



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0108278
(43) 공개일자 2020년09월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) C07K 14/725 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7019671
(22) 출원일자(국제) 2018년12월07일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년07월07일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/064628
(87) 국제공개번호 WO 2019/113557
국제공개일자 2019년06월13일
(30) 우선권주장
62/596,774 2017년12월08일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
주노 세리퓨티크스 인코퍼레이티드
미국 워싱턴 98109 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400
(72) 발명자
무자킵, 미르나
미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400
라할조, 아이유
미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인이름리온

전체 청구항 수 : 총 178 항

(54) 발명의 명칭 **조작된 T 세포의 조성물을 제조하는 방법**

(57) 요약

본 발명은, 세포 요법에서 사용하기 위한, CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포와 같은 T 세포를 유전적으로 조작하기 위한 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 제공된 방법은 예를 들어 1:1의 비율로 농축된 CD4+ 및 CD8+ 세포를 풀링(pooling)하고, 이어서 자극 조건하에서 상기 세포를 인큐베이팅(incubating)하고, 형질도입(transduction) 또는 형질주입(transfection)을 통해서 상기 세포에 재조합 폴리펩티드를 도입하고/하거나 증식 및/또는 증폭을 촉진시키는 조건하에서 상기 세포를 배양(cultivating)하는 하나 이상의 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 제공된 방법은 높은 성공도로 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 효율적이고 신뢰할만한 수단이다.

(52) CPC특허분류

C12N 2500/90 (2013.01)
 C12N 2501/00 (2013.01)
 C12N 2501/50 (2013.01)
 C12N 2501/599 (2013.01)
 C12N 2501/998 (2013.01)

(72) 발명자

류체스네, 파스칼

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

쿠우-두옹, 키엔

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

아이푸와, 아이비

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

찬, 켈빈

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

(30) 우선권주장

62/614,965	2018년01월08일	미국(US)
62/716,971	2018년08월09일	미국(US)
62/721,604	2018년08월22일	미국(US)
62/740,903	2018년10월03일	미국(US)
62/754,564	2018년11월01일	미국(US)
62/774,165	2018년11월30일	미국(US)
62/774,855	2018년12월03일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

조작된 세포의 조성물의 제조방법으로서, 상기 제조방법은,

(a) CD4+ T 세포의 조성물 및 CD8+ T 세포의 조성물을 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율로 조합함으로써(combine), 투입 조성물(input composition)을 생성하는 단계;

(b) 상기 투입 조성물을 자극 조건(stimulating condition)하에 인큐베이션함으로써(incubation), 자극된 조성물을 생성하는 단계로서; 상기 자극 조건은 TCR 복합체(TCR complex)의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자(costimulatory molecule)의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약(stimulatory reagent)의 존재를 포함하는 것인 단계;

를 포함하고;

상기 투입 조성물은 적어도 100×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함하는, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 산출 조성물 중의 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 대상체로부터의 1차 샘플로부터 농축되거나 또는 선택되고, 선택적으로 상기 산출 조성물 중의 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 대상체로부터의 1차 샘플로부터 별도로 농축되거나 또는 선택되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 CD4+ T 세포의 조성물은 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 CD4+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 CD8+ T 세포의 조성물은 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 5

조작된 세포의 조성물의 제조방법으로서, 상기 제조방법은,

투입 조성물을 자극 조건하에 인큐베이션함으로써, 자극된 조성물을 생성하는 단계를 포함하되,

상기 투입 조성물은 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율로 포함하고, 상기 투입 조성물은 적어도 100×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함하며;

상기 자극 조건은 TCR 복합체의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함하는,

조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 인큐베이션은 무혈청 배지 중에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은, CD4+ 세포 또는 CD8+ T 세포인 세포를 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 100×10^6 내지 500×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 (약) 300×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 생존 세포인 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 11

제 1 항 내지 제 10 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 1×10^6 개 세포/mL 내지 5×10^6 개 세포/mL의 농도로 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 11 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 (약) 3×10^6 개 세포/mL의 농도로 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 1.5:1 내지 1:1.5의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 14

제 1 항 내지 제 13 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 1.2:1 내지 0.8:1의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 (약) 1:1의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 16

제 1 항 내지 제 15 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성(surface positive)인 CD4+ 및 CD8+를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 17

제 16 항에 있어서,

CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 세포 대 CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD8+ 세포의 비는 (약) 1.1:1인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 18

제 1 항 내지 제 17 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 및 CD8+ 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 19

제 18 항에 있어서,

CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 세포 대 CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD8+ 세포의 비는 (약) 1.69:1인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 20

제 1 항 내지 제 19 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 CCR7에 대해 표면 양성이고 CD62L에 대해 표면 음성(surface negative)인 CD4+ 및 CD8+ 세포를, 선택적으로는 2.0:1 내지 1.5:1의 비율로 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 21

제 1 항 내지 제 20 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 자극된 조성물로부터 세포로 재조합 수용체를 도입시킴으로써 조작된 세포 조성물을 생성하되, 상기 도입은 상기 자극된 조성물의 세포를 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제제와 접촉시키는 것을 더 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 22

제 21 항에 있어서,

상기 접촉은 벡터를 사용한 형질주입(transfection)에 의한 것으로, 상기 벡터는 전이인자(transposon)이고, 선택적으로는 슬리핑 뷰티(Sleeping Beauty; SB) 전이인자, 피기백(PiggyBac) 전이인자이거나; 또는 상기 접촉은 바이러스 벡터를 사용한 형질도입(transduction)에 의한 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 23

제 1 항 내지 제 22 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 자극된 조성물로부터 세포로 재조합 수용체를 도입시킴으로써 조작된 세포 조성물을 생성하되, 상기 도입은 상기 자극된 조성물의 세포를 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터로 형질도입하는 것을 더 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 24

제 21 항 내지 제 23 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입은 무혈청 배지 중에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 25

제 21 항 내지 제 24 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 300×10^6 개 미만의 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 26

제 21 항 내지 제 25 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 50×10^6 개 내지 200×10^6 개의 세포, 선택적으로는 약 100×10^6 개의 세포, 예를 들어 약 100×10^6 개의 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 27

제 21 항 내지 제 25 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 적어도 약 100×10^6 개의 세포 및 약 200×10^6 개까지의 세포, 예를 들어 적어도 약 100×10^6 개 및 약 200×10^6 개까지의 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 28

제 21 항 내지 제 27 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 3×10^6 개 세포/mL 미만의 농도를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 29

제 21 항 내지 제 28 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 0.5×10^6 개 세포/mL 내지 2×10^6 개의 세포/mL의 농도를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 30

제 21 항 내지 제 29 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 (약) 1×10^6 개 세포/mL의 농도를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 31

제 21 항 내지 제 30 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 제조할 수용체를 상기 자극된 조성물의 세포로 도입하기 전에 자극 조건하에 인큐베이션한 후 상기 자극된 조성물의 조성을 조정하는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 32

제 21 항 내지 제 31 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 자극된 조성물의 세포는 생존 세포인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 33

조작된 세포의 조성물의 제조방법으로서, 상기 제조방법은,

제조합 수용체를 T 세포 조성물의 세포로 도입하는 단계를 포함하되,

상기 T 세포 조성물은 적어도 또는 적어도 약 1×10^6 개의 생존 세포/mL의 농도로 포함하고, 상기 T 세포 조성물의 세포의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포인,

조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 34

제 33 항에 있어서,

상기 T 세포 조성물의 농도는 5×10^6 개 미만의 생존 세포/mL인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 35

제 33 항 또는 제 34 항에 있어서,

상기 T 세포 조성물은 적어도 또는 적어도 약 또는 약 100×10^6 개의 생존 세포를 포함하거나, 또는 상기 T 세포 조성물은 적어도 약 100×10^6 개의 생존 세포 및 약 약 200×10^6 개까지의 생존 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 36

제 33 항 내지 제 35 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 T 세포 조성물은 300×10^6 개 미만의 생존 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 37

제 33 항 내지 제 36 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입은, 상기 T 세포를 형질도입에 의해서 상기 제조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터와 접촉시키는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 38

제 33 항 내지 제 37 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입은 무혈청 배지 중에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 39

제 33 항 내지 제 38 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 T 세포 조성물의 하나 이상의 세포는 활성화되고/되거나 상기 IDL 수용체의 표면 발현을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 40

제 33 항 내지 제 39 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 세포 조성물의 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 또는 적어도 60%는,

(i) HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L 및 4-1BB로 이루어진 군으로부터 선택된 표면 마커(surface marker)를 발현하고;

(ii) IL-2, IFN-감마, TNF-알파로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인의 세포내 발현을 포함하고;

(iii) 상기 세포 사이클의 G1 또는 나중 단계(later phase)에 있고/있거나;

(iv) 증식(proliferating)할 수 있는 것인,

조작된 세포 조성물의 제조방법.

청구항 41

제 33 항 내지 제 40 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입 이전에, 상기 조성물의 세포는 자극 조건하에 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하는 투입 조성물을 인큐베이션하는 것을 포함하는 공정에 의해서 생성되고, 상기 자극 조건은 TCR 복합체의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함하는 것인, 조작된 세포 조성물의 제조방법.

청구항 42

제 41 항에 있어서,

상기 인큐베이션은 무혈청 배지 중에서 수행되고, 선택적으로 상기 도입은 상기 인큐베이션에 대한 무혈청 배지와 동일하거나 상이한 조성물의 무혈청 배지 중에서 수행되는 것인, 조작된 세포 조성물의 제조방법.

청구항 43

조작된 세포 조성물의 제조방법으로서, 상기 제조방법은,

(a) 투입 조성물을 자극 조건하에 인큐베이션함으로써, 자극된 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 투입 조성물은 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율을 포함하고 적어도 100×10^6 개의 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함하며, 상기 자극 조건은 TCR 복합체(TCR complex)의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함하는 것인 단계; 및

(b) 재조합 수용체를 상기 자극된 조성물의 300×10^6 개 미만의 세포로 도입함으로써 조작된 세포 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 도입은 상기 자극된 조성물의 세포를 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터와 접촉시키는 것을 포함하는 것인 단계;

를 포함하는, 조작된 세포 조성물의 제조방법.

청구항 44

제 43 항에 있어서,

상기 인큐베이션 및/또는 상기 도입은 무혈청 배지 중에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 45

제 43 항 또는 제 44 항에 있어서,

상기 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 생존 세포인 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 46

제 44 항에 있어서,

상기 자극된 조성물로부터의 상기 세포는 생존 세포인 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 47

제 33 항 내지 제 46 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 2일 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 2일 이내에 개시되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 48

제 33 항 내지 제 47 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 36시간 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 36시간 이내에 개시되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 49

제 33 항 내지 제 48 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 30시간 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 30시간 이내에 개시되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 50

제 33 항 내지 제 49 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 조작된 세포의 증식 및/또는 증폭(expansion)을 촉진시키는 조건하에 상기 조작된 T 세포를 배양하여 상기 조작된 T 세포를 포함하는 산출 조성물을 제조하는 것을 더 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 51

제 50 항에 있어서,

상기 배양은 무혈청 배지 중에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 52

조작된 세포의 조성물의 제조방법으로서, 상기 제조방법은,

(a) 투입 조성물을 자극 조건하에 인큐베이션함으로써, 자극된 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 투입 조성물은 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율을 포함하고, 상기 투입 조성물은 적어도 100×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함하며; 상기 자극 조건은 TCR 복합체(TCR complex)의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함하는 것인 단계;

(b) 재조합 수용체를 상기 자극된 조성물로부터 300×10^6 개 미만의 세포로 도입함으로써 조작된 세포 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 도입은 상기 자극된 조성물의 세포를 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터와 접촉시키는 것을 포함하는 것인 단계; 및

(c) 상기 조작된 조성물을 상기 조작된 세포의 증식 및/또는 증폭을 촉진시키는 조건하에서 배양함으로써, 상기 조작된 T 세포를 포함하는 산출 조성물을 제조하는 단계

를 포함하는, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 53

제 52 항에 있어서,

상기 인큐베이션, 도입, 및 배양 단계들 중의 하나, 둘, 또는 모두는 무혈청 배지 또는 무혈청 배지 중에서 수행되고, 선택적으로 상기 무혈청 배지는 상기 동일한 조성물 또는 상이한 조성물들을 갖는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 54

제 41 항 내지 제 53 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 1.5:1 내지 1:1.5의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포, 1.2:1 내지 0.8:1의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포, 선택적으로는 (약) 1:1의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 55

제 41 항 내지 제 54 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 및 CD8+를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 56

제 55 항에 있어서,

CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 세포 대 CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD8+ 세포의 비는 (약) 1.1:1인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 57

제 41 항 내지 제 56 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 및 CD8+ 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 58

제 57 항에 있어서,

CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 세포 대 CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD8+ 세포의 비는 (약) 1.69:1인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 59

제 41 항 내지 제 58 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 CCR7에 대해 표면 양성이고 CD62L에 대해 표면 음성(surface negative)인 CD4+ 및 CD8+ 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 60

제 43 항 내지 제 59 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 300×10^6 개 미만의 세포, 선택적으로는 50×10^6 개 내지 200×10^6 개의 생존 세포, 및 선택적으로는 (약) 100×10^6 개의 생존 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 61

제 43 항 내지 제 59 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 적어도 약 100×10^6 개의 생존 세포 및 약 200×10^6 개까지의 생존 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 62

제 43 항 내지 제 61 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 3×10^6 개 세포/mL 미만의 농도를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 63

제 43 항 내지 제 62 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 0.5×10^6 개 세포/mL 내지 2×10^6 개의 세포/mL, 선택적으로는 (약) 1×10^6 개 세포/mL의 농도를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 64

제 43 항 내지 제 63 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 재조합 수용체를 상기 자극된 조성물의 세포로 도입하기 전에 자극 조건하에 인큐베이션한 후 상기 자극된 조성물의 조성물을 조정하는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 65

제 1 항 내지 제 64 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 인큐베이션은 하나 이상의 사이토카인의 존재하에서, 선택적으로는 무혈청 배지 중에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 66

제 65 항에 있어서,

상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2, 재조합 IL-7, 및/또는 재조합 IL-15로부터 선택되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 67

제 66 항에 있어서,

상기 하나 이상의 사이토카인은 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-2, 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7, 및/또는 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 68

제 66 항 또는 제 67 항에 있어서,

상기 하나 이상의 사이토카인은 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-2, 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7, 및 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 69

제 1 항 내지 제 68 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 자극된 조성물의 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 또는 적어도 60%는;

(i) HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L 및 4-1BB로 이루어진 군으로부터 선택된 표면 마커(surface marker)를 발현하고;

(ii) IL-2, IFN-감마, TNF-알파로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인의 세포내 발현을 포함하고;

(iii) 상기 세포 사이클의 G1 또는 나중 단계(later phase)에 있고/있거나;

(iv) 증식(proliferating)할 수 있는 것인,

조작된 세포 조성물의 제조방법. .

청구항 70

제 1 항 내지 제 69 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 자극 시약은, TCR 복합체의 일원(member)에 특이적으로 결합하는, 선택적으로는 CD3에 특이적으로 결합하는 1차 제제(primary agent)를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 71

제 70 항에 있어서,

상기 자극 시약은, T 세포 공동 자극 분자에 특이적으로 결합하는 2차 제제(secondary agent)를 더 포함하고, 선택적으로 상기 공동 자극 분자는 CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, 또는 ICOS로부터 선택되는 것인, 조작된 세포

의 조성물의 제조방법.

청구항 72

제 70 항 또는 제 71 항에 있어서,

상기 1차 제제 및/또는 2차 제제는 항체를 포함하고, 선택적으로 상기 자극 시약은 항-CD3 항체 및 항-CD28, 또는 그들의 항원-결합 단편과의 인큐베이션을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 73

제 71 항 또는 제 72 항에 있어서,

상기 1차 제제 및/또는 2차 제제는 고체 지지체의 표면 상에 존재하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 74

제 73 항에 있어서,

상기 고체 지지체는 비드(bead)이거나 또는 그를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 75

제 74 항에 있어서,

상기 비드는 (약) 3.5 μm 초과이지만 (약) 9 μm 이하 또는 (약) 8 μm 이하 또는 (약) 7 μm 이하 또는 (약) 6 μm 이하 또는 (약) 5 μm 이하의 직경을 갖는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 76

제 74 항 또는 제 75 항에 있어서,

상기 비드는 (약) 4.5 μm 의 직경을 갖는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 77

제 74 항 내지 제 76 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 비드는 불활성인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 78

제 74 항 내지 제 77 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 비드는 폴리스티렌 표면이거나 또는 그를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 79

제 74 항 내지 제 78 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 비드는 자성(magnetic)이거나 또는 초자성(superparamagnetic)인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 80

제 74 항 내지 제 79 항 중의 어느 한 항에 있어서,

비드 대 세포의 상기 비율은 3:1 미만인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 81

제 74 항 내지 제 80 항 중의 어느 한 항에 있어서,

비드 대 세포의 상기 비율은 (약) 2:1 내지 0.5:1이고, 선택적으로 비드 대 세포의 상기 비율은 (약) 1:1인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 82

제 71 항 내지 제 72 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 1차 제제 및 2차 제제는 복수의 스트렙타비딘(streptavidin) 또는 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 분자(streptavidin mutein molecules)를 포함하는 올리고머 입자 시약(oligomeric particle reagent)의 표면 위에 가역적으로 결합되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 83

제 1 항 내지 제 82 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 자극 조건하에 48시간 미만동안 인큐베이션되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 84

제 1 항 내지 제 83 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 자극 조건하에 12시간 내지 36시간동안(경계 포함) 인큐베이션되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 85

제 1 항 내지 제 84 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 자극 조건하에 18시간 내지 30시간동안(경계 포함) 인큐베이션되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 86

제 1 항 내지 제 85 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 투입 조성물은 자극 조건하에 (약) 24시간동안 인큐베이션되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 87

제 23 항 내지 제 86 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 48시간 미만동안 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 88

제 23 항 내지 제 87 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 12시간 내지 36시간(경계 포함)동안 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 89

제 23 항 내지 제 88 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 18시간 내지 30시간(경계 포함)동안 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 90

제 23 항 내지 제 89 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 (약) 24시간동안 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 91

제 23 항 내지 제 90 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터(retroviral vector)인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 92

제 23 항 내지 제 91 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터(lentiviral vector) 또는 감마레트로바이러스 벡터(gammaretroviral vector)인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 93

제 23 항 내지 제 92 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 형질도입 보조제(transduction adjuvant)의 부재하에서 수행된 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 94

제 23 항 내지 제 93 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 인큐베이션은 하나 이상의 사이토카인의 존재하에서, 선택적으로는 무혈청 배지 중에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 95

제 94 항에 있어서,

상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2, 재조합 IL-7, 및/또는 재조합 IL-15로부터 선택되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 96

제 94 항 또는 제 95 항에 있어서,

상기 하나 이상의 사이토카인은 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-2, 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7, 및/또는 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 97

제 94 항 내지 제 96 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 사이토카인은 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-2, 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7, 및 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 98

제 50 항 내지 제 97 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 배양의 적어도 일부는 혼합(mixing) 및/또는 관류(perfusion)로 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 99

제 98 항에 있어서,

상기 배양의 적어도 일부는 (약) 또는 적어도 500 mL/day, 600 mL/day, 700 mL/day, 750 mL/day, 800 mL/day, 900 mL/day, 1,000 mL/day, 1,200 mL/day, 1,400 mL/day, 1,500 mL/day, 1,600 mL/day, 1,800 mL/day, 및/또는 2,000 mL/day의 관류 속도로 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 100

제 98 항 또는 제 99 항에 있어서,

상기 배양의 적어도 제 1 부분은 (약) 또는 적어도 500 mL/day, 750 mL/day, 또는 1,000 mL/day의 관류 속도

로 수행되고, 상기 배양의 적어도 제 2 부분은 (약) 또는 적어도 1,200 mL/day, 1,400 mL/day, 또는 1,500 mL/day의 관류 속도로 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 101

제 98 항 내지 제 100 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 관류는 세포가 특정 밀도에 도달할 때 개시되고/되거나 증가되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 102

제 101 항에 있어서,

상기 특정 밀도는 (약) 또는 적어도 0.4×10^6 개의 세포, 0.5×10^6 개의 세포, 0.6×10^6 개의 세포, 0.8×10^6 개의 세포, 1.0×10^6 개의 세포, 1.2×10^6 개의 세포, 1.4×10^6 개의 세포, 1.6×10^6 개의 세포, 1.8×10^6 개의 세포, 2.0×10^6 개의 세포, 2.2×10^6 개의 세포, 또는 2.4×10^6 개의 세포인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 103

제 98 항 내지 제 102 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 관류는 상기 세포가 (약) 0.6×10^6 개 세포/mL의 밀도에 도달할 때 (약) 750 mL/day의 속도로 개시되고/되거나 증가되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 104

제 98 항에 있어서,

상기 관류는 상기 세포가 (약) 2.0×10^6 개 세포/mL의 밀도에 도달할 때 (약) 1500 mL/day의 속도로 개시되고/되거나 증가되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 105

제 50 항 내지 제 104 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 배양은 하나 이상의 사이토카인의 존재하에서, 선택적으로는 무혈청 배지 중에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 106

제 105 항에 있어서,

상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2, 재조합 IL-7, 및/또는 재조합 IL-15으로부터 선택되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 107

제 105 항 또는 제 106 항에 있어서,

상기 하나 이상의 사이토카인은 50 내지 400 IU/mL의 재조합 IL-2; 100 IU/mL 내지 2,000 IU/mL의 재조합 IL-7; 및/또는 50 내지 400 IU/mL의 재조합 IL-15을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 108

제 105 항 내지 제 107 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 사이토카인은 50 내지 400 IU/mL의 재조합 IL-2; 100 IU/mL 내지 2,000 IU/mL의 재조합 IL-7; 및 50 내지 400 IU/mL의 재조합 IL-15을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 109

제 50 항 내지 제 108 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 배양은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 3일 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 3일 이내에 개시되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 110

제 50 항 내지 제 109 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 배양은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 60시간 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 60시간 이내에 개시되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 111

제 50 항 내지 제 110 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 배양은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 48시간 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 48시간 이내에 개시되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 112

제 50 항 내지 제 111 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 배양은, 적어도 상기 조성물이 T 세포의 임계치의 수, 생존 T 세포의 임계치의 수, T 세포의 임계치의 농도, 생존 T 세포의 임계치의 농도에 도달할 때까지 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 113

제 112 항에 있어서,

상기 T 세포의 임계치의 수 또는 상기 생존 T 세포의 임계치의 수는 (약) 또는 적어도 2400×10^6 개 또는 5500×10^6 개의 핵 형성 세포(nucleated cell)의 총 수(total number)이고, 선택적으로 상기 핵 형성 세포의 총수의 생존율은 약 또는 적어도 약 75% 또는 약 또는 적어도 약 85%인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 114

제 112 항에 있어서,

상기 배양은, 상기 T 세포의 임계치의 수, 생존 T 세포의 임계치의 수, T 세포의 임계치의 농도, 생존 T 세포의 임계치의 농도가 도달된 후 적어도 1일동안 지속되고, 선택적으로 상기 T 세포의 임계치의 수 또는 상기 생존 T 세포의 임계치의 수는 (약) 또는 적어도 900×10^6 개, (약) 또는 적어도 1200×10^6 개, 또는 (약) 또는 적어도 3500×10^6 개의 핵 형성 세포의 총수인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 115

제 50 항 내지 제 114 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 T 세포의 임계치의 수는, 약 또는 적어도 약 85%의 생존율을 갖는 (약) 또는 적어도 2400×10^6 개의 핵 형성 세포의 총수인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 116

제 50 항 내지 제 114 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 T 세포의 임계치의 수는, (약) 또는 적어도 5500×10^6 개의 핵 형성 세포의 총수인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 117

제 50 항 내지 제 116 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 배양 후 상기 산출 조성물의 세포를 수거하는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 118

제 50 항 내지 제 117 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 배양 후 상기 산출 조성물의 세포를 수거하는 것을 포함하되, 상기 산출 조성물의 세포는 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시 후 적어도 9일 경과 후에 수거되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 119

제 50 항 내지 제 118 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 배양 후 상기 산출 조성물의 세포를 수거하는 것을 포함하되, 상기 산출 조성물의 세포는 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시 후 적어도 10일 경과 후에 수거되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 120

제 118 항 또는 제 119 항에 있어서,

8일 내지 25일 이내, 선택적으로는 14일 내지 18일 사이인 상기 인큐베이션의 개시와 상기 산출 조성물의 세포 수거 사이의 시간량(amount of time)의 95% 신뢰 구간을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 121

제 118 항 또는 제 119 항에 있어서,

9일 내지 21일 이내인 상기 인큐베이션의 개시와 상기 산출 조성물의 세포 수거 사이의 시간량의 95% 신뢰 구간을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 122

제 118 항 또는 제 119 항에 있어서,

9일 내지 16일 이내인 상기 인큐베이션의 개시와 상기 산출 조성물의 세포 수거 사이의 시간량의 95% 신뢰 구간을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 123

제 52 항 내지 제 122 항 중의 어느 한 항에 있어서,

선택적으로는 약학적으로 허용가능한 부형제의 존재하에 저온 보존(cryopreservation)을 위해 상기 산출 조성물의 세포를 제형화하고/하거나 대상체에 투여하는 것을 더 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 124

제 123 항에 있어서,

상기 산출 조성물의 세포는 저온 보호제(cryoprotectant)의 존재하에서 제형화되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 125

제 124 항에 있어서,

상기 저온 보호제는 DMSO를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 126

제 122 항 내지 제 125 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 산출 조성물의 상기 세포는 용기, 선택적으로는 바이알(vial) 또는 백(bag)에서 제형화되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 127

제 1 항 내지 제 126 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 인큐베이션 이전에 생물학적 샘플로부터 상기 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포를 단리시키는 것을 더 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 128

제 127 항에 있어서,

상기 단리는 CD4 및/또는 CD8의 표면 발현에 기초하여, 선택적으로는 양성 또는 음성 선별에 의해서 세포를 선별하는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 129

제 127 항 또는 제 128 항에 있어서,

상기 단리는 면역 친화성-기반 선별(immunoaffinity-based selection)을 수행하는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 130

제 127 항 내지 제 129 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 대상체로부터 수득된 1차 T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 131

제 130 항에 있어서,

상기 대상체는 인간 대상체인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 132

제 127 항 내지 제 131 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 생물학적 샘플은 전혈 샘플(whole blood sample), 버피 코트 샘플(buffy coat sample), 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 샘플, 비분획 T 세포 샘플(unfractionated T cell sample), 림프구 샘플, 백혈구 샘플, 성분 채집 생성물(apheresis product), 또는 백혈구 생성물(leukapheresis product)이거나 또는 그들을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 133

제 1 항 내지 제 132 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 재조합 수용체는 질병, 장애 또는 병태의 세포 또는 조직과 관련되고, 그에 특이적이고/이거나 그 위에서 발현되는 표적 항원에 결합할 수 있는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 134

제 133 항에 있어서,

상기 질병, 장애 또는 병태는 감염성 질병 또는 장애, 자가면역 질병, 염증성 질병, 또는 종양 또는 암인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 135

제 133 항 또는 제 134 항에 있어서,

상기 표적 항원은 종양 항원인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 136

제 133 항 내지 제 135 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 표적 항원은,

5T4, 8H9, avb6 인테그린, B7-H6, B 세포 성숙화 항원(BCMA), CA9, 암성-고환 항원, 탄산 무수화 효소 9(CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, B형 간염 표면 항원, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸 4(CSPG4), 암배아성 항원(CEA), CE7, 사이클린, 사이클린 A2, c-Met, 이중 항원, EGFR, 상피 당단백질 2(epithelial glycoprotein 2, EPG-2), 상피 당단백질 40(EPG-40), EPHA2, 에프린B2(efrinB2), erb-B2, erb-B3, erb-B4, erbB 이합체들, EGFR vIII, 에스트로겐 수용체, 태아 AchR, 엽산 수용체 알파, 엽산 결합 단백질(FBP), FCRL5, FCRH5, 태아 아세틸콜린 수용체, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, 글리피칸-3(GPC3), G 단백질-결합 수용체 클래스 그룹 5 멤버 D(GPRC5D), Her2/neu(수용체 티로신 키나아제 erbB2), HMW-MAA, IL-22R-알파, IL-13 수용체 알파 2(IL-13R α 2), 키나아제 삽입 도메인 수용체(kdr), 카파 경쇄, 루이스 Y, L1-세포 접착 분자(L1-CAM), 흑색종-관련 항원(MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, MAGE-A10, 메소텔린(MSLN), 쥐-CMV, 뮤신 1(mucin 1, MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, O-아세틸화 GD2(OGD2), 종양 태아성 항원(oncofetal antigen), 흑색종에서 우선적으로 발현되는 항원(PRAME), PSCA, 프로게스테론 수용체, 서바이빈, ROR1, TAG72, 티로시나제 관련된 단백질 1(TRP1, TYRP1 또는 gp75로도 알려짐), 티로시나제 관련된 단백질 2(TRP2, 도파크롬 타우토머라제(dopachrome tautomerase), 도파크롬 델타-아이소머라제(dopachrome delta-isomerase) 또는 DCT로도 알려짐), VEGF 수용체, VEGF-R2, 윌름스 종양 1(WT-1), 병원균-특이적 항원 및 범용 태그와 관련된 항원

중에서 선택되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 137

제 1 항 내지 제 136 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 재조합 수용체는 기능성 비-TCR 항원 수용체 또는 TCR 또는 그들의 항원-결합 단편이거나 또는 그들을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 138

제 1 항 내지 제 137 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 재조합 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 139

제 1 항 내지 제 138 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 재조합 수용체는 항-BCMA CAR인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 140

제 138 항 또는 제 139 항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 항원-결합 도메인을 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 141

제 140 항에 있어서,

상기 항원-결합 도메인은 항체 또는 그의 항체 단편이거나 그들을 포함하고, 선택적으로는 단쇄 단편(single chain fragment)인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 142

제 141 항에 있어서,

상기 단편은 가요성 링커(flexible linker)에 의해서 연결된(joined) 항체 가변 영역을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 143

제 141 항 또는 제 142 항에 있어서,

상기 단편은 scFv를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 144

제 138 항 내지 제 143 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 스페이서(spacer) 또는 힌지 영역(hinge region)을 더 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 145

제 138 항 내지 제 144 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 세포내 신호전달 영역(intracellular signaling region)을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 146

제 145 항에 있어서,

상기 세포내 신호전달 영역은 세포내 신호전달 도메인(intracellular signaling domain)을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 147

제 146 항에 있어서,

상기 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 도메인(primary signaling domain), T 세포에서 1차 활성화 신호(primary activation signal)를 유도할 수 있는 신호전달 도메인, T 세포 수용체(TCR) 요소의 신호전달 도메인 및/또는 면역 수용체 티로신-계 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 신호전달 도메인이거나 또는 그들을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 148

제 146 항 또는 제 147 항에 있어서,

상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3 쇠(chain)의 세포내 신호전달 도메인, 선택적으로는 CD3-제타(CD3 ζ) 쇠, 또는 그의 신호전달 부분(signaling portion)이거나 또는 그들을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 149

제 145 항 내지 제 148 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 키메라 항원 수용체는 추가로 상기 세포외 도메인과 상기 세포내 신호전달 영역 사이에 배치된 막관통 도메인(transmembrane domain)을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 150

제 145 항 내지 제 149 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 세포내 신호전달 영역은 동시 자극 신호전달 영역(costimulatory signaling region)을 더 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 151

제 150 항에 있어서,

상기 동시 자극 신호전달 영역은 T 세포 동시 자극 분자의 세포내 신호전달 도메인 또는 그의 신호전달 부분을

포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 152

제 150 항 또는 제 151 항에 있어서,

상기 동시 자극 신호전달 영역은 CD28, a 4-1BB 또는 ICOS의 세포내 신호전달 도메인 또는 그의 신호전달 부분을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 153

제 150 항 내지 제 152 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 동시 자극 신호전달 영역은 상기 막관통 도메인과 상기 세포내 신호전달 영역 사이에 있는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 154

제 113 항 내지 제 153 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 임계치의 수 또는 그 초과수의 세포를 포함하는 상기 산출 조성물은, 상기 제조방법의 반복의 (약) 85% 초과, (약) 90% 초과 또는 (약) 95% 초과 중에서 생성되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 155

제 1 항 내지 제 154 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 무혈청 배지는;

기본 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민 0.5 mM 내지 5 mM;

L-글루타민 0.5 mM 내지 5 mM; 및

적어도 하나의 단백질;

을 포함하되,

상기 배지는 무혈청인

것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 156

제 155 항에 있어서,

상기 디펩티드 형태의 L-글루타민은 L-알라닐-L-글루타민인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 157

제 155 항 또는 제 156 항에 있어서,

상기 무혈청 배지 중의 상기 디펩티드 형태의 L-글루타민의 농도는 (약) 2 mM인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 158

제 155 항 내지 제 157 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 무혈청 배지 중의 L-글루타민의 농도는 (약) 2 mM인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 159

제 155 항 내지 제 158 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 적어도 하나의 단백질은 하나 이상의 알부민, 인슐린 또는 트랜스페린(transferrin), 선택적으로는 하나 이상의 인간 또는 재조합 알부민, 인슐린 또는 트랜스페린을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 160

제 1 항 내지 제 159 항 또는 제 165 항 내지 제 177 항 중의 어느 한 항의 제조방법에 의해서 제조된 조작된 세포를 포함하는 조성물.

청구항 161

제 160 항에 있어서,
약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 것인 조성물.

청구항 162

제 160 항 또는 제 161 항에 있어서,
저온 보호제(cryoprotectant), 선택적으로는 DMSO를 포함하는 것인 조성물.

청구항 163

제 160 항 내지 제 162 항 중의 어느 한 항의 조성물, 및 산출 조성물을 대상체에 투여하기 위한 지침을 포함하는 제조 제품.

청구항 164

제 163 항에 있어서,
상기 대상체는 질병 또는 병태를 갖고, 선택적으로 상기 제조용 수용체는 상기 질병 또는 병태의, 세포와 관련되거나 또는 그 위에서 발현하거나 또는 존재하는 항원을 특이적으로 인식하거나 또는 그에 특이적으로 결합하는 것인, 제조 제품.

청구항 165

제 55 항 내지 제 159 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 배양의 적어도 일부동안, 상기 세포는 세포 생존율, 농도, 밀도, 수, 또는 그의 조합에 대해 모니터링되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 166

제 165 항에 있어서,
상기 모니터링은 광학 방법(optical method), 선택적으로 현미경에 의해서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 167

제 165 항 또는 제 166 항에 있어서,
상기 모니터링은 명 시야 현미경(bright field microscopy), 형광 현미경, 시차 간섭 콘트라스트 현미경(differential interference contrast microscopy), 위상 콘트라스트 현미경(phase contrast microscopy), 디지털 홀로그래피 현미경(DHM), 시차 디지털 홀로그래피 현미경(DDHM), 또는 이들의 조합에 의해서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 168

제 165 항 내지 제 167 항 중의 어느 한 항에 있어서,
상기 모니터링은 시차 디지털 홀로그래피 현미경(DDHM)에 의해서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 169

제 165 항 내지 제 168 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 모니터링은 상기 배양의 적어도 일부동안 간헐적으로 또는 연속적으로 수행되고, 선택적으로는 상기 배양 도중에 적어도 매 1시간, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 또는 26시간동안 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 170

제 165 항 내지 제 169 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 모니터링은, 상기 세포가 T 세포의 임계치의 수, 생존 T 세포의 임계치의 수, T 세포의 임계치의 농도 또는 생존 T 세포의 임계치의 농도에 도달할 때까지 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 171

제 165 항 내지 제 170 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 모니터링 및 배양은 폐쇄된 시스템(closed system)에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 172

제 50 항 내지 제 159 항 및 제 165 항 내지 제 171 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 산출 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 메모리 표현형(memory phenotype)이고;

상기 산출 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 중추 메모리 표현형이고;

상기 산출 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, 그랜자임(granzyme) B-, 및/또는 CD127+이고/이거나;

상기 산출 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 CCR7+/CD45RA-이거나 CCR7+/CD45RO+인

것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 173

제 50 항 내지 제 159 항 및 제 165 항 내지 제 172 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 제조방법의 반복은 선택적으로는 상기 방법이 복수의 상이한 개별 대상체 중에서 실시되는 인간 생물학적 샘플로부터 복수의 산출 조성물을 생성하되, 상기 복수의 산출 조성물 중의 메모리 표현형의 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이고;

상기 복수의 산출 조성물 중의 중추 메모리 표현형의 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이며;

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

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

상기 복수의 산출 조성물의 조작된 CD4+ T 세포 중의 중추 메모리 CD4+ T 세포, 선택적으로는 CAR+CD4+ T 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이고;

상기 복수의 산출 조성물의 조작된 CD8+ T 세포 중의 중추 메모리 CD8+ T 세포, 선택적으로는 CAR+CD8+ T 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55%

내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이고/이거나;

상기 복수의 산출 조성물의 조작된 T 세포 중의 중추 메모리 T 세포, 선택적으로는 CD4+ 중추 메모리 T 세포 및 CD8+ 중추 메모리 T 세포, 선택적으로는 CAR+ T 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인

것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 174

제 1 항 내지 제 159 항 및 제 165 항 내지 제 173 항 중의 어느 한 항에 있어서,

상기 제조방법은, 복수의 상이한 개별 대상 중에서 수행되는 인간 생물학적 샘플의 적어도 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 97%, 약 99%, 약 100%, 또는 100%에서, 예비 결정된 특징, 선택적으로는 산출 조성물에서 CAR을 발현하는 임계 수의 세포를 나타내는 산출 조성물을 생성하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 175

제 174 항에 있어서,

상기 복수의 상이한 개별 대상체는 질병 또는 병태를 갖는 대상체를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 176

제 175 항에 있어서,

상기 질병 또는 병태는 암인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 177

제 176 항에 있어서,

상기 암은 혈액 암, 선택적으로는 다발성 골수종인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

청구항 178

제 160 항에 있어서,

상기 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 메모리 표현형이고;

상기 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 중추 메모리 표현형이며;

상기 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, 그랜자임 B-, 및/또는 CD127+이고/이거나;

상기 산출 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 CCR7+/CD45RA-이거나 CCR7+/CD45RO+인

것인, 조성물.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원의 상호 참조

본 출원은, 「PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS」라는 명칭으로 2017.12.08.자로 출원된 미국 가출원 제62/596,774호; 「PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS」라는 명칭으로 2018.08.09.자로 출원된 미국 가출원 제62/614,965호; 「PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF

[0001]

[0002]

ENGINEERED T CELLS」라는 명칭으로 2018.08.09.자로 출원된 미국 가출원 제62/716,971호; 「PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS」라는 명칭으로 2018.08.22.자로 출원된 미국 가출원 제 62/721,604호; 「PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS」라는 명칭으로 2018.10.03.자로 출원된 미국 가출원 제62/740,903호; 「PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS」라는 명칭으로 2018.11.01.자로 출원된 미국 가출원 제62/754,564호; 「PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS」라는 명칭으로 2018.11.30.자로 출원된 미국 가출원 제62/774,165호; 및 「PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF ENGINEERED T CELLS」라는 명칭으로 2018.12.03.자로 출원된 미국 가출원 제 62/774,855호의 우선권을 주장하며, 상기 특허출원들은 그 전체가 본원에서 참조로 인용된다.

[0003] 서열목록의 참조에 의한 포함

[0004] 본 출원은 전자 포맷의 서열목록과 함께 출원된다. 서열목록은 68킬로바이트 용량으로 2018.12.07.자로 생성된 735042014340SeqList.txt 파일명으로 제공된다. 서열목록의 전자 포맷의 정보는 그 전체가 참조로 포함된다.

[0005] 본 발명은, 세포 요법에서 사용하기 위한, CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포와 같은 T 세포를 유전적으로 조작하기 위한 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 제공된 방법은 예를 들어 1:1의 비율로 농축된 CD4+ 및 CD8+ 세포를 풀링(pooling)하고, 이어서 자극 조건하에서 상기 세포를 인큐베이팅(incubating)하고, 형질도입(transduction) 또는 형질주입(transfection)을 통해서 상기 세포에 재조합 폴리펩티드를 도입하고/하거나 증식 및/또는 증폭(expansion)을 촉진시키는 조건하에서 상기 세포를 배양(cultivating)하는 하나 이상의 단계를 포함한다. 일부 측면에서, 제공된 방법은 높은 성공도로 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 효율적이고 신뢰할만한 수단이다.

배경 기술

[0006] 질병 및 병태를 치료하는데 다양한 세포 요법이 이용될 수 있다. 세포 요법 중에는 면역 세포, 예를 들어 재조합 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체로 유전자 조작된 T 세포를 포함하는 방법이 있다. 하나 이상의 효율적인 공정 및/또는 개선된 세포 조성 생성물을 제공하는 것을 비롯한 그러한 세포 요법제를 제조하고/하거나 가공하기 위한 개선된 방법이 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일부 구현예에서, 본원에서는 조작된 세포의 조성물의 제조방법이 제공되며, 상기 제조방법은, (a) CD4+ T 세포의 조성물 및 CD8+ T 세포의 조성물을 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율로 조합함으로써(combine), 투입 조성물(input composition)을 생성하는 단계; (b) 상기 투입 조성물을 자극 조건(stimulating condition)하에 인큐베이션함으로써(incubation), 자극된 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 자극 조건은 TCR 복합체(TCR complex)의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자(costimulatory molecule)의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약(stimulatory reagent)의 존재를 포함하는 것인 단계를 포함하고; 상기 투입 조성물은 적어도 100×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함한다.

[0008] 일부 구현예에서, 본원에서는 조작된 세포의 조성물의 제조방법이 제공되며, 상기 제조방법은, 투입 조성물을 자극 조건하에 인큐베이션함으로써, 자극된 조성물을 생성하는 단계를 포함하되, 상기 투입 조성물은 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율로 포함하고, 상기 투입 조성물은 적어도 100×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함하며; 상기 자극 조건은 TCR 복합체의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함한다.

[0009] 일부 구현예에서, 본원에서는 조작된 세포의 조성물의 제조방법이 제공되며, 상기 제조방법은, 재조합 수용체를 T 세포 조성물의 세포로 도입하는 단계를 포함하되, 상기 T 세포 조성물은 적어도 또는 적어도 약 1×10^6 개의 생존 세포/mL의 농도로 포함하고, 상기 T 세포 조성물의 세포의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포이다.

- [0010] 특정 구현예에서, 상기 인큐베이션은 무혈청 배지에서 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 CD4+ 세포 또는 CD8+ T 세포인 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 100×10^6 내지 500×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 300×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 생존 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 1×10^6 개 세포/mL 내지 5×10^6 개 세포/mL의 농도로 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 3×10^6 개 세포/mL의 농도로 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 1.5:1 내지 1:1.5의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율로 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 1.2:1 내지 0.8:1의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율로 포함한다.
- [0011] 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 1:1의 CD4+ 대 CD8+ 세포의 비율로 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 CD45RA 및 CCR7에 대해 양성 표면인 CD4+ 및 CD8+를 포함한다.
- [0012] 특정 구현예에서, CD45RA 및 CCR7에 양성인 CD4+ 세포 표면 대 CD45RA 및 CCR7에 양성인 CD8+ 세포 표면의 비율은 (약) 1.1:1이다.
- [0013] 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 CD27 및 CCR7에 양성 표면인 CD4+ 및 CD8+ 세포를 포함한다.
- [0014] 특정 구현예에서, CD27 및 CCR7에 양성인 CD4+ 세포 대 CD27 및 CCR7에 양성인 CD8+ 세포의 비율은 (약) 1.69:1이다.
- [0015] 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 CCR7에 양성 표면이고 CD62L에 음성 표면인 CD4+ 및 CD8+ 세포를, 선택적으로는 2.0:1 내지 1.5:1의 비로 포함한다.
- [0016] 일부 구현예는 추가로, 상기 자극된 조성물로부터 세포로 재조합 수용체를 도입시킴으로써 조작된 세포 조성물을 생성하되, 상기 도입은 상기 자극된 조성물의 세포를 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제제와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 구현예는 추가로, 상기 자극된 조성물로부터 세포로 재조합 수용체를 도입시킴으로써 조작된 세포 조성물을 생성하되, 상기 도입은 상기 자극된 조성물의 세포를 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 도입은 무혈청 배지 중에서 수행된다.
- [0017] 특정 구현예에서, 본원에서는 조작된 세포의 조성물의 제조방법이 제공되며, 상기 제조방법은, (a) CD4+ T 세포의 조성물 및 CD8+ T 세포의 조성물을 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율로 조합함으로써, 투입 조성물을 생성하는 단계; (b) 상기 투입 조성물을 자극 조건하에 인큐베이션함으로써, 자극된 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 자극 조건은 TCR 복합체(TCR complex)의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함하는 것인 단계를 포함하고; 상기 투입 조성물은 적어도 100×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함한다.
- [0018] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물 중의 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 대상체로부터의 1차 샘플로부터 농축되거나 또는 선택되고, 선택적으로 상기 산출 조성물 중의 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 대상체로부터의 1차 샘플로부터 별도로 농축되거나 또는 선택된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 CD4+ T 세포의 조성물은 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 CD4+ T 세포를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 CD8+ T 세포의 조성물은 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 CD8+ T 세포를 포함한다.
- [0019] 일부 구현예에서, 본원에서는 조작된 세포의 조성물의 제조방법이 제공되며, 상기 제조방법은, 투입 조성물을 자극 조건하에 인큐베이션함으로써, 자극된 조성물을 생성하는 단계를 포함하되, 상기 투입 조성물은 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율로 포함하고, 상기 투입 조성물은 적어도 100×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함하며; 상기 자극 조건은 TCR 복합체의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함한다.
- [0020] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 인큐베이션은 무혈청 배지 중에서 수행된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 CD4+ 세포 또는 CD8+ T 세포인 적어도 80%, 적어도 85%,

적어도 90%, 또는 적어도 95%의 세포를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 100×10^6 내지 500×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 300×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함한다.

[0021] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 생존 세포이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 1×10^6 개 세포/mL 내지 5×10^6 개 세포/mL의 농도로 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 3×10^6 개 세포/mL의 농도로 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 1.5:1 내지 1:1.5의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율로 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 투입 조성물은 1.2:1 내지 0.8:1의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율로 포함한다.

[0022] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 1:1의 CD4+ 대 CD8+ 세포의 비율로 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 CD45RA 및 CCR7에 대해 양성 표면인 CD4+ 및 CD8+를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, CD45RA 및 CCR7에 양성인 CD4+ 세포 표면 대 CD45RA 및 CCR7에 양성인 CD8+ 세포 표면의 비율은 (약) 1.1:1이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 CD27 및 CCR7에 양성 표면인 CD4+ 및 CD8+ 세포를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, CD27 및 CCR7에 양성인 CD4+ 세포 대 CD27 및 CCR7에 양성인 CD8+ 세포의 비율은 (약) 1.69:1이다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 투입 조성물은 CCR7에 양성 표면이고 CD62L에 음성 표면인 CD4+ 및 CD8+ 세포를, 선택적으로는 2.0:1 내지 1.5:1의 비로 포함한다.

[0023] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 방법은 추가로, 상기 자극된 조성물로부터 세포로 재조합 수용체를 도입시킴으로써 조작된 세포 조성물을 생성하되, 상기 도입은 상기 자극된 조성물의 세포를 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제제와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0024] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 접촉은 벡터를 사용한 형질주입(transfection)에 의한 것으로, 상기 벡터는 전이인자(transposon)이고, 선택적으로는 슬리핑 뷰티(Sleeping Beauty; SB) 전이인자, 피기백(PiggyBac) 전이인자이거나; 또는 상기 접촉은 바이러스 벡터를 사용한 형질도입(transduction)에 의한 것이다.

[0025] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 추가로, 상기 자극된 조성물로부터 세포로 재조합 수용체를 도입시킴으로써 조작된 세포 조성물을 생성하되, 상기 도입은 상기 자극된 조성물의 세포를 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질도입하는 것을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 도입은 무혈청 배지 중에서 수행된다.

[0026] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 도입을 위해서 상기 자극된 조성물은 300×10^6 개 미만의 세포를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 도입을 위해서 상기 자극된 조성물은 50×10^6 개 내지 200×10^6 개의 세포를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 도입을 위해서 상기 자극된 조성물은 (약) 100×10^6 개의 세포를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 도입을 위해서 상기 자극된 조성물은 3×10^6 개 세포/mL 미만의 농도를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 도입을 위해서 상기 자극된 조성물은 0.5×10^6 개 세포/mL 내지 2×10^6 개 세포/mL의 농도를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 도입을 위해서 상기 자극된 조성물은 (약) 1×10^6 개 세포/mL의 농도를 포함한다.

[0027] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예는 상기 재조합 수용체를 상기 자극된 조성물의 세포로 도입하기 전에 자극 조건하에 인큐베이션한 후 상기 자극된 조성물의 조성물을 조정하는 것을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 자극된 조성물의 세포는 생존 세포이다. 특정 구현예에서, 본원에서 조작된 세포의 조성물을 생성하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 재조합 수용체를 T 세포 조성물의 세포로 도입하는 것을 포함하되, 상기 T 세포 조성물은 적어도 (약) 1×10^6 개의 생존 세포/mL의 농도를 포함하고, 상기 T 세포 조성물의 세포의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포이다.

[0028] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 T 세포 조성물의 농도는 5×10^6 개의 생존 세포/mL 미만이다.

상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 T 세포 조성물은 적어도 (약) 100×10^6 개의 생존 세포를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 T 세포 조성물은 300×10^6 개 미만의 생존 세포를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 도입은 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터를 형질주입에 의해서 상기 T 세포와 접촉시키는 것을 포함한다.

[0029] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 도입은 무혈청 배지 중에서 수행된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 T 세포 조성물의 하나 이상의 세포는 활성화되고/되거나 상기 LDL 수용체의 표면 발현을 포함한다.

[0030] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 세포 조성물의 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 또는 적어도 60%는, (i) HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L 및 4-1BB로 이루어진 군으로부터 선택된 표면 마커(surface marker)를 발현하고; (ii) IL-2, IFN-감마, TNF-알파로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인의 세포내 발현을 포함하고; (iii) 상기 세포 사이클의 G1 또는 나중 단계(later phase)에 있고/있거나; (iv) 증식(proliferating)할 수 있는 것이다.

[0031] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 도입 이전에, 상기 조성물의 세포는 자극 조건하에 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하는 투입 조성물을 인큐베이션하는 것을 포함하는 공정에 의해서 생성되고, 상기 자극 조건은 TCR 복합체의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 인큐베이션은 무혈청 배지 중에서 수행된다.

[0032] 특정 구현예에서, 본원에서 조작된 세포의 조성물을 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은, (a) 투입 조성물을 자극 조건하에 인큐베이션함으로써, 자극된 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 투입 조성물은 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율을 포함하고 적어도 100×10^6 개의 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함하며, 상기 자극 조건은 TCR 복합체(TCR complex)의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함하는 것인 단계; 및 (b) 재조합 수용체를 상기 자극된 조성물의 300×10^6 개 미만의 세포로 도입함으로써 조작된 세포 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 도입은 상기 자극된 조성물의 세포를 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터와 접촉시키는 것을 포함하는 것인 단계를 포함한다.

[0033] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 인큐베이션 및/또는 도입은 무혈청 배지 중에서 수행된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 생존 세포이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 자극된 조성물로부터의 상기 세포는 생존 세포이다.

[0034] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 도입은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 2일 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 2일 이내에 개시된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 도입은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 36시간 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 36시간 이내에 개시된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 도입은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 30시간 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 30시간 이내에 개시된다.

[0035] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예는, 추가로 상기 조작된 세포의 증식 및/또는 증폭을 촉진시키는 조건하에 상기 조작된 T 세포를 포함하는 산출 조성물을 제조하는 것을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 배양은 무혈청 배지 중에서 수행된다.

[0036] 특정 구현예에서, 본원에서 조작된 세포의 조성물을 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은, (a) 투입 조성물을 자극 조건하에 인큐베이션함으로써, 자극된 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 투입 조성물은 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율을 포함하고, 상기 투입 조성물은 적어도 100×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함하며; 상기 자극 조건은 TCR 복합체(TCR complex)의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함하는 것인 단계; (b) 재조합 수용체를 상기 자극된 조성물로부터 300×10^6 개 미만의 세포로 도입함으로써 조작된 세포 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 도입은 상기

자극된 조성물의 세포를 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터와 접촉시키는 것을 포함하는 것인 단계; 및 (c) 상기 조작된 조성물을 상기 조작된 세포의 증식 및/또는 증폭을 촉진시키는 조건하에서 배양함으로써, 상기 조작된 T 세포를 포함하는 산출 조성물을 제조하는 단계를 포함한다.

- [0037] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 인큐베이션, 도입 및/또는 배양은 무혈청 배지 중에서 수행된다.
- [0038] 상기 제공된 방법의 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 1.5:1 내지 1:1.5의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포, 1.2:1 내지 0.8:1의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포, 선택적으로는 (약) 1:1의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포를 포함한다. 상기 제공된 방법의 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성(surface positive)인 CD4+ 및 CD8+를 포함한다. 상기 제공된 방법의 일부 구현예에서, CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 세포 대 CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD8+ 세포의 비는 (약) 1.1:1이다. 상기 제공된 방법의 일부 구현예에서, 상기 투입 조성물은 CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 및 CD8+ 세포를 포함한다. 상기 제공된 방법의 특정 구현예에서, CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 세포 대 CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD8+ 세포의 비는 (약) 1.69:1이다. 상기 제공된 방법의 일부 구현예에서, 상기 투입 조성물은 CCR7에 대해 표면 양성이고 CD62L에 대해 표면 음성(surface negative)인 CD4+ 및 CD8+ 세포를 포함한다.
- [0039] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 도입을 위해서 상기 자극된 조성물은 300×10^6 개 미만의 세포를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 도입을 위해서 상기 자극된 조성물은 50×10^6 개 내지 200×10^6 개의 세포, 선택적으로는 (약) 100×10^6 개의 세포를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 도입을 위해서 상기 자극된 조성물은 3×10^6 개 세포/mL 미만의 농도를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 도입을 위해서 상기 자극된 조성물은 0.5×10^6 개 세포/mL 내지 2×10^6 개 세포/mL, 선택적으로는 (약) 1×10^6 개 세포/mL의 농도를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 재조합 수용체를 상기 자극된 조성물의 세포로 도입하기 전에 자극 조건하에 인큐베이션한 후 상기 자극된 조성물의 조성물을 조정하는 것을 포함한다.
- [0040] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 인큐베이션은 하나 이상의 사이토카인, 예를 들어 무혈청 배지 중에서 수행된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2, 재조합 IL-7, 및/또는 재조합 IL-15로부터 선택된다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-2, 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7, 및/또는 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-2, 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7, 및/또는 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15를 포함한다.
- [0041] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 자극된 조성물의 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 또는 적어도 60%는, (i) HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L 및 4-1BB로 이루어진 군으로부터 선택된 표면 마커(surface marker)를 발현하고; (ii) IL-2, IFN-감마, TNF-알파로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인의 세포내 발현을 포함하고; (iii) 상기 세포 사이클의 G1 또는 나중 단계(later phase)에 있고/있거나; (iv) 증식(proliferating)할 수 있는 것이다.
- [0042] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은, 다수의 TCR 복합체에 특이적으로 결합하는, 선택적으로는 CD3에 특이적으로 결합하는 1차 제제(primary agent)를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 추가로, T 세포 공동 자극 분자에 특이적으로 결합하는 2차 제제(secondary agent)를 포함하고, 선택적으로 상기 공동 자극 분자는 CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, 또는 ICOS로부터 선택된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 1차 제제 및/또는 2차 제제는 항체를 포함하고, 선택적으로 상기 자극 시약은 항-CD3 항체 및 항-CD28, 또는 그들의 항원-결합 단편과의 인큐베이션을 포함한다.
- [0043] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 1차 제제 및/또는 2차 제제는 고체 지지체의 표면 상에 존재한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 고체 지지체는 비드(bead)이거나 또는 그를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 비드는 (약) $3.5 \mu\text{m}$ 초과이지만 (약) $9 \mu\text{m}$ 이하 또는 (약) $8 \mu\text{m}$ 이하 또는 (약) $7 \mu\text{m}$ 이하 또는 (약) $6 \mu\text{m}$ 이하 또는 (약) $5 \mu\text{m}$ 이하의 직경을 갖는다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 비드는 (약) $4.5 \mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 비드는 불활성이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 비드는 폴리

스티렌 표면이거나 또는 그를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 비드는 자성(magnetic)이거나 또는 초자성(superparamagnetic)이다.

- [0044] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 비드 대 세포의 상기 비율은 3:1 미만이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 비드 대 세포의 상기 비율은 (약) 2:1 내지 0.5:1이다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 비드 대 세포의 상기 비율은 (약) 1:1이다.
- [0045] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 자극 조건하에 48시간 미만동안 인큐베이션된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 자극 조건하에 12시간 내지 36시간(경계 포함)동안 인큐베이션된다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 투입 조성물은 자극 조건하에 18시간 내지 30시간(경계 포함)동안 인큐베이션된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 자극 조건하에 (약) 24시간동안 인큐베이션된다.
- [0046] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 48시간 미만동안 수행된다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 12시간 내지 36시간(경계 포함)동안 수행된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 18시간 내지 30시간(경계 포함)동안 수행된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 (약) 24시간동안 수행된다.
- [0047] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터(retroviral vector)이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터(lentiviral vector) 또는 감마레트로바이러스 벡터(gammaretroviral vector)이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 형질도입 보조제(transduction adjuvant)의 존재하에서 수행된다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 도입은 하나 이상의 사이토카인의 존재하에, 예를 들어 무혈청 배지 중에서 수행된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2, 재조합 IL-7, 및/또는 재조합 IL-15로부터 선택된다.
- [0048] 상기 제공된 방법 중의 임의의 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-2; 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7; 및/또는 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15를 포함한다. 제공된 방법 중의 임의의 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-2; 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7; 및 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15를 포함한다.
- [0049] 상기 제공된 방법 중의 임의의 특정 구현예에서, 상기 배양의 적어도 일부는 혼합 및/또는 관류(perfusion)로 수행된다. 상기 제공된 방법 중의 임의의 특정 구현예에서, 상기 배양의 적어도 일부는 (약) 또는 적어도 500 mL/day, 600 mL/day, 700 mL/day, 750 mL/day, 800 mL/day, 900 mL/day, 1,000 mL/day, 1,200 mL/day, 1,400 mL/day, 1,500 mL/day, 1,600 mL/day, 1,800 mL/day, 및/또는 2,000 mL/day 관류 속도로 수행된다. 상기 제공된 방법 중의 임의의 일부 구현예에서, 상기 배양의 적어도 제 1 부분은 (약) 또는 적어도 500 mL/day, 750 mL/day, 또는 1,000 mL/day의 관류 속도로 수행되고, 상기 배양의 적어도 제 2 부분은 (약) 또는 적어도 1,200 mL/day, 1,400 mL/day, 또는 1,500 mL/day의 관류 속도로 수행된다.
- [0050] 상기 제공된 방법 중의 임의의 특정 구현예에서, 상기 관류는 세포가 특정 밀도에 도달할 때 개시되고/되거나 증가된다. 상기 제공된 방법 중의 임의의 특정 구현예에서, 상기 특정 밀도는 (약) 또는 적어도 0.4×10^6 개의 세포, 0.5×10^6 개의 세포, 0.6×10^6 개의 세포, 0.8×10^6 개의 세포, 1.0×10^6 개의 세포, 1.2×10^6 개의 세포, 1.4×10^6 개의 세포, 1.6×10^6 개의 세포, 1.8×10^6 개의 세포, 2.0×10^6 개의 세포, 2.2×10^6 개의 세포, 또는 2.4×10^6 개의 세포이다. 상기 제공된 방법 중의 임의의 일부 구현예에서, 상기 관류는 상기 세포가 (약) 0.6×10^6 개 세포/mL의 밀도에 도달할 때 (약) 750 mL/day의 속도로 개시되고/되거나 증가된다. 상기 제공된 방법 중의 임의의 일부 구현예에서, 관류는 상기 세포가 (약) 2.0×10^6 개 세포/mL의 밀도에 도달할 때 (약) 1500 mL/day의 속도로 개시되고/되거나 증가된다.
- [0051] 상기 제공된 방법 중의 임의의 특정 구현예에서, 상기 배양은 하나 이상의 사이토카인의 존재하에, 예를 들어 무혈청 배지(serum-free medium)에서 수행된다. 상기 제공된 방법 중의 임의의 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2, 재조합 IL-7, 및/또는 재조합 IL-15으로부터 선택된다. 제공된 방법 중의 임의의 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 50 내지 400 IU/mL의 재조합 IL-2; 100 IU/mL 내지 2,000 IU/mL의 재조합 IL-7; 및/또는 50 내지 400 IU/mL의 재조합 IL-15를 포함한다. 상기 제공된 방법 중의

임의의 특정 구현예에서, 상기 배양은 50 내지 400 IU/mL의 재조합 IL-2; 100 IU/mL 내지 2,000 IU/mL의 재조합 IL-7; 및 50 내지 400 IU/mL의 재조합 IL-15의 존재하에서, 예를 들어 무혈청 배지에서 수행된다. 상기 제공된 방법 중의 임의의 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 50 내지 400 IU/mL의 재조합 IL-2; 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7; 및 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15을 포함한다.

[0052] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 배양은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 3일 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 3일 이내에 개시된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 배양은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 60시간 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 60시간 이내에 개시된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 배양은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 48시간 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 48시간 이내에 개시된다.

[0053] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 배양은, 적어도 상기 조성물이 T 세포의 임계치의 수를 포함할 때까지 수행된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 T 세포의 임계치의 수는 (약) 또는 적어도 2400×10^6 개의 세포이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 T 세포의 임계치의 수는 (약) 또는 적어도 5500×10^6 개의 세포이다.

[0054] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 배양은, 상기 T 세포의 임계치의 수가 도달된 후 적어도 1일 동안 지속된다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 T 세포의 임계치의 수는 (약) 또는 적어도 900×10^6 개의 세포이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 T 세포의 임계치의 수는 (약) 또는 적어도 1200×10^6 개의 세포이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 배양은, 상기 T 세포의 임계치의 수가 (약) 또는 적어도 2400×10^6 개의 세포일 때 종료한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 T 세포의 임계치의 수는 (약) 또는 적어도 3500×10^6 개의 세포이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 배양은, 상기 T 세포의 임계치의 수가 (약) 또는 적어도 5500×10^6 개의 세포일 때 종료한다.

[0055] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예는 상기 배양 후 상기 산출 조성물의 세포를 수거하는 것을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예는 상기 배양 후 상기 산출 조성물의 세포를 수거하는 것을 포함하되, 상기 산출 조성물의 세포는 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시 후 적어도 9일 경과 후에 수거된다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예는 상기 배양 후 상기 산출 조성물의 세포를 수거하는 것을 포함하되, 상기 산출 조성물의 세포는 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시 후 적어도 10일 경과 후에 수거된다.

[0056] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예는, 8일 내지 25일 이내인 상기 인큐베이션의 개시와 상기 산출 조성물의 세포 수거 사이의 시간의 95% 신뢰 구간을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예는, 9일 내지 21일 이내인 상기 인큐베이션의 개시와 상기 산출 조성물의 세포 수거 사이의 시간의 95% 신뢰 구간을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예는, 9일 내지 16일 이내인 상기 인큐베이션의 개시와 상기 산출 조성물의 세포 수거 사이의 시간의 95% 신뢰 구간을 포함한다.

[0057] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예는, 추가로 선택적으로는 약학적으로 허용가능한 부형제의 존재하에 저온 보존(cryopreservation)동안 상기 산출 조성물의 세포를 제형화하고/하거나 대상체에 투여하는 것을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 저온 보호제(cryoprotectant)의 존재하에서 제형화된다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 저온 보호제는 DMSO를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 상기 세포는 용기, 선택적으로는 바이알(vial) 또는 백(bag)에서 제형화된다.

[0058] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예는, 상기 인큐베이션 이전에 생물학적 샘플로부터 상기 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포를 단리시키는 것을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 단리는 CD4 및/또는 CD8의 표면 발현에 기초하여, 선택적으로는 양성 또는 음성 선별에 의해서 세포를 선별하는 것을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 단리는 면역 친화성-기반 선별(immunoaffinity-based selection)을 수행하는 것을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 생물학적 샘플은 대상체로부터 획득된 1차 T 세포를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 대상체는 인간 대상체이다.

- [0059] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 생물학적 샘플은 전혈 샘플(whole blood sample), 버피 코트 샘플(buffy coat sample), 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 비분획 T 세포 샘플(unfractionated T cell sample), 림프구 샘플, 백혈구 샘플, 성분 채집 생성물(apheresis product), 또는 백혈구 생성물(leukapheresis product)이거나 또는 그들을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 재조합 수용체는 질병, 장애 또는 병태의 세포 또는 조직과 관련되고, 그에 특이적이고/이거나 그 위에서 발현되는 표적 항원에 결합할 수 있다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 질병, 장애 또는 병태는 감염성 질병 또는 장애, 자가면역 질병, 염증성 질병, 또는 종양 또는 암이다.
- [0060] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 표적 항원은 종양 항원이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 표적 항원은 5T4, 8H9, avb6 인테그린, B7-H6, B 세포 성숙화 항원(BCMA), CA9, 암성-고환 항원, 탄산 무수화 효소 9(CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, B형 간염 표면 항원, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, 암배아성 항원(CEA), CE7, 사이클린, 사이클린 A2, c-Met, 이종 항원, EGFR, 상피 당단백질 2(epithelial glycoprotein 2, EPG-2), 상피 당단백질 40(EPG-40), EPHA2, 에프린B2(ephrinB2), erb-B2, erb-B3, erb-B4, erbB 이합체들, EGFR vIII, 에스트로젠 수용체, 태아 AchR, 엽산 수용체 알파, 엽산 결합 단백질(FBP), FCRL5, FCRH5, 태아 아세틸콜린 수용체, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, Her2/neu(수용체 티로신 키나아제 erbB2), HMW- MAA, IL-22R-알파, IL-13 수용체 알파 2(IL-13R α 2), 키나아제 삽입 도메인 수용체(kdr), 카파 경쇄, 루이스 Y, L1-세포 접착 분자(L1-CAM), 흑색종-관련 항원(MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, 메소텔린, 쥐-CMV, 뮤신 1(mucin 1, MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, O-아세틸화 GD2(OGD2), 종양 태아성 항원(oncofetal antigen), 흑색종에서 우선적으로 발현되는 항원(PRAME), PSCA, 프로게스테론 수용체, 서바이빈, ROR1, TAG72, VEGF 수용체, VEGF-R2, 윌름스 종양 1(WT-1), 병원균-특이적 항원 및 범용 태그와 관련된 항원 중에서 선택된다.
- [0061] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 재조합 수용체는 기능성 비-TCR 항원 수용체 또는 TCR 또는 그들의 항원-결합 단편이거나 또는 그들을 포함한다.
- [0062] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 재조합 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 재조합 수용체는 항-BCMA CAR이다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 키메라 항원 수용체는 항원-결합 도메인을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 항원-결합 도메인은 항체 또는 그의 항체 단편이거나 그들을 포함하고, 선택적으로는 단쇄 단편(single chain fragment)이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 단편은 가요성 링커(flexible linker)에 의해서 연결된(joined) 항체 가변 영역을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 단편은 scFv를 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 키메라 항원 수용체는 추가로 스페이서(spacer) 또는 힌지 영역(hinge region)을 포함한다.
- [0063] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 키메라 항원 수용체는 세포내 신호전달 영역(intracellular signaling region)을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 세포내 신호전달 영역은 세포내 신호전달 도메인(intracellular signaling domain)을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 도메인(primary signaling domain), T 세포에서 1차 활성화 신호(primary activation signal)를 유도할 수 있는 신호전달 도메인, T 세포 수용체(TCR) 요소의 신호전달 도메인 및/또는 면역 수용체 티로신-계 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 신호전달 도메인이거나 또는 그들을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3 쇄의 세포내 신호전달 도메인, 선택적으로는 CD3-제타(CD3 ζ) 쇄, 또는 그의 신호전달 부분(signaling portion)이거나 또는 그들을 포함한다.
- [0064] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 키메라 항원 수용체는 추가로 상기 세포내 도메인과 상기 세포내 신호전달 영역 사이에 배치된 막관통 도메인(transmembrane domain)을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 세포내 신호전달 영역은 추가로 동시 자극 신호전달 영역(costimulatory signaling region)을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 동시 자극 신호전달 영역은 T 세포 동시 자극 분자의 세포내 신호전달 도메인 또는 그의 신호전달 부분을 포함한다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 동시 자극 신호전달 영역은 CD28, a 4-1BB 또는 ICOS의 세포내 신호전달 도메인 또는 그의 신호전달 부분을 포함한다.
- [0065] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 동시 자극 신호전달 영역은 상기 막관통 도메인과 상기 세포내 신호전달 영역 사이에 있다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 임계치의 수 또는 그 초과

의 수의 세포를 포함하는 상기 산출 조성물은, 상기 방법의 반복의 (약) 85% 초과, (약) 90% 초과 또는 (약) 95% 초과 중에서 생성된다.

[0066] 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 기본 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민 0.5 mM 내지 5 mM; L-글루타민 0.5 mM 내지 5 mM; 및 적어도 하나의 단백질을 포함하되, 상기 배지는 무혈청 배지이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 디펩티드 형태의 L-글루타민은 L-알라닐-L-글루타민이다.

[0067] 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 상기 디펩티드 형태의 L-글루타민의 농도는 (약) 2 mM이다. 상기 제공된 방법의 임의의 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 상기 L-글루타민의 농도는 (약) 2 mM이다. 상기 제공된 방법의 임의의 특정 구현예에서, 상기 적어도 하나의 단백질은 하나 이상의 알부민, 인슐린 또는 트랜스페린(transferrin), 선택적으로는 하나 이상의 인간 또는 재조합 알부민, 인슐린 또는 트랜스페린을 포함한다.

[0068] 본원에서 제공된 방법의 임의의 구현예 중의 일부에서, 상기 배양의 적어도 일부동안, 상기 세포는 세포 생존율, 농도, 밀도, 수, 또는 그의 조합에 대해 모니터링된다. 임의의 상기 구현예 중의 일부에서, 상기 모니터링은 광학 방법(optical method), 선택적으로 현미경에 의해서 수행된다. 임의의 상기 구현예 중의 일부에서, 상기 모니터링은 명 시야 현미경(bright field microscopy), 형광 현미경, 시차 간섭 콘트라스트 현미경(differential interference contrast microscopy), 위상 콘트라스트 현미경(phase contrast microscopy), 디지털 홀로그래피 현미경(DHM), 시차 디지털 홀로그래피 현미경(DDHM), 또는 이들의 조합물에 의해서 수행된다. 임의의 상기 구현예 중의 일부에서, 상기 모니터링은 시차 디지털 홀로그래피 현미경(DDHM)에 의해서 수행된다. 임의의 상기 구현예 중의 일부에서, 상기 모니터링은 상기 배양의 적어도 일부동안 간헐적으로 또는 연속적으로 수행되고, 선택적으로는 상기 배양도중에 적어도 매 1시간, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 또는 26시간동안 수행된다. 임의의 상기 구현예 중의 일부에서, 상기 모니터링은, 상기 세포가 T 세포의 임계치의 수, 생존 T 세포의 임계치의 수, T 세포의 임계치의 농도 또는 생존 T 세포의 임계치의 농도에 도달할 때까지 수행된다. 임의의 상기 구현예 중의 일부에서, 상기 모니터링 및 배양은 폐쇄된 시스템(closed system)에서 수행된다.

[0069] 상기 제공된 방법의 임의의 구현예 중의 일부에서, 상기 산출 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 메모리 표현형(memory phenotype)이고; 상기 산출 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 중추 메모리 표현형이며; 상기 산출 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, 그랜자임(granzyme) B-, 및/또는 CD127+이고/이거나; 상기 산출 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 CCR7+/CD45RA-이거나 CCR7+/CD45RO+이다.

[0070] 상기 제공된 방법의 임의의 구현예 중의 일부에서, 상기 방법의 반복은 선택적으로는 상기 방법이 복수의 상이한 개별 대상체 중에서 실시되는 인간 생물학적 샘플로부터 복수의 산출 조성물을 생성하되, 상기 복수의 산출 조성물 중의 메모리 표현형의 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이고; 상기 복수의 산출 조성물 중의 중추 메모리 표현형의 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이며; 상기 복수의 산출 조성물 중에서 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, 그랜자임 B-, 및/또는 CD127+인 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이고; 상기 복수의 산출 조성물 중에서 CCR7+/CD45RA- 또는 CCR7+/CD45RO+인 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이며; 상기 복수의 산출 조성물의 조작된 CD4+ T 세포 중의 중추 메모리 CD4+ T 세포, 선택적으로는 CAR+CD4+ T 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이고; 상기 복수의 산출 조성물의 조작된 CD8+ T 세포 중의 중추 메모리 CD8+ T 세포, 선택적으로는 CAR+CD8+ T 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이고/이거나; 상기 복수의 산출 조성물의 조작된 T 세포 중의 중추 메모리 T 세포, 선택적으로

는 CD4+ 증추 메모리 T 세포 및 CD8+ 증추 메모리 T 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이다.

