세포에 비해 TIL의 성장에 호의적인 조건 하에서 IL-2를 함유하는 혈청에서 배양한다. 일부 실시양태에서, 종양 소화물을 6000 IU/mL의 IL-2를 갖는 불활성화된 인간 AB 혈청을 포함하는 배지에서 2 mL 웰에서 (또는 일부의 경우, 본원에 개요된 바와 같이, aAPC 세포 집단의 존재 하에서) 인큐베이션한다. 이 1차 세포 집단을 수 일의 기간, 일반적으로 10 내지 14일 동안 배양하여,

벌크한 TIL 집단, 일반적으로 약 1×10^8개의 벌크한 TIL 세포를 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 동안의 성장 배지는 IL-2 또는 그의 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL은 재조합 인간 IL-2 (rhIL-2)이다. 일부 실시양태에서 IL-2 스톡 용액은 1 mg 바이알에 대해 20 내지 30×10^6 IU/mg의 비활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, IL-2 스톡 용액은 1 mg 바이알에 대해 20×10^6 IU/mg의 비활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, IL-2 스톡 용액은 1 mg 바이알에 대해 25×10^6 IU/mg의 비활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, IL-2 스톡 용액은 1 mg 바이알에 대해 30×10^6 IU/mg의 비활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, IL-2 스톡 용액은 4 내지 8×10^6 IU/mg의 IL-2의 최종 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, IL-2 스톡 용액은 5 내지 7×10^6 IU/mg의 IL-2의 최종 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, IL-2 스톡 용액은 6×10^6 IU/mg의 IL-2의 최종 농도를 갖는다. 일부 실시양태에서, IL-2 스톡 용액은 실시예 4에 기재된 바와 같이 제조된다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 10,000 IU/mL의 IL-2, 약 9,000 IU/mL의 IL-2, 약 8,000 IU/mL의 IL-2, 약 7,000 IU/mL의 IL-2, 약 6000 IU/mL의 IL-2 또는 약 5,000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 9,000 IU/mL의 IL-2 내지 약 5,000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 8,000 IU/mL의 IL-2 내지 약 6,000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 7,000 IU/mL의 IL-2 내지 약 6,000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 6,000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 IL-2를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 3000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 IL-2를 더 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 3000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 1000 IU/mL, 약 1500 IU/mL, 약 2000 IU/mL, 약 2500 IU/mL, 약 3000 IU/mL, 약 3500 IU/mL, 약 4000 IU/mL, 약 4500 IU/mL, 약 5000 IU/mL, 약 5500 IU/mL, 약 6000 IU/mL, 약 6500 IU/mL, 약 7000 IU/mL, 약 7500 IU/mL, 또는 약 8000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 1000 내지 2000 IU/mL, 2000 내지 3000 IU/mL, 3000 내지 4000 IU/mL, 4000 내지 5000 IU/mL, 5000 내지 6000 IU/mL, 6000 내지 7000 IU/mL, 7000 내지 8000 IU/mL, 또는 약 8000 IU/mL의 IL-2를 포함한다.

[0219] 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 500 IU/mL의 IL-15, 약 400 IU/mL의 IL-15, 약 300 IU/mL의 IL-15, 약 200 IU/mL의 IL-15, 약 180 IU/mL의 IL-15, 약 160 IU/mL의 IL-15, 약 140 IU/mL의 IL-15, 약 120 IU/mL의 IL-15, 또는 약 100 IU/mL의 IL-15를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 500 IU/mL의 IL-15 내지 약 100 IU/mL의 IL-15를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 400 IU/mL의 IL-15 내지 약 100 IU/mL의 IL-15를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 300 IU/mL의 IL-15 내지 약 100 IU/mL의 IL-15를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 200 IU/mL의 IL-15를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 180 IU/mL의 IL-15를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 IL-15를 더 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 180 IU/mL의 IL-15를 포함한다.

[0220] 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 20 IU/mL의 IL-21, 약 15 IU/mL의 IL-21, 약 12 IU/mL의 IL-21, 약 10 IU/mL의 IL-21, 약 5 IU/mL의 IL-21, 약 4 IU/mL의 IL-21, 약 3 IU/mL의 IL-21, 약 2 IU/mL의 IL-21, 약 1 IU/mL의 IL-21, 또는 약 0.5 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 20 IU/mL의 IL-21 내지 약 0.5 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 15 IU/mL의 IL-21 내지 약 0.5 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 12 IU/mL의 IL-21 내지 약 0.5 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 10 IU/mL의 IL-21 내지 약 0.5 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 5 IU/mL의 IL-21 내지 약 1 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 약 2 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 1 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 0.5 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 IL-21을 더 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 1 IU/mL의 IL-21을 포함한다.

[0221] 일부 실시양태에서, 제1 확장 배양 배지는 배양 배지에 대한 약어인 "CM"으로 지칭된다. 일부 실시양태에서, 이는 CM1 (배양 배지 1)로 지칭된다. 일부 실시양태에서, CM은 10% 인간 AB 혈청, 25 mM 헤페스, 및 10 mg/mL 겐타미신으로 보충된 글루타맥스를 갖는 RPMI 1640으로 이루어진다. 배양이 40 mL 용량 및 10 cm^2 기체-투과성 규소 바닥을 갖는 기체-투과성 플라스크 (예를 들어, G-렉스10; 윌슨 울프 매뉴팩처링, 미국 미네소타주

뉴 브링톤)에서 개시되는 실시양태 (도 1)에서, 각각의 플라스크를 IL-2를 갖는 10 내지 40 mL의 CM에서 10 내지 40 × 10^6개의 생존 종양 소화물 세포 또는 5 내지 30개의 종양 단편으로 로딩하였다. G-렉스10 및 24-웰 플레이트 둘 다를 습화된 인큐베이터에서 37℃에서 5% CO_2에서 인큐베이션하고, 배양 개시 후 5일에, 배지의 반을 제거하고, 신선한 CM 및 IL-2로 대체하고, 제5일 후에, 배지의 반을 2 내지 3일마다 교환하였다. 일부 실시양태에서, CM은 실시예에 기재된 CM1이며, 실시예 5를 참조한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장은 초기 세포 배양 배지 또는 제1 세포 배양 배지에서 일어난다. 일부 실시양태에서, 초기 세포 배양 배지 또는 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함한다.

[0222] 일부 실시양태에서, 제1 확장 (예를 들어 때때로 사전-REP로 지칭되는 것들을 포함할 수 있는, 도 27의 단계 B에 기재된 것들과 같은 프로세스를 포함함) 프로세스는 실시예 및 도면에서 논의된 바와 같이 3 내지 14일로 단축된다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 (예를 들어 때때로 사전-REP로 지칭되는 것들을 포함할 수 있는, 도 27의 단계 B에 기재된 것들과 같은 프로세스를 포함함)은, 뿐만 아니라 예를 들어, 도 27의 단계 B에 기재된 확장을 포함하여, 실시예에서 논의되고, 도 4 및 5에 나타내어진 바와 같이, 7 내지 14일로 단축된다. 일부 실시양태에서, 단계 B의 제1 확장은 실시예에서 논의되고, 도 4 및 5에 나타내어진 바와 같이 10 내지 14일로 단축된다. 일부 실시양태에서, 제1 확장은, 뿐만 아니라 도 27의 단계 B에 기재된 바와 같은 확장을 포함하여, 실시예에서 논의되고, 도 4 및 5에 나타내어진 바와 같이 11일로 단축된다.

[0223] 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 또는 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 1일 내지 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 2일 내지 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 3일 내지 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 4일 내지 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 5일 내지 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 6일 내지 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 7일 내지 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 8일 내지 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 9일 내지 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 10일 내지 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 11일 내지 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 12일 내지 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 13일 내지 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 1일 내지 11일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 2일 내지 11일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 3일 내지 11일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 4일 내지 11일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 5일 내지 11일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 6일 내지 11일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 7일 내지 11일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 8일 내지 11일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 9일 내지 11일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 10일 내지 11일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 11일 동안 진행될 수 있다.

[0224] 일부 실시양태에서, IL-2, IL-7, IL-15, 및/또는 IL-21의 조합은 제1 확장 동안 조합으로서 채용된다. 일부 실시양태에서, IL-2, IL-7, IL-15, 및/또는 IL-21 뿐만 아니라 이들의 임의의 조합은 예를 들어 도 27에 따른, 뿐만 아니라 본원에 기재된 단계 B 프로세스 동안을 비롯한 제1 확장 동안 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2, IL-15, 및 IL-21의 조합은 제1 확장 동안 조합으로서 채용된다. 일부 실시양태에서, IL-2, IL-15, 및 IL-21 뿐만 아니라 이들의 임의의 조합은 도 27에 따른 및 본원에 기재된 바와 같은 단계 B 프로세스 동안 포함될 수 있다.

[0225] 일부 실시양태에서, 제1 확장 (사전-REP로 지칭되는 프로세스를 포함함; 예를 들어, 도 27에 따른 단계 B) 프로세스는 실시예 및 도면에서 논의된 바와 같이 3 내지 14일로 단축된다. 일부 실시양태에서, 단계 B의 제1 확장은 실시예에서 논의되고, 도 4 및 5에 나타내어진 바와 같이 7 내지 14일로 단축된다. 일부 실시양태에서, 단계 B의 제1 확장은 실시예에서 논의되고, 도 4, 5, 및 27에 나타내어진 바와 같이 10 내지 14일로 단축된다. 일부 실시양태에서, 제1 확장은 실시예에서 논의되고, 도 4, 5, 및 27에 나타내어진 바와 같이 11일로 단축된다.

[0226] 일부 실시양태에서, 제1 확장, 예를 들어, 도 27에 따른 단계 B는 닫힌 계 생물반응기에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 닫힌 계는 본원에 기재된 바와 같이 TIL 확장을 위해 채용된다. 일부 실시양태에서, 단일 생물반응기가 채용된다. 일부 실시양태에서, 채용되는 단일 생물반응기는 예를 들어 G-렉스-10 또는 G-렉스-100이다.

일부 실시양태에서, 닫힌 계 생물반응기는 단일 생물반응기이다.

[0227] **C. 단계 C: 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행**

[0228] 일부의 경우, 예를 들어, 예를 들어, 도 27에 지시된 바와 같은 단계 B로부터 얻어진 TIL 집단을 비롯한 제1 확장으로부터 얻어진 벌크한 TIL 집단은 하기 본원에서 논의된 프로토콜을 사용하여 즉시 냉동보존될 수 있다. 대안적으로, 제2 TIL 집단으로 지칭되는 제1 확장으로부터 얻어진 TIL 집단은 제2 확장 (이는 때때로 REP로 지칭되는 확장을 포함할 수 있음)으로 처리된 후, 하기 논의된 바와 같이 냉동보존될 수 있다. 유사하게, 유전적으로 변형된 TIL이 요법에 사용되게 될 경우, 제1 TIL 집단 (때때로 벌크한 TIL 집단으로 지칭됨) 또는 제2 TIL 집단 (이는 일부 실시양태에서 REP TIL 집단으로 지칭되는 집단을 포함할 수 있음)은 확장 전에 또는 제1 확장 후에 또는 제2 확장 전에 적합한 처리를 위해 유전적 변형으로 처리될 수 있다.

[0229] 일부 실시양태에서, 제1 확장으로부터 (예를 들어, 도 27에 지시된 바와 같은 단계 B로부터) 얻어진 TIL은 선택을 위해 표현형결정될 때까지 저장된다. 일부 실시양태에서, 제1 확장으로부터 (예를 들어, 도 27에 지시된 바와 같은 단계 B로부터) 얻어진 TIL은 저장되지 않고, 제2 확장으로 직접적으로 진행된다. 일부 실시양태에서, 제1 확장으로부터 얻어진 TIL은 제1 확장 후에 및 제2 확장 전에 냉동보존되지 않는다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 약 3일, 4,일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 또는 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 약 3일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 약 4일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 약 4일 내지 10일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 약 7일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 약 14일에 일어난다.

[0230] 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 또는 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 1일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 TIL 확장은 2일 내지 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 3일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 4일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 5일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 6일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 7일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 8일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 9일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 10일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 11일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 12일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 13일 내지 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 14일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 1일 내지 11일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 2일 내지 11일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 3일 내지 11일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 4일 내지 11일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 5일 내지 11일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 6일 내지 11일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 7일 내지 11일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 8일 내지 11일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 9일 내지 11일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 10일 내지 11일에 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행은 단편화가 일어난 때로부터 11일에 일어난다.

[0231] 일부 실시양태에서, TIL은 제1 확장 후에 및 제2 확장 전에 저장되지 않고, TIL은 제2 확장으로 직접적으로 진행된다 (예를 들어, 일부 실시양태에서, 도 27에 나타내어진 바와 같이 단계 B에서 단계 D로의 이행 동안 저장

이 없음). 일부 실시양태에서, 이행은 본원에 기재된 바와 같이 닫힌 계에서 일어난다. 일부 실시양태에서, 제1 확장으로부터의 TIL, 즉, TIL의 제2 집단은 이행 기간을 갖지 않고 제2 확장으로 직접적으로 진행된다.

[0232] 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행, 예를 들어, 도 27에 따른 단계 C는 닫힌 계 생물반응기에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 닫힌 계는 본원에 기재된 바와 같이 TIL 확장을 위해 채용된다. 일부 실시양태에서, 단일 생물반응기가 채용된다. 일부 실시양태에서, 채용되는 단일 생물반응기는 예를 들어 G-렉스-10 또는 G-렉스-100이다. 일부 실시양태에서, 닫힌 계 생물반응기는 단일 생물반응기이다.

[0233] **D. 단계 D: 제2 확장**

[0234] 일부 실시양태에서, TIL 세포 집단은 도 27에 지시된 바와 같이, 수확 및 초기 벌크한 프로세싱 후에, 예를 들어, 단계 A 및 단계 B, 및 단계 C로 지칭되는 이행 후에 수에 있어서 확장된다. 이 추가의 확장은 본원에서 제2 확장으로 지칭되며, 이는 일반적으로 관련 기술분야에서 급속 확장 프로세스 (REP; 뿐만 아니라 도 27의 단계 D에 지시된 바와 같은 프로세스)로 지칭되는 확장 프로세스를 포함할 수 있다. 제2 확장은 일반적으로 기체-투과성 용기에 공급자 세포, 시토카인 공급원, 및 항-CD3 항체를 비롯한 다수의 성분을 포함하는 배양 배지를 사용하여 달성된다.

[0235] 일부 실시양태에서, TIL의 제2 확장 또는 제2 TIL 확장 (이는 때때로 REP로 지칭되는 확장; 뿐만 아니라 도 27의 단계 D에 지시된 바와 같은 프로세스를 포함할 수 있음)은 임의의 TIL 플라스크 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 공지된 용기를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 TIL 확장은 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 또는 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 TIL 확장은 약 7일 내지 약 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 TIL 확장은 약 8일 내지 약 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 TIL 확장은 약 9일 내지 약 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 TIL 확장은 약 10일 내지 약 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 TIL 확장은 약 11일 내지 약 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 TIL 확장은 약 12일 내지 약 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 TIL 확장은 약 13일 내지 약 14일 동안 진행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 TIL 확장은 약 14일 동안 진행될 수 있다.

[0236] 한 실시양태에서, 제2 확장은 본 개시내용의 방법 (예를 들어, REP로 지칭되는 확장; 뿐만 아니라 도 27의 단계 D에 지시된 바와 같은 프로세스를 포함함)을 사용하여 기체 투과성 용기에서 수행될 수 있다. 예를 들어, TIL은 인터루킨-2 (IL-2) 또는 인터루킨-15 (IL-15)의 존재 하에서 비-특이적 T-세포 수용체 자극을 사용하여 급속하게 확장될 수 있다. 비-특이적 T-세포 수용체 자극은 예를 들어, 항-CD3 항체, 예컨대 약 30 ng/mL의 OKT3, 마우스 모노클로날 항-CD3 항체 (미국 뉴저지주 라리탄에 소재하는 오르토-맥네일 (Ortho-McNeil) 또는 미국 캘리포니아주 오번에 소재하는 밀테니 바이오테크로부터 시판됨) 또는 UHCT-1 (미국 캘리포니아주 샌 디에고에 소재하는 바이오레전드 (BioLegend)로부터 시판됨)을 포함할 수 있다. TIL은 임의로 T-세포 성장 인자, 예컨대 300 IU/mL IL-2 또는 IL-15의 존재 하에서, 임의로 벡터, 예컨대 인간 백혈구 항원 A2 (HLA-A2) 결합 펩티드, 예를 들어, 0.3 μM MART-1 :26-35 (27 L) 또는 gp1 00:209-217 (210 M)로부터 발현될 수 있는 암의, 그의 항원 부분, 예컨대 에피토프(들)를 비롯한, 제2 확장 동안 1종 이상의 항원을 포함시킴으로써 시험관내에서 TIL의 추가의 자극을 유도하도록 확장될 수 있다. 다른 적합한 항원으로는 예를 들어, NY-ESO-1, TRP-1, TRP-2, 티로시나제 암 항원, MAGE-A3, SSX-2, 및 VEGFR2, 또는 그의 항원 부분을 들 수 있다. TIL은 또한 HLA-A2-발현 항원-제시 세포 상으로 펄싱된 암의 동일한 항원(들)으로의 재-자극에 의해 급속하게 확장될 수 있다. 대안적으로, TIL은 예를 들어, 방사선조사된, 자가 림프구로, 또는 방사선조사된 HLA-A2+ 동종이형 림프구 및 IL-2로 추가로 재-자극될 수 있다. 일부 실시양태에서, 재-자극은 제2 확장의 일부로서 일어난다. 일부 실시양태에서, 제2 확장은 방사선조사된, 자가 림프구의 존재 하에서 또는 방사선조사된 HLA-A2+ 동종이형 림프구 및 IL-2로 일어난다.

[0237] 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 IL-2를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 3000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 1000 IU/mL, 약 1500 IU/mL, 약 2000 IU/mL, 약 2500 IU/mL, 약 3000 IU/mL, 약 3500 IU/mL, 약 4000 IU/mL, 약 4500 IU/mL, 약 5000 IU/mL, 약 5500 IU/mL, 약 6000 IU/mL, 약 6500 IU/mL, 약 7000 IU/mL, 약 7500 IU/mL, 또는 약 8000 IU/mL의 IL-2를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 1000 내지 2000 IU/mL, 2000 내지 3000 IU/mL, 3000 내지 4000 IU/mL, 4000 내지 5000 IU/mL, 5000 내지 6000 IU/mL, 6000 내지 7000 IU/mL, 7000 내지 8000 IU/mL, 또는 8000 IU/mL의 IL-2를 포함한다.

[0238] 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 OKT3 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 30 ng/mL

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

[0239] 일부 실시양태에서, IL-2, IL-7, IL-15, 및/또는 IL-21의 조합은 제2 확장 동안 조합으로서 채용된다. 일부 실시양태에서, IL-2, IL-7, IL-15, 및/또는 IL-21 뿐만 아니라 이들의 임의의 조합은 예를 들어 도 27에 따른, 뿐만 아니라 본원에 기재된 단계 D 프로세스 동안을 비롯한 제2 확장 동안 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, IL-2, IL-15, 및 IL-21의 조합은 제2 확장 동안 조합으로서 채용된다. 일부 실시양태에서, IL-2, IL-15, 및 IL-21 뿐만 아니라 이들의 임의의 조합은 도 27에 따른 및 본원에 기재된 바와 같은 단계 D 프로세스 동안 포함될 수 있다.

[0240] 일부 실시양태에서, 제2 확장은 IL-2, OKT-3, 및 항원-제시 공급자 세포를 포함하는 보충된 세포 배양 배지에서 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 확장은 보충된 세포 배양 배지에서 일어난다. 일부 실시양태에서, 보충된 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3, 및 항원-제시 공급자 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3, 및 항원-제시 세포 (APC; 항원-제시 공급자 세포로도 지칭됨)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 확장은 IL-2, OKT-3, 및 항원-제시 공급자 세포 (즉, 항원 제시 세포)를 포함하는 세포 배양 배지에서 일어난다.

[0241] 일부 실시양태에서, 제2 확장 배양 배지는 약 500 IU/mL의 IL-15, 약 400 IU/mL의 IL-15, 약 300 IU/mL의 IL-15, 약 200 IU/mL의 IL-15, 약 180 IU/mL의 IL-15, 약 160 IU/mL의 IL-15, 약 140 IU/mL의 IL-15, 약 120 IU/mL의 IL-15, 또는 약 100 IU/mL의 IL-15를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 배양 배지는 약 500 IU/mL의 IL-15 내지 약 100 IU/mL의 IL-15를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 배양 배지는 약 400 IU/mL의 IL-15 내지 약 100 IU/mL의 IL-15를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 배양 배지는 약 300 IU/mL의 IL-15 내지 약 100 IU/mL의 IL-15를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 배양 배지는 약 200 IU/mL의 IL-15를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 180 IU/mL의 IL-15를 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 IL-15를 더 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 180 IU/mL의 IL-15를 포함한다.

[0242] 일부 실시양태에서, 제2 확장 배양 배지는 약 20 IU/mL의 IL-21, 약 15 IU/mL의 IL-21, 약 12 IU/mL의 IL-21, 약 10 IU/mL의 IL-21, 약 5 IU/mL의 IL-21, 약 4 IU/mL의 IL-21, 약 3 IU/mL의 IL-21, 약 2 IU/mL의 IL-21, 약 1 IU/mL의 IL-21, 또는 약 0.5 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 배양 배지는 약 20 IU/mL의 IL-21 내지 약 0.5 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 배양 배지는 약 15 IU/mL의 IL-21 내지 약 0.5 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 배양 배지는 약 12 IU/mL의 IL-21 내지 약 0.5 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 배양 배지는 약 10 IU/mL의 IL-21 내지 약 0.5 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 배양 배지는 약 5 IU/mL의 IL-21 내지 약 1 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 배양 배지는 약 2 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 1 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 0.5 IU/mL의 IL-21을 포함한다. 한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 IL-21을 더 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 세포 배양 배지는 약 1 IU/mL의 IL-21을 포함한다.

[0243] 일부 실시양태에서 항원-제시 공급자 세포 (APC)는 PBMC이다. 한 실시양태에서, 급속 확장 및/또는 제2 확장에서 TIL 대 PBMC 및/또는 항원-제시 세포의 비는 약 1 대 25, 약 1 대 50, 약 1 대 100, 약 1 대 125, 약 1 대 150, 약 1 대 175, 약 1 대 200, 약 1 대 225, 약 1 대 250, 약 1 대 275, 약 1 대 300, 약 1 대 325, 약 1 대 350, 약 1 대 375, 약 1 대 400, 또는 약 1 대 500이다. 한 실시양태에서, 급속 확장 및/또는 제2 확장에서 TIL 대 PBMC의 비는 1 대 50 내지 1 대 300이다. 한 실시양태에서, 급속 확장 및/또는 제2 확장에서 TIL 대 PBMC의 비는 1 대 100 내지 1 대 200이다.

[0244] 한 실시양태에서, REP 및/또는 제2 확장은 150 ml 배지 중 100 또는 200배 과량의 불활성화된 공급자 세포, 30 mg/mL OKT3 항-CD3 항체 및 3000 IU/mL IL-2와 혼합된 벌크한 TIL을 갖는 플라스크에서 수행된다. 배지 대체는 세포가 대안적 성장 챔버로 이동될 때까지 수행된다 (일반적으로 호흡을 통한 신선한 배지로의 2/3 배지 대

체). 대안적 성장 챔버는 하기에서 보다 충분히 논의된 바와 같이 G-렉스 플라스크 및 기체 투과성 용기를 포함한다.

[0245] 일부 실시양태에서, 제2 확장 (이는 REP 프로세스로 지칭되는 프로세스를 포함할 수 있음)은 실시예 및 도면에서 논의된 바와 같이 7 내지 14일로 단축된다. 일부 실시양태에서, 제2 확장은 11일로 단축된다.

[0246] 한 실시양태에서, REP 및/또는 제2 확장은 이전에 기재된 바와 같이 T-175 플라스크 및 기체 투과성 백 (Tran, *et al.*, *J. Immunother.* **2008**, *31*, 742-51; Dudley, *et al.*, *J. Immunother.* **2003**, *26*, 332-42) 또는 기체 투과성 배양장치 (G-렉스 플라스크)를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 (급속 확장으로 지칭되는 확장을 포함함)은 T-175 플라스크에서 수행되며, 150 mL의 배지에 현탁된 약 1 × 10^6개의 TIL을 각각의 T-175 플라스크에 첨가할 수 있다. TIL을 mL 당 3000 IU의 IL-2 및 mL 당 30 ng의 항-CD3으로 보충된 CM 및 AIM-V 배지의 1 대 1 혼합물에서 배양할 수 있다. T-175 플라스크를 37℃에서 5% CO_2에서 인큐베이션할 수 있다. 배지의 반을 제5일에 mL 당 3000 IU의 IL-2를 갖는 50/50 배지를 사용하여 교환할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제7일에 2개의 T-175 플라스크로부터의 세포를 3 L 백에서 합할 수 있고, 5% 인간 AB 혈청을 갖는 300 mL의 AIM V 및 mL 당 3000 IU의 IL-2를 300 mL의 TIL 현탁액에 첨가하였다. 각각의 백 중의 세포의 수를 매일 또는 2일마다 카운팅하고, 신선한 배지를 첨가하여 세포 카운트를 0.5 내지 2.0 × 10^6개의 세포/mL로 유지하였다.

[0247] 한 실시양태에서, 제2 확장 (이는 REP로 지칭되는 확장, 뿐만 아니라 도 27의 단계 D에서 지칭된 것들을 포함할 수 있음)은 100 cm 기체-투과성 규소 바닥을 갖는 500 mL 용량 기체 투과성 플라스크 (G-렉스 100, 미국 미네소타주 뉴 브링톤에 소재하는 윌슨 울프 매뉴팩처링 코포레이션으로부터 시판됨)에서 수행될 수 있으며, 5 × 10^6 또는 10 × 10^6개의 TIL을 5% 인간 AB 혈청, mL 당 3000 IU의 IL-2 및 mL 당 30 ng의 항-CD3 (OKT3)으로 보충된 400 mL의 50/50 배지에서 PBMC와 함께 배양할 수 있다. G-렉스 100 플라스크를 37℃에서 5% CO_2에서 인큐베이션할 수 있다. 제5일에, 250 mL의 상청액을 제거하고, 원심분리 병 내에 정치하고, 1500 rpm (491 × g)에서 10분 동안 원심분리할 수 있다. TIL 펠릿을 5% 인간 AB 혈청, mL 당 3000 IU의 IL-2를 갖는 150 mL의 신선한 배지로 재-현탁시키고, 원래 G-렉스 100 플라스크로 다시 첨가할 수 있다. TIL이 G-렉스 100 플라스크에서 연속적으로 확장되는 경우, 제7일에 각각의 G-렉스 100 중의 TIL을 각각의 플라스크에 존재하는 300 mL의 배지에 현탁시킬 수 있고, 세포 현탁액을 3개의 G-렉스 100 플라스크를 시딩하는 데 사용될 수 있는 3개의 100 mL 분취물로 나눌 수 있다. 그 후, 5% 인간 AB 혈청 및 mL 당 3000 IU의 IL-2를 갖는 150 mL의 AIM-V를 각각의 플라스크에 첨가할 수 있다. G-렉스 100 플라스크를 37℃에서 5% CO_2에서 인큐베이션할 수 있고, 4일 후 mL 당 3000 IU의 IL-2를 갖는 150 mL의 AIM-V를 각각의 G-렉스 100 플라스크에 첨가할 수 있다. 세포를 배양의 제14일에 수확할 수 있다.

[0248] 한 실시양태에서, 제2 확장 (REP로 지칭되는 확장을 포함함)이 150 ml 배지 중 100 또는 200배 과량의 불활성화된 공급자 세포, 30 mg/mL OKT3 항-CD3 항체 및 3000 IU/mL IL-2와 혼합된 벌크한 TIL을 갖는 플라스크에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 배지 대체는 세포가 대안적 성장 챔버로 이동될 때까지 수행된다. 일부 실시양태에서, 배지의 2/3을 호흡에 의해 신선한 배지로 대체한다. 일부 실시양태에서, 대안적 성장 챔버는 하기에서 보다 충분히 논의된 바와 같이 G-렉스 플라스크 및 기체 투과성 용기를 포함한다.

[0249] 한 실시양태에서, 제2 확장 (REP로 지칭되는 확장을 포함함)은 수행되고, TIL이 우수한 종양 반응성을 위해 선택되는 단계를 더 포함한다. 관련 기술분야에 공지된 임의의 선택 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 그의 개시내용이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 출원 공개 제2016/0010058 A1호에 기재된 방법은 우수한 종양 반응성을 위한 TIL의 선택에 사용될 수 있다.

[0250] 임의로, 세포 생존력 검정은 제2 확장 (REP 확장으로 지칭되는 확장을 포함함) 후에 관련 기술분야에 공지된 표준 검정을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 죽은 세포를 선택적으로 표지하고, 생존력 평가를 허용하는 트리판 블루 배제 검정은 벌크한 TIL의 샘플에 대해 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL 샘플을 카운팅하고, 생존력을 셀로미터 K2 자동화 세포 카운터 (넥스셀롬 바이오사이언스, 미국 매사추세츠주 로렌스)를 사용하여 측정할 수 있다. 일부 실시양태에서, 생존력은 예를 들어, 실시예 15에 기재된 셀로미터 K2 화상 세포측정기 자동 세포 카운터 (Cellometer K2 Image Cytometer Automatic Cell Counter) 프로토콜에 따라 측정된다.

[0251] 일부 실시양태에서, TIL의 제2 확장 (REP로 지칭되는 확장을 포함함)은 이전에 기재된 바와 같이 T-175 플라스크 및 기체-투과성 백 (Tran KQ, Zhou J, Durflinger KH, et al., **2008**, *J Immunother.*, 31:742-751, and

Dudley ME, Wunderlich JR, Shelton TE, et al. 2003, *J Immunother.*, 26:332-342) 또는 기체-투과성 G-렉스 플라스크를 사용하여 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 확장은 플라스크를 사용하여 수행된다. 일부 실시양태에서, 제2 확장은 기체-투과성 G-렉스 플라스크를 사용하여 수행된다. 일부 실시양태에서, 제2 확장은 T-175 플라스크에서 수행되고, 약 1 × 10^6개의 TIL을 약 150 mL의 배지에 현탁시키고, 이를 각각의 T-175 플라스크에 첨가한다. TIL을 "공급자" 세포로서 방사선조사된 (50 Gy) 동종이형 PBMC와 함께 1 대 100의 비로 배양하고, 세포를 3000 IU/mL의 IL-2 및 30 ng/mL의 항-CD3으로 보충된 CM 및 AIM-V 배지 (50/50 배지)의 1 대 1 혼합물에서 배양하였다. T-175 플라스크를 37℃에서 5% CO_2에서 인큐베이션한다. 일부 실시양태에서, 배지의 반을 제5일에 3000 IU/mL의 IL-2를 갖는 50/50 배지를 사용하여 교환한다. 일부 실시양태에서, 제7일에, 2개의 T-175 플라스크로부터의 세포를 3 L 백에서 합하고, 5% 인간 AB 혈청 및 3000 IU/mL의 IL-2를 갖는 300 mL의 AIM-V를 300 mL의 TIL 현탁액에 첨가한다. 각각의 백 중의 세포의 수를 매일 또는 2일마다 카운팅할 수 있고, 신선한 배지를 첨가하여 약 0.5 내지 약 2.0 × 10^6개의 세포/mL의 세포 카운트를 유지할 수 있다.

[0252] 일부 실시양태에서, 제2 확장 (REP로 지칭되는 확장을 포함함)은 100 cm^2 기체-투과성 규소 바닥을 갖는 500 mL 용량 플라스크 (G-렉스 100, 윌슨 울프)에서 수행되고 (도 1), 약 5×10^6 또는 10×10^6개의 TIL을 3000 IU/mL의 IL-2 및 30 ng/ mL의 항-CD3으로 보충된 400 mL의 50/50 배지에서 방사선조사된 동종이형 PBMC와 함께 1 대 100의 비로 배양한다. G-렉스 100 플라스크를 37℃에서 5% CO_2에서 인큐베이션한다. 일부 실시양태에서, 제5일에, 250 mL의 상청액을 제거하고, 원심분리 병 내로 정치하고, 1500 rpm (491 g)에서 10분 동안 원심분리한다. 그 후, TIL 펠릿을 3000 IU/ mL의 IL-2를 갖는 150 mL의 신선한 50/50 배지로 재현탁시키고, 원래 G-렉스 100 플라스크에 다시 첨가할 수 있다. TIL이 G-렉스 100 플라스크에서 연속적으로 확장되는 실시양태에서, 제7일에 각각의 G-렉스 100 중의 TIL을 각각의 플라스크에 존재하는 300 mL의 배지에 현탁시키고, 세포 현탁액을 3개의 G-렉스 100 플라스크를 시딩하는 데 사용되는 3개의 100 mL 분취물로 나누었다. 그 후, 5% 인간 AB 혈청 및 3000 IU/mL의 IL-2를 갖는 150 mL의 AIM-V를 각각의 플라스크에 첨가한다. G-렉스 100 플라스크를 37℃에서 5% CO_2에서 인큐베이션하고, 4일 후 3000 IU/mL의 IL-2를 갖는 150 mL의 AIM-V를 각각의 G-렉스 100 플라스크에 첨가한다. 세포를 배양의 제14일에 수확한다.

[0253] T 및 B 림프구의 다양한 항원 수용체는 제한된, 그러나 다수의 유전자 절편의 체세포적 재조합에 의해 생산된다. 이들 유전자 절편: V (가변), D (다양성), J (연결), 및 C (불변)은 이뮤노글로불린 및 T-세포 수용체 (TCR)의 결합 특이성 및 하류 적용을 결정한다. 본 발명은 T-세포 레퍼토리 다양성을 나타내고 증가시키는 TIL을 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 방법에 의해 얻어진 TIL은 T-세포 레퍼토리 다양성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 제2 확장에서 얻어진 TIL은 T-세포 레퍼토리 다양성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 다양성의 증가는 이뮤노글로불린 다양성 및/또는 T-세포 수용체 다양성의 증가이다. 일부 실시양태에서, 다양성은 이뮤노글로불린에 있고, 이뮤노글로불린 중쇄에 있다. 일부 실시양태에서, 다양성은 이뮤노글로불린에 있고, 이뮤노글로불린 경쇄에 있다. 일부 실시양태에서, 다양성은 T-세포 수용체에 있다. 일부 실시양태에서, 다양성은 알파, 베타, 감마, 및 델타 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 T-세포 수용체 중 하나에 있다. 일부 실시양태에서, T-세포 수용체 (TCR) 알파 및/또는 베타의 발현의 증가가 있다. 일부 실시양태에서, T-세포 수용체 (TCR) 알파의 발현의 증가가 있다. 일부 실시양태에서, T-세포 수용체 (TCR) 베타의 발현의 증가가 있다. 일부 실시양태에서, TCRab (즉, TCRα/β)의 발현의 증가가 있다.

[0254] 일부 실시양태에서, 제2 확장 배양 배지 (예를 들어, 때때로 CM2 또는 제2 세포 배양 배지로 지칭됨)는 하기에 보다 상세히 논의된 바와 같이 IL-2, OKT-3, 뿐만 아니라 항원-제시 공급자 세포 (APC)를 포함한다.

[0255] 일부 실시양태에서, 제2 확장, 예를 들어, 도 27에 따른 단계 D는 닫힌 계 생물반응기에서 수행된다. 일부 실시양태에서, 닫힌 계는 본원에 기재된 바와 같이 TIL 확장을 위해 채용된다. 일부 실시양태에서, 단일 생물반응기가 채용된다. 일부 실시양태에서, 채용되는 단일 생물반응기는 예를 들어 G-렉스-10 또는 G-렉스-100이다. 일부 실시양태에서, 닫힌 계 생물반응기는 단일 생물반응기이다.

[0256] 1. 공급자 세포 및 항원 제시 세포

[0257] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 제2 확장 절차 (예를 들어 도 27로부터의 단계 D에 기재된 것들, 뿐만 아니라 REP로 지칭되는 것들과 같은 확장을 포함함)는 REP TIL 확장 동안 및/또는 제2 확장 동안 과량의 공급자 세포를 요구한다. 많은 실시양태에서, 공급자 세포는 건강한 혈액 공여자로부터의 표준 전혈 단위로부터 얻어진 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이다. PBMC는 표준 방법, 예컨대 피콜-파크 (Ficoll-Paque) 구배 분리를 사용하여 얻어

진다.

[0258] 일반적으로, 동종이형 PBMC는 실시예, 특히 방사선조사된 동종이형 PBMC의 복제 부적격을 평가하는 예시적인 프로토콜을 제공하는 실시예 14에 기재된 바와 같이 방사선조사 또는 열 처리 중 어느 하나를 통해 불활성화되고, REP 절차에 사용된다.

[0259] 일부 실시양태에서, PBMC는 제14일에서의 생존 세포의 총 수가 REP의 제0일 및/또는 제2 확장의 제0일 (즉, 제2 확장의 시작일)에서의 배양 내로 놓인 초기 생존 세포 수보다 적은 경우 복제 부적격으로 간주되며, 본원에 기재된 TIL 확장 절차에 사용하기 위해 허용된다. 예를 들어, 실시예 14를 참조한다.

[0260] 일부 실시양태에서, PBMC는 제7일 및 제14일에 OKT3 및 IL-2의 존재 하에서 배양된 생존 세포의 총 수가 REP의 제0일 및/또는 제2 확장의 제0일 (즉, 제2 확장의 시작일)에서의 배양 내로 놓인 초기 생존 세포 수로부터 증가되지 않은 경우 복제 부적격으로 간주되며, 본원에 기재된 TIL 확장 절차에 사용하기 위해 허용된다. 일부 실시양태에서, PBMC는 30 ng/ml OKT3 항체 및 3000 IU/ml IL-2의 존재 하에서 배양된다. 예를 들어, 실시예 13을 참조한다.

[0261] 일부 실시양태에서, PBMC는 제7일 및 제14일에 OKT3 및 IL-2의 존재 하에서 배양된 생존 세포의 총 수가 REP의 제0일 및/또는 제2 확장의 제0일 (즉, 제2 확장의 시작일)에서의 배양 내로 놓인 초기 생존 세포 수로부터 증가되지 않은 경우 복제 부적격인 것으로 간주되며, 본원에 기재된 TIL 확장 절차에 사용하기 위해 허용된다. 일부 실시양태에서, PBMC는 5 내지 60 ng/ml OKT3 항체 및 1000 내지 6000 IU/ml IL-2의 존재 하에서 배양된다. 일부 실시양태에서, PBMC는 10 내지 50 ng/ml OKT3 항체 및 2000 내지 5000 IU/ml IL-2의 존재 하에서 배양된다. 일부 실시양태에서, PBMC는 20 내지 40 ng/ml OKT3 항체 및 2000 내지 4000 IU/ml IL-2의 존재 하에서 배양된다. 일부 실시양태에서, PBMC는 25 내지 35 ng/ml OKT3 항체 및 2500 내지 3500 IU/ml IL-2의 존재 하에서 배양된다.

[0262] 일부 실시양태에서, 항원-제시 공급자 세포는 PBMC이다. 일부 실시양태에서, 항원-제시 공급자 세포는 인공 항원-제시 공급자 세포이다. 한 실시양태에서, 제2 확장에서 TIL 대 항원-제시 공급자 세포의 비는 약 1 대 25, 약 1 대 50, 약 1 대 100, 약 1 대 125, 약 1 대 150, 약 1 대 175, 약 1 대 200, 약 1 대 225, 약 1 대 250, 약 1 대 275, 약 1 대 300, 약 1 대 325, 약 1 대 350, 약 1 대 375, 약 1 대 400, 또는 약 1 대 500이다. 한 실시양태에서, 제2 확장에서 TIL 대 항원-제시 공급자 세포의 비는 1 대 50 내지 1 대 300이다. 한 실시양태에서, 제2 확장에서 TIL 대 항원-제시 공급자 세포의 비는 1 대 100 내지 1 대 200이다.

[0263] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 제2 확장 절차는 약 2.5×10^9 공급자 세포 대 약 100×10^6 TIL의 비를 요구한다. 또다른 실시양태에서, 본원에 기재된 제2 확장 절차는 약 2.5×10^9 공급자 세포 대 약 50×10^6 TIL의 비를 요구한다. 추가의 또다른 실시양태에서, 본원에 기재된 제2 확장 절차는 약 2.5×10^9 공급자 세포 대 약 25×10^6 TIL의 비를 요구한다.

[0264] 한 실시양태에서, 본원에 기재된 제2 확장 절차는 제2 확장 동안 과량의 공급자 세포를 요구한다. 많은 실시양태에서, 공급자 세포는 건강한 혈액 공여자로부터의 표준 전혈 단위로부터 얻어진 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이다. PBMC는 표준 방법, 예컨대 피콜-파크 구배 분리를 사용하여 얻어진다. 한 실시양태에서, 인공 항원-제시 (aAPC) 세포는 PBMC 대신 사용된다.

[0265] 일반적으로, 동종이형 PBMC는 방사선조사 또는 열 처리 중 어느 하나를 통해 불활성화되고, 도 4, 5, 및 27에 기재된 예시적인 절차를 비롯한 본원에 기재된 TIL 확장 절차에 사용된다.

[0266] 한 실시양태에서, 인공 항원 제시 세포는 제2 확장에서 PBMC에 대한 대체물로서, 또는 그와 조합으로 사용된다.

[0267] 2. 시토카인

[0268] 본원에 기재된 확장 방법은 일반적으로 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 고 용량의 시토카인, 특히 IL-2를 갖는 배양 배지를 사용한다.

[0269] 대안적으로, TIL의 급속 확장 및 또는 제2 확장을 위해, 일반적으로 그 전문이 본원에 명백하게 참조로 포함되는 국제 공개 제WO 2015/189356호 및 국제 공개 제WO 2015/189357호에 개요된 바와 같이, IL-2, IL-15 및 IL-21 중 2종 이상의 조합으로 시토카인의 조합을 사용하는 것은 추가적으로 가능하다. 따라서, 가능한 조합은 IL-2 및 IL-15, IL-2 및 IL-21, IL-15 및 IL-21 및 IL-2, IL-15 및 IL-21을 포함하며, 후자는 많은 실시양태에

서 특정 용도를 발견한다. 시토카인의 조합의 사용은 구체적으로 림프구, 및 특히 본원에 기재된 바와 같은 T-세포의 생성에 호의적이다.

[0270] 3. 항-CD3 항체

[0271] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 확장 방법 (REP로 지칭되는 것들을 포함함, 예를 들어, 도 27 참조)에 사용되는 배양 배지는 또한 항-CD3 항체를 포함한다. IL-2와 조합으로 항-CD3 항체는 T 세포 활성화 및 TIL 집단에서의 세포 분열을 유도한다. 이 효과는 전장 항체 뿐만 아니라 Fab 및 F(ab')2 단편으로 나타날 수 있으며, 전자가 일반적으로 바람직하다; 예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Tsoukas *et al.*, *J. Immunol.* **1985**, *135*, 1719]을 참조한다.

[0272] 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해될 것인 바와 같이, 뮤린, 인간, 영장류, 래트, 및 개 항체를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 포유동물로부터의 항-인간 CD3 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 비롯한, 본 발명에서 용도를 발견하는 다수의 적합한 항-인간 CD3 항체가 있다. 특정 실시양태에서, OKT3 항-CD3 항체가 사용된다 (미국 뉴저지주 라리탄에 소재하는 오르토-맥네일 또는 미국 캘리포니아주 오번에 소재하는 밀테니 바이오테크로부터 시판됨).

[0273] **E. 단계 E: TIL을 수확하기**

[0274] 제2 확장 단계 후, 세포는 수확될 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL은 예를 들어 도 27에서 제공된 바와 같이, 1, 2, 3, 4회 이상의 확장 단계 후에 수확된다. 일부 실시양태에서 TIL은 예를 들어 도 27에서 제공된 바와 같이, 2회의 확장 단계 후에 수확된다.

[0275] TIL은 예를 들어 원심분리에 의해서를 비롯한 임의의 적절하고 멸균 방식으로 수확될 수 있다. TIL 수확 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 임의의 이러한 공지된 방법은 본 프로세스와 함께 채용된다. 일부 실시양태에서, TIL은 자동화 시스템을 사용하여 수확된다.

[0276] 세포 수확기 및/또는 세포 프로세싱 시스템은 예를 들어, 프레세니우스 카비 (Fresenius Kabi), 톰텍 라이프 사이언스 (Tomtec Life Science), 퍼킨 엘머 (Perkin Elmer), 및 이노테크 바이오시스템즈 인터내셔널, 인크. (Inotech Biosystems International, Inc.)를 비롯한 다양한 공급원으로부터 시판된다. 임의의 세포 기재 수확기는 본 발명의 방법과 함께 채용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 수확기 및/또는 세포 프로세싱 시스템은 막-기재 세포 수확기이다. 일부 실시양태에서, 세포 수확은 세포 프로세싱 시스템, 예컨대 LOVO 시스템 (프레세니우스 카비에 의해 제조됨)을 통해서이다. 용어 "LOVO 세포 프로세싱 시스템"은 또한 연속적 유동 및 세포 프로세싱을 허용하여 펠릿화 없이 상청액 또는 세포 배양 배지를 제거하는, 멸균 및/또는 닫힌 계 환경에서 막 또는 필터, 예컨대 스피닝 막 또는 스피닝 필터를 통해 세포를 포함하는 용액을 펌핑할 수 있는 임의의 판매자에 의해 제조된 임의의 기기 또는 장치를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 세포 수확기 및/또는 세포 프로세싱 시스템은 닫힌, 멸균 계에서 세포 분리, 세척, 유체-교환, 농축, 및/또는 다른 세포 프로세싱 단계를 수행할 수 있다.

[0277] 일부 실시양태에서, 수확, 예를 들어, 도 27에 따른 단계 E는 닫힌 계 생물반응기로부터 수행된다. 일부 실시양태에서, 닫힌 계는 본원에 기재된 바와 같이 TIL 확장을 위해 채용된다. 일부 실시양태에서, 단일 생물반응기가 채용된다. 일부 실시양태에서, 채용되는 단일 생물반응기는 예를 들어 G-렉스-10 또는 G-렉스-100이다. 일부 실시양태에서, 닫힌 계 생물반응기는 단일 생물반응기이다.

[0278] **F. 단계 F: 최종 제형화/ 주입 백으로의 이동**

[0279] 도 27에 예시적인 순서로 제공된 바와 같이 및 상기 및 본원에 상세히 개요된 바와 같이 단계 A 내지 E가 완료된 후, 세포를 환자에의 투여에 사용하기 위해 용기로 옮긴다. 일부 실시양태에서, 치료상 충분한 수의 TIL이 상기 기재된 확장 방법을 사용하여 얻어지면, 이들은 환자에의 투여에 사용하기 위해 용기로 옮겨진다.

[0280] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 APC를 사용하여 확장된 TIL은 제약 조성물로서 환자에게 투여된다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 멸균 완충제 중 TIL의 현탁액이다. 본 개시내용의 PBMC를 사용하여 확장된 TIL은 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, T-세포는 바람직하게는 대략 30 내지 60분 지속되는 단일 동맥내 또는 정맥내 주입으로서 투여된다. 다른 적합한 투여 경로로는 복강내, 경막내, 및 림프내를 들 수 있다.

[0281] 1. 제약 조성물, 투여량, 및 투여 처방

[0282] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 방법을 사용하여 확장된 TIL은 제약 조성물로서 환자에게 투여된다. 한 실시양태에서, 제약 조성물은 멸균 완충제 중 TIL의 현탁액이다. 본 개시내용의 PBMC를 사용하여 확장된 TIL은 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, T-세포는 바람직하게는 대략 30 내지 60분 지속되는 단일 동맥내 또는 정맥내 주입으로서 투여된다. 다른 적합한 투여 경로로는 복강내, 경막내, 및 림프내를 들 수 있다.

[0283] TIL의 임의의 적합한 용량이 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 약 2.3×10^{10} 내지 약 13.7×10^{10}개의 TIL이 투여되며, 특히 암이 흑색종인 경우, 평균은 대략 7.8×10^{10}개의 TIL이다. 한 실시양태에서, 약 1.2×10^{10} 내지 약 4.3×10^{10}개의 TIL이 투여된다. 일부 실시양태에서, 약 3×10^{10} 내지 약 12×10^{10}개의 TIL이 투여된다. 일부 실시양태에서, 약 4×10^{10} 내지 약 10×10^{10}개의 TIL이 투여된다. 일부 실시양태에서, 약 5×10^{10} 내지 약 8×10^{10}개의 TIL이 투여된다. 일부 실시양태에서, 약 6×10^{10} 내지 약 8×10^{10}개의 TIL이 투여된다. 일부 실시양태에서, 약 7×10^{10} 내지 약 8×10^{10}개의 TIL이 투여된다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 투여량은 약 2.3×10^{10} 내지 약 13.7×10^{10}개이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 투여량은 특히 암이 흑색종인 경우 약 7.8×10^{10}개의 TIL이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 투여량은 약 1.2×10^{10} 내지 약 4.3×10^{10}개의 TIL이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 투여량은 약 3×10^{10} 내지 약 12×10^{10}개의 TIL이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 투여량은 약 4×10^{10} 내지 약 10×10^{10}개의 TIL이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 투여량은 약 5×10^{10} 내지 약 8×10^{10}개의 TIL이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 투여량은 약 6×10^{10} 내지 약 8×10^{10}개의 TIL이다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 투여량은 약 7×10^{10} 내지 약 8×10^{10}개의 TIL이다.

[0284] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에서 제공되는 TIL의 수는 약 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}, 및 9×10^{13}개이다. 한 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에서 제공되는 TIL의 수는 1×10^{6} 내지 5×10^{6}, 5×10^{6} 내지 1×10^{7}, 1×10^{7} 내지 5×10^{7}, 5×10^{7} 내지 1×10^{8}, 1×10^{8} 내지 5×10^{8}, 5×10^{8} 내지 1×10^{9}, 1×10^{9} 내지 5×10^{9}, 5×10^{9} 내지 1×10^{10}, 1×10^{10} 내지 5×10^{10}, 5×10^{10} 내지 1×10^{11}, 5×10^{11} 내지 1×10^{12}, 1×10^{12} 내지 5×10^{12}, 및 5×10^{12} 내지 1×10^{13}개의 범위에 있다.

[0285] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에서 제공되는 TIL의 농도는 예를 들어, 제약 조성물의 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%, 0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002% 또는 0.0001% w/w, w/v 또는 v/v 미만이다.

[0286] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에서 제공되는 TIL의 농도는 제약 조성물의 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 19.75%, 19.50%, 19.25% 19%, 18.75%, 18.50%, 18.25% 18%, 17.75%, 17.50%, 17.25% 17%, 16.75%, 16.50%, 16.25% 16%, 15.75%, 15.50%, 15.25% 15%, 14.75%, 14.50%, 14.25% 14%, 13.75%, 13.50%, 13.25% 13%, 12.75%, 12.50%, 12.25% 12%, 11.75%, 11.50%, 11.25% 11%, 10.75%, 10.50%, 10.25% 10%, 9.75%, 9.50%, 9.25% 9%, 8.75%, 8.50%, 8.25% 8%, 7.75%, 7.50%, 7.25% 7%, 6.75%, 6.50%, 6.25% 6%, 5.75%, 5.50%, 5.25% 5%, 4.75%, 4.50%, 4.25%, 4%, 3.75%, 3.50%, 3.25%, 3%, 2.75%, 2.50%, 2.25%, 2%, 1.75%, 1.50%, 125%, 1%, 0.5%, 0.4%, 0.3%, 0.2%, 0.1%, 0.09%, 0.08%, 0.07%, 0.06%, 0.05%, 0.04%, 0.03%, 0.02%, 0.01%,

0.009%, 0.008%, 0.007%, 0.006%, 0.005%, 0.004%, 0.003%, 0.002%, 0.001%, 0.0009%, 0.0008%, 0.0007%, 0.0006%, 0.0005%, 0.0004%, 0.0003%, 0.0002% 또는 0.0001% w/w, w/v, 또는 v/v 초과이다.

[0287] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에서 제공되는 TIL의 농도는 제약 조성물의 약 0.0001% 내지 약 50%, 약 0.001% 내지 약 40%, 약 0.01% 내지 약 30%, 약 0.02% 내지 약 29%, 약 0.03% 내지 약 28%, 약 0.04% 내지 약 27%, 약 0.05% 내지 약 26%, 약 0.06% 내지 약 25%, 약 0.07% 내지 약 24%, 약 0.08% 내지 약 23%, 약 0.09% 내지 약 22%, 약 0.1% 내지 약 21%, 약 0.2% 내지 약 20%, 약 0.3% 내지 약 19%, 약 0.4% 내지 약 18%, 약 0.5% 내지 약 17%, 약 0.6% 내지 약 16%, 약 0.7% 내지 약 15%, 약 0.8% 내지 약 14%, 약 0.9% 내지 약 12% 또는 약 1% 내지 약 10% w/w, w/v 또는 v/v의 범위에 있다.

[0288] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에서 제공되는 TIL의 농도는 제약 조성물의 약 0.001% 내지 약 10%, 약 0.01% 내지 약 5%, 약 0.02% 내지 약 4.5%, 약 0.03% 내지 약 4%, 약 0.04% 내지 약 3.5%, 약 0.05% 내지 약 3%, 약 0.06% 내지 약 2.5%, 약 0.07% 내지 약 2%, 약 0.08% 내지 약 1.5%, 약 0.09% 내지 약 1%, 약 0.1% 내지 약 0.9% w/w, w/v 또는 v/v의 범위에 있다.

[0289] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에서 제공되는 TIL의 양은 10 g, 9.5 g, 9.0 g, 8.5 g, 8.0 g, 7.5 g, 7.0 g, 6.5 g, 6.0 g, 5.5 g, 5.0 g, 4.5 g, 4.0 g, 3.5 g, 3.0 g, 2.5 g, 2.0 g, 1.5 g, 1.0 g, 0.95 g, 0.9 g, 0.85 g, 0.8 g, 0.75 g, 0.7 g, 0.65 g, 0.6 g, 0.55 g, 0.5 g, 0.45 g, 0.4 g, 0.35 g, 0.3 g, 0.25 g, 0.2 g, 0.15 g, 0.1 g, 0.09 g, 0.08 g, 0.07 g, 0.06 g, 0.05 g, 0.04 g, 0.03 g, 0.02 g, 0.01 g, 0.009 g, 0.008 g, 0.007 g, 0.006 g, 0.005 g, 0.004 g, 0.003 g, 0.002 g, 0.001 g, 0.0009 g, 0.0008 g, 0.0007 g, 0.0006 g, 0.0005 g, 0.0004 g, 0.0003 g, 0.0002 g, 또는 0.0001 g 이하이다.

[0290] 일부 실시양태에서, 본 발명의 제약 조성물에서 제공되는 TIL의 양은 0.0001 g, 0.0002 g, 0.0003 g, 0.0004 g, 0.0005 g, 0.0006 g, 0.0007 g, 0.0008 g, 0.0009 g, 0.001 g, 0.0015 g, 0.002 g, 0.0025 g, 0.003 g, 0.0035 g, 0.004 g, 0.0045 g, 0.005 g, 0.0055 g, 0.006 g, 0.0065 g, 0.007 g, 0.0075 g, 0.008 g, 0.0085 g, 0.009 g, 0.0095 g, 0.01 g, 0.015 g, 0.02 g, 0.025 g, 0.03 g, 0.035 g, 0.04 g, 0.045 g, 0.05 g, 0.055 g, 0.06 g, 0.065 g, 0.07 g, 0.075 g, 0.08 g, 0.085 g, 0.09 g, 0.095 g, 0.1 g, 0.15 g, 0.2 g, 0.25 g, 0.3 g, 0.35 g, 0.4 g, 0.45 g, 0.5 g, 0.55 g, 0.6 g, 0.65 g, 0.7 g, 0.75 g, 0.8 g, 0.85 g, 0.9 g, 0.95 g, 1 g, 1.5 g, 2 g, 2.5, 3 g, 3.5, 4 g, 4.5 g, 5 g, 5.5 g, 6 g, 6.5 g, 7 g, 7.5 g, 8 g, 8.5 g, 9 g, 9.5 g, 또는 10 g 초과이다.

[0291] 본 발명의 제약 조성물에서 제공되는 TIL은 폭넓은 투여량 범위에 걸쳐 유효하다. 정확한 투여량은 투여 경로, 화합물이 투여되는 형태, 치료되는 대상체의 성별 및 연령, 치료되는 대상체의 체중, 및 담당 의사의 선호도 및 경험에 의존할 것이다. TIL의 임상적으로-확립된 투여량은 또한 적절할 경우 사용될 수 있다. 본원의 방법을 사용하여 투여되는 제약 조성물의 양, 예컨대 TIL의 투여량은 치료되는 인간 또는 포유동물, 장애 또는 상태의 중증도, 투여 속도, 활성 제약 성분의 성향 및 처방하는 의사의 재량에 의존적일 것이다.

[0292] 일부 실시양태에서, TIL은 단일 용량으로 투여될 수 있다. 이러한 투여는 주사, 예를 들어, 정맥내 주사에 의한 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL은 다중 용량으로 투여될 수 있다. 투여는 1년 당 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 또는 6회 초과일 수 있다. 투여는 1개월에 1회, 2주마다 1회, 1주에 1회, 또는 2일마다 1회일 수 있다. TIL의 투여는 필요한 만큼 길게 계속될 수 있다.

[0293] 일부 실시양태에서, TIL의 유효 투여량은 약 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}, 및 9×10^{13}개이다. 일부 실시양태에서, TIL의 유효 투여량은 1×10^{6} 내지 5×10^{6}, 5×10^{6} 내지 1×10^{7}, 1×10^{7} 내지 5×10^{7}, 5×10^{7} 내지 1×10^{8}, 1×10^{8} 내지 5×10^{8}, 5×10^{8} 내지 1×10^{9}, 1×10^{9} 내지 5×10^{9}, 5×10^{9} 내지 1×10^{10}, 1×10^{10} 내지 5×10^{10}, 5×10^{10} 내지 1×10^{11}, 5×10^{11} 내지 1×10^{12}, 1×10^{12} 내지 5×10^{12}, 및 5×10^{12} 내지 $1\times$

10^{13}개의 범위에 있다.

[0294] 일부 실시양태에서, TIL의 유효 투여량은 약 0.01 mg/kg 내지 약 4.3 mg/kg, 약 0.15 mg/kg 내지 약 3.6 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 3.2 mg/kg, 약 0.35 mg/kg 내지 약 2.85 mg/kg, 약 0.15 mg/kg 내지 약 2.85 mg/kg, 약 0.3 mg 내지 약 2.15 mg/kg, 약 0.45 mg/kg 내지 약 1.7 mg/kg, 약 0.15 mg/kg 내지 약 1.3 mg/kg, 약 0.3 mg/kg 내지 약 1.15 mg/kg, 약 0.45 mg/kg 내지 약 1 mg/kg, 약 0.55 mg/kg 내지 약 0.85 mg/kg, 약 0.65 mg/kg 내지 약 0.8 mg/kg, 약 0.7 mg/kg 내지 약 0.75 mg/kg, 약 0.7 mg/kg 내지 약 2.15 mg/kg, 약 0.85 mg/kg 내지 약 2 mg/kg, 약 1 mg/kg 내지 약 1.85 mg/kg, 약 1.15 mg/kg 내지 약 1.7 mg/kg, 약 1.3 mg/kg mg 내지 약 1.6 mg/kg, 약 1.35 mg/kg 내지 약 1.5 mg/kg, 약 2.15 mg/kg 내지 약 3.6 mg/kg, 약 2.3 mg/kg 내지 약 3.4 mg/kg, 약 2.4 mg/kg 내지 약 3.3 mg/kg, 약 2.6 mg/kg 내지 약 3.15 mg/kg, 약 2.7 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 약 2.8 mg/kg 내지 약 3 mg/kg, 또는 약 2.85 mg/kg 내지 약 2.95 mg/kg의 범위에 있다.

[0295] 일부 실시양태에서, TIL의 유효 투여량은 약 1 mg 내지 약 500 mg, 약 10 mg 내지 약 300 mg, 약 20 mg 내지 약 250 mg, 약 25 mg 내지 약 200 mg, 약 1 mg 내지 약 50 mg, 약 5 mg 내지 약 45 mg, 약 10 mg 내지 약 40 mg, 약 15 mg 내지 약 35 mg, 약 20 mg 내지 약 30 mg, 약 23 mg 내지 약 28 mg, 약 50 mg 내지 약 150 mg, 약 60 mg 내지 약 140 mg, 약 70 mg 내지 약 130 mg, 약 80 mg 내지 약 120 mg, 약 90 mg 내지 약 110 mg, 또는 약 95 mg 내지 약 105 mg, 약 98 mg 내지 약 102 mg, 약 150 mg 내지 약 250 mg, 약 160 mg 내지 약 240 mg, 약 170 mg 내지 약 230 mg, 약 180 mg 내지 약 220 mg, 약 190 mg 내지 약 210 mg, 약 195 mg 내지 약 205 mg, 또는 약 198 내지 약 207 mg의 범위에 있다.

[0296] TIL의 유효량은 단일 또는 다중 용량 중 어느 하나로 비내 및 경피 경로, 동맥내 주사, 정맥내로, 복강내로, 비경구로, 근육내로, 피하로, 국소적으로, 이식에 의해, 또는 흡입에 의해를 비롯한 유사한 유용성을 갖는 작용제의 허용된 투여 방식 중 임의의 것에 의해 투여될 수 있다.

[0297] **G. 임의적 세포 생존력 분석**

[0298] 임의로, 세포 생존력 검정은 단계 B 제1 확장 후에 관련 기술분야에 공지된 표준 검정을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 죽은 세포를 선택적으로 표지하고, 생존력 평가를 허용하는 트리판 블루 배제 검정은 벌크한 TIL의 샘플에 대해 수행될 수 있다. 생존력을 시험하는 데 사용하기 위한 다른 검정으로는 알라마 블루 (Alamar blue) 검정; 및 MTT 검정을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0299] 1. 세포 카운트, 생존력, 유동 세포측정법

[0300] 일부 실시양태에서, 세포 카운트 및/또는 생존력이 측정된다. 마커, 예컨대 CD3, CD4, CD8, 및 CD56, 뿐만 아니라 본원에 개시되거나 기재된 임의의 다른 것 (그러나 이에 제한되지는 않음)의 발현은 항체를 사용한 유동 세포측정법, 예를 들어 비디 바이오-사이언시즈 (BD Bio-sciences) (비디 바이오사이언시즈 (BD Biosciences), 미국 캘리포니아주 산 호세)로부터 시판되는 것들 (그러나 이에 제한되지는 않음)에 의해 팍스칸토 (FACSCanto)™ 유동 세포측정기 (비디 바이오사이언시즈)를 사용하여 측정될 수 있다. 세포는 일회용 c-칩 혈구계 (VWR, 미국 일리노이주 바타비아)를 사용하여 수동으로 카운팅될 수 있으며, 생존력은 트리판 블루 염색을 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0301] 일부의 경우, 벌크한 TIL 집단은 하기 논의된 프로토콜을 사용하여 즉시 냉동보존될 수 있다. 대안적으로, 벌크한 TIL 집단은 REP로 처리된 후, 하기 논의된 바와 같이 냉동보존될 수 있다. 유사하게, 유전적으로 변형된 TIL이 요법에 사용될 것인 경우, 벌크한 또는 REP TIL 집단은 적합한 처리를 위해 유전적 변형으로 처리될 수 있다.

[0302] 2. 세포 배양

[0303] 한 실시양태에서, TIL을 확장시키는 방법은 약 5,000 mL 내지 약 25,000 mL의 세포 배지, 약 5,000 mL 내지 약 10,000 mL의 세포 배지, 또는 약 5,800 mL 내지 약 8,700 mL의 세포 배지를 사용하는 것을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, TIL의 수를 확장시키는 것은 1가지 이하의 유형의 세포 배양 배지를 사용한다. 임의의 적합한 세포 배양 배지, 예를 들어, AIM-V 세포 배지 (L-글루타민, 50 μM 스트렙토마이신 술페이트, 및 10 μM 겐타미신 술페이트) 세포 배양 배지 (인비트로젠 (Invitrogen), 미국 캘리포니아주 칼스배드)가 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명 방법은 유리하게는 TIL의 수를 확장시키는 데 요구되는 배지의 양 및 배지의 유형의 수를 감소시킨다. 한 실시양태에서, TIL의 수를 확장시키는 것은 3일 또는 4일마다 이하의 빈도로 신선한 세포 배양 배지를 세포에 첨가하는 것 (세포를 공급하는 것으로도 지칭됨)을 포함할 수 있다. 기체 투과성 용기에서 세포

의 수를 확장시키는 것은 세포를 확장시키는 데 필요한 공급 빈도를 감소시킴으로써 세포의 수를 확장시키는 데 필요한 절차를 간소화한다.

[0304] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 기체 투과성 용기에서의 세포 배지는 비여과된다. 비여과된 세포 배지의 사용은 세포의 수를 확장시키는 데 필요한 절차를 간소화할 수 있다. 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 기체 투과성 용기에서의 세포 배지는 베타-머캅토에탄올 (BME)이 결여된다.

[0305] 한 실시양태에서, 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 얻고; 종양 조직 샘플을 그 안에 세포 배지를 함유하는 제1 기체 투과성 용기에서 배양하고; 종양 조직 샘플로부터 TIL을 얻고; TIL의 수를 약 14 내지 약 42일, 예를 들어, 약 28일의 지속기간 동안 aAPC를 사용하여 그 안에 세포 배지를 함유하는 제2 기체 투과성 용기에서 확장시키는 것을 포함하는 방법의 지속기간.

[0306] 한 실시양태에서, TIL은 기체-투과성 용기에서 확장된다. 기체-투과성 용기는 그의 개시내용이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 출원 공개 제2005/0106717 A1호에 기재된 것들을 비롯한 관련 기술분야에 공지된 방법, 조성물, 및 장치를 사용하여 PBMC를 사용하여 TIL을 확장시키는 데 사용되었다. 한 실시양태에서, TIL은 기체-투과성 백에서 확장된다. 한 실시양태에서, TIL은 기체 투과성 백, 예컨대 주리 세포 확장 시스템 W25 (지이 헬스케어 (GE Healthcare))에서 TIL을 확장시키는 세포 확장 시스템을 사용하여 확장된다. 한 실시양태에서, TIL은 기체 투과성 백, 예컨대 주리 세포 확장 시스템 W5 (지이 헬스케어)로도 공지된 웨이브 생물반응기 시스템 (WAVE Bioreactor System)에서 TIL을 확장시키는 세포 확장 시스템을 사용하여 확장된다. 한 실시양태에서, 세포 확장 시스템은 약 100 mL, 약 200 mL, 약 300 mL, 약 400 mL, 약 500 mL, 약 600 mL, 약 700 mL, 약 800 mL, 약 900 mL, 약 1 L, 약 2 L, 약 3 L, 약 4 L, 약 5 L, 약 6 L, 약 7 L, 약 8 L, 약 9 L, 및 약 10 L로 이루어진 군으로부터 선택되는 부피를 갖는 기체 투과성 세포 백을 포함한다. 한 실시양태에서, TIL은 G-렉스 플라스크 (윌슨 울프 매뉴팩처링으로부터 시판됨)에서 확장될 수 있다. 이러한 실시양태는 세포 집단이 약 5×10^5 개의 세포/cm^2 내지 10×10^6 내지 30×10^6개의 세포/cm^2로 확장되는 것을 허용한다. 한 실시양태에서, 이 확장은 신선한 세포 배양 배지를 세포에 첨가 (세포를 공급하는 것으로도 지칭됨)하지 않고 수행된다. 한 실시양태에서, 이는 배지가 G-렉스 플라스크에서 약 10 cm의 높이로 있는 한 공급이 없다. 한 실시양태에서, 이는 공급이 없지만, 1종 이상의 시토카인의 첨가를 갖는다. 한 실시양태에서, 시토카인은 시토카인을 배지와 혼합할 임의의 필요 없이 볼루스로서 첨가될 수 있다. 이러한 용기, 장치, 및 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, TIL을 확장시키는 데 사용되었고, 미국 특허 출원 공개 제US 2014/0377739A1호, 국제 공개 제WO 2014/210036 A1호, 미국 특허 출원 공개 제us 2013/0115617 A1호, 국제 공개 제WO 2013/188427 A1호, 미국 특허 출원 공개 제US 2011/0136228 A1호, 미국 특허 제US 8,809,050 B2호, 국제 공개 제WO 2011/072088 A2호, 미국 특허 출원 공개 제US 2016/0208216 A1호, 미국 특허 출원 공개 제US 2012/0244133 A1호, 국제 공개 제WO 2012/129201 A1호, 미국 특허 출원 공개 제US 2013/0102075 A1호, 미국 특허 제US 8,956,860 B2호, 국제 공개 제WO 2013/173835 A1호, 미국 특허 출원 공개 제US 2015/0175966 A1호에 기재된 것들을 포함하며, 이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. 이러한 프로세스는 또한 문헌 [Jin *et al.*, *J. Immunotherapy,* **2012,** 35:283-292]에 기재되어 있다.

[0307] TIL의 임의적 유전적 조작

[0308] 일부 실시양태에서, TIL은 고-친화도 T 세포 수용체 (TCR), 예를 들어, 종양-연관된 항원, 예컨대 MAGE-1, HER2, 또는 NY-ESO-1, 또는 종양-연관된 세포 표면 분자 (예를 들어, 메소텔린) 또는 계통-제한된 세포 표면 분자 (예를 들어, CD19)에 결합하는 키메라 항원 수용체 (CAR)에서 표적화된 TCR을 포함하나 이에 제한되지는 않는 추가의 기능성을 포함하도록 임의로 유전적으로 조작된다.

[0309] **H. TIL의 임의적 냉동보존**

[0310] 상기 논의되고, 도 27에서 제공된 바와 같은 단계 A 내지 E에서 예시된 바와 같이, 냉동보존은 TIL 확장 프로세스 전반에 걸쳐 다수의 시점에서 일어날 수 있다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 (예를 들어, 도 27의 단계 D에 따라 제공된 바와 같음) 후의 TIL의 확장된 집단은 냉동보존될 수 있다. 냉동보존은 일반적으로 TIL 집단을 동결 용액, 예를 들어, 85% 보체 불활성화된 AB 혈청 및 15% 디메틸 술폭시드 (DMSO) 내로 정치함으로써 달성될 수 있다. 용액 중의 세포를 냉동 바이알 내로 정치하고, 냉동보존을 위한 기체성 질소 동결기로의 임의적 이동과 함께, -80 ℃에서 24시간 동안 저장한다. 문헌 [Sadeghi, *et al., Acta Oncologica* **2013,** *52,* 978-986]을 참조한다. 일부 실시양태에서, TIL은 5% DMSO에서 냉동보존된다. 일부 실시양태에서, TIL은 세포 배양 배지 더하기 5% DMSO에서 냉동보존된다. 일부 실시양태에서, TIL은 실시예 8 및 9에서 제공된 방법에 따라 냉동보

존된다.

[0311] 적절할 경우, 세포를 동결기로부터 제거하고, 37 ℃ 수조에서 용액의 대략 4/5가 해동될 때까지 해동시킨다. 세포를 일반적으로 완전 배지에 재현탁시키고, 임의로 1회 이상 세척한다. 일부 실시양태에서, 해동된 TIL을 카운팅하고, 관련 기술분야에서 공지된 바와 같이 생존력에 대해 평가할 수 있다.

[0312] **I. 확장된 TIL의 표현형적 특징**

[0313] 일부 실시양태에서, TIL은 본원에 및 실시예에 기재된 것들을 비롯한 확장 후에 다수의 표현형 마커의 발현에 대해 분석된다. 한 실시양태에서, 1종 이상의 표현형적 마커의 발현이 조사된다. 일부 실시양태에서, TIL의 표현형적 특징은 단계 B에서의 제1 확장 후에 분석된다. 일부 실시양태에서, TIL의 표현형적 특징은 단계 C에서의 이행 동안 분석된다. 일부 실시양태에서, TIL의 표현형적 특징은 단계 C에 따른 이행 동안 및 냉동보존 후에 분석된다. 일부 실시양태에서, TIL의 표현형적 특징은 단계 D에 따른 제2 확장 후에 분석된다. 일부 실시양태에서, TIL의 표현형적 특징은 단계 D에 따른 2회 이상의 확장 후에 분석된다. 일부 실시양태에서, 마커는 TCRab (즉, TCRα/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, CD8a, CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38, 및 HLA-DR로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 마커는 TCRab (즉, TCRα/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, 및 CD8a로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 마커는 CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38, 및 HLA-DR로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14개의 마커의 발현이 조사된다. 일부 실시양태에서, 각각의 군으로부터의 1종 이상의 마커로부터의 발현이 조사된다. 일부 실시양태에서, HLA-DR, CD38, 및 CD69 발현 중 1종 이상은 해동된 TIL에 비해 신선한 TIL에서 유지된다 (즉, 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않음). 일부 실시양태에서, TIL의 활성화 상태는 해동된 TIL에서 유지된다.

[0314] 한 실시양태에서, 1종 이상의 조절성 마커의 발현이 측정된다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD-1, TIM-3, CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1, 및 CD154로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD-1, 및 TIM-3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1, 및 CD154로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 조절성 분자 발현은 신선한 TIL에 비해 해동된 TIL에서 감소된다. 일부 실시양태에서, 조절성 분자 LAG-3 및 TIM-3의 발현은 신선한 TIL에 비해 해동된 TIL에서 감소된다. 일부 실시양태에서, CD4, CD8, NK, TCRαβ 발현의 유의한 차이가 없다. 일부 실시양태에서, 해동된 TIL에 비해 신선한 TIL에서 CD4, CD8, NK, TCRαβ 발현, 및/또는 기억 마커의 유의한 차이가 없다. 일부 실시양태에서, 예를 들어 도 27에 예시된 바와 같이 본원에서 제공된 방법에 의해 제조된 TIL, 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL 사이에 CD4, CD8, NK, TCRαβ 발현의 유의한 차이가 없다.

[0315] 일부 실시양태에서, CD4, CD8, 및/또는 NK, TCRαβ 발현에 기초한 TIL의 제1 집단, TIL의 제2 집단, TIL의 제3 집단, 수확된 TIL 집단, 및/또는 치료 TIL 집단의 선택은 상기 논의된 또는 예를 들어 도 27에 제공된 바와 같은 것들을 비롯한 단계 중 임의의 것 동안 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD4, CD8, 및/또는 NK, TCRαβ에 기초한 TIL의 제1 집단의 선택은 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD4, CD8, 및/또는 NK, TCRαβ 발현에 기초한 TIL의 제2 집단의 선택은 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD4, CD8, 및/또는 NK, TCRαβ 발현에 기초한 TIL의 제3 집단의 선택은 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD4, CD8, 및/또는 NK, TCRαβ 발현에 기초한 TIL의 수확된 집단의 선택은 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD4, CD8, 및/또는 NK, TCRαβ 발현에 기초한 TIL의 치료 집단의 선택은 수행되지 않는다.

[0316] 한 실시양태에서, CD4, CD8, 및/또는 NK, TCRαβ 발현에 기초한 TIL의 제1 집단, TIL의 제2 집단, TIL의 제3 집단, 또는 수확된 TIL 집단의 선택은

[0317] (a) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 환자로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0318] (b) 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계;

[0319] (c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0320] (d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0321] (e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0322] (f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남)

[0323] 를 포함하는, 종양 침윤 림프구 (TIL)를 TIL의 치료 집단으로 확장시키는 방법의 단계 (a) 내지 (f) 중 임의의 것 동안 수행되지 않는다.

[0324] 한 실시양태에서, CD4, CD8, 및/또는 NK, TCRαβ 발현에 기초한 TIL의 제1 집단, TIL의 제2 집단, TIL의 제3 집단, 또는 수확된 TIL 집단의 선택은

[0325] (a) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 대상체로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0326] (b) 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계;

[0327] (c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0328] (d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0329] (e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0330] (f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남);

[0331] (g) 임의로 단계 (f)로부터의 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계;

[0332] (h) 단계 (g)에서의 주입 백으로부터의 TIL의 제3 집단의 치료 유효 투여량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 확장된 종양 침윤 림프구 (TIL)를 투여하는 것을 포함하는 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법의 단계 (a) 내지 (h) 중 임의의 것 동안 수행되지 않는다.

[0333] 일부 실시양태에서, 기억 마커는 CCR7 및 CD62L로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0334] 일부 실시양태에서, 해동된 TIL에 비한 신선한 TIL의 생존력은 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%이다. 일부 실시양태에서, 신선한 및 해동된 TIL 둘 다의 생존력은 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 98% 초과이다. 일부 실시양태에서, 신선한 및 해동된 생성물 둘 다의 생존력은 80% 초과, 81% 초과, 82% 초과, 83% 초과, 84% 초과, 85% 초과, 86% 초과, 87% 초과, 88% 초과, 89% 초과, 또는 90% 초과이다. 일부 실시양태에서, 신선한 및 해동된 생성물 둘 다의 생존력은 86% 초과이다.

[0335] 한 실시양태에서, 재자극된 TIL은 또한 시토카인 방출 검정을 사용하여 시토카인 방출에 대해 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL은 OKT3으로의 또는 자가 종양 소화물과의 공동-배양물 중 어느 하나로의 자극에 반응하여 인터페론-7 (IFN-7) 분비에 대해 평가될 수 있다. 예를 들어, OKT3 자극을 채용하는 실시양태에서, TIL을

광범위하게 세척하고, 이중 웰을 포스페이트-완충 염수에 희석된 0.1 또는 1.0 μg/mL의 OKT3으로 사전코팅된 96-웰 평저 플레이트에서 0.2 mL CM 중 1 × 10^5개의 세포로 제조한다. 밤샘 인큐베이션 후, 상청액을 수확하고, 상청액 중의 IFN-7을 ELISA (피어스 (Pierce)/엔도겐 (Endogen), 미국 매사추세츠주 우번)에 의해 측정한다. 공동-배양 검정을 위해, 1 × 10^5개의 TIL 세포를 자가 종양 세포 (1:1 비)를 갖는 96-웰 플레이트 내로 정치한다. 24-시간 인큐베이션 후, 상청액을 수확하고, IFN-7 방출을 예를 들어 ELISA에 의해 정량화할 수 있다.

[0336] 세포 표면 바이오마커의 유동 세포측정 분석: TIL 샘플을 세포 표면 마커의 유동 세포측정 분석을 위해 분취하였다. 예를 들어, 실시예 7, 8, 및 9를 참조한다.

[0337] 일부 실시양태에서, TIL은 다양한 조절성 마커에 대해 평가되고 있다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 TCR α/β, CD56, CD27, CD28, CD57, CD45RA, CD45RO, CD25, CD127, CD95, IL-2R-, CCR7, CD62L, KLRG1, 및 CD122로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 TCR α/β이다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD56이다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD27이다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD28이다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD57이다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD45RA이다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD45RO이다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD25이다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD127이다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD95이다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 IL-2R-이다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CCR7이다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD62L이다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 KLRG1이다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD122이다.

[0338] 한 실시양태에서, 확장된 TIL은 본원에 및 실시예에 기재된 것들을 비롯한 다수의 표현형 마커의 발현에 대해 분석된다. 한 실시양태에서, 1종 이상의 표현형적 마커의 발현이 조사된다. 일부 실시양태에서, 마커는 TCRab (즉, TCRα/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, CD8a, CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38, 및 HLA-DR로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 마커는 TCRab (즉, TCRα/β), CD57, CD28, CD4, CD27, CD56, 및 CD8a로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 실시양태에서, 마커는 CD45RA, CD8a, CCR7, CD4, CD3, CD38, 및 HLA-DR로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14개의 마커의 발현이 조사된다. 일부 실시양태에서, 각각의 군으로부터의 1종 이상의 마커로부터의 발현이 조사된다. 일부 실시양태에서, HLA-DR, CD38, 및 CD69 발현 중 1종 이상은 해동된 TIL에 비해 신선한 TIL에서 유지된다 (즉, 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않음). 일부 실시양태에서, TIL의 활성화 상태는 해동된 TIL에서 유지된다.

[0339] 한 실시양태에서, 1종 이상의 조절성 마커의 발현이 측정된다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD1, TIM-3, CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1, 및 CD154로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD137, CD8a, Lag3, CD4, CD3, PD1, 및 TIM-3으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 조절성 마커는 CD69, CD8a, TIGIT, CD4, CD3, KLRG1, 및 CD154로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 조절성 분자 발현은 신선한 TIL에 비해 해동된 TIL에서 감소된다. 일부 실시양태에서, 조절성 분자 LAG-3 및 TIM-3의 발현은 신선한 TIL에 비해 해동된 TIL에서 감소된다. 일부 실시양태에서, CD4, CD8, NK, TCRαβ 발현의 유의한 차이가 없다. 일부 실시양태에서, 해동된 TIL에 비해 신선한 TIL에서 CD4, CD8, NK, TCRαβ 발현, 및/또는 기억 마커의 유의한 차이가 없다.

[0340] 일부 실시양태에서, 기억 마커는 CCR7 및 CD62L로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0341] 일부 실시양태에서, 해동된 TIL에 비한 신선한 TIL의 생존력은 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 98%이다. 일부 실시양태에서, 신선한 및 해동된 TIL 둘 다의 생존력은 70% 초과, 75% 초과, 80% 초과, 85% 초과, 90% 초과, 95% 초과, 또는 98% 초과이다. 일부 실시양태에서, 신선한 및 해동된 생성물 둘 다의 생존력은 80% 초과, 81% 초과, 82% 초과, 83% 초과, 84% 초과, 85% 초과, 86% 초과, 87% 초과, 88% 초과, 89% 초과, 또는 90% 초과이다. 일부 실시양태에서, 신선한 및 해동된 생성물 둘 다의 생존력은 86% 초과이다.

[0342] 한 실시양태에서, 재자극된 TIL은 또한 시토카인 방출 검정을 사용하여 시토카인 방출에 대해 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL은 OKT3으로의 또는 자가 종양 소화물과의 공동배양물 중 어느 하나로의 자극에 반응하여 인터페론-7 (IFN-7) 분비에 대해 평가될 수 있다. 예를 들어, OKT3 자극을 채용하는 실시양태에서, TIL을 광범위하게 세척하고, 이중 웰을 포스페이트-완충 염수에 희석된 0.1 또는 1.0 μg/mL의 OKT3으로 사전코팅된 96-웰 평저 플레이트에서 0.2 mL CM 중 1 × 10^5개의 세포로 제조한다. 밤샘 인큐베이션 후, 상청액을 수확하

고, 상청액 중의 IFN-7을 ELISA (피어스/엔도겐, 미국 매사추세츠주 우번)에 의해 측정한다. 공동배양 검정을 위해, 1 × 10^5개의 TIL 세포를 자가 종양 세포 (1:1 비)를 갖는 96-웰 플레이트 내로 정치한다. 24-시간 인큐베이션 후, 상청액을 수확하고, IFN-7 방출을 예를 들어 ELISA에 의해 정량화할 수 있다.

[0343] 일부 실시양태에서, 표현형적 특징규명은 냉동보존 후에 조사된다.

[0344] **J. 확장된 TIL의 대사적 건강**

[0345] 재자극된 TIL은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 해동된 후 TIL 중 어느 하나에 비해 기저 당분해의 유의한 향상을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 제1 집단, TIL의 제2 집단, TIL의 제3 집단, 수확된 TIL 집단, 및/또는 치료 TIL 집단의 선택은 상기 논의된 또는 예를 들어 도 27에서 제공된 바와 같은 것들을 비롯한 단계 중 임의의 것 동안 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 제1 집단의 선택은 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 제2 집단의 선택은 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 제3 집단의 선택은 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 수확된 집단의 선택은 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 치료 집단의 선택은 수행되지 않는다.

[0346] 한 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 제1 집단, TIL의 제2 집단, TIL의 제3 집단, 또는 수확된 TIL 집단의 선택은

[0347] (a) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 환자로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0348] (b) 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계;

[0349] (c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0350] (d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0351] (e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0352] (f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남)

[0353] 를 포함하는, 종양 침윤 림프구 (TIL)를 TIL의 치료 집단으로 확장시키는 방법의 단계 (a) 내지 (f) 중 임의의 것 동안 수행되지 않는다.

[0354] 한 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 제1 집단, TIL의 제2 집단, TIL의 제3 집단, 또는 수확된 TIL 집단의 선택은

[0355] (a) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 대상체로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0356] (b) 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계;

[0357] (c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0358] (d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제

3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0359] (e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0360] (f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남);

[0361] (g) 임의로 단계 (f)로부터의 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계;

[0362] (h) 단계 (g)에서의 주입 백으로부터의 TIL의 제3 집단의 치료 유효 투여량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 확장된 종양 침윤 림프구 (TIL)를 투여하는 것을 포함하는 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법의 단계 (a) 내지 (h) 중 임의의 것 동안 수행되지 않는다.

[0363] 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 TIL은 예를 들어, 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 비해 기저 당분해의 유의한 향상을 특징으로 한다. 한 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 제1 집단, TIL의 제2 집단, TIL의 제3 집단, 수확된 TIL 집단, 및/또는 치료 TIL 집단의 선택은 상기 논의된 또는 예를 들어 도 27에서 제공된 바와 같은 것들을 비롯한 단계 중 임의의 것 동안 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 제1 집단의 선택은 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 제2 집단의 선택은 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 제3 집단의 선택은 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 수확된 집단의 선택은 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 치료 집단의 선택은 수행되지 않는다. 한 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 제1 집단, TIL의 제2 집단, TIL의 제3 집단, 또는 수확된 TIL 집단의 선택은 단계 (a) 내지 (h) 중 임의의 것 동안 수행되지 않는다.

[0364] 예비 호흡 용량 (SRC) 및 당분해 예비력은 본 개시내용의 상이한 방법으로 확장된 TIL에 대해 평가될 수 있다. 씨호스 XF 셀 미토 스트레스 시험 (Seahorse XF Cell Mito Stress Test)은 미토콘드리아에서의 전자 수송 쇄의 성분을 표적화하는 호흡의 조정인자를 사용하여, 세포의 산소 소비율 (OCR)을 직접적으로 측정함으로써 미토콘드리아 기능을 측정한다. 시험 화합물 (올리고마이신, FCCP, 및 하기 기재된 로테논 및 안티마이신 A의 믹스)을 연속적으로 주사하여 ATP 생산, 최대 호흡, 및 비-미토콘드리아 호흡을 각각 측정한다. 그 후, 양성자 누출 및 예비 호흡 용량을 이들 파라미터 및 기저 호흡을 사용하여 계산한다. 각각의 조정인자는 전자 수송 쇄의 특이적 성분을 표적화한다. 올리고마이신은 ATP 신타제 (복합체 V)를 억제하며, 올리고마이신의 주사 후의 OCR의 감소는 세포성 ATP 생산과 연관된 미토콘드리아 호흡과 상관된다. 카르보닐 시아나이드-4 (트리플루오로메톡시) 페닐히드라존 (FCCP)은 양성자 구배를 붕괴시키고, 미토콘드리아 막 잠재성을 파괴하는 비커플링제이다. 그 결과, 전자 수송 쇄를 통한 전자 유동은 비억제되고, 산소는 복합체 IV에 의해 최대로 소비된다. 그 후, FCCP-자극된 OCR을 사용하여, 최대 호흡 및 기저 호흡 사이의 차이로서 정의되는 예비 호흡 용량을 계산할 수 있다. 예비 호흡 용량 (SRC)은 증가된 에너지 수요에 반응하는 세포의 능력의 척도이다. 제3 주사는 로테논, 복합체 I 억제제, 및 안티마이신 A, 복합체 III 억제제의 믹스이다. 이 조합은 미토콘드리아 호흡을 셧 다운시키며, 미토콘드리아 외부의 프로세스에 의해 유도된 비미토콘드리아 호흡의 계산을 가능하게 한다. 일부 실시양태에서, 비교는 예를 들어, 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 대한 것이다.

[0365] 일부 실시양태에서, 대사적 검정은 기저 호흡이다. 일반적으로, 제2 확장 TIL은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 기저 호흡률의 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 기저 호흡률을 갖는다. 일부 실시양태에서, 기저 호흡률은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 기저 호흡률의 약 50% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 기저 호흡률은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 기저 호흡률의 약 60% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 기저 호흡률은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현

된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 기저 호흡률의 약 70% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 기저 호흡률은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 기저 호흡률의 약 80% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 기저 호흡률은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 기저 호흡률의 약 90% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 기저 호흡률은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 기저 호흡률의 약 95% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 TIL 또는 제2 추가의 확장 TIL (예컨대, 예를 들어, 재REP TIL로 지칭되는 TIL을 비롯한 도 27의 단계 D에 기재된 것들)은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 기저 호흡률과 통계적으로 유의하게 상이하지 않은 기저 호흡률을 갖는다. 일부 실시양태에서, 비교는 예를 들어, 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 대한 것이다.

[0366] 일부 실시양태에서, 대사적 검정은 예비 호흡 용량이다. 일반적으로, 제2 확장 TIL 또는 제2 추가의 확장 TIL (예컨대, 예를 들어, 재REP TIL로 지칭되는 TIL을 비롯한 도 27의 단계 D에 기재된 것들)은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 기저 호흡률의 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 예비 호흡 용량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 예비 호흡 용량은 신선하게 수확된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 50% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 예비 호흡 용량은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 50% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 예비 호흡 용량은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 60% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 예비 호흡 용량은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 70% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 예비 호흡 용량은 신선하게 수확된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 80% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 예비 호흡 용량은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 90% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 예비 호흡 용량은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 95% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 TIL 또는 제2 추가의 확장 TIL (예컨대, 예를 들어, 재REP TIL로 지칭되는 TIL을 비롯한 도 27의 단계 D에 기재된 것들)은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*과 통계적으로 유의하게 상이하지 않은 예비 호흡 용량을 갖는다.

[0367] 일반적으로, 제2 확장 TIL 또는 제2 추가의 확장 TIL (예컨대, 예를 들어, 재REP TIL로 지칭되는 TIL을 비롯한 도 27의 단계 D에 기재된 것들)은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 기저 호흡률의 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 예비 호흡 용량을 갖는다. 일부 실시양태에서, 측정되는 대사적 검정은 당분해 예비력이다. 일부 실시양태에서, 대사적 검정은 예비 호흡 용량이다. 세포성 (호흡) 대사를 측정하기 위해, 세포를 미토콘드리아 호흡 및 당분해의 억제제로 처리하여 하기 척도로 이루어진 TIL에 대한 대사적 프로파일을 측정하였다: 기준선 산화적 인산화 (OCR에 의해 측정된 바와 같음), 예비 호흡 용량, 기준선 당분해 활성 (ECAR에 의해 측정된 바와 같음), 및 당분해 예비력. 대사적 프로파일은 미토콘드리아 ATP 생산의 차단 시 당분해를 수행하는 세포의 용량을 측정하는 것을 허용하는 씨호스 조합 미토콘드리아/당분해 스트레스 시험 검정 (Seahorse Combination Mitochondrial/Glycolysis Stress Test Assay) (애질런트 (Agilent)®로부터 시판되는 키트를 포함함)을 사용하여 수행되었다. 일부 실시양태에서, 세포를 글루코스 고갈시킨 후, 글루코스, 이어서 스트레스제를 주사한다. 일부 실시양태에서, 스트레스제는 올리고마이신, FCCP, 로테논, 안티마이신 A 및/또는 2-데옥시글루코스 (2-DG), 뿐만 아니라 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 올리고마이신은 10 mM로 첨가된다. 일부 실시양태에서, FCCP는 10 mM로 첨가된다. 일부 실시양태에서, 로테논은 2.5 mM로 첨가된다. 일부 실시양태에서, 안티마이신 A는 2.5 mM로 첨가된다. 일부 실

시양태에서, 2-데옥시글루코스 (2-DG)는 500 mM로 첨가된다. 일부 실시양태에서, 당분해 용량, 당분해 예비력, 및/또는 비-당분해 산성화가 측정된다. 일반적으로, TIL은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 기저 호흡률의 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 당분해 예비력을 갖는다. 일부 실시양태에서, 당분해 예비력은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 50% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 당분해 예비력은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 60% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 당분해 예비력은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 70% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 당분해 예비력은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 80% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 당분해 예비력은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 90% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 당분해 예비력은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 95% 내지 약 99%이다.

[0368] 일부 실시양태에서, 대사적 검정은 기저 당분해이다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 TIL 또는 제2 추가의 확장 TIL (예컨대, 예를 들어, 재REP TIL로 지칭되는 TIL을 비롯한 도 27의 단계 D에 기재된 것들)은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 비해 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 또는 적어도 10배의 기저 당분해의 증가를 갖는다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 TIL 또는 제2 추가의 확장 TIL (예컨대, 예를 들어, 재REP TIL로 지칭되는 TIL을 비롯한 도 27의 단계 D에 기재된 것들)은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 비해 약 2배 내지 약 10배의 기저 당분해의 증가를 갖는다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 TIL 또는 제2 추가의 확장 TIL (예컨대, 예를 들어, 재REP TIL로 지칭되는 TIL을 비롯한 도 27의 단계 D에 기재된 것들)은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 비해 약 2배 내지 약 8배의 기저 당분해의 증가를 갖는다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 TIL 또는 제2 추가의 확장 TIL (예컨대, 예를 들어, 재REP TIL로 지칭되는 TIL을 비롯한 도 27의 단계 D에 기재된 것들)은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 비해 약 3배 내지 약 7배의 기저 당분해의 증가를 갖는다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 TIL 또는 제2 추가의 확장 TIL (예컨대, 예를 들어, 재REP TIL로 지칭되는 TIL을 비롯한 도 27의 단계 D에 기재된 것들)은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 비해 약 2배 내지 약 4배의 기저 당분해의 증가를 갖는다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 TIL 또는 제2 추가의 확장 TIL (예컨대, 예를 들어, 재REP TIL로 지칭되는 TIL을 비롯한 도 27의 단계 D에 기재된 것들)은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 비해 약 2배 내지 약 3배의 기저 당분해의 증가를 갖는다.

[0369] 일반적으로, 제2 확장 TIL 또는 제2 추가의 확장 TIL (예컨대, 예를 들어, 재REP TIL로 지칭되는 TIL을 비롯한 도 27의 단계 D에 기재된 것들)은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 기저 호흡률의 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 당분해 예비력을 갖는다. 일부 실시양태에서, 당분해 예비력은 신선하게 수확된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 50% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 당분해 예비력은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 60% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 당분해 예비력은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 70% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 당분해 예비력은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제

공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 80% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 당분해 예비력은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 90% 내지 약 99%이다. 일부 실시양태에서, 당분해 예비력은 신선하게 수확된 TIL의 *기저 호흡률*의 약 95% 내지 약 99%이다.

[0370] 그란자임 B 생산: 그란자임 B는 표적 세포를 살해하는 TIL의 능력의 또다른 척도이다. CD3, CD28, 및 CD137/4-1BB에 대한 항체를 사용하여 상기 기재된 바와 같이 재자극된 배지 상청액을 또한 인간 그란자임 B 듀오세트 (DuoSet) ELISA 키트 (알 앤 디 시스템즈 (R & D Systems), 미국 미네소타주 미네아폴리스)를 제조자의 지시서에 따라 사용하여 그란자임 B의 그들의 수준에 대해 평가하였다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 TIL 또는 제2 추가의 확장 TIL (예컨대, 예를 들어, 재REP TIL로 지칭되는 TIL을 비롯한 도 27의 단계 D에 기재된 것들)은 증가된 그란자임 B 생산을 갖는다. 일부 실시양태에서, 제2 확장 TIL 또는 제2 추가의 확장 TIL (예컨대, 예를 들어, 재REP TIL로 지칭되는 TIL을 비롯한 도 27의 단계 D에 기재된 것들)은 증가된 세포독성 활성을 갖는다.

[0371] 일부 실시양태에서, 텔로미어 길이는 세포 생존력 및/또는 세포 기능의 척도로서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 텔로미어는 놀랍게도 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 비해 본 발명에 의해 제조된 TIL에서 동일한 길이이다. 텔로미어 길이 측정: 다양한 방법이 게놈 DNA 및 세포학적 제제에서 텔로미어의 길이를 측정하는 데 사용되었다. 텔로미어 제한 단편 (TRF) 분석은 텔로미어 길이를 측정하는 금 표준이다 (de Lange et al., 1990). 그러나, TRF의 주요한 제한은 다량의 DNA (1.5 ^g)의 요구이다. 텔로미어 길이의 측정을 위한 2가지 폭넓게 사용되는 기법, 즉, 형광 계내 혼성화 (FISH; 애질런트 테크놀로지즈 (Agilent Technologies), 미국 캘리포니아주 산타 클라라) 및 정량적 PCR은 본 발명으로 채용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 A에서 초기에 수확된 TIL 및 예를 들어 도 27에서 제공된 바와 같은 단계 D로부터의 확장된 TIL 사이의 텔로미어 길이의 변화가 없다.

[0372] 일부 실시양태에서, TIL 건강은 IFN-감마 (IFN-ɣ) 분비에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, IFN-ɣ 분비는 활성 TIL의 지표이다. 일부 실시양태에서, IFN-ɣ 생산에 대한 효능 검정이 채용된다. IFN-ɣ 생산은 세포독성 잠재성의 또다른 척도이다. IFN-ɣ 생산은 CD3, CD28, 및 CD137/4-1BB에 대한 항체로 자극된 TIL의 배지 중의 시토카인 IFN-ɣ의 수준을 측정함으로써 측정될 수 있다. 이들 자극된 TIL로부터의 배지 중의 IFN-ɣ 수준은 IFN-ɣ 방출을 측정함으로써 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어 도 27에서 제공된 바와 같은 단계 A에서의 초기에 수확된 TIL에 비한 예를 들어 도 27에서 제공된 바와 같은 단계 D TIL에서의 IFN-ɣ 생산의 증가는 단계 D TIL의 세포독성 잠재성의 증가의 지표이다. 일부 실시양태에서, IFN-ɣ 분비는 1배, 2배, 3배, 4배, 또는 5배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-ɣ 분비는 1배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-ɣ 분비는 2배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-ɣ 분비는 3배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-ɣ 분비는 4배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-ɣ 분비는 5배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-ɣ는 콴티킨 ELISA 키트를 사용하여 측정된다. 일부 실시양태에서, IFN-ɣ는 TIL에서 생체외에서 측정된다. 일부 실시양태에서, IFN-ɣ는 예를 들어 도 27 방법을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 생산된 TIL, 뿐만 아니라 신선하게 수확된 TIL 또는 다른 방법, 예컨대 예를 들어 도 83에서 제공된 것들에 의해 생산된 TIL (예컨대 예를 들어 프로세스 1C TIL)을 비롯한 TIL에서 생체외에서 측정된다.

[0373] 일부 실시양태에서, 표적 세포를 용해시키는 TIL의 세포독성 잠재성을 TIL 세포독성을 고도 민감성 용량 의존적 방식으로 측정하는 TIL 검정을 위한 생체발광 재지정 용해 검정 (효능 검정)에 따라, 생체발광 세포주, P815 (클론 G6)와의 TIL의 공동-배양 검정을 사용하여 평가하였다.

[0374] 일부 실시양태에서, 본 방법은 상기 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 TIL 생존력을 평가하는 검정을 제공한다. 일부 실시양태에서, TIL은 예를 들어 도 27에서 제공된 바와 같은 것을 비롯하여 상기 논의된 바와 같이 확장된다. 일부 실시양태에서, TIL은 생존력에 대해 평가되기 전에 냉동보존된다. 일부 실시양태에서, 생존력 평가는 제1 확장, 제2 확장, 및 추가의 제2 확장을 수행하기 전에 TIL을 해동시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 세포 증식, 세포 독성, 세포 사멸, 및/또는 TIL 집단의 생존력에 관한 다른 용어를 평가하는 검정을 제공한다. 생존력은 상기 기재된 TIL 대사적 검정 중 임의의 것 뿐만 아니라 관련 기술분야에 공지된 세포 생존력을 평가하기 위한 공지된 임의의 방법에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 도 27에 예시된 것들을 비롯한 본원에 기재된 방법을 사용하여 확장된 TIL의 세포 증식, 세포 독성, 세포 사멸, 및/또는 생존력과 관련된 다른 용어의 평가를 위한 검정을 제공한다.

[0375] 본 발명은 또한 TIL 생존력을 측정하는 검정 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, TIL은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여

제조된 TIL에 비해 동등한 생존력을 갖는다. 일부 실시양태에서, TIL은 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 비해 증가된 생존력을 갖는다. 본 개시내용은

[0376] (i) 이전에 확장된 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0377] (ii) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계;

[0378] (iii) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단보다 수에 있어서 적어도 100배 더 크고, 제2 확장은 TIL의 제3 집단을 얻기 위해 적어도 14일 동안 수행되고, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하고, 제3 집단은 생존력에 대해 추가로 검정됨)

[0379] 를 포함하는, 종양 침윤 림프구 (TIL)를 TIL의 보다 큰 집단으로 확장시킴으로써 TIL을 생존력에 대해 검정하는 방법을 제공한다.

[0380] 일부 실시양태에서, 방법은

[0381] (iv) TIL의 제3 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, 추가의 OKT-3, 및 추가의 APC로 보충함으로써 추가의 제2 확장을 수행하는 단계 (여기서, 추가의 제2 확장은 적어도 14일 동안 수행되어 단계 (iii)에서 얻어진 것보다 TIL의 보다 큰 집단을 얻고, TIL의 보다 큰 집단은 TIL의 제3 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하고, 제3 집단은 생존력에 대해 추가로 검정됨)

[0382] 를 더 포함한다.

[0383] 일부 실시양태에서, 단계 (i) 전에, 세포는 냉동보존된다.

[0384] 일부 실시양태에서, 세포는 단계 (i)을 수행하기 전에 해동된다.

[0385] 일부 실시양태에서, 단계 (iv)는 분석을 위한 충분한 TIL을 얻기 위해 1 내지 4회 반복된다.

[0386] 일부 실시양태에서, 단계 (i) 내지 (iii) 또는 (iv)는 약 40일 내지 약 50일의 기간 내에 수행된다.

[0387] 일부 실시양태에서, 단계 (i) 내지 (iii) 또는 (iv)는 약 42일 내지 약 48일의 기간 내에 수행된다.

[0388] 일부 실시양태에서, 단계 (i) 내지 (iii) 또는 (iv)는 약 42일 내지 약 45일의 기간 내에 수행된다.

[0389] 일부 실시양태에서, 단계 (i) 내지 (iii) 또는 (iv)는 약 44일 내에 수행된다.

[0390] 일부 실시양태에서, 단계 (iii) 또는 (iv)로부터의 세포는 신선하게 수확된 세포와 유사한 수준으로 CD4, CD8, 및 TCR αβ를 발현한다.

[0391] 일부 실시양태에서, 항원 제시 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이다.

[0392] 일부 실시양태에서, PBMC는 단계 (iii)에서 제9일 내지 제17일 중 임의의 날에 세포 배양물에 첨가된다.

[0393] 일부 실시양태에서, 단계 (iv)에서의 TIL의 보다 큰 집단에서의 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 세포의 제3 집단에서의 이펙터 T 세포, 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 CD27의 발현, CD28의 발현, 보다 긴 텔로미어, 증가된 CD57 발현, 및 감소된 CD56 발현으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 나타낸다.

[0394] 일부 실시양태에서, 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 증가된 CD57 발현 및 감소된 CD56 발현을 나타낸다.

[0395] 일부 실시양태에서, APC는 인공 APC (aAPC)이다.

[0396] 일부 실시양태에서, 방법은 TIL의 제1 집단을 고-친화도 T 세포 수용체를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터로 형질도입하는 단계를 더 포함한다.

[0397] 일부 실시양태에서, 형질도입하는 단계는 단계 (i) 전에 일어난다.

[0398] 일부 실시양태에서, 방법은 TIL의 제1 집단을 T-세포 신호화 분자의 적어도 하나의 내도메인과 융합된 단일 쇄

가변 단편 항체를 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터로 형질도입하는 단계를 더 포함한다.

[0399] 일부 실시양태에서, 형질도입하는 단계는 단계 (i) 전에 일어난다.

[0400] 일부 실시양태에서, TIL은 생존력에 대해 검정된다.

[0401] 일부 실시양태에서, TIL은 냉동보존 후에 생존력에 대해 검정된다.

[0402] 일부 실시양태에서, TIL은 냉동보존 후에 및 단계 (iv) 후에 생존력에 대해 검정된다.

[0403] T 및 B 림프구의 다양한 항원 수용체는 제한된, 그러나 다수의 유전자 절편의 체세포적 재조합에 의해 생산된다. 이들 유전자 절편: V (가변), D (다양성), J (연결), 및 C (불변)는 이뮤노글로불린 및 T-세포 수용체 (TCR)의 결합 특이성 및 하류 적용을 결정한다. 본 발명은 T-세포 레퍼토리 다양성 (때때로 폴리클로날성으로 지칭됨)을 나타내고 증가시키는 TIL을 생성하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, T-세포 레퍼토리 다양성의 증가는 신선하게 수확된 TIL 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 비한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 방법에 의해 얻어진 TIL은 T-세포 레퍼토리 다양성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서 얻어진 TIL은 T-세포 레퍼토리 다양성의 증가를 나타낸다. 일부 실시양태에서, 다양성의 증가는 이뮤노글로불린 다양성 및/또는 T-세포 수용체 다양성의 증가이다. 일부 실시양태에서, 다양성은 이뮤노글로불린에 있고, 이뮤노글로불린 중쇄에 있다. 일부 실시양태에서, 다양성은 이뮤노글로불린에 있고, 이뮤노글로불린 경쇄에 있다. 일부 실시양태에서, 다양성은 T-세포 수용체에 있다. 일부 실시양태에서, 다양성은 알파, 베타, 감마, 및 델타 수용체로 이루어진 군으로부터 선택되는 T-세포 수용체 중 하나에 있다. 일부 실시양태에서, T-세포 수용체 (TCR) 알파 및/또는 베타의 발현의 증가가 있다. 일부 실시양태에서, T-세포 수용체 (TCR) 알파의 발현의 증가가 있다. 일부 실시양태에서, T-세포 수용체 (TCR) 베타의 발현의 증가가 있다. 일부 실시양태에서, TCRab (즉, TCRα/β)의 발현의 증가가 있다.

[0404] 본 개시내용에 따르면, TIL을 생존력에 대해 검정하는 방법 및/또는 대상체에의 투여에서의 추가의 사용. 일부 실시양태에서, 종양 침윤 림프구 (TIL)를 검정하는 방법은

[0405] (i) TIL의 제1 집단을 얻는 단계;

[0406] (ii) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계;

[0407] (iii) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 큼);

[0408] (iv) TIL의 제3 집단을 수확하고, 세척하고, 냉동보존하는 단계;

[0409] (v) 냉동보존된 TIL을 저온에서 저장하는 단계;

[0410] (vi) TIL의 제3 집단을 해동시켜 TIL의 해동된 제3 집단을 제공하는 단계;

[0411] (vii) 제3 집단의 세포 배양 배지를 적어도 3일의 추가의 확장 기간 (때때로 재REP 기간으로 지칭됨) 동안 IL-2, OKT-3, 및 APC로 보충함으로써 TIL의 해동된 제3 집단의 부분의 추가의 제2 확장을 수행하는 단계 (여기서, 제3 확장을 수행하여 TIL의 제4 집단을 얻고, TIL의 제4 집단에서의 TIL의 수를 TIL의 제3 집단에서의 TIL의 수와 비교하여 비를 얻음);

[0412] (viii) 단계 (vii)에서의 비에 기초하여 TIL의 해동된 집단이 환자에의 투여에 적합한지 여부를 결정하는 단계;

[0413] (ix) TIL의 제4 집단에서의 TIL의 수 대 TIL의 제3 집단에서의 TIL의 수의 비가 단계 (viii)에서 5:1 초과인 것으로 측정되는 경우, TIL의 해동된 제3 집단의 치료 유효 투여량을 환자에게 투여하는 단계

[0414] 를 포함한다.

[0415] 일부 실시양태에서, 추가의 확장 기간 (때때로 재REP 기간으로 지칭됨)은 TIL의 제4 집단에서의 TIL의 수 대 TIL의 제3 집단에서의 TIL의 수의 비가 50:1 초과일 때까지 수행된다.

[0416] 일부 실시양태에서, 치료 유효 투여량을 위한 충분한 TIL의 수는 약 2.3×10^{10} 내지 약 13.7×10^{10}개이다.

[0417] 일부 실시양태에서, 단계 (i) 내지 (vii)은 약 40일 내지 약 50일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (i) 내지 (vii)은 약 42일 내지 약 48일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (i) 내지 (vii)은 약 42일 내지 약 45일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (i) 내지 (vii)은 약 44일 내에 수행된다.

[0418] 일부 실시양태에서, 단계 (iii) 또는 (vii)로부터의 세포는 신선하게 수확된 세포와 유사한 수준으로 CD4, CD8, 및 TCR αβ를 발현한다. 일부 실시양태에서 세포는 TIL이다.

[0419] 일부 실시양태에서, 항원 제시 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이다. 일부 실시양태에서, PBMC는 단계 (iii)에서 제9일 내지 제17일 중 임의의 날에 세포 배양물에 첨가된다.

[0420] 일부 실시양태에서, 단계 (iii) 또는 (vii)에서의 TIL의 보다 큰 집단에서의 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 세포의 제3 집단에서의 이펙터 T 세포, 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 CD27의 발현, CD28의 발현, 보다 긴 텔로미어, 증가된 CD57 발현, 및 감소된 CD56 발현으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 나타낸다.

[0421] 일부 실시양태에서, 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 증가된 CD57 발현 및 감소된 CD56 발현을 나타낸다.

[0422] 일부 실시양태에서, APC는 인공 APC (aAPC)이다.

[0423] 일부 실시양태에서, TIL의 제1 집단을 고-친화도 T 세포 수용체를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터로 형질도입하는 단계.

[0424] 일부 실시양태에서, 형질도입하는 단계는 단계 (i) 전에 일어난다.

[0425] 일부 실시양태에서, TIL의 제1 집단을 T-세포 신호화 분자의 적어도 하나의 내도메인과 융합된 단일 쇄 가변 단편 항체를 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 코딩하는 핵산을 포함하는 발현 벡터로 형질도입하는 단계.

[0426] 일부 실시양태에서, 형질도입하는 단계는 단계 (i) 전에 일어난다.

[0427] 일부 실시양태에서, TIL은 단계 (vii) 후에 생존력에 대해 검정된다.

[0428] 본 개시내용은 또한 TIL을 검정하는 추가의 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은

[0429] (i) 냉동보존된 TIL의 제1 집단의 부분을 얻는 단계;

[0430] (ii) 냉동보존된 TIL의 제1 집단의 부분을 해동시키는 단계;

[0431] (iii) TIL의 제1 집단의 부분을 적어도 3일의 추가의 확장 기간 (때때로 재REP 기간으로 지칭됨) 동안 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, TIL의 제1 집단으로부터의 부분을 TIL의 제2 집단과 비교하여 TIL의 수의 비를 얻고, TIL의 제2 집단에서의 TIL의 수 대 TIL의 제1 집단의 부분에서의 TIL의 수의 비는 5:1 초과임);

[0432] (iv) 단계 (iii)에서의 비에 기초하여 TIL의 제1 집단이 환자에의 치료 투여에 사용하기에 적합한지 여부를 결정하는 단계;

[0433] (v) TIL의 제2 집단에서의 TIL의 수 대 TIL의 제1 집단에서의 TIL의 수의 비가 단계 (iv)에서 5:1 초과인 것으로 측정되는 경우, TIL의 제1 집단이 치료 투여에 사용하기에 적합한 것으로 결정하는 단계

[0434] 를 포함하는, TIL을 검정하는 방법을 제공한다.

[0435] 일부 실시양태에서, TIL의 제2 집단에서의 TIL의 수 대 TIL의 제1 집단의 부분에서의 TIL의 수의 비는 50:1 초과이다.

[0436] 일부 실시양태에서, 방법은 본원에서 제공된 실시양태 중 임의의 것에 기재된 바와 같은 방법에 따라 단계 (i)로부터의 냉동보존된 TIL의 전체 제1 집단의 확장을 수행하는 것을 더 포함한다.

[0437] 일부 실시양태에서, 방법은 단계 (i)로부터의 냉동보존된 TIL의 전체 제1 집단을 환자에게 투여하는 것을 더 포함한다.

[0438] **K. TIL 제조를 위한 닫힌 계**

[0439] 본 발명은 TIL 배양 프로세스 동안 닫힌 계의 사용을 제공한다. 이러한 닫힌 계는 미생물 오염을 방지하고/거나 감소시키는 것을 허용하고, 보다 적은 플라스크의 사용을 허용하고, 비용 감소를 허용한다. 일부 실시양태에서, 닫힌 계는 2개의 용기를 사용한다.

[0440] 이러한 닫힌 계는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm and https://www.fda.gov/BiololgicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm.에서 발견될 수 있다.

[0441] FDA 웹사이트 상에 제공된 바와 같이, 멸균 방법을 갖는 닫힌 계는 공지되어 있으며, 널리 기재되어 있다. 상기 언급되고 하기 적절한 부분에서 제공된 바와 같이, https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm을 참조한다.

[0442] 도입

[0443] 멸균 연결 장치 (STCD)는 호환성 배관의 2개의 조각 사이에 멸균 용접을 생성한다. 이 절차는 다양한 용기 및 튜브 직경의 멸균 연결을 허용한다. 이 지침은 이들 장치의 사용을 위한 권고된 관례 및 절차를 기재한다. 이 지침은 멸균 연결 장치의 제조자가 시장화에 대한 승인 또는 허가를 얻기 위해 FDA에 제출해야 하는 데이터 또는 정보를 다루지 않는다. 또한, 표지화에서 인가되지 않은 목적을 위한 승인되거나 허가된 멸균 연결 장치의 사용은 장치가 연방 식품, 약물 및 화장품 법률 (Federal Food, Drug and Cosmetic Act) 하에 불순하고 부정표시된 것으로 간주되는 것을 야기할 수 있음을 주목하는 것이 중요하다.

[0444] 1. FDA 권고사항

[0445] 통상적으로 FDA-허가된 STCD를 사용할 것을 제안하는 혈액 생성물의 제조자는 각각의 혈액 생성물에 대해 표준 작업 절차 (SOP) 매뉴얼에 이러한 사용에 관한 정보를 포함시켜야 한다. 이들 항목은 기록 보관, 생성물 추적, 튜브 용접 품질 제어, 소프트웨어 및 일회용품의 로트 수 (첨가되는 요소의 공급원(들)을 포함함)를 포함해야 한다. 품질 제어 절차는 각각의 용접의 통합성의 시험을 포함해야 한다.

[0446] 2. STCD의 적용

[0447] 사용자는 장치의 사용이 새로운 생성물을 생성하거나, 안전성 및 효능이 입증되지 않은 규제된 생성물의 형태를 상당히 변형시킬 수 있음을 알아야 한다. 그들 "새로운 생성물"을 위해, 인가, 신청서, 또는 신청 보완서에 대한 대상은 SOP의 제출 외에도 FDA에 제출되어야 한다. 일반적으로, 세포 성분을 포함하는 풀링 또는 혼합은 면허 신청서 또는 신청 보완서의 제출 및 승인을 요구하는 제품의 변화를 나타낸다. 이러한 신청서 및 신청 보완서는 "새로운 생성물"이 안전하고, 제안된 데이팅 기간 전반에 걸쳐 그의 의도된 사용에 유효함을 입증하는 제조 절차의 데이터 및 설명을 함유해야 한다.

[0448] 하기 코멘트는 FDA 허가된 또는 승인된 STCD의 보다 통상적인 사용에 대한 지침으로서 제공된다.

[0449] **L.** 새로운 또는 보다 작은 바늘을 혈액 수집 세트에 첨가하기

[0450] 절차 (전혈 수집, 혈소판성분채집술 또는 공급원 혈장 수집)의 개시 <u>전에</u> STCD를 사용하여 바늘을 첨가하는 것은 기능적으로 닫힌 계를 여는 것으로 간주되지 않는다. 바늘이 절차 <u>동안</u> 첨가되는 경우, 단지 액체-충전된 배관을 용접하기 위해 승인된 STCD가 사용되어야 한다. 용접 통합성의 시험이 만족스러운 경우, STCD의 사용은 기능적으로 닫힌 계를 여는 것으로 간주되지 않는다.

[0451] 열린 계에서 제조된 혈소판, 성분채집술은 24시간 구형으로 표지되어야 하고, 기능적으로 닫힌 계에서 제조된 혈소판, 성분채집술 생성물은 5일 구형으로 표지되어야 한다 (문헌 [Revised Guideline for Collection of Platelets, Pheresis, October 7, 1988] 참조).

[0452] 첨가된 배관 및 바늘의 공급원 및 명세는 혈액 센터의 SOP 및 기록에서 다루여져야 한다. STCD를 사용하여 바늘을 첨가하는 것은 인가된 기관이 사전승인을 필요로 하는 제조의 주요한 변화를 나타내지 않는다.

[0453] **M. STCD를 사용하여 성분을 제조하기**

[0454] STCD가 추가의 성분 제조 백을 부착시키는 데 사용되는 경우, 이동 팩의 공급원 및 혈액 단위 수 및 ABO/Rh의 적절한 입증을 확인하는 기록은 적절하게 유지되어야 한다. 모든 혈액 및 혈액 성분은 적절하게 표지되어야 한

다 (21 CFR 606.121).

[0455] 예:

[0456] · 신선한 동결된 혈장으로부터의 냉동침전된 AHF의 제조를 위해 제4 백을 전혈 수집 삼중-팩에 첨가함.

[0457] · 추가의 용액의 적혈구 단위에의 연결.

[0458] · 성분 제조에 사용하기 위해 FDA 인가된 인-라인 필터의 첨가.

[0459] · 제3 저장 용기의 혈소판성분채집술 하니스 (harness)에의 첨가.

[0460] · 상기 언급된 사용을 위해, 절차는 개발되어야 하고, 기록은 유지되어야 하지만, 면허권자는 절차를 시작하기 위해 FDA 승인을 가질 필요는 없다.

[0461] 1. **혈액 생성물을 풀링하기 위해 STCD를 사용하기**

[0462] 전혈 수집으로부터 제조된 혈소판을 풀링하기 위한 STCD의 적절한 사용은 통상적으로 사용되는 스파이크 및 포트 엔트리부터 잠재적 오염을 제거할 수 있다. 수혈 직전에 수행된 풀링은 이러한 적절한 사용의 예이다. 풀링된 혈소판은 풀링 후 4시간 이하에 투여되어야 한다 (21 CFR 606.122(l)(2) 참조).

[0463] 그러나, 풀링 및 후속의 저장은 무작위 공여자 단위의 투여에 비해 위험을 증가시킬 수 있으며; 한 오염된 단위가 다른 것으로 풀링되고, 투여 전에 저장되는 경우, 투여되는 총 박테리아 접종물은 추가의 부피에서의 복제의 결과로서 증가될 수 있다. 따라서, 4시간 초과 동안 혈소판을 풀링하고 저장하기 위한 STCD의 제안된 사용은 이러한 풀링이 증가된 위험과 연관되는지 여부를 만족스럽게 다루는 데이터에 의해 지지되어야 한다.

[0464] 이러한 혈소판 풀링은 새로운 생성물의 제조를 구성한다.

[0465] 혈소판을 포함하는 풀링 또는 혼합은 저장 기간이 4시간을 초과하는 경우 면허 신청서 또는 신청 보완서의 제출 및 승인을 요구하는 새로운 생성물의 제조로 간주된다.

[0466] 2. **소아과 사용 및 분할된 단위를 위한 분취물을 제조하기 위해 STCD를 사용하기**

[0467] STCD를 사용하여 제조된 전혈, 적혈구, 및 신선한 동결된 혈장에 대한 소아과 단위 및 분할된 단위는 하기 조건이 충족되는 경우 생물제제 면허 신청 (BLA) 보완서가 요구되는 새로운 생성물로서 간주되지 않을 것이다:

[0468] 제조자는 사용되는 각각의 항응고제에 대한 승인을 비롯한, 원래 (즉, 비분할된) 생성물에 대한 승인된 생물제제 면허 또는 면허 보완서를 가져야 한다.

[0469] 표지는 분배 전에 검토 및 승인을 위해 제출되어야 한다. 표기법은 FDA 형식 2567, 표지 및 회람의 송달 (Transmittal of Labels and Circulars)의 코멘트 섹션 하에 이루어져야 한다.

[0470] 제조되는 성분의 저장을 위해 승인된 최종 생성물 용기가 사용되어야 한다.

[0471] 인가 하에 제조된 혈소판은 적어도 $5.5 \times (10)^{10}$개의 혈소판을 함유해야 한다 (21 CFR 640.24 (c)). 인가 하에 제조된 혈소판, 성분채집술은 적어도 $3.0 \times (10)^{11}$개의 혈소판을 함유해야 한다 (문헌 [Revised Guideline for the Collection of Platelets, Pheresis, October 7, 1988] 참조).

[0472] 전혈 수집으로부터 및 혈장으로부터 분할된 생성물을 제조하기 위한 STCD의 사용에 관해 따라야 할 절차 및 자동화 혈액성분채집술 절차에 의해 제조된 혈소판은 하기의 설명을 포함해야 한다:

[0473] · 성분채집술 하니스 또는 수집 용기가 어떻게 FDA-허가된 STCD로 변형될 것인지;

[0474] · 분할된 혈장 또는 전혈 생성물의 최소 부피;

[0475] · 분할된 혈소판채집술 생성물의 부피 및 혈소판 농도;

[0476] · 생성물의 저장 시간. 생성물은 승인된 용기에 있어야 하고, 이러한 용기의 표지 상의 저장 시간과 일치해야 한다;

[0477] · 혈액 센터의 기록에서 분할된 생성물을 표지하고 추적하는 데 사용되는 방법(들).

[0478] 주: 분취물을 표지하는 절차는 절차에서 명백하게 언급되어야 하고, 기록 보관은 필요할 경우 모든 성분의 추적 및 회수를 허용하기에 적당해야 한다.

[0479] 3. **자동화 혈장성분채집술 절차 동안 추가의 염수 또는 항응고제 라인을 연결하기 위해 STCD를 사용하기**

[0480] 절차는 개발되어야 하고, 기록은 사용을 위한 기기 제조자의 지시와 일관되게 유지되어야 하지만, 면허권자는 절차를 시작하기 위해 FDA 승인을 가질 필요는 없다.

[0481] 4. **프로세싱 용액을 부착하기 위해 STCD를 사용하기**

[0482] 프로세싱 용액을 갖는 용기를 세척되거나 동결된 적혈구 생성물에 부착하기 위해 STCD를 사용하는 경우, 생성된 생성물에 대한 데이팅 기간은, 데이터가 보다 긴 데이팅 기간을 지지하는 CBER에 대한 면허 신청서 또는 신청 보완서의 형태로 제공되지 않는다면, 24시간이다 (21 CFR 610.53(c)). 면제 또는 변형은 디렉터, CBER로부터의 글에서 승인되어야 한다 (21 CFR 610.53(d)).

[0483] 5. **FDA-허가된 백혈구 감소 필터를 첨가하기 위해 STCD를 사용하기**

[0484] 일부 백혈구-감소 필터는 전혈 수집 시스템에 완전하게 부착되지 않는다. 사전-저장 여과를 위한 STCD의 사용을 위한 절차는 사용을 위한 필터 제조자의 지시와 일치해야 한다.

[0485] 허여 전의 백혈구 감소는 주요한 제조 변화를 구성한다. 따라서, STCD를 사용하여 제조된 새로운 백혈구-감소된 생성물을 위해, 제조자는 생물제제 면허 신청서 (21 CFR 601.2) 또는 사전 승인 신청 보완서를 FDA에 제출해야 한다 (21 CFR 601.12).

[0486] 시험을 위해 혈액 생성물 용기로부터 샘플을 제거하기 위해 STCD를 사용하기 (예를 들어, 교차 매칭을 위한 혈소판 또는 혈소판, 성분채집술의 용기로부터 혈소판의 샘플을 얻기 위해 STCD를 사용하기).

[0487] 샘플 철회 후의 생성물의 부피 및/또는 세포 카운트가 원래 표지 상에 또는 정보의 회람에 언급된 것과 상이한 경우, 생성물 상의 표지는 새로운 부피 및/또는 세포 카운트를 반영하도록 변형되어야 한다. 예를 들어, 혈소판의 단위의 혈소판 카운트를 $5.5 \times (10)^{10}$개 미만의 혈소판까지 감소시키는 샘플은 제거되지 않을 수 있다 (21 CFR 640.24 (c)).

[0488] 6. **FDA 지침으로부터의 추가의 정보**

[0489] FDA 지침은 STCD의 사용을 다루는 FDA에의 신청서 및 신청 보완서의 제출을 위한 명세에 관한 일반적 지침 뿐만 아니라 구체적 정보 및 예를 제시한다. STCD의 적절한 사용에 관하여 추가의 질문이 발생하는 경우, 혈액 연구 및 검토 관청, 생물제제 평가 및 연구 센터 (Office of Blood Research and Review, Center for Biologics Evaluation and Research)로 관심이 향해져야 한다.

[0490] 일부 실시양태에서, 닫힌 계는 종양 단편이 얻어지는 때로부터 TIL이 환자에의 투여 또는 냉동보존을 위해 준비될 때까지 1개의 용기를 사용한다. 일부 실시양태에서, 2개의 용기가 사용되는 경우, 제1 용기는 닫힌 G-용기이고, TIL의 집단은 원심분리되고, 제1 닫힌 G-용기를 열지 않고 주입 백으로 이동된다. 일부 실시양태에서, 2개의 용기가 사용되는 경우, 주입 백은 하이포써모솔-함유 주입 백이다. 닫힌 계 또는 닫힌 TIL 세포 배양 시스템은 일단 종양 샘플 및/또는 종양 단편이 첨가된 것에 특징이 있고, 시스템을 외부로부터 긴밀하게 밀봉하여 박테리아, 진균, 및/또는 임의의 다른 미생물 오염의 침입이 없는 닫힌 환경을 형성한다.

[0491] 일부 실시양태에서, 미생물 오염의 감소는 약 5% 내지 약 100%이다. 일부 실시양태에서, 미생물 오염의 감소는 약 5% 내지 약 95%이다. 일부 실시양태에서, 미생물 오염의 감소는 약 5% 내지 약 90%이다. 일부 실시양태에서, 미생물 오염의 감소는 약 10% 내지 약 90%이다. 일부 실시양태에서, 미생물 오염의 감소는 약 15% 내지 약 85%이다. 일부 실시양태에서, 미생물 오염의 감소는 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 97%, 약 98%, 약 99%, 또는 약 100%이다.

[0492] 닫힌 계는 미생물 오염의 부재 하에서 및/또는 그의 유의한 감소와 함께 TIL 성장을 허용한다.

[0493] 더욱이, TIL 세포 배양 환경의 pH, 이산화탄소 분압 및 산소 분압은 각각 세포가 배양됨에 따라 다양하다. 결과적으로, 세포 배양에 적절한 배지는 순환되더라도, 닫힌 환경은 여전히 TIL 증식을 위한 최적 환경으로서 일정하게 유지될 필요가 있다. 이 목적으로, 닫힌 환경의 배양 액체 내의 pH, 이산화탄소 분압 및 산소 분압의 물리적 인자는 센서에 의해 모니터링되는 것이 바람직하며, 그의 신호는 배양 환경의 유입구에 설치되는 기체 교환기를 제어하는 데 사용되고, 닫힌 환경의 기체 분압은 세포 배양 환경을 최적화하도록 배양 액체의 변화에 따라 실시간으로 조정되는 것이 바람직하다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 유입구에서 닫힌 환경으로 닫힌 환

경의 pH, 이산화탄소 분압 및 산소 분압을 측정하는 모니터링 장치를 구비한 기체 교환기를 혼입시키고, 모니터링 장치로부터의 신호에 기초하여 기체 농도를 자동적으로 조정함으로써 세포 배양 환경을 최적화하는 닫힌 세포 배양 시스템을 제공한다.

[0494] 일부 실시양태에서, 닫힌 환경 내의 압력은 연속적으로 또는 간헐적으로 제어된다. 즉, 닫힌 환경에서의 압력은 예를 들어 압력 유지 장치에 의해 다양화될 수 있으며, 따라서, 공간이 양의 압력 상태에서 TIL의 성장에 적합함을 보장하거나, 음의 압력 상태에서의 유체의 삼출을 촉진시키고, 따라서, 세포 증식을 촉진시킨다. 더욱이, 음의 압력을 간헐적으로 인가함으로써, 닫힌 환경에서의 순환 액체를 닫힌 환경의 부피의 일시적 수축에 의해 균일하게 및 효율적으로 대체하는 것이 가능하다.

[0495] 일부 실시양태에서, TIL의 증식을 위한 최적 배양 성분은 치환되거나 첨가될 수 있으며, IL-2 및/또는 OKT3, 뿐만 아니라 조합과 같은 인자를 포함하여 첨가될 수 있다.

[0496] **C. 세포 배양**

[0497] 한 실시양태에서, 상기 논의된 뿐만 아니라 도 27에 예시된 것들을 비롯한 TIL을 확장시키는 방법은 약 5,000 mL 내지 약 25,000 mL의 세포 배지, 약 5,000 mL 내지 약 10,000 mL의 세포 배지, 또는 약 5,800 mL 내지 약 8,700 mL의 세포 배지를 사용하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 배지는 예를 들어 실시예 21에 기재된 바와 같이 혈청 무함유 배지이다. 일부 실시양태에서, 제1 확장에서의 배지는 혈청 무함유이다. 일부 실시양태에서, 제2 확장에서의 배지는 혈청 무함유이다. 일부 실시양태에서, 제1 확장 및 제2 확장에서의 배지는 둘 다 혈청 무함유이다. 한 실시양태에서, TIL의 수를 확장시키는 것은 하나 초과의 유형의 세포 배양 배지를 사용한다. 임의의 적합한 세포 배양 배지, 예를 들어, AIM-V 세포 배지 (L-글루타민, 50 μM 스트렙토마이신 술페이트, 및 10 μM 겐타미신 술페이트) 세포 배양 배지 (인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스배드)가 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명 방법은 유리하게는 TIL의 수를 확장시키는 데 요구되는 배지의 양 및 배지의 유형의 수를 감소시킨다. 한 실시양태에서, TIL의 수를 확장시키는 것은 세포를 3일 또는 4일 이하마다 빈번하게 세포를 공급하는 것을 포함할 수 있다. 기체 투과성 용기에서 세포의 수를 확장시키는 것은 세포를 확장시키는 데 필요한 공급 빈도를 감소시킴으로써 세포의 수를 확장시키는 데 필요한 절차를 간소화한다.

[0498] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 기체 투과성 용기에서의 세포 배지는 비여과된다. 비여과된 세포 배지의 사용은 세포의 수를 확장시키는 데 필요한 절차를 간소화할 수 있다. 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 기체 투과성 용기에서의 세포 배지는 베타-머캅토에탄올 (BME)이 결여된다.

[0499] 한 실시양태에서, 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 얻고; 종양 조직 샘플을 그 안에 세포 배지를 함유하는 제1 기체 투과성 용기에서 배양하고; 종양 조직 샘플로부터 TIL을 얻고; TIL의 수를 세포 배지를 함유하는 제2 기체 투과성 용기에서 약 7일 내지 14일, 예를 들어, 약 11일의 지속기간 동안 확장시키는 것을 포함하는 방법의 지속기간. 일부 실시양태에서, 사전-REP는 약 7일 내지 14일, 예를 들어, 약 11일이다. 일부 실시양태에서, REP는 약 7일 내지 14일, 예를 들어, 약 11일이다.

[0500] 한 실시양태에서, TIL은 기체-투과성 용기에서 확장된다. 기체-투과성 용기는 그의 개시내용이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 출원 공개 제2005/0106717 A1호에 기재된 것들을 비롯한, 관련 기술분야에 공지된 방법, 조성물, 및 장치를 사용하여 PBMC를 사용하여 TIL을 확장시키는 데 사용되었다. 한 실시양태에서, TIL은 기체-투과성 백에서 확장된다. 한 실시양태에서, TIL은 기체 투과성 백, 예컨대 주리 세포 확장 시스템 W25 (지이 헬스케어)에서 TIL을 확장시키는 세포 확장 시스템을 사용하여 확장된다. 한 실시양태에서, TIL은 기체 투과성 백, 예컨대 주리 세포 확장 시스템 W5 (지이 헬스케어)로도 공지된 웨이브 생물반응기 시스템에서 TIL을 확장시키는 세포 확장 시스템을 사용하여 확장된다. 한 실시양태에서, 세포 확장 시스템은 약 100 mL, 약 200 mL, 약 300 mL, 약 400 mL, 약 500 mL, 약 600 mL, 약 700 mL, 약 800 mL, 약 900 mL, 약 1 L, 약 2 L, 약 3 L, 약 4 L, 약 5 L, 약 6 L, 약 7 L, 약 8 L, 약 9 L, 및 약 10 L로 이루어진 군으로부터 선택되는 부피를 갖는 기체 투과성 세포 백을 포함한다.

[0501] 한 실시양태에서, TIL은 G-렉스 플라스크 (윌슨 울프 매뉴팩처링으로부터 시판됨)에서 확장될 수 있다. 이러한 실시양태는 세포 집단이 약 5×10^5개의 세포/cm^2 내지 10×10^6 내지 30×10^6개의 세포/cm^2로 확장되는 것을 허용한다. 한 실시양태에서, 이는 공급이 없다. 한 실시양태에서, 이는 배지가 G-렉스 플라스크에 약 10 cm의 높이로 있는 한 공급이 없다. 한 실시양태에서, 이는 공급이 없지만, 1종 이상의 시토카인의 첨가가 있다. 한 실시양태에서, 시토카인은 시토카인을 배지와 혼합할 임의의 필요 없이 볼루스로서 첨가될 수 있다. 이러한 용기, 장치, 및 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, TIL을 확장시키는 데 사용되었고, 미국 특허 출원 공개

제US 2014/0377739A1호, 국제 공개 제WO 2014/210036 A1호, 미국 특허 출원 공개 제us 2013/0115617 A1호, 국제 공개 제WO 2013/188427 A1호, 미국 특허 출원 공개 제US 2011/0136228 A1호, 미국 특허 제US 8,809,050 B2호, 국제 공개 제WO 2011/072088 A2호, 미국 특허 출원 공개 제US 2016/0208216 A1호, 미국 특허 출원 공개 제US 2012/0244133 A1호, 국제 공개 제WO 2012/129201 A1호, 미국 특허 출원 공개 제US 2013/0102075 A1호, 미국 특허 제US 8,956,860 B2호, 국제 공개 제WO 2013/173835 A1호, 미국 특허 출원 공개 제US 2015/0175966 A1호에 기재된 것들을 포함하며, 이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. 이러한 프로세스는 또한 문헌 [Jin *et al.*, *J. Immunotherapy,* **2012,** 35:283-292]에 기재되어 있다.

[0502] **D. TIL의 임의적 유전적 조작**

[0503] 일부 실시양태에서, TIL은 고-친화도 T 세포 수용체 (TCR), 예를 들어, 종양-연관된 항원, 예컨대 MAGE-1, HER2, 또는 NY-ESO-1, 또는 종양-연관된 세포 표면 분자 (예를 들어, 메소텔린) 또는 계통-제한된 세포 표면 분자 (예를 들어, CD19)에 결합하는 키메라 항원 수용체 (CAR)에서 표적화된 TCR을 포함하나 이에 제한되지는 않는 추가의 기능성을 포함하도록 임의로 유전적으로 조작된다.

[0504] **E. TIL의 임의적 냉동보존**

[0505] 벌크한 TIL 집단 또는 TIL의 확장된 집단 중 어느 하나는 임의로 냉동보존될 수 있다. 일부 실시양태에서, 냉동보존은 치료 TIL 집단에 대해 일어난다. 일부 실시양태에서, 냉동보존은 제2 확장 후에 수확된 TIL에 대해 일어난다. 일부 실시양태에서, 냉동보존은 도 27의 예시적인 단계 F에서의 TIL에 대해 일어난다. 일부 실시양태에서, TIL은 주입 백에서 냉동보존된다. 일부 실시양태에서, TIL은 주입 백에서의 정치 전에 냉동보존된다. 일부 실시양태에서, TIL은 냉동보존되고, 주입 백에 정치되지 않는다. 일부 실시양태에서, 냉동보존은 냉동보존 배지를 사용하여 수행된다. 일부 실시양태에서, 냉동보존 배지는 디메틸술폭시드 (DMSO)를 함유한다. 이는 일반적으로 TIL 집단을 동결 용액, 예를 들어 85% 보체 불활성화된 AB 혈청 및 15% 디메틸 술폭시드 (DMSO) 내로 놓음으로써 달성된다. 용액 중의 세포를 냉동 바이알 내로 정치하고, 냉동보존을 위한 기체성 질소 동결기로의 임의적 이동과 함께, -80 ℃에서 24시간 동안 저장한다. 문헌 [Sadeghi, *et al., Acta Oncologica* **2013,** *52,* 978-986]을 참조한다.

[0506] 적절할 경우, 세포를 동결기로부터 제거하고, 용액의 대략 4/5가 해동될 때까지 37 ℃ 수조에서 해동시킨다. 세포를 일반적으로 완전 배지에 재현탁시키고, 임의로 1회 이상 세척한다. 일부 실시양태에서, 해동된 TIL을 카운팅하고, 관련 기술분야에 공지된 바와 같이 생존력에 대해 평가할 수 있다.

[0507] 바람직한 실시양태에서, TIL의 집단은 CS10 냉동보존 배지 (크리오스토르 10, 바이오라이프 솔루션즈)를 사용하여 냉동보존된다. 바람직한 실시양태에서, TIL의 집단은 디메틸술폭시드 (DMSO)를 함유하는 냉동보존 배지를 사용하여 냉동보존된다. 바람직한 실시양태에서, TIL의 집단은 1:1 (부피:부피) 비의 CS10 및 세포 배양 배지를 사용하여 냉동보존된다. 바람직한 실시양태에서, TIL의 집단은 약 1:1 (부피:부피) 비의 CS10 및 추가의 IL-2를 더 포함하는 세포 배양 배지를 사용하여 냉동보존된다.

[0508] 단계 A 내지 E에서 상기 논의된 바와 같이, 냉동보존은 TIL 확장 프로세스 전반에 걸쳐 다수의 시점에서 일어날 수 있다. 일부 실시양태에서, 단계 B에 따른 제1 확장 후의 벌크한 TIL 집단 또는 단계 D에 따른 1회 이상의 제2 확장 후의 TIL의 확장된 집단은 냉동보존될 수 있다. 냉동보존은 일반적으로 TIL 집단을 동결 용액, 예를 들어, 85% 보체 불활성화된 AB 혈청 및 15% 디메틸 술폭시드 (DMSO) 내로 정치함으로써 달성될 수 있다. 용액 중의 세포를 냉동 바이알 내로 정치하고, 냉동보존을 위한 기체성 질소 동결기로의 임의적 이동과 함께, -80 ℃에서 24시간 동안 저장한다. 문헌 [Sadeghi, *et al., Acta Oncologica* **2013,** *52,* 978-986]을 참조한다.

[0509] 적절할 경우, 세포를 동결기로부터 제거하고, 용액의 대략 4/5가 해동될 때까지 37 ℃ 수조에서 해동시킨다. 세포를 일반적으로 완전 배지에 재현탁시키고, 임의로 1회 이상 세척한다. 일부 실시양태에서, 해동된 TIL을 카운팅하고, 관련 기술분야에 공지된 바와 같이 생존력에 대해 평가할 수 있다.

[0510] 일부의 경우, 단계 B TIL 집단은 하기 논의된 프로토콜을 사용하여 즉시 냉동보존될 수 있다. 대안적으로, 벌크한 TIL 집단은 단계 C 및 단계 D로 처리된 후, 단계 D 후에 냉동보존될 수 있다. 유사하게, 유전적으로 변형된 TIL이 요법에 사용될 것인 경우, 단계 B 또는 단계 D TIL 집단은 적합한 처리를 위해 유전적 변형으로 처리될 수 있다.

[0511] **F.** 임의적 세포 생존력 분석

[0512] 임의로, 세포 생존력 검정은 제1 확장 (때때로 초기 벌크한 확장으로 지칭됨) 후에 관련 기술분야에 공지된 표

준 검정을 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 죽은 세포를 선택적으로 표지하고, 생존력 평가를 허용하는 트리판 블루 배제 검정은 벌크한 TIL의 샘플에 대해 수행될 수 있다. 생존력을 시험하는 데 사용하기 위한 다른 검정으로는 알라마 블루 검정; 및 MTT 검정을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0513] 1. 세포 카운트, 생존력, 유동 세포측정법

[0514] 일부 실시양태에서, 세포 카운트 및/또는 생존력이 측정된다. 마커, 예컨대 CD3, CD4, CD8, 및 CD56, 뿐만 아니라 본원에 개시되거나 기재된 임의의 다른 것들 (그러나, 이에 제한되지는 않음)의 발현은 항체를 사용한 유동 세포측정법, 예를 들어 비디 바이오-사이언시즈 (비디 바이오사이언시즈, 미국 캘리포니아주 산 호세)로부터 시판되는 것들 (그러나 이에 제한되지는 않음)에 의해 팍스칸토™ 유동 세포측정기 (비디 바이오사이언시즈)를 사용하여 측정될 수 있다. 세포는 일회용 c-칩 혈구계 (VWR, 미국 일리노이주 바타비아)를 사용하여 수동으로 카운팅될 수 있으며, 생존력은 트리판 블루 염색을 포함하나 이에 제한되지는 않는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 평가될 수 있다.

[0515] 일부의 경우, 벌크한 TIL 집단은 하기 논의된 프로토콜을 사용하여 즉시 냉동보존될 수 있다. 대안적으로, 벌크한 TIL 집단은 REP로 처리된 후, 하기 논의된 바와 같이 냉동보존될 수 있다. 유사하게, 유전적으로 변형된 TIL이 요법에 사용될 것인 경우, 벌크한 또는 REP TIL 집단은 적합한 처리를 위해 유전적 변형으로 처리될 수 있다.

[0516] 2. 세포 배양

[0517] 한 실시양태에서, TIL을 확장시키는 방법은 약 5,000 mL 내지 약 25,000 mL의 세포 배지, 약 5,000 mL 내지 약 10,000 mL의 세포 배지, 또는 약 5,800 mL 내지 약 8,700 mL의 세포 배지를 사용하는 것을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, TIL의 수를 확장시키는 것은 1가지 이하의 유형의 세포 배양 배지를 사용한다. 임의의 적합한 세포 배양 배지, 예를 들어, AIM-V 세포 배지 (L-글루타민, 50 μM 스트렙토마이신 술페이트, 및 10 μM 겐타미신 술페이트) 세포 배양 배지 (인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스배드)가 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명 방법은 유리하게는 TIL의 수를 확장시키는 데 요구되는 배지의 양 및 배지의 유형의 수를 감소시킨다. 한 실시양태에서, TIL의 수를 확장시키는 것은 3일 또는 4일마다 이하의 빈도로 세포를 공급하는 것을 포함할 수 있다. 기체 투과성 용기에서 세포의 수를 확장시키는 것은 세포를 확장시키는 데 필요한 공급 빈도를 감소시킴으로써 세포의 수를 확장시키는 데 필요한 절차를 간소화한다.

[0518] 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 기체 투과성 용기에서의 세포 배지는 비여과된다. 비여과된 세포 배지의 사용은 세포의 수를 확장시키는 데 필요한 절차를 간소화할 수 있다. 한 실시양태에서, 제1 및/또는 제2 기체 투과성 용기에서의 세포 배지는 베타-머캅토에탄올 (BME)이 결여된다.

[0519] 한 실시양태에서, 포유동물로부터 종양 조직 샘플을 얻고; 종양 조직 샘플을 그 안에 세포 배지를 함유하는 제1 기체 투과성 용기에서 배양하고; 종양 조직 샘플로부터 TIL을 얻고; TIL의 수를 약 14일 내지 약 42일, 예를 들어, 약 28일의 지속기간 동안 aAPC를 사용하여 그 안에 세포 배지를 함유하는 제2 기체 투과성 용기에서 확장시키는 것을 포함하는 방법의 지속기간.

[0520] 한 실시양태에서, TIL은 기체-투과성 용기에서 확장된다. 기체-투과성 용기는 그의 개시내용이 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 출원 공개 제2005/0106717 A1호에 기재된 것들을 비롯한 관련 기술분야에 공지된 방법, 조성물, 및 장치를 사용하여 PBMC를 사용하여 TIL을 확장시키는 데 사용되었다. 한 실시양태에서, TIL은 기체-투과성 백에서 확장된다. 한 실시양태에서, TIL은 기체 투과성 백, 예컨대 주리 세포 확장 시스템 W25 (지이 헬스케어)에서 TIL을 확장시키는 세포 확장 시스템을 사용하여 확장된다. 한 실시양태에서, TIL은 기체 투과성 백, 예컨대 주리 세포 확장 시스템 W5 (지이 헬스케어)로도 공지된 웨이브 생물반응기 시스템에서 TIL을 확장시키는 세포 확장 시스템을 사용하여 확장된다. 한 실시양태에서, 세포 확장 시스템은 약 100 mL, 약 200 mL, 약 300 mL, 약 400 mL, 약 500 mL, 약 600 mL, 약 700 mL, 약 800 mL, 약 900 mL, 약 1 L, 약 2 L, 약 3 L, 약 4 L, 약 5 L, 약 6 L, 약 7 L, 약 8 L, 약 9 L, 및 약 10 L로 이루어진 군으로부터 선택되는 부피를 갖는 기체 투과성 세포 백을 포함한다.

[0521] 한 실시양태에서, TIL은 G-렉스 플라스크 (윌슨 울프 매뉴팩처링으로부터 시판됨)에서 확장될 수 있다. 이러한 실시양태는 세포 집단이 약 5×10^5개의 세포/cm^2 내지 10×10^6 내지 30×10^6개의 세포/cm^2로 확장되는 것을 허용한다. 한 실시양태에서, 이는 공급이 없다. 한 실시양태에서, 이는 배지가 G-렉스 플라스크에 약 10 cm의 높이로 있는 한 공급이 없다. 한 실시양태에서, 이는 공급이 없지만, 1종 이상의 시토카인의 첨가를 갖는다. 한 실시양태에서, 시토카인은 시토카인을 배지와 혼합할 임의의 필요 없이 볼루스로서 첨가될 수 있다. 이러한 용

기, 장치, 및 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, TIL을 확장시키는 데 사용되었고, 미국 특허 출원 공개 제US 2014/0377739A1호, 국제 공개 제WO 2014/210036 A1호, 미국 특허 출원 공개 제us 2013/0115617 A1호, 국제 공개 제WO 2013/188427 A1호, 미국 특허 출원 공개 제US 2011/0136228 A1호, 미국 특허 제US 8,809,050 B2호, 국제 공개 제WO 2011/072088 A2호, 미국 특허 출원 공개 제US 2016/0208216 A1호, 미국 특허 출원 공개 제US 2012/0244133 A1호, 국제 공개 제WO 2012/129201 A1호, 미국 특허 출원 공개 제US 2013/0102075 A1호, 미국 특허 제US 8,956,860 B2호, 국제 공개 제WO 2013/173835 A1호, 미국 특허 출원 공개 제US 2015/0175966 A1호에 기재된 것들을 포함하며, 이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. 이러한 프로세스는 또한 문헌 [Jin *et al.*, *J. Immunotherapy*, **2012**, 35:283-292]에 기재되어 있다.

[0522] TIL의 임의적 유전적 조작

[0523] 일부 실시양태에서, TIL은 고-친화도 T 세포 수용체 (TCR), 예를 들어, 종양-연관된 항원, 예컨대 MAGE-1, HER2, 또는 NY-ESO-1, 또는 종양-연관된 세포 표면 분자 (예를 들어, 메소텔린) 또는 계통-제한된 세포 표면 분자 (예를 들어, CD19)에 결합하는 키메라 항원 수용체 (CAR)에서 표적화된 TCR을 포함하나 이에 제한되지는 않는 추가의 기능성을 포함하도록 임의로 유전적으로 조작된다.

[0524] **IV. 환자를 치료하는 방법**

[0525] 치료 방법은 초기 TIL 수집 및 TIL의 배양과 함께 시작한다. 이러한 방법은 둘 다 예를 들어, 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Jin *et al.*, *J. Immunotherapy*, **2012**, 35(3):283-292]에 의해 관련 기술분야에 기재되었다. 치료 방법의 실시양태는 실시예를 비롯한 하기 섹션 전반에 걸쳐 기재된다.

[0526] 예를 들어 상기 단계 A 내지 F에 기재된 바와 같은 또는 상기 단계 A 내지 F에 따른 (또한, 예를 들어, 도 27에 나타내어진 바와 같은)을 비롯한 본원에 기재된 방법에 따라 제조된 확장된 TIL은 암을 갖는 환자의 치료에서 특정 용도를 발견한다 (예를 들어, 문헌 [Goff, et al., *J. Clinical Oncology*, **2016**, 34(20):2389-239], 뿐만 아니라 보충적 내용에 기재된 바와 같음; 그 전문이 본원에 참조로 포함됨). 일부 실시양태에서, TIL을 이전에 기재된 바와 같이 전이성 흑색종의 절제된 침착물로부터 성장시켰다 (문헌 [Dudley, et al., *J Immunother.*, **2003**, 26:332-342] 참조; 그 전문이 본원에 참조로 포함됨). 신선한 종양을 멸균 조건 하에서 절개할 수 있다. 대표적 샘플을 형식적 병원체 분석을 위해 수집할 수 있다. 2 mm^3 내지 3 mm^3의 단일 단편이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 환자 당 5, 10, 15, 20, 25 또는 30개의 샘플이 얻어진다. 일부 실시양태에서, 환자 당 20, 25, 또는 30개의 샘플이 얻어진다. 일부 실시양태에서, 환자 당 20, 22, 24, 26, 또는 28개의 샘플이 얻어진다. 일부 실시양태에서, 환자 당 24개의 샘플이 얻어진다. 샘플을 24-웰 플레이트의 개별적 웰에 정치하고, 고-용량 IL-2 (6,000 IU/mL)를 갖는 성장 배지에서 유지하고, 종양의 파괴 및/또는 TIL의 증식에 대해 모니터링 할 수 있다. 프로세싱 후에 잔류하는 생존 세포를 갖는 임의의 종양을 단일 세포 현탁액 내로 효소적으로 소화시키고, 본원에 기재된 바와 같이 냉동보존할 수 있다.

[0527] 일부 실시양태에서, 성공적으로 성장된 TIL을 표현형 분석 (CD3, CD4, CD8, 및 CD56)을 위해 샘플링하고, 이용 가능한 경우 자가 종양에 대해 시험할 수 있다. TIL은 밤샘 공동배양이 인터페론-감마 (IFN-ɣ) 수준 > 200 pg/mL 및 2배 배경을 생성한 경우 반응성인 것으로 간주될 수 있다. (Goff, et al., *J Immunother.*, **2010**, 33:840-847; 그 전문이 본원에 참조로 포함됨). 일부 실시양태에서, 자가 반응성 또는 충분한 성장 패턴의 증거를 갖는 배양물을 때때로 급속 확장 (REP)으로 지칭되는 제2 확장을 비롯한 제2 확장 (예를 들어, 도 27의 단계 D에 따라 제공된 바와 같은 제2 확장)을 위해 선택할 수 있다. 일부 실시양태에서, 높은 자가 반응성 (예를 들어, 제2 확장 동안 높은 증식)을 갖는 확장된 TIL은 추가의 제2 확장을 위해 선택된다. 일부 실시양태에서, 높은 자가 반응성 (예를 들어, 도 27의 단계 D에서 제공된 바와 같은 제2 확장 동안 높은 증식)을 갖는 TIL은 도 27의 단계 D에 따른 추가의 제2 확장을 위해 선택된다.

[0528] 일부 실시양태에서, 환자는 ACT (입양 세포 전달)로 직접적으로 이동되지 않으며, 예를 들어, 일부 실시양태에서, 수확 및/또는 제1 확장 후, 세포는 즉시 이용되지 않는다. 이러한 실시양태에서, TIL은 냉동보존되고, 환자에의 투여 전 2일에 해동될 수 있다. 이러한 실시양태에서, TIL은 냉동보존되고, 환자에의 투여 전 1일에 해동될 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL은 냉동보존되고, 환자에의 투여 직전에 해동될 수 있다.

[0529] 주입 백 TIL의 냉동보존된 샘플의 세포 표현형은 유동 세포측정법 (예를 들어, 플로우조 (FlowJo))에 의해 표면 마커 CD3, CD4, CD8, CCR7, 및 CD45RA (비디 바이오사이언시즈)에 대해, 뿐만 아니라 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 의해 분석될 수 있다. 혈청 시토카인을 표준 효소-결합 면역흡착 검정 기법을 사용하여 측정하였다. 혈청 IFN-g의 상승은 > 100 pg/mL 및 4 3 기준선 수준 초과로서 정의되었다.

[0530] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법, 예를 들어 도 27에 예시된 것들에 의해 제조된 TIL은 TIL의 임상적 효능의 놀라운 개선을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법, 예를 들어 도 27에 예시된 것들에 의해 제조된 TIL은 예를 들어, 도 27에 예시된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에 기재된 것들 외의 방법에 의해 제조된 TIL에 비해 증가된 임상적 효능을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 것들 외의 방법은 프로세스 1C 및/또는 1세대 (Gen 1)로 지칭되는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 증가된 효능은 DCR, ORR, 및/또는 다른 임상적 반응에 의해 측정된다. 일부 실시양태에서, 본원에서 제공된 방법, 예를 들어 도 27에 예시된 것들에 의해 제조된 TIL은 예를 들어, 도 27에 예시된 것들 외의 방법, 예를 들어 Gen 1 프로세스를 비롯한 본원에 기재된 것들 외의 방법에 의해 제조된 TIL에 비해 유사한 반응까지의 시간 및 안전성 프로파일을 나타낸다.

[0531] 일부 실시양태에서, IFN-감마 (IFN-γ)는 치료 효능 및/또는 증가된 임상적 효능의 지표이다. 일부 실시양태에서, TIL로 치료되는 대상체의 혈액 중의 IFN-γ는 활성 TIL의 지표이다. 일부 실시양태에서, IFN-γ 생산에 대한 효능 검정이 채용된다. IFN-γ 생산은 세포독성 잠재성의 또다른 척도이다. IFN-γ 생산은 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 대상체의 혈액, 혈청, 또는 TIL에서 생체외에서 시토카인 IFN-γ의 수준을 측정함으로써 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, IFN-γ의 증가는 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 환자에서 치료 효능의 지표이다. 일부 실시양태에서, IFN-γ는 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1배, 2배, 3배, 4배, 또는 5배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ 분비는 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ 분비는 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 2배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ 분비는 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 3배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ 분비는 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 4배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ 분비는 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 5배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ는 콴티킨 ELISA 키트를 사용하여 측정된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ는 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 대상체의 TIL에서 생체외에서 측정된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ는 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 대상체의 혈액에서 측정된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ는 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 대상체의 TIL 혈청에서 측정된다.

[0532] 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 치료 효능 및/또는 증가된 임상적 효능의 지표이다. 일부 실시양태에서, TIL로 치료되는 대상체의 혈액 중의 보다 높은 평균 IP-10은 활성 TIL의 지표이다. IP-10 생산은 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 대상체의 혈액 중의 IP-10의 수준을 측정함으로써 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 환자에서의 치료 효능의 지표이다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1배, 2배, 3배, 4배, 또는 5배 이상의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 2배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 3배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 4배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서

제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 5배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, IP-10은 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 대상체의 혈액에서 측정된다. 일부 실시양태에서, IP-10은 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 대상체의 TIL 혈청에서 측정된다.

[0533] 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 치료 효능 및/또는 증가된 임상적 효능의 지표이다. 일부 실시양태에서, TIL로 치료되는 대상체의 혈액 중의 보다 높은 평균 MCP-1은 활성 TIL의 지표이다. MCP-1 생산은 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 대상체의 혈액 중의 MCP-1의 수준을 측정함으로써 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 환자에서의 치료 효능의 지표이다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1배, 2배, 3배, 4배, 또는 5배 이상의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 2배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 3배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 4배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 5배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, MCP-1은 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 대상체의 혈액에서 측정된다. 일부 실시양태에서, MCP-1은 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 대상체의 TIL 혈청에서 측정된다.

[0534] 일부 실시양태에서, 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL은 도 27에 예시되지 않은 것들을 비롯한 다른 방법, 에컨대 예를 들어, 프로세스 1C 방법으로 지칭되는 방법에 의해 제조된 TIL에 비해 증가된 폴리클로날성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 유의하게 개선된 폴리클로날성 및/또는 증가된 폴리클로날성은 치료 효능 및/또는 증가된 임상적 효능의 지표이다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 T-세포 레퍼토리 다양성을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성의 증가는 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL의 투여에 관한 치료 효능의 지표일 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 비해 1배, 2배, 10배, 100배, 500배, 또는 1000배 증가된다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1배 증가된다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 2배 증가된다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 10배 증가된다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 100배 증가된다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 500배 증가된다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1000배 증가된다.

[0535] 효능의 척도는 관련 기술분야에 공지된 뿐만 아니라 실시예 28을 비롯한 본원에서 제공된 실시예에 기재된 바와 같이, 질환 제어율 (DCR) 측정 뿐만 아니라 전체 반응률 (ORR)을 포함할 수 있다.

[0536] 1. **암 및 다른 질환을 치료하는 방법**

[0537] 본원에 기재된 조성물 및 방법은 질환을 치료하는 방법에 사용될 수 있다. 한 실시양태에서, 이들은 과다증식

성 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 것이다. 이들은 또한 본원에 및 하기 단락에 기재된 바와 같은 다른 장애를 치료하는 데 사용될 수 있다.

[0538] 일부 실시양태에서, 과다증식성 장애는 암이다. 일부 실시양태에서, 과다증식성 장애는 고형 종양 암이다. 일부 실시양태에서, 고형 종양 암은 흑색종, 난소암, 자궁경부암, 비-소세포 폐암 (NSCLC), 폐암, 방광암, 유방암, 인간 유두종 바이러스에 의해 유발되는 암, 두경부암 (두경부 편평 세포 암종 (HNSCC)을 포함함), 신장암, 및 신세포 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 과다증식성 장애는 혈액학적 악성 종양이다. 일부 실시양태에서, 고형 종양 암은 만성 림프구성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 광범위 거대 B 세포 림프종, 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 소포성 림프종, 및 외투 세포 림프종으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0539] 한 실시양태에서, 본 발명은 환자가 본 개시내용에 따른 TIL의 주입 전에 비-골수절제 화학요법으로 사전-치료되는, TIL의 집단으로 암을 치료하는 방법을 포함한다. 한 실시양태에서, 비-골수절제 화학요법은 2일 동안 (TIL 주입 전 제27일 및 제26일) 시클로포스파미드 60 mg/kg/일 및 5일 동안 (TIL 주입 전 제27일 내지 제23일) 플루다라빈 25 mg/m^2/일이다. 한 실시양태에서, 비-골수절제 화학요법 및 본 발명에 따른 TIL 주입 (제0일에) 후, 환자는 생리학적 허용시까지 8시간마다 720,000 IU/kg으로 정맥내로 IL-2의 정맥내 주입을 받는다.

[0540] 지시된 질환 또는 장애를 치료하고/거나, 예방하고/거나, 관리하는 데 있어서의 본원에 기재된 화합물 및 화합물의 조합의 효능은 인간 질환의 치료에 대한 지침을 제공하는 관련 기술분야에 공지된 다양한 모델을 사용하여 시험될 수 있다. 예를 들어, 난소암에 대한 치료의 효능을 측정하기 위한 모델은 예를 들어, 문헌 [Mullany, *et al.*, *Endocrinology* **2012**, *153,* 1585-92]; 및 [Fong, *et al.*, *J. Ovarian Res.* **2009**, *2,* 12]에 기재되어 있다. 췌장암에 대한 치료의 효능을 측정하기 위한 모델은 문헌 [Herreros-Villanueva, *et al.*, *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18,* 1286-1294]에 기재되어 있다. 유방암에 대한 치료의 효능을 측정하기 위한 모델은 예를 들어, 문헌 [Fantozzi, *Breast Cancer Res.* **2006**, *8,* 212]에 기재되어 있다. 흑색종에 대한 치료의 효능을 측정하기 위한 모델은 예를 들어, 문헌 [Damsky, *et al.*, *Pigment Cell & Melanoma Res.* **2010**, *23,* 853-859]에 기재되어 있다. 폐암에 대한 치료의 효능을 측정하기 위한 모델은 예를 들어, 문헌 [Meuwissen, *et al.*, *Genes & Development*, **2005**, *19,* 643-664]에 기재되어 있다. 폐암에 대한 치료의 효능을 측정하기 위한 모델은 예를 들어, 문헌 [Kim, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.* **2009**, *2,* 55-60]; 및 [Sano, *Head Neck Oncol.* **2009**, *1,* 32]에 기재되어 있다.

[0541] 일부 실시양태에서, IFN-감마 (IFN-γ)는 과다증식성 장애 치료에 대한 치료 효능의 지표이다. 일부 실시양태에서, TIL로 치료되는 대상체의 혈액 중의 IFN-γ는 활성 TIL의 지표이다. 일부 실시양태에서, IFN-γ 생산에 대한 효능 검정이 채용된다. IFN-γ 생산은 세포독성 잠재성의 또다른 척도이다. IFN-γ 생산은 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 대상체의 혈액 중의 시토카인 IFN-γ의 수준을 측정함으로써 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 방법에 의해 얻어진 TIL은 도 83에 예시된 바와 같은 프로세스 1C로 지칭되는 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 대상체에 비해 본 방법의 TIL로 치료되는 대상체의 혈액 중의 증가된 IFN-γ를 제공한다. 일부 실시양태에서, IFN-γ의 증가는 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 환자에서의 치료 효능의 지표이다. 일부 실시양태에서, IFN-γ는 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1배, 2배, 3배, 4배, 또는 5배 이상 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ 분비는 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ 분비는 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 2배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ 분비는 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 3배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ 분비는 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 4배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ 분비는 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 5배 증가된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ는 콴티킨 ELISA 키트를 사용하여 측정된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ는 콴티킨 ELISA 키트를 사용하여 측정된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ는 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 환자로부터의 TIL에서 생체외에서 측정된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ는 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되

는 환자의 혈액에서 측정된다. 일부 실시양태에서, IFN-γ는 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 환자에서의 혈청에서 측정된다.

[0542] 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 과다증식성 장애 치료에 대한 치료 효능 및/또는 증가된 임상적 효능의 지표이다. 일부 실시양태에서, TIL로 치료되는 대상체의 혈액 중의 보다 높은 평균 IP-10은 활성 TIL의 지표이다. 일부 실시양태에서, 본 방법에 의해 얻어진 TIL은 도 83에 예시된 바와 같은 프로세스 1C로 지칭되는 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 대상체에 비해 본 방법의 TIL로 치료되는 대상체의 혈액 중의 보다 높은 평균 IP-10을 제공한다. IP-10 생산은 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 대상체의 혈액 중의 IP-10의 수준을 측정함으로써 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 환자에서의 치료 효능의 지표이다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1배, 2배, 3배, 4배, 또는 5배 이상의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 2배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 3배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 4배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 IP-10은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 5배의 증가와 상관된다.

[0543] 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 과다증식성 장애 치료에 대한 치료 효능 및/또는 증가된 임상적 효능의 지표이다. 일부 실시양태에서, TIL로 치료되는 대상체의 혈액 중의 보다 높은 평균 MCP-1은 활성 TIL의 지표이다. 일부 실시양태에서, 본 방법에 의해 얻어진 TIL은 도 83에 예시된 바와 같은 프로세스 1C로 지칭되는 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 대상체에 비해 본 방법의 TIL로 치료되는 대상체의 혈액 중의 보다 높은 평균 MCP-1을 제공한다. MCP-1 생산은 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 대상체의 혈액 중의 MCP-1의 수준을 측정함으로써 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL로 치료되는 환자에서의 치료 효능의 지표이다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1배, 2배, 3배, 4배, 또는 5배 이상의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 2배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 3배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 4배의 증가와 상관된다. 일부 실시양태에서, 보다 높은 평균 MCP-1은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 5배의 증가와 상관된다.

[0544] 일부 실시양태에서, 예를 들어 도 27에 기재된 바와 같은 것들을 비롯한 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL은 도 27에 예시되지 않은 것들을 비롯한 다른 방법, 예컨대 예를 들어, 프로세스 1C 방법으로 지칭되는 방법에 의해 제조된 TIL에 비해 증가된 폴리클로날성을 나타낸다. 일부 실시양태에서, 유의하게 개선된 폴리클로날성 및/또는 증가된 폴리클로날성은 암 치료에 대한 치료 효능 및/또는 증가된 임상적 효능의 지표이다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 T-세포 레퍼토리 다양성을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성의 증가는 본 발명의 방법에 의해 제조된 TIL의 투여에 관한 치료 효능의 지표일 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성

은 예를 들어 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL에 비해 1배, 2배, 10배, 100배, 500배, 또는 1000배 증가된다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1배 증가된다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 2배 증가된다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 10배 증가된다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 100배 증가된다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 500배 증가된다. 일부 실시양태에서, 폴리클로날성은 비치료된 환자에 비해 및/또는 예를 들어, 도 27에 구현된 것들 외의 방법을 비롯한 본원에서 제공된 것들과는 다른 방법을 사용하여 제조된 TIL로 치료되는 환자에 비해 1000배 증가된다.

[0545] 2. **공동-투여의 방법**

[0546] 일부 실시양태에서, 예를 들어 도 27의 단계 A 내지 F에 기재된 방법으로부터 유래된 TIL을 비롯한 본원에 기재된 바와 같이 제조된 TIL은 1종 이상의 면역 검사점 조절제, 예컨대 하기 기재된 항체와 조합으로 투여될 수 있다. 예를 들어, PD-1을 표적화하고, 본 발명의 TIL과 공동-투여될 수 있는 항체로는 예를 들어, 니볼루맙 (BMS-936558, 브리스톨-마이어스 스퀴브 (Bristol-Myers Squibb); 옵디보 (Opdivo)®), 펨브롤리주맙 (람브롤리주맙, MK03475 또는 MK-3475, 머크 (Merck); 키트루다 (Keytruda)®), 인간화 항-PD-1 항체 JS001 (상하이 준시 (ShangHai JunShi)), 모노클로날 항-PD-1 항체 TSR-042 (테사로, 인크. (Tesaro, Inc.)), 피딜리주맙 (Pidilizumab) (항-PD-1 mAb CT-011, 메디베이션 (Medivation)), 항-PD-1 모노클로날 항체 BGB-A317 (베이진 (BeiGene)), 및/또는 항-PD-1 항체 SHR-1210 (상하이 헹루이 (ShangHai HengRui)), 인간 모노클로날 항체 REGN2810 (리제네론 (Regeneron)), 인간 모노클로날 항체 MDX-1106 (브리스톨-마이어스 스퀴브), 및/또는 인간화 항-PD-1 IgG4 항체 PDR001 (노바티스 (Novartis))을 들 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, PD-1 항체는 클론: RMP1-14 (래트 IgG) - 바이오엑스셀 (BioXcell) 카탈로그# BP0146으로부터의 것이다. 본원에 기재된 바와 같은 단계 A 내지 F에 따라 제조된 TIL과의 공동-투여 방법에 사용하기에 적합한 다른 적합한 항체는 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제8,008,449호에 개시된 항-PD-1 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체 또는 그의 항원-결합 부분은 PD-L1에 특이적으로 결합하고, PD-1과의 그의 상호작용을 억제함으로써, 면역 활성을 증가시킨다. PD-L1에 결합하고, PD-1 및 PD-L1 사이의 상호작용을 방해하며, 항-종양 면역 반응을 자극하는 관련 기술분야에 공지된 임의의 항체는 본원에 기재된 바와 같은 단계 A 내지 F에 따라 제조된 TIL과의 공동-투여 방법에 사용하기에 적합하다. 예를 들어, PD-L1을 표적화하고, 임상 시험 중인 항체로는 BMS-936559 (브리스톨-마이어스 스퀴브) 및 MPDL3280A (제넨테크)를 들 수 있다. PD-L1을 표적화하는 다른 적합한 항체는 본원에 참조로 포함되는 미국 특허 제7,943,743호에 개시되어 있다. PD-1 또는 PD-L1에 결합하고, PD-1/PD-L1 상호작용을 방해하며, 항-종양 면역 반응을 자극하는 임의의 항체는 본원에 기재된 바와 같은 단계 A 내지 F에 따라 제조된 TIL과의 공동-투여 방법에 사용하기에 적합함은 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다. 일부 실시양태에서, 단계 A 내지 F에 따라 제조된 TIL의 조합이 투여되는 대상체는 환자가 항-PD-1 항체 단독의 투여에 난치성인 암 유형을 갖는 경우, 항-PD-1 항체와 공동 투여된다. 일부 실시양태에서, 환자는 환자가 난치성 흑색종을 갖는 경우 항-PD-1과 조합으로 TIL이 투여된다. 일부 실시양태에서, 환자는 환자가 비-소세포 폐 암종 (NSCLC)을 갖는 경우 항-PD-1과 조합으로 TIL이 투여된다.

[0547] 3. **환자의 임의적 림프구고갈 사전컨디셔닝**

[0548] 한 실시양태에서, 본 발명은 환자가 본 개시내용에 따른 TIL의 주입 전에 비-골수절제 화학요법으로 사전-치료되는, TIL의 집단으로 암을 치료하는 방법을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 비-골수절제 화학요법으로 사전-치료된 환자에서 암의 치료에 사용하기 위한 TIL의 집단을 포함한다. 한 실시양태에서, TIL의 집단은 주입에 의해 투여하기 위한 것이다. 한 실시양태에서, 비-골수절제 화학요법은 2일 동안 (TIL 주입 전 제27일 및 제26일) 시클로포스파미드 60 mg/kg/일 및 5일 동안 (TIL 주입 전 제27일 내지 제23일) 플루다라빈 25 mg/m^2/일이다. 한 실시양태에서, 비-골수절제 화학요법 및 본 개시내용에 따른 TIL 주입 (제0일에) 후, 환자는 생리학적 허용시까지 8시간마다 720,000 IU/kg으로 정맥내로 IL-2 (알데스루킨, 프로루킨으로서 시판됨)의 정맥내 주입을 받는다. 특정 실시양태에서, TIL의 집단은 IL-2와 조합으로 암을 치료하는 데 사용하기 위한 것이며, IL-

2는 TIL의 집단 후에 투여된다.

[0549] 실험적 발견은 종양-특이적 T 림프구의 입양 전달 전의 림프구고갈이 조절성 T 세포를 제거하고, 면역계의 요소('시토카인 싱크')와 경쟁함으로써 치료 효능을 향상시키는 데 핵심적 역할을 함을 지시한다. 따라서, 본 발명의 일부 실시양태는 본 발명의 TIL의 도입 전에 환자에 대한 림프구고갈 단계 (때때로 "면역억제성 컨디셔닝"으로도 지칭됨)를 이용한다.

[0550] 일반적으로, 림프구고갈은 플루다라빈 또는 시클로포스파미드 (활성 형태는 마포스파미드로 지칭됨) 및 이들의 조합의 투여를 사용하여 달성된다. 이러한 방법은 문헌 [Gassner, *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, *60,* 75-85], [Muranski, *et al.*, *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, **2006**, *3,* 668-681], [Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26,* 5233-5239], 및 [Dudley, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **2005**, *23,* 2346-2357]에 기재되어 있으며, 이들 모두는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0551] 일부 실시양태에서, 플루다라빈은 0.5 μg/mL 내지 10 μg/mL 플루다라빈의 농도로 투여된다. 일부 실시양태에서, 플루다라빈은 1 μg/mL 플루다라빈의 농도로 투여된다. 일부 실시양태에서, 플루다라빈 치료는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 또는 7일 이상 동안 투여된다. 일부 실시양태에서, 플루다라빈은 10 mg/kg/일, 15 mg/kg/일, 20 mg/kg/일, 25 mg/kg/일, 30 mg/kg/일, 35 mg/kg/일, 40 mg/kg/일, 또는 45 mg/kg/일의 투여량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 플루다라빈 치료는 2 내지 7일 동안 35 mg/kg/일로 투여된다. 일부 실시양태에서, 플루다라빈 치료는 4 내지 5일 동안 35 mg/kg/일로 투여된다. 일부 실시양태에서, 플루다라빈 치료는 4 내지 5일 동안 25 mg/kg/일로 투여된다.

[0552] 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드의 활성 형태인 마포스파미드는 시클로포스파미드의 투여에 의해 0.5 μg/mL 내지 10 μg/mL의 농도로 얻어진다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드의 활성 형태인 마포스파미드는 시클로포스파미드의 투여에 의해 1 μg/mL의 농도로 얻어진다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드 치료는 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 또는 7일 이상 동안 투여된다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드는 100 mg/m^2/일, 150 mg/m^2/일, 175 mg/m^2/일, 200 mg/m^2/일, 225 mg/m^2/일, 250 mg/m^2/일, 275 mg/m^2/일, 또는 300 mg/m^2/일의 투여량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드는 정맥내로 (즉, i.v.) 투여된다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드 치료는 2 내지 7일 동안 35 mg/kg/일로 투여된다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드 치료는 4 내지 5일 동안 250 mg/m^2/일로 i.v. 투여된다. 일부 실시양태에서, 시클로포스파미드 치료는 4일 동안 250 mg/m^2/일로 i.v. 투여된다.

[0553] 일부 실시양태에서, 림프구고갈은 환자에게 플루다라빈 및 시클로포스파미드를 함께 투여함으로써 수행된다. 일부 실시양태에서, 플루다라빈은 25 mg/m^2/일로 i.v. 투여되고, 시클로포스파미드는 250 mg/m^2/일로 4일에 걸쳐 i.v. 투여된다.

[0554] 한 실시양태에서, 림프구고갈은 2일 동안 60 mg/m^2/일의 용량으로 시클로포스파미드의 투여, 이어서 5일 동안 25 mg/m^2/일의 용량으로 플루다라빈의 투여에 의해 수행된다.

[0555] 4. **IL-2 처방**

[0556] 한 실시양태에서, IL-2 처방은 고-용량 IL-2 처방을 포함하며, 고-용량 IL-2 처방은 TIL의 치료 집단의 치료 유효 부분을 투여한 다음날에 시작하여 정맥내로 투여되는 알데스루킨, 또는 그의 바이오시밀러 또는 변이체를 포함하고, 알데스루킨 또는 그의 바이오시밀러 또는 변이체는 최대 14개의 용량 동안, 허용시까지 8시간마다 15-분 볼루스 정맥내 주입을 사용하여 0.037 mg/kg 또는 0.044 mg/kg IU/kg (환자 체질량)의 용량으로 투여된다. 9일의 휴식 후, 이 스케줄은 총 최대 28개의 용량 동안, 또다른 14개의 용량 동안 반복될 수 있다.

[0557] 한 실시양태에서, IL-2 처방은 데크레센도 IL-2 처방을 포함한다. 데크레센도 IL-2 처방은 문헌 [O'Day, *et al.*, *J. Clin. Oncol.* **1999**, *17,* 2752-61] 및 [Eton, *et al.*, *Cancer* **2000**, *88,* 1703-9]에 기재되었으며, 이들의 개시내용은 본원에 참조로 포함된다. 한 실시양태에서, 데크레센도 IL-2 처방은 6시간에 걸쳐 정맥내로 투여되는 18 × 10^6 IU/m^2, 이어서 12시간에 걸쳐 정맥내로 투여되는 18 × 10^6 IU/m^2, 이어서 24시간에 걸쳐 정맥내로 투여되는 18 × 10^6 IU/m^2, 이어서 72시간에 걸쳐 정맥내로 투여되는 4.5 × 10^6 IU/m^2를 포함한다. 이 치료 사이클은 28일마다 최대 4 사이클 동안 반복될 수 있다. 한 실시양태에서, 데크레센도 IL-2 처방은 제1일

에 18,000,000 IU/m^2, 제2일에 9,000,000 IU/m^2, 및 제3일 및 제4일에 4,500,000 IU/m^2를 포함한다.

[0558] 한 실시양태에서, IL-2 처방은 0.10 mg/일 내지 50 mg/일의 용량으로 1, 2, 4, 6, 7, 14 또는 21일마다 페길화된 IL-2의 투여를 포함한다.

[0559] 5. **입양 세포 전달**

[0560] 입양 세포 전달 (ACT)은 매우 효과적인 형태의 면역요법이며, 암 환자 내로의 항종양 활성을 갖는 면역 세포의 전달을 포함한다. ACT는 항종양 활성을 갖는 림프구의 시험관내에서의 확인, 이들 세포의 많은 수로의 시험관내 확장, 및 암-함유 숙주 내로의 그들의 주입을 포함하는 치료 접근법이다. 입양 전달에 사용되는 림프구는 절제된 종양 (종양 침윤 림프구 또는 TIL)의 기질로부터 유래될 수 있다. ACT를 위한 TIL은 본원에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL은 예를 들어, 도 27에 기재된 바와 같은 방법에 따라 제조된다. 이들은 또한 이들이 항종양 T-세포 수용체 (TCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하도록 유전적으로 조작되거나, 혼합된 림프구 종양 세포 배양물 (MLTC)로 풍부화되거나, 자가 항원 제시 세포 및 종양 유래된 펩티드를 사용하여 클로닝되는 경우 혈액으로부터 유래될 수 있다. 림프구가 주입되는 암-함유 숙주로부터 기원하는 ACT는 자가 ACT로 용어화된다. 미국 공개 제2011/0052530호는 주로 전이성 흑색종을 앓고 있는 환자의 치료를 위한, 입양 세포 요법을 수행하여 암 퇴행을 촉진시키는 방법에 관한 것이며, 이는 이들 방법에 대해 그 전문이 참조로 포함된다. 일부 실시양태에서, TIL은 본원에 기재된 바와 같이 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL은 단일 용량으로 투여될 수 있다. 이러한 투여는 주사, 예를 들어, 정맥내 주사에 의한 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, TIL 및/또는 세포독성 림프구는 다중 용량으로 투여될 수 있다. 투여는 1년 당 1회, 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 또는 6회 초과일 수 있다. 투여는 1개월에 1회, 2주마다 1회, 1주에 1회, 또는 2일마다 1회일 수 있다. TIL 및/또는 세포독성 림프구의 투여는 필요한 만큼 길게 계속될 수 있다.

[0561] 6. **예시적인 치료 실시양태**

[0562] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 (a) 환자로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계; (b) TIL의 제1 집단의 초기 확장을 제1 세포 배양 배지에서 수행하여 TIL의 제2 집단을 얻는 단계 (여기서, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 5배 더 크고, 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함함); (c) TIL의 제2 집단의 급속 확장을 골수 인공 항원 제시 세포 (골수 aAPC)의 집단을 사용하여 제2 세포 배양 배지에서 수행하여 TIL의 제3 집단을 얻는 단계 (여기서, TIL은 제3 집단은 급속 확장의 시작으로부터 7일 후에 TIL의 제2 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고; 제2 세포 배양 배지는 IL-2 및 OKT-3을 포함함); (d) TIL의 제3 집단의 치료 유효 부분을 암을 갖는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양 침윤 림프구 (TIL)의 집단으로 암을 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 암을 치료하는 데 사용하기 위한 종양 침윤 림프구 (TIL)의 집단을 제공하며, TIL의 집단은 (b) 환자로부터 절제된 종양으로부터 얻어진 TIL의 제1 집단의 초기 확장을 제1 세포 배양 배지에서 수행하여 TIL의 제2 집단을 얻는 단계 (여기서, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 5배 더 크고, 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함함); (c) TIL의 제2 집단의 급속 확장을 골수 인공 항원 제시 세포 (골수 aAPC)를 사용하여 제2 세포 배양 배지에서 수행하여 TIL의 제3 집단을 얻는 단계 (여기서, TIL의 제3 집단은 급속 확장의 시작으로부터 7일 후에 TIL의 제2 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고; 제2 세포 배양 배지는 IL-2 및 OKT-3을 포함함); (d) TIL의 제3 집단의 치료 유효 부분을 암을 갖는 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수득가능하다. 일부 실시양태에서, 방법은 환자로부터 절제된 종양으로부터 TIL의 제1 집단을 얻는 제1 단계 (a)를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL-2는 제2 세포 배양 배지에서 약 3000 IU/mL의 초기 농도로 존재하고, OKT-3 항체는 약 30 ng/mL의 초기 농도로 존재한다. 일부 실시양태에서, 제1 확장은 14일 이하의 기간에 걸쳐 수행된다. 일부 실시양태에서, 제1 확장은 기체 투과성 용기를 사용하여 수행된다. 일부 실시양태에서, 제2 확장은 기체 투과성 용기를 사용하여 수행된다. 일부 실시양태에서, 급속 확장에서 TIL의 제2 집단 대 aAPC의 집단의 비는 1 대 80 내지 1 대 400이다. 일부 실시양태에서, 급속 확장에서 TIL의 제2 집단 대 aAPC의 집단의 비는 약 1 대 300이다. 일부 실시양태에서, 치료를 위한 암은 흑색종, 난소암, 자궁경부암, 비-소세포 폐암 (NSCLC), 폐암, 방광암, 유방암, 인간 유두종 바이러스에 의해 유발되는 암, 두경부암 (두경부 편평 세포 암종 (HNSCC)을 포함함), 신장암, 및 신세포 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 치료를 위한 암은 흑색종, 난소암, 및 자궁경부암으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 치료를 위한 암은 흑색종이다. 일부 실시양태에서, 치료를 위한 암은 난소암이다. 일부 실시양태에서, 치료를 위한 암은 자궁경부암이다. 일부 실시양태에서, 암을 치료하는 방법은 TIL의 제3 집단을 환자에게 투여하기 전에 환자를 비-골수절제 림프구고갈 처방으로 치료하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 비-골수절제 림프구고갈 처방은 2일 동안 60 mg/m2/일

의 용량으로 시클로포스파미드의 투여, 이어서 5일 동안 25 mg/m2/일의 용량으로 플루다라빈의 투여의 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 고 용량 IL-2 처방은 허용시까지 8시간마다 15-분 볼루스 정맥내 주입으로서 투여되는 600,000 또는 720,000 IU/kg의 알데스루킨, 또는 그의 바이오시밀러 또는 변이체를 포함한다.

[0563] **V. 예시적인 실시양태**

[0564] 일부 실시양태에서, 본 발명은

[0565] (a) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 대상체로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0566] (b) 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계;

[0567] (c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 11일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0568] (d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 11일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0569] (e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0570] (f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남);

[0571] (g) 단계 (f)로부터의 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계;

[0572] (h) 단계 (g)에서의 주입 백으로부터의 TIL의 제3 집단의 치료 유효 투여량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 확장된 종양 침윤 림프구 (TIL)를 투여하는 것을 포함하는 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0573] 일부 실시양태에서, 냉동보존 프로세스는 DMSO를 포함하는 배지에서의 냉동보존을 포함한다. 일부 실시양태에서, 냉동보존 배지는 7% 내지 10% DMSO를 포함한다. 일부 실시양태에서, 냉동보존 배지는 CS10이다.

[0574] 일부 실시양태에서, 단계 (e)에서 수확된 TIL의 치료 집단은 단계 (h)에서 TIL의 치료 유효 투여량을 투여하기 위한 충분한 TIL을 포함한다.

[0575] 일부 실시양태에서, 단계 (h)에서 치료 유효 투여량을 투여하기 위한 충분한 TIL의 수는 약 2.3×10^{10} 내지 약 13.7×10^{10}개이다.

[0576] 일부 실시양태에서, 항원 제시 세포 (APC)는 PBMC이다.

[0577] 일부 실시양태에서, PBMC는 단계 (d)에서 제9일 내지 제11일 중 임의의 날에 세포 배양물에 첨가된다.

[0578] 일부 실시양태에서, 단계 (h)에서 TIL 세포의 치료 유효 투여량을 투여하기 전에, 비-골수절제 림프구고갈 처방이 환자에게 투여되었다.

[0579] 일부 실시양태에서, 비-골수절제 림프구고갈 처방은 2일 동안 60 mg/m^2/일의 용량으로 시클로포스파미드의 투여, 이어서 5일 동안 25 mg/m^2/일의 용량으로 플루다라빈의 투여의 단계를 포함한다.

[0580] 일부 실시양태에서, 방법은 단계 (h)에서 환자에의 TIL 세포의 투여 후 일에 시작하여 고-용량 IL-2 처방으로 환자를 치료하는 단계를 더 포함한다.

[0581] 일부 실시양태에서, 고-용량 IL-2 처방은 허용시까지 8시간마다 15-분 볼루스 정맥내 주입으로서 투여되는 600,000 또는 720,000 IU/kg을 포함한다.

[0582] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서 TIL의 제3 집단은 대상체에게 투여되는 경우 증가된 효능, 증가된 인터페론-

감마 (IFN-γ) 생산, 증가된 폴리클로날성, 증가된 평균 IP-10, 및/또는 증가된 평균 MCP-1을 제공한다. 일부 실시양태에서, IFN-γ의 증가, 증가된 평균 IP-10, 및/또는 증가된 평균 MCP-1은 TIL로 치료되는 대상체의 혈액에서 측정된다.

[0583] 일부 실시양태에서, 암은 흑색종, 난소암, 자궁경부암, 비-소세포 폐암 (NSCLC), 폐암, 방광암, 유방암, 인간 유두종 바이러스에 의해 유발되는 암, 두경부암 (두경부 편평 세포 암종 (HNSCC)을 포함함), 신장암, 및 신세포 암종으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 흑색종, HNSCC, 자궁경부암, 및 NSCLC로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 암은 흑색종이다. 일부 실시양태에서, 암은 HNSCC이다. 일부 실시양태에서, 암은 자궁경부암이다. 일부 실시양태에서, 암은 NSCLC이다.

[0584] 한 실시양태에서, 본 발명은 종양 침윤 림프구 (TIL)를 확장시키는 방법을 제공한다.

[0585] 본 발명은 (a) 환자로부터 종양 샘플을 얻는 단계 (여기서, 상기 종양 샘플은 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 포함함); (b) 상기 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱하는 단계; (c) 상기 종양 단편을 닫힌 용기 내로 첨가하는 단계; (d) 상기 TIL의 제1 집단의 초기 확장을 제1 세포 배양 배지에서 수행하여 TIL의 제2 집단을 얻는 단계 (여기서, 상기 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함하고, 상기 초기 확장은 적어도 100 cm^2의 기체-투과성 표면적을 제공하는 상기 닫힌 용기에서 수행되고, 상기 초기 확장은 약 7일 내지 14일의 제1 기간 내에 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, 상기 TIL의 제2 집단은 상기 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남); (e) 상기 TIL의 제2 집단을 제2 세포 배양 배지에서 확장시키는 단계 (여기서, 상기 제2 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3, 및 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC, 단핵 세포 (MNC)로도 공지됨)를 포함하고, 상기 확장은 약 7일 내지 14일의 제2 기간 내에 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, 상기 TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 나타내고, 상기 확장은 적어도 500 cm^2의 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남); (f) 단계 (e)로부터 얻어진 상기 TIL의 제3 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 단계 (f)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남); 및 (g) 단계 (f)로부터의 상기 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 상기 단계 (f)에서 (g)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남)를 포함하는, 종양 침윤 림프구 (TIL)를 확장시키는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 방법은 시험관내 또는 생체외 방법이다.

[0586] 일부 실시양태에서, 방법은 단계 (f)에서 세포 프로세싱 시스템, 예컨대 프레세니우스 카비에 의해 제조된 LOVO 시스템을 통해 수확하는 것을 더 포함한다. 용어 "LOVO 세포 프로세싱 시스템"은 또한 연속적 유동 및 세포 프로세싱을 허용하여 펠릿화 없이 상청액 또는 세포 배양 배지를 제거하는, 멸균 및/또는 닫힌 계 환경에서 막 또는 필터, 예컨대 스피닝 막 또는 스피닝 필터를 통해 세포를 포함하는 용액을 펌핑할 수 있는 임의의 판매자에 의해 제조된 임의의 기기 또는 장치를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 세포 프로세싱 시스템은 닫힌, 멸균 계에서 세포 분리, 세척, 유체-교환, 농축, 및/또는 다른 세포 프로세싱 단계를 수행할 수 있다.

[0587] 일부 실시양태에서, 닫힌 용기는 G-용기 및 주리 세포백으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0588] 일부 실시양태에서, 단계 (g)에서의 주입 백은 하이포써모솔-함유 주입 백이다.

[0589] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서의 제1 기간 및 단계 (e)에서의 상기 제2 기간은 각각 개별적으로 10일, 11일, 또는 12일의 기간 내에 수행된다.

[0590] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서의 제1 기간 및 단계 (e)에서의 상기 제2 기간은 각각 개별적으로 11일의 기간 내에 수행된다.

[0591] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (g)는 약 25일 내지 약 30일의 기간 내에 수행된다.

[0592] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (g)는 약 20일 내지 약 25일의 기간 내에 수행된다.

[0593] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (g)는 약 20일 내지 약 22일의 기간 내에 수행된다.

[0594] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (g)는 22일 이하에 수행된다.

[0595] 일부 실시양태에서, 단계 (c) 내지 (f)는 단일 용기에서 수행되며, 단일 용기에서 단계 (c) 내지 (f)를 수행하는 것은 1개 초과의 용기에서 단계 (c) 내지 (f)를 수행하는 것에 비해 절제된 종양 당 TIL 수득량의 증가를 발생시킨다.

[0596] 일부 실시양태에서, PBMC는 단계 (e)에서의 제2 기간 동안 계를 열지 않고 TIL에 첨가된다.

[0597] 일부 실시양태에서, 상기 TIL의 제3 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 상기 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 CD27+의 발현, CD28+의 발현, 보다 긴 텔로미어, 증가된 CD57 발현, 및 감소된 CD56 발현으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 나타낸다.

[0598] 일부 실시양태에서, 상기 TIL의 제3 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 상기 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 증가된 CD57 발현 및 감소된 CD56 발현을 나타낸다.

[0599] 일부 실시양태에서, 미생물 오염의 위험은 열린 계에 비해 감소된다.

[0600] 일부 실시양태에서, 단계 (g)로부터의 TIL은 환자 내로 주입된다.

[0601] 본 발명은 또한 (a) 환자로부터 종양 샘플을 얻는 단계 (여기서, 상기 종양 샘플은 TIL의 제1 집단을 포함함); (b) 상기 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱하는 단계; (c) 상기 종양 단편을 닫힌 용기 내로 첨가하는 단계; (d) 상기 TIL의 제1 집단의 초기 확장을 제1 세포 배양 배지에서 수행하여 TIL의 제2 집단을 얻는 단계 (여기서, 상기 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함하고, 상기 초기 확장은 적어도 100 cm^2의 기체-투과성 표면적을 제공하는 상기 닫힌 용기에서 수행되고, 상기 초기 확장은 약 7일 내지 14일의 제1 기간 내에 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, 상기 TIL의 제2 집단은 상기 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남); (e) 상기 TIL의 제2 집단을 제2 세포 배양 배지에서 확장시키는 단계 (여기서, 상기 제2 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3, 및 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함하고, 상기 확장은 약 7일 내지 14일의 제2 기간 내에 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, 상기 TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 나타내고, 상기 확장은 적어도 500 cm^2의 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남); (f) 단계 (e)로부터 얻어진 상기 TIL의 제3 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 단계 (f)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남); (g) 단계 (f)로부터의 상기 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 상기 단계 (f)에서 (g)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남); 및 (h) 단계 (g)에서의 상기 주입 백으로부터의 TIL 세포의 치료 유효량을 상기 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 종양 침윤 림프구 (TIL)의 집단으로 환자에서 암을 치료하는 방법을 제공한다.

[0602] 일부 실시양태에서, 본 발명은 또한 암을 치료하는 데 사용하기 위한 종양 침윤 림프구 (TIL)의 집단을 포함하며, TIL의 집단은 (b) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 프로세싱하는 단계 (여기서, 상기 종양 샘플은 다수의 종양 단편으로의 TIL의 제1 집단을 포함함); (c) 상기 종양 단편을 닫힌 용기 내로 첨가하는 단계; (d) 상기 TIL의 제1 집단의 초기 확장을 제1 세포 배양 배지에서 수행하여 TIL의 제2 집단을 얻는 단계 (여기서, 상기 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함하고, 상기 초기 확장은 적어도 100 cm^2의 기체-투과성 표면적을 제공하는 상기 닫힌 용기에서 수행되고, 상기 초기 확장은 약 7일 내지 14일의 제1 기간 내에 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, 상기 TIL의 제2 집단은 상기 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남); (e) 상기 TIL의 제2 집단을 제2 세포 배양 배지에서 확장시키는 단계 (여기서, 상기 제2 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3, 및 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 포함하고, 상기 확장은 약 7일 내지 14일의 제2 기간 내에 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, 상기 TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 나타내고, 상기 확장은 적어도 500 cm^2의 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남); (f) 단계 (e)로부터 얻어진 상기 TIL의 제3 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 단계 (f)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남); (g) 단계 (f)로부터의 상기 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 상기 단계 (f)에서 (g)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남)를 포함하는 방법으로부터 수득가능하다. 일부 실시양태에서, 방법은 환자로부터 종양 샘플을 얻는 제1 단계 (a)를 포함하며, 상기 종양 샘플은 TIL의 제1 집단을 포함한다. 일부 실시양태에서, TIL의 집단은 치료 유효량으로 단계 (g)에서의 상기 주입 백으로부터의 투여를 위한 것이다.

[0603] 일부 실시양태에서, 단계 (h)에서 TIL 세포의 치료 유효량을 투여하기 전에, 비-골수절제 림프구고갈 처방이 상기 환자에게 투여되었다. 일부 실시양태에서, TIL의 집단은 비-골수절제 림프구고갈 처방을 겪은 환자에게 투

여하기 위한 것이다.

[0604] 일부 실시양태에서, 비-골수절제 림프구고갈 처방은 2일 동안 60 mg/m^2/일의 용량으로 시클로포스파미드의 투여, 이어서 5일 동안 25 mg/m^2/일의 용량으로 플루다라빈의 투여의 단계를 포함한다.

[0605] 일부 실시양태에서, 방법은 단계 (h)에서의 상기 환자에의 상기 TIL 세포의 투여 후 일에 시작하여 상기 환자를 고-용량 IL-2 처방으로 치료하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, TIL의 집단은 고-용량 IL-2 처방 전에 투여하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, TIL의 집단은 고-용량 IL-2 처방의 시작 전 1일에 투여하기 위한 것이다.

[0606] 일부 실시양태에서, 고-용량 IL-2 처방은 허용시까지 8시간마다 15-분 볼루스 정맥내 주입으로서 투여되는 600,000 또는 720,000 IU/kg을 포함한다.

[0607] 일부 실시양태에서, 상기 TIL의 제3 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 상기 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 CD27+의 발현, CD28+의 발현, 보다 긴 텔로미어, 증가된 CD57 발현, 및 감소된 CD56 발현으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 나타낸다.

[0608] 일부 실시양태에서, 상기 TIL의 제3 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 상기 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 증가된 CD57 발현 및 감소된 CD56 발현을 나타낸다.

[0609] 본 발명은 또한 (a) 프로세싱된 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계; (b) 상기 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단의 제1 확장을 제1 세포 배양 배지에서 수행하여 TIL의 제2 집단을 얻는 단계 (여기서, 상기 제1 세포 배양 배지는 IL-2를 포함하고, 상기 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 상기 제1 확장은 약 3일 내지 14일의 제1 기간 내에 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, 상기 TIL의 제2 집단은 상기 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (a)에서 단계 (b)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남); (c) 상기 TIL의 제2 집단을 제2 세포 배양 배지에서 확장시키는 단계 (여기서, 상기 제2 세포 배양 배지는 IL-2, OKT-3, 및 항원-제시 세포를 포함하고, 상기 확장은 약 7일 내지 14일의 제2 기간 내에 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, 상기 TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 나타내고, 상기 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남); (d) 단계 (c)로부터 얻어진 상기 TIL의 제3 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남); 및 (e) 단계 (d)로부터의 상기 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 상기 단계 (d)에서 (e)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남)를 포함하는, 종양 침윤 림프구 (TIL)를 확장시키는 방법을 제공한다.

[0610] 일부 실시양태에서, 방법은 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계를 더 포함한다. 일부 실시양태에서, 냉동보존 프로세스는 1:1 비의 수확된 TIL 집단 대 CS10 배지를 사용하여 수행된다.

[0611] 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이다. 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 인공 항원-제시 세포이다.

[0612] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서의 수확은 LOVO 세포 프로세싱 시스템을 사용하여 수행된다.

[0613] 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 50개의 단편을 포함하며, 각각의 단편은 약 27 mm^3의 부피를 갖는다. 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1300 mm^3 내지 약 1500 mm^3의 총 부피를 갖는 약 30개 내지 약 60개의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1350 mm^3의 총 부피를 갖는 약 50개의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1 그램 내지 약 1.5 그램의 총 질량을 갖는 약 50개의 단편을 포함한다.

[0614] 일부 실시양태에서, 제2 세포 배양 배지는 G-용기 및 주리 세포백으로 이루어진 군으로부터 선택되는 용기에 제공된다.

[0615] 일부 실시양태에서, 단계 (e)에서의 주입 백은 하이포써모솔-함유 주입 백이다.

[0616] 일부 실시양태에서, 단계 (b)에서의 제1 기간 및 단계 (c)에서의 상기 제2 기간은 각각 개별적으로 10일, 11일, 또는 12일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)에서의 제1 기간 및 단계 (c)에서의 상기 제2

기간은 각각 개별적으로 11일의 기간 내에 수행된다.

[0617] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e)는 약 25일 내지 약 30일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e)는 약 20일 내지 약 25일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e)는 약 20일 내지 약 22일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e)는 22일 이하에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e) 및 냉동보존은 22일 이하에 수행된다.

[0618] 일부 실시양태에서, 단계 (b) 내지 (e)는 단일 닫힌 계에서 수행되며, 단일 용기에서 단계 (b) 내지 (e)를 수행하는 것은 1개 초과의 용기에서 단계 (b) 내지 (e)를 수행하는 것에 비해 절제된 종양 당 TIL 수득량의 증가를 발생시킨다.

[0619] 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 단계 (c)에서의 제2 기간 동안 계를 열지 않고 TIL에 첨가된다.

[0620] 일부 실시양태에서, 상기 TIL의 제3 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 상기 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 CD27+의 발현, CD28+의 발현, 보다 긴 텔로미어, 증가된 CD57 발현, 및 감소된 CD56 발현으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 나타낸다.

[0621] 일부 실시양태에서, 상기 TIL의 제3 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 상기 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 증가된 CD57 발현 및 감소된 CD56 발현을 나타낸다.

[0622] 일부 실시양태에서, 미생물 오염의 위험은 열린 계에 비해 감소된다.

[0623] 일부 실시양태에서, 단계 (e)로부터의 TIL은 환자 내로 주입된다.

[0624] 일부 실시양태에서, 닫힌 용기는 단일 생물반응기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 닫힌 용기는 G-렉스-10을 포함한다. 일부 실시양태에서, 닫힌 용기는 G-렉스-100을 포함한다. 일부 실시양태에서, 닫힌 용기는 G-렉스 500을 포함한다. 일부 실시양태에서, 닫힌 용기는 주리 또는 웨이브 생물반응기 기체 투과성 백을 포함한다.

[0625] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은

[0626] (b) 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계 (여기서, 종양 단편은 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 포함함);

[0627] (c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0628] (d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0629] (e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0630] (f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남)

[0631] 을 포함하는, 종양 침윤 림프구 (TIL)를 TIL의 치료 집단으로 확장시키는 방법을 제공한다.

[0632] 일부 실시양태에서, 방법은 또한 제1 단계로서

[0633] (a) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 환자로부터 절제된 종양으로부터 TIL의 제1 집단을 얻는 것

[0634] 을 포함한다.

[0635] 한 실시양태에서, 방법은 시험관내 또는 생체외 방법이다.

[0636] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은

[0637] (a) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 환자로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0638] (b) 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계;

[0639] (c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0640] (d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0641] (e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0642] (f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남)

[0643] 를 포함하는, 종양 침윤 림프구 (TIL)를 TIL의 치료 집단으로 확장시키는 방법을 제공한다.

[0644] 한 실시양태에서, 방법은 시험관내 또는 생체외 방법이다.

[0645] 일부 실시양태에서, 방법은 단계 (f)에서의 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계를 더 포함한다.

[0646] 일부 실시양태에서, 냉동보존 프로세스는 1:1 비의 수확된 TIL 집단 대 냉동보존 배지를 사용하여 수행된다. 일부 실시양태에서, 냉동보존 배지는 디메틸술폭시드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 냉동보존 배지는 크리오스토르 CS10, 하이포써마솔, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0647] 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이다.

[0648] 일부 실시양태에서, PBMC는 방사선조사되고, 동종이형이다.

[0649] 일부 실시양태에서, PBMC는 단계 (d)에서 제9일 내지 제14일 중 임의의 날에 세포 배양물에 첨가된다.

[0650] 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 인공 항원-제시 세포이다.

[0651] 일부 실시양태에서, 단계 (e)에서의 수확은 LOVO 세포 프로세싱 시스템을 사용하여 수행된다.

[0652] 일부 실시양태에서, 종양 단편은 다수의 단편이고, 약 4개 내지 약 50개의 단편을 포함하며, 각각의 단편은 약 27 mm^3의 부피를 갖는다. 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1300 mm^3 내지 약 1500 mm^3의 총 부피를 갖는 약 30개 내지 약 60개의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1350 mm^3의 총 부피를 갖는 약 50개의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1 그램 내지 약 1.5 그램의 총 질량을 갖는 약 50개의 단편을 포함한다.

[0653] 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 G-용기 및 주리 세포백으로 이루어진 군으로부터 선택되는 용기에 제공된다.

[0654] 일부 실시양태에서, 단계 (f)에서의 주입 백은 하이포써모솔-함유 주입 백이다.

[0655] 일부 실시양태에서, 단계 (c)에서의 제1 기간 및 단계 (e)에서의 제2 기간은 각각 개별적으로 10일, 11일, 또는 12일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (c)에서의 제1 기간 및 단계 (e)에서의 제2 기간은 각각 개별적으로 11일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f)는 약 25일 내지 약 30일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f)는 약 20일 내지 약 25일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f)는 약 20일 내지 약 22일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계

(a) 내지 (f)는 22일 이하에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f) 및 냉동보존은 22일 이하에 수행된다.

[0656] 일부 실시양태에서, 단계 (e)에서 수확된 TIL의 치료 집단은 TIL의 치료 유효 투여량을 위한 충분한 TIL을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료 유효 투여량을 위한 충분한 TIL의 수는 약 2.3×10^{10} 내지 약 13.7×10^{10}개이다.

[0657] 일부 실시양태에서, 단계 (b) 내지 (e)는 단일 용기에서 수행되며, 단일 용기에서 단계 (b) 내지 (e)를 수행하는 것은 1개 초과의 용기에서 단계 (b) 내지 (e)를 수행하는 것에 비해 절제된 종양 당 TIL 수득량의 증가를 발생시킨다.

[0658] 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 단계 (d)에서의 제2 기간 동안 계를 열지 않고 TIL에 첨가된다.

[0659] 일부 실시양태에서, TIL의 치료 집단에서의 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포, 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 CD27+의 발현, CD28+의 발현, 보다 긴 텔로미어, 증가된 CD57 발현, 및 감소된 CD56 발현으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 나타낸다.

[0660] 일부 실시양태에서, TIL의 제3 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 증가된 CD57 발현 및 감소된 CD56 발현을 나타낸다.

[0661] 일부 실시양태에서, 미생물 오염의 위험은 열린 계에 비해 감소된다.

[0662] 일부 실시양태에서, 단계 (f)로부터의 TIL은 환자 내로 주입된다.

[0663] 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 4개의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 4개의 단편은 G-렉스-100 내로 정치된다. 일부 실시양태에서, 4개의 단편은 직경이 약 0.5 cm이다. 일부 실시양태에서, 4개의 단편은 G-렉스-100 내로 정치된다. 일부 실시양태에서, 4개의 단편은 직경이 약 0.1 cm, 0.2 cm, 0.3 cm, 0.4 cm, 0.5 cm, 0.6 cm, 0.7 cm, 0.8 cm, 0.9 cm, 또는 1 cm이다. 일부 실시양태에서, 4개의 단편은 직경이 약 0.1 cm, 0.2 cm, 0.3 cm, 0.4 cm, 0.5 cm, 0.6 cm, 0.7 cm, 0.8 cm, 0.9 cm, 또는 1 cm이고, G-렉스-100 내로 정치된다. 일부 실시양태에서, 4개의 단편은 직경이 약 0.1 cm, 0.2 cm, 0.3 cm, 0.4 cm, 0.5 cm, 0.6 cm, 0.7 cm, 0.8 cm, 0.9 cm, 또는 1 cm이고, G-렉스-100과 등가의 부피를 갖는 용기 내로 정치된다. 일부 실시양태에서, 4개의 단편은 직경이 약 0.5 cm이고, G-렉스-100 내로 정치된다. 일부 실시양태에서, 4개의 단편은 직경이 약 0.5 cm이고, G-렉스-100과 등가의 부피를 갖는 용기 내로 정치된다.

[0664] 단계 (a), (b), (c), (d), (e) 및 (f)의 추가의 상세사항은 예를 들어 표제 "단계 A: 환자 종양 샘플을 얻기", "단계 B: 제1 확장", "단계 C: 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행", "단계 D: 제2 확장", "단계 E: TIL을 수확하기" 및 "단계 F: 최종 제형화/ 주입 백으로의 이동" 하에 기재된 실시양태를 포함하나 이에 제한되지는 않는 하기에 본원에서 제공된다.

[0665] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은

[0666] (a) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 대상체로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0667] (b) 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계;

[0668] (c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0669] (d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0670] (e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를

열지 않고 일어남);

[0671] (f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남);

[0672] (g) 임의로 단계 (f)로부터의 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계;

[0673] (h) 단계 (g)에서의 주입 백으로부터의 TIL의 제3 집단의 치료 유효 투여량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 확장된 종양 침윤 림프구 (TIL)를 투여하는 것을 포함하는 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다.

[0674] 일부 실시양태에서, 본 발명은 암을 치료하는 데 사용하기 위한 종양 침윤 림프구 (TIL)의 치료 집단을 제공하며, 집단은

[0675] (b) 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계 (여기서, 종양 단편은 TIL의 제1 집단을 포함함);

[0676] (c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0677] (d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0678] (e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0679] (f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남);

[0680] (g) 임의로 단계 (f)로부터의 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계

[0681] 를 포함하는 방법으로부터 수득가능하다.

[0682] 일부 실시양태에서, 집단은 제1 단계로서

[0683] (a) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 환자로부터 절제된 종양으로부터 TIL의 제1 집단을 얻는 것

[0684] 을 또한 포함하는 방법에 의해 수득가능하다.

[0685] 한 실시양태에서, 방법은 시험관내 또는 생체외 방법이다.

[0686] 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (f) 중 임의의 것은 본원에 개시된 하나 이상의 특색, 예를 들어 표제 "단계 A: 환자 종양 샘플을 얻기", "단계 B: 제1 확장", "단계 C: 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행", "단계 D: 제2 확장", "단계 E: TIL을 수확하기" 및 "단계 F: 최종 제형화/ 주입 백으로의 이동" 하에 개시된 하나 이상의 특색을 포함한다.

[0687] 일부 실시양태에서, 단계 (g)는 본원에 개시된 하나 이상의 특색, 예를 들어 표제 "단계 H: TIL의 임의적 냉동보존" 하에 개시된 하나 이상의 특색을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단계 (h)는 본원에 개시된 하나 이상의 특색, 예를 들어 표제 "단계 F:1 제약 조성물, 투여량 및 투여 처방" 하에 개시된 하나 이상의 특색을 포함한다.

[0688] 일부 실시양태에서, 단계 (e)에서 수확된 TIL의 치료 집단은 단계 (h)에서 TIL의 치료 유효 투여량을 투여하기 위한 충분한 TIL을 포함한다.

[0689] 일부 실시양태에서, 단계 (h)에서 치료 유효 투여량을 투여하기 위한 충분한 TIL의 수는 약 2.3×10^{10} 내지 약

13.7×10^{10}개이다.

[0690] 일부 실시양태에서, 항원 제시 세포 (APC)는 PBMC이다.

[0691] 일부 실시양태에서, PBMC는 단계 (d)에서 제9일 내지 제14일 중 임의의 날에 세포 배양물에 첨가된다.

[0692] 일부 실시양태에서, 단계 (h)에서 TIL 세포의 치료 유효 투여량을 투여하기 전에, 비-골수절제 림프구고갈 처방이 환자에게 투여되었다.

[0693] 일부 실시양태에서, 암을 치료하는 데 및 비-골수절제 림프구고갈 처방과 조합으로 사용하기 위한 종양 침윤 림프구 (TIL)의 치료 집단이 제공된다. 일부 실시양태에서, 비-골수절제 림프구고갈 처방은 종양 침윤 림프구 (TIL)의 치료 집단을 투여하기 전에 투여된다.

[0694] 일부 실시양태에서, 비-골수절제 림프구고갈 처방은 2일 동안 60 mg/m^2/일의 용량으로 시클로포스파미드의 투여, 이어서 5일 동안 25 mg/m^2/일의 용량으로 플루다라빈의 투여의 단계를 포함한다.

[0695] 일부 실시양태에서, 고-용량 IL-2 처방으로 환자를 치료하는 단계는 단계 (h)에서 환자에의 TIL 세포의 투여 후 일에 시작한다.

[0696] 일부 실시양태에서, 암을 치료하는 데 및 고-용량 IL-2 처방과 조합으로 사용하기 위한 종양 침윤 림프구 (TIL)의 치료 집단이 제공된다. 일부 실시양태에서, 고-용량 IL-2 처방은 TIL 세포의 치료 집단의 투여 후 일에 시작한다.

[0697] 일부 실시양태에서, 고-용량 IL-2 처방은 허용시까지 8시간마다 15-분 볼루스 정맥내 주입으로서 투여되는 600,000 또는 720,000 IU/kg을 포함한다.

[0698] 일부 실시양태에서, TIL의 치료 집단에서의 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포, 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 CD27+의 발현, CD28+의 발현, 보다 긴 텔로미어, 증가된 CD57 발현, 및 감소된 CD56 발현으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 나타낸다.

[0699] 일부 실시양태에서, TIL의 치료 집단에서의 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 증가된 CD57 발현 및 감소된 CD56 발현을 나타낸다.

[0700] 본 개시내용은 또한

[0701] (a) 환자로부터 절제된 종양으로부터 프로세싱된 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하여 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0702] (b) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (a)에서 단계 (b)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0703] (c) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0704] (d) 단계 (c)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0705] (e) 단계 (d)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 (e)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남)

[0706] 를 포함하는, 종양 침윤 림프구 (TIL)를 TIL의 치료 집단으로 확장시키는 방법을 제공한다.

[0707] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서 수확된 TIL의 치료 집단은 TIL의 치료 유효 투여량을 위한 충분한 TIL을 포함한다.

[0708] 일부 실시양태에서, 치료 유효 투여량을 위한 충분한 TIL의 수는 약 2.3×10^{10} 내지 약 13.7×10^{10}개이다.

[0709] 일부 실시양태에서, 방법은 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계를 더 포함한다.

[0710] 일부 실시양태에서, 냉동보존 프로세스는 1:1 비의 수확된 TIL 집단 대 CS10 배지를 사용하여 수행된다.

[0711] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은

[0712] (a) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 대상체로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0713] (b) 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계;

[0714] (c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0715] (d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0716] (e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0717] (f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남);

[0718] (g) 임의로 단계 (f)로부터의 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계;

[0719] (h) 단계 (g)에서의 주입 백으로부터의 TIL의 제3 집단의 치료 유효 투여량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하며,

[0720] TIL 집단의 선택이 단계 (a) 내지 (h) 중 임의의 것 동안 수행되지 않는 것인 확장된 종양 침윤 림프구 (TIL)를 투여하는 것을 포함하는 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 표현형에 기초한 TIL의 제2 집단 (사전-REP 집단)의 선택은 단계 (d)의 제2 확장을 수행하기 전에 수행되지 않는다. 한 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 제1 집단, TIL의 제2 집단, TIL의 제3 집단, 또는 수확된 TIL 집단의 선택은 단계 (a) 내지 (h) 중 임의의 것 동안 수행되지 않는다.

[0721] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은

[0722] (a) 환자로부터 얻어진 종양 샘플을 다수의 종양 단편으로 프로세싱함으로써 대상체로부터 절제된 종양으로부터 종양 침윤 림프구 (TIL)의 제1 집단을 얻는 단계;

[0723] (b) 종양 단편을 닫힌 계 내로 첨가하는 단계;

[0724] (c) TIL의 제1 집단을 IL-2를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양함으로써 제1 확장을 수행하여 TIL의 제2 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제1 확장은 제1 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 제1 확장은 약 3일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제2 집단을 얻고, TIL의 제2 집단은 TIL의 제1 집단보다 수에 있어서 적어도 50배 더 크고, 단계 (b)에서 단계 (c)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0725] (d) TIL의 제2 집단의 세포 배양 배지를 추가의 IL-2, OKT-3, 및 항원 제시 세포 (APC)로 보충함으로써 제2 확장을 수행하여 TIL의 제3 집단을 제조하는 단계 (여기서, 제2 확장은 약 7일 내지 14일 동안 수행되어 TIL의 제3 집단을 얻고, TIL의 제3 집단은 TIL의 제2 집단에 비해 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포의 증가된 하위집단을 포함하는 TIL의 치료 집단이고, 제2 확장은 제2 기체-투과성 표면적을 제공하는 닫힌 용기에서 수행되고, 단계 (c)에서 단계 (d)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0726] (e) 단계 (d)로부터 얻어진 TIL의 치료 집단을 수확하는 단계 (여기서, 단계 (d)에서 단계 (e)로의 이행은 계를 열지 않고 일어남);

[0727] (f) 단계 (e)로부터의 수확된 TIL 집단을 주입 백으로 옮기는 단계 (여기서, 단계 (e)에서 (f)로의 이동은 계를 열지 않고 일어남);

[0728] (g) 단계 (f)로부터의 수확된 TIL 집단을 포함하는 주입 백을 냉동보존 프로세스를 사용하여 냉동보존하는 단계 (여기서, 냉동보존 프로세스는 냉동보존 배지를 수확된 TIL의 집단과 혼합하는 것을 포함함);

[0729] (h) 단계 (g)에서의 주입 백으로부터의 TIL의 제3 집단의 치료 유효 투여량을 환자에게 투여하는 단계를 포함하며,

[0730] TIL 집단의 선택이 단계 (a) 내지 (h) 중 임의의 것 동안 수행되지 않는 것인 확장된 종양 침윤 림프구 (TIL)를 투여하는 것을 포함하는 암을 갖는 대상체를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 표현형에 기초한 TIL의 제2 집단 (예를 들어, 사전-REP 집단)의 선택은 단계 (d)의 제2 확장을 수행하기 전에 수행되지 않는다. 한 실시양태에서, CD8 발현에 기초한 TIL의 제1 집단, TIL의 제2 집단, TIL의 제3 집단, 또는 수확된 TIL 집단의 선택은 단계 (a) 내지 (h) 중 임의의 것 동안 수행되지 않는다. 일부 실시양태에서, 비-골수절제 림프구고갈 처방은 수확된 TIL 집단을 투여하기 전에 투여된다. 일부 실시양태에서, 비-골수절제 림프구고갈 처방은 2일 동안 60 mg/m^2/일의 용량으로 시클로포스파미드의 투여, 이어서 5일 동안 25 mg/m^2/일의 용량으로 플루다라빈의 투여의 단계를 포함한다.

[0731] 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)이다. 일부 실시양태에서, PBMC는 방사선조사되고, 동종이형이다. 일부 실시양태에서, PBMC는 단계 (c)에서 제9일 내지 제14일 중 임의의 날에 세포 배양물에 첨가된다.

[0732] 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 인공 항원-제시 세포이다.

[0733] 일부 실시양태에서, 단계 (d)에서의 수확은 LOVO 세포 프로세싱 시스템을 사용하여 수행된다.

[0734] 일부 실시양태에서, 방법은 단계 (d)에서의 수확이 LOVO 세포 프로세싱 시스템, 예컨대 프레세니우스 카비에 의해 제조된 LOVO 시스템을 통한 것을 포함한다. 용어 "LOVO 세포 프로세싱 시스템"은 또한 연속적 유동 및 세포 프로세싱을 허용하여 펠릿화 없이 상청액 또는 세포 배양 배지를 제거하는, 멸균 및/또는 닫힌 계 환경에서 막 또는 필터, 예컨대 스피닝 막 또는 스피닝 필터를 통해 세포를 포함하는 용액을 펌핑할 수 있는 임의의 기기 또는 장치를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 세포 프로세싱 시스템은 닫힌, 멸균 계에서 세포 분리, 세척, 유체-교환, 농축, 및/또는 다른 세포 프로세싱 단계를 수행할 수 있다.

[0735] 일부 실시양태에서, 종양 단편은 다수의 단편이고, 약 4개 내지 약 50개의 단편을 포함하며, 각각의 단편은 약 27 mm^3의 부피를 갖는다. 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1300 mm^3 내지 약 1500 mm^3의 총 부피를 갖는 약 30개 내지 약 60개의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1350 mm^3의 총 부피를 갖는 약 50개의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 1 그램 내지 약 1.5 그램의 총 질량을 갖는 약 50개의 단편을 포함한다.

[0736] 일부 실시양태에서, 다수의 단편은 약 4개의 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 4개의 단편은 G-렉스-100 내로 정치된다. 일부 실시양태에서, 4개의 단편은 직경이 약 0.1 cm, 0.2 cm, 0.3 cm, 0.4 cm, 0.5 cm, 0.6 cm, 0.7 cm, 0.8 cm, 0.9 cm, 또는 1 cm이다. 일부 실시양태에서, 4개의 단편은 직경이 약 0.1 cm, 0.2 cm, 0.3 cm, 0.4 cm, 0.5 cm, 0.6 cm, 0.7 cm, 0.8 cm, 0.9 cm, 또는 1 cm이고, G-렉스-100 내로 정치된다. 일부 실시양태에서, 4개의 단편은 직경이 약 0.1 cm, 0.2 cm, 0.3 cm, 0.4 cm, 0.5 cm, 0.6 cm, 0.7 cm, 0.8 cm, 0.9 cm, 또는 1 cm이고, G-렉스-100과 등가의 부피를 갖는 용기 내로 정치된다. 일부 실시양태에서, 4개의 단편은 직경이 약 0.5 cm이고, G-렉스-100 내로 정치된다. 일부 실시양태에서, 4개의 단편은 직경이 약 0.5 cm이고, G-렉스-100과 등가의 부피를 갖는 용기 내로 정치된다.

[0737] 일부 실시양태에서, 세포 배양 배지는 G-용기 및 주리 세포백으로 이루어진 군으로부터 선택되는 용기에 제공된다.

[0738] 일부 실시양태에서, 단계 (e)에서의 주입 백은 하이포써모솔-함유 주입 백이다.

[0739] 일부 실시양태에서, 단계 (b)에서의 제1 기간 및 단계 (c)에서의 제2 기간은 각각 개별적으로 10일, 11일, 또는

12일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (b)에서의 제1 기간 및 단계 (c)에서의 제2 기간은 각각 개별적으로 11일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e)는 약 25일 내지 약 30일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e)는 약 20일 내지 약 25일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e)는 약 20일 내지 약 22일의 기간 내에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e)는 22일 이하에 수행된다. 일부 실시양태에서, 단계 (a) 내지 (e) 및 냉동보존은 22일 이하에 수행된다.

[0740] 일부 실시양태에서, 단계 (b) 내지 (e)는 단일 용기에서 수행되며, 단일 용기에서 단계 (b) 내지 (e)를 수행하는 것은 1개 초과의 용기에서 단계 (b) 내지 (e)를 수행하는 것에 비해 절제된 종양 당 TIL 수득량의 증가를 발생시킨다.

[0741] 일부 실시양태에서, 항원-제시 세포는 단계 (c)에서의 제2 기간 동안 계를 열지 않고 TIL에 첨가된다.

[0742] 일부 실시양태에서, TIL의 치료 집단에서 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포, 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 CD27+의 발현, CD28+의 발현, 보다 긴 텔로미어, 증가된 CD57 발현, 및 감소된 CD56 발현으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 특징을 나타낸다.

[0743] 일부 실시양태에서, TIL의 치료 집단에서 얻어진 이펙터 T 세포 및/또는 중심 기억 T 세포는 세포의 제2 집단으로부터 얻어진 이펙터 T 세포, 및/또는 중심 기억 T 세포에 비해 증가된 CD57 발현 및 감소된 CD56 발현을 나타낸다.

[0744] 일부 실시양태에서, 미생물 오염의 위험은 열린 계에 비해 감소된다.

[0745] 일부 실시양태에서, 단계 (e)로부터의 TIL은 환자 내로 주입된다.

[0746] 일부 실시양태에서, 닫힌 용기는 단일 생물반응기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 닫힌 용기는 G-렉스-10을 포함한다. 일부 실시양태에서, 닫힌 용기는 G-렉스-100을 포함한다.

[0747] **실시예**

[0748] 이하, 본원에 포함된 실시양태를 하기 실시예를 참조로 설명한다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로 제공되며, 본원에 포함된 개시내용은 어떤 식으로도 이들 실시예에 제한되는 것으로 해석되지 않아야 하며, 오히려 본원에서 제공된 교시내용의 결과로서 명백하게 되는 임의의 및 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0749] **실시예 1: 닫힌 계 검정**

[0750] 본원에서 논의된 바와 같이, 닫힌 계에서 환자 종양으로부터 TIL을 생성하기 위한 프로토콜 및 검정을 개발하였다.

[0751] 이 실시예는 G-렉스 장치에서 환자의 절제된 종양 조직으로부터 임상적으로 관련된 수의 TIL을 생성하고, 최종 세포 생성물의 냉동보존을 위한 신규한 간략화된 절차를 기재한다. 이 절차의 추가의 측면은 실시예 2 내지 8에 기재된다.

[0752] **정의/약어**

[0753] BSC - 생물학적 안전성 캐비닛

[0754] ℃ - 도 섭씨

[0755] CO_2 - 이산화탄소

[0756] CD3 - 분화 클러스터 3

[0757] CM1 - 완전 배지 1

[0758] CM2 - 완전 배지 2

[0759] TIWB - 종양 단리 세척 완충제

[0760] CM4 - 완전 배지 4

[0761] CRF - 제어 속도 동결기

[0762] EtOH - 에탄올

[0763] GMP - 우수 제조 관례

[0764] IL-2, rIL-2 -인터루킨-2, 재조합 인간 인터루킨-2,

[0765] IU - 국제 단위

[0766] L - 리터

[0767] LN2 - 액체 질소

[0768] mL - 밀리리터

[0769] μl - 마이크로리터

[0770] mM - 밀리몰

[0771] μm - 마이크로미터

[0772] NA - 적용되지 않음

[0773] PBMC - 말초 혈액 단핵 세포

[0774] PPE - 개인 보호 장비

[0775] 사전-REP - 종양 단편으로부터 기원한 초기 TIL 배양물

[0776] REP - 급속 확장 프로토콜

[0777] TIL - 종양 침윤 림프구

[0778] TIWB - TIL 단리 세척 완충제

[0779] SOP - 표준 작업 절차

[0780] 절차

[0781] 1. 사전 준비: 제0일 (미리 36시간까지 수행됨)

[0782] 1.1 500 mL 행크 평형 염 용액 (Hanks Balanced Salt Solution)을 50 μg/mL 겐타미신으로 보충함으로써 TIL 단리 세척 완충제 (TIWB)를 제조하였다. 10 mg/mL 겐타미신 스톡 용액을 위해 2.5 mL를 HBSS로 옮겼다. 50 mg/mL 스톡 용액을 위해 0.5 mL를 HBSS로 옮겼다.

[0783] 1.2. LAB-005 "CM2 지시를 위한 사전REP 및 REP를 위한 배지의 제조"에 따라 글루타맥스™를 갖는 CM1 배지를 제조하였다. 4 ℃에서 24시간까지 저장하였다. 사용 전에 37℃에서 적어도 1시간 동안 가온하였다.

[0784] 1.3. IL-2 분취물(들)을 -20℃ 동결기로부터 제거하고, 분취물(들)을 2 내지 8℃ 냉장고에 정치하였다.

[0785] 2. 종양 조직의 수령

[0786] 2.1. 받은 모든 서류를 종양 조직과 함께 보관하고, 수송 용기 및 종양 조직의 사진을 얻었다.

[0787] 2.2. 템프테일 (TempTale)이 제공된 경우, 연관된 문서를 인쇄 및 저장하고; PDF를 저장하였다.

[0788] 2.3. 종양 시편 및 2차 용기 (지퍼백)를 선적기로부터 제거하고, 프로세싱을 위해 준비될 때까지 4 ℃에서 저장하였다.

[0789] 2.4 비사용된 종양을 하이포써마솔에 또는 동결된 단편으로서 크리오스토르 CS10 중 어느 하나에 선적하였다 (둘 다 바이오라이프 솔루션즈, 인크.로부터 시판됨).

[0790] 3. TIL에 대한 종양 프로세싱

[0791] 3.1. 필요에 따라 하기 물질을 BSC로 무균적으로 옮기고, 하기 표 3에 따라 표지하였다.

[0792] <표 3>

[0793] 종양 단리를 위한 물질.

항목	최소량	인-프로세스 표지
종양	1	N/A
페트리 디쉬, 150 mm	1	절개
페트리 디쉬, 100 mm	4	세척 1, 2, 3, 4
페트리 디쉬, 100 mm	1	비바람직한 조직
6 웰 플레이트	2	뚜껑 표지 - “종양 단편” 플레이트 바닥 - “바람직한 조직”
롤러	2	N/A
세척 완충제	1	N/A
겸자	1	N/A
긴 겸자	1	N/A
스캘펠	필요에 따라	N/A

[0794]

[0795] 3.2. 종양 단편 디쉬 (Tumor Fragments Dish)의 원을 문자 A 내지 J로 표지하였다.

[0796] 3.3. 바람직한 조직 디쉬 (Favorable Tissue Dish)의 웰의 밑면을 문자 A 내지 J로 표지하였다.

[0797] 3.4. 5 mL 겐타미신을 HBSS 병으로 옮겼다. TIWB로서 표지하였다.

[0798] 3.5. 선회시켜 혼합하였다.

[0799] 3.6. 50 mL TIWB를 하기의 각각에 피펫팅하였다:

[0800] 1. 세척 1 디쉬

[0801] 2. 세척 2 디쉬

[0802] 3. 세척 3 디쉬

[0803] 4. 세척 4 디쉬

[0804] 3.7. 2 mL TIWB를 바람직한 조직 디쉬의 웰 A 내지 J 내로 피펫팅하였다.

[0805] 3.8. 바람직한 조직 디쉬 (6-웰 플레이트 바닥)를 상응하는 종양 단편 디쉬 (6-웰 플레이트 뚜껑)로 덮었다.

[0806] 3.9. 긴 겸자를 사용하여, 종양(들)을 시편 병으로부터 제거하고, 세척 1 디쉬로 옮겼다.

[0807] 3.10. 종양을 주위 온도에서 세척 1 디쉬에서 3분 동안 인큐베이션하였다.

[0808] 3.11. 인큐베이션 동안, 시편 병을 "생물부하 (Bioburden)"로 표지하고, 시험을 위한 품질 제어에 제출될 때까지 2 내지 8 ℃에서 저장하였다.

[0809] 3.12. 긴 겸자를 버리고, 추가의 조작을 위해 짧은 겸자를 사용하였다.

[0810] 3.13. 겸자를 사용하여 종양을 세척 2 디쉬로 옮겼다.

[0811] 3.14. 종양을 주위 온도에서 세척 2 디쉬에서 3분 동안 인큐베이션하였다.

[0812] 3.15. 겸자를 사용하여 종양을 세척 3 디쉬로 옮겼다.

[0813] 3.16. 종양을 주위 온도에서 세척 3 디쉬에서 3분 동안 인큐베이션하였다.

[0814] 3.17. 종양 단편 디쉬 (6-웰 플레이트 뚜껑)를 바람직한 조직 디쉬 (6-웰 플레이트 바닥)로부터 제거하고, 종양 단편 디쉬를 BSC 표면 상에 뒤집어 정치하였다.

[0815] 3.18. 이동 피펫을 사용하여, TIWB의 대략 4개의 고르게-이격된, 개별적 액적을 종양 단편 디쉬의 각각의 원에 첨가하였다.

[0816] 3.19. 룰러를 절개 디쉬 (Dissection dish) 밑에 정치하였다.

[0817] 3.20. 겸자를 사용하여 종양을 절개 디쉬로 옮겼다.

[0818] 3.21. 절개 디쉬 아래의 룰러를 사용하여, 종양의 길이를 측정하고, 기록하였다.

[0819] 3.22. 1 cm 초과의 종양에 대해, 추가의 바람직한 조직 디쉬를 제조하였다.

[0820] 3.23. 절개 디쉬에서 종양 조각의 10개의 중간 조각으로의 초기 절개를 수행하고, 각각의 중간 조각의 종양 구조를 보존하기 위해 주의를 기울였다.

[0821] 3.24. 전체 절개 절차 동안 수화되어 잔류하는 조직을 보장하기 위해 단편으로 활성적으로 절개되지 않은 임의의 중간 종양 조각을 세척 4 디쉬로 옮겼다.

[0822] 3.25. 한 번에 1개의 중간 종양 조각으로 작업하고, 참조를 위해 디쉬 밑의 룰러를 사용하여, 종양을 절개 디쉬에서 3×3×3 mm 이하의 단편으로 주의깊게 슬라이스하였다. 스캘펄이 무뎌지면, 새로운 스캘펄로 대체하였다.

[0823] 3.26. 중간 조각에서의 모든 조직이 평가될 때까지 중간 종양 조각으로부터 단편을 절개하는 것을 계속하였다.

[0824] 3.27. 바람직한 단편을 선택하고, 이동 피펫을 사용하여 4개 이하의 바람직한 단편을 종양 단편 디쉬에서의 1개의 원에서 TIWB 액적 내로 옮겼다.

[0825] 3.28. 이동 피펫을 사용하여 종양 조각으로부터의 임의의 잔류의 바람직한 단편을 이용가능한 경우 바람직한 조직 디쉬에서의 상응하는 웰로 옮겼다.

[0826] 3.29. 이동 피펫을 사용하여 가능한 한 많은 비바람직한 조직 및 폐기물을 비바람직한 조직 디쉬로 옮겨 절개 디쉬를 청소하였다. 비바람직한 조직은 황색 지방 조직 또는 괴사성 조직에 의해 지시되었다.

[0827] 3.30. 잔류의 중간 종양 조각에 대해 단계 7.3.25 내지 7.3.30을 반복함으로써 프로세싱을 계속하고, 모든 종양이 프로세싱될 때까지 한 번에 1개의 중간 조각을 작업하였다.

[0828] 3.31. 4개 미만의 종양 단편이 종양 단편 디쉬의 상응하는 원에서 이용가능한 경우, 40개의 단편 목표를 달성하는 데 이용가능한 바와 같은 바람직한 조직 디쉬의 비-상응하는 웰로부터 단편을 사용하는 것이 허용되었다. 40개 미만의 단편의 경우, 10 내지 40개를 단일화된 G-렉스 100M 플라스크에 정치하였다.

[0829] 4. G-렉스 100M 플라스크를 시딩하기

[0830] 4.1. 필요에 따라 하기 물질을 BSC로 무균적으로 옮기고, 하기 표 4에 따라 표지하였다.

[0831] <표 4>

[0832] 플라스크를 시딩하기 위한 추가의 물질.

[0833]

항목	최소량	인-프로세스 표지
G-렉스 100M 플라스크	필요에 따라	로트#
가온 CM1	필요에 따라	로트#
IL-2 분취물	필요에 따라	로트#

[0834] 4.2. 각각의 리터의 CM1을 1 mL의 IL-2 스톡 용액 (6×10^6 IU/mL)으로 보충하였다.

[0835] 4.3. 하기 표 5에 의해 측정된 바와 같이 필요한 각각의 G-렉스 100M 생물반응기에 6,000 IU/mL의 IL-2를 함유하는 1000 mL의 사전-가온된 CM1을 정치하였다.

[0836] 4.4. 이동 피펫을 사용하여, 적절한 수의 종양 단편을 각각의 G-렉스 100M 플라스크로 옮겨, 단편을 표 5에 따라 분배하였다.

[0837] 4.5. 1개 이상의 종양 단편을 G-렉스 100M 플라스크 플로트로 옮기는 경우, 이용가능한 경우 1개의 추가의 종양 단편을 바람직한 조직 디쉬로부터 얻고, 이를 G-렉스 100M 플라스크로 옮겼다.

[0838] 4.6. 각각의 플라스크에 첨가된 단편의 총 수를 기록하였다.

[0839] 4.7. 비바람직한 조직 디쉬를 버렸다.

[0840] 4.8. 각각의 G-렉스 100M 생물반응기를 37 ℃, 5% CO_2 인큐베이터에 정치하였다.

[0841] 4.9. 40개 초과의 단편이 이용가능한 경우:

[0842] 4.9.1. 41개 초과의 단편이 얻어진 경우, 1000 mL의 사전-가온된 완전 CM1을 제2 G-렉스 100M 생물반응기에 정치하였다.

[0843] <표 5>

[0844] 필요한 G-렉스 생물반응기의 수.

[0845]

단편의 수	G-렉스	G-렉스의 수	필요한 CM1
1 내지 40개	G-렉스 100M	1	1000 mL
플라스크 사이에 분포된 41 내지 80개	G-렉스 100M	2	2000 mL
80개 초과	15 분 사전-인큐베이션 후에 단편을 CS10에서 동결시킴		

[0846] 5. 사전 준비: 제11일 (미리 24시간까지 준비함)

[0847] 5.1. 글루타맥스를 갖는 6 L의 CM2를 제조하였다. "CM2 지시를 위한 사전REP 및 REP를 위한 배지의 제조"를 위한 참조 실험실 절차를 사용하였다. 사용 전에 37 ℃에서 1시간 가온하였다.

[0848] 5.2. IL-2 분취물을 해동시켰다: IL-2 분취물을 동결기로부터 제거하고, 4 ℃에서 정치하였다.

[0849] 6. TIL을 수확하기 (제11일)

[0850] 6.1. G-렉스-100M 플라스크를 인큐베이터로부터 주의깊게 제거하고, BSC2에 정치하였다. 플라스크의 바닥 상에 세포를 흩뜨리지 않도록 주의하였다.

[0851] 6.2. 개더렉스 (GatherRex) 또는 연동 펌프를 사용하여 약 900 mL의 세포 배양 상청액을 플라스크(들)로부터 흡인하였다.

[0852] 6.3. 플라스크를 부드럽게 선회시킴으로써 TIL을 재현탁시켰다. 모든 세포가 막으로부터 유리되었음을 관찰하였다.

[0853] 6.4. 연동 펌프 또는 개더렉스를 사용하여 잔류의 세포 현탁액을 적절한 크기의 혈액 이동 팩 (300 내지 1000 mL)으로 옮겼다. 단편이 혈액 이동 팩으로 옮겨지지 않도록 주의하였다.

[0854] 6.5. 이동 팩을 4" 혈장 이동 세트로 스파이킹하였다 (클램프가 닫히는 것을 보장함).

[0855] 6.6. 세포 현탁액이 잘 혼합된 것을 보장하기 위해 팩을 문지르고, 3 mL 시린지를 사용하여, 세포 카운트를 위해 1 mL TIL 현탁액을 제거하였다. 배관을 클램핑하고, 암루어 (female luer) 커넥터를 새로운 멸균 루어 캡으로 재캡핑하였다.

[0856] 6.7. 이동 팩을 플라스틱 지퍼백 내로 정치하고, 사용 준비될 때까지 인큐베이터 내로 재정치하였다.

[0857] 7. 배지 제조

[0858] 7.1. 배지를 37 ℃에서 1시간 초과 동안 가온하였다.

[0859] 7.2. 3 mL의 6×10^{6} IU/mL 스톡 rhIL-2를 6 L CM2에 첨가하여 3,000 IU/mL rhIL-2의 최종 농도에 도달하게 하

였다. "완전 CM2"로서 표지하였다.

[0860] 7.3. 4" 혈장 이동 세트를 암루어로 1 L 이동 팩에 멸균 용접하였다.

[0861] 7.4. 500 mL 완전 CM2를 1 L 이동 팩으로 옮겼다. 유체 이동 세트 또는 시린지를 탈착시키고, 멸균 루어 플러그를 암루어 포트에 부착시켰다.

[0862] 7.5. 팩을 샘플 부위 커플러로 스파이킹하였다.

[0863] 7.6. 바늘을 갖는 1.0 mL 시린지를 사용하여 150 μL의 1 mg/mL 항-CD3 (클론 OKT3)을 뽑아내고, 500 mL "완전 CM2"에 샘플 부위 커플러를 통해 옮겼다. 모든 시약이 라인으로부터 플러싱된 것을 보장하기 위해 시린지 상에 다시 뽑아내었다. 사용할 때까지 37 ℃에서 저장하였다.

[0864] 8. 플라스크 제조

[0865] 8.1. 4.5 L "완전 CM2"를 참조용 플라스크 상의 눈금을 사용하여 G-렉스-500M 플라스크로 옮겼다.

[0866] 8.2. 플라스크를 준비될 때까지 37 ℃ 인큐베이터 내로 정치하였다.

[0867] 9. 방사선조사된 공급자를 해동하기

[0868] 9.1. 사용하기 위한 2명 이상의 공여자로부터의 5.0 × 10^9개의 동종이형 방사선조사된 공급자를 이용하였다.

[0869] 9.2. 공급자를 LN2 동결기로부터 제거하고, 생물유해 수송 백에 정치하였다.

[0870] 9.3. 생물유해 수송 백에서의 공급자 백으로, 공급자를 37 ℃ 인큐베이터 또는 비드조에서 해동시켰다. 백을 고정되고 잠기게 유지하였다. 공급자를 거의 완전히 해동되지만 여전히 차가울 때까지 조로부터 제거하였다.

[0871] 9.4. 공급자 백을 70% EtOH로 분무하거나 닦고, BSC2에 정치하였다. 충분한 수의 방사선조사된 세포 (5×10^9개의 세포, +/- 20%)를 보장하기 위해 각각의 공급자 백을 열린 G-렉스 500M에 직접적으로 첨가하였다.

[0872] 9.5. 숫루어 (male luer) 잠금장치를 갖는 펜월 Y 유형 커넥터 상의 둘 다의 클램프를 닫았다.

[0873] 9.6. 각각의 공급자 백을 Y 커넥터의 다리로 스파이킹하였다.

[0874] 9.7. 500 mL "완전 CM2" + OKT3을 갖는 1 L 이동 팩을 제거하고, BSC로 옮겼다.

[0875] 9.8. 60 mL 시린지를 3 웨이 스톱콕에 무균적으로 부착시키고, 이동 팩을 정지 콕의 숫말단에 부착시켰다.

[0876] 9.9. Y 커넥터를 3 웨이 스톱콕에 무균적으로 부착시켰다.

[0877] 9.10. 공급자 백의 전체 내용물을 시린지 내로 뽑아내고, 부피를 기록하고, 5.0 × 10^9개의 동종이형 방사선조사된 공급자를 이동 팩 내로 분배하였다.

[0878] 9.11. 클램핑하고, 이동 팩을 장치로부터 탈착시키고, 암루어 잠금장치를 새로운 멸균 루어 플러그로 막았다.

[0879] 9.12. 바늘 및 3 mL 시린지를 사용하여 샘플 부위 커플러로부터 세포 카운트를 위해 1 mL를 뽑아내었다.

[0880] 9.13. 표적 세포 수 (5.0 × 10^9개)의 +/- 10%이 >70% 생존력으로 도달한 경우, 진행하였다.

[0881] 9.14. 표적 세포 수 (5.0 × 10^9개)의 90% 미만이 >70% 생존력으로 도달한 경우, 또다른 백을 해동시키고, 7.9.4 내지 7.9.12를 반복하였다. 표적 세포 수의 110% 초과가 달성된 경우, 바람직한 세포 용량에 요구되는 적절한 부피를 계산하고, 진행하였다.

[0882] 10. TIL 및 공급자를 G-렉스 500M 플라스크에서 공동-배양하기

[0883] 10.1. 제조된 배지를 함유하는 G-렉스 500M 플라스크를 인큐베이터로부터 제거하고, BSC2에 정치하였다.

[0884] 10.2. 공급자 이동 팩을 G-렉스-500M에 부착시키고, 백의 내용물을 500M 내로 배수하였다.

[0885] 10.3. TIL 현탁액을 인큐베이터로부터 제거하고, BSC에 정치하였다.

[0886] 10.4. 200 × 10^6개의 총 생존 세포를 달성하기 위해 첨가할 TIL 현탁액의 부피를 계산하였다.

[0887] *(TVC/mL) / 200 x 10^6 = mL*

[0888] 10.5. TIL이 5 내지 200 × 10^6개의 총 생존 세포인 경우, 모든 TIL (총 부피)을 G-렉스-500M에 첨가하였다. TIL 카운트가 200 × 10^6개 초과의 총 생존 세포인 경우, 200 × 10^6개의 TIL이 개별적 G-렉스-500M으로 분포되는 데 필요한 계산된 부피를 첨가하였다. 잔류의 TIL을 스핀 다운시키고, 적어도 2개의 냉동바이알에서 CS10 중 10^8/mL 이하로 동결시키고, TIL 확인 및 동결된 날짜로 표지하였다.

[0889] 10.6. G-렉스-500M을 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에 5일 동안 정치하였다.

[0890] 11. 사전 준비: 제16일 내지 제18일

[0891] 11.1. 50 × 10^6개 미만의 TIL로 개시된 배양을 위해 AIM V의 1개의 10 L 백을, 50 × 10^6개 초과의 TIL로 개시된 것들을 위해 2개를 37 ℃에서 적어도 1시간 또는 사용 준비될 때까지 가온하였다.

[0892] 12. TIL 세포 카운트를 수행하기: 제16일 내지 제18일

[0893] 12.1. G-렉스-500M 플라스크를 인큐베이터로부터 제거하고, BSC2에 정치하였다. 플라스크의 바닥 상에 세포 배양물을 흩뜨리지 않도록 주의하였다.

[0894] 12.2. 4 L의 세포 배양 배지를 G-렉스-500M 플라스크로부터 무균적으로 제거하고, 멸균 용기 내로 정치하였다.

[0895] 12.3. G-렉스-500M을 모든 TIL이 막으로부터 재현탁될 때까지 선회시켰다.

[0896] 12.4. 개더렉스 또는 연동 펌프를 사용하여 세포 현탁액을 2 L 이동 팩으로 옮겼다. 500M 플라스크를 나중의 사용을 위해 보유하였다. TIL의 소실을 피하기 위해 포트를 샘플 부위 커플러로 밀봉하였다.

[0897] 12.5. 이동 팩을 샘플 부위 커플러로 스파이킹하고, 3 mL 시린지 및 바늘을 사용하여 2×1 mL 독립적 샘플을 세포 카운트를 위해 제거하였다.

[0898] 12.6. 하기 식에 따라 계대배양에 요구되는 플라스크의 총 수를 계산하였다. 분수를 반올림하였다.

[0899] *총 생존 세포 / 1.0 x10^9 = 플라스크 #*

[0900] 13. CM4를 제조하기

[0901] 13.1. 필요한 모든 2개의 500M 플라스크에 대해 AIM-V의 10 L 백을 준비하였다. 필요에 따라 추가의 배지를 가온하였다.

[0902] 13.2. 필요한 모든 10 L의 AIM-V에 대해, 100 mL의 글루타맥스를 첨가하여 CM4를 제조하였다.

[0903] 13.3. CM4 배지를 3,000 IU/mL rhIL-2의 최종 농도를 위해 rhIL-2로 보충하였다.

[0904] 14. 세포 배양물을 분할하기

[0905] 14.1. 플라스크 상의 눈금을 사용하여, 각각의 G-렉스-500M을 5 L로 중력 충전하였다.

[0906] 14.2. TIL 부피를 계산된 수의 G-렉스-500M 중에 고르게 분포시켰다.

[0907] 14.3. 플라스크를 REP의 제22일에 수확할 때까지 37 ℃, 5% CO_2 인큐베이터에 정치하였다.

[0908] 15. 사전 준비: 제22일 내지 제24일

[0909] 15.1. 40 mL의 25% HSA를 플라스마라이트 (PlasmaLyte) A 7.4의 2개의 1 L 백의 각각에 첨가함으로써 2 L의 1% HSA 세척 완충제를 제조하였다. LOVO 보조 백 내로 풀링하였다.

[0910] 15.2. 200 mL CS10을 600 IU/mL의 IL-2로 보충하였다.

[0911] 15.3. 4개의 750 mL 알루미늄 동결기 캐니스터를 4 ℃에서 사전-냉각시켰다.

[0912] 16. TIL을 수확하기: 제22일 내지 제24일

[0913] 16.1. G-렉스-500M 플라스크를 37 ℃ 인큐베이터로부터 제거하고, BSC2에 정치하였다. 플라스크의 바닥 상에 세포 배양물을 흩뜨리지 않도록 주의하였다.