[0071] 본원에서 제공된 방법의 임의의 구현예의 일부에서, 상기 방법은 복수의 상이한 개별 대상 중에서 수행되는 인간 생물학적 샘플의 적어도 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 97%, 약 99%, 약 100%, 또는 100%에서, 예비 결정된 특징, 선택적으로는 산출 조성물에서 CAR을 발현하는 임계 수의 세포를 나타내는 산출 조성물을 생성한다. 임의의 상기 구현예의 일부에서, 복수의 상이한 개별 대상체는 질병 또는 병태를 갖는 대상체를 포함한다. 임의의 상기 구현예의 일부에서, 상기 질병 또는 병태는 암이다. 임의의 상기 구현예의 일부에서, 상기 암은 혈액암, 선택적으로는 다발성 골수종이다. 임의의 상기 구현예의 일부에서, 상기 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 메모리 표현형이고; 상기 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, 그랜자임 B-, 및/또는 CD127+이고/이거나; 상기 산출 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 CCR7+/CD45RA-이거나 CCR7+/CD45RO+이다.

[0072] 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 임의의 방법에 의해서 생성된 조작된 세포를 포함하는 조성물이 제공된다. 상기 제공된 조성물의 임의의 일부 구현예는 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 상기 제공된 조성물의 임의의 특정 구현예는 동결방지제(cryoprotectant), 선택적으로는 DMSO를 포함한다.

[0073] 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 임의의 조성물 및 산출 조성물을 대상체에게 투여하기 위한 지침을 포함하는 제품이 제공된다. 본원에서 제공된 임의의 제품의 특정 구현예에서, 상기 대상체는 질병 또는 병태이며, 선택적으로 재조합 수용체는 상기 질병 또는 병태와 관련되거나 세포상에서 발현되거나 존재하는 항원을 특이적으로 인식하거나 그것과 특이적으로 결합한다.

도면의 간단한 설명

[0074] 도 1a는 T 세포 활성화, 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물로의 형질도입 및 증폭 이후 T 세포 조성물 내 CAR+CD4+ T 세포 대 CAR+CD8+ T 세포의 비율 (CAR+ CD4+/CD8+ 비율)과 비교하여, 성분채집술 샘플 내 생존 D4+ 세포 대 생존 CD8+ 세포의 비율(생존 CD4+/CD8+ 비율)의 이변량 피트 분석의 플롯을 도시한다. 곡선은 p=0.990에서의 이변량 정규 타원의 경계를 나타낸다. 데이터 포인트는 건강한 대상 (원) 및 골수종이 있는 대상체 (더하기 부호)을 포함하여 각 대상체로부터 4 개의 샘플의 평균 비율을 나타낸다. 도 1b는 T 세포 활성화, 키메라 항원 수용체 (CAR) 작제물로의 형질도입 및 증폭 이후 T 세포 조성물 내 CAR+ CD4+/CD8+ 비율과 비교하여 선별된 CD4 및 CD8 세포의 출발 혼합물 내 CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 비율의 이변량 피트 분석의 플롯을 도시한다. 곡선은 p=0.990에서의 이변량 정규 타원의 경계를 나타낸다. 데이터 포인트는 건강한 대상체 (원) 및 골수종이 있는 대상체 (더하기 부호)을 포함하여 각 대상체로부터 4 개의 샘플의 평균 비율을 나타낸다.

도 2a-2c는 조작된 CAR+ T 세포 조성물 내 CAR+ CD4+/CD8+ 비율과 비교하여 선별된 CD4 및 CD8 세포의 출발 혼합물 내 상이한 표현형 세포의 비율의 이변량 피트 분석의 플롯을 도시한다. 도 2a는 조작된 CAR+ T 세포 조성물 내 CAR+ CD4+/CD8+ 비율과 비교하여 선별된 CD4 및 CD8 세포의 출발 혼합물 내 CD45RA+/CCR7+/CD4+ 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ 세포 비율의 이변량 피트 분석의 플롯을 도시한다. 도 2b는 조작된 CAR+ T 세포 조성물 내 CAR+ CD4+/CD8+ 비율과 비교하여 선별된 CD4 및 CD8 세포의 출발 혼합물 내 CD62L-/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율의 이변량 피트 분석의 플롯을 도시한다. 도 2c는 조작된 CAR+ T 세포 조성물 내 CAR+ CD4+/CD8+ 비율과 비교하여 선별된 CD4 및 CD8 세포의 출발 혼합물 내 CD27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율의 이변량 피트 분석의 플롯을 도시한다. 곡선은 p=0.950에서의 이변량 정규 타원의 경계를 나타낸다. 데이터 포인트는 건강한 공여체 (원) 및 다발성 골수종이 있는 환자 (더하기 부호)을 포함하여 각 대상체로부터 다중 샘플의 평균 비율을 나타낸다.

도 3a-3c는 생성된 조작된 CAR+ T 세포 조성물 내 CAR+ CD4+/CD8+ 비율과 비교하여, 다발성 골수종을 가지는 7 명의 공여체로부터의 선별된 CD4 및 CD8 세포의 출발 혼합물 내 상이한 표현형 세포의 비율의 이변량 피트 분석의 플롯을 도시한다. 도 3a는 조작된 CAR+ T 세포 조성물 내 CAR+ CD4+/CD8+ 비율과 비교하여 선별된 CD4 및 CD8 세포의 출발 혼합물 내 CD27+/CCR7+/CD4+ 대 CD27+/CCR7+/CD8+ 세포 비율의 이변량 피트 분석의 플롯을 도시한다. 도 3b는 조작된 CAR+ T 세포 조성물 내 CAR+ CD4+/CD8+ 비율과 비교하여 선별된 CD4 및 CD8 세포의

출발 혼합물 내 CD27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율의 이변량 피트 분석의 플롯을 도시한다. 도 3c는 조작된 CAR+ T 세포 조성물 내 CAR+ CD4+/CD8+ 비율과 비교하여 선별된 CD4 및 CD8 세포의 출발 혼합물 내 CD62L-/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율의 이변량 피트 분석의 플롯을 도시한다. 곡선은 p=0.950에서의 이변량 정규 타원의 경계를 나타낸다.

도 4a 및 도 4b는 실험 수행 1(도 4a) 및 수행 2(도 4b)에서, 시차 DHM("연속", 라인) 또는 수동 샘플링("수동", 도트)에 의한 연속 모니터링을 이용하여 평가한 생존 세포수(VCC; $\times 10^6$ 개 세포/mL) 및 세포 생존율을 도시한 것이다. 상부 패널은 각각에 대한 측정을 도시하며, 하부 패널은 연속 모니터링 및 수동 샘플링을 비교하기 위한 선형 회귀 분석 및 R 및 기울기(s)를 도시한다.

도 5는 수동 증폭 공정과 비교하여 자동화된 증폭 공정에서 시차 DHM에 의한 연속 모니터링을 이용하여 평가한 생존 세포(VCC; $\times 10^6$ 개 세포/mL) 및 세포 생존율(%)을 도시한 것이다.

도 6a 내지 6d는 각각 다발성 골수종 환자로부터의 40개의 조작된 CAR + T 세포 조성물의 예시적인 표현형 프로파일을 도시한 것이다. CAR + T 세포 조성물 중에서 CD45RA \times CCR7 발현 프로파일을 CD4 + 집단(도 6a) 및 CD8 + 집단에 대해 나타내었다(도 6b). CAR + T 세포 조성물 중에서 CD27 \times CD28 발현 프로파일을 CD4 + 집단(도 6c) 및 CD8 + 집단에 대해 나타내었다(도 6d). 각각의 CAR + T 세포 조성물은 도트(●), 크로스(×), 다이아몬드(◇), 또는 삼각형(△)으로 도시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075] 본원에서는, 제조합 수용체를 발현하는, 조작된 세포, 예를 들어 조작된 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 조성물을 생성하거나 또는 제조하는 방법이 제공된다. 특정 구현예에서, 상기 방법은, 자극 조건하에 세포, 예를 들어 투입 세포의 조성물을 인큐베이션하는 단계; 예를 들어 제조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 형질도입 또는 형질주입함으로써 세포를 유전자 조작하는 단계; 및/또는 세포 증식 및/또는 증폭을 촉진시키는 조건하에 상기 조작된 세포를 배양하는 단계를 포함하는 공정과 관련하여 사용된다.

[0076] 본원의 일부 구현예에서, CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포를 조합(combining)하여 투입 조성물을 생성하는 단계, 및 상기 투입 조성물을 자극 조건하에 인큐베이션하는 단계를 포함하는 조작된 세포의 조성물을 제조하는 방법이 제공된다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 CD4+ 세포 및 CD8+ T 세포를 2:1 내지 1:2의 비율로 함유하는 투입 조성물을 인큐베이션하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 5×10^6 개 세포/mL의 농도로 적어도 100×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함한다.

[0077] 본원의 특정 구현예에서, 제조합 수용체를 한 세트 또는 고정된 양의 세포(a set fixed or amount of cells)에, 예를 들어 세포 조성물의 적어도 또는 약 1×10^6 , 10×10^6 , 100×10^6 , 또는 $1,000 \times 10^6$ 개의 세포에 도입하는 것을 포함하는 조작된 세포의 조성물을 제조하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 자극된 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 생존 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 도입은 제조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터로 상기 자극된 조성물의 T 세포에 형질도입하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 세포 조성물은 CD4+ 세포 또는 CD8+ T 세포인 세포 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%를 포함한다.

[0078] 본원의 일부 구현예에서는, (i) 투입 조성물을 자극 조건하에 인큐베이션함으로써, 자극된 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 투입 조성물은 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율을 포함하고, 상기 투입 조성물은 적어도 100×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함하는 것인 단계; (ii) 제조합 수용체를 상기 자극된 조성물로부터 300×10^6 개 미만의 세포로 도입함으로써 조작된 세포 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 도입은 상기 자극된 조성물의 세포를 상기 제조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터와 접촉시키는 것을 포함하는 것인 단계; 및 (ii) 상기 조작된 조성물을 상기 조작된 세포의 증식 및/또는 증폭을 촉진시키는 조건하에서 배양함으로써, 상기 조작된 T 세포를 포함하는 산출 조성물을 제조하는 단계를 포함하는, 조작된 세포의 조성물의 제조방법이 제공된다.

[0079] 키메라 항원 수용체를 발현하는 조작된 T 세포를 생성하는 것을 포함한, 유전자 조작된 T 세포 집단을 생성하기 위해 상이한 공정이 이용될 수 있다. 그러나, 일부 구현예에서, 이들 공정 중의 일부는 상기 조작된 세포를 생성하는데 장시간 또는 비교적 장시간을 요구할 수 있다. 특정 구현예에서, 이들 공정 중의 일부는 상이한 대상

체로부터 치료요법에 적합한 조작된 세포를 성공적으로 생성하는 능력이 다양할 수 있다. 특정 구현예에서, 이들 공정 중의 일부는 세포 건강, 생존율, 형질도입 효율, 및/또는 세포 활성과 같은 높은 정도의 가변 파라미터로 유전자 조작된 T 세포 조성물을 생성할 수 있다.

[0080] 상기 제공된 구현예는 하나 이상의 이들 이슈에 주목한다. 특정 구현예에서, 상기 제공된 방법은 일부 종래 공정과 비교하여 단시간 또는 비교적 단시간에 치료요법에 적합한 조작된 T 세포, 예를 들어 자가 세포 요법에 적합한 조작된 T 세포를 생성한다. 또한, 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법은 상이한 대상체 중에서 수집된 샘플로부터 조작된 세포를 제조하는데 필요한 시간의 양 측면에서 보다 일관되고 덜 가변적인 공정을 초래한다. 특히, 본원에 제공된 방법은 높은 비율의 대상체로부터 세포 요법에 적합한 조작된 T 세포를 성공적으로 생성할 수 있다. 특정 구현예에서, 생성된 세포 조성물은 높거나 또는 비교적 높은 포션(portion)의 건강한 세포, 세포자멸성 마커를 발현하지 않는 세포, 재조합 수용체를 발현하는 높거나 또는 비교적 높은 포션의 세포, 및/또는 항원 자극에 대한 반응에서 높거나 또는 비교적 높은 활성, 예를 들어 세포독성, 항 종양 및/또는 사이토카인 생산성을 갖는 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법은 조작된 세포 생성물을 제조하는 방법을 제공하며, 일부 구현예에서는, 특정 성공률 예를 들어 높은 성공률 또는 임계치 보다 높은 성공률, 예를 들어 치료학적 세포 조성물을 생성할 수 있는 것, 예를 들어 대다수 또는 높은 비율의 샘플에서, 예를 들어 상이한 개별적인 대상체 또는 환자 각각으로부터, 예를 들어 상기 치료학적 조성물로 치료되는 대상체 또는 환자로부터(예를 들어 자가 세포 요법과 관련하여) 유도된 모든 또는 매우 높은 비율의 샘플에서 특정하게 요구되거나 원하는 특징들을 갖는다. 일부 측면에서, 상기 대상체 또는 환자는 질병 또는 병태 예를 들어 암 예를 들어 혈액 또는 혈액암 예를 들어 다발성 골수종을 갖는다. 일부 측면에서, 상기 샘플(매우 높은 비율이 치료학적 세포 조성물을 생성할 수 있는 것)은 세포 표현형 또는 상기 샘플 또는 그의 세포의 다른 파라미터의 측면에서 가변적인 것들을 포함한 환자 샘플이다.

[0081] 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법은 예를 들어 다른 공정을 통해 생성된 세포 조성물에 비해 개선되거나 또는 높은 정도의 세포 건강을 갖는 조작된 T 세포 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 조성물은 아포토틱 마커에 음성인 높은 비율의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법은 강력한 사이토카인 생산성으로 다기능성 세포를 포함하는 T 세포 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법은, 메모리 표현형(memory phenotype)에 대해 농축되고, 중추 메모리 표현형(central memory phenotype)에 대해 농축되고/되거나, CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, 그랜자임(granzyme) B-, 및/또는 CD127+에 대해 농축된 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중의 세포, 상기 조성물 중의 T 세포, 또는 상기 조성물 중의 조작된 T 세포의, 적어도 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 또는 80% 또는 그 이상(또는, 예를 들어 상기 방법을 이용하여 제조된 샘플의 적어도 절반 또는 대부분을 위한 조성물 중의 세포의 적어도 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 또는 80% 또는 그 이상)은 중추 메모리 표현형의 T 세포이고; CD27+, CD28+는 CCR7+, CD45RA-이고/이거나; CCR7+, CD45RO+이다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 중의 세포, 상기 조성물 중의 T 세포, 또는 상기 조성물 중의 조작된 T 세포의, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 또는 80 또는 85 또는 90 또는 95% 이상 또는 그 이상(또는, 상기 방법을 이용하여 제조된 샘플의 적어도 절반 또는 대부분을 위한 조성물 중의 세포의 50, 55, 60, 65, 70, 75, 또는 80 또는 85 또는 90 또는 95% 이상 또는 그 이상, 또는 평균적으로, 상기 방법을 사용하여 제조된 샘플의 경우)은 메모리 표현형의 T 세포이고; CD45RA-이고/이거나; CD45RO+이다.

[0082] 특정 구현예에서, 상기 제공된 방법은 세포 요법에 사용하기 적합한 조작된 세포를 효율적으로 제조하거나 또는 생성하기 위한 공정과 관련하여 사용된다. 특정 구현예에서, 상기 공정의 각각의 단계에 사용된 시기(timing), 조건, 및 시약은 각각의 후속 단계 및/또는 총괄 공정의 효율성을 증진시킨다. 예를 들어 일부 구현예에서, 세포는 원하는 효과, 예를 들어 상기 세포의 자극 또는 개선된 형질도입 효율을 달성하기에 충분히 높은 세포 농도로 그러나 후속 공정 단계들에서의 느린 성장 또는 감소된 생존율을 피하기에 충분히 낮은 농도로 인큐베이션, 형질도입, 및/또는 배양될 수 있다. 추가로, 일부 구현예에서, 상기 공정의 단계들은 후속 공정 단계들 및/또는 전체 공정의 효율성을 개선시키는 특정 시점에서 시작하거나 또는 종료하도록 타이밍될 수 있다. 예를 들어 일부 구현예에서, 인큐베이션 및 조작(예를 들어 세포의 형질도입 또는 형질주입)을 위한 단계들은 대안 방법에서 보다 상기 공정이 조기에 완성되며, 이것은 특정 구현예에서 배양 단계의 후속 단계 동안 생존 및/또는 건강, 및/또는 상기 세포의 증식 및 증폭의 속도를 개선시킨다. 따라서, 일부 측면에서, 각각의 단계의 특정 타이밍, 조건, 및 시약은 상기 개별 단계를 넘어서 상기 세포에 영향을 주며, 특정 구현예에서는 전체 공정의 성능에 영향을 주게 된다.

[0083] 일부 구현예에서, 상기 방법은, 대안 공정 보다 신속하고 보다 효율적일 수 있는 방식으로 세포 요법에 사용하

기 적합한 유전자 조작된 세포를 효율적으로 제조하거나 또는 생성하기 위한 공정과 관련하여 사용된다. 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 상기 방법은 대안 공정으로부터 가능할 수 있는 것 보다 광범위한 집단의 대상체들로부터 조작된 세포의 조성물을 생성하거나 또는 제조하기 위한 높은 성공률을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 제공된 방법에 의해서 제조되거나 또는 생성된 상기 조작된 세포는 보다 높은 건강, 생존율, 활성화능을 가질 수 있으며, 대안 방법에 의해서 제조된 세포 보다 높은 발현의 재조합 수용체를 가질 수 있다. 따라서, 일부 측면에서, 세포 요법을 위한 조작된 세포를 생성하기 위한 상기 제공된 방법의 속도 및 효율은 일부 대안 방법에 의해 가능할 수 있는 보다 광범위한 집단의 대상체에 대해 세포 요법 치료, 예를 들어 자가 세포 요법의 보다 용이한 계획 및 조정을 가능하게 한다.

[0084] 본 출원에 언급된 특허 문서, 과학 논문 및 데이터베이스를 포함한 모든 간행물은 각각의 개별 간행물이 참조로 개별적으로 통합된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 참조로 그 내용 전체가 통합된다. 본원에 제시된 정의가 본원에 참조로 포함된 특허, 출원, 공개 출원 및 기타 간행물에 기재된 정의와 상반되거나 불일치하는 경우, 참조로 본원에 포함된 정의 보다 본원에 제시된 정의가 우선한다.

[0085] 본원에 사용된 섹션 제목은 단지 정리 목적을 위한 것이며 기술된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니된다.

[0086] **I. 조작 세포를 생성하는 공정**

[0087] 본원에서는, 재조합 단백질, 예를 들어 재조합 수용체 예를 들어 T 세포 수용체(TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)을 발현하는 조작된 세포, 예를 들어 조작된 CD4+ T 및 CD8+ T 세포의 산출 조성물을 생성하는 방법이 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 상기 방법은 세포 요법제를 제조, 생성, 또는 생산하는 것과 관련하여 사용되며, 추가 공정 단계, 예를 들어 상기 세포의 단리, 분리, 선별, 활성화 또는 자극, 형질도입, 세척, 현탁, 희석, 농축, 및/또는 제형화를 위한 단계들과 관련하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 세포, 예를 들어 조작된 CD4+ T 및 CD8+ T 세포를 생성 또는 제조하는 방법은 대상체로부터 세포를 단리하고, 상기 세포를 제조, 가공, 자극 조건하의 인큐베이션, 및/또는 조작(예를 들어 형질도입)하는 것 중의 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은, 생물학적 샘플로부터 먼저 투입 세포, 예를 들어 1차 CD4+ 및 CD8+ 세포를 단리시키고, 예를 들어 선별하거나 분리시키고; 투입 세포를 자극 조건하에서 인큐베이션하고, 백터 입자, 예를 들어 바이러스 벡터 입자로 조작하여 형질도입 또는 형질주입에 의해서 상기 세포에 재조합 폴리뉴클레오티드를 도입시키고; 상기 조작된 세포, 예를 들어 형질도입된 세포를 상기 세포가 증폭하도록 배양하고; 상기 세포의 전부 또는 일부를 갖는 용기, 예를 들어 백 또는 바이알에 산출 조성물의 제형화된 세포를 수거, 수확, 및/또는 충전하는 것의 순서로 실시된다.

[0088] 특정 구현예에서, 상기 제공된 방법은 세포의 초기 또는 투입 조성물로부터 재조합 수용체를 발현하는 세포의 산출 조성물을 생성하는 것과 관련하여 사용된다. 특정 구현예에서, 투입 조성물은 농축된 T 세포, 농축된 CD4+ T 세포 및/또는 농축된 CD8+ 세포를 함유하는 세포 조성물(이하, 각각 '농축된 T CD4+ 세포의 조성물', 및 '농축된 CD8+ 세포의 조성물'이라고도 함)을 포함하는 세포를 조합, 혼합 및/또는 풀링(pooling)함으로써 생산, 생성 및/또는 제조된다. 일부 구현예에서, 상기 세포의 투입 조성물은 조합, 혼합 및/또는 풀링된 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 조성물이다. 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법은, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입에 의해 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 도입하기 위해, 활성화 및/또는 자극된 세포를 유전적으로 조작하는 단계; 및/또는 예를 들어 증식 및/또는 증폭을 촉진하는 조건하에서 조작된 세포를 배양하는 단계 중의 하나 이상과 관련하여 사용된다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 또한 농축된 T 세포의 투입 조성물을 생성하는 생물학적 샘플로부터, 예를 들어 대상체로부터 채취, 수거, 및/또는 수득한 생물학적 샘플로부터 세포를 단리 또는 선별하는 것과 관련하여 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 제공된 방법은, 상기 세포가 인큐베이션, 활성화, 자극, 조작, 형질도입, 형질주입, 및/또는 배양된 후 농축된 T 세포의 조성물을 수확, 수거, 및/또는 제형화하는 것과 관련하여 사용될 수 있다.

[0089] 일부 구현예에서, 자극 조건하에 세포를 인큐베이션하는 것은 자극 시약, 예를 들어 본원에서 예를 들어 섹션 I-B-1에 기술된 자극 시약으로 상기 세포를 인큐베이션하는 것이거나 또는 그것을 포함한다. 특정 구현예에서, 한 세트 또는 고정된 양의 세포, 예를 들어 적어도 100×10^6 개 초과 세포를 자극 조건하에 한 세트 또는 고정된 농도, 예를 들어 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 인큐베이션한다. 특정 구현예에서, 상기 인큐베이션은 한 세트 또는 고정된 양의 시간, 예를 들어 2일 이하의 일정한 시간 또는 18시간 내지 30시간 사이의 시간동안 수행된다.

- [0090] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 방법은 세포를 조작, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입하는 것과 관련하여 수행된다. 일부 구현예에서, 한 세트 또는 고정된 양의 세포, 예를 들어 생존 CD4+ 및 CD8+ 세포를 조작에 적용시킨다. 일부 구현예에서, 적어도 10×10^6 개 초과와 일정 양의 세포를 자극 조건하에 한 세트 또는 고정된 농도, 예를 들어 3×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 인큐베이션한다. 특정 구현예에서, 상기 조작은 한 세트 또는 고정된 양의 시간, 예를 들어 2일 이하의 일정한 시간 또는 18시간 내지 30시간 사이의 시간동안 수행된다.
- [0091] 특정 구현예에서, 적어도 일부의 배양 단계는 일정한 혼합 및/또는 관류로, 예를 들어 폐쇄된 시스템의 바이오리액터를 사용하여 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 혼합 및/또는 관류는 사용된 또는 오래된 세포 배지 또는 용액의 신선한 배지 또는 용액으로의 정상적 및/또는 점진적 대체를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 배양은 일정한 시간 내에, 예를 들어 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 출발 또는 개시로부터 2, 3, 4, 또는 5일 이내에, 세포 예를 들어 CD4+ 및 CD8+ 세포를 혼합, 플링, 및/또는 조합하는 것으로부터 2, 3, 4, 또는 5일 이내에; 상기 생물학적 샘플이 수거될 때부터 3, 4, 5, 또는 6일 이내에; 및/또는 생물학적 샘플로부터의 농축된 T 세포, 예를 들어 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 조성물의 단리, 선별, 및/또는 농축으로부터 3, 4, 5, 또는 6일 이내에 개시되어 투입 조성물을 생성한다.
- [0092] 일부 구현예에서, 하나 이상의 공정 단계는 적어도 부분적으로는 무혈청 배지 중에서 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 정의된 및/또는 잘 정의된 세포 배양 배지이다. 특정 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 처리된, 예를 들어 억제제 및/또는 성장 인자(growth factor)를 제거하도록 여과된 제어된 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 단백질을 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 혈청 알부민, 가수 분해물, 성장 인자, 호르몬, 담체 단백질 및/또는 부착 인자를 함유할 수 있다.
- [0093] 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법은 임상적 용도, 예를 들어 임상 세포 요법을 위한 세포의 제조에서 하나 이상의 또는 모든 단계가 비-멸균 상태에 세포를 노출시키지 않으면서 수행되도록 실시된다. 상기 공정의 일부 구현예에서, 상기 세포는 폐쇄된 시스템에서 모두 단리, 분리 또는 선별, 형질도입, 세척, 선택적으로는 활성화 또는 자극 및 제형화된다. 일부 구현예에서, 상기 단계들 중의 하나 이상은 상기 폐쇄된 시스템 또는 장치와는 별도로 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 농축된 세포의 조성물은 멸균 조건하에, 예를 들어 별도의 폐쇄된 시스템으로의 멸균 운반에 의해서 상기 폐쇄된 시스템 또는 장치와는 별도로 운반된다.
- [0094] 특정 구현예에서, 농축된 T 세포의 조성물은, 재조합 수용체를 발현하는 농축된 T 세포의 산출 조성물을 생성하는 공정의 임의의 스테이지 또는 단계 이전에, 도중에, 또는 그 후에 0°C 미만, -20°C 미만, 또는 -70°C 또는 -80°C 또는 그 미만에서 수거, 저온 보호를 위한 제형화, 저온 동결, 및/또는 저장된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 미만의 시간동안, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8주 미만의 시간동안, 또는 8주 초과와 시간동안 저장될 수 있다. 저장 후, 농축된 T 세포의 조성물은 해동될 수 있으며 상기 공정은 그 공정의 동일한 지점에서 재개될 수 있다. 일부 구현예에서, 농축된 T 세포의 투입 조성물은 추가 가공, 예를 들어 자극 조건하의 인큐베이션 이전에 저온 동결 및 저장된다. 특정 구현예에서, 농축된 T 세포의 배양 및/또는 제형화된 조성물은 대상체에, 예를 들어 자가 세포 요법제로서 투여되기 전에 저온 동결 및 저장된다.
- [0095] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 상기 방법은, 자극 조건하에 상기 세포를 인큐베이션하고, 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 발현하도록 상기 세포에 형질도입시키고, 증식 또는 증폭을 촉진시키는 조건하에 상기 세포를 배양하는 것을 포함하는 공정에 의해서 조작된 세포가 생성되는 공정과 관련하여 사용된다. 특정 구현예에서, 상기 인큐베이션은 18시간 내지 30시간동안, 예를 들어 (약) 24시간동안 후속적으로 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는, 상기 세포가 자극 및 형질도입된 후 자극 및/또는 증폭을 촉진시키는 조건하에 배양된다. 특정 구현예에서, 상기 인큐베이션은, 예를 들어 상기 세포를 자극 시약과 접촉시킴으로써 개시되고, 상기 형질도입은, 상기 인큐베이션이 개시된 후 48시간, 36시간 또는 30시간 이내에 개시된다. 일부 구현예에서, 상기 배양은 상기 인큐베이션 및 형질도입 후에 수행되며, 상기 배양은, 상기 인큐베이션이 개시된 후 72시간, 66시간, 또는 60시간 이내에 개시된다. 특정 구현예에서, 상기 배양은, 세포의 임계치의 양, 밀도, 및/또는 증폭이 달성될 때까지, 상기 세포의 임계치의 양, 밀도, 및/또는 증폭이 달성된 후 적어도 1일까지, 및/또는 상기 인큐베이션의 개시후 적어도 8일, 9일, 10일, 11일, 또는 12일까지 수행된다.
- [0096] 특정 구현예에서, 상기 공정의 임의의 스테이지 또는 단계에서, 상기 세포의 일부는 샘플링되거나 수거될 수 있으며, 예를 들어 세포는, 상기 조성물이 예를 들어 상기 단리, 인큐베이션, 조작, 배양, 및/또는 제형화도중에 상기 폐쇄된 시스템에 유지되는 동안 농축된 T 세포의 조성물로부터 채취될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기

세포는 제한되지는 않지만 생존율, 아포프토시스, 활성화, 자극, 성장, 및/또는 고갈을 비롯한 제조업자, 특정, 또는 특성에 대해 분석될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 세포는, 상기 농축된 T 세포의 조성물이 상기 폐쇄된 시스템에 유지되는 동안 자동화된 공정에 의해서 샘플링되거나 수거된다. 일부 구현예에서, 상기 샘플링되거나 수거된 세포의 분석은 자동화된다. 특정 구현예에서, 상기 분석은 멸균 조건하에 폐쇄된 시스템에서 수행된다.

[0097] 본원의 일부 구현예에서, (예를 들어 세포 조성물 중의 T 세포를 활성화하는) 자극 조건하에 투입 세포 조성물을 인큐베이션하는 단계, 상기 세포 조성물을 조작(예를 들어 형질도입)에 적용시켜서 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 발현시키는 단계, 상기 세포를, 세포 증식 또는 증폭을 촉진시키는 조건하에 배양하는 단계, 및/또는 상기 세포를 수확 또는 수거하여 조작된 세포, 예를 들어 세포 요법제용 조작된 T 세포를 포함하는 세포 조성물을 생성하는 단계를 포함하여 조작된 세포를 생성하는 공정이 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 세포 조성물은, 자극 시약(예를 들어 섹션 I-B-1에 기술된 비드 시약) 대 세포의 비율이 (약) 1:1이고; 상기 투입 조성물은 (약) 1:1의 비율로 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함하고(예를 들어 CD4+ T 세포에 대해 농축된 조성물 및 CD8+ T 세포에 대해 농축된 조성물은 (약) 1:1의 비율로 풀링, 혼합, 및/또는 조합될 수 있다); 상기 자극 조건하에 예를 들어 상기 자극 시약을 사용한 인큐베이션의 총 기간은 약 12시간 내지 약 36시간, 예를 들어 18시간 내지 약 30시간이며; 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물의 세포는 상기 자극 조건하에 예를 들어 자극 시약의 존재하에, 약 5×10^5 개의 세포/m 내지 약 5×10^7 개 세포/mL, 예를 들어 (약) 3×10^6 개의 세포/m의 밀도로 인큐베이션하고/하거나; 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물의 세포는 무혈청 배지(예를 들어 하나 이상의 재조합 사이토카인, 예를 들어 IL-2, IL-7, 및 IL-15를 포함하는 무혈청 배지) 중에서 자극되고/되거나 활성화되는 것을 포함하는 자극 조건하에 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는, 원심분리하에, 예를 들어 스피노클레이션(sp inoculation)(예를 들어 원심 집중)하에, 예를 들어 약 1600×g으로 약 60분동안 상기 세포를 재조합 단백질을 암호화하는 핵산 분자, 예를 들어 재조합 수용체와 접촉시키고; 상기 세포를, 약 5×10^5 개 세포/mL 내지 약 5×10^7 개 세포/mL, 예를 들어 (약) 1×10^6 개의 세포/m의 밀도로 조작에 적용시키고; 자극 조건하에 배양된 상기 조성물로부터의 약 100×10^6 개의 세포를 조작에 적용시키고; 상기 조작 단계, 예를 들어 형질도입의 총 기간은 약 12시간 내지 약 36시간, 예를 들어 18시간 내지 약 30시간이고/이거나; 상기 세포는, 무혈청 배지(예를 들어 하나 이상의 재조합 사이토카인, 예를 들어 IL-2, IL-7, 및 IL-15를 포함하는 무혈청 배지) 중에서 조작에 적용되는 것을 포함하는 조건하에서 조작에 적용된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는, 상기 세포를 락킹 및/또는 관류 조건하에서 배양시키고/시키거나; 상기 세포를 무혈청 배지(예를 들어 하나 이상의 재조합 사이토카인, 예를 들어 IL-2, IL-7, 및 IL-15, 선택적으로는 상기 자극/활성화 및/또는 상기 조작 보다 고농도의 재조합 사이토카인을 포함하는 무혈청 배지) 중에서 배양시키는 조건하에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포가 임계치의 양, 농도, 및/또는 증폭, 예를 들어 적어도 약 3500×10^6 개의 세포 또는 약 5500×10^6 개의 세포인 임계치의 세포수(예를 들어 총 핵 형성 세포수)를 달성할 때 상기 배양을 종료하고 그 세포를 수확한다. 일부 구현예에서, 상기 세포가 상기 자극/활성화, 조작, 배양, 및/또는 수확 공정동안 주어진 시간에 표적 또는 임계치를 달성하지 못하는 경우에는, 상기 표적 또는 임계치에 도달하는 나중 시점까지 상기 세포는 자극되거나 활성화될 수 있으며, 조작에 적용시키고/시키거나 배양시킨다.

[0098] 본원의 일부 구현예에서, (예를 들어 세포 조성물 중의 T 세포를 활성화하는) 자극 조건하에 투입 세포 조성물을 인큐베이션하는 단계, 상기 세포 조성물을 조작(예를 들어 형질도입)에 적용시켜서 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 발현시키는 단계, 상기 세포를, 세포 증식 또는 증폭을 촉진시키는 조건하에 배양하는 단계, 및/또는 상기 세포를 수확 또는 수거하여 조작된 세포, 예를 들어 세포 요법제용 조작된 T 세포를 포함하는 세포 조성물을 생성하는 단계를 포함하여 조작된 세포를 생성하는 공정이 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 세포 조성물은, 자극 시약(예를 들어 섹션 I-B-1에 기술된 비드 시약) 대 세포의 비율이 (약) 1:1이고; 상기 투입 조성물은 (약) 1:1의 비율로 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함하고(예를 들어 CD4+ T 세포에 대해 농축된 조성물 및 CD8+ T 세포에 대해 농축된 조성물은 (약) 1:1의 비율로 풀링, 혼합, 및/또는 조합될 수 있다); 상기 자극 조건하에 예를 들어 상기 자극 시약을 사용한 인큐베이션의 총 기간은 약 12시간 내지 약 36시간, 예를 들어 18시간 내지 약 30시간이며; 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물의 세포는 상기 자극 조건하에 예를 들어 자극 시약의 존재하에, 약 5×10^5 개의 세포/m 내지 약 5×10^7 개 세포/mL, 예를 들어 (약) 3×10^6 개의 세포/m의 밀도로 인큐베이션하고/하거나; 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물의 세포는 무혈청 배지(예를 들어 하나 이상의 재조합 사이토카인, 예를 들어 IL-2, IL-7, 및 IL-15를 포함하는 무혈청 배지) 중에서 자극되고/되거나 활성화되는 것을 포함하는 자극 조건하에 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는, 원심분리하에, 예를

들어 스피노콜레이션(spinoculation)(예를 들어 원심 집중)하에, 예를 들어 약 $1600 \times g$ 으로 약 60분동안 상기 세포를 제조함 단백질을 암호화하는 핵산 분자, 예를 들어 제조함 수용체와 접촉시키고; 상기 세포를, 약 5×10^5 개 세포/mL 내지 약 5×10^7 개 세포/mL, 예를 들어 (약) 1×10^6 개의 세포/mL의 밀도로 조작에 적용시키고; 자극 조건하에 배양된 상기 조성물로부터의 적어도 약 100×10^6 개 및 약 200×10^6 개까지의 세포를 조작에 적용시키고; 상기 조작 단계, 예를 들어 형질도입의 총 기간은 약 12시간 내지 약 36시간, 예를 들어 18시간 내지 약 30시간 이고/이거나; 상기 세포는, 무혈청 배지(예를 들어 하나 이상의 제조함 사이토카인, 예를 들어 IL-2, IL-7, 및 IL-15를 포함하는 무혈청 배지) 중에서 조작에 적용되는 것을 포함하는 조건하에서 조작에 적용된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는, 상기 세포를 락킹 및/또는 관류 조건하에서 배양시키고/시키거나; 상기 세포를 무혈청 배지(예를 들어 하나 이상의 제조함 사이토카인, 예를 들어 IL-2, IL-7, 및 IL-15, 선택적으로는 상기 자극/활성화 및/또는 상기 조작 보다 고농도의 제조함 사이토카인을 포함하는 무혈청 배지) 중에서 배양시키는 조건하에서 배양된다. 일부 구현예에서, 세포가 임계치의 양, 농도, 및/또는 증폭, 예를 들어 적어도 약 2400×10^6 개의 세포인 임계치의 세포수(예를 들어 총 핵 형성 세포수)를 달성하고 상기 세포가 임계치의 생존율을 달성할 때, 예를 들어 상기 세포의 적어도 약 75% 또는 적어도 약 85%가 생존할 때 상기 배양을 종료하고 그 세포를 수확한다. 일부 구현예에서, 상기 세포가 상기 자극/활성화, 조작, 배양, 및/또는 수확 공정동안 주어진 시간에 표적 또는 임계치를 달성하지 못하는 경우에는, 상기 표적 또는 임계치에 도달하는 나중 시점까지 상기 세포는 자극되거나 활성화될 수 있으며, 조작에 적용시키고/시키거나 배양시킨다.

[0099] 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법에 의해서 제조되고/되거나 가공된 세포 또는 조성물은 예시적 및/또는 대안 공정에 의해 가공 또는 제조된 세포 또는 조성물과 비교될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 대안 및/또는 예시적 공정은 하나 이상의 특정 측면에서 상이할 수 있지만, 그렇지 않은 경우 비교되는 상기 제공된 방법의 구현예 또는 측면과 유사하거나 동일한 특징, 측면, 단계, 스테이지, 시약, 및/또는 조건을 갖는다. 예를 들어 상기 제공된 방법은 시약의 존재하에서 세포를 인큐베이션하는 것과 관련하여 사용되며, 상기 세포는 예시적 및/또는 대안 공정에서 상기 시약으로 인큐베이션되지 않은 세포와 비교될 수 있다. 일부 구현예에서, 별도로 특정되지 않는한, 상기 제공된 방법 및 상기 예시적 및/또는 대안적 공정은 동일하거나 유사하고, 예를 들어 단리, 선별, 농축, 활성화, 자극, 조작, 형질주입, 형질도입, 배양, 및/또는 제형화를 위한 유사하거나 동일한 단계를 갖는다. 일부 구현예에서, 별도로 지시되지 않는한, 상기 제공된 방법 및 상기 대안 공정은 동일하거나 유사한 유형의 생물학적 샘플, 및/또는 동일한 세포 유형의 공정 세포 및/또는 투입 세포로부터 세포를 단리, 서별, 및/또는 농축한다.

[0100] 또한, 약학 조성물 및 제형을 포함한 상기 방법에 의해서 제조된 세포 및 조성물, 및 키트, 시스템, 및 상기 방법을 수행하기 위한 장치가 제공된다. 또한 치료학적 방법, 예를 들어 입양 세포 요법을 위한 방법을 포함한 상기 방법에 의해서 제조된 세포 및 조성물의 사용방법, 및 대상체에 투여하기 위한 약학 조성물이 제공된다.

[0101] **A. 샘플 및 세포 준비**

[0102] 특정 구현예에서, 제공된 방법은 농축된 세포, 예를 들어 T 세포의 하나 이상의 투입 조성물을 생성하기 위해서 생물학적 샘플로부터 세포를 단리, 선별, 및/또는 농축하는 것과 관련하여 사용된다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 생물학적 샘플로부터의 세포 또는 그의 조성물의 단리, 예를 들어 대상체, 예를 들어 특정 질병 또는 병태를 갖거나 또는 세포 요법을 필요로 하거나 또는 세포 요법제가 투여될 대상으로부터 얻어지거나 또는 그로부터 유래된 것을 포함한다. 일부 측면에서, 대상체는 사람, 예를 들어 특정 치료적 개입, 예를 들어 세포가 단리되고, 가공되고/되거나 조작되는 입양 세포 요법을 필요로 하는 환자인 대상체이다. 따라서, 일부 구현예에서, 세포는 1차 세포, 예를 들어 1차 인간 세포이다. 샘플은 조직, 유액 및 대상체로부터 직접 취한 다른 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플은 생물학적 공급원으로부터 직접 얻은 샘플 또는 가공된 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 체액, 예를 들어 혈액, 혈장, 혈청, 뇌척수액, 활액, 소변 및 땀, 조직 및 기관 샘플, 예를 들어 이들로부터 유래한 가공된 샘플을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0103] 일부 측면에서, 샘플은 혈액 또는 혈액-유래 샘플이거나, 또는 성분채집술 또는 백혈구 성분채집술 산물로부터 유래된 것이다. 예시적인 샘플은 전혈, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 백혈구, 골수, 흉선, 조직 생검, 종양, 백혈병, 림프종, 림프절, 장 관련 림프 조직, 점막 관련 림프 조직, 비장, 기타 림프 조직, 간, 폐, 위장, 소장, 대장, 신장, 췌장, 유방, 뼈, 전립선, 자궁 경부, 고환, 난소, 편도선 또는 기타 기관, 및/또는 이들로부터 유래되는 세포를 포함한다. 샘플은 세포 요법과 관련하여, 예를 들어 입양 세포 요법, 자가 및 동종 원으로부터의 샘플을 포함한다.

- [0104] 일부 예에서, 대상체의 순환 혈액으로부터의 세포는 예를 들어 성분채집술 또는 백혈구성분채집술에 의해 수득된다. 일부 측면에서 샘플은, T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포들, 기타 유핵 백혈구 세포들, 적혈구 세포들, 및/또는 혈소판을 비롯한 림프구를 포함하며 일부 측면에서 적혈구 세포와 혈소판이 아닌 세포들을 함유한다.
- [0105] 일부 구현예에서, 대상체로부터 수집된 혈액 세포들을 세척하여 예를 들어 혈장 분획을 제거하고 후속 프로세싱 단계를 위하여 세포를 적절한 완충액 또는 배지에 넣는다. 일부 구현예에서, 세포들을 인산완충염수(PBS)로 세척한다. 일부 구현예에서, 세척용액은 칼슘 및/또는 마그네슘 및/또는 다수의 또는 모든 2가 양이온을 결여한다. 일부 측면에서, 세척 단계는 제조사 설명서에 따라 반자동화식 "병류(flow-through)" 원심 분리(예를 들어 Cobe 2991 세포 프로세서, Baxter)에 의해 달성된다. 일부 측면에서, 세척 단계는 제조사 설명서에 따라 탄젠트 유동 여과(tangential flow filtration: TFF)에 의해 달성된다. 일부 구현예에서, 세포는 예를 들어 Ca^{2+} / Mg^{2+} 가 없는 PBS와 같은 다양한 생체적합성 완충액에 재현탁된다. 특정 구현예에서, 혈액세포 샘플 성분들을 제거하고 세포들을 배양 배지에 직접 현탁시킨다.
- [0106] 일부 구현예에서, 제조 방법은 형질도입 및 조작을 위한 단리, 선별 및/또는 농축 및/또는 인큐베이션 전 또는 후에 세포를 동결, 예를 들어 저온 보존하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 동결 및 후속적인 해동 단계는 세포 집단 내의 과립구 및, 어느 정도로 단핵구를 제거한다. 일부 구현예에서는 예를 들어 혈장 및 혈소판 제거를 위해 세척 단계 후에 냉동 용액에 세포들을 현탁시킨다. 일부 측면에서 공지의 다양한 여하한 냉동 용액 및 파라미터가 모두 사용가능하다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 (약) 12.5%, 12.0%, 11.5%, 11.0%, 10.5%, 10.0%, 9.5%, 9.0%, 8.5%, 8.0%, 7.5%, 7.0%, 6.5%, 6.0%, 5.5%, 또는 5.0% DMSO, 또는 (약) 1% 내지 (약) 15%, (약) 6% 내지 (약) 12%, (약) 5% 내지 (약) 10%, 또는 (약) 6% 내지 (약) 8% DMSO의 최종 농도를 갖는 배지 및/또는 용액에서 동결되고, 예를 들어 저온 동결(cryofrozen) 또는 저온 보존된다(cryopreserved). 특정 구현예에서, 상기 세포는 (약) 5.0%, 4.5%, 4.0%, 3.5%, 3.0%, 2.5%, 2.0%, 1.5%, 1.25%, 1.0%, 0.75%, 0.5%, 또는 0.25% HSA, 또는 0.1% 내지 5%, 0.25% 내지 4%, 0.5% 내지 2%, 또는 1% 내지 2% HSA의 최종 농도를 갖는 배지 및/또는 용액에서 동결되고, 예를 들어 저온 동결 또는 저온 보존된다. 그 한 가지 예는 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민(HSA)를 함유하는 PBS 또는 그 밖의 적절한 세포 동결 배지의 사용을 포함한다. 이어서 배지로 1:1 희석하여 DMSO 및 HSA의 최종 농도가 각각 10% 및 4%가 되도록 한다. 이어서 세포를 일반적으로 분당 1°C 또는 약 1°C의 속도로 -80°C 또는 약 -80°C까지 냉동시키고 액체질소 저장 탱크의 증기상에 보관한다.
- [0107] 일부 구현예에서, 세포 또는 집단의 단리는 하나 이상의 제조 및/또는 비-친화성 기반 세포 분리 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는, 예를 들어 원치 않는 서분을 제거, 원하는 성분을 농축, 특정 시약에 민감한 세포를 용리하거나 제거하기 위하여, 하나 이상의 시약의 존재하에서 수세, 원심 분리 및/또는 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 특성에 기초하여, 예를 들어 밀도, 부착 성질, 크기, 민감성 및/또는 특정 성분에 대한 내성에 기초하여 분리된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 밀도-기반 세포 분리 방법을 포함하는데, 예를 들어 적혈구를 용리시켜 Percoll 또는 Ficoll 구배를 통해 원심 분리 함으로써 말초 혈액으로부터 백혈구를 제조하는 것이다.
- [0108] 일부 구현예에서, 상기 선별 단계의 적어도 일부는 선별 시약을 사용한 세포의 인큐베이션을 포함한다. 선별 시약(들)을 사용한 인큐베이션은 하나 이상의 특정 분자의 세포의 발현 또는 존재 또는 그에 기초한 하나 이상의 상이한 세포 유형의 선별을 위한 하나 이상의 선별 시약, 예를 들어 표면 마커, 예를 들어 표면 단백질, 세포내 마커 또는 핵산을 사용하여 수행될 수 있는 선별 방법의 일부이다. 세포에서 하나 이상의 특정 분자들의 발현 또는 존재에 기초하여 여러 가지 세포 유형을 분리하는 것을 포함하는데, 예를 들어 특정 분자는 표면 마커, 예를 들어 표면 단백질, 세포내 마커 또는 핵산이다. 일부 구현예에서, 이러한 마커에 기초한 선별 시약(들)을 사용한 임의의 공지된 분리 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 선별 시약(들)은 친화도-또는 면역친화도-기반 분리인 분리를 결과한다. 예를 들어 일부 측면에서, 상기 선별은 세포의 하나 이상의 마커, 통상 세포 표면 마커에 대한 발현 또는 발현 수준에 기초한 세포 및 세포 집단의 분리를 위한 시약(들)을 사용한 인큐베이션을 포함하는데, 이는 예를 들어 그러한 마커들에 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 파트너와의 인큐베이션, 일반적으로 그 후의 수세 단계와 상기 항체 또는 결합 파트너와 결합하지 않은 그러한 세포들로부터 상기 항체 또는 결합 파트너에 결합된 세포의 분리에 의한다.
- [0109] 상기 공정의 일부 측면에서, 세포의 부피는 원하는 친화성-기반 선별 시약의 양과 혼합된다. 면역 친화성-기반 선별은 분리되는 세포와, 상기 세포 상의 마커에 특이적으로 결합하는 분자, 예를 들어 고체 표면, 예를 들어 입자 상의 항체 또는 다른 결합 파트너 사이에서 바람직한 에너지 상호작용을 일으키는 임의의 시스템 또는 방법을 이용하여 실행될 수 있다. 일부 구현예에서, 방법들은 세포의 마커에 특이적인 선별 제제(예를 들어

항체)로 코팅되는 입자 예를 들어 비드, 예를 들어 자성 비드(magnetic bead)를 이용하여 실행될 수 있다. 입자들(예를 들어 비드들)은, 에너지적으로 선호되는 상호작용을 촉진시키는데 도움이 되는 일정한 세포 밀도 대 입자(예를 들어 비드) 비로, 진탕 또는 혼합하는 동안 용기, 예를 들어 튜브 또는 백에서 세포와 인큐베이션 또는 혼합될 수 있다. 다른 경우에, 상기 방법은 전부 또는 일부의 선별이 원심 챔버(centrifugal chamber)의 내부 공동에서, 예를 들어 원심 회전(centrifugal rotation)하에서 수행되는 세포의 선별을 포함한다. 선별 시약, 예를 들어 면역 친화성-기반 선별 시약(immunoaffinity-based selection reagent)을 사용한 세포의 인큐베이션은 원심 챔버에서 수행된다. 특정 구현예에서, 단리 또는 분리는 국제공개공보 제WO2009/072003호 또는 미국특허출원공개공보 제US2011/0003380 A1호에 기술된 시스템, 기구, 또는 장치를 이용하여 수행된다.

[0110] 일부 구현예에서, 원심 챔버의 공동(cavity)에서 그러한 선별 단계 또는 그의 일부(예를 들어 항체-코팅된 입자, 예를 들어 자성 비드로 인큐베이션)를 수행함으로써, 사용자는 특정 파라미터, 예를 들어 다양한 용액의 부피, 그의 가공 및 타이밍동안 용액의 첨가를 조절할 수 있으며, 이것은 다른 이용가능한 방법과 비교하여 이점을 제공할 수 있다. 예를 들어 인큐베이션동안 공동 중의 액체 부피를 감소시키는 능력은 상기 공동에서 세포의 총수에 영향을 끼치지 않으면서 상기 선별에 사용된 입자(예를 들어 비드 시약)의 농도를 증가시킬 수 있다. 이것은 처리되는 세포와 선별에 사용되는 입자 사이의 쌍별(pairwise) 상호 작용을 향상시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들어 본원에서 기술된 시스템, 회로, 및 제어와 관련된 때 상기 챔버에서 인큐베이션 단계를 수행하는 것은 사용자가 인큐베이션도중 원하는 시간에 용액의 교반을 수행하는 것을 허용하며, 이것은 또한 상호작용을 증진시킬 수 있다.

[0111] 일부 구현예에서, 선별 단계의 적어도 일부는 원심 챔버에서 수행되며, 이것은 선별 시약을 사용한 세포의 인큐베이션을 포함한다. 이러한 공정의 일부 측면에서, 세포의 부피는 제조업자의 지침에 따른 동일한 수의 세포 및/또는 세포의 부피의 선별을 위한 튜브 또는 용기에서 유사한 선별을 수행할 때 정상적으로 사용되는 것 보다 훨씬 적은 원하는 친화성-기반 선별 시약의 양과 혼합된다. 일부 구현예에서, 제조업자의 지침에 따른 동일한 수의 세포 및/또는 세포의 부피의 선별을 위한 튜브 또는 용기-기반 인큐베이션에서 세포의 선별을 위해 사용된 동일한 선별 시약(들)의 양의 (약) 5% 이하, (약) 10% 이하, (약) 15% 이하, (약) 20% 이하, (약) 25% 이하, (약) 50% 이하, (약) 60% 이하, (약) 70% 이하 또는 (약) 80% 이하인 선별 시약(들)의 양이 사용된다.

[0112] 일부 구현예에서, 선별을 위해, 예를 들어 세포의 면역친화성-기반 선별을 위해, 농축 및/또는 고갈시키고자 하는 세포 상의 표면 마커에 특이적으로 결합하지만, 예를 들어 스키펠드 예를 들어 폴리머 또는 표면 예를 들어 비드 예를 들어 자성 비드 예를 들어 CD4 및 CD8에 특이적인 모노클로날 항체에 커플링된 자성 비드와 같은, 조성물 내 다른 세포 상의 마커에는 특이적으로 결합하지 않는 분자와 같은 선별 시약과 함께 선별 완충액 역시도 함유하는 조성물에서 챔버의 공동에서 세포를 인큐베이션한다. 전술한 바와 같은 일부 구현예에서, 선별 시약은 챔버의 공동 내의 세포에, 진탕 또는 회전하면서 튜브 내 선별을 수행하는 경우 동일한 세포 갯수 또는 동일한 세포 부피를 선별하는 것과 동일 또는 유사한 효율을 달성하는데 일반적으로 이용되거나 필요한, 선별 시약의 양 또는 대략 그 양 보다 실질적으로 더 적은 양(예를 들어 그 양의 (약) 5% 이하, 10% 이하, 20% 이하, 30% 이하, 40% 이하, 50% 이하, 60% 이하, 70% 이하 또는 80% 이하의 양)으로 챔버의 공동 내의 세포에, 첨가된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 10 mL 또는 약 10 mL 내지 200 mL 또는 약 200 mL, 예를 들어 적어도 또는 적어도 약 또는 약 또는 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL, 100 mL, 150 mL 또는 200 mL의 양의 표적 부피량의 시약을 달성하기 위해 세포에 선별 완충액 및 선별 시약을 첨가하는 것에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 선별 완충액 및 선별 시약은 세포에 첨가되기 전에 예비-혼합된다. 일부 구현예에서, 선별 완충액 및 선별 시약은 세포에 별도로 첨가된다. 일부 구현예에서, 선별 인큐베이션은 주기적으로 약하게 혼합하는 조건과 함께 수행되는데, 이러한 조건은 에너지 발생에 유리한 상호반응을 촉진할 수 있으므로 고선별 효율을 달성하면서도, 전체적인 선별 시약의 양을 덜 사용할 수 있게 해준다.

[0113] 일부 구현예에서, 선별 시약과의 총 인큐베이션 기간은 5분 또는 약 5분 내지 6시간 또는 약 6시간, 예를 들어 30분 내지 3시간, 예를 들어 적어도 또는 적어도 약 30분, 60분, 120분 또는 180분이다.

[0114] 일부 구현예에서, 인큐베이션은 일반적으로 혼합 조건 하에, 예를 들어 600 rpm 또는 약 600 rpm 내지 1700 rpm 또는 약 1700 rpm(예를 들어 적어도 600 rpm, 1000 rpm, 또는 1500 rpm 또는 1700 rpm), 예를 들어 샘플 또는 챔버 벽 또는 기타 컨테이너 벽에서의 RCF가 약 80g 내지 100g(예를 들어 약 또는 적어도 80g, 85g, 90g, 95g, 또는 100g)인 조건과 같이, 세포 펠렛에 사용되는 것보다 낮은 속도와 같은 상대적으로 낮은 힘 또는 속도에서 이루어지는 스피닝 존재 하에, 수행된다. 일부 구현예에서, 스핀은 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 초동안 스핀 및/또는 휴지를 수행하는 것, 예를 들어 약 1초 또는 2초간 스핀한 다음 약 5, 6, 7, 또는 8

초동안 휴지하는 방식으로, 저속 스핀 후 휴지 기간의 반복 실시 간격을 이용하여 수행된다.

- [0115] 일부 구현예에서, 이러한 프로세스는 챔버가 불가분하게 통합된 전체적으로 밀폐된 시스템 내에서 수행된다. 일부 구현예에서, 이 프로세스(및 면면 측면에서 성분채집술 샘플과 같은 세포를 함유하는 샘플을 세척하는 이전의 세척 단계와 같은 하나 이상의 부가적인 단계를 포함)는 자동화 방식으로 수행되며, 이에 따라 세
- [0116] 포, 시약 및 기타 성분들이 적절한 시간 및 원심 분리 하에 챔버 내로 견인 및 유출되어, 자동화 프로그램을 이용하여 단일의 밀폐 시스템에서 세척과 결합 단계를 완결시킬 수 있다.
- [0117] 일부 구현예에서, 인큐베이션 및/또는 세포와 선별 시약 및/또는 시약들의 혼합 후, 인큐베이션된 세포들을 특정 시약 또는 시약들의 존재 또는 부재에 기초하여 세포를 선별하기 위한 분리 단계를 거치게 한다. 일부 구현예에서, 분리는 선별 시약으로 세포의 인큐베이션이 수행되었던 것과 동일한 밀폐 시스템에서 수행된다. 일부 구현예에서, 선별 시약으로 인큐베이션한 후, 선별 시약과 결합된 세포를 비롯한 인큐베이션된 세포들은 면역친화성-기반 세포의 분리를 위한 시스템 내로 전달된다. 일부 구현예에서, 면역친화성-기반 분리를 위한 시스템은 자성 분리 컬럼이거나 또는 이것을 포함한다.
- [0118] 이러한 분리 단계는 양성 선별 및/또는 음성 선별에 기초할 수 있는데, 양성 선별에서는 시약, 예를 들어 항체 또는 결합 파트너에 결합된 세포는 추가 사용을 위하여 보유되며, 음성 선별에서는 상기 시약, 예를 들어 항체 또는 결합 파트너에 결합하지 않은 세포들이 보유된다. 일부 구체예에 있어서, 두 분획은 추후 사용을 위해 보유된다. 일부 측면에서, 음성 선별은 이중 집단에서 세포 유형을 특이적으로 식별하는 어떠한 항체도 이용 가능하지 않은 경우에 특히 유용할 수 있고, 그로써, 원하는 집단 이외의 세포에 의해 발현된 마커에 기초하여 분리가 가장 잘 수행된다.
- [0119] 일부 구현예에서, 공정 단계는 추가로 예를 들어 친화성-기반 선별을 수행할 수 있는 시스템 또는 장치를 이용하는 인큐베이션된 및 세포의 음성 및/또는 양성 선별을 포함한다. 일부 구현예에서, 단리(isolation)는 양성 선별에 의한 특정 세포 집단을 위한 농축(enrichment), 또는 특정 세포 집단의 고갈, 음성 선별에 의해서 수행된다. 일부 구현예에서, 양성 또는 음성 선별은 하나 이상의 항체 또는 각각 발현되거나 또는 양성 또는 음성으로 선별된 세포 상의 상대적으로 높은 수준(마커^{high})에서 발현된 하나 이상의 표면 마커에 특이적으로 결합하는 다른 결합제로 세포를 인큐베이션함으로써 수행된다.
- [0120] 분리는, 특정 마커를 발현하는 특정 세포 집단 또는 세포들을 100% 농축 또는 제거하는 결과를 나타낼 필요는 없다. 예를 들어 마커를 발현하는 것들과 같은 특정 유형의 세포에 대한 양성 선별 또는 농축은 그러한 세포의 수 또는 백분율을 증가시키는 것을 말하지만, 그 마커를 발현하지 않는 세포가 전혀 없는 결과를 나타낼 필요는 없다. 마찬가지로, 마커를 발현하는 것과 같은 특정 유형의 세포에 대한 음성 선별, 제거 또는 희석(depletion)은 그러한 세포의 수 또는 백분율을 감소시키는 것을 말하지만, 그러한 모든 세포를 완전히 제거하는 결과를 나타낼 필요는 없다.
- [0121] 일부 구체예에서, 하나의 단계로부터 양성 또는 음성으로 선별된 분획이 다른 분리 단계로 들어가는 다수 회전 의 분리 단계가 수행되는데, 다른 분리 단계는 예를 들어 후속하는 양성 또는 음성 선별이다. 일부 구체예에서, 단일 분리 단계는 예를 들어 음성 선별을 위하여 표적화된 마커에 각각 특이적인 복수 개의 항체 또는 결합 파트너들과 세포를 인큐베이션함으로써 다수의 마커를 발현하는 세포를 동시에 희석시킬 수 있다. 마찬가지로, 다양한 세포 유형에서 발현되는 복수 개의 항체 또는 결합 파트너와 세포를 인큐베이션함으로써 다수의 세포 유형이 동시에 양성적으로 선별될 수 있다. 특정 구현예에서, 분리 단계는 반복되고/되거나 1회 이상 수행되고, 하나의 단계로부터 양성 또는 음성적으로 선별된 분획은 동일반 분리 단계, 예를 들어 반복된 양성 또는 음성 선별에 적용된다. 일부 실시예에서, 단일 분리 단계는 반복되고/되거나 1회 이상 수행되어, 예를 들어 선별된 세포의 순도를 증가시키고/시키거나 음성적으로 선별된 분획으로부터의 음성적으로 선별된 세포를 희석(deplete)시킨다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 분리 단계가 2회, 3회, 4회, 5회, 6회, 7회, 8회, 9회, 10회, 또는 10회 이상 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 선별 단계들은 1회 내지 10회, 1회 내지 5회, 또는 3회 내지 5회 수행되고/되거나 반복된다.
- [0122] 예를 들어 일부 측면에서, 특정 서브집단의 T 세포, 예를 들어 하나 이상의 표면 마커, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD27+, CD127+, CD4+, CD8+, CD45RA+, 및/또는 CD45RO+ T 세포를 발현하는 세포에 대하여 양성 또는 이를 높은 수준으로 발현하는 세포가 양성 또는 음성 선별 기법에 의해 분리된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 상기 마커에 특이적으로 결합하나 또는 하나 이상의 항체 또는 결합 파트너를 사용함 인큐베이션에 의해서 선별된다. 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 결합 파트너는 자성 비드(magnetic bead) 또는 상자성 비드(magnetic bead)와

같은 선별을 수행하는 고체 지지체 또는 매트릭스에 직접 또는 간접적으로 콘주게이트될 수 있다. 예를 들어 CD3+, CD28+ T 세포는 항-CD3/항-CD28 콘주게이트된 자성 비드(예를 들어 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 세포 증폭제, 및/또는 ExpACT® 비드)를 사용하여 양성적으로 선별될 수 있다.

- [0123] 일부 구현예에서, T 세포는 비-T 세포, 예를 들어 B 세포, 단핵구, 또는 기타 백혈구, 예를 들어 CD14 상에서 발견되는 마커들의 음성 선별에 의하여 PBMC 샘플로부터 분리된다. 일부 측면에서, CD4+ 또는 CD8+ 선별 단계는 CD4+ 헬퍼 및 CD8+ 세포독성 T 세포를 분리하기 위하여 사용된다. 그러한 CD4+ 및 CD8+ 집단은 하나 이상의 나이브, 기억 및/또는 이펙터 T 세포 서브집단 상에서 발견되거나 상대적으로 더 높은 정도로 발견되는 마커들에 대하여 양성 또는 음성 선별함으로써 서브집단으로 더 분류될 수 있다.
- [0124] 일부 구현예에서, CD8+ 세포는, 예를 들어 각각의 서브집단과 관련된 표면 항원에 기초한 양성 또는 음성 선별에 의하여, 나이브, 중추 기억, 이펙터 기억, 및/또는 중추 기억 줄기 세포에 대하여 더 농축되거나 회석될 수 있다. 일부 구현예에서, 중추 기억 T 세포 (TCM)에 대한 농축은 효능을 증가시키기 위하여 수행되는데, 예를 들어 투여 다음에 장기간 생존, 증식 및/또는 생착을 향상시키기 위하여 수행되고, 이는 일부 측면에서 특히 이러한 서브집단에서 양호한(robust) 것이다[문헌 「Terakura et al., (2012) Blood.1:72-82」 및 「Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701」 참조].
- [0125] 일부 구현예에서, 기억 T 세포는 CD8+ 말초 혈액 림프구의 CD62L+ 및 CD62L- 서브세트 양자 모두에 존재한다. PBMC는, 예를 들어 항-CD8 및 항-CD62L 항체를 사용하여, CD62L-CD8+ 및/또는 CD62L+CD8+ 분획에 대하여 농축 또는 회석될 수 있다.
- [0126] 일부 구현예에서, 중추 기억 T 세포 (TCM)에 대한 농축은 CD45RO, CD62L, CCR7, CD27, CD28, CD95, CD3, 및/또는 CD127의 양성 또는 높은 표면 발현에 기초하고; 일부 측면에서, 이는 CD45RA 및/또는 그랜자임 B를 발현하거나 크게 발현하는 세포에 대한 음성 선별에 기초한다. 일부 측면에서, TCM 세포에 대하여 농축된 CD8+ 집단의 단리는 CD4, CD14, CD45RA를 발현하는 세포를 회석, 및 CD62L을 발현하는 세포에 대한 양성 선별 또는 농축에 의함으로써 수행된다. 한 측면에서, 중추 기억 T 세포 (TCM)에 대한 농축은 CD4 발현에 기초하여 선별되는 음성 세포 분획을 가지고 시작하여 수행되는데, 이는 CD14 및 CD45RA의 발현에 기초한 음성 선별 및 CD62L에 기초한 양성 선별이 이루어진 것이다. 일부 측면에서 이러한 선별은 동시에 수행되고 다른 측면에서는 어느 순서로든 순차적으로 수행된다. 일부 측면에서, CD8+ 세포 집단 또는 서브집단을 제조하는데 사용된 동일한 CD4 발현-기반 선별 단계는 또한 CD4+ 세포 집단 또는 서브-집단을 생성시키는데 사용되는데, 그로써 상기 CD4-기반 분리로부터의 양성 및 음성 분획들 양자 모두는 보유되고 상기 방법의 후속 단계에서 사용되며, 필요에 따라 하나 이상의 추가적인 양성 또는 음성 선별 단계가 뒤따른다. 일부 구현예에서, CD4+ 세포 집단에 대한 선별 및 CD8+ 세포 집단에 대한 선별은 동시에 수행된다. 일부 구현예에서, CD4+ 세포 집단에 대한 선별 및 CD8+ 세포 집단에 대한 선별은 임의의 순서로 순차적으로 수행된다. 일부 구현예에서, 세포를 선별하는 방법은 미국특허 출원공개공보 제US2017/0037369호에 기술된 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 선별된 CD4+ 세포 집단 및 선별된 CD8+ 세포 집단은 상기 선별 후에 결합될 수 있다. 일부 측면에서, 선별된 CD4+ 세포 집단 및 선별된 CD8+ 세포 집단은 본원에서 기술된 바이오리액터 백(bioreactor bag)에서 결합될 수 있다.
- [0127] 일부 구현예에서, 중추 기억 CD8+ 세포는 CD27+, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD45RA-, 및/또는 CD45RO+이다. 일부 구현예에서, 중추 기억 CD8+ 세포는 CD62L+ 및 CD45RO+이다. 일부 구현예에서, 중추 기억 CD8+ 세포는 CCR7+ 및 CD45RA-이다. 일부 구현예에서, 중추 기억 CD8+ 세포는 CD62L+ 및 CCR7+이다. 일부 구현예에서, 중추 기억 CD8+ 세포는 CD62L+/CD45RA-, CCR7+/CD45RA-, CD62L+/CCR7+, 또는 CD62L+/CCR7+/CD45RA-이며, 고 발현의 CD44에 대한 중간체를 갖는다. 일부 구현예에서, 중추 기억 CD8+ 세포는 CD27+/CD28+/CD62L+/CD45RA-, CD27+/CD28+/CCR7+/CD45RA-, CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+, 또는 CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+/CD45RA-이다.
- [0128] 특정 구현예에서, 생물학적 샘플, 예를 들어 PBMC 또는 다른 백혈구의 샘플은 CD4+ T 세포의 선별에 적용되며, 여기서 음성 및 양성 분획이 둘 다 유지된다. 특정 구현예에서, CD8+ T 세포는 음성 분획으로부터 선별된다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 CD8+ T 세포의 선별에 적용되고, 여기서 음성 및 양성 분획이 둘 다 유지된다. 특정 구현예에서, CD4+ T 세포는 음성 분획으로부터 선별된다.
- [0129] 특정 예시에서, PBMC 샘플 또는 다른 백혈구 샘플에는 CD4+ 세포의 선별이 이루어지는데, 여기서는 음성 및 양성 분획 모두가 보유된다. 그 후, 음성 분획은 CD14 및 CD45RA 또는 CD19의 발현에 기초한 음성 선별, 및 CD62L 또는 CCR7과 같은 중추 기억 T 세포의 마커 특징에 기초한 양성 선별을 받는데, 여기서 상기 양성 및 음성 선별은 어떤 순서로도 수행된다.

- [0130] CD4+ T 헬퍼 세포는 세포 표면 항원을 갖는 세포 집단을 동정함으로써 나이브, 중추 기억 및 이펙터 세포로 분류된다. CD4+ 림프구는 표준 방법으로 얻을 수 있다. 일부 구현예에서, 나이브 CD4+ T 림프구는 CD45RO-, CD45RA+, CD62L+, CD4+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 중추 기억 CD4+ 세포는 CD62L+ 및 CD45RO+이다. 일부 구현예에서, 중추 기억 CD4+ 세포는 CD27+, CD28+, CD62L+, CCR7+, CD45RA-, 및/또는 CD45RO+이다. 일부 구현예에서, 중추 기억 CD4+ 세포는 CD62L+ 및 CD45RO+. 일부 구현예에서, 중추 기억 CD4+ 세포는 CCR7+ 및 CD45RO+. 일부 구현예에서, 중추 기억 CD4+ 세포는 CCR7+ 및 CD45RA-. 일부 구현예에서, 중추 기억 CD4+ 세포는 CD62L+ 및 CCR7+이다.. 일부 구현예에서, 중추 기억 CD4+ 세포는 CD62L+/CD45RA-, CCR7+/CD45RA-, CD62L+/CCR7+, or CD62L+/CCR7+/CD45RA-이고, 고 발현의 CD44에 대한 중간체를 갖는다. 일부 구현예에서, 중추 기억 CD4+ 세포는 CD27+/CD28+/CD62L+/CD45RA-, CD27+/CD28+/CCR7+/CD45RA-, CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+, 또는 CD27+/CD28+/CD62L+/CCR7+/CD45RA-이다. 일부 구현예에서, 이펙터 CD4+ 세포는 CD62L- 및 CD45RO-이다.
- [0131] 한 예시에서, 음성 선별에 의하여 CD4+ 세포를 농축하기 위해, 모노클로날 항체 콕테일은 통상 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 결합 파트너는 양성 및/또는 음성 선별에 대하여 세포의 분리가 가능케 하기 위해 자성 비드 또는 상자성 비드와 같은 고체 지지체 또는 기질에 결합된다. 예를 들어 일부 구현예에서, 세포 및 세포 집단은 면역자기 (또는 친화자기) 분리 기법을 사용하여 분리 또는 단리된다[문헌 「Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In Vitro and In Vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher (c) Humana Press Inc., Totowa, NJ」에서 검토됨].
- [0132] 일부 측면에서, 분리될 세포의 인큐베이션된 샘플 또는 조성물은 작은 자화가능하거나 자기적으로 반응하는 물질, 예를 들어 자기적으로 반응하는 입자 또는 미세입자, 예를 들어 상자성 비드[예를 들어 Dynalbeads 또는 MACS® 비드]를 함유하는 선별 시약을 사용하여 인큐베이션된다. 상기 자기적으로 반응하는 물질, 예를 들어 입자는, 일반적으로, 분리하고자 하는 세포, 세포들 또는 세포 집단, 예를 들어 음성 또는 양성적으로 선별하고자 하는 것들 상에 존재하는 분자, 예를 들어 표면 마커에 특이적으로 결합하는 결합 파트너, 예를 들어 항체에 직접 또는 간접적으로 부착된다.
- [0133] 일부 구현예에서, 자성 입자 또는 비드는 특이적 결합 구성원, 예를 들어 항체 또는 다른 결합 파트너에 결합된 자기적으로 반응하는 물질을 포함한다. 자기 분리법에 사용되는 다수의 잘 알려진 자기적으로 반응하는 물질들이 있다. 적합한 자기 입자는 Molday의 미국특허 제4,452,773호 및 유럽특허 제452342B호에 개시된 것들을 포함하며, 상기 특허문헌은 본원에서 참조로 인용된다. 콜로이드 크기 입자, 예를 들어 Owen의 미국특허 제 4,795,698호; Liberti의 미국특허 제5,200,084호에 개시된 것들은 다른 예이다.
- [0134] 인큐베이션은 일반적으로, 그에 의하여 상기 자성 입자 또는 비드에 부착되는 항체 또는 결합 파트너, 또는 분자, 예를 들어 2차 항체 또는 기타 그러한 항체 또는 결합 파트너에 특이적으로 결합하는 시약들이, 샘플 내 세포상에 세포 표면 분자가 존재한다면 그 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 조건 하에서 수행된다.
- [0135] 특정 구현예에서, 자기적으로 반응하는 입자는 1차 항체 또는 다른 결합 파트너, 2차 항체, 렉틴, 효소 또는 스트렙타비딘으로 코팅된다. 특정 구현예에서, 자성 입자는 하나 이상의 마커에 특이적인 1차 항체의 코팅을 통해 세포에 부착된다. 특정 구현예에서, 비드보다는 세포가 1차 항체 또는 결합 파트너로 표지되고, 그 후 세포-유형 특이적인 2차 항체 또는 다른 결합 파트너(예를 들어 스트렙타비딘)-코팅된 자성 입자가 첨가된다. 특정 구현예에서, 스트렙타비딘-코팅된 자성 입자는 바이오티닐화 1차 또는 2차 항체와 함께 사용된다.
- [0136] 일부 측면에서, 분리는, 샘플이 자기장 내에 위치되고, 자기적으로 반응하는 또는 자화가능한 입자들이 부착된 세포들이 자석에 끌려서 비표지된 세포들로부터 분리되는 과정에서 달성된다. 양성 선별의 경우, 자석에 끌리는 세포가 보유하고; 음성 선별의 경우 끌리지 않은 세포 (표지가 없는 세포)가 보유된다. 일부 측면에서, 양성 및 음성 선별의 조합은 동일한 선별 단계 중에 수행되는데, 여기서 양성 및 음성 분획은 보유하고 더 가공되거나 또는 추가 분리 단계를 거친다.
- [0137] 일부 구현예에서, 친화도-기반 선별은 자기-활성화 세포 분류 (MACS)(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)를 통해 이루어진다. 자기 활성화 세포 분류(MACS), 예를 들어 CliniMACS 시스템은 그에 자화된 입자가 부착된 세포를 고-순도로 선별할 수 있다. 특정 구체예에서, MACS는 외부 자기장의 적용 후 비-표적종 및 표적종을 순차적으로 용리시키는 모드로 작동한다. 즉, 자화된 입자에 부착된 세포는 비부착종이 용리되는동안 제 위치에 유지된다. 그 후, 이러한 첫 번째 용리 단계가 완료된 후, 자기장에 포획되어 용리 방지된 종은 어떤 방식으로든 자유롭게 되고 그로써 용리 및 회수될 수 있다. 특정 구체예에서, 비-표적 세포는 표지되고 이중 세포 집단으로부터 희석

된다.

- [0138] 일부 구현예에서, 자기적으로 반응하는 입자는 후속적으로 인큐베이션, 배양, 및/또는 조작될 세포에 부착된 채로 남게 되며; 일부 측면에서, 상기 입자는 환자에게 투여하기 위해 세포에 부착된 채로 남는다. 일부 구현예에서, 자화 가능한 또는 자기적으로 반응하는 입자는 세포로부터 제거된다. 세포로부터 자화 가능한 입자를 제거하는 방법은 공지되어 있으며, 예를 들어 경쟁적 비-표지 항체, 절단 가능한 링커 등과 콘주게이트된 자화 가능한 입자 또는 항체를 사용하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 자화 가능한 입자는 생분해성이다.
- [0139] 일부 측면에서, 분리 및/또는 다른 단계는 CliniMACS 시스템(Miltenyi Biotec)을 사용하여, 예를 들어 밀폐된 및 멸균 시스템에서 임상-규모 수준의 세포의 자동 분리를 위해 수행된다. 구성 요소는 통합 마이크로컴퓨터, 자기 분리 유닛, 연동 펌프 및 다양한 핀치 밸브가 포함할 수 있다. 일부 측면에서 상기 통합 컴퓨터는 기구의 모든 구성 요소를 제어하고 표준화된 순서로 반복적인 절차를 수행하도록 시스템에 지시한다. 일부 구현예에서, 자기 분리 유닛은 이동 가능한 영구 자석 및 선별 컬럼용 홀더를 포함한다. 연동 펌프는 튜브 세트 전체의 유속을 제어하며 핀치 밸브와 함께 시스템을 통한 완충액의 흐름 제어와 세포의 지속적인 현탁을 보장한다.
- [0140] 일부 측면에서 CliniMACS 시스템은 멸균, 비-발열원성 용액으로 공급되는 항체-결합 자성 입자를 사용한다. 일부 구현예에서, 자성 입자로 세포를 표지한 후, 세포는 과량의 입자를 제거하기 위하여 수세된다. 그 후, 세포 준비 백은 튜브 세트에 연결되는데, 이는 차례로 완충액 함유 백 및 세포 수집 백과 연결된다. 튜브 세트는 미리 조립된 멸균 튜브들로 이루어지는데, 예를 들어 프리-컬럼 및 분리 컬럼이고, 일회용으로만 사용된다. 분리 프로그램을 시작하면 시스템이 자동으로 세포 샘플을 분리 컬럼에 적용시킨다. 표지된 세포는 컬럼 내에 보유되는 반면, 표지되지 않은 세포는 일련의 수세 단계에 의해 제거된다. 일부 구현예에서, 본 발명에 기재된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 표지되지 않고 컬럼에 보유되지 않는다. 일부 구현예에서, 본 발명에서 기재된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 표지되고 컬럼에 보유된다. 일부 구현예에서, 본 발명에 기재된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 자기장의 제거 후 컬럼으로부터 용리되어 세포 수집 백 내에 수집된다.
- [0141] 특정 구현예에서, 분리 및/또는 다른 단계는 CliniMACS Prodigy 시스템 (Miltenyi Biotec)을 사용하여 수행된다. CliniMACS Prodigy 시스템은 원심 분리에 의한 세포의 자동화 세척 및 분획화를 가능케 하는 세포 처리체를 갖추고 있다. CliniMACS Prodigy 시스템은 또한 공급원 세포 생성물의 거시적 층을 포착하여 최적의 세포 분획화 종말점을 결정하는 온보드 카메라 및 이미지 인식 소프트웨어를 포함할 수도 있다. 예를 들어 말초 혈액은 적혈구, 백혈구 및 혈장 층으로 자동 분리된다. CliniMACS Prodigy 시스템은 또한 세포 분화 및 증폭, 항원 로딩 및 장기적 세포 배양과 같은 세포 배양 프로토콜을 수행하는 통합 세포 배양 챔버를 포함할 수 있다. 투입 포트는 멸균 제거 및 배지 보충을 가능케 하며 세포는 통합 현미경을 사용하여 모니터링될 수 있다[예를 들어 문헌 「Klebanoff et al. (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) *Blood*.1:72-82」 및 「Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701」 참조].
- [0142] 일부 구현예에서, 본 발명에서 기재되는 세포 집단은 유세포 계측법을 통해 수집 및 농축 (또는 희석)되고, 여기서 다중 세포 표면 마커에 대해 염색된 세포는 유체 스트림으로 운반된다. 일부 구현예에서, 본 발명에서 기재되는 세포 집단은 분취 스케일 (FACS)-분류를 통해 수집 및 농축 (또는 희석)된다. 특정 구현예에서, 본 발명에서 기술되는 세포 집단은 FACS-기반 검출 시스템과 조합된 마이크로 전기기계 시스템 (MEMS) 칩의 사용에 의해 수집 및 농축(또는 희석)된다 [예를 들어 국제공개공보 제W02010/033140호, 「Cho et al. (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573」 및 「Godin et al. (2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376」 참조]. 두 경우 모두에서, 세포는 다중의 마커로 표지될 수 있고, 이는 잘 구분된 T 세포 서브 세트를 고순도로 단리할 수 있게 한다.
- [0143] 일부 구현예에서, 항체 또는 결합 파트너는 양성 및/또는 음성 선별을 위한 분리를 용이하게 하기 위해, 하나 이상의 검출 가능한 마커로 표지된다. 예를 들어 분리는 형광으로 표지된 항체와의 결합에 기초할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 세포 표면 마커에 특이적인 항체 또는 다른 결합 파트너의 결합에 기초하는 세포의 분리는 예를 들어 유-세포 탐지 시스템과 조합하여, 분취 스케일 (FACS)을 포함하는 형광-활성화 세포 분류기(FACS) 및/또는 MEMS 칩에 의하여 수행된다. 이러한 방법은 다중 마커에 기초하여 동시에 양성 및 음성 선별을 가능케 한다.
- [0144] 일부 구현예에서, 단리 및/또는 선별은 농축된 T 세포, 예를 들어 CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, 및/또는 CD8+ T 세포의 하나 이상의 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 농축된 T 세포의 둘 이상이 별도의 조성물이 단일의 생물학적 샘플로부터, 단리, 선별, 농축, 또는 수득된다. 일부 구현예에서, 별도의 조성물들이 동일한 대상체

로부터 수거된, 수집된, 및/또는 수득된 별도의 생물학적 샘플로부터 단리, 선별, 농축, 또는 수득된다.

- [0145] 특정 구현예에서, 상기 단리 및/또는 선별은 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 98%, 적어도 (약) 99%, 적어도 (약) 99.5%, 적어도 (약) 99.9%, 또는 (약) 100%의 CD3+ T 세포를 포함하는 농축된 T 세포의 하나 이상의 조성물을 생성한다. 특정 구현예에서, 농축된 T 세포의 조성물은 필수적으로 CD3+ T 세포로 구성된다.
- [0146] 특정 구현예에서, 상기 단리 및/또는 농축은 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 98%, 적어도 (약) 99%, 적어도 (약) 99.5%, 적어도 (약) 99.9%, 또는 (약) 100%의 CD4+ T 세포를 포함하는 농축된 CD4+ T의 조성물을 생성한다. 특정 구현예에서, CD4+ T 세포의 투입 조성물은 (약) 40% 미만, (약) 35% 미만, (약) 30% 미만, (약) 25% 미만, (약) 20% 미만, (약) 15% 미만, (약) 10% 미만, (약) 5% 미만, (약) 1% 미만, (약) 0.1% 미만, 또는 (약) 0.01% CD8+ T 세포를 포함하고/하거나 CD8+ T 세포를 함유하지 않고/않거나 CD8+ T 세포가 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 농축된 T 세포의 조성물은 필수적으로 CD4+ T 세포로 구성된다.
- [0147] 특정 구현예에서, 상기 단리 및/또는 농축은 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 98%, 적어도 (약) 99%, 적어도 (약) 99.5%, 적어도 (약) 99.9%, 또는 (약) 100%의 CD8+ T 세포를 포함하는 농축된 CD8+ T의 조성물을 생성한다. 특정 구현예에서, CD8+ T 세포의 투입 조성물은 (약) 40% 미만, (약) 35% 미만, (약) 30% 미만, (약) 25% 미만, (약) 20% 미만, (약) 15% 미만, (약) 10% 미만, (약) 5% 미만, (약) 1% 미만, (약) 0.1% 미만, 또는 (약) 0.01% CD4+ T 세포를 함유하고/하거나 CD4+ T 세포를 함유하지 않고/않거나 CD4+ T 세포가 존재하지 않거나 실질적으로 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 농축된 T 세포의 조성물은 필수적으로 CD8+ T 세포로 구성된다.
- [0148] 일부 구현예에서, 농축된 T 세포의 하나 이상의 조성물은 분리, 선별 및/또는 농축 후 동결, 예를 들어 저온 보존(cryopreserved) 및/또는 저온 동결(cryofrozen)된다. 특정 구현예에서, 농축된 CD4+ T 세포의 조성물은 분리, 선별 및/또는 농축 후 동결, 예를 들어 저온 보존 및/또는 저온 동결된다. 특정 구현예에서, 농축된 CD8+ T 세포의 조성물은 분리, 선별 및/또는 농축 후 동결, 예를 들어 저온 보존 및/또는 저온 동결된다. 일부 구현예에서, 농축된 T 세포의 하나 이상의 조성물은 상기 세포의 조성물을 인큐베이션, 활성화, 자극, 조작, 형질도입, 형질주입, 배양, 증폭, 수확, 및/또는 제형화하는 단계 전에 동결, 예를 들어 저온 보존 및/또는 저온 동결된다. 특정 구현예에서, 농축된 CD4+ T 세포의 조성물은 상기 세포의 조성물을 인큐베이션, 활성화, 자극, 조작, 형질도입, 형질주입, 배양, 증폭, 수확, 및/또는 제형화하는 단계 전에 동결, 예를 들어 저온 보존 및/또는 저온 동결된다. 일부 구현예에서, 농축된 CD8+ T 세포의 조성물은 상기 세포의 조성물을 인큐베이션, 활성화, 자극, 조작, 형질도입, 형질주입, 배양, 증폭, 수확, 및/또는 제형화하는 단계 전에 동결, 예를 들어 저온 보존 및/또는 저온 동결된다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 저온 동결된 투입 조성물은 예를 들어 약 -80℃에서 12시간 내지 7, 24시간 내지 120시간, 또는 2일 내지 5일동안 저장된다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 저온 동결된 투입 조성물은 예를 들어 약 -80℃에서 10일, 9일, 8일, 7일, 6일, 또는 5일, 4일, 3일, 2일, 또는 1일 미만의 시간동안 저장된다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 저온 동결된 투입 조성물은 예를 들어 약 -80℃에서 (약) 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 또는 6일동안 저장된다.
- [0149] 일부 구현예에서, 세포를 함유하는 상기 샘플(예를 들어 성분 채집 생성물 또는 백혈구 성분 제품)은 성분채집 또는 백혈구 감소 도중에 추가된 하나 이상의 항-응고제, 예를 들어 헤파린을 제거하기 위해서 세척된다.
- [0150] 일부 구현예에서, 세포를 함유하는 상기 샘플(예를 들어 전혈 샘플, 버피 코트 샘플, 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 샘플, 비분획 T 세포 샘플, 림프구 샘플, 백혈구 샘플, 성분 채집 생성물 또는 백혈구 생성 제품)은 저온 보존되고/되거나 저온 보호(예를 들어 동결)된 후, 상기 세포의 집단을 단리, 선별, 활성화, 자극, 조작, 형질도입, 형질주입, 인큐베이션, 배양, 수확, 제형화하고/하거나 상기 제형화된 세포 집단을 대상체에 투여하는 임의의 단계 이전에 해동된다.
- [0151] 특정 구현예에서, 성분 채집 생성물 또는 백혈구 생성 제품은 저온 보존되고/되거나 저온 보호된(예를 들어 동결된) 후, 하기 기술한 바와 같이 세포 선별 또는 단리 단계(예를 들어 T 세포 선별 또는 단리 단계)에 적용하기 전에 해동시킨다. 일부 구현예에서, 저온 보존되고/되거나 저온 보호된 성분 채집 생성물 또는 백혈구 생성 제품은 T 세포 선별 또는 단리 단계에 적용한 후에는, 상기 세포의 집단을 단리, 선별, 활성화, 자극, 조작, 형질도입, 형질주입, 인큐베이션, 배양, 수확, 제형화하고/하거나 상기 제형화된 세포 집단을 대상체에 투여하는

단계들과 같은 후속 단계들 도중 또는 그 사이에 추가의 저온 보존 및/또는 저온 보호 단계가 수행되지 않는다. 예를 들어 해동된 저온 보존되고/되거나 저온 보호된 성분 채집 생성물 또는 백혈구 생성 제품은 다운스트림 공정동안, 예를 들어 T 세포 활성화/자극 또는 형질도입 공정동안 해동되기 전에 재차 저온 보존되고/되거나 저온 보호되지 않는다.

[0152] 특정 구현예에서, 상기 저온 보존되고/되거나 저온 보호된 성분 채집 생성물 또는 백혈구 생성 제품은 बैं킹(banking)되고(예를 들어 상기 샘플을 동결하기 전에 T 세포 선별 없이), 이것은 일부 측면에서 후속 제조 단계들에 보다 유연성을 허용할 수 있다. 한 측면에서, 선별 전에 세포를 बैं킹하는 것은 다운스트림 공정에 대한 세포 수율을 증가시키고, 세포를 조기에 बैं킹하는 것은 그것들이 보다 건강하다는 것을 의미할 수 있으며 제조 성공 기준을 보다 용이하게 충족시킬 수 있다. 또 다른 측면에서, 일단 해동되면, 상기 저온 보존되고/되거나 저온 보호된 성분 채집 생성물 또는 백혈구 생성 제품은 하나 이상의 상이한 선별법에 적용시킬 수 있다. 이러한 접근법의 이점은 다른 것들 중에서 예를 들어 상기 샘플의 공여체 및/또는 또다른 수용자에서와 같은 대상체의 질병 또는 병태에 대한 세포 요법제의 세포의 이용률, 효능, 및/또는 다른 측면을 향상시키는 것이다.

[0153] 일부 구현예에서, 상기 샘플(예를 들어 성분 채집 또는 백혈구 생성 샘플)은, 상기 공여체가 질병 또는 병태를 갖는 것으로 진단된 후의 시점에서 사전 세포 선별 없이 (예를 들어 크로마토그래피에 의한 선별과 같은 사전 T 세포 선별 없이) 수거되고 저온 보존되고/되거나 저온 보호된다. 일부 측면에서, 저온 보존의 시기는 또한 상기 공여체가 상기 질병 또는 병태에 대한 임의의 초기 치료, 상기 질병 또는 병태에 대한 치료를 위해 표지된 처치, 방사선 및/또는 화학요법 이외의 임의의 치료 중의 하나 이상을 받기 전이다. 일부 구현예에서, 상기 샘플은 질병의 초기 치료 후 질병의 최초 재발 후, 및 상기 공여체 또는 대상체가 상기 질병에 대한 후속 치료를 받기 전에 수거된다. 상기 초기 및/또는 후속 치료는 세포 요법과는 다른 요법일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 수거된 세포는 초기 및/또는 후속 치료 후 세포 요법에 사용될 수 있다. 한 측면에서, 사전 세포 선별이 없는 상기 저온 보존되고/되거나 저온 보호된 샘플은 예를 들어 크로스오버(crossover)할 수 있고 나중에 치료를 요구할 수 있는 무작위 클리닉 시험에서 비-치료 환자들과 관련된 것과 같은 선불 비용(up-front costs)을 줄이는데 도움이 될 수 있다.

[0154] 일부 구현예에서, 상기 샘플(예를 들어 성분 채집 또는 백혈구 생성 샘플)은, 상기 질병 치료의 제 2 라인 후의 질병의 제 2 재발 후 및 상기 공여체 또는 대상체가 상기 질병에 대한 후속 치료를 받기 전의 시점에서 사전 세포 선별 없이 (예를 들어 크로마토그래피에 의한 선별과 같은 사전 T 세포 선별 없이) 수거되고 저온 보존되고/되거나 저온 보호된다. 일부 구현예에서, 환자들은 예를 들어 특정 위험 인자들을 분석함으로써 제 2 라인의 치료 후에 재발할 가능성이 높은 것으로 식별된다. 일부 구현예에서, 상기 위험 인자들은 질병 유형 및/또는 유전학, 예를 들어 더블-히트 림프종(double-hit lymphoma), 1차 불응성 암 또는 활성화된 B-세포 림프종에 기반한다. 일부 구현예에서, 상기 위험 인자들은 임상적 표현, 예를 들어 제 1 라인 치료 후 조기 재발, 또는 치료 후 기타 불량한 예후 지표(예를 들어 IPI(International Prognostic Index) > 2)에 기반한다.

[0155] 일부 구현예에서, 상기 샘플(예를 들어 성분 채집 또는 백혈구 생성 샘플)은, 상기 공여체 또는 대상체가 질병으로 진단 받기 전의 시점에서 사전 세포 선별 없이 (예를 들어 크로마토그래피에 의한 선별과 같은 사전 T 세포 선별 없이) 수거되고 저온 보존되고/되거나 저온 보호된다. 일부 측면에서, 상기 공여체 또는 대상체는 건강한 대상체일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 공여체 또는 대상체는 생후 말기 단계에서 세포 요법이 필요한 경우에 질병을 일으키거나 질병으로 진단 받을 위험이 없는 세포를 बैं킹 또는 저장하도록 선택할 수 있다. 일부 경우에, 공여체 또는 대상체는 유전적 변이, 유전적 이상, 유전적 혼란, 가족력, 단백질 이상(예를 들어 단백질 생산 및/또는 가공 결함)과 같은 인자들, 및 질병을 일으킬 수 있는 라이프스타일 선택에 기초하여 질병을 일으킬 위험이 있는 것으로 간주될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 예방적으로 수거된다.

[0156] 일부 구현예에서, 세포의 상기 저온 보존되고/되거나 저온 보호된 샘플(예를 들어 성분 채집 또는 백혈구 생성 샘플), 예를 들어 사전 세포 선별에 적용되지 않은(예를 들어 크로마토그래피에 의한 선별과 같은 사전 T 세포 선별 없는) 세포의 샘플은 (약) 12시간, 24시간, 36시간, 또는 48시간, 또는 그 초과 시간동안 저장되거나 बैं킹된다. 일부 구현예에서, 상기 샘플은 1주, 2주, 3주, 또는 4주 또는 그 초과 기간동안 저장되거나 बैं킹된다. 일부 샘플은 장기간 저장 또는 장기간 बैं킹으로 배치된다. 일부 측면에서, 상기 샘플은 (약) 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 1년, 2년, 3년, 4년, 5년, 6년, 7년, 8년, 9년, 10년, 11년, 12년, 13년, 14년, 15년, 16년, 17년, 18년, 19년, 20년, 25년, 30년, 35년, 40년, 또는 그 이상, 또는 그 초과 기간동안 저장된다.

[0157] 일부 구현예에서, 공여체로부터 채취한 성분 채집 또는 백혈구 생성 샘플은 냉각된 환경에서 저장 또는 처리 시

설로 운송되고/되거나, 저장 시설에서 극저온 저장되거나 처리 시설에서 처리된다. 일부 구현예에서, 운송하기 전에, 상기 샘플은 예를 들어 T 세포, 예를 들어 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포를 선별함으로써 처리된다. 일부 구현예에서, 상기 처리는 운송 후 및 상기 샘플을 극저온 저장 전에 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 처리는 극저온 저장 후 상기 샘플을 해동시키기 전에 수행된다.

[0158] 상기 공여체, 및 따라서 그들의 세포가 질병에 대한 광범위한 치료를 받지 않을 때 및/또는 질병 또는 병태를 발생시키거나 그의 진단을 받기 전의 단계에서 공여체가 그들의 세포를 저장하게 함으로써, 상기 세포는 1회 또는 복수회의 라운드의 치료 후에 수확된 세포와 비교하여 세포 요법에 사용하기 위한 특정 이점을 가질 수 있다. 예를 들어 1회 또는 그 이상의 라운드의 치료 전에 수확된 세포는 보다 높은 수준의 특정 세포 활성을 나타내고, 보다 신속하게 성장하고/하거나 수회의 라운드의 치료를 받은 세포 보다 유전자 조작에 더 수용적일 수 있다. 본원에서 기술된 구현예에 따르는 이점의 또다른 예는 편의성을 포함할 수 있다. 예를 들어 세포 요법에 필요로 하기 전에 공여체의 세포를 수거함으로써, 선택적으로 처리함으로써, 그리고 저장함으로써 상기 세포는 수용자가 나중에 그것들을 필요로 하는 경우 및 필요로 할 때 신속하게 이용할 수 있게 된다. 이것은 성분 채집 실험실 용량을 증가시켜서, 기술자에게 성분 채집 수고 공정을 계획하는데 보다 큰 유연성을 제공한다.

[0159] 샘플로부터의 세포의 극저온 저장 및 처리를 위한 예시적 방법 및 시스템, 예를 들어 성분 채집 샘플은 국제공개공보 제W02018170188호에 기술된 것들을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법 및 시스템은 환자가 세포 요법을 필요로 하기 전에 성분 채집 샘플을 수거한 다음, 재조합 수용체(예를 들어 CAR)로 상기 세포, 예를 들어 T 세포를 조작하는 공정에서 나중에 사용하기 위해 상기 성분 채집 샘플을 저온 보존에 적용시키는 것을 포함한다. 일부 경우에, 상기 공정은 본원에서 기술된 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 성분 채집 샘플은 대상체로부터 수거되고, 세포들의 집단의 후속 T 세포 선별, 활성화, 자극, 조작, 형질도입, 형질주입, 인큐베이션, 배양, 수확, 제형화, 및/또는 대상체에 제형화된 세포 집단의 투여 이전에 저온 보관된다. 이러한 구체예에서, 저온 보관된 성분 채집 샘플은 상기 샘플을 하나 이상의 선별 단계, 예를 들어 본원에 기술된 임의의 것에 적용시키기 전에 해동된다.

[0160] 일부 구현예에서, 세포들의 저온 보존되고/되거나 저온 보호된 샘플(예를 들어 성분 채집 또는 백혈구 생성 샘플), 예를 들어 사전 세포 선별에 적용되지 않은(예를 들어 크로마토그래피에 의한 선별과 같은 사전 T 세포 선별 없는) 세포의 샘플은 세포 요법을 위한 세포 집단, 예를 들어 CAR+ T 세포를 함유하는 T 세포 집단의 제조를 위한 다운스트림 공정에 사용하기 전에 해동된다. 일부 구현예에서, 그와 같은 세포들의 저온 보존되고/되거나 저온 보호된 샘플(예를 들어 성분 채집 또는 백혈구 생성 샘플)은, 조작된 T 세포 요법, 예를 들어 CAR+ T 세포 요법을 위해 본원에서 제공된 방법과 관련하여 사용된다. 특정 구체예에서, 상기 수확/제형화 단계들 이전 또는 도중에 추가의 저온 보존 단계는 수행되지 않는다.

[0161] **1. 투입 조성물**

[0162] 특정 구현예에서, 상기 제공된 방법은 세포의 투입 조성물을 생성하고/하거나 제조하는 방법과 관련하여 사용된다. 특정 구현예에서, 상기 투입 세포 조성물은 유전자 조작에 사용하기 위한 세포, 예를 들어 유전자 조작되고/되거나 유전자 조작된 세포를 제조하는 공정을 거칠 세포의 조성물이다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 재조합 수용체를 암호화하는 핵산으로 처리, 이와 접촉, 및/또는 이와 인큐베이션될 것이다. 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 나이브 및/또는 나이브-유사 T 세포인 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 함유한다.

[0163] 일부 구현예에서, 원하는, 고정된, 및/또는 제어된 비율은 인큐베이션 및/또는 조작 단계 또는 다른 가공 단계의 완료 시 및/또는 해동 시 및/또는 대상체에게 투여하기 직전에, 두 가지 유형의 세포 또는 단리된 세포 집단이 투입 세포 조성물에 포함되며, 원하는, 정의된, 및/또는 제어된 비율, 또는 이의 허용되는 오차 비율 또는 차이 이내의, 조작된 CD4+ 대 CD8+ T 세포를 가지는 산출 세포 조성물을 생성하도록 설계될 때, 세포의 비율 또는 개수이다.

[0164] 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 농축된 CD3+ T 세포의 조성물이다. 일부 구현예에서, 상기 투입 조성물은 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 98%, 적어도 (약) 99%, 적어도 (약) 99.5%, 적어도 (약) 99.9%, 또는 (약) 100%의 CD3+ T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 투입 조성물은 필수적으로 CD3+ T 세포로 구성된다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 농축된 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 조성물이다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 98%, 적어도 (약) 99%,

적어도 (약) 99.5%, 적어도 (약) 99.9%, 또는 (약) 100%의, CD4+ 또는 CD8+ T 세포인 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 투입 조성물은 필수적으로 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포로 구성된다.

[0165] 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 30% 내지 (약) 70%, (약) 35% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 60%, (약) 45% 내지 (약) 55%, 또는 약 50% 또는 50%의 CD4+ T 세포 및 (약) 30% 내지 (약) 70%, (약) 35% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 60%, (약) 45% 내지 (약) 55%, 또는 약 50% 또는 50%의 CD8+ T 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 45% 내지 (약) 55%, 약 50%, 또는 50%의 CD4+ T 세포 및 (약) 45% 내지 (약) 55%, 약 50%, 또는 50%의 CD8+ T 세포를 함유한다.

[0166] 일부 구현예에서, 농축된 CD4+ T 세포의 적어도 하나의 별도의 조성물 및 농축된 CD8+ T 세포의 적어도 하나의 별도의 조성물은 단일 생물학적 샘플, 예를 들어 PBMC의 샘플 또는 동일한 공여체 예를 들어 환자 또는 건강한 개인으로부터의 다른 백혈구로부터 단리, 선별, 농축, 또는 수득된다. 일부 구현예에서, 농축된 CD4+ T 세포의 별도의 조성물 및 농축된 CD8+ T 세포의 별도의 조성물은 생물학적 샘플, 예를 들어 단일 대상체로부터 수득, 수거, 및/또는 채취한 단일 생물학적 샘플로부터 기원되며, 예를 들어 초기 단리, 선별, 및/또는 농축된다. 일부 구현예에서, 생물학적 샘플은 CD4+ T 세포의 선별에 먼저 적용되며, 음성 및 양성 분획들은 둘 다 유지되고, 음성 분획은 추가로 CD8+ T 세포의 선별에 적용된다. 다른 구현예에서, 생물학적 샘플은 CD8+ T 세포의 선별에 먼저 적용되며, 음성 및 양성 분획들은 둘 다 유지되고, 음성 분획은 추가로 CD4+ T 세포의 선별에 적용된다. 일부 구현예에서, 선별 방법은 국제공개공보 제W02015/164675호에 기술된 바와 같이 수행된다. 일부 측면에서, 생물학적 샘플은 농축된 CD8+ T 세포의 적어도 하나의 조성물을 생성하도록 CD8+ T 세포에 대해 먼저 양성으로 선별되고, 이어서 음성 분획은 농축된 CD4+ T 세포의 적어도 하나의 조성물을 생성하도록 CD4+ T 세포에 대해 양성으로 선별되므로, 상기 농축된 CD4+ T 세포의 적어도 하나의 별도의 조성물 및 상기 농축된 CD8+ T 세포의 적어도 하나의 별도의 조성물은 동일한 생물학적 샘플, 예를 들어 동일한 공여체 환자 또는 건강한 개인으로부터의 별도의 조성물이다. 일부 측면에서, 예를 들어 적어도 하나는 농축된 CD4+ T 세포의 조성물이고 적어도 하나는 동일한 공여체로부터의 농축된 CD8+ T 세포의 조성물인 농축된 T 세포의 둘 이상의 별도의 조성물은 저온 보존 배지에서 별도로 동결, 예를 들어 저온 동결 또는 저온 보존된다. 일부 측면에서, 별도로 저온 보존된 세포 조성물은 하나 이상의 shipment(shipment)의 별도의 용기에 저장 및/또는 운송된다. 일부 측면에서, 별도로 저온 보존된 세포 조성물은 해동되고 선택적으로 세척된다.

[0167] 일부 측면에서, 예를 들어 적어도 하나는 농축된 CD4+ T 세포의 조성물이고 적어도 하나는 동일한 공여체로부터의 농축된 CD8+ T 세포의 조성물인 농축된 T 세포의 둘 이상의 별도의 조성물은 동결 및 혼합되고, 조합되고/되거나 풀링되며, 상기 조성물들은 상기 혼합, 조합, 및/또는 풀링 후 또는 전에 선택적으로 세척될 수 있다. 일부 측면에서, 농축된 T 세포의 상기 혼합, 조합, 및/또는 풀링 및 선택적으로 세척된 조성물은 투입 조성물을 형성한다. 일부 측면에서, 상기 투입 조성물(예를 들어 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포를 (약) 1:1의 비로 포함함)은 자극 시약과 접촉함으로써(예를 들어 T 세포 활성화를 위해 CD3/CD28 콘주게이트된 자성 비드를 사용한 인큐베이션에 의해서) 활성화 및/또는 자극되고, 상기 활성화/자극으로부터의 세포 조성물의 부피는 표적 부피를 얻기 위해서 선택적으로 조정되고, 예를 들어 감소된다. 일부 측면에서, 상기 활성화/자극된 세포 조성물은 재조합 단백질(예를 들어 CAR)을 암호화하는 레트로바이러스 벡터를 사용하여 조작, 형질도입, 및/또는 형질감연시켜서 상기 세포 조성물의 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포에서 동일한 재조합 단백질을 발현시킨다. 일부 측면에서, 상기 조작으로부터의 세포 조성물의 부피는 표적 부피를 얻기 위해서 선택적으로 조정, 예를 들어 감소된다. 일부 측면에서, 상기 방법은 상기 세포 조성물로부터 자극 시약, 예를 들어 자성 비드를 제거하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, CD4+ T 세포 및 조작된 CD8+ T 세포를 함유하는 세포 조성물은 예를 들어 그 안에서 CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포 집단의 증폭을 위해서 배양된다. 특정 구현예에서, 상기 배양으로부터의 세포 조성물은 상기 세포 조성물을 제형화 완충액 중에서 세척함으로써 수확 및/또는 수거 및/또는 제형화된다. 특정 구현예에서, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함하는 제형화된 세포 조성물은 저온 배지 중에서 동결, 예를 들어 저온 동결 또는 저온 보존된다. 일부 측면에서, 상기 저온 보존된 제형은 하나 이상의 용기에 저장 및/또는 운송된다. 일부 측면에서, 상기 제형 중의 조작된 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 동일한 공여체 또는 생물학적 샘플로부터 기원하고 동일한 재조합 단백질(예를 들어 CAR)을 발현하며, 상기 제형은 그것을 필요로 하는 대상체 예를 들어 동일한 공여체에 투여된다.

[0168] 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 3:1 내지 1:3, 2:1 내지 1:2, 1.5 내지 0.75, 1.25 내지 0.75, 또는 1.2 내지 0.8의 비로 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 1:1의 비로 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포를 함유한다.

[0169] 일부 구현예에서, 농축된 CD4+ T 세포의 조성물로부터의 세포 및 농축된 CD8+ T 세포의 조성물로부터의 세포는

혼합, 조합, 및/또는 풀링되어 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 함유하는 투입 조성물을 생성한다. 특정 구현예에서, 농축된 CD4+ T 세포 및 농축된 CD8+ T 세포의 조성물은 자극 조건하에 상기 세포를 인큐베이션하기 전에 풀링, 혼합, 및/또는 조합된다. 특정 구현예에서, 농축된 CD4+ T 및 CD8+ T 세포의 조성물은 풀링, 혼합, 및/또는 조합한 다음, 생물학적 샘플로부터 상기 CD4+ T 및 CD8+ T 세포를 단리, 농축, 및/또는 선별한다. 특정 구현예에서, 농축된 CD4+ T 및 CD8+ T 세포의 조성물은 풀링, 혼합, 및/또는 조합한 다음, 농축된 CD4+ T 및 CD8+ T 세포의 조성물을 동결, 예를 들어 저온 동결, 및 해동시킨다.

[0170] 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 농축된 CD4+ 세포의 조성물로부터의 세포를 농축된 CD8+ 세포의 조성물로부터의 세포와 혼합, 풀링(pooling), 및/또는 조합함으로써 생성, 발생, 또는 제조된다. 특정 구현예에서, 농축된 CD4+ T 세포의 조성물은 적어도 (약) 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, that express CD4 or CD8 또는 99.9%의 CD4+ T 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 농축된 CD4+ T 세포의 조성물은 100%의 CD4+ T 세포를 함유하거나 또는 약 100%의 CD4+ T 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 농축된 T세포의 조성물은 (약) 20% 미만, (약) 10% 미만, (약) 5% 미만, (약) 1% 미만, (약) 0.1% 미만, 또는 (약) 0.01% 미만의 CD8+ T 세포를 포함하거나 함유하고/하거나 CD8+ T 세포가 부재하거나 실질적으로 부재하다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 필수적으로 CD4+ T 세포로 구성된다. 특정 구현예에서, 농축된 CD8+ T 세포의 조성물은 적어도 (약) 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 99.9%의 CD8+ T 세포를 함유하거나, 또는 약 100%의 CD8+ T 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 농축된 CD8+ T 세포의 조성물은 (약) 20% 미만, (약) 10% 미만, (약) 5% 미만, (약) 1% 미만, (약) 0.1% 미만, 또는 (약) 0.01% 미만의 CD4+ T 세포를 포함하거나 함유하고/하거나 CD4+ T 세포가 부재하거나 실질적으로 부재하다. 일부 구현예에서, 세포의 집단은 필수적으로 CD8+ T 세포로 구성된다.

[0171] 특정 구현예에서, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 1:10 내지 10:1, 1:5 내지 5:1, 4:1 내지 1:4, 3:1, 1:3 내지 3:1, 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.25:1 내지 1:1.25, 1.2:1 내지 1:1.2, 1.1:1 내지 1:1.1, 또는 약 1:1 또는 1:1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비율로 풀링, 혼합, 및/또는 결합된다. 특정 구현예에서, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.25:1 내지 1:1.25, 1.2:1 내지 1:1.2, 1.1:1 내지 1:1.1, 또는 약 1:1 또는 1:1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비율로 풀링, 혼합, 및/또는 결합된다. 일부 구현예에서, (약) 1:1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비율로 풀링, 혼합, 및/또는 결합된다.

[0172] 일부 구현예에서, 농축된 CD4+ 세포의 조성물로부터의 세포 및 농축된 CD8+ 세포의 조성물로부터의 세포는 1:10 내지 10:1, 1:5 내지 5:1, 4:1 내지 1:4, 3:1, 1:3 내지 3:1, 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.25:1 내지 1:1.25, 1.2:1 내지 1:1.2, 1.1:1 내지 1:1.1, 또는 약 1:1 또는 1:1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비율로 풀링, 혼합, 및/또는 결합된다. 특정 구현예에서, 농축된 CD4+ 세포 및 농축된 CD8+ 세포의 조성물로부터의 세포는 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.25:1 내지 1:1.25, 1.2:1 내지 1:1.2, 1.1:1 내지 1:1.1, 또는 약 1:1 또는 1:1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비율로 풀링, 혼합, 및/또는 결합된다. 일부 구현예에서, 농축된 CD4+ 세포 및 농축된 CD8+ 세포의 조성물로부터의 세포는 (약) 1:1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비율로 풀링, 혼합, 및/또는 결합된다.

[0173] 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 CD4+ 나이브-유사 T 세포 대 CD8+ 나이브-유사 T 세포의 일정한 비, 예를 들어 정의된, 조절된, 및/또는 고정된 비로 함유한다. 특정 구현예에서, CD4+ 나이브-유사 T 세포 대 CD8+ 나이브-유사 T 세포의 비율은 10:1 내지 0.05:1, 8:1 내지 0.1:1, 5:1 내지 0.2:1, 2.5:1 내지 0.25:1, 2.2:1 내지 0.8:1, 2:1 내지 0.5:1, 또는 1.5:1 내지 1:1이다. 특정 구현예에서, CD4+ 나이브-유사 T 세포 대 CD8+ 나이브-유사 T 세포의 비율은 2:1 내지 0.8:1, 1.6:1 내지 0.8:1, 1.4:1 내지 0.8:1, 1.2:1 내지 0.8:1, 또는 1.2:1 내지 0.8:1이다. 일부 구현예에서, 상기 비는 2.2:1 내지 0.8:1이다. 특정 구현예에서, CD4+ 나이브-유사 T 세포 대 CD8+ 나이브-유사 T 세포의 비율은 (약) 2.2:1, 2.1:1, 2.0:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1.0:1, 0.9:1, 또는 0.8:1이다. 특정 구현예에서, 상기 비는 (약) 1.1:1이다.

[0174] 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 총 세포 또는 총 생존 세포의 양을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 ,

1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , 또는 1×10^9 개의, CD4 또는 CD8을 발현하는 세포의 양을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 CD4+ 나이브-유사 T 세포 및 CD8+ 나이브-유사 T 세포의 양을 갖는다.

[0175] 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 1×10^6 내지 (약) 1×10^{10} , (약) 1×10^7 내지 (약) 1×10^9 , (약) 5×10^7 내지 (약) 5×10^8 , 또는 (약) 1×10^8 내지 (약) 3×10^8 개의 총 세포 또는 총 생존 세포의 양을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 1×10^6 내지 (약) 1×10^{10} , (약) 1×10^7 내지 (약) 1×10^9 , (약) 5×10^7 내지 (약) 5×10^8 , 또는 (약) 1×10^8 내지 (약) 3×10^8 개의, CD4 또는 CD8을 발현하는 세포의 양을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 1×10^6 내지 (약) 1×10^{10} , (약) 1×10^7 내지 (약) 1×10^9 , (약) 5×10^7 내지 (약) 5×10^8 , 또는 (약) 1×10^8 내지 (약) 3×10^8 개의 CD4+ 나이브-유사 T 세포 및 CD8+ 나이브-유사 T 세포의 양을 갖는다.

[0176] 일부 구현예에서, 상기 투입 조성물은 적어도 (약) 1%, 적어도 (약) 5%, 적어도 (약) 10%, 적어도 (약) 20%, 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 96%, 적어도 (약) 97%, 적어도 (약) 98%, 적어도 (약) 99%, 적어도 (약) 99.5%, 적어도 (약) 99.9%, 또는 100% 또는 약 100%의 나이브-유사 세포를 갖거나 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 (약) 100% 미만, (약) 99% 미만, (약) 98% 미만, (약) 97% 미만, (약) 96% 미만, (약) 95% 미만, (약) 90%, 또는 (약) 85% 미만의 나이브-유사 세포를 포함하거나 함유한다.

[0177] 특정 구현예에서, 본원에 제공되는 방법은 투입 조성물의 제조, 생성, 및/또는 생산 중 하나 이상의 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 투입 조성물의 제조, 생성, 및/또는 생산은 CD4+ T 세포의 조성물의 세포와 CD8+ T 세포의 조성물의 세포를 혼합 또는 조합하는 하나 이상의 단계를 포함한다.

[0178] 일부 구현예에서, 투입 조성물의 세포, 예를 들어 CD4+ T 세포 CD8+ T 세포는 샘플, 예를 들어 생물학적 샘플로부터 단리 및/또는 선별되었다. 특정 구현예에서, 투입 조성물의 세포 공급원은 세포의 조성물, 예를 들어 샘플로부터 단리 및/또는 선별된 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 조성물이다. 특정 구현예에서, CD4+ T 세포의 조성물 및 CD8+ T 세포의 조성물은 샘플, 예를 들어 생물학적 샘플로부터 단리 및/또는 선별된다. 특정 구현예에서, CD4+ T 세포의 조성물 및 CD8+ T 세포의 조성물은 동일한 샘플로부터 단리된 및/또는 선별된다. 특정 구현예에서, CD4+ T 세포의 조성물 및 CD8+ T 세포의 조성물은 동일한 대상체로부터 수득 또는 획득된 샘플로부터 단리된 및/또는 선별된다.

[0179] 특정 구현예에서, CD4+ T 세포의 조성물은 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 96%, 적어도 (약) 97%, 적어도 (약) 98%, 적어도 (약) 99%, 적어도 (약) 99.5%, 적어도 (약) 99.9%, 또는 100% 또는 약 100%의 CD4+ T 세포를 함유 또는 포함한다. 일부 구현예에서, CD4+ T 세포의 조성물은 100% 미만, 99% 미만, 98% 미만, 97% 미만, 96% 미만, 95% 미만, 90%, 또는 85% 미만의 CD4+ T 세포를 함유하거나 또는 포함한다.

[0180] 특정 구현예에서, CD8+ T 세포의 조성물은 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 96%, 적어도 (약) 97%, 적어도 (약) 98%, 적어도 (약) 99%, 적어도 (약) 99.5%, 적어도 (약) 99.9%, 또는 100% 또는 약 100%의 CD8+ T 세포를 함유 또는 포함한다. 특정 구현예에서, CD8+ T 세포의 조성물은 100% 미만, 99% 미만, 98% 미만, 97% 미만, 96% 미만, 95% 미만, 90%, 또는 85% 미만의 CD8+ T 세포를 함유하거나 또는 포함한다.

[0181] 특정 구현예에서, 투입 조성물의 제조, 생성, 및/또는 생산은, 예를 들어 세포 조성물의 세포를 조합 또는 혼합하기 전, CD4+ T 세포 조성물 및/또는 CD8+ T 세포 조성물에 존재하는 생존 CD4+ T 세포 및/또는 생존 CD8+ T

세포의 양, 부분, 개수, 부피 당 개수, 중량 당 개수 및/또는 백분율을 측정, 결정, 및/또는 정량화하는 단계 중 하나 이상의 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 투입 조성물의 제조, 생성, 및/또는 생산은 CD4+ T 세포 조성물 및/또는 CD8+ T 세포 조성물에 존재하는 나이브-유사 CD4+ T 세포 및/또는 나이브-유사 CD8+ T 세포의 양, 부분, 개수, 부피 당 개수, 중량 당 개수 및/또는 백분율의 측정, 결정, 및/또는 정량화하는 단계 중 하나 이상의 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 나이브-유사 CD4+ 및/또는 나이브-유사 CD8+ T 세포는 생존 나이브-유사 세포이다.

[0182] 특정 구현예에서, 투입 조성물의 제조, 생성, 및/또는 생산은 샘플, 예를 들어 생물학적 샘플 내 존재하는 생존 CD4+ T 세포 및/또는 생존 CD8+ T 세포의 양, 부분, 개수, 부피 당 개수, 중량 당 개수 및/또는 백분율을 측정, 결정, 및/또는 정량화하는 단계 중 하나 이상의 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 투입 조성물의 제조, 생성, 및/또는 생산은 샘플 내 존재하는 나이브-유사 CD4+ T 세포 및/또는 나이브-유사 CD8+ T 세포의 양, 부분, 개수, 부피 당 개수, 중량 당 개수 및/또는 백분율을 측정, 결정, 및/또는 정량화하는 단계 중 하나 이상의 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 나이브-유사 CD4+ 및/또는 나이브-유사 CD8+ T 세포는 생존 나이브-유사 세포이다.

[0183] 일부 구현예에서, 투입 조성물의 세포는 샘플, 예를 들어 생물학적 샘플로부터 단리 및/또는 선별된다. 특정 구현예에서, 샘플 내 나이브-유사 세포 부분, 예를 들어 나이브-유사 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 부분은 공지되어 있거나, 또는 결정, 측정, 또는 평가되었다. 일부 구현예에서, 샘플로부터 유래한 세포는 정의된, 고정된, 또는 제어된 나이브-유사 CD4+ T 세포 대 나이브-유사 CD8+ T 세포의 비율을 가지는 세포 조성물, 예를 들어 투입 조성물을 직접적으로 제조하기 위해 단리 및/또는 선별된다. 특정 구현예에서, 세포는 면역친화성 비드 선별로 단리 및/또는 선별된다. 일부 구현예에서, 세포는 친화도 컬럼으로 단리 및/또는 선별된다. 특정 구현예에서, 샘플로부터 유래한 세포는 정의된, 제어된, 및/또는 고정된 나이브-유사 CD4+ 세포 대 나이브-유사 CD8+ 세포의 비율을 가지는 세포 조성물을 제조하기 위해 국제공개공보 제WO 2015/164675호에 기재된 임의의 방법에 따라 단리 또는 선별된다.

[0184] 특정 구현예에서, 투입 조성물은 제 1 및 제 2 단리 또는 선별에 의해 샘플로부터 직접적으로 단리 및/또는 선별된 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 투입 조성물은 정의된, 고정된, 및/또는 제어된 나이브-유사 CD4+ 대 나이브-유사 CD8+ T 세포의 비율을 제조하기에 충분한 양, 개수 또는 농도의 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 단리하기 위해 제 1 및 제 2 선별을 수행함으로써 제조된다.

[0185] 일부 구현예에서, 샘플로부터 유래한 세포는 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포에 대해 농축된 투입 조성물을 제조하기 위해 직접적으로 단리, 선별, 및/또는 농축된다. 일부 구현예에서, 나이브-유사 CD4+ 및 나이브-유사 CD8+ 세포의 양, 개수, 백분율, 부피 당 개수 및/또는 중량 당 개수는 have 샘플에서 측정, 평가, 및/또는 결정되었으며, CD4+ 및 CD8+ 세포는 정의된, 고정된, 또는 제어된 나이브-유사 CD4+ 대 나이브-유사 CD8+ T 세포 비율을 가지는 투입 조성물을 달성하기에 충분한 양으로 단리, 선별, 및/또는 농축된다. 일부 구현예에서, 샘플로부터 직접적으로 단리, 선별, 및/또는 농축된 세포는 투입 조성물이며, 후속의 가공 단계, 예를 들어 농축된 세포의 인큐베이션, 자극, 활성화, 조작 및/또는 제제화를 수반하는 후속 가공 단계에서 사용된다.

[0186] 일부 구현예에서, 세포로부터 단리, 선별, 및/또는 농축된 세포, 예를 들어 투입 조성물은, 정의된, 고정된, 또는 제어된 나이브-유사 CD4+ 세포 대 나이브-유사 CD8+ 세포의 비율로 CD4+ 세포 대 CD8+ 세포의 비율을 포함한다. 본원에 제공되는 방법의 구현예에서, 샘플의 제 1 및/또는 제 2 선별, 또는 이의 서브집단의 선별은 원하는 나이브-유사 CD4+ T 세포 대 나이브-유사 CD8+ 세포의 비율을 가지는 투입 조성물을 생성하는 방식으로 수행될 수 있다.

[0187] 일부 구현예에서, 샘플로부터 제 1 및/또는 제 2 선별을 수행하기 전, 샘플, 예를 들어 생물학적 샘플 내 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율이 결정된다. 특정 구현예에서, 제 1 및/또는 제 2 선별을 수행하기 전, 샘플 내 나이브-유사 CD4+ 대 나이브-유사 CD8+ T 세포의 비율이 결정된다. 샘플에 따라 달라질 수 있는, 샘플 내 CD4+ 대 CD8+ T 세포 및/또는 나이브-유사 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 구체적인 비율에 기초하여, 특정 선별 모드는 예를 들어 크로마토그래피 컬럼의 크기, 또는 면역친화성 시약의 양 또는 농도의 선별에 따라 샘플에 대해 개별화되어, 원하는, 고정된, 또는 제어된 비율을 달성할 수 있다. 대상체 내 다양한 세포 집단의 상대적인 수준 및 빈도는 이러한 집단 또는 서브집단에 존재하는 마커 또는 마커들의 표면 발현에 대한 평가에 기초하여 결정될 수 있다. 표면 마커 또는 단백질의 발현 수준을 평가하는 다수의 공지된 방법, 예를 들어 친화도-기반의 방법, 예를 들어 면역친화성-기반의 방법, 예를 들어 세포 표면 단백질의 맥락에서, 예를 들어 유세포 분석에 의한 검출이 사용될 수 있다.

- [0188] 일부 맥락에서, 적절한 나이브-유사 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 비율은 상황에 따라 달라질 수 있는데, 예를 들어 특정 질병, 병태, 또는 세포가 유도되는 대상체의 사전 치료, 및/또는 세포의 특정 항원-특이성, 특정 유형의 (예를 들어 CD4+ 세포)의 다양한 서브집단의 세포 사이의 상대적인 표현, 예를 들어 이펙터 대 기억 대 나이브 세포, 및/또는 세포가 인큐베이션될 하나 이상의 조건, 예를 들어 배지, 자극 시제, 배양 시간, 완충액, 산소 함량 이산화탄소 함량, 항원, 사이토카인, 항체, 및 다른 성분에 따라 달라질 수 있다. 이에 따라, 전형적으로 또는 일반적으로 다른 유형보다 더욱 빠르게 증식 또는 증폭하는 것으로 알려진 세포 유형이 모든 상황에서 항상 이러한 특성을 갖는 것은 아닐 수 있다. 이에 따라, 일부 양태에서, 나이브-유사 CD4+ T 세포 및 나이브-유사 CD8+ T 세포의 비율은 세포 또는 세포가 유래되는 대상체의 표현형 또는 상태에 대한 평가, 및/또는 경험적 증거와 함께, 일반적인 또는 전형적인 상황에서 세포 유형의 공지된 용량에 기초하여 결정된다.
- [0189] 일부 구현예에서, 분리 및/또는 단계는 면역자기성 비드를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, CD4+ 및 CD8+ 세포를 함유하는 세포 샘플은 CD4 또는 CD8에 결합하는 제 1 면역친화성 시약을 함유하는 자기성 비드 및 다른 CD4 또는 CD8에 결합하는 제 2 면역친화성 시약을 함유하는 자기성 비드와 접촉된다. 분리 및/또는 단계는 동시에 및/또는 순차적으로 일어날 수 있다.
- [0190] 일부 구현예에서, 제 1 및/또는 제 2 면역친화성 시약은 준최적의 산출 농도로 인큐베이션 조성물 내에 존재하며, 이에 의해 농축된 조성물은 contains 인큐베이션 조성물 내 전체보다 작은, 예를 들어 70%의 전체 CD4+ 세포 및/또는 인큐베이션 조성물 내 전체보다 작은, 예를 들어 70%의 CD8+ 세포를 함유하여, CD4+ 및 CD8+ T 세포에 대해 농축된 조성물을 제조한다.
- [0191] 일부 구현예에서, 친화성 시약의 준최적의 산출 농도는 상기 시약으로의 세포를 인큐베이션하고 이러한 시약에 결합된 세포를 회수 또는 분리하는 단계를 수반하는, 주어진 선별 또는 농축에서 결합된 세포의 최적의 또는 최대의 수율을 달성하기 위해 사용되는 또는 요구되는 농도 미만의 농도이다("산출"은, 예를 들어 인큐베이션에서의 폐소의 전체 수와 비교하여, 시약에 의해 표적화되는 또는 시약에 대해 특이적인 또는 시약이 특이적이며 결합할 수 있는 마커를 가지는, 이와같이 회수 또는 선별된 세포의 수) 준최적의 산출 농도는 일반적으로 이러한 공정 또는 단계가, 시약에 결합된 세포의 회수 시에 결합된 세포, 예를 들어 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 전체보다 작은, 예를 들어 70% 미만의 산출을 달성하는 시약의 농도 또는 양이다. 일부 구현예에서, (약) 50%, 45%, 40%, 30%, 또는 25% 미만의 산출은 친화성 시약의 준최적 농도에 의해 달성된다. 농도는 세포 당 입자 또는 표면의 수 또는 다수(mass) 및/또는 세포 당 시제(예를 들어 항체, 예를 들어 항체 단편)의 다수 또는 분자의 수의 관점으로 표현될 수 있다. 특정 구현예에서, 준최적의 산출 농도는 고정된, 제어된, 및/또는 나이브-유사 CD4+ T 세포 대 나이브-유사 CD8+ T 세포의 정의된 비율을 유도 또는 달성하기에 충분하다.
- [0192] 일부 구현예에서, 예를 들어 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포에 대한 친화성을 가지는 둘 이상 선별 시약 각각, 또는 하나 이상에 대해 준최적의 산출 농도로 작업하는 경우, 이러한 시약 중 하나 이상은, 다른 시약(들)에 의해 인식되는 세포 유형(들)과 비교하여 이러한 시약에 의해 인식되는 세포 유형의 비율을 편향시키기 위해 이러한 다른 시약(들) 중 하나 이상보다 더 높은 농도로 사용된다. 예를 들어 비율을 편향시키기 위해 바람직한 마커에 대해 특이적으로 결합하는 시약은 다른 시약(들)과 비교하여, 비율을 증가시키는 것이 얼마나 필요한지에 따라 절반, 1 배, 2 배, 3 배, 4 배, 5 배, 10 배 이상으로 증가된 농도(예를 들어 세포 당 시제 또는 다수)로 포함될 수 있다.
- [0193] 일부 구현예에서, 준최적 범위에서 및/또는 시약 포화를 달성하기에 충분한 세포로 작업하는 경우, 면역친화성 시약의 양은 농축된 세포의 대략적인 산출량에 비례한다. 특정 구현예에서, 농축된 또는 선별된 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 함유하는 생성된 조성물의 원하는 비율에 의존하는 면역친화성 시약의 적절한 양 또는 농도는 일상적으로 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 분리 및/또는 단리 단계는 면역친화성 시약이, 예를 들어 국제공개공보 제W02015/164675호에 기재된 바와 같이 스트렙타비딘 뮤테인과의 썬타드 리간드 상호 작용을 통해 가역적으로 결합되는 자성 비드를 사용하여 수행된다. 예시적인 자성 비드는 Streptamers®이다. 일부 구현예에서, 분리 및/또는 단계는 자성 비드, 예를 들어 Miltenyi Biotec으로부터 상업적으로 입수 가능한 자성 비드를 사용하여 수행된다.
- [0194] 일부 구현예에서, 샘플로부터 CD4+ 및 CD8+ 세포의 제 1 선별 또는 농축은 면역친화성-기반의 시약을 사용하여 수행되며, 이러한 시약은 적어도 각각, 항체가 고정된 제 1 및 제 2 친화성 크로마토그래피 매트릭스를 포함한다. 일부 구현예에서, 제 1 및/또는 제 2 선별 중 하나 또는 둘 모두는 복수의 친화성 크로마토그래피 매트릭스 및/또는 항체를 사용할 수 있으며, 이에 따라 동일한 선별, 즉, 제 1 선별 또는 제 2 선별에 사용되는 복수의 매트릭스 및/또는 항체는 직렬로 연결된다. 일부 구체예에서, 제 1 및/또는 제 2 선별에 사용되는 친화성

크로마토그래피 매트릭스 또는 매트릭스들은 적어도 (약) 50×10^6 개 세포/mL, 100×10^6 개 세포/mL, 200×10^6 개 세포/mL 또는 400×10^6 개 세포/mL를 흡착하거나, 또는 이를 선별 또는 농축할 수 있다. 일부 구현예에서, 흡착 용량은 컬럼의 직경 및/또는 길이에 기초하여 조정될 수 있다. 일부 구현예에서, 선별된 또는 농축된 조성물의 배양-개시 비율은 예를 들어 세포를 선별하기 위한 컬럼 또는 컬럼들의 흡착 용량에 기초하여 가정할 때 배양-개시 비율을 달성하기에 충분한 양의 매트릭스 및/또는 충분한 상대량을 선택함으로써 달성된다.

[0195] 하나의 예시적인 구현예에서, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 나이브-유사 세포와 동일한 또는 유사한 부분을 가지며, 매트릭스 또는 매트릭스들의 흡착 용량은 제 1 및 제 2 선별에서 동일하여, 예를 들어 두 선별 모두에 대해 (약) 1×10^8 개의 세포/mL이고, 이에 의해 제 1 선별 및 제 2 선별에서 세포의 농축 또는 선별은 나이브-유사 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비가 (약) 1:1인 CD4+ 세포 대 CD8+ 세포를 함유하는 조성물을 생성한다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 세포의 부분 및 생성된 투입 조성물의 원하는 비율에 따라, 제 1 및/또는 제 2 선별에 대한 친화성 매트릭스 크로마토그래피 컬럼의 적절한 부피, 직경 또는 개수는 일상적으로 선별 또는 결정될 수 있다.

[0196] 일부 구현예에서, 컬럼 매트릭스 또는 매트릭스들의 흡착 용량은 대상체로부터의 출발 샘플 내 각각의 CD4+ 또는 CD8+ 모체 집단의 세포의 빈도와 비교하여, 나이브-유사 세포, 예를 들어 나이브 유사 CD4+ 또는 CD8+ 세포의 빈도의 차이를 설명하기 위해 조정된다. 대상체 내 다양한 세포 집단의 상대적인 수준 및 빈도는 이러한 집단 또는 서브집단에 존재하는 마커 또는 마커들의 표면 발현에 대한 평가에 기초하여 결정될 수 있다. 표면 마커 또는 단백질의 발현 수준을 평가하는 다수의 공지된 방법, 예를 들어 친화도-기반의 방법, 예를 들어 면역친화성-기반의 방법, 예를 들어 세포 표면 단백질의 맥락에서, 예를 들어 유세포 분석에 의한 검출이 사용될 수 있다.

[0197] 일부 구현예에서, 나이브-유사 세포, 예를 들어 나이브-유사 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포는 세포 조성물, 예를 들어 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포 조성물에서, 또는 샘플, 예를 들어 생물학적 샘플에서 평가, 측정, 및/또는 검출된다. 일부 구현예에서, 나이브-유사 T 세포는 세포가 나이브 및/또는 나이브-유사 세포임을 나타내는 하나 이상의 마커의 발현에 대해 양성인 T 세포이다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 T 세포는 T 세포에서 나이브 또는 나이브-유사 상태와 연관이 있는 마커의 발현에 대해 양성인 세포이다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 T 세포는 세포가 나이브가 아님 및/또는 나이브-유사 세포가 아님을 나타내는 하나 이상의 마커의 발현에 대해 음성인 T 세포이다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 T 세포는 T 세포에서 비-나이브 또는 비-나이브-유사 상태와 연관된 마커의 발현에 대해 음성인 세포이다. 특정 구현예에서, T 세포내 비-나이브 또는 비-나이브-유사 상태로는, 예를 들어 이펙터 T(T_{EFF}) 세포, 기억 T 세포, 증추 기억 T 세포(T_{CM}), 이펙터 기억 T(T_{EM}) 세포, 및 이의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0198] 일부 구현예에서, 나이브-유사 T 세포는 세포가 나이브 및/또는 나이브-유사 세포이고, 및/또는 T 세포에서 나이브 또는 나이브-유사 상태와 연관이 있음을 나타내는 마커의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10개 이상의 발현에 대해 양성이다. 일부 구현예에서, 마커는 세포 표면 상에서 발현된다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 T 세포는 세포가 비-나이브 및/또는 비-나이브-유사 세포이고, 및/또는 T 세포에서 비-나이브 또는 비-나이브-유사 상태와 연관이 있음을 나타내는 마커의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 10개 이상의 발현에 대해 음성이다.

[0199] T 세포가 나이브 및/또는 나이브-유사 T 세포이고, 및/또는 T 세포에서 나이브 또는 나이브-유사 상태와 연관이 있음을 나타내는 마커로는 CD27, CD28, CD45RA, CD62L, 및/또는 CCR7을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 나이브-유사 T 세포, 예를 들어 나이브-유사 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포는 CD27, CD28, CD45RA, CD62L, 및/또는 CCR7의 발현에 대해 양성이다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 T 세포는 CD27, CD28, CD45RA, CD62L, 및/또는 CCR7 중 하나 이상의 표면 발현에 대해 양성이다.

[0200] 세포가 비-나이브 및/또는 비-나이브-유사 T 세포이고, 및/또는 T 세포에서 비-나이브 또는 비-나이브-유사 상태와 연관이 있음을 나타내는 마커로는, CD25, CD45RO, CD56, KLRG1, 및/또는 CD95를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 나이브-유사 T 세포, 예를 들어 나이브-유사 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포는 CD25, CD45RO, CD56, 및/또는 KLRG1의 발현에 대해 음성이다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 T 세포, 예를 들어 나이브-유사 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포는 비-나이브 또는 비-나이브-유사 세포와 연관된 마커의 낮은 발현을 가진다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 T 세포는 CD95의 낮은 발현을 가진다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 T 세포는 CD25, CD45RO, CD56, 및/또는 KLRG1 중 하나 이상의 표면 발현에 대해 음성이다.

[0201] 일부 구현예에서, 비-나이브 또는 비-나이브-유사 세포와 연관이 있는 마커의 낮은 발현은 비-나이브-유사 세포

인 세포내 발현, 및/또는 비-나이브 및/또는 비-나이브-유사 T 세포이고, 및/또는 T 세포에서 비-나이브 또는 비-나이브-유사 상태와 연관이 있음을 나타내는 하나 이상의 마커에 대해 양성인 세포내 발현보다 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 더 적은 발현이거나, 또는 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 비-나이브 또는 비-나이브-유사 세포와 연관이 있는 마커의 낮은 발현은 이펙터 T(T_{EFF}) 세포, 기억 T 세포, 중추 기억 T 세포(T_{CM}), 및/또는 이펙터 기억 T(T_{EM}) 세포내 마커의 발현보다 적어도 (약) 10%, 적어도 (약) 20%, 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 또는 적어도 (약) 99% 더 적은 발현이거나, 또는 이를 포함한다.

[0202] 일부 구현예에서, 세포가 비-나이브 및/또는 비-나이브-유사 T 세포이고, 및/또는 T 세포에서 비-나이브 또는 비-나이브-유사 상태와 연관이 있음을 나타내는 마커로는, 하나 이상의 사이토카인을 포함한다. 예를 들어 특정 구현예에서, 비-나이브 또는 비-나이브-유사 T 세포는 IL-2, IFN- γ , IL-4, 및 IL-10 중 하나 이상의 발현 및/또는 제조에 대해 음성이다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인이 분비된다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 사이토카인은, 예를 들어 분비를 예방, 억제, 또는 감소시키는 시제로 치료하는 동안 또는 이후에 비-나이브-유사 T 세포에 의해 내부적으로 발현된다.

[0203] 특정 구현예에서, 나이브-유사 T 세포는 CD45RA 및 CCR7의 발현, 예를 들어 표면 발현에 대해 양성이다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 CD4+ T 세포는 CD45RA 및 CCR7의 발현, 예를 들어 표면 발현에 대해 양성이다. 일부 구현예에서, 나이브-유사 CD8+ T 세포는 CD45RA 및 CCR7의 발현, 예를 들어 표면 발현에 대해 양성이다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 T 세포는 CD45RA, CD27, 및 CCR7의 발현, 예를 들어 표면 발현에 대해 양성이고, CD45RO의 발현, 예를 들어 표면 발현에 대해 음성이다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 CD4+ T 세포는 CD45RA, CD27, 및 CCR7의 발현, 예를 들어 표면 발현에 대해 양성이고, CD45RO의 발현, 예를 들어 표면 발현에 대해 음성이다. 일부 구현예에서, 나이브-유사 CD8+ T 세포는 CD45RA, CD27, 및 CCR7의 발현, 예를 들어 표면 발현에 대해 양성이고, CD45RO의 발현, 예를 들어 표면 발현에 대해 음성이다.

[0204] 특정 구현예에서, CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포는 생존 세포이다. 특정 구현예에서, CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포는 생존 나이브-유사 세포이다. 생존 세포는 세포가 정상적인 기능적 세포 과정을 거치고 및/또는 괴사 또는 프로그램된 세포 사멸을 거치는 과정하에 있지 않았거나 또는 있지 않음을 나타내는 마커의 발현에 대해 양성이다. 일부 구현예에서, 생존력은 세포의 산화환원 전위, 세포 막의 완전성, 또는 미토콘드리아의 활성 또는 기능에 의해 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 생존력은 세포 사멸과 연관이 있는 특정 분자의 부재, 분석에서 세포 사멸의 징후의 부재이다.

[0205] 특정 구현예에서, 세포 생존율은 분석법으로 평가되며, 이러한 분석법으로는, 염료 흡수 분석법 (예를 들어 칼 세인 AM 분석법), XTT 세포 생존율 분석법, 및 염료 배제 분석법 (예를 들어 트리토판 블루, 에오신, 또는 프로피듐 염료 배제 분석법)을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 특정 구현예에서, 생존 세포는 세포 사멸 마커, 예를 들어 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3 중 하나 이상에 대해 음성 발현을 가진다. 일부 구현예에서, 생존 세포는 하나 이상의 세포사멸 마커의 발현에 대해 음성이며, 이러한 마커로는 카스파제, 예를 들어 카스파제 2, 카스파제 3, 카스파제 6, 카스파제 7, 카스파제 8, 카스파제 9, 및 카스파제 10, Bcl-2 패밀리의 멤버, 예를 들어 Bax, Bad, 및 Bid, 아넥신 V, 및/또는 TUNEL 염색을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0206] 일부 구현예에서, 발현은 마커의 양, 수준, 농도, 및/또는 존재이거나, 또는 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 마커는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 마커는 mRNA이다. 일부 구현예에서, 발현은 폴리펩티드, 예를 들어 마커 폴리펩티드의 양, 수준, 농도, 및/또는 존재이거나, 또는 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 mRNA 또는 mRNA로부터 유래된 cDNA의 양, 수준, 농도, 및/또는 존재이다. 특정 구현예에서, 발현은 세포 표면 상에 또는 세포 막 내부에 있는 또는 발현되는 마커의 양, 수준, 농도, 및/또는 존재이거나, 또는 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 발현은 세포 표면 상에 또는 세포 막 내부에 있는 또는 발현되는 마커의 양, 수준, 농도, 및/또는 존재이거나, 또는 이를 포함한다. 특정 구현예에서, 발현은 내부 발현, 예를 들어 세포 내에, 예를 들어 세포액, 핵, 소포체, 및/또는 골지체 내에서의 마커의 양, 수준, 농도, 및/또는 존재이거나, 또는 이를 포함한다.

[0207] 일부 구현예에서, 마커는 시험관내 분석을 수행함으로써 측정, 평가, 및/또는 정량화된다. 일부 예시에서, 시험관내 분석은 면역분석, 앵타머-기반 분석, 조직학적 또는 세포학적 분석, 또는 mRNA 발현 수준 분석이다. 일부 구현예에서, 시험관내 분석은 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA), 면역 블로팅, 면역 침전법, 방사 면역 분석법(RIA), 면역 염색법, 유세포 측정 분석법, 표면 플라즈몬 공명(SPR), 화학발광 분석, 측면 흐름 면역 분석,

역제 분석 또는 열성 분석일 수 있다. 일부 구현예에서, 마커의 발현은 RNA-seq에 의해 측정, 평가, 및/또는 정량화된다. 특정 구현예에서, 마커의 발현은 면역염색 기법에 의해 측정, 평가, 및/또는 정량화된다. 특정 구현예에서, 마커의 발현은 유세포 분석법에 의해 측정, 평가, 및/또는 정량화된다. 일부 구현예에서, 마커의 발현은 내부 사이토카인 염색법에 의해 측정, 평가, 및/또는 정량화된다.

[0208] 일부 구현예에서, 마커는 CD4+ T 세포 조성물의 세포로 측정, 평가, 및/또는 정량된다. 특정 구현예에서, CD4+ T 세포의 적어도 (약) 1%, 적어도 (약) 5%, 적어도 (약) 10%, 적어도 (약) 15%, 적어도 (약) 20%, 적어도 (약) 25%, 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 35%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 45%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 97%, 또는 적어도 (약) 99%가 나이브-유사 CD4 + T 세포이다. 특정 구현예에서, CD4+ T 세포의 (약) 10% 내지 (약) 50%, (약) 20% 내지 (약) 60%, (약) 25% 내지 (약) 75%, (약) 30% 내지 (약) 80%, (약) 40% 내지 (약) 90%, (약) 50% 내지 (약) 100%, (약) 30% 내지 (약) 50%, (약) 40% 내지 (약) 60%, (약) 50% 내지 (약) 70%, (약) 60% 내지 (약) 80%, (약) 70% 내지 (약) 90%, (약) 80% 내지 (약) 100%, (약) 5% 내지 (약) 25%, (약) 25% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 75%, 또는 (약) 75% 내지 (약) 99%가 나이브-유사 CD4+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 CD4+ T 세포는 생존 나이브-유사 CD4+ T 세포이다.

[0209] 특정 구현예에서, 마커는 CD8+ T 세포 조성물의 세포로 측정, 평가, 및/또는 정량된다. 특정 구현예에서, CD8+ T 세포의 적어도 (약) 1%, 적어도 (약) 5%, 적어도 (약) 10%, 적어도 (약) 15%, 적어도 (약) 20%, 적어도 (약) 25%, 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 35%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 45%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 97%, 또는 적어도 (약) 99%가 나이브-유사 CD4 + T 세포이다. 특정 구현예에서, CD4+ T 세포의 (약) 10% 내지 (약) 50%, (약) 20% 내지 (약) 60%, (약) 25% 내지 (약) 75%, (약) 30% 내지 (약) 80%, (약) 40% 내지 (약) 90%, (약) 50% 내지 (약) 100%, (약) 30% 내지 (약) 50%, (약) 40% 내지 (약) 60%, (약) 50% 내지 (약) 70%, (약) 60% 내지 (약) 80%, (약) 70% 내지 (약) 90%, (약) 80% 내지 (약) 100%, (약) 5% 내지 (약) 25%, (약) 25% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 75%, 또는 (약) 75% 내지 (약) 99%가 나이브-유사 CD8+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 CD8+ T 세포는 생존 나이브-유사 CD8+ T 세포이다.

[0210] 일부 구현예에서, CD4+ T 세포의 조성물로부터의 세포는, 10:1 내지 0.05:1, 8:1 내지 0.1:1, 5:1 내지 0.2:1, 2.5:1 내지 0.25:1, 2.2:1 내지 0.8:1, 2:1 내지 0.5:1, 또는 1.5:1 내지 1:1의 나이브-유사 CD4+ T 세포 대 나이브-유사 CD8+ T 세포의 비를 갖는 투입 조성물을 생성하기에 충분한 양 및/또는 비율 혼합 또는 결합된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 2.2:1 내지 0.8:1의 나이브-유사 CD4+ T 세포 대 나이브-유사 CD8+ T 세포의 비에 충분한 양 및/또는 비율로 혼합된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 (약) 2.2:1, 2.1:1, 2.0:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1.0:1, 0.9:1, 또는 0.8:1의 나이브-유사 CD4+ T 세포 대 나이브-유사 CD8+ T 세포의 비율로 혼합 또는 결합된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 (약) 1.1:1의 비로 혼합 또는 결합된다.

[0211] 일부 구현예에서, (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 총 또는 총 생존 CD4+ T 세포의 양은, 나이브-유사 CD4+ T 세포 대 나이브-유사 CD8+ T 세포의 정의된 비를 갖는 투입 조성물을 생성하도록 (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5.5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 총 또는 총 생존 CD8+ T 세포의 양과 혼합 또는 결합된다. 특정 구현예에서, 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 총 또는 총 생존 CD4+ T 세포는, 나이브-유사 CD4+ T 세포 대 나이브-유사 CD8+ T 세포의 정의된 비를 갖는 투입 조성물을 생성하도록 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 총 또는 총

생존 CD8+ T 세포의 양과 혼합 또는 결합된다.

[0212] 일부 구현예에서, (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 나이브-유사 CD4+ T 세포의 양은, 나이브-유사 CD4+ T 세포 대 나이브-유사 CD8+ T 세포의 정의된 비를 갖는 투입 조성물을 생성하도록 (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5.5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 나이브-유사 CD8+ T 세포의 양과 혼합 또는 결합된다. 특정 구현예에서, 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 나이브-유사 CD4+ T 세포는, 나이브-유사 CD4+ T 세포 대 나이브-유사 CD8+ T 세포의 정의된 비를 갖는 투입 조성물을 생성하도록 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 나이브-유사 CD8+ T 세포의 양과 혼합 또는 결합된다.

[0213] 특정 구현예에서, 투입 조성물의 나이브-유사 CD4+ T 세포 대 나이브-유사 CD8+ T 세포의 비율은 샘플, 예를 들어 생물학적 샘플의 나이브-유사 CD4+ T 세포 대 나이브-유사 CD8+ T 세포의 비에 비해 조정, 변화 및/또는 변경되었다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 CD4+ T 세포 대 나이브-유사 CD8+ T 세포의 비율은 생물학적 샘플로부터 1-배, 1.5-배, 2-배, 2.5-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 20-배, 50-배, 100-배 조정, 변화 및/또는 변경된 적어도 (약) 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%이다. 특정 구현예에서, 상기 샘플은 투입 조성물의 세포가 유도, 단리, 선별, 및/또는 얻어지는 샘플이다.