[0914] 16.2. 4.5 L의 세포 배양 상청액을 각각의 플라스크로부터 흡인하고, 버렸다.

[0915] 16.3. G-렉스-500M 플라스크를 선회시켜 TIL을 완전히 재현탁시켰다.

[0916] 16.4. 3 내지 5 L 바이오프로세스 백을 사용 전에 칭량하였다.

[0917] 16.5. 개더렉스 또는 연동 펌프를 사용하여, TIL을 바이오프로세스 백 내로 수확하였다.

[0918] 16.6. 백을 잘 혼합하고, 3 mL 시린지를 사용하여 2 × 2 mL 샘플을 세포 카운팅을 위해 시린지 샘플 포트로부터 취하였다.

[0919] 16.7. 백을 칭량하고, 초기 및 최종 중량 사이의 차이를 실측하였다. 하기 계산을 사용하여 세포 현탁액의 부피를 측정하였다.

[0920] *세포 현탁액의 순 중량 (mL) / 1.03 = 부피 (mL)*

[0921] 17. TIL을 여과하고, LOVO 공급원 백을 제조하기

[0922] 17.1. 세포 배양물을 함유하는 백을 BSC2 내로 정치하였다.

[0923] 17.2. 170 μm 혈액 필터를 BSC2 내로 정치하고, 모든 클램프를 닫았다.

[0924] 17.3. 필터의 공급원 다리를 세포 현탁액에 멸균 용접하였다.

[0925] 17.4. 새로운 적절한 크기의 바이오프로세스 백 (이는 LOVO 공급원 백으로 지칭되었음)을 칭량하였다.

[0926] 17.5. 필터의 말단을 LOVO 공급원 백에 대해 멸균 용접하였다.

[0927] 17.6. 세포를 IV 막대기 상에 매달아 세포의 중력-유동 이동을 설정함으로써 세포 현탁액을 상승시켰다.

[0928] 주: (공급원 백이 여과 장치로부터 매달리지 않도록 하였다.)

[0929] 17.7. 모든 필요한 클램프를 열고, TIL이 필터를 통해 및 LOVO 공급원 백 내로 세포 현탁액으로부터 배수되게 하였다.

[0930] 17.8. 일단 모든 세포를 LOVO 공급원 백으로 옮기면, 모든 클램프를 닫고, LOVO 공급원 백 배관을 밀봉하여 필터를 제거하였다.

[0931] 17.9. LOVO 공급원 백을 칭량하고, 부피를 계산하였다.

[0932] 17.10. LOVO 공급원 백은 LOVO를 위해 준비되었다.

[0933] 17.11. 백 부근의 배관을 밀봉함으로써 LOVO 최종 생성물 백을 일회용 키트로부터 제거하였다.

[0934] 18. 600 IU/mL rhIL-2로 보충된 차가운 CS10에서 TIL을 1:1 제형화하기

[0935] 18.1. 필요한 냉동백의 요구되는 수를 계산하였다.

[0936] *(세포 생성물의 부피 x 2) / 100 = 요구되는 백의 수 (버림)*

[0937] 18.2. 부피를 계산하여 각각의 백 내로 분배시켰다.

[0938] *(세포 생성물의 부피 x 2) / 요구되는 백의 수 = 각각의 백에 첨가되는 부피*

[0939] 18.3. 표 6에서의 하기 물질을 BSC로 무균적으로 옮겼다.

[0940] <표 6>

[0941] TIL 냉동보존을 위한 물질.

항목	최소량	인-프로세스 표지
세포 생성물	1	로트#
알루미늄 동결기 카세트 (750 ml)	1	n/a
차가운 CS10 + IL-2 @600IU/mL	필요에 따라	로트#
세포 연결 CC1 장치	1	n/a
750 mL 냉동백	계산치	표지 분취물 1- 가장큰#
100 mL 시린지	#냉동백 +1	n/a
3 웨이 스톱콕	1	n/a
냉동바이알	5	TIL 냉동-생성물 위성 바이알

[0942]

[0943] 19. TIL 제형

[0944] 19.1. 세포 연결 CC1 상의 모든 클램프를 닫았다.

[0945] 19.2. 세포 연결 장치에 LOVO 최종 생성물, CS10 백 루어 잠금장치 및 적절한 수의 냉동백을 무균적으로 부착시켰다. 60 mL 시린지를 100 mL 시린지로 대체하였다.

[0946] 19.3. 필요한 CS10 부피의 양은 LOVO 최종 생성물 백의 부피와 등가였다.

[0947] 19.4. 스톱콕 경로를 열고, LOVO 최종 생성물 백 및 시린지 사이의 라인을 클램핑해제하여 CS10을 시린지 내로 뽑아내고, CS10 경로를 재클램핑하였다. 경로를 세포 백으로 클램핑해제하여 CS10을 LOVO 최종 생성물 백 내로 밀어내었다. 시린지를 사용하여 LOVO 최종 생성물 백에 첨가된 부피를 측정하였다. 바람직한 양의 CS10이 옮겨질 때까지 새로운 시린지를 사용하여 필요에 따라 반복하였다.

[0948] 19.5. LOVO 최종 생성물 백을 반전에 의해 혼합하였다.

[0949] 19.6. 100 mL 시린지를 대체하였다.

[0950] 19.7. 750 mL 냉동백 상의 클램프를 한 번에 1개 열었다.

[0951] 19.8. 사용에 있어서 제형화된 생성물 및 냉동백과 직접적으로 연관된 클램프만을 열었다.

[0952] 19.9. 100 mL 시린지를 사용하여 냉동백으로 이어지는 제형화된 생성물의 부피를 측정하였다.

[0953] 19.10. 100 mL의 제형화된 생성물을 각각의 냉동백 내로 옮겼다.

[0954] 19.11. 각각의 백에 첨가한 후, 시린지 상에 다시 뽑아내어 모든 공기 버블을 냉동백으로부터 제거하고, 연관된 라인을 재클램핑하였다.

[0955] 19.12. 최종 백 상에 QC 시험을 위해 10 mL 보유물을 다시 뽑아내었다.

[0956] 19.13. 각각의 냉동백을 밀봉하여, 가능한 한 적은 배관을 남겼다.

[0957] 19.14. 보유된 샘플을 함유하는 시린지를 제거하고, 50 mL 원뿔형 튜브로 옮기고; 1.5 ml를 개별적 냉동바이알 내로 옮기고, 제어 속도 동결기 내로 동결하였다.

[0958] 19.15. 밀봉된 백을 표지가 제조되는 동안 4 ℃로 옮겼다.

[0959] 19.16. 각각의 냉동백을 생성물 설명, 명칭 및 날짜, 부피, 세포 카운트, 및 생존력으로 표지하였다.

[0960] 19.17. 각각의 냉동백을 사전-냉각된 알루미늄 동결기 캐니스터 내로 정치하였다.

[0961] 20. 제어 속도 동결기 (CRF)를 사용한 TIL의 냉동보존

[0962] 20.1. 제어 속도 동결기에 대한 표준 절차를 따랐다.

[0963] 20.2. CRF를 사용한 후, 냉동백을 액체 질소 (LN_2)에 저장하였다.

[0964] 21. 예상된 결과를 측정하고, 허용 기준을 측정하였다.

[0965] **실시예 2: 8가지 환자 종양에 대한 프로세스 실행**

[0966] 실시예 1의 프로세스를 8가지 환자 종양을 사용하여 실행하여 TIL의 8개의 배치를 생성하였다. 배양물로부터의 양호한 회수, 생존력, 세포 카운트, $CD3^+$ (% T 세포 함량을 지시함) 및 IFN-감마 (IFN-g 또는 IFN-γ) 방출을 하기 표 7에 및 도 7 내지 도 10에 나타내어진 바와 같이 얻었다.

[0967] <표 7>

[0968] 실시예 1의 프로세스의 정체성, 효능, 및 생존력/회수의 시험의 결과.

	IFNg (pg/1e6 세포/24hr)		CD3 (%)		세포/mL (생존+ 비생존)		% 회수율	% 생존율	
							신선한/Lovo		
M1061T	4570		95.3		1.27E+08		**103**	88.1	
M1062T	3921		99.7		1.65E+08		**89**	84.5	
M1063T	5587		98.7		1.51E+08		**112**	82.1	
M1064T	619		84.5		1.75E+08		**83**	86.8	
M1065T	1363		96.8		3.42E+07		**128**	76.4	
EP11001T	4263		90.4		1.82E+08		**92**	77.9	
M1056T	6065		94.2		2.11E+08		**85**	84.8	
M1058T	1007		99		2.72E+08		**89**	87.5	

[0969]

[0970] **실시예 3: 변형된 TIL 프로세스의 확장성**

[0971] 여기에 제시된 연구는 프로세스 개발 (PD) 실험실에서 수행되었으며, 이어서, 조작 실행을 이용한 프로세스 정성화 (PQ) 연구는 제조 시설에서 GMP 클린 룸 스위트에서 수행되었다. 3회의 PQ/조작 실행은 GMP 시설 클린 룸에서 정성화 프로토콜, 및 여기에 제시된 PD 연구에 기초한 배치 기록에 따라 완료되었다. 조작 실행을 위한 허용 기준은 장래적으로 설정되었다. PQ 연구를 하기에 추가로 요약하며, 조작 배치에 대해 얻어진 시험 결과를 하기 섹션에 제공한다.

[0972] 사전-급속 확장 프로토콜 (사전-REP) 배양물로부터 생성된 세포의 수는 종종 100 × 10^6개의 생존 세포를 초과하였다. 또한, 사전-REP 및 REP 배양 단계 사이의 동결-해동 사이클을 포함하는 것은 생존 세포 수득량을 감소시켰다. 인-프로세스 냉동보존 단계를 제거함으로써, REP는 증가된 수의 TIL로 신뢰성 있게 및 규칙적으로 개시될 수 있었다. 이 변화는 REP의 지속기간이 세포 용량에 영향을 미치지 않고 대략 11일로의 세포 배가 시간의 비례적 양만큼 감소되게 하였다. 또한, 활성화에서 수확까지의 감소된 배양 시간은 생체내에서 지속할 수 있는 보다 덜 분화되고, 잠재적으로 보다 양호한 생성물을 발생시킨다 (Tran 2008).

[0973] PD 연구는 고정된 수의 공급자 세포를 갖는 200 × 10^6개 이하의 세포로 REP 배양의 개시를 입증하였다. 그 후, REP 배양물을 수확하는 최적 시간을 9 내지 14일에 걸쳐 평가하였다. 배양물을 공급자에서 100:1 내지 25:1의 범위의 TIL 비로 시딩하였다. 수확 시간의 최적화를 총 세포 카운트, 생존력, 면역표현형, 배지 소비, 대사물 분석, 인터루킨-2 (IL-2) 분석, 및 하기 기재된 기능적 분석을 측정함으로써 측정하였다.

[0974] REP 배양의 종료 시에 세포의 면역표현형결정을 하기 표 8에 열거된 마커에 기초하여 평가하였다. 세포의 표현형적 활성화 및 분화 상태를 평가하였다. 표현형의 통계적 차이는 실험적 조건 중 임의의 것 중에서 관찰되지 않았다.

[0975] <표 8>

[0976] 프로세스 최적화 배양에 대해 검정된 활성화 및 분화의 마커.

표적	검출을 위한 표지	클론
패널 1		
TCRab (즉, TCRα/β)	PE/Cy7	IP26
CD57	PerCP-Cy5.5	HNK-1
CD28	PE	CD28.2
CD4	FITC	OKT4
CD27	APC-H7	M-T271
CD56	APC	N901
CD8a	PB	RPA-T8
패널 2		
CD45RA	PE/Cy7	HI100
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2
CCR7	PE	150503
CD8	FITC	HIT8
CD4	APC/Cy7	OKT4
CD38	APC	HB-7
HLA-DR	PB	L243
패널 3		
CD137	PE/Cy7	4B4-1
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2
Lag3	PE	3DS223H
CD8	FITC	HIT8
CD4	APCCy7	OKT4
PD1	APC	EH12.2H7
Tim-3	BV421	F38-2E2

[0977]

[0978] 약어: PE/Cy7=피코에리트린: Cy-7 탠덤 접합체; PerCP-Cy5.5=페리디닌-엽록소-단백질 복합체:CY5.5 접합체; PE=피코에리트린; FITC=플루오레세인 이소티오시아네이트 접합체; APC-H7=알로피코시아닌:H7 탠덤 접합체; APC=알로피코시아닌; PB=퍼시픽 블루 (Pacific Blue)™

[0979] 배지 소비 및 대사물 생산은 시험된 모든 조건에 대해 허용 한계 내에 잔류하였으며; IL-2 수준은 배양 상청액의 150 IU/mL 초과로 잔류하였다 (데이터는 나타내지 않음).

[0980] T-세포에 의한 종양 세포 살해는 종양 세포의 표면 상에 제시된 펩티드에 반응하여 이펙터 T-세포 상의 T-세포 수용체의 활성화에 의해 매개되는 것으로 이해된다. 생체외 확장된 T-세포는 이들이 주입 시 생체내에서 존속하고, 종양 퇴행을 매개하는 경우, 활성화되는 능력을 보유하고, TCR 활성화에 반응하여 증식해야 한다.

[0981] 배양된 세포의 활성화 잠재성을 평가하기 위해, 상이한 시점에서 수확된 TIL을 OKT3으로 로딩된 방사선조사된 동종이형 PBMC로 재활성화시켰다. TIL 배양물을 7일 후에 수확하고, 배수-확장에 대해 검정하였다. 이 연구의 결과를 표 9에 요약한다.

[0982] <표 9>

[0983] 결과의 요약: OKT3 로딩된 동종이형 PBMC과 함께 재-배양 시 사후-REP TIL의 증식.

수확일	배수-확장	SD	P-값 (스튜던트 't'검정)
실험 1			
제9일	43	6.088	NA
제10일	48	3.105	NA
제11일	71	11.137	0.135
제14일	60	6.995	
실험 2			
제9일	44	6.276	NA
제10일	27	4.762	NA
제11일	72	18.795	0.045
제14일	41	7.050	
실험 3			
제9일	54	5.810	NA
제10일	54	9.468	NA
제11일	65	1.674	0.071
제14일	50	8.541	

[0984]

[0985] 이 연구는 TIL이 이 검정에서 활성화되는 잠재성이 배양의 각각의 일과 함께 제11일까지 (수확 제9일 내지 제11일) 증가하였음을 입증하였다. TIL을 유사하게 제어하기 위해 수행된 변형된 프로세스의 제11일에 수확된 세포는 현재의 프로세스와 유사한 14일 동안 배양에서 유지되었다.

[0986] 이들 연구는 변형된 TIL 프로세스의 확장성을 입증하였으며, TIL 대 공급자 세포의 시딩 비의 허용가능한 범위를 확립하였다. 또한, 성장 특징은 배양의 제14일까지 지속하는 것으로 밝혀진 반면, 배양 조건은 제11일까지 최적으로 잔류하였다. 시험된 조건은 TIL 표현형에 대해 측정가능한 효과를 나타내지 않았다. REP 배양 제11일에 수확된 세포는 재활성화에 반응하는 가장 양호한 능력을 입증한 반면, 세포 배양 조건은 허용 내에 잔류하였다. 이들 변화는 제5일에 일어난 배양 분할 및 제11일에 수확으로 전체 규모로 채택되고, 입증되었다.

[0987] 조작 실행을 환자에의 투여를 위한 자가 TIL 생성물의 GMP 제조 전에 제조에서의 경험을 얻고, TIL 생성물을 시험하기 위해 프로세스 개발 시설에서 시행하였다. 조작 실행에 사용된 제조 절차는 GMP TIL 생성물의 제조에 사용되는 것과 동일한 규모의 것이었다. 흑색종, 유방암, 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC), 자궁경부 암종, 및 폐암의 전이를 비롯한 다양한 유형의 종양으로부터 TIL을 성장시키는 데 있어서의 경험은 전이성 종양 샘플로부터의 TIL의 절개 및 결과물이 이들 암에 대해 유사함을 측정하였다 (Sethuraman 2016, JITC P42). 종양 단편의 초기 단리 및 림프구의 결과물은 종양 조직학 사이에 유사한 것으로 보이기 때문에, 이들 조작 실행은 HNSCC, 자궁경부 및 흑색종 종양으로부터 TIL의 제조를 위한 프로세스를 정성화하는 데 충분하다.

[0988] 표 10은 조작 실행에 사용된 종양 샘플의 공급원 및 특징을 나타낸다.

[0989] <표 10>

[0990] 조작 실행을 위해 시험된 종양 샘플.

종양 샘플	조작 실행 1	조작 실행 2	조작 실행 3
환자 ID	1001185	600-D455	40231
공급원	바이오쌤 리서치	바이오옵션즈	모피트
조직	폐, 좌측	유방, ERPR+Her2-	흑색종
프로세싱된 날짜	2017년 1월 5일	2017년 1월 12일	2017년 1월 26일

[0991]

[0992] 프로세스 개발 시설에서의 TIL의 3회의 조작 실행의 방출 시험을 하기 기재된 바와 같이 완료하였다 (표 11). 생성물을 제16일 및 제22일에 시험하였다. IFN-γ 분비를 또한 다른 곳에 상세화된 바와 같이 3회의 조작 실행에 대해 측정하였다 (표 12).

[0993] <표 11>

[0994] 프로세스 개발 시설에서의 조작 실행에 대한 생성물 방출 시험 결과.

[0995]

	파라미터	시험 방법	허용 기준	조작 실행		
				실행 1	실행 2	실행 3
제16일	멸균성*	BacTAlert	성장 없음	성장 없음	성장 없음	성장 없음
	미코플라스마	PCR	제7일 분할로부터 음성	음성	음성	음성
제22일	생존율 (%)	AOPI	≥ 70%	82.3%	85.13%	84.6%
	총 생존 세포	AOPI	결과 보고	2.6×10^{10}	1×10^{10}	1.4×10^{11}
	멸균성	그램 염색	음성	음성	음성	음성
	멸균성 최종 생성물*	BacT/Alert	성장 없음	음성	음성	보류
	% $CD45^+CD3^+$	유동 세포측정법	≥ 90%	99.3%	96.3%	99.8%
	내독소	엔도세이프	≤ 0.7 EU/mL	<0.5 EU/mL	<0.5 EU/mL	<0.5 EU/mL
	미코플라스마 최종 생성물	PCR	음성	음성	음성	음성
	외관	육안 검사	가시적 무리를 갖지 않는 무손상 백	무손상 백, 가시적 무리가 없음	무손상 백, 가시적 무리가 없음	무손상 백, 가시적 무리가 없음

[0996] * 제16일 및 제22일에 대한 최종 멸균성 결과는 선적을 위한 최종 생성물 방출 후까지 이용가능하지 않다. 제22일로부터의 그램 염색 결과는 멸균성 선적 방출에 사용된다.

[0997] <표 12>

[0998] 추가의 기능적 특징규명: IFN-γ 분비의 측정.

[0999]

기능적 특징규명	방법	예상된 결과	조작 실행		
			실행 1	실행 2	실행 3
항-CD3, CD28, CD137로의 IFN-γ 자극 (pg/백만개 세포)	ELISA	비-자극된 것에 비해 >2 표준 편차	3085 +/- 182	2363 +/- 437	보류
IFN-γ 비-자극된 (pg/백만개 세포)	ELISA	적용되지 않음	34 +/- 5	27 +/- 10	보류

[1000] 결론적으로, 조작 실행으로부터의 데이터는 TIL 약물 생성물이 환자에의 자가 투여의 목적을 위해 제조될 수 있음을 입증한다.

[1001] **실시예 4: 림프구고갈**

[1002] 세포 카운트를 제7일에 및 림프구고갈 전에 취할 수 있다. 최종 세포 생성물은 플라스마-라이트 (Plasma-Lyte) A™ (부피/부피) 중 최소 50% 하이포써모솔™에 제형화된 대략 150×10^9개 이하의 생존 세포 및 300 IU/mL IL2를 함유하는 0.5% HSA (인간 주입에 혼화성임)를 포함하였다. 최종 생성물은 주입을 위한 2개의 부피 중 1개에서 투여에 이용가능하였다:

[1003] 1) 수확된 총 TIL이 ≤ 75×10^9개인 경우, 250 mL (300-mL 용량 주입 백 중)

[1004] 또는

[1005] 2) 수확된 총 TIL이 < 150×10^9개인 경우, 500 mL (600-mL 용량 주입 백 중)

[1006] REP 단계 동안 T-세포 확장 속도에 있어서의 환자-대-환자 변이로 인해 각각의 환자에 대한 최종 TIL 주입 생성물에 대해 생성될 수 있는 세포의 수는 예측될 수 없다. 3 내지 14-일 REP의 제3일, 제4일, 제5일, 제6일, 제7일의 세포의 하한은 환자를 시클로포스파미드 더하기 플루다라빈 화학요법 처방을 사용하여 림프구고갈시키는

결정을 하기 위해 필요한 세포의 최소 수에 기초하여 설정된다. 일단 본 발명자들이 이 최소 달성된 세포 수에 기초하여 림프구고갈을 시작하였으면, 본 발명자들은 환자를 제3일 내지 제14일 중 임의의 것, 및 많은 경우 제7일까지 본 발명자들이 REP에서 생성한 TIL의 이용가능한 수로 치료하는 것을 실행한다. 주입을 위한 범위의 상한 (150 × 10^9개의 생존 세포)은 임상적 반응이 달성된 경우 안전하게 주입되는 공지된 공개된 상한에 기초한다. Radvanyi, et al., *Clin Cancer Res* **2012**, *18,* 6758-6770.

[1007] **실시예 5: 프로세스 2A - 제0일**

[1008] 이 실시예는 실시예 1 내지 4에 기재된 2A 프로세스에 대한 상세한 제0일 프로토콜을 기재한다.

[1009] 제조.

[1010] 1. 종양 세척 배지 (Tumor Wash Medium), CM1, 및 IL-2가 유효 기간 내인지 확인하였다.

[1011] 2. CM1 (세포 배지 1)을 인큐베이터에 정치하였다.

[1012] 방법.

[1013] 1. 생물학적 안전성 캐비닛 (BSC)을 청소하였다.

[1014] 2. 인-프로세스 감시 플레이트를 설치하고, 절차 동안 생물안정성 캐비닛에 1 내지 2시간 동안 방치하였다.

[1015] 3. TIL 배지 CM1을 생물학적 안전성 캐비닛에 정치하였다.

[1016] 4. 6000 IU/mL IL-2를 함유하는 TIL 배지 CM1을 제조하였다:

[1017] 4.1. 1 L CM1

[1018] 4.2. 1 ml IL-2 (6,000,000 IU/mL)

[1019] 4.3. 25 mL의 CM1+IL2를 G-렉스에 첨가하는 경우 단편에 대해 사용되는 50 ml 원뿔형 내로 정치하였다.

[1020] 4.4.37 ℃ 인큐베이터에 정치하여 사전-가온하였다.

[1021] 5. G-렉스 100MCS 패키지를 70% 알콜로 닦고, 생물안정성 캐비닛에 정치하였다. 필터 라인을 제외한 모든 클램프를 닫았다.

[1022] 6. 아카시아 (Acacia) 펌프 보정을 수행하였다.

[1023] 7. G-렉스 100MCS 플라스크의 적색 라인을 아카시아 펌프 부트의 배출구 라인에 부착시켰다.

[1024] 8. 펌프마틱을 펌프 부트의 유입구 라인에 부착시키고, 배지를 갖는 병에 정치하였다. 클램프를 펌프 부트로 풀었다.

[1025] 9. 각각의 G-렉스 100MCS 생물반응기에 6,000 IU/mL의 IL-2를 함유하는 잔류의 975 mL의 사전-가온된 CM1을 펌핑하였다.

[1026] 10. 적색 라인을 가열 밀봉하고, 펌프 부트로부터 분리하였다.

[1027] 11. G-렉스 상에 표지를 정치하였다.

[1028] 12. G-렉스 100MCS를 필요할 때까지 인큐베이터에 정치하였다.

[1029] 조직 절개

[1030] 1. 종양 프로세싱의 시작 시간을 기록하였다.

[1031] 2. 종양 세척 배지를 BSC로 옮겼다.

[1032] 3. 5개의 100 mm 페트리 디쉬를 생물안정성 캐비닛에 정치하였으며, 3개는 세척용, 1개는 유지용, 및 1개는 비바람직한 조직용이었다. 디쉬를 그에 따라 표지하였다. 비바람직한 조직은 황색 지방 조직 또는 괴사성 조직에 의해 지시되었다.

[1033] 4. 3개의 6 웰 플레이트를 생물안정성 캐비닛 내로 정치하였다.

[1034] 5. 3 내지 5 mL의 종양 세척 배지를 과량의 종양 조각을 위해 1개의 6 웰 플레이트의 각각의 웰 내로 피펫팅하

였다.

[1035] 6. 50 mL의 종양 세척 배지를 세척 디쉬 1 내지 3 및 유지 디쉬로 피펫팅하였다.

[1036] 7. 2개의 150 mm 절개 디쉬를 생물안정성 캐비닛 내로 정치하였다.

[1037] 8. 3개의 멸균 50 mL 원뿔형 튜브를 BSC 내로 정치하였다.

[1038] 9. 하나는 겸자 종양 세척 배지로서, 두번째는 스캘펄 종양 세척 배지로서, 및 세번째는 뚜껑 덮기에 사용되는 종양 세척 배지를 위한 것으로 표지하였다.

[1039] 10. 5 내지 20 mL의 종양 세척 배지를 각각의 원뿔형에 첨가하였다. 겸자 및 스캘펄을 필요에 따라 종양 세척 및 절개 프로세스 동안 종양 세척 배지 내로 디핑하였다.

[1040] 11. 스캘펄 및 겸자를 적절한 튜브에 정치하였다.

[1041] 12. 긴 겸자를 사용하여 종양(들)을 시편 병으로부터 제거하고, 세척 1 디쉬로 옮겼다.

[1042] 13. 종양을 주위에서 세척 1 디쉬에서 3분 이상 동안 인큐베이션하였다.

[1043] 14. 인큐베이션 동안, 시편 병을 "생물부하"로 재-표지하고, 최종 수확 또는 추가의 멸균성 시험이 요구될 때까지 2 내지 8 ℃에서 저장하였다.

[1044] 15. 겸자를 사용하여 종양을 세척 2 디쉬로 옮겼다.

[1045] 16. 종양을 주위에서 세척 2 디쉬에서 3분 이상 동안 인큐베이션하였다.

[1046] 17. 인큐베이션 동안, 이동 피펫을 사용하여, 종양 세척 배지의 대략 4개의 고르게-이격된, 개별적 액적을 종양 단편 디쉬로서 명명된 6 웰 플레이트 뚜껑의 각각의 원에 첨가하였다.

[1047] 18. 겸자를 사용하여 종양을 세척 3 디쉬로 옮겼다.

[1048] 19. 종양을 주위에서 세척 3 디쉬에서 3분 이상 동안 인큐베이션하였다.

[1049] 20. 150 mm 디쉬 뚜껑을 절개에 사용하였다. 룰러를 밑에 정치하였다.

[1050] 21. 겸자를 사용하여 종양을 절개 디쉬로 옮기고, 종양의 길이를 측정하고, 기록하였다.

[1051] 22. 종양의 사진을 찍었다.

[1052] 23. 각각의 중간 조각의 종양 구조를 보존하도록 주의하면서 절개 디쉬에서 종양 조각의 중간 조각으로의 초기 절개를 수행하였다.

[1053] 24. 조직이 전체 절개 절차 동안 수화되어 잔류하는 것을 보장하기 위해 단편으로 활성적으로 절개되지 않은 임의의 중간 종양 조직을 조직 유지 디쉬로 옮겼다.

[1054] 25. 한 번에 1개의 중간 종양 조직으로 작업하고, 종양을 참조용 디쉬 밑의 룰을 사용하여 절개 디쉬에서 대략 3×3×3 mm 단편으로 주의깊게 슬라이스하였다.

[1055] 26. 중간 조직에서의 모든 조직이 평가될 때까지 중간 종양 조각으로부터의 단편을 절개하는 것을 계속하였다.

[1056] 27. 바람직한 단편을 선택하고, 이동 피펫을 사용하여 4개 이하의 바람직한 단편을 종양 단편 디쉬에서의 1개의 원에서의 세척 배지 액적 내로 옮겼다. 이동 피펫 스캘펄 또는 겸자를 사용하여, 가능한 한 많은 비바람직한 조직 및 폐기물을 비바람직한 조직 디쉬로 옮겨 절개 디쉬를 청소하였다. 모든 잔류의 조직을 6-웰 플레이트의 웰 중 하나 내로 정치하였다. (비바람직한 조직은 황색 지방 조직 또는 괴사성 조직에 의해 지시되었음.)

[1057] 28. 잔류의 중간 종양 조각에 대해 단계 23 내지 26을 반복하고, 전체 종양이 프로세싱될 때까지 한 번에 1개의 중간 조각을 작업함으로써 프로세싱을 계속하였다. (프로세싱 기술자에 의해 결정되는 필요에 따라 신선한 스캘펄 또는 겸자를 얻었음.)

[1058] 29. 단편 플레이트를 후드 후방을 향해 이동시켰다.

[1059] 30. 이동 피펫, 스캘펄, 또는 겸자를 사용하여, 50개 이하의 가장 양호한 종양 단편을 CM1을 함유하는 50 mL 원뿔형 튜브 표지된 종양 단편으로 옮겼다.

[1060] 31. 플로터를 이동 피펫으로 50 mL 원뿔형으로부터 제거하였다. 단편 및 플로터의 수를 기록하였다.

[1061] 32. 모든 불필요한 항목을 후드로부터 제거하여, 이들이 가외의 단편을 함유하는 경우 바람직한 조직 플레이트를 보유하게 하였다. 후드를 알콜 와이프로 닦았다.

[1062] 33. G-렉스 100MCS를 인큐베이터로부터 제거하고, 70% 알콜로 닦고, 생물안정성 캐비닛에 정치하였다.

[1063] 34. 종양 단편을 갖는 원뿔형을 선회시키고, 내용물을 50 ml 원뿔형 상에서 G-렉스 100MCS 플라스크 내로 부었다.

[1064] 35. 1개 이상의 종양 단편을 G-렉스 100M 플라스크 플로트로 옮기는 경우, 바람직한 조직 디쉬로부터 이용가능한 경우 1개의 추가의 종양 단편을 얻고, 이를 G-렉스 100M 플라스크로 옮겼다.

[1065] 36. 인큐베이터 # (들) 및 각각의 플라스크에 첨가된 단편의 총 수를 기록하였다.

[1066] 37. G-렉스 100M 생물반응기를 37 ℃, 5% CO_2 인큐베이터에 정치하였다.

[1067] 38. 임의의 비사용된 종양을 100 mL의 하이포써모솔에 정치하고, 실험실로 전달하였다.

[1068] 39. 종양 프로세싱의 정시 시간을 기록하였다.

[1069] 40. IL-2를 함유하는 임의의 비-사용된 TIL 완전 배지 및 IL-2의 임의의 비-사용된 분취물을 버렸다.

[1070] 41. 생물학적 안전성 캐비닛을 청소하였다.

[1071] 42. 생물부하 샘플을 적절한 저장 조건에 정치하였다.

[1072] 43. 데이터를 기록하였다.

[1073] 44. 제조된 환자의 파일에 대한 파일 시편 ID#종양 프로세스 날짜로서의 사진을 저장하였다.

[1074] 45. 고정 플레이트의 미생물학 실험실로의 전달을 지시하고, 보장하였다.

[1075] **실시예 6: 프로세스 2A - 제11일**

[1076] 이 실시예는 실시예 1 내지 4에 기재된 2A 프로세스에 대한 상세한 제11일 프로토콜을 기재한다.

[1077] 사전 준비.

[1078] 1. 프로세싱 전 일:

[1079] 1.1. CM2는 프로세싱이 일어나기 전 일에 제조될 수 있다. 4℃에서 정치하였다.

[1080] 2. 프로세싱일.

[1081] 2.1. 공급자 세포 하니스를 제조하였다.

[1082] 2.1.1. CC2 및 4S-4M60 커넥터 세트 상의 모든 클램프를 닫았다.

[1083] 2.1.2. 4S-4M60 하니스의 4개의 스파이크를 스파이크를 제거하는 CC2 상의 스파이크 라인에 멸균 용접하였다.

[1084] 2.1.3. 공급자 세포 풀링을 위해 챙겨두었다.

[1085] 2.2. CTF-FORM-318 당 5 mL의 냉동보존 배지를 제조하고, 필요할 때까지 4℃에서 정치하였다.

[1086] 클린 룸 환경적 모니터링 - 사전-프로세싱

[1087] 1. 클린 룸 정보를 기록하였다.

[1088] 2. 생물안정성 캐비닛 (BSC)을 큰 포화된 알콜 와이프 또는 알콜 스프레이로 청소하였다.

[1089] 3. 프로세싱을 시작하기 전에 10분 동안 입자 카운트를 확인하였다.

[1090] 4. 인-프로세스 감시 플레이트를 설치하고, 절차 동안 1 내지 2시간 동안 생물안정성 캐비닛에 방치하였다.

[1091] G-렉스 500MCS 플라스크를 제조하기:

[1092] 1. 10 mL 시린지를 사용하여 각각의 리터의 CM2 (세포 배지 2)에 대한 0.5 mL의 IL-2 (스톡은 6 × 10^6 IU/mL임)를 비사용된 멸균 암루어 커넥터를 통해 바이오프로세스 백 내로 무균적으로 옮겼다.

[1093] 2. 시린지에서의 과량의 공기를 사용하여 라인을 청소하고, 일부 배지를 백으로부터 뽑아내고, 연이어 배출하였다. 이는 모든 IL-2가 배지와 혼합된 것을 보장하였다. 잘 혼합하였다.

[1094] 3. 외부 패키징을 열고, G-렉스 500MCS를 BSC에 정치하였다. 큰 필터 라인을 제외하고 장치 상의 모든 클램프를 닫았다.

[1095] 4. G-렉스 500MCS로부터의 적색 수확 라인을 펌프 배관 배출구 라인에 멸균 용접하였다.

[1096] 5. 바이오프로세스 백 암루어를 펌프 부트의 숫루어에 연결하였다.

[1097] 6. 바이오프로세스 백을 IV 막대기 상에 매달고, 클램프를 열고, 4.5 리터의 CM2 배지를 G-렉스 500MCS 내로 펌핑하였다. 라인, 클램프, 및 열 밀봉부를 청소하였다.

[1098] 7. 라인을 펌프로부터 배지로 보유하였다. 이는 공급자 세포를 제조하는 경우 사용되었다.

[1099] 8. G-렉스 500MCS를 인큐베이터에 정치하였다.

[1100] 방사선조사된 공급자 세포를 제조하기

[1101] 1. 밀봉하고, 스파이크(들)를 IL TP로부터 제거하였다. 둘 다의 라인을 클램핑하였다.

[1102] 2. 1 L 이동 팩 (TP)의 건조 중량을 기록하였다.

[1103] 3. 1 L 이동 팩을 백으로부터의 아카시아 펌프 부트 약 12"에 멸균 용접하였다.

[1104] 4. 펌프 배관의 다른 말단은 여전히 10 L 랩테이너에 연결되었다.

[1105] 5. 500 mL CM2를 중량에 의해 TP 내로 펌핑하였다.

[1106] 6. 클램프를 닫고, 용접부에 가깝게 밀봉하였다.

[1107] 7. 인큐베이터에 정치하였다.

[1108] 8. 공급자 세포 백을 확인하고, 로그 아웃하였다.

[1109] 9. 사용된 공급자 로트를 기록하였다.

[1110] 10. 백을 알콜로 닦았다.

[1111] 11. 지퍼백에 정치하였다.

[1112] 12. 공급자 세포를 37℃ (+/- 1℃) 수조에서 해동시켰다. 수조의 온도를 기록하였다.

[1113] 13. 제거하고, 거즈로 건조시켰다.

[1114] 14. 공급자 세포를 패스 쓰루를 통해 프렙 룸 (Prep Room) 내로 통과시켰다.

[1115] 15. 클린 룸 (Clean Room) 중의 BSC로 옮겼다.

[1116] 16. 이전에 제조된 공급자 하니스를 사용하여, 배지를 갖는 1 L TP를 3 웨이 스톱콕의 샘플 포트 측 상의 비사용된 라인 중 하나에 가능한 한 적은 배관이 느슨해지는 밀봉부에 가능한 한 가깝게 용접하였다.

[1117] 17. 공급자 하니스를 BSC 내로 놓았다.

[1118] 18. 3개의 공급자 백의 각각을 공급자 하니스로부터의 스파이크로 공급자 백의 단일 포트 내로 스파이킹하였다.

[1119] 19. 스톱콕 밸브를 1 L TP가 "오프" 위치에 있도록 회전시켰다.

[1120] 20. 한 번에 1개의 백으로 작업하고, 공급자 백에 대한 라인 상의 클램프를 열고, 시린지에서 공기를 배출하고, 공급자 백의 내용물을 시린지 내로 뽑아내었다. 세포를 회수하는 데 도움이 된 시린지로부터 공기를 배출하였다. 공급자 백에 대한 클램프를 닫았다.

[1121] 21. 각각의 백에서 해동된 공급자 세포의 회수된 부피를 기록하였다.

[1122] 22. 스톱콕 밸브를 공급자 백이 "오프" 위치에 있도록 회전시켰다.

[1123] 23. TP 상의 클램프를 열고, 시린지의 내용물을 TP 내로 분배시켰다.

[1124] 24. 라인이 청소된 것을 보장하고, TP를 재-클램핑하였다. 라인을 청소하는 데 사용하기 위해 TP로부터 시린지

내로 일부 공기를 뽑아내어야 할 수 있다.

[1125] 25. 세포를 잘 혼합하였다.

[1126] 26. 공급자 백에 대한 클램프를 닫았다.

[1127] 27. 스톱콕을 시린지 포트가 "오프" 위치에 있도록 회전시켰다. 60 mL 시린지를 스톱콕으로부터 분리하였다.

[1128] 28. 각각의 공급자 백에 대해 새로운 시린지로 대체하였다.

[1129] 29. 시린지를 최종 백 뒤에 방치하였다.

[1130] 30. 최종 공급자 제형을 잘 혼합하였다.

[1131] 31. 스톱콕을 공급자 세포 현탁액이 "오프" 위치에 있도록 회전시켰다.

[1132] 32. 세포를 잘 혼합하고, 5 mL 시린지 및 무바늘 포트를 사용하여, 정확한 샘플링을 보장하기 위해 포트를 일부 세포 용액으로 세정하고, 1 mL의 세포를 제거하고, 카운팅을 위해 표지된 튜브 내로 정치하였다.

[1133] 33. 제2 시린지로 반복하였다. 이들 2개의 독립적 샘플은 각각 단일 세포 카운트가 수행되었다.

[1134] 34. 스톱콕을 공급자 현탁액이 "열림" 위치에 있도록 돌리고, 하니스에 부착된 60 ml 시린지를 사용하여 공기를 TP 내로 배출하여 라인을 청소하였다.

[1135] 35. 시린지를 제거하고, 루어 포트를 새로운 멸균 캡으로 덮었다.

[1136] 36. 용접부에 가까운 TP를 열 밀봉하고, 하니스를 제거하였다.

[1137] 37. 세포 현탁액을 갖는 이동 팩의 질량을 기록하고, 세포 현탁액의 부피를 계산하였다.

[1138] 38. 인큐베이터에 정치하였다.

[1139] 39. 단일 세포 카운트를 공급자 세포 샘플에 대해 수행하고, 데이터를 기록하고, 카운팅 원 데이터를 배치 기록에 부착시켰다.

[1140] 40. 셀로미터 카운팅 프로그램을 문서화하였다.

[1141] 41. 정확한 희석이 셀로미터 내로 들어갔는 지를 확인하였다.

[1142] 42. 공급자 이동 팩 중의 총 생존 세포 밀도를 계산하였다.

[1143] 43. 세포 카운트가 < 5 x10^{9}인 경우, 보다 많은 세포를 해동시키고, 카운팅하고, 공급자 세포에 첨가하였다.

[1144] 44. 공급자 백을 재-칭량하고, 부피를 계산하였다.

[1145] 45. 제거하는 세포의 부피를 계산하였다.

[1146] 공급자의 G-렉스로의 첨가

[1147] 1. 4" 이동 세트를 공급자 TP에 멸균 용접하였다.

[1148] 2. BSC에서 적절한 크기의 시린지를 공급자 이동 팩에 용접된 암루어에 부착시켰다.

[1149] 3. 세포를 잘 혼합하고, 5.0× 10^{9}개의 세포를 달성하기 위해 단계 40 또는 41에서 계산된 부피를 제거하였다. 비필요한 세포를 버렸다.

[1150] 4. 1 mL 시린지 및 18G 바늘을 사용하여 0.150 mL의 OKT3을 뽑아내고, 바늘을 제거하고, 암루어를 통해 공급자 TP로 옮겼다.

[1151] 5. 배관 및 시린지를 공급자 세포로 세정하고, 백을 잘 혼합하였다. 라인을 시린지로부터의 공기로 청소하였다.

[1152] 6. G-렉스 500MCS를 인큐베이터로부터 제거하고, 알콜 와이프로 닦고, SCD 옆에 정치하였다.

[1153] 7. 공급자 백을 G-렉스 500MCS 상의 적색 라인에 멸균 용접하였다. 라인을 클램핑해제하고, 공급자 세포를 중력에 의해 플라스크 내로 유동시켰다.

[1154] 8. 라인이 완전히 청소된 것을 보장한 후, 원래 용접에 가까운 라인을 열 밀봉하고, 공급자 백을 제거하였다.

[1155] 9. G-렉스 500MCS를 인큐베이터로 복귀시키고, 시간을 기록하였다.

[1156] TIL을 제조하기: TIL 수확의 시간 개시를 기록하기

[1157] 1. G-렉스 100MCS를 인큐베이터로부터 주의깊게 제거하고, 큰 필터 라인을 제외한 모든 클램프를 닫았다.

[1158] 2. 1L 이동 팩을 G-렉스 100MCS 상의 적색 라인에 용접하였다.

[1159] 3. 300 ml TP 상의 클램프를 닫았다. 백으로부터 약 12 인치를 열 밀봉하여 스파이크를 제거하였다. 건조 중량/질량을 기록하였다.

[1160] 4. 300 mL 이동 팩을 열 밀봉부에 가까운 100MCS 상의 세포 수집 라인에 멸균 용접하였다. 라인을 클림핑하였다.

[1161] 5. 1 L TP에 이어지는 모든 클램프를 풀었다.

[1162] 6. 개더렉스를 사용하여 약 900 mL의 배양 상청액을 1L 이동 팩으로 옮겼다. 공기가 라인으로 들어왔을 때 개더렉스를 정지시켰다. 라인을 클램핑하고, 열 밀봉하였다.

[1163] 7. 모든 세포가 막으로부터 탈착될 때까지 플라스크를 선회시켰다. 모든 세포가 탈착된 것을 확인하기 위해 막을 점검하였다.

[1164] 8. 플라스크를 수집 배관으로부터 기울이고, 종양 단편이 모서리를 따라 고정되도록 하였다.

[1165] 9. 단편이 플라스크의 반대 측에 잔류하도록 플라스크를 수집 배관을 향해 서서히 티핑하였다.

[1166] 10. 개더렉스를 사용하여 잔류의 세포 현탁액을 300 mL 이동된 팩 내로 옮겨 종양 단편을 회피하였다.

[1167] 11. 모든 세포가 막으로부터 제거된 것을 재점검하였다.

[1168] 12. 필요할 경우, 개더렉스 상의 클램프를 풂으로써 다시 세척하고, 일부 배지를 중력에 의해 G-렉스 100MCS 플라스크 내로 유동시켰다.

[1169] 13. 플라스크를 격렬하게 두드려서 세포를 방출시키고, 300 ml TP 내로 펌핑하였다.

[1170] 14. 수집이 완료된 후, 적색 라인을 닫고, 열 밀봉하였다.

[1171] 15. 수집 라인을 열 밀봉하여 건조 중량이 기록된 경우와 대략 동일한 길이의 배관을 남겼다.

[1172] 16. 세포 현탁액을 함유하는 300 ml TP의 질량 (건조 질량을 포함함)을 기록하고, 세포 현탁액의 부피를 계산하였다.

[1173] 17. BSC에서 300 mL TP를 4" 혈장 이동된 세트로 스파이킹하였다. 세포를 잘 혼합하였다. 5 mL 시린지를 무균적으로 부착시키고, 1 mL를 뽑아내고, 냉동 바이알에 정치하였다. 제2 시린지로 반복하였다. 이들을 세포 카운팅, 생존력에 사용하였다.

[1174] 18. 재-클램핑하고, 루어 캡을 새로운 멸균 루어 캡으로 대체하였다.

[1175] 19. 인큐베이터에 정치하고, 인큐베이터에 정치된 시간을 기록하였다.

[1176] 20. 단일 세포 카운트를 각각의 샘플에 대해 수행하고, 데이터를 기록하고, 카운팅 원 데이터를 배치 기록에 부착시켰다.

[1177] 21. 셀로미터 카운팅 프로그램을 문서화하였다.

[1178] 22. 정확한 희석이 셀로미터 내로 들어갔는 지를 확인하였다.

[1179] 23. 필요할 경우 총 생존 TIL 밀도를 $\leq 2\times10^{8}$개의 생존 세포로 조정하였다.

[1180] 24. 제거하거나 필요하지 않은 조정을 나타내는 부피를 계산하였다.

[1181] 25. BSC에서 적절한 크기의 시린지를 300 mL TP에 무균적으로 부착시켰다.

[1182] 26. 요구되는 경우, "제거할 부피를 계산하기" 표에서 계산된 세포의 계산된 부피를 제거하였다.

[1183] 27. 클램핑하고, 300 ml TP를 열 밀봉하였다.

[1184] 28. 과량의 세포를 적절한 크기의 원뿔형 튜브로 옮기고, 나중의 냉동보존을 위해 느슨해진 캡을 갖는 인큐베이터에 정치하였다.

[1185] 29. G-렉스 500MCS를 인큐베이터로부터 제거하고, SCD 옆에 정치하였다.

[1186] 30. 300 ml TP를 아카시아 펌프의 유입구 라인에 멸균 용접하였다.

[1187] 31. G-렉스 500MCS의 적색 라인을 아카시아 펌프의 배출구 라인에 멸균 용접하였다.

[1188] 32. 세포를 플라스크 내로 펌핑하였다.

[1189] 33. 라인이 완전히 청소된 것을 보장한 후, 원래 용접부에 가까운 적색 라인을 열 밀봉하였다.

[1190] 34. G-렉스 500MCS 상의 모든 클램프가 큰 필터 라인을 제외하고 닫혔는 지를 점검하였다.

[1191] 35. G-렉스 500MCS를 인큐베이터로 복귀시키고, G-렉스 인큐베이터에 정치된 시간을 기록하였다.

[1192] 36. 고정 플레이트의 미생물학 실험실로의 전달을 지시하고, 보장하였다.

[1193] 과량의 냉동보존

[1194] 세포에 첨가할 동결 배지의 양을 계산하였다:

[1195] <표 13>

[1196] 표적 세포 농도는 1 × 10^8개/ml이었다.

[1197]

A. 제거된 총 세포 (단계 15로부터)	mL
B. 표적 세포 농도	1 x 10^8개의 세포/mL
첨가할 동결 배지의 부피 (A/B)	mL

[1198] 37. TIL을 400 × g에서 5분 동안 20℃에서 충분한 제동 및 충분한 가속으로 스핀 다운시켰다.

[1199] 38. 상청액을 무균적으로 흡인하였다.

[1200] 39. 튜브의 바닥을 부드럽게 두드려서 세포를 잔류의 유체에 재현탁시켰다.

[1201] 40. 튜브를 부드럽게 두드리는 동안, 제조된 동결 배지를 서서히 첨가하였다.

[1202] 41. 적절한 크기의 냉동 튜브 내로 분취하고, 세포가 -80℃ 내로 정치된 시간을 기록하였다.

[1203] **실시예 7: 프로세스 2A - 제16일**

[1204] 이 실시예는 실시예 1 내지 4에 기재된 2A 프로세스에 대한 상세한 제16일 프로토콜을 기재한다.

[1205] 클린 룸 환경적 모니터링 - 사전-프로세싱.

[1206] 1. 생물안정성 캐비닛을 큰 포화된 알콜 와이프 또는 알콜 스프레이로 청소하였다.

[1207] 2. 프로세싱을 시작하기 전에 10분 동안 입자 카운트를 확인하였다.

[1208] 3. 인-프로세스 감시 플레이트를 설치하고, 절차 동안 1 내지 2시간 동안 생물안정성 캐비닛에 방치하였다.

[1209] TIL을 수확하고 카운팅하기.

[1210] 1. CM4의 1개의 10 L 백을 가온하여, 배양을 50×10^6개 미만의 TIL로 37℃ 인큐베이터에서 적어도 30분 또는 사용 준비될 때까지 개시하였다.

[1211] 2. BSC에서 백스터 (Baxter) 연장 세트를 10 L 랩테이너 백에 무균적으로 부착시켰다.

[1212] 3. G-렉스 500MCS 플라스크를 인큐베이터로부터 제거하고, 개더렉스에 인접한 벤치톱 상에 정치하였다. 큰 필터 라인을 제외하고 모든 클램프가 닫혔는 지를 점검하였다. 클램프를 "T" 연접부에 가까운 빠른 연결 라인 상에 이동시켰다.

[1213] 4. 10 L 랩테이너를 백스터 연장 상의 용접가능한 배관을 통해 G-렉스 500MCS 상의 적색 수확 라인에 멸균 용접하였다.

[1214] 5. "Y 밑의 2 L 이동 팩 2"를 열 밀봉하여 스파이크를 제거하고, 건조 중량을 기록하였다. 2 L TP를 G-렉스 500MCS 상의 깨끗한 수집 라인에 멸균 용접하였다.

[1215] 6. G-렉스 500MCS를 수준 표면 상에 놓았다.

[1216] 7. 10 L 랩테이너에 이어지는 모든 클램프를 클램핑해제하고, 개더렉스를 사용하여 약 4 L의 배양 상청액을 10 L 랩테이너로 옮겼다.

[1217] 8. 적절한 개더렉스 수확 지시에 따라 수확하였다.

[1218] 9. 적색 라인을 클램핑하고, TIL 수확이 개시된 시간을 기록하였다.

[1219] 10. 공기가 라인으로 들어간 경우 개더렉스를 정지시켰다. 적색 라인을 클램핑하였다.

[1220] 11. 상청액의 제거 후, 모든 세포가 막으로부터 탈착될 때까지 플라스크를 선회시켰다. 호스가 플라스크의 모서리에 있는 것을 보장하기 위해 플라스크를 기울였다.

[1221] 12. 2 L TP에 이어지는 모든 클램프를 풀고, 개더렉스를 사용하여 잔류의 세포 현탁액을 2 L TP 내로 옮겨, 모든 세포가 수집될 때까지 기울여진 모서리를 유지하였다.

[1222] 13. 막을 부착된 세포에 대해 점검하였다.

[1223] 14. 필요할 경우, 적색 라인 상의 클램프를 풂으로써 다시 세척하고, 일부 배지를 중력에 의해 플라스크 내로 유동시켰다.

[1224] 15. 적색 라인을 닫고, 삼중 열 밀봉하였다.

[1225] 16. 플라스크를 격렬하게 두드려서 세포를 방출시켰다.

[1226] 17. 세포를 2 L TP에 첨가하였다.

[1227] 18. 2 L 이동 팩을 열 밀봉하여 건조 중량이 기록된 경우와 대략 동일한 길이의 배관을 남겼다.

[1228] 19. G-렉스 500MCS를 보유하고, 이것을 분할에 재사용하였다.

[1229] 20. 세포 현탁액을 갖는 이동 팩의 질량을 기록하고, 세포 현탁액의 부피를 계산하였다.

[1230] 21. 건조 질량을 포함형 세포 현탁액 부피를 측정하였다.

[1231] 22. 4" 이동 세트를 세포 현탁액 백에 멸균 용접하였다.

[1232] 23. BSC에서 세포를 부드럽게 혼합하고, 20 cc 시린지로 11 ml를 뽑아내고, 표 14에 나타내어진 바와 같이 분취하였다:

[1233] <표 14>

[1234] 시험 파라미터.

시험	샘플 부피	용기
세포 카운트 및 생존율	2- 2mL 샘플	냉동바이알
미코플라스마	1 mL	냉동바이알을 시험이 완료될 때까지 4 °C에서 저장함.
멸균성	1 mL	0.5mL를 1개의 각각의 혐기성 및 호기성 배양 병 내로 접종함
유동	2 - 2mL	비사용된 세포 카운트 (장래의 배치 시험을 위해 냉동보존함)
세포의 나머지		버림

[1235]

[1236] 24. 열 밀봉하였다. 클램프를 보유하는 루어 연결을 닫았다.

[1237] 25. 표지하고, 세포 현탁액을 인큐베이터에 정치하고, 인큐베이터에 정치된 시간을 기록하였다.

[1238] 26. 새로운 부피를 계산하였다.

[1239] 27. 세포 현탁액의 부피 및 QC를 위해 제거된 부피 (11 mL)에 기초하여 2 L 이동 팩 중의 부피를 기록하였다.

[1240] 28. 접종하고, 멸균성 시험을 지시하였다.

[1241] 29. 미코플라스마 샘플을 4 ℃에서 미코플라스마 시험을 위한 보류 랙에 저장하였다.

[1242] 30. TIL을 시딩할 때까지 챙겨두었다.

[1243] 세포 카운트:

[1244] 단일 세포 카운트를 수행하고, 데이터를 기록하고 카운팅 원 데이터를 배치 기록에 부착시켰다. 희석을 문서화하였다. 셀로미터 카운팅 프로그램을 문서화하였다. 정확한 희석이 셀로미터 내로 들어갔는 지를 확인하였다.

[1245] 계속된 방법:

[1246] 31. 계대배양에 요구되는 플라스크의 총 수를 계산하였다.

[1247] **원래 용기를 재-사용하고, 추가의 용기의 분수를 반올림하였다.

[1248] CM에의 IL-2 첨가

[1249] 1. 글루타맥스를 갖는 Aim V의 10 L 백을 BSC에 정치하였다.

[1250] 2. 배지 백을 4" 혈장 이동 세트로 스파이킹하였다.

[1251] 3. 18G 바늘을 10 mL 시린지에 부착시키고, 5 mL의 IL-2를 시린지 내로 뽑아내었다 (최종 농도는 3000 IU/ml 임).

[1252] 4. 바늘을 제거하고, 시린지를 혈장 이동 세트에 무균적으로 부착시키고, IL-2를 백 내로 분배시켰다.

[1253] 5. 라인을 공기로 플러싱하고, 일부 배지를 뽑아내고, 백 내로 분배시켰다. 이는 모든 IL-2가 배지에 있는 것을 보장하였다.

[1254] 6. Aim V의 잔류의 백에 대해 반복하였다.

[1255] G-렉스500MCS 플라스크를 제조하기

[1256] 1. 플라스크에 첨가할 CM4의 양을 측정하였다. 플라스크 당 첨가된 세포의 부피 및 CM4 5000 mL-A의 부피를 기

록하였다.

[1257] 2. 큰 필터 라인을 제외한 모든 클램프를 닫았다.

[1258] 3. 아카시아 펌프의 유입구 라인을 CM4를 함유하는 배지 백 상의 4" 혈장 이동 세트에 멸균 용접하였다.

[1259] 4. 펌프의 배출구 라인을 적색 수집 라인을 통해 G-렉스 500MCS에 멸균 용접하였다.

[1260] 5. 결정된 양의 CM4를 가이드로서 플라스크 상의 라인을 사용하여 G-렉스 500MCS 내로 펌핑하였다.

[1261] 6. G-렉스 500MCS 적색 라인을 열 밀봉하였다.

[1262] 7. 각각의 플라스크에 대해 단계 4 내지 6을 반복하였다. 다수의 플라스크는 중력 충전 또는 다수의 펌프를 사용하여 동시에 충전될 수 있다. "Y" 커넥터는 펌프의 배출구 라인에 용접되고, 2개의 아암은 둘 다를 동시에 충전하는 2개의 G-렉스 500MCS 플라스크에 용접될 수 있다.

[1263] 8. 플라스크를 37℃, 5% CO_2에 정치하였다.

[1264] 플라스크를 TIL로 시딩하기

[1265] 1. 큰 필터 라인을 제외하고 G-렉스 500MCS 상의 모든 클램프를 닫았다.

[1266] 2. 세포 생성물 백을 아카시아 펌프의 유입구 라인에 멸균 용접하였다.

[1267] 3. 펌프의 다른 말단을 G-렉스 500MCS 상의 적색 라인에 멸균 용접하였다.

[1268] 4. 펌프 부트를 펌프에 정치하였다.

[1269] 5. 세포 생성물 백을 분석용 저울 상에 정치하고, TIL이 G-렉스 플라스크에 첨가된 시간을 기록하였다.

[1270] 6. 저울을 영점조절하였다.

[1271] 7. 라인을 클램핑해제하고, 세포의 요구되는 부피를 1 g=1 mL로 가정한 중량에 의해 G-렉스 500MCS 내로 펌핑하였다.

[1272] 8. 세포 백을 뒤집고, 공기를 펌핑하여 라인을 청소하였다. G-렉스 500MCS의 적색 라인을 열 밀봉하였다. 플라스크를 인큐베이터에 정치하였다.

[1273] 9. 펌프의 배출구 라인을 적색 수집 라인을 통해 다음 G-렉스 500MCS에 멸균 용접하였다.

[1274] 10. 세포를 잘 혼합하였다.

[1275] 11. 모든 플라스크에 대해 세포 이동을 반복하였다.

[1276] 12. 플라스크를 37℃, 5% CO_2에 정치하고, TIL이 G_REX 플라스크에 첨가된 시간을 기록하였다.

[1277] 13. 고정 플레이트에 대한 시험을 미생물학 실험실에 지시하였다.

[1278] 14. 수탁 번호를 기록하였다.

[1279] 15. 호기성 및 혐기성 멸균성에 대한 시험을 지시하였다.

[1280] 16. 미생물학 실험실로의 플레이트 및 병의 전달을 보장하였다.

[1281] 유동 또는 과량의 세포의 냉동보존:

[1282] 1. 요구되는 동결 배지의 양을 계산하였다:

[1283] a. 표적 세포 농도는 1 × 10^8개/ml이었고; 제거된 총 세포를 기록하였다. 표적 세포 농도는 1×10^8개의 세포/mL이었다. 첨가할 동결 배지의 총 부피를 계산하였다.

[1284] 2. 냉동 보존 배지를 제조하고, 필요할 때까지 40℃에서 정치하였다.

[1285] 3. TIL을 400 × g에서 5분 동안 20℃에서 충분한 제동 및 충분한 가속으로 스핀 다운시켰다.

[1286] 4. 상청액을 무균적으로 흡인하였다.

[1287] 5. 튜브의 바닥을 부드럽게 두드려 세포를 잔류의 유체에 재현탁시켰다.

[1288] 6. 튜브를 부드럽게 두드리는 동안, 제조된 동결 배지를 서서히 첨가하였다.

[1289] 7. 적절한 크기의 표지된 냉동 튜브 내로 분취하였다.

[1290] 8. 바이알을 프로스티씨 (Mr. Frosty) 또는 등가물에 정치하고, -80℃ 동결기에 정치하였다.

[1291] 9. 72시간 내에 영구 저장 위치로 옮기고, 문서화하고, -80℃ 동결기에 정치된 날짜 및 시간을 기록하였다.

[1292] **실시예 8: 프로세스 2A - 제22일**

[1293] 이 실시예는 실시예 1 내지 4에 기재된 2A 프로세스에 대한 상세한 제22일 프로토콜을 기재한다.

[1294] 음성 인-프로세스 멸균성 결과를 문서화하기

[1295] 수확을 시작하기 전에, 제16일 예비 멸균성 결과를 미생물학 실험실로부터 얻었다. 결과가 양성인 경우, 추가의 지시를 위해 실험실 책임자 또는 피지명자와 접촉하였다.

[1296] 클린 룸 환경적 모니터링 - 사전-프로세싱

[1297] 1. 프로세싱을 시작하기 전에 10분 동안 입자 카운트를 확인하였다.

[1298] 2. 생물안정성 캐비닛을 큰 포화 알콜 와이프 또는 알콜 스프레이로 청소하였다.

[1299] 3. 인-프로세스 감시 플레이트를 설치하고, 절차 동안 1 내지 2시간 동안 생물안정성 캐비닛에 방치하였다.

[1300] 사전 준비

[1301] 1. BSC에서 백스터 연장 세트를 10 L 랩테이너 백 또는 등가물에 무균적으로 부착시켰다. LOVO 여액 백을 표지하였다.

[1302] 2. 플라스마라이트 A의 3개의 1 L 백을 BSC에 정치하였다.

[1303] 3. 풀을 제조하고, 1% HSA를 갖는 플라스마라이트 A 백을 표지하였다:

[1304] 3.1. 4S-4M60 커넥터 세트 상의 모든 클램프를 닫고, 플라스마라이트 백의 각각을 스파이킹하였다.

[1305] 3.2. 4S-4M60의 숫말단 중 하나를 아카시아 펌프 부트의 유입구 라인에 용접하였다.

[1306] 3.3. 펌프 부트의 배출구 라인을 3 리터 수집 백에 용접하였다. 펌핑할 라인을 제외하고 3 L 백 상의 모든 클램프를 닫았다.

[1307] 3.4. 3 리터의 플라스마라이트를 3 리터 백 내로 펌핑하였다. 필요할 경우 펌프를 뒤집음으로써 공기를 3 L 백으로부터 제거하였다.

[1308] 3.5. 암루어를 갖는 라인을 제외한 모든 클램프를 닫았다.

[1309] 3.6. 2개의 100 mL 시린지 및 16 내지 18G 바늘을 사용하여, 120 mL의 25% HSA를 로딩하였다. 시린지를 적색 캡핑하였다.

[1310] 3.7. 1개의 시린지를 3 리터 백 상의 암루어에 부착시키고, HSA를 3 L 플라스마라이트 백으로 옮겼다. 잘 혼합하였다.

[1311] 3.8. 제2 시린지로 반복하였다.

[1312] 3.9. 잘 혼합하였다.

[1313] 3.10. 모든 클램프를 닫았다.

[1314] 3.11. 10 mL 시린지를 사용하여, 1% HSA를 갖는 5 mL의 플라스마라이트를 3 리터 백 상의 무바늘 포트로부터 제거하였다.

[1315] 3.12. 시린지를 캡핑하고, IL-2 희석을 위해 BSC에서 보관하였다.

[1316] 3.13. 모든 클램프를 닫았다.

[1317] 3.14. 열 밀봉하여 암루어 라인을 펌프 부트로부터 제거하였다.

[1318] 3.15. LOVO 세척 완충제 및 날짜를 표지하였다. 주위 온도에서 24시간 내에 만료되었다.

[1319] IL-2 제조

[1320] 1. 5 mL 시린지로부터의 플라스마라이트/1% HSA를 표지된 50 ml 멸균 원뿔형 튜브 내로 분배시켰다.

[1321] 2. 0.05 mL IL-2 스톡을 플라스마라이트를 함유하는 튜브에 첨가하였다.

[1322] 3. IL-2를 6×10^{4}으로 표지하였다.

[1323] 4. 표지를 캡핑하고, 2 내지 8℃에서 저장하였다. 부피를 기록하였다.

[1324] 세포의 제조

[1325] 1. 10 L 랩테이너 백 상의 모든 클램프를 닫았다. 백스터 연장 세트를 루어 연결을 통해 10 L 백에 부착시켰다.

[1326] 2. G-렉스 500M 플라스크를 37℃로부터 제거하였다.

[1327] 3. G-렉스 500MCS로부터의 적색 배지 제거 라인을 10 L 바이오프로세스 백 상의 연장 세트에 멸균 용접하였다.

[1328] 4. G-렉스 500MCS로부터의 투명 세포 제거 라인을 3 L 수집 백에 멸균 용접하고, "풀링된 세포 현탁액"으로 표지하였다.

[1329] 5. 적색 라인 및 10 L 백을 클램핑해제하였다.

[1330] 6. 개더렉스 펌프를 사용하고, 제1 플라스크를 부피 감소시켰다.

[1331] 주: 공기 버블이 검출된 경우, 펌프는 조기에 정지할 수 있다. 충분한 부피 감소가 완료되지 않은 경우, 개더렉스 펌프를 재활성화시켰다.

[1332] 7. 상청액 백 및 적색 라인 상의 클램프를 닫았다.

[1333] 8. G-렉스 500M 플라스크를 TIL이 완전히 재현탁될 때까지 스플래싱 또는 발포를 회피하면서 선회시켰다. 모든 세포가 막으로부터 제거된 것을 확인하였다.

[1334] 9. 투명 라인 및 3 L 세포 백 상의 클램프를 열었다.

[1335] 10. 세포 현탁액이 수집 스트로가 위치한 플라스크의 측에서 풀링되도록 G-렉스 플라스크를 기울였다.

[1336] 11. 개더렉스가 세포 현탁액을 수집하도록 시작시켰다. 주: 세포 수집 스트로가 벽 및 바닥 막의 연접부에 있지 않은 경우, 플라스크를 45° 각으로 기울이면서 랩핑하는 것은 통상적으로 스트로를 적절하게 위치시키는 데 충분하였다.

[1337] 12. 모든 세포가 플라스크로부터 제거된 것을 보장하였다.

[1338] 13. 세포가 플라스크에 잔류한 경우, 100 mL의 상청액을 플라스크에 다시 첨가하고, 선회시키고, 세포 현탁액 백 내로 수집하였다.

[1339] 14. 세포 수집 백에 대한 라인 상의 클램프를 닫았다. 개더렉스 상의 클램프를 풀었다.

[1340] 15. G-렉스 500MCS의 투명 라인을 열 밀봉하였다.

[1341] 16. G-렉스 500MCS의 적색 라인을 열 밀봉하였다.

[1342] 17. 추가의 플라스크에 대해 단계 3 내지 16을 반복하였다.

[1343] 18. 모든 제2 플라스크 후에 필요에 따라 10 L 상청액 백을 대체하는 것이 필요하였다.

[1344] 19. 다수의 개더렉스가 사용될 수 있다.

[1345] 20. 프로세싱된 G-렉스 500MCS의 수를 문서화하였다.

[1346] 21. 세포 수집 백을 열 밀봉하였다. 수확된 G-렉스의 수를 기록하였다.

[1347] 22. 마커로 새로운 3 리터 수집 백 상의 암루어 커넥터 중 하나로부터 약 2"를 표시하였다.

[1348] 23. 열 밀봉하고, 마크 바로 아래의 암루어를 제거하였다.

[1349] 24. LOVO 공급원 백으로서 표지하였다.

[1350] 25. 건조 중량을 기록하였다.

[1351] 26. 170 μm 혈액 필터의 모든 클램프를 닫았다.

[1352] 27. 필터의 말단을 마크 바로 아래의 LOVO 공급원 백에 멸균 용접하였다.

[1353] 28. 필터의 공급원 라인을 세포 현탁액을 함유하는 백에 멸균 용접하였다.

[1354] 29. 세포를 IV 막대기 상에 매달아서 세포의 중력-유동 이동을 개시시킴으로써 세포 현탁액을 상승시켰다. (주: 공급원 백을 여과 장치로부터 매달리지 않도록 하였다.)

[1355] 30. 모든 필요한 클램프를 열고, TIL이 필터를 통해 및 LOVO 공급원 백 내로 세포 현탁액 백으로부터 배수시켰다.

[1356] 31. 일단 모든 세포가 LOVO 공급원 백으로 옮겨지면, 모든 클램프를 닫고, 마크 바로 위에서 열 밀봉하고, 탈착시켜 필터를 제거하였다.

[1357] 32. 백을 잘 혼합하고, 2개의 3 mL 시린지를 사용하여 2개의 독립적인 2 mL 샘플을 세포 카운팅 및 생존력을 위해 시린지 샘플 포트로부터 취하였다.

[1358] 33. 백을 칭량하고, 초기 및 최종 중량 사이의 차이를 측정하였다.

[1359] 34. 데이터를 기록하고, 건조 질량을 포함하여 인큐베이터에 정치하였다.

[1360] 세포 카운트.

[1361] 단일 세포 카운트를 각각의 샘플에 대해 수행하고, 데이터를 기록하고, 카운팅 원 데이터를 배치 기록에 부착시켰다. 셀로미터 카운팅 프로그램을 문서화하였다. 정확한 희석이 셀로미터 내로 들어갔는 지를 확인하였다. 유핵 세포의 총 수를 측정하였다. 보유하기 위해 제거할 TNC의 수를 측정하였다 = LOVO 프로세싱을 위해 1.5 × 10^{11}개의 세포. 제거된 세포를 처리를 위해 적절한 크기의 용기 내로 정치하였다.

[1362] LOVO 수확

[1363] 사전 준비에서의 백스터 연장 세트를 갖는 10 L 랩테이너는 나중에 LOVO 키트에 용접된 대체 여액 백이었다. LOVO를 켜고, 스크린 디스플레이를 따랐다.

[1364] 칭량 저울 및 압력 센서를 점검하기

[1365] *기기 작동 프로파일* (*Instrument Operation Profile*)을 평가하기 위해:

[1366] 1. 정보 버튼을 터치하였다.

[1367] 2. 기기 설정 탭을 터치하였다.

[1368] 3. 기기 작동 프로파일 버튼을 터치하였다.

[1369] 4. 기기 작동 프로파일이 표시되었다.

[1370] 칭량 저울을 점검하기

[1371] 1. 칭량 저울 중 임의의 것에 매달린 것이 없는 것을 확인하고, 각각의 저울에 대한 판독을 검토하였다.

[1372] 2. 저울 중 임의의 것이 0 +/- 2 g의 범위 밖을 판독하는 경우, 제조자로부터의 칭량 저울 보정 매뉴얼 (Weigh Scale Calibration Manual)에 기재된 바와 같이 칭량 저울 보정을 수행하였다.

[1373] 3. 모든 저울이 매달린 추를 갖지 않고 견딜 수 있는 경우, 1-kg 추를 각각의 저울 (#1 내지 4)에 매달기를 진행하고, 판독을 검토하였다.

[1374] 4. 저울 중 임의의 것이 1-kg 추가 매달려 있을 때 1000 +/- 10 g의 범위 밖을 판독하는 경우, 제조자로부터의 LOVO 조작자 매뉴얼 (LOVO Operator's Manual)에 기재된 바와 같이 칭량 저울 보정을 수행하였다.

[1375] 압력 센서를 점검하기

[1376] 1. 압력 센서 판독을 기기 작동 프로파일 스크린 상에서 점검하였다.

[1377] 2. N/A: 압력 센서 판독이 0 +/- 10 mmHg 밖인 경우, 제조자로부터의 LOVO 조작자 매뉴얼에 기재된 바와 같이 새로운 대기압 설정을 서비스 모드 (Service Mode)에서 저장하였다.

[1378] a. *기기 작동 프로파일 스크린* 상의 체크 버튼을 터치하였다.

[1379] b. *기기 설정 (Instrument Setting) 탭* 상의 체크 버튼을 터치하였다.

[1380] 3. 칭량 저울 보정이 수행되었거나, 새로운 대기압 설정이 저장된 경우, 관련 섹션을 반복하였다.

[1381] 절차를 시작하기 위해, "TIL G-렉스 수확 (TIL G-Rex Harvest)" 프로토콜을 프로토콜 선택 스크린 상의 드롭-다운 메뉴로부터 선택하고, 시작 (Start)을 눌렀다.

[1382] 1. 절차 설정 스크린 (Procedure Setup Screen)이 표시되었다.

[1383] 2. 용액 정보 (Solutions Information) 버튼을 터치하였다.

[1384] 3. 용액 1 스크린 (Solution 1 Screen)이 표시되었다. 용액 1 (Solution 1)에 대해 요구되는 세척 완충제의 유형을 점검하였다. (플라스마라이트를 판독해야 함.)

[1385] 4. 다음 (Next) 버튼을 터치하여 용액 2 스크린 (Solution 2 Screen)으로 진행하였다. 용액 2 (Solution 2)에 요구되는 세척 완충제의 유형을 점검하였다. (프로토콜이 단지 플라스마라이트인 1가지 유형의 세척 완충제만을 사용하도록 구성되었음을 지시하는 "없음 (NONE)"을 판독해야 함.)

[1386] 5. 용액 2 정보 스크린 (Solution 2 Information Screen) 상의 체크 버튼을 터치하여 절차 설정 스크린으로 복귀하였다.

[1387] 6. 절차 정보 (Procedure Information) 버튼을 터치하였다.

[1388] 7. 절차 정보 스크린 (Procedure Information Screen)이 표시되었다.

[1389] 8. 사용자 (User) ID 입력 필드를 터치하였다. 키패드가 표시될 것이다. 수행자 및 확인자의 이니셜을 입력하였다. 버튼을 터치하여 입력을 허용하였다.

[1390] 9. 공급원 (Source) ID 입력 필드를 터치하였다. 키패드가 표시될 것이다. 생성물 로트 #를 입력하였다. 버튼을 터치하여 입력을 허용하였다.

[1391] 10. 절차 (Procedure) ID 입력 필드를 터치하였다. 키패드가 표시될 것이다. "TIL 수확 (TIL Harvest)"을 입력하였다. 버튼을 터치하여 입력을 허용하였다.

[1392] 11. 기록할 여분의 주 (note)가 있는 경우, 절차 주 (Procedure Note) 입력 필드를 터치하였다. 키패드가 표시되었다. 임의의 주를 입력하였다. 버튼을 터치하여 입력을 허용하였다.

[1393] **주: 절차 주 입력 필드는 임의적이며, 블랭크로 남겨질 수 있다.**

[1394] 12. 절차 정보 스크린 상의 체크 버튼을 터치하여 절차 설정 스크린으로 복귀하였다.

[1395] 13. "체크"가 절차 정보 버튼에 표시되는 것을 확인하였다. "체크"가 표시되지 않는 경우, 절차 정보 버튼을 다시 터치하고, 사용자 ID, 공급원 ID, 및 절차 ID 필드가 모두 입력을 갖는 것을 보장하였다.

[1396] 14. 파라미터 구성 (Parameter Configuration) 버튼을 터치하였다.

[1397] 15. 일반적 절차 정보 스크린 (General Procedure Information Screen)이 표시되었다.

[1398] 16. 공급원 부피 (Source Volume) (mL) 입력 필드를 터치하였다. 수치 키패드가 표시되었다. 표 1로부터 세포 현탁액의 계산된 부피 (mL)를 입력하였다.

[1399] 17. 버튼을 터치하여 입력을 허용하였다.

[1400] 18. 공급원 PCV (%) 입력 필드를 터치하였다. TIL (생존+죽은) 스크린이 표시된다.

[1401] 19. 세포 농도 (Cell Concentration) 입력 필드를 터치하였다. 수치 키패드가 표시되었다. 공급원 생성물에서 표 14로부터 총 세포 농도/mL를 "$\times 10^6$/mL"의 단위로 입력하였다. 입력은 00.0 내지 99.9의 범위일 수 있다. 버튼을 터치하여 입력을 허용하고, 일반적 절차 정보 스크린으로 복귀하였다. 주: 세포 농도가 허용된 후, 일반적 절차 정보 스크린 상의 공급원 PCV (%) 입력 필드는 조작자에 의해 만들어진 세포 농도 입력에 기초하여

LOVO에 의해 계산된 PCV %를 표시하였다.

[1402] 20. 일반적 절차 스크린 상에, 다음 버튼을 터치하여 8의 스크린 4, 최종 생성물 부피 (Final Product Volume) (농축물 부피 (Retentate Volume)) 스크린으로 진행하였다. 주: 스크린 2 및 3은 조작자가 그 안에 채워야 할 임의의 입력 필드를 갖지 않았다.

[1403] 21. 최종 생성물 부피 (농축물 부피) 스크린이 표시되었다.

[1404] 22. 표 15로부터의 총 유핵 세포 (TNC) 값을 사용하여, 하기 표 (표 16)에서의 최종 생성물 표적 부피를 측정하였다. LOVO 절차 설정 동안 그 세포 범위 (Cell Range)와 연관된 최종 생성물 부피 (mL)를 입력하였다.

[1405] <표 15>

[1406] 최종 생성물 표적 부피의 측정.

세포 범위	표적화할 최종 생성물 (농축물) 부피 (mL)
0 < 총 (생존 + 죽은) 세포 ≤ 7.1E10	150
7.1E10 < 총 (생존 + 죽은) 세포 ≤ 1.1E11	200
1.1E11 < 총 (생존 + 죽은) 세포 ≤ 1.5E11	250

[1407]

[1408] <표 16>

[1409] 생성물 표적 부피.

총 유핵 세포 (TNC) $x10^6$	최종 생성물 (농축물) 표적 부피 (mL)

[1410]

[1411] 23. 표 16으로부터 명시된 부피를 표적화하기 위해, 최종 생성물 부피 (mL) 입력 필드를 터치하였다. 수치 키패드가 표시되었다. 바람직한 최종 생성물 부피를 mL의 단위로 입력하였다. 버튼을 터치하여 입력을 허용하였다.

[1412] 24. 최종 생성물 부피 (농축물 부피) 스크린 상에 터치하여 절차 설정 스크린으로 복귀하였다. 주: 스크린 5 내지 8은 조작자가 그 안에 채워야 할 임의의 입력 필드를 갖지 않았다.

[1413] 25. "체크"가 파라미터 구성 버튼에서 표시되는 지를 확인하였다. "체크"가 표시되지 않는 경우, 절차 정보 버튼을 다시 터치하고, 페이지 1 상에 공급원 부피 및 공급원 PCV가 입력을 갖는 것을 보장하였다. 또한, 표적 최소 최종 생성물 부피 (Target Minimum Final Product Volume) 체크박스가 체크되었는지 또는 최종 생성물 부피 (mL) 필드가 페이지 4 상에 입력을 가졌는지를 보장하였다.

[1414] 26. 스크린의 상부 우측 코너에 추정 (Estimate) 버튼을 터치하였다.

[1415] 27. 추정 요약 스크린 (Estimation Summary Screen)이 표시되었다. 공급원 및 플라스마라이트 세척 완충제에 대한 충분하고 정확한 값을 확인하였다.

[1416] 28. 일회용 키트를 로딩하였다: 헬프 버튼 "(?)"을 선택함으로써 키트 로딩을 위한 스크린 지시를 따랐다.

[1417] 29. 여액 및 용액 1 (Filtrate and Solution 1)에 대해 표시된 부피의 주를 적었다 (플라스마라이트를 판독함).

[1418] 30. 여액 및 용액 1에 대해 표시된 부피의 주를 적었다 (플라스마라이트를 판독함).

[1419] 31. 일회용 키트를 로딩하는 것에 대한 지시를 위해, 헬프 버튼을 터치하거나, 상세한 지시를 위해 조작자 매뉴얼에서의 지시를 따랐다.

[1420] 32. 표준 LOVO 일회용 키트가 로딩된 경우, 다음 버튼을 터치하였다. 용기 정보 및 위치 스크린 (Container Information and Location Screen)이 표시되었다. 여액 백을 저울 #3으로부터 제거하였다.

[1421] 33. 이 프로토콜을 위해, 여액 용기는 새로운 및 오프 스케일 (New and Off Scale)이었다.

[1422] 34. 여액 용기가 이미 새로운 및 오프-스케일로서 나타난 경우, 변화가 이루어지지 않았다.

[1423] 35. 여액 용기 유형이 원래 (Original)로서 나타난 경우, 원래 버튼을 터치하여 새로운 (New)으로 토글하였다.

[1424] 36. 여액 위치가 온-스케일 (On-Scale)로서 나타난 경우, 온-스케일 버튼을 터치하여 오프-스케일 (Off-Scale)로 토글하였다.

[1425] 37. 생성되는 여액의 부피가 ≤ 2500 mL인 경우, 여액 용기 위치 (Filtrate Container Location)는 온-스케일로서 나타났다. 실행 중에서의 일관성을 위해, 여액 용기 위치는 오프-스케일로 변화되었고, 용기 유형은 "새로운"이었다.

[1426] 38. 온-스케일 버튼을 터치하여 오프-스케일로 토글하였다. 이동 세트를 부착시켰다. 멸균 용접 기법을 사용하여 LOVO 일회용 키트 여액 용기를 10-L 백으로 대체하였다. 용접을 열었다.

[1427] 39. 여액 용기를 벤치톱 상에 정치하였다. 여액 백을 칭량 저울 #3 상에 매달지 않았다. 칭량 저울 #3은 절차 동안 비어 있었다.

[1428] 40. 여액 용기로 이어지는 배관 상의 임의의 플라스틱 클램프를 열었다. 주: 배관이 용접 동안 F 클램프로부터 제거된 경우, 클램프에 재정치하였다.

[1429] 41. 여액 용기 용량 (Filtrate Container Capacity) 입력 필드를 터치하였다. 수치 키패드가 표시되었다. 총 새로운 여액 용량 (10,000 mL)을 입력하였다. "체크" 버튼을 터치하여 입력을 허용하였다.

[1430] 42. 멸균 용접 기법을 사용하여 LOVO 일회용 키트 여액 용기를 10-L 백으로 대체하였다. 용접을 열었다. 주: 배관이 용접 동안 F 클램프로부터 제거된 경우, 클램프에 재정치하였다.

[1431] 43. 새로운 여액 용기를 벤치톱 상에 정치하였다. 여액 백을 칭량 저울 #3 상에 매달지 않았다. 칭량 저울 #3은 절차 동안 비어 있었다.

[1432] 44. 여액 용기로 이어지는 배관 상의 임의의 플라스틱 클램프를 열었다.

[1433] 45. 농축물 용기에 대해, 스크린은 원래 및 온-스크린을 표시하였다.

[1434] 46. 농축물 용기에 대해 변화가 이루어지지 않았다.

[1435] 47. 모든 변화가 여액 용기에 대해 이루어지고, 적절한 정보가 입력된 경우, 다음 버튼을 터치하였다.

[1436] 48. 일회용 키트 건조 체크 (Disposable Kit Dry Checks) 오버레이가 표시된다. 키트가 적절하게 로딩된 것을 점검한 후, 예 (Yes) 버튼을 눌렀다.

[1437] 49. 모든 LOVO 기계적 클램프가 자동적으로 닫히고, 일회용 키트 설치 체크 (Checking Disposable Kit Installation) 스크린이 표시되었다. LOVO를 일련의 가압 단계를 거치게 하여 키트를 점검하였다.

[1438] 50. 일회용 키트 체크가 성공적으로 통과한 후, 연결 용액 (Connect Solutions) 스크린이 표시되었다.

[1439] 51. 3 L는 세척 부피였다. 이 값을 스크린 상에 입력하였다.

[1440] 52. 멸균 용접 기법을 사용하여 플라스마라이트의 3-L 백을 클램프 1을 통해 통과하는 배관에 부착시켰다. 용접을 열었다.

[1441] 53. 플라스마라이트 백을 IV 막대기 상에 매달았다,

[1442] 54. 플라스마라이트 백으로 이어지는 배관 상의 임의의 플라스틱 클램프를 열었다.

[1443] 55. 용액 부피 (Solution Volume) 입력이 3000 mL인지 확인하였다. 이는 이전에 입력되었다.

[1444] 56. 다음 버튼을 터치하였다. 일회용 키트 프라임 (Disposable Kit Prime) 오버레이가 표시되었다. 플라스마라이트가 부착되고, 플라스미드로 이어지는 임의의 용접 및 플라스틱 클램프가 열린 것을 확인한 후, 예 버튼을 터치하였다. 주: 단지 1가지 유형의 세척 완충제 (플라스마라이트)가 LOVO 절차 동안 사용되었기 때문에, 용액은 클램프 2를 통해 통과하는 배관에 부착되지 않았다. 이 배관 상의 로버트 (Roberts) 크램프는 절차 동안 닫

힌 채로 잔류하였다.

[1445] 57. 일회용 키트 프라임이 시작되고, 일회용 키트 프라이밍 스크린 (Priming Disposable Kit Screen)이 표시되었다. 플라스마라이트가 플라스마라이트에 연결된 배관을 통해 이동하는 것을 육안으로 관찰하였다. 유체가 이동하지 않은 경우, 스크린 상의 일시정지 (Pause) 버튼을 누르고, 클램프 또는 용접이 여전히 닫힌지를 측정하였다. 일단 문제가 해결되면, 스크린 상의 재개 (Resume) 버튼을 눌러 일회용 키트 프라임을 재개하였다.

[1446] 58. 일회용 키트 프라임이 성공적으로 종료된 경우, 연결 공급원 스크린 (Connect Source Screen)이 표시되었다.

[1447] 59. 이 프로토콜에 대해, 공급원 용기는 새로운 및 오프-스케일이었다.

[1448] 60. 공급원 용기가 이미 새로운 및 오프-스케일로서 나타난 경우, 변화는 이루어지지 않았다.

[1449] 61. 공급원 위치가 온-스케일로서 나타난 경우, 온-스케일 버튼을 터치하여 오프-스케일로 토글하였다.

[1450] 62. 공급원 용량 (Source Capacity) (mL) 입력 필드를 터치하였다. 수치 키패드가 표시되었다. 공급원 생성물을 보유한 용기의 용량을 입력하였다. 체크 버튼을 터치하여 입력을 허용하였다. 주: 공급원 용량 입력은 공급원 백이 공급원 프라임 단계 동안 백에 첨가된 추가의 용액을 보유할 수 있는 지를 확인하기 위해 사용되었다.

[1451] 63. 멸균 용접 기법을 사용하여 공급원 용기를 클램프 S를 통해 통과하는 배관에 부착시켰다. 용접을 열었다. 배관을 필요에 따라 클램프로부터 제거하였다.

[1452] 64. 공급원 배관을 S 클램프 내로 재정치하는 지를 확인하였다.

[1453] 65. 다음 버튼을 터치하였다. 공급원 프라임 오버레이가 표시되었다. 공급원이 일회용 키트에 부착되고, 공급원으로 이어지는 배관 상의 임의의 용접 및 플라스틱 클램프가 열렸는 지를 확인한 후, 예 버튼을 터치하였다.

[1454] 66. 공급원 프라임이 시작되고, 공급원 프라이밍 스크린 (Priming Source Screen)이 표시되었다. 플라스마라이트가 공급원 백에 부착된 배관을 통해 이동하고 있음을 육안으로 확인하였다. 유체가 이동하고 있지 않은 경우, 스크린 상의 일시정지 버튼을 누르고, 클램프 또는 용접이 여전히 닫혔는 지를 측정하였다. 일단 문제가 해결되면, 스크린 상의 재개 버튼을 눌러 공급원 프라임을 재개하였다.

[1455] 67. 공급원 프라임이 성공적으로 종료된 경우, 절차 시작 스크린 (Start Procedure Screen)이 표시되었다.

[1456] 68. 시작 버튼을 눌렀다. "IP를 코팅하고, 공급원을 혼합하라"는 지시와 함께, 사전-세척 사이클 1 (Pre-Wash Cycle 1)" 일시정지 스크린이 나타났다.

[1457] 69. IP 백을 사전-코팅하였다.

[1458] 70. 시작 버튼을 누르기 전에, IP 백을 칭량 저울 #2로부터 제거하고 (또한 배관을 IP 상부 포트 배관 가이드로부터 제거할 수 있음), 이를 손으로 뒤집어 일회용 키트 프라임 단계 동안 첨가된 세척 완충제가 백의 모든 내부 표면에 코팅되게 하였다.

[1459] 71. IP 백을 칭량 저울 #2에 다시 매달았다 (좌측에 대면한 백 상의 표지). 상부 포트 배관을 그것이 제거된 경우 배관 가이드에 재정치하였다.

[1460] 72. 공급원 백을 혼합하였다.

[1461] 73. 시작 버튼을 누르기 전에, 공급원 백을 칭량 저울 #1로부터 제거하고, 그것을 수 회 뒤집어 균질한 세포 현탁액을 생성하였다.

[1462] 74. 공급원 백을 칭량 저울 #1 또는 IV 막대기 상에 다시 매달았다. 백이 흔들리지 않고 있는지 확인하였다.

[1463] 75. 시작 버튼을 눌렀다.

[1464] 76. LOVO는 유체를 공급원 백으로부터 프로세싱하는 것을 시작하고, 세척 사이클 1 스크린 (Wash Cycle 1 Screen)이 표시되었다.

[1465] LOVO 절차 동안, 시스템은 자동적으로 일시정지되어 조작자가 상이한 백과 상호작용하는 것을 허용하였다. 상이한 스크린은 상이한 일시정지 동안 표시되었다. 각각의 스크린에 대한 상응하는 지시를 따랐다.

[1466] 공급원 세정 일시정지

[1467] 공급원 백을 배수한 후, LOVO는 세척 완충제를 공급원 백에 첨가하여 백을 세정하였다. 세척 완충제의 구성된 부피가 공급원 백에 첨가된 후, LOVO는 자동적으로 일시정지되고, 공급원 세정 일시정지된 스크린 (Source Rinse Paused Screen)을 표시하였다.

[1468] 공급원 세정 일시정지된 스크린이 표시된 경우, 조작자는:

[1469] 1. 공급원 백을 칭량 저울 #1로부터 제거하였다.

[1470] 1. 공급원 백을 수 회 뒤집어 세척 완충제가 전체 백 내부를 터치하게 하였다.

[1471] 2. 공급원 백을 칭량 저울 #1에 다시 매달았다. 공급원 백이 칭량 저울 #1 상에서 흔들리지 않고 있는지 확인하였다.

[1472] 3. 재개 버튼을 눌렀다.

[1473] LOVO는 세정 유체를 공급원 백으로부터 프로세싱한 후, 자동화 절차로 계속되었다.

[1474] IP 백 혼합하기 일시정지

[1475] 스피너를 통한 또다른 통로를 위한 세포를 제조하기 위해, IP 백을 세척 완충제로 희석하였다. 세척 완충제를 IP 백에 첨가한 후, LOVO는 자동적으로 일시정지되고, "IP 백 혼합" 일시정지 스크린 ("Mix IP bag" Pause Screen)을 표시하였다.

[1476] "IP 백 혼합" 일시정지 스크린이 표시된 경우, 조작자는:

[1477] 1. IP 백을 칭량 저울 #2로부터 제거하였다. 또한 배관을 IP 상부 포트 배관 가이드로부터 제거할 수 있다.

[1478] 2. IP 백을 수 회 뒤집어 세포 현탁액을 철저하게 혼합하였다.

[1479] 3. IP 백을 칭량 저울 #2 상에 다시 매달았다. 또한, IP 상부 포트 배관을 그것이 제거된 경우 배관 가이드에 재정치하였다. IP 백이 칭량 저울 #2 상에서 흔들리지 않고 있는지 확인하였다.

[1480] 4. 재개 버튼을 눌렀다. LOVO는 유체를 IP 백으로부터 프로세싱하는 것을 시작하였다.

[1481] IP 코너 문지르기 일시정지

[1482] LOVO 절차의 최종 세척 사이클 동안, 세포를 IP 백으로부터, 스피너를 통해, 및 농축물 (최종 생성물) 백으로 펌핑하였다. IP 백이 비어 있는 경우, 10 mL의 세척 완충제를 IP 백의 바닥 포트에 첨가하여 백을 세정하였다. 세정 유체를 첨가한 후, LOVO는 자동적으로 일시정지되고, "IP 코너 문지르기" 일시정지 스크린 ("Massage IP Corners" Pause Screen)이 표시되었다.

[1483] "IP 코너 문지르기" 일시정지 스크린이 표시된 경우, 조작자는:

[1484] 1. IP 백을 칭량 저울 #2로부터 제거하지 않았다.

[1485] 2. 칭량 저울 #2에 여전히 매달려 있는 IP 백으로, 백의 코너를 문질러 임의의 잔류의 세포를 현탁액 내로 가져왔다.

[1486] 3. IP 백이 칭량 저울 #2 상에서 흔들리지 않고 있는지 확인하였다.

[1487] 4. 재개 버튼을 눌렀다.

[1488] 5. LOVO는 세정 유체를 IP 백으로부터 펌핑하는 것을 시작하였다.

[1489] LOVO 절차의 종료 시에, 생성물 제거하기 스크린 (Remove Products Screen)이 표시되었다. 이 스크린이 표시된 경우, LOVO 키트 상의 모든 백은 조작될 수 있다.

[1490] **주: 생성물 제거하기 스크린이 표시될 때까지 어느 백도 터치하지 않았다.**

[1491] 지혈제를 농축물 백 상의 포트에 매우 가까운 배관 상에 정치하여 세포 현탁액이 배관 내로 고정되지 못하게 하고, 지혈제 밑에서 삼중 열 밀봉하였다.

[1492] 중간 밀봉부를 파괴함으로써 농축물 백을 제거하고, BSC로 옮겼다.

[1493] 생성물 제거하기 스크린 상의 지시를 따랐다.

[1494] 다음 버튼을 터치하였다. 모든 LOVO 기계적 클램프가 열렸고, 키트 제거하기 스크린 (Remove Kit Screen)이 표시되었다.

[1495] 키트 제거하기 스크린 상의 지시를 따랐다. 완료된 경우, 진행하였다.

[1496] 다음 버튼을 터치하였다. 모든 LOVO 기계적 클램프가 닫히고, 결과 요약 스크린 (Results Summary Screen)이 표시되었다. 결과 요약 스크린으로부터의 데이터를 표 17에 기록하였다. 모든 펌프를 닫고, 지지체를 여과하였다.

[1497] <표 17>

[1498] LOVO 결과 요약 표.

[1499]

경과된 프로세싱 시간 (괄호 #)	경과된 공급원 프로세싱 시간 (괄호 #)	일시정지 시간	공급원 부피 (mL)	농축물 부피 (mL)	여액 부피 (mL)	용액 1 부피 (mL)
A.	B.	C.	D.	E.	F.	G.

[1500] 다음 버튼을 터치하였다. 프로토콜 선택 스크린 (Protocol Selection Screen)이 표시되었다.

[1501] LOVO 셧다운 절차

[1502] 1. 모든 클램프가 닫히고, 필터 지지체가 정립 위치에 있는 것을 보장하였다.

[1503] 2. LOVO의 정면 상의 정지 (STOP) 버튼을 터치하였다.

[1504] 3. 정지 버튼 결정 오버레이 (STOP Button Decision Overlay)가 표시되었다.

[1505] 4. 셧다운 확인 오버레이 (Shutdown Confirmation Overlay)가 표시되었다.

[1506] 5. 예 버튼을 터치하였다. 셧 다운 스크린 (Shutting Down Screen)이 표시되었다.

[1507] 6. 수 초 후, 전원 끄기 스크린 (Power Off Screen)이 표시되었다. 이 스크린이 표시된 경우, 기기의 좌측 등 상의 스위치를 사용하여 LOVO를 껐다.

[1508] 최종 제형화된 생성물 부피를 표에 기록하였다.

[1509] 요구되는 IL-2의 양을 최종 생성물 표로부터 계산하였다.

A. 최종 생성물에 필요한 IL-2의 계산된 양. (300 IU/ml의 IL-2 최종 생성물):

최종 생성물 부피 (ml) [최종 제형화된 생성물 부피 표로부터의 제형화된 세포 생성물의 부피]x 300IU/ml = 요구되는 IL-2의 IU

_____ml X ____300 IU_____ = 요구되는 IL-2의 _____IU

B. 요구되는 IL-2의 IU ÷ IL-2 제조 단계에서 제조된 작업 스톡 희석 ($6x10^4$ IU/mL의 농도) = 최종 생성물에 첨가되는 IL-2의 부피 (ml).

상기로부터 요구되는 IL-2의 _____ IU] ÷ 60,000 IU/ml = _____ ml IL-2 작업 스톡

[1510]

[1511] 냉동백의 수 및 보유 부피 (Retain Volume)를 측정하였다.

[1512] 표적 부피 및 하기 보유 표 상에 냉동보존 백의 수 및 생성물에 대한 보유 샘플의 부피를 표시하였다.

[1513] 표적화된 부피/백 계산: (최종 제형화된 부피 - 100% 회수를 얻지 않음으로 인한 부피 조정=10 mL)/# 백.

[1514] 1:1 (부피:부피) CS10 (크리오스토르 10, 바이오라이프 솔루션즈) 및 IL-2를 갖는 세포를 제조하였다.

[1515] 1. 어셈블리 연결 (Assemble Connect) 장치

[1516] 1.1. CS750 냉동백을 각각의 백에 대한 원위 숫루어 말단 중 하나를 대체하는 CC2 세포 연결 (Cell Connect) 장치에 멸균 용접하였다.

[1517] 1.2. 클램프를 닫힌 위치에서 보유하였다.

[1518] 1.3. 백 1 내지 4를 표지하였다.

[1519] 2. IL-2를 갖는 세포를 제조하고, 장치를 연결하였다.

[1520] 2.1. BSC에서 세포 생성물 백을 암루어 커넥터를 갖는 4" 혈장 이동 세트로 스파이킹하였다. 클램프가 이동 세트 상에서 닫혔는 지를 확인하였다.

[1521] 2.2. 적절한 크기의 시린지로 최종 생성물 표로부터 측정된 IL-2 작업 희석액의 부피를 뽑아내었다.

[1522] 2.3. LOVO 생성물 내로 분배시켰다.

[1523] 2.4. LOVO 생성물 백을 CC2 단일 스파이크 라인에 멸균 용접하여 스파이크를 제거하였다.

[1524] 2.5. 세포 및 장치를 수송 백에 정치하고, 2 내지 8 ℃에서 15분 이하 동안 정치하였다.

[1525] 3. CS10의 첨가

[1526] 3.1. BSC에서 3 웨이 스톱콕을 차가운 CS10의 백 상의 숫루어에 부착시켰다.

[1527] 3.2. 적절한 크기의 시린지를 스톱콕의 암루어에 부착시켰다.

[1528] 3.3. 백을 클램핑해제하고, "최종 제형화된 생성물 부피" 표에서 측정된 CS10의 양을 뽑아내었다.

[1529] 3.4. 시린지를 제거하고, 적색 캡핑하였다.

[1530] 3.5. 다수의 시린지가 요구된 경우 반복하였다.

[1531] 3.6. 세포/CC2 장치를 2 내지 8 ℃ 냉장고로부터 제거하고, BSC에 정치하였다.

[1532] 3.7. CS10을 함유하는 제1 시린지를 스톱콕의 중간 루어에 부착시켰다. CS750 백에 대한 라인이 "오프" 위치에 있도록 스톱콕을 돌렸다.

[1533] 3.8. 서서히 및 부드럽게 혼합하면서, CS10 (1:1, 부피:부피)을 세포에 첨가하였다.

[1534] 3.9. CS10의 추가의 시린지에 대해 반복하였다.

[1535] 제형화된 세포 생성물의 냉동백 내로의 첨가

[1536] 1. 시린지를 각각의 냉동 백에 정치되는 세포의 부피에 대해 적절한 크기의 시린지로 대체하였다.

[1537] 2. 세포 생성물을 혼합하였다.

[1538] 3. 세포 생성물 백으로 이어지는 클램프를 열고, 적절한 부피를 뽑아내었다.

[1539] 4. 세포 생성물 백이 "오프" 위치에 있도록 스톱콕을 돌리고, 시린지의 내용물을 냉동백 #1 내로 분배시켰다. 라인을 시린지로부터의 공기로 청소하였다.

[1540] 최종 생성물 부피를 기록하기

[1541] 1. 무바늘 포트 및 적절한 크기의 시린지를 사용하여, 이전에 측정된 보유물의 양을 뽑아내었다.

[1542] 2. 보유된 것을 "보유물 (Retain)"로 표지된 50 mL 원뿔형 튜브에 정치하였다.

[1543] 3. 시린지를 사용하여 하니스에 부착시키고, 모든 공기를 백으로부터 제거하여 약 1" 패스트 백에 대한 세포를 배관 내로 뽑아내었다. 클램핑하고, 열 밀봉하였다. 2 내지 8 ℃에서 정치하였다.

[1544] 4. 냉동 백이 "오프" 위치에 있도록 스톱콕을 돌렸다.

[1545] 5. 세포를 세포 생성물 백에서 혼합하고, 잔류의 CS750 백에 대해 단계 3 내지 8을 스톱콕 상의 새로운 시린지

및 새로운 시린지를 사용하여 반복하여 세포 보유물을 얻었다.

[1546] 6. 보유물은 일단 생성물이 CRF에 있으면 프로세싱을 위해 챙겨두어야 한다.

[1547] 제어-속도 동결기 (CRF) 절차 (또한 실시예 9 참조)

[1548] 1. CRF (크리오메드 제어 속도 동결기 (CryoMed Controlled Rate Freezer), 모델 7454) 및 연관된 랩톱 컴퓨터를 켰다.

[1549] 2. 계정 및 암호를 사용하여 컴퓨터에 로그온하였다.

[1550] 3. 데스크톱 상에 위치한 제어 속도 동결기를 열었다.

[1551] 4. 메인 스크린 상의 실행 (Run) 버튼을 클릭하였다.

[1552] 5. 프로파일 열기 (Open Profile)를 클릭하고, 열기 (Open)를 클릭하였다.

[1553] 6. 실행 파일 명칭 (Run File Name), 이어서 날짜를 이 형식으로 입력하였다: runMMDDYYYY.

[1554] 7. MMDDYYY로서 대쉬 없이 날짜로서 데이터 태그 (Data Tag)를 입력하였다.

[1555] 8. CRF에 대한 문을 닫았다.

[1556] 9. 실행 시작 (Start Run)을 클릭하였다.

[1557] 10. 풀 다운 메뉴 상의 COM 6을 선택하였다.

[1558] 11. Ok를 클릭하였다. 약 30초 기다렸다.

[1559] 12. "프로파일 다운로드 (Profile Download)"가 팝업된 경우, OK를 클릭하였다. 저장 (Save)을 클릭하였다. (제어-속도 동결 프로파일 상세사항에 대해서는 실시예 9 참조).

[1560] 13. 샘플이 CRF에 있을 때까지 기다려서 녹색 버튼을 눌렀다. 동결기를 이들을 첨가할 준비가 될 때까지 4 ℃에서 유지하였다.

[1561] 14. 샘플을 CRF에 첨가하였다.

[1562] 15. CRF가 4 ℃로 복귀할 때까지 기다렸다. 일단 온도가 도달되면, 녹색 계속 버튼을 클릭하였다. 이는 프로그램이 프로그램에서 다음 단계로 가도록 개시하였다.

[1563] 16. 하기에 대해 냉동백의 육안 검사를 수행하였다 (주: 오버 또는 언더필에 대해서는 검사하지 않았음): 용기 통합성, 포트 통합성, 밀봉 통합성, 세포 무리의 존재, 및 입자의 존재.

[1564] 17. 승인된 행 태그 라벨을 각각의 백 상에 정치하였다.

[1565] 18. 로트 번호, 생성물 명칭, 제조자 날짜, 생성물 부피, 다른 첨가제, 저장 온도, 및 유통기한을 비롯한 최종 생성물 표지를 확인하였다.

[1566] 19. 각각의 냉동백 (행태그를 가짐)을 오버-백 내로 정치하였다.

[1567] 20. 열 밀봉하였다.

[1568] 21. 차가운 카세트에 정치하였다.

[1569] 22. 각각의 백에 대해 반복하였다.

[1570] 23. 표지된 냉동백을 사전컨디셔닝된 카세트 내로 정치하고, CRF로 옮겼다.

[1571] 24. 카세트를 CRF에서의 랙에 고르게 분포시켰다.

[1572] 25. 리본 열전대를 중심 카세트에 적용하거나, 더미 (dummy) 백을 중심 위치에 정치하였다.

[1573] 26. CRF에 대한 문을 닫았다.

[1574] 27. 일단 챔버 온도가 4 ℃ +/- 1.5 ℃에 도달하면, PC 인터페이스 (Interface) 소프트웨어 상의 실행을 눌렀다.

[1575] 28. 생성물이 CRF로 옮겨진 시간 및 챔버 온도를 기록하였다.

[1576] 품질 제어 샘플의 프로세싱

[1577] 1. 필요에 따라 하기 물질을 BSC로 무균적으로 옮기고, 하기 표에 따라 표지하였다:

[1578] 2. 새로운 피펫을 사용하여 하기를 피펫팅하였다:

[1579] QC 및 보유 표

[1580] 3. QC로 전달하였다: 1 -세포 카운트 튜브, 1-내독소 튜브, 1-미코플라스마 튜브, 1-그램 염색 튜브, 1 튜브 재자극 튜브, 및 1- 즉각적 시험을 위한 QC에 대한 유동 튜브. 잔류의 이중 튜브를 제어 속도 동결기에 정치하였다.

[1581] 4. QC 감독자와 접촉하여 요구되는 시험을 통지하였다.

[1582] 5. 시험 및 저장 지시에 대해 표 18을 참조한다.

[1583] <표 18>

[1584] 시험 및 저장 지시.

시험	용기
세포 카운트 및 생존율	냉동바이알.
미코플라스마	냉동바이알을 시험이 완료될 때까지 4 °C에서 저장함.
멸균성	0.5 mL를 혐기성 배양 병 내로 및 0.5mL를 호기성 배양 병 내로 접종함.
그램 염색	냉동바이알을 시험이 완료될 때까지 4 °C에서 저장함.
내독소	냉동바이알을 시험이 완료될 때까지 4 °C에서 저장함.
유동	냉동바이알을 시험이 완료될 때까지 4 °C에서 저장함.
사후 제형 보유	장래의 시험을 위해 냉동보존함: 5개의 멸균 바이알로 이루어짐, 1 –세포 카운트 튜브,1- 내독소 튜브, 1-미코플라스마 튜브, 1-그램 염색 튜브, 및 1- 즉각적 시험을 위한 QC에 대한 유동 튜브.
재자극	샘플은 실온에서 전달되고, 검정은 세포 카운트 결과의 30분 내에 시작되어야 함.

[1585]

[1586] 세포 카운트

[1587] 단일 세포 카운트를 각각의 샘플에 대해 수행하고, 데이터를 기록하고, 카운팅 원 데이터를 배치 기록에 부착시켰다. 셀로미터 카운팅 프로그램을 문서화하였다. 정확한 희석이 셀로미터 내로 들어갔는 지를 확인하였다.

[1588] 사후 제형 보유 세포의 냉동보존:

[1589] 1. 바이알을 CRF에 정치하였다.

[1590] 2. 동결의 완료 후에 저장 위치로 이동시키고, CFR에 정치된 날짜 및 시간을 기록하였다. LN_2로 이동된 날짜 및 시간을 기록하였다.

[1591] 미생물학 시험

[1592] 1. 고정 플레이트를 위한 시험을 미생물학 실험실에 지시하였다.

[1593] 2. 수탁 번호를 기록하였다.

[1594] 3. 호기성 및 혐기성 멸균성에 대한 시험을 지시하였다.

[1595] 4. 플레이트 및 병의 미생물학 실험실로의 전달을 보장하였다.

[1596] **세포 생성물 백의 사후-냉동보존**

[1597] 1. 실행의 완료 후에 동결기를 정지시켰다. 실행은 정지 버튼을 클릭하거나, 동결기 키패드 상의 뒤로 (Back) 키를 누름으로써 정지될 수 있다.

[1598] 2. 냉동백을 카세트로부터 제거하였다.

[1599] 3. 카세트를 증기 상 LN_2로 옮겼다.

[1600] 4. 저장 위치를 기록하였다.

[1601] 5. 텍스트 입력 창이 다시 열린 경우 임의의 추가의 코멘트를 입력하였다. 이 창은 실행 정지 방법과 무관하게 나타났다.

[1602] 6. 프로파일 보고서를 인쇄하고, 실행을 위한 로트 번호로 표지된 배치 기록에 부착시켰다.

[1603] 7. 가온 모드 (Warm Mode)를 종료하고, 나가기 (Exit) 버튼으로 실행 스크린을 닫았다.

[1604] **실시예 9: 냉동보존 프로세스**

[1605] 이 실시예는 크리오메드 제어 속도 동결기, 모델 7454 (써모 사이언티픽 (Thermo Scientific))를 사용하여 실시예 8에 상기 기재된 단축된, 닫힌 절차로 제조된 TIL에 대한 냉동보존 프로세스 방법을 기재한다.

[1606] 실시예 9에 기재된 것 외에 사용된 장비는 하기와 같다: 알루미늄 카세트 홀더 랙 (CS750 동결기 백과 호환성임), 750 mL 백을 위한 냉동저장 카세트, 저압 (22 psi) 액체 질소 탱크, 냉장고, 열전대 센서 (백을 위한 리본 유형), 및 크리오스토어 CS750 동결 (CryoStore CS750 Freezing) 백 (오리진 사이언티픽 (OriGen Scientific)).

[1607] 동결 프로세스는 핵형성으로부터 -20 ℃까지 0.5 ℃ 속도 및 -80 ℃ 말단 온도까지 분 당 1 ℃ 냉각 속도를 제공한다. 프로그램 파라미터는 하기와 같다: 단계 1 - 4 ℃에서 기다림; 단계 2: -4 ℃까지 1.0 ℃/분 (샘플 온도); 단계 3: -45 ℃까지 20.0 ℃/분 (챔버 온도); 단계 4: -10.0 ℃까지 10.0 ℃/분 (챔버 온도); 단계 5: -20 ℃까지 0.5 ℃/분 (챔버 온도); 및 단계 6: -80 ℃까지 1.0 ℃/분 (샘플 온도).

[1608] 실시예 1 내지 8의 프로세스와 함께 이 실시예의 절차의 묘사를 도 11에 나타낸다.

[1609] **실시예 10: 프로세스 2A TIL의 특징규명**

[1610] 이 실시예는 상기 기재된 단축된, 닫힌 절차로 제조된 TIL의 특징규명을 기재한다. 요약하면, 단축된, 닫힌 절차 (프로세스 2A, 실시예 1 내지 9에 기재됨)는 표 19에 주어진 이전의 TIL 제조 프로세스에 비해 이점을 갖는다. 사전-REP에 대한 이점으로는 플라스크 당 증가된 종양 단편, 단축된 배양 시간, 감소된 단계의 수, 및/또는 닫힌 계를 처리할 수 있음을 들 수 있다. 사전-REP에서 REP 이행에 대한 이점으로는 단축된 사전-REP-에서-REP로의 프로세스, 감소된 단계의 수, 제거된 표현형결정 선택, 및/또는 닫힌 계를 처리할 수 있음을 들 수 있다. REP에 대한 이점으로는 감소된 단계의 수, 보다 짧은 REP 지속기간, 플라스크 사이의 TIL의 닫힌 계 이동, 및/또는 닫힌 계 배지 교환을 들 수 있다. 수확에 대한 이점으로는 감소된 단계의 수, 자동화 세포 세척, 닫힌 계, 및 세척 동안 감소된 생성물의 소실을 들 수 있다. 최종 제형 및/또는 생성물에 대한 이점으로는 선적 유연성을 들 수 있다.

[1611] <표 19>

[1612] 예시적인 프로세스 1C 및 프로세스 2A의 실시양태의 비교.

프로세스 단계	프로세스 1C - 실시양태	프로세스 2A - 실시양태
사전-REP	• 10개의 G-렉스-10 플라스크 당 4개의 단편 • 11 내지 21일 지속기간	• 1개의 G-렉스-100M 플라스크 당 40개의 단편 • 11일 지속기간
사전-REP에서 REP로의 이행	• 사전-REP TIL은 선택을 위해 표현형결정될 때까지 동결된 후, 해동되어 REP로 진행한다 (약 제30일) • REP는 >40×10^{6}개의 TIL을 요구한다	• 사전-REP TIL은 제11일에 REP로 직접적으로 이동한다 • REP는 25 내지 200×10^{6}개의 TIL을 요구한다
REP	• REP 제0일에 6개의 G-렉스-100M 플라스크 • REP 제0일에 플라스크 당 5×10^{6}개의 TIL 및 5×10^{8}개의 PBMC 공급자 • REP 제7일에 18 내지 36개의 플라스크로 분할 • 14일 지속기간	• 제11일에 1개의 G-렉스-500M 플라스크 • 제11일에 25 내지 200×10^{6}개의 TIL 및 5x10^{9}개의 PBMC 공급자 • 제16일에 6개 이하의 G-렉스-500M 플라스크로 분할 • 11일 지속기간
수확	• 원심분리를 통해 수확된 TIL	• LOVO 자동화 세포 세척 시스템을 통해 수확된 TIL
최종 제형화	• 하이포써모솔 중의 신선한 생성물 • 단일 주입 백 • 제한된 운송 안정성	• LN_2에 저장된 플라스마라이트-A + 1% HSA 및 CS10 중 냉동보존된 생성물 • 다수의 분취물 • 보다 긴 운송 안정성
전체적인 추정된 프로세스 시간	• 43 내지 55일	• 22일

[1613]

[1614] 총 9회의 실험을 표 20에 기재된 9가지 종양으로부터 유래된 TIL을 사용하여 수행하였다. 여기에 나타내어진 모든 데이터는 프로세스 1C 및 프로세스 2A의 실시양태로부터의 해동된 동결된 TIL 생성물로부터 측정되었다.

[1615] <표 20>

[1616] 종양 공여자, 프로세싱 날짜 및 프로세싱 위치의 설명.

종양 ID	조직 유형	공급원	조직
M1061	흑색종	MT 그룹	원발성 – 좌측 측면 발
M1062	흑색종	모피트	N/A
M1063	흑색종	MT 그룹	전이성 C - 우측 사타구니
M1064	흑색종	MT 그룹	전이성 C - 좌측 발목
M1065	흑색종	바이오 옵션즈	전이성-보조 림프절
EP11001	ER+PR+	MT 그룹	원발성 - 좌측 유방 침습성 관암종
M1056*	흑색종	모피트	N/A
M1058*	흑색종	MT 그룹	전이성 - 단계 IIB 우측 두피
M1023*	흑색종	아틀란틱 헬스	원발성 - 우측 겨드랑이

[1617]

[1618] 프로세스 2A에 대해 본원에 기재된 절차를 사용하여 이 실시예에서 특징규명을 위한 TIL을 제조하였다. 간략하게, REP를 위해, 제11일에, 3000 IU/ml rhil-2, 30 ng/mL 항-CD3 (클론 OKT3) 및 5 × 10^9개의 방사선조사된 동종이형 공급자 PBMC 세포로 보충된 5 L의 CM2를 함유하는 1개의 G-렉스-500M 플라스크를 제조하였다. 부피 감소 후에 사전-REP G-렉스-100M 플라스크로부터 수확된 TIL을 카운팅하고, G-렉스-500M 플라스크 내로 5 × 10^6 내지 200 × 10^6개의 세포의 범위인 밀도로 시 딩하였다. 그 후, 플라스크를 습화된 37 ℃, 5% CO_2 조직 배양 인큐베이터에 5일 동안 정치하였다. 제16일에, G-렉스-500M 플라스크의 부피를 감소시키고, TIL을 카운팅하고, 그들의 생존력을 측정하였다. 이 시점에서, TIL을 다수의 G-렉스-500M 플라스크 (최대 6개 이하의 플라스크) 내로 확장시켰으며, 각각은 1 × 10^9개의 TIL/플라스크의 시딩 밀도를 갖는다. 그 후, 모든 플라스크를 습화된 37 ℃, 5% CO_2 조직 배양 인큐베이터에 추가의 6일 동안 정치하였다. 제22일, 수확일에, 각각의 플라스크를 90% 부피 감소시키고, 세포를 함께 풀링하고, 170 μm 혈액 필터를 통해 여과한 후, LOVO를 사용하여 자동화 세척을 위한 제조에서 3 L 오리진 (Origin) EV3000 백 또는 등가물 내로 수집하였다. TIL을 세포 배양 배지의 99.99%를 1% HSA로 보충된 플라스마라이트로 이루어진 세척 완충제로 대체한 LOVO 자동화 세포 프로세싱 시스템을 사용하여 세척하였다. LOVO는 혈청, 성장 인자, 및 시토카인, 뿐만 아니라 다른 데브리스 및 미립자를 비롯한 잔류의 조직 배양 성분을 사실상 제거하면서 TIL의 92% 초과를 회수하는 스피닝 여과 막 기술을 사용하여 작동한다. 세척의 완료 후, 세포 카운트를 수행하여 TIL의 확장 및 수확 시 그들의 생존력을 측정하였다. CS10을 세척된 TIL에 1:1 부피:부피 비로 첨가하여 프로세스 2A 최종 제형화를 달성하였다. 최종 제형화된 생성물을 냉동저장 백 내로 분취하고, 밀봉하고, 사전-냉각된 알루미늄 카세트에 정치하였다. 그 후, TIL을 함유하는 냉동저장 백을 크리오메드 제어 속도 동결기 (써모피셔 사이언티픽 (ThermoFisher Scientific), 미국 매사추세츠주 월텀)를 실시예 9를 비롯한 본원에 기재된 절차에 따라 사용하여 동결시켰다.

[1619] 9회의 실행에 대한 세포 카운트 및 백분율 생존력을 도 12 및 13에서 비교하였다.

[1620] 하기 결과에서 나타내어진 세포 표면 마커를 유동 세포측정법 (칸토 (Canto) II 유동 세포측정기, 벡톤,

디킨슨, 앤드 컴퍼니 (Becton, Dickinson, and Co.), 미국 뉴저지주 프랭클린 레이크스)을 사용하여 적합한 시판되는 시약을 사용하여 분석하였다. 관심의 마커에 대한 결과를 도 14 내지 도 23에 나타낸다.

[1621] 다양한 방법이 게놈 DNA 및 세포학적 제제에서 텔로미어의 길이를 측정하는 데 사용되었다. 텔로미어 제한 단편 (TRF) 분석은 텔로미어 길이를 측정하는 금 표준이다 (de Lange et al., 1990). 그러나, TRF의 주요한 제한은 다량의 DNA (1.5 μg)의 요구이다. 여기서, 텔로미어 길이의 측정을 위한 2가지 폭넓게 사용되는 기법, 즉, 형광 계내 혼성화 (FISH) 및 정량적 PCR을 적용하였다.

[1622] 유동-FISH를 데이코 (Dako) 키트 (K532711-8 RUO 코드 K5327 유동 세포측정법을 위한 텔로미어 PNA 키트/FITC, PNA FISH 키트/FITC. 유동, 20 시험)를 사용하여 수행하고, 제조자의 지시서를 따라 텔로미어 반복부의 평균 길이를 측정하였다. 간략하게, 세포를 CD3 APC로 4℃에서 20분 동안, 이어서 GAM 알렉사 (Alexa) 546으로 20분 동안 표면 염색하였다. 그 후, 항원-항체 복합체를 2 mM BS3 (피셔 사이언티픽 (Fisher Scientific)) 화학적 가교제로 가교시켰다. 긴 텔로미어를 갖는 T-세포의 표준 집단, 저캇 (Jurkat) 1301 T 백혈병 세포주 (1301 세포)에서 PNA-텔로미어 프로브 결합을 각각의 검정에서 내부 참조 표준으로서 사용하였다. 개별적 TIL을 항체 인큐베이션 후에 카운팅하고, 1301 세포 (ATCC)와 1:1 세포 비로 혼합하였다. 5×10^5개의 TIL을 5×10^5개의 1301 세포와 혼합하였다. 계내 혼성화를 혼성화 용액 (70% 포름아미드, 1% BSA, 20 mM 트리스 (Tris) pH 7.0)에서 이중으로 및 텔로미어 반복 서열에 상보적인 FITC-접합된 텔로미어 PNA 프로브 (파나진 (Panagene)), FITC-OO-CCC-TAA-CCC-TAA-CCC-TAA의 존재 및 부재 하에서 60 nM의 최종 농도에서 수행하였다. 텔로미어 PNA 프로브의 첨가 후, 세포를 진탕 수조에서 81℃에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 어둠에서 실온에서 밤새 정치하였다. 다음날 아침, 과량의 텔로미어 프로브를 40℃로 사전-가온된 PBS로 2회 세척함으로써 제거하였다. 세척 후, DAPI (인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스배드)를 75 ng/mL의 최종 농도로 첨가하였다. DAPI로의 DNA 염색을 사용하여 G0/G1 집단에서의 세포를 게이팅하였다. 샘플 분석을 본 발명자들의 유동 세포 측정기 (BD 칸토 (Canto) II, 미국 캘리포니아주 마운틴 뷰)를 사용하여 수행하였다. 시험 샘플의 텔로미어 형광을 하기 식에 따라 1301 세포의 형광 (fl)의 백분율로서 표현하였다: 상대 텔로미어 길이 = [(프로브를 갖는 평균 FITC fl 시험 세포 - 프로브를 갖지 않는 평균 FITC fl 시험 세포) × DNA 인덱스 1301 세포 × 100] / [(프로브를 갖는 평균 FITC fl 1301 세포 - 프로브를 갖지 않는 평균 FITC fl 1301 세포) × DNA 인덱스 시험 세포.

[1623] 실시간 qPCR을 또한 사용하여 상대 텔로미어 길이를 측정하였다 (Nucleic Acids Res. 2002 May 15; 30(10): e47., 20, Leukemia, 2013, 27, 897-906). 간략하게, 텔로미어 반복 카피 수 대 단일 유전자 카피 수 (T/S) 비를 바이오래드 (BioRad) PCR 열 사이클러 (미국 캘리포니아주 허큘레스)를 사용하여 96-웰 형식으로 측정하였다. 10 ng의 게놈 DNA를 텔로미어 또는 헤모글로빈 (hgb) PCR 반응 중 어느 하나에 대해 사용하였으며, 사용된 프라이머는 하기와 같았다: Tel-1b 프라이머 (CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT), Tel-2b 프라이머 (GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT), hgb1 프라이머 (GCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC), 및 hgb2 프라이머 (CACCAACTTCATCCACGTTCACC). 모든 샘플을 텔로미어 및 헤모글로빈 반응 둘 다에 의해 분석하고, 분석을 동일한 플레이트 상에서 삼중으로 수행하였다. 시험 샘플 외에도, 각각의 96-웰 플레이트는 1301 세포주로부터 단리된 게놈 DNA를 사용한 0.08 ng 내지 250 ng의 5-점 표준 곡선을 함유하였다. 각각의 샘플에 대한 T/S 비 (-dCt)를 중위 헤모글로빈 역치 사이클 (Ct) 값을 중위 텔로미어 Ct 값으로부터 뺌으로써 계산하였다. 상대 T/S 비 (-ddCt)를 10.0 ng 표준 곡선 점의 T/S 비를 각각의 미지의 샘플의 T/S 비로부터 뺌으로써 측정하였다.

[1624] 유동-FISH 결과를 도 24 및 25에 나타내고, 프로세스 1C 및 프로세스 2A 사이에 유의한 차이는 관찰되지 않았으며, 이는 프로세스 2A에 의해 제조된 TIL의 놀라운 특성이 TIL 단독의 나이로부터 예측가능하지 않았음을 시사한다.