[0214] 일부 구현예에서, 투입 조성물을 생산, 생성, 및/또는 제조하는 것은, 2.2:1 내지 0.8:1의 나이브-유사 CD4+ T 세포 대 나이브-유사 CD8+ T 세포 비를 갖는 투입 조성물을 생성하도록 CD4+ T 세포 조성물을 CD8+ T 세포 조성물의 세포와 혼합 또는 결합하는 하나 이상의 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 나이브-유사 세포의 수, 부피당 수, 중량당 수, 및/또는 양, 레벨, 또는 백분율은 혼합 또는 결합 전에 CD4+ T 세포 조성물 및 CD8+ T 세포 조성물에서 측정, 평가, 및/또는 정량된다. 일부 구현예에서, 나이브-유사 세포의 양, 레벨, 수, 부피당 수, 중량당 수, 및/또는 백분율은 CD45RA+;CCR7+ T 세포를 검출함으로써 측정, 평가, 및/또는 정량된다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 2.2:1 내지 0.8:1의 CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 투입 조성물은 약 1.1:1의 CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비를 갖는다.

[0215] 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 비, 예를 들어 정의된, 제어된, 및/또는 고정된 비의 CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 10:1 내지 0.05:1, 8:1 내지 0.1:1, 5:1 내지 0.2:1, 2.5:1 내지 0.25:1, 2.2:1 내지 0.8:1, 2:1 내지 0.5:1, 또는 1.5:1 내지 1:1이다. 특정 구현예에서, CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 2:1 내지 0.8:1, 1.6:1 내지 0.8:1, 1.4:1 내지 0.8:1, 1.2:1 내지 0.8:1, 또는 1.2:1 내지 0.8:1이다. 특정 구현예에서, 상기 비는 2.2:1 내지 0.8:1이다. 특정 구현예에서, CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 (약) 2.2:1, 2.1:1, 2.0:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1.0:1, 0.9:1, 또는 0.8:1이다. 특정 구현예에서, 상기 비는 (약) 1.1:1이다.

[0216] 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 총 세포 또는 총 생존 세포의 양을 갖는다. 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 CD4 또는 CD8을 발현하는, (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 ,

2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 세포의 양을 갖는다. 일부 구현예에서, 투입 세포 조성물은 (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 CD45RA+/CCR7+/CD4+ 및 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포의 양을 갖는다.

[0217] 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 총 세포 또는 총 생존 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 CD4 또는 CD8을 발현하는 (약) 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 세포의 양을 갖는다. 일부 구현예에서, 투입 세포 조성물은 (약) 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 CD45RA+/CCR7+/CD4+ 및 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포의 양을 갖는다.

[0218] 일부 구현예에서, 투입 세포 조성물은 적어도 1%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 적어도 99.9%, 또는 100% or about 100%의 CD45RA+/CCR7+ 세포를 갖거나 또는 함유한다. 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 100% 이하, 99% 이하, 98% 이하, 97% 이하, 96% 이하, 95% 이하, 90% 이하, 또는 85% 이하의 CD45RA+/CCR7+ 세포를 함유하거나 또는 포함한다.

[0219] 일부 구현예에서, (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 총 또는 총 생존 CD4+ T 세포의 양은, CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포의 정의된 비를 갖는 투입 세포 조성물을 생성하도록 (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5.5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 총 또는 총 생존 CD8+ T 세포의 양과 혼합되거나 또는 결합된다. 특정 구현예에서, 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 총 또는 총 생존 CD4+ T 세포는, CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포의 정의된 비를 갖는 투입 세포 조성물을 생성하도록 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 총 또는 총 생존 CD8+ T 세포의 양과 혼합되거나 또는 결합된다.

[0220] 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물의 CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 샘플, 예를 들어 생물학적 샘플의 CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비에 비해 조정, 변화 및/또는 변경되었다. 특정 구현예에서, CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 생물학적 샘플로부터 1-배, 1.5-배, 2-배, 2.5-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 20-배, 50-배, 100-배 조정, 변화 및/또는 변경된 적어도 (약) 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%이다. 특정 구현예에서, 상기 샘플은 투입 세포 조성물의 세포가 유도, 단리, 선별, 및/또는 얻어지는 샘플이다.

[0221] 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 CD27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비, 예를 들어 정의된, 제어된, 및/또는 고정된 비로 함유한다. 특정 구현예에서, D27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 10:1 내지 0.05:1, 8:1 내지 0.1:1, 5:1 내지 0.2:1, 2.5:1 내지 0.25:1, 2.2:1 내지 0.8:1, 2:1 내지 0.5:1, 또는 2:1 내지 1:1이다. 특정 구현예에서, D27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 2:1 내지 0.8:1, 1.8:1 내지 1:1, 1.8:1 내지 1.2:1, 1.2:1 내지 1.4:1, 또

는 1.8:1 내지 1.6:1이다. 일부 구현예에서, 상기 비는 1.8:1 내지 1.6:1이다. 특정 구현예에서, D27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 약 2.2:1, 2.1:1, 2.0:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.69:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 또는 1.3:1이다. 특정 구현예에서, 상기 비는 (약) 1.69:1이다.

[0222] 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 총 세포 또는 총 생존 세포의 양을 갖는다. 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 CD4 또는 CD8을 발현하는, (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , or 1×10^9 개의 세포의 양을 갖는다. 일부 구현예에서, 투입 세포 조성물은 (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 CD27+/CCR7+/CD4+ 및 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 양을 갖는다.

[0223] 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 총 세포 또는 총 생존 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 CD4 또는 CD8을 발현하는, (약) 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 세포의 양을 갖는다. 일부 구현예에서, 투입 세포 조성물은 (약) 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 CD27+/CCR7+/CD4+ 및 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 양을 갖는다.

[0224] 일부 구현예에서, 투입 세포 조성물은 적어도 (약) 1%, 적어도 (약) 5%, 적어도 (약) 10%, 적어도 (약) 20%, 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 96%, 적어도 (약) 97%, 적어도 (약) 98%, 적어도 (약) 99%, 적어도 (약) 99.5%, 적어도 (약) 99.9%, 또는 100% 또는 약 100%의 CD27+/CCR7+ 세포를 갖거나 또는 함유한다. 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 100% 이하, (약) 99% 이하, (약) 98% 이하, (약) 97% 이하, (약) 96% 이하, (약) 95% 이하, (약) 90%, 또는 (약) 85% 이하의 CD27+/CCR7+ 세포를 갖거나 또는 함유한다.

[0225] 일부 구현예에서, (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 총 또는 총 생존 CD4+ T 세포의 양은, CD27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 정의된 비를 갖는 투입 세포 조성물을 생성하도록 (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5.5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 총 또는 총 생존 CD8+ T 세포의 양과 혼합되거나 또는 결합된다. 특정 구현예에서, 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 총 또는 총 생존 CD4+ T 세포는, CD27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 정의된 비를 갖는 투입 세포 조성물을 생성하도록 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 총 또는 총 생존 CD8+ T 세포의 양과 혼합되거나 또는 결합된다.

- [0226] 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물의 CD27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 샘플, 예를 들어 생물학적 샘플의 CD27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비에 비해 조정, 변화 및/또는 변경되었다. 특정 구현예에서, CD27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 생물학적 샘플로부터 1-배, 1.5-배, 2-배, 2.5-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 20-배, 50-배, 100-배 조정, 변화 및/또는 변경된 적어도 (약) 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%이다. 특정 구현예에서, 상기 샘플은 투입 세포 조성물의 세포가 유도, 단리, 선별, 및/또는 얻어지는 샘플이다.
- [0227] 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 CD62L-/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포의 비, 예를 들어 정의된, 제어된, 및/또는 고정된 비로 함유한다. 특정 구현예에서, D27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 10:1 내지 0.05:1, 8:1 내지 0.1:1, 5:1 내지 0.2:1, 2.5:1 내지 0.25:1, 2.2:1 내지 0.8:1, 2:1 내지 0.5:1, 또는 1.5:1 내지 1:1이다. 특정 구현예에서, D27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 2:1 내지 0.8:1, 1.6:1 내지 0.8:1, 1.4:1 내지 0.8:1, 1.2:1 내지 1.4:1, 또는 1.8:1 내지 1.6:1이다. 일부 구현예에서, 상기 비는 1.8:1 내지 1.6:1이다. 특정 구현예에서, D27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 약 2.2:1, 2.1:1, 2.0:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1.0:1, 0.9:1, 또는 0.8:1이다. 특정 구현예에서, 상기 비는 (약) 1.1:1이다.
- [0228] 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 총 세포 또는 총 생존 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 CD4 또는 CD8을 발현하는, (약) 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 세포의 양을 갖는다. 일부 구현예에서, 투입 세포 조성물은 (약) 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 CD62L-/CCR7+/CD4+ 및 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포의 양을 갖는다.
- [0229] 일부 구현예에서, 투입 세포 조성물은 적어도 (약) 1%, 적어도 (약) 5%, 적어도 (약) 10%, 적어도 (약) 20%, 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 96%, 적어도 (약) 97%, 적어도 (약) 98%, 적어도 (약) 99%, 적어도 (약) 99.5%, 적어도 (약) 99.9%, 또는 100% 또는 약 100%의 CD62L-/CCR7+ 세포를 갖거나 또는 함유한다. 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물은 100% 이하, (약) 99% 이하, (약) 98% 이하, (약) 97% 이하, (약) 96% 이하, (약) 95% 이하, (약) 90%, 또는 (약) 85% 이하의 CD62L-/CCR7+ 세포를 갖거나 또는 함유한다.
- [0230] 일부 구현예에서, (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 총 또는 총 생존 CD4+ T 세포의 양은, CD62L-/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포의 정의된 비를 갖는 투입 세포 조성물을 생성하도록 (약) 1×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1.0×10^8 , 1.1×10^8 , 1.2×10^8 , 1.3×10^8 , 1.4×10^8 , 1.5×10^8 , 1.6×10^8 , 1.7×10^8 , 1.8×10^8 , 1.9×10^8 , 2.0×10^8 , 2.1×10^8 , 2.2×10^8 , 2.3×10^8 , 2.4×10^8 , 2.5×10^8 , 2.6×10^8 , 2.7×10^8 , 2.8×10^8 , 2.9×10^8 , 3.0×10^8 , 3.5×10^8 , 4.0×10^8 , 4.5×10^8 , 5×10^8 , 5.5×10^8 , 또는 1×10^9 개의 총 또는 총 생존 CD8+ T 세포의 양과 혼합되거나 또는 결합된다. 특정 구현예에서, 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 총 또는 총 생존 CD4+ T 세포는, CD62L-/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포의 정의된 비를 갖는 투입 세포 조성물을 생성하도록 1×10^6 내지 1×10^{10} , 1×10^7 내지 1×10^9 , 5×10^7 내지 5×10^8 , 또는 1×10^8 내지 3×10^8 개의 총 또는 총 생존 CD8+ T 세포의 양과 혼합되거나 또는 결합된다.
- [0231] 특정 구현예에서, 투입 세포 조성물의 CD62L-/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 샘플, 예를 들어 생물학적 샘플의 CD62L-/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포의 비에 비해 조정, 변화 및/또는 변경되었다. 특정 구현예에서, CD62L-/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포의 비율은 생

물학적 샘플로부터 1-배, 1.5-배, 2-배, 2.5-배, 3-배, 4-배, 5-배, 10-배, 20-배, 50-배, 100-배 조정, 변화 및/또는 변경된 적어도 (약) 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%이다. 특정 구현예에서, 상기 샘플은 투입 세포 조성물의 세포가 유도, 단리, 선별, 및/또는 얻어지는 샘플이다.

[0232] 일부 구현예에서, 세포 투입 조성물을 생산, 생성, 및/또는 제조하는 것은, 2.2:1 내지 0.8:1의 CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포 비를 갖는 세포 투입 조성물을 생성하도록 CD4+ T 세포 조성물을 CD8+ T 세포 조성물의 세포와 혼합 또는 결합하는 하나 이상의 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, CD45RA+/CCR7+ 세포의 수, 부피당 수, 중량당 수, 및/또는 양, 레벨, 또는 백분율은 혼합 또는 결합 전에 CD4+ T 세포 조성물 및 CD8+ T 세포 조성물에서 측정, 평가, 및/또는 정량된다. 일부 구현예에서, CD45RA+/CCR7+ 세포의 양, 레벨, 수, 부피당 수, 중량당 수, 및/또는 백분율은 CD45RA+/CCR7+ T 세포를 검출함으로써 측정, 평가, 및/또는 정량된다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 2.2:1 내지 0.8:1의 CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 세포 투입 조성물은 약 1.1:1의 CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비를 갖는다.

[0233] 일부 구현예에서, 세포 투입 조성물을 생산, 생성, 및/또는 제조하는 것은, 2.4:1 내지 1:1의 CD27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포 비를 갖는 세포 투입 조성물을 생성하도록 CD4+ T 세포 조성물을 CD8+ T 세포 조성물의 세포와 혼합 또는 결합하는 하나 이상의 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, CD27+/CCR7+ 세포의 수, 부피당 수, 중량당 수, 및/또는 양, 레벨, 또는 백분율은 혼합 또는 결합 전에 CD4+ T 세포 조성물 및 CD8+ T 세포 조성물에서 측정, 평가, 및/또는 정량된다. 일부 구현예에서, CD27+/CCR7+ 세포의 양, 레벨, 수, 부피당 수, 중량당 수, 및/또는 백분율은 CD45RA+/CCR7+ T 세포를 검출함으로써 측정, 평가, 및/또는 정량된다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 2.4:1 내지 1:1의 CD27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 세포 투입 조성물은 약 1.9:1의 CD27+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD27+/CCR7+/CD8+ T 세포의 비를 갖는다.

[0234] 일부 구현예에서, 세포 투입 조성물을 생산, 생성, 및/또는 제조하는 것은, 2.2:1 내지 0.8:1의 CD62L-/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포 비를 갖는 세포 투입 조성물을 생성하도록 CD4+ T 세포 조성물을 CD8+ T 세포 조성물의 세포와 혼합 또는 결합하는 하나 이상의 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, CD62L-/CCR7+ 세포의 수, 부피당 수, 중량당 수, 및/또는 양, 레벨, 또는 백분율은 혼합 또는 결합 전에 CD4+ T 세포 조성물 및 CD8+ T 세포 조성물에서 측정, 평가, 및/또는 정량된다. 일부 구현예에서, CD62L-/CCR7+ 세포의 양, 레벨, 수, 부피당 수, 중량당 수, 및/또는 백분율은 CD62L-/CCR7+ T 세포를 검출함으로써 측정, 평가, 및/또는 정량된다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물은 2.2:1 내지 0.8:1의 CD62L-/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포의 비를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 세포 투입 조성물은 약 1.1:1의 CD62L-/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD62L-/CCR7+/CD8+ T 세포의 비를 갖는다.

[0235] **B. 활성화 및 자극**

[0236] 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법은 자극 조건하에 세포를 인큐베이션하는 것과 관련하여 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 자극 조건은 세포에서, 예를 들어 CD4+ T 세포에서의 신호를, 예를 들어 TCR 및/또는 공수용체 (coreceptor)로부터 발생된 신호를 활성화하거나 또는 자극하고/하거나 활성화하거나 또는 자극할 수 있는 조건을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 자극 조건은, 자극 시약, 예를 들어 세포에서의 신호를 활성화하거나 또는 자극하고/하거나 활성화하거나 또는 자극할 수 있는 시약과 함께 또는 시약의 존재하에 세포를 컬처링 (culturing), 배양(cultivating), 인큐베이션, 활성화, 증식하는 하나 이상의 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은 TCR 및/또는 공수용체를 자극하고/하거나 활성화한다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 본원에 제공된, 예를 들어 섹션 I-B-1에 기술된 시약이다.

[0237] 특정 구현예에서, 농축된 T 세포의 하나 이상의 조성물은, 예를 들어 본원에서 제공된 방법 또는 기법, 예를 들어 섹션 I-C에 기술된 방법 또는 기법에 의해서 상기 세포를 유전자 조작하기 전에, 예를 들어 상기 세포를 형질주입 및/또는 형질도입하기 전에 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 자극 조건하에 인큐베이션되는 농축된 T 세포의 조성물은 투입 조성물이다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물의 세포는 생물학적 샘플로부터 미리 단리, 선별, 농축, 또는 수득된다. 특정 구현예에서, 상기 투입 조성물로부터의 세포는 미리 저온 동결되고 저장되며, 인큐베이션 전에 해동된다.

[0238] 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법은 세포, 예를 들어 투입 조성물로부터의 세포를 자극하는 단계를 포함하는 하나 이상의 단계와 관련하여 사용된다. 특정 구현예에서, 상기 인큐베이션은 유전자 조작하는 것, 예를 들어 본원에서 기술된 형질도입의 구현예로부터 결과하여 유전자 조작하는 것, 예를 들어 섹션 I-C에 기술된 방법 이

전 일 수 있거나 그와 병행할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 자극은 예를 들어 조작 이전에, 예를 들어 형질 도입 이전에 상기 세포의 활성화 및/또는 증식을 결과한다.

[0239] 일부 구현예에서, 상기 공정 단계는 세포, 예를 들어 투입 세포 및/또는 상기 세포 조성물의 세포의 인큐베이션을 포함하고, 상기 인큐베이션 단계는 세포의 컬처(culture), 배양, 자극, 및/또는 증식을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 또는 세포는 자극 조건 또는 자극제하에 인큐베이션된다. 이러한 조건은 집단에서 세포의 증식, 증폭, 활성화 및/또는 생존을 유도하고, 항원 노출을 모방하고/하거나, 유전자 조작을 위해, 예를 들어 재조합 항원 수용체의 도입을 위해 세포를 프라이밍(priming)하도록 설계된 것들을 포함한다.

[0240] 특정 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물의 세포는 예를 들어 자극 시약의 존재하에서와 같은 자극 조건하에, (약) 5×10^7 개 세포/mL, 4×10^7 개의 세포/m, 3×10^7 개 세포/mL, 2×10^7 개 세포/mL, 1×10^7 개 세포/mL, 9×10^6 개 세포/mL, 8×10^6 개 세포/mL, 7×10^6 개 세포/mL, 6×10^6 개 세포/mL, 5×10^6 개 세포/mL, 4×10^6 개 세포/mL, 또는 3×10^6 개 세포/mL 미만의 밀도로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 5×10^6 개 세포/mL 미만의 밀도로 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 1×10^3 개 세포/mL 내지 1×10^9 개의 세포/m, 1×10^4 개 세포/mL 내지 1×10^8 개 세포/mL, 1×10^5 개 세포/mL 내지 1×10^7 개 세포/mL, 5×10^5 개의 세포/m 내지 1×10^7 개 세포/mL, 1×10^6 개 세포/mL 내지 5×10^6 개 세포/mL, 또는 3×10^6 개 세포/mL 내지 5×10^6 개 세포/mL의 밀도로 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 (약) 1×10^6 개 세포/mL, 1.5×10^6 개 세포/mL, 2×10^6 개 세포/mL, 2.5×10^6 개 세포/mL, 3×10^6 개 세포/mL, 3.5×10^6 개 세포/mL, 4×10^6 개 세포/mL, 4.5×10^6 개 세포/mL, 또는 5×10^6 개 세포/mL의 밀도로 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 (약) 3×10^6 개 세포/mL의 밀도로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 생존 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 아포프토틱 마커(apoptotic marker), 예를 들어 아넩신 V(Annexin V) 또는 활성 카스파제 3(active caspase 3)에 대해 음성이다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포이거나 그를 포함한다.

[0241] 특정 구현예에서, 생존의 지표는 제한되지는 않지만 세포 복제, 미토콘드리아 기능, 에너지 균형, 막 완전성 및 세포 사망률의 지표를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 생존의 지표는 추가로 산화 스트레스, 대사 활성화, 대사 안정성, 효소 유도, 효소 억제 및 세포막 수송체와의 상호 작용의 지표를 포함한다. 일부 구현예에서, 생존 가능한 세포는 정상적인 기능성 세포 과정을 겪는 세포 및/또는 괴사 또는 프로그래밍된 세포 사멸을 겪지 않거나 그렇지 않은 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 생존력은 세포의 산화 환원 전위, 세포막의 완전성, 또는 미토콘드리아의 활성 또는 기능에 의해 평가될 수 있다. 일부 구현예에서, 생존성은 세포 사멸과 관련된 특정 분자의 부재 또는 분석에서 세포 사멸의 징후의 부재이다. 특정 구현예에서, 세포의 생존력은 다수의 통상적인 수단에 의해 검출, 측정 및/또는 평가될 수 있다. 이러한 생존력 분석의 비제한적 예는 제한되지는 않지만 염료 흡수 분석 (예를 들어 칼세인 AM 분석), XTT 세포 생존율 분석 및 염료 배제 분석 (예를 들어 트립판 블루(trypan blue), 에오신(Eosin) 또는 프로피디움 염료 배제 분석(propidium dye exclusion assay))을 포함한다. 생존력 분석은 세포 용량, 세포 조성 및/또는 세포 샘플에서 생존 세포의 수 또는 백분율(예를 들어 빈도)을 결정하는데 유용하다.

[0242] 특정 구현예에서, 상기 아포프토틱 마커는 아포토시스(apoptosis)와 관련된 임의의 공지된 마커를 포함할 수 있으며, 유전자, 단백질 또는 활성 형태의 단백질의 발현, 또는 블레빙(blebbing) 및/또는 핵 분해(nuclear breakdown)와 같은 아포토시스와 관련된 특징의 외관(appearance)을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 아포프토틱 마커는, 제한되지는 않지만, 아포토시스를 개시하는 것으로 알려진 프로-아포프토틱 인자(pro-apoptotic factor), 사멸 수용체 경로(eath receptor pathway)의 멤버, 미토콘드리아 (내재적) 경로의 활성화된 멤버, Bcl-2 패밀리 멤버(Bcl-2 family member) 예를 들어 Bax, Bad, 및 Bid, Fas, FADD, 핵 수축(예를 들어 현미경으로 모니터링된)의 존재, 염색체 DNA 단편화의 존재(예를 들어 염색체 DNA 사다리의 존재), 또는 아포토시스 분석과 관련된 마커, 예를 들어 TUNEL 스테이닝(TUNEL staining), 및 아넩신 V 스테이닝(Annexin V staining)를 포함할 수 있는 아포토시스와 관련된 마커이다. 일부 구현예에서, 아포토시스의 마커는 카스파제 발현(caspase expression), 예를 들어 활성 형태의 카스파제-1, 카스파제-2, 카스파제-3, 카스파제-7, 카스파제-8, 카스파제-9, 카스파제-10 및/또는 카스파제-13이다. 특정 구현예에서, 아포프토틱 마커는 활성 카스파제-3이다.

[0243] 일부 구현예에서, (약) 1×10^5 내지 (약) $500,000 \times 10^6$ 개의 세포, (약) 1×10^6 내지 (약) $50,000 \times 10^6$ 개의 세포,

(약) 10×10^6 내지 (약) $5,000 \times 10^6$ 개의 세포, (약) 1×10^6 내지 (약) $1,000 \times 10^6$ 개의 세포, (약) 50×10^6 내지 (약) $5,000 \times 10^6$ 개의 세포, (약) 10×10^6 내지 (약) $1,000 \times 10^6$ 개의 세포, (약) 100×10^6 내지 (약) $2,500 \times 10^6$ 개의 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물의 세포는 예를 들어 자극 조건하에 가령 자극 시약의 존재하에 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 적어도 (약) 50×10^6 개의 세포, 100×10^6 개의 세포, 150×10^6 개의 세포, 200×10^6 개의 세포, 250×10^6 개의 세포, 300×10^6 개의 세포, 350×10^6 개의 세포, 400×10^6 개의 세포, 450×10^6 개의 세포, 또는 500×10^6 개의 세포는 예를 들어 자극 조건하에 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 생존가능한 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 아포토시시스의 마커, 예를 들어 아넥신 V 또는 활성 카스파제-3에 대해 음성이다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포이거나 또는 그를 포함한다.

[0244] 일부 구현예에서, (약) 1×10^5 내지 (약) $25,000 \times 10^6$, (약) 1×10^6 내지 (약) $25,000 \times 10^6$, (약) 10×10^6 내지 (약) $2,500 \times 10^6$, (약) 1×10^6 내지 (약) 500×10^6 , (약) 50×10^6 내지 (약) $2,500 \times 10^6$, (약) 10×10^6 내지 (약) 500×10^6 , (약) 50×10^6 내지 (약) 300×10^6 개의 세포, (약) 100×10^6 내지 (약) $2,500 \times 10^6$ 개의 CD4+ T 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물의 세포는 예를 들어 자극 조건하에 가령 자극 시약의 존재하에 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 적어도 (약) 25×10^6 , 50×10^6 , 75×10^6 , 100×10^6 , 125×10^6 , 150×10^6 , 175×10^6 , 200×10^6 , 225×10^6 , 또는 250×10^6 개의 CD4+ T 세포는 예를 들어 자극 조건하에 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 CD4+ T 세포는 생존가능한 CD4+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 CD4+ T 세포는 아포토시시스의 마커, 예를 들어 아넥신 V 또는 활성 카스파제-3에 대해 음성이다.

[0245] 일부 구현예에서, (약) 1×10^5 내지 (약) $25,000 \times 10^6$, (약) 1×10^6 내지 (약) $25,000 \times 10^6$, (약) 10×10^6 내지 (약) $2,500 \times 10^6$, (약) 1×10^6 내지 (약) 500×10^6 , (약) 50×10^6 내지 (약) $2,500 \times 10^6$, (약) 10×10^6 내지 (약) 500×10^6 , (약) 50×10^6 내지 (약) 300×10^6 개의 세포, (약) 100×10^6 내지 (약) $2,500 \times 10^6$ 개의 CD8+ T 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물의 세포는 예를 들어 자극 조건하에 가령 자극 시약의 존재하에 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 적어도 (약) 25×10^6 , 50×10^6 , 75×10^6 , 100×10^6 , 125×10^6 , 150×10^6 , 175×10^6 , 200×10^6 , 225×10^6 , 또는 250×10^6 개의 CD8+ T 세포는 예를 들어 자극 조건하에 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 CD8+ T 세포는 생존가능한 CD8+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 CD8+ T 세포는 아포토시시스의 마커, 예를 들어 아넥신 V 또는 활성 카스파제-3에 대해 음성이다.

[0246] 일부 구현예에서, 자극 및/또는 활성화를 위한 조건은 하나 이상의 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 제제, 예를 들어 영양물질, 아미노산, 항생제, 이온, 및/또는 자극 요소, 예를 들어 사이토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체, 및 상기 세포를 활성화하도록 설계된 임의의 다른 제제를 포함할 수 있다.

[0247] 일부 구현예에서, 상기 자극 조건 또는 자극 시약은 하나 이상의 시약, 예를 들어 리간드를 포함하며, 이것은 TCR 복합체의 세포내 신호전달 도메인을 자극하거나 또는 활성화할 수 있는 것이다. 일부 측면에서, 상기 제제, 예를 들어 1차 신호를 전달하는데, 예를 들어 ITAM-유도된 신호의 활성화를 개시하는데 적합한 제제, 예를 들어 TCR 구성성분에 특이적인 것들, 예를 들어 항-CD3, 및/또는 공동 자극 신호를 촉진하는 제제, 예를 들어 T 세포 공동 자극 수용체에 특이적인 것, 예를 들어 고체 지지체 예를 들어 비드에 결합된, 항-CD28, 또는 항-4-1BB, 및/또는 하나 이상의 사이토카인은 T 세포에서 TCR/CD3 세포내 신호전달 캐스케이드를 턴-온(turn on)하거나 개시한다. 상기 자극 시약은 항-CD3/항-CD28(예를 들어 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T 세포 증폭제, 및/또는 ExPACT® 비드)이다. 선택적으로, 증폭 방법은 추가로 배양 배지에 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체를 첨가하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 자극 제제는 사이토카인을 포함한다.

[0248] 특정 구현예에서, 상기 자극 조건은 자극 시약으로 세포를 인큐베이션, 컬처링, 및/또는 배양하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 본원에서 제공된 제제, 예를 들어 섹션 I-B-1에서 기술된 제제이다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 비드이거나 또는 그를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 자극 조건하의 인큐베이션, 컬처링, 및/또는 배양의 시작 또는 개시는 상기 세포가 상기 자극 시약과 접촉하게 되고/되거나 상기 자극 시약으로 인큐베이션될 때 일어난다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 상기 세포를 유전자 조작하기 전에, 그 도중에, 및/또는 그 후에, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입에 의해서 재조합 폴리뉴클레오티드를 상기 세

포에 도입하기 전에, 그 도중에, 및/또는 그 후에 인큐베이션된다.

- [0249] 일부 구현예에서, 농축된 T 세포의 조성물은 (약) 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.5:1, 1.25:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 0.9:1, 0.8:1, 0.75:1, 0.67:1, 0.5:1, 0.3:1, 또는 0.2:1의 자극 시약 및/또는 비드 대 세포의 비율로 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약 및/또는 비드 대 세포의 비율은 2.5:1 내지 0.2:1, 2:1 내지 0.5:1, 1.5:1 내지 0.75:1, 1.25:1 내지 0.8:1, 1.1:1 내지 0.9:1이다. 특정 구현예에서, 자극 시약 대 세포의 비율은 약 1:1이거나 1:1이다.
- [0250] 특정 구현예에서, 상기 자극 조건은 상기 세포, 예를 들어 투입 조성물로부터의 세포를 하나 이상의 사이토카인으로 및/또는 그의 존재하에 인큐베이션, 컬처링, 및/또는 배양하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 사이토카인이다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 T 세포에 의해 발현되고/되거나 그에 내인성인 수용체에 결합하고/하거나 결합할 수 있는 것이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 사이토카인의 4-알파-헬릭스 다발 패밀리의 멤버이거나 또는 그를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 4-알파-헬릭스 다발 패밀리의 멤버는 제한되지는 않지만, 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-9(IL-9), 인터루킨-12(IL-12), 인터루킨-15(IL-15), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF) 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 IL-15이거나 그것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 IL-7이거나 그것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 IL-2이거나 그것을 포함한다.
- [0251] 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인의 양 또는 농도는 국제단위(International Unit; IU)로 측정되고/되거나 정량화된다. 국제단위는 비타민, 호르몬, 사이토카인, 백신, 혈액 생성물, 및 유사한 생물학적으로 활성 물질을 정량화하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, IU는 비중 및 강도의 국제 참조 표준, 예를 들어 Human IL-2, 86/504에 대한 WHO 국제 표준(WHO 1st International Standard for Human IL-2, 86/504)과 비교하여 생물학적 체제의 효능의 측정 단위이거나 그를 포함한다. 국제단위는 국제적 공동 연구 노력으로 발간된 생물학적 활동 단위를 보고하는 유일하게 인식되고 표준화된 방법이다. 특정 구현예에서, 조성물, 샘플, 또는 사이토카인의 소스에 대한 상기 IU는 유사한 WHO 표준 제품과의 제품 비교 테스트를 통해 얻을 수 있다. 예를 들어 일부 구현예에서, 조성물, 샘플, 또는 인간 재조합 IL-2, IL-7, 또는 IL-15의 소스의 IU/mg은 각각 WHO 표준 IL-2 제품(NIBSC 코드: 86/500), WHO 표준 IL-17 제품(NIBSC 코드: 90/530) 및 WHO 표준 IL-15 제품(NIBSC 코드: 95/554)와 비교된다.
- [0252] 일부 구현예에서, IU/mg로 나타낸 생물학적 활성은 (ng/mL로 나타낸 ED₅₀)⁻¹ × 10⁶에 해당한다. 특정 구현예에서, 재조합 인간 IL-2 또는 IL-15의 ED₅₀은 CTLL-2 세포를 사용한 세포 증식(XTT 절단)의 절반-최대 자극(half-maximal stimulation)에 필요한 농도에 해당한다. 특정 구현예에서, 재조합 인간 IL-7의 ED₅₀은 PHA_활성화된 인간 말초 혈액 림프구의 증식을 위한 절반-최대 자극에 필요한 농도에 해당한다. IL-2에 대한 IU의 분석 및 계산에 관한 세부 사항은 문헌 「Wadhwa et al., Journal of Immunological Methods (2013), 379 (1-2): 1-7」; 및 「Gearing and Thorpe, Journal of Immunological Methods (1988), 114 (1-2): 3-9」에 논의되어 있으며, IL-15에 대한 IU의 분석 및 계산에 관한 세부 사항은 문헌 「Soman et al. Journal of Immunological Methods (2009) 348 (1-2): 83-94」에 논의되어 있다.
- [0253] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 세포는, (약) 1 IU/mL 내지 (약) 1,000 IU/mL, (약) 10 IU/mL 내지 (약) 50 IU/mL, (약) 50 IU/mL 내지 (약) 100 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 200 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 500 IU/mL, (약) 250 IU/mL 내지 (약) 500 IU/mL, 또는 (약) 500 IU/mL 내지 (약) 1,000 IU/mL의 농도의, 사이토카인, 예를 들어 인간 재조합 사이토카인으로 인큐베이션된다.
- [0254] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 세포는, 예를 들어 무혈청 배지 중에서, (약) 1 IU/mL 내지 (약) 500 IU/mL, (약) 10 IU/mL 내지 (약) 250 IU/mL, (약) 50 IU/mL 내지 (약) 200 IU/mL, (약) 50 IU/mL 내지 (약) 150 IU/mL, (약) 75 IU/mL 내지 (약) 125 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 200 IU/mL, 또는 (약) 10 IU/mL 내지 (약) 100 IU/mL의 농도의, IL-2, 예를 들어 인간 재조합 IL-2로 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물의 세포는, (약) 50 IU/mL, 60 IU/mL, 70 IU/mL, 80 IU/mL, 90 IU/mL, 100 IU/mL, 110 IU/mL, 120 IU/mL, 130 IU/mL, 140 IU/mL, 150 IU/mL, 160 IU/mL, 170 IU/mL, 180 IU/mL, 190 IU/mL, 또는 100 IU/mL의 농도의 재조합 IL-2로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물의 세포는, (약) 100 IU/mL의 IL-2, 예를 들어 인간 재조합 IL-2의 존재하에서 인큐베이션된다.

- [0255] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 세포는, 예를 들어 무혈청 배지 중에서, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 2,000 IU/mL, (약) 500 IU/mL 내지 (약) 1,000 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 500 IU/mL, (약) 500 IU/mL 내지 (약) 750 IU/mL, (약) 750 IU/mL 내지 (약) 1,000 IU/mL, 또는 (약) 550 IU/mL 내지 (약) 650 IU/mL의 농도의 재조합 IL-7, 예를 들어 인간 재조합 IL-7로 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 세포는, (약) 50 IU/mL, 100 IU/mL, 150 IU/mL, 200 IU/mL, 250 IU/mL, 300 IU/mL, 350 IU/mL, 400 IU/mL, 450 IU/mL, 500 IU/mL, 550 IU/mL, 600 IU/mL, 650 IU/mL, 700 IU/mL, 750 IU/mL, 800 IU/mL, 750 IU/mL, 또는 1,000 IU/mL의 농도의 IL-7로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 세포는, (약) 600 IU/mL의 IL-7, 예를 들어 인간 재조합 IL-7의 존재하에서 인큐베이션된다.
- [0256] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 세포는, 예를 들어 무혈청 배지 중에서, (약) 1 IU/mL 내지 (약) 500 IU/mL, (약) 10 IU/mL 내지 (약) 250 IU/mL, (약) 50 IU/mL 내지 (약) 200 IU/mL, (약) 50 IU/mL 내지 (약) 150 IU/mL, (약) 75 IU/mL 내지 (약) 125 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 200 IU/mL, 또는 (약) 10 IU/mL 내지 (약) 100 IU/mL의 농도의 재조합 IL-15, 예를 들어 인간 재조합 IL-15로 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물의 세포는, (약) 50 IU/mL, 60 IU/mL, 70 IU/mL, 80 IU/mL, 90 IU/mL, 100 IU/mL, 110 IU/mL, 120 IU/mL, 130 IU/mL, 140 IU/mL, 150 IU/mL, 160 IU/mL, 170 IU/mL, 180 IU/mL, 190 IU/mL, 또는 200 IU/mL의 농도의 재조합 IL-15로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 세포는, (약) 100 IU/mL의 IL-15, 예를 들어 인간 재조합 IL-15의 존재하에서 인큐베이션된다.
- [0257] 특정 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물로부터의 세포는, 예를 들어 무혈청 배지 중에서 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 존재하에서 자극 조건하에 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15는 재조합이다. 특정 구현예에서, 상기 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15는 인간이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15이거나 또는 그를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 예를 들어 무혈청 배지 중에서 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 존재하에서 자극 조건하에 인큐베이션된다.
- [0258] 상기 조건은 하나 이상의 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 제제, 예를 들어 영양물질, 아미노산, 항생제, 이온, 및/또는 자극 요소, 예를 들어 사이토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체, 및 상기 세포를 활성화하도록 설계된 임의의 다른 제제를 포함할 수 있다.
- [0259] 몇몇 측면에서, 인큐베이션은 Riddell 등의 미국특허 제6,040,177호, 문헌 「Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651-660」, 「Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651-660」, 「Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82」 및/또는 「Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701」에 설명된 기술에 따라 수행된다.
- [0260] 일부 구현예에서, 상기 인큐베이션은 무혈청 배지 중에서 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 정의된 및/또는 잘 정의된 세포 배양 배지이다. 특정 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 처리된, 예를 들어 억제제 및/또는 성장 인자(growth factor)를 제거하도록 여과된 제어된 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 단백질을 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 혈청 알부민, 가수 분해물, 성장 인자, 호르몬, 담체 단백질 및/또는 부착 인자를 함유할 수 있다.
- [0261] 일부 구현예에서, 하나 이상의 자극 조건 또는 자극 시약의 존재하에 상기 인큐베이션의 적어도 일부는 예를 들어 국제공개공보 제W02016/073602호에 기술된 바와 같이 원심 챔버의 내부 공동에서, 예를 들어 원심 회전하에 수행된다. 일부 구현예에서, 원심 챔버에서 수행된 상기 인큐베이션의 적어도 일부는 자극 및/또는 활성화를 유도하는 시약(들)과 혼합하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 선별된 세포는 상기 원심 챔버 중에서 자극 조건 또는 자극제와 혼합된다. 이러한 공정의 일부 측면에서, 일정 부피의 세포는, 세포 배양 판 또는 다른 시스템에서 유사한 자극을 수행할 때 정상적으로 사용되는 것 보다 훨씬 적은 양의 하나 이상의 자극 조건 또는 제제와 혼합된다.
- [0262] 일부 구현예에서, 상기 자극제는, 선별이 원심 챔버에서, 예를 들어 주기적으로 셰이킹(shaking)하거나 회전하는 튜브 또는 백에서 동일한 수의 세포 또는 동일한 부피의 세포의 선별의 동일하거나 유사한 선별 효율을 달성하기 위해 전형적으로 사용되거나 필요한 자극제의 양과 비교하여 실질적으로 적은 양(예를 들어 상기 양의 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80% 이하)으로 챔버의 공동(chamber)의 세포에 첨가된다. 일부 구현예에서, 상기 인큐베이션은, 예를 들어 10 mL 내지 200 mL, 예를 들어 적어도 또는 적어도 약 또는 (약) 10 mL,

20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL, 100 mL, 150 mL 또는 200 mL의 상기 시약의 인큐베이션으로 표적 부피를 달성하기 위해 상기 세포 및 자극제에 인큐베이션 완충액(incubation buffer)을 첨가하여 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 인큐베이션 완충액 및 자극제는 상기 세포에 분리하여 첨가된다. 일부 구현예에서, 상기 자극 인큐베이션은 주기적인 온화한 혼합 조건으로 수행되고, 이것은 에너지적으로 바람직한 상호작용을 촉진하는데 도움을 줄 수 있으며 그에 의해서 세포의 자극 및 활성화를 성취하면서 보다 적은 총괄 자극제의 사용을 허용한다.

[0263] 일부 구현예에서, 상기 인큐베이션은, 예를 들어 스피닝(spinning)의 존재하에서, 일반적으로는 비교적 적은 힘 또는 속도에서, 예를 들어 세포를 펠릿화하는 데 사용되는 속도보다 낮은 속도에서, 예를 들어 (약) 600 rpm 내지 (약) 1700 rpm (예를 들어 (약) 또는 적어도 600 rpm, 1000 rpm, 또는 1500 rpm 또는 1700 rpm), 예를 들어 약 80g 내지 100g(예를 들어 (약) 또는 적어도 80g, 85g, 90g, 95g, 또는 100g)의 챔버 또는 다른 용기의 샘플 또는 벽의 RCF에서, 혼합 조건하에 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 스피닝은 그러한 저속에서 스피닝의 반복된 간격을 이용하여 수행된 후, 휴지 기간(rest period)을 가지며, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10초의 스피닝 및/또는 휴지, 예를 들어 대략 1초 또는 2초의 스피닝에 대략 5, 6, 7, 또는 8초의 휴지기를 갖는다.

[0264] 일부 구현예에서, 자극 조건하에, 예를 들어 상기 자극 시약을 사용한 인큐베이션의 전체 기간은 (약) 1시간 내지 96시간, 1시간 내지 72시간, 1시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 8시간 내지 30시간, 12시간 내지 24시간, 18시간 내지 30시간, 예를 들어 적어도 또는 적어도 약 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간 또는 72시간이다. 일부 구현예에서, 예를 들어 상기 자극 시약을 사용한 인큐베이션의 전체 기간은 (약) 18시간 내지 약 30시간이다.

[0265] 일부 구현예에서, 상기 세포는 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를, 예를 들어 섹션 I-C에 기술된 것과 같은 형질도입 및/또는 형질주입에 의해서 상기 세포에 도입하는 단계 이전에 및/또는 도중에 자극 조건하에 컬처링(culturing)되고, 배양되고/되거나 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 유전자 조작 이전에 자극 조건하에 30분 내지 2시간, 1 hour and 8시간, 6시간 내지 12시간, 12시간 내지 18시간, 16시간 내지 24시간, 18시간 내지 30시간, 24시간 내지 48시간, 24시간 내지 72시간, 42시간 내지 54시간, 60시간 내지 120시간, 96시간 내지 120시간, 90시간 내지 1일 및 7일, 3일 내지 8, 1일 내지 3일, 4일 내지 6일, 또는 4일 내지 5일의 시간동안 컬처링, 배양, 및/또는 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 자극 조건하에서 (약) 18시간 내지 30시간동안 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 (약) 24 시간동안 자극 조건하에 인큐베이션된다.

[0266] 일부 구현예에서, 자극 조건하에 상기 세포를 인큐베이션하는 것은 상기 세포를 섹션 I-B-1에 기술된 자극 시약으로 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은 비드, 예를 들어 상차성 비드를 함유하거나 포함하며, 상기 세포는 3:1(비드:세포) 미만의 비, 예를 들어 1:1의 비의 상기 자극 시약으로 인큐베이션한다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 하나 이상의 사이토카인의 존재하에서 상기 자극 시약으로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 재조합 IL-2, IL-7, 및 IL-15의 존재하에서 1:1(비드:세포)의 비의 상기 자극 시약으로 인큐베이션된다.

[0267] 특정 구현예에서, CD4+ 및 CD8+ T 세포를 함유하는 세포의 투입 조성물은 자극 조건하에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 무혈청 배지 주중에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, (약) 1:1의 비로 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 적어도 (약) 100×10^6 개의 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물로부터의 세포는 예를 들어 (약) 5×10^6 개 세포/mL 미만의 밀도에서 자극 조건하에 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 적어도 (약) 50×10^6 개의 50×10^6 CD4+ T 세포 및 적어도 (약) 50×10^6 개의 CD8+ T 세포가 자극 조건하에 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 18시간 내지 30시간동안 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 자극 조건하에서 상기 세포를 인큐베이션하는 것은 상기 세포를 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 존재하에서 자극 시약으로 인큐베이션하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 3:1 미만의 자극 시약 대 세포의 비로 자극 시약을 사용하여 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 (약) 50 IU/mL 내지 (약) 200 IU/mL IL-2, (약) 400 내지 (약) 1,000 IU/mL IL-7, 및/또는 (약) 50 IU/mL 내지 (약) 200 IU/mL IL-15로 인큐베이션된다.

[0268] 특정 구현예에서, (약) 1:1의 비의 CD+ 및 CD8+ T를 함유하는 투입 조성물의 100×10^6 내지 500×10^6 개의 세포가 자극 조건하에 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 생존 세포이고/이거나 아포토픽 마커에 대해

음성이다. 일부 구현예에서, 상기 투입 조성물의 (약) 300×10^6 개의 세포가 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 무혈청 배지 중에서 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 (약) 3×10^6 개 세포/mL의 밀도에서 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, (약) 150×10^6 개의 CD4+ T 세포 및 (약) 150×10^6 개의 CD8+ T 세포가 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 (약) 1:1의 자극 시약 대 세포의 비로 자극 시약을 사용하여 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 (약) 100 IU/mL IL-2, (약) 600 IU/mL IL-7, 및 50 IU/mL 및/또는 (약) 200 IU/mL IL-15의 존재하에서 인큐베이션된다.

[0269] 1. 자극 시약

[0270] 일부 구현예에서, 자극 조건하에 농축된 세포의 조성물을 인큐베이션하는 것은 상기 농축된 세포의 조성물을 T 세포를 활성화시키고/시키거나 증폭시킬 수 있는 자극 시약으로 인큐베이션하고/하거나 그와 접촉시키는 것이거나 또는 그를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은 상기 세포에서 하나 이상의 신호를 자극하고/하거나 활성화시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 신호는 수용체에 의해서 매개된다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 신호는 수용체에 의해서 매개된다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 신호는 신호 전달(signal transduction)의 변화 및/또는 2차 메신저, 예를 들어 cAMP 및/또는 세포내 칼슘의 수준 또는 양, 상기 양의 변화, 세포 국소화(cellular localization), 확인(confirmation), 인산화, 유비퀴틴화(ubiquitination), 및/또는 하나 이상의 세포 단백질의 절단(truncation), 및/또는 세포 활성의 변화, 예를 들어 전사, 번역, 단백질 분해, 세포 형태, 활성화 상태 및/또는 세포 분열이거나 또는 그들과 관련된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 조건은 자극 시약으로 상기 세포를 인큐베이션, 킬러링, 및/또는 배양하는 것을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 비드를 함유하거나 또는 그를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 자극의 개시는 상기 세포가 자극 시약으로 인큐베이션되거나 또는 접촉될 때 일어난다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 올리고머 시약, 예를 들어 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 올리고머를 함유하거나 또는 그를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 TCR 복합체의 하나 이상의 성분들의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시키고/시키거나 활성화시킬 수 있다.

[0271] 일부 구현예에서, 자극 조건 또는 자극 시약은 하나 이상의 제제, 예를 들어 TCR 복합체의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 리간드를 포함한다. 비드는 1종 이상의 제제, 이를테면 비드 표면에 커플링, 컨주게이트 또는 연결(직간접적으로)된 제제를 함유한다. 일부 구현예에서, 본원에서 상정된 제제는 RNA, DNA, 단백질(예를 들어 효소), 항원, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 항체 단편, 탄수화물, 지질 랙틴, 또는 원하는 표적에 대해 친화성을 갖는 기타 바이오분자를 포함할 수 있으며 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 원하는 표적은 T 세포 수용체 및/또는 T 세포 수용체의 성분이다. 특정 구현예에서, 원하는 표적은 CD3이다. 특정 구현예에서, 원하는 표적은 T 세포 공동 자극분자, 예를 들어 CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, 또는 ICOS이다. 1종 이상의 제제는 공지의 또는 기술분야에서 입수가능한 다양한 방법에 의해 비드에 직간접적으로 부착될 수 있다. 이러한 부착은 공유, 비공유, 정전기 또는 소수성 부착일 수 있고 예를 들어 화학적 수단, 기계적 수단 또는 효소적 수단을 비롯한 다양한 부착 수단에 의해 달성가능하다. 일부 구현예에서, 상기 제제는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 예를 들어 Fab이다. 일부 구현예에서, 바이오분자(예를 들어 바이오티닐화된 항-CD3 항체)는 비드에 직접 부착된 또 다른 바이오분자(예를 들어 항-비오틴 항체)를 통해 간접적으로 부착될 수도 있다.

[0272] 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은 세포(예를 들어 T 세포) 상의 하나 이상의 하기 거대분자에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 제제(예를 들어 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 예를 들어 Fab)를 함유한다: CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-1), CD127, MHC I, MHC II, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-감마R, TNF-알파R, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a (LFA-1), CD62L(L-selectin), CD29/CD49d (VLA-4), 노치 리간드(Notch ligand)(예를 들어 델타-유사 1/4, Jagged 1/2, 등), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, 및 CXCR3 또는 그들의 단편(이들 거대분자 또는 그들의 단편에 대응하는 리간드를 포함함). 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은 세포(예를 들어 T 세포) 상의 하나 이상의 하기 거대분자에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 제제(예를 들어 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 예를 들어 Fab)를 함유한다: CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA, 및/또는 CD45RO. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 제제는 비드(예를 들어 상자성 비드)에 부착된 것이거나 또는 부착될 수 있는 것이다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 제제는 올리고머성 시약, 예를 들어 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 올리고머(streptavidin mutein oligomer)에 부착(예를

들어 가역적으로 부착)된 것이거나 또는 부착될 수 있는 것이다.

- [0273] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 제제는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 예를 들어 Fab를 포함한다. 항체로는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체(면역글로불린 Fc 영역을 갖는 전장 항체를 포함한다), 폴리에피토프 특이성을 갖는 항체 조성물, 다중 특이적 항체(예를 들어 이중특이 항체, 다이아바디 및 단쇄 분자, 및 항체 단편(예를 들어 Fab, F(ab')₂, 및 Fv)을 들 수 있다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 항체 단편(항원-결합 단편을 포함), 예를 들어 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 또는 (Fab')₂ 단편이다. IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역을 비롯한 본원에 상정된 항체용으로 임의의 이소타입의 불변 영역이 이용될 수 있고 이러한 불변 영역은 인간 또는 동물 종(예를 들어 쥐 종)으로부터 수득가능한 것으로 이해될 수 있을 것이다. 일부 구현예에서, 제제는 T 세포 수용체의 하나 이상의 성분에 결합 및/또는 이를 인식하는 항체이거나 상기 항체를 포함한다. 특정 구현예에서, 제제는 항-CD3 항체이거나 상기 항체를 포함한다. 특정 구현예에서, 제제는 공-수용체에 결합 및/또는 이를 인식하는 항체이다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 항-CD28 항체이거나 상기 항체를 포함한다.
- [0274] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 집단의 세포는 (약) 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.5:1, 1.25:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 0.9:1, 0.8:1, 0.75:1, 0.67:1, 0.5:1, 0.3:1, 또는 0.2:1의 자극 시약 대 세포의 비율의 존재하에서 자극된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약 대 세포의 비율은 2.5:1 내지 0.2:1, 2:1 내지 0.5:1, 1.5:1 내지 0.75:1, 1.25:1 내지 0.8:1, 1.1:1 내지 0.9:1이다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약 대 세포의 비율은 약 1:1 또는 1:1이다.
- [0275] 일부 구현예에서, 상기 세포는 10⁶개의 세포당 상기 자극 시약의 적어도 (약) 0.01 μg, 0.02 μg, 0.03 μg, 0.04 μg, 0.05 μg, 0.1 μg, 0.2 μg, 0.3 μg, 0.4 μg, 0.5 μg, 0.75 μg, 1 μg, 2 μg, 3 μg, 4 μg, 5 μg, 6 μg, 7 μg, 8 μg, 9 μg, 또는 10 μg의 존재하에 자극된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 10⁶개의 세포당 (약) 4 μg의 존재하에 자극된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 10⁶개의 세포당 (약) 0.8 μg의 존재하에 자극된다.
- [0276] a. 비드 시약
- [0277] 특정 구현예에서, 자극 시약은 세포, 예를 들어 T 세포를 활성화 및/또는 증폭시킬 수 있는, 하나 이상의 제제, 예를 들어 바이오분자에 콘주게이트되거나 또는 연결되는 입자, 예를 들어 비드를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 제제는 비드에 결합된다. 일부 구현예에서, 상기 비드는 바이오 적합성(biocompatible)이며, 즉 생물학적 사용에 적합하다. 일부 구현예에서, 상기 비드는 배양된 세포, 예를 들어 배양된 T 세포에 대해 무독성이다. 일부 구현예에서, 상기 비드는 상기 제제와 세포 사이의 상호작용을 허용하는 방식으로 제제를 부착시킬 수 있는 임의의 입자일 수 있다.
- [0278] 일부 구현예에서, 자극 시약은 비드, 예를 들어 비드 표면에 결합 또는 달리 부착된 세포, 예를 들어 T 세포를 활성화 및/또는 증폭시킬 수 있는 1종 이상의 제제를 함유한다. 특정 구현예에서, 비드는 비-세포 입자이다. 특정 구현예에서, 비드는 콜로이드 입자, 마이크로스피어, 나노입자, 자성 비드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서 비드는 아가로스 비드이다. 특정 구현예에서, 비드는 세파로스 비드이다.
- [0279] 특정 구현예에서, 자극 시약은 단분산성(monodisperse)인 비드를 함유한다. 특정 구현예에서, 단분산성 비드는 상호 간 직경 표준 편차가 5% 미만인 크기 단분산을 포함한다.
- [0280] 일부 구현예에서, 비드는 1종 이상의 제제, 이를테면 비드 표면에 커플링, 컨주게이트 또는 연결(직간접적으로)된 제제를 함유한다. 일부 구현예에서, 본원에서 상정된 제제는 RNA, DNA, 단백질(예를 들어 효소), 항원, 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체, 항체 단편, 탄수화물, 지질 렉틴, 또는 원하는 표적에 대해 친화성을 갖는 기타 바이오분자를 포함할 수 있으며 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 원하는 표적은 T 세포 수용체 및/또는 T 세포 수용체의 성분이다. 특정 구현예에서, 원하는 표적은 CD3이다. 특정 구현예에서, 원하는 표적은 T 세포 공동 자극 분자, 예를 들어 CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, 또는 ICOS이다. 1종 이상의 제제는 공지의 또는 기술분야에서 입수가능한 다양한 방법에 의해 비드에 직간접적으로 부착될 수 있다. 이러한 부착은 공유, 비공유, 정전기 또는 소수성 부착일 수 있고 예를 들어 화학적 수단, 기계적 수단 또는 효소적 수단을 비롯한 다양한 부착 수단에 의해 달성가능하다. 일부 구현예에서, 바이오분자(예를 들어 바이오티닐화된 항-CD3 항체)는 비드에 직접 부착된 또 다른 바이오분자(예를 들어 항-비오틴 항체)를 통해 간접적으로 부착될 수도 있다.
- [0281] 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은 비드 및, 세포의 표면상의 거대분자와 직접 상호작용하는 하나 이상의 제제를 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 비드(예를 들어 상자성 비드)는 상기 세포 상의 하나 이상의 거대분자(예

를 들어 하나 이상의 세포 표면 단백질)에 특이적인 하나 이상의 제제(예를 들어 항체)를 통해서 세포와 상호작용한다. 특정 구현예에서, 상기 비드(예를 들어 상자성 비드)는 본원에서 기술된 제 1 제제, 예를 들어 1차 항체(예를 들어 항-바이오틴 항체) 또는 다른 바이오분자로 라벨되고, 이어서 제 2 제제, 예를 들어 2차 항체(예를 들어 바이오티닐화된 항-CD3 항체) 또는 다른 제 2 바이오분자(예를 들어 스트렙타비딘)가 부가되고, 그에 의해서 상기 2차 항체 또는 다른 제 2 바이오분자는 상기 1차 항체 또는 입자 상의 다른 바이오분자에 특이적으로 결합한다.

[0282] 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은 비드(예를 들어 상자성 비드)에 부착되고 세포(예를 들어 T 세포) 상의 하나 이상의 하기 거대분자에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 제제(예를 들어 항체)를 함유한다: CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-1), CD127, MHC I, MHC II, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-감마R, TNF-알파R, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a(LFA-1, $\alpha_L\beta_2$), CD62L(L-selectin), CD29/CD49d (VLA-4), 노치 리간드(Notch ligand)(예를 들어 델타-유사 1/4, Jagged 1/2, 등), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, 및 CXCR3 또는 그들의 단편(이들 거대분자 또는 그들의 단편에 대응하는 리간드를 포함함). 일부 구현예에서, 상기 비드에 부착된 제제(예를 들어 항체)는 세포(예를 들어 T 세포) 상의 하나 이상의 하기 거대분자에 특이적으로 결합한다: CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA, 및/또는 CD45RO.

[0283] 일부 구현예에서, 비드에 부착된 하나 이상의 제제는 항체이다. 상기 항체는 폴리클론성 항체, 모노클론성 항체(면역 글로불린 Fc 영역을 갖는 전장 항체를 포함함), 폴리에피토프 특이성(polyepitopic specificity)을 갖는 항체 조성물, 다중 특이적(multispecific) 항체(예를 들어 이중 특이적 항체, 디아버디(diabody), 및 단쇄 분자 뿐만 아니라 항체 단편(예를 들어 Fab, F(ab')₂, 및 Fv)를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 자극 시약(stimulatory reagent)은 항체 단편(항체-결합 단편을 포함함), 예를 들어 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 또는 (Fab')₂이다. IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE 불변 영역을 포함하여 임의의 이소 타입의 불변 영역이 본원에서 고려되는 항체에 사용될 수 있으며, 상기 불변 영역은 임의의 인간 또는 동물종(예를 들어 쥐과 종)으로부터 얻어질 수 있다는 것으로 이해될 것이다. 일부 구현예에서, 상기 제제는 T 세포 수용체의 하나 이상의 성분들에 결합하거나 그 성분들을 인식하는 항체이다. 특정 구현예에서, 상기 제제는 항-CD3 항체이다. 특정 구현예에서, 상기 제제는 공-수용체에 결합하거나 또는 그것을 인식하는 항체이다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 항-CD28 시약을 포함한다. 일부 구현예에서, 비드는 (약) 0.001 μm 초과, (약) 0.01 μm 초과, (약) 0.1 μm 초과, (약) 1.0 μm 초과, (약) 10 μm 초과, (약) 50 μm 초과, (약) 100 μm 또는 (약) 1000 μm 및 (약) 1500 μm 초과의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, 비드는 (약) 1.0 μm 내지 (약) 500 μm , (약) 1.0 μm 내지 (약) 150 μm , (약) 1.0 μm 내지 (약) 30 μm , (약) 1.0 μm 내지 (약) 10 μm , (약) 1.0 μm 내지 (약) 5.0 μm , (약) 2.0 μm 내지 (약) 5.0 μm , 또는 (약) 3.0 μm 내지 (약) 5.0 μm 의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, 비드는 (약) 3 μm 내지 (약) 5 μm 의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, 비드는 적어도 또는 적어도 약 또는 약 0.001 μm , 0.01 μm , 0.1 μm , 0.5 μm , 1.0 μm , 1.5 μm , 2.0 μm , 2.5 μm , 3.0 μm , 3.5 μm , 4.0 μm , 4.5 μm , 5.0 μm , 5.5 μm , 6.0 μm , 6.5 μm , 7.0 μm , 7.5 μm , 8.0 μm , 8.5 μm , 9.0 μm , 9.5 μm , 10 μm , 12 μm , 14 μm , 16 μm , 18 μm 또는 20 μm 의 직경을 갖는다. 특정 구현예에서, 비드는 (약) 4.5 μm 의 직경을 갖는다. 특정 구현예에서, 비드는 (약) 2.8 μm 의 직경을 갖는다.

[0284] 일부 구현예에서, 비드는 0.001 g/cm³ 초과, 0.01 g/cm³ 초과, (약) 0.05 g/cm³ 초과, (약) 0.1 g/cm³ 초과, (약) 0.5 g/cm³ 초과, (약) 0.6 g/cm³ 초과, (약) 0.7 g/cm³ 초과, (약) 0.8 g/cm³ 초과, (약) 0.9 g/cm³ 초과, (약) 1 g/cm³ 초과, (약) 1.1 g/cm³ 초과, (약) 1.2 g/cm³ 초과, (약) 1.3 g/cm³ 초과, (약) 1.4 g/cm³ 초과, (약) 1.5 g/cm³ 초과, (약) 2 g/cm³ 초과, (약) 3 g/cm³ 초과, (약) 4 g/cm³ 초과 또는 (약) 5g/cm³ 초과의 밀도를 갖는다. 일부 구현예에서, 비드는 (약) 0.001 g/cm³ 내지 (약) 100 g/cm³, (약) 0.01 g/cm³ 내지 (약) 50 g/cm³, (약) 0.1 g/cm³ 내지 (약) 10 g/cm³, (약) 0.1 g/cm³ 내지 (약) 5 g/cm³, (약) 0.5 g/cm³ 내지 (약) 1 g/cm³, (약) 0.5 g/cm³ 내지 (약) 1.5 g/cm³, (약) 1 g/cm³ 내지 (약) 1.5 g/cm³, (약) 1 g/cm³ 내지 (약) 2 g/cm³, 또는 (약) 1 g/cm³ 내지 (약) 5 g/cm³의 밀도를 갖는다. 일부 구현예에서, 비드는 (약) 0.5 g/cm³, (약) 0.5 g/cm³, (약) 0.6 g/cm³, (약) 0.7 g/cm³, (약) 0.8 g/cm³, (약) 0.9 g/cm³, (약) 1.0 g/cm³, (약) 1.1 g/cm³, (약) 1.2 g/cm³, (약) 1.3 g/cm³, (약) 1.4 g/cm³, (약) 1.5 g/cm³, (약) 1.6 g/cm³, (약) 1.7 g/cm³,

(약) 1.8 g/cm^3 , (약) 1.9 g/cm^3 , 또는 (약) 2.0 g/cm^3 의 밀도를 갖는다. 특정 구현예에서, 비드는 (약) 1.6 g/cm^3 의 밀도를 갖는다. 특수한 구현예에서, 비드는 (약) 1.5 g/cm^3 의 밀도를 갖는다. 특정 구현예에서, 비드는 (약) 1.3 g/cm^3 의 밀도를 갖는다.

[0285] 특정 구현예에서, 복수의 비드는 균일한 밀도를 갖는다. 특정 구현예에서, 균일한 밀도는 10% 미만, 5% 미만 또는 1% 미만의 평균 비드 밀도의 밀도 표준 편차를 포함한다.

[0286] 일부 구현예에서, 비드는 각각의 입자 1g 당 (약) $0.001 \text{ m}^2/\text{g}$ 내지 (약) $1,000 \text{ m}^2/\text{g}$, (약) $0.010 \text{ m}^2/\text{g}$ 내지 (약) $100 \text{ m}^2/\text{g}$, (약) $0.1 \text{ m}^2/\text{g}$ 내지 (약) $10 \text{ m}^2/\text{g}$, (약) $0.1 \text{ m}^2/\text{g}$ 내지 (약) $1 \text{ m}^2/\text{g}$, (약) $1 \text{ m}^2/\text{g}$ 내지 (약) $10 \text{ m}^2/\text{g}$, (약) $10 \text{ m}^2/\text{g}$ 내지 (약) $100 \text{ m}^2/\text{g}$, (약) $0.5 \text{ m}^2/\text{g}$ 내지 (약) $20 \text{ m}^2/\text{g}$, (약) $0.5 \text{ m}^2/\text{g}$ 내지 (약) $5 \text{ m}^2/\text{g}$, 또는 (약) $1 \text{ m}^2/\text{g}$ 내지 (약) $4 \text{ m}^2/\text{g}$ 의 표면적을 갖는다. 일부 구현예에서, 입자 또는 비드는 (약) $1 \text{ m}^2/\text{g}$ 내지 (약) $4 \text{ m}^2/\text{g}$ 의 표면적을 갖는다.

[0287] 일부 구현예에서, 비드는 제제에 커플링, 연결 또는 컨주게이트될 수 있는 비드 표면이나 그 근방에 적어도 1종의 재료를 함유한다. 일부 구현예에서, 비드는 표면 관능화되며, 즉 결합 분자 예를 들어 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 공유결합을 형성할 수 있는 관능기를 포함한다. 특정 구현예에서, 비드는 표면-에폭시화된 카르복실, 아미노, 하이드록실, 토실, 에폭시, 및/또는 클로로메틸기를 포함한다. 특정 구현예에서, 비드는 표면 노출된 아가로스 및/또는 세파로스를 포함한다. 특정 구현예에서, 비드 표면은 결합 분자에 결합 또는 부착 가능한 부착된 자극 시약을 포함한다. 특정 구현예에서, 바이오분자는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 비드는 표면 노출된 단백질 A, 단백질 G, 또는 비오틴을 포함한다.

[0288] 일부 구현예에서, 비드는 자기장과 반응한다. 일부 구현예에서, 비드는 자성 비드이다. 일부 구현예에서, 자성 비드는 상자성이다. 특정 구현예에서, 자성 비드는 초상자성이다. 특정 구현예에서, 비드는 자기장에 노출되지 않는 한 자기 특성을 나타내지 않는다.

[0289] 특정 구현예에서, 비드는 자성 코어, 상자성 코어 또는 초상자성 코어를 포함한다. 일부 구현예에서, 자성 코어는 금속을 함유한다. 일부 구현예에서, 금속은 철, 니켈, 구리, 코발트, 가돌리늄, 망간, 탄탈륨, 아연, 지르코늄 또는 이들의 임의의 조합일 수 있지만, 이에 제한되지는 않는다. 특정 구현예에서, 자성 코어는 금속 산화물 (예를 들어 산화철), 페라이트(예를 들어 망간 페라이트, 코발트 페라이트, 니켈 페라이트 등), 적철광 및 금속 합금(예를 들어 CoTaZn)을 포함한다. 일부 구현예에서, 자성 코어는 페라이트, 금속, 금속 합금, 산화철 또는 이산화크롬 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 자성 코어는 원소 철 또는 이의 화합물을 포함한다. 일부 구현예에서, 자성 코어는 마그네타이트(Fe_3O_4), 마그헤마이트($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$) 또는 그리그나이트(Fe_3S_4) 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 내부 코어는 산화철(예를 들어 Fe_3O_4)을 포함한다.

[0290] 특정 구현예에서, 비드는 표면 관능화된 코트 또는 코팅에 의해 덮인 자기, 상자성 및/또는 초상자성 코어를 포함한다. 일부 구현예에서, 코트는 비제한적인 예로서 폴리머, 다당류, 실리카, 지방산, 단백질, 탄소, 아가로스, 세파로스 또는 이들의 조합을 포함하는 물질을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리머는 폴리에틸렌 글리콜, 폴리(락트-코-글리콜산), 폴리글루타르알데히드, 폴리우레탄, 폴리스티렌 또는 폴리비닐 알콜일 수 있다. 특정 구현예에서, 외부 코트 또는 코팅은 폴리스티렌을 포함한다. 특정 구현예에서, 외부 코팅은 표면 관능화된다.

[0291] 일부 구현예에서, 자극 시약은 금속 산화물 코어(예를 들어 산화철 코어) 및 코트를 함유하는 비드를 포함하고, 여기서 금속 산화물 코어는 적어도 하나의 다당류(예를 들어 텍스트란)를 포함하고, 여기서 코트는 적어도 하나의 다당류(예를 들어 아미노 텍스트란), 적어도 하나의 폴리머(예를 들어 폴리우레탄) 및 실리카를 포함한다. 일부 구현예에서 금속 산화물 코어는 콜로이드성 산화철 코어이다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 제제는 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 제제는 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 항-CD3 항체, 항-CD28 항체 및 항-비오틴 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 자극 시약은 항-비오틴 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 비드의 직경은 약 $3 \mu\text{m}$ 내지 약 $10 \mu\text{m}$ 이다. 일부 구현예에서, 비드의 직경은 약 $3 \mu\text{m}$ 내지 약 $5 \mu\text{m}$ 이다. 특정 구현예에서, 비드는 약 $35 \mu\text{m}$ 의 직경을 갖는다.

[0292] 일부 구현예에서, 자극 시약은 금속 산화물 코어(예를 들어 산화철 내부 코어) 및 코트(예를 들어 보호 코트)를

포함하는 비드에 부착된 하나 이상의 제제를 포함하고, 여기서 코트는 폴리스티렌이다. 특정 구현예에서, 비드는 예를 들어 마그네타이트(Fe_3O_4) 및/또는 마그헤마이트(γFe_2O_3) c 및 폴리스티렌 코트 또는 코팅을 포함하는 코어와 같은 상자성(예를 들어 초상자성) 철 코어를 포함하는, 단분산성, 상자성(예를 들어 초상자성) 비드이다. 일부 구현예에서, 비드는 비다공성(non-porous)이다. 일부 구현예에서, 비드는 하나 이상의 제제가 부착된 관능화된 표면을 함유한다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 제제는 표면에서 비드에 공유 결합된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 제제는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 제제는 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 제제는 항-CD3 항체 및/또는 항-CD28 항체, 및 표지된 항체(예를 들어 바이오틴화된 항체), 예를 들어 표지된 항-CD3 또는 항-CD28 항체에 결합할 수 있는 그의 항체 또는 항원 단편을 포함한다. 특정 구현예에서, 비드의 밀도는 약 $1.5g/cm^3$ 이고 표면적은 약 $1m^2/g$ 내지 약 $4m^2/g$ 이다. 특정 구현예에서, 비드는 직경이 약 $4.5\mu m$ 이고 밀도가 약 $15g/cm^3$ 인 단분산성 초상자성 비드이다. 일부 구현예에서, 비드는 평균 직경이 약 $2.8\mu m$ 이고 밀도가 약 $1.3g/cm^3$ 인 단분산성 초상자성 비드이다.

[0293] 일부 구현예에서, 농축된 T 세포의 조성물은 (약) 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.5:1, 1.25:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 0.9:1, 0.8:1, 0.75:1, 0.67:1, 0.5:1, 0.3:1, 또는 0.2:1의 비대 대 세포의 비율로 자극 시약과 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 비드 대 세포의 비율은 2.5:1 내지 0.2:1, 2:1 내지 0.5:1, 1.5:1 내지 0.75:1, 1.25:1 내지 0.8:1, 1.1:1 내지 0.9:1이다. 특정 구현예에서, 상기 비드 대 세포의 비율은 약 1:1 또는 1:1이다.

[0294] **b. 올리고머 시약**

[0295] 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 올리고머 시약, 예를 들어 스트렙타비딘 돌연변이 단백질을 함유하고, 그것은 하나 이상의 제제, 예를 들어 TCR 복합체의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 리간드에 콘쥬게이트되거나, 연결되거나, 또는 부착되는 것이다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 제제는 특정 결합 부위(예를 들어 결합 부위 Z)에서 올리고머 시약과 결합할 수 있는 부착된 결합 도메인 또는 결합 파트너(예를 들어 결합 파트너 C)를 갖는다. 일부 구현예에서, 복수의 제제가 상기 올리고머 시약에 가역적으로 결합된다. 다양한 구현예에서, 상기 올리고머 시약은 특정 구현예에서 결합 도메인(예를 들어 결합 파트너 C)에서 복수의 제제에 가역적으로 결합되는 복수의 특정 결합 부위를 갖는다. 일부 구현예에서, 결합된 제제의 양은 경쟁 시약, 예를 들어 특정 결합 부위(예를 들어 결합 부위 Z)에 결합할 수도 있는 시약의 존재하에 감소된다. 항-CD3/항-CD28 올리고머 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 시약은 국제공개공보 제W02018/197949호에 기술되어 있다.

[0296] 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은, 적어도 하나의 제제(예를 들어 세포 예를 들어 T 세포에서 신호를 생성할 수 있는 제제)가 상기 올리고머 시약과 관련되는, 예를 들어 가역적으로 관련되는 가역적 시스템이거나 또는 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 시약은 상기 제제에 결합할 수 있는, 예를 들어 가역적으로 결합할 수 있는 복수의 결합 부위를 함유한다. 일부 경우에, 상기 시약은 세포 예를 들어 T 세포에서 신호를 생성할 수 있는 적어도 하나의 부착된 제제를 갖는 올리고머 입자 시약이다. 일부 구현예에서, 상기 제제는, 상기 분자의 에피토프 또는 영역에 특이적으로 결합할 수 있고 또한 상기 시약의 적어도 하나의 결합 부위, 예를 들어 상기 시약의 결합 부위 Z에 특이적으로 결합하는, 결합 파트너 C로도 지칭되는 결합 파트너를 함유하는, 적어도 하나의 결합 부위, 예를 들어 결합 부위 B를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 결합 파트너 C와 상기 적어도 하나의 결합 부위 Z 사이의 결합 상호작용은 비-공유 상호작용이다. 일부 경우, 상기 결합 파트너 C와 상기 적어도 하나의 결합 부위 Z 사이의 결합 상호작용은 공유 상호작용이다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 결합 부위 Z 사이의 결합 상호작용, 예를 들어 비-공유 상호작용은 가역적이다.

[0297] 상기 가역적 시스템에서 올리고머 시약으로서 사용될 수 있는 물질은 공지되어 있다[미국특허 제5,168,049호; 제5,506,121호; 제6,103,493호; 제7,776,562호; 제7,981,632호; 제8,298,782호; 제8,735,540호; 제9,023,604호; 및 국제공개공보 제W02013/124474호 및 제W02014/076277호 참조]. 가역적 상호작용을 형성할 수 있는 시약 및 결합 파트너, 및 그러한 결합을 되돌릴 수 있는 물질(예를 들어 경쟁 시약)은 하기 기술된다.

[0298] 일부 구현예에서, 상기 올리고머 시약은 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 또는 유사체(예를 들어 뉴트라비딘) 또는 그들의 혼합물의 올리고머이며, 여기서 상기 올리고머 시약은 상기 제제의 결합 도메인(예를 들어 결합 파트너 C)와 가역적으로 관련시키기 위한 하나 이상의 결합 부위를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 제제의 결합 도메인은 바이오틴, 바이오틴 유도체 또는 유사체, 또는 스트렙타비딘-결합 펩티드 또는, 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 또는 유사체, 아비딘 또는 아미딘 돌연변이 단백질 또는 유사체에 특

이적으로 결합할 수 있는 다른 분자일 수 있다.

- [0299] 특정 구현예에서, 하나 이상의 제제(예를 들어 세포 예를 들어 T 세포에서 신호를 생성할 수 있는 제제)는, 상기 올리고머 시약, 예를 들어 상기 올리고머 시약 상에 존재하는 상기 복수의 특정 결합 부위(예를 들어 결합 부위 Z)와 관련되거나, 예를 들어 거기에 가역적으로 결합된다. 일부 경우에, 이것은, 상기 제제에 의해 결합되거나 인식되는 세포 표면 분자를 (그의 적어도 2개의 복제물에서) 각의 표적 세포가 상기 제제와 접촉하는 경우 결합활성 효과가 발생할 수 있도록 서로 근접하게 배열되는 제제를 생성한다.
- [0300] 일부 구현예에서, 상기 올리고머 제제는 스트렙타비딘 올리고머, 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 올리고머, 스트렙타비딘 유사체 올리고머, 아미딘 올리고머, 아비딘 돌연변이 단백질 또는 아비딘 유사체(예를 들어 뉴트라비딘) 또는 그들의 혼합물로 구성된 올리고머이다. 특정 구현예에서, 상기 올리고머 시약은 제제의 결합 도메인(예를 들어 결합 파트너 C)에 결합할 수 있는 특정 결합 부위를 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 결합 도메인은 바이오틴, 바이오틴 유도체 또는 유사체, 또는 스트렙타비딘-결합 펩티드 또는, 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 또는 유사체, 아비딘 또는 아비딘 돌연변이 단백질 또는 유사체에 특이적으로 결합할 수 있는 다른 분자일 수 있다.
- [0301] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘은 야생형 스트렙타비딘, 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 또는 유사체, 예를 들어 스트렙타비딘-유사 폴리펩티드일 수 있다. 유사하게, 일부 측면에서, 아비딘은 야생형 아비딘 또는 아비딘의 돌연변이 단백질 또는 유사체 예를 들어 뉴트라비딘, 천연 아비딘의 대안으로 이용 가능하고 보다 중성 pi를 전형적으로 나타내는 개질 아르기닌을 갖는 탈당화된 아비딘을 포함한다. 일반적으로, 아비딘의 탈당화된, 중성 형태는 상업적으로 이용 가능한 형태 예를 들어 "Extravidin"(Sigma Aldrich를 통해 이용 가능) 또는 "NeutrAvidin"(예를 들어 Thermo Scientific 또는 Invitrogen을 통해 이용 가능)을 포함한다.
- [0302] 일부 구현예에서, 시약은 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 또는 유사체이다. 일부 구현예에서, 야생형 스트렙타비딘(wt-스트렙타비딘)은 문헌[Argarana 외, Nucleic Acids Res 14(1986) 1871-1882(SEQ ID NO: 72)]에 개시된 아미노산 서열을 갖는다. 일반적으로, 스트렙타비딘은 자연에서 4 개의 같은 서브 유닛의 사랑체로 존재한다, 즉 동중-사랑체이고, 각각의 서브 유닛은 비오틴, 비오틴 유도체 또는 유사체 또는 비오틴 모방체에 대한 단일 결합 위치를 함유한다. 스트렙타비딘 서브 유닛의 예시적인 서열은 SEQ ID NO: 72에 제시된 아미노산 서열이나, 상기 서열은 다른 Streptomyces 종으로부터 이의 상동물에 존재하는 서열을 또한 포함할 수 있다. 특히, 스트렙타비딘의 각각의 서브 유닛은 (약) 10^{-14} M 정도의 평형 해리 상수(KD)로 비오틴에 대한 강력한 결합 친화도를 나타낼 수 있다. 일부 경우에, 스트렙타비딘은 4 개의 결합 위치 중 하나만이 작용성인 1가 사랑체[문헌 「Howarth et al. (2006) Nat. Methods, 3:267-73」; 「Zhang et al. (2015) Biochem. Biophys. Res. Commun., 463:1059-63」 참조], 4 개의 결합 위치 중 2 개가 작용성인 2 가 사랑체[문헌 「Fairhead et al. (2013) J. Mol. Biol., 426:199-214」 참조]로 존재할 수 있고 또는 단량체 또는 이량체 형태[문헌 「Wu et al. (2005) J. Biol. Chem., 280:23225-31」; 「Lim et al. (2010) Biochemistry, 50:8682-91」 참조]로 존재할 수 있다.
- [0303] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘은 임의의 형태, 야생형 또는 미변형 스트렙타비딘, 예를 들어 바이오틴, 바이오틴 유도체 또는 유사체 또는 바이오틴 모방체에 대한 결합 부위를 함유하는 하나 이상의 기능성 서브 유닛을 포함하는 스트렙토마이세스 종(*Streptomyces species*)으로부터의 스트렙타비딘 또는 그의 기능적으로 활성인 단편일 수 있으며, 예를 들어 SEQ ID NO: 72에 제시된 스트렙토마이세스 아비디니 세트(*Streptomyces avidinii* set)로부터의 야생형 스트렙타비딘 또는 그의 기능적으로 활성인 단편의 적어도 하나의 기능성 서브 유닛 또는 그의 기능적으로 활성인 단편을 함유한다. 예를 들어 일부 구현예에서, 스트렙타비딘은 야생형 스트렙타비딘의 단편을 포함할 수 있으며, 이는 N-말단 및/또는 C-말단에서 단축된다. 이러한 최소 스트렙타비딘은 SEQ ID NO: 72의 10번 내지 16번의 아미노산 위치의 영역에서 N-말단으로 시작하고 SEQ ID NO: 72의 133번 내지 142번의 아미노산 위치의 영역에서 C-말단으로 종지하는 임의의 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘의 기능적 활성 단편은 SEQ ID NO: 73에 제시된 아미노산의 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 예를 들어 SEQ ID NO: 73에 제시된 것과 같은 스트렙타비딘은 추가로 SEQ ID NO: 72에 제시된 넘버링 세트를 갖는 A1a13에 대응하는 위치에서 N-말단 메티오닌을 추가로 함유할 수 있다. 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 돌연변이 단백질에서 잔기들의 위치에 관한 언급은 SEQ ID NO: 72에서 잔기들의 넘버링과 관련이 있다.
- [0304] 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 돌연변이 단백질의 예는 예를 들어 국제공개공보 제WO 86/02077호, 독일특허출원 제19641876 A1호, 미국특허 제6,022,951호, 국제공개공보 제WO 98/40396호 또는 제WO 96/24606호에 언급되어 있다. 스트렙타비딘 돌연변이 단백질의 예는 당해 분야에 공지되어 있다[미국특허 제5,168,049호; 제

5,506,121호; 제6,022,951호; 제6,156,493호; 제6,165,750호; 제6,103,493호; 또는 제6,368,813호; 국제공개공보 제W02014/076277호 참조].

[0305] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 돌연변이 단백질은 미변형 또는 야생형 스트렙타비딘의 일부가 아니거나 또는 미변형 또는 야생형 스트렙타비딘의 일부만을 포함할 수 있는 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 돌연변이 단백질은 미변형 또는 야생형 스트렙타비딘의 서브유닛과 비교하여, 예를 들어 SEQ ID NO: 72에 제시된, 예를 들어 SEQ ID NO: 73 또는 SEQ ID NO: 94에 제시된 미변형 또는 야생형 스트렙타비딘 또는 그의 기능적 활성 단편과 비교하여 하나 이상의 아미노산 치환(대체)을 가질 수 있는 적어도 하나의 서브 유닛을 함유한다.

[0306] 일부 구현예에서, 결합 도메인에 대한 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 돌연변이 단백질(streptavidin mutein)의 결합 친화도, 예를 들어 해리 상수(K_d)는 (약) 1×10^{-4} M, 5×10^{-4} M, 1×10^{-5} M, 5×10^{-5} M, 1×10^{-6} M, 5×10^{-6} M 또는 1×10^{-7} M 미만이지만, 일반적으로는 1×10^{-13} M, 1×10^{-12} M 또는 1×10^{-11} M 초과이다. 예를 들어 미국특허 제5,506,121호에 개시된 것과 같은 펩티드 서열(스트렙-태그(스트렙-태그s))은 비오틴 모방체(biotin mimics)로서 작용하고 대략 10^{-4} and 10^{-5} M의 K_D 로 스트렙타비딘에 대한 결합 친화도를 입증한다[미국특허 제6,103,493호 또는 국제공개공보 제W02014/076277호 참조]. 일부 구현예에서, 결합 친화도는 당해 기술분야에 공지된, 예를 들어 본원에서 기술된 임의의 방법에 의해서 결정될 수 있다.

[0307] 일부 구현예에서, 시약, 예를 들어 시약, 예를 들어 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 돌연변이 단백질은 펩티드 리간드 결합 파트너에 대한 결합 친화도를 나타내고, 상기 펩티드 리간드 결합 파트너는 제제(예를 들어 수용체-결합제 또는 선별제) 중에 존재하는 결합 파트너 C일 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 펩티드 서열은 일반식 His-Pro-Xaa를 갖는 서열을 함유하며, 여기서 Xaa는 글루타민, 아스파라긴, 또는 메티오닌이며, 예를 들어 SEQ ID NO: 89에 제시된 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 펩티드 서열은 SEQ ID NO: 90, 예를 들어 SEQ ID NO: 80에 제시된 일반적인 방식을 갖는다. 한 구체예에서, 상기 펩티드 서열은 Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly('스트렙-태그®'이라고도 함; SEQ ID NO: 81에 제시됨)이다. 한 구체예에서, 상기 펩티드 서열은 Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys('스트렙-태그® II'라고도 함; SEQ ID NO: 75에 제시됨)이다. 일부 구현예에서, 펩티드 리간드는 2 개 이상의 스트렙타비딘-결합 모듈의 순차적인 배열을 함유하고, 여기서 2 개의 모듈 사이 거리는 0 이상 및 50 개 이하의 아미노산이고, 여기서 1 개의 결합 모듈은 3 내지 8 개의 아미노산을 갖고 적어도 His-Pro-Xaa 서열을 함유하고, 여기서 Xaa는 글루타민, 아스파라긴 또는 메티오닌이고, 다른 결합 모듈은 예를 들어 SEQ ID 번호: 90에 제시된 동일하거나 상이한 스트렙타비딘 펩티드 리간드를 갖는다[예를 들어 국제공개공보 제W002/077018호; 미국 특허 제7,981,632호 참조]. 일부 구현예에서, 펩티드 리간드는 임의의 SEQ ID 번호: 82 또는 83에 제시된 방식을 갖는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 펩티드 리간드는 임의의 SEQ ID 번호: 76-78 및 84-85에 제시된 아미노산 서열을 갖는다. 대부분의 경우, 이들 모두의 스트렙타비딘 결합 펩티드는 동일한 결합 부위, 즉 스트렙타비딘의 비오틴 결합 부위에 결합한다. 하나 이상의 스트렙타비딘 결합 펩티드가 결합 파트너 C, 예를 들어 C1 및 C2로서 사용되는 경우, 결합 파트너 C를 통해서 상기 하나 이상의 제제에 결합된 다량체화 시약 및/또는 올리고머성 입자 시약은 전형적으로는 하나 이상의 스트렙타비딘 돌연변이 단백질로 구성된다.

[0308] 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 돌연변이 단백질은 미국특허 제6,103,493호에 기술된 바와 같이 돌연변이 체이다. 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 돌연변이 단백질은 SEQ ID NO: 72에 제시된 바와 같이 야생형 스트렙타비딘의 아미노산 서열에 기초한 아미노산 위치 44번 내지 53번의 영역 내에 적어도 하나의 돌연변이를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 돌연변이 단백질은 하나 이상의 잔기 44, 45, 46 및/또는 47번에서 돌연변이를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 돌연변이 단백질은, 소수성 지방족 아미노산, 예를 들어 Val, Ala, Ile 또는 Leu, 45번 위치의 임의의 아미노산, 지방족 아미노산, 예를 들어 46번 위치의 소수성 지방족 아미노산으로 야생형 스트렙타비딘의 44번 위치의 Glu의 치환 및/또는 염기성 아미노산, 예를 들어 Arg 또는 Lys, 예를 들어 일반적으로는 Arg으로 47번 위치의 Val의 치환을 함유한다. 일부 구현예에서, Ala는 46번 위치에 있고/있거나 Arg는 47번 위치에 있고/있거나 Val 또는 Ile는 44번 위치에 있다. 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 돌연변이 단백질은, 예를 들어 SEQ ID NO: 86 or SEQ ID NO: 87 또는 88에 제시된 아미노산의 서열을 함유하는 예시적인 스트렙타비딘 돌연변이 단백질(스트렙타비딘 돌연변이 단백질 1, SAM1로도 알려짐)에 제시된 것과 같은 잔기 Val44-Thr45-Ala46-Arg47을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 돌연변이 단백질은, 예를 들어 SEQ ID NO: 91, 74, 또는 79에 제시된 아미노산의 서열을 함유하는 예시적인 스트렙타비딘 돌연변이 단백질(SAM2로도 알려짐)에 제시된 것과 같은 잔기 Ile44-Gly45-Ala46-Arg47을 함유한다.

일부 경우에, 상기 스트렙타비딘 돌연변이 단백질은 예를 들어 미국특허 제6,103,493호에 기술되어 있으며, 상표명 Strep-Tactin®으로 상업적으로 판매되고 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 스트렙타비딘 돌연변이 단백질은 SEQ ID NO: 92 또는 SEQ ID NO: 93에 제시된 아미노산의 서열을 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 분자는 SEQ ID NOS: 73, 87, 74, 92, 94, 88, 또는 79 중의 임의의 것에 제시된 서열을 포함하는 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 돌연변이 단백질의 사량체(tetramer)이며, 이것은 사량체로서, 단량체당 1개의 N-말단 아민 및 4개의 리신(lysine)을 포함한, 20개의 1차 아민을 함유하는 분자이다.

[0309] 일부 구현예에서, 스트렙타비딘 돌연변이 단백질은 펩티드 리간드(Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; 스트렙-태그®로도 불리워짐; SEQ ID NO: 81에 제시됨)에 대해 3.7×10^{-5} M 또는 (약) 3.7×10^{-5} M 미만이고/이거나 펩티드 리간드(Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; 스트렙-태그® II로도 불리워짐; SEQ ID NO: 75에 제시됨)에 대해 7.1×10^{-5} M 또는 (약) 7.1×10^{-5} M 미만이고/이거나 SEQ ID NOS: 75, 82-85, 76-78, 80, 81, 89, 및 90 중의 임의의 것에 제시된 펩티드 리간드 중의 임의의 것에 대해 7.0×10^{-5} M, 5.0×10^{-5} M, 1.0×10^{-5} M, 5.0×10^{-6} M, 1.0×10^{-6} M, 5.0×10^{-7} M, 또는 1.0×10^{-7} M, 또는 (약) 7.0×10^{-5} M, 5.0×10^{-5} M, 1.0×10^{-5} M, 5.0×10^{-6} M, 1.0×10^{-6} M, 5.0×10^{-7} M, 또는 1.0×10^{-7} M 미만이지만, 일반적으로는 (약) 1×10^{-13} M, 1×10^{-12} M 또는 1×10^{-11} M 초과인 평형 해리 상수(K_D)에 의해서 특징지워지는 결합 친화도를 나타낸다.

[0310] 일부 구현예에서, 생성되는 스트렙타비딘 돌연변이 단백질은 펩티드 리간드(Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly; 스트렙-태그®로도 불리워짐; SEQ ID NO: 81에 제시됨)에 대해 2.7×10^4 M⁻¹ 또는 (약) 2.7×10^4 M⁻¹ 초과이고/이거나 펩티드 리간드(Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys; 스트렙-태그® II로도 불리워짐; SEQ ID NO: 75에 제시됨)에 대해 1.4×10^4 M⁻¹ 또는 (약) 1.4×10^4 M⁻¹ 초과이고/이거나 SEQ ID NOS: 75, 82-85, 76-78, 80, 81, 89, 및 90 중의 임의의 것에 제시된 펩티드 리간드 중의 임의의 것에 대해 1.43×10^4 M⁻¹, 1.67×10^4 M⁻¹, 2×10^4 M⁻¹, 3.33×10^4 M⁻¹, 5×10^4 M⁻¹, 1×10^5 M⁻¹, 1.11×10^5 M⁻¹, 1.25×10^5 M⁻¹, 1.43×10^5 M⁻¹, 1.67×10^5 M⁻¹, 2×10^5 M⁻¹, 3.33×10^5 M⁻¹, 5×10^5 M⁻¹, 1×10^6 M⁻¹, 1.11×10^6 M⁻¹, 1.25×10^6 M⁻¹, 1.43×10^6 M⁻¹, 1.67×10^6 M⁻¹, 2×10^6 M⁻¹, 3.33×10^6 M⁻¹, 5×10^6 M⁻¹, 1×10^7 M⁻¹, 또는 (약) 1.43×10^4 M⁻¹, 1.67×10^4 M⁻¹, 2×10^4 M⁻¹, 3.33×10^4 M⁻¹, 5×10^4 M⁻¹, 1×10^5 M⁻¹, 1.11×10^5 M⁻¹, 1.25×10^5 M⁻¹, 1.43×10^5 M⁻¹, 1.67×10^5 M⁻¹, 2×10^5 M⁻¹, 3.33×10^5 M⁻¹, 5×10^5 M⁻¹, 1×10^6 M⁻¹, 1.11×10^6 M⁻¹, 1.25×10^6 M⁻¹, 1.43×10^6 M⁻¹, 1.67×10^6 M⁻¹, 2×10^6 M⁻¹, 3.33×10^6 M⁻¹, 5×10^6 M⁻¹, 1×10^7 M⁻¹ 초과이지만, 일반적으로는 (약) 1×10^{13} M⁻¹, 1×10^{12} M⁻¹ 또는 1×10^{11} M⁻¹ 초과인 평형 결합 상수(K_A)에 의해서 특징지워지는 결합 친화도를 나타낸다.

[0311] 특정 구현예에서, 본원에서는 복수의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 사량체로 구성되고/되거나 그를 함유하는 올리고머 입자 시약이 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 상기 올리고머 입자 시약은, 하나 이상의 제제, 예를 들어 자극제 및/또는 선별제에 가역적으로 결합하고/하거나 가역적으로 결합할 수 있는 복수의 결합 부위를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 올리고머 입자 시약은 (약) 70 nm 내지 (약) 125 nm의 반경, 예를 들어 평균 또는 평균값 반경; (약) 1×10^7 g/mol 내지 (약) 1×10^9 g/mol의 분자량; 및/또는 (약) 1,000개 내지 (약) 5,000개의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 사량체를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 올리고머 입자 시약은 하나 이상의 제제 예를 들어 세포의 표면에서 분자에, 예를 들어 수용체에 결합하는 제제에 결합, 예를 들어 가역적으로 결합된다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 제제는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 예를 들어 Fab이거나 또는 그를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 제제는 세포(예를 들어 T 세포) 상의 하기 거대분자 중의 하나 이상에 특이적으로 결합한다: CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD25, CD27, CD28, CD29, CD31, CD44, CD45RA, CD45RO, CD54 (ICAM-1), CD127, MHCI, MHCII, CTLA-4, ICOS, PD-1, OX40, CD27L (CD70), 4-1BB (CD137), 4-1BBL, CD30L, LIGHT, IL-2R, IL-12R, IL-1R, IL-15R; IFN-감마R, TNF-알파R, IL-4R, IL-10R, CD18/CD11a (LFA-1), CD62L (L-selectin), CD29/CD49d (VLA-4), 노치 리간드(Notch ligand) (예를 들어 델타-유사 1/4, 재기드(Jagged) 1/2, 등.), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, 및 CXCR3 또는 그들의 단편(이들 거대분자 또는 그들의 단편에 대응하는 리간드를 포함함). 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 제제는 세포(예를 들어 T 세포) 상의 하기 거대분자 중의 하나 이상에 특이적으로 결합한다: CD28, CD62L, CCR7, CD27, CD127, CD3, CD4, CD8, CD45RA, 및/또는 CD45RO. 일부 구현예에서, 상기 하

나 이상의 제제는 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 예를 들어 Fab를 포함하고, 상기 항체는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체(면역글로불린 Fc 영역을 갖는 전장 항체를 포함한다), 폴리에피토프 특이성을 갖는 항체 조성물, 다중 특이적 항체(예를 들어 이중특이 항체, 다이아바디 및 단쇄 분자, 및 항체 단편(예를 들어 Fab, F(ab')₂, 및 Fv)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 시약은 항체 단편(항원-결합 단편을 포함), 예를 들어 Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, 또는 (Fab')₂ 단편이다. IgG, IgM, IgA, IgD, 및 IgE 불변 영역을 비롯한 본원에 상정된 항체용으로 임의의 이소타입의 불변 영역이 이용될 수 있고 이러한 불변 영역은 인간 또는 동물 종(예를 들어 쥐 종)으로부터 수득가능한 것으로 이해될 수 있을 것이다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 시약은 T 세포 수용체의 하나 이상의 성분에 결합 및/또는 이를 인식하는 항체이거나 상기 항체를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 시약은 항-CD3 항체이거나 상기 항체를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 시약은 공-수용체에 결합 및/또는 이를 인식하는 항체이거나 또는 그를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 시약은 항-CD28 항체이거나 또는 그를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 시약은 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체 또는 그의 항원 결합 단편, 예를 들어 결합 파트너, 예를 들어 스트렙타비딘 결합 펩티드, 예를 들어 스트렙-태그® II를 함유하는 항체 또는 그의 항원 단편이거나 또는 그를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 제제는 결합 파트너, 예를 들어 스트렙타비딘 결합 펩티드, 예를 들어 스트렙-태그® II를 함유하는 항-CD3 및/또는 항-CD28 Fab이거나 또는 그를 포함한다.

[0312] 일부 구현예에서, 본원에서는 복수의 스트렙타비딘 또는 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 사량체로 구성되고/되거나 그를 함유하는 올리고머 입자 시약이 제공된다. 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 상기 올리고머 입자 시약은, 하나 이상의 제제, 예를 들어 자극제 및/또는 선별제에 가역적으로 결합하고/하거나 가역적으로 결합할 수 있는 복수의 결합 부위를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 올리고머 입자 시약은 (약) 80 nm 내지 (약) 120 nm의 반경, 예를 들어 평균 반경; (약) 7.5×10^6 g/mol 내지 (약) 2×10^8 g/mol의 분자량; 및/또는 (약) 500 개 내지 (약) 10,000개의 양, 예를 들어 평균 양을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 올리고머 입자 시약은 하나 이상의 제제 예를 들어 세포의 표면에서 분자에, 예를 들어 수용체에 결합하는 제제에 결합, 예를 들어 가역적으로 결합된다. 일부 구현예에서, 상기 제제는 결합 파트너, 예를 들어 스트렙타비딘 결합 펩티드, 예를 들어 스트렙-태그® II를 함유하는 항-CD3 및/또는 항-CD28 Fab, 예를 들어 Fab이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 제제는 결합 파트너, 예를 들어 스트렙타비딘 결합 펩티드, 예를 들어 스트렙-태그® II를 함유하는 항-CD3 및/또는 항-CD28 Fab이다.

[0313] 일부 구현예에서, 상기 세포는 10^6 개의 세포 당 (약) 또는 적어도 (약) 0.01 μ g, 0.02 μ g, 0.03 μ g, 0.04 μ g, 0.05 μ g, 0.1 μ g, 0.2 μ g, 0.3 μ g, 0.4 μ g, 0.5 μ g, 0.75 μ g, 1 μ g, 2 μ g, 3 μ g, 4 μ g, 5 μ g, 6 μ g, 7 μ g, 8 μ g, 9 μ g, 또는 10 μ g의 올리고머 자극 시약의 존재하에서 자극된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 10^6 개의 세포 당 (약) 4 μ g의 존재하에서 자극된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 10^6 개의 세포 당 (약) 0.8 μ g의 존재하에서 자극된다. 특정 경우에, 4 μ g의 올리고머 자극 시약은 (약) 3 μ g의 올리고머 입자 및 (약) 1 μ g의 부착 제제, 예를 들어 (약) 0.5 μ g의 항-CD3 Fab 및 (약) 0.5 μ g의 항-CD28 Fab이거나 또는 그를 포함한다.

[0314] **2. 세포로부터의 자극 시작의 제거**

[0315] 일부 구현예에서, 자극 시작은 세포를 수거, 수확, 또는 제형화하기 전에 세포 또는 세포 집단으로부터 제거된다. 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은 인큐베이션, 예를 들어 섹션 I-D에서와 같이 본원에서 기술된 인큐베이션 후 또는 도중에 세포 또는 세포 집단으로부터 분리 또는 제거된다. 특정 구현예에서, 상기 세포 또는 세포 집단은 인큐베이션 후 세포를 수거, 수확, 또는 제형화하는 단계 이전에 자극 시약을 제거하는 공정, 과정, 단계, 또는 기법(technique)을 거친다. 특정 구현예에서, 상기 세포 또는 세포 집단은 인큐베이션 후에 자극 시약을 제거하는 공정, 과정, 단계, 또는 기법을 거친다. 일부 측면에서, 인큐베이션도중 세포로부터 자극 시약이 분리될 때, 상기 세포는 인큐베이션의 잔여 기간동안 분리 또는 제거 이전과 동일한 인큐베이션 조건으로 복귀된다.

[0316] 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 세포로부터 제거 및/또는 분리된다. 특정 구현예에서, 자극 시약과 세포 사이의 결합 및/또는 연합(association)은 일부 경우 인큐베이션도중에 시간에 따라 감소될 수 있다. 특정 구현예에서, 하나 이상의 제제를 부가하여 자극 시약과 세포 사이의 결합 및/또는 연합을 감소시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 세포 배양 조건에서의 변화, 예를 들어 제제의 첨가 및/또는 배지 온도 및/또는 pH의 변화는 자극 시약과 세포 사이의 결합 및/또는 연합을 감소시킬 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 자극 시약은 예를 들어 배양, 세포 배양 시스템 및/또는 용액으로부터 세포를 제거하지 않고 배양, 세포 배양 시스템 및/또는 세

포와 별도로 용액으로부터 제거될 수 있다.

- [0317] 특정 구현예에서, 자극 시약은 일정 시간 경과 후 세포로부터 분리 및/또는 제거될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 일정 시간은 자극의 개시로부터의 일정 시간이다. 특정 구현예에서, 상기 인큐베이션의 시작은 세포가 자극 시약 및/또는 상기 자극 시약을 함유하는 배지 또는 용액과 접촉하는 시점 또는 대략 그 시점인 것으로 고려된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 상기 자극의 개시 후 (약) 120시간, 108시간, 96시간, 84시간, 72시간, 60시간, 48시간, 36시간, 24시간, 또는 12시간 이내에 세포로부터 제거 또는 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 상기 자극이 개시된 후 (약) 48시간에 세포로부터 제거 또는 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 상기 자극이 개시된 후 (약) 72시간에 세포로부터 제거 또는 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 상기 자극이 개시된 후 (약) 96시간에 세포로부터 제거 또는 분리된다.
- [0318] 세포로부터 자극 시약(예를 들어 입자 예를 들어 비드 입자 또는 자화가능한 입자이거나 그들을 함유하는 자극 시약)을 제거하는 방법이 공지되어 있다. 특정 구현예에서, 비드 자극성 입자(bead stimulatory reagent), 예를 들어 항-CD3/항-CD28 항체 콘주게이트된 상자성 비드가 세포 또는 세포 집단으로부터 분리 또는 제거된다. 일부 구현예에서, 경쟁 항체, 예를 들어 자극 시약의 1차 항체에 결합하고 상기 세포 상의 항체에 대한 친화성을 변경시켜서 온화한 분리(gentle detachment)를 허용하는 비-표지된 항체가 사용될 수 있다. 일부 경우에, 분리 후에 상기 경쟁 항체는 입자(예를 들어 비드 입자)와 관련된 상태를 유지할 수 있으나 미반응 항체는 세척되거나 될 수 있고 세포는 단리, 선별, 농축 및/또는 활성화하는 항체가 없다. 상기 시약의 예로는 DETACaBEAD(Friedl 외 1995; Entschladen 외 1997)가 있다. 일부 구현예에서, 입자(예를 들어 비드 입자)는 절단 가능한 링커(예를 들어 DNA 링커)의 존재하에 제거될 수 있고, 입자-결합된 항체는 링커(예를 들어 CELlection, Dynal)에 접합된다. 일부 경우에, 링커 영역은 분리, 예를 들어 DNA 분해효소 또는 기타 방출 완충액의 추가로 세포로부터 입자(예를 들어 비드 입자)를 제거하기 위한 절단 가능한 위치를 제공한다. 일부 구현예에서, 기타 효소적 방법이 세포로부터 입자(예를 들어 비드 입자)를 방출시키기 위해 이용될 수도 있다. 일부 구현예에서, 입자(예를 들어 비드 입자 또는 자화성 입자)는 생분해성이다.
- [0319] 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은 자성, 상자성, 및/또는 초상자성(superparamagnetic)이고/이거나, 자성, 상자성, 및/또는 초상자성인 비드를 함유하며, 상기 자극 시약은 세포를 자기장에 노출시킴으로써 세포로부터 제거될 수 있다. 자기장을 발생시키는 자석을 함유하는 적당한 장치의 예로는 DynaMag CTS(제조원: Thermo Fisher), Magnetic Separator(제조원: Takara) 및 EasySep Magnet(제조원: Stem Cell Technologies)를 들 수 있다.
- [0320] 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 상기 제공된 방법의 완료 전에, 예를 들어 본원에서 제공된 방법에 의해서 생산된 조작된 세포를 수확, 수거, 및/또는 제형화하기 전에 상기 세포로부터 제거 또는 분리된다. 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은 세포를 조작한 후, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입 후에 상기 세포로부터 세포로부터 제거 또는 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 상기 세포의 배양 후, 예를 들어 증식 및/또는 증폭을 촉진하는 조건하에 조작된, 예를 들어 형질주입된 또는 형질도입된 세포의 배양 전에 제거된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은, 상기 세포가 세포의 배양도중에 임계치의 수, 밀도, 및/또는 증폭을 달성한 후 제거된다. 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은, 상기 세포를 제형화하기 전에, 예를 들어 상기 배양된 세포, 예를 들어 상기 임계치의 수, 밀도, 또는 증폭을 달성한 배양된 세포를 형성하기 전에 분리된다.
- [0321] 일부 구현예에서, 상기 자극 비드 시약, 예를 들어 상기 자극 자성 비드 시약은, 상기 세포를 수거, 수확, 또는 제형화하기 전에 상기 세포 또는 세포 집단으로부터 분리 또는 제거된다. 일부 구현예에서, 상기 자극 비드 시약, 예를 들어 상기 자극 자성 비드 시약은, 상기 인큐베이션, 예를 들어 섹션 I-D에서와 같이 본원에서 기술된 인큐베이션 도중 또는 그 후에 자기장에 노출함으로써 상기 세포 또는 세포 집단으로부터 분리 또는 제거된다. 특정 구현예에서, 상기 세포 또는 세포 집단은, 상기 인큐베이션 후 그러나 상기 세포를 수거, 수확, 또는 제형화하는 단계 전에 상기 자기장에 노출되어 상기 자극 비드 시약, 예를 들어 상기 자극 자성 비드 시약을 제거된다. 특정 구현예에서, 상기 세포 또는 세포 집단은, 상기 인큐베이션 후에 상기 자기장에 노출되어 상기 자극 비드 시약, 예를 들어 상기 자극 자성 비드 시약을 제거된다. 일부 측면에서, 상기 자극 비드 시약이 상기 인큐베이션도중에 상기 세포 또는 세포 집단으로부터 분리 또는 제거되는 경우, 상기 세포 또는 세포 집단은, 상기 인큐베이션의 잔여 기간동안 상기 자기장에 노출되기 전과 동일한 인큐베이션 조건으로 복귀된다.
- [0322] 특정 구현예에서, 상기 자극 비드 시약, 예를 들어 상기 자극 자성 비드 시약은, 예를 들어 자기장에 노출됨으로써 상기 자극의 개시의 (약) 120시간, 108시간, 96시간, 84시간, 72시간, 60시간, 48시간, 36시간, 24시간, 또는 12시간 이내에 상기 세포로부터 분리 또는 제거된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 비드 시약, 예를 들어

상기 자극 자성 비드 시약은, 예를 들어 자기장에 노출됨으로써 상기 자극이 개시된 후 (약) 72시간에 상기 세포로부터 분리 또는 제거된다. 일부 구현예에서, 상기 자극 비드 시약, 예를 들어 상기 자극 자성 비드 시약은, 예를 들어 자기장에 노출됨으로써 상기 자극이 개시된 후 (약) 96시간에 상기 세포로부터 분리 또는 제거된다.

[0323] 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 일정 시간 후 상기 세포로부터 분리 및/또는 제거된다. 특정 구현예에서, 상기 일정 시간은 자극 조건하의 인큐베이션의 시작 및/또는 개시로부터의 일정 시간이다. 특정 구현예에서, 상기 인큐베이션의 시작은 대략 상기 세포가 상기 자극 시약 및/또는 상기 자극 시약을 함유하는 배지 또는 용액과 접촉할 때인 것으로 고려된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은, 상기 인큐베이션의 시작 또는 개시 후 (약) 28일, 21일, 20일, 19일, 18일, 17일, 16일, 15일, 14일, 13일, 12일, 11일, 10일, 또는 9일 이내에 상기 세포로부터 제거 또는 분리된다. 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은, 상기 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포가 상기 투입 조성물에 풀링(pooling)되고, 조합되고/되거나 혼합된 후 (약) 28일, 21일, 20일, 19일, 18일, 17일, 16일, 15일, 14일, 13일, 12일, 11일, 10일, 또는 9일 이내에 상기 세포로부터 제거 또는 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은, 상기 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포가 생물학적 샘플로부터 수득, 단리, 농축, 및/또는 선별된 후 (약) 28일, 21일, 20일, 19일, 18일, 17일, 16일, 15일, 14일, 13일, 12일, 11일, 10일, 또는 9일 이내에 상기 세포로부터 제거 또는 분리된다.

[0324] 일부 구현예에서, 자극제, 예를 들어 기술된 올리고머 자극 시약의 제거는, 인큐베이션된 T 세포의 집단에 물질, 예를 들어 경쟁제(competition agent)를 첨가하는 것, 예를 들어 상기 자극제의 신호전달을 방해, 예를 들어 단축 및/또는 중지하도록 T 세포에 첨가하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 인큐베이션된 T 세포의 집단은 물질, 예를 들어 경쟁제, 예를 들어 바이오틴 또는 바이오틴 유사체, 예를 들어 D-바이오틴의 존재를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 물질, 예를 들어 경쟁제, 예를 들어 바이오틴 또는 바이오틴 유사체, 예를 들어 D-바이오틴은, 상기 물질이 배양도중에 외인적으로 첨가되지 않은 배양된 T 세포의 기준 집단 또는 제제 중의 물질의 양 보다 적어도 1.5-배, 적어도 2-배, 적어도 3-배, 적어도 4-배, 적어도 5-배, 적어도 10-배, 적어도 100-배, 적어도 1000-배 또는 그 보다 많은 양으로 존재한다. 일부 구현예에서, 배양된 T 세포의 집단 중의, 상기 물질, 예를 들어 경쟁제, 예를 들어 바이오틴 또는 바이오틴 유사체, 예를 들어 D-바이오틴의 양은, (약) 10 μM 내지 (약) 100 μM, (약) 100 μM 내지 (약) 1 mM, (약) 100 μM 내지 (약) 500 μM 또는 (약) 10 μM 내지 (약) 100 μM이다. 일부 구현예에서, 바이오틴 또는 바이오틴 유사체, 예를 들어 D-바이오틴의 10 μM 또는 약 10 μM이 상기 세포 또는 세포 집단에 첨가되어 상기 세포 또는 세포 집단으로부터 상기 올리고머 자극 시약을 분리 또는 제거한다.

[0325] 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 제제(예를 들어 TCR 및/또는 공수용체를 자극하거나 활성화하는 제제)는, 예를 들어 상기 올리고머 시약 상에 존재하는 복수의 특정 결합 부위(예를 들어 결합 부위 Z)를 통해서 상기 올리고머 시약과 결합하고, 예를 들어 그에 가역적으로 결합된다. 일부 경우에, 이것은, 제제에 의해서 결합되거나 인식되는 세포 표면 분자를 갖는 표적 세포(그의 적어도 2개의 복제물)가 상기 제제와 접촉하는 경우 결합활성 효과(avidity effect)가 발생할 수 있도록 제제들이 서로 근접하게 배열되게 한다. 일부 측면에서, 상기 수용체 결합 시약은 결합 부위 B에서 세포의 수용체 분자에 대해 낮은 친화도를 가지므로, 상기 수용체 결합 시약은 경쟁 시약의 존재하에서 상기 세포로부터 해리된다. 따라서, 일부 구현예에서, 상기 제제는 경쟁 시약의 존재하에서 세포로부터 제거된다.

[0326] 일부 구현예에서, 상기 올리고머 자극 시약은 가역적으로 부착된 항-CD3 및 항-CD28 Fab를 갖는 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 올리고머이다. 일부 구현예에서, 상기 Fab는 예를 들어 상기 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 올리고머에 대한 가역성 부착을 허용하는 스트렙타비딘 결합 도메인을 함유한다. 일부 경우에, 항-CD3 및 항-CD28 Fab는, T 세포 발현 CD3 및/또는 CD28이 가역적으로 부착된 Fab를 갖는 올리고머 자극 시약과 접촉하는 경우 결합활성 효과를 발생하도록 서로 근접하게 배열된다. 일부 측면에서, 상기 Fab는 CD3 및 CD28에 대한 낮은 친화도를 가지므로, 상기 fab는 경쟁 시약, 예를 들어 바이오틴 또는 바이오틴 변이체 또는 유사체의 존재하에 세포로부터 해리된다. 따라서, 일부 구현예에서, 상기 Fab는 경쟁 시약 예를 들어 D-바이오틴의 존재하에서 세포로부터 제거 또는 해리된다.

[0327] 일부 구현예에서, 상기 올리고머 자극 시약, 예를 들어 상기 자극 올리고머 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 시약은 세포를 수거, 수확 또는 제형화하기 전에 세포(들) 집단으로부터 제거 또는 분리된다. 일부 구현예에서, 자극 올리고머 시약, 예를 들어 상기 자극 올리고머 스트렙타비딘 돌연변이 단백질 시약은, 인큐베이션, 본원에서 예를 들어 섹션 I-D에서 기술된 인큐베이션 후 또는 도중에 경쟁 시약, 예를 들어 바이오틴, 또는 바이오틴 유사체와 접촉 또는 그에 대한 노출에 의해서 세포들 또는 세포 집단으로부터 제거 또는 분리된다. 특정 구현예

에서, 상기 세포들 또는 세포 집단은 경쟁 시약, 예를 들어 바이오틴, 또는 바이오틴 유사체와 접촉 또는 노출되어 상기 인큐베이션 후 그러나 상기 세포를 수거, 수확 또는 제형화하기 전에 자극 올리고머 시약, 예를 들어 상기 자극 올리고머 스트랩타비딘 돌연변이 단백질 시약을 제거한다. 특정 구현예에서, 상기 세포들 또는 세포 집단은 경쟁 시약, 예를 들어 바이오틴, 또는 바이오틴 유사체와 접촉 또는 노출되어 상기 인큐베이션 후에 자극 올리고머 시약, 예를 들어 상기 자극 올리고머 스트랩타비딘 돌연변이 단백질 시약을 제거한다. 일부 측면에서, 자극 올리고머 시약, 예를 들어 상기 자극 올리고머 스트랩타비딘 돌연변이 단백질 시약이 상기 인큐베이션 도중에, 예를 들어 경쟁 시약, 예를 들어 바이오틴 또는 바이오틴 유사체 예를 들어 D-바이오틴과의 접촉 또는 노출에 의해서 분리 또는 제거될 때, 상기 세포는 상기 인큐베이션의 잔여 기간동안 상기 분리 또는 제거 이전과 동일한 인큐베이션 조건으로 복귀된다.

[0328] 일부 구현예에서, 상기 세포는 (약) 또는 적어도 (약) 0.01 μM , 0.05 μM , 0.1 μM , 0.5 μM , 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM , 10 μM , 100 μM , 500 μM , 0.01 mM, 1 mM, 또는 10 mM의 경쟁 시약과 접촉하여 세포로부터 올리고머 자극 시약을 분리 또는 제거한다. 다양한 구현예에서, 상기 세포는 (약) 또는 적어도 (약) 0.01 μM , 0.05 μM , 0.1 μM , 0.5 μM , 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM , 10 μM , 100 μM , 500 μM , 0.01 mM, 1 mM, 또는 10 mM의 바이오틴 또는 바이오틴 유사체 예를 들어 D-바이오틴과 접촉하여 세포로부터 항-CD3 및 항-CD28 Fab를 분리 또는 제거한다.

[0329] 특정 구현예에서, 상기 자극 올리고머 시약, 예를 들어 상기 자극 올리고머 스트랩타비딘 돌연변이 단백질 시약은 상기 자극 개시의 (약) 120시간, 108시간, 96시간, 84시간, 72시간, 60시간, 48시간, 36시간, 24시간, 또는 12시간 이내에 상기 세포로부터 제거 또는 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 올리고머 시약, 예를 들어 상기 자극 올리고머 스트랩타비딘 돌연변이 단백질 시약은 상기 자극이 개시된 후 (약) 48시간에 상기 세포로부터 제거 또는 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 올리고머 시약, 예를 들어 상기 자극 올리고머 스트랩타비딘 돌연변이 단백질 시약은 상기 자극이 개시된 후 (약) 72시간에 상기 세포로부터 제거 또는 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 올리고머 시약, 예를 들어 상기 자극 올리고머 스트랩타비딘 돌연변이 단백질 시약은 상기 자극이 개시된 후 (약) 96시간에 상기 세포로부터 제거 또는 분리된다.

[0330] **C. 세포 조작**

[0331] 일부 구현예에서, 상기 가공 단계는 세포, 예를 들어 조작된 세포를 예를 들어 하나 이상의 세포에 재조합 단백질을 암호화하는 핵산의 도입을 위한 조건하에서 조작에 적용시키는 것을 포함한다. 이러한 재조합 단백질의 예는 재조합 수용체, 예를 들어 섹션 II에서 기술한 임의의 것이다. 예를 들어 세포에, 상기 재조합 단백질, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 분자의 도입을 위해서 세포를 조작하는 방법은 임의의 다수의 공지 방법을 이용하여, 예를 들어 벡터, 또는 상기 재조합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 다른 제제를 이용하여 실시될 수 있다. 이러한 벡터는 렌티바이러스(lentiviral) 및 감마레트로바이러스(gammaretroviral) 시스템 뿐만 아니라 트랜스포손-계 시스템(transposon-based system) 예를 들어 예를 들어 피기백(PiggyBac) 또는 슬리핑 뷰티-계 유전자 전달 시스템(Sleeping Beauty-based gene transfer system)을 비롯한 바이러스 및 비-바이러스계 시스템을 포함한다. 예시적인 방법은 바이러스, 예를 들어 레트로바이러스 또는 렌티바이러스를 통해서 수용체를 암호화하는 핵산의 전달, 형질도입, 트랜스포손 및 전기 천공법(electroporation)을 포함한다.

[0332] 특정 구현예에서, 세포 및/또는 농축된 세포의 조성물은 예를 들어 상기 세포를 배양하기 전에 형질도입 또는 형질주입을 포함하는 공정에 의해서 조작에 적용시킨다. 일부 경우, 상기 배양은 본원에 제공된, 예를 들어 섹션 I-D에 기술된 방법에 의해서 증식 및/또는 증폭을 촉진시키는 조건하에서 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는, 상기 세포가 예를 들어 본원에 제공된, 예를 들어 섹션 I-B에 기술된 방법들 중의 임의의 것에 의해서 자극 조건하에 자극, 활성화, 및/또는 인큐베이션된 후, 조작에 적용시킨다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 자극된 세포이고/이거나 세포의 조성물은 예를 들어 섹션 I-B에 기술된 자극 조건하의 사전 인큐베이션에 의한 세포의 자극된 조성물이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 자극된 조성물은 미리 저온 동결되고 저장되며, 조작하기 전에 해동된다.

[0333] 일부 구현예에서, 한 세트 및/또는 고정된 수의 세포, 예를 들어 자극된 세포는, 예를 들어 상기 세포를, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입에 의해서 세포를 조작하기 위한 재조합 단백질(예를 들어 CAR)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 제제(예를 들어 렌티바이러스 벡터)와 접촉시키는 것에 의해서 조작에 적용시킨다. 특정 구현예에서, (약) 1×10^5 내지 (약) $50,000 \times 10^6$ 개의 세포, (약) 1×10^6 내지 (약) $50,000 \times 10^6$ 개의 세포, (약) 10×10^6 내지 (약) $5,000 \times 10^6$ 개의 세포, (약) 1×10^6 내지 (약) $1,000 \times 10^6$ 개의 세포, (약) 50×10^6 내지

(약) $5,000 \times 10^6$ 개의 세포, (약) 10×10^6 내지 (약) $1,000 \times 10^6$ 개의 세포, (약) 50×10^6 내지 (약) 500×10^6 개의 세포, 예를 들어 자극된 세포가 예를 들어 형질도입 또는 형질주입에 의한 조작에 적용된다. 특정 구현예에서, 적어도 (약) 50×10^6 개의 세포, 100×10^6 개의 세포, 150×10^6 개의 세포, 200×10^6 개의 세포, 또는 250×10^6 개의 세포가 조작에 적용된다. 특정 구현예에서, 적어도 약 100×10^6 개의 세포가 조작에 적용된다. 특정 구현예에서, 200×10^6 개까지의 세포가 조작에 적용된다. 특정 구현예에서, 약 100×10^6 내지 약 200×10^6 개의 세포가 조작에 적용된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 자극된 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 생존 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 아포토시스의 마커, 예를 들어 아넥신 V(Annexin V) 또는 활성 카스파제 3에 대해 음성이다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 예를 들어 자극 조건하의 인큐베이션에 의해서 자극된 생존 세포이다.

[0334] 일부 구현예에서, 예를 들어 상기 세포를, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입에 의해서 재조합 단백질(예를 들어 CAR)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 제제(예를 들어 렌티바이러스 벡터)와 접촉시키는 것에 의해서 조작에 적용되는 세포(예를 들어 자극된 세포)의 수는 상기 활성화 또는 자극 후 세포의 총수이고, 최대 총 200×10^6 개까지의 세포이다. 일부 구현예에서, 상이한 공여체로부터 유래된 투입 조성물에 있어서, 상기 활성화 또는 자극 후 상이한 수의 세포들이 예를 들어 형질도입 또는 형질주입과 같은 조작에 적용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 활성화 또는 자극 후 세포들의 총수는 200×10^6 개이거나 그를 초과하며, 상기 활성화 또는 자극 후 세포의 총수가 200×10^6 개 미만인 경우 활성화 후 또는 자극 후 모든 세포가 조작에 적용된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 자극된 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 생존 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 아포토시스의 마커, 예를 들어 아넥신 V 또는 활성 카스파제 3에 대해 음성이다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 예를 들어 자극 조건하의 인큐베이션에 의해서 자극된 생존 세포이다.

[0335] 일부 구현예에서, 유전자 전달은 먼저 세포를 자극, 예를 들어 상기 세포를 반응 예를 들어 사이토카인의 발현 또는 활성화 마커에 의해서 측정되는 증식, 생존, 및/또는 활성화와 같은 반응을 유발하는 자극과 조합한 다음, 상기 활성화된 세포의 형질도입, 및 배양물에서 임상 응용에 충분한 수로의 증폭에 의해서 달성된다. 특정 구현예에서, 상기 유전자 전달은 예를 들어 본원에 기술된, 예를 들어 섹션 I-B에 기술된 방법들 중의 임의의 것에 의해서 먼저 자극 조건하에 상기 세포를 인큐베이션함으로써 달성된다.

[0336] 특정 구현예에서, 유전자 조작을 위한 방법은 상기 재조합 단백질, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 분자와 조성물의 하나 이상의 세포를 접촉시킴으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은, 예를 들어 유인원 바이러스 40(SV40), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV)로부터 유래한 벡터와 같은 재조합 감염성 바이러스 입자를 사용하여, 세포내로 전달된다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터, 예를 들어 감마-레트로바이러스 벡터를 사용하여, T 세포내로 전달된다[예를 들어 문헌 「Koste et al(2014) Gene Therapy 2014 Apr 3 doi: 101038/gt201425」; 「Carlens et al(2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46」; 「Alonso-Camino et al(2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93」; 「Park et al., Trends Biotechnol 2011 November 29(11): 550-557」 참조].

[0337] 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터는 긴 말단 반복부 서열(LTR), 예를 들어 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(MoMLV), 골수 증식성 육종 바이러스(MPSV), 뮤린 배아 줄기세포 바이러스(MESV), 뮤린 줄기세포 바이러스(MSCV), 비장 병소 형성 바이러스(SFFV), 또는 아데노-연관 바이러스(AAV)로부터 유래한 레트로바이러스 벡터를 가질 수 있다. 대부분의 레트로바이러스 벡터는 뮤린 레트로바이러스로부터 유래한다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 임의의 조류 또는 포유류 세포 공급원으로부터 유래한 것을 포함한다. 레트로바이러스는 통상적으로 양쪽성이며, 이는 이들이 인간을 포함하는 여러 종의 숙주 세포를 감염시킬 수 있음을 의미한다. 하나의 구현예에서, 발현될 유전자는 레트로바이러스 gag, pol 및/또는 env 서열을 대체한다. 다수의 예시적 레트로바이러스 시스템이 기재된 바 있다[예를 들어 미국 특허 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; 문헌 「Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1 :5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; and Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3 : :102-109」 참조].

[0338] 렌티바이러스 형질도입 방법은 공지되어 있다. 예시적 방법은, 예를 들어 문헌 「Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101 : :1637--1644; Verhoeyen et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; and Cavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505」 에 기재되어 있다.

- [0339] 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 전기천공을 통해 T 세포내로 전달된다[예를 들어 문헌 「Chicaybam et al., (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 and Van Tedeloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437」 참조]. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 트랜스포지션(transposition)을 통해 T 세포내로 전달된다[예를 들어 문헌 「Manuri et al. (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; and Huang et al., (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126」 참조]. 면역 세포에서 유전 물질을 도입하여, 발현시키는 다른 방법으로는 인산칼륨 형질주입[예를 들어 존 윌리 앤드 손(미국 뉴욕주 뉴욕 소재)의 「Current Protocols in Molecular Biology」에 기재된 바와 같음], 원형질체 융합, 양이온성 리포솜 매개 형질주입; 텡스텐 입자 촉진 미립자 충격[문헌 「Johnston, *Nature*, 346: 776-777(1990)」]; 및 스트론튬 인산염 DNA 공-침전[문헌 「Brash et al., *Mol Cell Biol*, 7: 2031-2034(1987)」 참조]을 포함한다.
- [0340] 재조합 산물을 암호화하는 핵산의 전달을 위한 다른 접근법 및 벡터에는, 예를 들어 국제공개공보 제 W02014/055668호 및 미국특허 제7,446,190호에 기재된 것들이 있다.
- [0341] 일부 구현예에서, 상기 조작, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입은 무혈청 배지 중에서 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 정의된 및/또는 잘 정의된 세포 배양 배지이다. 특정 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 처리된, 예를 들어 억제제 및/또는 성장 인자(growth factor)를 제거하도록 여과된 제어된 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 단백질을 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 혈청 알부민, 가수 분해물, 성장 인자, 호르몬, 담체 단백질 및/또는 부착 인자를 함유할 수 있다.
- [0342] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 자극된 세포는 형질도입 보조제(transduction adjuvant)의 존재하에서 형질도입되거나 또는 형질주입된 조작에 적용된다. 예시적인 형질도입 보조제는 제한되지는 않지만, 폴리양이온, 피브로넥틴 또는 피브로넥틴 유래 단편 또는 변이체, 및 렉트로넥틴(RetroNectin)을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 폴리양이온, 피브로넥틴 또는 피브로넥틴 유래 단편 또는 변이체, 및/또는 렉트로넥틴의 존재하에서 조작에 적용된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는, 폴리브렌, DEAE-텍스트란, 프로타민 설페이트, 폴리-L-리신, 또는 양이온성 리포솜인 폴리양이온의 존재하에서 조작에 적용된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 프로타민 설페이트의 존재하에서 조작에 적용된다.
- [0343] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 자극된 세포는 형질도입 보조제의 부재하에서 형질도입되거나 또는 형질주입된 조작에 적용된다. 따라서, 특정 구현예에서, 상기 세포는 폴리양이온, 피브로넥틴 또는 피브로넥틴 유래 단편 또는 변이체, 및 렉트로넥틴의 부재하에서 조작에 적용된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 폴리브렌인 폴리양이온, DEAE-텍스트란, 프로타민 설페이트, 폴리-L-리신, 또는 양이온성 리포솜의 부재하에서 조작에 적용된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 프로타민 설페이트의 부재하에서 조작에 적용된다.
- [0344] 일부 실시 양태에서, 세포, 예를 들어 T 세포는 예를 들어 세포 수용체 (TCR) 또는 키메라 항원 수용체(CAR)와 함께 활성화, 자극, 및/또는 증식도중 또는 후에 형질도입될 수 있다. 바람직한 수용체 유전자의 도입을 위한 이러한 형질주입은 예를 들어 임의의 적합한 레트로바이러스 벡터로 수행될 수 있다. 유전적으로 변형된 세포 집단은 초기 자극(예를 들어 CD3/CD28 자극)으로부터 유리될 수 있고, 이어서 예를 들어 de novo 도입된 수용체를 통해 제 2 유형의 자극으로 자극될 수 있다. 이러한 제 2 유형의 자극은 펩티드/MHC 분자, 유전적으로 도입된 수용체의 동족 (가교) 리간드(예 : CAR의 천연 리간드) 또는 새로운 수용체의 골격 내에 직접 결합(예를 들어 수용체 내의 불변 영역을 인식함으로써)하는 임의의 리간드(항체와 같은)의 형태의 항원 자극을 포함할 수 있다[예를 들어 문헌 「Cheadle et al, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" *Methods Mol Biol*. 2012; 907:645-66」 또는 「Barrett et al., *Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine* Vol. 65: 333-347 (2014)」 참조].
- [0345] 일부 측면에서, 상기 세포들은 추가로 사이토카인 또는 다른 인자들의 발현을 촉진시키는 조작에 적용된다. 부가적인 핵산들 중에서도, 예를 들어 도입을 위한 유전자로는 예를 들어 전달된 세포의 생존능 및/또는 기능을 촉진함으로써 치료 효능을 향상시키는 것들; 예를 들어 생체내 생존 또는 국소화를 위해, 세포의 선별 및/또는 평가를 위한 유전자 마커를 제공하기 위한 유전자; 예를 들어 우세한(dominant) 양성 선별가능한 마커와 음성 선별가능한 마커를 융합시켜 유도된 이중기능성 선별가능한 융합 유전자의 사용에 관하여 설명된 문헌 「Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); and Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992)」; PCT/US91/08442 및 PCT/US94/05601, Lupton 등 참조]에 설명된 바와 같이 생체내 음성 선별에 민감한 세포를 만들어냄으로써, 안정성을 향상시키는 유전자를 들 수 있다[Lupton 등의 국제출원 제PCT/US91/08442호 및 PCT/US94/05601호의 공보, Riddell 등의 미국특허 제6,040,177호의 컬럼 14-17의 기재 참조].
- [0346] 일부 구현예에서, 상기 도입은 상기 재조합 단백질을 암호화하는 핵산 분자, 예를 들어 재조합 수용체와 조성물

의 하나 이상의 세포를 접촉시킴으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 접촉은 스피노큐레이션 (spinoculation)(예를 들어 원심 집중)으로 수행될 수 있다. 상기 방법은 국제공개공보 제W02016/073602호에 기술된 것 중의 임의의 것을 포함한다. 예시적인 원심 분리 챔버는 A-200/F 및 A-200 원심 분리 챔버 및 이러한 시스템과 함께 사용하기 위한 다양한 키트를 포함하여 Sepax® 및 Sepax® 2 시스템과 함께 사용되기 위한 것을 포함하여 바이오세이프 에스에이(Biosafe SA)사가 제조 및 판매하는 것을 포함한다. 예시적인 챔버, 시스템 및 처리 기기 및 캐비닛은 예를 들어 미국특허 제6,123,655호, 미국특허 제6,733,433호 및 미국특허출원공개 제US 2008/0171951호, 및 국제출원공개공보 제W000/38762호에 설명되어 있고, 이들 문헌의 내용은 그 전체가 본 발명에 참조로 인용된다. 이러한 시스템과 함께 사용하기 위한 예시적인 키트는 BioSafe SA사가 CS-430.1, CS-490.1, CS-600.1 또는 CS-900.2라는 제품명으로 판매하는 일회용 키트를 포함하지만 이에 한정되지는 않는다.

[0347] 일부 구현예에서, 상기 시스템은 시스템에서 수행되는 형질도입 단계 및 하나 이상의 다양한 다른 처리 단계, 예를 들어 본원에서 기술되거나 또는 국제공개공보 제W02016/073602호에 개시된 원심 분리 챔버 시스템 (centrifugal chamber system)으로 또는 그와 연결하여 수행될 수 있는 처리 단계의 양태를 조작, 자동화, 제어 및/또는 모니터링하기 위한 장비를 포함한 다른 장비에 함께 포함되거나 및/또는 관련될 수 있다. 일부 구현예에서 이러한 장비는 캐비닛 내에 포함된다. 일부 구현예에서, 장비는 제어 회로, 원심 분리기, 커버, 모터, 펌프, 센서, 디스플레이 및 사용자 인터페이스를 포함하는 하우징을 포함하는 캐비닛을 포함한다. 예시적인 기기는 미국특허 제6,123,655호, 미국특허 제6,733,433호, 및 미국특허출원 제2008/0171951호에 개시되어 있다.

[0348] 일부 구현예에서, 시스템은 일련의 용기, 예를 들어 백, 튜빙, 스톱 코크, 클램프, 커넥터 및 원심 분리 챔버를 포함한다. 일부 구현예에서, 백과 같은 용기는 형질도입된 세포 및 바이러스 벡터 입자를 동일한 용기 또는 별도의 용기 예를 들어 동일한 백 또는 별도의 백과 같은 하나 이상의 용기를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 시스템은 챔버 및/또는 다른 구성 요소로 인출되어 방법이 수행되는동안 성분 및/또는 조성물을 회석, 재순환 및/또는 세척하는 회석액 및/또는 세척액과 같은 배지를 함유하는 하나 이상의 용기 예를 들어 백을 더 포함한다. 용기는 투입 라인, 회석 라인, 세척 라인, 폐기물 라인 및/또는 산출 라인에 대응하는 위치와 같이 시스템 내 하나 이상의 위치에 연결될 수 있다.

[0349] 일부 구현예에서, 챔버는 그 회전축 주위와 같이 챔버의 회전을 수행 할 수 있는 원심 분리기와 연계된다. 회전은 상기 세포의 형질도입과 연결하여 및/또는 하나 이상의 다른 공정 단계에서 인큐베이션 전, 도중 및/또는 후에 발생할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 다양한 처리 단계 중 하나 이상이 예를 들어 소정의 힘으로 회전하여 수행된다. 챔버는 원심 분리 중에 챔버가 수직으로 위치하도록 전형적으로 수직 또는 일반적으로 수직 회전할 수 있고, 측벽과 축들은 수평 또는 일반적으로 수평이 되도록 단부 벽(들)에 대해 수직 또는 일반적으로 수직이다.

[0350] 일부 구현예에서, 세포를 함유하는 상기 조성물 및, 바이러스 벡터 입자, 및 선택적으로 공기를 함유하는 조성물은 상기 공동에 상기 조성물들을 제공하기 전에 조합 또는 혼합된다. 일부 구현예에서, 세포를 함유하는 상기 조성물 및, 바이러스 벡터 입자, 및 선택적으로 공기를 함유하는 조성물은 별도로 제공되어 상기 공동에서 조합 및 혼합된다. 일부 구현예에서, 세포를 함유하는 상기 조성물, 바이러스 벡터 입자, 및 선택적으로 공기를 함유하는 조성물은 상기 내부 공동에 임의의 순서로 제공될 수 있다. 이러한 일부 구현예 중의 임의의 것에서, 세포 및 바이러스 벡터 입자를 함유하는 상기 조성물은, 원심 챔버의 내부 또는 외부에서 조합 또는 혼합되는지 및/또는 세포 및 바이러스 벡터 입자들이 상기 원심 챔버에 함께 또는 별도로, 예를 들어 동시에 또는 순차적으로 제공되는지에 관계없이 일단 조합 또는 혼합되면 상기 투입 조성물이다.

[0351] 일부 구현예에서, 상기 형질도입 방법에서 상기 세포 및 바이러스 벡터 입자의 인큐베이션, 예를 들어 회전 이전에 가스, 예를 들어 공기의 부피 흡수가 일어난다. 일부 구현예에서, 상기 형질도입 방법에서 상기 세포 및 바이러스 벡터 입자의 인큐베이션, 예를 들어 회전 도중에 가스, 예를 들어 공기의 부피 흡수가 일어난다.

[0352] 일부 구현예에서, 상기 형질도입 조성물, 및 가스, 선택적으로는 공기의 부피를 보충하는 상기 세포 또는 바이러스 벡터 입자의 액체 부피는 예비 결정된 부피일 수 있다. 상기 부피는 상기 시스템과 관련된 회로로 프로그래밍되고/되거나 그에 의해서 제어되는 부피일 수 있다.

[0353] 일부 구현예에서, 상기 형질도입 조성물, 및 선택적으로는 가스, 예를 들어 공기의 흡수는, 원하는 또는 예비 결정된 부피가 상기 챔버의 내부 공동으로 흡수될 때까지 수동으로, 반자동으로 및/또는 자동으로 제어된다. 일부 구현예에서, 상기 시스템과 관련된 센서는 예를 들어 칼러, 유속 및/또는 밀도를 통해서 상기 원심 챔버로 및 그로부터의 액체 및/또는 가스 유동을 탐지할 수 있으며, 상기 원하는 또는 예비 결정된 부피의 흡수가 달성될 때까지 필요에 따라 그 흡수가 중단 또는 계속될 수 있도록 관련된 회로와 커뮤니케이션할 수 있다. 일부

측면에서, 상기 시스템에서 가스(공기)가 아닌 액체만을 탐지하도록 프로그래밍되거나 프로그래밍될 수 있는 센서는 흡수의 중단 없이 상기 시스템으로의 가스, 예를 들어 공기의 통과를 허용할 수 있다. 일부 이러한 구현예에서, 가스, 예를 들어 공기의 흡수가 필요한 경우 상기 센서의 근처에 불투명한 조각의 배관이 배치될 수 있다. 일부 구현예에서, 가스, 예를 들어 공기의 흡수는 수동으로 제어될 수 있다.

[0354] 상기 제공된 방법의 일부 측면에서, 상기 원심 챔버의 내부 동공은 고속 회전에 적용된다. 일부 구현예에서, 회전은 상기 액체 투입 조성물, 및 선택적으로는 공기의 흡수 이전에, 그와 동시에, 그 후에 또는 간헐적으로 수행된다. 일부 구현예에서, 회전은 상기 액체 투입 조성물, 및 선택적으로는 공기의 흡수 후에 수행된다. 일부 구현예에서, 회전은 (약) 또는 적어도 (약) 800g, 1000g, 1100g, 1500g, 1600g, 1800g, 2000g, 2200g, 2500g, 3000g, 3500g 또는 4000g의, 내부 공동의 측면의 내부 표면 및/또는 세포의 표면층에서의 상대 원심력에서의 상기 원심 챔버의 원심 분리에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 회전은 (약) 1100 g 초과, 예를 들어 (약) 1200 g 초과, 또는 (약) 1400 g 초과, (약) 1600 g 초과, (약) 1800 g 초과, (약) 2000 g 초과, (약) 2400 g 초과, (약) 2800 g 초과, (약) 3000 g 초과 또는 (약) 3200 g 초과인 원심력에서의 원심 분리에 의한 것이다. 일부 구현예에서, 회전은 (약) 1600 g의 원심력에서의 원심 분리에 의한 것이다.

[0355] 일부 구현예에서, 형질도입의 방법은 원심 챔버에서 약 5분 초과동안, 예를 들어 (약) 10분 초과, (약) 15분 초과, (약) 20분 초과, (약) 30분 초과, (약) 45분 초과, (약) 60분 초과, (약) 90분 초과 또는 (약) 120분 초과 동안의 상기 형질도입 조성물, 및 선택적으로 공기의 회전 또는 원심 분리를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 형질도입 조성물, 및 선택적으로 공기는 상기 원심 챔버에서 5분 초과이되, 60분 이하, 45분 이하, 30분 이하, 또는 15분 이하 동안 회전시키거나 또는 원심 분리시킨다. 특정 구현예에서, 상기 형질도입은 (약) 60분동안의 회전 또는 원심 분리를 포함한다.

[0356] 일부 구현예에서, 상기 형질도입의 방법은 상기 원심 챔버에서 (약) 10분 내지 (약) 60분, (약) 15분 내지 (약) 60분, (약) 15분 내지 (약) 45분, (약) 30분 내지 (약) 60분 또는 (약) 45분 내지 (약) 60분(각각을 포함)동안 및 적어도 또는 (약) 1000g, 1100g, 1200g, 1400g, 1500g, 1600g, 1800g, 2000g, 2200g, 2400g, 2800g, 3200 g 또는 3600 g 초과인 상기 내부 공동의 측면의 내부 표면에서 및 상기 세포의 표면층에서의 원심력에서 상기 형질도입 조성물, 및 선택적으로는 공기의 회전 또는 원심 분리를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 형질도입의 방법은 (약) 1600 g의 원심력에서 (약) 60분동안 상기 형질도입 조성물, 예를 들어 상기 세포 및 상기 바이러스 입자의 회전 또는 원심 분리를 포함한다.

[0357] 일부 구현예에서, 상기 챔버의 공중에서의 상기 가스, 예를 들어 공기는 상기 챔버로부터 배출된다. 일부 구현예에서, 상기 가스, 예를 들어 공기는 상기 원심 챔버를 갖는 폐쇄된 시스템의 일부로서 작동가능하게 연결된 용기로 배출된다. 일부 구현예에서, 상기 챔버의 공동에서의 상기 공기, 예를 들어 가스는 멸균 배관 라인을 통해서 상기 챔버의 내부 공동에 작동가능하게 연결된 필터를 통해서 배출된다. 일부 구현예에서, 상기 공기는 수동, 반자동 또는 자동 공정을 이용하여 배출된다. 일부 구현예에서, 상기 공기는, 인큐베이션된 세포 및 바이러스 입자를 함유하는 산출 조성물, 예를 들어 형질도입이 개시되었거나 세포가 바이러스 벡터에 형질도입된 세포를 발현하기 전에, 그와 동시에, 간헐적으로 또는 그 후에 상기 챔버의 공동으로부터 배출된다.

[0358] 일부 구현예에서, 상기 형질도입 및/또는 다른 인큐베이션은 연속식 또는 반-연속식(semi-continuous) 공정으로서 또는 그의 일부로서 수행된다. 일부 구현예에서, 연속식 공정은, 적어도 일부의 인큐베이션동안, 예를 들어 원심분리하는 동안 상기 용기로부터 상기 세포 및 바이러스 벡터 입자, 예를 들어 형질도입 조성물(단일 사전-존재(pre-existing) 조성물로서 또는 동일한 용기(vessel), 예를 들어 공동(cavity)으로 그의 부분들을 연속 플링하고, 그에 의해서 혼합함으로써)의 연속적 흡수, 및/또는 액체의 연속적 발현 또는 축출(continuous expression or expulsion), 및 선택적으로는 가스(예를 들어 공기)의 배출을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 연속적 흡수 및 연속적 발현은 적어도 부분적으로 동시에 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 연속적 흡수는 상기 인큐베이션의 일부동안, 예를 들어 상기 원심 분리의 일부동안 일어나며, 상기 연속적 발현은 상기 인큐베이션의 별도의 부분동안 일어난다. 상기 두가지는 교번될 수 있다. 따라서, 상기 인큐베이션을 수행하는 동안 상기 연속적 흡수 및 발현은 처리되는, 예를 들어 형질도입되는 샘플의 보다 큰 총 부피를 허용할 수 있다.

[0359] 일부 구현예에서, 상기 인큐베이션은, 상기 방법이 상기 챔버의 회전동안 및 상기 인큐베이션의 일부동안 상기 공동으로의 상기 형질도입 조성물의 연속적 흡수를 수행하고, 액체의 연속적 발현을 수행하며, 선택적으로는 상기 챔버의 회전동안 적어도 하나의 개구를 통해서 상기 공동으로부터 가스(예를 들어 공기)의 배출을 수행하는 것을 상기 인큐베이션의 적어도 일부동안 포함하는 연속식 공정의 일부이다.

[0360] 일부 구현예에서, 상기 반-연속식 인큐베이션은, 상기 공동으로의 상기 조성물의 흡수, 인큐베이션, 상기 공동

으로부터의 액체의 발현 및, 선택적으로 상기 공동으로부터 예를 들어 산출 용기로의 가스(예를 들어 공기)의 배출, 이어서 보다 많은 세포 및 예를 들어 바이러스 벡터 입자를 처리하고 그 공정을 반복하기 위한 다른 시약을 함유하는 후속(예를 들어 제 2, 제3 등) 조성물의 흡수를 교번하여 실시함으로써 수행된다. 예를 들어 일부 구현예에서, 상기 인큐베이션은 반-연속식 공정의 일부이며, 상기 방법은 상기 인큐베이션 전에 상기 적어도 하나의 개구를 통해서 상기 공동으로의 상기 형질도입 조성물의 흡수를 실시하고, 상기 공동으로부터의 유체의 발현을 실시하며; 상기 내부 공동으로의 세포 및 상기 바이러스 벡터 입자들을 포함하는 또다른 형질도입 조성물의 흡수; 및 상기 또다른 형질도입 조성물 중의 상기 세포가 상기 벡터에 형질도입되는 조건하에 상기 내부 동공에서 상기 또다른 형질도입 조성물을 인큐베이션하는 것을 포함한다. 상기 공정은 다수의 부가 라운드동안 반복적인 방식으로 계속될 수 있다. 이와 관련하여, 상기 반-연속식 또는 연속식 방법은 훨씬 반흔은 부피 및/또는 수의 세포를 허용할 수 있다.

[0361] 일부 구현예에서, 상기 형질도입 인큐베이션의 일부는 원심 챔버에서 수행되며, 이것은 회전 또는 원심 분리를 포함하는 조건하에서 수행된다.

[0362] 일부 구현예에서, 상기 방법은 상기 세포 및 바이러스 벡터 입자의 인큐베이션의 추가의 부분이 회전이나 원심 분리 없이 수행되는 인큐베이션을 포함하며, 이것은 일반적으로 상기 챔버의 회전 또는 원심 분리를 포함하는 인큐베이션의 적어도 일부에 이어서 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 추가의 인큐베이션은 상기 바이러스 벡터를 하나 이상의 세포의 숙주 게놈 내로 통합시키는 조건하에서 수행된다. 상기 인큐베이션이 바이러스 벡터 입자들이 숙주 게놈으로 통합되는지를 분석 또는 평가하는 것, 따라서 추가의 인큐베이션을 위해 상기 조건을 실험적으로 결정하는 것은 당업자의 수준 내에 있다. 일부 구현예에서, 숙주 게놈으로의 바이러스성 벡터의 통합은 인큐베이션 후 바이러스성 벡터 입자의 게놈에 함유된 핵산에 의해서 암호화된 재조합 단백질, 예를 들어 이중 단백질의 발현 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다. 친 화성-기반 방법, 예를 들어 유동 친화도 측정법과 같은 세포 표면 단백질과 관련한 면역친화성-기반 방법에 의한 검출과 같은 재조합 분자의 발현 수준을 평가하기 위한 다수의 널리 공지된 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 발현은 형질도입 마커 및/또는 리포터 구조물의 검출에 의해 측정된다. 일부 구현예에서, 절단된(truncated) 표면 단백질을 암호화하는 핵산은 벡터 내에 포함되어 그의 발현 및/또는 증진의 마커로서 사용된다.