[1625] 결론적으로, 프로세스 2A는 높은 수준의 공동-자극성 분자, 낮은 수준의 고갈 마커, 및 재활성화 시 시토카인을 분비하는 증가된 능력에 의해 정의된 바와 같은 "신생" 표현형을 갖는 강력한 TIL 생성물을 제조하였다. 간략화된 22일 확장 플랫폼은 요법의 긴급한 필요에 있어서 환자를 위한 TIL의 임상적 규모 용량의 급속 생성을 허용한다. 냉동보존된 약물 생성물은 급속 제조 및 분포에 있어서의 유연성을 허용하는 중요한 물류 효율을 도입한다. 이 확장 방법은 TIL 요법의 보다 폭넓은 적용에 대한 전통적인 장벽을 극복한다.

[1626] **실시예 11: IL-2, IL-15, 및 IL-21 시토카인 칵테일의 사용**

[1627] 이 실시예는 실시예 1 내지 10의 TIL 프로세스와 조합으로, 추가의 T 세포 성장 인자로서 기능하는 IL-2, IL-

15, 및 IL-21 시토카인의 사용을 기재한다.

[1628] 실시예 1 내지 10의 프로세스를 사용하여, TIL을 결장직장, 흑색종, 자궁경부, 삼중 음성 유방, 폐 및 신장 종양으로부터 실험의 한 부문에서 IL-2, 및 배양의 개시에서 또다른 부문에서 IL-2 대신 IL-2, IL-15, 및 IL-21의 조합의 존재 하에서 성장시켰다. 사전-REP의 완료 시, 배양물을 확장, 표현형, 기능 (CD107a+ 및 IFN-γ) 및 TCR Vβ 레퍼토리에 대해 평가하였다. IL-15 및 IL-21은 본원의 다른 곳에 및 문헌 [Gruijl, et al., IL-21 promotes the expansion of CD27+CD28+ tumor infiltrating lymphocytes with high cytotoxic potential and low collateral expansion of regulatory T cells, *Santegoets, S. J.,* J Transl Med., **2013,** *11*:37 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3626797/)]에 기재되어 있다.

[1629] 결과는 IL-2, IL-15, 및 IL-21 처리된 조건에서 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 세포 둘 다에서 향상된 TIL 확장 (>20%)이 IL-2 단독 조건에 비해 다수의 조직학에서 관찰되었음을 나타내었다. IL-2 단독 배양물에 비해 IL-2, IL-15, 및 IL-21 처리된 배양물로부터 얻어진 TIL에서 편향된 TCR Vβ 레퍼토리를 갖는 우세하게 $CD8^+$ 집단을 향한 편향이 있었다. IFN-γ 및 CD107a는 IL-2만으로 처리된 TIL에 비해 IL-2, IL-15, 및 IL-21 처리된 TIL에서 상승되었다.

[1630] **실시예 12: 흑색종에서의 2상, 다기관, 3-코호트 연구**

[1631] 이 2상, 다기관, 3-코호트 연구는 전이성 흑색종을 갖는 환자에서 프로세스 1C (본원에 기재된 바와 같음)에 따라 제조된 TIL 요법의 안전성 및 효능을 평가하기 위해 설계된다. 코호트 1 및 2는 각각 30명 이하의 환자를 등록할 것이고, 코호트 3은 10명 이하의 환자에서 제2 TIL 주입을 위한 재-치료 코호트이다. 첫번째 2개의 코호트는 2가지 상이한 제조 프로세스를 평가하고 있다: 프로세스 1C 및 프로세스 2A의 실시양태 (각각 실시예 1 내지 10에 기재됨). 코호트 1에서의 환자는 신선한, 비-냉동보존된 TIL을 받고, 코호트 2 환자는 냉동보존된 생성물을 생성하는 실시예 1 내지 10에 기재된 프로세스를 통해 제조된 생성물을 받는다. 연구 설계를 도 26에 나타낸다. 연구는 전이성 흑색종을 갖는 환자의 하위집단의 치료를 위한 자가 TIL의 안전성 및 효능을 평가하기 위한 2상, 다기관, 3 코호트 연구이다. 핵심 포함 기준은 측정가능한 전이성 흑색종 및 TIL 생성을 위한 절제가능한 1개 이상의 병변; 전신 요법의 적어도 하나의 사전 라인; 연령 ≥ 18세; 및 0 내지 1의 ECOG 수행 상태를 포함한다. 치료 코호트는 비-냉동보존된 TIL 생성물 (프로세스 1C를 사용하여 제조됨), 냉동보존된 TIL 생성물 (프로세스 2A의 실시양태를 사용하여 제조됨), 및 반응이 없거나 초기 반응 후에 진행하는 환자에 대한 TIL 생성물로의 재치료를 포함한다. 1차 종점은 안전성이고, 2차 종점은 객관적 반응 속도 (ORR), 완전 완화 속도 (CRR), 무진행 생존 (PFS), 반응의 지속기간 (DOR), 및 전체 생존 (OS)으로서 정의되는 효능이다.

[1632] **실시예 13: 감마-방사선조사된 말초 단핵 세포의 개별적 로트의 정성화**

[1633] 이 실시예는 본원에 기재된 예시적인 방법에서 동종이형 공급자 세포로서 사용하기 위한 감마-방사선조사된 말초 단핵 세포 (PBMC, MNC로도 공지됨)의 개별적 로트를 정성화하는 신규한 간략화된 절차를 기재한다.

[1634] 각각의 방사선조사된 MNC 공급자 로트를 개별적 공여자로부터 제조하였다. 각각의 로트 또는 공여자를 정제된 항-CD3 (클론 OKT3) 항체 및 인터루킨-2 (IL-2)의 존재 하에서 REP에서 TIL을 확장시키는 그들의 능력에 대해 개별적으로 스크리닝하였다. 또한, 공급자 세포의 각각의 로트를 TIL의 첨가 없이 시험하여 감마 방사선의 받은 용량이 그들을 복제 부적격이 되게 하는 데 충분하였는 지를 확인하였다.

[1635] **정의/약어**

[1636] BSC - 생물학적 안전성 캐비닛

[1637] CD3 - 분화 클러스터 3; 표면 마커 단백질 T-림프구

[1638] CF - 원심분리

[1639] CM2 - TIL #를 위한 완전 배지

[1640] CMO - 위탁 제조 기관

[1641] CO_2 - 이산화탄소

[1642] EtOH - 에틸 알콜

[1643] GMP - 우수 제조 관례

[1644] IL-2 - 인터루킨 2

[1645] IU - 국제 단위

[1646] LN2 - 액체 질소

[1647] 미니-REP - 미니-급속 확장 프로토콜

[1648] ml - 밀리리터

[1649] MNC - 단핵 세포

[1650] NA - 적용되지 않음

[1651] OKT3 - MACS GMP CD3 순수한 (클론 OKT3) 항체

[1652] PPE - 개인 보호 장비

[1653] 사전-REP - 급속 확장 프로토콜 전

[1654] QS - 적당량; 이 양으로 충전

[1655] REP - 급속 확장 프로토콜

[1656] TIL - 종양 침윤 림프구

[1657] T25 - 25 cm^2 조직 배양 플라스크

[1658] μg - 마이크로그램

[1659] μL - 마이크로리터

[1660] 절차

[1661] 배경

[1662] 7.1.1 감마-방사선조사된, 성장-정지된 MNC 공급자 세포는 TIL의 REP를 위해 요구되었다. 공급자 MNC 상의 막 수용체는 REP 플라스크에서 항-CD3 (클론 OKT3) 항체에 결합하고, TIL에 가교하여, TIL을 확장되도록 자극한다. 공급자 로트를 개별적 공여자로부터 취해진 전혈의 백혈구성분채집술로부터 제조하였다. 백혈구성분채집술 생성물을 피콜-하이파크 (Ficoll-Hypaque) 상에서 원심분리하고, 세척하고, 방사선조사하고, GMP 조건 하에서 냉동보존하였다.

[1663] 7.1.2 TIL 요법을 받은 환자가 생존 공급자 세포로 주입되지 않는 것은, 이것이 이식편-대-숙주 질환 (Graft-Versus-Host Disease) (GVHD)을 초래할 수 있기 때문에 중요하다. 따라서, 공급자 세포는 재배양 시 이중 가닥 DNA 파손 및 MNC 세포의 세포 생존력의 소실을 초래하는 감마-방사선조사로 세포를 투여함으로써 성장-정지된다.

[1664] 평가 기준 및 실험 설정

[1665] 공급자 로트를 2가지 기준에 대해 평가하였다: 1) 공동-배양물에서 TIL을 확장시키는 그들의 능력 >100배 및 2) 그들의 복제 부적격성.

[1666] 7.2.2 공급자 로트를 정립 T25 조직 배양 플라스크에서 성장된 2가지 1차 사전-REP TIL 계통을 이용하여 미니-REP 형식으로 시험하였다.

[1667] 7.2.3 공급자 로트를 2가지 별개의 TIL 계통에 대해 시험하였는데, 이는 각각의 TIL 계통이 REP에서 활성화에 반응하여 증식하는 그의 능력에 있어서 고유하기 때문이다.

[1668] 7.2.4 대조군으로서, 역사적으로 7.2.1의 기준을 충족시키는 것으로 나타난 방사선조사된 MNC 공급자 세포의 로트를 시험 로트와 나란히 실행하였다.

[1669] 7.2.5 단일 실험에서 시험된 모든 로트가 등가의 시험을 받는 것을 보장하기 위해, 동일한 사전-REP TIL 계통의 충분한 스톡이 모든 조건 및 모든 공급자 로트를 시험하기 위해 이용가능하였다.

[1670] 7.2.6 시험되는 공급자 세포의 각각의 로트에 대해, 총 6개의 T25 플라스크가 있었다:

[1671] 7.2.6.1 사전-REP TIL 계통 #1 (2개의 플라스크)

[1672] 7.2.6.2 사전-REP TIL 계통 #2 (2개의 플라스크)

[1673] 7.2.6.3 공급자 대조군 (2개의 플라스크)

[1674] 주: TIL 계통 #1 및 #2를 함유하는 플라스크는 TIL을 확장시키는 공급자 로트의 능력을 평가하였다. 공급자 대조군 플라스크는 공급자 로트의 복제 부적격을 평가하였다.

[1675] 실험 프로토콜

[1676] 7.3.1 제-2/3일, TIL 계통의 해동

[1677] 7.3.1.1 CM2 배지를 제조하였다.

[1678] 7.3.1.2 CM2를 37℃ 수조에서 가온하였다.

[1679] 7.3.1.3 3000 IU/ml IL-2로 보충된 40 mL의 CM2를 제조하였다. 사용할 때까지 따뜻하게 유지하였다.

[1680] 7.3.1.4 IL-2를 갖지 않는 20 mL의 사전-가온된 CM2를 사용된 TIL 계통의 명칭으로 표지된 2개의 50 ml 원뿔형 튜브의 각각 내로 정치하였다.

[1681] 7.3.1.5 2개의 지정된 사전-REP TIL 계통을 LN2 저장고로부터 제거하고, 바이알을 조직 배양실로 옮겼다.

[1682] 7.3.1.6 TIL 계통 확인을 기록하였다.

[1683] 7.3.1.7 바이알을 그들을 37℃ 수조 중의 밀봉된 지퍼 저장 백 내부에 소량의 얼음이 잔류할 때까지 정치함으로써 해동시켰다.

[1684] 7.3.1.8 해동된 바이알을 70% 에탄올로 분무하거나 닦고, 바이알을 BSC로 옮겼다.

[1685] 7.3.1.9 멸균 이동 피펫을 사용하여, 바이알의 내용물을 제조된, 표지된 50 ml 원뿔형 튜브 중의 20 mL의 CM2 내로 즉시 옮겼다.

[1686] 7.3.1.10 IL-2 없는 CM2를 사용하여 40 ml로 QS하여 세포를 세척하였다.

[1687] 7.3.1.11 400 × CF에서 5분 동안 원심분리하였다.

[1688] 7.3.1.12 상청액을 흡인하고, 3000 IU/ml IL-2로 보충된 5 ml 따뜻한 CM2에 재현탁시켰다.

[1689] 7.3.1.13 작은 분취물 (20 μl)을 자동화 세포 카운터를 사용한 세포 카운팅을 위해 이중으로 제거하였다. 카운트를 기록하였다.

[1690] 7.3.1.14 카운팅하는 동안, TIL 세포를 갖는 50 ml 원뿔형 튜브를 기체 교환을 허용하기 위해 느슨해진 캡을 갖는 습화된 37℃, 5% CO_2 인큐베이터 내로 정치하였다.

[1691] 7.3.1.15 세포 농도를 측정하고, TIL을 1 × 10^6개의 세포/ml로 3000 IU/ml의 IL-2로 보충된 CM2에 희석하였다.

[1692] 7.3.1.16 미니-REP의 제0일까지 습화된 37℃ 인큐베이터에서 필요한 만큼 많은 웰에서 24-웰 조직 배양 플레이트의 2 ml/웰에서 배양하였다.

[1693] 7.3.1.17 교란 및 잠재적 교차-오염을 회피하기 위해 상이한 TIL 계통을 별개의 24-웰 조직 배양 플레이트에서 배양하였다.

[1694] 7.3.2 제0일, 미니-REP를 개시하기

[1695] 7.3.2.1 시험되는 공급자 로트의 수에 대해 충분한 CM2 배지를 제조하였다. (예를 들어, 한 번에 4개의 공급자 로트를 시험하기 위해, 800 mL의 CM2 배지를 제조하였음).

[1696] 7.3.2.2 7.3.2.1에서 제조된 CM2의 부분을 분취하고, 이를 세포의 배양을 위해 3000 IU/ml IL-2로 보충하였다. (예를 들어, 한 번에 4개의 공급자 로트를 시험하기 위해, 3000 IU/ml IL-2를 갖는 500 mL의 CM2 배지를 제조하였음).

[1697] 7.3.2.3 IL-2를 갖지 않는 CM2의 나머지는 하기 기재된 바와 같이 세포의 세척에 사용될 것이다.

[1698] 7.3.2.4 교차-오염을 방지하기 위해 각각의 TIL 계통으로 별개로 작업하여, TIL 배양물을 갖는 24-웰 플레이트

를 인큐베이터로부터 제거하고, BSC로 옮겼다.

[1699] 7.3.2.5 멸균 이동 피펫 또는 100 내지 1000 μl 피페터 (Pipettor) 및 팁을 사용하여, 약 1 ml의 배지를 사용되는 TIL의 각각의 웰로부터 제거하고, 24-웰 조직 배양 플레이트의 비사용된 웰에 정치하였다. 이를 웰을 세척하는 데 사용하였다.

[1700] 7.3.2.6 신선한 멸균 이동 피펫 또는 100 내지 1000 μl 피페터 및 팁을 사용하여, 잔류의 배지를 웰 중의 TIL과 혼합하여 세포를 재현탁시킨 후, 세포 현탁액을 TIL 명칭으로 표지된 50 ml 원뿔형 튜브로 옮기고, 부피를 기록하였다.

[1701] 7.3.2.7 웰을 따로 남겨 둔 배지로 세척하고, 그 부피를 동일한 50 ml 원뿔형 튜브로 옮겼다.

[1702] 7.3.2.8 세포를 400 × CF에서 회전시켜 세포 펠릿을 수집하였다.

[1703] 7.3.2.9 배지 상청액을 흡인 제거하고, 세포 펠릿을 3000 IU/ml IL-2, 수확된 웰의 수 및 펠릿의 크기에 기초하여 사용되는 부피를 함유하는 2 내지 5 mL의 CM2 배지에 재현탁시켰다 - 부피는 >1.3 × 10^6개의 세포/ml의 농도를 보장하기에 충분해야 한다.

[1704] 7.3.2.10 혈청학적 피펫을 사용하여, 세포 현탁액을 철저하게 혼합하고, 부피를 기록하였다.

[1705] 7.3.2.11 200 μl를 자동화 세포 카운터를 사용한 세포 카운트를 위해 제거하였다.

[1706] 7.3.2.12 카운팅 동안, TIL 세포를 갖는 50 ml 원뿔형 튜브를 기체 교환을 허용하기 위해 느슨해진 캡을 갖는 습화된, 5% CO_2, 37℃ 인큐베이터 내로 정치하였다.

[1707] 7.3.2.13 카운트를 기록하였다.

[1708] 7.3.2.14 TIL 세포를 함유하는 50 ml 원뿔형 튜브를 인큐베이터로부터 제거하고, 이들 세포를 1.3×10^6개의 세포/ml의 농도에서 3000 IU/ml IL-2로 보충된 따뜻한 CM2에 재현탁시켰다. 50 ml 원뿔형 튜브를 느슨한 캡을 갖는 인큐베이터로 복귀시켰다.

[1709] 7.3.2.15 바람직한 경우, 원래 24-웰 플레이트를 임의의 잔류의 TIL을 재배양하기 위해 보관하였다.

[1710] 7.3.2.16 제2 TIL 계통에 대해 단계 7.3.2.4 내지 7.3.2.15를 반복하였다.

[1711] 7.3.2.17 TIL을 실험을 위해 T25 플라스크 내로 플레이팅하기 직전에, TIL을 하기 단계 7.3.2.35에 따라 1.3 × 10^5개의 세포/ml의 최종 농도를 위해 1:10 희석하였다.

[1712] MACS GMP CD3 순수한 (OKT3) 작업 용액을 제조하기

[1713] 7.3.2.18 OKT3의 스톡 용액 (1 mg/ml)을 4℃ 냉장고로부터 꺼내고, BSC에 정치하였다.

[1714] 7.3.2.19 30 ng/ml OKT3의 최종 농도를 미니-REP의 배지에 사용하였다.

[1715] 7.3.2.20 600 ng의 OKT3가 실험의 각각의 T25 플라스크에서 20 ml를 위해 필요하였으며; 이는 각각의 공급자 로트에 대해 각각의 20 ml에 대해 60 μl의 10 μg/ml 용액의 등가물, 또는 시험된 모든 6개의 플라스크에 대해 360 μl이었다.

[1716] 7.3.2.21 시험된 각각의 공급자 로트에 대해, 10 μg/ml의 작업 농도를 위해 1 mg/ml OKT3의 400 μl의 1:100 희석액을 제조하였다 (예를 들어, 한 번에 4개의 공급자 로트를 시험하기 위해, 1 mg/ml OKT3의 1600 μl의 1:100 희석액: 16 μl의 1 mg/ml OKT3 + 3000 IU/ml IL-2를 갖는 1.584 mL의 CM2 배지를 제조함.)

[1717] T25 플라스크를 제조하기

[1718] 7.3.2.22 각각의 플라스크를 시험되는 TIL 계통의 명칭, 플라스크 반복실험 번호, 공급자 로트 번호, 날짜, 및 분석자의 이니셜로 표지하였다.

[1719] 7.3.2.23 플라스크를 공급자 세포를 제조하기 전에 CM2 배지로 충전하였다.

[1720] 7.3.2.24 플라스크를 37℃ 습화된 5% CO_2 인큐베이터 내로 정치하여 잔류의 성분을 첨가하도록 기다리면서 배지를 따뜻하게 유지하였다.

[1721] 7.3.2.25 일단 공급자 세포가 제조되면, 성분은 각각의 플라스크 중의 CM2에 첨가될 것이다.

[1722] MACS GMP CD3 순수한 (OKT3) 작업 용액을 제조하기.

[1723] <표 21>

[1724] 용액

[1725]

성분	공동-배양 플라스크 중의 부피	대조군 (공급자 단독) 플라스크 중의 부피
CM2 + 3000 IU/ml IL-2	18ml	19ml
MNC: CM2 + 3000IU IL-2 중 1.3 x 10^7개/ml (최종 농도 1.3 x 10^7개/플라스크)	1ml	1ml
OKT3: CM2 + 3000IU IL-2 중 10μg/ml	60μl	60μl
TIL: 3000IU의 IL-2를 갖는 CM2 중 1.3 x 10^5개/ml (최종 농도 1.3 x 10^5개/플라스크)	1ml	0

[1726] 공급자 세포를 제조하기

[1727] 7.3.2.26 최소 78 × 10^6개의 공급자 세포가 이 프로토콜을 위해 시험되는 로트 당 필요하였다. SDBB에 의해 동결된 각각의 1 ml 바이알은 동결 시 100 × 10^6개의 생존 세포를 가졌다. LN2 저장고로부터 해동 시 50% 회수를 가정하여, 각각의 REP에 대해 추정된 100 × 10^6개의 생존 세포를 제공하는 로트 당 공급자 세포의 적어도 2개의 1 ml 바이알을 해동시킬 것이 권고되었다. 대안적으로, 1.8 ml 바이알에서 공급되는 경우, 단지 1개의 바이알은 충분한 공급자 세포를 제공하였다.

[1728] 7.3.2.27 공급자 세포를 해동시키기 전에, 시험되는 각각의 공급자 로트에 대해 IL-2를 갖지 않는 대략 50 mL의 CM2를 사전-가온하였다.

[1729] 7.3.2.28 지정된 공급자 로트 바이알을 LN2 저장고로부터 제거하고, 지퍼 저장 백에 정치하고, 얼음 상에 정치하였다. 바이알을 조직 배양실로 옮겼다.

[1730] 7.3.2.29 바이알을 닫힌 지퍼 저장 백 내부에서 37℃ 수조에 침지시킴으로써 해동시켰다.

[1731] 7.3.2.30 바이알을 지퍼 백으로부터 제거하고, 70% EtOH로 분무하거나 닦고, 바이알을 BSC로 옮겼다.

[1732] 7.3.2.31 이동 피펫을 사용하여 공급자 바이알의 내용물을 50 ml 원뿔형 튜브 중의 30 ml의 따뜻한 CM2 내로 즉시 옮겼다. 바이알을 작은 부피의 CM2로 세척하여 바이알 중의 임의의 잔류의 세포를 제거하였다.

[1733] 7.3.2.32 400 × CF에서 5분 동안 원심분리하였다.

[1734] 7.3.2.33 상청액을 흡인하고, 4 ml 따뜻한 CM2 더하기 3000 IU/ml IL-2에 재현탁시켰다.

[1735] 7.3.2.34 200 μl를 자동화 세포 카운터를 사용한 세포 카운팅을 위해 제거하였다. 카운트를 기록하였다.

[1736] 7.3.2.34 세포를 1.3 × 10^7개의 세포/ml로 따뜻한 CM2 더하기 3000 IU/ml IL-2에 재현탁시켰다.

[1737] 7.3.2.34 TIL 세포를 1.3 × 10^6개의 세포/ml 내지 1.3 × 10^5개의 세포/ml로 희석하였다. 교차-오염을 방지하기 위해 각각의 TIL 계통으로 독립적으로 작업하였다.

[1738] 공동-배양을 설정하기

[1739] 7.3.2.36 TIL 세포를 1.3 × 10^6개의 세포/ml 내지 1.3 × 10^5개의 세포/ml로 희석하였다. 교차-오염을 방지하기 위해 각각의 TIL 계통으로 독립적으로 작업하였다.

[1740] 7.3.2.36.1 4.5 ml의 CM2 배지를 15 ml 원뿔형 튜브에 첨가하였다.

[1741] 7.3.2.36.2 TIL 세포를 인큐베이터로부터 제거하고, 10 ml 혈청학적 피펫을 사용하여 잘 재현탁시켰다.

[1742] 7.3.2.36.3 0.5 ml의 세포를 1.3 × 10^6개의 세포/ml TIL 현탁액으로부터 제거하고, 15 ml 원뿔형 튜브 중의 4.5 ml의 배지에 첨가하였다. TIL 스톡 바이알을 인큐베이터로 복귀시켰다.

[1743] 7.3.2.36.4 잘 혼합하였다.

[1744] 7.3.2.36.5 제2 TIL 계통에 대해 단계 7.3.2.36.1 내지 7.3.2.36.4를 반복하였다.

[1745] 7.3.2.36.6 한 번에 1개 초과의 공급자 로트를 시험하는 경우, TIL을 플레이팅하기 직전에 TIL을 각각의 공급자 로트에 대해 보다 낮은 농도로 희석하였다.

[1746] 7.3.2.37 단일 공급자 로트에 대한 사전-가온된 배지를 갖는 플라스크를 인큐베이터로부터 BSC로 옮겼다.

[1747] 7.3.2.38 공급자 세포를 1 ml 피펫 팁으로 수 회 상하로 피펫팅함으로써 혼합하고, 1 ml (1.3 × 10^7개의 세포)를 그 공급자 로트에 대한 각각의 플라스크로 옮겼다.

[1748] 7.3.2.39 60 μl의 OKT3 작업 스톡 (10 μg/ml)을 각각의 플라스크에 첨가하였다.

[1749] 7.3.2.40 2개의 대조군 플라스크를 인큐베이터로 복귀시켰다.

[1750] 7.3.2.41 1 ml (1.3 × 10^5개)의 각각의 TIL 로트를 상응하게 표지된 T25 플라스크로 옮겼다.

[1751] 7.3.2.42 플라스크를 인큐베이터로 복귀시키고, 정립하여 인큐베이션하였다. 제5일까지 건드리지 않았다.

[1752] 7.3.2.43 시험되는 모든 공급자 로트에 대해 7.3.2.36 내지 7.3.2.42를 반복하였다.

[1753] 제5일, 배지 교환

[1754] 7.3.3.1 3000 IU/ml IL-2를 갖는 CM2를 제조하였다. 각각의 플라스크에 대해 10 ml가 필요하다.

[1755] 7.3.3.2 교차-오염을 방지하기 위해, 한 번에 단일 공급자 로트에 대한 플라스크를 취급하였다. 플라스크를 인큐베이터로부터 제거하고, BSC로 옮기고, 플라스크의 바닥 상에 세포 층을 흩뜨리지 않도록 주의하였다.

[1756] 7.3.3.3 대조군 플라스크를 포함하여 모든 플라스크에 대해 반복하였다.

[1757] 7.3.3.4 10 ml 피펫으로, 3000 IU/ml IL-2를 갖는 10 ml 따뜻한 CM2를 각각의 플라스크로 옮겼다.

[1758] 7.3.3.5 플라스크를 인큐베이터로 복귀시키고, 제7일까지 정립하여 인큐베이션하였다. 시험되는 모든 공급자 로트에 대해 7.3.3.1 내지 7.3.3.6을 반복하였다.

[1759] 제7일, 수확

[1760] 7.3.4.1 교차-오염을 방지하기 위해, 한 번에 단일 공급자 로트에 대한 플라스크를 취급하였다.

[1761] 7.3.4.2 플라스크를 인큐베이터로부터 제거하고, BSC로 옮기고, 플라스크의 바닥 상에 세포 층을 흩뜨리지 않도록 주의하였다.

[1762] 7.3.4.3 플라스크의 바닥 상에 성장하는 세포를 흩뜨리지 않고, 10 ml의 배지를 각각의 시험 플라스크로부터 및 15 ml의 배지를 대조군 플라스크의 각각으로부터 제거하였다.

[1763] 7.3.4.4 10 ml 혈청학적 피펫을 사용하여, 세포를 잔류의 배지에 재현탁시키고, 잘 혼합하여 세포의 임의의 무리를 파괴하였다.

[1764] 7.3.4.5 각각의 플라스크에 대한 부피를 기록하였다.

[1765] 7.3.4.6 피펫팅함으로써 세포 현탁액을 철저하게 혼합한 후, 200 μl를 세포 카운팅을 위해 제거하였다.

[1766] 7.3.4.7 TIL을 적절한 표준 작업 절차를 자동화 세포 카운터 장비와 함께 사용하여 카운팅하였다.

[1767] 7.3.4.8 제7일에 카운트를 기록하였다.

[1768] 7.3.4.9 시험되는 모든 공급자 로트에 대해 7.3.4.1 내지 7.3.4.8을 반복하였다.

[1769] 7.3.4.10 공급자 대조군 플라스크를 복제 부적격에 대해 평가하고, TIL을 함유하는 플라스크를 표 21 (하기)에 열거된 기준에 따라 제0일로부터의 배수 확장에 대해 평가하였다.

[1770] 제7일, 제14일까지 공급자 대조군 플라스크의 계속

[1771] 7.3.5.1 공급자 대조군 플라스크의 제7일 카운트를 완료한 후, 3000 IU/ml IL-2를 함유하는 15 ml의 신선한 CM2 배지를 대조군 플라스크의 각각에 첨가하였다.

[1772] 7.3.5.2 대조군 플라스크를 인큐베이터로 복귀시키고, 제14일까지 정립 위치에서 인큐베이션하였다.

[1773] 제14일, 공급자 대조군 플라스크의 연장된 비-증식

[1774] 7.3.6.1 교차-오염을 방지하기 위해, 한 번에 단일 공급자 로트에 대한 플라스크를 취급하였다.

[1775] 7.3.6.2 플라스크를 인큐베이터로부터 제거하고, BSC로 옮기고, 플라스크의 바닥 상에 세포 층을 흩뜨리지 않도록 주의하였다.

[1776] 7.3.6.3 플라스크의 바닥 상에 성장하는 세포를 흩뜨리지 않고, 대략 17 ml의 배지를 각각의 대조군 플라스크로부터 제거하였다.

[1777] 7.3.6.4 5 ml 혈청학적 피펫을 사용하여, 세포를 잔류의 배지에 재현탁시키고, 잘 혼합하여 세포의 임의의 무리를 파괴하였다.

[1778] 7.3.6.5 각각의 플라스크에 대한 부피를 기록하였다.

[1779] 7.3.6.6 피펫팅함으로써 세포 현탁액을 철저하게 혼합한 후, 200 μl를 세포 카운팅을 위해 제거하였다.

[1780] 7.3.6.7 TIL을 적절한 표준 작업 절차를 자동화 세포 카운터 장비와 함께 사용하여 카운팅하였다.

[1781] 7.3.6.8 카운트를 기록하였다.

[1782] 7.3.6.9 시험되는 모든 공급자 로트에 대해 7.3.4.1 내지 7.3.4.8을 반복하였다.

[1783] **결과 및 허용 기준**

[1784] 결과

[1785] 10.1.1 감마 방사선조사의 용량은 공급자 세포를 복제 부적격이 되게 하는 데 충분하였다. 모든 로트는 평가 기준을 충족할 것으로 예상되었고, 또한 제0일에 비해 REP 배양의 제7일에 잔류하는 공급자 세포의 총 생존 수의 감소를 입증하였다.

[1786] 10.1.2 모든 공급자 로트는 REP 배양의 제7일까지 TIL 성장의 100배 확장의 평가 기준을 충족할 것으로 예상되었다.

[1787] 10.1.3 공급자 대조군 플라스크의 제14일 카운트는 제7일에 나타난 비-증식적 경향을 계속할 것으로 예상되었다.

[1788] 허용 기준

[1789] 10.2.1 하기 허용 기준은 공급자 세포의 각각의 로트에 대해 시험된 각각의 반복실험 TIL 계통에 대해 충족되었다.

[1790] 10.2.2 허용은 하기와 같이 2배였다 (하기 표에 개요됨).

[1791] <표 22>

[1792] 허용 기준

[1793]

시험	허용 기준
MNC의 방사선조사 / 복제 부적격	7일 및 14일에 성장이 관찰되지 않음
TIL 확장	각각의 TIL의 적어도 100배 확장 (최소 1.3 x 10^7개의 생존 세포)

[1794] 10.2.2.1 방사선의 용량이 MNC 공급자 세포가 30 ng/ml OKT3 항체 및 3000 IU/ml IL-2의 존재 하에서 배양되는 경우 복제 부적격이 되는 데 충분한지 여부를 평가하였다.

[1795] 10.2.2.1.1 복제 부적격을 REP의 제7일 및 제14일에 자동화 세포 카운팅에 의해 측정된 바와 같은 총 생존 세포 카운트 (TVC)에 의해 평가하였다.

[1796] 10.2.2.1.2 허용 기준은 "성장 없음 (No Growth)"이었으며, 이는 총 생존 세포 수가 REP의 제0일에 배양에 들어간 초기 생존 세포 수로부터 제7일 및 제14일에 증가되지 않았음을 의미한다.

[1797] 10.2.2.2 TIL 확장을 지지하는 공급자 세포의 능력을 평가하였다.

[1798] 10.2.2.2.1 TIL 성장을 REP의 제0일에 배양의 개시로부터 REP의 제7일까지의 생존 세포의 배수 확장의 관점에서 측정하였다.

[1799] 10.2.2.2.1 제7일에, TIL 배양물은 자동화 세포 카운팅에 의해 평가된 바와 같이, 최소 100배 확장 (즉, REP 제0일에 배양에 들어간 총 생존 TIL 세포 수의 100배 초과)을 달성하였다.

[1800] 10.2.2.3 로트가 상기 2가지 기준을 충족시키는 데 실패한 경우, 로트를 하기 섹션 10.3에 개요된 긴급사태 대책에 따라 재시험하였다.

[1801] 10.2.2.4 실패한 로트의 재시험 후, 원래 평가 및 긴급사태 시험 둘 다에서 2가지 허용 기준을 충족시키지 않은 임의의 MNC 공급자 로트를 제외하였다.

[1802] 10.2.2.5 허용 기준을 충족시키지만, 동일한 사전-REP TIL 계통과 병행하여 시험된 다른 이전의 공급자 로트에 비해 TIL을 확장시키는 능력에 관하여 저조한 성능을 갖는 것으로 판단된 임의의 MNC 공급자 로트를 제외하였다.

[1803] 허용 기준을 충족시키지 않는 MNC 공급자 로트의 긴급사태 시험

[1804] 10.3.1 MNC 공급자 로트가 상기 섹션 10.2에 개요된 허용 기준 중 어느 하나를 충족시키지 않는 경우, 그의 원인으로서 단순 실험자 오차를 배제하기 위해 하기 단계를 취하여 로트를 재시험할 것이다.

[1805] 10.3.2 로트의 2개 이상의 잔류의 위성 시험 바이알이 있는 경우, 로트를 재시험하였다. 로트의 잔류의 위성 시험 바이알이 1개 있거나, 없는 경우, 로트는 상기 섹션 10.2에 열거된 허용 기준에 따라 실패하였다.

[1806] 10.3.3 해당 로트를 평가한 원래 사람을 포함하여 2명의 훈련된 인원은 둘 다 동시에 로트를 시험하였다.

[1807] 10.3.4 섹션 7.2 내지 7.3을 반복하는 것을 수행하여 해당 로트를 재-평가하였다.

[1808] 10.3.5 각각의 사람은 해당 로트 뿐만 아니라 대조군 로트를 시험하였다 (상기 섹션 7.2.4에서 정의된 바와 같음).

[1809] 10.3.6 정성화되기 위해, 해당 로트 및 대조군 로트는 긴급사태 시험을 수행하는 인원 둘 다에 대해 섹션 10.2의 허용 기준을 달성해야 했다.

[1810] 10.3.7 이들 기준을 충족시킬 때, 로트를 상기 섹션 10.2에 개요된 바와 같이 CMO 사용을 위해 방출하였다.

[1811] **실시예 14: 감마-방사선조사된 말초 혈액 단핵 세포의 개별적 로트를 정성화하기**

[1812] 이 실시예는 본원에 기재된 예시적인 방법에서 동종이형 공급자 세포로서 사용하기 위한 감마-방사선조사된 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 개별적 로트를 정성화하기 위한 신규한 간략화된 절차를 기재한다. 이 실시예는 TIL의 임상적 로트의 제조에 사용하기 위한 방사선조사된 PBMC 세포 로트의 평가를 위한 프로토콜을 제공한다. 각각의 방사선조사된 PBMC 로트를 개별적 공여자로부터 제조하였다. 100개 초과의 정성화 프로토콜의 과정에 걸쳐, 모든 경우에서, SDBB (샌 디에고 혈액 은행 (San Diego Blood Bank))로부터의 방사선조사된 PBMC 로트는 REP의 제7일에 TIL을 100배 초과 확장시켰다. 이 변형된 정성화 프로토콜은 SDBB로부터의 방사선조사된 공여자 PBMC 로트에 적용하는 것으로 의도되었고, 이는 그 후 감마 방사선의 받은 용량이 이들을 복제 부적격이 되게 하는 데 충분한 지를 확인하기 위해 추가로 시험되었다. 일단 이들이 14일의 과정에 걸쳐 복제 부적격을 유지한 것으로 입증되면, 공여자 PBMC 로트를 TIL의 임상적 로트를 제조하는 데 사용하기에 "자격이 있는" 것으로 간주하였다.

[1813] 핵심 용어 및 정의

[1814] μg - 마이크로그램

[1815] μl - 마이크로리터

[1816] AIM-V - 시판되는 세포 배양 배지 생물학적 안전성 캐비닛

[1817] BSC - 분화 클러스터

[1818] CD - TIL #2에 대한 완전 배지

[1819] CM2 - 3000 IU/ml IL-2로 보충된 CM2

[1820] CM2IL2 - 위탁 제조 기관

[1821] CO_2 - 이산화탄소

[1822] EtOH - 에탄올

[1823] GMP - 우수 제조 관례

[1824] Gy - 그레이

[1825] IL - 인터루킨

[1826] IU - 국제 단위

[1827] LN2 - 액체 질소

[1828] MI - 밀리리터

[1829] NA - 적용되지 않음

[1830] OKT3 - 항-CD3 모노클로날 항체 명칭

[1831] P20 - 2 내지 20 μl 피페터

[1832] P200 - 20 내지 200 μl 피페터

[1833] PBMC - 말초 혈액 단핵 세포

[1834] P1000 - 100 내지 1000 μl 피페터

[1835] PPE - 개인 보호 장비

[1836] REP - 급속 확장 프로토콜

[1837] SDBB - 샌 디에고 혈액 은행

[1838] TIL - 종양 침윤 림프구

[1839] T25 - 25 cm2 조직 배양 플라스크

[1840] x g - "중력 배수" - 상대 원심분리력의 척도

[1841] 시편은 방사선조사된 공여자 PBMC (SDBB)를 포함한다.

[1842] 절차

[1843] 배경

[1844] 7.1.1 감마-방사선조사된, 성장-정지된 PBMC는 TIL의 현재의 표준 REP에 요구되었다. PBMC 상의 막 수용체는 항-CD3 (클론 OKT3) 항체에 결합하고, 배양물에서 TIL에 가교하여, TIL이 확장되도록 자극한다. PBMC 로트를 개별적 공여자로부터 취해진 전혈의 백혈구성분채집술로부터 제조하였다. 백혈구성분채집술 생성물을 피콜-하이파크 상에서 원심분리하고, 세척하고, 방사선조사하고, GMP 조건 하에서 냉동보존하였다.

[1845] TIL 요법을 받은 환자가 생존 PBMC로 주입되지 않는 것은, 이것이 이식편-대-숙주 질환 (GVHD)을 초래할 수 있기 때문에 중요하다. 따라서, 공여자 PBMC를 세포를 감마-방사선조사로 투여함으로써 성장-정지시키며, 이는 재배양 시 이중 가닥 DNA 파손 및 PBMC의 세포 생존력의 소실을 초래한다.

[1846] 평가 기준

[1847] 7.2.1 방사선조사된 PBMC 로트에 대한 평가 기준은 그들의 복제 부적격성이었다.

[1848] 실험 설정

[1849] 7.3.1 공급자 로트를 이들이 정립 T25 조직 배양 플라스크를 사용하여 TIL과 공동-배양된 것처럼, 미니-REP 형식으로 시험하였다.

[1850] 7.3.1.1 대조군 로트: 역사적으로 7.2.1의 기준을 충족시킨 것으로 나타난 방사선조사된 PBMC의 하나의 로트를 대조군으로서 실험 로트와 나란히 실행하였다.

[1851] 7.3.2 시험된 방사선조사된 공여자 PBMC의 각각의 로트에 대해, 이중 플라스크를 실행하였다.

[1852] 실험 프로토콜

[1853] 이 프로토콜에서 모든 조직 배양 작업은 BSC에서 멸균 기법을 사용하여 수행되었다.

[1854] 제0일

[1855] 7.4.1 시험되는 공여자 PBMC의 각각의 로트에 대해 약 90 ml의 CM2 배지를 제조하였다. CM2를 37℃ 수조에서 따뜻하게 유지하였다.

[1856] 7.4.2 6 × 10^6 IU/ml IL-2의 분취물을 해동시켰다.

[1857] 7.4.3 CM2 배지를 BSC로 복귀시키고, 70% EtOH로 닦은 후, 후드에 정치하였다. 시험된 PBMC의 각각의 로트에 대해, 별개의 멸균 병에 대해 약 60 ml의 CM2를 제거하였다. 해동된 6 × 10^6 IU/ml 스톡 용액으로부터의 IL-2를 3000 IU/ml의 최종 농도를 위해 이 배지에 첨가하였다. 이 병을 이를 비보충된 CM2로부터 구별하기 위해 "CM2/IL2" (또는 유사한 것)로 표지하였다.

[1858] 7.4.4 시험되는 PBMC의 각각의 로트에 대한 2개의 T25 플라스크를 표지하였다. 최소 표지는 하기를 포함하였다:

[1859] 7.4.4.1 로트 번호

[1860] 7.4.4.2 플라스크 번호 (1 또는 2)

[1861] 7.4.4.3 배양의 개시의 날짜 (제0일)

[1862] OKT3을 제조하기

[1863] 7.4.5 항-CD3 (OKT3)의 스톡 용액을 4℃ 냉장고로부터 꺼내고, BSC에 정치하였다.

[1864] 7.4.6 30 ng/ml OKT3의 최종 농도를 미니-REP의 배지에 사용하였다.

[1865] 7.4.7 1 mg/ml 스톡 용액으로부터 항-CD3 (OKT3)의 10 μg/ml 작업 용액을 제조하였다. 필요할 때까지 냉장고에 정치하였다.

[1866] 7.4.7.1 시험된 각각의 PBMC 로트에 대해, 항-CD3 (OKT3) 스톡의 1:100 희석액 150 μl를 제조하였다.

[1867] 예를 들어, 한 번에 4개의 PBMC 로트를 시험하기 위해, 6 μl의 1 mg/ml 스톡 용액을 3000 IU/ml IL-2로 보충된 594 μl의 CM2에 첨가함으로써 600 μl의 10 μg/ml 항-CD3 (OKT3)을 제조하였다.

[1868] 플라스크를 제조하기

[1869] 7.4.8 CM2/IL-2의 플라스크 당 19 ml를 표지된 T25 플라스크에 첨가하고, 플라스크를 37℃, 습화된, 5% CO_2 인큐베이터에 세포를 제조하는 동안 정치하였다.

[1870] 방사선조사된 PBMC를 제조하기

[1871] 7.4.9 로트의 잠재적 교차-오염을 회피하기 위해 각각의 공여자 PBMC 로트로 개별적으로 작업하였다.

[1872] 7.4.10 시험되는 PBMC 로트의 바이알을 LN2 저장고로부터 회수하였다. 이들을 해동시키기 전에 -80℃에서 정치하거나, 드라이 아이스 상에서 유지하였다.

[1873] 7.4.11 30 ml의 CM2 (IL-2 보충 없음)를 각각의 로트가 해동되게 하기 위해 50 ml 원뿔형 튜브 내로 정치하였다. 각각의 튜브를 해동되는 PBMC의 상이한 로트 번호로 표지하였다. 튜브를 긴밀하게 캡핑하고, 사용 전에 37℃ 수조에 정치하였다. 필요에 따라, 50 ml 원뿔형 튜브를 BSC로 복귀시키고, 70% EtOH로 닦은 후, 후드에 정치하였다.

[1874] 7.4.12 바이알 PBMC을 차가운 저장고로부터 제거하고, 해동시키기 위해 37℃ 수조 중의 부유 튜브 랙에 정치하였다. 소량의 얼음이 바이알에 잔류할 때까지 해동을 진행하였다.

[1875] 7.4.13 해동된 바이알을 70% EtOH로 분무하거나 닦고, BSC로 옮겼다.

[1876] 7.4.14 멸균 이동 피펫을 사용하여, 바이알의 내용물을 50 ml 원뿔형 튜브 중의 30 ml의 CM2 내로 즉시 옮겼다. 약 1 ml의 배지를 튜브로부터 제거하여 바이알을 세정하고; 세정물을 50 ml 원뿔형 튜브로 복귀시켰다. 긴밀하게 캡핑하고, 부드럽게 선회시켜 세포를 세척하였다.

[1877] 7.4.15 400 × g에서 5분 동안 실온에서 원심분리하였다.

[1878] 7.4.16 상청액을 흡인하고, 세포 펠릿을 1000 μl 피펫 팁을 사용하여 1 ml의 따뜻한 CM2/IL-2에 재현탁시켰다. 대안적으로, 배지를 첨가하기 전에, 세포 펠릿을 캡핑된 튜브를 비어 있는 튜브 랙을 따라 끎으로써 재현탁시켰다. 세포 펠릿을 재현탁시킨 후, CM2/IL-2 배지를 사용하여 부피가 4 ml가 되게 하였다. 부피를 기록하였다.

[1879] 7.4.17 작은 분취물 (예를 들어, 100 μl)을 자동화 세포 카운터를 사용한 세포 카운팅을 위해 제거하였다.

[1880] 7.4.17.1 카운트를 특정 자동화 세포 카운터 SOP에 따라 이중으로 수행하였다. 필시, 세포 카운트를 수행하기 전에 PBMC의 희석을 수행하는 것이 필요하였다. 권고된 시작 희석은 1:10이었지만, 이는 사용된 세포 카운터의 유형에 따라 다양하였다.

[1881] 7.4.17.2 카운트를 기록하였다.

[1882] 7.4.18 PBMC의 농도를 CM2/IL-2 배지를 사용하여 단계 7.4.15.2에서의 워크시트에 따라 1.3 × 10^7개의 세포/ml로 조정하였다. 부드럽게 선회시킴으로써 또는 혈청학적 피펫을 사용하여 상하로 부드럽게 흡인함으로써 잘 혼합하였다.

[1883] 배양 플라스크를 설치하기

[1884] 7.4.19 2개의 표지된 T25 플라스크를 조직 배양 인큐베이터로부터 BSC로 복귀시켰다.

[1885] 7.4.20 항-CD3/OKT3의 10 μg/ml 바이알을 BSC로 복귀시켰다.

[1886] 7.4.21 1 ml의 1.3 × 10^7개의 PBMC 세포 현탁액을 각각의 플라스크에 첨가하였다.

[1887] 7.4.22 60 μl의 10 μg/ml 항-CD3/OKT3을 각각의 플라스크에 첨가하였다.

[1888] 7.4.23 캡핑된 플라스크를 조직 배양 인큐베이터로 흩뜨림 없이 성장의 14일 동안 복귀시켰다.

[1889] 7.4.24 항-CD3/OKT3 바이알을 다음 로트에 대해 필요할 때까지 냉장고 내로 다시 정치하였다.

[1890] 7.4.25 평가되는 PBMC의 각각의 로트에 대해 단계 7.4.9 내지 7.4.24를 반복하였다.

[1891] 제14일, PBMC의 비-증식의 측정

[1892] 7.4.26 각각의 로트로 독립적으로 작업하면서, 이중 T25 플라스크를 BSC로 주의깊게 복귀시켰다.

[1893] 7.4.27 각각의 플라스크에 대해, 신선한 10 ml 혈청학적 피펫을 사용하여, 약 17 ml를 플라스크의 각각으로부터 제거한 후, 잔류의 배지를 주의깊게 뽑아내어 플라스크에 잔류하는 부피를 측정하였다. 부피를 기록하였다.

[1894] 7.4.28 동일한 혈청학적 피펫을 사용하여 상하로 피펫팅함으로써 샘플을 잘 혼합하였다.

[1895] 7.4.29 200 μl 샘플을 카운팅을 위해 각각의 플라스크로부터 제거하였다.

[1896] 7.4.30 세포를 자동화 세포 카운터를 사용하여 카운팅하였다.

[1897] 7.4.31 평가되는 PBMC의 각각의 로트에 대해 단계 7.4.26 내지 7.4.31을 반복하였다.

[1898] 결과 및 허용 기준

[1899] 결과

[1900] 10.1.1 감마 방사선조사의 용량은 공급자 세포를 복제 부적격이 되게 하는 데 충분할 것으로 예상되었다. 모든 로트는 평가 기준을 충족시킬 것으로 예상되었으며, 이는 제0일에 비해 REP 배양의 제14일에 잔류하는 공급자 세포의 총 생존 수의 감소를 입증한다.

[1901] 허용 기준

[1902] 10.2.1 하기 허용 기준은 시험된 각각의 방사선조사된 공여자 PBMC 로트에 대해 충족되었다.

[1903] 10.2.2 "성장 없음" - 제14일에 생존 세포의 총 수가 REP의 제0일에 배양에 들어간 초기 생존 세포 수 미만이었음을 의미하였다.

[1904] 10.2.3 로트가 상기 기준을 충족시키는 데 실패할 경우, 로트를 섹션 10.4에 개요된 긴급사태 시험 절차에 따라 재시험하였다.

[1905] 10.2.4 실패한 로트의 재시험 후, 원래 평가 및 긴급사태 시험 둘 다에서 허용 기준을 충족시키지 않은 임의의 MNC 공급자 로트를 제외하였다.

[1906] 허용 기준을 충족시키지 않는 PBMC 로트의 긴급사태 시험.

[1907] 10.4.1 방사선조사된 공여자 PBMC 로트가 상기 허용 기준을 충족시키지 않은 경우, 그의 실패의 원인으로서 단순한 실험자 오차를 배제하기 위해 하기 단계를 취하여 로트를 재시험하였다.

[1908] 10.4.2 로트의 2개 이상의 잔류의 위성 바이알이 있는 경우, 로트를 재시험하였다. 로트의 잔류의 위성 바이알이 1개 있거나, 없는 경우, 로트는 상기 섹션 10.2에 열거된 허용 기준에 따라 실패하였다.

[1909] 10.4.3 가능할 때마다, 2명의 훈련된 인원 (바람직하게는 해당 로트를 평가한 원래 사람을 포함함)은 2개의 별개의 바이알의 시험을 독립적으로 수행하였다. 이는 긴급사태 시험의 바람직한 방법이었다. PBMC의 별개의 바이알 이외에, 동일한 시약은 둘 다의 인원에 의해 사용될 수 있다.

[1910] 10.4.3.1. 2명의 인원이 이용가능하지 않은 경우, 1명의 사람은 각각의 바이알로 독립적으로 작업하면서 실패한 로트에 대해 2개의 PBMC 바이알의 시험을 수행하였다.

[1911] 10.4.4 섹션 7.4 "실험 프로토콜"을 반복하는 것을 수행하여 해당 로트를 재-평가하였다.

[1912] 10.4.5 해당 로트 외에도, 대조군 로트를 긴급사태 시험을 수행하는 각각의 사람에 의해 시험하였다.

[1913] 10.4.5.1 2명의 인원이 긴급사태 시험을 수행하는 경우, 둘 다의 인원은 대조군 로트를 독립적으로 시험하였다.

[1914] 10.4.5.2 단지 한 명의 사람이 긴급사태 시험을 수행하는 데 이용가능한 경우, 대조군 로트가 이중으로 실행되는 것이 필요하지는 않았다.

[1915] 10.4.5.3 정성화되기 위해, 긴급사태 시험을 통과하는 PBMC 로트는 둘 다의 대조군 로트를 가졌으며, 해당 로트의 둘 다의 반복실험은 섹션 10.2의 허용 기준의 통과를 달성한다.

[1916] 10.4.5.4 이 기준을 충족시킬 때, 로트를 섹션 10.2에 개요된 바와 같이 CMO 사용을 위해 방출하였다.

[1917] **실시예 15: 셀로미터 IC2 화상 세포측정기 자동 세포 카운터**

[1918] 이 실시예는 셀로미터 K2 화상 세포측정기 자동 세포 카운터의 작동을 위한 절차를 기재한다.

[1919] 1. **정의**

[1920] μl 마이크로리터

[1921] AOPI 아크리딘 오렌지 프로피듐 아이오딘

[1922] BSC 생물학적 안전성 캐비닛

[1923] DPBS 둘베코 포스페이트 완충 염수

[1924] ml 밀리리터

[1925] MNC 단핵 혈액 세포

[1926] NA 적용되지 않음

[1927] PBMC 말초 혈액 단핵 세포

[1928] PPE 개인 보호 장비

[1929] 사전-REP 배양의 급속 확장 프로토콜 전의 초기 TIL 배양

[1930] REP 급속 확장 프로토콜

[1931] TIL 종양 침윤 림프구

[1932] 7. **절차**

[1933] 7.1 세포 현탁액 제조

[1934] 7.1.1 트리판 블루 제조

[1935] 최종 트리판 블루 농도는 0.1%였다. 제조자는 0.2%의 스톡 용액을 제조하는 것을 권고하였다.

[1936] 7.1.1.1 셀로미터 K2 상의 트리판 블루를 사용하는 경우, 스톡 (0.4 %)을 PBS로 0.2 %로 희석하였다.

[1937] 7.1.1.2 트리판 블루를 0.2 내지 0.4 마이크로미터 필터로 여과하고, 작은 부피로 표지된, 캡핑된 튜브 내로 분취하였다.

[1938] 7.1.1.3 세포 현탁액을 1:1로 0.2 % 트리판 블루와 혼합하였다.

[1939] 7.1.2 AOPI 제조

[1940] 7.1.2.1 셀로미터 K2 상의 AOPI를 사용하여, AOPI 용액을 얻었다.

[1941] 7.1.2.2 세포 샘플을 1:1로 AOPI 용액으로 염색하였다.

[1942] 주: 고 농도 배양물을 카운팅하는 경우, 세포 샘플을 세포 배양 배지에 희석한 후, 트리판 블루 또는 AOPI로 최종 1:1 희석하였다.

[1943] 카운팅의 제조자의 제안된 범위를 사용하여 사용하기에 가장 양호한 희석을 결정하였다.

[1944] 7.2 셀로미터 K2 설정

[1945] 7.2.1 셀로미터 K2 장비를 켰다.

[1946] 7.2.2 연결된 컴퓨터 모니터 상의 셀로미터 화상 세포측정기 (Cellometer Image Cytometer) 아이콘을 선택하였다.

[1947] 7.2.3 소프트웨어의 메인 스크린 상에서, 드롭다운 박스에 열거된 검정 (Assay) 중 하나를 선택하였다.

[1948] 7.2.3.1 적절한 검정을 선택하는 경우, 세포 유형 (Cell Type) 및 화상 모드 (Image Mode)는 저절로 덧붙여진다.

[1949] 7.2.3.2 "샘플 (Sample)" 섹션 아래에, 사용자/샘플 ID 설정 (Set User/Sample ID)을 클릭하여 또다른 스크린을 열어 시편에 대한 조작자의 정보를 입력하였다.

[1950] 7.2.3.2.1 "사용자 ID"를 입력하였다. 이는 사용자의 3 문자 이니셜로 이루어질 것이다.

[1951] 7.2.3.2.2 "샘플 ID"를 입력하였다. 샘플 ID는 들어오는 시편 정보로부터 유래된다.

[1952] 7.2.3.3 희석 파라미터를 설정하였다.

[1953] 7.2.3.3.1 1:1 혼합물 외에 다른 희석이 이루어지지 않은 경우, 희석 인자는 2였다.

[1954] 7.2.3.3.2 최종 1:1 혼합물 전에 희석이 이루어진 경우, 희석 인자는 사전 희석의 2배였다.

[1955] 7.2.3.3.3 스크린의 희석 섹션에 사용된 혼합물에 따라 희석 인자를 갱신하였다. 연필 아이콘을 클릭하여 대화 스크린을 불러왔다.

[1956] 7.2.3.3.4 F1 화상 및 F2 화상 섹션이 서로 동일한 지를 확인하였다.

[1957] 7.2.3.3.5 설정이 완료된 후에 "저장" 버튼을 클릭하였다.

[1958] 7.3 세포 카운팅

[1959] 7.3.1 플라스틱 배킹을 셀로미터 카운팅 챔버 슬라이드 (SD100)의 양측으로부터 제거하고, 이를 깨끗한, 보풀 없는 와이프의 상부에 정치하였다.

[1960] 7.3.2 세포 현탁액을 제조한 후, 샘플의 작은 분취물을 제거하고, 이를 다중웰 세포 배양 플레이트 또는 튜브의 웰 내로 옮겼다.

[1961] 7.3.3 샘플을 희석하는 경우, 세포 배양 배지를 사용하여 희석을 수행하였다.

[1962] 7.3.4 20 I11의 세포 현탁액을 다중웰 세포 배양 플레이트 또는 튜브의 웰 내로 첨가하였다.

[1963] 7.3.5 20 111의 0.2% 트리판 블루 또는 AOPI 용액을 20111의 세포 현탁액에 첨가하고, 샘플을 철저하게 혼합하였다.

[1964] 7.3.6 20 IA의 1:1 용액을 측정하고, 이를 카운팅 챔버의 한 측 내로 옮겼다.

[1965] 주: 슬라이드의 투명 영역을 터치하는 것을 회피하였다.

[1966] 7.3.7 필요할 경우, 샘플을 슬라이드의 다른 측 상에서 반복하였다. 7.3.8. 챔버를 셀로미터의 앞면 상의 슬롯 내로 삽입하였다.

[1967] 7.3.8 AOPI 세포 카운팅을 위해, 메인 스크린 상의 "Fl 미리보기 (Preview Fl)"를 클릭하여 녹색 형광 화상 (살아있는 세포) 화상을 미리보기하였다. 트리판 블루 카운팅을 위해, "명시야 미리보기 (Preview Brightfield)"를 클릭하였다.

[1968] 7.3.9 초점 맞추개를 사용하여, 화상을 광학 초점 내로 가져왔다. 세포는 밝은 중심 및 명백하게-한정된 모서리를 가졌다.

[1969] 7.3.10 "카운트"를 클릭하여 카운팅 프로세스를 시작하였다.

[1970] 7.3.11 결과가 카운팅 프로세스의 결과를 나타내는 컴퓨터 스크린 상의 카운팅 결과 팝-업 박스에 표시되었다.

[1971] **실시예 16: IL-2 스톡 용액 (셀제닉스)의 제조**

[1972] 이 실시예는 정제된, 동결건조된 재조합 인간 인터루킨-2를 rhIL-2를 사용하는 것을 포함하는 것들을 비롯한, 본 출원 및 실시예에 기재된 것들 모두를 포함하는 추가의 조직 배양 프로토콜에 사용하기에 적합한 스톡 샘플 내로 용해시키는 프로세스를 기재한다.

[1973] **3. 정의/약어**

[1974] μL: 마이크로리터

[1975] BSC: 생물학적 안전성 캐비닛

[1976] BSL2: 생물안전성 수준 2

[1977] D-PBS: 둘베코 포스페이트 완충 염수

[1978] G: 게이지

[1979] GMP: 우수 제조 프로세싱

[1980] HAc: 아세트산

[1981] HSA: 인간 혈청 알부민

[1982] mL: 밀리리터

[1983] NA: 적용되지 않음

[1984] PPE: 개인 보호 장비

[1985] rhIL-2; IL-2: 재조합 인간 인터루킨-2

[1986] COA: 분석 성적서

[1987] 6. **절차**

[1988] 6.1 0.2% 아세트산 용액 (HAc)을 제조하였다.

[1989] 6.1.1 29 mL 멸균수를 50 mL 원뿔형 튜브로 옮겼다.

[1990] 6.1.2 1 mL 1N 아세트산을 50 mL 원뿔형 튜브에 첨가하였다.

[1991] 6.1.3 튜브를 2 내지 3회 뒤집음으로써 잘 혼합하였다.

[1992] 6.1.4 HAc 용액을 스테리플립 (Steriflip) 필터를 사용한 여과에 의해 멸균하였다.

[1993] 6.1.5 캡핑하고, 날짜기입하고, 용액을 "멸균 0.2% 아세트산 용액 (Sterile 0.2% Acetic Acid Solution)"으로 표지하였다.

[1994] 6.1.6 용액은 2개월 후에 만료되었다. 실온에서 저장하였다.

[1995] 6.2 PBS 중 1% HSA를 제조하였다.

[1996] 6.2.1 4 mL의 25% HSA 스톡 용액을 150 mL 멸균 필터 유닛 중 96 mL PBS에 첨가하였다.

[1997] 6.2.2 용액을 여과하였다.

[1998] 6.2.3 캡핑하고, 날짜기입하고, 용액을 "PBS 중 1% HSA"로 표지하였다.

[1999] 6.2.4 용액은 2개월 후에 만료되었다. 4℃에서 저장하였다.

[2000] 6.3 제조된 rhIL-2의 각각의 바이알에 대해, 양식을 채워넣었다.

[2001] 6.4 rhIL-2 스톡 용액 (6×10^6 IU/mL 최종 농도)을 제조하였다.

[2002] 6.4.1 rhIL-2의 각각의 로트는 상이하였으며, 제조자의 분석 성적서 (COA)에서 발견된 정보, 예컨대 하기를 요구하였다:

[2003] 6.4.1.1 바이알 당 rhIL-2의 질량 (mg)

[2004] 6.4.1.2 rhIL-2의 비활성 (IU/mg)

[2005] 6.4.1.3 권고된 0.2% HAc 재구성 부피 (mL)

[2006] 6.4.2 하기 방정식을 사용함으로써 rhIL-2 로트에 요구되는 1% HSA의 부피를 계산하였다:

$$\left(\frac{\text{바이알 질량 (mg) x 생물학적 활성 } (\frac{IU}{mg})}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - HAc\ vol\ (mL) = 1\%\ HSA\ vol\ (mL)$$

[2007]

[2008] 6.4.2.1 예를 들어, 셀제닉스의 rhIL-2 로트 10200121 COA에 따라, 1 mg 바이알에 대한 비활성은 25×10^6 IU/mg이다. 이는 rhIL-2를 2 mL 0.2% HAc에서 재구성할 것을 권고한다.

$$\left(\frac{1mg\ x\ 25x10^6\ \frac{IU}{mg}}{6x10^6\ \frac{IU}{mL}}\right) - 2mL = 2.167mL\ HSA$$

[2009]

[2010] 6.4.3 IL-2 바이알의 고무 스토퍼를 알콜 와이프로 닦았다.

[2011] 6.4.4 16G 바늘을 사용하여 3 mL 시린지에 부착시키고, 권고된 부피의 0.2% HAc를 바이알 내로 주사하였다. 바늘을 빼낼 때 스토퍼가 이탈하지 않도록 주의하였다.

[2012] 6.4.5 바이알을 3회 뒤집고, 모든 분말이 용해될 때까지 선회시켰다.

[2013] 6.4.6 스토퍼를 주의깊게 제거하고, 알콜 와이프 상에 챙겨두었다.

[2014] 6.4.7 계산된 부피의 1% HSA를 바이알에 첨가하였다.

[2015] 6.4.8 바이알을 고무 스토퍼로 캡핑하였다.

[2016] 6.5 rhIL-2 용액의 저장

[2017] 6.5.1 단기 저장 (<72시간)을 위해, 바이알을 4℃에서 저장하였다.

[2018] 6.5.2 장기 저장 (>72시간)을 위해, 바이알을 보다 작은 부피로 분취하고, 사용 준비될 때까지 냉동바이알에서

-20℃에서 저장하였다. 동결/해동 사이클을 회피하였다. 제조일 후 6개월에 만료되었다.

[2019] 6.5.3 Rh-IL-2 표지는 판매자 및 카탈로그 번호, 로트 번호, 유효 기간, 조작자 이니셜, 분취물의 농도 및 부피를 포함하였다.

[2020] **실시예 17: 사전-REP 및 REP 프로세스를 위한 배지의 제조**

[2021] 이 실시예는 전이성 흑색종, 두경부 편평 세포 암종 (HNSCC), 난소 암종, 삼중-음성 유방 암종, 및 폐 선암종을 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 종양 유형으로부터 유래된 종양 침윤 림프구 (TIL)의 배양을 포함하는 프로토콜에 사용하기 위한 조직 배양 배지의 제조를 위한 절차를 기재한다. 이 배지는 본 출원 및 실시예에 기재된 TIL 중 임의의 것의 제조에 사용될 수 있다.

[2022] 3. **정의**

[2023] μg 마이크로그램

[2024] μm 마이크로미터

[2025] μM 마이크로몰

[2026] AIM-V® 혈청-무함유 조직 배양 배지 (써모 피셔 사이언티픽)

[2027] BSC 생물학적 안전성 캐비닛

[2028] CM1 완전 배지 #1

[2029] CM2 완전 배지 #2

[2030] CM3 완전 배지 #3

[2031] CM4 완전 배지 #4

[2032] IU 또는 U 국제 단위

[2033] ml 밀리리터

[2034] mM 밀리몰

[2035] NA 적용되지 않음

[2036] PPE 개인 보호 장비

[2037] 사전-REP 사전-급속 확장 프로세스

[2038] REP 급속 확장 프로세스

[2039] rhIL-2, IL-2 재조합 인간 인터루킨-2

[2040] RPMI1640 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 배지, 제형 1640

[2041] SOP 표준 작업 절차

[2042] TIL 종양 침윤 림프구

[2043] 7. **절차**

[2044] 7.1 모든 절차는 BSC (부류 II, 유형 A2)에서 멸균 기법을 사용하여 수행된다.

[2045] 7.1.1 후드의 표면을 그의 사용 전에 70% 에탄올로 분무하였다.

[2046] 7.1.2 모든 항목 및 시약을 70% 에탄올로 분무한 후, 이들을 조직 배양 후드 내로 정치하였다.

[2047] 7.2 200 mM L-글루타민을 분취하기

[2048] 7.2.1 L-글루타민을 혈청의 제조에 필요한 것보다 더 큰 부피로 공급하였다 (예를 들어, 100 ml 또는 500 ml 부피).

[2049] 7.2.2 L-글루타민의 병을 37℃ 수조에서 해동시켰다.

[2050] 7.2.3 해동 후에 L-글루타민을 그것이 해동 후에 침전되기 때문에 잘 혼합하였다. 모든 침전물이 용액으로 복귀된 것을 보장한 후, 분취하였다.

[2051] 7.2.4 L-글루타민의 5 내지 10 ml 분취물을 멸균 15 ml 원뿔형 튜브 내로 정치하였다.

[2052] 7.2.5 튜브를 농도, 판매자, 로트 번호, 분취된 날짜, 및 유효 기간으로 표지하였다.

[2053] 7.2.6 그 후, 튜브를 -20℃에서 저장하고, 필요에 따라 배지 제조를 위해 뽑아내었다.

[2054] 7.3 CM1의 제조

[2055] 7.3.1 하기 시약을 차가운 저장고로부터 제거하고, 이들을 37℃ 수조에서 가온하였다:

[2056] 7.3.1.1 RPMI1640

[2057] 7.3.1.2 인간 AB 혈청

[2058] 7.3.1.3 200 mM L-글루타민

[2059] 7.3.2 BME를 4℃ 저장고로부터 제거하고, 조직 배양 후드에 정치하였다.

[2060] 7.3.3 실온 저장고로부터의 겐타마이신 스톡 용액을 조직 배양 후드 내로 정치하였다.

[2061] 7.3.4 CM1 배지를 하기 표 23에 따라 각각의 성분을 여과되는 부피에 적절한 0.2 um 필터 유닛의 상부 섹션 내로 첨가함으로써 제조하였다.

[2062] <표 23>

[2063] CM1의 제조

[2064]

성분	최종 농도	최종 부피 500 ml	최종 부피 IL
RPMI1640	NA	450 ml	900 m1
인간 AB 혈청, 열-불활성화된 10%	50 ml	100 ml	
200mM L-글루타민	2 mM	5 ml	10 m1
55mM BME	55 μM	0.5 ml	1 ml
50mg/ml 겐타미신 술페이트	50 μg/ml	0.5 ml	1 ml

[2065] 7.3.5 CM1 배지 병을 그의 명칭, 제조자의 이니셜, 그것이 여과된/제조된 날짜, 2주 유효 기간으로 표지하고, 조직 배양에 필요할 때까지 4℃에서 저장하였다. 배지를 필요에 따라 보다 작은 부피 병 내로 분취할 수 있다.

[2066] 7.3.6 임의의 잔류의 RPMI1640, 인간 AB 혈청, 또는 L-글루타민을 배지의 다음 제조까지 4℃에서 저장하였다.

[2067] 7.3.7 BME의 스톡 병을 4℃ 저장고로 복귀시켰다.

[2068] 7.3.8 겐타미신의 스톡 병을 그의 적절한 RT 저장 위치로 복귀시켰다.

[2069] 7.3.9 배지의 제한된 완충 용량 때문에, CM1을 제조 후 2주 이하, 또는 페놀 레드 pH 지시약이 pH에 있어서 극심한 이동을 나타낸 때 (밝은 적색에서 분홍색 착색) 버렸다.

[2070] 7.3.10 사용 일에, 요구되는 양의 CM1을 37℃ 수조에서 사전가온하고, 6000 IU/m1 IL-2를 첨가하였다.

[2071] 7.3.11 추가의 보충 - 필요에 따라

[2072] 7.3.11.1 글루타맥스®로 보충된 CM1

[2073] 7.3.11.1.1 CM1은 2 mM 글루타민을 2 mM 글루타맥스™로 치환함으로써 제조될 수 있다 (최종 농도, 표 2 참조). 이를 수행한 경우, 배지 병을 CM1의 표준 제형과의 혼동을 방지하기 위해 "2 mM 글루타맥스"를 첨가하여 상기 단계 7.3.5에서와 같이 표지하였다.

[2074] 7.3.11.2 가외의 항생제/항진균제로 보충된 CM1

[2075] 7.3.11.2.1 일부 CM1 제형은 특정 종양 유형으로부터 성장된 사전-REP TIL의 오염을 방지하기 위해 추가의 항생

제 또는 항진균제를 요구하였다.

[2076] 7.3.11.2.2 항생제/항진균제를 하기 표 24에 나타내어진 최종 농도로 첨가하였다.

[2077] 7.3.11.2.3 이것을 수행한 경우, 배지 병을 CM1의 표준 제형과의 혼동을 방지하기 위해 추가의 항생제/항진균제의 명칭(들)을 첨가하여 상기 단계 7.3.1에서와 같이 표지하였다.

[2078] <표 24>

[2079] 필요에 따라, CM1의 추가의 보충.

[2080]

보충	스톡 농도	희석	최종 농도
글루타맥스Tm	200mM	1:100	2mM
페니실린/스트렙토마이신	10,000 U/ml 페니실린 10,000μg/ml 스트렙토마이신	1:100	100 U/ml 페니실린 100 μg/ml 스트렙토마이신
암포테리신 B	250μg/ml	1:100	2.5μg/ml

[2081] 7.4 CM2의 제조

[2082] 7.4.1 제조된 CM1을 냉장고로부터 제거하거나, 상기 섹션 7.3에 따라 신선한 CM1을 제조하였다.

[2083] 7.4.2 AIM-V®를 냉장고로부터 제거하였다.

[2084] 7.4.3 제조된 CM1을 멸균 배지 병에서 동등한 부피의 AIM-V®와 혼합함으로써 필요한 CM2의 양을 제조하였다.

[2085] 7.4.4 3000 IU/ml IL-2를 사용 일에 CM2 배지에 첨가하였다.

[2086] 7.4.5 사용 일에 3000 IU/ml IL-2를 갖는 충분한 양의 CM2를 제조하였다.

[2087] 7.4.6 CM2 배지 병을 그의 명칭, 제조자의 이니셜, 그것이 여과된/제조된 날짜, 2주 유효 기간으로 표지하고, 조직 배양에 필요할 때까지 4℃에서 저장하였다. 배지를 필요에 따라 보다 작은 부피 병 내로 분취하였다.

[2088] 7.4.7 IL-2를 갖지 않는 임의의 CM2를 그것이 2주 이하 동안, 또는 페놀 레드 pH 지시약이 pH에 있어서 극심한 이동을 나타낼 때까지 (밝은 적색에서 분홍색 착색) 저장될 수 있는 냉장고로 복귀시켰다.

[2089] 7.5 CM3의 제조

[2090] 7.5.1 CM3을 그것이 사용에 요구된 날에 제조하였다.

[2091] 7.5.2 CM3은 사용 일에 3000 IU/ml IL-2로 보충된 AIM-V® 배지와 동일하였다.

[2092] 7.5.3 IL-2 스톡 용액을 AIM-V의 병 또는 백에 직접적으로 첨가함으로써 실험적 필요에 충분한 CM3의 양을 제조하였다. 부드러운 진탕에 의해 잘 혼합하였다. AIM-V를 첨가한 직후 병을 "3000 IU/ml IL-2"로 표지하였다. 과량의 CM3이 있는 경우, 이를 배지 명칭, 제조자의 이니셜, 배지가 제조된 날짜, 및 그의 유효 기간 (제조 후 7일)으로 표지된 4℃의 병에 저장하였다.

[2093] 7.5.4 4℃에서 7일 저장 후 IL-2로 보충된 배지를 버렸다.

[2094] 7.6 CM4의 제조

[2095] 7.6.1 CM4는 2 mM 글루타맥스 (최종 농도)의 추가의 보충을 갖는 CM3과 동일하였다.

[2096] 7.6.1.1 모든 1 L의 CM3에 대해, 10 ml의 200 mM 글루타맥스™를 첨가하였다.

[2097] 7.6.2 IL-2 스톡 용액 및 글루타맥스™ 스톡 용액을 AIM-V의 병 또는 백에 직접적으로 첨가함으로써 실험적 필요에 충분한 CM4의 양을 제조하였다. 부드러운 진탕에 의해 잘 혼합하였다.

[2098] 7.6.3 AIM-V에 첨가한 직후 병을 "3000 IL/nil IL-2 및 글루타맥스"로 표지하였다.

[2099] 7.6.4 과량의 CM4가 있는 경우, 이를 배지 명칭, "글루타맥스", 제조자의 이니셜, 배지가 제조된 날짜, 및 그의 유효 기간 (제조 후 7일)으로 표지된 4℃의 병에 저장하였다.

[2100] 7.6.5 4℃에서의 7일 저장 후 IL-2로 보충된 배지를 버렸다.

[2101] **실시예 18: 사후 REP TIL의 표면 항원 염색**

[2102] 1. **목적**

[2103] 이 실시예는 유동 세포측정법에 의한 사후-REP TIL의 세포 표면 염색을 위한 절차를 기재한다. 이 절차는 본 출원 및 실시예에 기재된 임의의 TIL에 대해 적용될 수 있다.

[2104] 핵심 용어 및 정의

[2105] α: 알파

[2106] β: 베타

[2107] μl: 마이크로리터

[2108] APC: 알로피코시아닌

[2109] Ax647: 알렉스 플루오르 647

[2110] BD: 벡톤 디킨슨 컴퍼니 (Becton Dickinson Company)

[2111] BSA: 소 혈청 알부민

[2112] BSC: 생물학적 안전성 캐비닛

[2113] BV421: 브릴리언트 바이올렛 (Brilliant Violet) 421

[2114] CD: 분화 클러스터

[2115] CST: 세포측정기 설정 및 추적

[2116] Cy: 시아닌

[2117] DPBS: 둘베코 포스페이트 완충 염수

[2118] FACS: 형광 활성화된 세포 분류기

[2119] FBS: 소 태아 혈청

[2120] FITC: 플루오레세인 이소티오시아네이트

[2121] FMO: 형광 마이너스 원

[2122] G: 그램

[2123] H7: Cy7의 유사체

[2124] Ml: 밀리리터

[2125] PE: 피코에리트린

[2126] PerCP-Cy5.5: 페리디닌-엽록소 단백질

[2127] PPE: 개인 보호 장비

[2128] REP: 급속 확장 프로토콜

[2129] SIT: 샘플 주사 튜브

[2130] TCR: T 세포 수용체

[2131] w/v: 중량 대 부피

[2132] **유동 세포측정법 항체 및 염색**

[2133] <표 25>

[2134] 살아있는/죽은 아쿠아 염색 써모피셔 카탈로그 # L34966.

표적	형식	클론	공급원	카탈로그 번호
TCRab (즉, TCRα/β)	PE/Cy7	IP26	바이오레전드	306720
CD57	PerCP-Cy5.5	HNK-1	바이오레전드	359622
CD28	PE	CD28.2	바이오레전드	302908
CD4	FITC	OKT4	이바이오사이언스	11-0048-42
CD27	APC-H7	M-T271	비디 바이오사이언시즈	560222
CD56	APC	N901	베크만 쿨터	IM2474U
CD8a	PB	RPA-T8	바이오레전드	301033
CD45R A	PE-Cy7	HI100	비디 바이오사이언시즈	560675
CD8a	PerCP/Cy5.5	RPA-T8	바이오레전드	301032
CCR7	PE	150503	비디 바이오사이언시즈	560765
CD3	APC/Cy7	HIT3a	바이오레전드	300318
CD38	APC	HB-7	바이오레전드	356606
HLA-DR	PB	L243	바이오레전드	307633
CD69	PE-Cy7	FN50	비디 바이오사이언시즈	557745
TIGIT	PE	MBSA43	이바이오사이언스	12-9500-42
KLRG1	Ax647	SA231A2	바이오레전드	367704
CD154	BV421	TRAP1	비디 바이오사이언시즈	563886
CD137	PE/Cy7	4B4-1	바이오레전드	309818
Lag3	PE	3DS223H	이바이오사이언스	12-2239-42
PD1	APC	EH12.2H 7	바이오레전드	329908
Tim-3	BV421	F38-2E2	바이오레전드	345008

[2135]

[2136] 7. **절차**

[2137] 7.1 시약 제조

[2138] 7.1.1 FACS 세척 완충제

[2139] 7.1.1.1 2% (w/v) 열-불활성화된 FBS를 DPBS에 첨가하였다 (10 ml FBS를 490 mL의 1X dPBS에 첨가함).

[2140] 7.1.1.2 0.1% (w/v) NaN_3을 첨가하였다 (76.9 ul를 500 mL 병에).

[2141] 7.1.1.3 용액을 40℃에서 저장하였다. 30일 후에 버렸다.

[2142] 7.1.2 아쿠아 염료

[2143] 7.1.2.1 50 μl의 DMSO를 반응성 염료의 바이알에 첨가하였다.

[2144] 7.1.2.2 잘 혼합하고, 모든 염료가 용해되었는 지를 육안으로 확인하였다.

[2145] 7.1.2.3 절차에 사용되지 않은 염료를 분취하고, 다음 사용때까지 20℃에서 동결시켰다. 재차 동결/해동시키지 않았다.

[2146] 7.1.3 항체 칵테일 제조.

[2147] 7.1.3.1 칵테일을 폴리프로필렌 튜브, 예컨대 에펜도르프 (Eppendorf) 튜브에서 구성하였다.

[2148] 7.1.3.2 칵테일을 6개월 이하 동안 저장하였다.

[2149] <표 26>

[2150] 분화 패널 1 (DF1):

표적	형식	클론	공급원	카탈로그 번호	역가
TCRab (즉, TCRα/β)	PE/Cy7	IP26	바이오레전드	306720	3
CD57*	PerCP-Cy5.5	HNK-1	바이오레전드	359622	2
CD28*	PE	CD28.2	바이오레전드	302908	2
CD4	FITC	OKT4	이바이오사이언스	11-0048-42	2
CD27*	APC-H7	M-T271	비디 바이오사이언시즈	560222	3
CD56	APC	N901	베크만 쿨터	IM2474U	3
CD8a	PB	RPA-T8	바이오레전드	301033	2
FACS 완충제					33

[2151]

[2152] <표 27>

[2153] 분화 패널 2 (DF2):

표적	형식	클론	공급원	카탈로그 번호	역가
CD45RA*	PE-Cy7	HI100	비디 바이오사이언시즈	560675	1
CCD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2	비디 바이오사이언시즈	552852	2
CCCR7*	PE	150503	비디 바이오사이언시즈	560765	5
CCD8	FITC	HIT8	바이오레전드	300906	2
CCD4	APC/Cy7	OKT4	바이오레전드	317418	2
CCD38*	APC	HB-7	바이오레전드	356606	1
HHLA-DR	PB	L243	바이오레전드	307633	2
FACS 완충제					35

[2154]

[2155] <표 28>

[2156] T-세포 활성화 패널 1 (Tact1)

표적	형식	클론	공급원	카탈로그 번호	역가
CD137*	PE/Cy7	4B4-1	바이오레전드	309818	2
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2	비디 바이오사이언시즈	552852	2
Lag3*	PE	3DS223H	이바이오사이언스	12-2239-42	5
CD8	FITC	HIT8	바이오레전드	300906	2
CD4	APCCy7	OKT4	바이오레전드	317418	2
PD1*	APC	EH12.2H7	바이오레전드	329908	2
Tim-3*	BV421	F38-2E2	바이오레전드	345008	2
FACS 완충제					33

[2157]

[2158] <표 29>

[2159] T-세포 활성화 패널 2 (Tact2)

표적	형식	클론	공급원	카탈로그 번호	역가
CD69*	PE-Cy7	FN50	비디 바이오사이언시즈	557745	3
CD3	PerCP/Cy5.5	SP34-2	비디 바이오사이언시즈	552852	2
TIGIT*	PE	MBSA43	이바이오사이언스	12-9500-42	3
CD8	FITC	HIT8	바이오레전드	300906	2
CD4	APCCy7	OKT4	바이오레전드	317418	2
KLRG1*	Ax647	SA231A2	바이오레전드	367704	1
CD154*	BV421	TRAP1	비디 바이오사이언시즈	563886	3
FACS 완충제					34

[2160]

[2161] 7.2 유동 세포측정법 검정 요건

[2162] 7.2.1 유동 세포측정기 보정

[2163] 7.2.1.1 유동 세포측정기를 검정 일에 CST 비드를 제조자의 지시서에 따라 사용하여 보정하였다.

[2164] 7.2.1.2 조작자는 유동 세포측정기가 성능 및 기준선 검사가 유효한 보정을 통과하였음을 보장하였다.

[2165] 7.2.2 보상/FMO 대조군

[2166] 7.2.2.1 단일 색상 보상 샘플을 BD 보상 비드 및 ArC™ 아민 반응성 보상 비드 키트 (Amine Reactive Compensation Bead Kit)를 사용하여 제조하였다.

[2167] 7.2.2.2 FMO 대조군, 세포 함유 샘플을 항체 빼기 하기 단일 항체 접합체, CD27, CD28, 및 CD57의 칵테일로 염색하였다.

[2168] 7.2.3 MFI 표준화

[2169] 7.2.3.1 세포측정기 전압을 비드 대조군 및 표적 전압 값과 함께 매일 측정하였다.

[2170] 7.3 샘플 염색

[2171] 7.3.1 FACS 튜브를 샘플 ID-DF1, 샘플 ID-DF2, 샘플 ID-T1, 샘플 ID-T2로 표지하였다.

[2172] 7.3.2 FMO 대조군의 한 세트를 CD27-APC-H7, CD28-PE, CD57-PerCPCy5.5, CD45RA-PECy7, CCR7-PE, CD38-APC, CD137-PE7, Lag3-PE, PD1 APC, Tim3-BV421, CD69-PE7, TIGIT-PE, KLRG1-Ax647, 및 CD154-BV421로 표지하였다.

[2173] 7.3.3 50만 내지 200만개의 세포를 각각의 튜브에 첨가하였다.

[2174] 7.3.4 3 mL의 1×PBS를 각각의 튜브에 QS하였다.

[2175] 7.3.5 튜브를 400 × g, 고 가속 및 제동에서 5분 동안 회전시켰다.

[2176] 7.3.6 샘플을 원심분리하는 동안, 아쿠아 염료를 표지하는 죽은 세포를 제조하였다.

[2177] 7.3.7 아쿠아 분취물을 동결기로부터 제거하고, PBS에서 1/200 희석하였다. 어둠에서 보관하였다. 2 uL 염료를 198 uL DPBS에 첨가하였다.

[2178] 7.3.8 단계 7.3.5로부터의 상청액을 경사분리하거나 흡인하였다.

[2179] 7.3.9 상기로부터의 25 uL의 아쿠아 용액을 샘플 및 FMO 대조군에 첨가하였다.

[2180] 7.3.10 어둠에서 실온 (RT)에서 15분 동안 인큐베이션하였다.

[2181] 7.3.11 주: 세포가 초기에 단백질 무함유 배지에 저장된 경우, 실온에서 10분 동안 5 uL 트루스테인 (TruStain)과 같은 차단 단계가 첨가되어야 한다.

[2182] 7.3.12 50 uL의 항체 칵테일을 적절한 튜브에 첨가하였다.

[2183] 7.3.13 튜브 랙을 진탕하여 혼합하였다.

[2184] 7.3.14 어둠에서 실온에서 15분 동안 인큐베이션하였다.

[2185] 7.3.15 시작 및 종료 시간을 기록하였다. 3 mL의 FACS 세척 완충제를 첨가하였다.

[2186] 7.3.16 튜브를 400 × g, 고 가속 및 제동에서 5분 동안 회전시켰다.

[2187] 7.3.17 원심분리기 회전이 완료된 경우, 상청액을 경사분리하거나 흡인하였다.

[2188] 7.3.18 튜브를 비어 있는 랙을 따라 슬라이딩함으로써 세포를 재현탁시켰다.

[2189] 7.3.19 100 uL의 1% 파라포름알데히드를 각각의 튜브에 첨가하였다.

[2190] 7.3.20 유동 세포측정기 상에서 수집할 준비가 될 때까지 40℃에서 어둠에서 저장하였다.

[2191] 주: 샘플은 72시간 이하 동안 저장될 수 있다.

[2192] 7.4 L/D 아쿠아 보상 대조군.

[2193] 7.4.1 FACS 튜브를 L/D 아쿠아 보상 대조군으로서 표지하였다.

[2194] 7.4.2 Arc 비드의 한 방울을 튜브에 첨가하였다.

[2195] 7.4.3 3 μl의 L/D 아쿠아를 비드에 직접적으로 첨가하였다.

[2196] 7.4.4 튜브를 실온에서 어둠에서 10 내지 30분 동안 인큐베이션하였다.

[2197] 7.4.5 시작 및 종료 인큐베이션 시간을 워크시트 상에 기록하였다.

[2198] 7.4.6 인큐베이션 후, 3 mL의 FACS 세척을 각각의 튜브에 첨가하였다.

[2199] 7.4.7 튜브를 400 × g, 고 가속 및 제동에서 5분 동안 회전시켰다.

[2200] 7.4.8 상청액을 경사분리하거나 흡인하였다.

[2201] 7.4.9 튜브를 500 μl의 1% PFA 용액으로 재현탁시켰다. 음성 비드의 한 방울을 첨가하였다. 수집할 때까지 40℃에서 어둠에서 정치하였다.

[2202] 7.5 보상 대조군 염색.

[2203] 7.5.1 FACS 튜브를 사후-REP TIL 표현형 워크시트에 나타내어진 바와 같이 표지하였다.

[2204] 7.5.2 항체를 사후-REP TIL 표현형 워크시트에 나타내어진 바와 같이 첨가하였다.

[2205] 7.5.3 인큐베이션 후, 3 mL의 FACS 완충제를 각각의 튜브에 첨가하였다.

[2206] 7.5.4 튜브를 500g, 고 가속 및 제동에서 2분 동안 회전시켰다.

[2207] 7.5.5 상청액을 경사분리하거나 흡인하였다.

[2208] 7.5.6 튜브를 PBS 중 500 μl의 1% PFA로 재현탁시키고, 2 내지 80℃에서 어둠에서 저장하였다.

[2209] 7.6 데이터 획득

[2210] 7.6.1 FACSDiva 소프트웨어를 열고, 로그인하였다.

[2211] 7.6.2 세포측정기 미스매치 대화에서, "CST 설정 사용하기 (Use CST Settings)"를 클릭하였다.

[2212] 7.6.3 "실험 (Experiment)" 탭을 클릭하고, "연장된 표현형 (Extended Phenotype)" 템플레이트를 선택함으로써 새로운 실험을 생성하였다.

[2213] 7.6.4 표적 값 (Target Values) 실험을 더블 클릭하고, 전압을 유동 코어 조작자에 의해 측정된 표적 값에 도달하도록 조정하였다.

[2214] 7.6.5 기기 설정을 복사하고, 이들을 새로운 실험 상으로 붙였다.

[2215] 7.6.6 각각의 개체에 대한 시편을 생성하고, 이를 적절하게 명명하였다.

[2216] 7.6.7 샘플에 대한 명칭을 그들의 튜브 상의 표지에 따라 생성하였다.

[2217] 7.6.8 부드럽게 볼텍싱하거나, 손가락으로 플릭한 후, 튜브를 SIT에 정치하였다.

[2218] 7.6.9 기록 (RECORD) 하의 데이터를 획득 (Acquisition) 보드에서 획득하였다.

[2219] 7.6.10 샘플을 초 당 7,500 사건 미만의 속도로 실행하였다.

[2220] 7.6.11 데브리스를 제외하고 50,000 내지 100,000개의 살아있는 사건을 수집하였다.

[2221] **실시예 19: 프로세스 2A 확인 프로세스 개발**

[2222] 이 실시예에서의 실험을 완료하여 사전-REP 절차, 이어서 변형된 REP에서의 종양으로부터의 TIL의 결과물을 비롯한 흑색종 및 단일 유방암의 환자-유래된 종양으로부터의 TIL의 제조를 위한 프로세스 2A를 분석하였다. 동결된 TIL 생성물의 확립 및 현재의 신선한 TIL 생성물 프로세스 (프로세스 1C)에 대한 동결된 TIL 생성물의 성능의 비교에 강조를 두었다. 이 보고는 유사한 프로파일이 신선한 및 해동된 중요한 품질 속성 (세포 수, % 생존력, % CD3+ T-세포, 및 비드-자극된 감마 인터페론 (IFN-γ) 생산) 뿐만 아니라 동일한 TIL 생성물이 신선한지 동결되든지 재-자극 연장된 표현형 절차 (재REP)의 평가에서 관찰됨을 입증할 것이다. 이 결론을 지지하기 위해 제시된 데이터는 증식, 생존력, 표현형, IFN-γ 방출, 효능, 텔로미어 길이, 및 대사적 활성을 포함한다. 결과는 프로세스 2A, 단축된 사전-REP/REP 프로세스, 이어서 TIL의 냉동보존을 특징규명할 뿐만 아니라, 2A 프로세스를 본원에 기재된 바와 같이 보다 긴 1C 프로세스와 비교한다.

[2223] 종양 공여자 설명, 프로세싱 날짜 및 프로세싱 위치는 하기 표 1에서 발견될 수 있다 (*는 REP가 동결된 사전-REP TIL 계통을 사용하여 시작되었음을 지시함):

[2224] <표 30>

[2225] 종양 공여자의 설명, 프로세싱 날짜 및 프로세싱 위치.

종양 ID	조직 유형	공급원	조직
M1061	흑색종	**MT** 그룹	원발성 - 좌측 측면 발
M1062	흑색종	모피트	**N/A**
M1063	흑색종	**MT** 그룹	전이성 **C-** 우측 사타구니
M1064	흑색종	**MT** 그룹	전이성 **C-** 좌측 발목
M1065	흑색종	바이오옵션즈	전이성-보조 림프절
EP11001	**ER+PR+**	**MT** 그룹	원발성- 좌측 유방 침습성 관 암종
M1056*	흑색종	모피트	**N/A**
M1058*	흑색종	**MT** 그룹	전이성- 단계 **IIB** 우측 두피
M1023*	흑색종	아틀란틱 헬스	원발성-우측 겨드랑이

[2226]

[2227] **3. 배경 정보**

[2228] 3.1 LN-144는 전이성 흑색종을 갖는 환자를 치료하기 위한 면역치료 생성물이다. 상기 생성물은 종양의 외과적 절제 후 개별적 환자로부터 얻어지고, 세절된 종양 단편 (사전-REP)의 세포 배양, 이어서 고 용량 IL-2, 항-CD3, 및 공동-자극성 APC의 존재 하에서의 TIL의 급속 확장을 통해 생체외에서 확장된 자가 종양-침윤 T 림프구 (TIL)로 구성되었다. 비-골수절제 림프구고갈 사전컨디셔닝 후, 환자는 그의/그녀의 TIL의 단일 주입 및 후속의 알데스루킨 (IL-2)의 정맥내 주입을 최대 6개의 용량 동안 8시간마다 받았다. 종양 미세환경 (TNE) 내의 손상 연관된 분자 패턴 분자 (Damage Associated Molecular Pattern Molecule) (DAMP)의 환경에서 TIL 확장의 대안적 방법을 포함하는 연구는 또한 요법에 유용한 T-세포의 효과적인 확장을 입증하였다 (Donia 2014; Sommerville, 2012).

[2229] TIL의 상업적 생산에 사용된 프로세스 1C는 면역고갈된 환자에게 24시간 내에 전달되는 주입가능한 TIL 생성물을 생산하는 데 약 45 내지 55일이 걸릴 수 있는 생산 스케줄을 포함한다. 수용자 환자의 면역고갈은 현재의 TIL 생성물의 수확과 정확하게 시기적절해야 한다. 신선한 생성물의 수확 또는 전달의 지연은 주입을 기다리는 면역고갈된 환자에게 부정적으로 영향을 미칠 수 있다. 프로세스 2A는 사전-REP 및 REP 절차 둘 다의 감소된 길이로 인해 제조 소요 시간 및 물질을 감소시킴으로써 프로세스 1C를 개선시켰다. 또한, 프로세스 2A는 생성물 선적 시간에 대한 유연성을 증가시켰다. 사전-REP, REP 및 프로세스의 수확에서 프로세스 1C 및 프로세스 2A의 차이 (표 2 참조)는 하기를 포함한다:

[2230] 3.1.1 사전-REP 절차에 사용된 증가된 종양 단편 용량을 갖는 더 큰 플라스크.

[2231] 3.1.2 닫힌 계를 사용하거나, 닫힌 계에 대한 장래의 적응을 처리할 수 있는 단계.

[2232] 3.1.3 사전-REP 및 REP 절차 둘 다에서 감소된 일의 수.

[2233] 3.1.4 REP로 진행하기 위한 사전-REP TIL의 특이적 집단을 선택하기 전에 사전-REP 집단을 표현형결정할 필요를 제거하는 REP로의 직접 접근법.

[2234] 3.1.5 TIL의 충분한 확장을 위해 계산된 항-CD3 (클론 OKT3)과 함께 방사선조사된, 동종이형 PBMC APC의 사전-세트 수와의 공동-배양.

[2235] 3.1.6 수확을 위한 자동화 세포-세척 시스템.

[2236] 3.1.7 선적 전에 냉동-보존된 CS10-기재 최종 제형.

[2237] <표 31>

[2238] 프로세스 1C에 대한 프로세스 2A의 영향.

프로세스 단계	프로세스 1C	프로세스 2A	영향
단계 A: 환자 종양 샘플을 얻기	• 수술 후, 수확 후 및 단계 B 전에 동결될 수 있다.	• 수술 후, 수확 후 및 단계 B 전에 동결될 수 있다.	• 동일.
단계 B: 제1 확장	• 물리적 단편화 • 10개의 G-렉스 -10 플라스크 당 4개의 단편 • 11 내지 21일 지속기간 • 성장 배지 배지는 IL-2를 포함한다	• 물리적 단편화 • 1개의 G-렉스 -100M 플라스크 당 40개의 단편 • 11일 지속기간 (3일 내지 14일 범위) • 성장 배지 배지는 IL-2를 포함한다	• 플라스크 당 증가된 종양 단편 • 단축된 배양 시간 • 감소된 단계의 수 • 닫힌 계를 처리할 수 있음
단계 C: 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행	• 단계 B TIL을 선택을 위해 표현형결정될 때까지 동결한 후, 해동시켜 단계 D로 진행한다 (약 제30일) • 단계 D는 >40x10^{6}개의 TIL을 요구한다	• 단계 B TIL은 단계 B 제11일에 단계 D로 직접적으로 이동한다 • 단계 D는 25 내지 200x10^{6}개의 TIL을 요구한다	• 단축된 사전-REP에서 REP까지의 프로세스 • 감소된 단계의 수 • 제거된 표현형결정 선택 • 닫힌 계를 처리할 수 있음
단계 D: 제2 확장	• 단계 D 제0일에 6개의 G-렉스 -100M 플라스크 • 단계 D 제0일에 플라스크 당 5x10^{6}개의 TIL 및 5x10^{8}개의 항원 제시 세포 공급자 • 단계 D 제7일에 18 내지 36개의 플라스크로 분할 • 단계 D에 대해 14일 지속기간 • 성장 배지 배지는 IL-2, OKT-3, 및 항원-제시 세포를 포함한다	• 단계 B 제11일에 1개의 G-렉스 -500M 플라스크 • 단계 B 제11일에 25 내지 200x10^{6}개의 TIL 및 5x10^{9}개의 항원 제시 세포 공급자 • 제16일에 ≤6개의 G-렉스 - 500M 플라스크로 분할 • 단계 D에 대해 11일 지속기간 • 성장 배지 배지는 IL-2, OKT-3, 및 항원-제시 세포를 포함한다	• 감소된 단계의 수 • 보다 짧은 REP 지속기간 • 플라스크 사이의 TIL의 닫힌 계 이동 • 닫힌 계 배지 교환
단계 E: TIL을 수확하기	• 원심분리를 통해 수확된 TIL	• LOVO 자동화 세포 세척 시스템을 통해 수확된 TIL	• 감소된 단계의 수 • 자동화된 세포 세척 • 닫힌 계 • 세척 동안 생성물의 감소된 소실
단계 F: 최종 제형화/ 주입 백으로의 이동	• 하이포셔모솔 중의 신선한 생성물 • 단일 주입 백 • 제한된 운송 안정성	• LN2에 저장된 플라스마라이트-A + 1% HSA에서 냉동보존된 생성물 및 CS10 • 다수의 분취물 • 보다 긴 운송 안정성	• 운송 유연성 • 유연한 환자 스케줄링 • 보다 시기적절한 방출 시험
전체 추정된 프로세스 시간	• 단계 A에서 단계 E까지 43 내지 55일	• 단계 A에서 단계 E까지 22일	• 환자로의 보다 빠른 반송 • 감소된 클린 룸 처리량 • 감소된 상품의 비용

[2239]

[2240] 4. **약어**

[2241] μg 마이크로그램

[2242] μl 마이크로리터

[2243] μm 마이크로미터

[2244] APC 항원 제시 세포

[2245] CD 분화 클러스터

[2246] CM 중심 기억

[2247] CM1, CM2, 배양 배지 1, 2

[2248] CO2 이산화탄소

[2249] CS10 크리오스토르® CS10 동결보존 배지 (바이오라이프 솔루션즈)

[2250] Ct PCR 역치 사이클

[2251] DAMP 손상 연관된 분자 패턴 분자

[2252] dCt 참조 Ct 값 및 시험 Ct 값 사이의 차이

[2253] ddCt dCt 및 10 ng 표준 Ct 값 사이의 차이

[2254] ECAR 세포외 산성화율 (당분해의 척도)

[2255] EM 이펙터 기억

[2256] ER+/PR+ 에스트로겐 수용체+/프로게스테론 수용체+

[2257] GMP 우수 제조 관례

[2258] HBSS 행크 평형 염 용액

[2259] HSA 인간 혈청 알부민

[2260] IFN-γ 인터페론 감마

[2261] IL 인터루킨

[2262] IU 국제 단위

[2263] LN2 액체 질소

[2264] Ml 밀리리터

[2265] Mm 밀리미터

[2266] ND 측정되지 않음

[2267] Ng 나노그램

[2268] ℃ 도 섭씨

[2269] OCR 산소 소비율 (산화적 인산화의 척도)

[2270] OKT3 항-CD3 모노클로날 항체의 클론 명칭

[2271] PBMC 말초 혈액 단핵 세포

[2272] PD 프로세스 개발

[2273] REP 급속 확장 프로토콜

[2274] Rh 재조합 인간

[2275] SOP 표준 작업 절차

[2276] T/S 텔로미어 반복부 카피 수 대 단일 유전자 카피 수 비

[2277] TIL 종양 침윤 림프구

[2278] VDJ T 세포 수용체의 가변, 다양성, 및 연결 절편

[2279] Vα, Vβ 우세한 종양 침윤 림프구에서의 성숙한 T 세포 수용체 가변 영역 절편

[2280] μg 마이크로그램

[2281] μl 마이크로리터

[2282] μm 마이크로미터

[2283] APC 항원 제시 세포

[2284] CD 분화 클러스터

[2285] CM 중심 기억

[2286] CM1, CM2, 배양 배지 1, 2

[2287] CO2 이산화탄소

[2288] CS10 크리오스토르® CS10 동결보존 배지 (바이오라이프 솔루션즈)

[2289] Ct PCR 역치 사이클

[2290] DAMP 손상 연관된 분자 패턴 분자

[2291] dCt 참조 Ct 값 및 시험 Ct 값 사이의 차이

[2292] ddCt dCt 및 10 ng 표준 Ct 값 사이의 차이

[2293] ECAR 세포외 산성화율 (당분해의 척도)

[2294] EM 이펙터 기억

[2295] ER+/PR+ 에스트로겐 수용체+/프로게스테론 수용체+

[2296] GMP 우수 제조 관례

[2297] HBSS 행크 평형 염 용액

[2298] HSA 인간 혈청 알부민

[2299] IFN-γ 인터페론 감마

[2300] IL 인터루킨

[2301] IU 국제 단위

[2302] LN2 액체 질소

[2303] Ml 밀리리터

[2304] Mm 밀리미터

[2305] ND 측정되지 않음

[2306] Ng 나노그램

[2307] ℃ 도 섭씨

[2308] OCR 산소 소비율 (산화적 인산화의 척도)

[2309] OKT3 항-CD3 모노클로날 항체의 클론 명칭

[2310] PBMC 말초 혈액 단핵 세포

[2311] PD 프로세스 개발

[2312] REP 급속 확장 프로토콜

[2313] Rh 재조합 인간

[2314] SOP 표준 작업 절차

[2315] T/S 텔로미어 반복부 카피 수 대 단일 유전자 카피 수 비

[2316] TIL 종양 침윤 림프구

[2317] VDJ T 세포 수용체의 가변, 다양성, 및 연결 절편

[2318] Vα, Vβ 우세한 종양 침윤 림프구에서의 성숙한 T 세포 수용체 가변 영역 절편

[2319] 5. **실험 설계**

[2320] 5.1 **프로세스 2A**

[2321] 5.1.1 **사전-REP**: 수령 시, 종양을 생물학적 안전성 캐비닛 (부류 II, 유형 A2)으로 옮겼다. 멸균 기법을 사용하여, 종양을 선적 용기로부터 제거하고, 50 μg/mL 겐타미신을 함유하는 HBSS에서 세척한다. 기술자는 종양을 40 × 3×3×3 mm 단편으로 세절하고, 이를 6000 IU/mL rhIL-2로 보충된 사전-가온된 CM1 배지를 함유하는 G-렉스-100M 플라스크로 옮긴다. 플라스크를 37℃, 5% CO2 습화된 조직 배양 인큐베이터에 11일 동안 정치한다.

종양이 40개 초과의 단편을 생성하는 경우, 1개 초과의 G-렉스-100M이 설치될 수 있다. 그 후, 세포를 수확하고, REP를 위해 제조한다.

[2322] 5.1.2 **REP**: 제11일에, 3000 IU/mL rhIL-2, 30 ng/mL 항-CD3 (클론 OKT3) 및 5 × 109개의 방사선조사된 동종이형 공급자 PBMC 세포로 보충된 5 L의 CM2를 함유하는 1개의 G-렉스-500M 플라스크를 제조한다. 부피 감소 후 사전-REP G-렉스-100M 플라스크로부터 수확된 TIL을 카운팅하고, G-렉스-500M 플라스크 내로 5 × 10^6 내지 200 × 10^6개의 세포의 범위일 수 있는 밀도로 시딩한다. 그 후, 플라스크를 습화된 37℃, 5% CO2 조직 배양 인큐베이터에 5일 동안 정치한다. 제16일에, G-렉스-500M 플라스크의 부피를 감소시키고, TIL을 카운팅하고, 그들의 생존력을 측정한다. 이 시점에서, TIL을 다수의 G-렉스-500M 플라스크 (최대 6개 이하의 플라스크) 내로, 각각 1 × 10^9개의 TIL/플라스크의 시딩 밀도로 확장시킨다. 그 후, 모든 플라스크를 습화된 37℃, 5% CO2 조직 배양 인큐베이터에 추가의 6일 동안 정치한다. 제22일, 수확 일에, 각각의 플라스크를 90% 부피 감소시키고, 세포를 함께 풀링하고, 170 μm 혈액 필터를 통해 여과한 후, LOVO를 사용한 자동화 세척을 위한 제조에서 3 L 오리진 EV3000 백 또는 등가물 내로 수집한다.

[2323] 5.1.3 **수확 및 최종 제형화**: TIL을 세포 배양 배지의 99.99%를 1% HSA로 보충된 플라스마라이트-A로 이루어진 세척 완충제로 대체하는 LOVO 자동화 세포 프로세싱 시스템을 사용하여 세척한다. LOVO는 혈청, 성장 인자, 및 시토카인, 뿐만 아니라 다른 데브리스 및 미립자를 비롯한 잔류의 조직 배양 성분을 사실상 제거하면서, TIL의 92% 초과를 회수하는 스피닝 여과 막 기술을 사용하여 작동한다. 세척의 완료 후, 세포 카운트를 수행하여 TIL의 확장 및 수확 시 그들의 생존력을 측정한다. CS10을 세척된 TIL에 1:1 부피:부피 비로 첨가하여 프로세스 2A 최종 제형화를 달성한다. 최종 제형화된 생성물을 냉동저장 백 내로 분취하고, 밀봉하고, 사전-냉각된 알루미늄 카세트에 정치한다. 그 후, TIL을 함유하는 냉동저장 백을 크리오메드 제어 속도 동결기 (써모피셔 사이언티픽, 미국 매사추세츠주 월텀)를 사용하여 SOP LAB-018 Rev 000 제어 속도 동결기의 작동에 따라 동결시킨다.

[2324] 5.2 **TIL 샘플**: 4가지 상태의 TIL을 특징규명 비교를 위해 수집하였다.

[2325] 5.2.1 신선한 수확된 TIL (1% HSA 세척 완충제를 갖는 플라스마라이트-A로부터 직접) 해동된 TIL (해동된 최종 생성물 백으로부터 직접)

[2326] 5.2.2 신선한 연장된 표현형 재REP TIL (7일 내지 14일 동안 IL-2, PBMC 공급자, 및 항-CD3 클론 OKT3과 함께 배양된 신선한 수확된 TIL)

[2327] 5.2.3 해동된 연장된 표현형 TIL (7일 내지 14일 동안 IL-2, PBMC 공급자, 및 항-CD3 클론 OKT3과 함께 배양된 해동된 TIL)

[2328] 5.3 **시험 개관** (도 2 참조)

[2329] 5.3.1 **사전-REP 시험**은 IL-2의 양을 평가하고, 사전-REP 전반에 걸쳐 세포 배양 대사물, 예컨대 글루코스, 락트산, L-글루타민 및 암모니아를 분석하는 것을 포함한다.

[2330] 5.3.1.1 IL-2 정량화: 배지를 사전-REP 배양물로부터 주기적으로 제거하고, ELISA에 의해 IL-2 정량화에 대해 시험하였다. 알앤디 시스템즈 인간 IL-2 콴티킨 ELISA 키트 제조자의 지시서를 참조한다.

[2331] 5.3.1.2 세포 배양 대사물 분석: 배지를 사전-REP 배양물로부터 주기적으로 제거하고, 하기 대사물에 대해 시험하였다: 글루코스, 락트산, L-글루타민 및 암모니아. 로슈 세덱스 생물분석기 (Roche Cedex Bioanalyzer) 지시서를 위한 사용자 매뉴얼을 참조한다.

[2332] 5.3.2 **REP 시험**은 연장된 검정, 예컨대 세포 카운트, % 생존력, 세포 표면 분자의 유동 세포측정 분석, 효능 (IFN-γ 생산), 생체발광 재지정 용해 검정, 그란자임 B 생산, 세포 대사 및 텔로미어 길이 측정을 포함한다.

[2333] 5.3.2.1 **세포 카운트 및 생존력**: TIL 샘플을 카운팅하고, 생존력을 셀로미터 K2 자동화 세포 카운터 (넥스셀롬 바이오사이언스, 미국 매사추세츠주 로렌스)를 SOP LAB-003 Rev 000 셀로미터 K2 화상 세포측정기 자동 세포 카운터에 따라 사용하여 측정하였다.

[2334] 5.3.2.2 **세포 표면 바이오마커의 유동 세포측정 분석**: TIL 샘플을 WRK LAB-041 Rev 000 사후 REP TIL의 표면 항원 염색 (Surface Antigen Staining of Post REP TIL)에 개요된 절차를 사용한 세포 표면 마커의 유동 세포측정 분석을 위해 분취하였다.

[2335] 5.3.2.3 **효능 검정 (IFN-γ 생산)**: 세포독성 잠재성의 또다른 척도를 CD3, CD28, 및 CD137/4-1BB에 대한 항체로 자극된 TIL의 배지 중의 시토카인 IFN-γ의 수준을 측정함으로써 측정하였다. 이들 자극된 TIL로부터의 배지 중의 IFN-γ 수준을 WRK LAB-016 Rev 000 IFN-γ 방출을 측정하기 위한 TIL의 자극 (Stimulation of TIL to Measure IFN-γ Release)을 사용하여 측정하였다.

[2336] 5.3.2.4 **생체발광 재지정 용해 검정**: 표적 세포를 용해하는 TIL의 세포독성 잠재성을 생체발광 세포주, P815 (클론 G6)와의 TIL의 공동-배양 검정을 사용하여 WRK LAB-040 TIL에 대한 생체발광 재지정 용해 검정 (효능 검정) (Bioluminescent Redirected Lysis Assay (Potency Assay))에 개요된 SOP에 따라 평가하였다.

[2337] 5.3.2.5 **그란자임 B 생산**: 그란자임 B는 표적 세포를 살해하는 TIL의 능력의 또다른 척도이다. 5.2.5.3에 기재된 바와 같이 재자극된 배지 상청액을 또한 인간 그란자임 B 듀오세트 ELISA 키트 (알 앤 디 시스템즈, 미국 미네소타주 미네아폴리스)를 제조자의 지시서에 따라 사용하여 그란자임 B의 그들의 수준에 대해 평가하였다.

[2338] 5.3.2.6 **세포 (호흡) 대사**: 세포를 미토콘드리아 호흡 및 당분해의 억제제로 처리하여 하기 척도로 이루어진 TIL에 대한 대사적 프로파일을 측정하였다: 기준선 산화적 인산화 (OCR에 의해 측정된 바와 같음), 예비 호흡 용량, 기준선 당분해 활성 (ECAR에 의해 측정된 바와 같음), 및 당분해 예비력. 대사적 프로파일을 WRK LAB-029 씨호스 조합 미토콘드리아/당분해 스트레스 시험 검정 (Seahorse Combination Mitochondrial/Glycolysis Stress Test Assay)에 개요된 절차를 사용하여 수행하였다.

[2339] 5.3.2.7 **텔로미어 길이 측정**: 게놈 DNA 및 세포학적 제제에서의 텔로미어의 길이를 측정하기 위해 다양한 방법이 사용되었다. 텔로미어 제한 단편 (TRF) 분석은 텔로미어 길이를 측정하는 금 표준이다 (de Lange et al., 1990). 그러나, TRF의 주요한 제한은 다량의 DNA (1.5 ^g)의 요구이다. 텔로미어 길이의 측정을 위한 2가지 폭넓게 사용되는 기법, 즉, 형광 계내 혼성화 (FISH; 애질런트 테크놀로지즈, 미국 캘리포니아주 산타 클라라) 및 정량적 PCR.

[2340] 5.3.3 추가의 샘플을 하기 시험을 위해 취하고, 필요에 따라 장래에 분석할 수 있다:

[2341] 5.3.3.1 심층 시토카인 분석

[2342] 5.3.3.2 TCR 시퀀싱

[2343] 6. **달성된 결과**

[2344] 총 9회의 실험을 섹션 2.3 실험 설계 및 섹션 5.1에서의 수확 조건에 기재된 종양으로부터 유래된 TIL을 사용하여 수행하였다. 프로세스 2A를 사용하여 수확된 TIL을 확장시키는 그들의 능력, 그들의 생존력, 표현형, 세포독성 잠재성, 및 대사적 프로파일을 이해할 목적으로 섹션 5.3.2에 개요된 시험으로 처리하였다. 모든 척도를 신선한 수확된 TIL 생성물 및 해동된 동결된 TIL 생성물 (프로세스 2A)에 대해 취하였다.

[2345] 6.1 **세포 카운트 및 생존력**

[2346] 6.1.1 세포 카운트를 사전-REP의 종료 시, REP의 제5일 또는 제6일 (확장 일), 및 REP의 종료 시, LOVO 세척 전 및 LOVO 세척 후 둘 다에 취하였다. 그 후, 세포 카운트를 사용하여 REP 동안의 TIL의 확장 및 LOVO 상의 세척 후의 TIL의 회수를 측정하였다. 해동 후, 세포를 다시 카운팅하여 해동후 회수 (TIL이 동결된 농도에 기초함) 및 해동후 생존력을 측정한 후, 다른 분석적 검정으로 진행하였다. 표 3은 9회의 프로세스 2A 실행에 대한 이들 결과의 모두를 요약한다.

[2347] <표 32>

[2348] 프로세스 2A 실행으로부터의 TIL의 세포 카운트, % 생존력, 및 확장.

	M1061T	M1062T	M1063T	M1064T	M1065T	EP11001T	M1056T	M1058T	M1023T
사전-REP 접종물	3.3 x 10^7	1 x 10^8	7.5 x 10^7	1.8 x 10^8	4.1 x 10^6	5.4 x 10^6	7 x 10^7	4.7 x 10^7	4.8 x 10^7
제5/6일 카운트	1.3 x 10^9	4 x 10^9	3 x 10^9	3.6 x 10^9	6.6 x 10^8	2.8 x 10^9	4.0 x 10^9	3.7 x 10^9	2.2 x 10^9
제0일에서 제11일까지의 배수 확장	898	590	470	130	1900	522	771	1400	850
수확	2.8 x 10^{10}	5.6 x 10^{10}	3.5 x 10^{10}	2.3 x 10^{10}	7.8 x 10^9	2.63 x 10^{10}	5 x 10^{10}	6.7 x 10^{10}	4.1 x 10^{10}
LOVO 회수 (%)	100	68	100	100	92	95	100	90	99
냉동저장 백	3 x 30ml	2 x 100ml	2 x 100ml	2 x 50ml	3 x 100ml	2 x 65ml	2 x 100ml	2 x 100ml	2 x 100ml
해동후 회수 (%)	103	84	90	88	101	82	82	86	78
해동후 생존율 (%)	84.75	84.36	77.15	83.48	79.98	74.85	80.28	85.03	89.21

[2349]

[2350] 6.1.2 프로세스 2A SOP는 REP를 위한 TIL의 시작 수를 5 200 × 106개의 TIL의 범위로서 정의한다. 프로세스 2A REP를 시작하는 데 사용된 9가지 TIL 샘플의 범위는 4.1 × 106 (M1065T) 내지 1.8 × 108 (M1064T)이었으며, 평균 시작 TIL 수는 6.58 × 107개였다. 흥미롭게도, 가장 적은 수의 TIL로 플레이팅된 REP는 REP 수확에서 가장 큰 정도로 확장되었다 (모든 9회의 REP에 대한 확장의 범위: 130 내지 1900배; 평균 확장, 840배). 이들 9회의 프로세스 2A REP의 종료 시에 수확된 TIL의 평균 수는 4.49 × 1010개였다 (7.8 × 109 내지 6.7 × 1010개의 범위).

[2351] 6.1.3 프로세스 1C의 비교 통계학을 위해, 문헌 [Chemistry, Manufacturing, and Controls (CMC) Section of Investigational New Drug (IND) Application for LN144/LN-145]을 참조한다.

[2352] 6.1.4 프로세스 1C는 TIL 생성물을 세척하기 위해 수동 취급 및 원심분리를 이용한다. 이는 시간 소비적이지만, 보다 중요하게는 수확 및 최종 제형화 사이에 생성물의 25% 이하의 소실을 초래할 수 있다. 자동 세포 세척 LOVO 시스템은 세포 소실을 최소화하고, 또한 세척 단계 동안 생성물의 오염의 위험을 감소시키는 닫힌 계 세척을 도입하는 방식을 제공한다. 프로토콜의 LOVO 세척 단계 후의 생성물의 회수는 세척 단계로 나아가는 TIL 생성물의 평균 93.8 ± 10.4% 회수를 나타내었다. 이 통계는 M1062T에 대한 TIL 생성물을 포함하며, 이는 68%의 LOVO 회수를 가졌고, 그 동안 LOVO의 작동에서 조작자 오류는 샘플을 원심분하고, 그 후 LOVO 절차를 재시작할 필요를 발생시켰다 (섹션 7, 편차 및 불일치 참조). 이는 REP 수확 일에 프로세스 1C 세척 단계 시 매우 바람직한 개선을 나타낸다.

[2353] 6.1.5 해동 후의 TIL의 회수는 또한 동결된 TIL 생성물에 대한 주요한 관심이다. 생성물의 회수를 냉동보존 전에 각각의 동결 백 내로 정치된 세포의 수에 비한 해동 후의 백으로부터 회수된 세포의 수를 측정함으로써 측정하였다. 해동으로부터의 회수의 범위는 78 내지 103%였으며, 평균 회수는 88.2 ± 8.6%였다.

[2354] 6.1.6 해동 전 또는 후에 샘플의 생존력의 유의한 차이가 있지만, 평균적으로, 해동 시 생존력의 단지 2% 소실이 있다. 냉동보존으로 나아가는 TIL의 생존력 84.3 ± 4.7%였으며, 해동 후의 동일한 TIL은 82.1 ± 4.4%의 생존력을 가졌다 (p = 0.0742, 대응 스튜던트 t-검정, 비-모수). 신선한 임상적 TIL 프로세스 1C 생성물에 대한 방출 기준은 최소 70% 생존력을 요구한다. 해동 시 생존력의 작은 소실과 무관하게, 프로세스 2A의 모든 9회의 실행은 냉동 생성물의 해동 후 이 방출 기준을 충족시켰다. 표 4 및 도 3은 냉동보존으로 나아가는 TIL의 생존력 (신선한 + CS10) 및 해동 시의 TIL의 생존력을 나타낸다.

[2355] <표 33>

[2356] 신선한 및 해동된 생성물의 생존력의 비교.

	M1061T	M1062T	M1063T	M1064T	M1065T	EP11001T	M1056T	M1058T	M1023T
신선한 + CS10	88.05	84.45	82.05	86.75	76.35	77.9	84.8	87.5	90.5
해동된	84.75	84.36	77.15	83.48	79.98	74.85	80.28	85.03	89.21

[2357]

[2358] 6.2 **TIL의 재-REP 확장**. REP에서 확장하는 신선한 생성물의 능력을 조사하는 것 외에도, 신선한 방사선조사된 동종이형 PBMC 공급자 APC 및 신선한 항-CD3으로의 재자극 시 확장하는 신선한 및 해동된 TIL 생성물 둘 다의 능력을 평가하였다. 7일 후, 이들 재자극된 TIL 생성물을 초기 배양 조건으로부터 확장하는 그들의 능력에 대해 분석하였다. 도 4 및 표 5는 배양물에서의 성장의 7일 후의 재-REP TIL 세포의 평균 확장을 나타낸다. 대

응 스튜던트 t-검정을 사용한 데이터의 분석은 재-REP에서 확장하는 TIL의 능력이 신선한 TIL 또는 해동된 TIL 생성물로 REP를 시작하든지 유의하게 상이하지 않음을 나타낸다 (p = 0.81).

[2359] <표 34>

[2360] 재-REP 배양물에서의 신선한 및 해동된 TIL 확장의 비교

[2361]

	M1061T	M1062T	M1063T	M1064T	M1065T	EP11001T	M1056T	M1058T	M1023T
신선한	139.67	264	227	60.12	24.67	268.83	176	316.33	202.33
해동된	177.33	110.33	220.67	177.6	220.2	302.5	114.77	190.67	73.82

[2362] 6.3 **세포 배양 대사물.** 라이온 (Lion) 2A의 주요한 전제 중 하나는 더 적은 테크 시간 및 프로세스 이동은 비용 절감을 발생시키고, 가변성을 제한할 것이라는 점이다. 이의 가능한 유해한 결과는 비바람직한 대사물의 증가 및 영양소 공급원의 감소였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 전해질 (나트륨 및 칼륨), 영양소 (글루타민 및 글루코스), 및 대사물 (락트산 및 암모니아)의 정상 혈액 값은 11일 사전-REP로부터 나오는 결과를 평가하는 경우 고려할 범위를 제공한다. 도 6에 나타난 바와 같이, 3가지 TIL (M1061T, M1062T, 및 M1064T)을 순차적으로 평가하였다. 이 환경에서, 칼륨 및 나트륨은 정상 수준에서 유지되었고, 글루코스는 >1.0 g/L 및 글루타민 > 0.3 mmol/L이었으며, 보다 낮은 정상 혈액 값 훨씬 위였다. 예상된 바와 같이, 락테이트는 정상적으로 혈액에서 발견되는 수준의 약 5배인 0.8 g/L만큼 높게 상승되었고, 암모니아는 급속하게 확장된 세포로부터 예상된 바와 같이, 3 mmol/L만큼 높게 상승되었으며, 또한 혈액에서 정상적으로 발견되는 것보다 실질적으로 더 높았다.

[2363] 6.4 **IL-2 정량화.**

[2364] 6.4.1 보충적 글루코스, 글루타민 및 충분한 산소화 외에도 사전-REP에서의 TIL 증식의 주요한 유도자는 rhIL-2의 높은 수준의 제공이다. 혈청 함유 배지에의 그의 첨가 후에, IL-2 수준은 2 내지 3.5×10^3 IU/ml에서 측정되었으며, 단지 배양의 11일에 걸쳐 약 1.0×10^3 IU/ml에 해당하였다. 이는 T-세포 증식을 지속하는 데 필요한 30 내지 100 IU/ml보다 훨씬 위이다. IL-2의 상이한 공급원 (프로메테우스 (Prometheus), 아크론 (Akron), 셀제닉스)을 사용한 IL-2 농도의 평가는 현재 탬파에 소재하는 라이온 바이오테크놀로지즈 (Lion Biotechnologies)에서 별개의 실험에서 시험되고 있다 (QP-17-010 : 셀제닉스, 아크론 및 프로메테우스로부터의 IL-2의 정성화).

[2365] 6.5 **IFN-γ 생산**

[2366] 6.5.1 섹션 5.3.5.3에 기재된 바와 같은 자성 항-CD3, CD28 및 4-1BB 다이나비드 (Dynabead)로의 TIL의 24시간 자극 후, 배양물로부터의 상청액을 수집하고, ELISA 키트를 사용하여 IFN-γ에 대해 분석하였다. 모든 재자극된 TIL은 그들의 비자극된 대응물보다 더 많은 IFN-γ를 생산하였으며, 이는 TIL의 자극이 그들의 활성화를 발생시켰음을 나타낸다. 도 8은 재자극 시 주위의 배지 내로 IFN-γ를 방출하는 시험된 4가지 상이한 TIL 조성물 (신선한, 해동된, 신선한 재-REP 및 해동된 재-REP TIL)의 능력을 나타낸다.