[0363] 일부 구현예에서, 세포, 및 바이러스 입자를 포함하는 조성물은 일반적으로 비교적 낮은 힘 또는 속력으로, 예를 들어 세포를 펠릿화하기 위해 사용되는 속도보다 낮은 속도, 예를 들어 (약) 600 rpm 내지 (약) 1700 rpm(예를 들어 적어도 약 600 rpm, 1000 rpm, 또는 1500 rpm 또는 1700 rpm)로 회전될 수 있다. 일부 구현예에서, 회전은 예를 들어 챔버 또는 캐비티의 내벽 또는 외벽에서 측정된 약 100 g 내지 3200g(예를 들어 적어도 약 100g, 200g, 300g, 400g, 500g, 1000g, 1500g, 2000g, 2500g, 3000g 또는 3200g), 예를 들어, 상대적 원심력과 같은 힘으로 수행된다. "상대적 원심력" 또는 RCF라는 용어는 일반적으로 회전축과 비교하여 공간 내 특정 지점에서, 지구 중력에 상대적으로, 객체 또는 물질 (예를 들어 회전되는 챔버 또는 기타 컨테이너 내의 세포, 샘플, 또는 펠릿 및/또는 지점)에 가해지는 유효력으로 이해된다. 이러한 값은 중력, 회전 속도 및 회전 반경(RCR가 측정되는 위치의 객체, 물질 또는 입자와 회전축 간의 거리)을 고려하여 공지된 공식을 이용하여 결정될 수 있다.

[0364] 특정 구현예에서, 세포 및 바이러스 입자를 함유하는 조성물을 (약) 5 분 초과, (약) 10분 초과, (약) 15분 초과, (약) 20분 초과, (약) 30분 초과, (약) 45분 초과, (약) 60분 초과, (약) 90분 초과 또는 (약) 120분 초과; 또는 (약) 5분 내지 120분, 30분 내지 90분, 15분 내지 60분, 15분 내지 45분, 30분 내지 60분 또는 45분 내지 60분(각각을 포함)동안 회전시킨다. 일부 구현예에서, 상기 조성물을 (약) 60분동안 회전시킨다.

[0365] 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어 자극된 세포는 조작, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입도중에 (약) 1×10^7 개 세포/mL, 9×10^6 개 세포/mL, 8×10^6 개 세포/mL, 7×10^6 개의 세포/mL, 6×10^6 개 세포/mL, 5×10^6 개 세포/mL, 4×10^6 개 세포/mL, 또는 3×10^6 개 세포/mL 초과의 밀도로 배양된다. 일부 구현예에서, (약) 1×10^3 개 세포/mL (약) 내지 1×10^9 개 세포/mL, (약) 1×10^4 개 세포/mL (약) 내지 1×10^8 개 세포/mL, (약) 1×10^5 개 세포/mL (약) 내지 1×10^7 개의 세포/mL, 또는 (약) 5×10^5 개 세포/mL (약) 내지 1×10^7 개 세포/mL의 밀도로 조작에 적용시킨다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 (약) 5×10^5 개 세포/mL, 1×10^6 개 세포/mL, 2×10^6 개 세포/mL, 3×10^6 개 세포/mL, 4×10^6 개 세포/mL, 또는 5×10^6 개 세포/mL의 밀도로 조작에 적용시킨다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 (약) 1×10^6 개 세포/mL의 밀도로 조작에 적용시킨다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 상기 회전, 예를 들어 상기 세포

및 상기 바이러스 입자를 함유하는 조성물의 회전 후에 배양된다.

- [0366] 일부 구현예에서, 상기 세포를 조작하는 것은 벡터, 예를 들어 비-바이러스 벡터의 바이러스 벡터와의 배양, 접촉, 또는 인큐베이션을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 벡터와 세포를 배양, 접촉, 및/또는 인큐베이션하는 것은 (약) 적어도 4시간, 6시간, 8시간, 12시간, 16시간, 18시간, 24시간, 30시간, 36시간, 40시간, 48시간, 54시간, 60시간, 72시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 또는 7일동안, 또는 7일 초과동안 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 벡터와 세포를 배양, 접촉, 및/또는 인큐베이션하는 것은 유전자 조작 이전에 30분 내지 2시간, 1시간 내지 8시간, 6시간 내지 12시간, 12시간 내지 18시간, 16시간 내지 24시간, 18시간 내지 30시간, 24시간 내지 48시간, 24시간 내지 72시간, 42시간 내지 54시간, 60시간 내지 120시간, 96시간 내지 120시간, 90시간 및 1일 내지 7일, 3일 내지 8일, 1일 내지 3일, 4일 내지 6일, 또는 4일 내지 5일동안 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 (약) 18시간 내지 30시간동안 벡터와 배양, 접촉, 및/또는 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 (약) 24시간동안 벡터와 배양, 접촉, 및/또는 인큐베이션된다.
- [0367] 일부 구현예에서, 적어도 일부의 유전자 조작, 예를 들어 형질도입동안, 및/또는 상기 유전자 조작 이후에, 상기 세포는 유전자 조작된 세포의 배양을 위해서, 예를 들어 전술한 세포의 배양 또는 증폭을 위해서 바이오반응기 백 어셈블리(bioreactor bag assembly)로 옮긴다.
- [0368] 특정 구현예에서, 상기 세포는 하나 이상의 사이토카인의 존재하에 조작에 적용시킨다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 T 세포에 의해서 발현되고/되거나 T 세포에 내인성인 수용체에 결합하고/하거나 결합할 수 있는 것이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 사이토카인의 4-알파-헬릭스 다발 패밀리의 구성원이거나 그것을 포함한다. 일부 구현예에서, 사이토카인의 4-알파-헬릭스 다발 패밀리의 구성원은 제한되지는 않지만, 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-9(IL-9), 인터루킨-12(IL-12), 인터루킨-15(IL-15), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF) 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 IL-15이거나 그것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 IL-7이거나 그것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2이거나 그것을 포함한다.
- [0369] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 자극된 세포는 (약) 1 IU/mL 내지 (약) 1,000 IU/mL, (약) 10 IU/mL 내지 (약) 50 IU/mL, (약) 50 IU/mL 내지 (약) 100 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 200 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 500 IU/mL, (약) 250 IU/mL 내지 (약) 500 IU/mL, 또는 (약) 500 IU/mL 내지 (약) 1,000 IU/mL의 농도로 하나 이상의 사이토카인, 예를 들어 인간 재조합 사이토카인의 존재하에서 조작, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입에 적용시킨다.
- [0370] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 자극된 세포는 (약) 1 IU/mL 내지 (약) 500 IU/mL, (약) 10 IU/mL 내지 (약) 250 IU/mL, (약) 50 IU/mL 내지 (약) 200 IU/mL, (약) 50 IU/mL 내지 (약) 150 IU/mL, (약) 75 IU/mL 내지 (약) 125 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 200 IU/mL, 또는 (약) 10 IU/mL 내지 (약) 100 IU/mL의 농도로 IL-2, 예를 들어 재조합 IL-2의 존재하에서 조작, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입에 적용시킨다. 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어 자극된 세포 조성물의 자극된 세포 및/또는 세포는 (약) 50 IU/mL, 60 IU/mL, 70 IU/mL, 80 IU/mL, 90 IU/mL, 100 IU/mL, 110 IU/mL, 120 IU/mL, 130 IU/mL, 140 IU/mL, 150 IU/mL, 160 IU/mL, 170 IU/mL, 180 IU/mL, 190 IU/mL, 또는 100 IU/mL의 농도로 재조합 IL-2과 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 자극된 세포는 (약) 100 IU/mL의 재조합 IL-2, 예를 들어 인간 재조합 IL-2의 존재하에 인큐베이션된다.
- [0371] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 자극된 세포는 (약) 100 IU/mL 내지 (약) 2,000 IU/mL, (약) 500 IU/mL 내지 (약) 1,000 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 500 IU/mL, (약) 500 IU/mL 내지 (약) 750 IU/mL, (약) 750 IU/mL 내지 (약) 1,000 IU/mL, 또는 (약) 500 IU/mL 내지 (약) 700 IU/mL의 농도로 IL-7, 예를 들어 인간 재조합 IL-7의 존재하에서 조작, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입에 적용시킨다. 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어 자극된 세포는 (약) 50 IU/mL, 100 IU/mL, 150 IU/mL, 200 IU/mL, 250 IU/mL, 300 IU/mL, 350 IU/mL, 400 IU/mL, 450 IU/mL, 500 IU/mL, 550 IU/mL, 600 IU/mL, 650 IU/mL, 700 IU/mL, 750 IU/mL, 800 IU/mL, 750 IU/mL, 750 IU/mL, 또는 1,000 IU/mL의 농도로 IL-7로 조작, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입된다. 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어 자극된 세포는 (약) 600 IU/mL의 IL-7의 존재하에서 인큐베이션된다.
- [0372] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 자극된 세포는 (약) 1 IU/mL 내지 (약) 500 IU/mL, (약) 10 IU/mL 내지 (약) 250 IU/mL, (약) 50 IU/mL 내지 (약) 200 IU/mL, (약) 50 IU/mL 내지 (약) 150 IU/mL, (약) 75 IU/mL 내

지 (약) 125 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 200 IU/mL, 또는 (약) 10 IU/mL 내지 (약) 100 IU/mL의 농도로 IL-7, 예를 들어 인간 재조합 IL-7의 존재하에서 조작, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입에 적용시킨다. 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 자극된 세포는 (약) 50 IU/mL, 60 IU/mL, 70 IU/mL, 80 IU/mL, 90 IU/mL, 100 IU/mL, 110 IU/mL, 120 IU/mL, 130 IU/mL, 140 IU/mL, 150 IU/mL, 160 IU/mL, 170 IU/mL, 180 IU/mL, 190 IU/mL, 또는 100 IU/mL의 농도로 재조합 IL-15로 인큐베이션된다. 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어 자극된 세포는 (약) 100 IU/mL의 재조합 IL-15의 존재하에서 인큐베이션된다.

[0373] 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어 자극된 세포는 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 존재하에 자극 조건하에 조작에 적용시킨다. 특정 구현예에서, 상기 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15는 재조합이다. 특정 구현예에서, 상기 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15는 인간이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 존재하에 자극 조건하에 조작, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입에 적용시킨다.

[0374] 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법은 재조합 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 바이러스 벡터를 300×10^6 개 미만의 세포, 예를 들어 자극된 세포 조성물의 세포로 형질 도입시키는 것과 관련하여 사용된다. 특정 구현예에서, (약) 100×10^6 개의 세포, 예를 들어 자극된 세포 조성물의 세포가 형질도입된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 생존 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 형질도입은 무혈청 배지 중에서 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 형질도입은 IL-2, IL-7, 및 IL-15의 존재하에서 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 자극된 세포 조성물의 세포는 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포인, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%의 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 형질도입은 24시간 내지 48시간, 36시간 내지 12시간, 18시간 내지 30시간동안, 또는 (약) 24시간동안 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 형질도입 단계는 인큐베이션, 예를 들어 자극 조건하의 인큐베이션의 시작 또는 개시후 2일 이내, 36시간 이내, 또는 30시간 이내에 개시된다.

[0375] **1. 형질도입을 위한 바이러스 벡터 입자의 제조**

[0376] 바이러스 벡터 계놈은 전형적으로 패키징 또는 생산자 세포주에 형질주입될 수 있는 플라스미드 형태로 구축된다. 이들 구체예 중의 어느 것에서, 재조합 단백질, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 바이러스 벡터의 영역, 예를 들어 바이러스 계놈의 비필수 영역에 삽입되거나 위치된다. 일부 구현예에서, 상기 핵산은 특정 바이러스 서열 대신 바이러스 계놈에 삽입되어 복제 결함이 있는 바이러스를 생성한다.

[0377] 계놈이 바이러스 벡터 계놈의 RNA 카피를 함유하는 레트로바이러스 입자를 생산하기 위해 임의의 다양한 공지된 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스-기반 유전자 전달 시스템을 만드는 데는 적어도 2가지 성분, 즉: 첫째로, 바이러스 벡터 입자를 생성시키는데 필요한 효소뿐만 아니라 구조 단백질을 포함하는 패키징 플라스미드 및 둘째로, 바이러스 벡터 자체, 즉 전달하고자 하는 유전 물질이 관여한다. 바이오안전성 안전장치는 이들 성분 중 어느 하나 또는 양자 모두의 설계시 도입될 수 있다.

[0378] 일부 구현예에서, 패키징 플라스미드는 HIV-1과 같은 모든 레트로바이러스, 엔벨롭 단백질 이외의 단백질을 함유할 수 있다(Naldini et al, 1998) 다른 구현예에서, 바이러스 벡터는 바이러스 독성(virulence)과 관련된 것들과 같은, 부가적인 바이러스 유전자, 예를 들어 vpr, vif, vpu 및 nef 및/또는 Tat, HIV의 주요 트랜스 액티베이터를 결여할 수 있다. 일부 구현예에서, HIV-기반 렌티바이러스 벡터와 같은 렌티바이러스 벡터는 재조합을 통해 야생형 바이러스의 재구성 가능성을 감소 시키거나 제거하는 gag, pol 및 rev와 같은 부모 바이러스의 단지 3 개의 유전자 만을 포함한다.

[0379] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터 계놈은 바이러스 벡터 계놈으로부터 전사된 바이러스 계놈 RNA를 바이러스 입자로 패키징하는데 필요한 모든 성분을 함유하는 패키징 세포주에 도입된다. 또는, 바이러스 벡터 계놈은 관심 있는 하나 이상의 서열, 예를 들어 재조합 핵산에 부가하여 바이러스 성분을 암호화하는 하나 이상의 유전자를 포함할 수 있다. 그러나, 일부 측면에서, 표적 세포에서 계놈의 복제를 방지하기 위해, 복제에 필요한 내인성 바이러스 유전자를 제거하고 패키징 세포주에 별도로 제공한다.

[0380] 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 입자를 생성시키는데 필요한 성분을 함유하는 하나 이상의 플라스미드 벡터로 형질주입된다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 LTR, 시스-작용 패키징 서열 및 관심 서열, 즉 CAR과 같은 항원 수용체를 암호화하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터 계놈을 함유하는 플라스미드; 및 Gag, pol 및/또는 rev와 같은 바이러스 효소 및/또는 구조 성분을 암호화하는 하나 이상의 헬퍼 플라스미드에 의해 형질주입된다. 일부 구현예에서, 다수의 벡터가 레트로바이러스 벡터 입자를 생성시키는 다양한 유전 성분을 분리하는데

이용된다. 일부 이러한 구현예에서, 개별적인 벡터를 패키징 세포에 제공하는 것은 그렇지 않으면 복제능 바이러스를 생성하는 제조함 이벤트의 기회를 감소시킨다. 일부 구현예에서, 모든 레트로바이러스 성분을 갖는 단일 플라스미드 벡터를 사용할 수 있다.

[0381] 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터 입자와 같은 레트로바이러스 벡터 입자는 숙주 세포의 형질도입 효율을 증가시키기 위해 슈도타입화된다. 예를 들어 렌티바이러스 벡터 입자와 같은 레트로바이러스 벡터 입자는 일부 구현예에서, 형질도입될 수 있는 세포 유형을 증폭시키는 넓은 세포 숙주 범위를 제공하는 VSV-G 당단백질로 슈도타입화된다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 비-천연 엔벨롭 당단백질, 예를 들어 제노트로픽, 폴리트로픽 또는 암포트로픽 엔벨롭, 예를 들어 신드비스 바이러스 엔벨롭, GALV 또는 VSV-G를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 또는 플라스미드에 의해 형질주입된다.

[0382] 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 바이러스 게놈 RNA를 렌티바이러스 벡터 입자로 패키징하기 위해 트랜스에서 요구되는 바이러스 조절 및 구조 단백질을 포함하는 성분을 제공한다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 렌티바이러스 단백질을 발현하고 기능성 렌티바이러스 벡터 입자를 생성할 수 있는 임의의 세포주 일 수 있다. 일부 측면에서, 적합한 패키징 세포주로는 293 (ATCC CCL X), 293T, HeLa (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) 및 Cf2Th (ATCC CRL 1430) 세포를 들 수 있다.

[0383] 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 바이러스 단백질(들)을 안정하게 발현한다. 예를 들어 일부 측면에서, gag, pol, rev 및/또는 다른 구조 유전자를 함유하지만 LTR 및 패키징 성분이 없는 패키징 세포주를 구축할 수 있다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 이중 단백질을 암호화하는 핵산 분자 및/또는 엔벨롭 당단백질을 코딩하는 핵산을 함유하는 바이러스 벡터 게놈과 함께 하나 이상의 바이러스 단백질을 암호화하는 핵산 분자로 일시적으로 형질주입될 수 있다.

[0384] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터 및 패키징 및/또는 헬퍼 플라스미드는 형질전환 또는 감염을 통해 패키징 세포주에 도입된다. 패키징 세포주는 바이러스 벡터 게놈을 포함하는 바이러스 벡터 입자를 생성한다. 형질주입 또는 감염에 대한 방법은 잘 알려져있다. 비제한적인 예로는 인산 칼슘, DEAE-텍스트란 및 리포펙션 방법, 전기천공 및 미세 주입을 들 수 있다.

[0385] 제조함 플라스미드 및 레트로바이러스 LTR 및 패키징 서열이 (예를 들어 칼슘 포스페이트 침전에 의해) 특정 세포주에 도입될 때, 패키징 서열은 제조함 플라스미드의 RNA 전사체가 바이러스 입자 내로 패키징되도록 허용할 수 있고, 이어서 이것은 배양 배지 내로 분비될 수 있다. 일부 구현예에서 제조함 레트로바이러스를 함유하는 배지를 수집하고, 선택적으로 농축시키고, 유전자 전달에 사용한다. 예를 들어 일부 측면에서, 패키징 플라스미드 및 전달 벡터의 패키징 세포주로의 동시형질전환(cotransfection) 후에, 바이러스 벡터 입자를 배양 배지로부터 회수하고 당업자가 사용하는 표준 방법으로 역가를 측정한다.

[0386] 일부 구현예에서, 렌티바이러스 벡터와 같은 레트로바이러스 벡터는 렌티바이러스 입자의 생성을 허용하기 위한 플라스미드의 도입에 의해 예시적인 HEK 293T 세포주와 같은 패키징 세포주에서 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 패키징 세포는 형질주입되어 및/또는 gag 및 pol을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 항원 수용체, 예를 들어 CAR과 같은 제조함 수용체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 rev 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 선택적으로 및/또는 추가로 형질주입되고 및/또는 상기 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 일부 구현예에서, 패키징 세포주는 VSV-G와 같은 비-천연 엔벨롭 당단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 선택적으로 및/또는 추가로 형질주입되고 및/또는 상기 폴리뉴클레오티드를 함유한다. 이러한 일부 구현예에서, 예를 들어 HEK 293T 세포와 같은 세포를 형질주입한지 약 2일 후, 세포 상등액은 제조함 렌티바이러스 벡터를 포함하며, 회수하여 적정할 수 있다.

[0387] 회수 및/또는 생산된 레트로바이러스 벡터 입자는 기재된 방법을 사용하여 표적 세포를 형질도입하는데 사용될 수 있다. 일단 표적 세포에서, 바이러스 RNA는 역전사되고, 핵으로 유입되며, 숙주 게놈에 안정적으로 통합된다. 바이러스 RNA의 통합 후 1일 또는 2일 후에, 제조함 단백질, 예를 들어 CAR과 같은 항원 수용체가 검출될 수 있다.

[0388] **2. 비-바이러스성 벡터**

[0389] 일부 구현예에서, 제조함 핵산은 전기천공을 통해 T 세포내로 전달된다[예를 들어 문헌 「Chicaybam et al., (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 and Van Tedeloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437」 참조]. 일부 구현예에서, 제조함 핵산은 트랜스포지션(transposition)을 통해 T 세포내로 전달된다[예를 들어 문헌 「Manuri et al. (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74;

and Huang et al., (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126」 참조]. 면역 세포에서 유전 물질을 도입하여, 발현시키는 다른 방법으로는 인산칼륨 형질주입[예를 들어 존 윌리 앤드 손(미국 뉴욕주 뉴욕 소재)의 「Current Protocols in Molecular Biology」에 기재된 바와 같음], 원형질체 융합, 양이온성 리포솜 매개 형질주입; 텅스텐 입자 촉진 미립자 충격[문헌 「Johnston, Nature, 346: 776-777(1990)」]; 및 스트론튬 인산염 DNA 공-침전[문헌 「Brash et al., Mol Cell Biol, 7: 2031-2034(1987)」 참조]을 포함한다.

[0390] 제조합 산물을 암호화하는 핵산의 전달을 위한 다른 접근법 및 벡터에는, 예를 들어 국제공개공보 제 WO2014/055668호 및 미국특허 제7,446,190호에 기재된 것들이 있다.

[0391] 일부 구현예에서, 제조합 핵산은 트랜스포존을 통해 T 세포내로 전달된다. 트랜스포존(전이 인자)은 계놈 내에서 한 유전자좌에서 다른 유전자좌로 이동할 수 있는 DNA의 이동 가능한 분절이다. 상기 요소는 보수적인 "잘라 내기 및 붙여 넣기" 메커니즘을 통해 이동한다: 전위효소는 트랜스포존의 원래 위치에서 절제를 촉매하고 계놈의 다른 곳에서 재통합을 촉진한다. 전위효소가 다른 전위효소 유전자에 의해 제공된다면, 전위효소 결핍 요소가 이동될 수 있다. 따라서, 트랜스포존은 바이러스 형질 도입 시스템을 사용하지 않고 외래 DNA를 숙주 계놈내로 편입하기 위해 이용될 수 있다. 포유 동물 세포, 예를 들어 인간 1 차 백혈구와 함께 사용하기에 적합한 트랜스포존의 예는 슬리핑 뷰티 및 Piggybac을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다.

[0392] 트랜스포존-기반 형질주입은 전위효소 및 트랜스포존으로 구성된 2-성분 시스템이다. 일부 구현예에서, 시스템은 동반되는 전위효소에 의해 인식되는 역반복/직접 반복(IR/DR) 서열에 의해 측면 위치된 외래 DNA(본원에서 카고 DNA로도 지칭), 예를 들어 제조합 수용체를 암호화하는 유전자를 포함하도록 조작된 트랜스포존을 포함한다. 일부 구현예에서, 비바이러스 플라스미드는 프로모터의 제어 하에 전위효소를 암호화한다. 숙주 세포내로의 플라스미드의 형질주입은 전위효소의 일시적 발현을 초래하므로, 형질주입 후 초기 기간 동안, 전위효소는 계놈 DNA 내로 트랜스포존을 통합시키기에 충분한 수준으로 발현된다. 일부 구현예에서, 전위효소 자체는 계놈 DNA에 통합되지 않으므로, 전위효소의 발현은 시간이 지남에 따라 감소한다. 일부 구현예에서, 전위효소 발현은 상응하는 트랜스포존을 약 4시간 미만, 약 8시간 미만, 약 12시간 미만, 약 24시간 미만, 약 2일 미만, 약 3일 미만, 약 4일 미만, 약 5일 미만, 약 6일 미만, 약 7일 미만, 약 2주 미만, 약 3주 미만, 약 4주 미만, 약 8주 미만, 또는 약 8주 미만동안 통합하기에 충분한 수준으로 숙주 세포에 의해 발현된다. 일부 구현예에서, 숙주 계놈으로 도입된 카고 DNA는 적어도 숙주가 카고 DNA를 절제할 수 있는 내인성 전위효소를 발현하지 않기 때문에 이 후에 숙주 계놈으로부터 제거되지 않는다.

[0393] 슬리핑 뷰티(SB)는 연어류 계놈에 보유된 휴면 요소로부터 재구성된 트랜스포존의 Tc/1-마리너 슈퍼패밀리의 합성 구성원이다. SB 트랜스포존-기반 형질주입은 전위효소 및 TA 디뉴클레오티드에 정확한 통합을 초래하는 역반복/직접 반복(IR/DR) 서열을 함유하는 트랜스포존으로 구성된 2-성분 시스템이다. 트랜스포존은 IR/DR이 측면에 있는 관심있는 발현 카세트에 설계된다. SB 전위효소는 슬리핑 뷰티 트랜스포존의 IR에 위치한 특정 결합 부위에 결합한다. SB 전위효소는 촉매 효소(SB)에 대한 결합 부위를 보유하는 역전된 말단 반복에 의해 양쪽 측면에 위치된 카고 서열을 암호화하는 이동 요소인 트랜스포존의 통합을 매개한다. SB가 잘라 내기 및 붙여 넣기 메커니즘을 통해 TA 표적 디뉴클레오티드에서 척추 동물 염색체에 유전자 서열을 삽입할 때 안정적인 발현이 일어난다. 상기 시스템은 1 차 인간 말초 혈액 백혈구를 포함한 다양한 척추 동물 세포 유형을 조작하는데 사용되어 왔다. 일부 구현예에서, 세포는 카고 유전자, 예를 들어 SB IR 서열에 의해 측면 위치된 제조합 수용체 또는 CAR을 암호화하는 유전자를 포함하는 SB 트랜스포존과 접촉, 인큐베이션 및/또는 처리된다. 특정 구현예에서, 형질주입될 세포는 카고 유전자, 예를 들어 SB IR 서열에 의해 측면 위치된 CAR을 암호화하는 유전자를 포함하는 SB 트랜스포존을 포함하는 플라스미드와 접촉, 인큐베이션 및/또는 처리된다. 특정 구현예에서, 플라스미드는 SB IR 서열에 의해 측면 위치되지 않은 SB 전위효소를 암호화하는 유전자를 추가로 포함한다.

[0394] PiggyBac(PB)은 카고 DNA를 숙주, 예를 들어 인간의 계놈 DNA에 통합하는데 사용될 수 있는 또 다른 트랜스포존 시스템이다. PB 전위효소는 트랜스포존의 양쪽 말단에 위치한 PB 트랜스포존-특정 역위 말단 반복 서열(ITR)을 인식하고, 원래 위치로부터 내용물을 효과적으로 이동시키고 이를 TTA 염색체 부위로 효과적으로 통합시킨다. PB 트랜스포존 시스템은 PB 벡터에서 2 개의 ITR 사이에 관심 유전자가 표적 계놈으로 이동될 수 있게 한다. PB 시스템은 1 차 인간 세포를 포함하여 다양한 척추 동물 세포 유형을 조작하는데 사용되어 왔다. 일부 구현예에서, 형질주입될 세포는 카고 유전자, 예를 들어 PB IR 서열에 의해 측면 위치된 CAR을 암호화하는 유전자를 포함하는 PB 트랜스포존과 접촉, 인큐베이션 및/또는 처리된다. 특정 구현예에서, 형질주입될 세포는 카고 유전자, 예를 들어 PB IR 서열에 의해 측면 위치된 CAR을 암호화하는 유전자를 포함하는 PB 트랜스포존을 포함하는 플라스미드와 접촉, 인큐베이션 및/또는 처리된다. 특정 구현예에서, 플라스미드는 SB IR 서열에 의해 측면

위치되지 않은 SB 전위효소를 암호화하는 유전자를 추가로 포함한다.

[0395] 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 사용된 트랜스포존/전위효소의 다양한 요소, 예를 들어 SB 또는 PB 벡터(들)는 제한 효소 절단, 결찰 및 분자 클로닝의 표준 방법에 의해 생산될 수 있다. 본 발명의 벡터를 구성하기 위한 하나의 프로토콜은 다음 단계를 포함한다. 먼저, 원하는 성분 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라 외부 서열을 함유하는 정제된 핵산 단편은 초기 공급원, 예를 들어 전위효소 유전자를 포함하는 벡터로부터 제한 엔도뉴클레아제로 절단된다. 이어서, 원하는 뉴클레오티드 서열을 함유하는 단편은 통상적인 분리 방법을 사용하여, 예를 들어 아가로스 겔 전기 영동에 의해 상이한 크기의 원치 않는 단편으로부터 분리된다. 원하는 단편은 겔로부터 절제되고, 원하는 서열, 예를 들어 상기 기재된 바와 같은 대상체 벡터의 다양한 요소에 상응하는 서열을 함유하는 원형 핵산 또는 플라스미드가 생산되도록 적절한 배치로 함께 결찰된다. 원하는 경우, 상기 구성된 원형 분자는 이어서 원핵 생물 숙주, 예를 들어 대장균에서 증폭된다. 상기 단계에 수반되는 절단, 플라스미드 구축, 세포 형질 전환 및 플라스미드 생산 절차는 당업자에게 널리 공지되어 있고 제한 및 결찰에 필요한 효소는 상업적으로 이용 가능하다[예를 들어 문헌 「R. Wu, Ed., Methods in Enzymology, Vol. 68, Academic Press, N.Y. (1979)」; 「T. Maniatis, E. F. Fritsch and J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1982)」; 「Catalog 1982-83, New England Biolabs, Inc.」; 「Catalog 1982-83, Bethesda Research Laboratories, Inc.」 참조]. 본 발명의 방법에 사용된 벡터를 구성하는 방법의 예는 하기 실험 섹션에 제공된다. 대표적인 슬리핑 뷰티 트랜스포존 시스템의 제조는 또한 국제공개공보 제W098/40510호 및 제W099/25817호에 개시되어 있다.

[0396] 일부 구현예에서, 트랜스포존에 의한 형질 도입은 전위효소 유전자를 포함하는 플라스미드 및 전위효소에 의해 인식되는 역위 반복/직접 반복(IR/DR) 서열에 의해 측면 위치된 카고 DNA 서열을 함유하는 트랜스포존을 포함하는 플라스미드로 수행된다. 특정 구현예에서, 카고 DNA 서열은 이중 단백질, 예를 들어 재조합 T 세포 수용체 또는 CAR을 암호화한다. 일부 구현예에서, 플라스미드는 전위효소 및 트랜스포존을 포함한다. 일부 구현예에서, 전위효소는 편재하는 프로모터 또는 표적 세포에서 전위효소의 발현을 유도하기에 적합한 임의의 프로모터의 제어 하에 있다. 편재하는 프로모터는 EF1a, CMB, SV40, PGK1, Ubc, 인간 β-액틴, CAG, TRE, UAS, Ac5, CaMKIIa 및 U6을 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다. 일부 구현예에서, 카고 DNA는 카고 DNA가 게놈 DNA 내로 안정적으로 통합된 세포의 선별을 허용하는 선별 카세트를 포함한다. 적합한 선별 카세트는 카나마이신 내성 유전자, 스펙티노마이신 내성 유전자, 스트렙토마이신 내성 유전자, 암피실린 내성 유전자, 카베니실린 내성 유전자, 히그로마이신 내성 유전자, 블레오마이신 내성 유전자, 에리스로마이신 내성 유전자 및 폴리믹신 B 내성 유전자를 암호화하는 선별 카세트를 포함하지만, 이에 제한되지는 않는다.

[0397] 일부 구현예에서, 트랜스포존, 예를 들어 SB 전위효소 및 SB 트랜스포존을 포함하는 플라스미드에 의한 형질 도입을 위한 성분이 표적 세포내로 도입된다. 임의의 편리한 프로토콜이 사용될 수 있으며, 여기서 상기 프로토콜은 표적 세포의 위치에 따라 시스템 성분을 표적 세포로 시험관내 또는 생체 내 도입하기 위해 제공될 수 있다. 예를 들어 표적 세포가 분리된 세포인 경우, 시스템은 예를 들어 표준 형질 전환 기술을 사용하여 표적 세포의 생존을 허용하는 세포 배양 조건 하에서 세포로 직접 도입될 수 있다. 상기 기술은 바이러스 감염, 형질 전환, 컨주게이션, 원형질 융합, 전기 천공, 입자 총 기술, 인산 칼슘 침전, 직접 미세 주사, 바이러스 벡터 전달 및 이와 유사한 것을 포함하지만, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다. 방법의 선별은 일반적으로 형질 전환되는 세포의 유형 및 형질 전환이 일어나는 환경(즉, 시험관내, 생체 외 또는 생체 내)에 의존한다. 상기 방법들에 대한 일반적인 논의는 문헌 「Ausubel, et al, Short Protocols in Molecular Biology, 3rd ed., Wiley & Sons, 1995」에서 찾을 수 있다.

[0398] 일부 구현예에서, SB 트랜스포존 및 SB 전위효소 공급원은 트랜스포존을 운반하는 벡터로부터 역위 반복 측면 핵산의 절제 및 절제된 핵산을 표적 세포의 게놈 내로 이어서 통합시키기에 충분한 조건 하에서 다세포 유기체, 예를 들어 포유 동물 또는 인간의 표적 세포내로 도입된다. 일부 구현예는 필수 전위효소 활성이 도입된 트랜스포존과 함께 표적 세포에 존재하는 것을 보장하는 단계를 추가로 포함한다. 트랜스포존 벡터 자체의 구조, 즉 벡터가 전위효소 활성을 갖는 생성물을 코딩하는 영역을 포함하는지 여부에 따라, 방법은 필수 전위효소 활성을 암호화하는 제 2 벡터를 표적 세포내로 도입하는 단계를 추가로 포함 할 수 있다.

[0399] 일부 구현예에서, 트랜스포존을 포함하는 벡터 핵산의 양 및 세포내로 도입되는 전위효소를 암호화하는 벡터 핵산의 양은 표적 세포 게놈 내로 트랜스포존 핵산의 원하는 절제 및 삽입을 제공하기에 충분한 양이다. 이와 같이, 도입된 벡터 핵산의 양은 충분한 양의 전위효소 활성 및 표적 세포내로 삽입되기를 원하는 충분한 카피수의 핵산을 제공해야 한다. 표적 세포내로 도입되는 벡터 핵산의 양은 사용되는 특정 도입 프로토콜, 예를 들어 사

용되는 특정 생체 외 투여 프로토콜의 효율에 따라 변한다.

[0400] 벡터 DNA가 필수 전위효소와 조합하여 표적 세포로 들어가면, 역위 반복에 의해 측면 위치한 벡터의 핵산 영역, 즉 역위 반복으로 인식된 슬리핑 뷰티 전위효소 사이에 위치한 벡터 핵산이 제공된 전위효소를 통해 벡터로부터 절제되고 표적 세포의 게놈에 삽입된다. 이와 같이, 벡터 DNA의 표적 세포로의 도입은 이어서 전위효소 매개된 절제 및 표적 세포의 게놈으로 벡터에 의해 운반된 외인성 핵산의 삽입이 뒤따른다. 특정 구현예에서, 벡터는 SB 트랜스포존 및/또는 SB 전위효소로 형질주입된 세포의 (약) 1% 이상, (약) 2% 이상, (약) 3% 이상, (약) 4% 이상, (약) 5% 이상, (약) 6% 이상, (약) 7% 이상, (약) 8% 이상, (약) 9% 이상, (약) 10% 이상, 15% 이상 또는 20% 이상이 게놈으로 통합된다. 일부 구현예에서, 표적 세포 게놈 내로의 핵산의 통합은 안정적이다, 즉 벡터 핵산은 일시적인 기간 이상 동안 표적 세포 게놈에 존재한 채 유지되며 염색체 유전 물질의 일부에서 표적 세포의 자손으로 전달된다.

[0401] 특정 구현예에서, 트랜스포존은 다양한 크기의 핵산, 즉 폴리뉴클레오티드를 표적 세포 게놈에 통합시키는데 사용된다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법을 사용하여 표적 세포 게놈에 삽입되는 DNA의 크기는 (약) 01 kb 내지 200 kb, (약) 05kb 내지 100 kb, (약) 10 kb 내지 (약) 80 kb, (약) 10 내지 (약) 200 kb, (약) 10 내지 (약) 10 kb, (약) 10 kb 내지 (약) 50 kb, (약) 50 kb 내지 (약) 100 kb 또는 (약) 100 kb 내지 (약) 200 kb 범위이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법을 사용하여 표적 세포 게놈에 삽입되는 DNA의 크기는 10 kb 내지 80 kb 또는 (약) 10 kb 내지 (약) 80 kb의 범위이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법을 사용하여 표적 세포 게놈에 삽입되는 DNA의 크기는 (약) 10 내지 (약) 200 kb의 범위이다. 특정 구현예에서, 본 발명의 방법을 사용하여 표적 세포 게놈에 삽입되는 DNA의 크기는 (약) 10 kb 내지(약) 80 kb의 범위이다.

[0402] **D. 세포의 배양 및/또는 증폭**

[0403] 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법은 예를 들어 증식 및/또는 증폭을 촉진하는 조건하에 세포를 배양하는 것에 의해서 세포를 배양하기 위한 하나 이상의 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 조작된 CD4+ 및 CD8+ T 세포는, 예를 들어 형질도입 또는 형질주입에 의해서 세포에 폴리캡티드를 도입하여 세포를 유전자 조작하는 것에 이어서 증식 및/또는 증폭을 촉진하는 조건하에 배양된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는, 상기 세포가 자극 조건하에 인큐베이션되고/되거나 상기 세포가 재조합 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드로 형질도입 또는 형질주입된 후 배양된다. 일부 구현예에서, 상기 배양은 배양된 세포를 생성한다. 특정 구현예에서, 상기 배양은 배양된 조성물, 예를 들어 배양된 세포의 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 공정 단계는 상기 단리된 세포, 예를 들어 선별된 세포 집단을 자극하는 단계를 포함한다. 상기 인큐베이션은 유전자 조작, 예를 들어 본원에서 기술된, 예를 들어 섹션 I-C에서 기술된 형질도입 방법의 구현예로부터 결과하는 유전자 조작 이전이거나 그와 관련될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 자극은 예를 들어 형질도입 전에 세포의 활성화 및/또는 증식을 일으킨다.

[0404] 특정 구현예에서, 세포, 및/또는 조작된 T 세포의 조성물은, 예를 들어 본원에 제공된, 예를 들어 섹션 I-E에 제공된 방법에 의해서 상기 세포를 수거 및 제형화하기 전에, 예를 들어 증폭 및/또는 증식을 촉진하는 조건하에 배양된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는, 예를 들어 섹션 I-C에 제공된 임의의 방법에 의해서 조작, 형질도입, 및/또는 형질주입된 후 배양된다. 특정 구현예에서, 상기 조작된 조성물은 미리 저온 동결되고 저장되며, 상기 배양 이전에 해동된다.

[0405] 특정 구현예에서, 세포의 조성물이 배양된다. 특정 구현예에서, 상기 조성물의 세포의 약 또는 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 98%, 적어도 (약) 99%, 적어도 (약) 99.5%, 적어도 (약) 99.9%, 또는 적어도 (약) 100%는 T CD3+ 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 조성물의 세포의 약 또는 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 98%, 적어도 (약) 99%, 적어도 (약) 99.5%, 적어도 (약) 99.9%, 또는 적어도 (약) 100%는 CD4+ 또는 T CD3+ 세포이다.

[0406] 일부 구현예에서, 조작, 형질주입, 및/또는 형질도입을 진행하거나 또는 진행한 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%가 배양된다. 특정 구현예에서, 조작, 형질주입, 및/또는 형질도입을 진행하거나 또는 진행한 세포의 전부 또는 거의 전부가 배양된다.

[0407] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 조작된 세포는 (약) 또는 적어도 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400

mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL, 1,000 mL, 1,200 mL, 1,400 mL, 1,600 mL, 1,800 mL, 2,000 mL, 2,200 mL, 또는 2,400 mL의 배지의 부피에서 배양된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 나중에 상이한 부피로 조정되는 초기 부피에서 배양된다. 특정 구현예에서, 상기 부피는 배양도중에 추후 조정된다. 특정 구현예에서, 상기 부피는 배양도중에 초기 부피에서 증가한다. 특정 구현예에서, 상기 부피는 상기 세포가 배양도중에 일정 밀도를 달성할 때 증가한다. 특정 구현예에서, 상기 초기 부피는 (약) 500 mL이다.

[0408] 특정 구현예에서, 상기 부피는, 상기 세포가 배양도중에 일정 밀도 또는 농도를 달성할 때 초기 부피에서 증가한다. 특정 구현예에서, 상기 부피는, 상기 세포가 (약) 또는 적어도 (약) 0.1×10^6 개 세포/mL, 0.2×10^6 개 세포/mL, 0.4×10^6 개의 세포/m, 0.6×10^6 개 세포/mL, 0.8×10^6 개 세포/mL, 1×10^6 개 세포/mL, 1.2×10^6 개 세포/mL, 1.4×10^6 개의 세포/m, 1.6×10^6 개 세포/mL, 1.8×10^6 개 세포/mL, 2.0×10^6 개 세포/mL, 2.5×10^6 개 세포/mL, 3.0×10^6 개의 세포/m, 3.5×10^6 개 세포/mL, 4.0×10^6 개 세포/mL, 4.5×10^6 개 세포/mL, 5.0×10^6 개 세포/mL, 6×10^6 개의 세포/m, 8×10^6 개 세포/mL, 또는 10×10^6 개 세포/mL, 또는 그들의 생존 세포의 밀도 및/또는 농도를 달성할 때 증가한다. 일부 구현예에서, 상기 밀도 및/또는 농도는 배양물 중의 생존 세포에 대한 것이다. 일부 구현예에서, 상기 부피는, 상기 세포가 적어도 또는 (약) 0.6×10^6 개 세포/mL를 달성할 때 초기 부피에서 증가한다.

[0409] 일부 구현예에서, 상기 세포는 일정 밀도 및/또는 농도를 달성하고, 상기 부피는 (약) 또는 적어도 (약) 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL, 1,000 mL, 1,200 mL, 1,400 mL, 1,600 mL, 1,800 mL, 2,000 mL, 2,200 mL 또는 2,400 mL까지 증가한다. 특정 구현예에서, 상기 부피는 (약) 또는 적어도 (약) 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL, 1,000 mL, 1,200 mL, 1,400 mL, 1,600 mL, 1,800 mL, 2,000 mL, 2,200 mL 또는 2,400 mL로 증가한다. 특정 구현예에서, 상기 부피는 1,000 mL로 증가한다. 특정 구현예에서, 상기 부피는 매 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10분당 (약) 또는 적어도 (약) 5 mL, 10 mL, 20 mL, 25 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 75 mL, 80 mL, 90 mL, 또는 100 mL의 속도로 증가한다.

[0410] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 조작된 세포는 약 500 mL의 부피로 초기에 배양된다. 특정 구현예에서, 상기 부피는 상기 세포가 배양도중 0.6×10^6 개 세포/mL의 밀도 또는 농도에 도달할 때 1,000 mL로 증가한다.

[0411] 일부 구현예에서, 상기 배양은 무혈청 배지 중에서 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 정의된 및/또는 잘 정의된 세포 배양 배지이다. 특정 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 처리된, 예를 들어 억제제 및/또는 성장 인자(growth factor)를 제거하도록 여과된 제어된 배양 배지이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 단백질을 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 혈청 알부민, 가수 분해물, 성장 인자, 호르몬, 담체 단백질 및/또는 부착 인자를 함유할 수 있다.

[0412] 일부 구현예에서, 제공된 방법은 증폭 및/또는 증식을 촉진하는 조건하에서 세포를 배양하는 단계와 관련하여 사용된다. 이러한 조건은 항원 노출 모방, 및/또는 예를 들면 재조합 항원 수용체 도입과 같은 유전자 조작을 위한 세포 프라임을 위해, 집단에서 세포의 증식, 증폭, 활성화 및/또는 생존을 유도하도록 설계된 것들을 포함한다.

[0413] 일부 구현예에서, 배양 조건은 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 물질, 예를 들어 영양물질, 아미노산, 항생제, 이온, 및/또는 자극 인자, 예를 들어 사이토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체, 및 세포 활성화를 위해 설계된 기타 물질 중 1가지 이상을 포함할 수 있다.

[0414] 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은 상기 배양에 이어서 및/또는 그 후에 상기 세포로부터 제거 및/또는 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 상기 배양에 이어서 및/또는 그 후에 및 세포를 제형화하기 전에, 예를 들어 배양된 산출 세포의 산출 조성물을 제형화한 후에 상기 세포로부터 제거 및/또는 분리된다. 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은 본원에, 예를 들어 섹션 I-B-1에 기술되는 자극 시약이다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 본원에, 예를 들어 섹션 I-B-2에 기술되는 세포로부터 제거 및/또는 분리된다.

[0415] 상기 조건은 하나 이상의 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 제제, 예를 들어 영양물질, 아미노산, 항생제, 이온, 및/또는 자극 요소, 예를 들어 사이토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체, 및 상기 세포를 활성화하도록 설계된 임의의 다른 제제를 포함할 수 있다.

- [0416] 몇몇 측면에서, 인큐베이션은 Riddell 등의 미국특허 제6,040,177호, 문헌 「Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651-660」, 「Klebanoff et al.(2012) J Immunother. 35(9): 651-660」, 「Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82」 및/또는 「Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701」에 설명된 기술에 따라 수행된다.
- [0417] 일부 구현예에서, 상기 배양의 적어도 일부는 예를 들어 국제공개공보 제W02016/073602호에 기술된 바와 같이 원심 챔버의 내부 공동에서, 예를 들어 원심 회전하에 수행된다. 일부 구현예에서, 원심 챔버에서 수행된 상기 인큐베이션의 적어도 일부는 자극 및/또는 활성화를 유도하는 시약(들)과 혼합하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 선별된 세포는 상기 원심 챔버 중에서 자극 조건 또는 자극제와 혼합된다. 이러한 공정의 일부 측면에서, 일정 부피의 세포는, 세포 배양관 또는 다른 시스템에서 유사한 자극을 수행할 때 정상적으로 사용되는 것 보다 훨씬 적은 양의 하나 이상의 자극 조건 또는 제제와 혼합된다.
- [0418] 일부 구현예에서, 상기 자극제는, 선별이 원심 챔버에서, 예를 들어 주기적으로 웨이킹(shaking)하거나 회전하는 튜브 또는 백에서 동일한 수의 세포 또는 동일한 부피의 세포의 선별의 동일하거나 유사한 선별 효율을 달성하기 위해 전형적으로 사용되거나 필요한 자극제의 양과 비교하여 실질적으로 적은 양(예를 들어 상기 양의 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 또는 80% 이하)으로 챔버의 공동(chamber)의 세포에 첨가된다. 일부 구현예에서, 상기 배양(cultivation)은, 예를 들어 10 mL 내지 2,000 mL, 예를 들어 적어도 또는 적어도 약 또는 (약) 10 mL, 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL, 100 mL, 150 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL, 1,000 mL, 1,200 mL, 1,400 mL, 1,600 mL, 1,800 mL, 2,000 mL, 2,200 mL 또는 2,400 mL의 표적 부피를 달성하기 위해 상기 세포 및 자극제에 배양 완충액(cultivation buffer)을 첨가하여 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 인큐베이션 완충액 및 자극제는 상기 세포에 분리하여 첨가된다. 일부 구현예에서, 상기 자극 인큐베이션은 주기적인 온화한 혼합 조건으로 수행되고, 이것은 에너지적으로 바람직한 상호작용을 촉진하는데 도움을 줄 수 있으며 그에 의해서 세포의 자극 및 활성화를 성취하면서 보다 적은 총괄 자극제의 사용을 허용한다.
- [0419] 일부 구현예에서, 상기 인큐베이션은, 예를 들어 스피닝(spining)의 존재하에서, 일반적으로는 비교적 적은 힘 또는 속도에서, 예를 들어 세포를 펠릿화하는 데 사용되는 속도보다 낮은 속도에서, 예를 들어 (약) 600 rpm 내지 (약) 1700 rpm (예를 들어 (약) 또는 적어도 600 rpm, 1000 rpm, 또는 1500 rpm 또는 1700 rpm), 예를 들어 약 80g 내지 100g(예를 들어 (약) 또는 적어도 80g, 85g, 90g, 95g, 또는 100g)의 챔버 또는 다른 용기의 샘플 또는 벽의 RCF에서, 혼합 조건하에 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 스피닝은 그러한 저속에서 스피닝의 반복된 간격을 이용하여 수행된 후, 휴지 기간(rest period)을 가지며, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10초의 스피닝 및/또는 휴지, 예를 들어 대략 1초 또는 2초의 스피닝에 대략 5, 6, 7, 또는 8초의 휴지기를 갖는다.
- [0420] 일부 구현예에서, 예를 들어 자극제를 사용한 상기 인큐베이션의 총 기간은 (약) 1시간 내지 96시간, 1시간 내지 72시간, 1시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 8시간 내지 30시간 또는 12시간 내지 24시간, 예를 들어 적어도 또는 적어도 약 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간 또는 72시간이다. 일부 구현예에서, 추가의 인큐베이션은 (약) 1시간 내지 48시간, 4시간 내지 36시간, 8시간 내지 30시간 또는 12시간 내지 24시간동안이다.
- [0421] 특정 구현예에서, 농축된 T 세포의 조성물은 하나 이상의 사이토카인의 존재하에서 배양된다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 T 세포에 의해서 발현되고/되거나 T 세포에 대해 내인성인 수용체에 결합하고/하거나 결합할 수 있는 것이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 사이토카인의 4-알파-헬릭스 다발 패밀리의 멤버이거나 또는 그를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 4-알파-헬릭스 다발 패밀리의 멤버는 제한되지는 않지만, 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-9(IL-9), 인터루킨-12(IL-12), 인터루킨-15(IL-15), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF) 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 IL-15이거나 그것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 IL-7이거나 그것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2이거나 그것을 포함한다.
- [0422] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 조작된 세포는, (약) 1 IU/mL 내지 (약) 2,000 IU/mL, (약) 10 IU/mL 내지 (약) 100 IU/mL, (약) 50 IU/mL 내지 (약) 200 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 1,000 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 1,000 IU/mL, (약) 500 IU/mL 내지 (약) 2,000 IU/mL, 또는 (약) 100 IU/mL 내지 (약) 1,500 IU/mL의 농도의, 사이토카인, 예를 들어 인간 재조합 사이토카인으로 배양된다.
- [0423] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 조작된 세포는, 예를 들어 무혈청 배지 중에서, (약) 1 IU/mL 내

지 (약) 500 IU/mL, (약) 10 IU/mL 내지 (약) 400 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 300 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 250 IU/mL, (약) 150 IU/mL 내지 (약) 300 IU/mL, (약) 200 IU/mL 내지 (약) 400 IU/mL, 또는 (약) 150 IU/mL 내지 (약) 300 IU/mL의 농도의, IL-2, 예를 들어 인간 재조합 IL-2로 배양된다. 특정 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물의 세포는, (약), 또는 적어도 (약) 100 IU/mL, 120 IU/mL, 140 IU/mL, 160 IU/mL, 180 IU/mL, 200 IU/mL, 220 IU/mL, 240 IU/mL, 260 IU/mL, 280 IU/mL, 300 IU/mL, 320 IU/mL, 340 IU/mL, 360 IU/mL, 380 IU/mL, 또는 400 IU/mL의 농도의 재조합 IL-2로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 투입 조성물의 세포는, (약) 200 IU/mL의 IL-2, 예를 들어 인간 재조합 IL-2의 존재하에서 배양된다.

[0424] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 배양된 세포는, 예를 들어 무혈청 배지 중에서, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 2,000 IU/mL, (약) 500 IU/mL 내지 (약) 1,500 IU/mL, (약) 600 IU/mL 내지 (약) 1200 IU/mL, (약) 800 IU/mL 내지 (약) 1600 IU/mL, (약) 900 IU/mL 내지 (약) 1,800 IU/mL, 또는 (약) 1,000 IU/mL 내지 (약) 1,500 IU/mL의 농도의 재조합 IL-7, 예를 들어 인간 재조합 IL-7로 배양된다. 특정 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 조작된 세포는, (약), 또는 적어도 (약) 200 IU/mL, 300 IU/mL, 400 IU/mL, 500 IU/mL, 600 IU/mL, 700 IU/mL, 800 IU/mL, 900 IU/mL, 1,000 IU/mL, 1,200 IU/mL, 1,400 IU/mL, 1,600 IU/mL, 1,800 IU/mL, 2,000 IU/mL, 2,200 IU/mL, or 2,400 IU/mL의 농도의 IL-7로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 조작된 세포는, (약) 1,200 IU/mL의 IL-7의 존재하에서 배양된다.

[0425] 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 배양된 세포는, 예를 들어 무혈청 배지 중에서, (약) 1 IU/mL 내지 (약) 500 IU/mL, (약) 10 IU/mL 내지 (약) 400 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 300 IU/mL, (약) 100 IU/mL 내지 (약) 250 IU/mL, (약) 150 IU/mL 내지 (약) 300 IU/mL, (약) 200 IU/mL 내지 (약) 400 IU/mL, 또는 (약) 150 IU/mL 내지 (약) 150 IU/mL의 농도의 IL-15, 예를 들어 인간 재조합 IL-15로 배양된다. 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어 상기 조작된 조성물의 세포는, (약), 또는 적어도 (약) 100 IU/mL, 120 IU/mL, 140 IU/mL, 160 IU/mL, 180 IU/mL, 200 IU/mL, 220 IU/mL, 240 IU/mL, 260 IU/mL, 280 IU/mL, 300 IU/mL, 320 IU/mL, 340 IU/mL, 360 IU/mL, 380 IU/mL, or 400 IU/mL의 농도의 재조합 IL-15로 인큐베이션된다. 일부 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 상기 조작된 T 세포는, (약) 200 IU/mL의 재조합 IL-15, 예를 들어 예를 들어 인간 재조합 IL-15의 존재하에서 배양된다.

[0426] 특정 구현예에서, 상기 세포, 예를 들어 조작된 세포 및/또는 상기 조작된 조성물로부터의 세포는 예를 들어 무혈청 배지 중에서 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 존재하에서 배양된다. 일부 구현예에서, 상기 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15는 재조합이다. 특정 구현예에서, 상기 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15는 인간이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15이거나 또는 그를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 재조합 IL-2, IL-7, 및/또는 IL-15의 존재하에서 배양된다.

[0427] 특정 구현예에서, 상기 배양은 폐쇄된 시스템에서 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 배양은 멸균 조건하에 폐쇄된 시스템에서 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 배양은 상기 제공된 시스템의 하나 이상의 단계와 동일한 폐쇄된 시스템에서 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 농축된 T 세포의 조성물은 폐쇄된 시스템으로부터 제거되고 상기 배양을 위한 바이오리액터(bioreactor)에 위치되고/되거나 거기에 연결된다. 상기 배양에 적합한 바이오리액터의 예는 제한되지는 않지만 GE Xuri W25, GE Xuri W5, Sartorius BioSTAT RM 20 | 50, Finesse SmartRocker Bioreactor Systems, 및 Pall XRS Bioreactor Systems을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 바이오리액터는 적어도 일부의 상기 배양 단계도중에 상기 세포를 관류 및/또는 혼합하는데 사용된다.

[0428] 일부 구현예에서, 바이오리액터의 밀폐, 연결, 및/또는 제어하에 배양된 세포는 배양도중에 바이오리액터 없이 배양되는 세포 보다, 예를 들어 정적 조건하에 예를 들어 혼합, 락킹(rocking), 모션(motion) 및/또는 관류(perfusion) 없이 배양되는 세포 보다 신속하게 증폭을 수행한다. 일부 구현예에서, 바이오리액터의 밀폐, 연결, 및/또는 제어하에 배양된 세포는 21일, 14일, 10일, 8일, 7일, 6일, 5일, 4일, 3일, 2일, 60시간, 48시간, 36시간, 24시간, 또는 12시간 이내에 임계치의 증폭, 세포수, 농도 및/또는 밀도에 도달하거나 그를 달성한다. 일부 구현예에서, 바이오리액터의 밀폐, 연결, 및/또는 제어하에 배양된 세포는, 바이오리액터의 밀폐, 연결, 및/또는 제어하에서는 세포가 배양되지 않는 예시적인 및/또는 대안적인 공정으로 배양되는 세포 보다 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 100%, 적어도 (약) 150%, 적어도 (약) 1-fold, 적어도 (약) 2-배, 적어도 (약) 3-배, 적어도 (약) 4-배, 적어도 (약) 5-배의 임계치의 증폭, 세포수, 농도 및/또는 밀도에 도달하거나 그를 달성한다.

[0429] 일부 구현예에서, 상기 혼합은 락킹 및/또는 모션닝(motioning)이거나 또는 그를 포함한다. 일부 경우에, 상기

바이오리액터는 이동 또는 락킹에 적용될 수 있으며, 일부 측면에서 이것은 산소 전달을 증가시킬 수 있다. 바이오리액터를 모션닝하는 것은 제한되지는 않지만, 수평축을 따라 회전시키는 것, 수직축을 따라 회전시키는 것, 바이오리액터의 경사지거나 기울어진 수평축에 따른 락킹 모션(rocking motion) 또는 그들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 인큐베이션의 적어도 일부는 락킹으로 수행된다. 락킹 속도(rocking speed) 및 락킹 각(rocking angle)은 원하는 교반(agitation)을 달성하도록 조정될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 락킹 각은 20°, 19°, 18°, 17°, 16°, 15°, 14°, 13°, 12°, 11°, 10°, 9°, 8°, 7°, 6°, 5°, 4°, 3°, 2°, 또는 1°이다. 특정 구현예에서, 상기 락킹 각은 6-16°이다. 다른 구현예에서, 상기 락킹 각은 7-16°이다. 다른 구현예에서, 상기 락킹 각은 8-12°이다. 일부 구현예에서, 상기 락킹 속도는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 rpm이다. 일부 구현예에서, 상기 락킹 속도는 4 내지 12 rpm, 예를 들어 4 내지 6 rpm이다.

[0430] 일부 구현예에서, 상기 바이오리액터는 (약) 또는 적어도 (약) 0.01 L/min, 0.05 L/min, 0.1 L/min, 0.2 L/min, 0.3 L/min, 0.4 L/min, 0.5 L/min, 1.0 L/min, 1.5 L/min, 또는 2.0 L/min 또는 2.0 L/min 초과와 정상 공기 유동(steady air flow)으로 (대략) 37°C의 온도 및 (대략) 5%의 CO₂ 수준을 유지한다. 특정 구현예에서, 상기 배양의 적어도 일부는, 예를 들어 배양의 시작과 관련된 시기 및/또는 배양된 세포의 밀도에 따라, 예를 들어 750 mL/day 및/또는 1500 mL/day의 속도를 갖는 관류로 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 세포 배양 증폭의 적어도 일부는, 예를 들어 5 내지 15 RPM, 예를 들어 6 RPM 또는 10 RPM과 같은 일정한 락킹 속도에서 5° 내지 10°의 각에서 락킹 모션으로 수행된다.

[0431] 일부 구현예에서, 상기 배양 단계의 적어도 일부는 일정한 관류하에서, 예를 들어 느린 정상 속도(slow steady rate)의 관류하에서 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 관류는 액체, 예를 들어 사용된 배지의 유출(outflow), 및 신선한 배지의 유입이거나 또는 그를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 관류는 사용된 배지를 신선한 배지로 대체한다. 일부 구현예에서, 상기 배양의 적어도 일부는 (약) 또는 적어도 (약) 100 mL/day, 200 mL/day, 250 mL/day, 275 mL/day, 290 mL/day, 300 mL/day, 350 mL/day, 400 mL/day, 450 mL/day, 500 mL/day, 550 mL/day, 575 mL/day, 580 mL/day, 600 mL/day, 650 mL/day, 700 mL/day, 750 mL/day, 800 mL/day, 850 mL/day, 900 mL/day, 950 mL/day, 1000 mL/day, 1100 mL/day, 1160 mL/day, 1200 mL/day, 1400 mL/day, 1500 mL/day, 1600 mL/day, 1800 mL/day, 2000 mL/day, 2200 mL/day, 또는 2400 mL/day의 정상 속도의 관류하에서 수행된다.

[0432] 특정 구현예에서, 배양은, 무관류(no perfusion), 및 하나의 세트 및/또는 예비 결정된 시간 후, 예를 들어 상기 배양의 시작 또는 개시 후 (약) 또는 적어도 (약) 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간, 또는 72시간 초과 후에 시작된 관류의 조건하에 시작된다. 특정 구현예에서 관류는, 상기 세포의 밀도 또는 농도가 하나의 세트 또는 예비 결정된 밀도 또는 농도에 도달할 때 시작된다. 일부 구현예에서, 상기 관류는, 배양된 세포가 (약) 또는 적어도 (약) 0.1×10⁶개의 세포/mL, 0.2×10⁶개 세포/mL, 0.4×10⁶개 세포/mL, 0.6×10⁶개 세포/mL, 0.8×10⁶개 세포/mL, 1×10⁶개의 세포/mL, 1.2×10⁶개 세포/mL, 1.4×10⁶개 세포/mL, 1.6×10⁶개 세포/mL, 1.8×10⁶개 세포/mL, 2.0×10⁶개의 세포/mL, 2.5×10⁶개 세포/mL, 3.0×10⁶개 세포/mL, 3.5×10⁶개 세포/mL, 4.0×10⁶개 세포/mL, 4.5×10⁶개 세포/mL, 5.0×10⁶개 세포/mL, 6×10⁶개 세포/mL, 8×10⁶개 세포/mL, 또는 10×10⁶개의 세포/mL, 또는 그들의 생존 세포의 밀도 또는 농도에 도달할 때 시작된다.

[0433] 특정 구현예에서, 상기 관류는 배양도중 상이한 속도에서 수행된다. 예를 들어 일부 구현예에서, 관류 속도는 배양된 세포의 밀도 및/또는 농도에 의존한다. 특정 구현예에서, 관류 속도는 세포가 하나의 세트 또는 예비 결정된 밀도 또는 농도에 도달할 때 증가된다. 상기 관류 속도는 예를 들어 하나의 정상 관류 속도로부터 증가된 정상 관류 속도까지 상기 배양도중에 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 5배 초과, 10배 초과, 15배 초과, 20배 초과, 25배 초과, 50배 초과, 또는 100배 초과로 변할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 정상 관류 속도는, 세포가 (약) 또는 적어도 (약) 0.6×10⁶개 세포/mL, 0.8×10⁶개 세포/mL, 1×10⁶개 세포/mL, 1.2×10⁶개의 세포/mL, 1.4×10⁶개 세포/mL, 1.6×10⁶개 세포/mL, 1.8×10⁶개 세포/mL, 2.0×10⁶개 세포/mL, 2.5×10⁶개의 세포/mL, 3.0×10⁶개 세포/mL, 3.5×10⁶개 세포/mL, 4.0×10⁶개 세포/mL, 4.5×10⁶개 세포/mL, 5.0×10⁶개의 세포/mL, 6×10⁶개 세포/mL, 8×10⁶개 세포/mL, 또는 10×10⁶개 세포/mL, 또는 그들의 생존 세포의 하나의 세트 또는 예비 결정된 세포 밀도 또는 농도에 도달할 때 증가한다.

- [0434] 일부 구현예에서, 배양은 무관류 조건하에 수행되고, 관류는 상기 세포의 밀도 또는 농도가 하나의 세트 및/또는 예비 결정된 밀도 또는 농도에 도달할 때 시작된다. 일부 구현예에서, 상기 관류는, 상기 세포의 밀도 또는 농도가 하나의 세트 및/또는 예비 결정된 밀도 또는 농도에 도달할 때 (약), 또는 적어도 (약) 100 mL/day, 200 mL/day, 250 mL/day, 275 mL/day, 290 mL/day, 300 mL/day, 350 mL/day, 400 mL/day, 450 mL/day, 500 mL/day, 550 mL/day, 575 mL/day, 580 mL/day, 600 mL/day, 650 mL/day, 700 mL/day, 750 mL/day, 800 mL/day, 850 mL/day, 900 mL/day, 950 mL/day, 1000 mL/day, 1100 mL/day, 1160 mL/day, 1200 mL/day, 1400 mL/day, 1600 mL/day, 1800 mL/day, 2000 mL/day, 2200 mL/day, 또는 2400 mL/day의 속도로 시작된다. 일부 구현예에서, 상기 관류는, 세포가 (약), 또는 적어도 (약) 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL, 또는 1000 mL의 부피에서 배양될 때 수행된다.
- [0435] 특정 구현예에서, 상기 배양의 적어도 일부는 특정 속도에서의 관류로 수행되며, 상기 관류 속도는, 상기 세포의 밀도 또는 농도가 하나의 세트 및/또는 예비 결정된 밀도 또는 농도에 도달할 때 (약), 또는 적어도 (약) 100 mL/day, 200 mL/day, 250 mL/day, 275 mL/day, 290 mL/day, 300 mL/day, 350 mL/day, 400 mL/day, 450 mL/day, 500 mL/day, 550 mL/day, 575 mL/day, 580 mL/day, 600 mL/day, 650 mL/day, 700 mL/day, 750 mL/day, 800 mL/day, 850 mL/day, 900 mL/day, 950 mL/day, 1000 mL/day, 1100 mL/day, 1160 mL/day, 1200 mL/day, 1400 mL/day, 1600 mL/day, 1800 mL/day, 2000 mL/day, 2200 mL/day, 또는 2400 mL/day로 증가된다. 상기 관류는, 상기 배양된 세포가 (약) 또는 적어도 (약) 0.1×10^6 개의 세포/m, 0.2×10^6 개 세포/mL, 0.4×10^6 개 세포/mL, 0.6×10^6 개 세포/mL, 0.8×10^6 개 세포/mL, 1×10^6 개의 세포/m, 1.2×10^6 개 세포/mL, 1.4×10^6 개 세포/mL, 1.6×10^6 개 세포/mL, 1.8×10^6 개 세포/mL, 2.0×10^6 개 세포/mL, 2.5×10^6 개 세포/mL, 3.0×10^6 개 세포/mL, 3.5×10^6 개 세포/mL, 4.0×10^6 개의 세포/m, 4.5×10^6 개 세포/mL, 5.0×10^6 개 세포/mL, 6×10^6 개 세포/mL, 8×10^6 개 세포/mL, 또는 10×10^6 개의 세포/m, 또는 그들의 생존 세포의 밀도 또는 농도에 도달할 때 시작된다.
- [0436] 특정 구현예에서, 배양은 무관류 또는 특정 속도에서의 관류의 조건하에 수행되고, 상기 관류 속도는, 세포의 밀도 또는 농도가 (약) 또는 적어도 0.61×10^6 개의 세포/m의 농도에 도달할 때 (약) 750 mL/day까지 증가한다. 특정 구현예에서, 상기 세포는, 세포가 (약), 또는 적어도 1000 mL인 경우 세포의 밀도 또는 농도가 (약) 또는 적어도 0.61×10^6 개 세포/mL의 농도에 도달할 때 (약) 또는 적어도 750 mL/day의 속도로 관류된다. 일부 구현예에서, 상기 관류 속도는 세포의 밀도 또는 농도가 (약) 또는 적어도 2×10^6 개 세포/mL의 농도에 도달할 때 (약) 1500 mL/day까지 증가한다.
- [0437] 일부 측면에서, 관류, 예를 들어 (약) 또는 적어도 (약) 500 mL/day, 600 mL/day, 700 mL/day, 750 mL/day, 800 mL/day, 900 mL/day, 1000 mL/day, 1100 mL/day, 1200 mL/day, 1300 mL/day, 1400 mL/day, 1500 mL/day, 1600 mL/day, 1700 mL/day, 1800 mL/day, 1900 mL/day, 또는 2000 mL/day의 고속의 관류로의 배양은, 예를 들어 세포에 대한 영양물질 이용을 증진시키고/시키거나 최적화하고, pH를 유지하고/하거나 세포 폐기물의 존재를 최소화함으로써 세포 건강, 생존력, 생존, 증식, 증폭 및/또는 기능을 증진시킨다.
- [0438] 일부 측면에서, 관류를 이용한 배양은 잔여 공정 시약의 제거 및/또는 감소를 개선시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 잔여 공정 시약(residual process reagent)은 공정 중 또는 공정 후에 수행되는 분석, 측정 및/또는 시험의 해석을 방해하고/하거나 복잡하게 할 수 있다. 상기 분석은 제한되지는 않으나 멸균성, 내독소, 잔류 비드, 바이러스 DNA, 예를 들어 복제가능한 바이러스성 DNA, 세포 수, 생존력 분석, 세포 건강 분석 및 세포 활성 분석에 대한 측정을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 고속의 관류는 저속의 관류 보다 더 많은 잔류 공정 시약을 제거한다.
- [0439] 일부 구현예에서, 농축된 세포의 조성물은 계면활성제의 존재하에 배양된다. 특정 구현예에서, 상기 조성물의 세포를 배양하는 것은 예를 들어 혼합, 락킹, 모션, 및/또는 관류에 기인하여 상기 배양도중에 발생할 수 있는 전단 응력의 양을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 계면활성제는 액체 및/또는 고체의 표면장력을 감소시키는 제제이거나 또는 그를 포함한다. 예를 들어 계면활성제는 지방 알콜(예를 들어 스테릴 알콜), 폴리옥시에틸렌 글리콜 옥틸페놀 에테르(예를 들어 Triton X-100) 또는 폴리옥시에틸렌 글리콜 소르비탄 알킬 에스테르(예를 들어 폴리소르베이트 20, 40, 60)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 계면활성제는 거기에 부가된 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 양쪽성 계면활성제, 또는 비이온성 계면활성제이거나 또는 그를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 계면활성제는 폴리소르베이트(Polysorbate) 80(PS80), 폴리소르베이트 20(PS20), 폴록사머(poloxamer) 188(P188)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 특정 구현예에서, 상기 계면활성제는 폴록사머, 예를

들어 폴록사머 188이다.

[0440] 특정 구현예에서, 상기 배양은 계면활성제의 부재하에서 수행된다.

[0441] 특정 구현예에서, 상기 배양은 세포가 임계치의 양, 농도 및/또는 증폭을 달성할 때 종료한다. 일부 구현예에서, 상기 배양은 세포가 임계치의 세포 총량, 예를 들어 임계치의 세포수를 달성할 때 종료한다. 일부 구현예에서, 임계치의 세포수는 (약) 또는 적어도 (약) 50×10^6 개의 세포, 100×10^6 개의 세포, 200×10^6 개의 세포, 300×10^6 개의 세포, 400×10^6 개의 세포, 600×10^6 개의 세포, 800×10^6 개의 세포, 1000×10^6 개의 세포, 1200×10^6 개의 세포, 1400×10^6 개의 세포, 1600×10^6 개의 세포, 1800×10^6 개의 세포, 2000×10^6 개의 세포, 2500×10^6 개의 세포, 3000×10^6 개의 세포, 3500×10^6 개의 세포, 5000×10^6 개의 세포, 3500×10^6 개의 세포, $10,000 \times 10^6$ 개의 세포, $12,000 \times 10^6$ 개의 세포, $15,000 \times 10^6$ 개의 세포 또는 $20,000 \times 10^6$ 개의 세포, 또는 그들의 생존 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 임계치의 세포수는 (약) 또는 적어도 3500×10^6 개의 세포 또는 5500×10^6 개의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 임계치의 세포수는 (약) 또는 5500×10^6 개 미만의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 임계치의 세포수는 (약) 또는 3500×10^6 개 미만의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 임계치의 세포수는 (약) 또는 적어도 2500×10^6 개의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 임계치의 세포수는 (약) 또는 적어도 2000×10^6 개의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 임계치의 세포수는 (약) 또는 적어도 3000×10^6 개의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 임계치의 세포수는 (약) 3000×10^6 개 내지 (약) 2000×10^6 개의 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 배양은 상기 세포가 임계치의 세포수를 달성할 때 종료한다. 일부 구현예에서, 상기 배양은 상기 임계치의 세포수가 달성된 후 (약) 또는 6시간, 12시간, 24시간, 36시간, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 또는 7일, 또는 그 이상 이내에 종료한다. 특정 구현예에서, 상기 배양은 상기 임계치의 세포수가 달성된 후 (약) 1일에 종료한다. 특정 구현예에서, 상기 배양은 상기 임계치의 세포수가 달성된 후 18시간 내지 30시간에 종료한다.

[0442] 특정 구현예에서, 상기 배양은 세포가 임계치의 밀도 또는 농도를 달성할 때 종료한다. 일부 구현예에서, 산출 조성물에 대한 상기 임계치의 세포 밀도 또는 농도는 (약) 또는 적어도 (약) 1×10^6 개 세포/mL, 5×10^6 개 세포/mL, 10×10^6 개 세포/mL, 15×10^6 개 세포/mL, 20×10^6 개 세포/mL, 25×10^6 개 세포/mL, 30×10^6 개 세포/mL, 35×10^6 개 세포/mL, 40×10^6 개 세포/mL, 45×10^6 개 세포/mL, 50×10^6 개 세포/mL, 55×10^6 개 세포/mL, 60×10^6 개 세포/mL, 65×10^6 개 세포/mL, 70×10^6 개 세포/mL, 75×10^6 개 세포/mL, 80×10^6 개 세포/mL, 85×10^6 개 세포/mL, 90×10^6 개 세포/mL, 95×10^6 개 세포/mL, 100×10^6 개 세포/mL, 또는 그들의 생존 세포이다. 일부 구현예에서, 복수의 산출 조성물에 대한 평균값 또는 중앙값의 임계치의 세포 밀도 또는 농도는 (약) 또는 적어도 (약) 1×10^6 개 세포/mL, 5×10^6 개 세포/mL, 10×10^6 개의 세포/m, 15×10^6 개 세포/mL, 20×10^6 개 세포/mL, 25×10^6 개 세포/mL, 30×10^6 개 세포/mL, 35×10^6 개의 세포/m, 40×10^6 개 세포/mL, 45×10^6 개 세포/mL, 50×10^6 개 세포/mL, 55×10^6 개 세포/mL, 60×10^6 개 세포/mL, 65×10^6 개 세포/mL, 70×10^6 개 세포/mL, 75×10^6 개 세포/mL, 80×10^6 개 세포/mL, 85×10^6 개 세포/mL, 90×10^6 개 세포/mL, 95×10^6 개 세포/mL, 100×10^6 개 세포/mL, 또는 그들의 생존 세포이다.