[2367] **표 6** 및 **7**은 9회의 프로세스 2A 실행에서의 IFN-γ 분비의 평균 값을 나타낸다. 재자극 시 주위의 배지 내로의 IFN-γ 분비는 신선한 TIL 생성물 및 해동된, 냉동보존된 TIL 사이에 상이하지 않다. **표 6**은 신선한 생성물이 평균 4143 ± 2285 pg IFN-γ/106개의 TIL을 생산한 반면, 해동된 생성물은 3910 ± 1487 pg IFN-γ/106개의 TIL을 생산하였음을 나타낸다 (대응 스튜던트 t-검정을 사용하여 p = 0.55). 총 TIL 생성물 (표 7)에 대해 정규화되는 경우, 평균적으로, 자극된 신선한 TIL은 86 ± 61 그램의 IFN-γ를 생산한 반면, 해동된 자극된 TIL은 68 ± 40 그램의 IFN-γ를 생산하였다 (p = 0.13). 이들 발견은 신선한 및 해동된 TIL 생성물 둘 다가 IFN-γ를 생산하며, 항-CD3/항-CD28/항-4-1BB로의 자극 시 IFN-γ를 생산하는 신선한 또는 해동된 매칭 TIL의 능력에 차이가 없음을 지시한다.

[2368] <표 35>

[2369] 신선한 및 해동된 TIL에서의 IFN-γ 분비 (pg/10^6개 세포/24시간으로서 표현됨)

[2370]

	M1061T	M1062T	M1063T	M1064T	M1065T	EP11001T	M1056T	M1058T	M1023T
신선한	4570	3921	5589	619	1363	4263	6065	2983	7918
해동된	3158	3543	5478	1563	2127	5059	4216	4033	6010
신선한 재-REP	3638	1732	971	2676	2753	1461	2374	770	3512
해동된 재-REP	2970	2060	1273	1074	1744	2522	5042	4038	923

[2371] <표 36>

[2372] 신선한 및 해동된 TIL에서의 IFN-γ 분비. 모든 값은 1012로임 (그램/10^6개 세포/24시간으로서 표현됨)

	M1061T	M1062T	M1063T	M1064T	M1065T	EP11001T	M1056T	M1058T	M1023T
신선한	67.1	78.4	99.6	8.4	4.8	66.1	157.0	109.0	187.0
해동된	47.7	59.7	87.9	18.7	7.5	64.4	88.9	127.0	111.0

[2373]

[2374] 6.6 **그란자임 B 생산**

[2375] 6.6.1 TIL을 5.2.5.3에 기재된 바와 같이 자성 항-CD3, CD28 및 4-1BB 다이나비드로 24시간 동안 자극하고, 배양물로부터의 상청액을 24시간 후에 수집하고, 그란자임 B 수준을 ELISA에 의해 분석하였다. 모든 재자극된 TIL은 그들의 비자극된 대응물보다 더 많은 그란자임 B를 생산하였으며, 이는 TIL의 자극이 그들의 활성화를 발생시켰음을 나타낸다. 도 9는 시토카인 칵테일로의 재자극 시 주위의 배지 내로 그란자임 B를 방출하는 신선한 TIL, 신선한 재-REP TIL, 및 해동된 재-REP TIL의 능력을 나타낸다.

[2376] 모든 생성물은 9190 pg/10^6개의 생존 세포 내지 262000 pg/10^6개의 생존 세포의 범위의 그란자임 B 생산을 나타내었다 (표 8). 표 6은 신선한 생성물이 평균 60644 + 42959를 생산한 반면, 신선한 및 해동된 재-REP는 각각 93600 + 67558 및 103878 + 84515를 생산하였음을 나타낸다. 신선한 재-REP 및 해동된 재-REP 사 이의 비교는 양쪽 조건으로부터 얻어진 TIL의 능력의 차이가 없음을 나타내었다 ($p = 0.7$). 해동된 생성물에서의 그란자임 B 측정의 결여로 인해, 통계적 분석은 신선한 TIL 생성물을 사용하여 수행되지 않았다.

[2377] <표 37>

[2378] 신선한 TIL, 신선한 재REP TIL, 및 해동된 재REP TIL에서의 그란자임 B 분비 (pg/10^6개 세포/24시간으로서 표현됨)

	M1061T	M1062T	M1063T	M1064T	M1065T	EP11001T	M1056T	M1058T	M1023T
신선한	10600	108000	49100	28400	24300	17900	120000	12900	79100
신선한 재REP	216000	37700	42400	91800	192000	22200	97300	73800	69200
해동된 재REP	262000	113000	35100	65600	48700	9190	147000	201000	53300

[2379]

[2380] 6.7 **세포 표면 바이오마커의 유동 세포측정 분석**

[2381] TIL의 표현형적 프로파일링: 4가지 항체 패널을 라이온에서 표준화하여 T-세포의 기능적 프로파일을 폭넓게 특징규명하였다. 이들 패널을 사용하여 신선한 TIL, 해동된 TIL, 신선한 재-REP TIL, 및 해동된 재-REP TIL의 면역표현형결정을 평가하였다. 이 섹션에서 그래프적 제시에 사용된 모든 데이터는 또한 부록 섹션 10에서 표 형식 (표 14 내지 24)으로 제공된다.

[2382] 6.8 **생체발광 재지정 용해 검정**

[2383] 6.8.1 그들의 표적 종양 세포를 살해하는 프로세스 2A TIL의 잠재적 능력을 측정하기 위해, 본 발명자들은 섹션 5.3.2.4에 기재된 바와 같이 생체발광 대리 표적 세포주 P815와의 TIL의 공동-배양을 포함하는 효능 검정을 개발하였다. 항-CD3 자극의 존재 하에서 P815과의 상이한 TIL 조성물의 4시간 공동-배양은 표적 세포의 50%를 살해하는 데 필요한 TIL의 수로서 정의될 수 있는 용해 단위인 LU50으로서 표현되는 TIL 세포의 세포독성 잠재성의 척도를 제공한다. 그 후, 이 척도는 LU50/106개 TIL로서 표현된다. 하기 도 32는 신선한 생성물로부터의, 및 2가지 재-REP TIL 조건, 즉, 신선한 재-REP 및 해동된 재-REP로부터의 TIL의 세포독성 잠재성을 나타낸다.

[2384] 6.8.2 신선한 재-REP와 해동된 재-REP의 비교는 표적 세포를 살해하는 양쪽 TIL의 능력에 유의한 차이가 없음을 나타낸다 ($p = 0.3126$). 이 데이터는 TIL 생성물의 세포독성 잠재성의 관점에서 신선한 및 해동된 생성물 사이에 차이가 없다는 결론을 지지한다. 신선한 사이의 비교는 세포독성 잠재성이 TIL을 해동한 직후에 측정되지 않았기 때문에 수행되지 않았다. 표 9는 P815 표적 세포주의 50%를 살해하는 데 필요한 TIL의 용해 단위를 나타낸다.

[2385] <표 38>

[2386] P815 표적 세포주에 대한 TIL에 의해 생성된 용해 단위

	신선한	신선한 재REP	해동된 재REP
M1061T	21.7	42.3	342
M1062T	5.9	17.0	20.9
M1063T	14.2	161	12.5
M10641	22.2	8.7	4.4
M10651	42.6	411	128 8
EP11001T	1.8	4.3	147
M1056T	25.0	16.6	18.2
M10513T	76.9	13.8	16.6
M1023T	30.8	25.6	30.4
avg ± sd	26.8 ± 22.5	20.6 ± 13.3	31.1 ± 37.6

[2387]

[2388] 6.9 **TIL의 세포 대사 프로파일**

[2389] 6.9.1 사후-REP TIL의 대사적 건강을 평가하기 위해, 본 발명자들은 애질런트 테크놀로지즈 (미국 캘리포니아주 산타 클라라)로부터의 씨호스 대사 분석기 기기 (XFp 및 XFe96)를 섹션 5.3.2.6에 개요된 프로토콜에 따라 이용하였다. 간략하게, 세포를 산화적 인산화 또는 당분해 중 어느 하나의 특정 측면을 표적화하는 억제제로 처리함으로써, 세포를 그들의 SRC 및 당분해 예비력의 측정을 허용하는 방식으로 스트레스를 가한다. 또한, 산화적 인산화 (기저 OCR) 및 당분해 (기저 ECAR) 둘 다의 기저 수준을 측정할 수 있다. 마지막으로, 산화적 인산화 및 당분해의 억제제가 동일한 시험에서 조합되기 때문에, SRC의 잠재적 숨겨진 예비력이 인식될 수 있으며, 이는 단지 세포가 당분해의 경쟁적 억제제, 2-데옥시글루코스 (2-DG), (SRC2DG로 표지됨)로 처리되는 경우 명백하며, 이는 그렇지 않다면 숨겨져서 잔류할 것인 SRC의 증가를 발생시킨다. 이 가외의 호흡 용량은 "은신(Covert)" SRC로서 표지되었다. 표 9는 세포에 대해 수행된 대사적 스트레스 시험으로부터 유래된 신선한 수확된 TIL, 신선한 재-REP TIL, 및 해동된 재-REP TIL의 대사적 프로파일을 나타낸다.

[2390] 6.9.2 **도 55a 내지 f**는 그래프 형태의 표 38로부터의 데이터를 나타낸다. 신선한 수확된 REP 생성물은 신선한 재-REP 및 해동된 재-REP 생성물과 일부 통계적 차이를 나타낸다. 이는 재-REP 생성물이 REP 직후 또는 해동 시 중 어느 하나에 신선한 방사선조사된 PBMC APC 및 신선한 항-CD3 항체로 재자극되었기 때문에 놀랍지 않다. 그러나, 모든 경우, 둘 다가 재-REP 절차에서 재자극되는 경우 신선한 및 해동된 생성물 사이에 유의한 차이가 없다 (표 9의 p 값 참조). 이는 냉동보존 프로세스가 TIL 생성물에 유해하게 영향을 미치지 않음을 지시한다. 가장 주목할 만하게는, 산화적 인산화에 대해, 재-REP 생성물은 그들의 매칭 신선한 수확 REP 생성물보다 더 높은 SRC를 갖는다. 당분해에 대해, 재-REP TIL은 신선한 REP 생성물보다 당분해의 통계적으로 유의하게 더 높은 기저 수준 및 반대로 당분해 예비력의 통계적으로 더 낮은 수준을 갖는다. 이는 재-REP TIL이 신선하게 수확된 TIL보다 더 매우 활성화됨을 지시할 수 있음은 주목할 만한 가치가 있으며, 활성화된 바와 같이, 건강한 TIL은 당분해 활성의 높은 수준을 갖는 것으로 보고된다 (Buck et al., JEM 212:1345-1360; 2015).

[2391] <표 39>

[2392] 프로세스 2A TIL의 대사적 프로파일

기저 OCR, pmol/분	M1061	M1062	M1063	Moff2	Moff3	Moff4	EP11001	M1064	M1065	avg	sd	p v. 신선한	p v. 신선한 재-REP
PLLA	50.33	33.95	74.89	36.80	38.48	39.89	63.02		55.89	49.16	14.56		
신선한 재-REP	38.92	38.48	54.35	25.98	18.68	38.61	37.33	41.04		36.67	10.57	0.03	
해동된 재-REP	39.25	43.28	60.05	30.68	57.90	59.08	27.85	52.58	32.82	44.83	12.90	0.48	0.11
명시 SRC, pmol/분													
PLLA	24.74	10.45	101.18	47.32	77.00	35.07	31.39		3.02	41.27	33.22		
신선한 재-REP	51.72	36.46	48.24	28.34	37.69	21.02	9.93	99.71		41.64	27.17	0.29	
해동된 재-REP	47.38	40.40	121.86	26.04	37.32	86.47	58.45	89.59	56.45	62.66	30.75	0.16	0.12
SRC20G, pmol/분													
PLLA	14.01	5.72	35.98	29.97	74.62	24.42	31.39		20.70	29.60	20.67		
신선한 재-REP	81.80	78.82	52.73	38.69	92.37	42.35	-12.81	137.15		63.89	44.45	0.08	
해동된 재-REP	76.97	77.72	177.48	48.27	56.57	69.05	74.14	130.76	85.89	88.54	40.59	0.00	0.25
은밀한 SRC, pmol/분													
PLLA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00		17.68	2.21	6.25		
신선한 재-REP	30.08	42.36	4.50	10.35	54.68	21.33	0.00	2.63		20.74	20.13	0.02	
해동된 재-REP	29.59	37.32	55.62	22.23	19.25	0.00	15.68	41.16	29.44	27.81	16.10	0.01	0.52
기저 ECAR, mpH/분													
PLLA	53.44	27.55	136.33	48.72	89.80	62.29	108.38		72.07	74.82	35.20		
신선한 재-REP	96.48	96.63	171.47	102.87	145.19	153.97	35.60	147.02		118.65	44.19	0.10	
해동된 재-REP	143.35	173.93	193.39	149.19	169.21	73.17	98.64	96.37	90.55	131.98	43.15	0.01	0.38
당분해 예비력, mpH/분													
PLLA	32.11	26.18	52.00	19.09	38.01	39.03	43.14		76.43	40.75	17.61		
신선한 재-REP	24.06	8.75	18.17	-8.28	-5.89	10.31	35.34	20.80		12.91	14.85	0.003	
해동된 재-REP	15.50	-18.94	13.56	-6.78	11.45	54.84	-21.37	-12.66	-5.47	3.35	23.75	0.01	0.47

[2393]

[2394] 6.9.3 재-REP 절차를 사용한 신선한 대 동결된 생성물의 직접 비교는 본 발명자들이 동일한 자극 조건 시 신선한 및 동결된 TIL 생성물 둘 다가 통계적으로 구별되지 않는 대사적 프로파일을 발생시킴을 측정하는 것을 가능하게 하였다. 신선한 재-REP 및 해동된 재-REP TIL 둘 다는 유사한 수준의 기저 호흡 (도 60a, 각각 36.7 ± 10.6 및 44.8 ± 12.9 pmol/분; p = 0.11) 뿐만 아니라 유사한 (명시적) SRC (도 60b, 41.6 ± 27.2 및 62.7 ± 30.8; p = 0.12)를 갖는다. 당분해의 억제를 발생시키는 글루코스에 대한 경쟁적 억제제인 2-DG로의 이들 재-REP 세포의 처리 시, 본 발명자들은 신선한 및 해동된 재-REP TIL 둘 다가 신선한 수확된 TIL 샘플에서 주로 낮거나 부재하는 가외의, "숨겨진" 예비 호흡 용량 (SRC2DG; 은신 SRC)을 나타내고 (도 60c); 단지 1개의 샘플은 신선한 수확된 TIL에서 높은 수준의 SRC2DG를 가진 반면 (도 60c), 반대로, 시험된 7개의 샘플 중 1개만이 재-REP 시 **은신** SRC의 결여를 나타내었음을 본다. 신선한 재-REP에 대한 은신 SRC (도 60d)는 평균 20.7 ± 20.1인 반면, 해동된 재-REP에 대한 은신 SRC (도 60d)는 27.8 ± 16.1의 범위였다; p = 0.52.

[2395] 6.9.4 연장된 표현형 (재-REP) TIL의 가장 두드러진 대사적 판독은 연장된 표현형 (재-REP) 샘플의 일관되게 높은 수준의 기저 당분해이다. 기저 당분해 (도 60e)는 재-REP 샘플에서 일관되게 높으며, 평균은 신선한 재-REP에서 118.7 ± 44.2 mpH/분 및 해동된 재-REP에서 132.0 ± 43.2 mpH/분이다. 이들 샘플은 서로 통계적으로 상이하지 않다 (p = 0.38). 그러나, 상기 언급된 바와 같이, 신선한 수확된 샘플은 당분해의 이러한 높은 기저 수준을 갖지 않는다. 신선한 재-REP TIL에 비해, 이 차이는 실질적이지만, 유의하지 않으며 (p = 0.10); 그러나, 해동된 재-REP 샘플과 비교할 경우, 차이는 유의하다 (p 0.01). 이들 재-REP 세포는 그들이 씨호스 대사적 시험에서 스트레스가 가해진 경우 잔류하는 당분해 예비력을 거의 갖지 않기 때문에 (도 60f), 그들의 에너지 필요에 대해 당분해에 명백하게 크게 의존한다: 신선한 재-REP TIL 평균 12.9 ± 14.9 mpH/분; 해동된 재-REP TIL, 3.35 ± 23.8 mpH/분. 이들 재-REP는 서로 상이하지 않지만 (p = 0.47), 둘 다는 평균 40.8 ± 17.6 mpH/분인 신선한 수확된 TIL 샘플에서 발견되는 당분해 예비력과는 통계적으로 상이하다 (신선한 재-REP 및 해동된 재-REP TIL에 비해 각각 p = 0.003 및 0.01). 이들 신선한 수확물 및 재-REP TIL 샘플 사이의 당분해에서 나타난 차이 뒤의 원인을 측정하기 위해 추가의 연구가 수행되어야 한다.

[2396] 6.10 **텔로미어 길이 측정**

[2397] 6.10.1 유동 Fish 및 qPCR에 의한 사후 REP TIL의 텔로미어 길이의 측정.

[2398] 6.10.1.1 유동-FISH를 데이코/애질런트 패톨로지 솔루션즈 (Agilent Pathology Solutions) (유동 세포측정법을 위한 텔로미어 PNA 키트/FITC) 키트를 사용하여 수행하고, 제조자의 지시서를 따라 텔로미어 반복부의 평균 길이를 측정하였다. 1301 T-세포 백혈병 세포주 (시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich), 미국 미주리주 세인트 루이스)를 각각의 검정에서 내부 참조 표준으로서 사용하였다. 개별적 TIL을 카운팅하고, 1301 세포와 1:1 세포 비로 혼합하였다. 2 × 106개의 TIL을 2 × 106개의 1301 세포와 혼합하였다. 계내 혼성화를 혼성화 용액 (70% 포름아미드, 1% BSA, 20 mM 트리스, pH 7.0)에서 이중으로 및 텔로미어 반복부 서열에 상보적인 FITC-접합된 텔로미어 PNA 프로브 (FITC-OO-CCCTAA-CCC-TAA-CCC-TAA)의 존재 및 부재 하에서 60 nM의 최종 농도에서 수행하였다. 텔로미어 PNA 프로브의 첨가 후, 세포를 열 블록에서 82℃에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 그 후, 세포를 어둠에서 실온에서 밤새 정치하였다. 다음날 아침, 과량의 텔로미어 프로브를 각각 40℃의 열 블록 상에서 10분 동안 세척 완충제로 2회 세척함으로써 제거하였다. 세척 후, DAPI (인비트로젠, 미국 캘리포니아주 칼스배드)를 75 ng/ml의 최종 농도로 첨가하였다. DAPI로의 DNA 염색을 사용하여 G0/G1 집단에서의 세포를 게이팅하였다. 샘플 분석을 예티 (Yeti) 유동 세포측정기 (프로펠-랩스 (Propel-Labs), 미국 콜로라도주 포트 콜린스)를 사용하여 수행하였다. 시험 샘플의 텔로미어 형광을 하기 식에 따라 1301 세포의 형광 (f1)의 백분율로서 표현하였다: 상대 텔로미어 길이 = [(프로브를 갖는 평균 FITC f1 시험 세포 - 프로브를 갖지 않는 평균 FITC f1 시험 세포) × 1301 세포의 DNA 인덱스 × 100] / [(프로브를 갖는 평균 FITC f1 1301 세포 - 프로브를 갖지 않는 평균 FITC f1 1301 세포) × 시험 세포의 DNA 인덱스.

[2399] 6.10.1.2 **qPCR**: 실시간 qPCR을 사용하여 상대 텔로미어 길이를 측정하였다. 간략하게, 텔로미어 반복부 카피 수 대 단일 유전자 카피 수 (T/S) 비를 바이오-래드 PCR 열 사이클러 (바이오-래드 래버러토리즈 (Bio-Rad Laboratories), 미국 캘리포니아주 허큘레스)를 사용하여 96-웰 형식으로 측정하였다. 10 나노그램의 게놈 DNA를 텔로미어 (Tel) 또는 헤모글로빈 (hgb) PCR 반응 중 어느 하나에 사용하였으며, 사용된 프라이머는 하기와 같았다: Tel-1b 프라이머 (CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT), Tel-2b 프라이머 (GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT), hgb1 프라이머 (GCTTCTGACACAACTGTGTTCACTAGC), 및 hgb2 프라이머 (CACCAACTTCATCCACGTTCACC). 모든 샘플을 텔로미어 및 헤모글로빈 반응 둘 다에 의해 분석하고, 분석을 동일한 플레이트 상에서 삼중으로 수행하였다. 시험 샘플 외에도, 각각의 96-웰 플레이트는 1301 세포로부터 단리된 게놈 DNA를 사용한 0.08 ng 내지 250 ng의 5-점 표준 곡선을 함유하였다. 각각의 샘플에 대한 T/S 비

(-dCt)를 중위 헤모글로빈 역치 사이클 (Ct) 값을 중위 텔로미어 Ct 값으로부터 뺌으로써 계산하였다. 상대 T/S 비 (-ddCt)를 10 ng 표준 곡선 점의 T/S 비를 각각의 미지의 샘플의 T/S 비로부터 뺌으로써 측정하였다.

[2400] 6.10.1.3 **텔로미어 길이 결과 및 논의**: 텔로미어는 완전한 염색체 복제를 용이하게 하는 데 중요한 역할을 하는 선형 염색체의 말단에서의 캡 (반복적 뉴클레오티드 서열)이다. 텔로미어 측정은 퇴행성 질환, 암, 및 노화와 같은 상태의 연구에서 최근 생겨난 도구이다. NIH로부터의 이전의 연구 (J Immunol. 2005, Nov 15;175(10):7046-52; Clin Cancer Res. 2011, Jul 1; 17(13): 4550-4557)는 TIL의 보다 긴 텔로미어 길이가 임상적 반응과 연관됨을 보였다. 반대로, 래드바니 (Radvanyi) 그룹은 반응자 및 비-반응자 사이에 TIL의 텔로미어 길이의 유의한 차이를 발견하지 않았다 (Clin Cancer Res; 18(24); 6758-70). 지금까지는, 텔로미어 길이가 시험관내 T 세포 배양물의 길이와 연관됨을 입증하는 증거가 없다. 프로세스 2A (22일 배양)에 의해 배양된 사후-REP TIL은 프로세스 1C 프로세스 (25 내지 36일 배양)에 의해 배양된 TIL과 비교할 경우 보다 긴 텔로미어 길이를 가질 것이 가능하다.

[2401] 7. **불일치 및 편차**

[2402] 7.1 **프로세스 편차**

[2403] 7.1.1 M1061T: REP 세포를 제6일에 4개의 G-렉스500M 플라스크 내로 분할하였다.

[2404] 7.1.2 M1062T: REP 세포를 제6일에 4개의 G-렉스500M 플라스크 내로 분할하였다. LOVO 여과 시스템의 조작자 오류로 인해, 긴급 정지가 일회용 키트로부터의 TIL의 수동 수집에 요구된 절차 동안 일어났다. TIL을 제2 LOVO 실행 동안 성공적으로 여과하였다.

[2405] 7.1.3 M1063T: 편차 없음 M1064T: 편차 없음

[2406] 7.1.4 M1065T: 사전-REP 세포는 제11일에 세포 카운트에 대해 하기 명세였지만 (<5 × 106개의 세포), REP로 계속되었다. REP 제6일에, 세포를 카운팅하고, G-렉스500M 내로 다시 정치하고, 4.5 L 신선한 배지로 공급하였다. TIL은 불충분한 세포 카운트 (REP 제6일에 <1 × 109개의 세포)로 인해 이 날에 확장되지 않았다.

[2407] 7.1.5 EP11001T: 편차 없음

[2408] 7.1.6 M1056T: 사전-REP 세포를 라이온에서 G-렉스 100 플라스크에서 21일 이하 동안 배양하였다. 종양 단편을 사전-REP 제11일에 여과하고, TIL을 수확 일에 100% CS10에서 1.5 ml 바이알 당 30 × 106개의 세포로 동결시켰다. 동결된 TIL을 모피트 PD에서 6000 IU/mL rhIL-2로 보충된 CM1에서 해동시키고, REP의 제0일을 개시하기 전에 3일 동안 휴지시켰다. REP 제6일에, TIL을 4개의 플라스크 내로 확장시키고, 이를 REP 제11일에 수확으로 진행하였다.

[2409] 7.1.7 M1058T: 사전-REP 세포를 라이온에서 G-렉스 100 플라스크에서 21일 이하 동안 배양하였다. 종양 단편을 사전-REP 제11일에 여과하고, TIL을 수확 일에 100% CS10에서 1.5 ml 바이알 당 30 × 106개의 세포로 동결시켰다. 동결된 TIL을 모피트 PD에서 6000 IU/mL rhIL-2로 보충된 CM1에서 해동시키고, REP의 제0일을 개시하기 전에 3일 동안 휴지시켰다. REP 제6일에, 세포를 4개의 플라스크 내로 분할하고, 이를 REP 제11일에 수확으로 진행하였다.

[2410] 7.1.8 M1023T: 사전-REP 세포를 라이온에서 G-렉스 10 플라스크에서 21일 이하 동안 배양하였다. 종양 단편을 사전-REP 제11일에 여과하고, TIL을 수확 일에 100% CS10에서 1.5 ml 바이알 당 30 × 106개의 세포로 동결시켰다. 동결된 TIL을 모피트 PD에서 6000 IU/mL rhIL-2로 보충된 CM1에서 해동시키고, REP의 제0일을 개시하기 전에 3일 동안 휴지시켰다. REP 제6일에, 세포를 4개의 플라스크 내로 확장시키고, 이를 REP 제11일에 수확으로 진행하였다.

[2411] 7.2 **시험 편차**

[2412] 7.2.1 심층 시토카인 분석 및 TCR 시퀀싱을 수행하지 않았다.

[2413] 8. **결론 및 권고사항**

[2414] 8.1 **보다 왕성한 프로세스를 개발하기**. 라이온에 대한 도전은 긴 프로세싱 시간을 가진 초기 라이온 프로세스 1C를 보다 짧은 프로세싱 시간 및 TIL 생성물의 냉동보존된 최종 제형을 발생시키는 개선을 이용하는 잠재적으로 보다 상업화가능한 라이온 프로세스 2A로 전환시키는 것이었다. 이 목적으로, 9회의 프로세스 개발 실행을 수행하여 오래된 및 새로운 프로세스가 필적하는 세포 수득량 및 필적하는 TIL 효능 및 표현형을 입증하였음을

확인하였다. 특히 주목할 것은 본 발명자들의 위탁 제조자에서 현재 실행된 역사적 라이온 프로세스 1C에 비해 사전-REP 및 REP 프로세스의 전체 길이의 50% 감소를 발생시키지만, 여전히 필적하는 TIL 수득량 (7.8 × 109 내지 67 x 109개의 세포)을 발생시키는 전체 프로세스의 현저하게 감소된 복잡성이었다. 이는 2017년 6월 2017 ASCO 프리젠테이션 (평균: 1.2 내지 96 × 109개의 세포의 범위를 갖는 41.04 × 109개의 세포)에 대해 최근 갱신되었다. 또한, 라이온은 성공적으로 냉동보존된 TIL 생성물을 개발하였으며, 이는 현재의 프로세스 1C 방출 기준과 일치하는, TIL의 >70% 생존력을 갖는 78 내지 103%의 해동후 회수를 입증하였다 (표 2 참조).

[2415] 8.2 **연장된 표현형적 분석 (재-REP)의 역할**. 유사분열촉진성 자극 (이 보고에서 제시된 실험적 재-REP에서와 같음)에 반응하여 증식하는 능력은 TIL의 중요한 품질 속성이다. 여기에 제시된 실험은 8/9 해동된 TIL 생성물이 7/9 매칭된 신선한 TIL 생성물에 비해 1주에 >100배 확장할 수 있었음을 나타내며, 이는 해동된 TIL 생성물 대 신선한 TIL 생성물의 비교가능성을 지지한다 (표 2). TIL의 2가지 추가의 중요한 품질 속성은 시토카인 (CD3/CD28/4-1BB) 자극 후 IFN-γ 및/또는 그란자임 B를 방출하는 그들의 능력이다. 신선한 및 해동된 생성물 둘 다의 시토카인 자극은 7/9 신선한 생성물에서 및 모든 해동돈 생성물에서 2 ng/10^6개 세포/24시간을 초과하는 IFN-γ 방출을 발생시켰다 (도 35) (이 보고의 섹션 6.2 참조). 그란자임 B 방출 (도 36)은 모든 9회의 프로세스 실행에서 관찰되었다. CD4 및 CD8 수준 (도 39 및 도 40)은 신선한 및 해동된 TIL 생성물 사이에 현저한 내부 일관성을 입증하였다. 또한, 대리 종양 표적 세포주 (P815, 도 59)를 살해하는 TIL의 능력의 분석은 신선한 및 해동된 TIL이 유사한 세포독성 잠재성을 가졌음을 나타내었다.

[2416] 8.3 **TIL의 대사적 스트레스 시험은 왕성한 생체에너지를 밝혀낸다**. 재-REP에서 자극된 신선한 및 해동된 TIL 생성물의 대사적 프로파일의 분석은 신선한 및 해동된 TIL 둘 다가 대사적 스트레스 시험에 유사하게 반응하였으며, 대사적 특징의 패널에서 실질적 차이를 나타내지 않았음을 입증하였다 (표 39). 따라서, 냉동보존된 프로세스 2A TIL 생성물은 이 보고에서 제시된 정체성, 효능, 세포 수, 및 생존력의 4가지 품질 속성에 기초하여 신선한 프로세스 1C 생성물과 필적하는 것으로 간주될 수 있다. 매칭된 신선한 및 해동된 세포를 비교하는 검정은 이 보고에서 개요된 모든 검정에서 꽤 필적하였다.

[2417] 8.4 **허용 기준**: 각각의 환자에 대한 개인화된 요법으로의 TIL 생성물의 내재적 이질성은 하기를 반영한다: (1) 그들의 고유한 주요한 조직적합성 복합체 제한 분자 (인간 생물학에서 가장 다형성 유전자 생성물); (2) 게놈 불안정성 및 고유한 개별적 운전자 및 승객 돌연변이를 갖는 종양 미세환경에서 발생하는 개별적 종양의 고유한 진화적 궤적; 및 (3) 네오에피토프 공유된 종양-고환 항원, 및 바이러스적으로 코딩된 생성물의 인식에 사용된 T-세포 수용체를 한정하는 대립유전자 변이, N-영역 다양성, 및 Vα 및 Vβ 절편에서의 VDJ 재배열. 프로세스 변화의 결과로서 일어나는 추가의 변이를 평가하는 것은 따라서 벅찬 일이며, 가능한 한 내재적으로 이질성 물질의 '비교가능성'을 확신하는 데 가능한 한 많은 파라미터의 평가를 요구한다. 이는 하기 표 40에 상세화된 바와 같은 실행가능성 및 비교가능성을 위한 몇몇 허용 기준을 충실하게 조사함으로써 달성되었다.

[2418] <표 40>

[2419] 실행가능성 및 비교가능성을 위한 허용 기준

샘플링 시점	파라미터	시험 방법	실행가능성을 위한 허용 기준	비교가능성을 위한 허용 기준
	총 생존 세포	AOPI를 갖는 자동화 세포 카운터	≥1.5x10^{9}개의 생존 세포	신선한 및 동결된 재REP 부문 사이에 통계적 유의성 없음 (p-값<0.05)
	% 생존율	AOPI를 갖는 자동화 세포 카운터	≥70% 생존성	신선한 및 동결된 재REP 부문 사이에 통계적 유의성 없음 (p-값<0.05)
	순도	유동 세포측정법	≥90% T-세포	신선한 및 동결된 재REP 부문 사이에 통계적 유의성 없음 (p-값<0.05)
		TCR 시퀀싱	N/A	N/A
	효능	IFNl(ELISA	≥2x 배경 및 ≥400pg/1x10^{6}개 생존 세포/ 24시간	신선한 및 동결된 재REP 부문 사이에 통계적 유의성 없음 (p-값<0.05)
		그란자임 B ELISA	≥2x 배경	N/A
		생물발광 재지정 용해 검정	N/A	N/A
	호흡	씨호스 스트레스 시험	N/A	N/A

[2420]

[2421] 표 11에 열거된 실행가능성 기준에 기초하여, TIL은 요구가 충족되었는지 여부에 대해 평가될 것이다. 모든 개별적 기준은 각각의 실험 및 각각의 TIL 계통 (n=9)에 대해 충족되었다. 스튜던트 t-검정을 통계적 분석에 사용하였다. 비-모수 스튜던트 T-검정을 사용하여 % 생존력에 대한 p-값을 계산하였는데, 이는 생존력 척도가 가우스 분포가 아닐 것이기 때문이다. 하기 표 41을 참조한다.

[2422] <표 41>

[2423] 실행가능성 허용 기준의 충족.

TIL 계통	세포 카운트		% 생존율		순도 (유동 세포측정법)		효능 (IFNγ ELISA) pg/1 x10^{6}개 세포/24시간	
	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
M1061T	6.48x10^9	6.66x10^9	88.05	84.93	95.3	91.5	4570	3158
M1062T	6.76x10^9	5.70x10^9	84.45	83.73	99.7	98.9	3921	3543
M1063T	14.9x10^9	13.5x10^9	82.05	77.15	98.7	99.6	5589	5478
M1064T	8.06x10^9	7.08x10^9	86.75	83.36	84.5	89.8	619	1563
M1065T	3.06x10^9	3.10x10^9	76.35	80.90	96.8	91.4	1363	2127
EP11001T	14.9x10^9	12.2x10^9	77.9	74.85	90.4	94.3	4263	5059
M1056T	13.1x10^9	10.7x10^9	84.8	80.20	94.2	94.1	6065	4216
M1058T	23.4x10^9	20.1x10^9	87.5	85.07	99	96.2	2983	4033
M1023T	18.4x10^9	144x10^9	90.5	89.52	96.5	98.8	7918	6010
P 값	0.1132		0.0742		0.9855		0.5821	
유의하게 상이한	없음		없음		없음		없음	

[2424]

[2425] 표 40에 열거된 허용 기준에 기초하여, 신선한 및 동결된 재-REP TIL을 요구가 충족되었는지 여부에 대해 평가하였다. (생존력은 재-REP의 지속기간이 7일이고, 잔류의 방사선조사된 PBMC가 TIL로부터 구별될 수 없었기 때문에 보고되지 않음.) 괄호 안의 수는 충족되지 않은 기준을 나타낸다. CD3+ 발현을 사용하여 측정된 순도 기준에 기초하여, 6/9 신선한 재-REP TIL 생성물은 엄격한 >90% 기준을 충족시켰으며 (M1061, M1065 및 EP11001은 그렇지 않았음), 8/9 해동된 생성물은 심지어 재-REP 후에도 허용 기준을 통과하였다. EP11001T 신선한 재-

REP에서의 CD3+ TIL의 낮은 수는 T 세포 수용체의 극심한 하향조절에 기인할 수 있다. 순도의 척도로서 CD3+ TIL의 측정은 M1023T 해동된 재-REP TIL에 대해 측정되지 않았다. 이 TIL 조성물에 대해, 순도는 TCRap 염색을 사용하여 추정되었으며, 별표 (*)로 나타낸다. 스튜던트-t 검정을 통계적 분석에 사용하였다. 하기 표 42를 참조한다.

[2426] <표 42>

[2427] 비교가능성 허용 기준의 충족.

[2428]

TIL 계통	세포 카운트		순도 (유동 세포측정법)		효능 (IFNγ ELISA) pg/1x10^{6}개 세포/24시간	
	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
M1061T	1.40x10^6	1.77x10^6	**(86.1)**	99.3	3638	2970
M1062T	2.64x10^6	1.10x10^6	99.3	97.1	1732	2060
M1063T	2.27x10^6	2.21x10^6	99.2	97.4	971	1273
M1064T	1.76x10^6	1.15x10^6	83.8	37.8	2676	1074
M1065T	3.16x10^6	1.91x10^6	**(78.1)**	**(75.8)**	2753	1744
EP11001T	2.02x10^6	0.738x10^6	**(18.2)**	85.4	1461	2522
M1056T	0.601x10^6	1.78x10^6	98.1	96.7	2374	5042
M1058T	0.740x10^6	2.20x10^6	98.4	99.2	770	4038
M1023T	2.69x10^6	3.03x10^6	97	39.9*	3512	923
P 값	0.6815		0.3369		0.7680	
유의하게 상이한	없음		없음		없음	

[2429] 참고문헌

[2430] Goff SL, Dudley ME, Citrin DE, Somerville RP, Wunderlich JR, Danforth DN, Zlott DA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Klebanoff CA, Hughes MS, Restifo NP, Langhan MM, Shelton TE, Lu L, Kwong ML, Ilyas S, Klemen ND, Payabyab EC, Morton KE, Toomey MA, Steinberg SM, White DE, Rosenberg SA. Randomized, Prospective Evaluation Comparing Intensity of Lymphodepletion Before Adoptive Transfer of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Metastatic Melanoma. J Clin Oncol. 2016 Jul 10;34(20):2389-97. doi: 10.1200/JCO.2016.66.7220. Epub 2016 May 23. PubMed PMID: 27217459; PubMed Central PMCID: PMC4981979.

[2431] Hinrichs CS, Rosenberg SA. Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. Immunol Rev. 2014 Jan;257(1):56-71. doi:10.1111/imr.12132. Review. PubMed PMID: 24329789; PubMed Central PMCID: PMC3920180.

[2432] Jin J, Sabatino M, Somerville R, Wilson JR, Dudley ME, Stroncek DF, Rosenberg SA. Simplified method of the growth of human tumor infiltrating lymphocytes in gas-permeable flasks to numbers needed for patient treatment. J Immunother. 2012 Apr;35(3):283-92. d10.1097/CJI.0b013e31824e801f. PubMed PMID: 22421946; PubMed Central PMCID: PMC3315105.

[2433] Somerville RP, Devillier L, Parkhurst MR, Rosenberg SA, Dudley ME. Clinical scale rapid expansion of lymphocytes for adoptive cell transfer therapy in the WAVE® bioreactor. J Transl Med. 2012 Apr 4;10:69.

[2434] Donia M, Larsen SM, Met O, Svane IM. Simplified protocol for clinical-grade tumor-infiltrating

lymphocyte manufacturing with use of the Wave bioreactor. Cytotherapy. 2014 Aug;16(8):1117-20. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.02.004; PubMed PMID: 24831841.

[2435] Henning AL, Levitt DE, Vingren JL, McFarlin BK. Measurement of T-Cell Telomere Length Using Amplified-Signal FISH Staining and Flow Cytometry. Curr Protoc Cytom. 2017 Jan 5;79:7.47.1-7.47.10. doi: 10.1002/cpcy.11. PubMed PMID 28055115

[2436] Kelesidis T, Schmid I. Assessment of Telomere Length, Phenotype, and DNA Content. Curr Protoc Cytom. 2017 Jan 5;79:7.26.1-7.26.23. doi: 10.1002/cpcy.12. PubMed PMID: 28055113.

[2437] Gardner M, Bann D, Wiley L, Cooper R, Hardy R, Nitsch D, Martin-Ruiz C, Shiels P, Sayer AA, Barbieri M, Bekaert S, Bischoff C, Brooks-Wilson A, Chen W, Cooper C, Christensen K, De Meyer T, Deary I, Der G, Diez Roux A, Fitzpatrick A, Hajat A, Halaschek-Wiener J, Harris S, Hunt SC, Jagger C, Jeon HS, Kaplan R, Kimura M, Lansdorp P, Li C, Maeda T, Mangino M, Nawrot TS, Nilsson P, Nordfjall K, Paolisso G, Ren F, Riabowol K, Robertson T, Roos G, Staessen JA, Spector T, Tang N, Unryn B, van der Harst P, Woo J, Xing C, Yadegarfar ME, Park JY, Young N, Kuh D, von Zglinicki T, Ben-Shlomo Y; Halcyon study team.. Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. Exp Gerontol. 2014 Mar;51:15-27. doi:10.1016/j.exger.2013.12.004. Epub 2013 Dec 21. Review. PubMed PMID: 24365661;PubMed Central PMCID: PMC4523138.

[2438] Carbonari M, Tedesco T, Fiorilli M. Correlation between terminal restriction fragments and flow-FISH measures in samples over wide range telomere lengths. Cell Prolif. 2014 Feb;47(1):20-7. doi: 10.1111/cpr.12086. PubMed PMID: 24450811.

[2439] Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. Nat Biotechnol. 1998 Aug;16(8):743-7. PubMed PMID: 9702772.

[2440] Li Y, Liu S, Hernandez J, Vence L, Hwu P, Radvanyi L. MART-1-specific melanoma tumor-infiltrating lymphocytes maintaining CD28 expression have improved survival and expansion capability following antigenic restimulation in vitro. J Immunol. 2010 Jan 1;184(1):452-65. doi: 10.4049/jimmunol.0901101. Epub 2009 Nov 30. PubMed PMID: 19949105.

[2441] Rosenberg SA, Dudley ME. Adoptive cell therapy for the treatment of patients with metastatic melanoma. Curr Opin Immunol. 2009 Apr;21(2):233-40. doi:10.1016/j.coi.2009.03.002. Epub 2009 Mar 21. Review. PubMed PMID: 19304471; PubMed Central PMCID: PMC3459355.

[2442] Shen X, Zhou J, Hathcock KS, Robbins P, Powell DJ Jr, Rosenberg SA, Hodes RJ. Persistence of tumor infiltrating lymphocytes in adoptive immunotherapy correlates with telomere length. J Immunother. 2007 Jan;30(1):123-9. PubMed PMID:17198091; PubMed Central PMCID: PMC2151201.

[2443] Zhou J, Shen X, Huang J, Hodes RJ, Rosenberg SA, Robbins PF. Telomere length of transferred lymphocytes correlates with in vivo persistence and tumor regression in melanoma patients receiving cell transfer therapy. J Immunol. 2005 Nov 15;175(10):7046-52. PubMed PMID: 16272366; PubMed Central PMCID: PMC1351312.

[2444] Maciejowski J, de Lange T. Telomeres in cancer: tumour suppression and genome instability. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017 Mar;18(3):175-186. doi:10.1038/nrm.2016.171. Epub 2017 Jan 18. Review. PubMed PMID: 28096526.

[2445] Erdel F, Kratz K, Willcox S, Griffith JD, Greene EC, de Lange T. Telomere Recognition and Assembly Mechanism of Mammalian Shelterin. Cell Rep. 2017 Jan 3;18(1):41-53. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.005. PubMed PMID: 28052260; PubMed Central PMCID: PMC5225662.

[2446] Cardenas ME, Bianchi A, de Lange T. A Xenopus egg factor with DNA-binding properties characteristic of terminus-specific telomeric proteins. Genes Dev.1993 May;7(5):883-94. PubMed PMID: 7684008.

[2447] de Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Apr

12;91(8):2882-5. Review. PubMed PMID: 8159672; PubMed Central PMCID: PMC43476.

[2448] de Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE. Structure and variability of human chromosome ends. Mol Cell Biol. 1990 Feb;10(2):518-27. PubMed PMID: 2300052; PubMed Central PMCID: PMC360828.

[2449] 9. **추가의 표**

[2450] <표 43> - 도 39: CD4+ 세포

종양 ID	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023
신선한	4.85	34	10.5	41.7	64.9	64.7	4.15	12.3	8.38
해동된	5.68	33	11.3	49.5	61.7	62.6	3.46	17.9	7.6
신선한 재REP	8.1	23.5	19.2	39/	31.9	16.3	6.46	12.9	16.7
해동된 재REP	11	33	15.3	49.3	39.3	26.7	9.51	17.2	19.1

[2451]

[2452] <표 44> - 도 40: CD8+ 세포

종양 ID	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023
신선한	45.6	54.7	85.8	38.2	28.6	22.3	93.2	84	88.8
해동된	50.8	55.7	76.7	37	22.8	19	92.9	76.6	84.3
신선한 재REP	63	48.3	72.4	37.9	47.8	5.87	90.3	74.5	74.4
해동된 재REP	66.3	46.7	47	21.6	19.1	9.23	82.8	63.7	64.3

[2453]

[2454] <표 45> - 도 41: CD4+CD154+ 세포 및 도 105: CD8+CD154+ 세포

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	CD154+	78.6	nd	nd	nd	93.3	62.1	94	76.2
CD8	CD154+	37.3	nd	nd	nd	85.8	19.9	89.3	61.1

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	CD154+	88.9	84	56	82.1	68.2	93.6	97	90.3
CD8	CD154+	35.6	49	12.5	19	59.1	77.88	0.025	90.1

[2455]

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	CD154+	91	87.2	79.1	83.1	89.3	92	90.1	92.6	77.9	66.9
CD8	CD154+	17	20.3	40	36.9	23	27.6	40.5	52.1	17.9	13.7

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	CD154+	0	91.6	52.1	87.1	77	86.4	92.7	85.1	90.7	81.3
CD8	CD154+	0.00609	61.8	45.3	74.8	47.3	81.7	73.6	78.3	24.2	27.1

[2456]

[2457] <표 46> - 도 43: CD4+CD69+ 세포 및 도 17: CD8+CD69+ 세포

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	CD69+	33.9	nd	nd	nd	82.2	68.8	51.3	84.8
CD8	CD69+	22.4	nd	nd	nd	83	78.3	67.8	78.6

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	CD69+	58.7	69.6	67.6	77.6	77.6	86.7	85.5	78.5
CD8	CD69+	80.9	80	62.7	73.2	87.6	87.9	92.2	88.3

[2458]

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	CD69+	82.7	84.4	78.7	58.3	83.9	84.9	89.7	644.6	33.8	38.7
CD8	CD69+	78.9	72.3	69.5	54.5	80.3	86	68	77.8	41.3	48.8

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	CD69+	90.2	93.2	74.7	39.1	96.1	93.8	91.1	93.7	35.3	80.1
CD8	CD69+	91.3	90.5	87.6	52.9	95.4	94.2	93.1	93.6	71.1	88.1

[2459]

[2460] <표 47> - 도 45: CD4+CD137+ 세포 및 도 19 CD8+CD137+ 세포

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	CD137+	19.8	nd	nd	nd	65.4	30.4	nd	1.31
CD8	CD137+	19.8	nd	nd	nd	65.4	30.4	nd	1.31

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	CD137+	15.4	30.4	73	78.1	62.6	53.2	51.6	64.7
CD8	CD137+	28.8	43.1	39.3	35.3	84.4	85.7	71.1	81

[2461]

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	CD137+	524	7.26	7.78	5.4	4.28	3.65	6.89	4.6	4.28	9.67
CD8	CD137+	3.23	7.26	7.78	5.4	4.28	3.65	6.89	4.6	4.28	9.67

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	CD137+	31.1	24.6	65.1	47.8	221	18.6	61.6	56.9	49.8	50.8
CD8	CD137+	50.9	33.8	57.3	54.6	77.3	78.8	76.9	87	58	50.3

[2462]

[2463] <표 48> - 도 47: CD4+CM 세포 및 도 21 CD8+CM 세포

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	CM	1.08	n/d	0.59	0.29	10.4	2.08	14.4	0.13
CD8	CM	0.37	n/d	0.9	0.17	3.2	0.66	73.2	0.13

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	CM	2.32	7.71	13.8	12.6	13.4	22.3	15.9	18.6
CD8	CM	1.85	9.38	6.48	14.2	15.7	25.7	24.2	25.8

[2464]

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	CM	0.42	0.53	0.48	1.17	1.83	1.5	1.36	1.8	2.45	1.79
CD8	CM	0.21	0.67	2.65	1.79	0.33	0.72	0.91	0.67	1.99	2.22

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	CM	7.03	2.28	18.9	3.73	49.6	55.6	20.1	12.6	22.1	12.7
CD8	CM	5.05	1.6	11.4	3.37	25.8	26.4	21.6	19.8	11.1	7.59

[2465]

[2466] <표 49> - 도 49: CD4+EM 세포 및 도 23 CD8+EM 세포

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	EM	90	n/d	98.3	98.9	83.9	97.2	84.1	99.8
CD8	EM	89.1	n/d	80.6	87.9	92.4	97.8	20.8	98.8

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	EM	95.6	84.4	84.5	83.4	84.3	73.7	80.6	80.4
CD8	EM	97.2	87.9	90.8	82.3	82.5	72.2	74.5	73

[2467]

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	EM	99.4	99.4	96.7	97.4	97.1	97.8	97.4	97.6	9.62	95.3
CD8	EM	98.3	98.6	91.8	95.5	98.8	98.9	98.8	99.2	93.9	95.2

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	EM	91.7	97	74.3	90.7	36.2	25.5	73.9	81.8	73.1	76.4
CD8	EM	91.5	96.1	83	90.8	73.2	71.9	77.1	78.2	84.1	85.1

[2468]

[2469] <표 50> - 도 51: CD4+CD28+ 세포 및 도 25 CD8+CD28+ 세포

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	CD28+	4.6	5.85	33.2	37	10.5	11.2	31.9	27.6
CD8	CD28+	30.1	34	24.5	23.1	83.8	49.3	22.5	15.5

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	CD28+	6.75	7.18	21.6	27.8	18.6	15	23	27.6
CD8	CD28+	24.6	17.9	10	6.4	28.6	18.9	15.7	11

[2470]

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	CD28+	41.7	38.2	63.2	59.8	3.97	3.29	12.2	17.5	8.27	7.48
CD8	CD28+	13.4	8.52	14.5	12	53	54.4	56.5	62.1	76.5	80.8

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	CD28+	12.3	15.2	13.3	20	6.22	9.29	12.3	16.5	15.4	17.9
CD8	CD28+	6.9	2.43	2.07	3.75	24	34	27	36.9	42	43.9

[2471]

[2472] <표 51> - 도 53: CD4+PD-1+ 세포 및 도 27 CD8+PD-1+ 세포

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	PD-1+	48.5	nd	nd	nd	77	40.6	nd	22.4
CD8	PD-1+	37.1	nd	nd	nd	56	24.6	nd	14

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	PD-1+	36.8	34.2	15.7	26.7	43.9	66	32.4	14.5
CD8	PD-1+	40.4	35.3	6.3	6.21	18	20.4	35.6	23.2

[2473]

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	PD-1+	7.87	7.23	33.3	28.2	33.9	32.8	41.7	38	22.7	23.8
CD8	PD-1+	1.61	0.72	19.2	12.5	23.8	24.7	78.4	59.8	42.6	36.1

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	PD-1+	22.4	15.5	40.9	33.4	56	51.3	40.3	32.5	18.9	27.3
CD8	PD-1+	6.49	5.73	29.8	34.6	18.9	15.2	68.6	47	28.9	36.1

[2474]

[2475] <표 52> - 도 55: CD4+LAG3+ 세포 및 도 29 CD8+LAG3+ 세포

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	LAG3+	16.8	nd	nd	nd	93.5	37.3	nd	6.8
CD8	LAG3+	74	nd	rid	nd	98.4	81.5	nd	31.8

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	LAG3+	68.3	73.1	35.2	56.9	26.9	27.3	52.6	64
CD8	LAG3+	98.3	98.7	97.1	97.7	89.6	85.1	92.8	94.7

[2476]

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	LAG3+	47.2	30.5	35.5	20.1	25	27.4	48.6	38	14.5	7.65
CD8	LAG3+	85.3	38.7	89.6	64.2	83.4	81.9	93.2	66.3	90.3	71.1

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	LAG3+	65.8	68.2	40.9	46	44.1	39.1	52.1	51	48.5	17.7
CD8	LAG3+	95.4	97.8	92.4	92.5	97.5	98.4	98.2	98.3	97.7	78.1

[2477]

[2478] <표 53> - 도 57: CD4+TIM-3+ 세포 및 도 31 CD8+TIM-3+ 세포

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	TIM3+	89.7	nd	nd	nd	98.3	87.6	nd	43.2
CD8	TIM3+	99	nd	nd	nd	99.4	88.1	nd	47

T 세포	마커	M1061		M1062		M1063		M1064	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	TIM3+	95.3	98	94.5	96.9	90.8	90.2	94.2	82.6
CD8	TIM3+	98.9	98.9	97.3	96.7	97.1	97.7	98.2	95.7

[2479]

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된	신선한	해동된
CD4	TIM3+	95	78.8	96.9	91.5	96.4	92.5	88.7	80.1	89.9	82.3
CD8	TIM3+	96.9	50.6	98.8	83	98.3	92.9	96.5	73.6	98.2	88.5

T 세포	마커	M1065		EP11001		M1056		M1058		M1203	
		신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP	신선한 재-REP	해동된 재-REP
CD4	TIM3+	91.1	95.4	94.3	98.7	74	75.4	86.5	87.3	94.4	90.6
CD8	TIM3+	94.9	96.5	96.3	98.3	98	99	97.3	98.6	99	97.7

[2480]

[2481] <표 54> - 도 61: 텔로미어 길이 반복부의 qPCR 및 유동-FISH 측정

종양 ID	M1061	M1062	M1063	M1064	M1065	EP11001	M1056	M1058	M1023
qPCR	0.111878	0.135842	0.149685	0.179244	0.151774	0.137738	0.134904	0.124137	0.086569
유동-FISH	9.330236	1215041	8.782231	7.174627	8.961553	6112918	9.010615	7.944534	5.766692

[2482]

[2483] **실시예 20: 전이성 흑색종을 갖는 환자에게 투여된 신규한 냉동보존된 종양 침윤 림프구 (LN-144)**

[2484] 전이성 흑색종을 갖는 환자에게 투여된 신규한 냉동보존된 종양 침윤 림프구 (LN-144)는 다기관 2상 임상 시험에서 효능 및 내약성을 입증한다.

[2485] **도입:**

[2486] 비-냉동보존된 종양 침윤 림프구 (TIL)로의 입양 세포 요법 (ACT)의 안전성 및 효능은 전이성 흑색종을 갖는 수백 명의 환자에서 연구되었다. 이 다기관 임상 시험은 비-냉동보존된 및 냉동보존된 주입 생성물로서 중앙집중적으로 제조된 TIL (LN-144)로 개시되었다. 비-냉동보존된 LN-144를 위한 본 발명자들의 신규한 제조 프로세스는 코호트 1, 및 단축된 3주에서 사용되고, 냉동보존된 LN-144는 코호트 2에서 사용된다. 코호트 2 제조는 환자 스케줄링 및 투여의 유연성을 허용하는 냉동보존된 TIL 생성물과 결합된, 유의하게 보다 짧은 프로세스를 제공한다. 보다 짧은 제조 프로세스는 환자가 그들의 TIL 생성물을 받기 위해 기다리는 시간을 감소시키며, 냉동보존은 임상 사이트로의 물류 및 전달에 대한 편의성을 더한다.

[2487] 방법:

[2488] C-144-01은 LN-144를 받는 전이성 흑색종 환자를 평가하는 전향적, 다기관 연구이다. Cy/Flu 사전컨디셔닝 처방으로의 비-골수절제 림프구고갈 후, 환자는 LN-144의 단일 주입, 이어서 6개 이하의 용량의 IL-2 (600,000 IU/kg)의 투여를 받는다. 환자를 24개월 이하 동안 1차 종점으로서 객관적 반응에 대해 평가한다.

[2489] 결과:

[2490] 본 발명자들은 코호트 1에 대해 사용된 것과 동일한 사전- 및 사후-TIL 주입 치료 처방 후의 코호트 2 (N=10)인 환자의 제2 코호트에게 투여된 냉동보존된 LN-144를 특징규명한다.

[2491] 코호트 2 환자를 증가된 수의 사전 계통으로 심하게 사전처리하였으며, 모든 환자는 항-CTLA-4 및 항-PD-1 요법, 및 보다 큰 종양 부하 (평균 SOD: 코호트 2, 1에 대해 15.3, 10.9 cm)를 갖는다. 사전 전신 요법의 중위 수는 코호트 2, 1에 대해 각각 4, 3이다. 안전성 데이터의 초기 분석은 냉동보존된 LN-144의 필적하는 내약성을 입증한다. 비-냉동보존된 LN-144를 받고 있는 코호트 1 환자에 대한 안전성 프로파일은 이 후기 단계 환자 집단에 대해 허용가능함을 계속한다. 빈도별로 둘 다의 코호트에서 관찰되는 가장 통상적인 TEAE는 구역, 빈혈, 열성 호중성백혈구감소증, 감소된 호중구 카운트 감소된, 감소된 혈소판 카운트이다. 효능 데이터의 초기 검토는 코호트 2에서 치료된 환자에서 관찰된 TIL 요법에 대해 PR을 비롯한 항-종양 활성을 지시한다.

[2492] 결론:

[2493] 이는 유의하게 보다 짧은 프로세스 (대략 3주)를 갖는 냉동보존된 자가 생성물에 대한 신규한 프로세스를 평가하는 중앙집중적으로 제조된 TIL로의 다기관 환경에서의 제1 임상 시험을 나타낸다. 예비 결과는 검사점 억제제를 비롯한 다수의 사전 요법에 실패한 전이성 흑색종을 갖는 환자에 대한 안전하고 허용가능한 치료 선택안으로서 냉동보존된 LN-144를 지시한다. 냉동보존된 LN-144는 환자 및 돌보미에 대한 보다 큰 유연성을 제공하며, 이러한 높은 비충족된 의학적 필요를 갖는 환자에 대한 보다 즉각적인 치료를 허용한다. NCT02360579.

[2494] **실시예 21: 2A 프로세스에 사용하기 위한 혈청-무함유 배지의 평가**

[2495] 이 실시예는 현재 2A 프로세스에 사용되는 표준 CM1, CM2, 및 CM4 배지에 대한 대체물로서 혈청-무함유 배지의 효능의 평가를 나타내는 데이터를 제공한다. 이 연구는 대체물로서 이용가능한 혈청-무함유 배지 (SFM) 및 혈청 무함유 대안품의 효능을 3가지 상에서 시험하였다;

[2496] 1상: 혈청 대체물 또는 혈소판 용해물을 갖거나 갖지 않는 표준 대 CTS 옵티마이저 또는 프라임 (Prime) T CDM 또는 엑스비보 (Xvivo)-20 혈청 무함유 배지를 사용하여 TIL 확장의 효능을 비교하였다 (n = 3).

[2497] 2상: G-렉스 5M을 사용한 미니-스케일 2A 프로세스에서의 후보 혈청 무함유 배지 조건을 시험하였다 (n=3).

[2498] 배경 정보

[2499] 사전 및 사후 REP 배양에 사용된 현재의 배지 조합은 효과적인 것으로 입증되었지만, REP 실패는 AIM-V로 일어날 수 있다. 효과적인 혈청-무함유 대안품이 확인된 경우, 이는 사용되는 배지 유형의 수를 3개에서 1개로 감소시킴으로써 프로세스를 CMO에서 수행되기에 보다 간단하고 단순하게 만들 것이다. 추가적으로, SFM은 인간 혈청의 사용을 제거함으로써 우발적인 질환의 기회를 감소시킨다. 이 실시예는 2A 프로세스에서 혈청 무함유 배지의 사용을 지지하는 것을 나타낸 데이터를 제공한다.

[2500] 약어

[2501] μl 마이크로리터

[2502] CM1,2,4 완전 배지 1, 2, 4

[2503] CTS OpTimizer SFM 세포 요법 시스템 옵티마이저 혈청 무함유 배지

[2504] g 그램

[2505] Hr 시간

[2506] IFU 사용을 위한 지시서

[2507] IL-2 인터루킨-2 시토카인

[2508] Min 분

[2509] mL 밀리리터

[2510] ℃ 도 섭씨

[2511] 사전REP 사전-급속 확장 프로토콜

[2512] REP 급속 확장 프로토콜

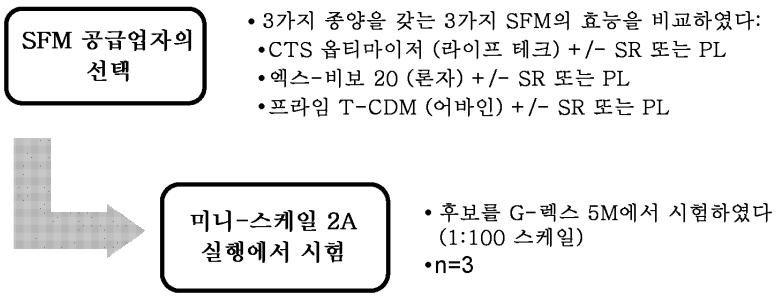
[2513] RT 실온

[2514] SR 혈청 대체물

[2515] TIL 종양 침윤 림프구

[2516] 실험 설계

[2517] 사전-REP 및 REP를 LAB-008에서 언급된 바와 같이 개시하였다. 실험의 이 3가지 상의 개관을 하기 차트에 나타낸다:



[2518]

[2519] 상기 차트에서 제공된 바와 같이, 프로젝트를 친밀화하여 2개의 단계에서 혈청 무함유 배지 및 보충물을 시험하였다.

[2520] 단계 1. 혈청-무함유 배지 공급업자의 선택. 사전REP 및 사후REP를 G-렉스 24 웰 플레이트에서 2A 프로세스를 모방하도록 설정하였다. 사전REP를 G-렉스 24 웰 플레이트의 각각의 단편/웰을 조건 당 삼중으로 또는 사중으로 배양함으로써 개시하였다. REP를 제11일에 G-렉스 24 웰의 4 × 10e5개의 TIL/웰을 배양하고, 제16일에 분할하고, 제22일에 수확함으로써 개시하였다. CTS 옵티마이저, 엑스-비보 20, 및 프라임 T-CDM을 사전REP 및 REP에 사용하기 위한 잠재적 혈청-무함유 배지 대안품으로서 사용하였다. CTS 이뮨 (Immune) SR 혈청 대체물

(라이프 테크놀로지즈 (Life Technologies)) 또는 혈소판 용해물 혈청 (SDBB)을 3%로 SFM에 첨가하였다. 각각의 조건은 2A 프로세스를 모방하는 사전REP 및 사후REP 둘 다에서 적어도 3가지 종양으로 시험하도록 계획되었다.

[2521] 단계 2. 확인된 후보를 프로토콜 (TP-17-007) 당 미니-스케일 2A 프로세스에 대해 추가로 시험하였다. 간략하게, 사전REP를 2개의 단편/G-렉스 5M 플라스크를 조건 당 삼중으로 배양함으로써 개시하였다. REP를 제11일에 2 × 10e6/G-렉스 5M 플라스크를 사용하여 개시하고, 제16일에 분할하고, 제22일에 수확하였다.

[2522] **주:** 일부 종양을 프로세싱하고, 한 실험에서 다수의 파라미터를 측정하도록 설정하였다.

[2523] 관찰

[2524] 혈청-무함유 배지를 2A 프로세스에 사용된 표준과 비교할 경우 세포 성장에서 등가의 또는 통계적으로 더 나은 결과가 관찰되었다.

[2525] 2A 프로세스에 사용된 표준 배지에서 성장된 TIL과 비교할 경우 혈청-무함유 배지에서 성장된 TIL로부터 유사한 표현형, IFN-γ 생산, 및 대사물 분석이 관찰되었다.

[2526] 결과

[2527] **사전 및 사후 REP TIL 확장에 대한 혈청 무함유 배지의 효능의 시험.**

[2528] **CTS 옵티마이저 + SR (혈청 대체물)은 향상된 사전REP TIL 확장 및 필적하는 REP TIL 확장을 나타내었다.** CTS 옵티마이저, 엑스-비보 20, 및 프라임 T-CDM을 3% CTS 이뮨 CTS SR과 함께 또는 없이 첨가하고, 표준 조건에 대해 시험하였다. M1079 및 L4026에서, CTS 옵티마이저 + CSR 조건은 표준 조건 (CM1, CM2, CM4)과 비교할 경우 유의하게 향상된 사전REP TIL 확장 ($p < 0.05$)을 나타내었다 (도 62a). 반대로, CSR 없는 CTS 옵티마이저는 사전REP TIL 확장에 도움이 되지 않았다 (부록 -1,2,3). CTS 옵티마이저 + CSR은 시험된 3가지 중 2가지의 종양에서 사후REP에서 필적하는 TIL 확장을 나타내었다 (도-2B). 다수의 변이는 사전 및 사후 REP에서 엑스-비보 20 및 프라임 T-CDM 조건으로 일어난 반면, CTS 옵티마이저는 사중실험 사이에 상대적으로 일관되었다. 또한, 첨가된 SFM 첨가된 혈소판 용해물은 표준과 비교할 경우 사전REP 및 사후REP TIL 확장을 향상시키지 않았다 (도 62a). 이 발견은 혈청 대체물이 본 발명자들의 표준과 필적하는 성장을 제공하는 데 확실히 필요하며, CTS 옵티마이저 +CSR이 후보일 수 있음을 시사한다.

[2529] G-렉스 5M 미니 스케일에서 후보 조건의 시험 (도 64 참조).

[2530] 사후 REP TIL의 표현형적 분석. 도 66 및 하기 표 56을 참조한다.

[2531] <표 56>

[2532] CTS 옵티마이저로의 CD8 편향

	평균 %CD8+	
	표준	CTS
M1078	11	34
M1079	29.3	43.85
M1080	33.67	54.37
L4020	0.02	0.17
EP11020	28.67	25.07
L4030	0.13	0.09
L4026	9.45	34.06
M1092	5.75	52.47
T6030	66	52.6

[2533]

[2534] 인터페론-감마 비교가능성

[2535] 인터페론-감마 ELISA (콴티킨). IFN-γ의 생산을 알앤디 시스템즈에 의한 콴티킨 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다. CTS+SR은 본 발명자들의 표준 조건과 비교할 경우 필적하는 양의 IFN-γ를 생산하였다. 도 67을 참조한다.

[2536] **실시예 22: T-세포 성장 인자 칵테일 IL-2/IL-15/IL-21은 종양-침윤 T 세포의 확장 및 이펙터 기능을 향상시킨다**

[2537] 자가 종양 침윤 림프구 (TIL)로의 입양 T 세포 요법은 전이성 흑색종 및 자궁경부 암종을 갖는 환자에서 임상적 효능을 입증하였다. 일부 연구에서, 보다 양호한 임상적 결과는 주입된 세포의 총 수 및/또는 CD8+ T 세포의 백분율과 양으로 상관되었다. 가장 현재의 생산 처방은 TIL 성장을 촉진시키기 위해 단지 IL-2를 이용한다. IL-15 및 IL-21-함유 처방을 사용하는 향상된 림프구 확장이 보고되었다. 이 연구는 IL-15 및 IL-21을 임상에서 최근 실행되는 제2 세대 IL-2-TIL 프로토콜에 첨가하는 것의 긍정적 효과를 기재한다.

[2538] 물질 및 방법

[2539] TIL을 생성하는 프로세스는 사전-급속 확장 프로토콜 (사전-REP)을 포함하며, 여기서, 1 내지 3 mm^3 크기의 종양 단편을 IL-2를 함유하는 배지에 정치한다. 사전-REP 동안, TIL은 종양 단편으로부터 이동하며, IL-2 자극에 반응하여 확장된다.

[2540] TIL 성장을 추가로 자극하기 위해, TIL을 방사선조사된 PBMC 공급자, IL-2 및 항-CD3을 포함하는 급속 확장 프로토콜 (REP)로 용어화된 2차 배양 기간을 통해 확장시킨다. 이 연구에서, 단축된 사전-REP 및 REP 확장 프로토콜을 개발하여 최종 TIL 생성물의 표현형적 및 기능적 속성을 유지하면서 TIL을 확장시켰다.

[2541] 이 단축된 TIL 제조 프로토콜을 사용하여 IL-2 단독 대 IL2/IL-15/IL-21의 조합의 영향을 평가하였다. 이들 2가지 배양 처방을 결장직장, 흑색종, 자궁경부, 삼중 음성 유방, 폐 및 신장 종양으로부터 성장된 TIL의 제조에 대해 비교하였다. 사전-REP의 완료 시, 배양된 TIL을 확장, 표현형, 기능 (CD107a+ 및 IFNγ) 및 TCR Vβ 레퍼토리에 대해 평가하였다.

[2542] 사전-REP 배양을 표준 IL-2 (600 IU/ml) 프로토콜을 사용하여, 또는 IL-2 외에도 IL-15 (180 IU/ml) 및 IL-21 (IU/ml)로 개시하였다. 세포를 사전-REP의 완료 시 확장에 대해 평가하였다. 배양물을 전체 성장이 적어도 20 % 향상된 경우 IL-2에 비해 증가된 확장을 갖는 것으로서 분류하였다. 흑색종 및 폐 표현형적 및 기능적 연구를 본원에 제시한다. 하기 표 57을 참조한다.

[2543] <표 57>

[2544] 다수의 적응증에서 IL-2/IL-15/IL-21로의 사전-REP 동안의 확장의 향상

종양 조직학	**IL-2의 # 대 IL-2/IL-15/IL-21 연구**	**IL-2/IL-15/IL-21 (IL-2에 비해) 을 사용한 성장의 >20% 향상을 입증하는 연구의 #**
흑색종	5	1/5(20%)
폐	8	3/8 (38%)
결장직장	11	7/11 (63%)
자궁경부	1	1/1 (100%)
췌장	2	2/2 (100%)
교모세포종	1	1/1 (100%)
삼중 음성 유방	1	1/2 (50%)

[2545]

[2546] 이들 데이터는 TIL을 IL-2 단독에 비해 IL-2/IL15/IL-21과 함께 배양한 경우, 폐에서의 표현형적 및 기능적 차이 외에도, 증가된 TIL 생성물 수득량을 입증한다.

[2547] TIL 확장에 대한 삼중 칵테일의 효과는 적응증-특이적이고, 대부분의 낮은 수득량 종양에 유익이 되었다.

[2548] CD8+/CD4+ T 세포 비는 NSCLC TIL 생성물에서의 처리에 의해 증가되었다.

[2549] T 세포 활성은 흑색종 및 NSCLC 둘 다에서 CD107a 발현 수준에 의해 평가된 바와 같이, IL-2에의 IL-15 및 IL-21의 첨가에 의해 향상된 것으로 보였다.

[2550] 여기에서 제공된 데이터는 보다 짧은, 보다 왕성한 프로세스, 예컨대 본 출원 및 다른 실시예에서 본원에 기재된 2A 프로세스를 사용한 TIL 확장이 IL-2/IL-15/IL-21 시토카인 칵테일을 포함하는 것으로 개조됨으로써, 특히 구체적인 적응증에서 TIL 확장을 추가로 촉진시키는 수단을 제공할 수 있음을 나타낸다.

[2551] 계속되는 실험은 TIL 기능에 대한 IL-2/IL-15/IL-21의 효과를 추가로 평가하고 있다.

[2552] 추가의 실험은 REP (제1 확장) 동안 삼중 칵테일의 효과를 평가할 것이다.

[2553] 이들 관찰은 특히 주류 항암 요법에 요구되는 폭넓은 적용가능성 및 이용가능성을 갖는 TIL의 대규모 제조에 필요한 TIL 배양 처방의 최적화 및 표준화에 관한 것이다.

[2554] **실시예 23: 간략화된 방법으로 생성된 냉동보존된 TIL**

[2555] **배경**

[2556] 이 실시예는 입양 세포 전달 (ACT)을 위한 바람직한 품질 속성을 나타내는 고 처리량 상업적 제조에 적합한 간략화된 방법으로 생성된, LN-144에 대한 냉동보존된 종양 침윤 림프구 (TIL) 생성물에 관한 데이터를 제공한다.

[2557] 임상적 TIL 생성물을 생성하는 기존의 방법은 치료 생성물을 생성하기 위해 열린 조작자 개입, 이어서 연장된 인큐베이션 기간을 포함한다. 1세대 프로세스는 대략 6주 걸리며, 신선한 생성물을 수득한다. TIL 요법을 그의 잠재성으로부터 유익을 얻을 수 있는 모든 환자에게 가져오기 위해, 먼 임상 사이트로의 선적이 가능한 냉동보존된 약물 생성물로 중앙집중화된 제조에 적합한 2세대의 간략화된 22일 배양 방법이 개발되었다. 2세대는 상업적 규모로 고 처리량 제조를 처리할 수 있는 유연한, 왕성한, 닫힌, 및 반-자동화 세포 제조 프로세스를 나타낸다. 이 방법에 의해 생성된 약물 생성물은 1세대 프로세스에 의해 생성된 것들과 필적하는 품질 속성을 갖는다.

[2558] **연구 목적:**

[2559] 1세대 (프로세스 1C 실시양태) 및 2세대 (프로세스 2A 실시양태) 프로세스에 의해 생성된 약물 생성물을 검정하여 하기 품질 속성의 관점에서 비교가능성을 측정하였다:

[2560] 용량 및 배수 확장.

[2561] T-세포 순도 및 T-세포 하위세트의 비율.

[2562] T-세포 하위세트 상의 공동-자극성 분자의 표현형적 발현.

[2563] 텔로미어 반복부의 평균 상대 길이.

[2564] TCR 재활성화에 반응하여 시토카인을 분비하는 능력.

[2565] T-세포 수용체 다양성.

[2566] **TIL 요법 프로세스의 개관:**

[2567] 추출: 환자의 TIL을 억제성 종양 미세환경으로부터 제거한다 (병변의 외과적 절제를 통해).

[2568] 확장: TIL을 IL-2과 함께의 배양에서 지수적으로 확장시켜 10^9 내지 10^{11}개의 TIL을 수득한 후, 이들을 환자 내로 주입한다.

[2569] 제제: 환자는 억제성 종양 미세환경을 잠재적으로 제거하고, TIL 요법의 이식 및 효능을 최대화하기 위해 NMA-LD (비-골수절제 림프구고갈, 시클로포스파미드: 60 mg/kg, IV × 2 용량 및 플루다라빈: 25 mg/m^2 × 5 용량)를 받는다.

[2570] 주입: 환자를 그들의 확장된 TIL (LN-144) 및 고-용량의 IL-2 (6개 이하의 용량 동안 600,000 IU/kg)의 짧은 지속기간으로 주입하여 TIL의 활성화, 증식, 및 항-종양 세포용해 활성을 촉진시킨다.

[2571] <표 58>

[2572] 2세대 제조에서의 프로세스 개선의 요약

프로세스 단계	**Gen 1**	**Gen 2**	**영향**
단편 배양	≤21일, 다수의 생물반응기, 다수의 조작자 개입	≤11일, 단일 닫힌 생물반응기, 개입 없음	배양을 단축함, 개입을 감소시킴, 자동화를 처리할 수 있음.
TIL 선택	IL-2 확장된 TIL 냉동보존, 시험, 표현형에 기초하여 선택, 해동, 공동-배양하기 위해 ≤ 30×106개의 TIL	공동-배양으로 직접 ≤ 200×10^{6}개의 벌크한 TIL	공동-배양의 증가된 시딩을 허용함으로써 프로세스를 단축시킴, 단계를 감소시킴, 시험을 제거함
급속 확장	≤36개 생물반응기, 14일	≤5개 생물반응기, 11일	조작자 개입을 감소시킴, 닫힌 계, 프로세스를 단축시킴, 자동화를 처리할 수 있음.
수확/세척	수동 개방 부피 감소 및 수확. 수동 세척 및 원심분리에 의한 농축.	닫힌 반-자동화 부피 감소 및 수확. 자동화 세척 및 농축.	조작자 개입을 감소시킴, 자동화, 닫힌 계를 유지함.
제형화	신선한 저온 생성물 (2 내지 8ºC)	냉동보존된 생성물 (≤ -150ºC)	운송 유연성, 환자 스케줄링, 보다

[2573]

			용이한 방출 시험, 세계적 시험
제조 시간	38일 프로세스 시간	22일 프로세스 시간	환자로의 반송, 클린 룸 처리량, COG

[2574]

[2575] **분석 방법 및 기기:**

[2576] **용량 및 생존력:** 최종 제형화된 생성물을 샘플링하고, NC-200 자동화 세포 카운터를 사용한 아크리딘 오렌지 / DAPI 반대염색에 의해 측정된 총 유핵 세포, 총 생존 세포, 및 생존력에 대해 검정하였다.

[2577] **유동 세포측정법:** 제형화된 약물 생성물을 샘플링하고, FACS에 의해 정체성에 대해 검정하였다. 퍼센트 T-세포를 생존 세포의 CD45, CD3 이중 양성 집단으로서 측정하였다. 각각의 프로세스에 대한 동결된 위성 또는 보초 바이알을 해동시키고, CD3, CD4, CD8, CD27, 및 CD28을 비롯한 연장된 표현형적 마커에 대해 검정하였다.

[2578] **텔로미어 반복부의 평균 상대 길이:** 유동-FISH 기술을 사용하여 텔로미어 반복부의 평균 길이를 측정하였다.

이 검정은 유동 세포측정법 프로토콜을 위한 데이코® 텔로미어 PNA 키트/FITC에 기재된 바와 같이 완료되었다. 간략하게, 2×10^6개의 TIL 세포를 2×10^6개의 1301 백혈병 세포와 합하였다. DNA를 82℃에서 10분 동안 변성시키고, PNA-FITC 프로브를 어둠에서 실온에서 밤새 혼성화하였다. 아이오딘화프로피듐을 사용하여 G0/1 기에서의 세포를 확인하였다.

[2579] **면역검정:** 재활성화 시 시토카인을 분비하는 약물 생성물의 능력을 mAb-코팅된 비드 (라이프 테크놀로지즈, 항-CD3, 항-CD28 및 항-CD137)와의 공동-배양 후에 측정하였다. 24시간 후, 배양 상청액을 수확하고, 동결시키고, 해동시키고, ELISA에 의해 콴티킨 IFNγ ELISA 키트 (알앤디 시스템즈)를 제조자의 지시서에 따라 사용하여 검정하였다.

[2580] **T-세포 수용체 다양성:** 최종 제형화된 생성물로부터의 RNA를 단리하고, VDJ 특이적 프라이머로 다중 PCR로 처리하였다. TIL 생성물 내에서 발현된 CDR3 서열을 반-정량적으로 증폭시켜 고유한 TIL 클론의 빈도 및 출현율을 측정하였다. 시퀀싱을 일루미나 마이섹 (Illumina MiSeq) 벤치톱 서열분석기 상에서 수행하였다. 값을 인덱싱하여 생성물에서의 T-세포 수용체의 상대적 다양성을 대표하는 점수를 수득하였다.

[2581] **결과 및 결론:**

[2582] 결과를 도 75 내지 81에 제공한다.

[2583] 2세대 프로세스는 1세대와 필적하는 품질 속성을 갖는 TIL 생성물을 생산한다.

[2584] 2세대는 Gen 1에 비해 필적하는 수준의 공동-자극성 분자를 발현하는 유사한 비율의 T-세포 하위세트로 구성된 유사한 양의 매우 순수한 TIL 생성물을 생산한다.

[2585] 2세대 TIL은 진입되는 경우, 시토카인의 왕성한 분비를 개시하는 TCR 수용체의 증가된 다양성을 나타낸다.

[2586] 냉동보존된 약물 생성물은 분포에 있어서의 유연성을 허용하는 중요한 물류적 효율을 도입한다.

[2587] 이전 프로세스와는 달리, 2세대 간략화된 22-일 확장 플랫폼은 요법의 긴급한 필요에 있는 환자에 대한 임상적 규모 용량의 급속 생성을 허용하는 확장가능하고 물류적으로 실행가능한 TIL 제조 플랫폼을 제시한다.

[2588] 2세대 TIL 제조 프로토콜은 지금까지는 TIL 요법의 보다 폭넓은 적용을 방해하였던 많은 장벽을 다룬다.

[2589] **실시예 24: 100:1 내지 25:1의 다양한 동종이형 공급자 세포:TIL 비의 평가**

[2590] 이 연구는 프로세스 1C에서 현재 이용되는 100:1 동종이형 공급자 세포 대 TIL의 대조군에 대해 25:1 및 50:1에서 TIL의 증식을 시험하였다.

[2591] 국립 암 연구소 (National Cancer Institute)의 수술 분과 (Surgery Branch)에 의해 공개된 연구는 REP의 개시에서 cm^2 당 5×10^6개의 동종이형 공급자 세포에서 G-렉스 100 플라스크에서 TIL의 최적 활성화를 위한 역치를 보였다[(1)]. 이는 수학적 모델링을 통해 확인되었으며, 동일한 모델로, 단위 면적 당 세포:세포 접촉에 대해 최적화된 공급자 층으로, TIL에 비한 동종이형 공급자 세포의 비율이 TIL 활성화 및 확장에 대한 최소 효과를 갖는 25:1로 감소될 수 있다고 예측하였다.

[2592] 이 연구는 REP 개시에서 단위 면적 당 공급자 세포의 최적 밀도를 확립하였으며, 임상적 로트 당 사용되는 공급자 세포의 양을 감소시키고 정규화하는 데 필요한 REP 개시에서의 동종이형 공급자 비의 유효 범위를 확인하였다. 연구는 또한 고정된 수의 공급자 세포와 공동-배양된 200×10^6개 미만의 TIL로의 REP의 개시를 확인하였다.

[2593] A. T-세포의 부피 (10 μm 직경): $V = (4/3)\ \pi r^3 = 523.6\ \mu m^3$

[2594] B. 40 μm (4개의 세포) 높이를 갖는 G-렉스 100 (M)의 컬럼: $V = (4/3)\ \pi r^3 = 4\times10^{12}\ \mu m^3$

[2595] C. 컬럼 B를 충전하는 데 요구되는 세포 수: $4\times10^{12}\ \mu m^3 / 523.6\ \mu m^3 = 7.6\times10^8\ \mu m^3 * 0.64 = 4.86\times10^8$

[2596] D. 4D 공간에서 최적으로 활성화될 수 있는 세포 수: $4.86\times10^8 / 24 = 20.25\times10^6$

[2597] E. G-렉스 500에 대해 추정된 공급자 및 TIL의 수: TIL: 100×10^6 및 공급자: 2.5×10^9

[2598] 방정식 1. 100 cm^2 베이스를 갖는 실린더에서 TIL의 활성화를 위한 20면체 기하구조를 제공하는 데 요구되는 단핵 세포의 수의 근사치. 계산은 NCI 실험 데이터를 가깝게 반영하는 T-세포의 역치 활성화에 대한 약 5×10^8의 실험적 결과를 유도한다.(1) (C) 승수 (0.64)는 1992년에 재거 및 나겔 (Jaeger and Nagel)에 의해 계산된 바와 같은 등가의 구에 대한 무작위 패킹 밀도이다.(2) (D) 제수 24는 4차원 공간 "뉴턴 수"에서 유사한 물체를 접촉할 수 있는 등가의 구의 수이다.(3)

[2599] **참고문헌**

[2600] (1) Jin, Jianjian, et al., Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Gas-Permeable Flasks to Numbers Needed for Patient Treatment. J Immunother. 2012 Apr; 35(3): 283-292.

[2601] (2) Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. 1992 Mar 20;255(5051):1523-31.

[2602] (3) O. R. Musin (2003). "The problem of the twenty-five spheres". Russ. Math. Surv. 58 (4): 794-795.

[2603] **실시예 25: TIL 생성물에 대한 핵심 품질 속성의 연구**

[2604] **배경**

[2605] 자가 종양 침윤 림프구 (TIL)로의 입양 T-세포 요법은 전이성 흑색종 및 다른 종양을 갖는 환자에서 임상적 효능을 입증하였다.[1-3]

[2606] 임상 연구로부터의 대부분의 보고는 품질 속성, 예컨대 생성물 효능 및/또는 안전성과 관련될 수 있는 멸균성, 정체성, 순도, 및 효능을 확인하는 의도로 주입된 TIL 생성물의 탐구적 분석을 포함하였다.[4,5]

[2607] 여기서, 본 발명자들은 TIL의 상업적 제조에 사용하기 위한 장래의 품질 제어 플랫폼에 기여할 수 있는 TIL 생성물로부터의 3가지 핵심 생성물 파라미터의 평가를 제시한다.

[2608] **TIL 요법 프로세스의 개관**

[2609] 1. 종양을 환자로부터 잘라내고, GMP 제조 시설로 수송하였다.

[2610] 2. 도착 시, 종양을 단편화하고, 사전-급속 확장 프로토콜 (REP)을 위해 IL-2를 갖는 플라스크에 정치한다.

[2611] 3. 사전-REP TIL을 방사선조사된 PBMC, 항-CD3 항체 (30 ng/mL), 및 IL-2 (3000 IU/mL)의 존재 하에서 REP 프로토콜에서 추가로 번식시켰다.

[2612] 4. TIL 생성물을 (1) 정체성 (2) 순도, 및 (3) 효능을 비롯한 중요한 품질 속성에 대해 평가하였다.

[2613] 5. 확장된 TIL (LN-144)의 주입 전에, 환자는 시클로포스파미드 및 플루다라빈으로 이루어진 비-골수절제 림프구고갈 처방을 받았다. TIL의 주입 후, 환자는 성장 및 이동된 TIL의 이식을 지지하기 위해 짧은 지속기간 (6개 이하의 용량)의 고-용량 IL-2 (600,000 IU/kg)를 받았다.

[2614] **연구 목적**

[2615] 목표: TIL 생성물을 정체성, 순도, 및 효능에 대해 충분히 특징규명하고, 그에 의해 (a) 중요한 품질 속성의 정의를 가이드하고, (b) TIL 생성물의 상업적 제조에서 실행되는 형식적 방출 기준의 확립을 지지하기 위해.

[2616] 전략: TIL 생성물 특징규명을 지지하는 하기 분석적 방법론을 개발하기 위해. 특히, 하기 방법을 수행하였다: 정체성 및 순도 평가를 위한 유동 세포측정법에 의한 표현형적 분석, 순도의 측정을 위한 잔류의 종양 세포 검출 검정, 및 효능의 평가를 위한 인터페론-감마 방출 검정.

[2617] **물질 및 방법**

[2618] **정체성 및 순도**

[2619] 표현형적 특징규명: TIL 생성물을 항-CD45, 항-CD3, 항-CD8, 항-CD4, 항-CD45RA, 항 CCR7, 항 CD62L, 항-CD19, 항-CD16, 및 항-CD56 항체로 염색하고, 유동 세포측정법에 의해 T 및 비-T 세포 하위세트의 정량화에 대해 분석

하였다.

[2620] **순도**

[2621] 잔류의 종양 검출 검정: TIL 생성물을 항-MCSP (흑색종-연관된 콘드로이틴 술페이트 프로테오글리칸) 및 항-CD45 항체, 뿐만 아니라 살아있는/죽은 고정가능한 아쿠아 염료로 염색한 후, 유동 세포측정법에 의해 흑색종 세포의 검출에 대해 분석하였다. 스파이킹 대조군을 사용하여 종양 검출의 정확도를 평가하고, 데이터 분석을 위한 게이팅 기준을 확립하였다.

[2622] **효능**

[2623] IFNγ 방출 검정: TIL 생성물을 항-CD3/CD28/CD137 코팅된 비드로 18 내지 24시간 동안 재-자극한 후, 상청액을 수확하여 ELISA 검정을 사용하여 IFNγ 분비를 평가하였다.

[2624] **결과**

[2625] 정체성: 대다수 (>99%)의 흑색종 TIL 생성물은 $CD45^+CD3^+$ 세포로 구성되었다.

[2626] 도 86a 내지 86c는 10-색상 유동 세포측정법 검정을 사용한 TIL 생성물의 표현형적 특징규명을 제공한다. (a) T-세포 및 비-T-세포 하위세트의 백분율은 각각 $CD45^+CD3^+$ 및 CD45-(비-림프구)/$CD45^+CD3^-$ (비-T-세포 림프구)에 의해 정의되었다. 전체적으로, 시험된 TIL 생성물의 >99%는 T-세포 ($CD45^+CD3^+$)로 이루어졌다. TIL 생성물의 평균이 나타내어진다 (n=10). (b) $CD45^+CD3^+CD8^+$ (청색 비어있는 원) 및 $CD45^+CD3^+CD4^+$ (분홍색 비어있는 원)를 비롯한 2가지 T-세포 하위세트의 백분율. 둘 다의 하위세트의 백분율의 통계적 차이는 스튜던트 독립표본 T 검정을 사용하여 관찰되지 않았다 (P=0.68). (c) 비-T-세포 집단은 1) 비-림프구 ($CD45^-$), 2) NK 세포 ($CD45^+CD3^-CD16^+/56^+$), 3) B-세포 ($CD45^+CD19^+$), 및 4) 비-NK/B-세포 ($CD45^+CD3^-CD16^-CD56^-CD19^-$)를 비롯한 4가지 상이한 하위세트에 대해 특징규명되었다.

[2627] 정체성: 대다수의 흑색종 TIL 생성물은 T-세포 세포독성 기능과 연관된 이펙터 또는 기억 T-세포 표현형을 나타내었다.

[2628] 도 87a 및 87b는 $CD45^+CD3^+CD4^+$ 및 $CD45^+CD3^+CD8^+$ 세포 집단에서의 T-세포 하위세트의 특징규명을 나타낸다. 나이브, 중심 기억 (TCM), 이펙터 기억 (TEF), 및 이펙터 기억 RA^+(EMRA) T-세포 하위세트는 CD45RA 및 CCR7을 사용하여 정의되었다. 도 87a 및 87b는 $CD4^+$ (a), 및 $CD8^+$ (b) 세포 집단 둘 다에서 10가지 최종 TIL 생성물로부터의 대표적인 T-세포 하위세트를 나타낸다. 이펙터 기억 T-세포 하위세트 (청색 비어있는 원)는 TIL 최종 생성물의 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 하위세트 둘 다에서 주요한 집단이었다 (>93%). TIL 생성물 세포의 7% 미만은 중심 기억 하위세트 (분홍색 비어있는 원)였다. EMRA (회색 비어있는 원) 및 나이브 (흑색 비어있는 원) 하위세트는 TIL 생성물에서 거의 검출되지 않았다 (<0.02%). p 값은 스튜던트 독립표본 T 검정을 사용한 EM 및 CM 사이의 차이를 나타낸다.

[2629] 순도: MCSP는 순도 검정을 위한 적절한 흑색종 종양 마커를 나타낸다.

[2630] 도 88a 및 88b는 흑색종 종양 세포에서의 MCSP 및 EpCAM 발현의 검출을 나타낸다. 흑색종 종양 세포주 (WM35, 526, 및 888), 환자-유래된 흑색종 세포주를 본원에 기재된 방법에 따라 생성하고 (1028, 1032, 및 1041), 결장 직장 선암종 세포주 (음성 대조군으로서 HT29)를 MCSP (흑색종-연관된 콘드로이틴 술페이트 프로테오글리칸) 및 EpCAM (상피 세포 부착 분자) 마커에 대해 염색함으로써 특징규명하였다. (a) 흑색종 종양 세포의 평균 90%는 MCSP를 발현하였다. (b) EpCAM 발현은 양성 대조군 HT29, EpCAM+ 종양 세포주에 비해 흑색종 종양 세포주에서 검출되지 않았다.

[2631] 순도: TIL 생성물에서 잔류의 종양 세포의 검출을 위한 유동 세포측정법-기재 검정의 개발.

[2632] 도 89a 및 89b는 종양 검출 정확도의 측정을 위한 스파이킹 대조군의 검출을 예시한다. 검정을 기지의 양의 종양 세포를 PBMC 현탁액 내로 스파이킹함으로써 수행하였다 (n=10). MCSP+526 흑색종 종양 세포를 1:10, 1:100, 및 1:1,000의 비로 희석한 후, PBMC와 혼합하고, 항-MCSP 및 항-CD45 항체 및 살아있는/죽은 염료로 염색하고, 유동 세포측정법에 의해 분석하였다. (a) 대략 3000개, 300개, 및 30개의 세포가 1:10, 1:100, 및 1:1000의 희석에서 각각 검출되었다. (b) 각각의 조건에서 획득된 세포의 평균 (AV) 및 표준 편차 (SD)를 사용하여 참조

상한 및 하한을 정의하였다.

[2633] 순도: 스파이킹 대조군을 사용한 잔류의 종양 검출 검정의 정성화

[2634] 도 90a 및 90b는 스파이킹 대조군에서의 상한 및 하한의 반복성 연구를 나타낸다. 3회의 독립적 실험을 삼중으로 수행하여 스파이킹 검정의 반복성을 측정하였다. (a) $MCSP^+$ 검출된 종양 세포의 수는 일관되게 참조 상한 및 하한의 범위 내였다. (b) 선형 회귀 플롯은 $MCSP^+$ 세포 및 스파이킹 희석 사이의 상관관계를 입증하며 (R^2=0.99), 흑색 실선은 최량 적합을 나타낸다. 녹색 및 회색 파선은 각각 표준 곡선 및 샘플에서의 95% 예측 한계를 나타낸다 (Exp#1 내지 3).

[2635] 순도: 흑색종 종양 세포 오염물은 최종 TIL 생성물에서의 검정 검출의 한계 미만이었다.

[2636] 도 91a 및 91b는 TIL 생성물에서의 잔류의 흑색종 종양의 검출을 나타낸다. TIL 생성물을 개발된 검정을 사용하여 잔류의 종양 오염에 대해 평가하였다 (n=15). 검출가능한 MCSP+ 사건의 중위 수 및 백분율은 각각 2 및 0.0002%였다.

[2637] 효능: TIL에 의한 IFNɣ 분비 (일관되게 > 1000 pg/ml)는 TIL 생성물의 이펙터 기능을 입증하였다.

[2638] 도 92는 T-세포 활성화 후의 TIL 생성물의 효능 평가를 나타낸다. ELISA에 의해 이중으로 평가된 TIL 생성물에서의 항-CD3/CD28/CD137로의 재-자극 후의 IFNɣ 분비 (n=5). TIL 생성물에 의한 IFNɣ 분비는 윌콕슨 부호 순위 검정을 사용하여 비자극된 대조군보다 유의하게 더 컸으며 (P=0.02), 일관되게 >1000 pg/ml이었다. IFNɣ 분비 >200 pg/ml는 강력한 것으로 간주되었다. p 값 <0.05는 통계적으로 유의한 것으로 간주된다.

[2639] **결론**

[2640] TIL 생성물의 정체성, 순도, 및 효능의 핵심 생성물 파라미터를 평가하였다. 본원에 기재된 방법에 따라 제조된 TIL 생성물은 99% 초과의 CD45+CD3+ T 세포로 이루어졌다. 대다수의 CD4+ 및 CD8+ TIL 하위세트는 T-세포 세포독성 기능과 연관된 이펙터-기억 표현형을 나타내었다. 최종 TIL 생성물에서 오염물 흑색종 종양 세포를 검출하기 위한 유동 세포측정법-기재 검정을 성공적으로 개발하고, 정성화하였다. 이 검정을 적용하여, 최종 TIL 생성물에서의 오염물 흑색종 종양 세포는 검정 검출의 한계 미만인 것으로 나타났다. 항-CD3/CD28/CD137 재-자극 후의 최종 TIL 생성물에 의한 IFNɣ 분비는 상업적으로 제조된 TIL에 대한 효능 검정으로서 기능할 수 있다. 이들 데이터는 TIL 생성물의 상업적 제조를 위한 중요한 품질 속성의 추가의 개발을 지지할 품질 제어 플랫폼의 토대를 제공한다.

[2641] **실시예 26: 고 처리량 상업적 제조에 적합한 간략화된 방법으로 생성된 냉동보존된 TIL 생성물은 입양 세포 전달을 위한 바람직한 품질 속성을 나타낸다**

[2642] **배경**

[2643] 입양 세포 전달 (ACT)을 위한 종양 침윤 림프구 (TIL)를 생성하는 고전적인 방법은 신선한 (비-냉동보존된) 주입 생성물을 수득하는 다수의 생체외 인큐베이션 단계를 포함한다.

[2644] 제1 세대 (Gen 1) 프로세스는 대략 6주에 신선한 TIL의 용량을 생산하였다. 생체외 배양 지속기간을 22일로 단축하는 제2 세대 (Gen 2) TIL 제조 프로세스가 개발되었다 (도 93).

[2645] Gen 2 프로세스는 중앙집중화된 제조에 적합하며, 스케줄링, 물류, 및 임상 사이트로의 전달에 있어서 편의성을 가져오는 냉동보존된 TIL 주입 생성물을 생성한다. Gen 2 프로세스에 의해 제조된 LN-144를 위한 냉동보존된 TIL 주입 생성물은 Gen 1 방법에 의해 생성된 TIL을 위한 비-냉동보존된 TIL 주입 생성물에 대해 필적하는 품질 속성을 갖는다. Gen 2 TIL 제조 방법은 상업적 규모로 고 처리량 TIL 제조를 처리할 수 있는 유연한, 왕성한, 닫힌, 및 반-자동화 세포 제조 프로세스를 나타낸다.

[2646] **연구 목적**

[2647] Gen 1 및 Gen 2 제조 프로세스에 의해 생성된 TIL 주입 생성물을 평가하여 하기 품질 속성의 관점에서 비교가능성을 측정하였다: (1) 세포 카운트 (용량), 생존력, REP 단계의 성장 속도, (2) T-세포 순도 및 T-세포 하위세트 상의 공동-자극성 분자의 표현형적 발현, (3) 텔로미어 반복부의 평균 상대 길이, (4) CD3, CD28, CD137 진입에 반응하여 IFNɣ를 분비하는 능력, 및 (5) 최종 주입 생성물에 존재하는 T-세포 수용체의 다양성 (도 94).

[2648] **분석 방법 및 기기**

[2649] 세포 카운트 및 생존력: 최종 제형화된 주입 생성물을 샘플링하고, NC-200 자동화 세포 카운터를 사용하여 아크리딘 오렌지/DAPI 반대염색에 의해 측정된 총 유핵 세포, 총 생존 세포, 및 생존력에 대해 검정하였다. 프로세스 발달 로트를 아크리딘 오렌지/프로피듐 아이오딘 이중 형광 염색을 사용하여 넥스셀롬 셀로미터 K2 세포 생존력 카운터 상에서 검정하였다.

[2650] 표현형적 마커: 제형화된 주입 생성물을 샘플링하고, 면역형광 염색에 의해 정체성에 대해 검정하였다. 퍼센트 T-세포를 생존 세포의 CD45+,CD3+ (이중 양성) 집단으로서 측정하였다. 각각의 프로세스에 대한 동결된 위성 또는 보초 바이알을 해동시키고, CD3, CD4, CD8, CD27, 및 CD28을 비롯한 연장된 표현형적 마커에 대해 검정하였다. 신선한 주입 생성물을 BD FACS 칸토 II 상에서 획득하고, 해동된 주입 생성물 상의 연장된 표현형적 마커를 바이오-래드 ZE5 세포 분석기 상에서 획득하였다.

[2651] 텔로미어 반복부의 평균 상대 길이: 유동-FISH 기술을 사용하여 텔로미어 반복부의 평균 길이를 측정하였다. 이 검정은 유동 세포측정법 프로토콜을 위한 데이코® 텔로미어 PNA 키트/FITC에 기재된 바와 같이 완료되었다. 간략하게, 2.0×10^{6}개의 TIL 세포를 2.0×10^{6}개의 인간 세포주 (1301) 백혈병 T-세포와 합하였다. DNA를 82℃에서 10분 동안 변성시키고, PNA-FITC 프로브를 어둠에서 실온에서 밤새 혼성화하였다. 아이오딘화프로피듐을 사용하여 G0/1 기에서의 세포를 확인하였다.

[2652] 면역 기능: 재활성화 시 IFNɣ를 분비하는 주입 생성물의 능력을 항체 코팅된 비드 (라이프 테크놀로지즈, 항-CD3, 항-CD28 및 항-CD137)와의 공동-배양 후에 측정하였다. 24시간 후, 배양 상청액을 수확하고, 동결시키고, 해동시키고, ELISA에 의해 콴티킨 IFNɣ ELISA 키트 (알앤디 시스템즈)를 제조자의 지시서에 따라 사용하여 검정하였다.

[2653] T-세포 수용체 다양성: 주입 생성물로부터의 RNA를 단리하고, VDJ 특이적 프라이머로 다중 PCR로 처리하였다. TIL 생성물 내에서 발현된 CDR3 서열을 반-정량적으로 증폭시키고, 딥 시퀀싱하여 고유한 TIL 클론의 빈도 및 출현율을 측정하였다. 시퀀싱을 일루미나 마이섹 벤치톱 서열분석기 상에서 수행하였다. 값을 인덱싱하여 생성물에서의 T-세포 수용체의 상대적 다양성을 대표하는 점수를 수득하였다.

[2654] **결과**

[2655] 제22일에 부피 감소된 세포 생성물을 풀링하고, 샘플링하여 세척 및 제형화 전에 배양 성능을 측정하였다. 도 95a 내지 95c는 총 생존 세포, 성장 속도, 및 생존력을 나타낸다. (a) 샘플을 이전에 기재된 바와 같이 NC-200 자동화 세포 카운터 상에서 분석하였다. 총 생존 세포 밀도를 4개의 독립적 샘플로부터의 이중 카운트의 전체 평균에 의해 측정한다. Gen 2 프로세스는 Gen 1과 유사한 용량의 TIL 생성물을 수득하였다 (Gen 1 평균 = $4.10\times10^{10}\pm2.8\times10^{10}$개, Gen 2 평균 = $4.12\times10^{10}\pm2.5\times10^{10}$개). (b) 성장 속도를 REP 단계에 대해 계산하였다. (c) 세포 생존력을 이전에 기재된 바와 같이 셀로미터 K2를 사용하여 9가지 프로세스 발달 로트로부터 평가하였다. 세포 생존력의 유의한 감소는 제형화된 생성물의 단일 동결-해동 사이클 후에 관찰되지 않았다. 해동 및 샘플링 시의 생존력의 평균 감소는 2.19%였다.

[2656] 도 96a 내지 96c는 Gen 2 생성물이 Gen 1과 필적하는 수준으로 공동자극성 분자를 발현하는 매우 순수한 T-세포 배양물임을 나타낸다. (도 96a) 신선한 제형화된 약물 생성물을 방출을 위한 유동 세포측정법에 의해 정체성에 대해 검정하였다. Gen 1 및 Gen 2 프로세스는 CD45+,CD3+ (이중 양성) 표현형에 의해 정의된 바와 같은 고 순도 T-세포 배양물을 생산한다. (도 96b 및 96c) 제형화된 약물 생성물의 냉동보존된 위성 바이알을 해동시키고, 이전에 기재된 바와 같이 유동 세포측정법에 의해 연장된 표현형에 대해 검정하였다. Gen 1 및 Gen 2 생성물은 T-세포 하위세트 상에 유사한 수준의 공동자극성 분자 CD27 및 CD28을 발현하였다. 공동자극성 분자, 예컨대 CD27 및 CD28은 T-세포 수용체 진입 시 이펙터 세포 증식에 필요한 2차 및 3차 신호화를 공급하는 데 요구될 수 있다. P-값을 만-휘트니 't' 검정을 사용하여 계산하였다.

[2657] 도 97은 Gen 2 생성물이 보다 긴 상대 텔로미어 길이에 대한 경향이 있음을 나타낸다. 유동-FISH 기술을 사용하여 이전에 기재된 바와 같이 텔로미어 반복부의 평균 길이를 측정하였다. RTL 값은 Gen 1에서의 염색체/게놈당 평균 텔로미어 형광이 7.5 % ± 2.1%이고, Gen 2는 대조군 세포주 (1301 백혈병 세포주)에서 염색체/게놈당 텔로미어 형광이 8.4% ± 1.8%이었음을 지시하였다. 데이터는 Gen 2 생성물이 평균적으로 Gen 1 생성물과 필적하는 텔로미어 길이를 가짐을 지시한다. 텔로미어 길이는 생체외 세포 배양물의 길이의 대리 척도이다.

[2658] 도 98은 Gen 2 약물 생성물이 CD3, CD28, 및 CD137 진입에 반응하여 IFNɣ를 분비함을 나타낸다. 냉동보존된 약물 생성물을 해동시키고, 이전에 기재된 바와 같이 항체-코팅된 비드와 함께 인큐베이션하였다. 데이터는 24

시간에 5×10^5개의 생존 세포에 의해 생산된 IFNɣ의 양으로서 표현된다. Gen 2 약물 생성물은 Gen 1 약물 생성물에 비해 재활성화 시 IFNɣ를 생산하는 증가된 능력을 나타내었다. 재활성화되고 시토카인을 분비하는 약물 생성물의 능력은 HLA의 맥락에서 동족 항원에의 TCR 결합 시 생체내 기능의 대리 척도이다.

[2659] 도 99a 및 99b는 Gen 2 약물 생성물이 고유한 T-세포 수용체의 증가된 다양성을 가짐을 나타낸다. T-세포 수용체 다양성을 하기와 같이 평가하였다. Gen 1 및 Gen 2 주입 생성물로부터의 10×10^6개의 TIL로부터의 RNA를 검정하여 각각의 생성물에 존재하는 고유한 CDR3 서열의 총 수 및 빈도를 측정하였다. (도 99a) 고유한 CDR3 서열을 각각의 생성물에서의 빈도에 대해 인덱싱하여 생성물에서의 T-세포 수용체의 전체 다양성의 대표인 점수를 수득하였다. (도 99b) 각각의 주입 생성물에 존재하는 고유한 CDR3 서열의 평균 총 수. 둘 다의 프로세스로부터의 TIL 생성물은 상이한 항원 특이성 및 결합력을 갖는 T-세포의 폴리클로날 집단으로 구성되었다. 총 T-세포 레퍼토리의 폭은 종양 세포에 제시된 작용가능한 에피토프의 수의 지표일 수 있다.

[2660] **결론**

[2661] Gen 2 제조 프로세스는 Gen 1과 필적하는 품질 속성을 갖는 TIL 주입 생성물 (LN-144)을 생산하였다. Gen 2는 유사한 용량의 매우 순수한 TIL을 생산하였다. T-세포 하위세트는 Gen 1에 비해 유사한 비율이었으며, 필적하는 수준에서 공동자극성 분자를 발현하였다. Gen 2 TIL은 감소된 생체외 배양 기간에 상응하는 보다 긴 상대 텔로미어 길이를 향한 경향을 가졌다. Gen 2 TIL은 진입되는 경우, 세포용해 이펙터 기능의 척도인 IFN-ɣ의 왕성한 분비를 개시한 TCR 수용체의 증가된 다양성을 나타내었다. 따라서, 냉동보존된 주입 생성물로의 Gen 2 간략화된 22-일 닫힌 확장 프로세스는 신규한 요법 선택안의 즉각적인 필요에서 암 환자를 위한 임상적 규모 용량의 급속 생성을 허용하는 확장가능하고 물류적으로 실행가능한 TIL 제조 플랫폼을 제시한다.

[2662] **참고문헌**

[2663] [1] Dudley, M. E. et al. Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 23, 2346-2357, doi:10.1200/JCO.2005.00.240 (2005).

[2664] [2] Chandran, S. S. et al. Treatment of metastatic uveal melanoma with adoptive transfer of tumour-infiltrating lymphocytes: a single-centre, two-stage, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol*, doi:10.1016/S1470-2045(17)30251-6 (2017).

[2665] [3] Stevanovic, S. et al. Complete regression of metastatic cervical cancer after treatment with human papillomavirus-targeted tumor-infiltrating T cells. *J Clin Oncol* 33, doi:10.1200/jco.2014.58.9093 (2015).

[2666] [4] FDA Reviewers and Sponsors: Content and Review of Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs), 21 CFR 610.3(r), 2008.

[2667] [5] Richards JO, Treisman J, Garlie N, Hanson JP, Oaks MK. Flow cytometry assessment of residual melanoma cells in tumor-infiltrating lymphocyte cultures. *Cytometry A* 2012; 81:374-81.

[2668] **실시예 27: T-세포 성장 인자 칵테일 IL-2/IL-15/IL-21은 본원에 기재된 신규한 프로세스에서 종양-침윤 T 세포의 확장 및 이펙터 기능을 향상시켰다**

[2669] **배경**

[2670] 자가 TIL로의 입양 T 세포 요법은 전이성 흑색종 및 자궁경부 암종을 갖는 환자에서 임상적 효능을 입증하였다. 일부 연구에서, 보다 양호한 임상적 결과는 주입된 세포의 총 수 및/또는 CD8+ T 세포의 백분율과 양으로 상관되었다. 대부분의 현재의 제조 처방은 TIL 성장을 촉진시키기 위해 단지 IL-2를 이용한다. IL-15 및 IL-21-함유 처방을 사용한 향상된 림프구 확장이 보고되었다. 이 연구는 IL-15 및 IL-21을 프로세스 2A의 실시양태 및 2세대 TIL 제조 프로세스에 첨가하는 것의 긍정적 효과 및 상승작용을 기재한다.

[2671] **본원에 기재된 신규한 프로세스를 사용한 TIL의 생성**

[2672] 종양을 환자로부터 잘라내고, GMP 제조 시설 또는 연구 목적을 위해 실험실로 수송하였다. 도착 시, 종양을 단편화하고, 사전-급속 확장 프로토콜 (사전-REP)을 위해 IL-2를 갖는 플라스크 내로 11일 동안 정치하였다. 삼중 칵테일 연구를 위해, IL-2, IL-15, 및 IL-21 (IL-2/IL-15/IL-21)을 사전-REP의 개시 시에 첨가하였다. 급속 확장 프로토콜 (REP)을 위해, TIL을 공급자 및 항-CD3 항체와 함께 추가의 11일 동안 배양하였다 (도 100).

[2673] **물질 및 방법**

[2674] TIL을 생성하는 프로세스는 사전-급속 확장 프로토콜 (사전-REP)을 포함하였으며, 여기서, 1 내지 3 mm3 크기의 종양 단편을 IL-2를 함유하는 배지에 정치하였 다. 사전-REP 동안, TIL은 종양 단편으로부터 이동하였고, IL-2 자극에 반응하여 확장되었다.

[2675] TIL 성장을 추가로 자극하기 위해, TIL을 방사선조사된 PBMC 공급자, IL-2 및 항-CD3 항체를 포함한 급속 확장 프로토콜 (REP)로 용어화된 2차 배양 기간을 통해 확장시켰다. 단축된 사전-REP 및 REP 확장 프로토콜을 개발하여 최종 TIL 생성물의 표현형적 및 기능적 속성을 유지하면서 TIL을 확장시켰다. 이 단축된 TIL-생성 프로토콜을 사용하여 IL-2 단독 대 사전-REP 단계에 첨가된 IL2/IL-15/IL-21의 조합의 영향을 평가하였다. 이들 2가지 배양 처방을 결장직장, 흑색종, 자궁경부, 삼중 음성 유방, 폐 및 신장 종양으로부터 성장된 TIL의 생성에 대해 비교하였다. 사전-REP의 완료 시, 배양된 TIL을 확장, 표현형, 기능 (CD107a+ 및 IFNɣ) 및 TCR Vβ 레퍼토리에 대해 평가하였다.

[2676] 연구는 다수의 종양 조직학에서 IL-2/IL-15/IL-21로의 사전-REP 동안 확장의 향상을 나타낸다. 사전-REP 배양을 표준 IL-2 (6000 IU/mL) 프로토콜을 사용하여, 또는 IL-2 외에도 IL-15 (180 IU/mL) 및 IL-21 (1 IU/mL)로 개시하였다 (도 101). 세포를 사전-REP의 완료 시 확장에 대해 평가하였다. 배양물을 전체 성장이 적어도 20 % 향상된 경우 IL-2에 비해 증가된 확장을 갖는 것으로 분류하였다. 흑색종 및 폐 표현형적 및 기능적 연구는 하기 단락에서 추가로 논의된다 (도 101에서 볼드체 텍스트).

[2677] IL-2/IL-15/IL-21은 폐 암종에서 CD8+ 세포의 백분율을 향상시켰지만, 흑색종에서는 그렇지 않았다. 도 102a 및 102b에서, (a) 흑색종 (n=4), 및 (b) 폐 (n=7)로부터 유래된 TIL을 사전-REP 후 유동 세포측정법을 사용하여 CD4+ 및 CD8+ 세포에 대해 표현형적으로 평가하였다. p 값은 스튜던트 독립표본 t-검정을 사용한 IL-2 및 IL-12/IL-15/IL-21 조건 사이의 차이를 나타낸다.

[2678] CD27의 발현은 IL-2/IL-15/IL-21로 처리된 배양물에서의 CD8+ 세포에서 약간 향상되었다. 도 103a 및 103b에서, (a) 흑색종 (n=4), 및 (b) 폐 (n=7)로부터 유래된 TIL을 사전-REP 후 유동 세포측정법을 사용하여 CD4+ 및 CD8+ 세포에서 CD27+ 및 CD28+에 대해 표현형적으로 평가하였다. 입양 T 세포 요법에 대한 결과와 상관된 보다 신생의 표현형과 연관된 세포 마커인 CD27의 발현은 IL-2 단독 대비 IL-2/IL-15/IL-21과의 배양으로부터 유래된 CD8+ TIL에서 약간 향상되었다.

[2679] T 세포 하위세트는 IL-15/IL-21의 첨가로 변경되지 않았다. 도 104a 및 104b에서, TIL을 사전-REP 후 유동 세포측정법을 통해 (a) 흑색종 (n=4), 및 (b) 폐 (n=8)로부터의 CD8+ 및 CD4+ (데이터는 나타내지 않음) 세포에서 이펙터/기억 하위세트 (CD45RA 및 CCR7)에 대해 표현형적으로 평가하였다. TEM=이펙터 기억 (CD45RA-, CCR7-), TCM=중심 기억 (CD45RA-, CCR7+), TSCM= 줄기 세포 기억 (CD45RA+, CCR7+), TEMRA=이펙터 T 세포 (CD45RA+CCR7-).

[2680] TIL의 기능적 용량은 IL-2/IL-15/IL-21로 차등적으로 향상되었다. 도 105a 및 105b에서, (a) 흑색종 (n=4) 및 (b) 폐 (n=5)로부터 유래된 TIL을 유동 세포측정법에 의해 CD4+ 및 CD8+ 세포에서 4시간 동안 PMA 자극에 반응한 CD107a+ 발현에 대해 평가하였다. (c) 흑색종 및 폐로부터 유래된 사전-REP TIL을 가용성 항-CD3 항체로 24시간 동안 자극하고, 상청액을 ELISA에 의해 IFNɣ에 대해 평가하였다.

[2681] TCRvβ 레퍼토리의 상대 빈도는 폐에서 IL-2/IL-15/IL-21에 반응하여 변경되었지만, 흑색종에서는 그렇지 않았다. 도 106a 및 106b에서, TCRvβ 레퍼토리 (24가지 특이성)를 유동 세포측정법을 위한 베크만 쿨터 키트를 사용하여 (a) 흑색종 및 (b) 폐 종양으로부터 유래된 TIL에서 평가하였다.

[2682] **요약**

[2683] 이 연구는 표현형적 및 기능적 특징에 영향을 미치는 것 외에도, 2세대 프로세스에서 IL-2 단독 (>20%)에 비해 TIL 수를 향상시키는 IL-2/IL-15/IL-21 칵테일의 능력을 입증한다.

[2684] TIL 확장에 대한 삼중 칵테일의 효과는 조직학 의존적이었다. CD8+/CD4+ T 세포 비는 폐 종양에서 IL-2/IL-15/IL-21의 첨가로 증가되었다. IL-15 및 IL-21의 첨가는 폐 종양으로부터 유래된 TIL에서 CD107a 발현 및

IFNγ 생산을 향상시켰다. IL-2/IL-15/IL-21의 첨가는 폐에서 TCRvβ 레퍼토리를 변경시켰다. 2세대 TIL 확장 프로세스를 사용하여 IL-2/IL-15/IL-21 시토카인 칵테일을 포함시킴으로써, 특이적 종양 조직학, 예컨대 폐 및 결장직장 종양에서 TIL 확장을 추가로 촉진시키는 수단을 제공하였다. 이들 관찰은 특히 주류 항암 요법에 요구되는 폭넓은 적용가능성 및 이용가능성을 갖는 TIL의 대규모 제조에 필요한 TIL 배양 처방의 최적화 및 표준화와 관련된다.

[2685] **실시예 28: 전이성 흑색종을 갖는 환자에게 투여된 신규한 냉동보존된 종양 침윤 림프구 (LN-144)는 다기관 2상 임상 시험에서 효능 및 내약성을 입증하였다**

[2686] **배경**

[2687] 종양 침윤 림프구 (TIL)를 이용한 입양 세포 요법 (ACT)의 안전성 및 효능은 전이성 흑색종을 갖는 수 백 명의 환자에서 연구되었으며, 유의미하고 내구성 있는 객관적 반응율 (ORR)을 입증하였다.[1] 계속되는 2상 시험, C-144-01에서, TIL의 중앙집중화된 GMP 제조를 이용하여 비-냉동보존된 1세대 (Gen 1) 및 냉동보존된 2세대 (Gen 2) TIL 제조 프로세스 둘 다를 평가하였다.

[2688] Gen 1은 제조의 지속기간에 있어서 대략 5 내지 6주인 반면 (C-144-01 연구의 코호트 1에서 투여됨), Gen 2는 제조의 지속기간에 있어서 22일이다 (프로세스 2A, C-144-01 연구의 코호트 2에서 투여됨). Gen 1 LN-144 제조된 생성물로 주입된 코호트 1 환자로부터의 예비 데이터는 TIL 요법 생성된 반응으로서 사후-PD-1 전이성 흑색종 환자를 치료하는 데 있어서 고무적이었다.[2] Gen 2의 유익은 하기를 포함하였다: (A) 환자 및 의사가 환자에게 TIL을 주입하기 위해 기다리는 시간의 감소; (B) 냉동보존은 스케줄링, 분포, 및 전달의 유연성을 허용함; 및 (C) 제조 비용의 감소. 코호트 2로부터의 예비 데이터를 여기에 제시한다. 도 107은 Gen 2 냉동보존된 LN-144 제조 프로세스 (프로세스 2A)의 실시양태를 나타낸다.

[2689] **연구 설계: 전이성 흑색종에서 C-144-01 2상 시험**

[2690] 전이성 흑색종을 갖는 환자의 치료를 위한 자가 종양 침윤 림프구 (LN-144)의 효능 및 안전성을 평가하기 위한 2상, 다기관, 3-코호트 연구.

[2691] 핵심 포함 기준: (1) 측정가능한 전이성 흑색종 및 ≥ 1 TIL 생성을 위한 절제가능한 병변; (2) 전신 요법의 적어도 하나의 사전 라인으로 진행; (3) 연령 ≥18세; 및 (4) ECOG PS 0-1.

[2692] 처리 코호트: (1) 비-냉동보존된 LN-144 생성물; (2) 냉동보존된 LN-144 생성물; 및 (3) 반응이 없거나 초기 반응 후에 진행하는 환자에 대해 LN-144로 재처리. 도 108은 연구 설계를 나타낸다.

[2693] 종점: (1) 1차: ORR로서 정의된 효능 및 (2) 2차: 안전성 및 효능.

[2694] **방법**

[2695] 코호트 2 안전성 세트: TIL 생성을 목적으로 절제를 겪고, 연구 치료의 임의의 성분을 받은 13명의 환자.

[2696] 코호트 2 효능 세트: NMA-LD 사전컨디셔닝, LN-144 주입 및 IL-2의 적어도 1개의 용량을 받고, 적어도 1회의 효능 평가를 가진 9명의 환자. 4명의 환자는 데이터 컷 시 효능 평가를 갖지 않았다.

[2697] 바이오마커 데이터는 데이터 컷의 날짜까지 판독된 모든 이용가능한 데이터에 대해 나타내어졌다.

[2698] **결과**

[2699] 도 109는 코호트 1 (ASCO 2017) 대 코호트 2로부터의 비교 환자 특징을 예시하는 표를 제공한다. 코호트 2는 4가지 중위 사전 요법을 갖고; 모든 환자는 사전 항-PD-1 및 항-CTLA-4를 받았으며; 표적 병변에 대한 보다 큰 직경의 합계 (SOD)에 의해 반영된 보다 높은 종양 부하 및 기준선에서 보다 높은 평균 LDH를 가졌다. 도 110은 치료 긴급 유해 사건을 나타내는 표를 제공한다 (≥30%).

[2700] 코호트 2 (냉동보존된 LN-144)에 대해, 주입 생성물 및 TIL 요법 특징은 (1) 주입된 TIL 세포의 평균 수: 37×10^9개, 및 (2) IL-2 용량 투여의 중위 수는 4.5였다. 도 111은 환자 #1 내지 #8에 대한 주입 생성물 및 TIL 요법의 효능을 나타낸다.

[2701] 도 112는 안정한 질환 (SD) 또는 보다 양호한 반응을 갖는 반응 평가가능한 환자의 임상적 상태를 나타낸다. 환자 6에 대한 부분적 반응 (PR)은 환자가 제2 효능 평가에 아직 도달하지 않았기 때문에 확인되지 않았다. 1

명의 환자 (환자 9)는 제1 평가 전에 사망하였다 (여전히 효능 세트에 간주됨).

[2702] 효능 세트에서의 9명의 환자 중에서, 1명의 환자 (환자 9)는 도 112에 나타나지 않은 제1 종양 평가 전에 흑색종-관련된 사망으로 인해 평가가능하지 않았다 (NE). 반응은 Gen 2로 처리된 환자에서 나타났다. 질환 제어율 (DCR)은 78%였다. 반응까지의 시간은 코호트 1과 유사하였다. 가장 양호한 반응으로서 진행성 질환 (PD)을 갖는 1명의 환자 (환자 3)는 수영장 레인 플롯에 포함되지 않았다.

[2703] 도 113은 직경의 합계의 퍼센트 변화를 나타낸다. 환자 9는 제42일 전에 흑색종-관련된 사망으로 인해 사후-LN-144 질환 평가를 갖지 않았다. 제-14일: 스크리닝으로부터 기준선 (제-14일)까지의 직경의 합계의 % 변화. 제-14일 내지 제126일: 기준선으로부터의 SOD의 % 변화. 제-14일 = 기준선. 제0일 = LN-144 주입.

[2704] TIL 치료 시, HMGB1의 증가가 관찰되었다 (도 114). 혈장 HMGB1 수준을 HMGB1 ELISA 키트 (테칸 유에스, 인크 (Tecan US, Inc))를 사용하여 측정하였다. 나타내어진 데이터는 코호트 1 및 코호트 2 환자에서의 LN-144 주입 전 (제-7일) 및 후 (제4일 및 제14일)의 HMGB1 수준의 배수 변화를 나타낸다 (p 값은 로그-전환된 데이터에 기초하여 양측 t-검정을 사용하여 계산되었음). 샘플 크기 (볼드체 및 이탤릭체) 및 평균 (이탤릭체) 값은 각각의 시점에 대해 괄호 안에 나타내어진다. HMGB1은 활성화된 면역 세포에 의해 분비되고, 손상된 종양 세포에 의해 방출된다. 따라서, LN-144로의 처리 후에 관찰된 증가된 HMGB1 수준은 항-종양 활성의 면역-매개된 메커니즘의 시사이다.

[2705] 혈장 IP-10 수준을 루미넥스 (Luminex) 검정을 사용하여 측정하였다. 도 115에 나타내어진 데이터는 코호트 1 및 코호트 2 환자에서의 LN-144 주입 전 (제-7일) 및 후 (제4일 및 제14일)의 IP-10 수준의 배수 변화를 나타낸다 (p 값은 로그-전환된 데이터에 기초하여 양측 t-검정을 사용하여 계산되었음). 샘플 크기 (볼드체 및 이탤릭체) 및 평균 (이탤릭체) 값은 각각의 시점에 대해 괄호 안에 나타내어진다. LN-144 주입후 IP-10의 증가는 TIL 지속성과의 가능한 상관관계를 이해하기 위해 모니터링되고 있다.

[2706] 코호트 2 (n = 17명의 환자)로부터의 갱신된 데이터는 도 116 내지 도 121에 보고된다. 64%의 DCR 및 29%의 전체 반응률 (ORR)을 나타낸 코호트 1 및 Gen 1 프로세스의 실시양태에 비해 (N = 14), 코호트 2 및 Gen 2 프로세스의 실시양태는 80%의 DCR 및 40%의 ORR을 나타내었다 (N = 10).

[2707] **결론**

[2708] 기존의 데이터로부터의 예비 결과는 Gen 1 및 Gen 2 LN-144 TIL 생성물 사이의 필적하는 안전성을 입증한다. Gen 2 프로세스 (본원에 기재된 바와 같은 프로세스 2A)로 제조된 TIL의 투여는 진행된 질환 전이성 흑색종 환자에서 나타난 놀랍게 증가된 임상적 반응을 발생시키며, 모두는 항-PD-1 및 항-CTLA-4 사전 요법으로 진행하였다. 코호트 2에 대한 DCR은 78%였다.

[2709] 예비 바이오마커 데이터는 TIL 요법에 대해 제안된 작용의 세포용해 메커니즘의 지지이다.

[2710] 본원에 기재된 Gen 2 제조 프로세스의 실시양태는 22일이 걸린다. 이 프로세스는 상업화 및 보건 규제 기관으로의 등록을 허용하는 이전의 접근법에 비해 다른 이점을 제공하면서, 환자가 그들의 TIL을 받기 위해 기다려야 하는 시간의 지속기간을 단축시키고, 환자에게 투여하는 시기의 유연성을 제공하고, 제조의 비용의 감소를 발생시킨다. Gen 2 제조 프로세스의 실시양태를 사용한 전이성 흑색종에서의 예비 임상적 데이터는 또한 Gen 1 프로세스를 사용하여 제조된 TIL에 비해 유사한 반응까지의 시간 및 안전성 프로파일로, DCR, ORR, 및 다른 임상적 반응에 의해 측정된 바와 같이, TIL의 임상적 효능의 놀라운 개선을 지시한다. Gen 2 TIL 생성물의 예상치 않게 개선된 효능은 또한 일반적으로 개선된 효능 (도 122), 유의하게 개선된 폴리클로날성 (도 99a 및 도 99b), 및 보다 높은 평균 IP-10 및 MCP-1 생산 (도 123 내지 도 126)과 상관되는, IFN-γ 생산 (도 98)의 5배 초과의 증가에 의해 입증된다. 놀랍게도, Gen 2의 훨씬 더 짧은 프로세스에도 불구하고, 상대 텔로미어 길이 (도 97) 및 CD27 및 CD28 발현 (도 96b 및 도 96c)을 비롯한 TIL 생성물의 많은 다른 중요한 특징은 보다 전통적인 제조 프로세스를 사용하여 관찰되는 것들과 유사하다.

[2711] **참고문헌**

[2712] [1]Goff, et al. Randomized, Prospective Evaluation Comparing Intensity of Lymphodepletion Before Adoptive Transfer of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol*. 2016 Jul 10;34(20):2389-97.

[2713] [2]Sarnaik A, Kluger H, Chesney J, et al. Efficacy of single administration of tumor-infiltrating

lymphocytes (TIL) in heavily pretreated patients with metastatic melanoma following checkpoint therapy. *J Clin Oncol*. 2017; 35 [suppl; abstr 3045].

[2714] **실시예 29: HNSCC 및 자궁경부 암종 2상 연구**

[2715] HNSCC (두경부 편평 세포 암종; C-145-03) 2상 연구를 위한 등록. 13명의 환자가 연구에 동의하였고, TIL이 10명의 환자로부터 수확되고, 궁극적으로 7명의 환자가 주입되고, 1명은 보다 진행 중이다.

[2716] 자궁경부 암종 2상 연구 (C-145-04)에서의 등록. 8명의 환자가 연구에 동의하였고, TIL이 4명의 환자로부터 수확되고, 궁극적으로 2명의 환자가 주입되고, 2명이 보다 진행 중이다.

[2717] 계속되는 연구로부터의 초기 데이터를 도 127에 제공한다. 안정한 질환 (SD) 및 진행성 반응은 84일 이하에서 TIL 요법으로 치료된 HCNSCC 및 자궁경부암 환자 둘 다에서 관찰되었다.

[2718] 상기 제시된 실시예는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 조성물, 시스템 및 방법의 실시양태를 제조하고 사용하는 방법의 완전한 개시 및 설명을 제공하기 위해 제공되며, 본 발명자들이 그들의 발명으로서 간주하는 것의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 자명한 본 발명을 수행하는 상기-기재된 방식의 변형은 하기 청구범위의 범위 내에 있는 것으로 의도된다. 본 명세서에 언급된 모든 특허 및 간행물은 본 발명이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자의 기술의 수준의 지표이다.

[2719] 모든 표제 및 섹션 명칭은 단지 명확성 및 참조 목적으로 사용되며, 어떠한 식으로도 제한으로 간주되지 않아야 한다. 예를 들어, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 본 발명의 정신 및 범위에 따라 적절한 바와 같은 상이한 표제 및 섹션으로부터 다양한 측면을 조합하는 것의 유용성을 이해할 것이다.

[2720] 본원에 인용된 모든 참고문헌은 각각의 개별적 간행물 또는 특허 또는 특허 출원이 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 지시된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 및 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[2721] 이 출원의 많은 변형 및 변경은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것인 바와 같이, 그의 정신 및 범위로부터 벗어나지 않고 이루어질 수 있다. 본원에 기재된 구체적인 실시양태 및 실시예는 단지 예로서 제공되며, 본 출원은 청구범위가 권리가 있는 등가물의 완전한 범위와 함께, 첨부된 청구범위의 관점에 의해서만 제한되어야 한다.

[2722] **서열:**

[2723] 서열식별번호: 1은 무로모납의 중쇄의 아미노산 서열이다.

[2724] 서열식별번호: 2는 무로모납의 경쇄의 아미노산 서열이다.

[2725] 서열식별번호: 3은 재조합 인간 IL-2 단백질의 아미노산 서열이다.

[2726] 서열식별번호: 4는 알데스루킨의 아미노산 서열이다.

[2727] 서열식별번호: 5는 재조합 인간 IL-4 단백질의 아미노산 서열이다.

[2728] 서열식별번호: 6은 재조합 인간 IL-7 단백질의 아미노산 서열이다.

[2729] 서열식별번호: 7은 재조합 인간 IL-15 단백질의 아미노산 서열이다.

[2730] 서열식별번호: 8은 재조합 인간 IL-21 단백질의 아미노산 서열이다.

[2731] 무로모납의 아미노산 서열.

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

[2732]

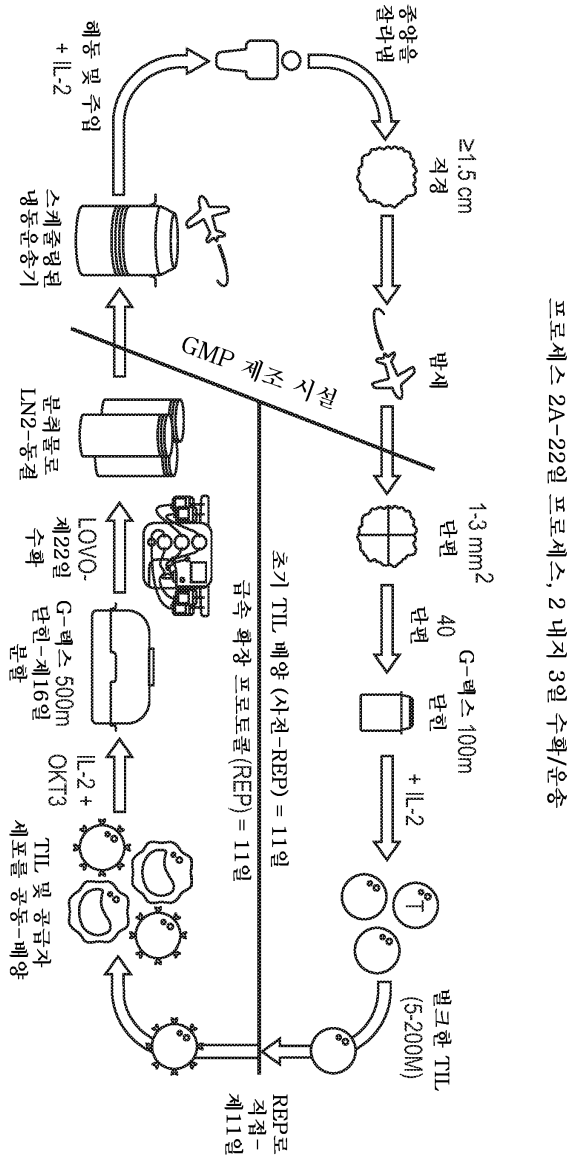
[2733] 인터루킨의 아미노산 서열.

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

[2734]

도면

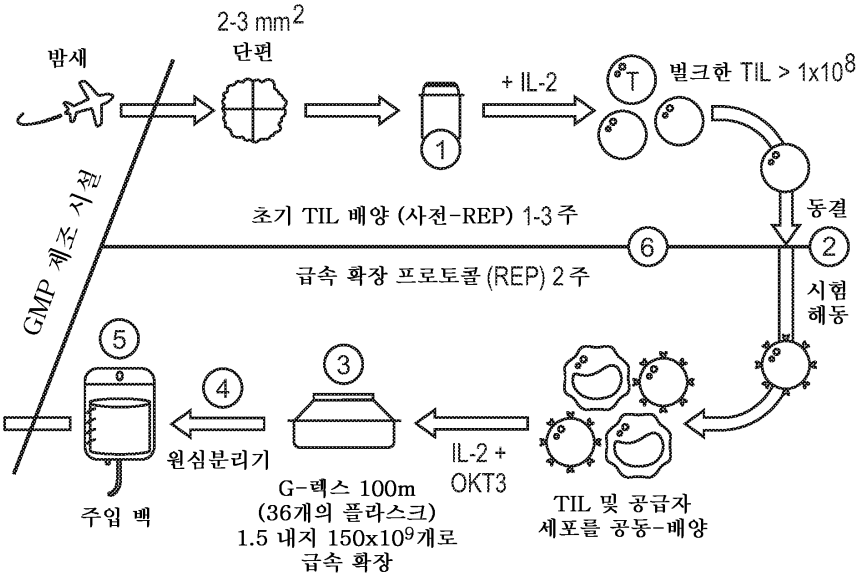
도면1



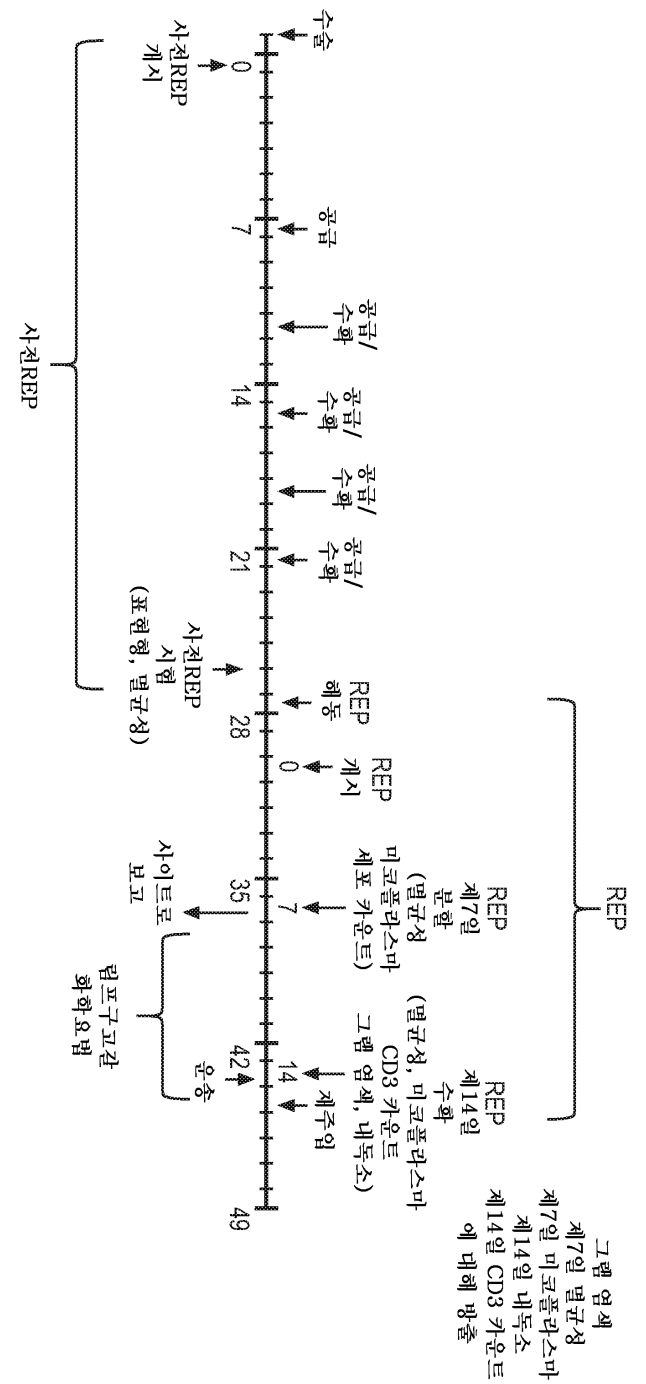
도면2

프로세스 개발

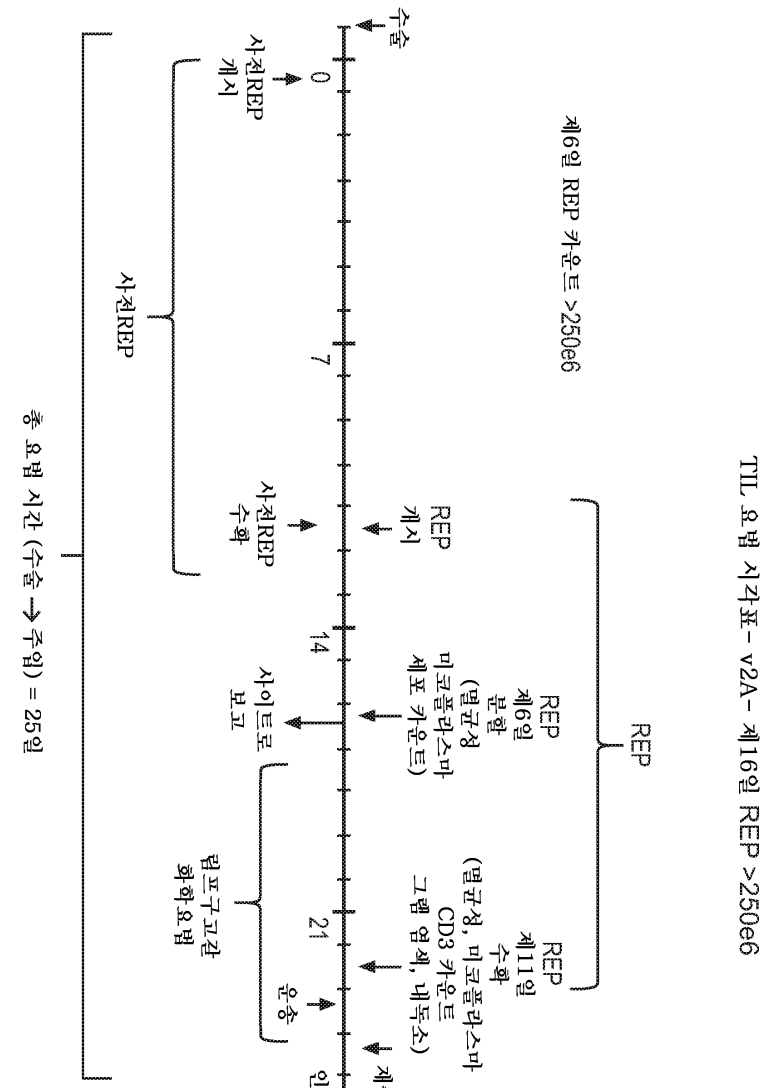
단계	현재의 프로세스-1C	새로운 프로세스-2A	영향
1	4개의 단편/10개의 G-렉스 10 내지 21일	40개의 단편/1개의 G-렉스 100 CS- (x2?) 11일	종양 샘플/용기를 증가시킴, 배양을 단축시킴, 단계를 감소시킴, 닫힌 계를 처리할 수 있음
2	사전REP 동결 -> 시험 -> 해동- 약 제27일- >40e6개의 TIL	REP로 직접- 제11일- <200e6	프로세스를 단축시킴, 단계를 감소시킴, 시험을 제거함
3	36개의 G-렉스 100- 약 제30일 >5e6개의 TIL - 분할 약 제36일	4 내지 5개의 G-렉스 500CS- TIL- 분할 제16일	단계를 감소시킴, 닫힌 계, 보다 짧은 REP
4	수확 약 제43일+ 원심분리에 의한 수확	수확 제22일 LOVO-자동화 세포 세척기	단계를 감소시킴, 자동화, 닫힌 계
5	신선한 생성물- 하이포써모솔-단일 주입 백	냉동보존된 생성물- LN_2 중 CS10 다수의 분취물	운송 유연성, 환자 스케줄링, 보다 용이한 방출 시험, 세계적 시험
6	43+ 일 프로세스 시간	22일 프로세스 시간	환자에게 반송, 클린 룸 처리량, COG



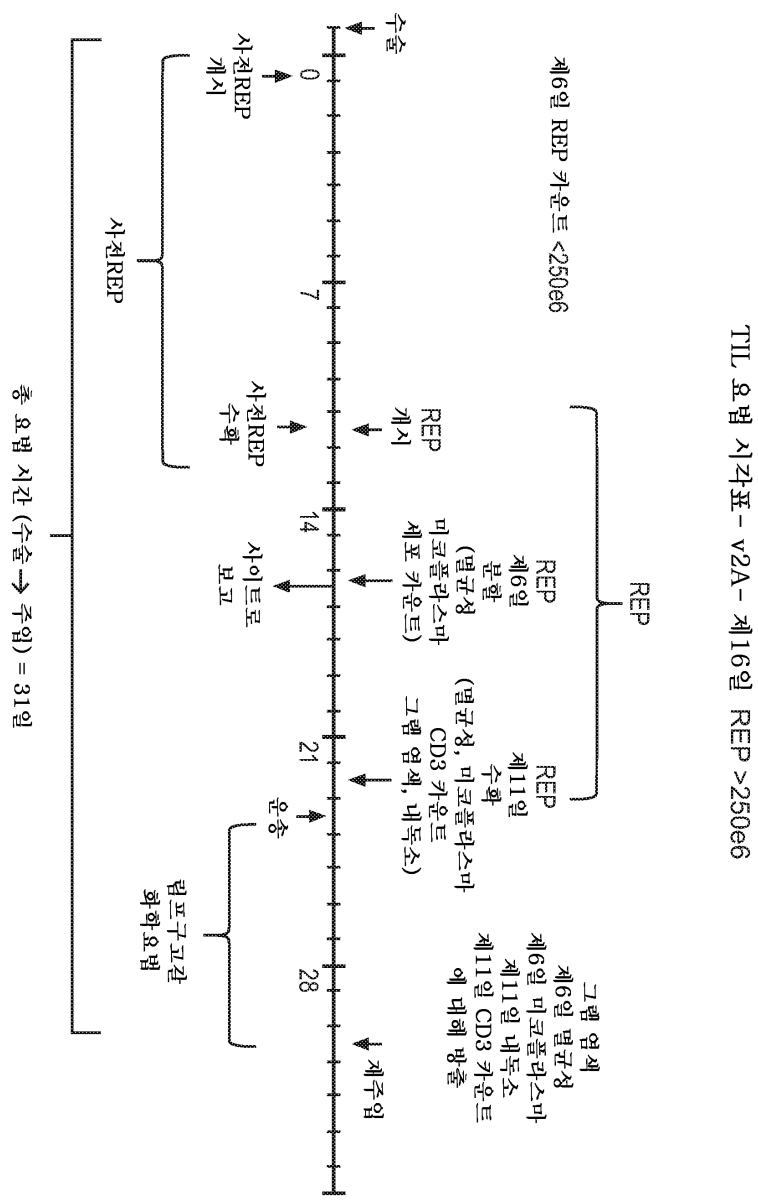
도면3


시각표 - 프로세스 1C- 현재의 프로세스
REP
그램 염색
제7일 멸균성
제7일 미코플라스마
제14일 내독소
제14일 CD3 카운트
에 대해 방출
REP
제7일
분할
(멸균성
미코플라스마
세포 카운트)
REP
제14일
수확
(멸균성, 미코플라스마
CD3 카운트
그램 염색, 내독소)
REP
게시
REP
해동
사전REP
시험
(표현형, 멸균성)
사이트로
보고
제주입
운송
사전REP
게시
수술
공급
공급/
수확
공급/
수확
공급/
수확
공급/
수확
0
7
14
21
28
0
7
35
14
42
49
사전REP
림프구고갈
화학요법

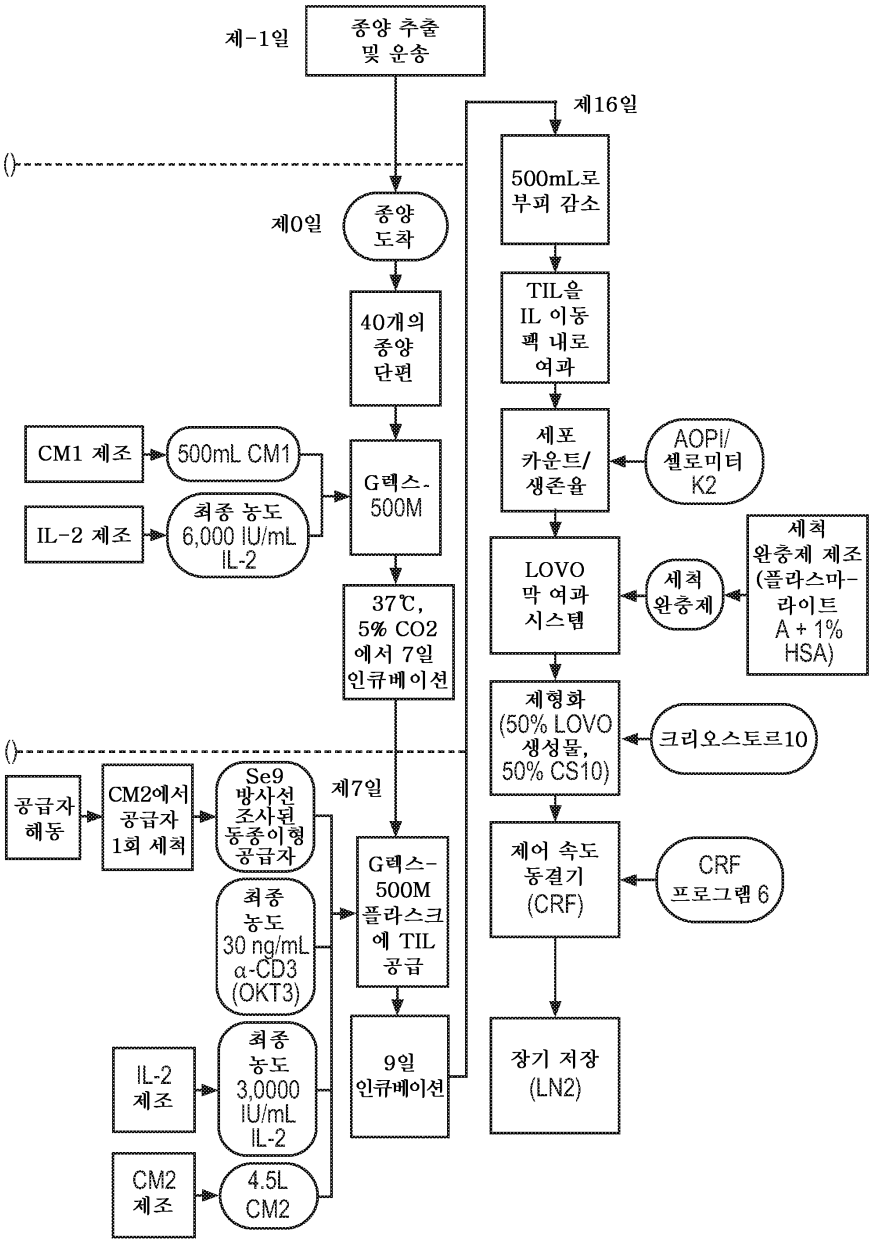
도면4


TIL 요법 시각표- v2A- 제16일 REP >250e6
수술
0
7
14
21
28
사전REP 게시
사전REP 수확
REP 게시
사이트로 보고
윤송
인터루킨-2
제주입
사전REP
총 요법 시간 (수술 → 주입) = 25일
제6일 REP 카운트 >250e6
REP
REP 제6일 분할 (멸균성, 미코플라스마 세포 카운트)
REP 제11일 수확 (멸균성, 미코플라스마 CD3 카운트 그램 염색, 내독소)
림프구고갈 화학요법
그램 염색 제6일 멸균성 제6일 미코플라스마 제11일 내독소 제11일 CD3 카운트 에 대해 방출

도면5

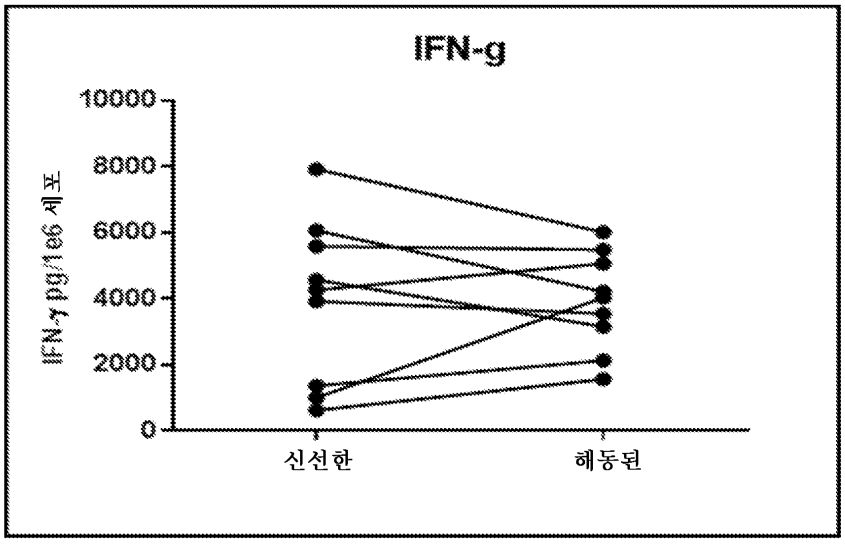

TIL 요법 시각표- v2A- 제16일 REP >250e6
REP
제6일 REP 카운트 <250e6
REP
제6일
분할
(멸균성
미코플라스마
세포 카운트)
REP
제11일
수확
(멸균성, 미코플라스마
CD3 카운트
그램 염색, 내독소)
그램 염색
제6일 멸균성
제6일 미코플라스마
제11일 내독소
제11일 CD3 카운트
에 대해 방출
수술
0
7
14
21
28
제주입
사전REP
개시
사전REP
수확
사이트로
보고
운송
림프구고갈
화학요법
사전REP
총 요법 시간 (수술→ 주입) = 31일

도면6


제-1일
종양 추출 및 운송
제0일
종양 도착
40개의 종양 단편
CM1 제조
500mL CM1
IL-2 제조
최종 농도 6,000 IU/mL IL-2
G렉스-500M
37℃, 5% CO2에서 7일 인큐베이션
제7일
공급자 해동
CM2에서 공급자 1회 세척
Se9 방사선 조사된 동종이형 공급자
최종 농도 30 ng/mL α-CD3 (OKT3)
IL-2 제조
최종 농도 3,0000 IU/mL IL-2
CM2 제조
4.5L CM2
G렉스-500M 플라스크에 TIL 공급
9일 인큐베이션
제16일
500mL로 부피 감소
TIL을 IL 이동팩 내로 여과
세포 카운트/생존율
AOPI/셀로미터 K2
LOVO 막 여과 시스템
세척 완충제
세척 완충제 제조 (플라스마-라이트 A + 1% HSA)
제형화 (50% LOVO 생성물, 50% CS10)
크리오스토르10
제어 속도 동결기 (CRF)
CRF 프로그램 6
장기 저장 (LN2)

도면7

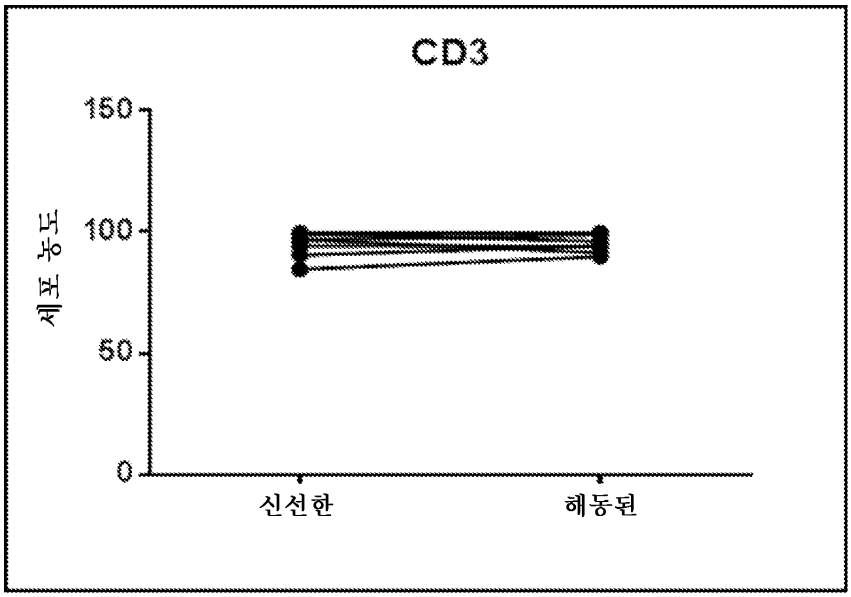
P 값	0.9797
P 값 요약	ns
유의하게 상이한가? (P < 0.05)	**아니오**
단측 또는 양측 P 값	양측
t, df	t=0.02626 df=8
쌍의 수	**9**



쌍형성은 얼마나 유효했는가?	
상관 계수 (r)	
P 값 (단측)	
P 값 요약	
쌍형성은 유의하게 유효했는가?	

도면8

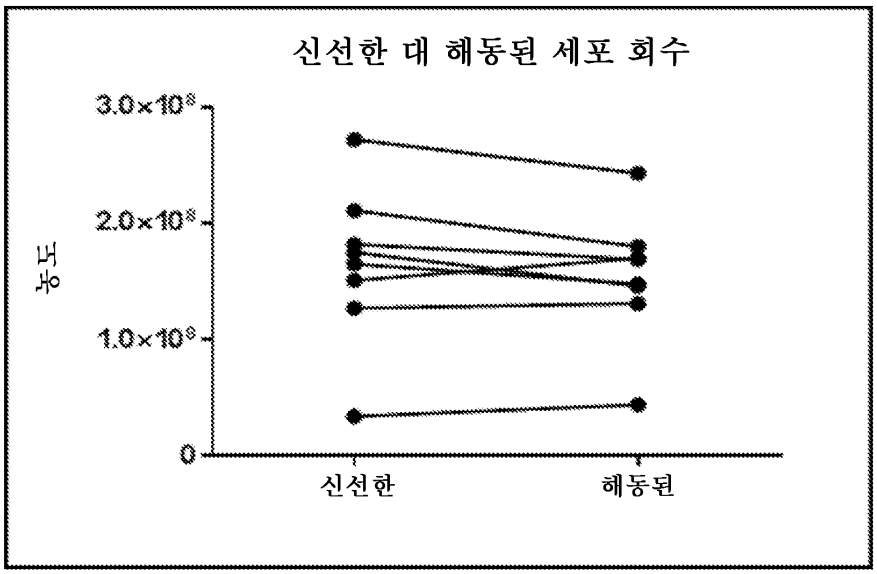
P 값 요약	ns
유의하게 상이한가? (P < 0.05)	아니오
단측 또는 양측 P 값?	양측
t, df	t=0.8479 df=7
쌍의 수	8



쌍형성은 얼마나 유효했는가?	
상관 계수 (r)	0.9711
P 값 (단측)	< 0.0001
P 값 요약	****
쌍형성은 유의하게 유효했는가?	예

도면9

P 값 요약	ns
유의하게 상이한가? (P < 0.05)	아니오
단측 또는 양측 P 값?	양측
t, df	t=1.568 df=7
쌍의 수	8

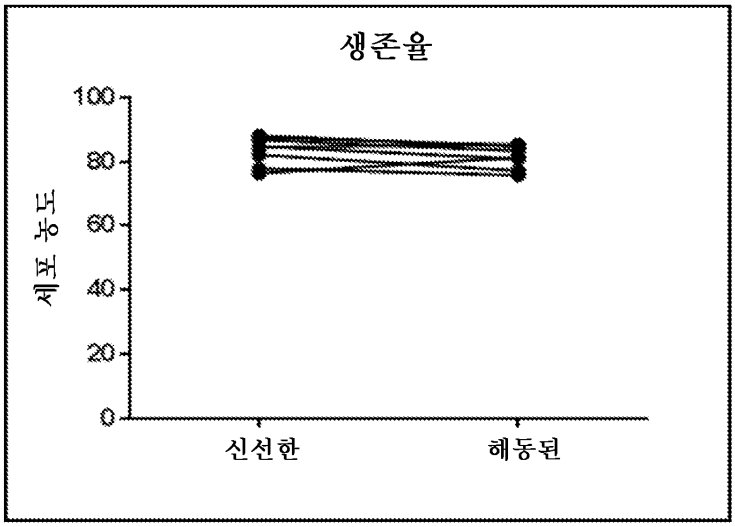


쌍형성은 얼마나 유효했는가?

상관 계수 (r)	0.7448
P 값 (단측)	0.017
P 값 요약	*
쌍형성은 유의하게 유효했는가?	예

도면10

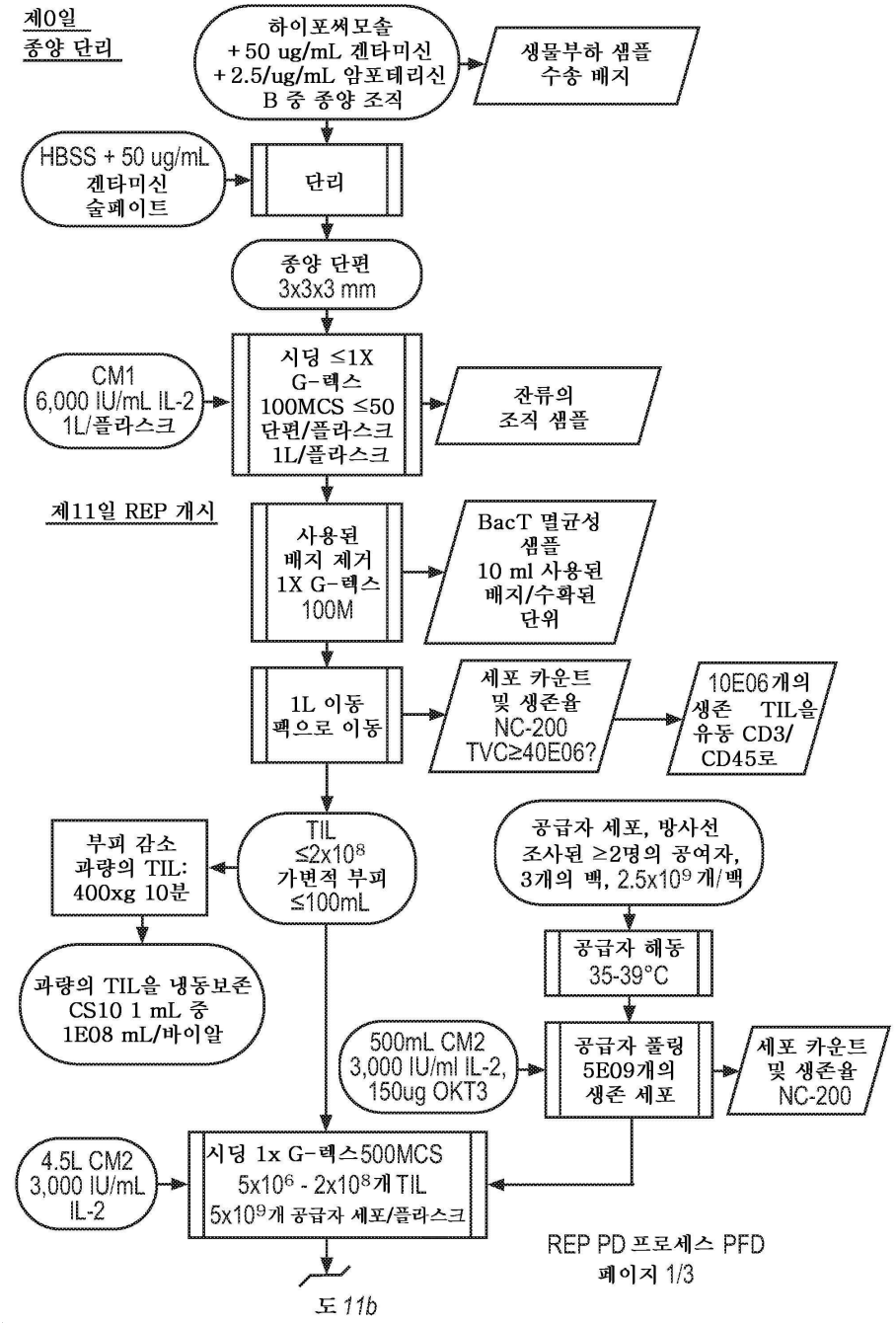
P 값 요약	ns
유의하게 상이한가? (P < 0.05)	아니오
단측 또는 양측 P 값?	양측
t, df	t=1.596 df=7
쌍의 수	8



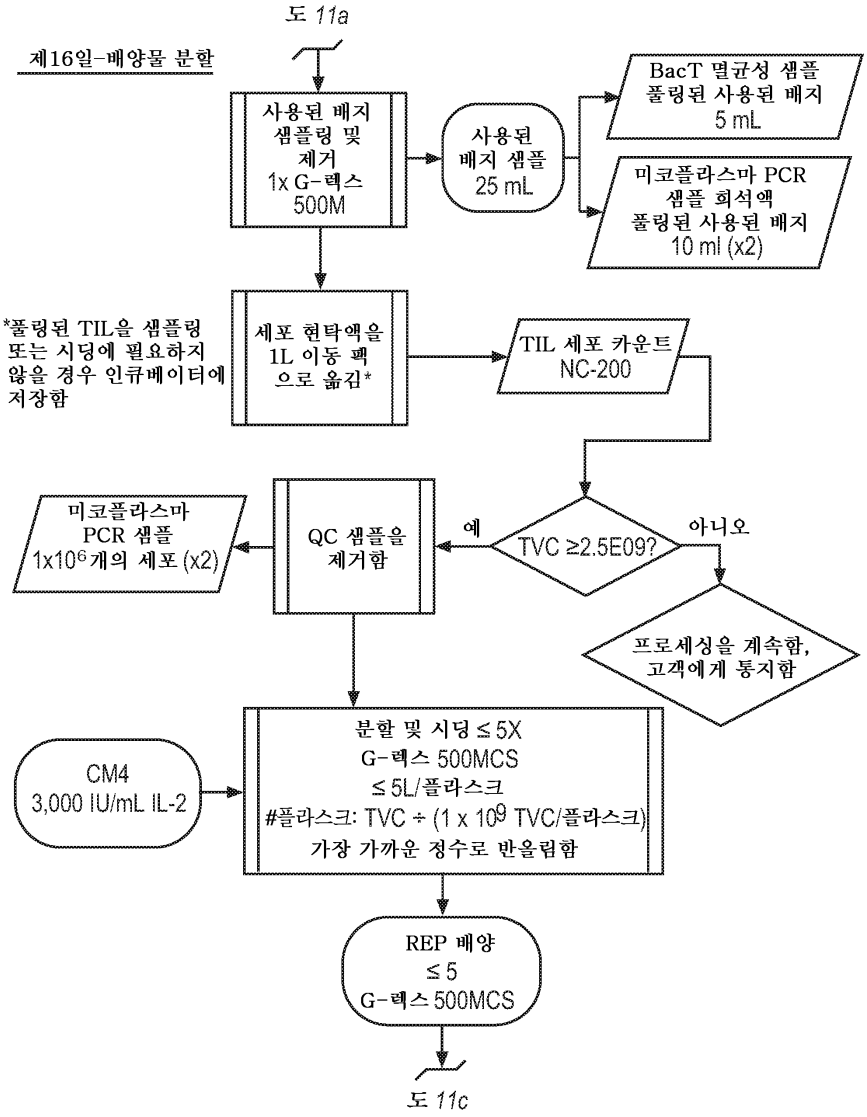
쌍형성은 얼마나 유효했는가?

상관 계수 (r)	0.6932
P 값 (단측)	0.0283
P 값 요약	*
쌍형성은 유의하게 유효했는가?	예

도면11a

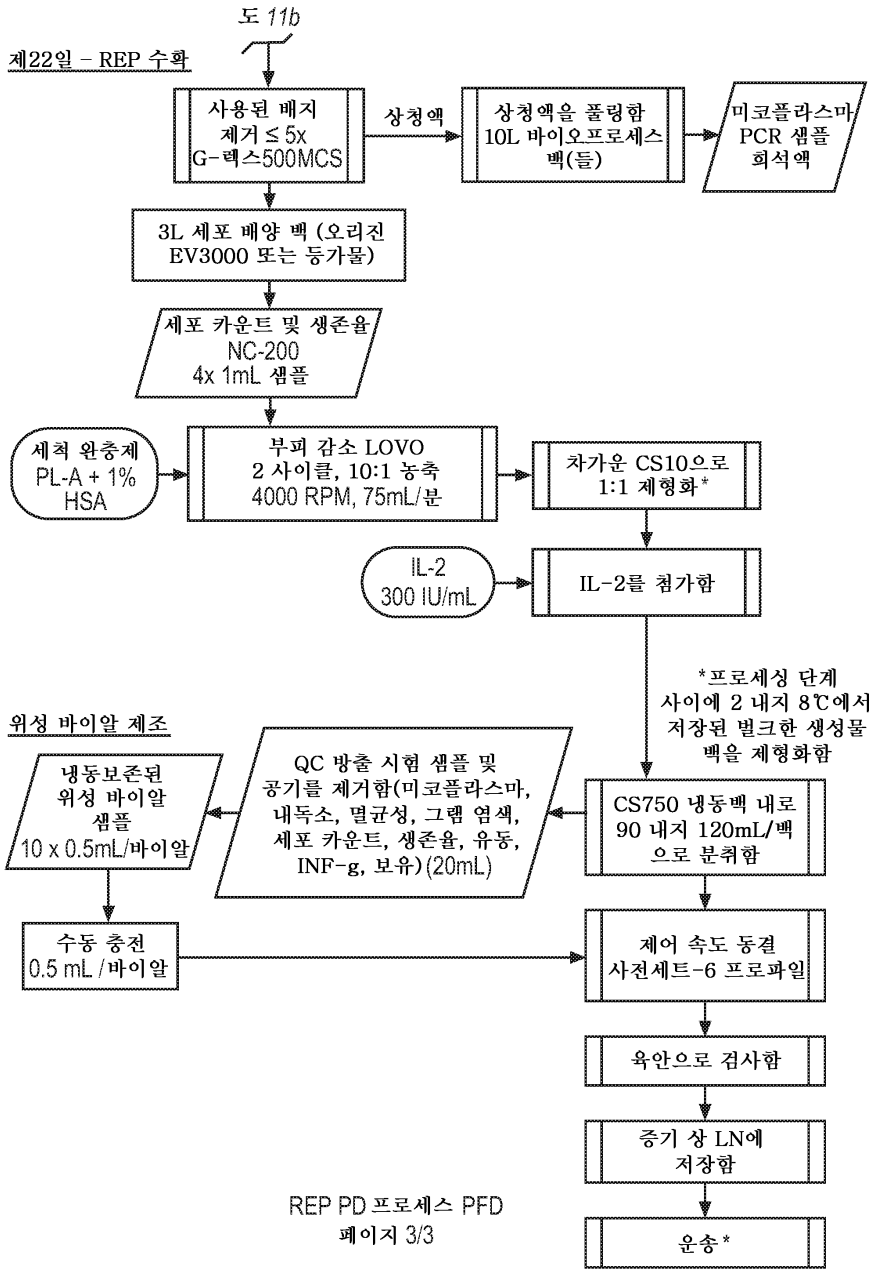

제0일
종양 단리
하이포써모솔
+ 50 ug/mL 겐타미신
+ 2.5/ug/mL 암포테리신
B 중 종양 조직
생물부하 샘플
수송 배지
HBSS + 50 ug/mL
겐타미신
술페이트
단리
종양 단편
3x3x3 mm
CM1
6,000 IU/mL IL-2
1L/플라스크
시딩 ≤1X
G-렉스
100MCS ≤50
단편/플라스크
1L/플라스크
잔류의
조직 샘플
제11일 REP 개시
사용된
배지 제거
1X G-렉스
100M
BacT 멸균성
샘플
10 ml 사용된
배지/수확된
단위
1L 이동
팩으로 이동
세포 카운트
및 생존율
NC-200
TVC≥40E06?
10E06개의
생존 TIL을
유동 CD3/
CD45로
부피 감소
과량의 TIL:
400xg 10분
TIL
≤2x10^8
가변적 부피
≤100mL
공급자 세포, 방사선
조사된 ≥2명의 공여자,
3개의 백, 2.5x10^9 개/백
공급자 해동
35-39°C
과량의 TIL을 냉동보존
CS10 1 mL 중
1E08 mL/바이알
500mL CM2
3,000 IU/ml IL-2,
150ug OKT3
공급자 풀링
5E09개의
생존 세포
세포 카운트
및 생존율
NC-200
4.5L CM2
3,000 IU/mL
IL-2
시딩 1x G-렉스500MCS
5x10^6 - 2x10^8개 TIL
5x10^9개 공급자 세포/플라스크
REP PD 프로세스 PFD
페이지 1/3
도 11b

도면11b

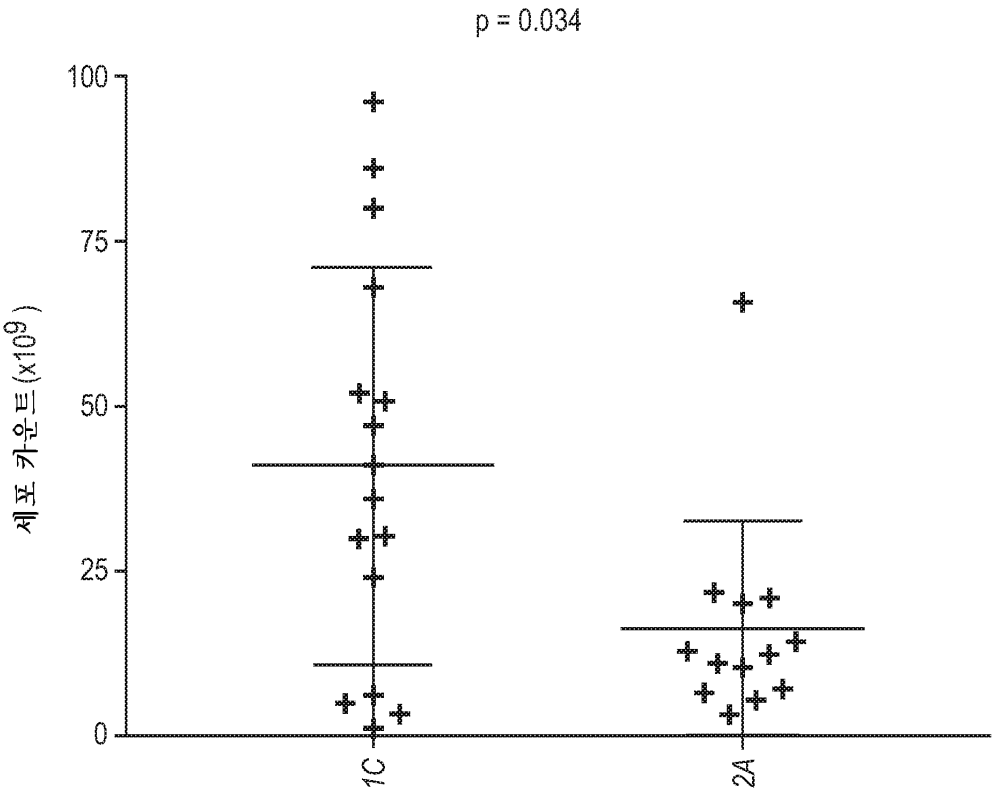


REP PD 프로세스 PFD
페이지 2/3

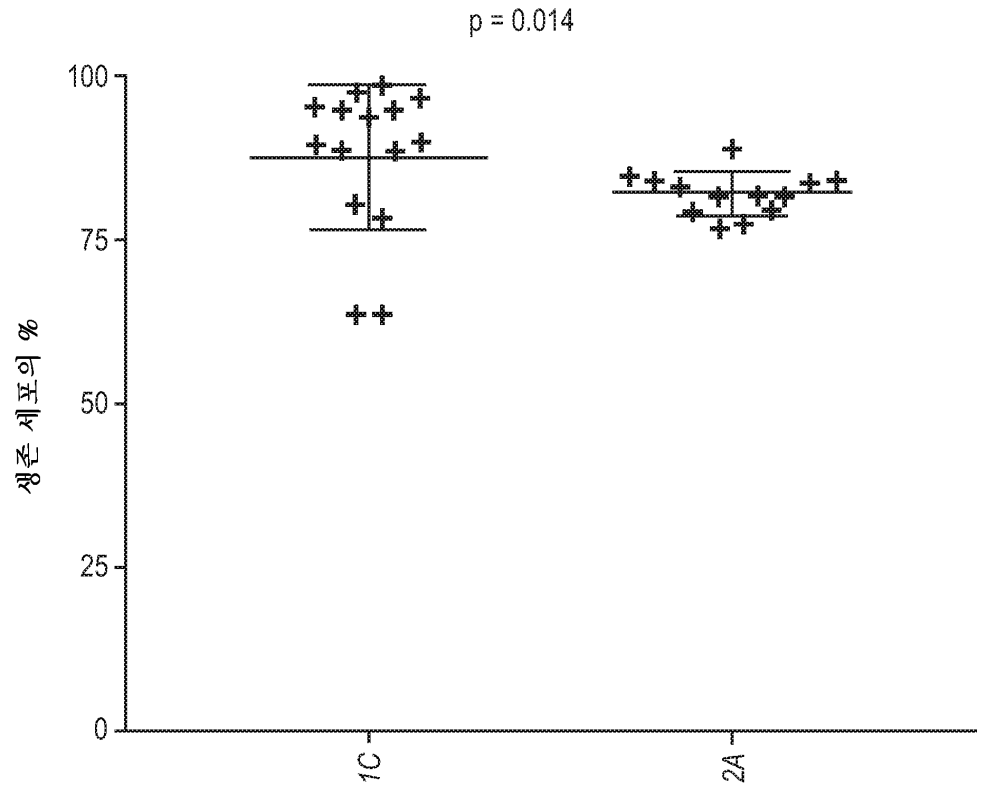
도면11c


도 11b
제22일 – REP 수확
사용된 배지 제거 ≤ 5x G-렉스500MCS
상청액
상청액을 풀링함 10L 바이오프로세스 백(들)
미코플라스마 PCR 샘플 희석액
3L 세포 배양 백 (오리진 EV3000 또는 등가물)
세포 카운트 및 생존율 NC-200 4x 1mL 샘플
세척 완충제 PL-A + 1% HSA
부피 감소 LOVO 2 사이클, 10:1 농축 4000 RPM, 75mL/분
차가운 CS10으로 1:1 제형화*
IL-2 300 IU/mL
IL-2를 첨가함
*프로세싱 단계 사이에 2 내지 8℃에서 저장된 벌크한 생성물 백을 제형화함
위성 바이알 제조
냉동보존된 위성 바이알 샘플 10 x 0.5mL/바이알
QC 방출 시험 샘플 및 공기를 제거함(미코플라스마, 내독소, 멸균성, 그램 염색, 세포 카운트, 생존율, 유동, INF-g, 보유) (20mL)
CS750 냉동백 내로 90 내지 120mL/백으로 분취함
수동 충전 0.5 mL /바이알
제어 속도 동결 사전세트-6 프로파일
육안으로 검사함
증기 상 LN에 저장함
운송*
REP PD 프로세스 PFD
페이지 3/3

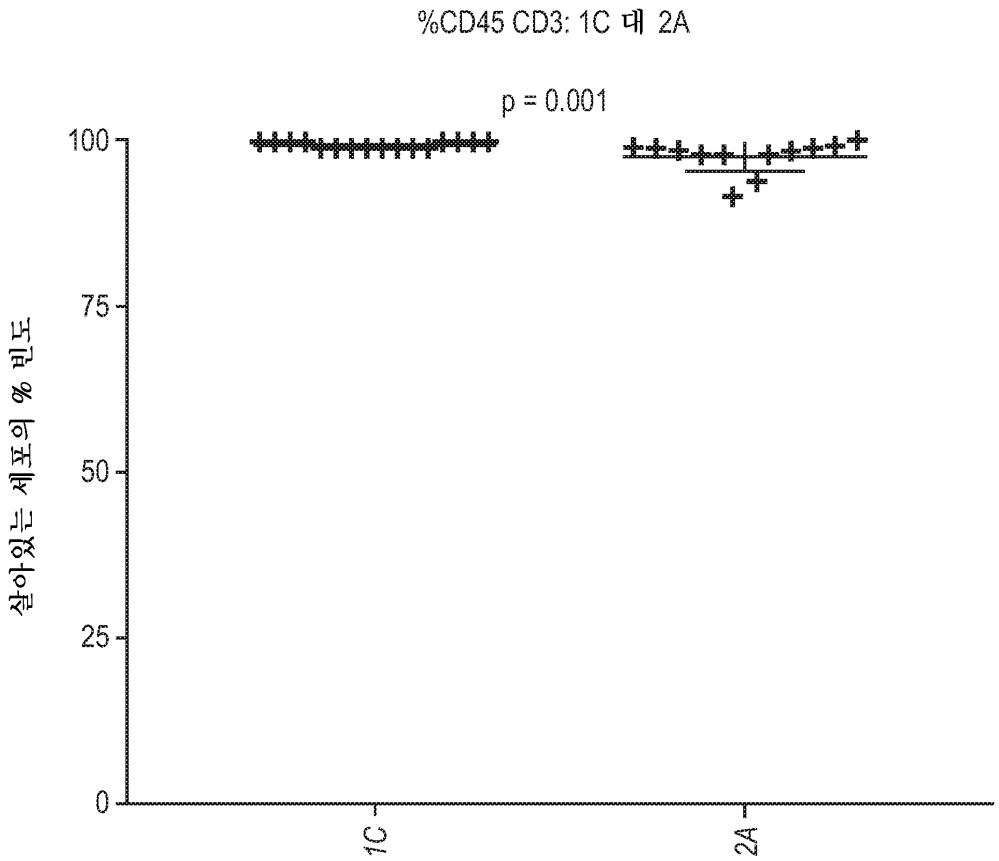
도면12


p = 0.034
100
75
50
25
0
세포 카운트 (x10^9)
1C
2A

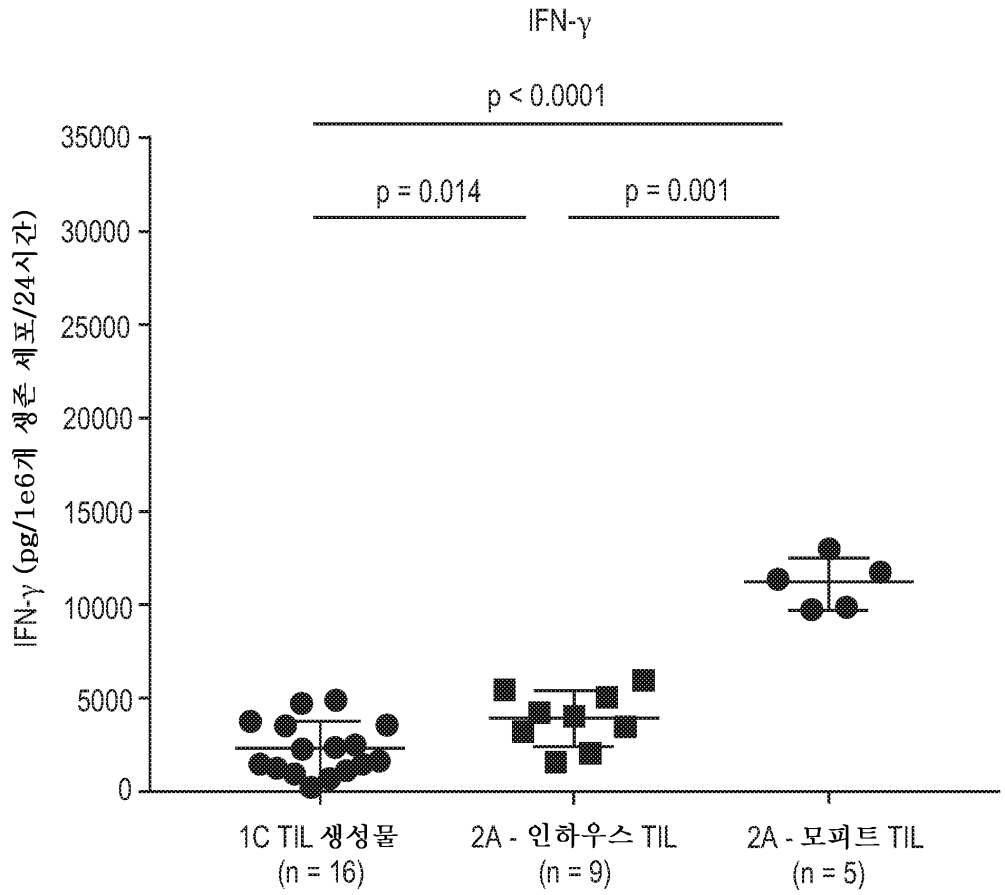
도면13


p = 0.014
100
75
50
25
0
생존 세포의 %
1C
2A

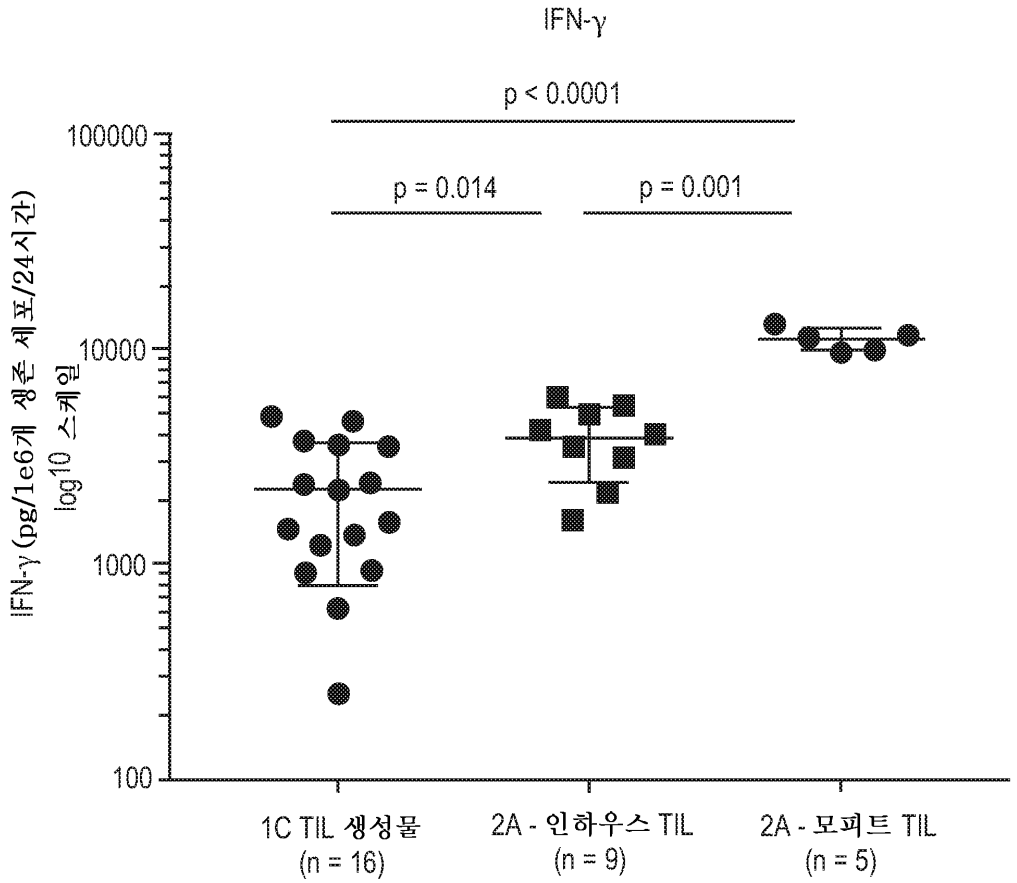
도면14



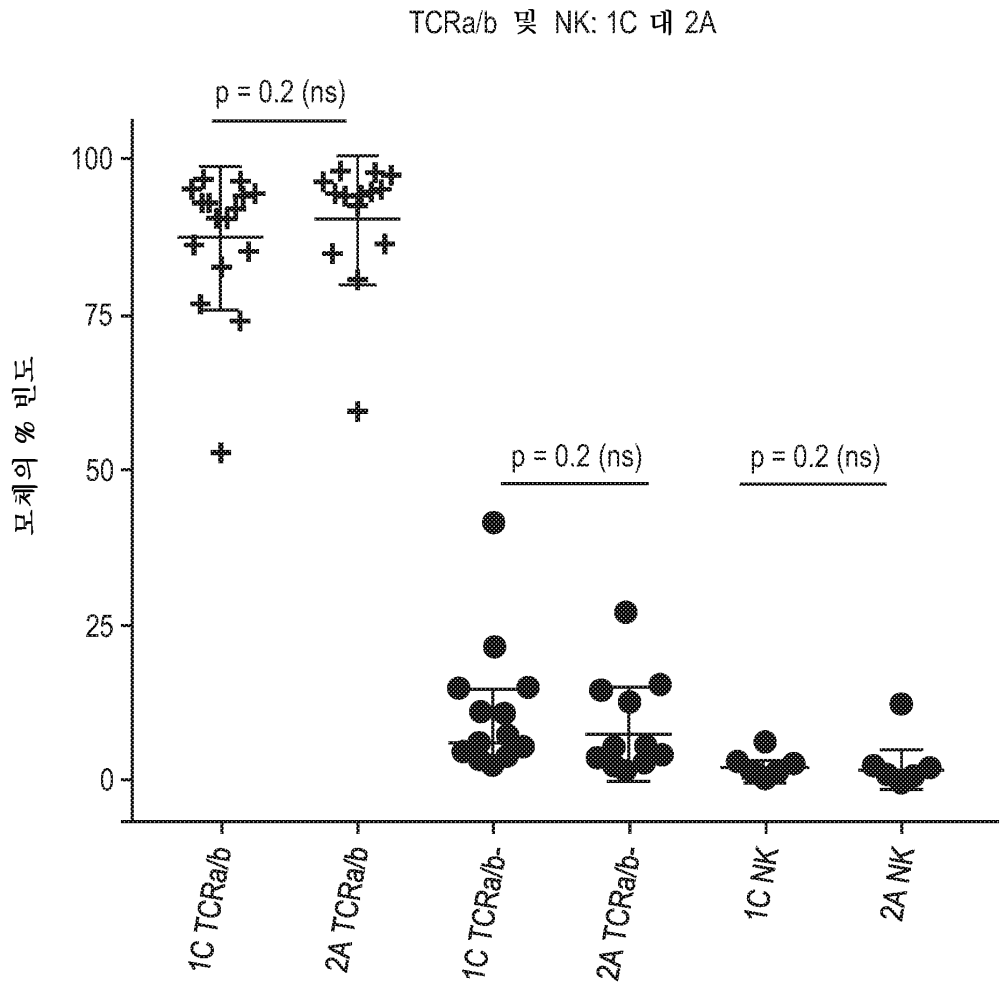
도면15


IFN-γ
p < 0.0001
p = 0.014
p = 0.001
IFN-γ (pg/1e6개 생존 세포/24시간)
35000
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
1C TIL 생성물
(n = 16)
2A - 인하우스 TIL
(n = 9)
2A - 모피트 TIL
(n = 5)

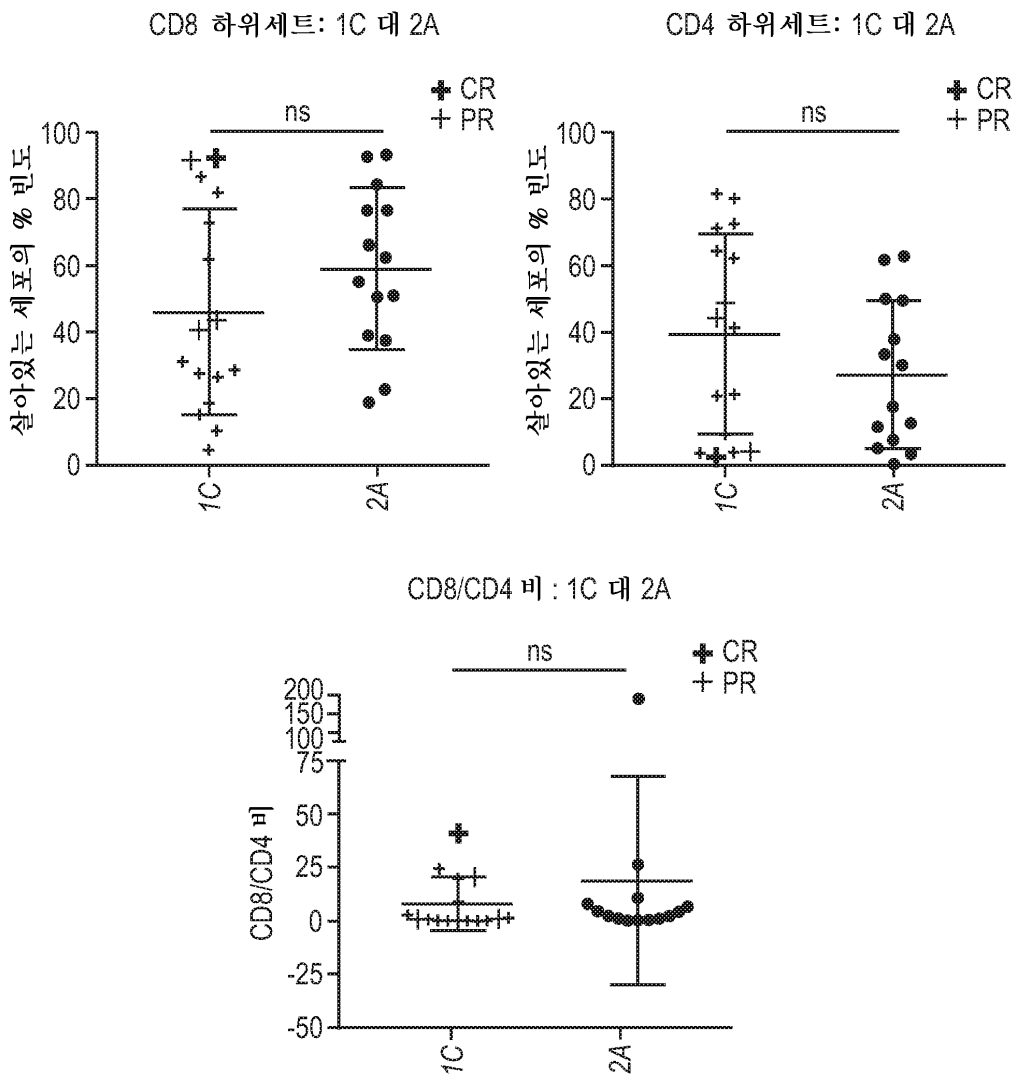
도면16


IFN-γ
p < 0.0001
p = 0.014
p = 0.001
IFN-γ (pg/1e6개 생존 세포/24시간)
log10 스케일
100000
10000
1000
100
1C TIL 생성물
(n = 16)
2A - 인하우스 TIL
(n = 9)
2A - 모피트 TIL
(n = 5)

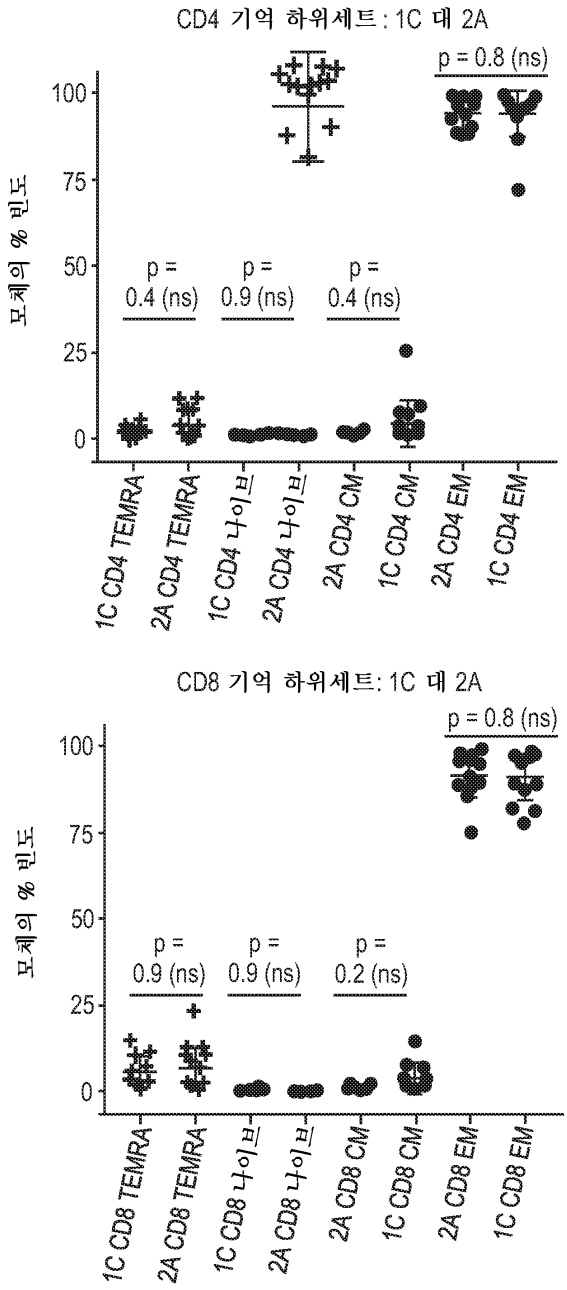
도면17


TCRa/b 및 NK: 1C 대 2A
p = 0.2 (ns)
p = 0.2 (ns)
p = 0.2 (ns)
모체의 % 빈도
100
75
50
25
0
1C TCRa/b
2A TCRa/b
1C TCRa/b-
2A TCRa/b-
1C NK
2A NK

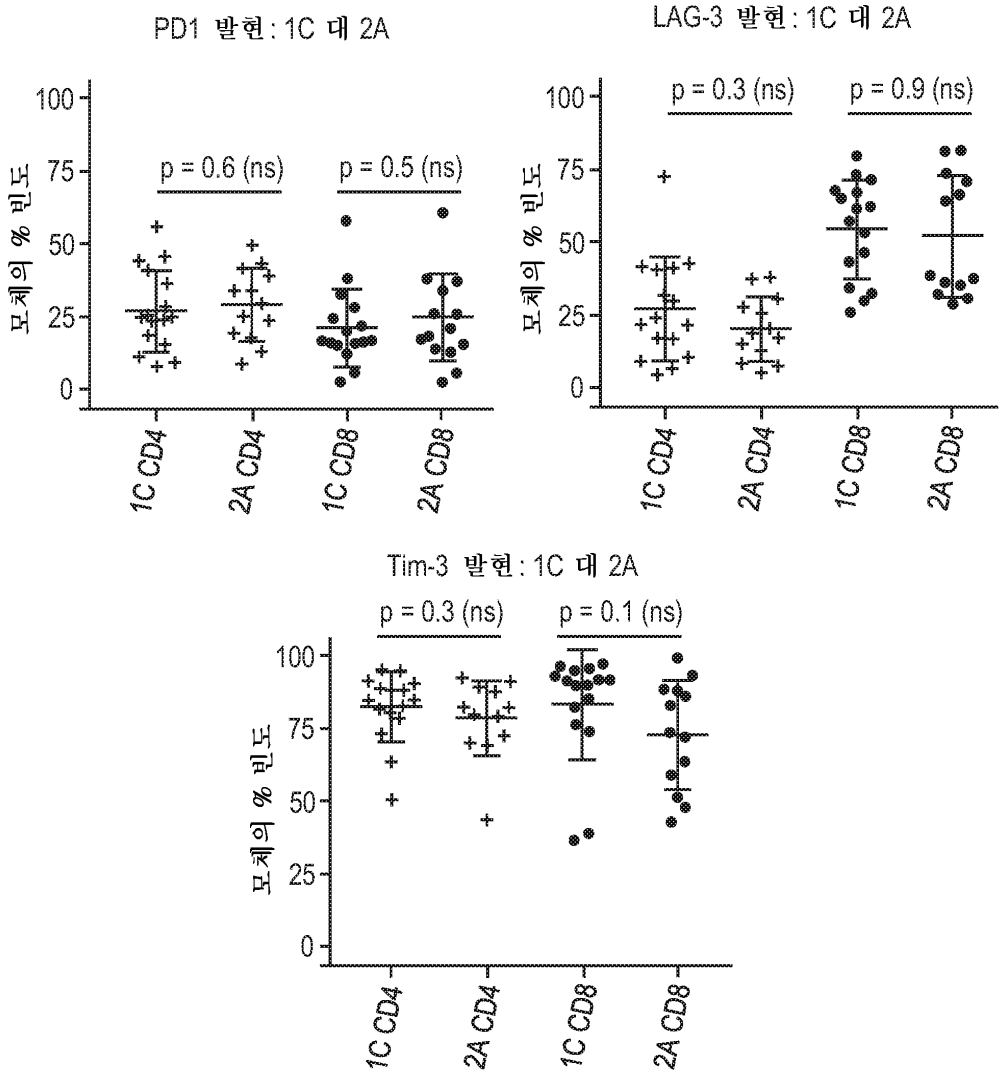
도면18


CD8 하위세트: 1C 대 2A
CD4 하위세트: 1C 대 2A
CD8/CD4 비 : 1C 대 2A
CR
PR
ns
살아있는 세포의 % 빈도
CD8/CD4 비
1C
2A
0
20
40
60
80
100
-50
-25
0
25
50
75
100
150
200

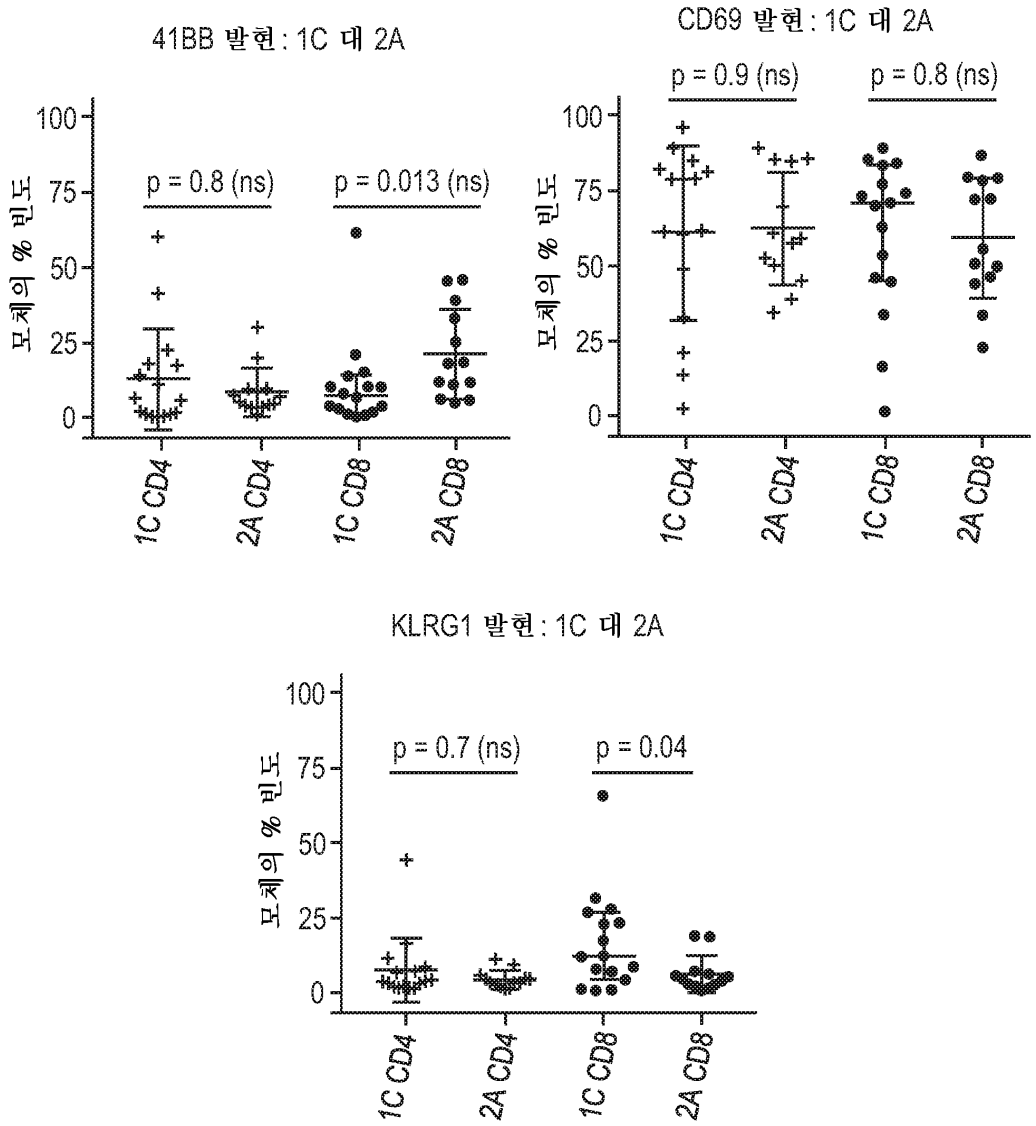
도면19


CD4 기억 하위세트 : 1C 대 2A
모체의 % 빈도
100
75
50
25
0
p = 0.8 (ns)
p = 0.4 (ns)
p = 0.9 (ns)
p = 0.4 (ns)
1C CD4 TEMRA
2A CD4 TEMRA
1C CD4 나이브
2A CD4 나이브
2A CD4 CM
1C CD4 CM
2A CD4 EM
1C CD4 EM
CD8 기억 하위세트: 1C 대 2A
모체의 % 빈도
100
75
50
25
0
p = 0.8 (ns)
p = 0.9 (ns)
p = 0.9 (ns)
p = 0.2 (ns)
1C CD8 TEMRA
2A CD8 TEMRA
1C CD8 나이브
2A CD8 나이브
2A CD8 CM
1C CD8 CM
2A CD8 EM
1C CD8 EM

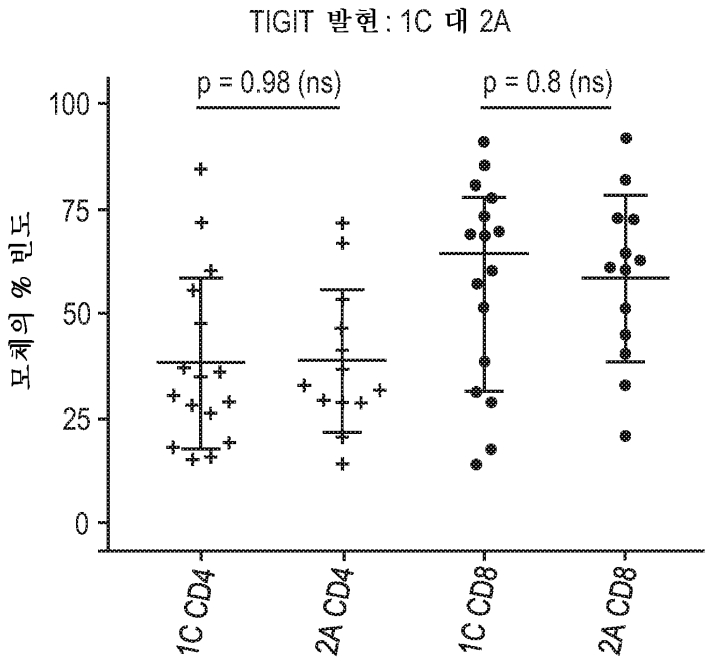
도면20


PD1 발현 : 1C 대 2A
모체의 % 빈도
100
75
50
25
0
p = 0.6 (ns)
p = 0.5 (ns)
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8
LAG-3 발현 : 1C 대 2A
모체의 % 빈도
p = 0.3 (ns)
p = 0.9 (ns)
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8
Tim-3 발현 : 1C 대 2A
모체의 % 빈도
p = 0.3 (ns)
p = 0.1 (ns)
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8

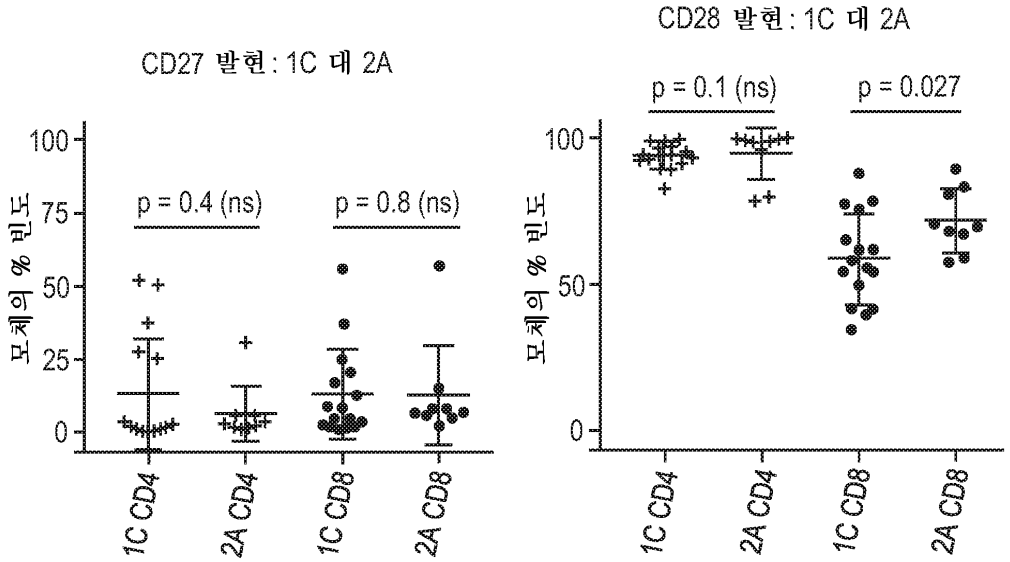
도면21


41BB 발현 : 1C 대 2A
모체의 % 빈도
100
75
50
25
0
p = 0.8 (ns)
p = 0.013 (ns)
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8
CD69 발현 : 1C 대 2A
p = 0.9 (ns)
p = 0.8 (ns)
KLRG1 발현 : 1C 대 2A
p = 0.7 (ns)
p = 0.04

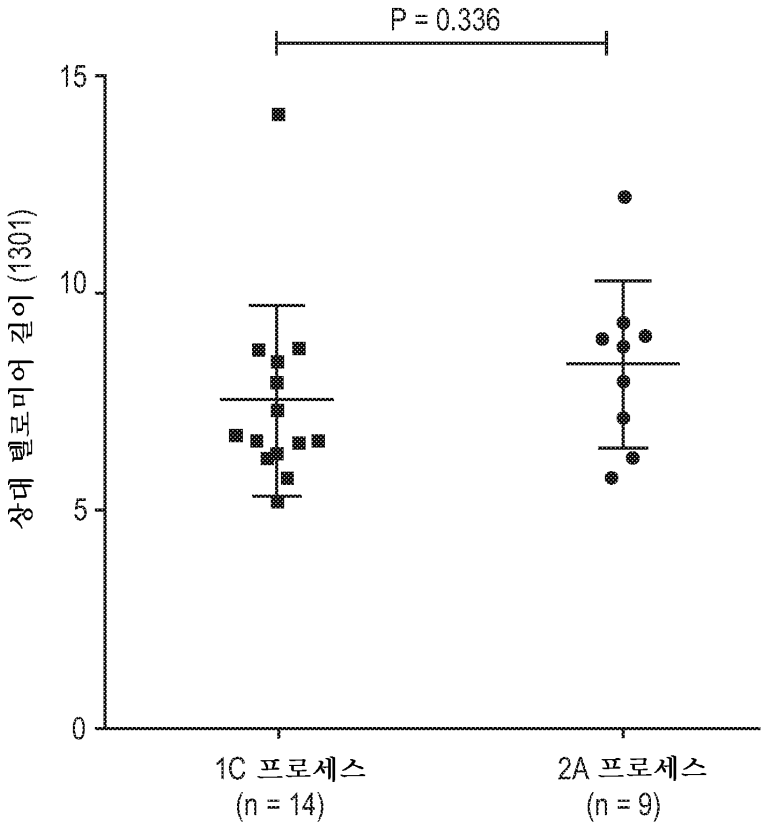
도면22


TIGIT 발현 : 1C 대 2A
p = 0.98 (ns)
p = 0.8 (ns)
모체의 % 빈도
100
75
50
25
0
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8

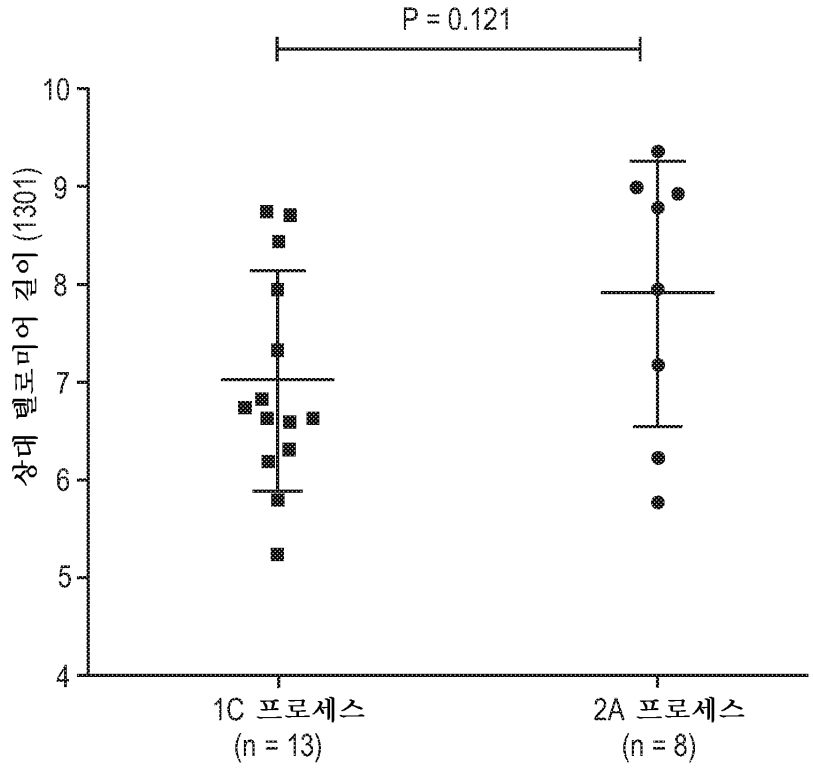
도면23


CD27 발현 : 1C 대 2A
p = 0.4 (ns)
p = 0.8 (ns)
CD28 발현 : 1C 대 2A
p = 0.1 (ns)
p = 0.027
모체의 % 빈도
100
75
50
25
0
1C CD4
2A CD4
1C CD8
2A CD8

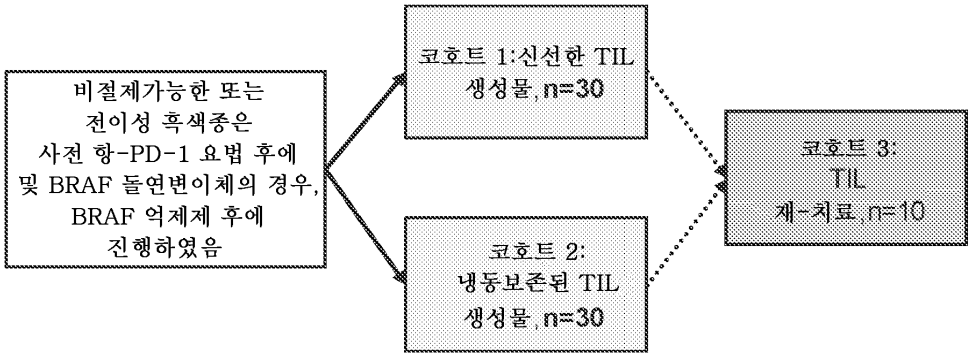
도면24


P = 0.336
15
10
5
0
상대 텔로미어 길이 (1301)
1C 프로세스
(n = 14)
2A 프로세스
(n = 9)

도면25


P = 0.121
10
9
8
7
6
5
4
상대 텔로미어 길이 (1301)
1C 프로세스
(n = 13)
2A 프로세스
(n = 8)

도면26



도면27

프로세스 2A: 단계 A에서 E까지 약 22일

1. **단계 A**

환자 종양 샘플을 얻기

2. **단계 B**

단편화 및 제1 확장
3일 내지 14일

3. **단계 C**

제1 확장에서 제2 확장으로의 이행
저장 없음 및 닫힌 계

4. **단계 D**

제2 확장
IL-2, OKT-3, 및 항원-제사 공급자 세포
닫힌 계

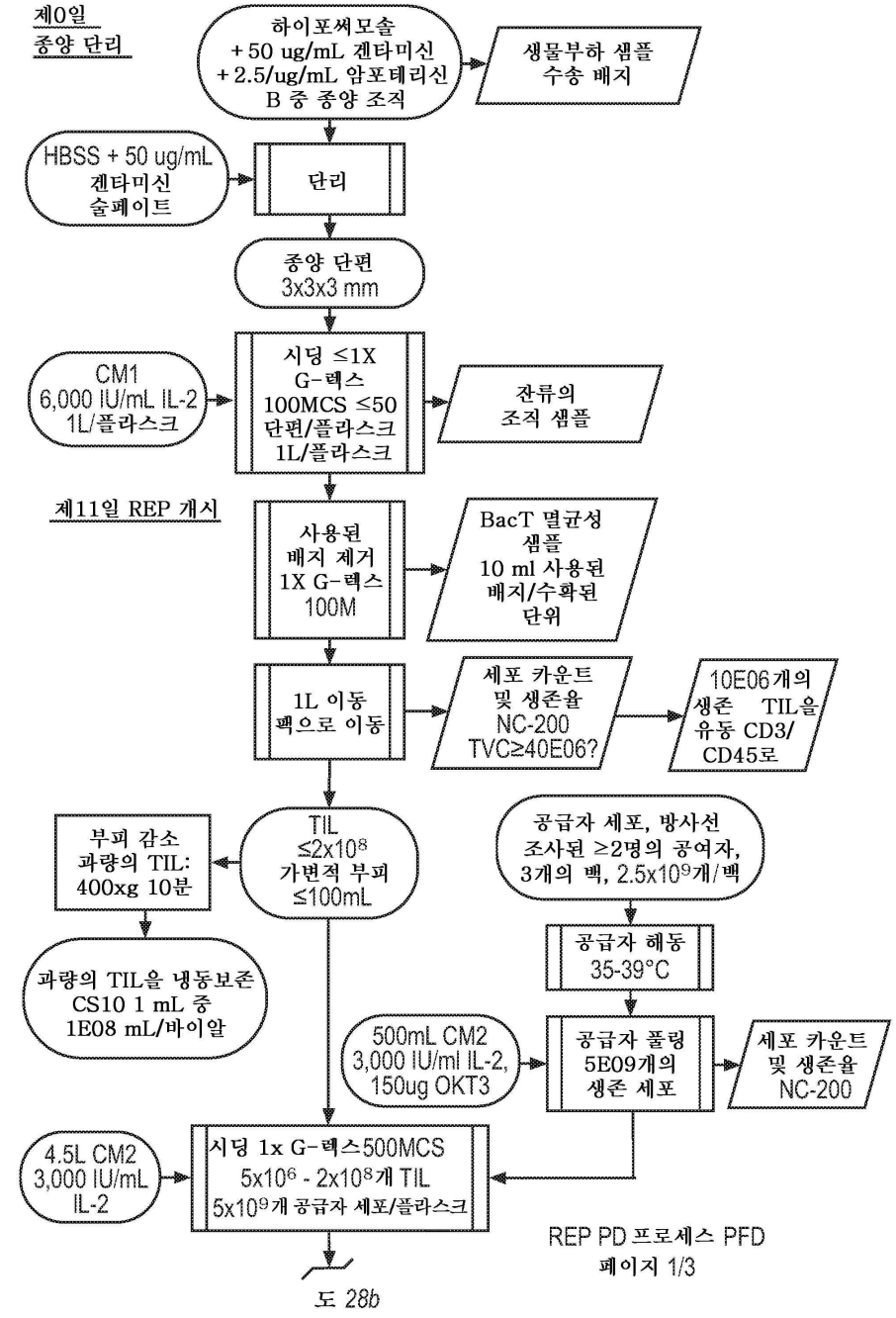
5. **단계 E**

단계 D로부터의 TIL을 수확하기
닫힌 계

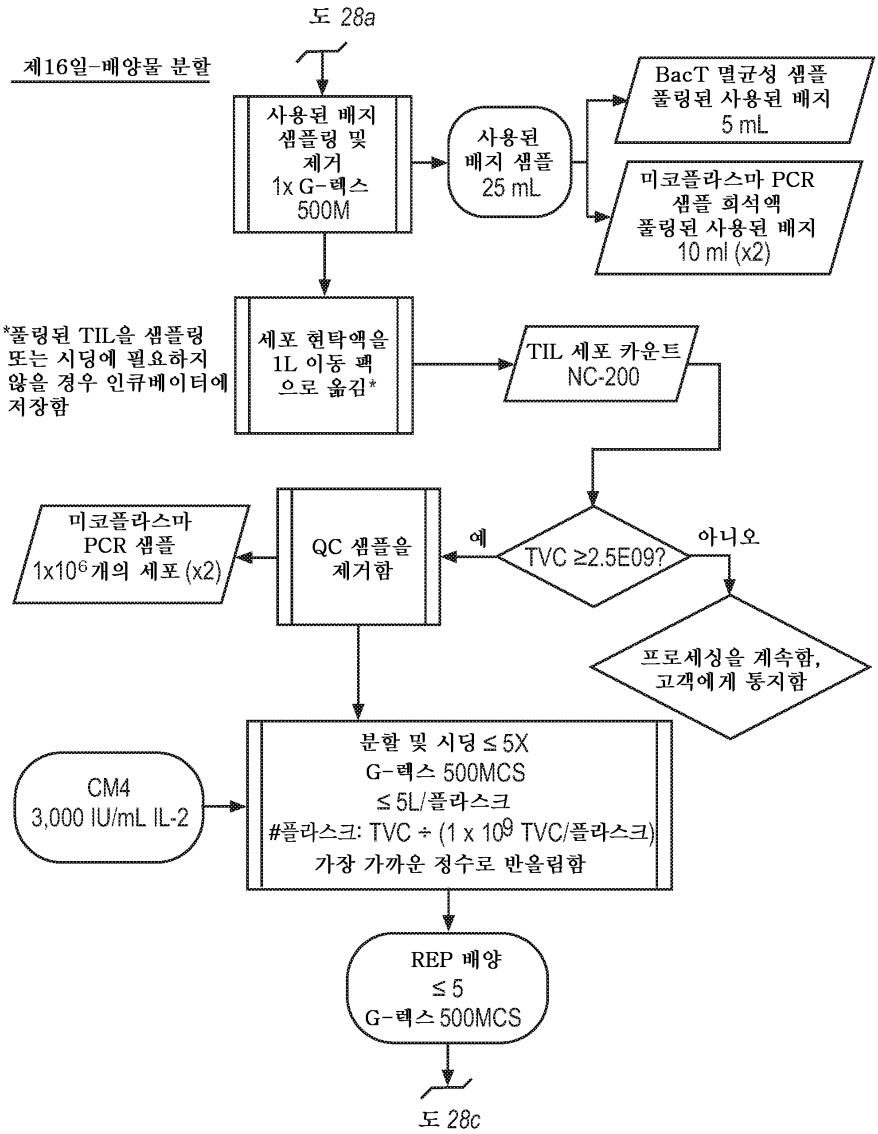
6. **단계 F**

최종 제형화 및/또는 주입 백으로의 이동
(임의로 냉동보존)

도면28a

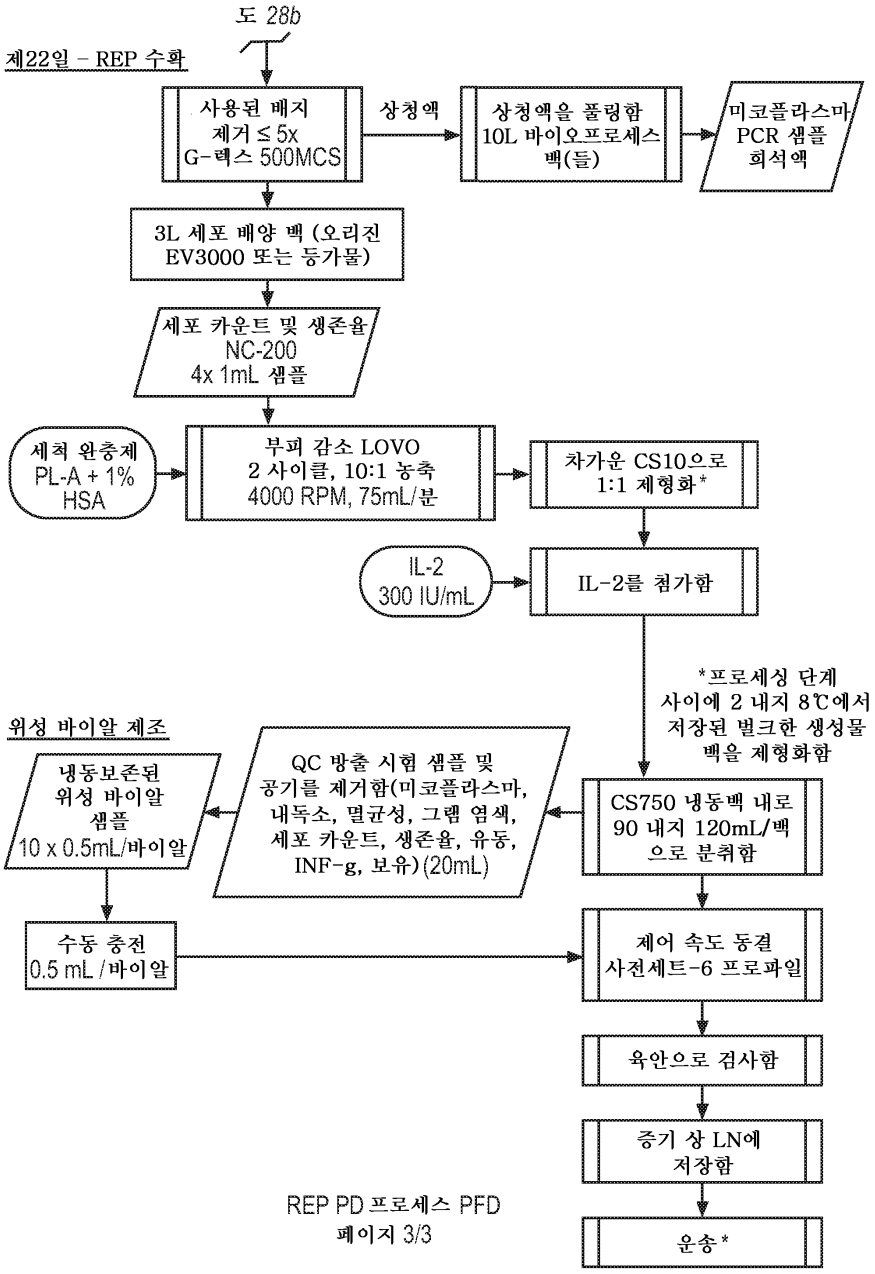

제0일
종양 단리
하이포써모솔
+ 50 ug/mL 겐타미신
+ 2.5/ug/mL 암포테리신
B 중 종양 조직
생물부하 샘플
수송 배지
HBSS + 50 ug/mL
겐타미신
술페이트
단리
종양 단편
3x3x3 mm
CM1
6,000 IU/mL IL-2
1L/플라스크
시딩 ≤1X
G-렉스
100MCS ≤50
단편/플라스크
1L/플라스크
잔류의
조직 샘플
제11일 REP 개시
사용된
배지 제거
1X G-렉스
100M
BacT 멸균성
샘플
10 ml 사용된
배지/수확된
단위
1L 이동
팩으로 이동
세포 카운트
및 생존율
NC-200
TVC≥40E06?
10E06개의
생존 TIL을
유동 CD3/
CD45로
부피 감소
과량의 TIL:
400xg 10분
TIL
≤2x10^8
가변적 부피
≤100mL
공급자 세포, 방사선
조사된 ≥2명의 공여자,
3개의 백, 2.5x10^9개/백
공급자 해동
35-39°C
과량의 TIL을 냉동보존
CS10 1 mL 중
1E08 mL/바이알
500mL CM2
3,000 IU/ml IL-2,
150ug OKT3
공급자 풀링
5E09개의
생존 세포
세포 카운트
및 생존율
NC-200
4.5L CM2
3,000 IU/mL
IL-2
시딩 1x G-렉스500MCS
5x10^6 - 2x10^8개 TIL
5x10^9개 공급자 세포/플라스크
REP PD 프로세스 PFD
페이지 1/3
도 28b

도면28b

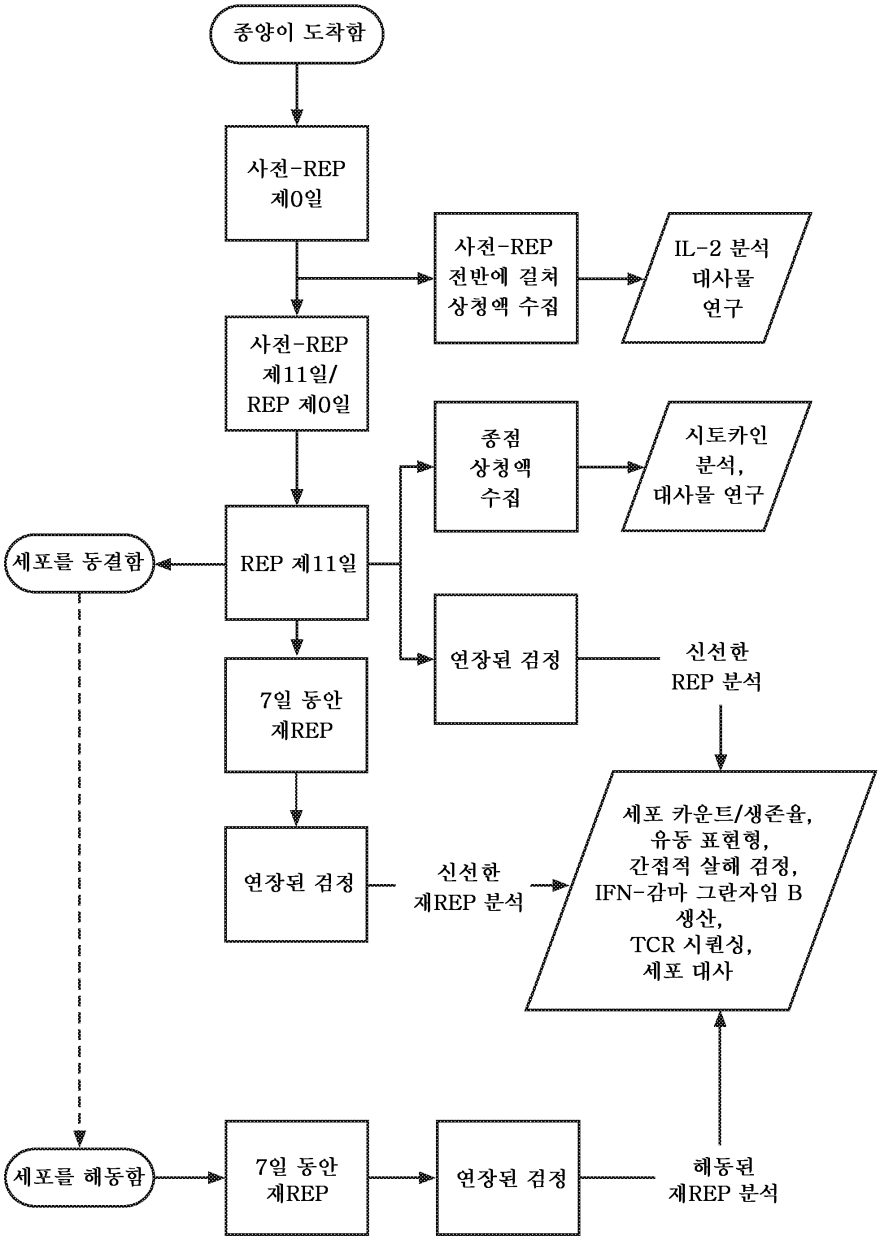


REP PD 프로세스 PFD
페이지 2/3

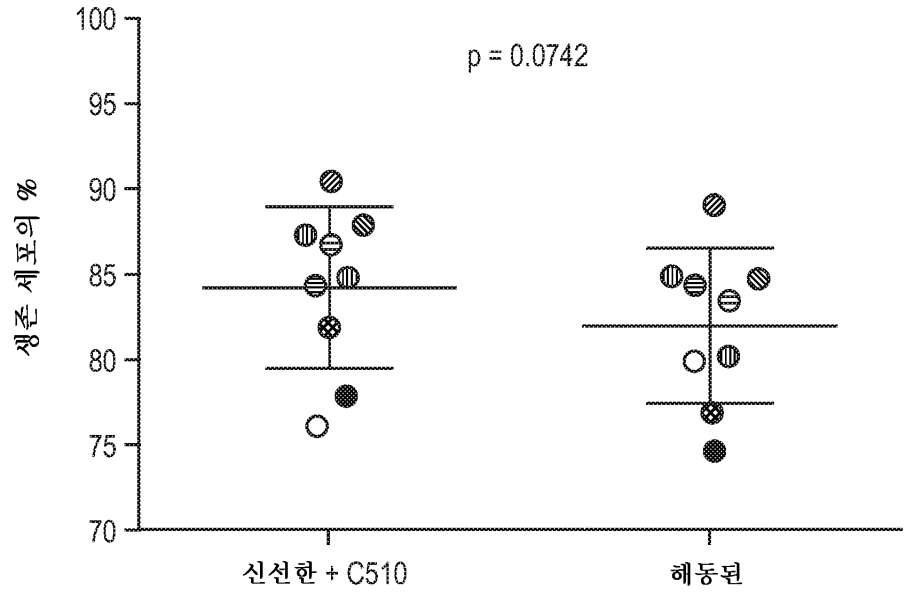
도면28c


도 28b
제22일 – REP 수확
사용된 배지 제거 ≤ 5x G-렉스 500MCS
상청액
상청액을 풀링함 10L 바이오프로세스 백(들)
미코플라스마 PCR 샘플 회석액
3L 세포 배양 백 (오리진 EV3000 또는 등가물)
세포 카운트 및 생존율 NC-200 4x 1mL 샘플
세척 완충제 PL-A + 1% HSA
부피 감소 LOVO 2 사이클, 10:1 농축 4000 RPM, 75mL/분
차가운 CS10으로 1:1 제형화*
IL-2 300 IU/mL
IL-2를 첨가함
*프로세싱 단계 사이에 2 내지 8℃에서 저장된 벌크한 생성물 백을 제형화함
위성 바이알 제조
냉동보존된 위성 바이알 샘플 10 x 0.5mL/바이알
QC 방출 시험 샘플 및 공기를 제거함(미코플라스마, 내독소, 멸균성, 그램 염색, 세포 카운트, 생존율, 유동, INF-g, 보유)(20mL)
CS750 냉동백 내로 90 내지 120mL/백으로 분취함
수동 충전 0.5 mL / 바이알
제어 속도 동결 사전세트-6 프로파일
육안으로 검사함
증기 상 LN에 저장함
운송*
REP PD 프로세스 PFD
페이지 3/3

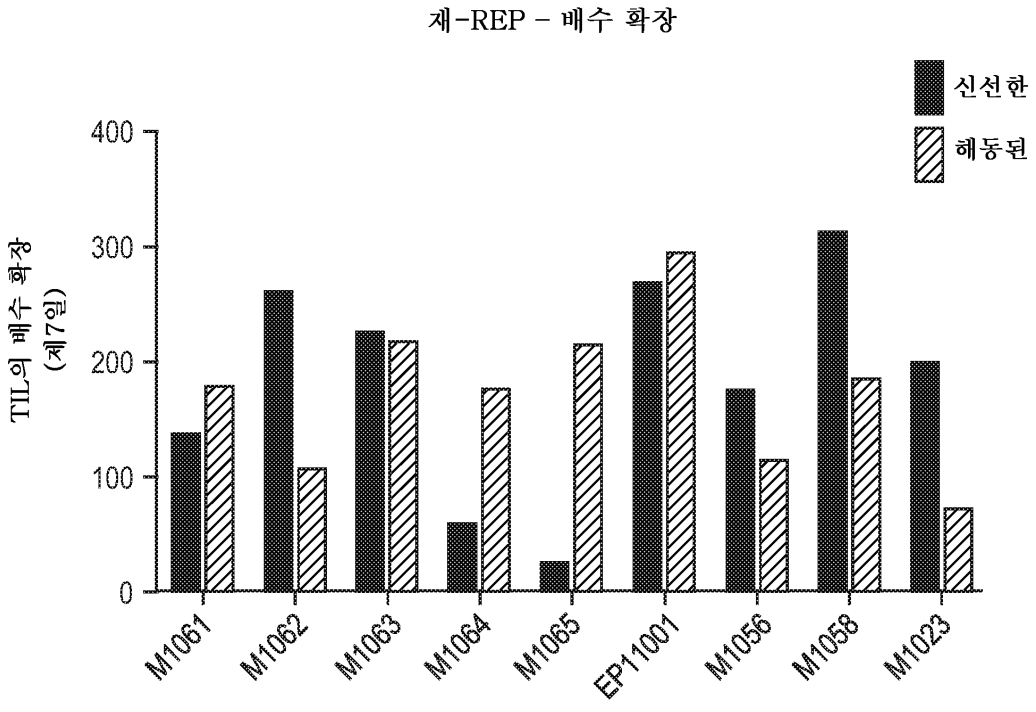
도면29


종양이 도착함
사전-REP
제0일
사전-REP
전반에 걸쳐
상청액 수집
IL-2 분석
대사물
연구
사전-REP
제11일/
REP 제0일
종점
상청액
수집
시토카인
분석,
대사물 연구
세포를 동결함
REP 제11일
연장된 검정
신선한
REP 분석
7일 동안
재REP
세포 카운트/생존율,
유동 표현형,
간접적 살해 검정,
IFN-감마 그란자임 B
생산,
TCR 시퀀싱,
세포 대사
연장된 검정
신선한
재REP 분석
세포를 해동함
7일 동안
재REP
연장된 검정
해동된
재REP 분석

도면30


p = 0.0742
생존 세포의 %
100
95
90
85
80
75
70
신선한 + C510
해동된

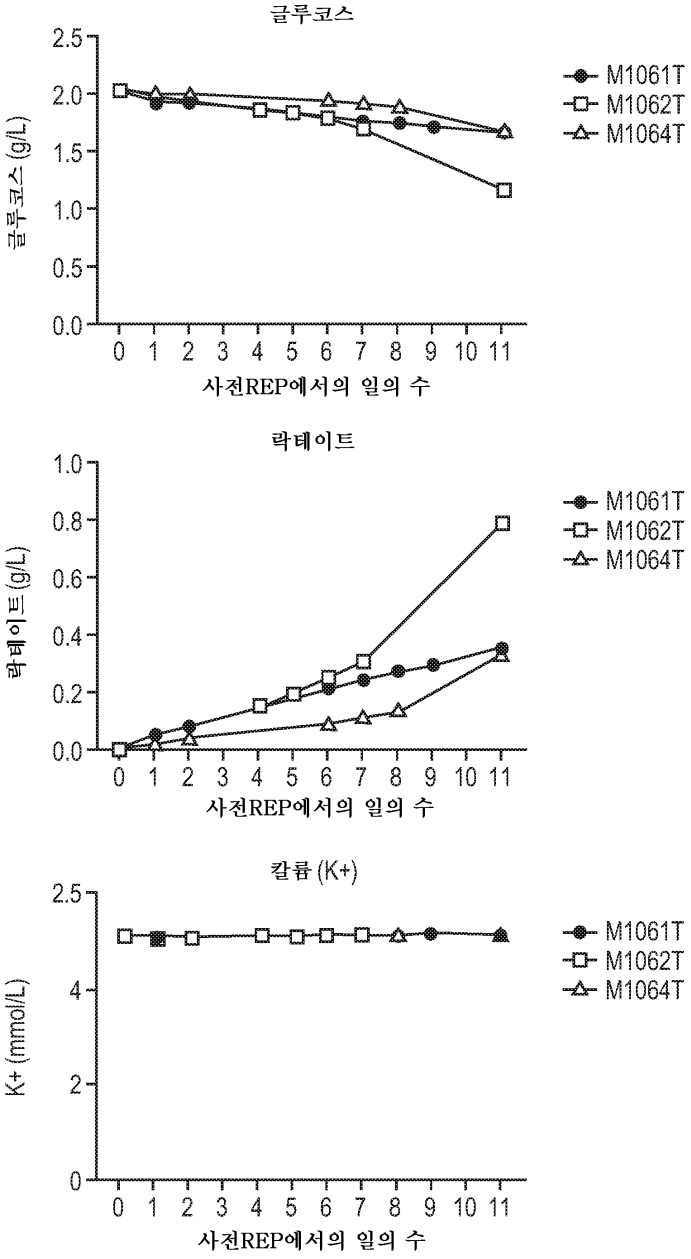
도면31


재-REP - 배수 확장
신선한
해동된
TIL의 배수 확장
(제7일)
400
300
200
100
0
M1061
M1062
M1063
M1064
M1065
EP11001
M1056
M1058
M1023

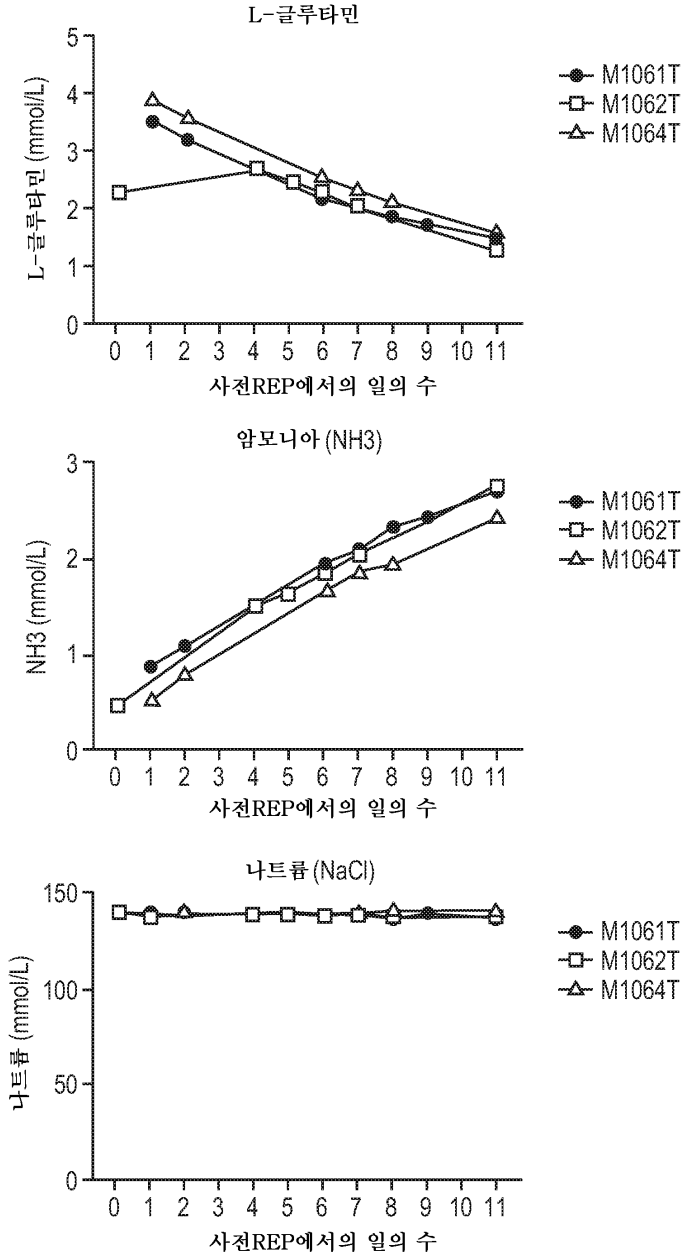
도면32

정상 혈액 값	
글루코스	0.7-1g/l
글루타민	0.3-0.65mmol/l
나트륨	135-145mol/l
칼륨	3.5-5.0mmol/l
락트산	0.060-.16g/l
암모니아	.023-.047mmol/l

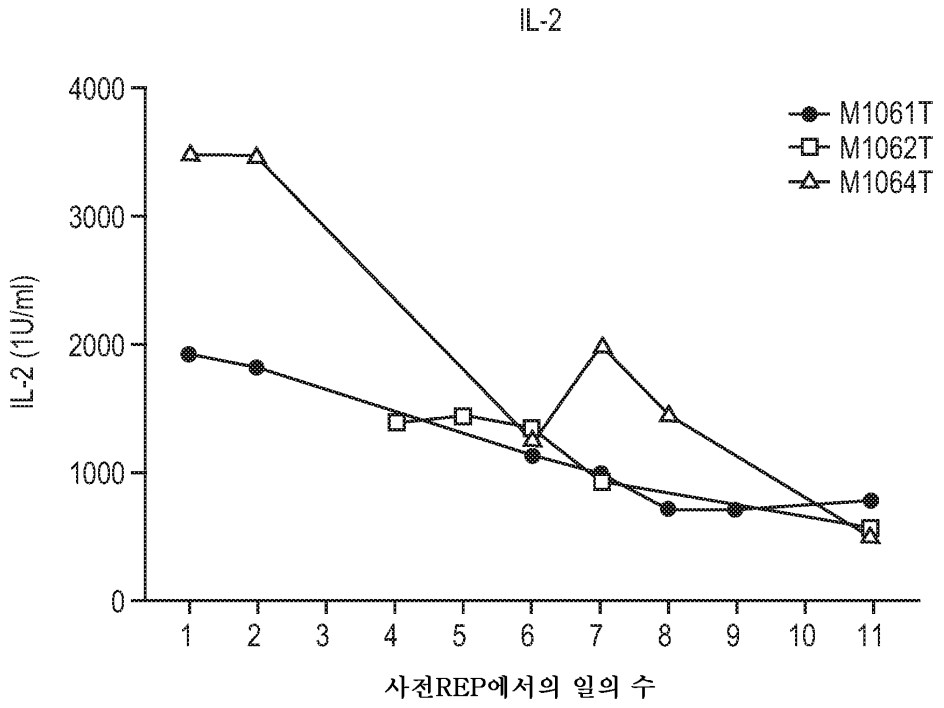
도면33a


글루코스
글루코스 (g/L)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
사전REP에서의 일의 수
M1061T
M1062T
M1064T
락테이트
락테이트 (g/L)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
사전REP에서의 일의 수
M1061T
M1062T
M1064T
칼륨 (K+)
K+ (mmol/L)
2.5
4
2
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
사전REP에서의 일의 수
M1061T
M1062T
M1064T

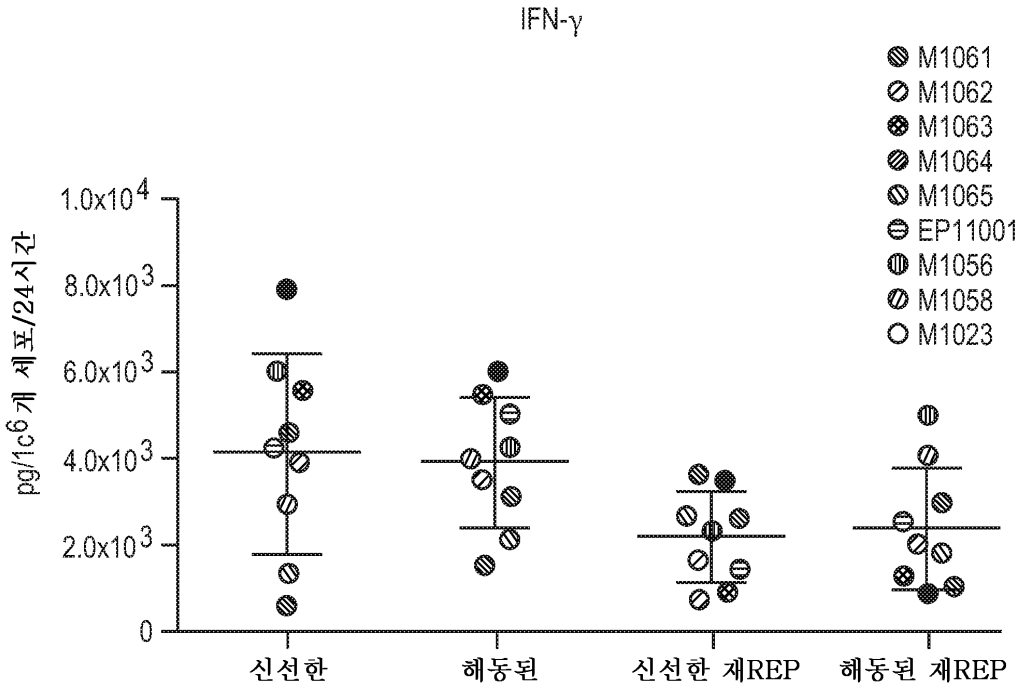
도면33b


L-글루타민
L-글루타민 (mmol/L)
0 1 2 3 4 5
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
사전REP에서의 일의 수
M1061T
M1062T
M1064T
암모니아 (NH3)
NH3 (mmol/L)
0 1 2 3
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
사전REP에서의 일의 수
M1061T
M1062T
M1064T
나트륨 (NaCl)
나트륨 (mmol/L)
0 50 100 150
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
사전REP에서의 일의 수
M1061T
M1062T
M1064T