[0443] 특정 구현예에서, 상기 세포가 상기 임계치의 양, 농도, 및/또는 증폭을 달성하기 전 1일 또는 약 24시간에(예를 들어 상기 세포가 세포의 임계치의 총량, 예를 들어 임계치의 세포수를 달성하기 전에), 세포의 총량은 (약) 또는 적어도 (약) 50×10^6 개의 세포, 100×10^6 개의 세포, 200×10^6 개의 세포, 300×10^6 개의 세포, 400×10^6 개의 세포, 600×10^6 개의 세포, 800×10^6 개의 세포, 1000×10^6 개의 세포, 1200×10^6 개의 세포, 1400×10^6 개의 세포, 1600×10^6 개의 세포, 1800×10^6 개의 세포, 2000×10^6 개의 세포, 2500×10^6 개의 세포, 3000×10^6 개의 세포, 3500×10^6 개의 세포, 5000×10^6 개의 세포, 3500×10^6 개의 세포, $10,000 \times 10^6$ 개의 세포, $12,000 \times 10^6$ 개의 세포, $15,000 \times 10^6$ 개의 세포 또는 $20,000 \times 10^6$ 개의 세포, 또는 그들의 생존 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포가 상기 임계치의 세포수를 달성하기 전 1일 또는 약 24시간에, 세포의 총량은 (약) 100×10^6 개의 세포 내지 (약)

4000×10⁶개의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포가 상기 임계치의 세포수를 달성하기 전 1일 또는 약 24시간에, 세포의 총량은 (약) 3000×10⁶개 미만의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포가 상기 임계치의 세포수를 달성하기 전 1일 또는 약 24시간에, 세포의 총량은 (약) 500×10⁶개의 세포 내지 (약) 1500×10⁶개의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포가 상기 임계치의 세포수를 달성하기 전 1일 또는 약 24시간에, 세포의 총량은 (약) 500×10⁶개의 세포 내지 (약) 1000×10⁶개의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포가 상기 임계치의 세포수를 달성하기 전 1일 또는 약 24시간에, 세포의 총량은 (약) 또는 적어도 900×10⁶개의 세포이다.

[0444] 특정 구현예에서, 상기 임계치의 세포수는 (약) 또는 적어도 (약) 1000×10⁶개의 세포, 1200×10⁶개의 세포, 1400×10⁶개의 세포, 1600×10⁶개의 세포, 1800×10⁶개의 세포, 2000×10⁶개의 세포, 2500×10⁶개의 세포, 3000×10⁶개의 세포, 3500×10⁶개의 세포, 또는 그들의 생존 세포인데 반해, 상기 세포가 상기 임계치의 세포수를 달성하기 전 1일 또는 약 24시간에, 세포의 총량은 (약) 또는 적어도 100×10⁶개의 세포, 200×10⁶개의 세포, 300×10⁶개의 세포, 400×10⁶개의 세포, 600×10⁶개의 세포, 800×10⁶개의 세포, 1000×10⁶개의 세포, 1200×10⁶개의 세포, 1400×10⁶개의 세포, 또는 1600×10⁶개의 세포, 또는 그들의 생존 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 임계치의 세포수는 (약) 2000×10⁶개의 세포 내지 (약) 3000×10⁶개의 세포, 또는 그들의 생존 세포인데 반해, 상기 세포가 상기 임계치의 세포수를 달성하기 전 약 1일 또는 (약) 24시간에, 세포의 총량은 (약) 500×10⁶개의 세포 내지 (약) 1500×10⁶개의 세포, 또는 그들의 생존 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 임계치의 세포수는 (약) 2500×10⁶개의 세포, 또는 그들의 생존 세포인데 반해, 상기 세포가 상기 임계치의 세포수를 달성하기 전 약 1일 또는 (약) 24시간에, 세포의 총량은 (약) 900×10⁶개의 세포, 또는 그들의 생존 세포이다.

[0445] 일부 구현예에서, 상기 배양은 상기 세포가 임계치의 양, 밀도, 및/또는 증폭을 달성하는데 필요한 시간동안 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 배양은 (약) 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간, 2일, 3일 4일, 5일, 5.5일, 6일, 7일, 7.5일, 8일, 9일, 10일, 1주, 2주, 3주, 또는 4주동안, 또는 (약) 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간, 2일, 3일 4일, 5일, 5.5일, 6일, 7일, 7.5일, 8일, 9일, 10일, 1주, 2주, 3주, 또는 4주 미만동안 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 임계치의 밀도를 달성하기 위해 상이한 생물학적 샘플로부터 단리, 농축, 및/또는 선별된 농축 T 세포의 복수의 별도의 조성물의 세포에 필요한 평균값 시간은 (약) 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간, 2일, 3일 4일, 5일, 6일, 7일, 7일, 8일, 9일, 10일, 1주, 2주, 3주, 또는 4주이다. 특정 구현예에서, 상기 임계치의 밀도를 달성하기 위해 상이한 생물학적 샘플로부터 단리, 농축, 및/또는 선별된 농축 T 세포의 복수의 별도의 조성물의 세포에 필요한 평균값 시간은 (약) 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간, 2일, 3일 4일, 5일, 6일, 7일, 7일, 8일, 9일, 10일, 1주, 2주, 3주, 또는 4주동안, 또는 (약) 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 36시간, 48시간, 60시간, 72시간, 2일, 3일 4일, 5일, 6일, 7일, 7일, 8일, 9일, 10일, 1주, 2주, 3주, 또는 4주이다.

[0446] 일부 구현예에서, 상기 배양은, 세포의 임계치 총량, 예를 들어 임계치의 세포수 약 5500×10⁶개의 세포를 달성할 때 종료하고, 상기 배양의 시작으로부터 상기 임계치의 양을 달성하는 세포에 필요한 시간은 약 6일 내지 약 7일 또는 6일과 7일 사이이다.

[0447] 일부 구현예에서, 상기 배양은 (예를 들어 세포가 수확 준비가 될 때) 상기 세포가 세포의 임계치 총량, 예를 들어 임계치의 세포수 (약) 5500×10⁶개의 세포를 달성할 때 종료한다. 일부 구현예에서, 상기 세포가 세포의 임계치의 양, 예를 들어 임계치의 세포수를 달성하기 전에 (약) 1일 또는 (약) 24시간에, 세포의 총량은 (약) 3000×10⁶개의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포가 (약) 5500×10⁶개의 세포를 달성하기 전날에 세포의 총량은 (약) 3000×10⁶개의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 배양의 시작으로부터 상기 임계치의 양을 달성하는 세포에 필요한 시간은 (약) 6일 내지 (약) 10일 또는 6일과 10일 사이, 예를 들어 (약) 7일 내지 (약) 10일 또는 7일과 10일 사이이다. 일부 구현예에서, 상기 배양의 시작으로부터 상기 임계치의 양을 달성하는 세포에 필요한 시간의 중앙값은 (약) 8일이거나 8일이다.

- [0448] 일부 구현예에서, 상기 배양은, 상기 세포가 세포의 임계치 총량, 예를 들어 임계치의 세포수 (약) 2000×10^6 개의 세포, (약) 2500×10^6 개의 세포, 또는 (약) 3000×10^6 개의 세포를 달성할 때 종료하고, 상기 배양의 시작으로 부터 상기 임계치의 양을 달성하는 세포에 필요한 시간은 (약) 4일 내지 (약) 5일, (약) 5일, 또는 5일이다. 일부 구현예에서, 상기 임계치의 세포수는 (약) 3000×10^6 개의 세포 내지 (약) 2000×10^6 개의 세포이고, 상기 배양의 시작으로 부터 상기 임계치의 양을 달성하는 세포에 필요한 시간은 (약) 4일 내지 (약) 5일, (약) 5일, 또는 5일이다.
- [0449] 일부 구현예에서, 상기 배양은 (예를 들어 세포가 수확 준비가 될 때) 상기 세포가 세포의 임계치 총량, 예를 들어 임계치의 세포수 (약) 2500×10^6 개의 세포를 달성할 때 종료한다. 일부 구현예에서, 상기 세포가 세포의 임계치의 양, 예를 들어 임계치의 세포수를 달성하기 전에 (약) 1일 또는 (약) 24시간에, 세포의 총량은 (약) 900×10^6 개의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포가 (약) 2500×10^6 개의 세포를 달성하기 전날에 세포의 총량은 (약) 900×10^6 개의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 배양의 시작으로 부터 상기 임계치의 양을 달성하는 세포에 필요한 시간은 (약) 6일 내지 (약) 9일 또는 6일과 9일 사이이다. 일부 구현예에서, 상기 세포가 상기 배양의 시작으로 부터 상기 임계치의 양을 달성하는데 필요한 시간은 (약) 5일 내지 (약) 9일 또는 5일과 9일 사이이다. 일부 구현예에서, 상기 배양의 시작으로 부터 상기 임계치의 양을 달성하는 세포에 필요한 시간의 중앙값은 (약) 7일이거나 7일이다.
- [0450] 일부 구현예에서, 상기 배양은 적어도 최소량의 시간동안 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 배양은, 상기 임계치가 상기 최소량의 시간 이전에 달성되는 경우에도 적어도 14일, 적어도 12일, 적어도 10일, 적어도 7일, 적어도 6일, 적어도 5일, 적어도 4일, 적어도 3일, 적어도 2일, 적어도 36시간, 적어도 24시간, 적어도 12시간, 또는 적어도 6시간동안 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 최소량의 시간은 (약) 또는 적어도 7 일, 8 일, 9 일, 또는 10 일이다. 특정 구현예에서, 상기 최소량의 시간은 8일이다.
- [0451] 특정 구현예에서, 상기 배양은 적어도 최소량의 시간동안 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 배양은, 자극 시약 하의 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터, 예를 들어 상기 세포가 상기 자극 시약과 접촉될 때부터; 상기 세포 및/또는 세포의 조성물, 예를 들어 CD4+ 및 CD8+ 세포가 혼합되어 상기 투입 조성물을 생성할 때부터 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 또는 13일, 약 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 또는 13일, 또는 적어도 13일, 약 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 또는 13일이 지날 때까지 수행된다.
- [0452] 특정 구현예에서, 상기 배양된 세포는 산출 세포이다. 일부 구현예에서, 배양된 농축 T 세포의 조성물은 농축 T 세포의 산출 조성물이다. 특정 구현예에서, 배양된 CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포는 산출 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포이다.
- [0453] 특정 구현예에서, 세포는 세포 집단의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 또는 그 이상의 세포 배가(cell doubling) 전에, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 또는 그 이상의 세포 배가 전에 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 또는 그 이상의 세포 배가 전에, 예를 들어 상기 배양 또는 증폭동안 일어나는 배가 전에 수확된다. 특정 구현예에서, 세포 배가의 양은 상이한 시점, 예를 들어 상기 배양 또는 확산 공정의 상이한 시점 또는 단계에서 집단 중의 생존 세포의 수를 계측함으로써 계산될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 세포 배가는 보다 이른 시점(earlier time point)에 존재하는 생존 세포의 총수에 대한 한 시점에서의 생존 세포의 총수를 비교함으로써 계산될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 배양 또는 증폭은 세포 집단의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 또는 그 이상의 세포 배가(cell doubling) 전에, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 또는 그 이상의 세포 배가 전에 또는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 20 또는 그 이상의 세포 배가 전에, 예를 들어 상기 배양 또는 증폭동안 일어나는 배가 전에 완성된다. 특정 측면에서, 상기 세포 배가는, 상기 배양 또는 증폭이 개시될 때 및 상기 배양 또는 증폭이 완성될 때 총 핵 형성 세포수(TNC)를 결정한 다음, 상기 개시시 TNC로 나눈 상기 완성시 상기 TNC의 생성물의 자연로그를 결정한 후, 상기 생성물의 상기 자연로그를 2의 자연로그로 나누어서 계산된다.
- [0454] 다양한 구현예에서, 상기 세포는 상기 투입 집단이 3배, 2배, 또는 1배 이상 배가되기 전에 수거되거나 수확된다. 일부 측면에서, 배양 또는 증폭 공정도중에 일어날 수 있는 배가를 감소시키는 것은 일부 구현예에서는 나이브-유사이고/이거나 메모리 표현형, 예를 들어 중추 메모리 표현형의 조작된 T 세포의 부분을 증가시키게 된다. 일부 구현예에서, 배양 또는 증폭 공정도중에 일어날 수 있는 배가를 증가시키는 것은 상기 배양 또는 증폭 공정도중에 일어날 수 있는 T 세포 분화를 증가시킨다. 일부 측면에서, 조작된 세포 조성물을 생성 또는 제조하는 공정에 있어서, 상기 공정도중에, 예를 들어 상기 배양 또는 증폭도중에 일어나는 상기 증폭 또는 세포

배가를 감소시키는 것은 생성되는 조작된 세포 조성물의, 나이브-유사 T 세포 및/또는 메모리 표현형, 예를 들어 중추 메모리 표현형의 T 세포의 양 또는 부분을 증가시키는 것으로 고려된다. 특정 측면에서, 상기 공정도 중에 일어나는 상기 증폭 또는 세포 배가를 증가시키는 것은 생성되는 조작된 세포 조성물의 분화된 T 세포의 양 또는 부분을 증가시킨다. 일부 측면에서, 생성되는 조작된 세포 조성물 중의 메모리 표현형, 예를 들어 중추 메모리 표현형의 나이브-유사 세포 및/또는 T 세포의 부분을 증가 또는 증폭시키는 공정, 예를 들어 본원에 제공된 공정은 예를 들어 상기 조작된 세포 조성물 투여후 생체내에서의 능력(potency), 효능(efficacy) 및 지속성(persistence)을 증가시킬 수 있다.

[0455] 일부 측면에서, 집단에서 일어나는 배가의 수는 하기 수학식 1을 이용하여 결정된다:

[0456] [수학식 1]

$$\text{세포 배가} = \frac{\ln\left(\frac{\text{수확시 TNC}}{\text{TNC 3 이후 - 활성화}}\right)}{\ln 2}$$

[0457]

[0458] 일부 구현예에서, 상기 수학식 1을 이용하여 결정된 세포 조성물의 집단 배가(population doubling)는 (약) 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0, 또는 그 미만 또는 약 그 미만이다. 특정 구현예에서, 복수의 세포 조성물의 평균값 집단 배가(mean population doubling)는 (약) 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0이다. 특정 구현예에서, 복수의 세포 조성물의 평균값 집단 배가는 약 3.0 내지 약 9.0, 또는 약 5 내지 약 7.5이다.

[0459] 일부 측면에서, 집단에서 일어나는 배가의 수는 하기 수학식 2를 이용하여 결정된다:

[0460] [수학식 2]

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

[0461]

[0462] 일부 구현예에서, 상기 수학식 2를 이용하여 결정된 세포 조성물의 집단 배가는 (약) 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0, 또는 그 미만 또는 약 그 미만이다. 특정 구현예에서, 복수의 세포 조성물의 평균값 집단 배가는 (약) 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0이다. 특정 구현예에서, 복수의 세포 조성물의 평균값 집단 배가는 약 3.0 내지 약 9.0, 또는 약 5 내지 약 7.5이다.

[0463] 일부 측면에서, 집단에서 일어나는 배가의 수는 하기 수학식 3을 이용하여 결정된다:

[0464] [수학식 3]

$$\text{세포 배가} = \frac{\ln\left(\frac{\text{수확시 TNC}}{\text{자극 개시 후 TNC}}\right)}{\ln 2}$$

[0465]

[0466] 일부 구현예에서, 상기 수학식 3을 이용하여 결정된 세포 조성물의 집단 배가는 (약) 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0, 또는 그 미만 또는 약 그 미만이다. 특정 구현예에서, 복수의 세포 조성물의 평균값 집단 배가는 (약) 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0이다. 특정 구현예에서, 복수의 세포 조성물의 평균값 집단 배가는 약 3.0 내지 약 9.0, 또는 약 5 내지 약 7.5이다.

[0467] 일부 측면에서, 집단에서 일어나는 배가의 수는 하기 수학적 식 4를 이용하여 결정된다:

[0468] [수학적 식 4]

$$\text{세포 배가} = \frac{\ln\left(\frac{\text{수확시 TNC}}{\text{형질도입시 TNC}}\right)}{\ln 2}$$

[0469]

[0470] 일부 구현예에서, 상기 수학적 식 4를 이용하여 결정된 세포 조성물의 집단 배가는 (약) 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0, 또는 그 미만 또는 약 그 미만이다. 특정 구현예에서, 복수의 세포 조성물의 평균값 집단 배가는 (약) 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0이다. 특정 구현예에서, 복수의 세포 조성물의 평균값 집단 배가는 약 3.0 내지 약 9.0, 또는 약 5 내지 약 7.5이다.

[0471] 일부 측면에서, 집단에서 일어나는 배가의 수는 하기 수학적 식 5를 이용하여 결정된다:

[0472] [수학적 식 5]

$$\text{세포 배가} = \frac{\ln\left(\frac{\text{수확시 TNC}}{\text{배양 또는 확장의 시작시 TNC}}\right)}{\ln 2}$$

[0473]

[0474] 일부 구현예에서, 상기 수학적 식 5를 이용하여 결정된 세포 조성물의 집단 배가는 (약) 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0, 또는 그 미만 또는 약 그 미만이다. 특정 구현예에서, 복수의 세포 조성물의 평균값 집단 배가는 (약) 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0이다. 특정 구현예에서, 복수의 세포 조성물의 평균값 집단 배가는 약 3.0 내지 약 9.0, 또는 약 5 내지 약 7.5이다.

[0475] 특정 구현예에서, 상기 배양 또는 증폭은, 세포의 총수, 예를 들어 배양된 세포 또는 상기 증폭을 거치는 세포의 총수가 상기 투입 집단의 세포의 수, 예를 들어 상기 자극 시약과 접촉된 세포의 총수 보다 (약) 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 8배, 10배, 20배 보다 많거나 또는 20배 초과로 되기 전에 완성된다. 특정 구현예에서, 상기 배양 또는 증폭은, 세포의 총수, 예를 들어 배양된 세포 또는 상기 증폭을 거치는 세포의 총수가 상기 투입 집단의 세포의 수, 예를 들어 상기 자극 시약과 접촉된 세포의 총수 보다 (약) 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0배이거나 또는 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0배 초과 또는 약 그 초과로 되기 전에 완성된다. 다양한 구현예에서, 상기 배양 또는 증폭은, 배양된 세포의 총수가 형질전환, 형질도입 또는 척추측량된(sp inoculated) 세포의 총수, 예를 들어 바이러스 벡터와 접촉된 세포의 총수 보다 (약) 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 8배, 10배, 20배 보다 많거나 또는 20배 초과로 되기 전에 완성된다. 특정 구현예에서, 상기 배양 또는 증폭은, 세포의 총수, 예를 들어 배양된 세포 또는 상기 증폭을 거치는 세포의 총수가 형질전환, 형질도입 또는 척추측량된 세포의 총수, 예를 들어 바이러스 벡터와 접촉된 세포의 총수 보다 (약) 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0배이거나 또는 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0배 초과 또는 약 그 초과로 되기 전에 완성된다. 특정 구현예에서, 세포 조성물의 집단 배가는 (약) 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0이거나, 또는 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0 초과 또는 약 그 초과이다. 특정 구현예에서, 복수의 세포 조성물의 평균값 집단 배가는 (약) 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0이거나, 또는 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10.0 초과 또는 약 그 초과이다. 특정 구현예에서, 복수의 세포 조성물의 평균값 집단 배

가는 약 3.0 내지 약 9.0 또는 약 5 내지 약 7.5이다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 T 세포, 생존 T 세포, CD3+ T 세포, CD4+ T 세포, CD8+ T 세포, T 세포를 발현하는 CAR, 또는 그들의 임의의 조합물이다.

[0476] 특정 구현예에서, 상기 배양이 종료될 때, 산출 조성물 중의 세포는 (약) 1×10^6 개 세포/mL, 5×10^6 개 세포/mL, 10×10^6 개 세포/mL, 15×10^6 개 세포/mL, 20×10^6 개 세포/mL, 25×10^6 개 세포/mL, 30×10^6 개 세포/mL, 35×10^6 개 세포/mL, 40×10^6 개 세포/mL, 45×10^6 개 세포/mL, 50×10^6 개 세포/mL, 55×10^6 개 세포/mL, 60×10^6 개 세포/mL, 65×10^6 개 세포/mL, 70×10^6 개 세포/mL, 75×10^6 개 세포/mL, 80×10^6 개 세포/mL, 85×10^6 개 세포/mL, 90×10^6 개 세포/mL, 95×10^6 개 세포/mL, 100×10^6 개 세포/mL, 또는 그들의 생존 세포의 세포 밀도 또는 농도를 달성하거나, 또는 복수의 산출 조성물 중의 세포는 (약) 1×10^6 개 세포/mL, 5×10^6 개 세포/mL, 10×10^6 개의 세포/m, 15×10^6 개 세포/mL, 20×10^6 개 세포/mL, 25×10^6 개 세포/mL, 30×10^6 개 세포/mL, 35×10^6 개 세포/mL, 40×10^6 개 세포/mL, 45×10^6 개 세포/mL, 50×10^6 개 세포/mL, 55×10^6 개 세포/mL, 60×10^6 개 세포/mL, 65×10^6 개 세포/mL, 70×10^6 개 세포/mL, 75×10^6 개 세포/mL, 80×10^6 개 세포/mL, 85×10^6 개 세포/mL, 90×10^6 개 세포/mL, 95×10^6 개 세포/mL, 100×10^6 개 세포/mL, 또는 그들의 생존 세포의 평균값 또는 중앙값 세포 밀도 또는 농도를 달성한다. 특정 구현예에서, 상기 배양이 종료될 때, 산출 조성물 중의 세포는 세포 밀도 또는 농도를 달성하거나, 또는 복수의 산출 조성물 중의 세포는 (약) 15×10^6 개 세포/mL 내지 (약) 45×10^6 개 세포/mL, (약) 20×10^6 개 세포/mL 내지 (약) 40×10^6 개 세포/mL, 예를 들어 약 21×10^6 개 세포/mL, 22×10^6 개의 세포/m, 23×10^6 개 세포/mL, 24×10^6 개 세포/mL, 25×10^6 개 세포/mL, 26×10^6 개 세포/mL, 27×10^6 개의 세포/m, 28×10^6 개 세포/mL, 29×10^6 개 세포/mL, 30×10^6 개 세포/mL, 31×10^6 개 세포/mL, 32×10^6 개 세포/mL, 33×10^6 개 세포/mL, 34×10^6 개 세포/mL, 35×10^6 개 세포/mL, 36×10^6 개 세포/mL, 37×10^6 개 세포/mL, 38×10^6 개 세포/mL, 또는 39×10^6 개 세포/mL의 평균값 또는 중앙값 세포 밀도 또는 농도를 달성한다. 일부 구현예에서, 상기 평균값 또는 중앙값 세포 밀도 또는 농도는 약 30×10^6 개 세포/mL 내지 약 40×10^6 개 세포/mL, 약 15×10^6 개 세포/mL 내지 약 25×10^6 개 세포/mL, 약 35×10^6 개 세포/mL 내지 약 40×10^6 개 세포/mL, 또는 약 20×10^6 개 세포/mL 내지 약 25×10^6 개의 세포/m이다.

[0477] **배양도중 세포 모니터링**

[0478] 일부 구현예에서, 배양 단계 도중에 상기 세포를 모니터링한다. 예를 들어 세포 형태(cell morphology), 세포 생존율, 세포 사멸 및/또는 세포 농도를 확인(예를 들어 측정, 정량화)하기 위해 모니터링이 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 수동으로, 예를 들어 인간 작업자에 의해서 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 자동화된 시스템에 의해서 수행된다. 상기 자동화된 시스템은 상기 배양된 세포를 모니터링하기 위해 최소 또는 수동 입력이 필요하지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 수동으로 및 자동화된 시스템 둘 다에 의해서 수행된다.

[0479] 특정 구현예에서, 상기 세포는 수동 입력을 요하지 않는 자동화된 시스템에 의해서 모니터링된다. 일부 구현예에서, 상기 자동화된 시스템은 바이오리액터, 예를 들어 본원에서 기술된 바이오리액터와 호환될 수 있으므로, 배양 중인 세포는 상기 바이오리액터로부터 제거되고, 모니터링된 다음, 상기 바이오리액터로 복귀될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링 및 배양은 폐쇄된 루프 배치(closed loop configuration)에서 일어난다. 일부 측면에서, 폐쇄된 루프 배치에서, 상기 자동화된 시스템 및 바이오리액터는 멸균 상태를 유지한다. 일부 구현예에서, 상기 자동화된 시스템은 멸균 상태이다. 일부 구현예에서, 상기 자동화된 시스템은 인-라인 시스템(in-line system)이다.

[0480] 일부 구현예에서, 상기 자동화된 시스템은 세포 형태, 세포 생존율, 세포 사멸 및/또는 세포 농도(예를 들어 생존 세포 농도, 생존 세포수)를 검출하기 위한 광학 기기(예를 들어 현미경)의 사용을 포함한다. 예를 들어 세포 특징, 생존율, 세포 농도 및 세포수를 결정하는데 적합한 광학 기기가 본원에서 고려된다. 유용한 광학 기기의 비제한적 예는 명 시야 현미경(bright field microscopy), 형광 현미경, 시차 간섭 콘트라스트 현미경, 위상 콘트라스트 현미경(phase contrast microscopy), 디지털 홀로그래피 현미경(DHM), 시차 디지털 홀로그래피 현미경(DDHM), 또는 이들의 조합물을 포함한다. 시차 디지털 홀로그래피 현미경(DDHM), 및 시차 DHM이 본원에서 교환가능하게 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 자동화된 시스템은 시차 디지털 홀로그래피 현미경을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 자동화된 시스템은 조명 수단(예를 들어 레이저, LED)을 포함한 시차 디지털

홀로그래피 현미경을 포함한다. DDHM 방법론(methodology) 및 사용법에 관한 설명은 예를 들어 미국특허 제 7,362,449호; 유럽특허 제1,631,788호; 미국특허 제9,904,248호; 및 미국특허 제9,684,281호에서 찾을 수 있으며, 상기 특허문헌 전체가 본원에서 참조로 인용된다.

[0481] DDHM은 라벨 없는 비과피 세포 이미징을 가능하게 하여 고-콘트라스트 홀로그래픽 이미지를 생성한다. 상기 이미지는 이미지화된 객체(object)(예를 들어 배양된 세포, 세포 부스러기)를 정량적으로 묘사하는 복수의 형태학적 특징을 얻기 위해 객체 분할(object segmentation) 및 추가 분석을 행할 수 있다. 가령, 다양한 특징들(예를 들어 세포 형태, 세포 생존율, 세포 농도, 세포수)이 예를 들어 이미지 획득, 이미지 처리, 이미지 분할 및 기능 추출의 단계를 이용하여 DDHM으로부터 직접 분석 또는 계산될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 자동화된 시스템은 홀로그래픽 이미지를 기록하는 디지털 기록 장치를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 자동화된 시스템은 홀로그램 이미지를 분석하기 위한 알고리즘을 포함하는 컴퓨터를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 자동화된 시스템은 홀로그램 이미지 분석 결과를 표시하기 위한 모니터 및/또는 컴퓨터를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 분석은 자동화된다(즉, 사용자 입력의 부재하에 수행될 수 있는). 상기 배양 단계도중에 세포를 모니터링하는데 적합한 자동화된 시스템의 예는 제한되지는 않지만 오비시오 아이라인 에프(Ovizio iLine F; 제조원: Ovizio Imaging Systems NV/SA, Brussels, Belgium)을 포함한다.

[0482] 특정 구현예에서, 상기 모니터링은 배양 단계동안 연속적으로 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계동안 실시간으로 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계동안 개별 시점에서 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 15분마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 30분마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 45분마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 1시간마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 2시간마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 4시간마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 6시간마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 8시간마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 10시간마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 12시간마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 14시간마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 16시간마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 18시간마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 20시간마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 매 22시간마다 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 1일에 한번 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 2일에 한번 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 3일에 한번 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 4일에 한번 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 5일에 한번 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 6일에 한번 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 7일에 한번 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 8일에 한번 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 9일에 한번 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 10일에 한번 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 모니터링은 상기 배양 단계의 기간동안 적어도 한번 수행된다.

[0483] 일부 구현예에서, DHM 또는 DDHM와 같은 광학 기기를 이용하는 것을 비롯한 상기 모니터링에 의해서 결정될 수 있는 세포의 특징은 세포 생존율, 세포 농도, 세포수 및/또는 세포 밀도를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 생존율이 특성화되나 결정된다. 일부 구현예에서, 세포 생존율, 세포 농도, 세포수 및/또는 세포 밀도가 특성화되나 결정된다. 일부 구현예에서, 생존 세포 농도, 생존 세포수 및/또는 생존 세포 밀도가 특성화되나 결정된다. 일부 구현예에서, 상기 배양된 세포는 예를 들어 위에서 기술한 바와 같이 임계치의 증폭에 도달할 때까지 상기 자동화된 시스템에 의해서 모니터링된다. 일부 구현예에서, 일단 임계치의 증폭에 도달하면, 상기 배양된 세포는 예를 들어 자동 또는 수동 방법, 예를 들어 인간 작업자에 의해서 수확된다. 상기 임계치의 증폭은 상기 자동화된 시스템에 의해서 결정된 배양된 세포의 총 농도, 밀도 및/또는 수에 의존할 수 있다. 다르게는, 상기 임계치의 증폭은 생존 세포 농도, 밀도 및/또는 수에 의존할 수 있다. 수(number 및 수(count)는 본원에서 호환가능하게 사용될 수 있다.

- [0484] 일부 구현예에서, 상기 수확된 세포는 예를 들어 약학적으로 허용가능한 담체의 존재하에서 기술된 바와 같이 제형화된다. 일부 구현예에서, 상기 수확된 세포는 저온 보호제(cryoprotectant)의 존재하에 제형화된다.
- [0485] **E. 세포 제형화**
- [0486] 일부 구현예에서, 세포 요법제 및/또는 조작된 세포를 제조, 생성 또는 생산하기 위한 하나 이상의 공정 단계 (예를 들어 원심 챔버 및/또는 폐쇄된 시스템에서 수행됨)은 세포의 제형화, 예를 들어 컬처링, 예를 들어 배양 및 증폭 전 또는 후에 상기 제공된 형질도입 처리 단계, 및/또는 기술된 하나 이상의 다른 처리 단계로부터 생성된 유전자 조작된 세포의 제형화를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 제형화와 관련된 상기 제공된 방법은 처리중인 형질도입된 세포, 예를 들어 폐쇄된 시스템에서 위에서 기술한 처리 단계를 이용하여 형질도입되고/되거나 증폭된 세포를 포함한다.
- [0487] 일부 구현예에서, 상기 자극 시약은 상기 제형화 이전에 상기 세포로부터 제거되고/되거나 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 상기 배양 후에 상기 세포로부터 제거되고/되거나 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은, 예를 들어 증식 및/또는 증폭을 촉진시키는 조건하에, 상기 배양 후에 그리고 상기 배양된 세포를 제형화하기 전에 상기 세포로부터 제거되고/되거나 분리된다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 본원에서, 예를 들어 섹션 I-B-1에서 기술되는 자극 시약이다. 특정 구현예에서, 상기 자극 시약은 본원에서, 예를 들어 섹션 I-B-2에서 기술된 세포로부터 제거되고/되거나 분리된다.
- [0488] 일부 구현예에서, 상기 세포는, 상기 배양도중에 임계치의 세포수, 밀도, 및/또는 증폭이 달성된 후 0일 내지 10일, 0일 내지 5일, 2일 내지 7일, 0.5일 내지 4일, 또는 1일 내지 3일에 제형화된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는, 상기 배양도중에 임계치의 세포수, 밀도, 및/또는 증폭이 달성된 후 (약) 12시간, 18시간, 24시간, 1일, 2일, 또는 3일 이내에 제형화된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는, 상기 배양도중에 임계치의 세포수, 밀도, 및/또는 증폭이 달성된 후 (약) 1일 이내에 제형화된다.
- [0489] 일부 구현예에서, 세포 요법제 및/또는 조작된 세포를 제조, 생성 또는 생산하기 위한 상기 제공된 방법은 세포의 제형화, 예를 들어 컬처링, 예를 들어 배양 및 증폭 전 또는 후에 상기 제공된 처리 단계, 및/또는 기술된 하나 이상의 다른 처리 단계로부터 생성된 유전자 조작된 세포의 제형화를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 제형화와 관련된 상기 제공된 방법은 처리중인 형질도입된 세포, 예를 들어 폐쇄된 시스템에서 위에서 기술한 처리 단계를 이용하여 형질도입되고/되거나 증폭된 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 제조할 항원 수용체, 예를 들어 CAR 또는 TCR로 조작된 세포를 포함하는 세포의 용량은 조성물 또는 제형, 예를 들어 약학 조성물 또는 제형으로 제공된다. 상기 조성물은 예를 들어 질병, 병태, 및 장애의 예방 또는 치료, 또는 탐지, 진단, 및 예후 방법(prognostic method)에서 상기 제공된 방법에 따라 사용될 수 있다.
- [0490] 일부 경우에, 상기 세포는, 세포의 제형화, 예를 들어 컬처링, 예를 들어 배양 및 증폭 전 또는 후에 상기 제공된 형질도입 처리 단계, 및/또는 기술된 하나 이상의 다른 처리 단계로부터 생성된 유전자 조작된 세포의 제형화를 포함하는, 세포 요법제 및/또는 조작된 세포를 제조, 생성 또는 생산하기 위한 하나 이상의 단계(예를 들어 원심 챔버 및/또는 폐쇄된 시스템에서 수행됨)에서 처리될 수 있다. 일부 경우에, 상기 세포는 용량 투여 (dosage administration), 예를 들어 단일 용량 투여 또는 다중 용량 투여를 위한 양으로 제형화될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 제형화와 관련된 상기 제공된 방법은 처리 중인 형질도입된 세포, 예를 들어 폐쇄된 시스템에서 위에서 기술한 처리 단계를 이용하여 형질도입되고/되거나 증폭된 세포를 포함한다.
- [0491] 특정 구현예에서, 농축된 T 세포의 하나 이상의 조성물이 제형화된다. 특정 구현예에서, 농축된 T 세포의 하나 이상의 조성물은, 상기 농축된 T 세포의 하나 이상의 조성물이 조작 및/또는 배양된 후에 제형화된다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 조성물은 투입 조성물이다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 조성물은 미리 저온 동결되고 저장되며, 인큐베이션 전에 해동된다.
- [0492] 특정 구현예에서, 상기 제형화된 세포는 산출 세포이다. 특정 구현예에서, 농축된 T 세포의 제형화된 조성물은 농축된 T 세포의 투입 조성물이다. 특정 구현예에서, 상기 제형화된 CD4+ T 세포 및 제형화된 CD8+ T 세포는 산출 CD4+ T 및 CD8+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 제형화된 세포 조성물, 예를 들어 농축된 CD4+ 및 CD8+ 세포의 제형화된 조성물은 산출 세포 조성물, 예를 들어 CD4+ 및 CD8+ 세포의 산출 조성물이다.
- [0493] 일부 구현예에서, 세포는 용기, 예를 들어 백 또는 바이알로 제형화될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 세포는, 상기 배양도중에 임계치의 세포수, 밀도, 및/또는 증폭이 달성된 후 0일 내지 10일, 0일 내지 5일, 2일 내지 7일, 0.5일 내지 4일, 또는 1일 내지 3일에 제형화된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는, 상기 배양도중에 임계치의 세포수, 밀도, 및/또는 증폭이 달성된 후 (약) 12시간, 18시간, 24시간, 1일, 2일, 또는 3일 이내에

제형화된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는, 상기 배양도중에 임계치의 세포수, 밀도, 및/또는 증폭이 달성된 후 (약) 1일 이내에 제형화된다.

[0494] 특정 구현예에서, 상기 세포는, 상기 임계치가 달성되는 때와 무관하게 세포가 상기 배양도중에 보다 빠른 시점에서 제형화되는 경우 보다 덜 활성화된 상태에서 수거되도록 최소 기간 또는 시간동안 배양된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는, 상기 배양도중에 임계치의 세포수, 밀도, 및/또는 증폭이 달성된 후 0일 내지 3일, 예를 들어 0일 내지 3일, 1일 내지 2일, (약) 1일, (약) 2일, 또는 (약) 3일에 제형화된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 상기 임계치의 세포수, 밀도, 및/또는 증폭을 활성화하고 상기 제형화 전의 최소 시간 또는 기간동안 배양된 상태를 유지한다. 일부 구현예에서, 상기 임계치를 달성한 세포는 그것들이 최소 시간 또는 기간, 예를 들어 1일 내지 14일, 2일 내지 7일, 또는 3일 내지 6일의 최소 시간 또는 기간, 또는 (약) 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 또는 7일 초과인 최소 시간 또는 기간동안 배양될 때까지 제형화되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 배양의 최소 시간 또는 기간은 3일 내지 6일이다.

[0495] 일부 구현예에서, 상기 세포는, 일부 측면에서 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있는 약학적으로 허용가능한 완충액 중에서 제형화된다. 일부 구현예에서, 상기 처리는, 대상체에게 투여하는데 약학적으로 허용가능하거나 바람직한 배지 또는 제형화 완충액으로의 배지의 교환을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 처리 단계는 상기 형질도입되고/되거나 증폭된 세포를 세척하여, 하나 이상의 선택적인 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함할 수 있는 약학적으로 허용가능한 완충액 속에서 상기 세포를 대체하는 것을 포함할 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체 또는 부형제를 포함하는 상기 약학 제형의 예는 상기 세포 및 조성물을 대상체에게 투여하는데 허용가능한 형태와 관련하여 하기에 기술된 임의의 것일 수 있다. 일부 구현예에서 상기 약학 조성물은 상기 세포를 상기 질병 또는 병태를 치료 또는 예방하는 유효량으로, 예를 들어 치료학적 효과량 또는 예방학적 효과량으로 함유한다.

[0496] "약학적으로 허용가능한 담체"라 함은 의약 조성물 내에서 활성 성분이 아니면서 대상체에게 비독성인 성분을 가리킨다. 약학적으로 허용가능한 담체의 비제한적인 예로는 완충제, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 들 수 있다.

[0497] 일부 측면에서, 담체의 선별은 부분적으로 특정한 세포, 및/또는 투여 방법에 따라 결정된다. 따라서, 적절한 제형이 다양하게 존재한다. 예를 들어 의약 조성물은 보존제를 함유할 수 있다. 적절한 보존제로는 예를 들어 메틸파라벤, 프로필파라벤, 소듐 벤조에이트, 및 염화 벤잘코늄을 들 수 있다. 일부 측면에서, 2종 이상의 보존제의 혼합물이 사용된다. 보존제 또는 그의 혼합물은 일반적으로 총 조성물 중 약 00001% 내지 약 2 중량%의 양으로 존재한다. 담체는 예를 들어 문헌 「Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)」에 설명되어 있다. 약학적으로 허용가능한 담체는 일반적으로 사용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성이며; 완충제 예를 들어 포스페이트, 시트레이트 및 기타 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 보존제(예를 들면 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드); 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤 예를 들면 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 잔기 미만) 폴리펩티드; 단백질, 예를 들면 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 폴리머 예를 들면 폴리비닐피롤리돈; 아미노산 예를 들면 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물 예를 들어 글루코스, 만노스 또는 텍스트린; 킬레이트화제 예를 들면 EDTA; 당 예를 들면 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 카운터-이온 예를 들면 소듐; 금속 복합체(예를 들어 Zn-단백질 복합체); 및/또는 비-이온성 계면활성제 예를 들면 폴리에틸렌 글리콜(PEG)를 포함할 수 있으며 이들로 한정되지 않는다.

[0498] 완충제는 일부 측면에서 조성물에 포함된다. 적절한 완충제의 예로는 시트르산, 소듐 시트레이트, 인산, 포타슘 포스페이트, 및 그 밖에 다양한 것 들 수 있다. 일부 측면에서, 2종 이상의 완충제의 혼합물이 사용된다. 완충제 또는 그의 혼합물은 총 조성물에 대해 일반적으로 약 0001% 내지 약 4 중량%의 양으로 존재한다. 투약가능한 의약 조성물의 제조 방법은 공지이다. 예시적인 방법은 예를 들면 문헌 「Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)」에 보다 자세히 설명되어 있다.

[0499] 제형(formulation)은 수용액을 포함할 수 있다. 제형 또는 조성물은 또한 세포로 치료되는 특정 징후, 질병 또는 병태에 유용한 하나 이상의 활성 성분, 바람직하게는 각각의 활성이 서로 역효과를 미치지 않는, 세포에 상보적인 활성을 갖는 활성 성분을 두 가지 이상 함유할 수 있다. 이러한 활성 성분은 적절하게 의도된 목적에

유효한 양으로 조합하여 존재한다. 따라서, 일부 구현예에서, 의약 조성물은 화학요법제, 예를 들어 아스파라기나제, 부술판, 카보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 겐시타빈, 히드록시우레아, 메토틱세이트, 파클리탁셀, 리톡시맙, 빈블라스틴, 및/또는 빈크리스틴과 같은 다른 약학적 활성 제제 또는 약물을 더 포함한다.

[0500] 일부 구현예에서, 조성물은 멸균 액상 제제, 예를 들어 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액 또는 점성 조성물로서 제공되며, 이들은 일부 측면에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액상 조성물은 예를 들어 물, 염수, 인산염 완충 염수, 폴리올(예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜) 및 이들의 적절한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 배지일 수 있는 담체를 포함할 수 있다. 예를 들어 적절한 담체, 희석제 또는 부형제, 예를 들어 멸균수, 생리식염수, 글루코스, 텍스트로스 등과 혼합된 용매에 세포를 혼입시킴으로써 주사가 가능한 멸균 용액을 제조할 수 있다. 투여 경로 및 소망하는 제제에 따라 조성물은 보조 제제, 예를 들어 습윤제, 분산제 또는 유화제(예를 들어 메틸셀룰로스), pH 완충제, 겔화제 또는 점도 증강 첨가제, 방부제, 풍미제, 및/또는 색소를 함유할 수 있다. 일부 측면에서 적절한 제제를 제조하기 위해, 표준 텍스트를 참조할 수 있다.

[0501] 항미생물 보존제, 항산화제, 킬레이팅제 및 완충제를 비롯하여, 조성물의 안정성과 멸균성을 향상시키는 다양한 첨가제가 첨가될 수 있다. 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 과라벤, 클로로부탄올, 페놀, 및/또는 소르브산에 의하여 미생물의 작용을 방지할 수 있다. 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 이용함으로써 주사가 가능한 의약 형태를 장기간 흡수시킬 수 있다.

[0502] 일부 구현예에서, 상기 제형 완충액은 저온 보존제(cryopreservative)를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는, 1.0% 내지 30% DMSO 용액, 예를 들어 5% 내지 20% DMSO 용액 또는 5% 내지 10% DMSO 용액을 함유하는 저온 보존제 용액으로 제형화된다. 일부 구현예에서, 상기 저온 보존제 용액은 예를 들어 PBS 함유 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민(HSA), 또는 다른 적당한 세포 동결 배지이거나 또는 그를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 저온 보존제 용액은 예를 들어 적어도 또는 약 7.5% DMSO이거나 또는 그를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 처리 단계는 형질도입되고/되거나 증폭된 세포를 세척하여 상기 세포를 저온 보존제 용액 중에서 대체하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 (약) 12.5%, 12.0%, 11.5%, 11.0%, 10.5%, 10.0%, 9.5%, 9.0%, 8.5%, 8.0%, 7.5%, 7.0%, 6.5%, 6.0%, 5.5%, 또는 5.0% DMSO, 또는 1% 내지 15%, 6% 내지 12%, 5% 내지 10%, 또는 6% 내지 8% DMSO의 최종 농도를 갖는 배지 및/또는 용액 중에서 동결, 예를 들어 저온 동결 또는 저온 보존된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 (약) 5.0%, 4.5%, 4.0%, 3.5%, 3.0%, 2.5%, 2.0%, 1.5%, 1.25%, 1.0%, 0.75%, 0.5%, 또는 0.25% HSA, 또는 0.1% 내지 5%, 0.25% 내지 4%, 0.5% 내지 2%, 또는 1% 내지 2% HSA의 최종 농도를 갖는 배지 및/또는 용액 중에서 동결, 예를 들어 저온 동결 또는 저온 보존된다.

[0503] 특정 구현예에서, 자극되고, 조작되고/되거나, 배양된 농축된 T 세포, 예를 들어 T 세포의 조성물은 제형화되고, 저온 동결된 다음, 일정 시간동안 저장된다. 특정 구현예에서, 상기 제형화되고, 저온 동결된 세포는, 상기 세포가 주입을 위해 방출될 때까지 저장된다. 특정 구현예에서, 상기 제형화되고 저온 동결된 세포는, 1일 내지 6개월, 1개월 내지 3개월, 1일 내지 14일, 1일 내지 7일, 3일 내지 6일, 6개월 내지 12개월, 또는 12개월 초과동안 저장된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 (약) 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 또는 7일, 또는 그 기간 미만동안 저장된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 상기 저장 후 해동되고 투여된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 (약) 5일동안 저장된다.

[0504] 일부 구현예에서, 상기 제형화는, 상기 세포, 예를 들어 상기 배양되거나 또는 증폭된 세포를 세척, 희석 또는 농축하는 것을 포함하는 하나 이상의 처리 단계를 이용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 처리는, 원하는 농도 또는 수로의, 주어진 용량 또는 그의 분획으로 투여하기 위한 세포의 수를 포함하는 단위 용량형으로의 상기 세포의 희석 또는 농축을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 처리 단계는 세포의 농도를 원하는 만큼 감소시키는 부피-감소를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 처리 단계는 일정 부피의 제형화 완충액을 형질도입되고/되거나 증폭된 세포에 첨가하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제형화 완충액의 부피는 (약) 10 mL 내지 1000 mL, 예를 들어 적어도 또는 적어도 (약) 50 mL, 100 mL, 200 mL, 300 mL, 400 mL, 500 mL, 600 mL, 700 mL, 800 mL, 900 mL 또는 1000 mL이다.

[0505] 일부 구현예에서, 세포 조성물을 제형화하기 위한 상기 처리 단계는 폐쇄된 시스템에서 수행된다. 예시적인 상기 처리 단계는, 세포 처리 시스템과 관련된 하나 이상의 시스템 또는 키트와 함께 원심 챔버를 이용하여, 예를 들어 Sepax® 및 Sepax2® 시스템과 함께 사용되기 위한 것을 포함하여 바이오세이프 에스에아(Biosafe SA) 사에 의해서 제조되고 판매되는 원심 챔버를 이용하여 수행될 수 있다. 예시적인 시스템 및 공정은 국제공개공보 제W02016/073602호에 기술되어 있다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 상기 원심 챔버의 내부 공동으로부터 제형

화된 조성물의 발현을 수행하는 것을 포함하고, 이것은 전술한 구현예들 중의 임의의 것에서 제형화 완충액, 예를 들어 약학적으로 허용가능한 완충액 중에서 제형화된 세포의 생성 조성물이다. 일부 구현예에서, 상기 제형화된 조성물의 발현은 용기, 예를 들어 원심 챔버를 갖는 폐쇄된 시스템의 일부로서 작동가능하게 연결되는 백에 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 용기, 예를 들어 백은 산출 라인 또는 투입 위치에 연결된다.

[0506] 일부 구현예에서, 예를 들어 원심 챔버 또는 세포 처리 시스템과 관련된 상기 폐쇄된 시스템은 하나 이상의 용기가 제형화된 조성물의 발현을 위해 연결될 수 있는 포트를 갖는 배관 라인의 각 단부에 관련된 다중 방식 배관 매니폴드(multi-way tubing manifold)를 포함하는 다중 포트 산출 키트(multi-port output kit)를 포함한다. 일부 측면에서, 원하는 수 또는 복수의 산출 용기, 예를 들어 백은 하나 이상, 일반적으로는 둘 이상 예를 들어 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 그 이상의 다중-포트 산출물에 멸균 상태로 연결될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 하나 이상의 용기, 예를 들어 백은 상기 포트에, 또는 모든 포트 보다는 적은 포트에 부착될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 상기 시스템은 복수의 산출 백으로의 산출 조성물의 발현을 수행할 수 있다.

[0507] 일부 측면에서, 세포는 용량 투여, 예를 들어 단일 단위 용량 투여 또는 다중 용량 투여를 위한 양으로 상기 복수의 산출 백 중의 하나 이상으로 발현될 수 있다. 예를 들어 일부 구현예에서, 상기 산출 백은 각각 주어진 용량 또는 그의 분획으로 투여하기 위한 세포의 수를 함유할 수 있다. 따라서, 각각의 백은 일부 측면에서 투여를 위한 단일 단위 용량을 함유할 수 있거나 또는 상기 복수의 산출 백, 예를 들어 2개의 산출 백, 또는 3개의 산출 백 중의 하나 초과가 함께 투여를 위한 용량을 구성하도록 원하는 용량의 분획을 함유할 수 있다.

[0508] 따라서, 상기 용기, 예를 들어 산출 백은 일반적으로는 투여되는 세포, 예를 들어 그의 하나 이상의 단위 용량을 함유한다. 상기 단위 용량은 대상체에 투여되는 세포의 양 또는 수, 또는 투여되는 세포의 수의 2배(또는 그 이상)일 수 있다. 대상체에 투여되는 상기 세포의 최저 용량 또는 최저 가능한 용량일 수 있다.

[0509] 일부 구현예에서, 상기 용기, 예를 들어 백은 각각 개별적으로 상기 세포의 단위 용량을 포함한다. 따라서 일부 구현예에서, 각각의 용기는 동일하거나 또는 대략적으로 또는 실질적으로 동일한 수의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 각각의 단위 용량은 적어도 또는 적어도 약 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , or 1×10^8 개의 조작된 세포, 총 세포, T 세포 또는 PBMC를 함유한다. 일부 구현예에서, 각각의 백 중의 상기 제형화된 세포 조성물의 부피는 10 mL 내지 100 mL, 예를 들어 적어도 또는 적어도 (약) 20 mL, 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL, 70 mL, 80 mL, 90 mL 또는 100 mL이다.

[0510] 일부 구현예에서, 상기 방법에 의해서 제조된 세포, 또는 상기 세포를 포함하는 조성물은 질병 또는 병태를 치료하기 위해 대상체에 투여된다.

[0511] **F. 상기 공정의 예시적 특징**

[0512] 특정 구현예에서, 상기 제공된 방법은 하나 이상의 투입 조성물로부터 및/또는 단일 생물학적 샘플로부터의 농축된 T 세포의 산출 조성물을 제조하거나 또는 생성하는 공정과 관련하여 사용된다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물은 제조할 수용체, 예를 들어 TCR 또는 CAR을 발현하는 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 조성물의 세포는 세포 요법체로서, 예를 들어 자가 세포 요법체로서 대상체에 투여하는데 적합하다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물은 농축된 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 조성물이다.

[0513] 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법은 산출 세포 및/또는 농축된 T 세포의 산출 조성물을 생성하거나 또는 제조하는 전체 공정, 예를 들어 생물학적 샘플을 수거 또는 수득하는 단계; 상기 생물학적 샘플로부터 투입 세포를 분리, 선별, 또는 농축하는 단계; 상기 투입 세포를 저온 동결 및 저장하는 단계; 자극 조건하에 상기 투입 세포를 해동 및/또는 인큐베이션하는 단계; 제조할 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 제조할 수용체 예를 들어 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현하거나 또는 함유하도록 상기 자극된 세포를 조작하는 단계; 상기 조작된 세포를 임계치의 양, 밀도, 또는 증폭으로 배양하는 단계; 및/또는 상기 제형화된 산출 세포를, 상기 세포가 주입을 위해서 방출되고/되거나 대상체에 투여되기 전에 적합할 때까지 저온 동결 및 저장하는 단계 중의 일부 또는 전부의 단계를 포함하는 공정과 관련하여 사용된다. 일부 구현예에서, 상기 전체 공정은 농축된 T 세포의 단일 조성물, 예를 들어 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 사용하여 수행된다. 특정 구현예에서, 상기 공정은 농축된 T 세포의 단일 산출 조성물을 생성하거나 또는 제조하는 공정 전에 및/또는 도중에 조합되는 농축된 T 세포의 둘 이상의 투입 조성물을 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 농축된 T 세포는 조작된 T 세포, 예를 들어 제조할 수용체를 발현하도록 형질도입된 T 세포이거나 또는 그를 포함한다.

[0514] 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법과 관련된 공정은 대안 공정과 비교된다. 특정 구현예에서, 상기 대안 공정은 하나 이상의 특이적 측면에서 상이할 수 있지만 그렇지 않은 경우 상기 제공된 방법과 관련된 공정의 동일한

특징, 측면, 단계, 스테이지, 시약 및/또는 조건을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 대안 공정은, 상기 제공된 방법과 유사하지만, 제한되지는 않으나, 상이한 시약 및/또는 배지 제형; 인큐베이션, 형질도입, 형질주입, 및/또는 배양도중에 혈청의 존재; 상기 투입 조성물의 상이한 세포 구성, 예를 들어 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율; 자극 조건하에서 인큐베이션된 투입 세포의 상이한 양 및/또는 농도; 상이한 자극 조건 및/또는 상이한 자극 시약; 자극 시약 대 세포의 상이한 비율; 상이한 배지 및/또는 형질도입 방법; 상기 세포를 인큐베이션, 형질도입, 및/또는 형질주입하기 위한 상이한 시기 또는 순서; 인큐베이션, 형질도입, 형질주입, 및/또는 배양도중에 존재하는 하나 이상의 재조합 사이토카인의 부재 또는 상이함; 형질도입되는 세포의 상이한 양 및/또는 농도; 배양도중의 상이한 락킹 및/또는 관련 조건; 및/또는 상기 배양도중에 달성된 상이한 임계치의 양, 밀도, 또는 증폭 중의 하나 이상을 포함한다.

[0515] 특정 구현예에서, 상기 공정은 (약) 35일, 34일, 33일, 32일, 31일, 30일, 29일, 28일, 27일, 26일, 25일, 24일, 23일, 22일, 21일, 20일, 19일, 18일, 17일, 16일, 15일, 14일, 13일, 12일, 11일, 10일, 9일, 또는 9일 미만의 기간 및/또는 시간 내에 완성된다. 일부 구현예에서, 상기 공정은 25일 내에 완성된다. 특정 구현예에서, 상기 공정은 21일 내에 완성된다. 특정 구현예에서, 상기 공정은 14일 내지 18일의 기간 및/또는 시간 내에 완성된다. 일부 구현예에서, 상기 공정은, 상기 조성물이 수확 및/또는 제형화될 때; 상기 조성물이 수확을 위한 목표 임계값에 도달하였을 때; 상기 조성물이 방출되고/되거나 포스트-제형화 시험(post-formulation testing)을 준비할 때; 상기 조성물이 대상체에 투여될 준비가 되었을 때; 및/또는 저온 동결 조성물의 저장 시간을 포함하여 상기 조성물이 대상체에 투여될 때 완성된 것으로 간주된다. 상기 공정이 동일한 생물학적 샘플로부터 얻어진 농축된 T 세포의 하나 초과 조성물에서 수행될 때, 상기 공정은 상기 동일한 생물학적 샘플로부터 각각 및 모든 조성물의 적어도 하나의 대표 샘플이 상기 공정을 완성하였을 때 완성된다.

[0516] 일부 구현예에서, 상기 공정은 상기 생물학적 샘플의 시작 또는 수거 및/또는 상기 생물학적 샘플로부터의 투입 세포의 단리, 선별, 자극, 및/또는 농축으로부터 상기 산출 세포가 투입을 위해서 방출될 때까지 측정하여 21일 이내에 완성된다. 특정 구현예에서, 상기 공정은 상기 생물학적 샘플의 시작 또는 수거 및/또는 상기 생물학적 샘플로부터의 투입 세포의 단리, 선별, 자극, 및/또는 농축으로부터 상기 산출 세포가 후-제형화 시험을 준비하고, 투입을 위해서 방출되고/되거나, 상기 대상체에 투여될 준비할 할 때까지 측정하여 14일 내지 18일 내에 완성된다.

[0517] 자극 조건하에 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터 상기 산출 세포가 수거, 제형화 및/또는 저온 동결될 때까지 일어나는 공정동안의 기간 및/또는 시간은 5일 또는 약 5일, 5일 내지 25일, 7일 내지 18일, 8일 내지 15일, 14일 내지 18일, 8일 내지 14일, 8일 내지 15일, 예를 들어 8일 내지 13일 또는 9일 내지 13일이다. 자극 조건하에 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터 상기 산출 세포가 수거, 제형화 및/또는 저온 동결될 때까지 일어나는 공정동안의 기간 및/또는 시간은 7일 내지 10일, 6일 내지 9일 또는 5일 내지 8일이다.

[0518] 상기 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터 상기 임계값이 달성될 때까지의 시간 및/또는 기간 중앙값은 약 또는 약 5일 미만, 5일 내지 25일, 7일 내지 18일, 9일 내지 13일, 14일 내지 18일이거나, 또는 (약) 5일, 5.5일, 6일, 6.5일, 7일, 7.5일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 또는 13일 또는 그 미만이다. 특정 구현예에서, 상기 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터 상기 임계값이 달성될 때까지의 시간 및/또는 기간 평균값은 약 5일 또는 약 5일 미만, 5일 내지 25일, 7일 내지 18일, 14일 내지 18일, 8일 내지 13일, 또는 9일 내지 13일이거나, 또는 (약) 5일, 5.5일, 6일, 6.5일, 7일, 7.5일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 또는 13일 또는 그 미만이다. 특정 구현예에서, 자극 조건하에 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터 상기 임계값이 달성될 때까지의 시간 및/또는 기간은 약 5일 또는 약 5일 미만, 5일 내지 7일, 7일 내지 10일, 6일 내지 9일 또는 5일 내지 8일이다.

[0519] 일부 구현예에서, 조작된 세포(예를 들어 CAR T-세포)가 상기 제공된 공정에 의해서 성공적으로 제조될 수 있는 성공률은 적어도 (약) 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%이다. 일부 측면에서, 상기 성공률은 샘플이 예를 들어 성분채집술(apheresis)에 의해서 상기 제공된 공정에 의해서 조작하기 위해서 수거된 대상체의 백분율으로서 결정되며, 여기서 상기 세포는 자극 시약을 사용한 자극의 개시 후 약 5일 또는 약 5일 미만, 5일 내지 10일, 예를 들어 7일 내지 10일, 6일 내지 9일 또는 5일 내지 8일, 예를 들어 5일, 5.5일, 6일, 6.5일, 7일, 또는 7.5일일 때, 산출 세포의 수거, 제형화 및/또는 냉동보존을 비롯한 산출 세포의 수확을 위한 가공 기준에 부합한다. 일부 측면에서, 상기 성공률은 상기 성공률은 샘플이 예를 들어 성분채집술에 의해서 상기 제공된 공정에 의해서 조작하기 위해서 수거된 대상체의 백분율으로서 결정되며, 여기서 상기 세포는 상기 자극 시약을 사용한 상기 자극의 개시 후 21일 이내인 시간에 상기 대상체에 상기 조작된 세포의 재-주입(re-infusion)을 위한 가공 기준에 부합한다.

[0520] 일부 구현예에서, 세포를 제조하기 위한 제공된 공정에 적용된 복수의 대상체 중의 대상체의 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%에 대해, 또는 약 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%에 대해, 또는 적어도 (약) 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%에 대해 자극 조건하의 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터 산출 세포가 수거, 제형화, 및/또는 저온 동결(cryofrozen)될 때까지 일어나는 공정동안의 시간 및/또는 기간은 9일 내지 15일이다. 특정 구현예에서, 세포를 제조하기 위한 제공된 공정에 적용된 복수의 대상체 중의 대상체의 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%에 대해, 또는 약 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%에 대해 자극 조건하의 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터 산출 세포가 수거, 제형화, 및/또는 저온 동결될 때까지 일어나는 공정동안의 시간 및/또는 기간은 14일 내지 18일이다. 특정 구현예에서, 세포를 제조하기 위한 제공된 공정에 적용된 복수의 대상체 중의 대상체의 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%에 대해, 또는 약 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%에 대해 자극 조건하의 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터 산출 세포가 수거, 제형화, 및/또는 저온 동결될 때까지 일어나는 공정동안의 시간 및/또는 기간은 7일 내지 10일이다. 특정 구현예에서, 세포를 제조하기 위한 제공된 공정에 적용된 복수의 대상체 중의 대상체의 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%에 대해, 또는 약 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%에 대해 자극 조건하의 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터 산출 세포가 수거, 제형화, 및/또는 저온 동결될 때까지 일어나는 공정동안의 시간 및/또는 기간은 6일 내지 9일이다. 특정 구현예에서, 세포를 제조하기 위한 제공된 공정에 적용된 복수의 대상체 중의 대상체의 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%에 대해, 또는 약 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%에 대해 자극 조건하의 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터 산출 세포가 수거, 제형화, 및/또는 저온 동결될 때까지 일어나는 공정동안의 시간 및/또는 기간은 5일 내지 8일이다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 질병 또는 병태, 예를 들어 암, 예를 들어 다발성 골수종을 갖는 환자이다.

[0521] 일부 구현예에서, 생물학적 샘플, 예를 들어 성분 채집 및/또는 백혈구 감소로부터의 농축된 CD4+ 및 CD8+ 세포의 조성물의 단리, 농축, 및/또는 선별로부터 산출 세포가 수거, 제형화, 및/또는 저온 동결될 때까지 일어나는 공정동안의 시간 및/또는 기간은 5일 내지 25일, 7일 내지 18일, 14일 내지 18일, 8일 내지 19일, 8일 내지 14일, 또는 10일 내지 16일이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 세포는 세포를 제조하기 위한 제공된 공정에 적용된 복수의 대상체 중의 대상체의 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%에 대한 단리, 농축, 및/또는 선별 후 10일 내지 16일 사이에 수거, 제형화, 및/또는 수확된다. 특정 구현예에서, 상기 산출 세포는 세포를 제조하기 위한 제공된 공정에 적용된 복수의 대상체 중의 대상체의 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%에 대한 단리, 농축, 및/또는 선별 후 14일 내지 18일 사이에 수거, 제형화, 및/또는 수확된다.

[0522] 일부 구현예에서, 상기 공정은, 생물학적 샘플, 예를 들어 성분 채집 및/또는 백혈구 감소 샘플의 시작 또는 수거로부터 산출 조성물이 대상체에 투여되거나 또는 투여될 준비를 하고, 상기 산출 세포가 수확되고/되거나 제형화되며; 상기 산출 세포가 수확될 준비를 하고/하거나 제형화되고; 상기 산출 세포가 수확을 위한 표적 임계값에 도달하고/하거나; 상기 산출 조성물이 저온 동결 조성물에 대한 저장 시간을 비롯한 시험을 위해 방출될 때까지 측정하여 (약) 35일, 34일, 33일, 32일, 31일, 30일, 29일, 28일, 27일, 26일, 25일, 24일, 23일, 22일, 21일, 20일, 19일, 18일, 17일, 16일, 15일, 14일, 13일, 12일, 11일, 10일, 9일, 또는 9일 미만 이내에 완성된다. 일부 구현예에서, 상기 공정은 상기 생물학적 샘플의 시작 또는 수거로부터 상기 산출 세포가 주입, 예를 들어 대상체로 주입하기 위해 방출될 준비를 하거나 방출될 때까지 측정하여 21일 이내에 완성된다.

[0523] 일부 구현예에서, 상기 공정은, 상기 생물학적 샘플의 시작 또는 수거 및/또는 상기 생물학적 샘플로부터의 투입 세포의 단리, 선별, 자극, 및/또는 농축으로부터 산출 세포가 저온 동결 조성물(cryofrozen composition)을 위한 저장 시간을 비롯한 주입을 위해 방출될 때까지 측정하여, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9%, 또는 적어도 (약) 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9%의 신뢰 구간 내에서, (약) 35일, 34일, 33일, 32일, 31일, 30일, 29일, 28일, 27일, 26일, 25일, 24일, 23일, 22일, 21일, 20일, 19일, 18일, 17일, 16일, 15일, 14일, 13일, 12일, 11일, 10일, 9일, 또는 9일 미만 이내에 완성된다. 특정 구현예에서, 상기 공정은, 상기 생물학적 샘플의 시작 또는 수거 및/또는 상기 생물학적 샘플로부터의 투입 세포의 단리, 선별, 자극, 및/또는 농축으로부터 산출 세포가 저온 동결 조성물을 위한 저장 시간을 비롯한 주입을 위해 방출될 때까지 측정하여, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9%, 또는 적어도 (약) 75%, 80%,

85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9%의 신뢰 구간 내에서, 14일 내지 18일 이내에 완성된다.

[0524] 특정 구현예에서, 상기 공정은, 상기 생물학적 샘플의 수거 및/또는 상기 생물학적 샘플로부터의 T 세포, 예를 들어 투입 T 세포의 단리, 선별, 자극, 및/또는 농축으로부터 산출 세포가 저온 동결 세포 조성물을 위한 저장 시간을 비롯한 대상체에 투여되고/되거나 대상체에 투여될 준비를 할 때까지 측정하여, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9%, 또는 적어도 (약) 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9%의 신뢰 구간 내에서, (약) 35일, 34일, 33일, 32일, 31일, 30일, 29일, 28일, 27일, 26일, 25일, 24일, 23일, 22일, 21일, 20일, 19일, 18일, 17일, 16일, 15일, 14일, 13일, 12일, 11일, 10일, 9일, 또는 9일 미만 이내에 완성된다. 특정 구현예에서, 상기 공정은, 상기 생물학적 샘플의 수거 및/또는 상기 생물학적 샘플로부터의 T 세포, 예를 들어 투입 T 세포의 단리, 선별, 자극, 및/또는 농축으로부터 산출 세포가 저온 동결 세포 조성물을 위한 저장 시간을 비롯한 대상체에 투여되고/되거나 대상체에 투여될 준비를 할 때까지 측정하여, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9%, 또는 적어도 (약) 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9%의 신뢰 구간 내에서, 14일 내지 18일의 기간 또는 시간 이내에 완성된다.

[0525] 특정 구현예에서, 상기 공정은, 상기 생물학적 샘플의 수거 및/또는 상기 생물학적 샘플로부터의 T 세포, 예를 들어 투입 T 세포의 단리, 선별, 자극, 및/또는 농축으로부터 산출 세포가 저온 동결 세포 조성물을 위한 저장 시간을 비롯한 포스트-제형화 시험(post-formulation testing) 준비를 할 때까지 측정하여, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9%, 또는 적어도 (약) 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9%의 신뢰 구간 내에서, (약) 35일, 34일, 33일, 32일, 31일, 30일, 29일, 28일, 27일, 26일, 25일, 24일, 23일, 22일, 21일, 20일, 19일, 18일, 17일, 16일, 15일, 14일, 13일, 12일, 11일, 10일, 9일, 또는 9일 미만 이내에 완성된다. 특정 구현예에서, 상기 공정은, 상기 생물학적 샘플의 수거 및/또는 상기 생물학적 샘플로부터의 T 세포, 예를 들어 투입 T 세포의 단리, 선별, 자극, 및/또는 농축으로부터 산출 세포가 저온 동결 세포 조성물을 위한 저장 시간을 비롯한 포스트-제형화 시험 준비를 할 때까지 측정하여, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9%, 또는 적어도 (약) 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9%의 신뢰 구간 내에서, 14일 내지 18일의 기간 또는 시간 이내에 완성된다.

[0526] 특정 구현예에서, 상기 공정을 완성하는 기간 및/또는 시간은, 예를 들어 복수의 대상체로부터, 및/또는 적어도 특정 백분율의 대상체, 예를 들어 특정 징후 또는 질병을 갖는 것들, 예를 들어 상기 대상체의 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% 또는 95% 초과에 대해 저장 시간이 포함될 때 10일 내지 35일, 12일 내지 33일, 17일 내지 2일, 14일 내지 18일, 또는 19일 내지 23일이다.

[0527] 특정 구현예에서, 상이한 생물학적 샘플로부터 복수의 출발 조성물에 대해 상기 공정(예를 들어 대상체로부터 시료를 채취하여 제품이 대상체에게 주입될 준비가 되거나 방출될 때까지 측정된 경우)을 완성하는 시간 및/또는 기간의 중앙값은, 예를 들어 상기 저장 시간이 포함될 때 15일 내지 27일, 17일 내지 25일, 14일 내지 18일, 또는 19일 내지 23일이거나, 또는 (약) 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 또는 23일이거나, 또는 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 또는 23일 미만이다. 특정 구현예에서, 상이한 생물학적 샘플로부터 복수의 조성물에 대해 상기 공정을 완성하는 시간 및/또는 기간의 평균값은, 예를 들어 상기 운반 및/또는 저장 시간이 포함될 때 15일 내지 27일, 17일 내지 25일, 14일 내지 18일, 또는 19일 내지 23일이거나, 또는 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 또는 23일 미만이거나, 또는 (약) 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 또는 23일이다. 특정 구현예에서, 상이한 생물학적 샘플로부터 복수의 조성물에 대해 상기 공정을 완성하는 시간 및/또는 기간은, 예를 들어 상기 운반 및/또는 저장 시간이 포함될 때 15일 내지 27일, 17일 내지 25일, 14일 내지 18일, 또는 19일 내지 23일이거나, 또는 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 또는 23일 미만이거나, 또는 (약) 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 또는 23일이다.

[0528] 특정 구현예에서, 예를 들어 상이한 생물학적 샘플 및/또는 상이한 질병을 갖는 대상체로부터의 일정 범위의 출발 조성물에 대한 상기 공정의 기간은 21일 미만 또는 초과이며; 일부 경우에 상기 결과는 상기 샘플 또는 환자에 대한 생성물을 제조하는데 있어서 (약) 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 또는 95% 초과 성공률로 성취된다. 특정 구현예에서, 예를 들어 상이한 생물학적 샘플 및/또는 상이한 질병을 갖는 대상체로부터의 일정 범위의 출발 조성물에 대한 상기 공정의 기간은 14일 내지 18일이며; 일부 경우에 상기 결과는 상기 샘플 또는 환자에 대한 생성물을 제조하는데 있어서 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 또는 95% 초과 성공률로 성취된다.

[0529] 일부 구현예에서, 냉동 세포의 저장 시간이 포함되지 않거나 고려하지 않을 때 상기 공정을 완성하는 시간 및/

또는 시간은 7일 내지 27일, 9일 내지 25일, 11일 내지 18일, 14일 내지 18일, 또는 11일 내지 15일이다. 특정 구현예에서, 상이한 생물학적 샘플로부터의 복수의 출발 조성물에서 상기 공정을 완성하는데 필요한 중앙값 시간 및/또는 기간은, 저온 동결 세포의 저장 시간이 포함되지 않거나 고려하지 않을 때 7일 내지 27일, 9일 내지 25일, 11일 내지 18일, 14일 내지 18일, 또는 11일 내지 15일이거나, 또는 (약) 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 또는 18일, 또는 그 미만이다. 특정 구현예에서, 상이한 생물학적 샘플로부터의 복수의 출발 조성물에서 상기 공정을 완성하는데 필요한 평균값 시간 및/또는 기간은, 저온 동결 세포의 저장 시간이 포함되지 않거나 고려하지 않을 때 7일 내지 27일, 9일 내지 25일, 11일 내지 18일, 14일 내지 18일, 또는 11일 내지 15일이거나, 또는 (약) 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 또는 18일, 또는 그 미만이다. 일부 구현예에서, 상이한 생물학적 샘플로부터의 복수의 출발 조성물에서 상기 공정을 완성하는데 필요한 평균값 시간 및/또는 기간은, 저온 동결 세포의 저장 시간이 포함되지 않을 때 21일 미만이다.

[0530] 일부 구현예에서, 상이한 소스, 예를 들어 상이한 생물학적 샘플 및/또는 상이한 생물학적 샘플로부터 단리, 농축, 및/또는 선별된 농축된 T 세포의 상이한 투입 조성물로부터 얻어진 적어도 10%의 복수의 조성물에서 상기 공정을 완성하는 시간은, 저온 동결 세포의 저장 시간이 포함되지 않거나 고려하지 않을 때 7일 내지 18일, 14일 내지 18일, 10일 내지 17일, 또는 11일 내지 15일이거나, 또는 (약) 11일, 12일, 또는 13일이다. 특정 구현예에서, 상이한 생물학적 소스로부터의 적어도 50%의 복수의 조성물에서 상기 공정을 완성하는데 필요한 시간은, 저온 동결 세포의 저장 시간이 포함되지 않거나 고려하지 않을 때 7일 내지 27일, 9일 내지 25일, 11일 내지 18일, 14일 내지 18일, 또는 11일 내지 15일이거나, 또는 (약) 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 또는 18일이거나, 또는 그 미만이다. 특정 구현예에서, 상이한 소스로부터의 적어도 90%의 복수의 조성물에서 상기 공정을 완성하는데 필요한 시간은, 저온 동결 세포의 저장 시간이 포함되지 않거나 고려하지 않을 때 7일 내지 27일, 9일 내지 25일, 11일 내지 18일, 14일 내지 18일, 또는 11일 내지 15일이거나, 또는 (약) 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 또는 18일이거나, 또는 그 미만이다. 특정 구현예에서, 상이한 소스로부터의 적어도 90%의 복수의 조성물에서 상기 공정을 완성하는데 필요한 시간은, 저온 동결 세포의 저장 시간이 포함되지 않을 때 21일 미만이다.