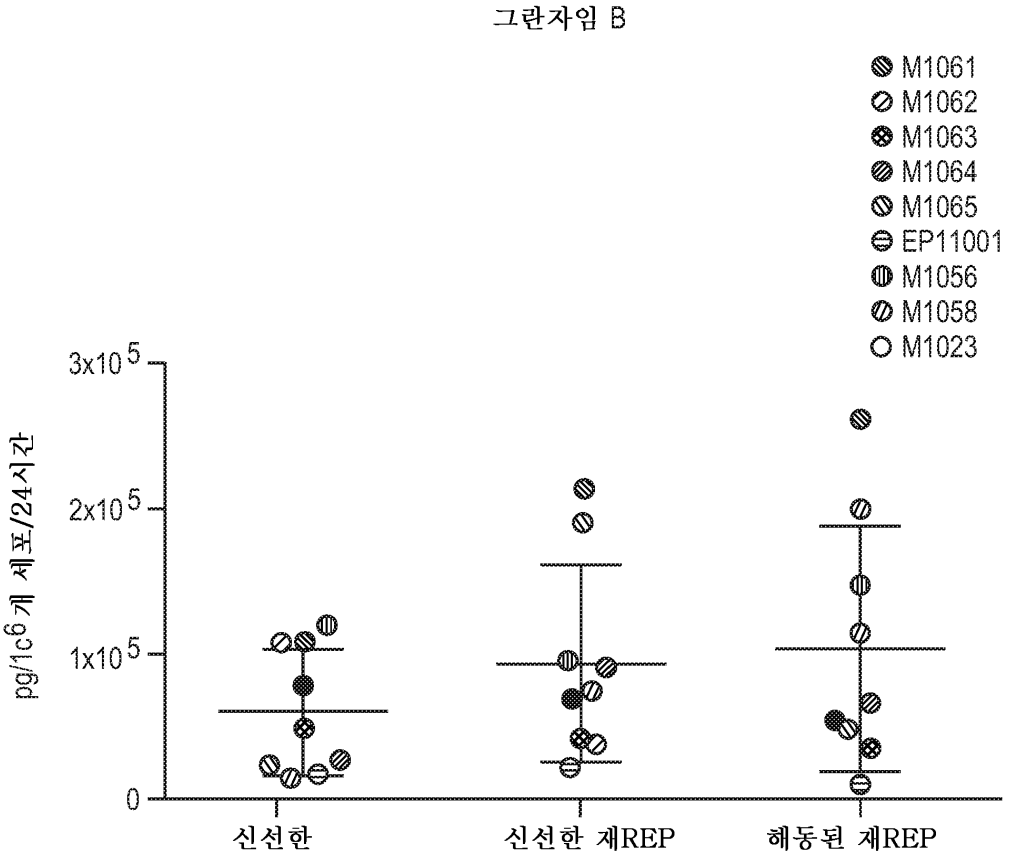
도면34


IL-2
4000
3000
2000
1000
0
IL-2 (1U/ml)
M1061T
M1062T
M1064T
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
사전REP에서의 일의 수

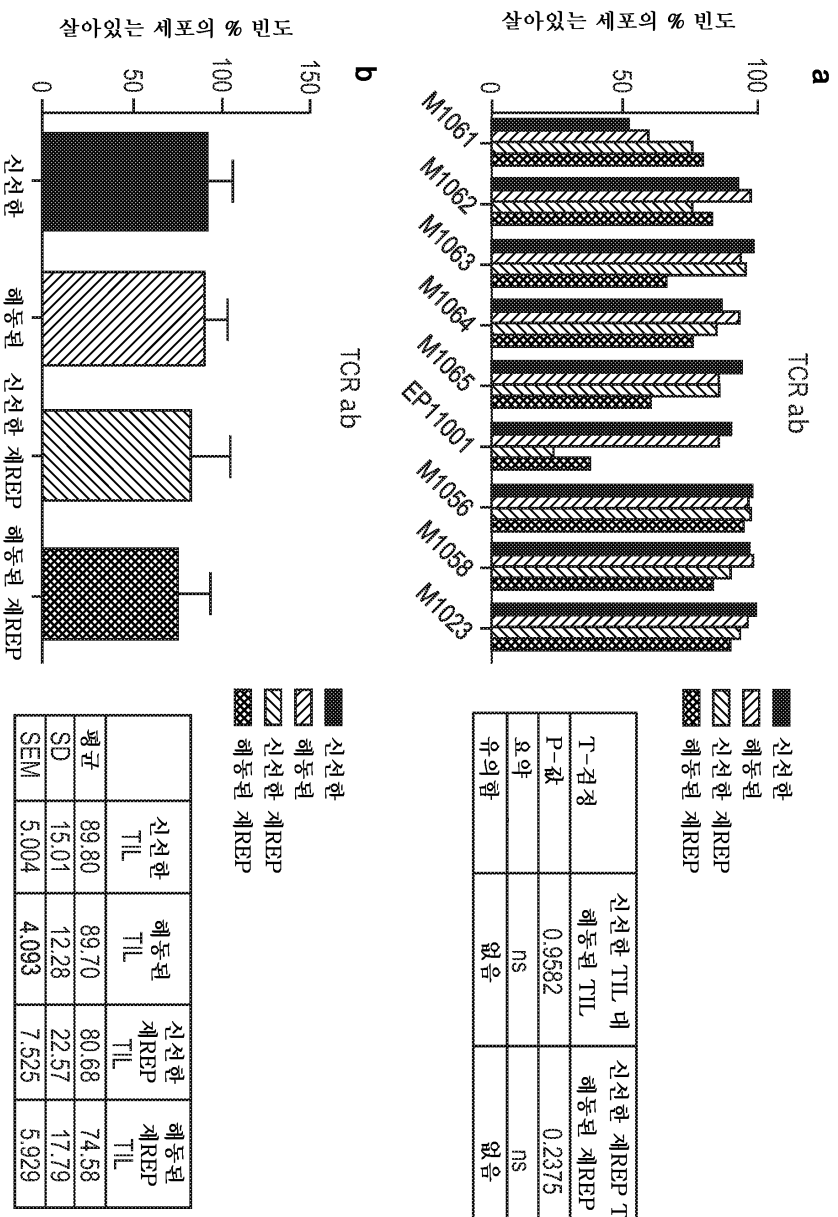
도면35


IFN-γ
M1061
M1062
M1063
M1064
M1065
EP11001
M1056
M1058
M1023
1.0x10^4
8.0x10^3
6.0x10^3
4.0x10^3
2.0x10^3
0
pg/1c^6개 세포/24시간
신선한
해동된
신선한 재REP
해동된 재REP

도면36


그란자임 B
M1061
M1062
M1063
M1064
M1065
EP11001
M1056
M1058
M1023
3x10 5
2x10 5
1x10 5
0
pg/1c6개 세포/24시간
신선한
신선한 재REP
해동된 재REP

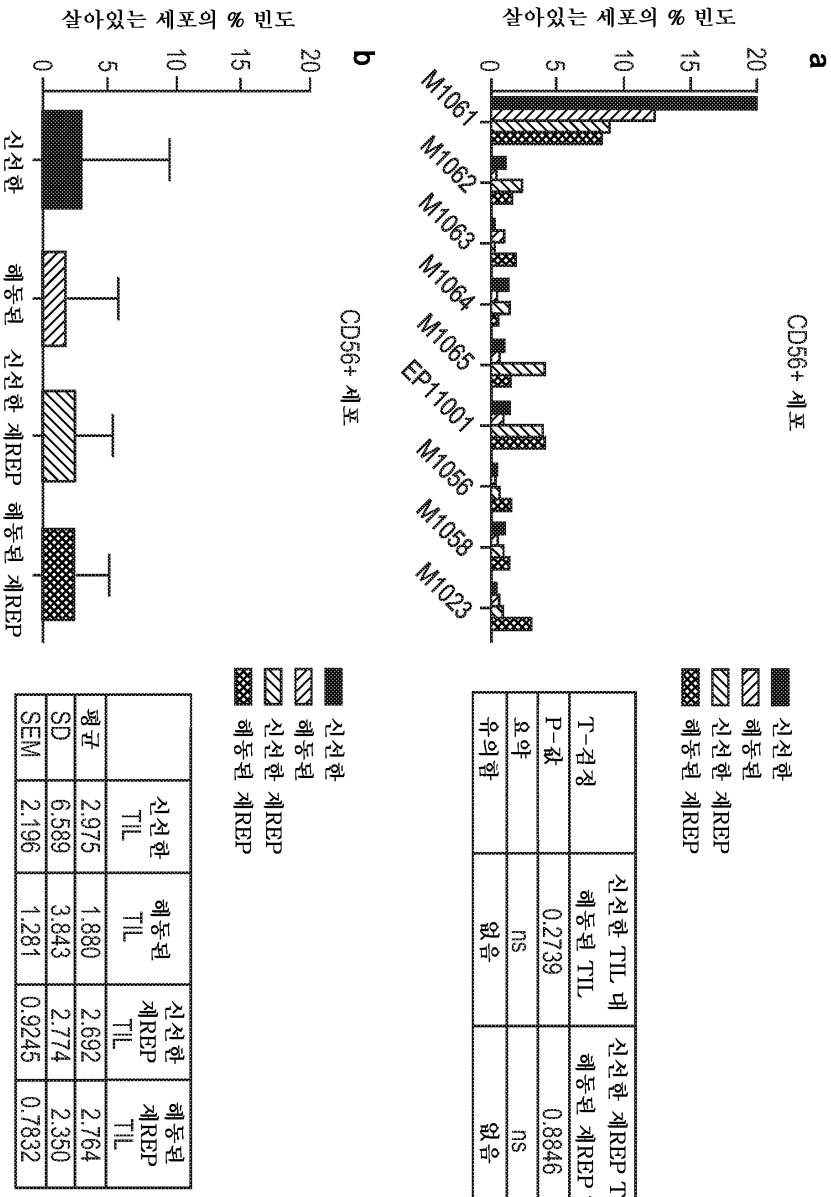
도면37



T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
P-값	0.9582	0.2375
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	89.80	89.70	80.68	74.58
SD	15.01	12.28	22.57	17.79
SEM	5.004	4.093	7.525	5.929

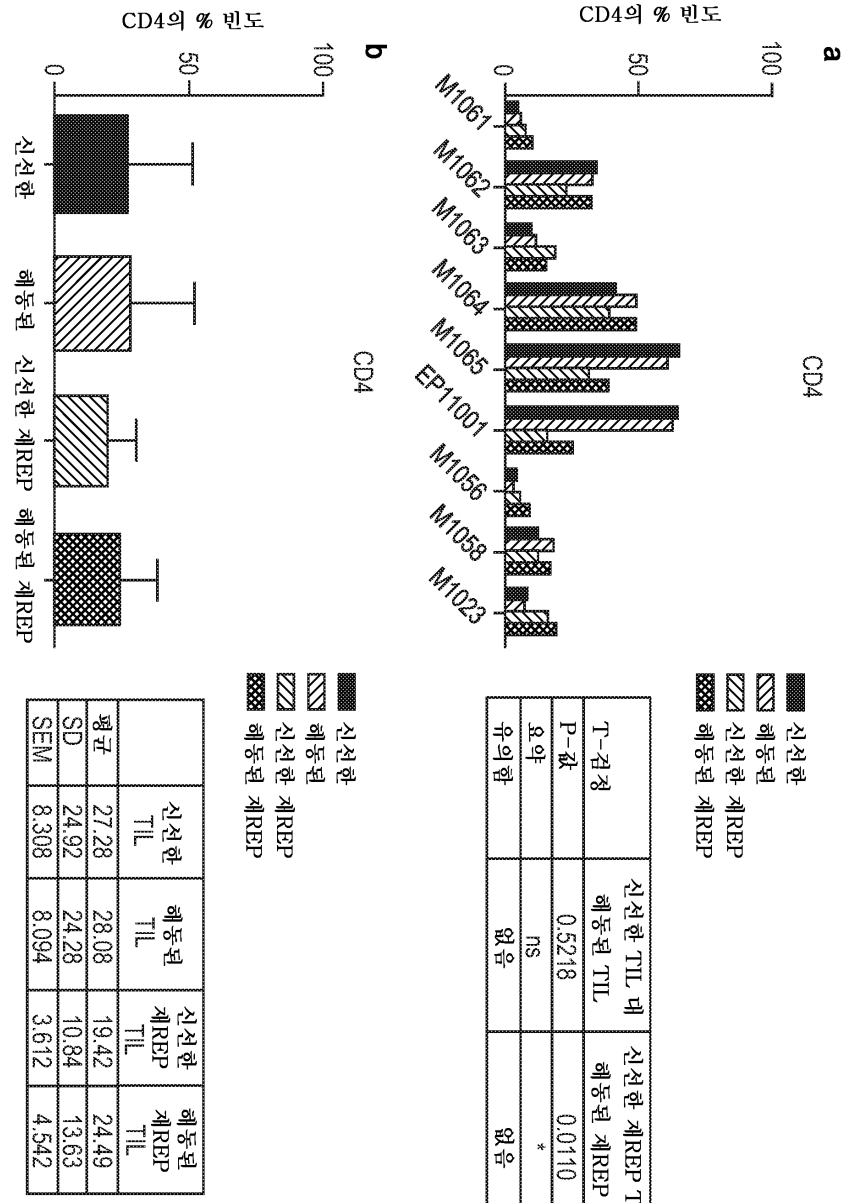
도면38



T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 재REP TIL 대 해동된 재REP TIL
P-값	0.2739	0.8846
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 재REP TIL	해동된 재REP TIL
평균	2.975	1.880	2.692	2.764
SD	6.589	3.843	2.774	2.350
SEM	2.196	1.281	0.9245	0.7832

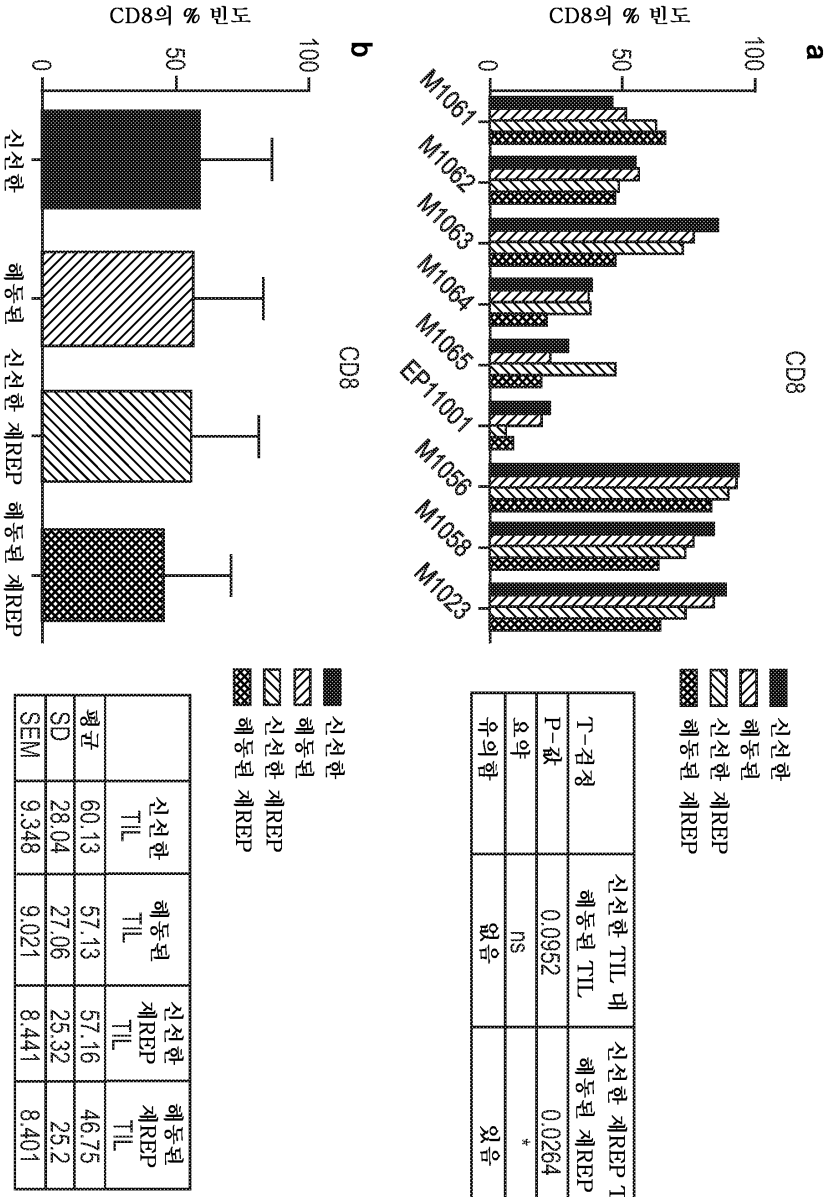
도면39



	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 재REP TIL 대 해동된 재REP TIL
T-검정		
P-값	0.5218	0.0110
요약	ns	*
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 재REP TIL	해동된 재REP TIL
평균	27.28	28.08	19.42	24.49
SD	24.92	24.28	10.84	13.63
SEM	8.308	8.094	3.612	4.542

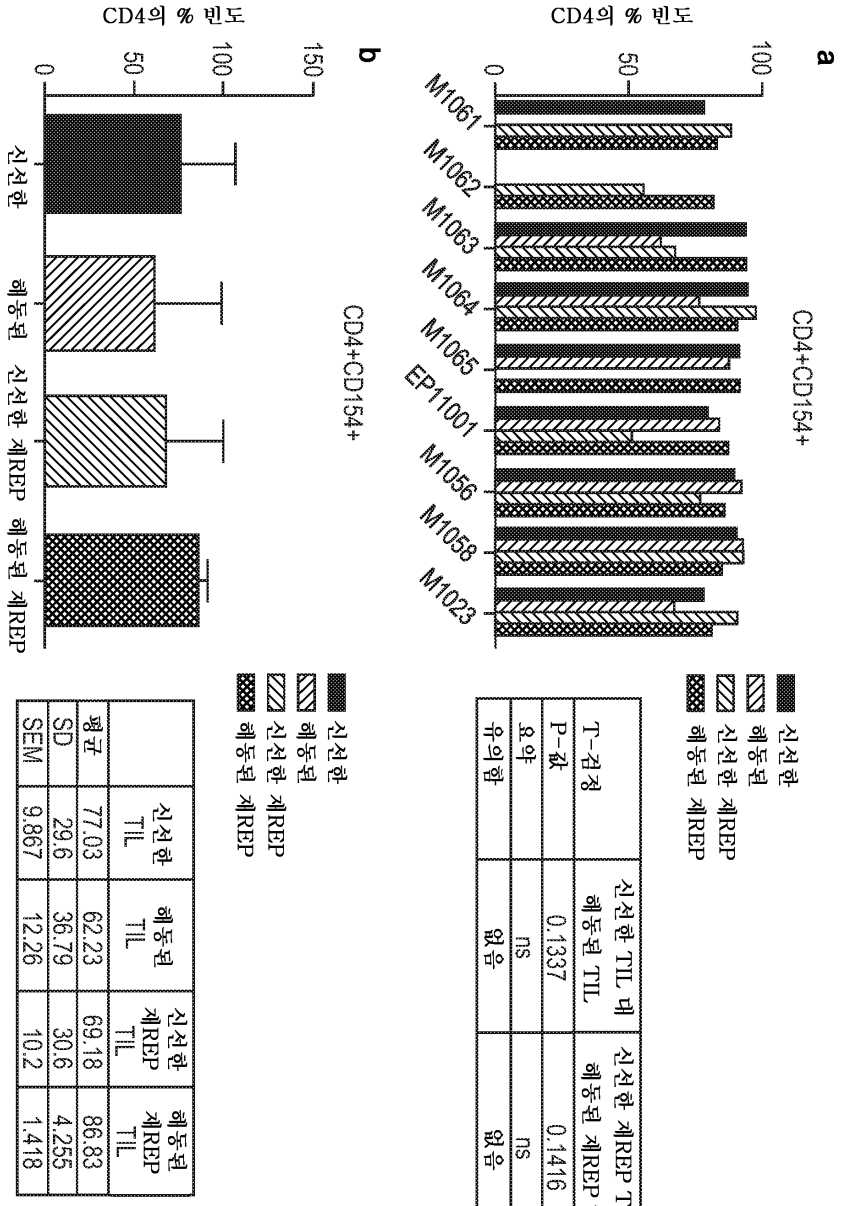
도면40



T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 재REP TIL 대 해동된 재REP TIL
P-값	0.0952	0.0264
요약	ns	*
유의함	없음	있음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 재REP TIL	해동된 재REP TIL
평균	60.13	57.13	57.16	46.75
SD	28.04	27.06	25.32	25.2
SEM	9.348	9.021	8.441	8.401

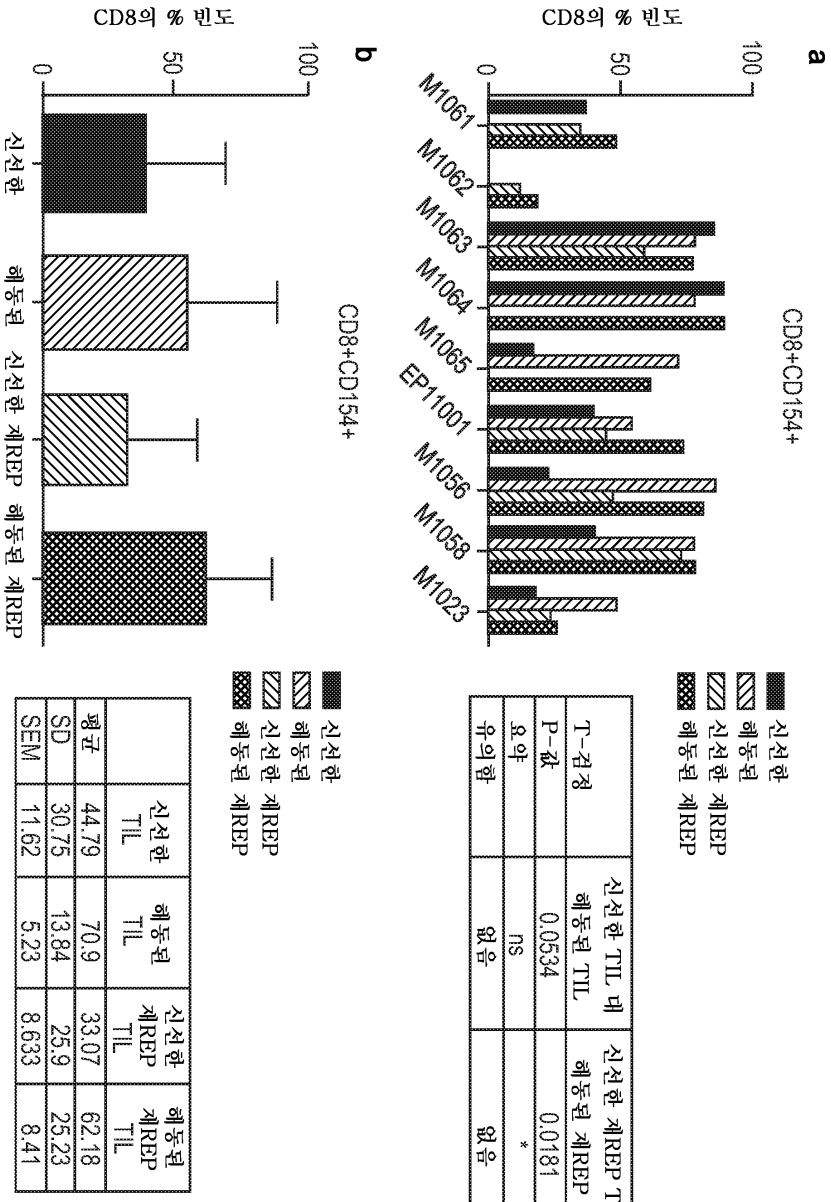
도면41



	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
T-검정		
P-값	0.1337	0.1416
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	77.03	62.23	69.18	86.83
SD	29.6	36.79	30.6	4.255
SEM	9.867	12.26	10.2	1.418

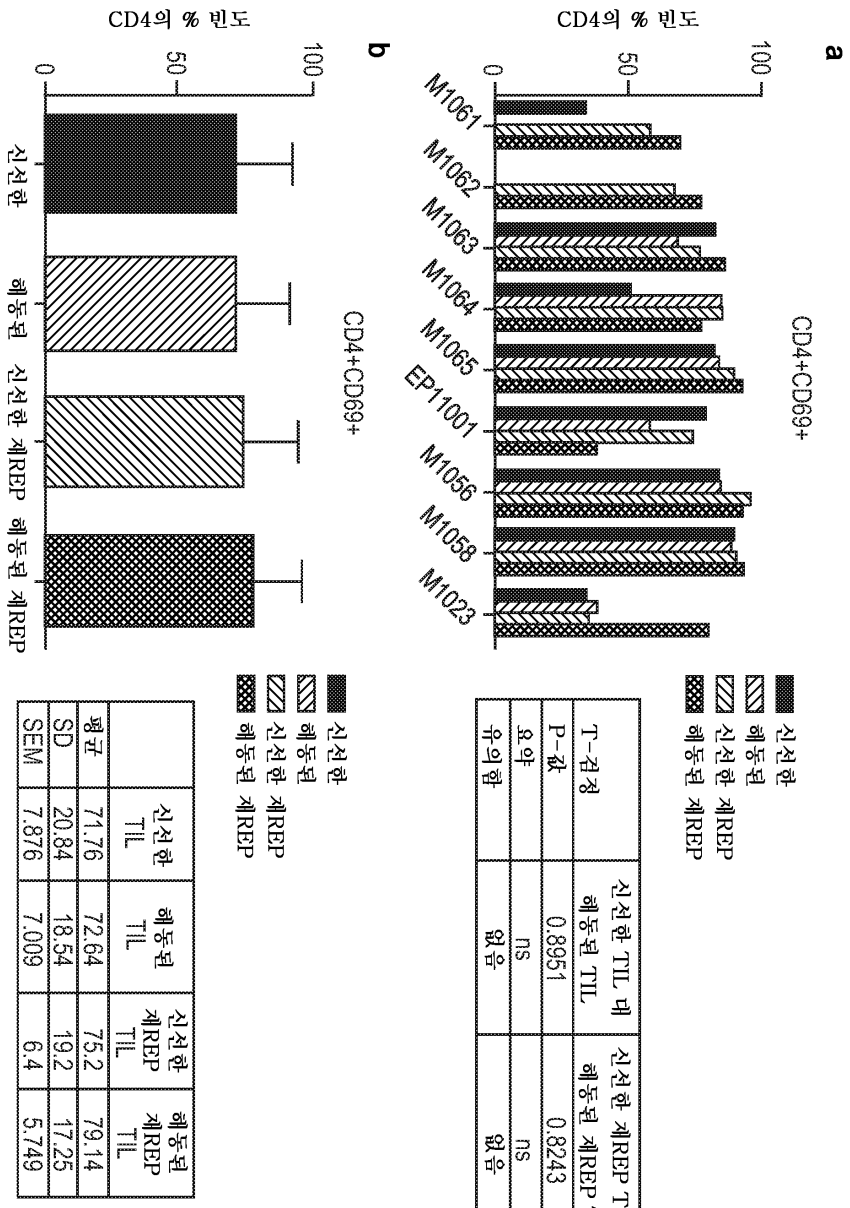
도면42



T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 재REP TIL 대 해동된 재REP TIL
P-값	0.0534	0.0181
요약	ns	*
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 재REP TIL	해동된 재REP TIL
평균	44.79	70.9	33.07	62.18
SD	30.75	13.84	25.9	25.23
SEM	11.62	5.23	8.633	8.41

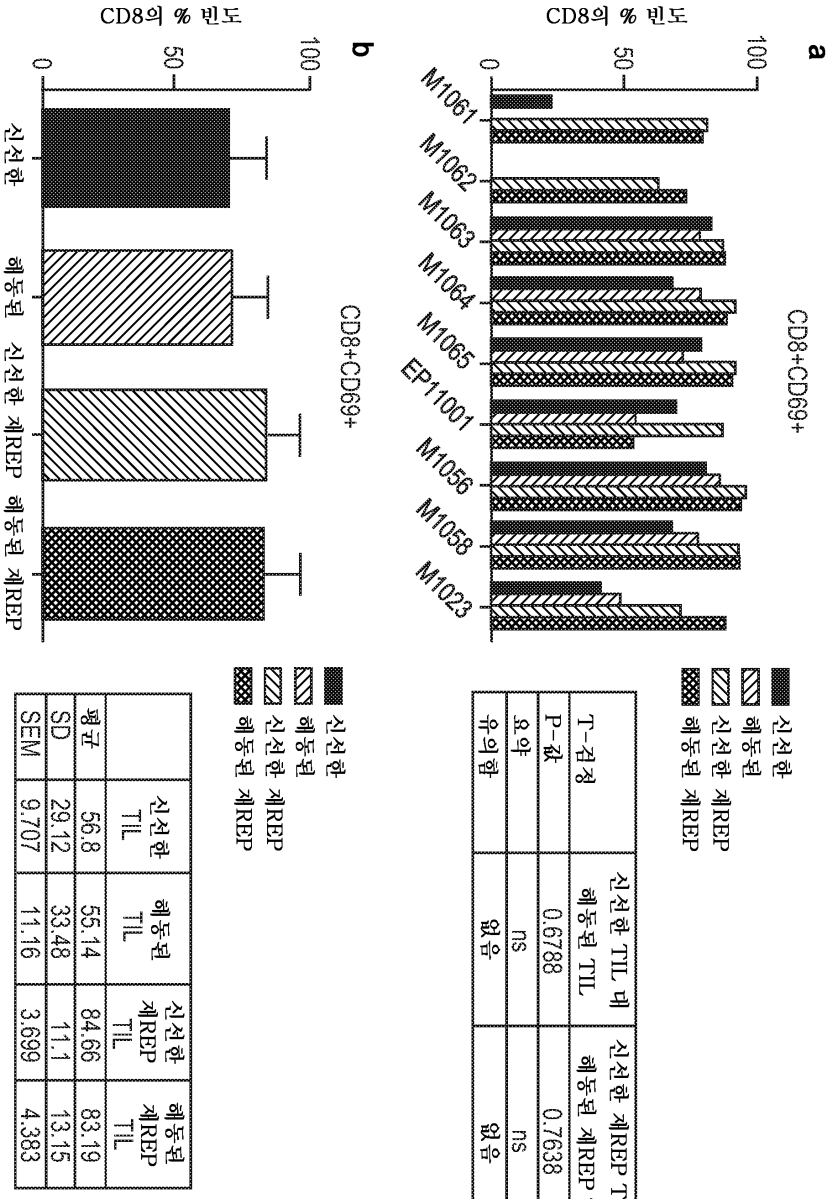
도면43



T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
P-값	0.8951	0.8243
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	71.76	72.64	75.2	79.14
SD	20.84	18.54	19.2	17.25
SEM	7.876	7.009	6.4	5.749

도면44



T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
P-값	0.6788	0.7638
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

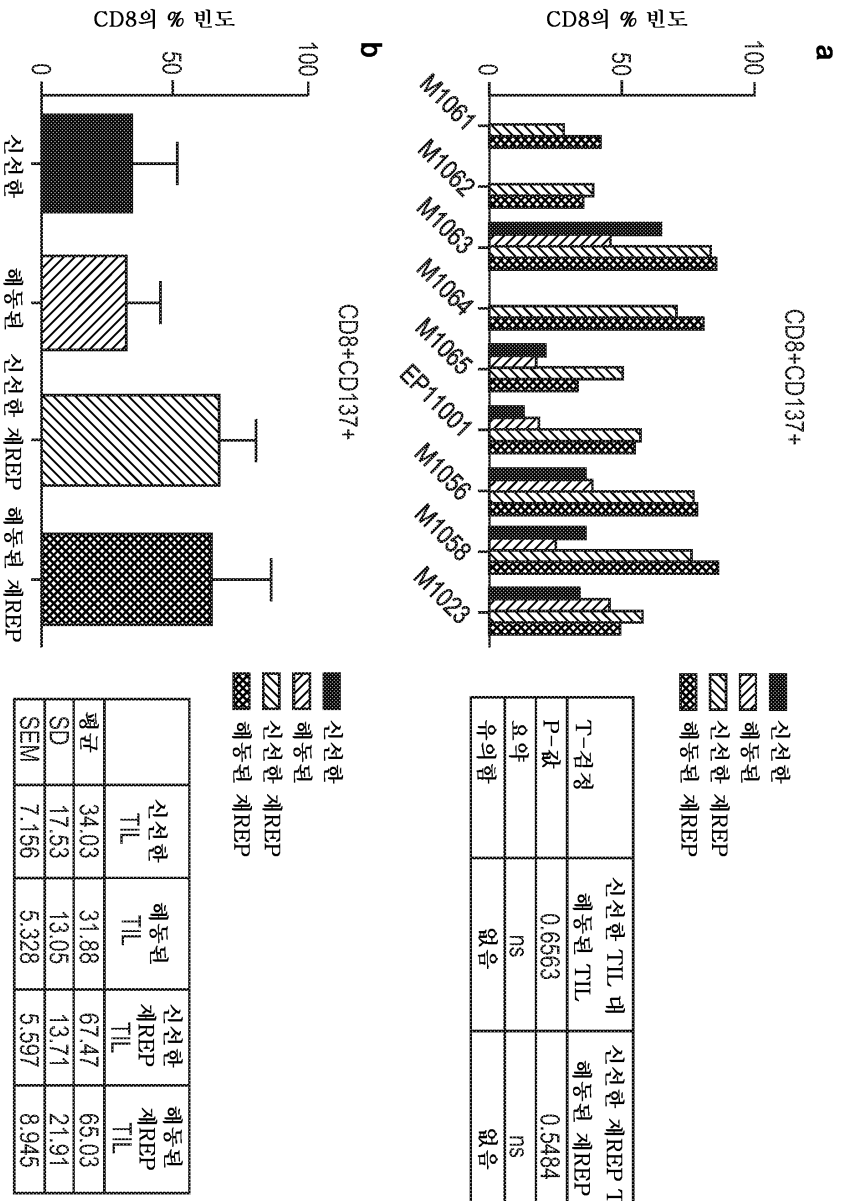
	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	56.8	55.14	84.66	83.19
SD	29.12	33.48	11.1	13.15
SEM	9.707	11.16	3.699	4.383

도면45

	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
T-검정		
P-값	0.2096	0.3686
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	14.29	7.623	48.9	45.05
SD	21.43	9.778	23.08	19.54
SEM	7.577	3.457	8.159	6.908

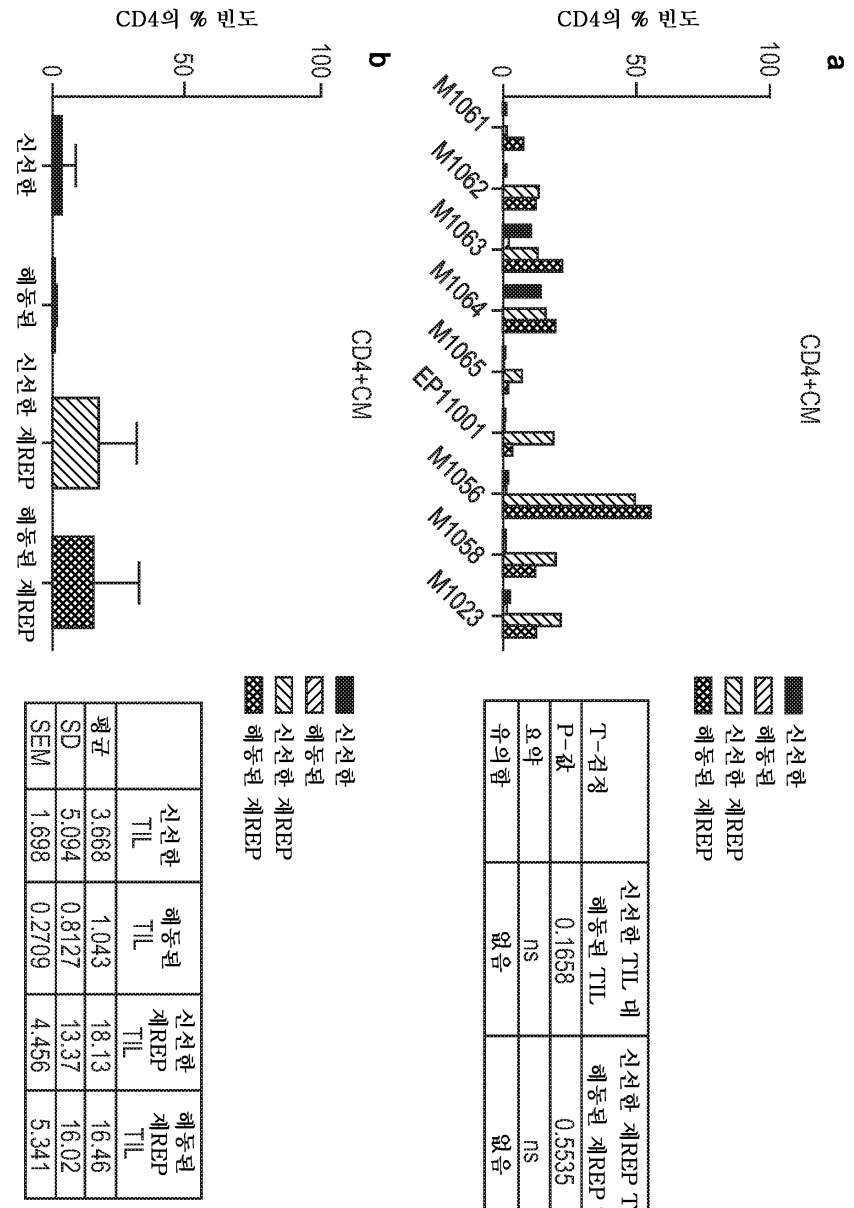
도면46



T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
P-값	0.6563	0.5484
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	34.03	31.88	67.47	65.03
SD	17.53	13.05	13.71	21.91
SEM	7.156	5.328	5.597	8.945

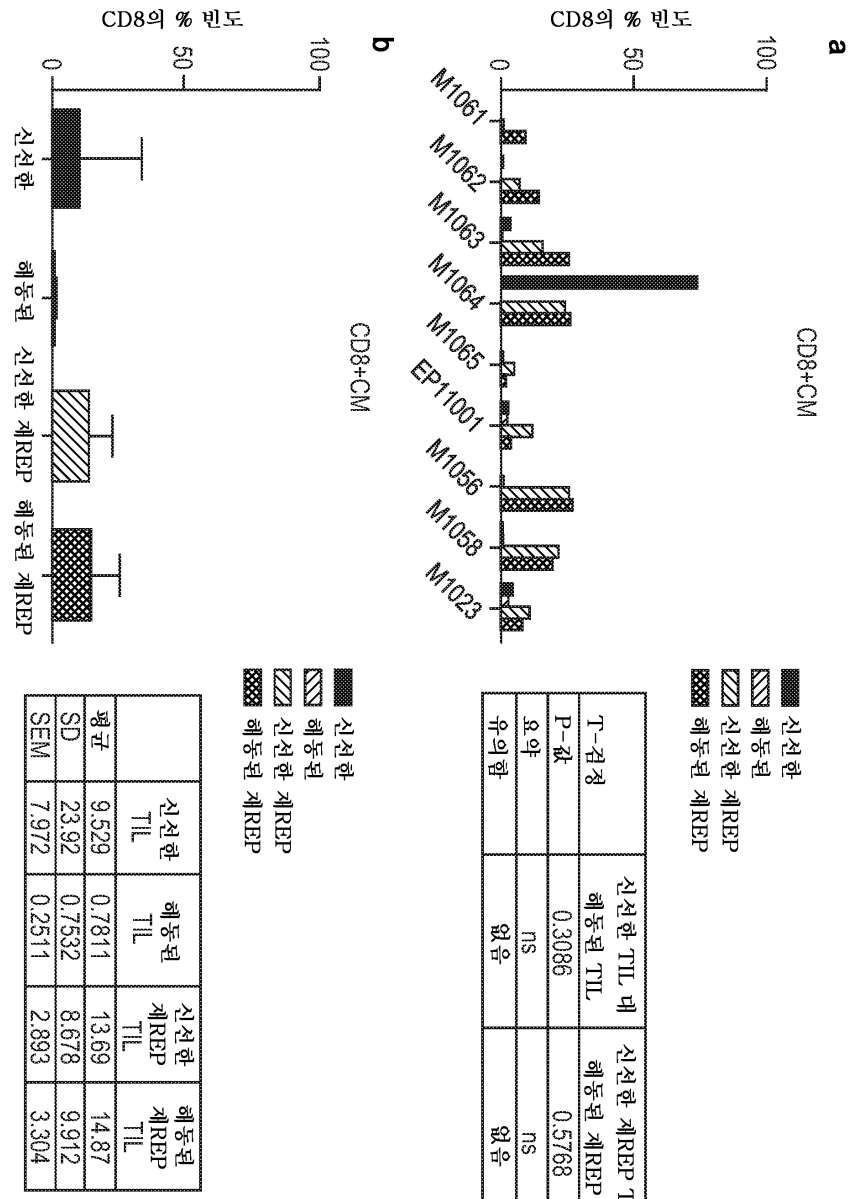
도면47



T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
P-값	0.1658	0.5535
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	3.668	1.043	18.13	16.46
SD	5.094	0.8127	13.37	16.02
SEM	1.698	0.2709	4.456	5.341

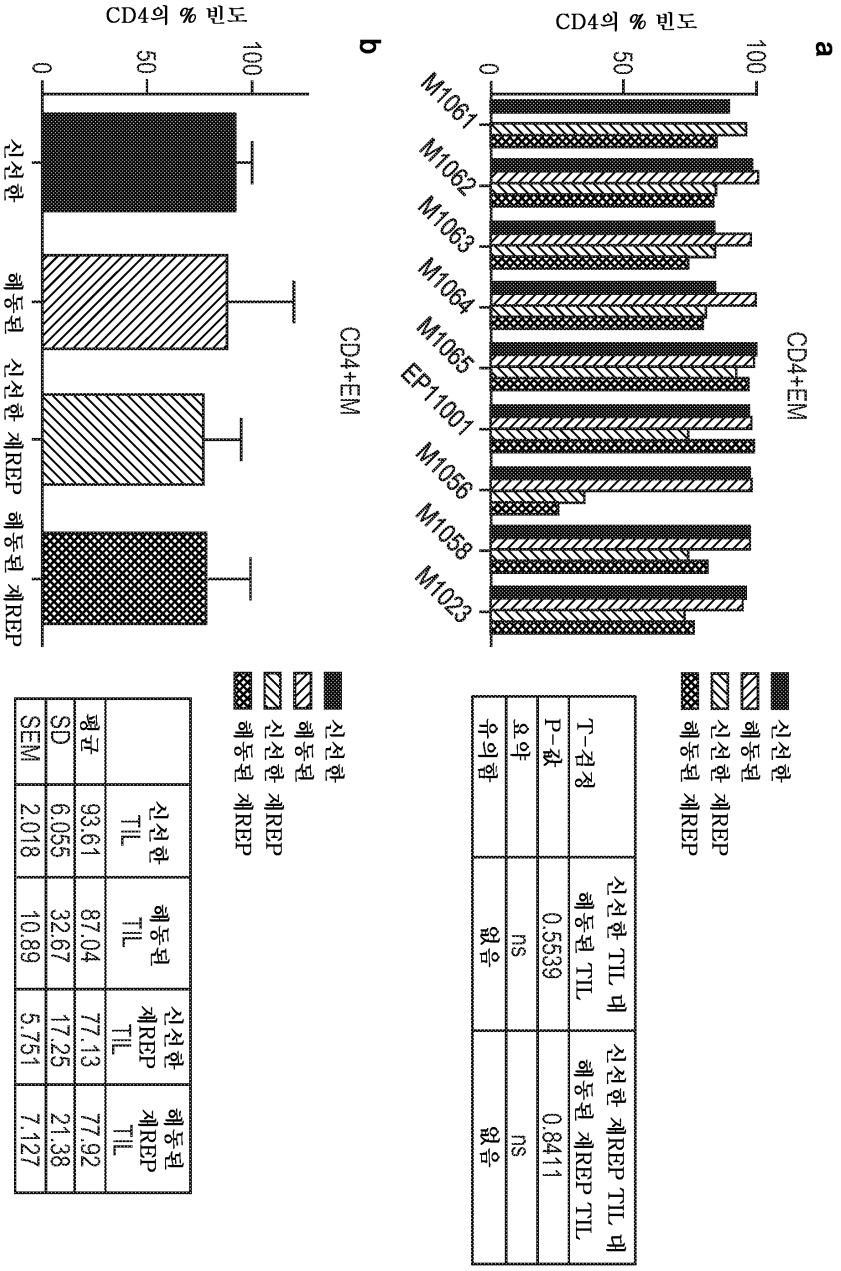
도면48



	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
T-검정		
P-값	0.3086	0.5768
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	9.529	0.7811	13.69	14.87
SD	23.92	0.7532	8.678	9.912
SEM	7.972	0.2511	2.893	3.304

도면49



T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
P-값	0.5539	0.8411
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

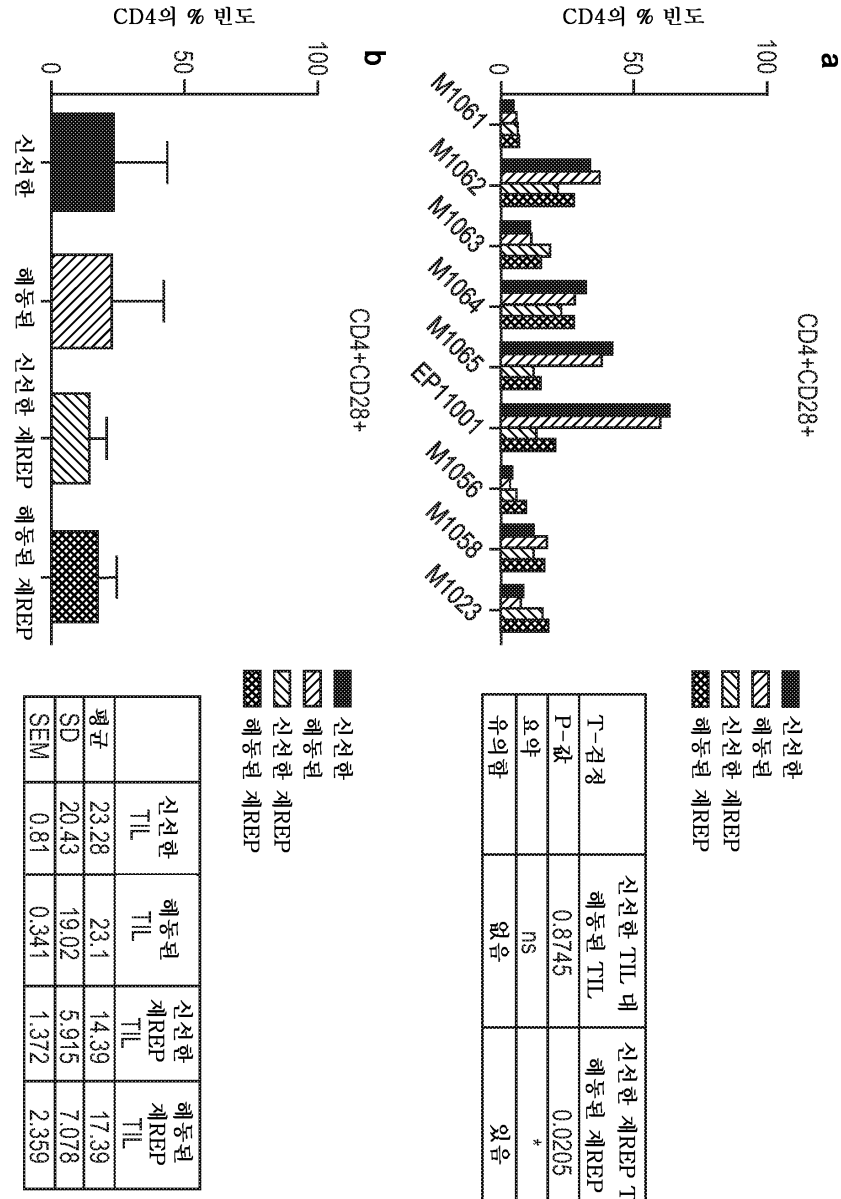
	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	93.61	87.04	77.13	77.92
SD	6.055	32.67	17.25	21.38
SEM	2.018	10.89	5.751	7.127

도면50

T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
P-값	0.9546	0.4107
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	84.94	85.77	83.77	81.93
SD	24.74	32.36	8.17	8.75
SEM	8.246	10.79	2.723	2.917

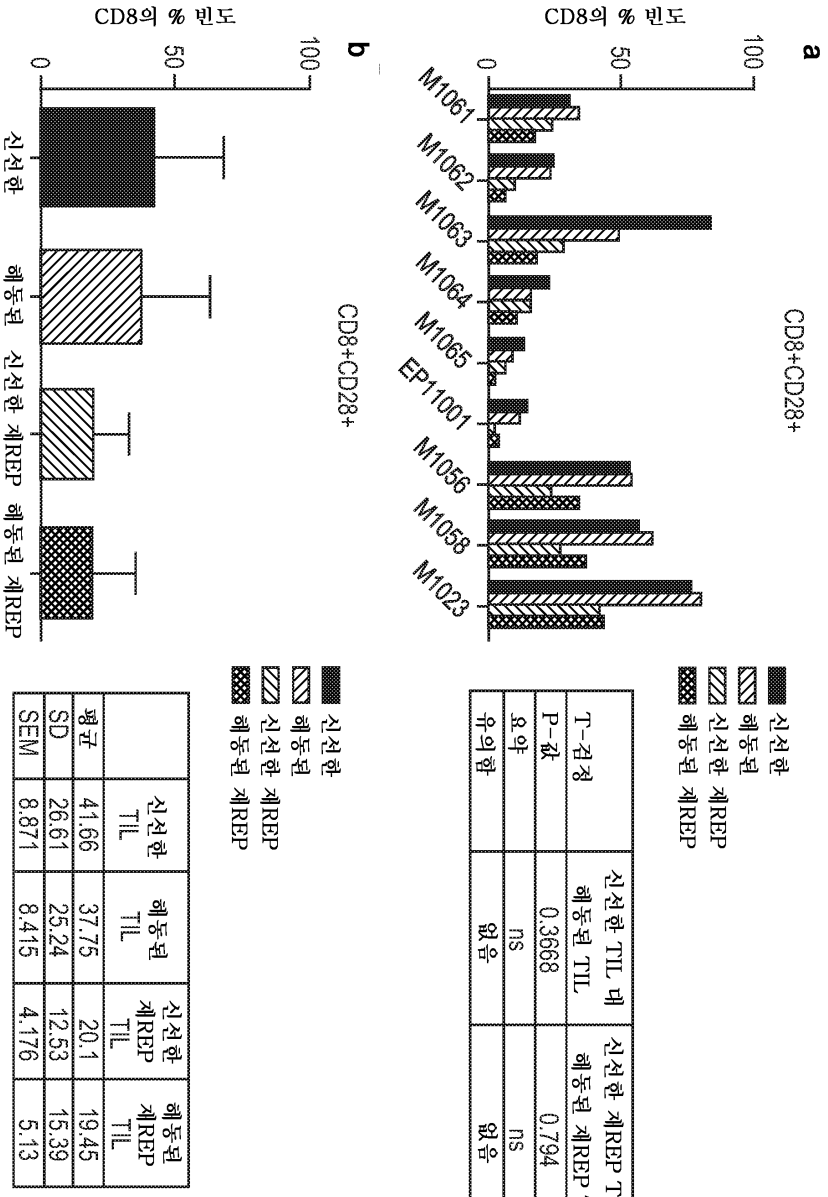
도면51



	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
T-검정		
P-값	0.8745	0.0205
요약	ns	*
유의함	없음	있음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	23.28	23.1	14.39	17.39
SD	20.43	19.02	5.915	7.078
SEM	0.81	0.341	1.372	2.359

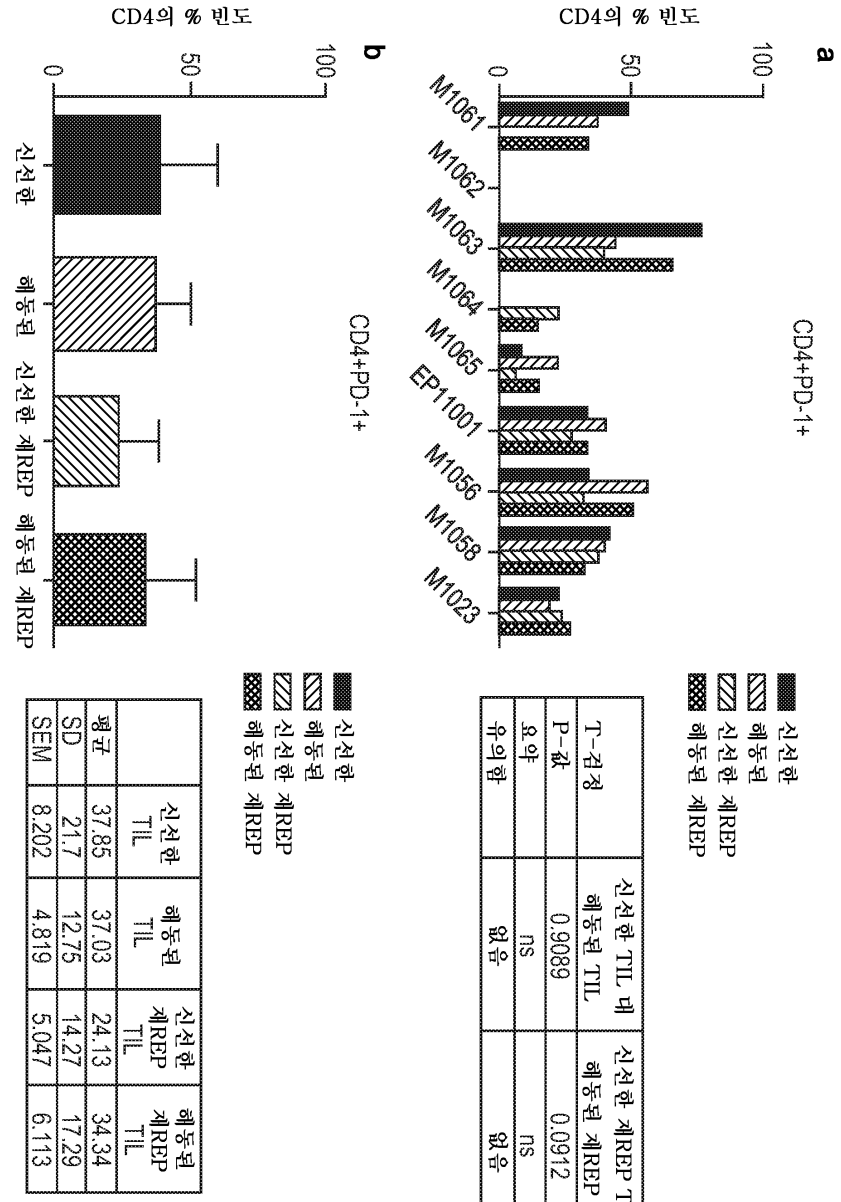
도면52



	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
T-검정		
P-값	0.3668	0.794
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	41.66	37.75	20.1	19.45
SD	26.61	25.24	12.53	15.39
SEM	8.871	8.415	4.176	5.13

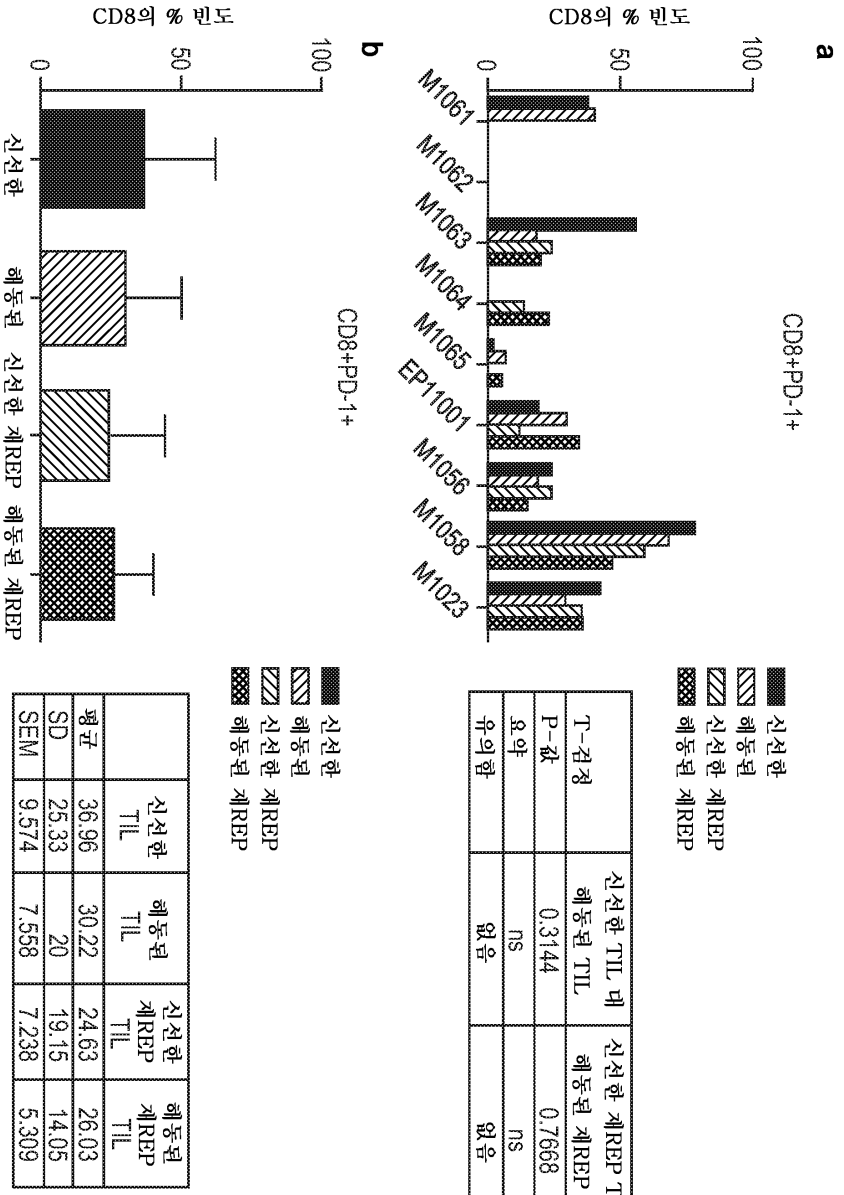
도면53



T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
P-값	0.9089	0.0912
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	37.85	37.03	24.13	34.34
SD	21.7	12.75	14.27	17.29
SEM	8.202	4.819	5.047	6.113

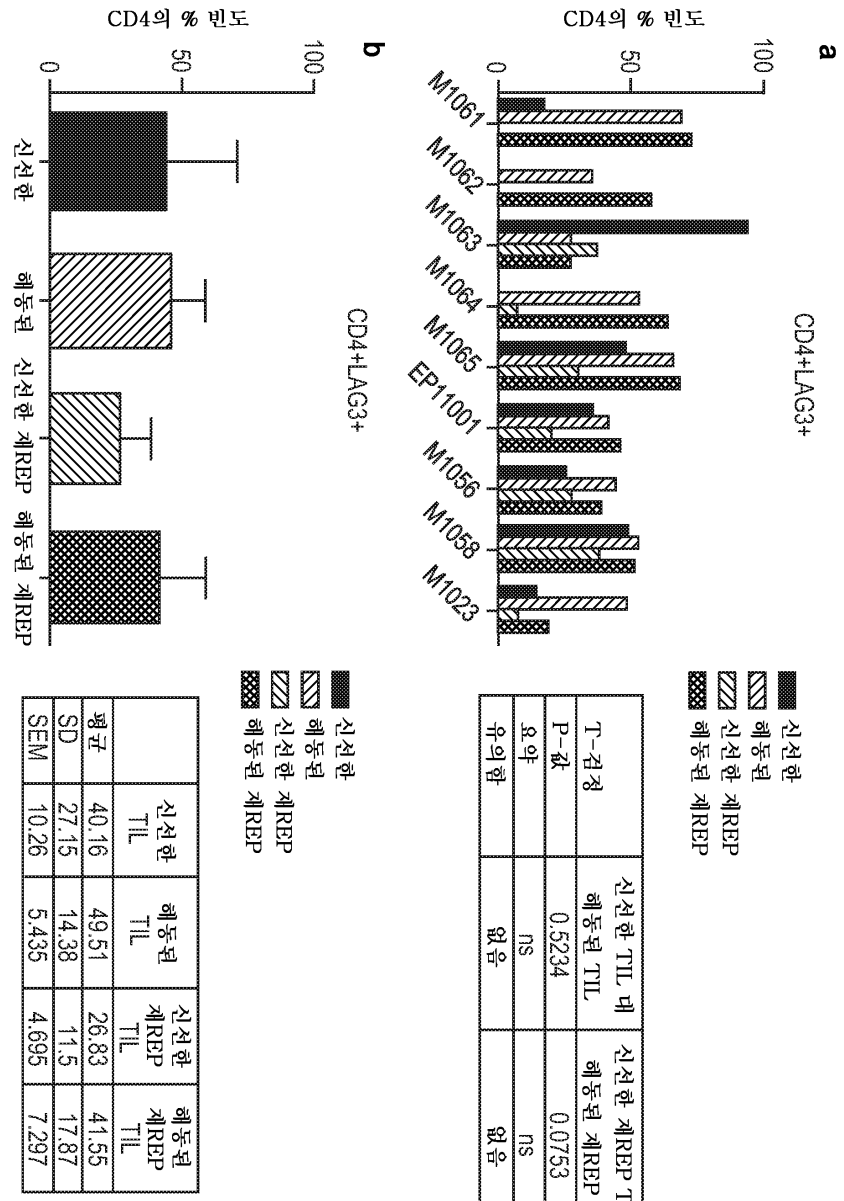
도면54



	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
T-검정		
P-값	0.3144	0.7668
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	36.96	30.22	24.63	26.03
SD	25.33	20	19.15	14.05
SEM	9.574	7.558	7.238	5.309

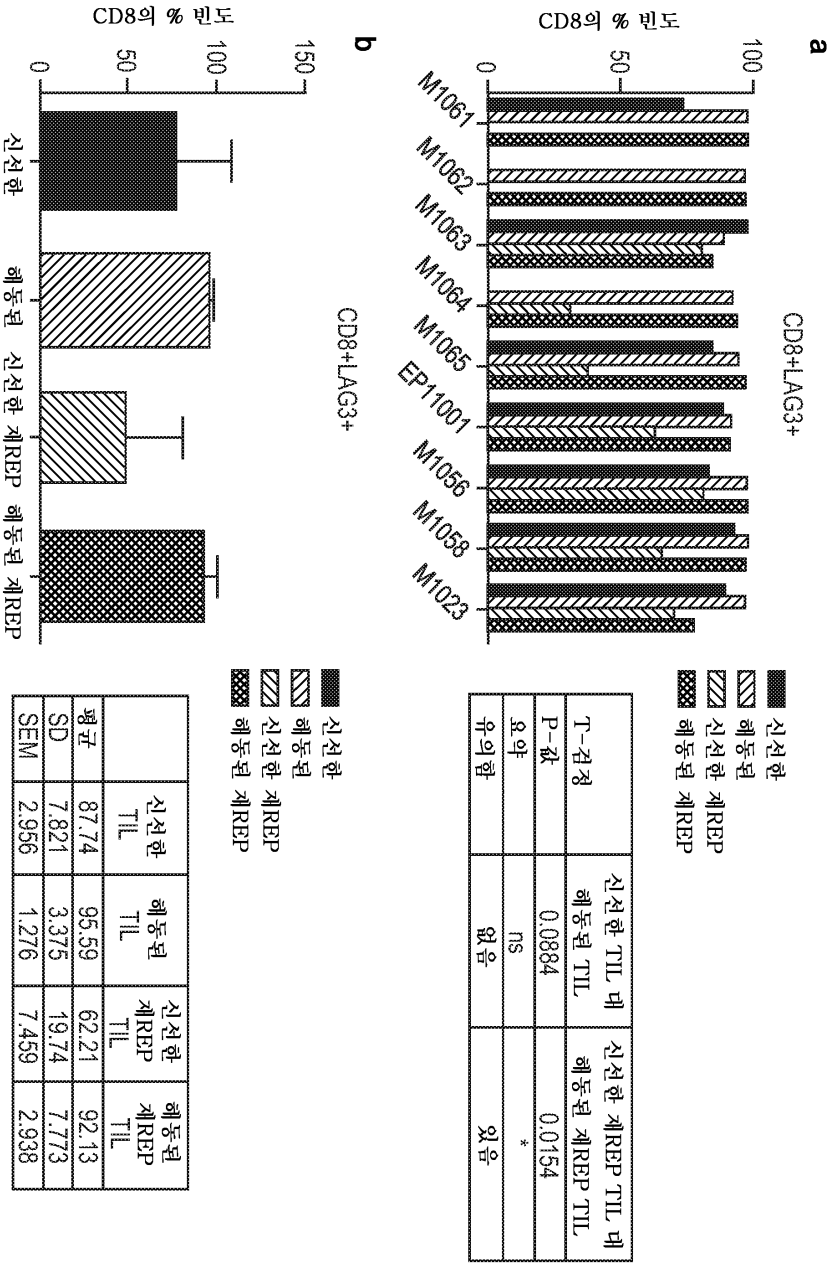
도면55



T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 재REP TIL 대 해동된 재REP TIL
P-값	0.5234	0.0753
요약	ns	ns
유의한	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 재REP TIL	해동된 재REP TIL
평균	40.16	49.51	26.83	41.55
SD	27.15	14.38	11.5	17.87
SEM	10.26	5.435	4.695	7.297

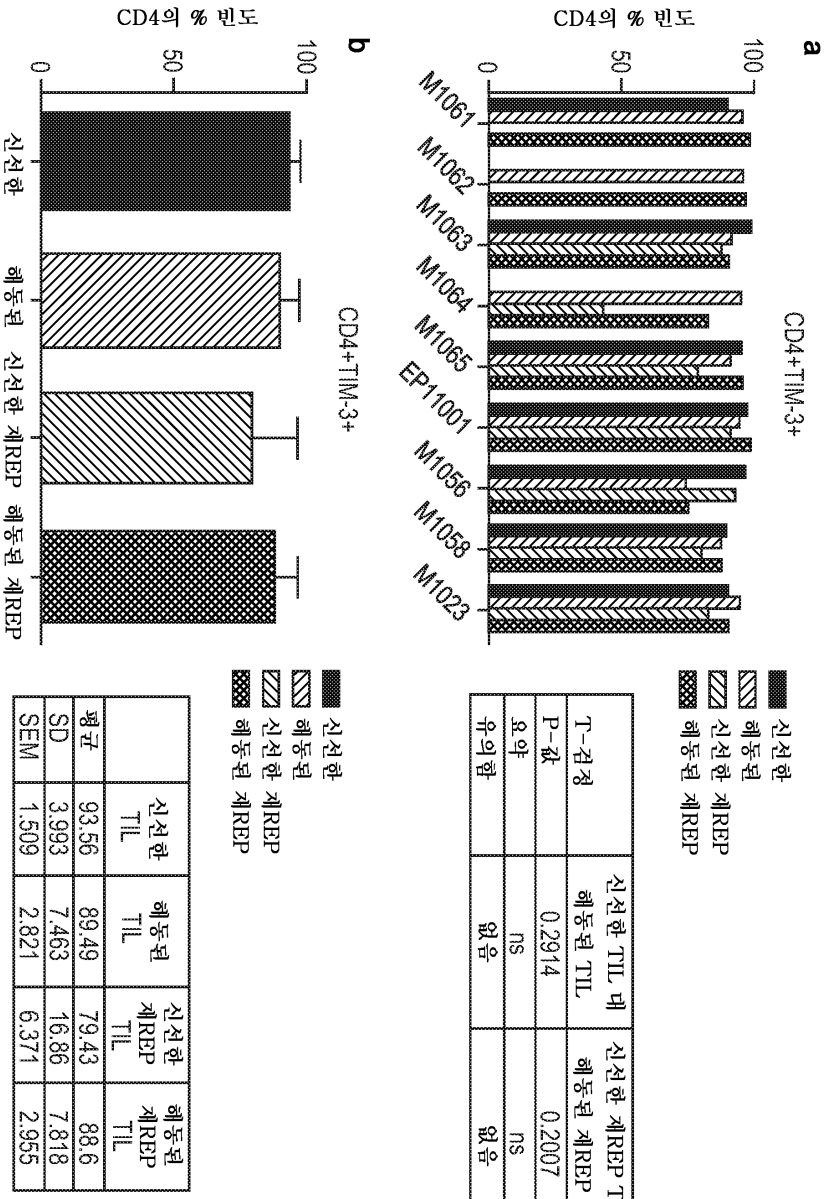
도면56



T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
P-값	0.0884	0.0154
요약	ns	*
유의함	없음	있음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	87.74	95.59	62.21	92.13
SD	7.821	3.375	19.74	7.773
SEM	2.956	1.276	7.459	2.938

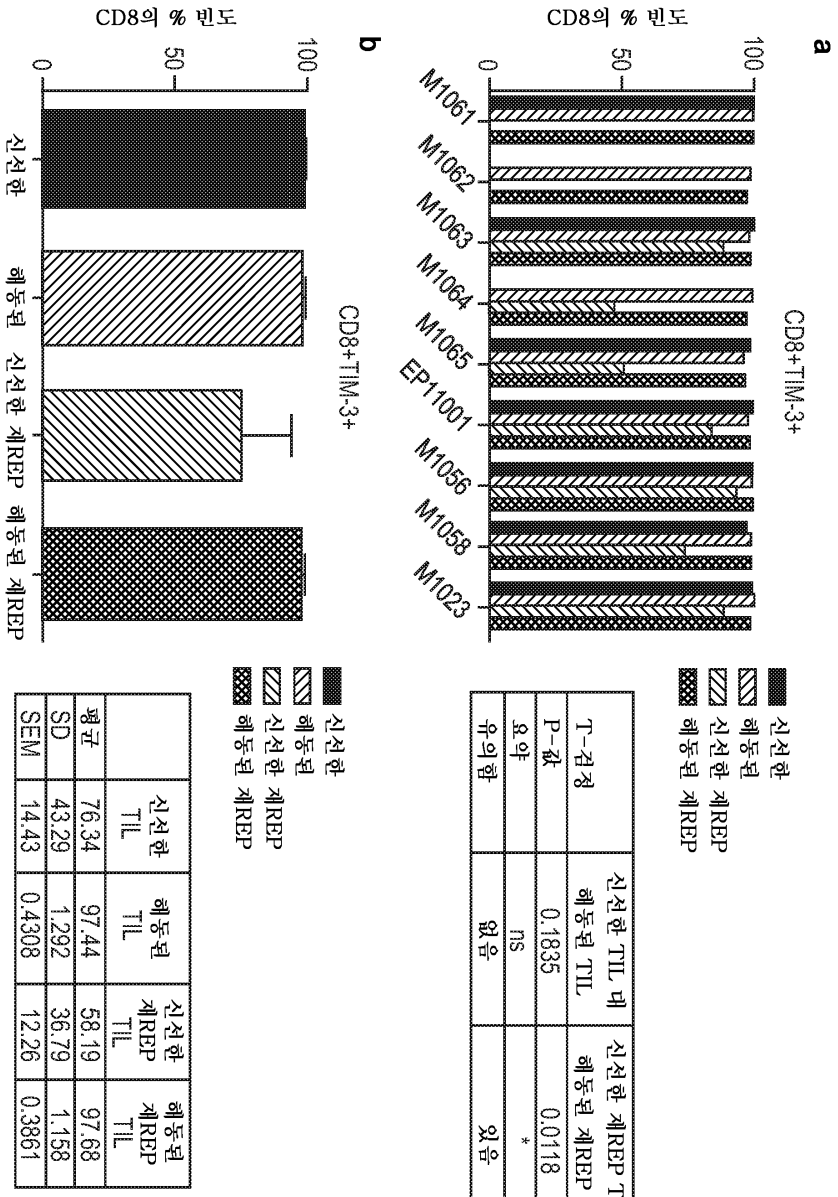
도면57



T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL
P-값	0.2914	0.2007
요약	ns	ns
유의함	없음	없음

	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 제REP TIL	해동된 제REP TIL
평균	93.56	89.49	79.43	88.6
SD	3.993	7.463	16.86	7.818
SEM	1.509	2.821	6.371	2.955

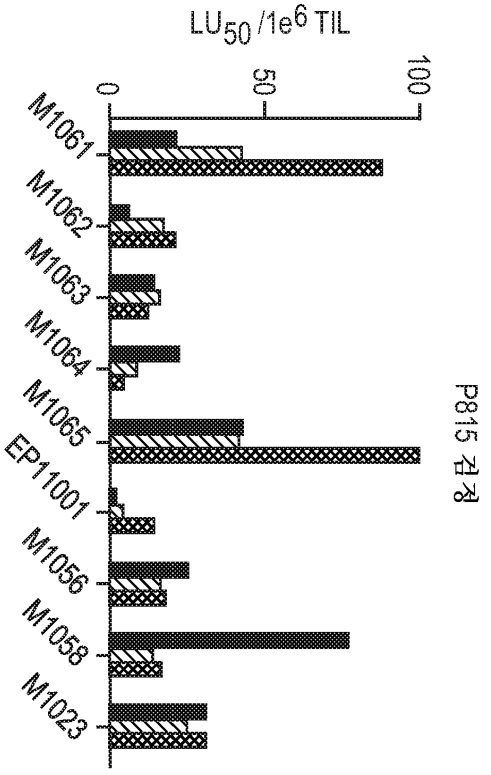
도면58



T-검정	신선한 TIL 대 해동된 TIL	신선한 재REP TIL 대 해동된 재REP TIL
P-값	0.1835	0.0118
요약	ns	*
유의함	없음	있음

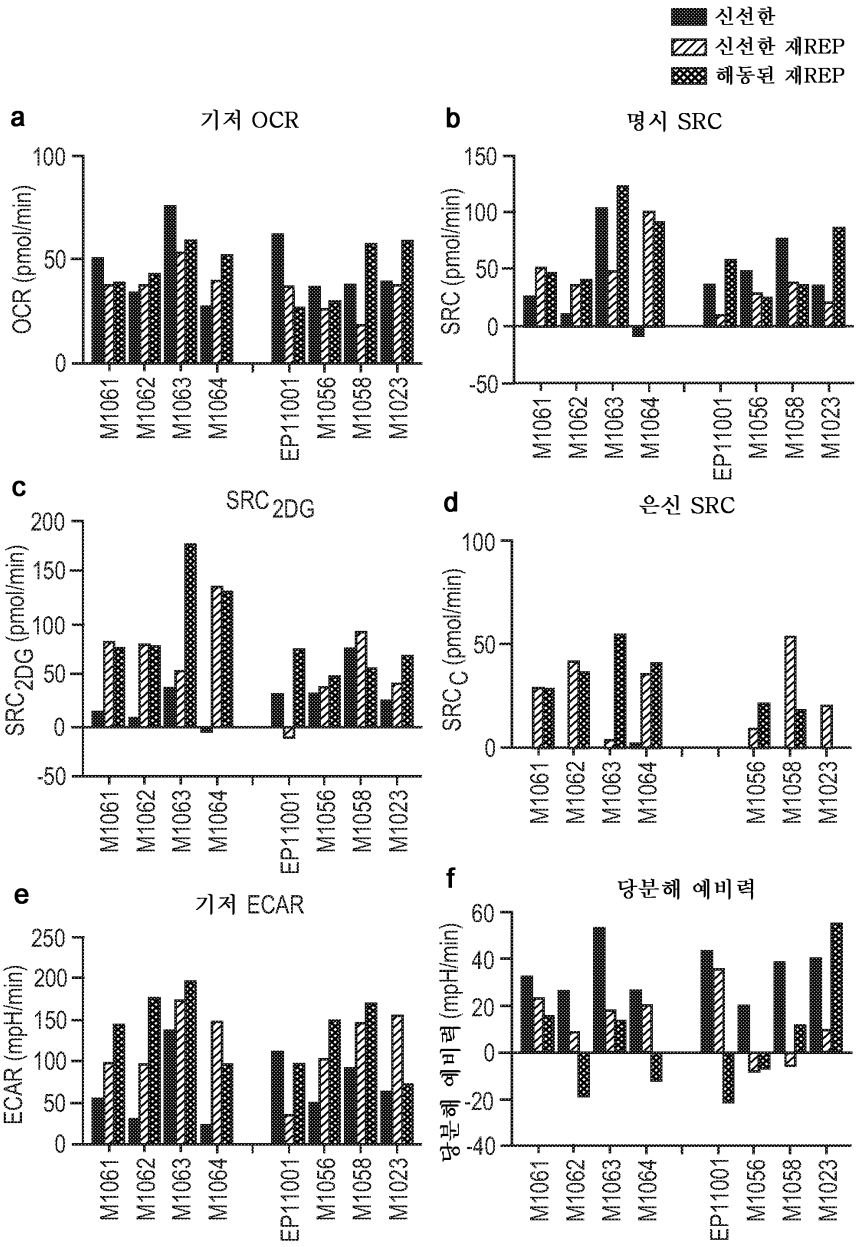
	신선한 TIL	해동된 TIL	신선한 재REP TIL	해동된 재REP TIL
평균	76.34	97.44	58.19	97.68
SD	43.29	1.292	36.79	1.158
SEM	14.43	0.4308	12.26	0.3861

도면59



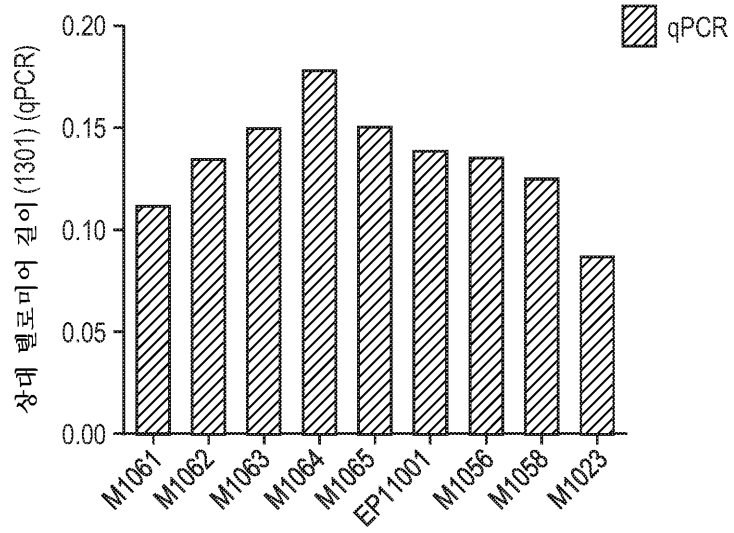
신선한 제REP TIL 대 해동된 제REP TIL	
T-검정	
P-값	0.3126
요약	ns
유의함	없음

도면60

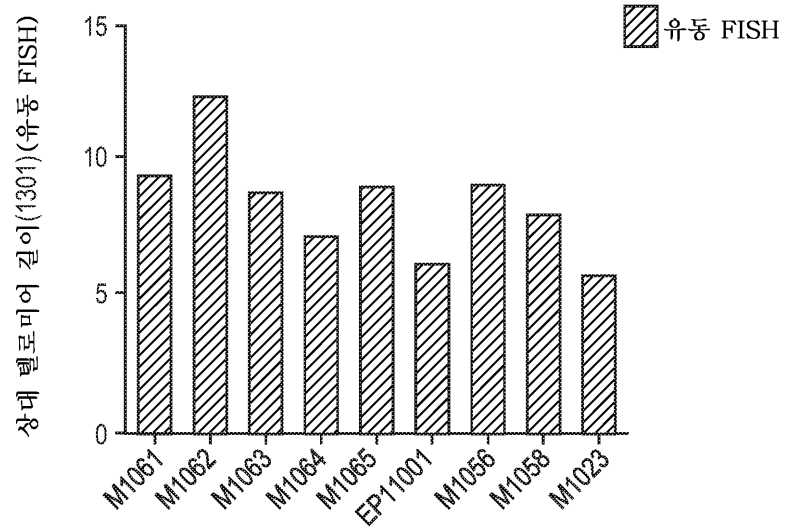

신선한
신선한 재REP
해동된 재REP
a
기저 OCR
OCR (pmol/min)
b
명시 SRC
SRC (pmol/min)
c
SRC2DG
SRC2DG (pmol/min)
d
은신 SRC
SRCC (pmol/min)
e
기저 ECAR
ECAR (mpH/min)
f
당분해 예비력
당분해 예비력 (mpH/min)
M1061
M1062
M1063
M1064
EP11001
M1056
M1058
M1023

도면61

a

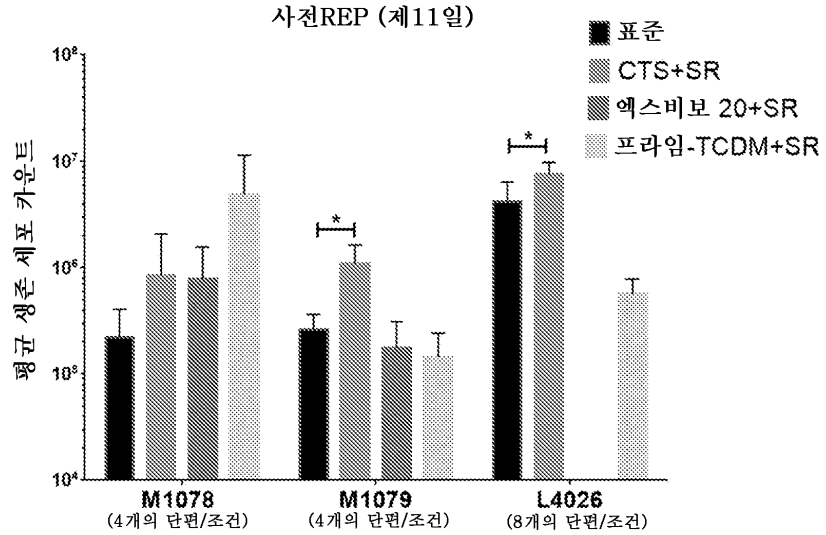

qPCR
상대 텔로미어 길이 (1301) (qPCR)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
M1061
M1062
M1063
M1064
M1065
EP11001
M1056
M1058
M1023

b

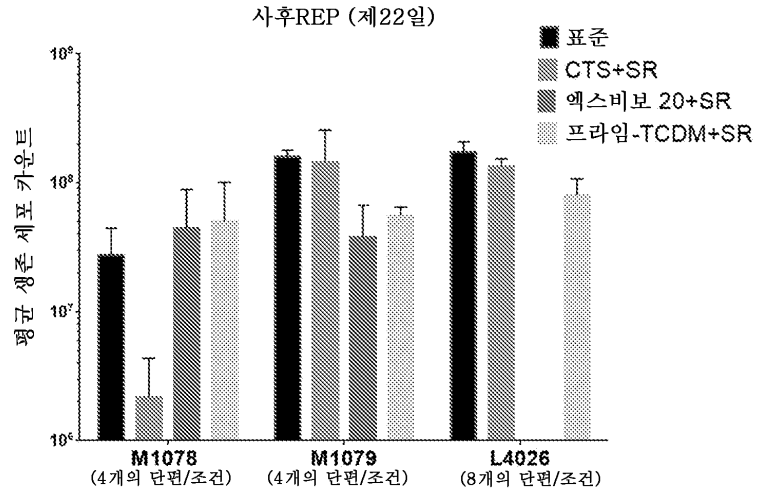

유동 FISH
상대 텔로미어 길이(1301)(유동 FISH)
15
10
5
0
M1061
M1062
M1063
M1064
M1065
EP11001
M1056
M1058
M1023

도면62

a

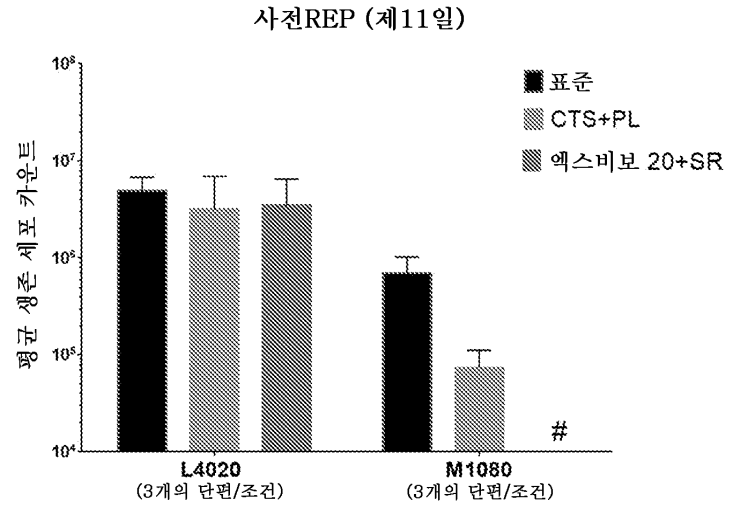

사전REP (제11일)
표준
CTS+SR
엑스비보 20+SR
프라임-TCDM+SR
평균 생존 세포 카운트
M1078
(4개의 단편/조건)
M1079
(4개의 단편/조건)
L4026
(8개의 단편/조건)

b

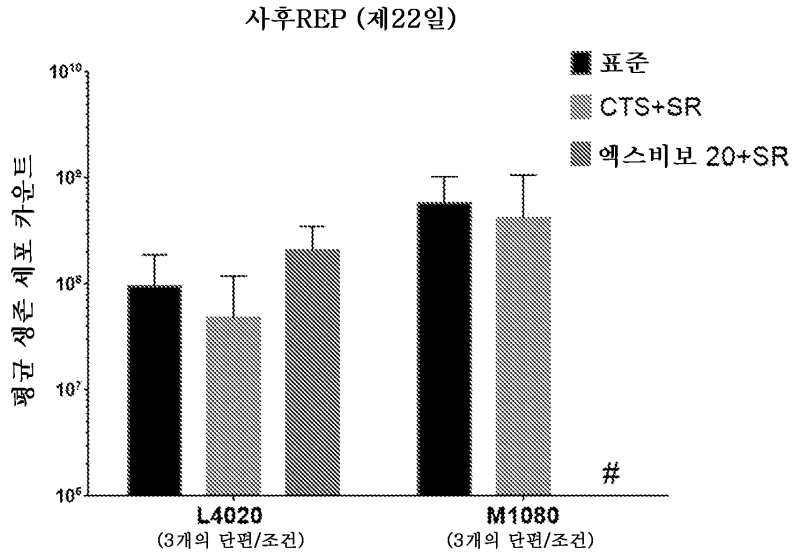

사후REP (제22일)
표준
CTS+SR
엑스비보 20+SR
프라임-TCDM+SR
평균 생존 세포 카운트
M1078
(4개의 단편/조건)
M1079
(4개의 단편/조건)
L4026
(8개의 단편/조건)

도면63

a

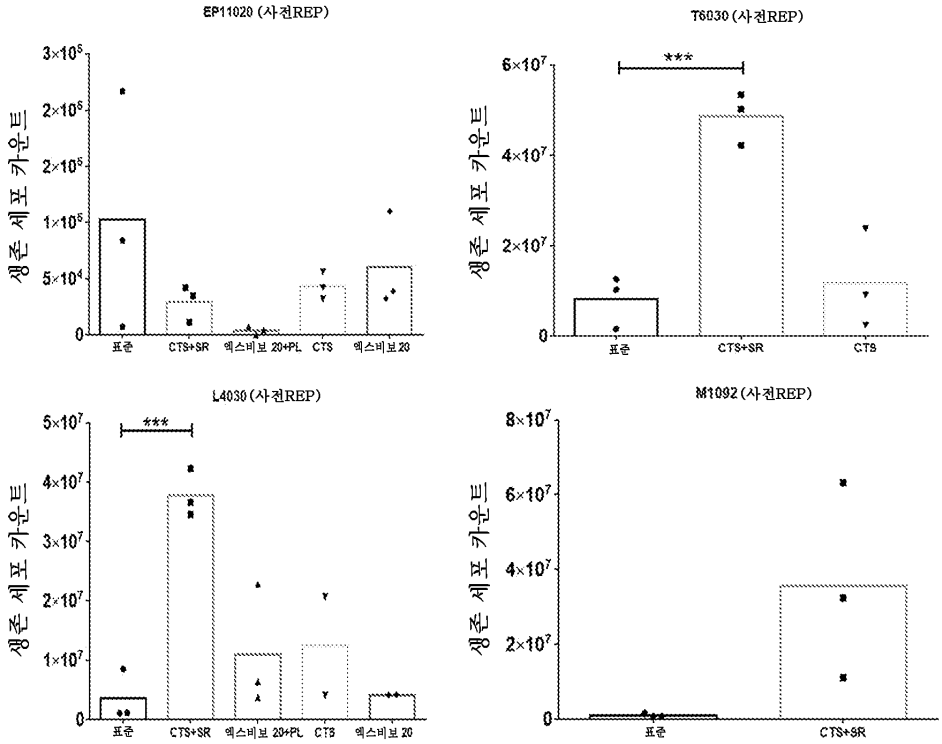

사전REP (제11일)
표준
CTS+PL
엑스비보 20+SR
평균 생존 세포 카운트
#
L4020
(3개의 단편/조건)
M1080
(3개의 단편/조건)

b


사후REP (제22일)
표준
CTS+SR
엑스비보 20+SR
평균 생존 세포 카운트
#
L4020
(3개의 단편/조건)
M1080
(3개의 단편/조건)

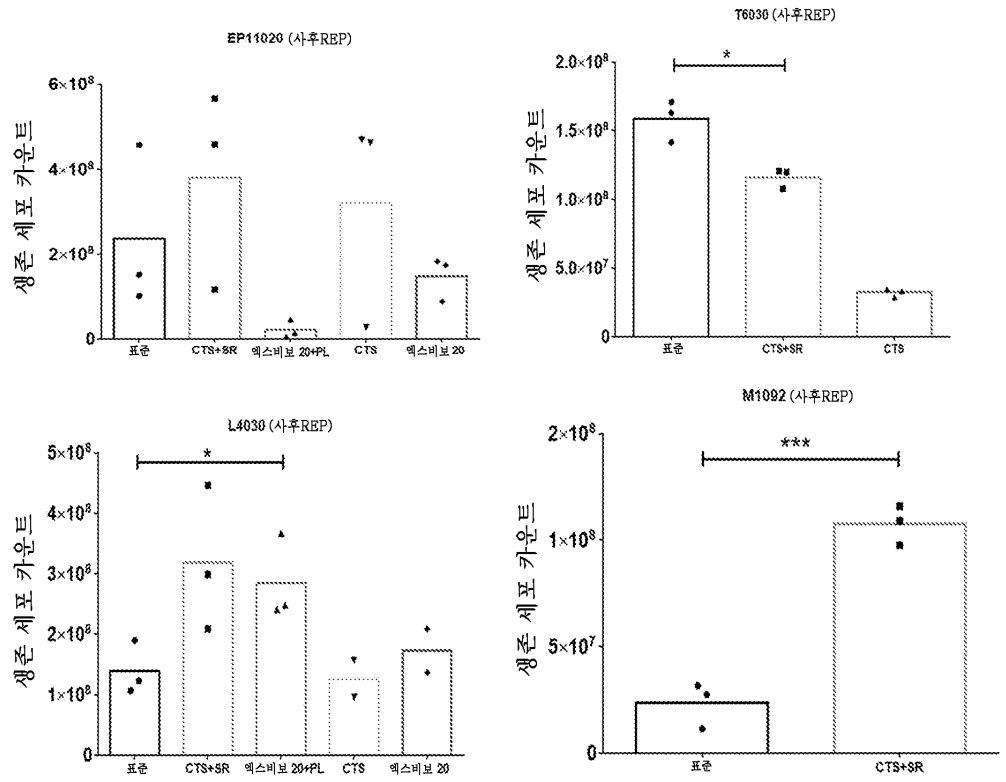
도면64i

a


EP11020 (사전REP)
생존 세포 카운트
표준
CTS+SR
엑스비보 20+PL
CTS
엑스비보20
T6030 (사전REP)
***
L4030 (사전REP)
M1092 (사전REP)

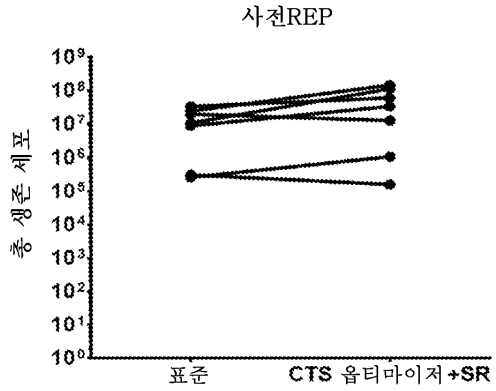
도면64ii

b

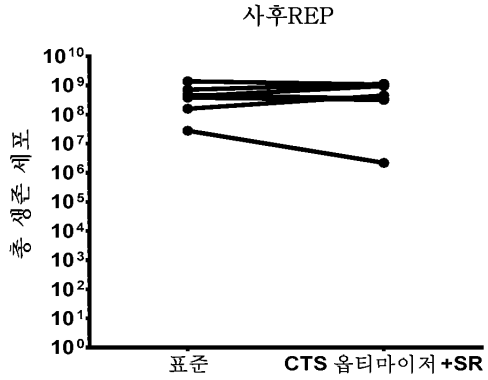

EP11020 (사후REP)
생존 세포 카운트
6×10^8
4×10^8
2×10^8
0
표준
CTS+SR
엑스비보 20+PL
CTS
엑스비보 20
T6030 (사후REP)
*
2.0×10^8
1.5×10^8
1.0×10^8
5.0×10^7
0
표준
CTS+SR
CTS
L4030 (사후REP)
*
5×10^8
4×10^8
3×10^8
2×10^8
1×10^8
0
표준
CTS+SR
엑스비보 20+PL
CTS
엑스비보 20
M1092 (사후REP)
***
2×10^8
1×10^8
5×10^7
0
표준
CTS+SR

도면65i

a



b

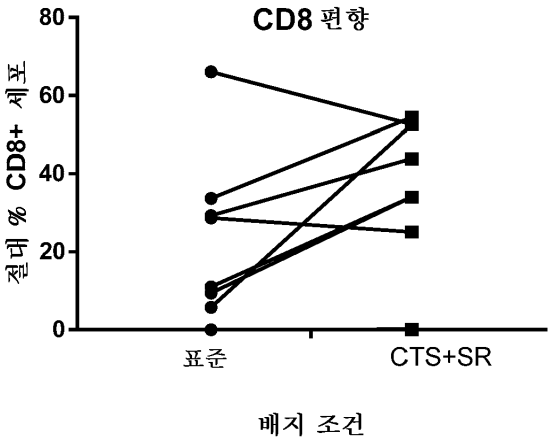


도면65ii

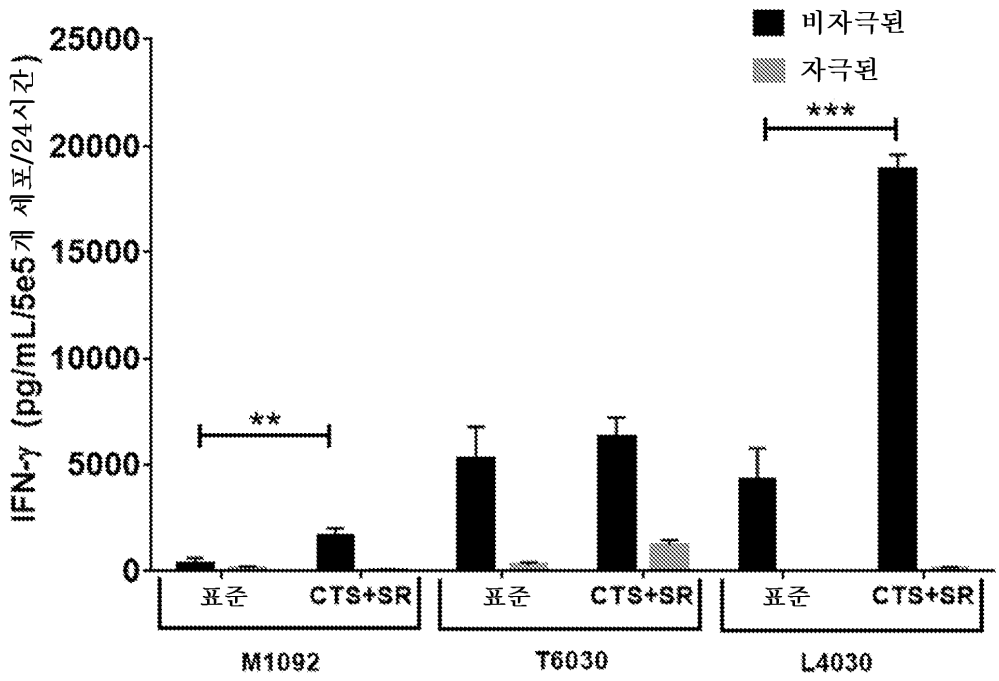
c

	사전-REP 세포 카운트		사후-REP 세포 카운트	
	표준	CTS 옵티마이저 +SR	표준	CTS 옵티마이저 +SR
M1078	8.82E+07	3.38E+08	3.46E+09	2.73E+08
M1079	2.60E+06	1.09E+07	1.99E+10	5.61E+10
M1080				
L4020	1.98E+08	1.27E+08	4.75E+10	3.99E+10
L4026	1.68E+08	3.02E+08	8.63E+10	6.69E+10
L4030	7.05E+07	7.48E+08	2.63E+10	5.96E+10
EP11020	2.04E+06	1.06E+06	4.44E+10	7.14E+10
T6030	1.61E+08	9.64E+08	2.98E+10	2.18E+10
M1092	2.00E+07	7.05E+08	4.41E+09	2.02E+10

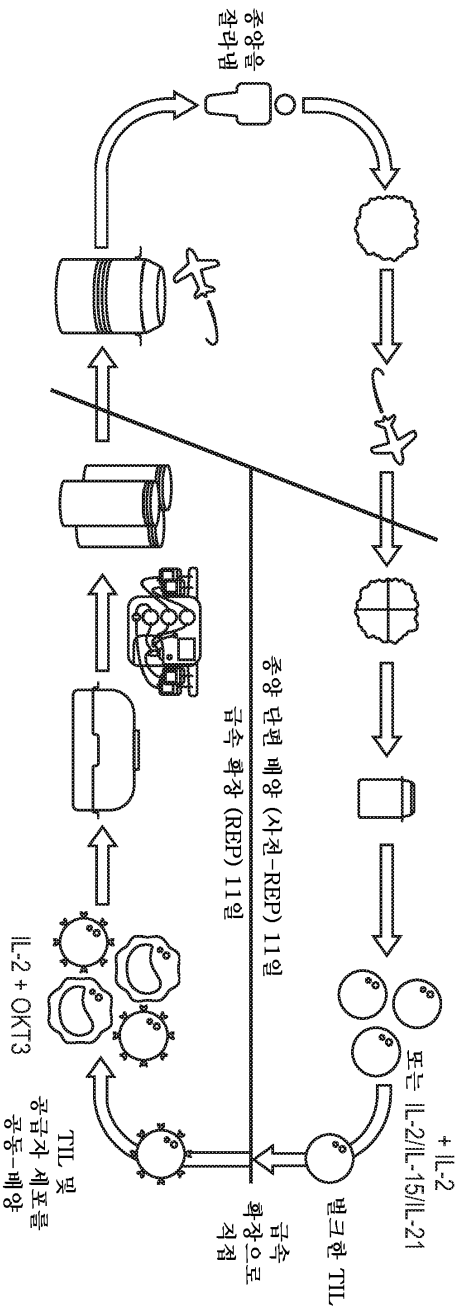
도면66


CD8 편향
절대 % CD8+ 세포
80
60
40
20
0
표준
CTS+SR
배지 조건

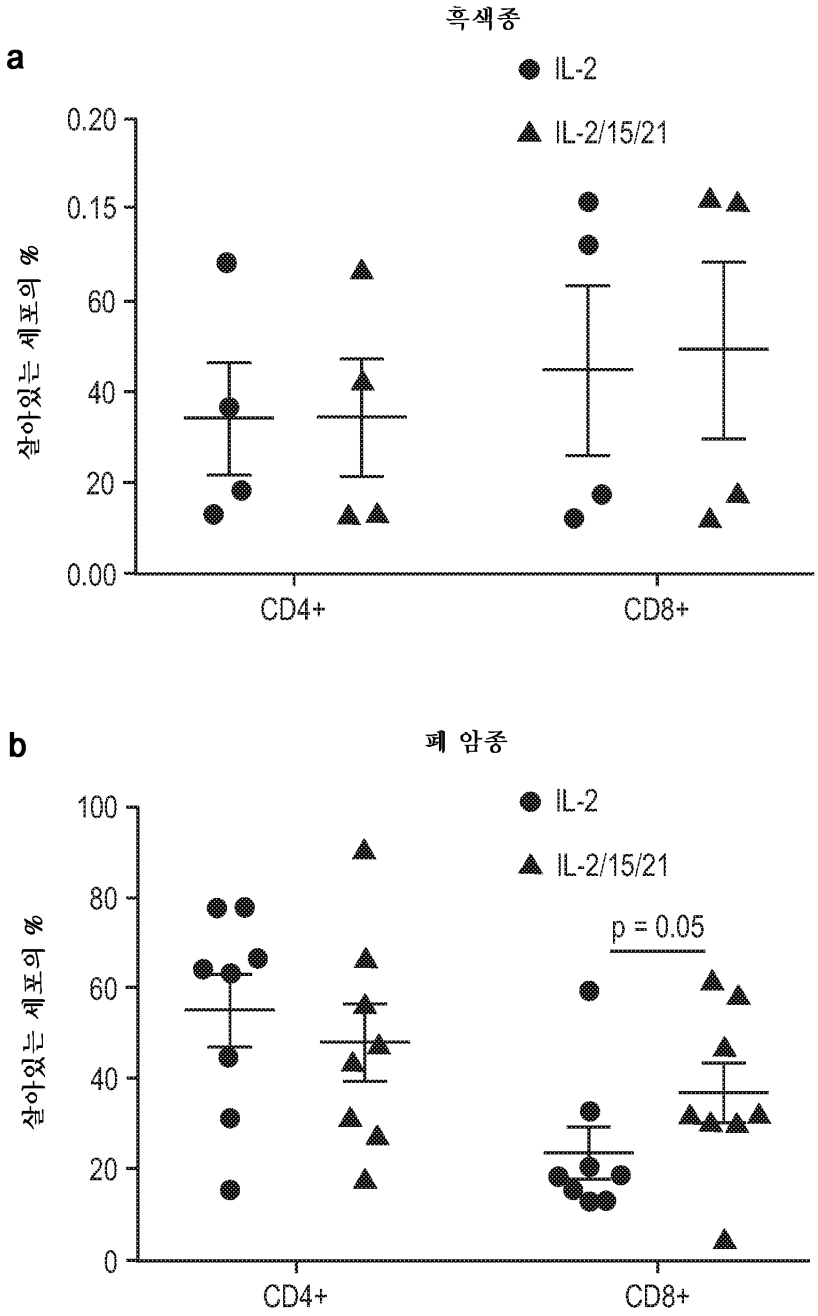
도면67


비자극된
자극된
***
**
IFN-γ (pg/mL/5e5개 세포/24시간)
25000
20000
15000
10000
5000
0
표준
CTS+SR
표준
CTS+SR
표준
CTS+SR
M1092
T6030
L4030

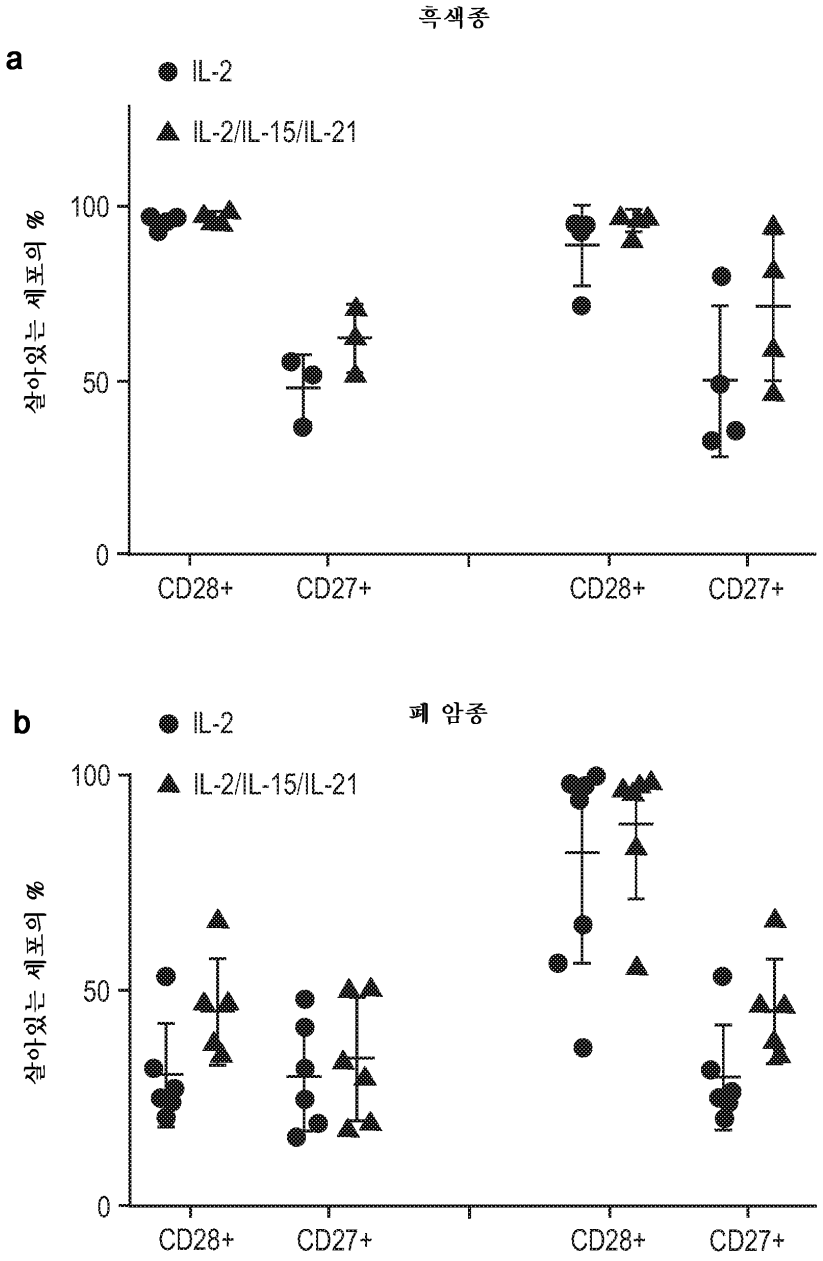
도면68


종양을
잘라냄
+ IL-2
또는 IL-2/IL-15/IL-21
벌크한 TIL
급속
확장으로
직접
종양 단편 배양 (사전-REP) 11일
급속 확장 (REP) 11일
TIL 및
공급자 세포를
공동-배양
IL-2 + OKT3

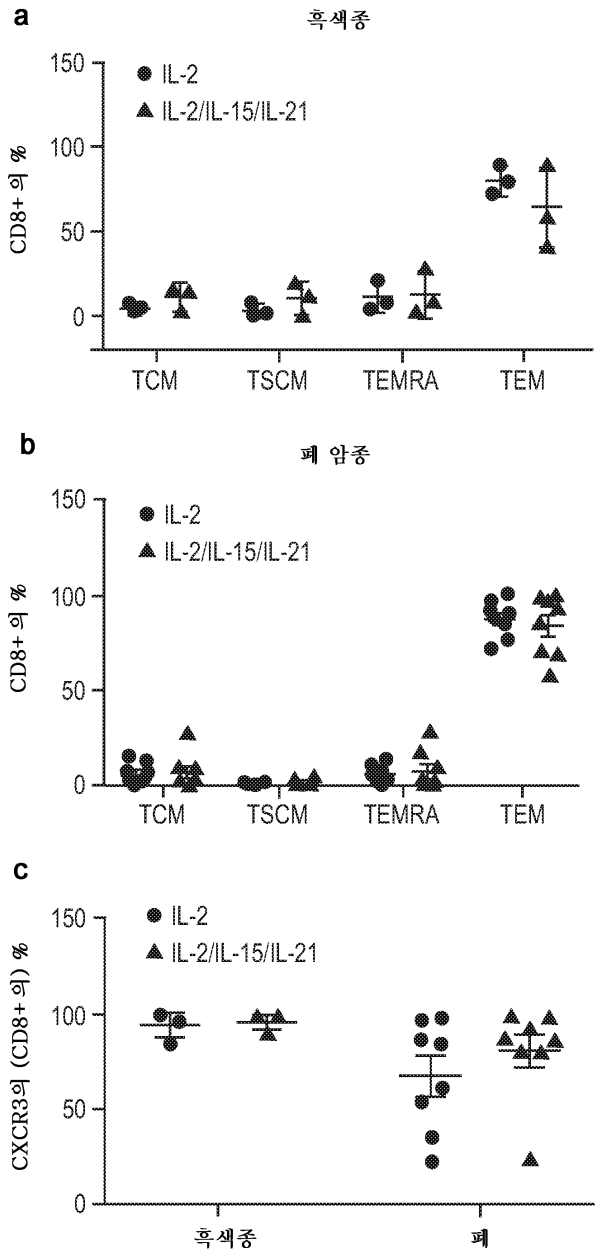
도면69


a
흑색종
IL-2
IL-2/15/21
살아있는 세포의 %
0.20
0.15
60
40
20
0.00
CD4+
CD8+
b
폐 암종
IL-2
IL-2/15/21
p = 0.05
살아있는 세포의 %
100
80
60
40
20
0
CD4+
CD8+

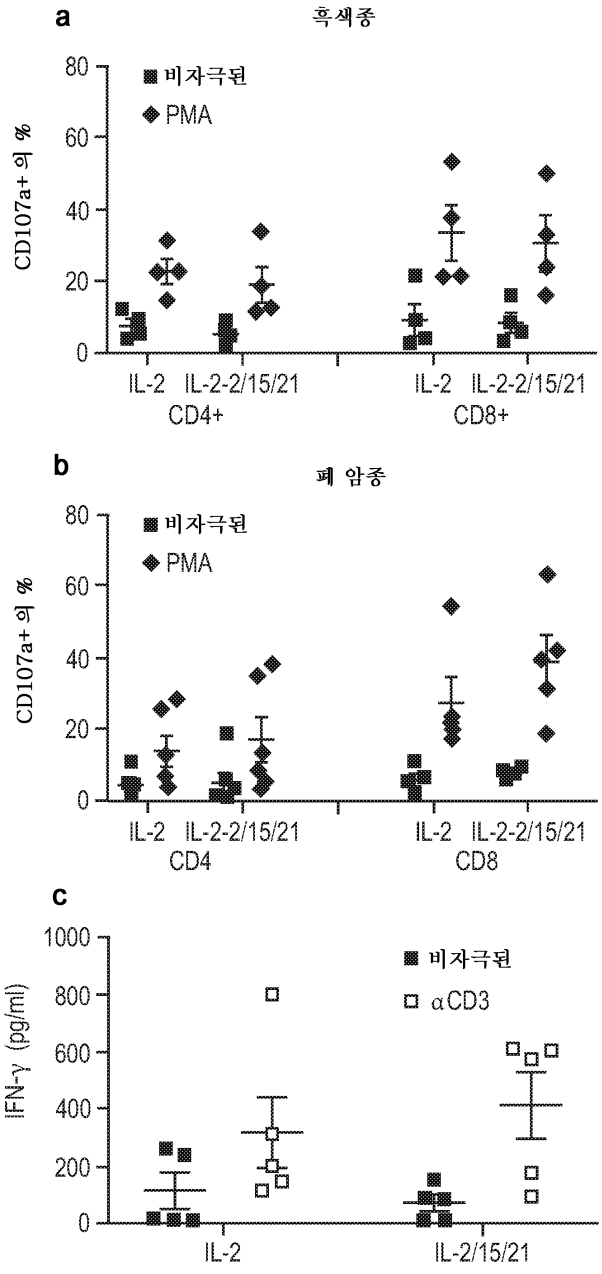
도면70


흑색종
a
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21
살아있는 세포의 %
100
50
0
CD28+
CD27+
CD28+
CD27+
b
폐 암종
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21
살아있는 세포의 %
100
50
0
CD28+
CD27+
CD28+
CD27+

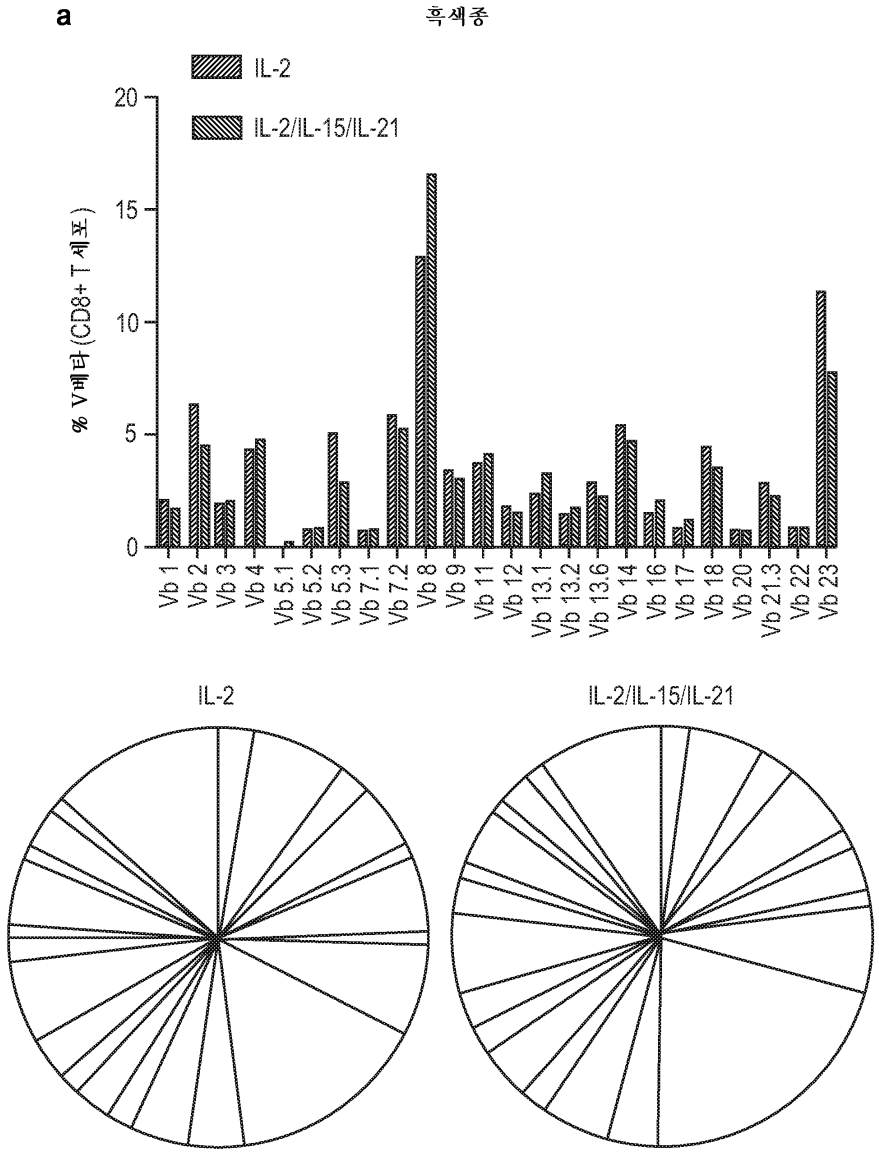
도면71


a
흑색종
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21
CD8+ 의 %
150
100
50
0
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
b
폐 암종
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21
CD8+ 의 %
150
100
50
0
TCM
TSCM
TEMRA
TEM
c
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21
CXCR3의 (CD8+ 의) %
150
100
50
0
흑색종
폐

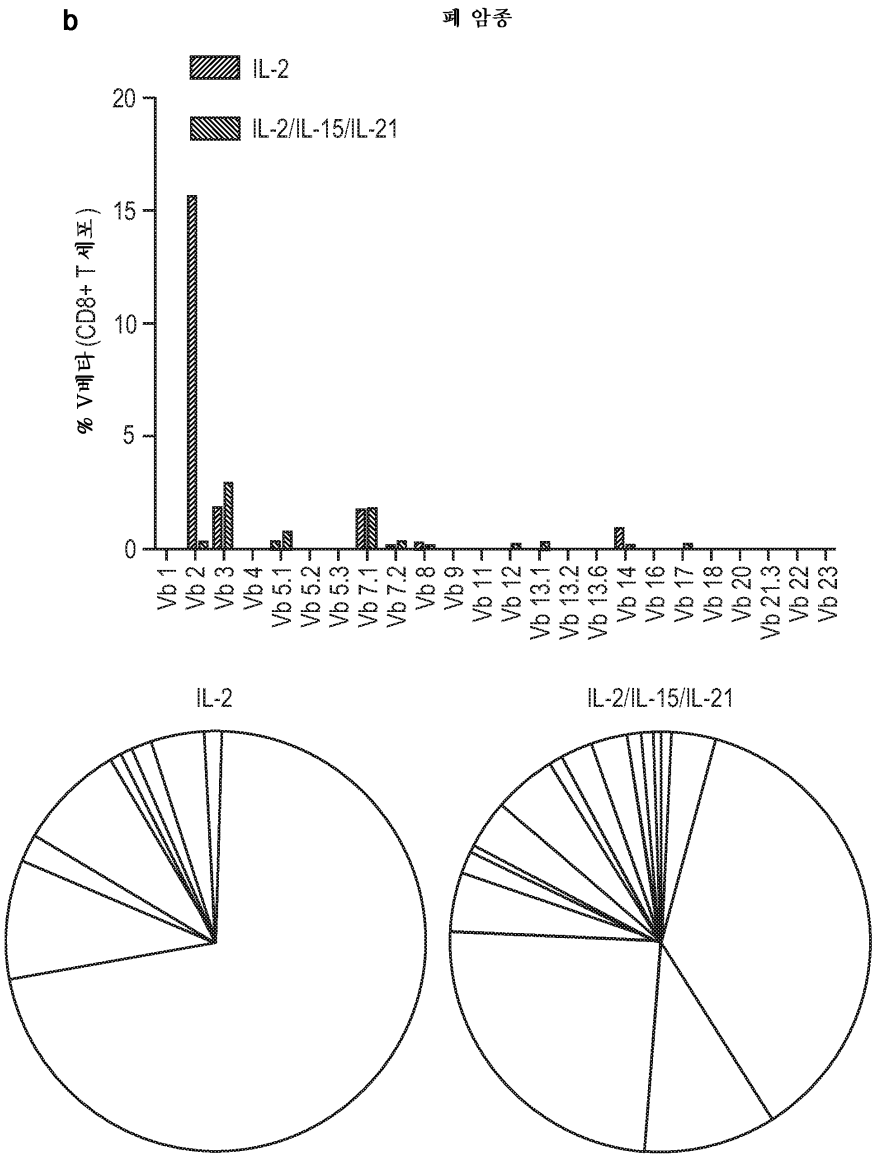
도면72


a
흑색종
비자극된
PMA
CD107a+ 의 %
80
60
40
20
0
IL-2
IL-2-2/15/21
CD4+
CD8+
b
폐 암종
비자극된
PMA
CD107a+ 의 %
CD4
CD8
c
비자극된
αCD3
IFN-γ (pg/ml)
1000
800
600
400
200
0
IL-2
IL-2/15/21

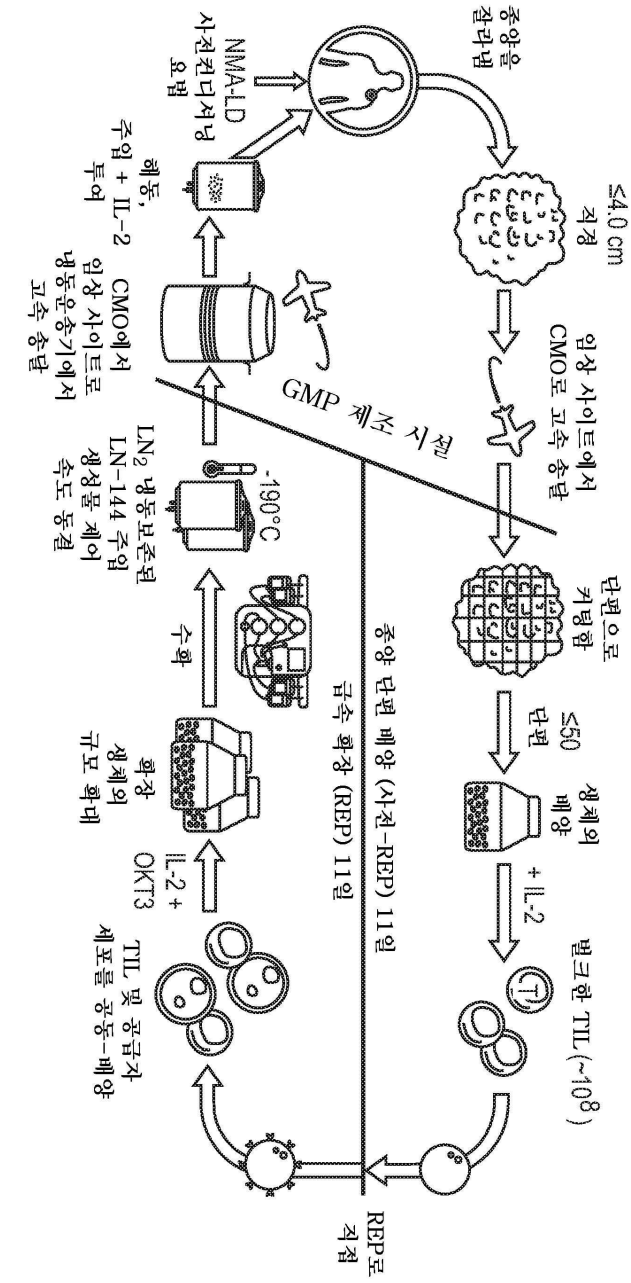
도면73i


a
흑색종
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21
% V베타 (CD8+ T 세포)
20
15
10
5
0
Vb 1
Vb 2
Vb 3
Vb 4
Vb 5.1
Vb 5.2
Vb 5.3
Vb 7.1
Vb 7.2
Vb 8
Vb 9
Vb 11
Vb 12
Vb 13.1
Vb 13.2
Vb 13.6
Vb 14
Vb 16
Vb 17
Vb 18
Vb 20
Vb 21.3
Vb 22
Vb 23
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21

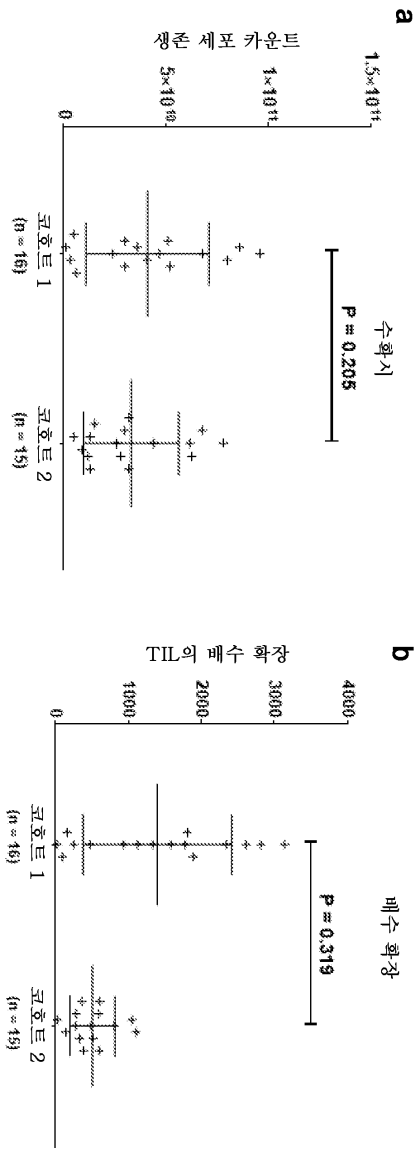
도면73ii


b
폐 암종
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21
% V베타 (CD8+ T 세포)
20
15
10
5
0
Vb 1
Vb 2
Vb 3
Vb 4
Vb 5.1
Vb 5.2
Vb 5.3
Vb 7.1
Vb 7.2
Vb 8
Vb 9
Vb 11
Vb 12
Vb 13.1
Vb 13.2
Vb 13.6
Vb 14
Vb 16
Vb 17
Vb 18
Vb 20
Vb 21.3
Vb 22
Vb 23
IL-2
IL-2/IL-15/IL-21

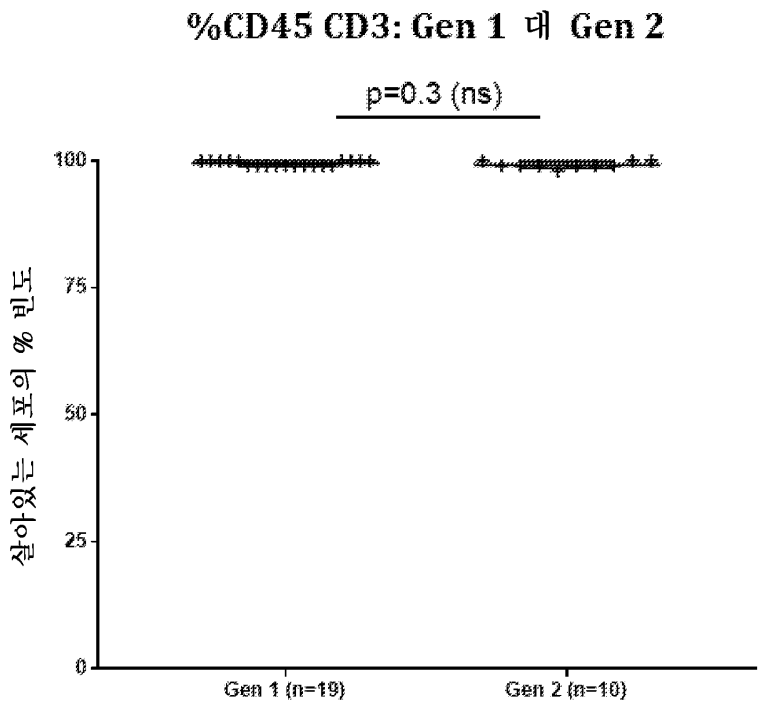
도면74


종양을 잘라냄
≤4.0 cm 직경
NMA-LD 사전컨디셔닝 요법
해동, 주입 + IL-2 투여
CMO에서 임상 사이트로 냉동운송기에서 고속 송달
LN2 냉동보존된 LN-144 주입 생성물 제어 속도 동결
-190°C
수확
확장 생체외 규모 확대
IL-2 + OKT3
TIL 및 공급자 세포를 공동-배양
REP로 직접
종양 단편 배양 (사전-REP) 11일
급속 확장 (REP) 11일
임상 사이트에서 CMO로 고속 송달
GMP 제조 시설
단편으로 커팅함
≤50 단편
생체외 배양
+ IL-2
벌크한 TIL (~10^8)

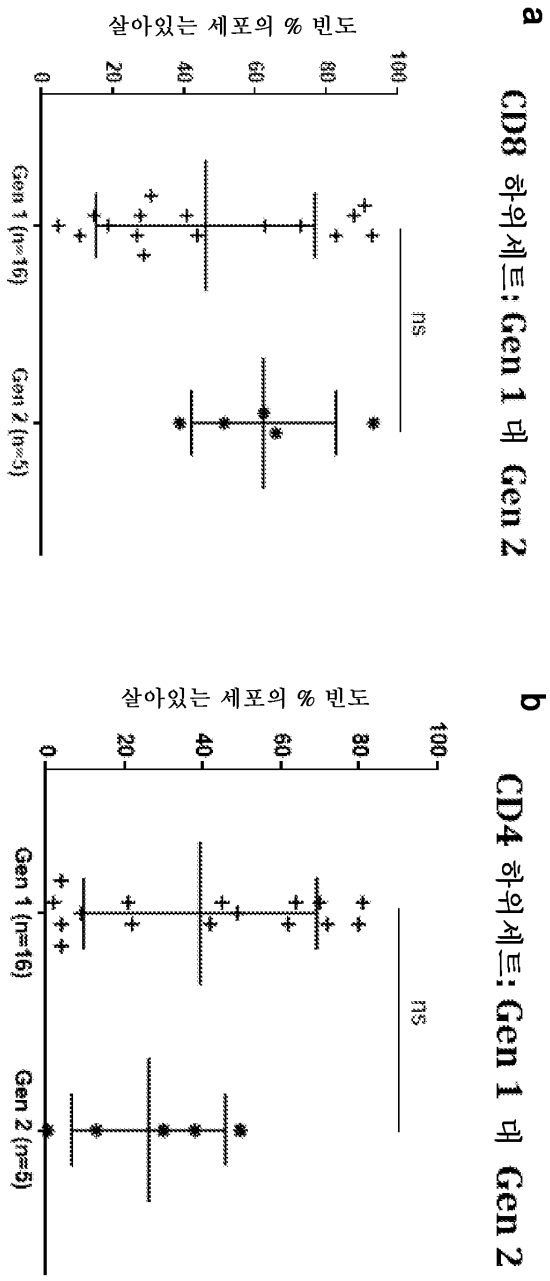
도면75


a
생존 세포 카운트
1.5×10^11
1×10^11
5×10^10
0
수확시
P = 0.205
코호트 1
(n = 16)
코호트 2
(n = 15)
b
TIL의 배수 확장
4000
3000
2000
1000
0
배수 확장
P = 0.319
코호트 1
(n = 16)
코호트 2
(n = 15)

도면76

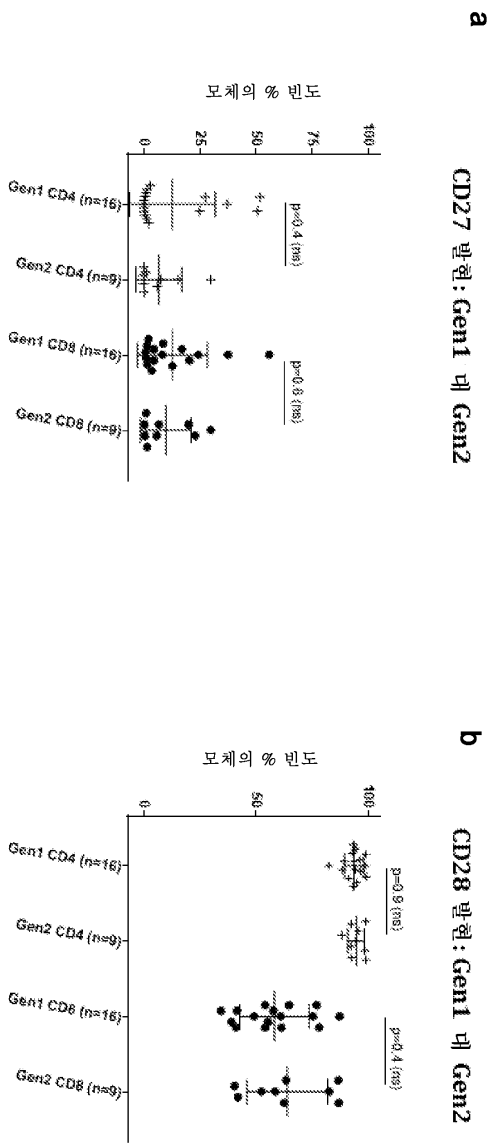

%CD45 CD3: Gen 1 대 Gen 2
p=0.3 (ns)
살아있는 세포의 % 빈도
100
75
50
25
0
Gen 1 (n=19)
Gen 2 (n=10)

도면77

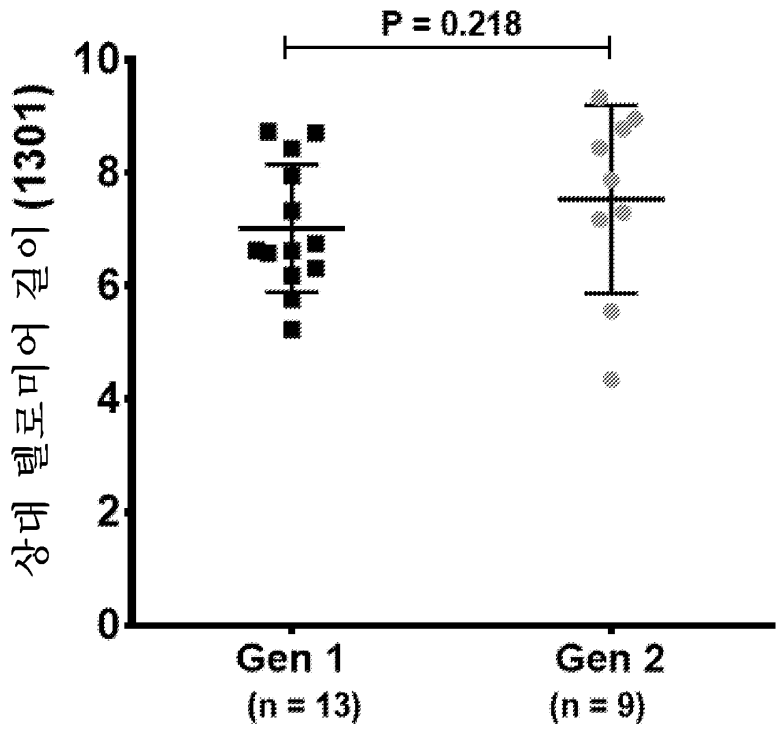

a
CD8 하위세트: Gen 1 대 Gen 2
살아있는 세포의 % 빈도
0
20
40
60
80
100
ns
Gen 1 (n=16)
Gen 2 (n=5)

b
CD4 하위세트: Gen 1 대 Gen 2
살아있는 세포의 % 빈도
0
20
40
60
80
100
ns
Gen 1 (n=16)
Gen 2 (n=5)

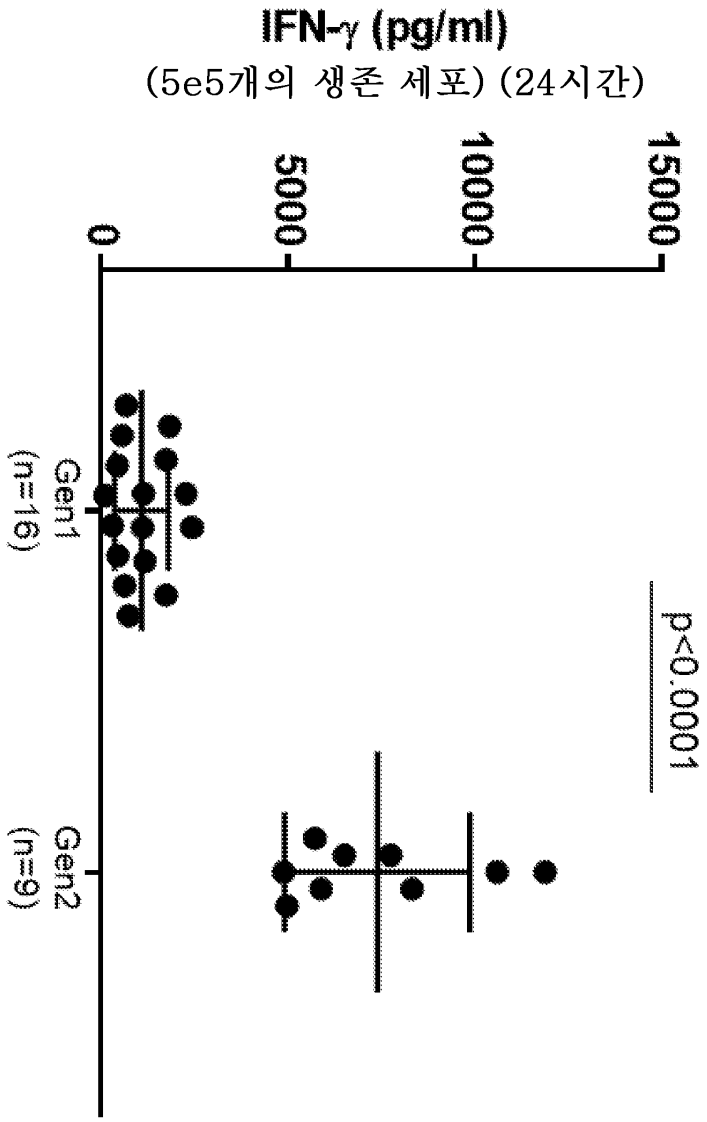
도면78


a
CD27 발현: Gen1 대 Gen2
모체의 % 빈도
0
25
50
75
100
Gen1 CD4 (n=16)
Gen2 CD4 (n=9)
Gen1 CD8 (n=16)
Gen2 CD8 (n=9)
p=0.4 (ns)
p=0.8 (ns)
b
CD28 발현: Gen1 대 Gen2
모체의 % 빈도
0
50
100
Gen1 CD4 (n=16)
Gen2 CD4 (n=9)
Gen1 CD8 (n=16)
Gen2 CD8 (n=9)
p=0.9 (ns)
p=0.4 (ns)

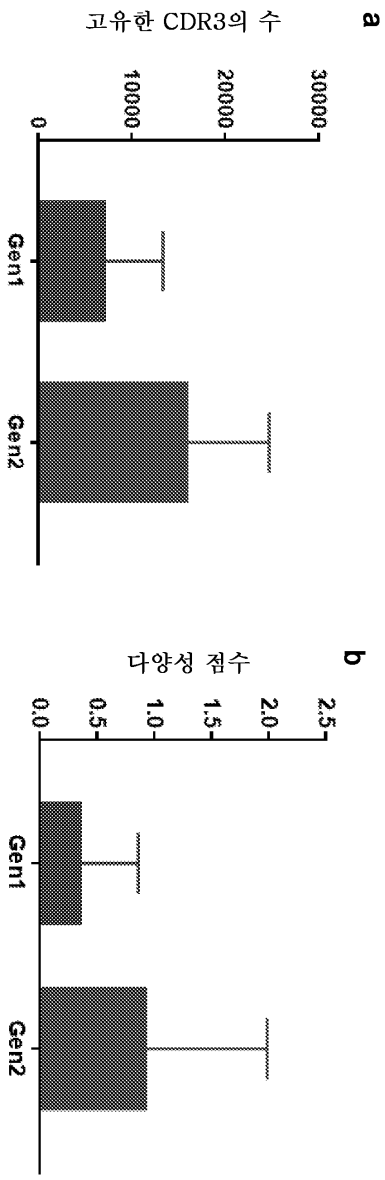
도면79



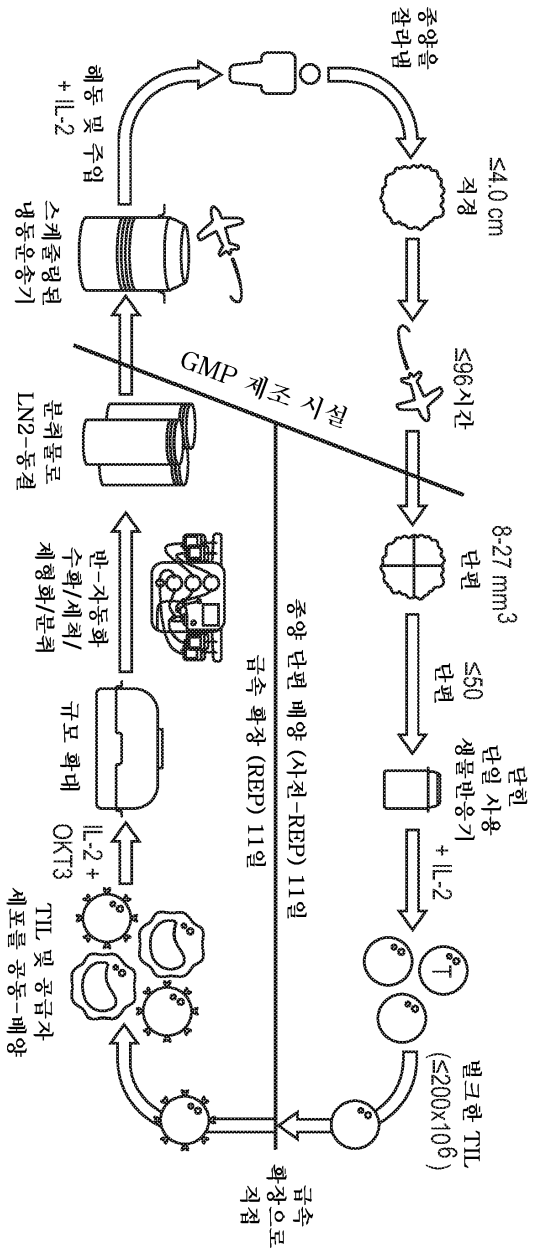
도면80


IFN-γ (pg/ml)
(5e5개의 생존 세포) (24시간)
0
5000
10000
15000
Gen1
(n=16)
Gen2
(n=9)
p<0.0001

도면81


a
고유한 CDR3의 수
0
10000
20000
30000
Gen1
Gen2
b
다양성 점수
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
Gen1
Gen2

도면82


종양을 잘라냄
≤4.0 cm 직경
≤96시간
8-27 mm3 단편
≤50 단편
닫힌 단일 사용 생물반응기
+ IL-2
별크한 TIL (≤200x10^6)
GMP 제조 시설
종양 단편 배양 (사전-REP) 11일
급속 확장 (REP) 11일
급속 확장으로 직접
TIL 및 공급자 세포를 공동-배양
IL-2 + OKT3
규모 확대
반-자동화 수확/세척/ 제형화/분취
분취물로 LN2-동결
스케줄링된 냉동운송기
해동 및 주입 + IL-2

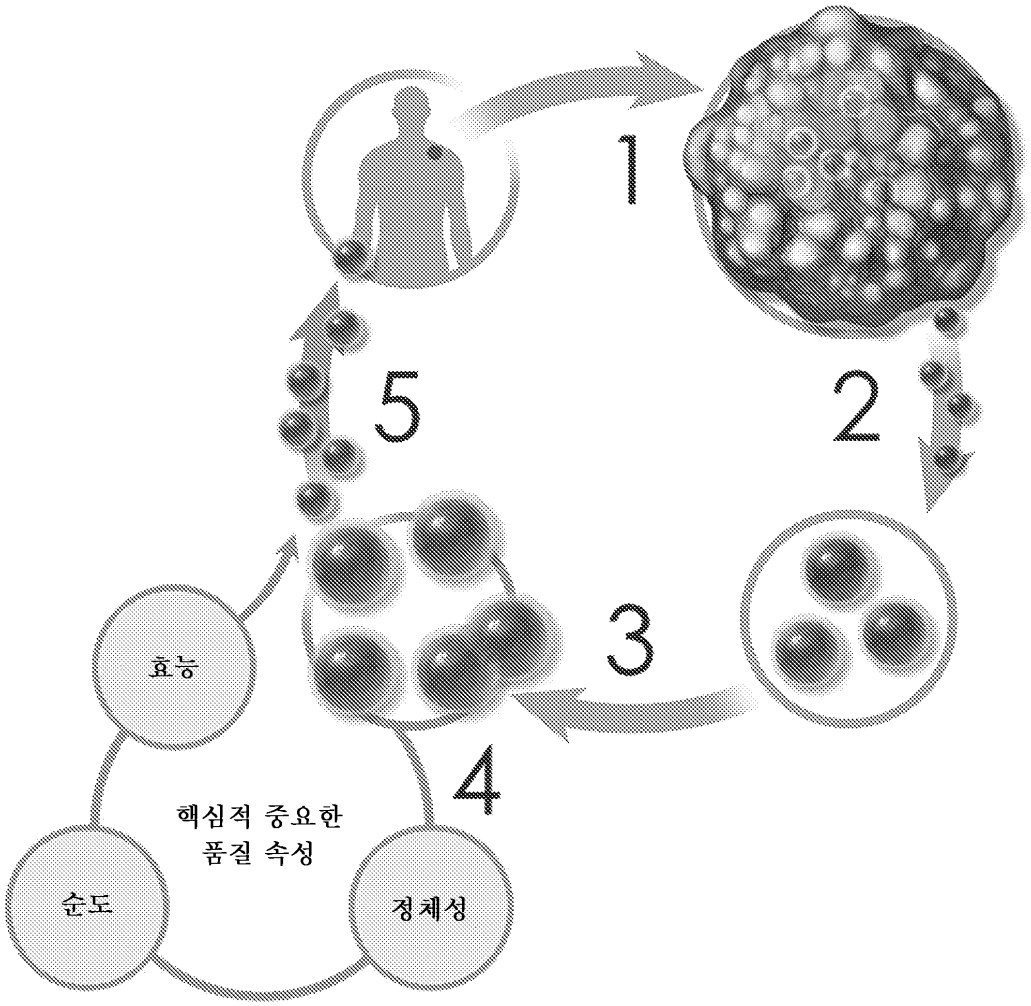
도면83

프로세스 1C: 단계 A에서 E까지 43 내지 55일	프로세스 2A: 단계 A에서 E까지 약 22일
1. 단계 A 환자 종양 샘플을 얻음	**2. 단계 A** 환자 종양 샘플을 얻음
3. 단계 B 단편화 및 제1 확장 11일 내지 21일	**3. 단계 B** 단편화 및 제1 확장 3일 내지 14일
3. 단계 C 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행 선택시까지 임의적 저장	**4. 단계 C** 제1 확장에서 제2 확장으로의 이행 저장 없음 및 닫힌 계
5. 단계 D 제2 확장 IL-2, OKT-3, 항원-제시 공급자 세포 임의로 1회 이상 반복함	**5. 단계 D** 제2 확장 IL-2, OKT-3, 및 항원-제시 공급자 세포 닫힌 계
6. 단계 E 단계 D로부터의 TIL을 수확함	**7. 단계 E** 단계 D로부터의 TIL을 수확함 닫힌 계
6. 단계 F 최종 제형화 및/또는 주입 백으로 이동	**8. 단계 F** 최종 제형화 및/또는 주입 백으로 이동 (임의적 냉동보존)

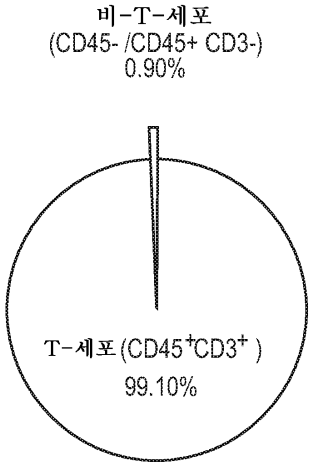
도면84

프로세스 단계	프로세스 1C 실시양태	프로세스 2A 실시양태	이점
사전-REP	• 10개의 G렉스-10 플라스크 당 4개의 단편 • 11 내지 21일의 지속기간	• 1개의 G렉스-100M 플라스크 당 40개의 단편 • 11일 지속기간	• 플라스크 당 증가된 종양 단편 • 단축된 배양 시간 • 감소된 단계의 수 • 폐쇄된 계를 받아들임
사전-REP에서 REP로의 이행	• 사전-REP TIL은 선택을 위해 표현형 결정될 때까지 동결된 후, 해동되어 REP로 진행한다 (약 제30일) • REP는 >40×10^6개의 TIL을 요구한다	• 사전-REP TIL은 제11일에 REP로 직접적으로 이동한다 • REP는 25 내지 200×10^6개의 TIL을 요구한다	• 단축된 사전-REP에서 REP로의 프로세스 • 감소된 단계의 수 • 제거된 표현형결정 선택 • 폐쇄된 계를 받아들임
REP	• REP 제0일에 6개의 G렉스-100M 플라스크 • REP 제0일에 플라스크 당 5×10^6개의 TIL 및 5×10^8개의 PBMC 공급자 • REP 제7일에 18 내지 36개의 플라스크로 분할 • 14일 지속기간	• 제11일에 1개의 G렉스-500M 플라스크 • 제11일에 25 내지 25-200×10^6개의 TIL 및 $5x10^9$개의 PBMC 공급자 • 제16일에 6개 이하의 G렉스-500M 플라스크로 분할 • 11일 지속기간	• 감소된 단계의 수 • 보다 짧은 REP 지속기간 • 플라스크 사이의 TIL의 닫힌 계 이동 • 닫힌 계 배지 교환
수확	• 원심분리를 통해 수확된 TIL	• LOVO 자동화 세포 세척 시스템을 통해 수확된 TIL'	• 감소된 단계의 수 • 자동화 세포 세척 • 닫힌 계 • 세척 동안 생성물의 감소된 소실
최종 제형화	• 하이포써모솔 중 신선한 생성물 • 단일 주입 백 • 제한된 운송 안정성	• LN_2에 저장된 플라스마라이트-A + 1% HAS 및 CS10 중 냉동보존된 생성물 • 다수의 분취물 • 보다 긴 운송 안정성	• 운송 유연성 • 유연한 환자 스케줄링 • 보다 시기적절한 방출 시험
전체 추정된 프로세스 시간	• 43 내지 55일	• 22일	• 환자에게 보다 빠른 반송

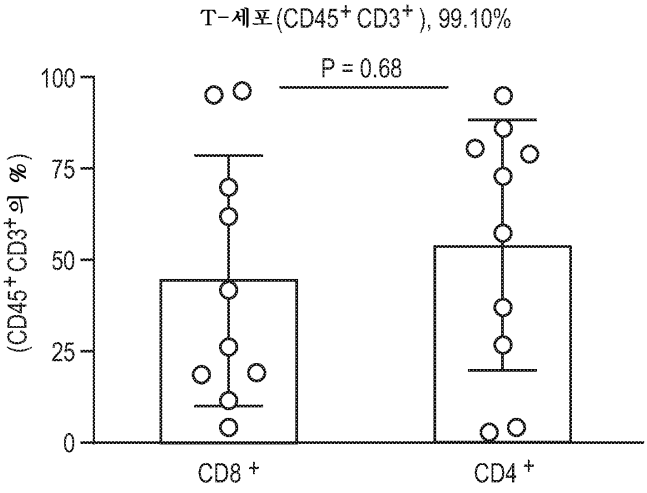
도면85



도면86i

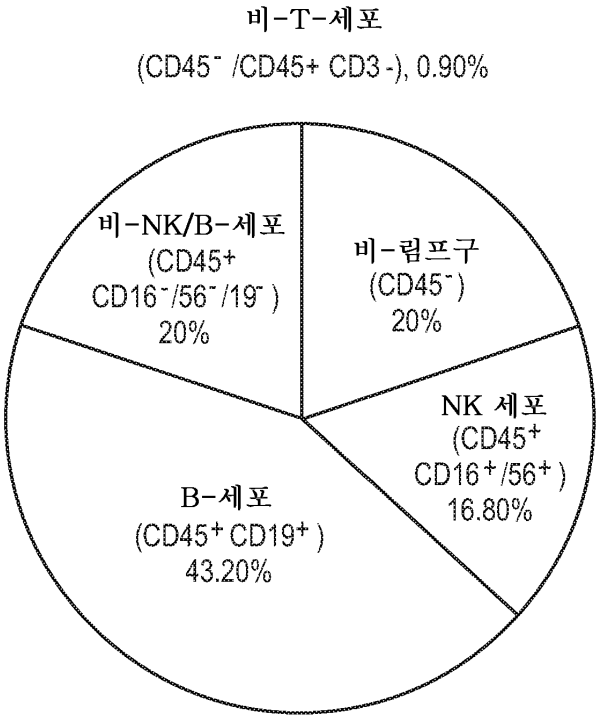


86a



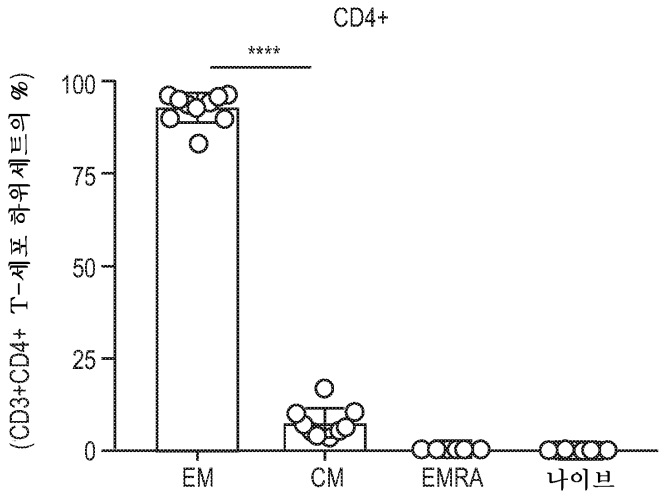
86b

도면86ii

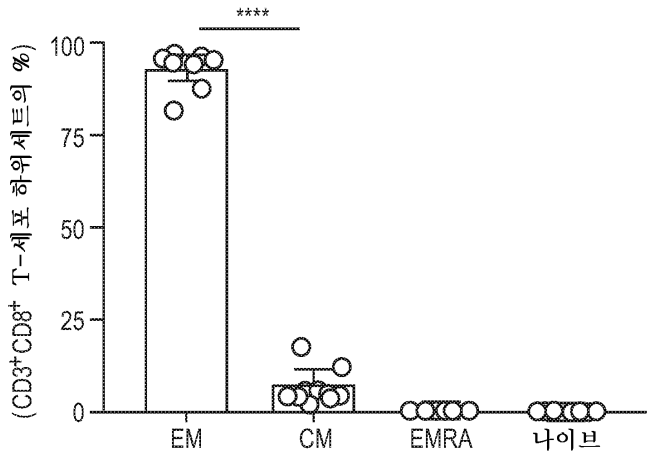

비-T-세포
(CD45⁻ /CD45+ CD3 -), 0.90%
비-NK/B-세포
(CD45+
CD16⁻/56⁻/19⁻)
20%
비-림프구
(CD45⁻)
20%
NK 세포
(CD45+
CD16+/56+)
16.80%
B-세포
(CD45+ CD19+)
43.20%

86c

도면87

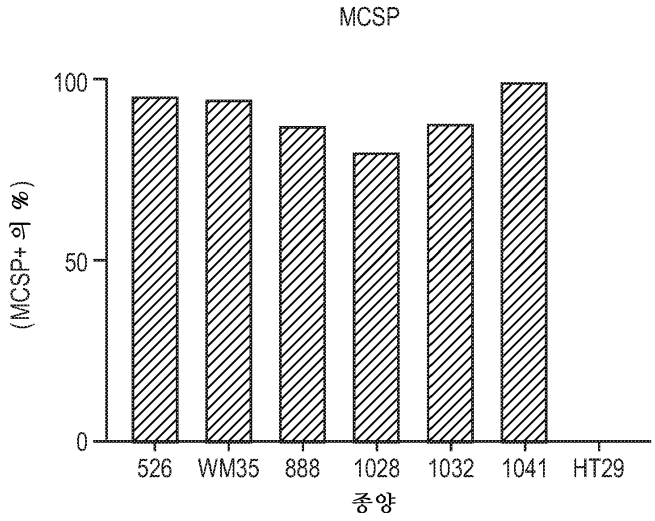

CD4+
****
(CD3+CD4+ T-세포 하위세트의 %)
100
75
50
25
0
EM
CM
EMRA
나이브

87a

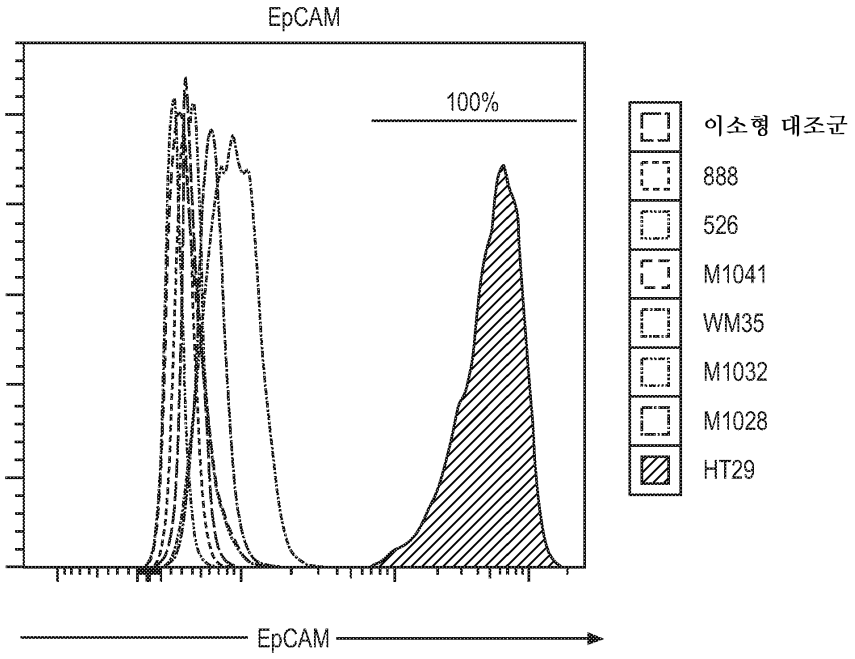

****
(CD3+CD8+ T-세포 하위세트의 %)
100
75
50
25
0
EM
CM
EMRA
나이브

87b

도면88

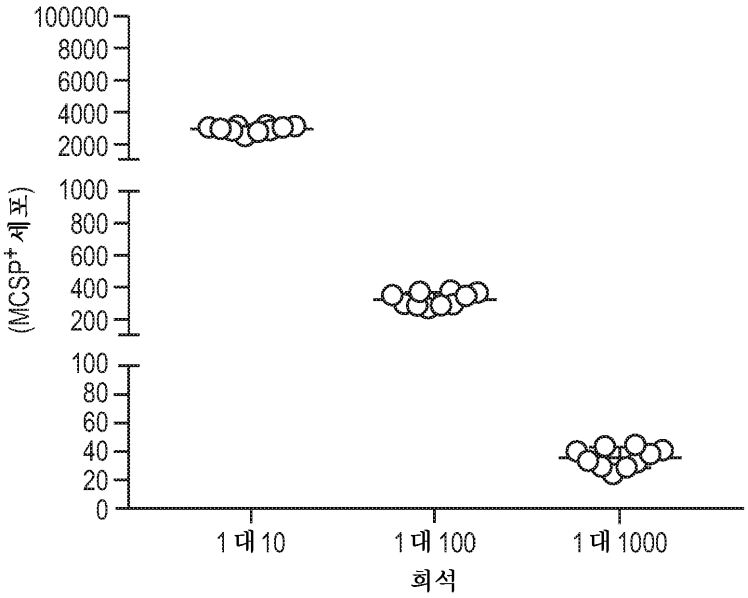

MCSP
100
50
0
(MCSP+ 의 %)
526
WM35
888
1028
1032
1041
HT29
종양

88a


EpCAM
100%
이소형 대조군
888
526
M1041
WM35
M1032
M1028
HT29
EpCAM

88b

도면89



89a

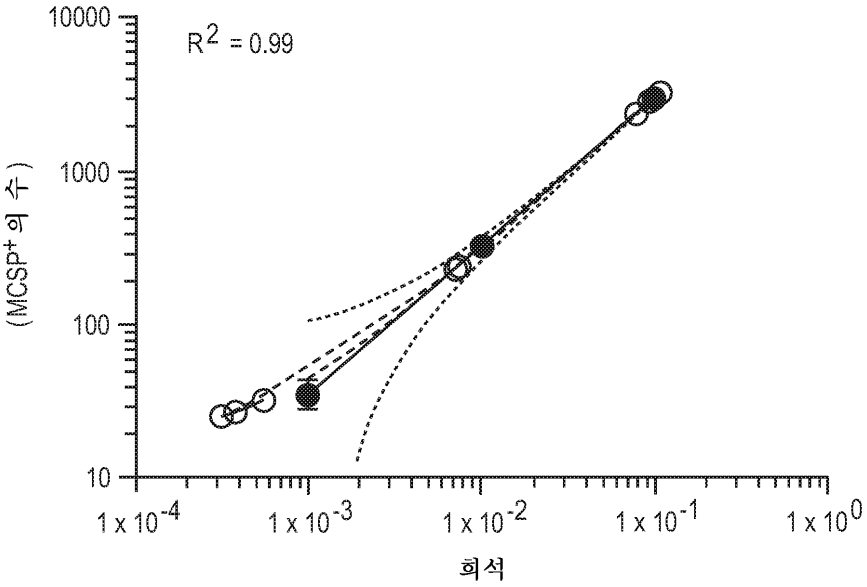
희석	AV	SD	상한 (AV + 3SD)	하한 (AV - 3SD)
1 대 10	2976	203	3585	2367
1 대 100	322	39	440	204
1 대 1000	36	7	56	16

89b

도면90

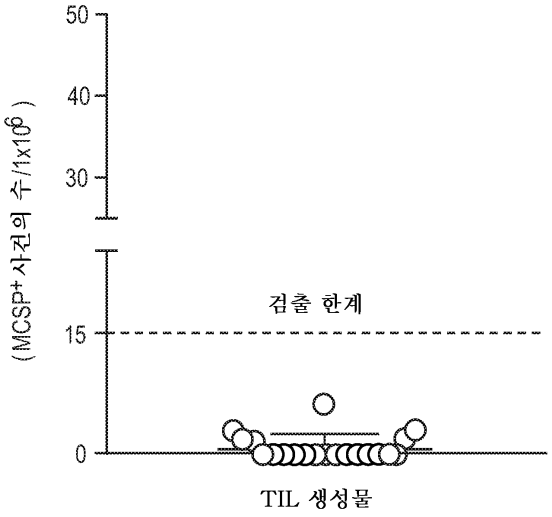
희석	범위 (상한-하한)	EXP#1 (AV)	EXP#2 (AV)	EXP#3 (AV)
1 대 10	3585-2367	2814	3282	2367
1 대 100	440-204	227	320	239
1 대 1000	56-16	27	25	32

90a

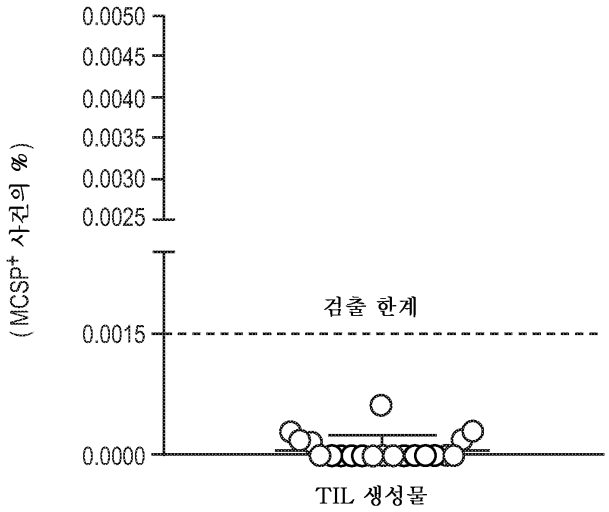


90b

도면91

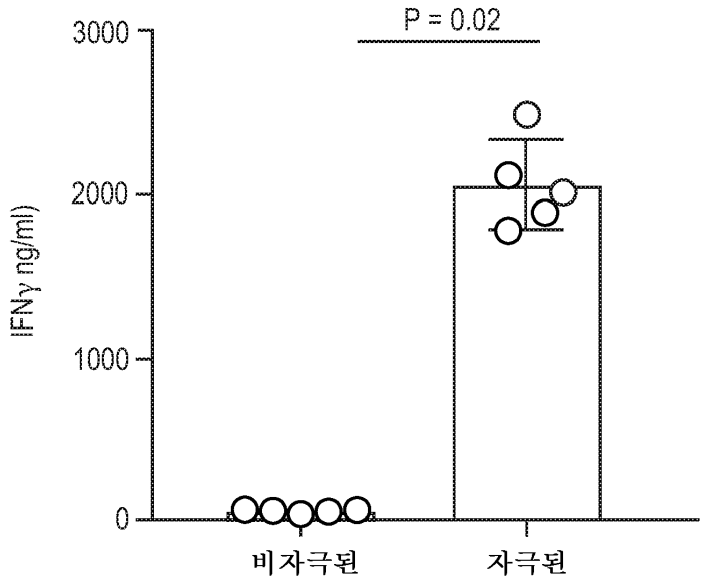

50
40
30
15
0
(MCSP+ 사건의 수/1x10^6)
검출 한계
TIL 생성물

91a

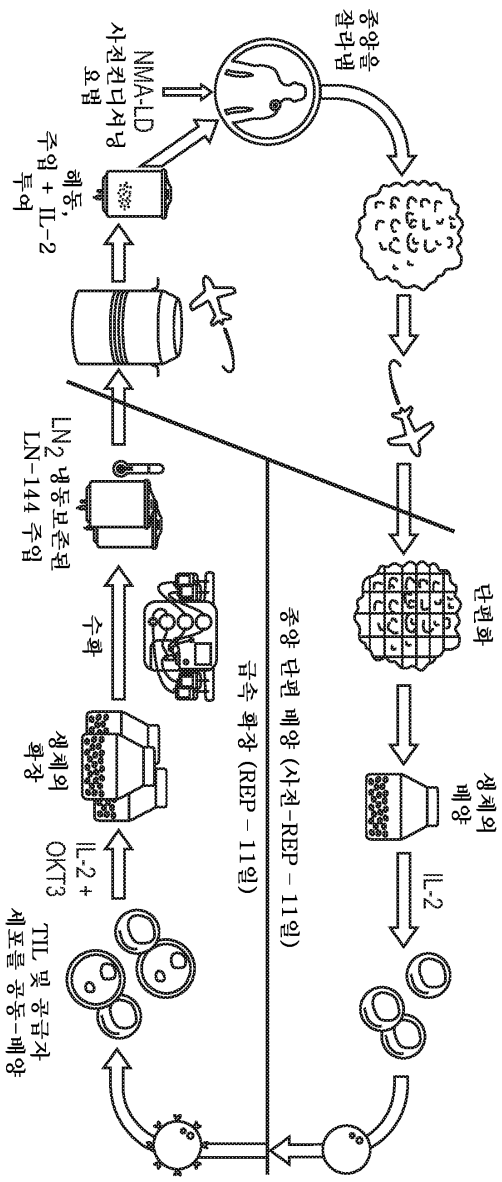

0.0050
0.0045
0.0040
0.0035
0.0030
0.0025
0.0015
0.0000
(MCSP+ 사건의 %)
검출 한계
TIL 생성물

91b

도면92



도면93

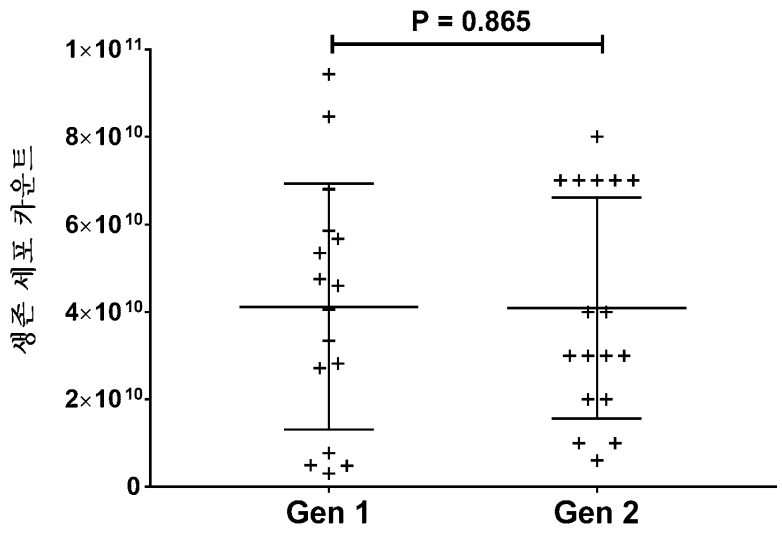

종양을 잘라냄
NMA-LD 사전컨디셔닝 요법
해동, 주입 + IL-2 투여
LN2 냉동보존된 LN-144 주입
수확
생체외 확장
IL-2 + OKT3
TIL 및 공급자 세포를 공동-배양
단편화
생체외 배양
IL-2
종양 단편 배양 (사전-REP – 11일)
급속 확장 (REP – 11일)

도면94

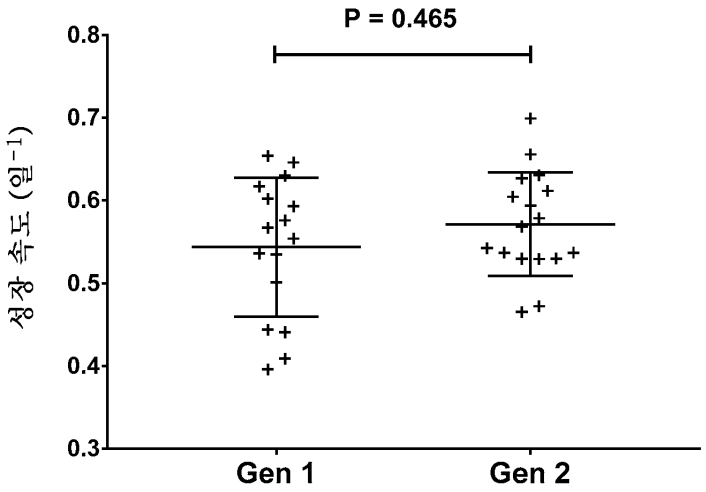
프로세스 단계	GEN 1	GEN 2	영향
단편 배양	≤21일, 다수의 생물반응기, 다수의 조작자 개입	≤11일, 단일 닫힌 생물반응기, 개입 없음	배양을 단축시킴, 개입을 감소시킴
TIL 선택	IL-2 확장된 TIL 냉동보존됨, 시험됨, 표현형에 기초한 선택, 해동, 휴지, 공동-배양	벌크한 TIL을 공동-배양으로 직접	단계를 감소시킴, 시험을 제거함, 클론 다양성을 증가시킴
수확/세척	수동 부피 감소 및 수확. 수동 세척 및 농축	닫힌 반-자동화 부피 감소 및 수확. 자동화 세척 및 농축	조작자 개입을 감소시킴, 프로세싱 시간을 감소시킴, 기능적으로 닫힌 계를 유지함
제형화	신선한 저온 생성물 (2- 8°C)	냉동보존된 생성물 (≤ -150°C)	운송 및 환자 스케줄링의 증가된 유연성을 통해 세계적 시험을 허용함
제조 시간	38일 프로세스 시간	22일 프로세스 시간	환자에게 반송, 클린 룸 처리량, 보다 낮은 상품의 비용

도면95i

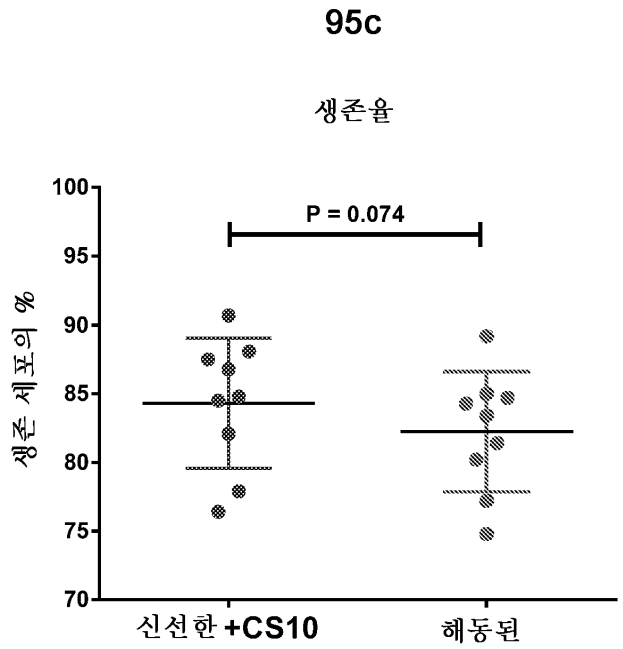
95a



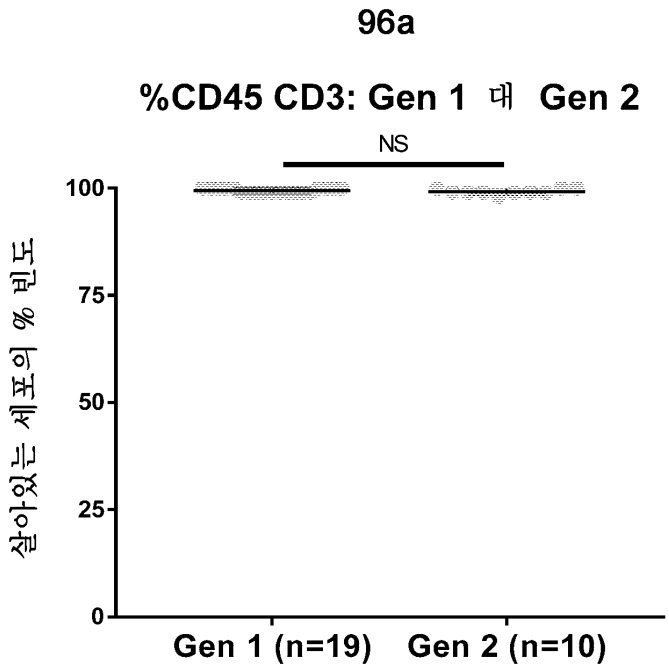
95b



도면95ii



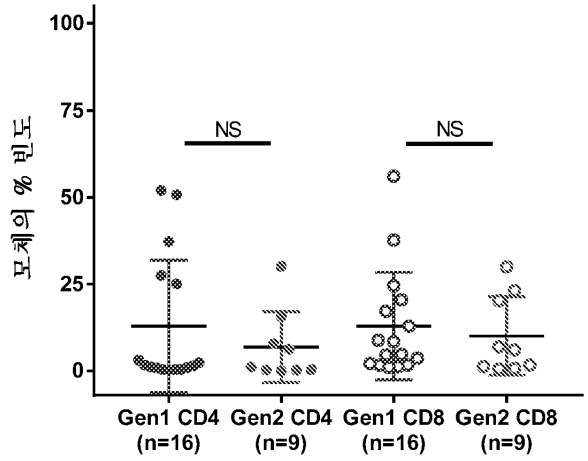
도면96i



도면96ii

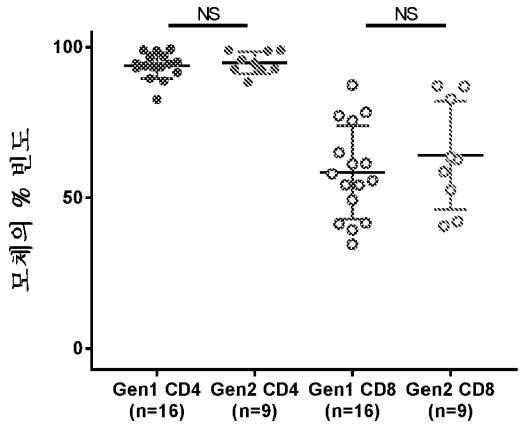
96b

CD27 발현 : Gen1 대 Gen2

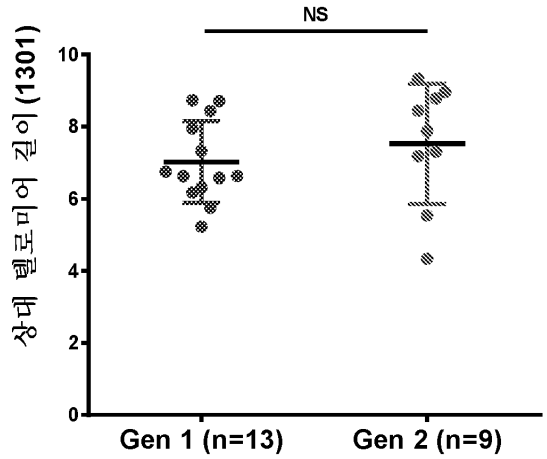


96c

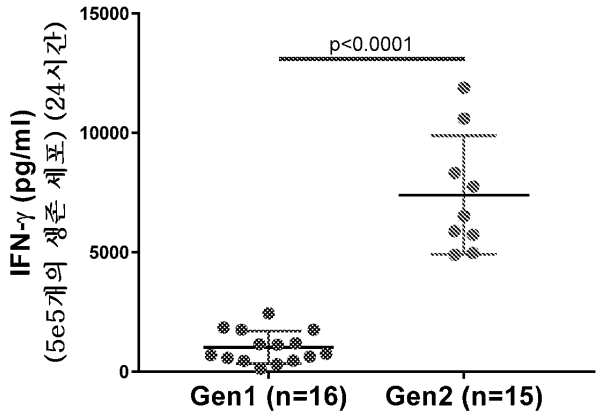
CD28 발현 : Gen1 대 Gen2



도면97

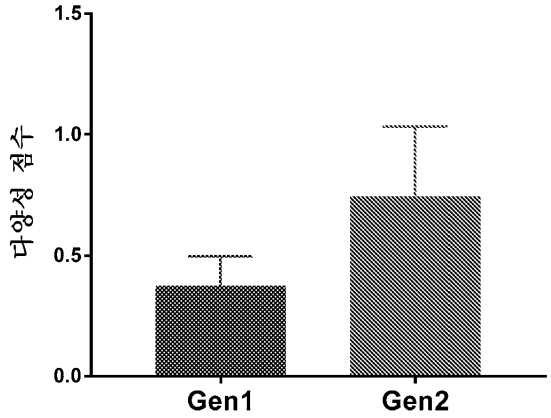

NS
상대 텔로미어 길이 (1301)
10
8
6
4
2
0
Gen 1 (n=13)
Gen 2 (n=9)

도면98

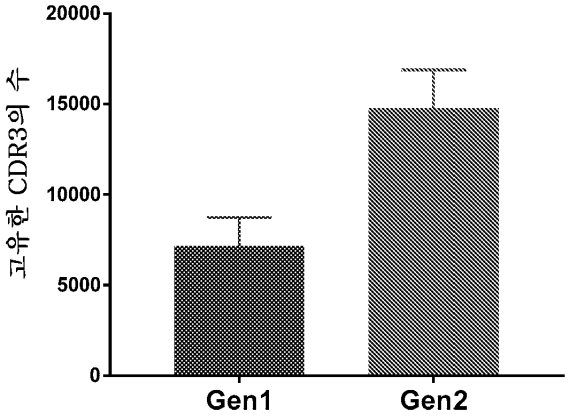

p<0.0001
IFN-γ (pg/ml)
(5e5개의 생존 세포) (24시간)
15000
10000
5000
0
Gen1 (n=16)
Gen2 (n=15)

도면99

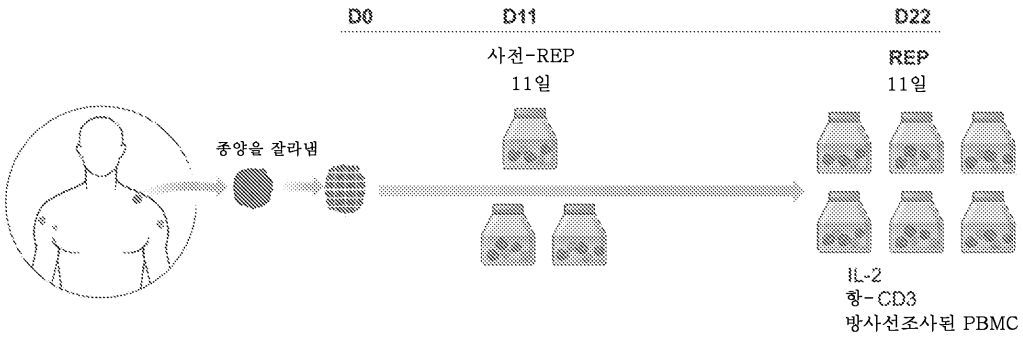
99a



99b



도면100

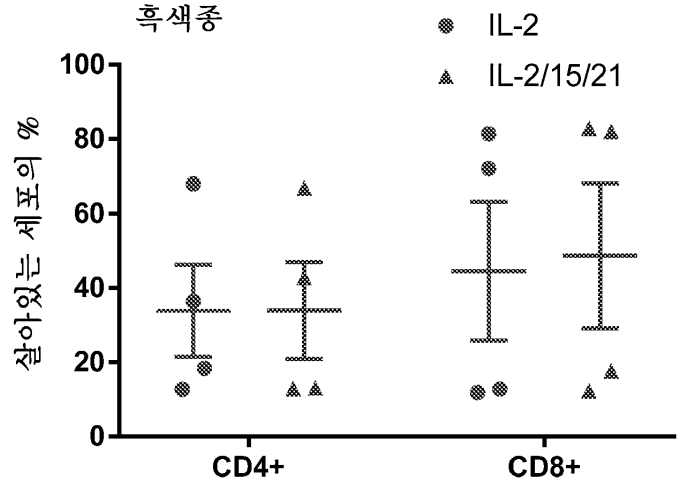


도면101

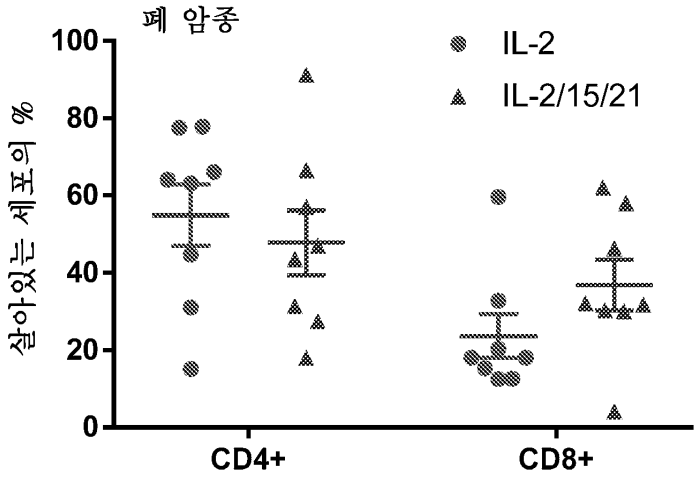
종양 조직학	IL-2/IL-15/IL-21을 사용한 성장의 >20% 향상을 입증하는 연구의 수 (IL-2에 비해)
흑색종	1/5(20%)
폐	3/8 (38%)
결장직장	7/11 (63%)
자궁경부	1/1 (100%)
췌장	2/2 (100%)
교모세포종	1/1 (100%)
삼중 음성 유방	1/2 (50%)

도면102

102a



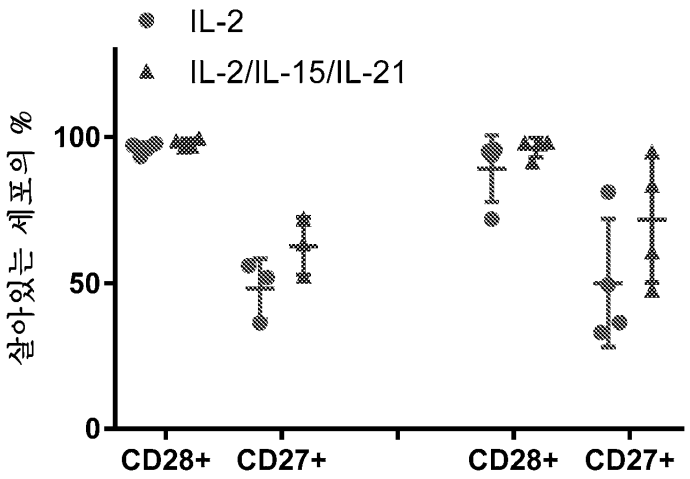
102b



도면103

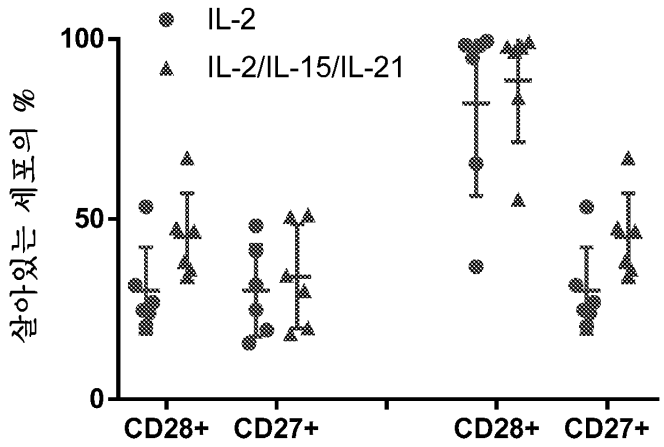
103a

흑색종



103b

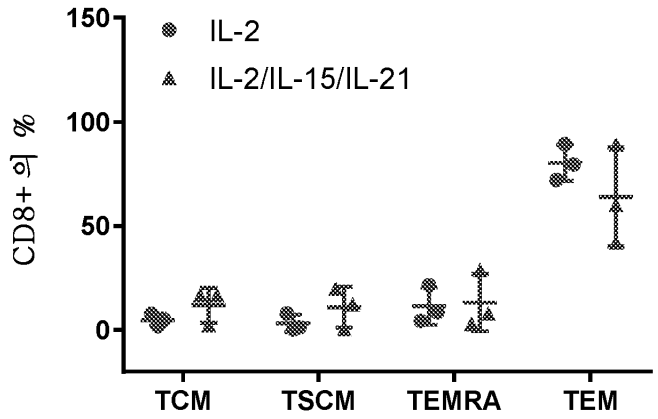
폐 암종



도면104

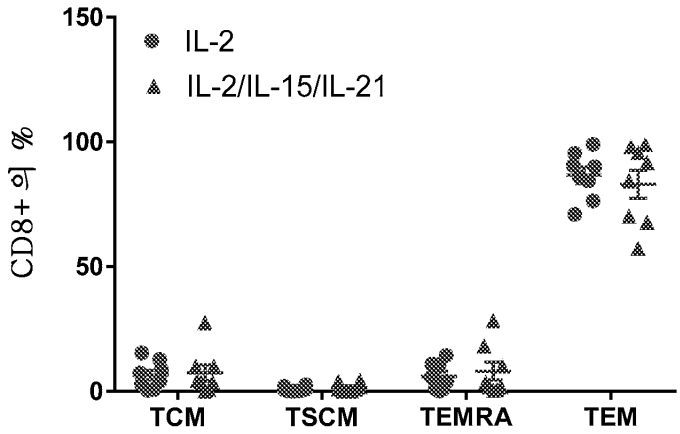
104a

흑색종



104b

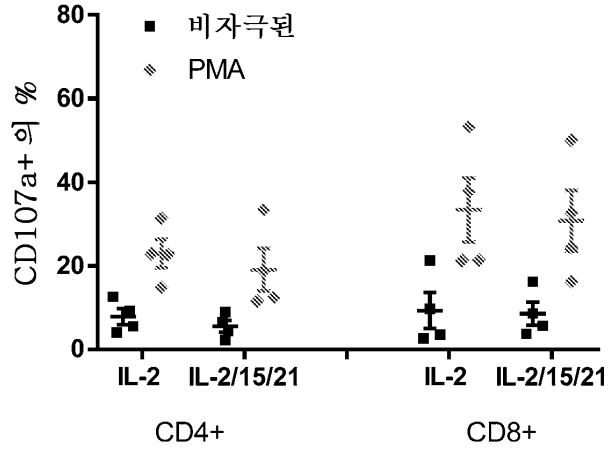
폐 암종



도면105i

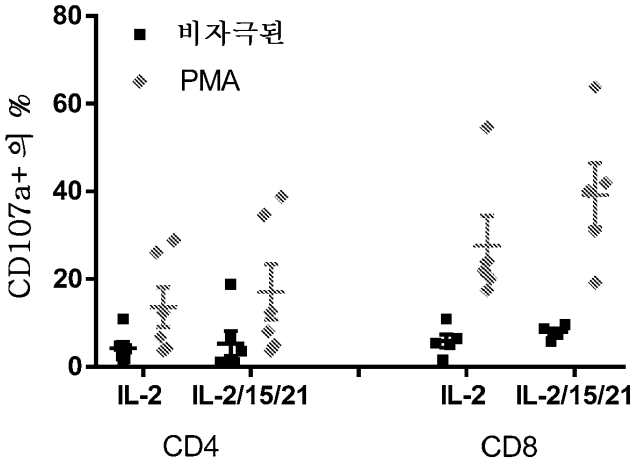
105a

흑색종

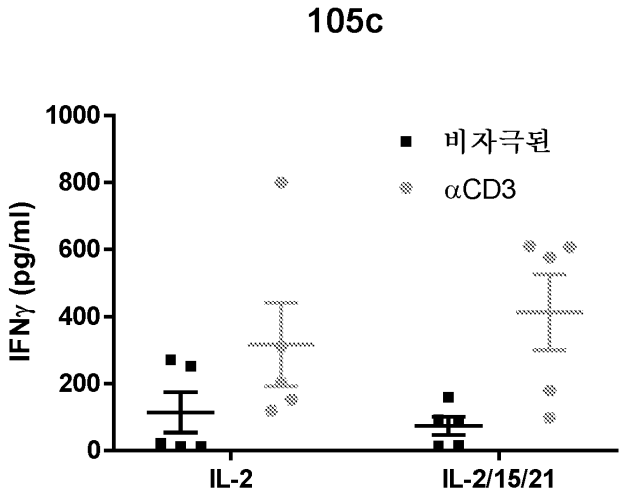


105b

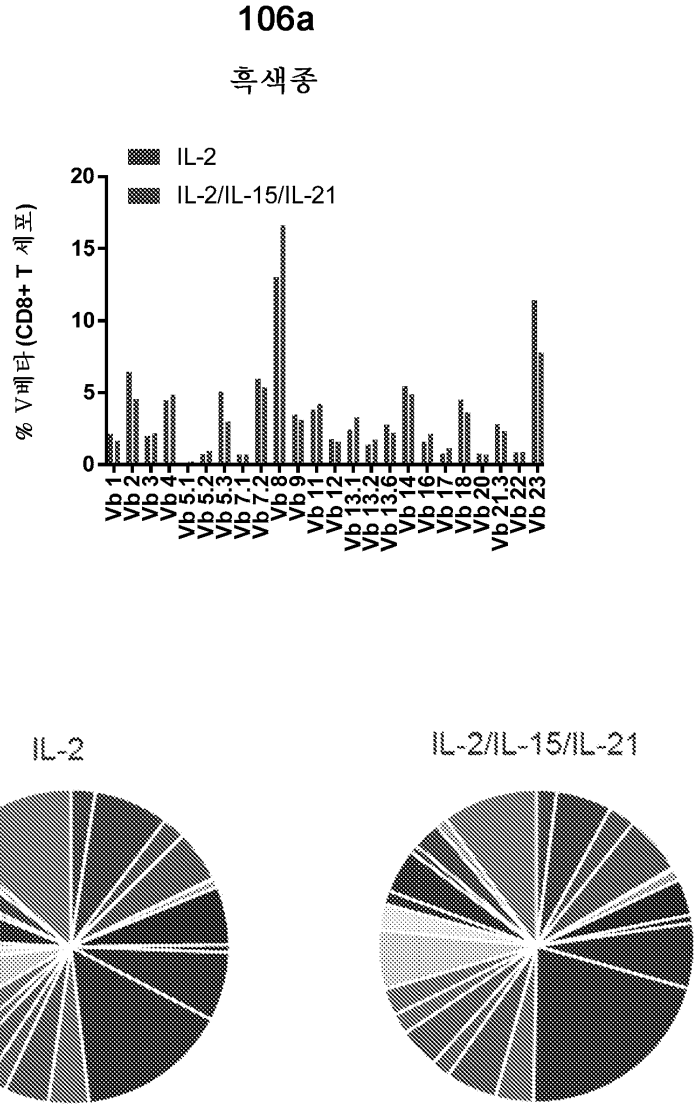
폐 암종



도면105ii



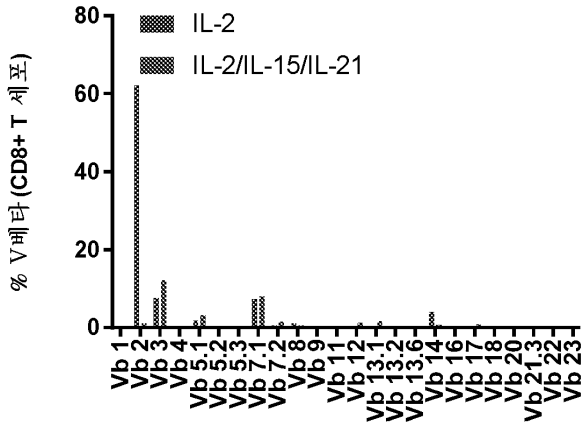
도면106i

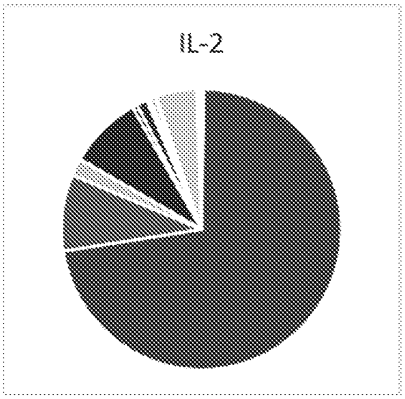


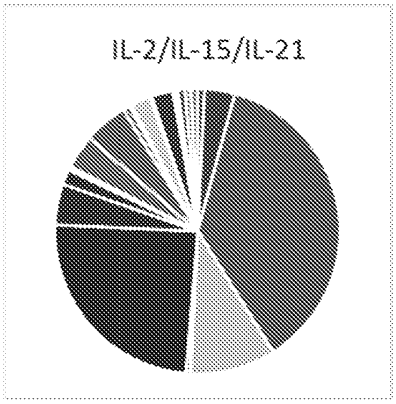
도면106ii

106b

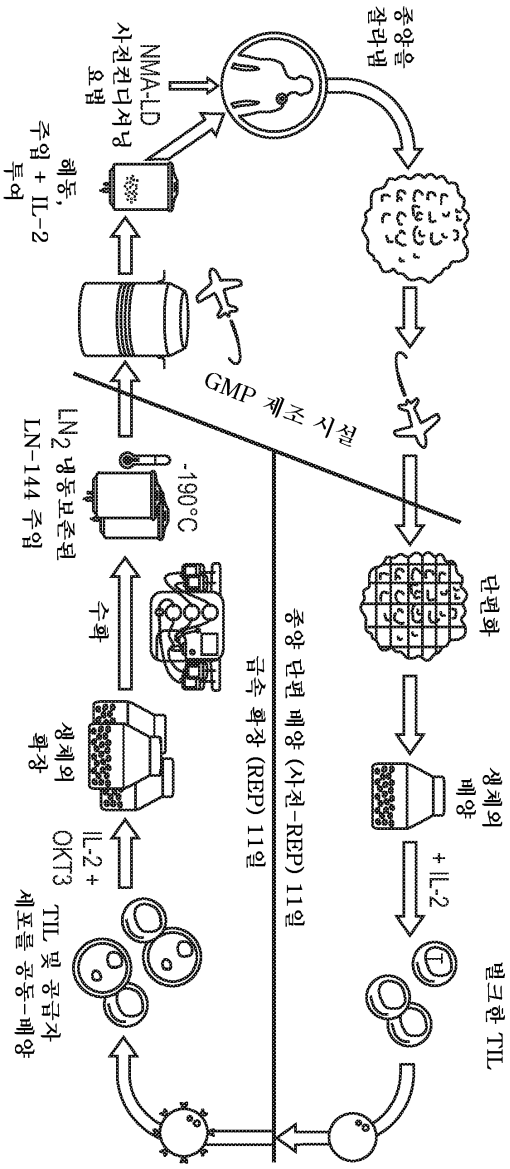
폐 암종



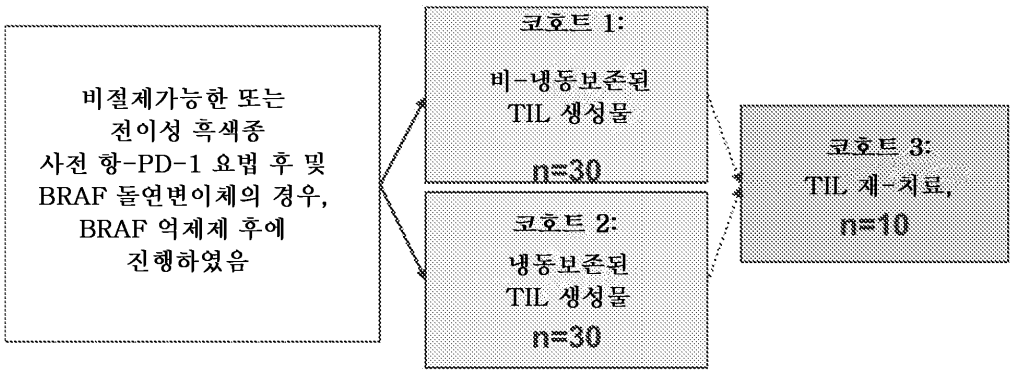




도면107


종양을 잘라냄
NMA-LD 사전컨디셔닝 요법
해동, 주입 + IL-2 투여
GMP 제조 시설
LN2 냉동보존된 LN-144 주입
-190°C
수확
생체외 확장
IL-2 + OKT3
TIL 및 공급자 세포를 공동-배양
단편화
생체외 배양
+ IL-2
빌크한 TIL
종양 단편 배양 (사전-REP) 11일
급속 확장 (REP) 11일

도면108


비절제가능한 또는
전이성 흑색종
사전 항-PD-1 요법 후 및
BRAF 돌연변이체의 경우,
BRAF 억제제 후에
진행하였음
코호트 1:
비-냉동보존된
TIL 생성물
n=30
코호트 2:
냉동보존된
TIL 생성물
n=30
코호트 3:
TIL 재-치료,
n=10

도면109

특징	역사적 코호트 1* N = 16, (%)	코호트 2 N = 13, (%)
성별, n (%)		
남성	7 (44)	5 (39)
여성	9 (56)	8 (62)
연령		
중위	55	54
최소, 최대	41, 72	35, 66
사전 요법, n (%)		
사전 전신 요법의 평균 #	3	4
항-CTLA-4	14 (88)	13 (100)
항-PD-1	21 (100)	13 (100)
직경의 표적 병변 합계(mm)		
평균(SD)	104 (68)	141 (102)
최소, 최대	15, 225	38, 342

특징	역사적 코호트 1* N = 16, (%)	코호트 2 N = 13, (%)
기준선 ECOG 점수, n (%)		
0	9 (56)	8 (62)
1	7 (44)	5 (39)
BRAF 상태, n (%)		
돌연변이된	9 (56)	6 (46)
야생형	7 (44)	7 (54)
기준선 LDH (U/L [SD])		
1 내지 2회 ULN	7 (44)	7 (54)
최소, 최대	1 (6)	2 (15)
표적 및 비-표적 병변의 수 (기준선에서)		
>3	12(75)	10(77)
평균	5.6	5.5

도면110

바람직한 기간	역사적 코호트 1 (N = 16) 임의의 등급 n (%)	등급 3/4 n (%)	등급 5 n (%)	코호트 2 (N = 13) 임의의 등급 n (%)	등급 3/4 n (%)	등급 5 n (%)
적어도 1회의 치료-긴급 AE를 보고한 환자의 수	14 (87.5)	14 (87.5)	0	12 (85.7)	11 (78.6)	0
구역	14 (87.5)	0	0	7 (53.8)	0	0
감소된 혈소판 카운트	12 (75.0)	12 (75.0)	0	7 (53.8)	6 (46.2)	0
빈혈	11 (68.8)	8 (50.0)	0	8 (61.5)	7 (53.8)	0
감소된 호중구 카운트	11 (68.8)	11 (68.8)	0	6 (46.2)	6 (46.2)	0
열성 호중성백혈구감소증	10 (62.5)	10 (62.5)	0	7 (53.8)	6 (46.2)	0
감소된 백혈구 카운트	10 (62.5)	10 (62.5)	0	6 (46.2)	6 (46.2)	0
오한	9 (56.3)	0	0	6 (46.2)	1 (7.7)	0
설사	8 (50.0)	1 (6.3)	0	4 (30.8)	0	0
피로	7 (43,8)	0	0	7 (53.8)	0	0
구토	7 (43.8	0	0	2 (15.4)	0	0
변비	6 (37.5)	0	0	3 (23.1)	0	0
감소된 식욕	5 (31.3)	0	0	4 (30.8)	0	0
두통	5 (31.3)	0	0	3 (23.1)	0	0
저칼슘혈증	5 (31.3)	0	0	1 (7.7)	0	0
저칼륨혈증	5 (31.3)	0	0	3 (23.1)	0	0
저인산혈증	5 (31.3)	5 (31.3)	0	4 (23.1)	1 (7.7)	0
고혈압	5 (31.3)	2 (12.5)	0	3 (23.1)	3 (7.7)	0
감소된 림프구 카운트	5 (31.3)	5 (31.3)	0	3 (23.1)	3 (23.1)	0
코 울혈	5 (31.3)	0	0	0	0	0
발열	5 (31.3)	0	0	9 (69.2)	1 (7.7)	0
기침	4 (25.0)	0	0	4 (30.8)	0	0
말초 부종	4 (25.0)	0	0	4 (30.8)	0	0
가려움	4 (25.0)	0	0	4 (30.8)	0	0

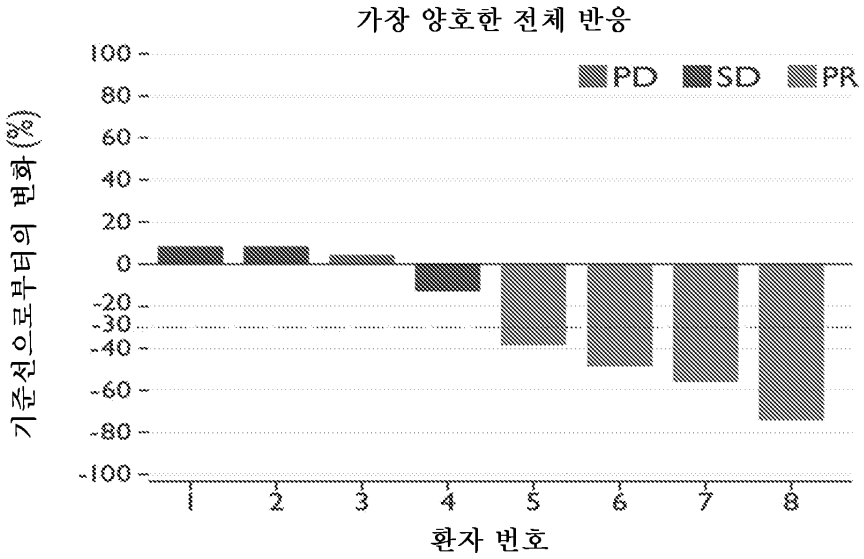
주: 유해 사건은 MedDRA 버전 18.1에 의해 코드화된다.

주어진 바람직한 기간에 대해 다수의 사건을 갖는 환자는 각각의 바람직한 기간 하에 최대 등급을 사용하여 단지 1회 카운팅된다.

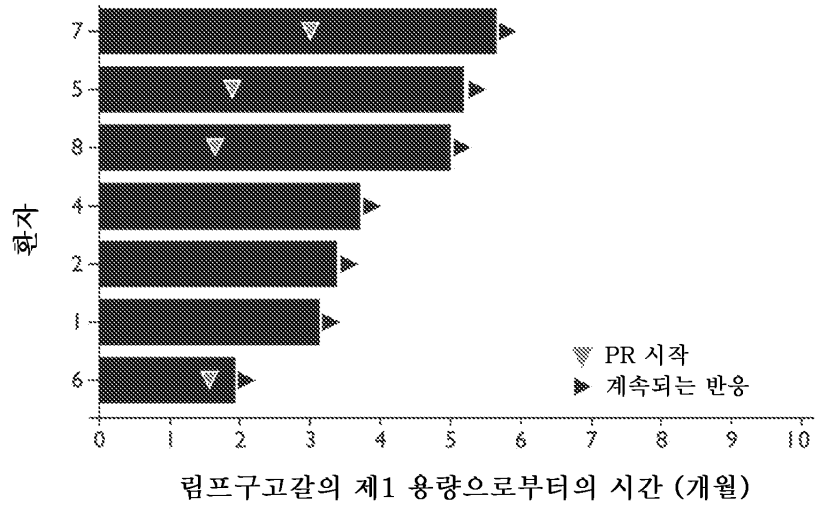
사건은 임의의 등급 당 SOC 하에 바람직한 기간의 빈도를 감소시킴으로써 분류된다.

치료-긴급 유해 사건은 사전-치료 화학요법 (플루다라빈 및 시클로포스파미드)의 제1 용량 날짜에 또는 그 후 시작하여 IL2의 마지막 용량 + 30일까지의 모든 AE를 지칭한다.

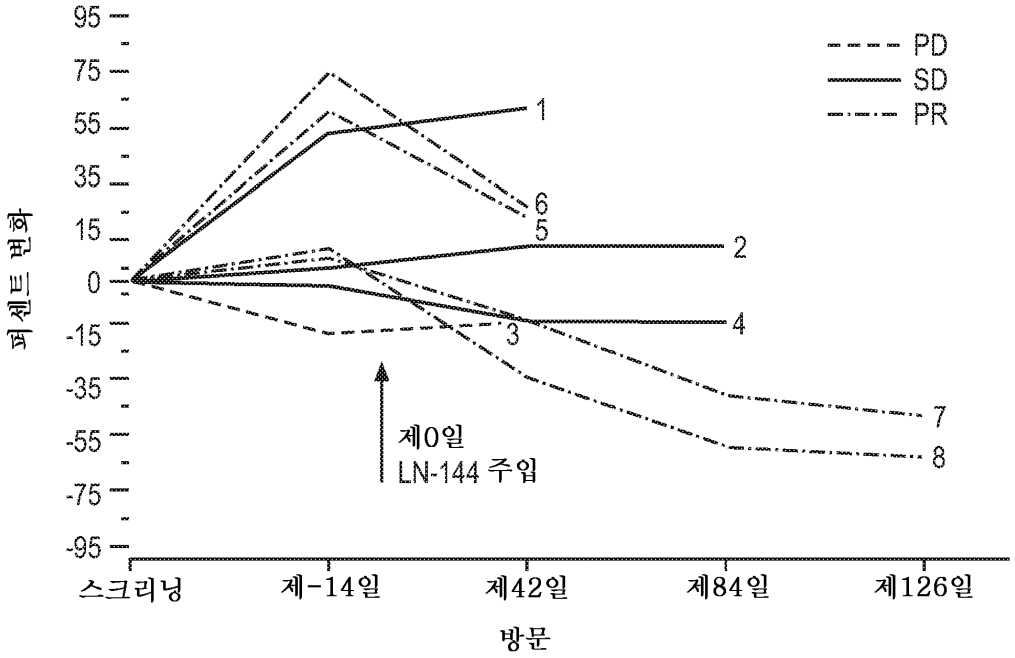
도면111


가장 양호한 전체 반응
PD
SD
PR
기준선으로부터의 변화 (%)
100
80
60
40
20
0
-20
-30
-40
-60
-80
-100
1
2
3
4
5
6
7
8
환자 번호

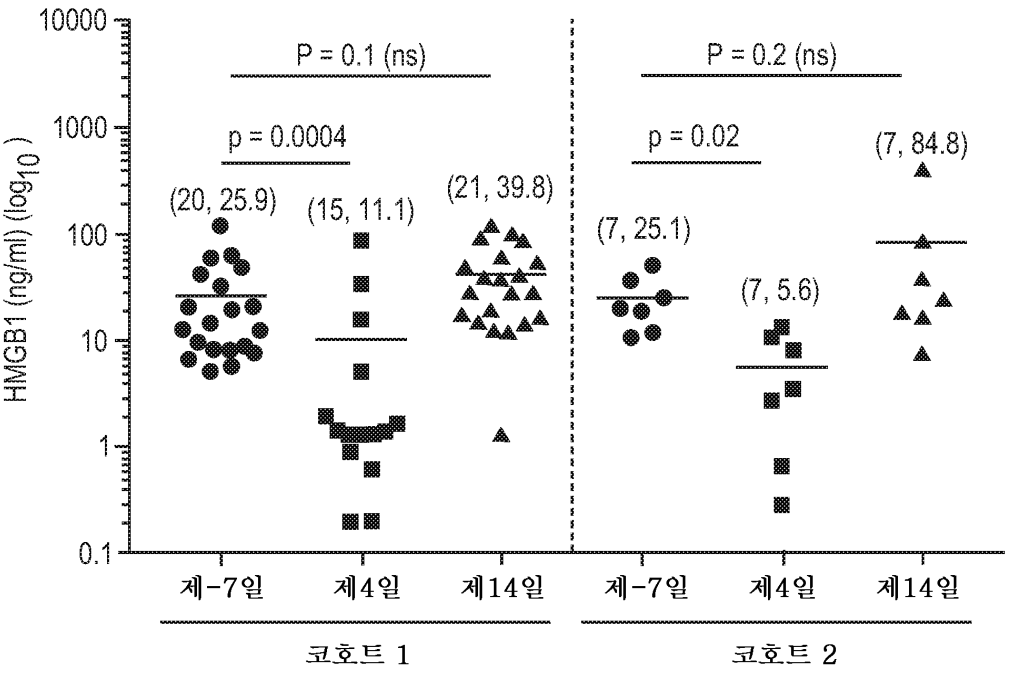
도면112


환자
7
5
8
4
2
1
6
PR 시작
계속되는 반응
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
림프구고갈의 제1 용량으로부터의 시간 (개월)

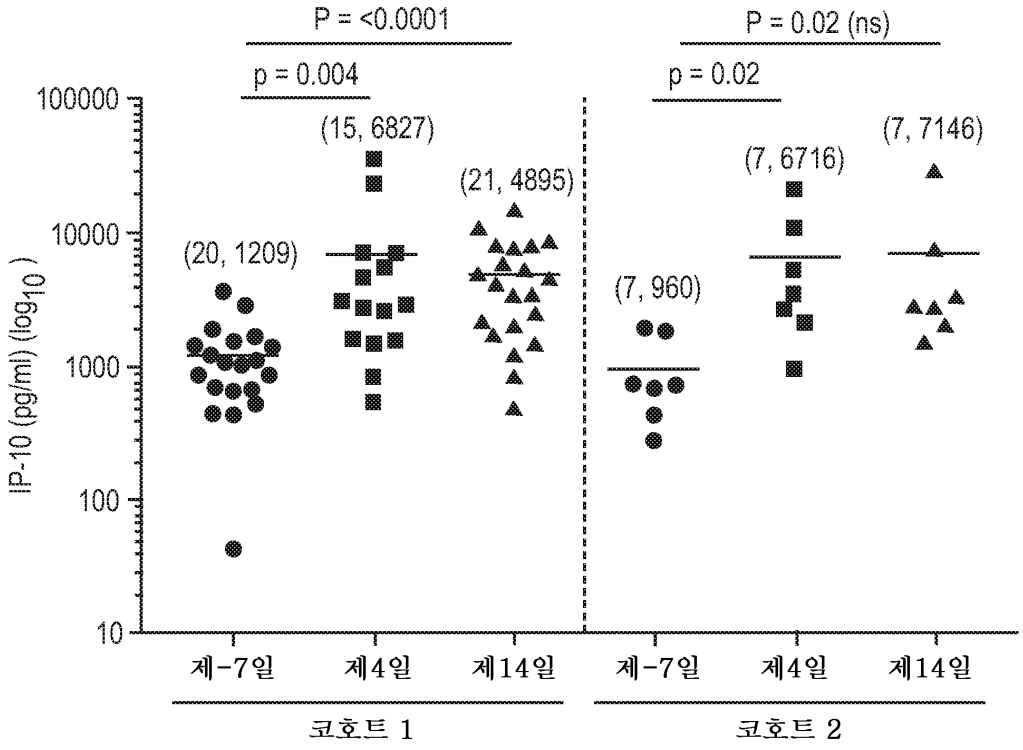
도면113


95
75
55
35
15
0
-15
-35
-55
-75
-95
퍼센트 변화
PD
SD
PR
1
2
3
4
5
6
7
8
제0일
LN-144 주입
스크리닝
제-14일
제42일
제84일
제126일
방문

도면114


10000
1000
100
10
1
0.1
HMGB1 (ng/ml) (log10)
P = 0.1 (ns)
p = 0.0004
P = 0.2 (ns)
p = 0.02
(20, 25.9)
(15, 11.1)
(21, 39.8)
(7, 25.1)
(7, 5.6)
(7, 84.8)
제-7일
제4일
제14일
제-7일
제4일
제14일
코호트 1
코호트 2

도면115


P = <0.0001
p = 0.004
P = 0.02 (ns)
p = 0.02
100000
10000
1000
100
10
IP-10 (pg/ml) (log10)
(20, 1209)
(15, 6827)
(21, 4895)
(7, 960)
(7, 6716)
(7, 7146)
제-7일
제4일
제14일
제-7일
제4일
제14일
코호트 1
코호트 2

도면116

특징	코호트 2 N = 17, (%)
성별, n (%)	
남성	8 (47)
여성	9 (53)
연령	
중위	54
최소, 최대	35, 66
사전 요법, n (%)	
사전 전신 요법의 평균 #	3.6
항-CTLA-4	15 (88)
항-PD-1	16 (94)
직경의 표적 병변 합계 (mm)	
평균 (SD)	140 (93)
최소, 최대	38, 342

특징	코호트 2 N = 17, (%)
기준선 ECOG, n (%)	
0	11 (65)
1	6 (35)
BRAF 상태, n (%)	
돌연변이된	5 (29)
야생형	9 (53)
미지	3 (18)
기준선 LDH (U/L [SD])	
1 내지 2회 ULN	8 (47)
> 2회 ULN	2 (12)
표적 및 비-표적 병변의 수 (기준선에서)	
> 3	12 (71)
평균	5.9

코호트 2는

3.6 중위 사전 요법

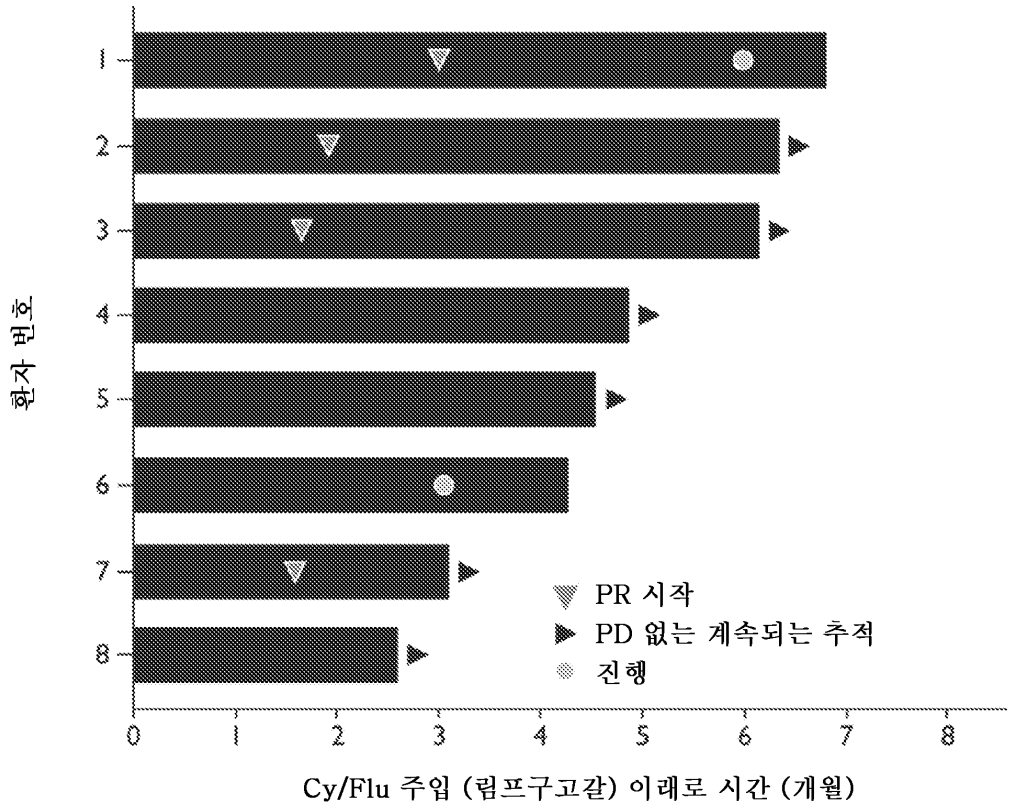
표적 병변에 대한 140 mm 직경의 합계에 의해 반영된 바와 같은 기준선에서의 높은 종양 부하를 갖는다.

도면117

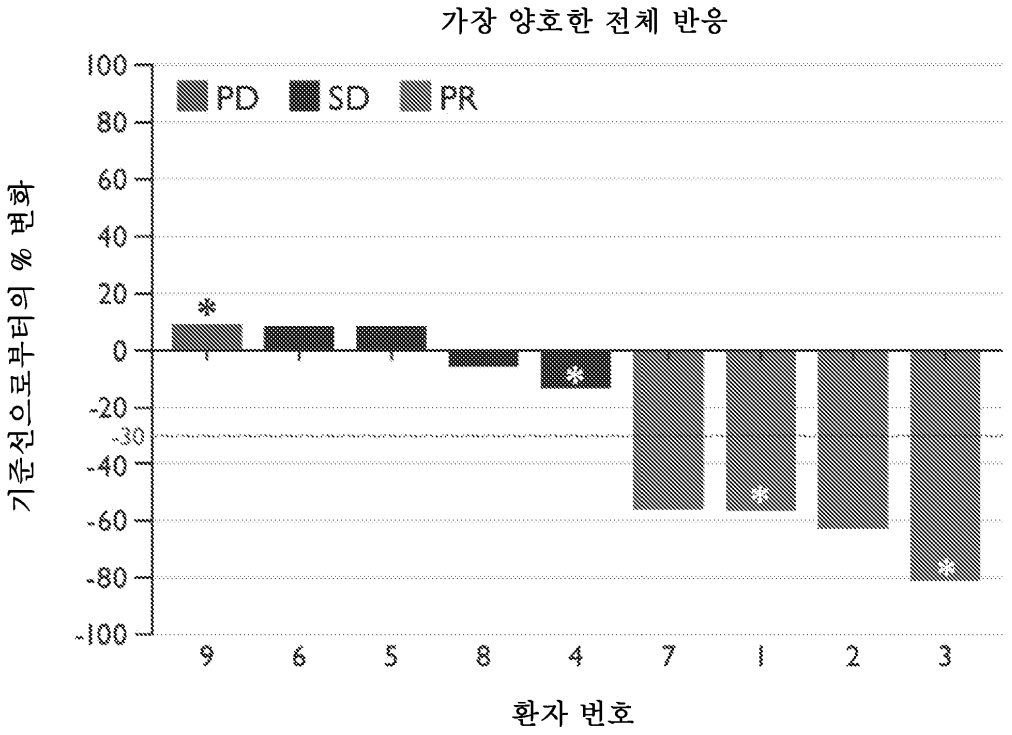
바람직한 기간	코호트 2 (N = 17)		
	임의의 등급 n (%)	등급 3/4 n (%)	등급 5 n (%)
적어도 1회의 치료-긴급 AE를 보고한 환자의 수	16 (94.1)	16 (94.1)	0
발열	13 (76.5)	1 (5.9)	0
빈혈	11 (64.7)	10 (58.8)	0
감소된 호중구 카운트	10 (58.8)	10 (58.8)	0
감소된 혈소판 카운트	10 (58.8)	8 (47.1)	0
열성 호중성백혈구감소증	10 (58.8)	8 (47.1)	0
피로	10 (58.8)	0	0
오한	9 (52.9)	1 (5.9)	0
구역	9 (52.9)	0	0
감소된 백혈구 카운트	8 (47.1)	8 (47.1)	0
감소된 림프구 카운트	6 (35.3)	6 (35.3)	0
설사	6 (35.3)	0	0
감소된 식욕	6 (35.3)	0	0

주: 주어진 바람직한 기간에 대해 다수의 사건을 갖는 환자는 각각의 바람직한 기간 하에 최대 등급을 사용하여 단지 1회 카운팅된다. 치료-긴급 유해 사건은 사전-치료 화학요법 (플루다라빈 및 시클로포스파미드)의 제1 용량 날짜에 또는 그 후 시작하여 IL2의 마지막 용량 + 30일까지의 모든 AE를 지칭한다.

도면118


환자 번호
1
2
3
4
5
6
7
8
PR 시작
PD 없는 계속되는 추적
진행
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Cy/Flu 주입 (림프구고갈) 이래로 시간 (개월)

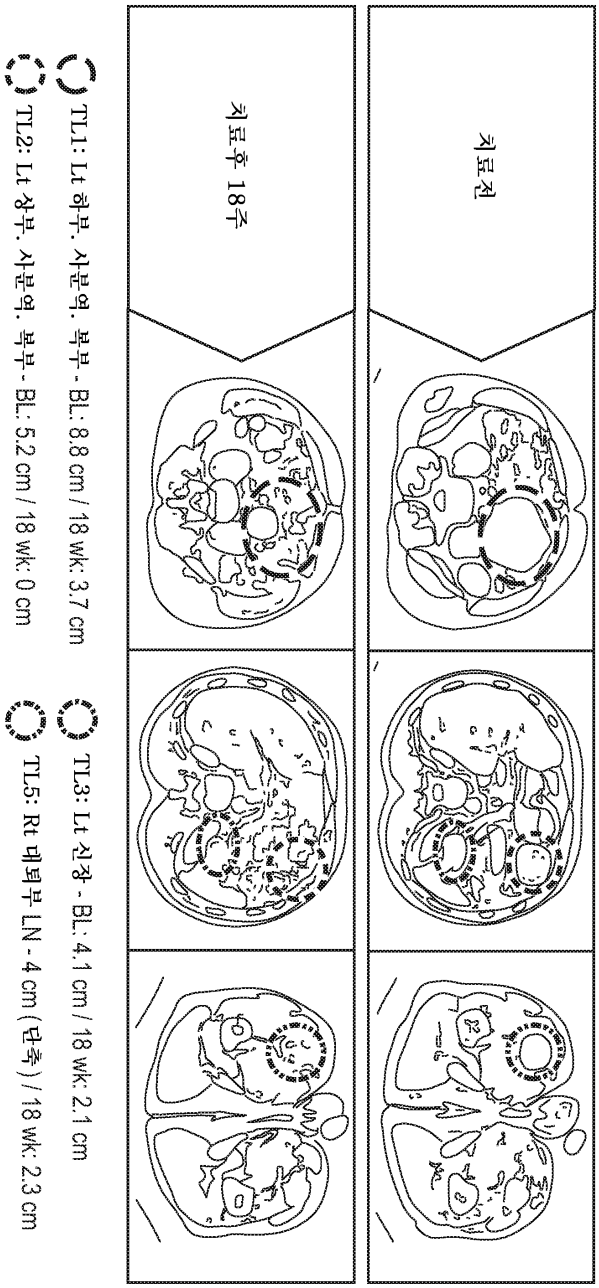
도면119


가장 양호한 전체 반응
기준선으로부터의 % 변화
PD
SD
PR
100
80
60
40
20
0
-20
-30
-40
-60
-80
-100
9
6
5
8
4
7
1
2
3
환자 번호

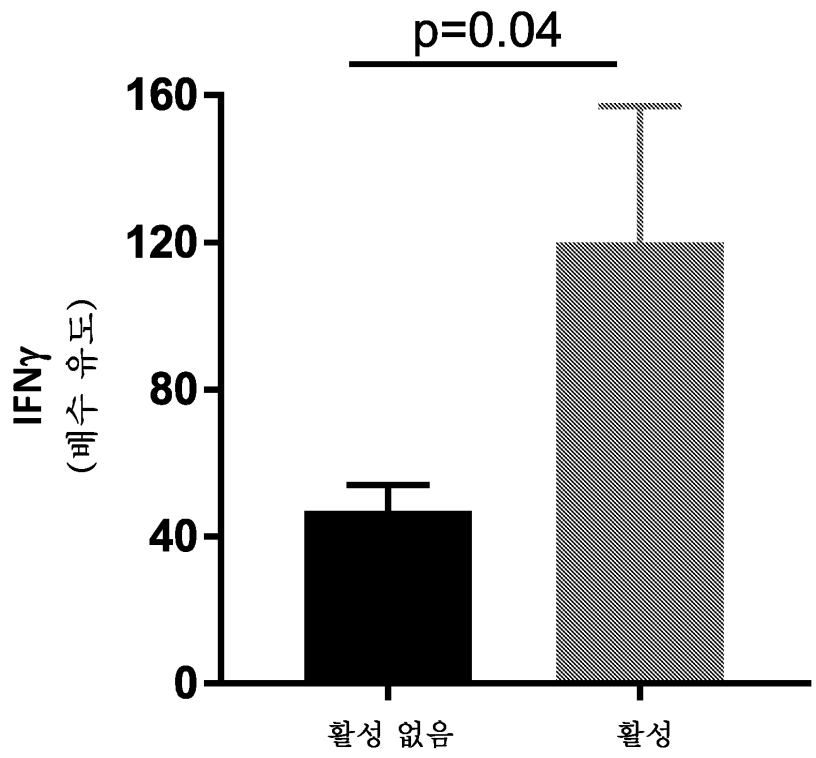
도면120

반응	환자, N=10 n (%)
객관적 반응율	**4 (40%)**
질환 제어율	8 (80%)
부분적 반응	4 (40%)
안정한 질환	4 (40%)
진행성 질환	1 (10%)
비-평가가능함*	1 (10%)

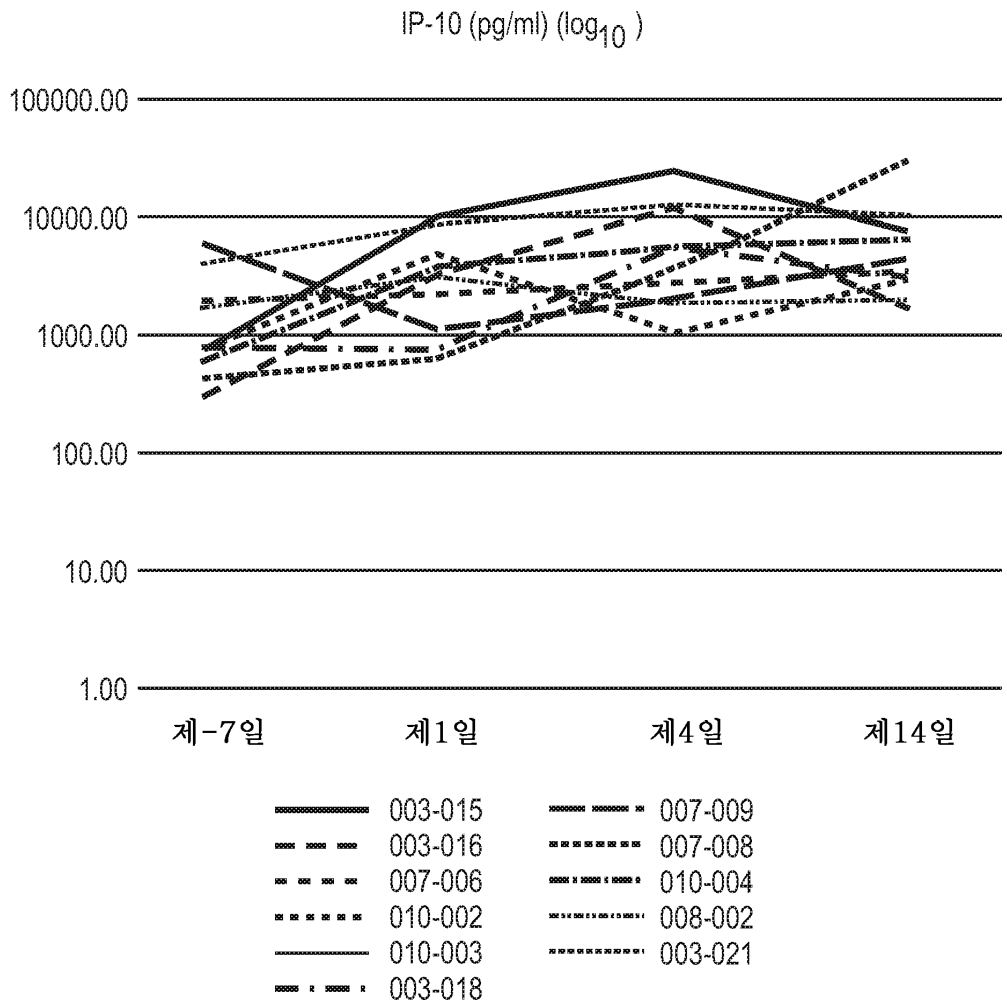
도면121


치료 전
치료후 18주
TL1: Lt 하부. 사분역. 복부 - BL: 8.8 cm / 18 wk: 3.7 cm
TL2: Lt 상부. 사분역. 복부 - BL: 5.2 cm / 18 wk: 0 cm
TL3: Lt 신장 - BL: 4.1 cm / 18 wk: 2.1 cm
TL5: Rt 대퇴부 LN - 4 cm (단축) / 18 wk: 2.3 cm

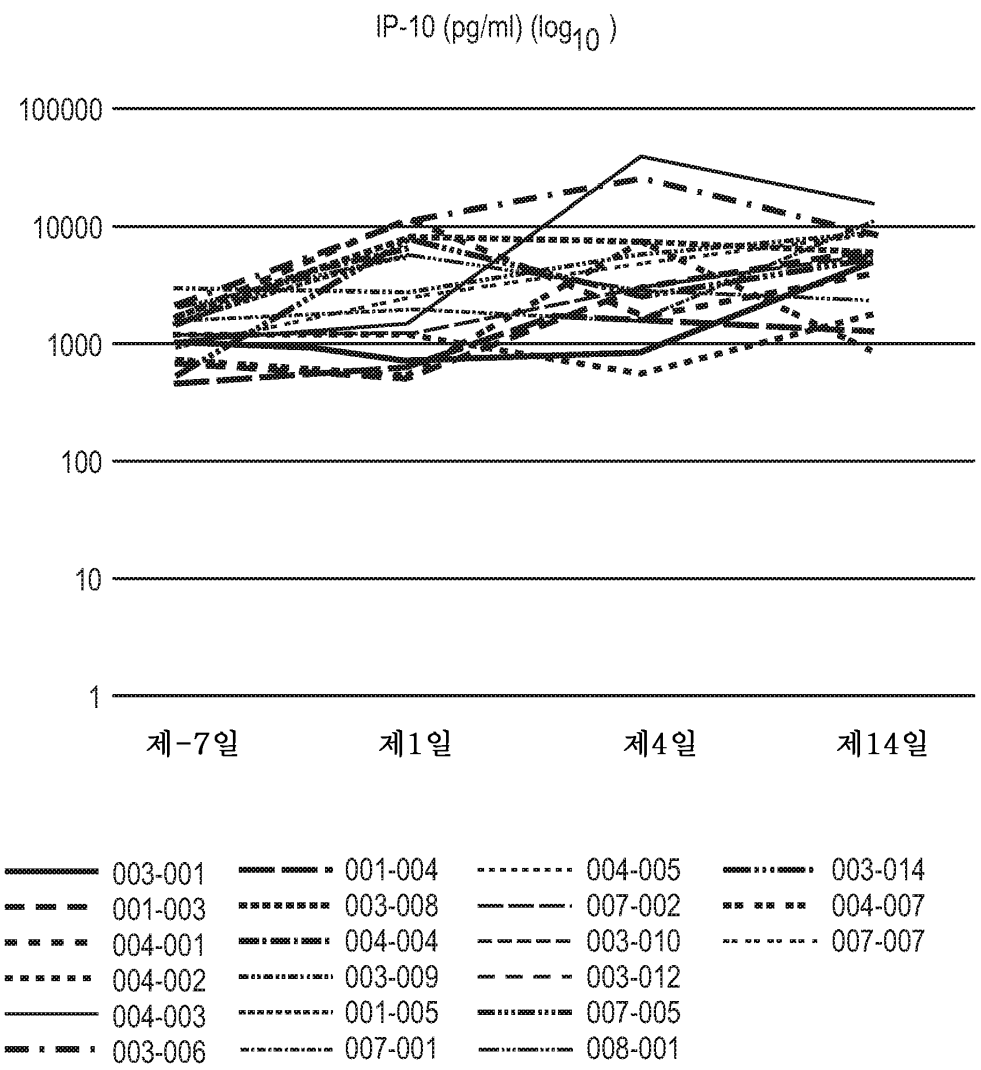
도면122



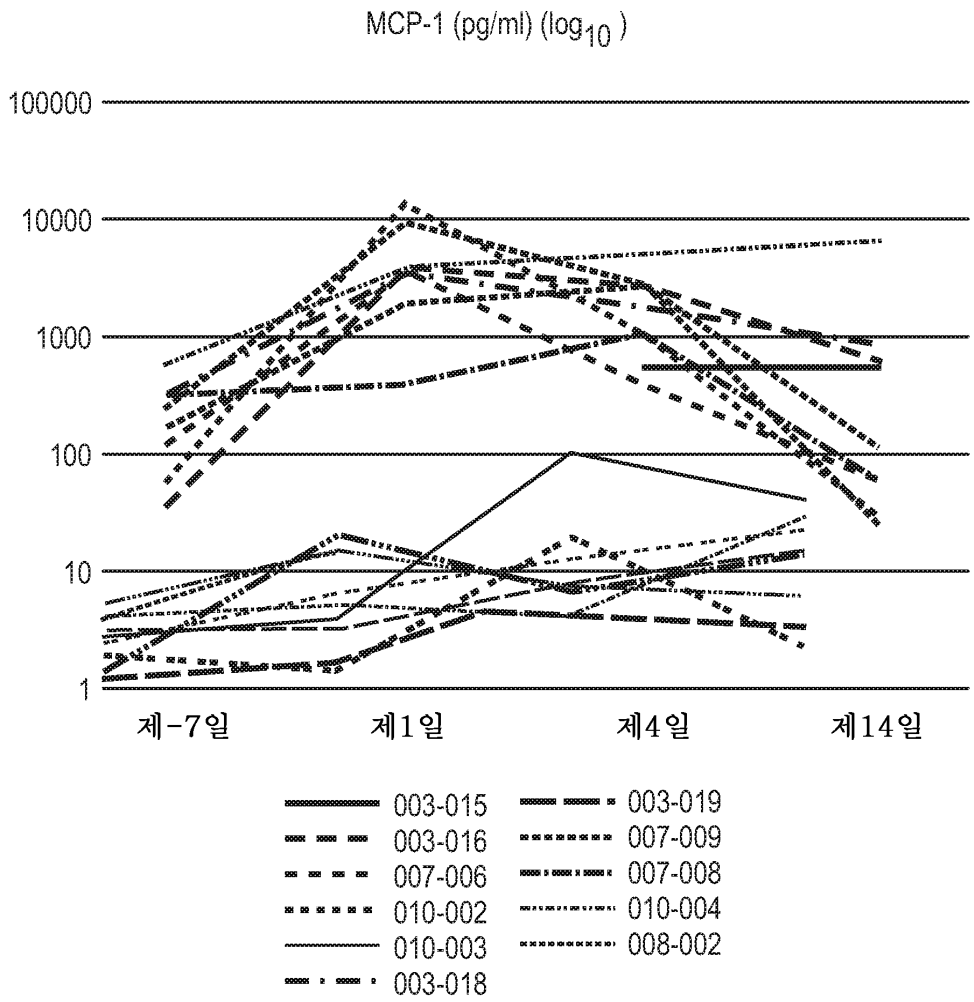
도면123


IP-10 (pg/ml) (log10)
100000.00
10000.00
1000.00
100.00
10.00
1.00
제-7일
제1일
제4일
제14일
003-015
003-016
007-006
010-002
010-003
003-018
007-009
007-008
010-004
008-002
003-021

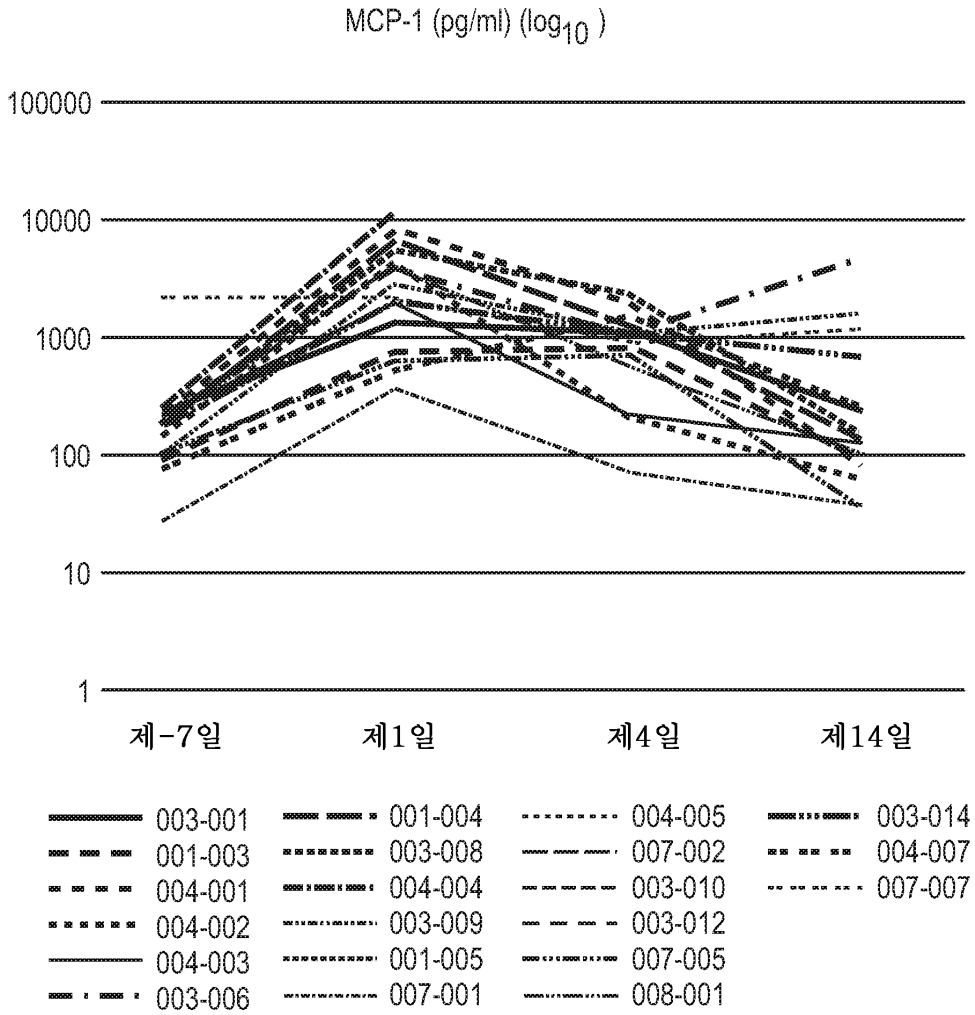
도면124


IP-10 (pg/ml) (log10)
100000
10000
1000
100
10
1
제-7일
제1일
제4일
제14일
003-001
001-003
004-001
004-002
004-003
003-006
001-004
003-008
004-004
003-009
001-005
007-001
004-005
007-002
003-010
003-012
007-005
008-001
003-014
004-007
007-007

도면125


MCP-1 (pg/ml) (log10)
100000
10000
1000
100
10
1
제-7일
제1일
제4일
제14일
003-015
003-016
007-006
010-002
010-003
003-018
003-019
007-009
007-008
010-004
008-002

도면126


MCP-1 (pg/ml) (log10)
100000
10000
1000
100
10
1
제-7일
제1일
제4일
제14일
003-001
001-003
004-001
004-002
004-003
003-006
001-004
003-008
004-004
003-009
001-005
007-001
004-005
007-002
003-010
003-012
007-005
008-001
003-014
004-007
007-007

도면127

자궁경부 암종 (C-145-04)

환자 번호	주입	주입된 세포 #	반응 제42일	반응 제84일	반응 제126일	6개월에서의 반응	9개월에서의 반응	BOR
1	2017년 8월 9일	326억개	PR	PR	-	-	-	-
2	2017년 9월 19일	414억개	SD (확인 필요)	-	-	-	-	-

HNSCC (C-145-03)

환자 번호	주입	주입된 세포 #	반응 제28일	반응 제56일	반응 제84일	4개월에서의 반응	6개월에서의 반응	BOR
1	2017년 5월 31일	210억개	SD	PD	중단됨	-	-	SD
2	2017년 6월 20일	210억개	PR	SD	SD	사망함	-	SD
3	2017년 8월 1일	300억개	PR	PR	PR	PD	-	PR
4	2017년 9월 14일	650억개	PR	PR	-	-	-	PR
5	2017년 11월 3일	100억개	-	-	-	-	-	-
6	2017년 11월 7일	370억개	-	-	-	-	-	-
7	2017년 11월 8일	215억개	-	-	-	-	-	-

HNSCC에 대한 중위 사전 요법: 4, 모두는 저조한 항-PD-1을 가졌다. 데이터는 실시간이며, 변경되기 쉽다.

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> IOVANCE BIOTHERAPEUTICS, INC.

Bender, James

Wardell, Seth

Lotze, Michael T.

<120> PROCESSES FOR PRODUCTION OF TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTES AND USES OF SAME IN IMMUNOTHERAPY

<130> 116983-5017

<150> 62/478,506

<151> 2017-03-29

<150> 62/539,410

<151> 2017-07-31

<150> 62/548,306

<151> 2017-08-21

<150> 62/554,538

<151> 2017-09-05

<150> 62/559,374

<151> 2017-09-15

<150> 62/567,121

<151> 2017-10-02

<150> 62/577,655

<151> 2017-10-26

<150> 62/582,874

<151> 2017-11-07

<150> 62/596,374

<151> 2017-12-08

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Muromonab heavy chain

<400> 1

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr
115 120 125
Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Gly Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu
130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175
Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser
180 185 190
Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser
195 200 205
Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

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

290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 2

<211> 213

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Muromonab light chain

<400> 2

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Asn Arg Asn Glu Cys

210

<210> 3

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant human IL-2 (rhIL-2)

<400> 3

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro
35 40 45

Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu
50 55 60

Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His
65 70 75 80

Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
85 90 95

Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr
100 105 110

Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser
115 120 125

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 4

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Aldesleukin

<400> 4

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu
1 5 10 15

Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn
20 25 30

Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys
35 40 45

Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
50 55 60

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg
65 70 75 80

Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys

85 90 95

Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
100 105 110
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ser Gln Ser Ile Ile
115 120 125
Ser Thr Leu Thr
130

<210> 5
<211> 130
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> recombinant human IL-4 (rhIL-4)
<400> 5
Met His Lys Cys Asp Ile Thr Leu Gln Glu Ile Ile Lys Thr Leu Asn
1 5 10 15

Ser Leu Thr Glu Gln Lys Thr Leu Cys Thr Glu Leu Thr Val Thr Asp
20 25 30
Ile Phe Ala Ala Ser Lys Asn Thr Thr Glu Lys Glu Thr Phe Cys Arg
35 40 45
Ala Ala Thr Val Leu Arg Gln Phe Tyr Ser His His Glu Lys Asp Thr
50 55 60
Arg Cys Leu Gly Ala Thr Ala Gln Gln Phe His Arg His Lys Gln Leu
65 70 75 80

Ile Arg Phe Leu Lys Arg Leu Asp Arg Asn Leu Trp Gly Leu Ala Gly
85 90 95
Leu Asn Ser Cys Pro Val Lys Glu Ala Asn Gln Ser Thr Leu Glu Asn
100 105 110
Phe Leu Glu Arg Leu Lys Thr Ile Met Arg Glu Lys Tyr Ser Lys Cys
115 120 125
Ser Ser
130

<210> 6

<211> 153

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant human IL-7 (rhIL-7)

<400> 6

Met Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val
1 5 10 15

Leu Met Val Ser Ile Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly
20 25 30

Ser Asn Cys Leu Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys
35 40 45

Asp Ala Asn Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu
50 55 60

Arg Gln Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu
65 70 75 80

Leu Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln
85 90 95

Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr Lys
100 105 110

Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu Asn Asp
115 120 125

Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn
130 135 140

Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His
145 150

<210> 7

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant human IL-15 (rhIL-15)

<400> 7

Met Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu

1 5 10 15

Ile Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val

20 25 30

His Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu

35 40 45

Gln Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val

50 55 60

Glu Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn

65 70 75 80

Val Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn

85 90 95

Ile Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile

100 105 110

Asn Thr Ser

115

<210> 8

<211> 132

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> recombinant human IL-21 (rhIL-21)

<400> 8

Met Gln Asp Arg His Met Ile Arg Met Arg Gln Leu Ile Asp Ile Val

1 5 10 15

Asp Gln Leu Lys Asn Tyr Val Asn Asp Leu Val Pro Glu Phe Leu Pro

20 25 30

Ala Pro Glu Asp Val Glu Thr Asn Cys Glu Trp Ser Ala Phe Ser Cys

35 40 45

Phe Gln Lys Ala Gln Leu Lys Ser Ala Asn Thr Gly Asn Asn Glu Arg

50 55 60

Ile Ile Asn Val Ser Ile Lys Lys Leu Lys Arg Lys Pro Pro Ser Thr

65 70 75 80

Asn Ala Gly Arg Arg Gln Lys His Arg Leu Thr Cys Pro Ser Cys Asp

85 90 95

Ser Tyr Glu Lys Lys Pro Pro Lys Glu Phe Leu Glu Arg Phe Lys Ser

100 105 110

Leu Leu Gln Lys Met Ile His Gln His Leu Ser Ser Arg Thr His Gly

115 120 125

Ser Glu Asp Ser

130