[0531] 일부 구현예에서, 자극 조건하에 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터, 임계치의 양, 밀도, 및/또는 정도의 증폭 (예를 들어 4배와 같은 특정 배수의 증폭 또는 특정 복용량)이 배양도중에 달성될 때까지 일어나는 상기 공정동안의 기간 및/또는 시간은 5일 내지 25일, 7일 내지 18일, 14일 내지 18일, 또는 8일 내지 15일, 예를 들어 8일 내지 13일 또는 9일 내지 13일이다. 특정 구현예에서, 상기 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터, 상기 임계치가 달성될 때까지 일어나는 상기 공정의 중앙값 시간 및/또는 기간은 5일 내지 25일, 7일 내지 18일, 14일 내지 18일, 또는 9일 내지 13일이거나, 또는 (약) 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 또는 13일이거나, 또는 그 미만이다. 특정 구현예에서, 상기 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터, 상기 임계치가 달성될 때까지 일어나는 상기 공정의 평균값 시간 및/또는 기간은 5일 내지 25일, 7일 내지 18일, 14일 내지 18일, 또는 9일 내지 13일이거나, 또는 (약) 9일, 10일, 11일, 12일, 또는 13일이다.

[0532] 일부 구현예에서, 자극 조건하에 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터, 임계치의 양, 밀도, 및/또는 정도의 증폭이 배양도중에 달성될 때까지의 상기 공정의 기간 및/또는 시간은 대안적 공정의 그것 보다 적어도 (약) 5%, 적어도 (약) 10%, 적어도 (약) 15%, 적어도 (약) 20%, 적어도 (약) 25%, 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 35%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 45%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 또는 적어도 (약) 90% 적은 시간이다. 특정 구현예에서, 자극 조건하에 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터, 임계치의 양, 밀도, 및/또는 정도의 증폭이 배양도중에 달성될 때까지의 상기 공정동안의 기간 및/또는 시간은 적어도 (약) 0.5일, 1일, 1.5일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 또는 14일 초과까지 상기 대안 공정의 기간 및/또는 시간 보다 짧다.

[0533] 특정 구현예에서, 자극 조건하에 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터, 배양도중에 임계치의 양, 밀도, 및/또는 증폭이 달성될 때까지 상기 임계치의 양, 밀도, 및/또는 증폭에 도달하는 상이한 생물학적 샘플로부터의 적어도 10%의 복수의 조성물에 필요한 시간은, 5일 내지 20일, 7일 내지 15일, 또는 9일 내지 11일이거나, 또는 (약) 7일, 8일, 9일, 또는 10일, 또는 그 미만이다. 특정 구현예에서, 자극 조건하에 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터 상기 임계치의 양, 밀도, 및/또는 증폭에 도달하는 상이한 생물학적 샘플로부터의 적어도 50%의 복수의 조성물에 필요한 시간은, 5일 내지 25일, 7일 내지 18일, 또는 9일 내지 13일이거나, 또는 (약) 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 또는 13일, 또는 그 미만이다. 일부 구현예에서, 자극 조건하에 인큐베이션의 시작 또는 개시로부터 상기 임계치의 양, 밀도, 및/또는 증폭에 도달하는 상이한 생물학적 샘플로부터의 적어도 90%의 복수

의 조성물에 필요한 시간은, 5일 내지 25일, 7일 내지 18일, 또는 9일 내지 13일이거나, 또는 (약) 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 또는 13일이다.

[0534] 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법은 세포 요법에 사용하기 적합한 조작된 T 세포의 산출 조성물을 성공적으로 생성하거나 또는 제조하는 것과 관련하여 사용된다. 일부 구현예에서, 산출 조성물은 상기 조성물의 세포가 배양도중에 임계치의 세포수, 밀도, 및/또는 증폭을 달성하는 경우 성공적으로 생성된다. 특정 구현예에서, 산출 조성물은, 적어도 (약) 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 세포가 재조합 수용체를 발현하는 경우에 성공적으로 생성된다. 특정 구현예에서, 산출 조성물은 상기 산출 조성물이 치료학적 용도에, 예를 들어 자가 세포 요법제로서 적합한 경우 성공적으로 제조 또는 생성된다. 특정 구현예에서, 산출 조성물은 상기 산출 조성물의 세포가 하나 이상의 기준에 부합하는 경우 치료학적 용도에 적합하다. 일부 구현예에서, 세포 요법에 사용하기 적합한 세포 및/또는 세포 조성물은 멸균 상태(예를 들어 검출가능한 미생물 오염이 없는 상태), 내독소(endotoxin)의 부재 상태, 복제 가능한 바이러스(replication competent virus)의 부재 상태, 생존 상태, 활성 상태(예를 들어 표적 항원에 반응하여 세포 용해 활성을 보유하고/하거나 사이토카인을 방출하는 것)이고/이거나, 재조합 수용체를 발현하는 고비율의 세포를 함유한다.

[0535] 일부 구현예에서, 산출 세포의 일부, 샘플, 및/또는 분획은 예를 들어 냉동하기 전에 수거되고, 하나 이상의 분석으로 시험된다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 분석은 상기 산출 세포를 평가하고, 예를 들어 상기 산출 세포의 특징, 표현형, 및/또는 특성을 산정(assess), 평가(evaluate), 및/또는 정량화(quantify)하여 예를 들어 상기 산출 세포의 안전성 및/또는 생물학적 특성을 결정하거나 또는 검증(verify)하는 분석을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 분석은 상기 산출 세포의 일부, 샘플, 및/또는 분획이 멸균 상태임을 검증하는 분석을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 분석은 미생물 어염, 박테리아 내독소, 잔류 시약, 및/또는 복제가능한 바이러스의 존재에 대한 시험을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 분석은 하나 이상의 생물학적 특성을 측정, 검출 및/또는 정량화한다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 분석은 세포수, 세포 밀도, 세포 표현형, 예를 들어 CD3, CD4, 및/또는 CD8의 표면 발현, 생존능력, 및/또는 활성, 예를 들어 사이토카인 방출 및/또는 세포 용해 활성을 측정, 검출 및/또는 정량화한다.

[0536] 특정 구현예에서, 하나 이상의 분석은 출력 세포가 주입을 위해 방출되고, 대상체에게 투여 준비되고/되거나 대상체에 투여되기 전에 수행된다. 특정 구현예에서, 출력 세포는 주입을 위해 방출되고, 대상체에 투여 준비되고/되거나, 하나 이상의 분석이 예를 들어 출력 세포의 일부, 분획 및/또는 샘플에서 수행된 후 대상체에 투여된다. 특정 구현예에서, 출력 세포가 주입을 위해 방출되고, 대상체에게 투여 준비되고/되거나, 산출 세포가 안전한 것으로, 예를 들어 멸균 상태 및/또는 부재 상태인 것으로 결정되고/되거나 상기 하나 이상의 분석의 완성에 따라 원하는 생물학적 특성을 가진 후 대상체에게 투여된다.

[0537] 특정 구현예에서, 제공된 방법은 투입 세포의 조성물 및/또는 생물학적 샘플로부터 농축 T 세포의 산출 조성물을 성공적으로 생성 또는 제조할 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 81%, 적어도 (약) 82%, 적어도 (약) 83%, 적어도 (약) 84%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 86%, 적어도 (약) 87%, 적어도 (약) 88%, 적어도 (약) 89%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 91%, 적어도 (약) 92%, 적어도 (약) 93%, 적어도 (약) 94%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 96%, 적어도 (약) 97%, 적어도 (약) 98%, 또는 적어도 (약) 99%의 확률 또는 가능성을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 확률 또는 가능성은 85% 내지 100%, 90% 내지 94%이다. 특정 구현예에서, 제공된 방법은 투입 세포의 복수의 조성물 및/또는 복수의 생물학적 샘플로부터의 조성물 및/또는 샘플의 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 81%, 적어도 (약) 82%, 적어도 (약) 83%, 적어도 (약) 84%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 86%, 적어도 (약) 87%, 적어도 (약) 88%, 적어도 (약) 89%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 91%, 적어도 (약) 92%, 적어도 (약) 93%, 적어도 (약) 94%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 96%, 적어도 (약) 97%, 적어도 (약) 98%, 또는 적어도 (약) 99%의 농축 T 세포의 산출 조성물을 성공적으로 생성하거나 또는 제조한다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 투입 세포의 복수의 조성물 및/또는 복수의 생물학적 샘플로부터의 조성물 및/또는 샘플의 (약) 85% 내지 (약) 100%, (약) 90% 내지 (약) 95%, 또는 (약) 92% 내지 (약) 94%의 농축 T 세포의 산출 조성물을 성공적으로 생성하거나 또는 제조한다.

[0538] 특정 구현예에서, 상기 공정은 상이한 대상체로부터의 샘플의 적어도 (약) 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 적어도 99.9%로부터 획득된, 선별된, 또는 농축된 세포에 대해 21일 이내에 완성되고, 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 이상의 성공률을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 공정은 상이한 대상체로부터의 샘플의 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 91%, 적어도 (약) 92%, 적어도 (약) 93%, 적어도 (약) 94%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 96%, 적어도 (약) 97%, 적어도 (약) 98% or 적어도 (약) 99%, 또는 100%로부터 획득된, 선별된, 또는 농축된 세포에 대해 21일 이내에 완성된다. 일부 구현예에서, 상기 공정은 대상체로부터 세포를

수득, 선별 또는 주입한 후 21일 이내에 대상체에 주입할 준비가 된 조작된 세포를 생성하는 것에 대해 90%의 성공률을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 공정은 상이한 대상체로부터의 샘플의 적어도 (약) 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 적어도 99.9%로부터 수득, 선별, 또는 농축된 세포에 대해 21일 이내에 완성되고, 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 이상의 성공률을 갖는다.

[0539] 특정 구현예에서, 상기 공정은 상이한 대상체로부터의 샘플의 적어도 (약) 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 적어도 99.9%로부터 수득된, 선별된, 또는 농축된 세포에 대해 14일 내지 18일에 완성되고, 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 이상의 성공률을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 공정은 상이한 대상체로부터의 샘플의 적어도 (약) 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 적어도 99.9%로부터 수득, 선별, 또는 농축된 세포에 대해 14일 내지 18일에 완성되고, 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 99%, 또는 그 이상의 성공률을 갖는다.

[0540] 특정 구현예에서, 상기 제공된 방법과 관련된 공정은 적어도 (약) 0.5%, 적어도 (약) 1%, 적어도 (약) 1.5%, 적어도 (약) 2%, 적어도 (약) 2.5%, 적어도 (약) 3%, 적어도 (약) 3.5%, 적어도 (약) 4.0%, 적어도 (약) 4.5%, 적어도 (약) 5%, 적어도 (약) 5.5%, 적어도 (약) 6%, 적어도 (약) 6.5%, 적어도 (약) 7%, 적어도 (약) 7.5%, 적어도 (약) 8%, 적어도 (약) 8.5%, 적어도 (약) 9%, 적어도 (약) 9.5%, 또는 적어도 (약) 10%까지, 또는 10% 초과까지 산출 조성물을 성공적으로 발생시키거나 또는 생성할 대안의 및/또는 예시적 공정에 대한 가능성 또는 확률 보다 높은 산출 조성물을 성공적으로 발생시키거나 또는 생성할 가능성 또는 확률을 갖는다.

[0541] **G. 산출 조성물의 예시적 특징**

[0542] 특정 구현예에서, 제공된 방법은 산출 세포 및/또는 농축된 T 세포의 산출 조성물을 발생 또는 생성하는 공정과 관련하여 사용된다. 특정 구현예에서, 상기 산출 세포 및/또는 농축된 T 세포의 산출 조성물은 생물학적 샘플, 예를 들어 혈액 샘플 또는 백혈구 샘플로부터 수거, 수득, 단리, 선별, 및/또는 농축되고; 자극 조건하에서 인큐베이션되며; 재조합 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 재조합 뉴클레오티드 예를 들어 CAR을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 발현 또는 함유하도록 조작되고, 예를 들어 형질도입되며; 임계량, 밀도, 또는 증폭으로 배양되고/되거나; 제형화되는 세포이거나 그것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물은 예를 들어 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 발현하는 T 세포, 예를 들어 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 함유한다.

[0543] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물은 농축된 CD3+ T 세포에 대해 농축된 세포의 조성물이다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물은 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 98%, 적어도 (약) 99%, 적어도 (약) 99.5%, 적어도 (약) 99.9%, 또는 (약) 100%의 CD3+ T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물은 필수적으로 CD3+ T 세포로 구성된다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물은 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 98%, 적어도 (약) 99%, 적어도 (약) 99.5%, 적어도 (약) 99.9%, 또는 (약) 100%의 CD4+ 또는 CD8+ T 세포인 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물은 필수적으로 CD4+ 및 CD8+ T 세포로 구성된다.

[0544] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물은 (약) 10% 내지 (약) 90%, (약) 20% 내지 (약) 80%, (약) 25% 내지 (약) 75%, (약) 30% 내지 (약) 70%, (약) 35% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 60%, (약) 55% 내지 (약) 45%, 또는 약 50% 또는 50%의 CD4+ T 세포 및 (약) 10% 내지 (약) 90%, (약) 20% 내지 (약) 80%, (약) 25% 내지 (약) 75%, (약) 30% 내지 (약) 70%, (약) 35% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 60%, (약) 55% 내지 (약) 45%, 또는 약 50% 또는 50%의 CD8+ T 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물은 (약) 35% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 60%, (약) 55% 내지 (약) 45%, 또는 약 50% 또는 50%의 CD4+ T 세포 및 (약) 35% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 60%, (약) 55% 내지 (약) 45%, 또는 약 50% 또는 50%의 CD8+ T 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물은 3:1 내지 1:3, 2.5:1 내지 1:2.5, 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.4:1 내지 1:1.4, 1.3:1 내지 1:1.3, 1.2:1 내지 1:1.2, 또는 1.1:1 내지 1:1.1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비율로 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 세포의 조성물은 (약) 3:1, 2.8:1, 2.5:1, 2.25:1, 2:1, 1.8:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.8, 1:2, 1:2.25, 1:2.5, 1:2.8, 1:3의 비를 갖는다.

[0545] 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 방법에 의해서 생성된 산출 조성물의 (약) 75%, (약) 80%, (약) 85%, (약) 90%, (약) 95%, (약) 97%, (약) 98%, 또는 (약) 99%는 10:90 내지 90:10, 20:80 내지 80:20, 75:25 내지

25:75, 70: 30 내지 30:70, 35:65 내지 65:35, 40:60 내지 60:40, 45:55 내지 55:45, 또는 약 50:50 또는 50:50의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 방법에 의해서 생성된 산출 조성물의 적어도 80%, 적어도 85%, 또는 적어도 90%는 3:1 내지 1:3, 2.5:1 내지 1:2.5, 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.4:1 내지 1:1.4, 1.3:1 내지 1:1.3, 1.2:1 내지 1:1.2, 또는 1.1:1 내지 1:1.1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 방법에 의해서 생성된 산출 조성물의 적어도 90%는 1:2 내지 2:1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 방법에 의해서 생성된 산출 조성물의 적어도 90%는 1.5:1 내지 1:1.5, 1.25:1 내지 1:1.25, 1.1:1 내지 1:1.1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 갖는다.

[0546] 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물은 3:1 내지 1:3, 2.5:1 내지 1:2.5, 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.4:1 내지 1:1.4, 1.3:1 내지 1:1.3, 1.2:1 내지 1:1.2, or between 1.1:1 내지 1:1.1의 비로 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 발현하는 CD4+ T 세포와 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 발현하는 CD8+ T 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 세포의 조성물은 (약) 3:1, 2.8:1, 2.5:1, 2.25:1, 2:1, 1.8:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.8, 1:2, 1:2.25, 1:2.5, 1:2.8, 1:3의 비를 갖는다.

[0547] 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 방법에 의해서 생성된 산출 조성물의 적어도 80%, 적어도 85%, 또는 적어도 90%는 3:1 내지 1:3, 2.5:1 내지 1:2.5, 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.4:1 내지 1:1.4, 1.3:1 내지 1:1.3, 1.2:1 내지 1:1.2, 또는 1.1:1 내지 1:1.1의, 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 발현하는 CD4+ T 세포 대 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 발현하는 CD8+ T의 비를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 방법에 의해서 생성된 산출 조성물의 적어도 90%는 1:2 내지 2:1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 방법에 의해서 생성된 산출 조성물의 적어도 90%는 1.5:1 내지 1:1.5, 1.25:1 내지 1:1.25, 1.1:1 내지 1:1.1의 CD4+ T 세포 대 CD8+ T 세포의 비를 갖는다.

[0548] 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법과 관련하여 발생되거나 또는 생성된 산출 조성물은 재조합 수용체, 예를 들어 TCR 또는 CAR을 발현하는 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 발현시키는 것은 제한되지는 않지만 세포막 및/또는 세포 표면에 국한된 하나 이상의 재조합 수용체 단백질을 갖는 것, 검출가능한 양의 재조합 수용체 단백질을 갖는 것, 상기 재조합 수용체를 암호화하는 재조합 폴리뉴클레오티드를 갖거나 또는 함유하는 것, 및/또는 재조합 수용체 발현을 위한 대리 마커인 mRNA 또는 단백질을 갖거나 또는 함유하는 것을 포함할 수 있다.

[0549] 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 45%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 97%, 적어도 (약) 99%, 또는 99% 초과는 재조합 수용체를 발현한다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 적어도 (약) 50%는 재조합 수용체를 발현한다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 45%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 97%, 적어도 (약) 99%, 또는 99% 초과는 재조합 수용체를 발현한다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 (약) 50%는 재조합 수용체를 발현한다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 45%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 97%, 적어도 (약) 99%, 또는 99% 초과는 재조합 수용체를 발현한다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 (약) 50%는 재조합 수용체를 발현한다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 45%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 65%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 97%, 적어도 (약) 99%, 또는 99% 초과는 재조합 수용체를 발현한다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 (약) 50%는 재조합 수용체를 발현한다.

[0550] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물은 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%의 생존 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물은 적어도 (약) 75%의 생존 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물은 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%의 생존

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

[0551] 특정 구현예에서, 상기 산출 세포는 아포토시스(apoptosis)를 진행하고 있고/있거나, 준비되고, 프라이밍되고/되거나 도입하고 있는 낮은 포션(low portion) 및/또는 빈도의 세포를 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 산출 세포는 아포프토틱 마커(apoptotic marker)에 양성인 낮은 포션(portion) 및/또는 빈도의 세포를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 40% 미만, (약) 35% 미만, (약) 30% 미만, (약) 25% 미만, (약) 20% 미만, (약) 15% 미만, (약) 10% 미만, (약) 5% 미만, 또는 (약) 1% 미만은 아포프토틱 마커를 발현하고, 함유하고/하거나 아포프토틱 마커에 양성이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 25% 미만은 아포프토틱 마커를 발현하고, 함유하고/하거나 아포프토틱 마커에 양성이다.

[0552] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+) 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%는 생존 세포, 예를 들어 아토프티크 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(caspase)(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+) 세포의 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%는 생존 세포, 예를 들어 아토프티크 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+) 세포의 적어도 (약) 90%는 생존 세포, 예를 들어 아토프티크 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%는 생존 세포, 예를 들어 아토프티크 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%는 생존 세포, 예를 들어 아토프티크 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 (약) 90%는 생존 세포, 예를 들어 아토프티크 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+) CD3+ T 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%는 생존 세포, 예를 들어 아토프티크 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+) CD3+ T 세포의 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%는 생존 세포, 예를 들어 아토프티크 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+) CD3+ T 세포의 적어도 (약) 90%는 생존 세포, 예를 들어 아토프티크 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다.

[0553] 특정 구현예에서, 본원에서 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+) 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%는 생존 세포, 예를 들어 아토프티크 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 특정 구현예에서, 본원에서 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+) 세포의 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%는 생존 세포, 예를 들어 아토프티크 마커에 음성인

세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 일부 구현예에서, 본원에서 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+) 세포의 적어도 (약) 90%는 생존 세포, 예를 들어 아토프틱 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 일부 구현예에서, 본원에서 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%는 생존 세포, 예를 들어 아토프틱 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 특정 구현예에서, 본원에서 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%는 생존 세포, 예를 들어 아토프틱 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 특정 구현예에서, 본원에서 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 CD3+ T 세포의 적어도 (약) 90%는 생존 세포, 예를 들어 아토프틱 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 일부 구현예에서, 본원에서 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+) CD3+ T 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 적어도 (약) 99%, 또는 적어도 (약) 99.9%는 생존 세포, 예를 들어 아토프틱 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 일부 구현예에서, 본원에서 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+) CD3+ T 세포의 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%는 생존 세포, 예를 들어 아토프틱 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 일부 구현예에서, 본원에서 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR+) CD3+ T 세포의 적어도 (약) 90%는 생존 세포, 예를 들어 아토프틱 마커에 음성인 세포, 예를 들어 카사파제(예를 들어 활성화된 카사파제-3)이다. 상술한 구현예 중의 임의의 것에서, 본원에서 개시된 방법에 의해서 생성된 상기 복수의 산출 조성물은 동일하거나 상이한 공여체로부터 유래될 수 있다. 일부 측면에서, 상기 복수의 산출 조성물 중의 둘 이상은 상이한 공여체로부터 유래된다. 일부 측면에서, 각각의 복수의 산출 조성물은 다수의 상이한 공여체, 예를 들어 약 2종, 약 5종, 약 10종, 약 15종, 약 20종, 약 25종, 약 30종, 약 35종, 약 40종, 약 45종, 약 50종, 약 55종, 약 60종, 또는 약 60종 초과 공여체 중의 1종, 예를 들어 세포 요법 예를 들어 CAR-T 세포 요법을 필요로 하는 환자로부터 유래된다.

[0554] 특정 구현예에서, 산출 조성물의 대부분의 세포는 나이브한 중추 메모리이그/이거나 이펙터 메모리 세포이다. 일부 구현예에서, 산출 조성물의 대부분의 세포는 중추 메모리 세포이다. 일부 측면에서, 덜 분화된 세포, 예를 들어 중추 메모리 세포는 보다 오래 생존하고 덜 빠르게 생존함으로써, 지속성과 내구성을 증가시킨다. 일부 측면에서, 세포 요법, CAR-T 세포 요법에 대한 반응자(responder)가 중추 메모리 계층의 증진된 발현을 갖는다[문헌 「Fraieta et al. (2018) Nat Med. 24(5):563-571」 참조].

[0555] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 높은 부분 및/또는 빈도의 중추 메모리 세포를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 또는 95% 초과는 중추 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 T 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 또는 적어도 (약) 65%는 중추 메모리 T 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, or (약) 60% 내지 (약) 65%는 중추 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 T 세포의 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 또는 95% 초과는 중추 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 T 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 T 세포의 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 또는 적어도 (약) 65%는 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 T 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 T 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 또는 적어도 (약) 65%는 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 T 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 T 세포의 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%는 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 T 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%,

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

[0556]

일부 구현예에서, 상기 방법의 반복은 선택적으로는 상기 방법이 복수의 상이한 개별 대상체 중에서 실시되는 인간 생물학적 샘플로부터 복수의 산출 조성물을 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 복수의 산출 조성물 중의 메모리 표현형의 세포의 평균값(즉, 평균치) 또는 중앙값 백분율은 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%이다. 일부 구현예에서, 상기 복수의 산출 조성물 중의 중추 메모리 표현형의 세포의 평균값(즉, 평균치) 또는 중앙값 백분율은 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%이다. 일부 구현예에서, 상기 복수의 산출 조성물 중의 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, 그랜자임 B-, 및/또는 CD127+인 세포의 평균값(즉, 평균치) 또는 중앙값 백분율은 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%이다. 일부 구현예에서, 상기 복수의 산출 조성물 중의 CCR7+/CD45RA- 또는 CCR7+/CD45RO+인 세포의 평균값(즉, 평균치) 또는 중앙값 백분율은 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%이다. 일부 구현예에서, 상기 복수의 산출 조성물의 조작된 CD4+ T 세포(예를 들어 CAR+CD4+ T 세포) 중의 중추 메모리 CD4+ T 세포의 평균값(즉, 평균치) 또는 중앙값 백분율은 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%이다. 일부 구현예에서, 상기 복수의 산출 조성물의 조작된 CD8+ T 세포(예를 들어 CAR+CD8+ T 세포) 중의 중추 메모리 CD8+ T 세포의 평균값(즉, 평균치) 또는 중앙값 백분율은 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%이다. 일부

구현예에서, 상기 복수의 산출 조성물의 조작된 세포(예를 들어 CAR+ T 세포) 중의 중추 메모리 T 세포(예를 들어 CD4+ 중추 메모리 T 세포 및 CD8+ 중추 메모리 T 세포)의 평균값(즉, 평균치) 또는 중앙값 백분율은 (약) 40% 내지 (약) 65%, (약) 40% 내지 (약) 45%, (약) 45% 내지 (약) 50%, (약) 50% 내지 (약) 55%, (약) 55% 내지 (약) 60%, 또는 (약) 60% 내지 (약) 65%이다.

[0557] 일부 구현예에서, 평균으로, 본원에 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 세포의 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 또는 (약) 95% 초과는 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 T 세포이다. 특정 구현예에서, 평균으로, 본원에 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 또는 적어도 (약) 65%는 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 T 세포이다. 일부 구현예에서, 평균으로, 본원에 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 세포의 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 또는 (약) 95% 초과는 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, 그랜자임 B-, 및/또는 CD127+이다. 특정 구현예에서, 평균으로, 본원에 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 또는 적어도 (약) 65%는 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, 그랜자임 B-, 및/또는 CD127+이다. 일부 구현예에서, 평균으로, 본원에 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 T 세포의 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 또는 (약) 95% 초과는 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 T 세포이다. 특정 구현예에서, 평균으로, 본원에 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 T 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 또는 적어도 (약) 65%는 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 표현형이거나 또는 중추 메모리 T 세포이다. 일부 구현예에서, 평균으로, 본원에 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 또는 (약) 95% 초과는 중추 메모리 CD4+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 평균으로, 본원에 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 CD4+ T 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 또는 적어도 (약) 65%는 중추 메모리 CD4+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 평균으로, 본원에 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 또는 (약) 95% 초과는 중추 메모리 CD8+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 평균으로, 본원에 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 CD8+ T 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 또는 적어도 (약) 65%는 중추 메모리 CD8+ T 세포이다. 일부 구현예에서, 평균으로, 본원에 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 또는 (약) 95% 초과는 중추 메모리 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포이다. 특정 구현예에서, 평균으로, 본원에 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물의 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 또는 적어도 (약) 65%는 중추 메모리 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포이다. 상술한 구현예 중의 임의의 것에서, 본원에 개시된 방법에 의해서 생성된 복수의 산출 조성물은 동일하거나 상이한 공여체로부터 유래될 수 있다. 일부 측면에서, 상기 복수의 산출 조성물 중의 둘 이상은 상이한 공여체로부터 유래된다. 일부 측면에서, 각각의 복수의 산출 조성물은 다수의 상이한 공여체, 예를 들어 약 2종, 약 5종, 약 10종, 약 15종, 약 20종, 약 25종, 약 30종, 약 35종, 약 40종, 약 45종, 약 50종, 약 55종, 약 60종, 또는 약 60종 초과 공여체 중의 1종, 예를 들어 세포 요법 예를 들어 CAR-T 세포 요법을 필요로 하는 환자로부터 유래된다.

[0558] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 고갈 및/또는 노화되는 세포의 낮은 포선 및/또는 빈도를 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 고갈 및/또는 노화되는 세포의 낮은 포선 및/또는 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 40% 미만, (약) 35% 미만, (약) 30% 미만, (약) 25% 미만, (약) 20% 미만, (약) 15% 미만, (약) 10% 미만, (약) 5%, 또는 (약) 1% 미만이 고갈되고/되거나 노화된다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 25% 미만이 고갈되고/되거나 노화된다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 10% 미만이 고갈되고/되거나 노화된다.

[0559] 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 CD27 및 CD28 발현, 예를 들어 표면 발현에 대해 음성인 세포의

낮은 포션 및/또는 빈도를 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 CD27-CD28-세포의 낮은 포션 및/또는 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 40% 미만, (약) 35% 미만, (약) 30% 미만, (약) 25% 미만, (약) 20% 미만, (약) 15% 미만, (약) 10% 미만, (약) 5%, 또는 (약) 1% 미만은 CD27-CD28-세포이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 25% 미만은 CD27-CD28-세포이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 10% 미만은 CD27-CD28-세포이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 5% 미만은 CD27-CD28-세포이다.

[0560] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 CD27 및 CD28 발현, 예를 들어 표면 발현에 양성인 높은 포션 (high portion) 및/또는 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 CD27+CD28+ 세포의 높은 포션 및/또는 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 75%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 85%, 적어도 (약) 90%, 적어도 (약) 95%, 또는 (약) 95% 초과는 CD27+CD28+ 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 25% 미만은 CD27-CD28-세포이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 적어도 (약) 50%는 CD27+CD28+ 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 적어도 (약) 75%는 CD27+CD28+ 세포이다.

[0561] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 T_{EMRA} 세포인 세포의 낮은 포션 및/또는 빈도를 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 T_{EMRA} 세포의 낮은 포션 및/또는 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 40% 미만, (약) 35% 미만, (약) 30% 미만, (약) 25% 미만, (약) 20% 미만, (약) 15% 미만, (약) 10% 미만, (약) 5%, 또는 (약) 1% 미만은 T_{EMRA} 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 25% 미만은 T_{EMRA} 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 10% 미만은 T_{EMRA} 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 5% 미만은 T_{EMRA} 세포이다.

[0562] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 CCR7에 음성이고 CD45RA 발현, 예를 들어 표면 발현에 대해 양성인 세포의 낮은 포션 및/또는 빈도를 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 CCR7-CD45RA+ 세포의 낮은 포션 및/또는 빈도를 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 40% 미만, (약) 35% 미만, (약) 30% 미만, (약) 25% 미만, (약) 20% 미만, (약) 15% 미만, (약) 10% 미만, (약) 5%, 또는 (약) 1% 미만은 CCR7-CD45RA+ 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 25% 미만은 CCR7-CD45RA+ 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 10% 미만은 CCR7-CD45RA+ 세포이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 (약) 5% 미만은 CCR7-CD45RA+ 세포이다.

[0563] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 대안 공정에 의해서 생성된 산출 세포와 유사한, 항원-자극에 대한 반응에서 사이토카인의 생산성을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 예시적인 대안 공정에 의해서 생성된 산출 세포와 유사한, 항원-자극에 대한 반응에서 사이토카인, 예를 들어 TNF-알파, IFN-감마, 및/또는 IL-2의 생산성을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 대안 공정과 비교하여 항원에 의한 자극에 대한 반응에서, 적어도 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 1-배, 2-배, 3-배, 4-배, or 5-배 하나 이상의 사이토카인의 생산성 증가를 갖는다. 일부 구현예에서, 사이토카인의 생산성은 제한되지는 않지만 ELISA 및/또는 항체 기본 검출법을 포함한 표준 공지 기법에 의해서 측정 또는 분석될 수 있다.

[0564] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는, 대안 공정에 의해서 생성된 산출 조성물의 포션, 백분율, 및/또는 양과 유사한, 항원 자극에 대한 반응에서 하나 이상의 사이토카인을 생성하는 세포의 포션, 백분율, 및/또는 양을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포의 약 또는 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 90%, 95%, 또는 100%는 항원 자극에 대한 반응에서 상기 하나 이상의 사이토카인, 예를 들어 TNF-알파, IFN-감마, 및/또는 IL-2를 생산한다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인을 생산하는 상기 산출 조성물의 세포의 포션, 백분율, 및/또는 양은, 상기 하나 이상의 사이토카인을 생산하는 대안 공정에 의해 생산된 산출 세포의 포션, 백분율, 및/또는 양 보다 많은, 약 또는 적어도 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 75%, 100%, 125%, 150%, 또는 1-배, 2-배, 3-배이다. 특정 구현예에서, 사이토카인을 생산하는 포션, 백분율, 및/또는 양은 세포내 사이토카인 염색 (intracellular cytokine staining; ICS) 분석을 포함한 임의의 공지 또는 표준 기법에 의해서 측정 또는 분석될 수 있다.

[0565] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물은 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 발현하는 기능성 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 세포의 적어도 일부는 항원 자극에 대한 반응에서 하나 이상의 사이토카인을 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 제한되지는 않지만 IL-2, TNF-알파, 및/또는 IFN-감마를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포, 예를 들어 상기 산출 세포의 샘플 및/

또는 일부분은 항원 자극된 기능 및/또는 활성에 대해 시험, 분석 및/또는 측정된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는 사이토카인 생산, 발현, 및/또는 분비를 측정할 수 있는 임의의 공지 분석법에 의해서 항원 자극 후 또는 도중에 사이토카인 생산성에 대해 시험된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 내부 사이토카인 염색(ICS) 분석으로 시험된다. 특정 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 적어도 25% CD4+ 세포 및 CD8+ 세포의 적어도 15%는 ICS로 측정하였을 때 항원 자극 후 IL-2에 대해 양성이다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 적어도 5% CD4+ 세포 및 CD8+ 세포의 적어도 5%는 ICS로 측정하였을 때 항원 자극 후 INF-감마에 대해 양성이다. 특정 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 적어도 40% CD4+ 세포 및 CD8+ 세포의 적어도 20%는 ICS로 측정하였을 때 항원 자극 후 TNF-알파에 대해 양성이다. 특정 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 적어도 2.5% CD4+ 세포 및 CD8+ 세포의 적어도 2%는 ICS로 측정하였을 때 항원 자극 후 IL-2, TNF-알파, 및 IFN-감마 모두에 대해 양성이다.

[0566] 특정 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 상기 세포의 적어도 일부는 활성화 또는 자극, 예를 들어 일반적인 활성화 또는 자극, T 세포 활성화 또는 자극 및/또는 PMA 및 이오노마이신(ionomycin)에 의한 활성화 또는 자극에 대한 반응에서 하나 이상의 사이토카인을 생성한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 제한되지는 않지만, IL-2, TNF-알파, 및/또는 IFN-감마를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포, 예를 들어 상기 산출 세포의 샘플 및/또는 일부는 활성화 또는 자극에 의해서, 예를 들어 PMA 및 이오노마이신을 사용하여 기능 및/또는 활성에 대해 시험, 분석, 및/또는 측정된다. 특정 구현예에서, 상기 세포는, 예를 들어 ICS 분석을 이용하여 사이토카인 생성, 발현, 및/또는 분비를 측정할 수 있는 임의의 공지 분석으로 활성화 또는 자극 후 또는 동안의 사이토카인 생성에 대해 시험된다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 적어도 50% CD4+ 세포 및 CD8+ 세포의 적어도 25%는 ICS에 의해서 측정하였을 때 PMA 및 이오노마이신을 사용한 자극 또는 활성화 후 IL-2에 대해 양성이다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 적어도 30% CD4+ 세포 및 CD8+ 세포의 적어도 10%는 ICS에 의해서 측정하였을 때 PMA 및 이오노마이신을 사용한 자극 또는 활성화 후 INF-감마에 대해 양성이다. 특정 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 적어도 50% CD4+ 세포 및 CD8+ 세포의 적어도 15%는 ICS에 의해서 측정하였을 때 PMA 및 이오노마이신을 사용한 자극 또는 활성화 후 TNF-알파에 대해 양성이다. 특정 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 적어도 10% CD4+ 세포 및 CD8+ 세포의 적어도 5%는 ICS에 의해서 측정하였을 때 PMA 및 이오노마이신을 사용한 자극 또는 활성화 후 IL-2, TNF-알파, 및 IFN-감마 모두에 대해 양성이다.

[0567] 일부 구현예에서, 대상체, 예를 들어 질병 또는 병태 예를 들어 암을 갖는 대상체에 상기 산출 조성물의 세포를 투여하는 것은 생존의 확률 및/또는 가능성을 향상시킨다. 예를 들어 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 질병 및/또는 병태를 갖는 대상체에 (약) 또는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 10년, 또는 10년 초과에 걸쳐서 투여되고, 생존 확률 또는 가능성은 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100%이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포를 사용한 투여는 대안 공정의 산출 세포를 투여하는 것 보다 적어도 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 또는 적어도 1-배, 2-배, 3-배, 4-배, 또는 5-배 초과에 생존 확률 또는 가능성을 제공한다.

[0568] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 질병 또는 병태를 치료하도록 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 질병 또는 병태는 암이다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포는 대상체에 투여되고, 상기 대상체는 암 세포 및/또는 종양 부피의 감소를 경험한다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 상기 산출 조성물의 세포 투여 후 상기 투여 이전의 대상체에서의 암세포의 양 및/또는 종양 부피와 비교하여 약 또는 적어도 25%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 100%의, 대상체에서의 암 세포의 양 감소 및/또는 종양 감소를 경험한다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포 투여는, 예시적인 대안 공정에 의해서 생성된 산출 세포의 투여 후 대상체에서의 암세포의 양 및/또는 종양 부피와 비교하여, 대상체에서의 암세포의 양 및/또는 종양 부피의 증가된 감소를 결과한다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포 투여는, 예시적인 대안 공정에 의해서 생성된 산출 세포의 투여 후 대상체에서의 암세포의 양 및/또는 종양 부피와 비교하여, (약) 또는 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 1-배, 2-배, 3-배, 4-배, 또는 5-배의, 대상체에서의 대상체에서의 암세포의 양 감소 및/또는 종양 감소의 증가를 결과한다.

[0569] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포, 예를 들어 상기 산출 조성물의 일부분 및/또는 용량이 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포가 투여되는 대상체는 경쟁 반응(CR)을 달성하고/하거나 경험할 확률 및/또는 가능성을 갖는다. 특정 구현예에서, CR을 달성하고/하거나 경험할 확률 및/또는 가능성은 적어도 (약) 10%, 적어도 (약) 15%, 적어도 (약) 20%, 적어도 (약) 25%, 적어도 (약) 30%, 적어도 (약) 35%,

적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 45%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%이다. 특정 구현예에서, CR을 달성하고/하거나 경험할 확률 및/또는 가능성은 적어도 (약) 25%이다. 특정 구현예에서, CR을 달성할 확률 및/또는 가능성은 적어도 (약) 50%이다.

[0570] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포가 투여되는 대상체는 ORR을 달성하고/하거나 경험할 확률 및/또는 가능성을 갖는다. 특정 구현예에서, ORR을 달성하고/하거나 경험할 확률 및/또는 가능성은 적어도 (약) 40%, 적어도 (약) 45%, 적어도 (약) 50%, 적어도 (약) 55%, 적어도 (약) 60%, 적어도 (약) 70%, 적어도 (약) 80%, 적어도 (약) 90%, 또는 적어도 (약) 95%이다. 특정 구현예에서, ORR을 달성하고/하거나 경험할 확률 및/또는 가능성은 적어도 (약) 80%이다. 특정 구현예에서, ORR을 달성할 확률 및/또는 가능성은 적어도 (약) 90%이다. 특정 구현예에서, ORR을 달성할 확률 및/또는 가능성은 (약) 100%이다.

[0571] 일부 구현예에서, 상기 산출 세포의 효능, 예를 들어 상기 산출 조성물의 세포의 투여 후 CR 또는 ORR을 달성하고/하거나 경험할 확률은 대안 공정에 의해서 생성되는 치료학적 세포의 그것 보다 높다. 특정 구현예에서, 대안 공정에 의해서 생성된 상기 치료학적 세포 조성물의 세포 투여 후와 비교하여, CR 또는 ORR을 달성하고/하거나 경험할 확률은 적어도 (약) 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 125%, 150%, 1-배, 2-배, 5-배, 10-배, 50-배, 또는 100-배 초과이다.

[0572] 특정 구현예에서, 상기 산출 세포 조성물의 세포는, 예시적인 대안 공정에 의해 생성된 산출 세포의 재조합 수용체(예를 들어 표적 세포)에 의해 결합되고/되거나 인식된 항원을 발현하는 세포에 대해 유사한 세포 용해 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 세포 조성물의 세포가 상기 항원, 예를 들어 상기 표적 세포를 발현하는 세포에 노출될 때, 상기 산출 세포 조성물의 세포는 상기 항원을 발현하는 세포의 (약) 또는 적어도 (약) 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%가 사멸한다. 특정 구현예에서, 상기 산출 세포 조성물의 세포는, 유사하거나 동일한 조건하의 예시적 대안 공정에 의해서 생성된 산출 세포 보다 적어도 (약) 25%, 50%, 75%, 100%, 150%, or 1-배, 2-배, 3-배, 4-배, 또는 5-배 많은 양의, 상기 항원, 예를 들어 표적 세포를 발현하는 세포를 사멸시킨다.

[0573] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법에 의해서 생성된 상기 산출 세포는 높고/높거나 비교적 높은 정도의 안전성을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 세포 조성물의 세포, 예를 들어 상기 산출 조성물의 세포의 일부분 및/또는 용량이 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포가 투여되는 대상체는 (약) 80%, 75%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만인, 독성, 예를 들어 CRS 또는 신경독성을 경험할 위험, 확률, 및/또는 가능성을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 독성은 신경독성 또는 CRS의 임의의 등급이다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포가 투여된 대상체는 CRS 또는 신경독성의 임의의 등급을 경험할 80% 미만의 위험, 확률 및/또는 가능성을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포가 투여된 대상체는 CRS 또는 신경독성의 임의의 등급을 경험할 80% 미만의 위험, 확률 및/또는 가능성을 갖는다.

[0574] 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포가 투여된 대상체는, (약) 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만인, 등급 3 또는 높은 CRS를 경험할 위험, 확률 및/또는 가능성을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포가 투여된 대상체는, 등급 3 또는 높은 CRS를 경험할 10% 미만의 위험, 확률 및/또는 가능성을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포가 투여된 대상체는, 등급 3 또는 높은 CRS를 경험할 5% 미만의 위험, 확률 및/또는 가능성을 갖는다.

[0575] 특정 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포가 투여된 대상체는, (약) 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만이거나 또는 (약) 0% 또는 무시할 정도인, 등급 3 또는 높은 신경독성을 경험할 위험, 확률 및/또는 가능성을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포가 투여된 대상체는, 등급 3 또는 높은 신경독성을 경험할 5% 미만의 위험, 확률 및/또는 가능성을 갖는다. 일부 구현예에서, 상기 산출 조성물의 세포가 투여된 대상체는, 등급 3 또는 높은 신경독성을 경험할 약 0% 및/또는 무시할 정도의 위험, 확률 및/또는 가능성을 갖는다.

[0576] **II. 무혈청 배지 제형 및 관련 성분**

[0577] 본원은 합성 아미노산(예를 들어 디펩티드 형태의 L-글루타민, 예를 들어 L-알라닐-L-글루타민), 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민), 및 적어도 하나의 단백질을 함유하는 무혈청 배지를 제공한다. 본원은 또한 적어도 하나의 합성 아미노산(예를 들어 디펩티드 형태의 L-글루타민, 예를 들어 L-알라닐-L-글루타민)을 포함하는 액체 기본 배지를 제공하는 것으로, 상기 기본 배지는 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민) 및 단백질이

없다. 본원의 또한 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민), 및 일부 경우에, 적어도 하나의 단백질, 예를 들어 혈청-치환 단백질을 포함하는 동결된 보충제를 제공한다. 하나 이상의 추가 보충제가 첨가될 수 있으며, 상기 보충제는 적어도 하나의 단백질, 예를 들어 혈청-치환 단백질, 또는 세포의 성장 및 증폭을 지원하는 하나 이상의 다른 성분들을 함유하는 하나 이상의 보충제를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산(예를 들어 디펩티드 형태의 L-글루타민, 예를 들어 L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 (약) 0.5 mM 내지 (약) 5 mM (예를 들어 2mM)이다. 일부 구현예에서, L-글루타민의 농도는 (약) 0.5 mM 내지 (약) 5 mM (예를 들어 2mM)이다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 단백질은 인간 단백질 또는 재조합 단백질, 예를 들어 혈청-치환 단백질, 예를 들어 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 추가로 하나 이상의 사이토카인(예를 들어 IL-2, IL-7, 또는 IL-15)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 페놀 레드를 포함하지 않는다.

[0578] 일부 구현예에서, 상기 제공된 무혈청 배지는 액체 기본 배지 및 하나 이상의 보충제로부터 생성 또는 제조된다.

[0579] 일부 구현예에서, 세포 배양물에서 L-글루타민으로 전환될 수 있는 합성 아미노산, 예를 들어 디펩티드 형태의 L-글루타민, 예를 들어 L-알라닐-L-글루타민인 합성 아미노산을 함유하는 액체 기본 배지가 제공된다. 일부 경우에, 상기 기본 배지에는 L-글루타민 및 단백질이 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 합성 아미노산(예를 들어 디펩티드 형태의 L-글루타민, 예를 들어 L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 (약) 0.5 mM 내지 (약) 5 mM (예를 들어 2mM)이다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 단백질은 인간-유래된 단백질, 재조합 단백질, 또는 이들 둘 다이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 페놀 레드를 포함하지 않는다.

[0580] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 단백질 및 유리된 형태의 글루타민, 예를 들어 L-글루타민을 포함하는 보충제가 제공되며, 상기 보충제는 L-글루타민이 그의 성분으로 된 후 동결되거나 또는 동결되었다. 일부 구현예에서, 상기 보충제 중의 L-글루타민의 농도는 200mM 미만, 예를 들어 150mM 미만, 100mM 또는 그 미만, 예를 들어 20mM 내지 120mM, 또는 40mM 내지 100mM, 예를 들어 약 80mM이다. 일부 구현예에서, 상기 보충제가 기본 배지와 조합된 후 L-글루타민의 농도는 (약) 0.5 mM 내지 (약) 5 mM (예를 들어 2mM)이다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 단백질은 비-포유동물 기원이 아니다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 단백질은 인간 단백질 또는 인간-유래된 단백질이거나, 재조합 단백질이다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 단백질은 알부민, 예를 들어 인간 또는 재조합 인간 알부민을 포함한다.

[0581] **A. 기본 배지**

[0582] 일부 구현예에서, 기본 배지는 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 아미노산은 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 세린, 글루타민, 히스티딘, 글리신, 트레오닌, 아르기닌, 알라닌, 티로신, 시스테인, 발린, 메티오닌, 노르발린, 트립토판, 페닐알라닌, 이소류신, 류신, 리신, 하이드록시프롤린, 사르코신 및/또는 프롤린을 포함한다.

[0583] 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 적어도 하나의 합성 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 세포를 포함하는 세포 배양물에서 유리된 형태의 글루탐산(즉, L-글루타민)으로 전환될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 인간 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 유전자 조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 유전자 조작된 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 재조합 수용체(예를 들어 키메라 항원 수용체)를 발현하도록 유전자 조작된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포를 발현하는 키메라 항원 수용체(CAR)이다.

[0584] 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 안정화된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)이다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 수용액(예를 들어 기본 배지) 중에서 글루타민(즉, L-글루타민)보다 더 안정하다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 기본 배지 중에서 상당량의 글루타민을 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 기본 배지 중에서 상당량의 피롤리돈 카복실산 또는 암모니아를 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 상기 배지 중에서 적어도 약 1, 3, 5, 7, 9, 11 13, 또는 14일동안 상당량의 글루타민(즉, L-글루타민)을 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 상기 배지 중에서 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주동안 상당량의 글루타민(즉, L-글루타민)을 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 상기 배지 중에서 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월 동안 상당량의 글루타민(즉, L-글루타민)을 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 상기 배지 중에서 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5년동안 상당량의 글루타민(즉, L-글루타민)을 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 상기 배지 중에서 적어도 약 1, 3, 5, 7, 9, 11 13, 또는 14일동안 상당량의 피롤리돈 카복실산 또는 암모니아를 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 상기 배지 중에

서 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주동안 상당량의 피롤리돈 카복실산 또는 암모니아를 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 상기 배지 중에서 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월동안 상당량의 피롤리돈 카복실산 또는 암모니아를 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 상기 배지 중에서 적어도 1, 2, 3, 4, 또는 5년동안 상당량의 피롤리돈 카복실산 또는 암모니아를 생성하지 않는다.

- [0585] 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 수용액(예를 들어 기본 배지) 중에서 가용성이다. 일부 구현예에서, 상기 수용액 중의 상기 합성 아미노산의 용해도는 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민) 보다 높다.
- [0586] 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 세포내로 운반될 수 있으며, 이때 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)으로 전환될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 유전자 조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 유전자 조작된 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 재조합 수용체(예를 들어 키메라 항원 수용체)이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포를 발현하는 키메라 항원 수용체(CAR)이다.
- [0587] 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 디펩티드이다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 트리펩티드이다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 디펩티드 형태의 L-글루타민(예를 들어 L-알라닐-L-글루타민)이다.
- [0588] 일부 구현예에서, 상기 기본 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민(즉, L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 (약) 0.5mM-5mM이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민(즉, L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 (약) 2mM이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민(즉, L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 (약) 0.5mM-1mM, 0.5mM-1.5mM, 0.5mM-2mM, 0.5mM-2.5mM, 0.5mM-3mM, 0.5mM-3.5mM, 0.5mM-4mM, 0.5mM-4.5mM, 0.5mM-5mM, 1mM-1.5mM, 1mM-2mM, 1mM-2.5mM, 1mM-3mM, 1mM-3.5mM, 1mM-4mM, 1mM-4.5mM, 1mM-5mM, 1.5mM-2mM, 1.5mM-2.5mM, 1.5mM-3mM, 1.5mM-3.5mM, 1.5mM-4mM, 1.5mM-4.5mM, 1.5mM-5mM, 2mM-2.5mM, 2mM-3mM, 2mM-3.5mM, 2mM-4mM, 2mM-4.5mM, 2mM-5mM, 2.5mM-3mM, 2.5mM-3.5mM, 2.5mM-4mM, 2.5mM-4.5mM, 2.5mM-5mM, 3mM-3.5mM, 3mM-4mM, 3mM-4.5mM, 3mM-5mM, 3.5mM-4mM, 3.5mM-4.5mM, 3.5mM-5mM, 4mM-4.5mM, 4mM-5mM, 또는 4.5mM-5mM(각각 포함)이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민(즉, L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 (약) 5mM-7.5mM, 5mM-10mM, 5mM-12.5mM, 5mM-15mM, 5mM-17.5mM, 5mM-20mM, 7.5mM-10mM, 7.5mM-12.5mM, 7.5mM-15mM, 7.5mM-17.5mM, 7.5mM-20mM, 10mM-12.5mM, 10mM-15mM, 10mM-17.5mM, 10mM-20mM, 12.5mM-15mM, 12.5mM-17.5mM, 12.5mM-20mM, 15mM-17.5mM, 15mM-20mM, 또는 17.5mM-20mM(각각 포함)이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민(즉, L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 적어도 (약) 0.5mM, 1mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM, 4mM, 4.5mM, 또는 5mM이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민(즉, L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 최대 (약) 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM, 4mM, 4.5mM, 5mM, 5.5mM, 6mM, 6.5mM, 7mM, 7.5mM, 8mM, 8.5mM, 9mM, 9.5mM, 10mM, 12.5mM, 15mM, 17.5mM, 또는 20mM이다.
- [0589] 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 L-글루타민을 포함하지 않거나 또는 상당한 양의 L-글루타민을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 L-글루타민을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지 중의 L-글루타민의 농도는 (약) 0.1 mM, 0.2 mM, 0.3 mM, 0.4 mM, 또는 0.5 mM, 또는 그 미만이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지 중의 L-글루타민의 농도는 (약) 1mM, 2mM, 3mM, 4mM, 또는 5mM, 또는 그 미만이다.
- [0590] 일부 구현예에서, 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민), 예를 들어 디펩티드 형태의 L-글루타민, 예를 들어 L-알라닐-L-글루타민으로 전환될 수 있는 적어도 하나의 합성 아미노산을 포함하는, 상기 하나 이상의 아미노산이 기본 배지 중에 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 인공 또는 합성 배지이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 밸런싱된 염 용액(예를 들어 PBS, DPBS, HBSS, EBSS)이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 덜코스 변형된 이글스 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium; DMEM), 최소 필수 배지(MEM), 기본 배지 이글(Basal Medium Eagle; B1ME), F-10, F-12, RPMI 1640, 글래스고 최소 필수 배지(Glasgow's Minimal Essential Medium; G1MEM), 알파 최소 필수 배지(alpha Minimal Essential Medium; 알파 MEM), 아이소코브스 변형된 덜코스 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium), 및 M199로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 복합 배지(예를 들어 RPMI-1640, IMDM)이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 OpTmizer™ CTS™ T-세포 증폭 기본 배지(OpTmizer™ CTS™ T-cell Expansion Basal Medium; ThermoFisher)이다.
- [0591] 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 무기 염, 설탕, 아미노산의 영양 혼합물을 포함하고, 선택적으로는 비타민,

유기산, 항산화제, 및/또는 완충액을 추가로 함유한다.

- [0592] 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 CO₃ 및 HCO₃를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지의 CO₃/HCO₃의 함량은 기상 CO₂(예를 들어 5-10%)로 밸런싱되고, 그에 의해서 상기 배지에서 최적 pH를 유지한다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 양쪽성 이온, HEPES를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 페놀 레드를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 페놀 레드를 포함하지 않는다.
- [0593] 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 무기 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 무기 염은 삼투압 밸런스를 촉진한다. 일부 구현예에서, 상기 무기 염은 나트륨, 칼륨, 및 칼슘 이온을 제공함으로써 막 전위를 조절한다.
- [0594] 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 하나 이상의 탄수화물을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 탄수화물은 글루코스를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 탄수화물은 갈락토스를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 탄수화물은 말토스를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 탄수화물은 프럭토스를 포함한다.
- [0595] 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 지방산을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 비타민(예를 들어 비타민 A, 비타민 B7, 비타민 B9, 비타민 B12, 비타민 C, 비타민 E)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 미량 원소를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 미량 원소는 아연을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 미량 원소는 셀레늄을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 미량 원소는 트리카복실산 중간체를 포함한다.
- [0596] 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 무기 염, 설탕, 아미노산, 선택적으로는 비타민, 유기산, 항산화제, 및/또는 완충액 또는 기타 공지된 세포 배양 영양물질의 혼합물을 함유한다. 영양물질에 더하여, 상기 배지는 또한 pH 및 삼투압을 유지하는 도움이 된다. 일부 측면에서, 상기 기본 배지의 시약은 세포 성장, 증식 및/또는 증폭을 지원한다. 다양한 상업적으로 이용가능한 기본 배지가 당해 분야의 숙련자에게 익히 알려져 있으며, 덜코스 변형된 이글스 배지(DMEM), 로스웰 파크 메모리얼 인스티튜트 배지(Roswell Park Memorial Institute Medium; RPMI), 아이소코브스 변형된 덜코스 배지 및 한스 배지(Hams medium)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 아이소코브스 변형된 덜코스 배지, RPMI-1640, 또는 α-MEM이다.
- [0597] 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 단백질 부재이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 인간 단백질(예를 들어 인간 혈청 단백질) 부재이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 혈청 부재이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 인간으로부터 유래된 혈청 부재이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 재조합 단백질 부재이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 인간 단백질 및 재조합 부재이다.
- [0598] 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 단백질 또는 펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 단백질은 알부민 또는 알부민 대체물이다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 인간 유래 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 재조합 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 천연 인간 혈청 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 재조합 인간 혈청 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 비인간 소스로부터의 재조합 알부민이다. 알부민 대체물은 임의의 단백질 또는 폴리펩티드 소스일 수 있다. 상기 단백질 또는 폴리펩티드 샘플의 예는 제한되는 않지만 소 뇌하수체 추출물, 식물 가수 분해물(예를 들어 쌀 가수 분해물), 태아소 알부민(페튜인(fetuin)), 계란 알부민, 인간 혈청 알부민(HSA) 또는 다른 동물 유래 알부민, 병아리 추출물, 소 배아 추출물, AlbuMAX® I, 및 AlbuMAX® II을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 단백질 또는 펩티드는 트랜스페린(transferrin)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 단백질 또는 펩티드는 아프로티닌(aprotinin)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 단백질은 페튜인(fetuin)을 포함한다.
- [0599] 일부 구현예에서, 상기 기본 배지(예를 들어 기본 배지)는 액체 제형이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지(예를 들어 기본 배지)는 동결되지 않거나 또는 의도된 사용 전에 동결되지 않도록(그의 프로토콜에 따라) 지시된다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 (약) 2°C 내지 8°C에서 저장된다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 실온에서 저장된다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 2°C 내지 8°C에서 저장될 때 적어도 (약) 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6주동안 안정성이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 2°C 내지 8°C에서 저장될 때 적어도 (약) 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6주동안 안정성이다.
- [0600] **B. 보충제**
- [0601] 일부 구현예에서, 본원에서 보충제, 예를 들어 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)을 포함하는 제 1 보충제가 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는 사용하기 전에 및/또는 기본 배지로 혼입하기 전에 동결된다. 일부 구현예에서, 본원에서 기술된 것과 같은 상기 보충제는 배지 보충제(예를 들어 기본 배지용 배지 보충제)

로서 사용하도록 의도된다. 일부 구현예에서, 상기 제 1 보충제는 세포의 유지, 증폭, 및/또는 활성화를 위한 보충제로서 사용하도록 의도된다. 일부 구현예에서, 상기 제 1 보충제는 세포의 증폭용 보충제로서 사용하도록 의도된다. 일부 구현예에서, 상기 제 1 보충제는 적어도 하나의 단백질 및 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)을 포함하는 동결된 보충제를 포함하되, 상기 제 1 보충제로 보충된 기본 세포 배양 배지는 세포의 발현을 지원할 수 있는 것이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 CD4 T 세포 또는 CD8 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 인간으로부터의 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 인간으로부터의 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 인간으로부터의 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 인간으로부터의 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 유전자 조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 인간으로부터 유도된 유전자 조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 인간으로부터의 유전자 조작된 T 세포(예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR) 발현 T 세포)이다.

[0602] 일부 구현예에서, 상기 보충제는 그의 의도된 사용 이전에 (약) -20°C 내지 (약) 0°C에서 저장되거나 또는 저장되는 것이 권장된다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는 약 0°C 미만에서 저장되거나 또는 저장되는 것이 권장된다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는, 상기 보충제가 그의 의도된 용도로 사용될 때의 시간까지 상기 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)이 그의 성분으로 된 후 즉각 또는 신속하게 동결된다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는, 상기 보충제가 그의 의도된 용도로 사용될 때의 시간까지 상기 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)이 그의 성분으로 된 후 대부분의 시간동안 동결된다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는, 상기 보충제가 그의 의도된 용도로 사용될 때의 시간까지 상기 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)이 그의 성분으로 된 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일 초과동안 액체로 유지되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는, 상기 보충제가 그의 의도된 용도로 사용될 때의 시간까지 상기 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)이 그의 성분으로 된 후 (약) 4, 8, 12, 16, 20, 또는 24시간 초과동안 액체로서 유지되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는, 상기 보충제가 그의 의도된 용도로 사용될 때의 시간까지 상기 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)이 그의 성분으로 되기 전 및 후 대부분의 시간동안 동결된다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는 상기 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)이 상기 보충제의 성분으로 될 때 실온 또는 그 미만(예를 들어 상기 보충제의 온도는 (약) 20°C, 15°C, 10°C, 5°C, 또는 0°C 아래에 있다)에 있다.

[0603] 일부 구현예에서, 보충제가 해동될 때 보충제 중의 L-글루타민은 석출되지 않는다. 일부 구현예에서, 보충제가 액체일 때 보충제 중의 L-글루타민은 석출되지 않는다. 일부 구현예에서, 보충제가 실온에서 해동될 때 보충제 중의 L-글루타민은 석출되지 않는다. 일부 구현예에서, 보충제 중의 L-글루타민의 농도는 (약) 200mM, 180mM, 160mM, 140mM, 120mM, 100mM 또는 80mM 또는 그 미만이다. 일부 구현예에서, 보충제 중의 L-글루타민의 농도는 (약) 10mM 내지 (약) 30mM, (약) 10mM 내지 (약) 50mM, (약) 10mM 내지 (약) 70mM, (약) 10mM 내지 (약) 90mM, (약) 10mM 내지 (약) 110mM, (약) 10mM 내지 (약) 130mM, (약) 10mM 내지 (약) 150mM, (약) 10mM 내지 (약) 170mM, (약) 30mM 내지 (약) 50mM, (약) 30mM 내지 (약) 70mM, (약) 30mM 내지 (약) 90mM, (약) 30mM 내지 (약) 110mM, (약) 30mM 내지 (약) 130mM, (약) 30mM 내지 (약) 150mM, (약) 30mM 내지 (약) 170mM, (약) 50mM 내지 (약) 70mM, (약) 50mM 내지 (약) 90mM, (약) 50mM 내지 (약) 110mM, (약) 50mM 내지 (약) 130mM, (약) 50mM 내지 (약) 150mM, (약) 50mM 내지 (약) 170mM, (약) 70mM 내지 (약) 90mM, (약) 70mM 내지 (약) 110mM, (약) 70mM 내지 (약) 130mM, (약) 70mM 내지 (약) 150mM, (약) 70mM 내지 (약) 170mM, (약) 90mM 내지 (약) 110mM, (약) 90mM 내지 (약) 130mM, (약) 90mM 내지 (약) 150mM, (약) 90mM 내지 (약) 170mM, (약) 110mM 내지 (약) 130mM, (약) 110mM 내지 (약) 150mM, (약) 110mM 내지 (약) 170mM, (약) 130mM 내지 (약) 150mM, (약) 130mM 내지 (약) 170mM, 또는 (약) 150mM 내지 (약) 170mM이다. 일부 구현예에서, 보충제 중의 L-글루타민의 농도는 약 80mM이다.

[0604] 일부 구현예에서, 보충제 중의 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)의 농도는 상기 보충제가 기본 배지(예를 들어 분원에서 기술된 것들)과 결합된 후, 배지 중의 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)의 농도가 (약) 0.5 mM-5mM로 되게 하는 것이다. 일부 구현예에서, 기본 배지 중의 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)의 농도는 (약) 2mM이다. 일부 구현예에서, 기본 배지 중의 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)의 농도는 (약) 0.5mM-1mM, 0.5mM-1.5mM, 0.5mM-2mM, 0.5mM-2.5mM, 0.5mM-3mM, 0.5mM-3.5mM, 0.5mM-4mM, 0.5mM-4.5mM, 0.5mM-5mM, 1mM-1.5mM, 1mM-2mM, 1mM-2.5mM, 1mM-3mM, 1mM-3.5mM, 1mM-4mM, 1mM-4.5mM, 1mM-5mM, 1.5mM-2mM, 1.5mM-2.5mM, 1.5mM-3mM, 1.5mM-3.5mM, 1.5mM-4mM, 1.5mM-4.5mM, 1.5mM-5mM, 2mM-2.5mM, 2mM-3mM, 2mM-3.5mM, 2mM-4mM, 2mM-4.5mM, 2mM-5mM, 2.5mM-3mM, 2.5mM-3.5mM, 2.5mM-4mM, 2.5mM-4.5mM, 2.5mM-5mM, 3mM-3.5mM, 3mM-4mM, 3mM-4.5mM, 3mM-5mM, 3.5mM-4mM, 3.5mM-4.5mM, 3.5mM-5mM, 4mM-4.5mM, 4mM-5mM, 또는 4.5mM-5mM(각각 포함)이다. 일부 구현예에서, 기본 배지 중의 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)의 농도

는 (약) 5mM-7.5mM, 5mM-10mM, 5mM-12.5mM, 5mM-15mM, 5mM-17.5mM, 5mM-20mM, 7.5mM-10mM, 7.5mM-12.5mM, 7.5mM-15mM, 7.5mM-17.5mM, 7.5mM-20mM, 10mM-12.5mM, 10mM-15mM, 10mM-17.5mM, 10mM-20mM, 12.5mM-15mM, 12.5mM-17.5mM, 12.5mM-20mM, 15mM-17.5mM, 15mM-20mM, 또는 17.5mM-20mM(각각 포함)이다. 일부 구현예에서, 기본 배지 중의 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)의 농도는 적어도 (약) 0.5mM, 1mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM, 4mM, 4.5mM, 또는 5mM이다. 일부 구현예에서, 기본 배지 중의 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)의 농도는 최대 (약) 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM, 4mM, 4.5mM, 5mM, 5.5mM, 6mM, 6.5mM, 7mM, 7.5mM, 8mM, 8.5mM, 9mM, 9.5mM, 10mM, 12.5mM, 15mM, 17.5mM, 또는 20mM이다.

[0605] 일부 구현예에서, 제 1 보충제는 하나 이상의 추가 성분을 함유한다. 일부 구현예에서, 추가의 보충제, 예를 들어 제 2 보충제는 하나 이상의 추가 성분을 제공하도록 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 보충제, 제 1 보충제 및 선택적으로 하나 이상의 추가 보충제, 예를 들어 제 2 보충제는 상기 기본 배지와 결합되어 상기 기본 배지에 상기 하나 이상의 추가 성분을 제공한다.

[0606] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 적어도 하나의 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 단백질은 비-포유류 기원의 것은 아니다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 단백질은 인간 또는 인간으로부터 유래된 것이다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 단백질은 재조합물이다. 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 단백질은 알부민, 트랜스페린, 인슐린, 피브로넥틴, 아프로티닌 또는 페투인이다. 일부 구현예에서, 상기 단백질은 알부민, 트랜스페린 또는 인슐린, 선택적으로는 인간 또는 재조합 알부민, 트랜스페린 또는 인슐린이다.

[0607] 일부 구현예에서, 상기 단백질은 알부민 또는 인슐린이다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 인간 유래된 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 재조합 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 천연 인간 혈청 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 재조합 인간 혈청 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 비-인간 기원의 재조합 혈청 알부민이다. 알부민 대체물은 임의의 단백질 또는 폴리펩티드 기원이다. 이러한 단백질 또는 폴리펩티드의 예는 제한되지는 않지만, 뇌하수체 추출물(bovine pituitary extract), 식물 가수분해물(예를 들어 쌀 가수분해물), 태아소 알부민(페튜인), 계란 알부민, 인간 혈청 알부민(HSA), 또는 또 다른 동물-유래된 알부민, 병아리 추출물, 소 배아 추출물, AlbuMAX® I, 및 AlbuMAX® II이다.

[0608] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 인간 알부민이거나 또는 인간 알부민으로부터 유래된 것이다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 인간 혈청 또는 인간 혈장으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 재조합 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 재조합 알부민은 인간으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는 천연 알부민을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 천연 알부민은 인간으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 상기 천연 알부민은 인간으로부터 유래되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 알부민의 농도는, 기본 배지(예를 들어 본원에서 기술된 것들)과 결합된 후, 상기 배지 중의 알부민의 농도가 (약) 0mg/mL 내지 (약) 2mg/mL, (약) 0mg/mL 내지 (약) 4mg/mL, (약) 0mg/mL 내지 (약) 6mg/mL, (약) 0mg/mL 내지 (약) 8mg/mL, (약) 0mg/mL 내지 (약) 10mg/mL, (약) 0mg/mL 내지 (약) 12mg/mL, (약) 2mg/mL 내지 (약) 4mg/mL, (약) 2mg/mL 내지 (약) 6mg/mL, (약) 2mg/mL 내지 (약) 8mg/mL, (약) 2mg/mL 내지 (약) 10mg/mL, (약) 2mg/mL 내지 (약) 12mg/mL, (약) 4mg/mL 내지 (약) 6mg/mL, (약) 4mg/mL 내지 (약) 8mg/mL, (약) 4mg/mL 내지 (약) 10mg/mL, (약) 4mg/mL 내지 (약) 12mg/mL, (약) 6mg/mL 내지 (약) 8mg/mL, (약) 6mg/mL 내지 (약) 10mg/mL, (약) 6mg/mL 내지 (약) 12mg/mL, (약) 8mg/mL 내지 (약) 10mg/mL, (약) 8mg/mL 내지 (약) 12mg/mL, (약) 10mg/mL 내지 (약) 12mg/mL, 또는 (약) 10mg/mL 내지 (약) 15mg/mL(각각 포함)로 되도록 하는 것이다. 일부 구현예에서, 배지 중의 상기 알부민의 농도는 (약) 5mg/mL이다.

[0609] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 트랜스페린 또는 트랜스페린 대체물을 포함한다. 일부 구현예에서, 트랜스페린 대체물은 보충제 중에서 트랜스페린과 실질적으로 유사한 결과를 제공하도록 트랜스페린을 대체할 수 있는 화합물이다. 일부 구현예에서, 트랜스페린의 예는 제한되지는 않지만 임의의 철 킬레이트 화합물을 포함한다. 사용될 수 있는 철 킬레이트 화합물은 제한되지는 않지만 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 에틸렌글리콜-비스(β -아미노에틸 에테르)-N,N',N'-테트라아세트산(EGTA), 데페록사민 메실레이트, 디카프토프로판올, 디에틸렌트리아민-펜타아세트산(DPTA), 및 트란스-1,2-디아미노사이클로헥산-N,N',N'-테트라아세트산(CDTA)의 철 킬레이트 화합물, 및 페릭 시트레이트 키킬레이트(ferric citrate chelate) 및 페로우스 설페이트 킬레이트(ferrous sulfate chelate)이다. 일부 구현예에서, 상기 트랜스페린은 철 포화된 트랜스페린이다. 일부 구현예에서, 상기 트랜스페린은 철 포화된 인간 트랜스페린이다.

[0610]

일부 구현예에서, 트랜스페린 또는 트랜스페린 대체물은 인간 트랜스페린이거나 인간 트랜스페린으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 트랜스페린 또는 트랜스페린 대체물은 인간 혈철 또는 혈장으로로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 트랜스페린 또는 트랜스페린 대체물은 재조합 트랜스페린이다. 일부 구현예에서, 트랜스페린의 농도는 보충제가 기본 배지(본원에서 기술된 것)와 결합된 후, 배지 중의 트랜스페린의 농도는, (약) 10mg/L 내지 (약) 50mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 100mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 150mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 200mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 250mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 300mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 350mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 400mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 450mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 50mg/L 내지 (약) 100mg/L, (약) 50mg/L 내지 (약) 150mg/L, (약) 50mg/L 내지 (약) 200mg/L, (약) 50mg/L 내지 (약) 250mg/L, (약) 50mg/L 내지 (약) 300mg/L, (약) 50mg/L 내지 (약) 350mg/L, (약) 50mg/L 내지 (약) 400mg/L, (약) 50mg/L 내지 (약) 450mg/L, (약) 50mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 50mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 50mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 50mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 50mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 100mg/L 내지 (약) 150mg/L, (약) 100mg/L 내지 (약) 200mg/L, (약) 100mg/L 내지 (약) 250mg/L, (약) 100mg/L 내지 (약) 300mg/L, (약) 100mg/L 내지 (약) 350mg/L, (약) 100mg/L 내지 (약) 400mg/L, (약) 100mg/L 내지 (약) 450mg/L, (약) 100mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 100mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 100mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 100mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 100mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 150mg/L 내지 (약) 200mg/L, (약) 150mg/L 내지 (약) 250mg/L, (약) 150mg/L 내지 (약) 300mg/L, (약) 150mg/L 내지 (약) 350mg/L, (약) 150mg/L 내지 (약) 400mg/L, (약) 150mg/L 내지 (약) 450mg/L, (약) 150mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 150mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 150mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 150mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 150mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 250mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 300mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 350mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 400mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 450mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 300mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 350mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 400mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 450mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 350mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 400mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 450mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 350mg/L 내지 (약) 400mg/L, (약) 350mg/L 내지 (약) 450mg/L, (약) 350mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 350mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 350mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 350mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 350mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 400mg/L 내지 (약) 450mg/L, (약) 400mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 400mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 400mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 400mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 400mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 450mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 450mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 450mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 450mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 450mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 500mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 500mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 500mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 500mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 550mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 550mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 550mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 600mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 600mg/L 내지 (약) 750mg/L, 또는 (약) 650mg/L 내지 (약) 750mg/L가 되도록 하는 것이다. 일부 구현예에서, 트랜스페린의 농도는 보충제가 기본 배지(본원에서 기술된 것)와 결합된 후, 배지 중의 트랜스페린의 농도는 (약) 100mg/L가 되도록 하는 것이다. 일부 구현예에서, 트랜스페린의 농도는 보충제가 기본 배지(본원에서 기술된 것)와 결합된 후, 배지 중의 트랜스페린의 농도는 (약) 50mg/L 내지 (약) 150mg/L가 되도록 하는 것이다.

[0611]

일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 인슐린 또는 인슐린 대체물을 포함한다. 일부 구현예에서, 인슐린 대체물은 인슐린과 실질적으로 유사한 결과를 제공하도록 인슐린 대신에 사용될 수 있는 아연 함유 화합물이다. 인슐린 대체물의 예는 제한되지는 않지만 염화 아연, 질산 아연, 브롬화 아연 및 황산 아연을 포함한다. 다수의 인슐린이 당해 분야의 숙련자에게 알려져 있다[문헌 「Gilman, A.G. et al, Eds., The Pharmacological Basis of Therapeutics, Pergamon Press, New York, 1990, pp. 1463-1495」 참조]. 일부 구현예에서, 인슐린 대체물 보다는 인슐린이 보충제 및 배지에 사용된다. 일부 구현예에서, 인슐린은 아연 인슐린이다. 일부 구현예에서, 인슐린은 인간 아연 인슐린이다.

[0612] 일부 구현예에서, 인슐린은 인간 아연 인슐린이거나 또는 인간 아연 인슐린으로부터 유도된다. 일부 구현예에서, 인슐린은 재조합 인슐린이다. 일부 구현예에서, 인슐린은 재조합 인간 인슐린이다. 일부 구현예에서, 인슐린(또는 인슐린 대체물)의 농도는, 보충제가 기본 배지(본원에서 기술된 것)와 결합된 후, 배지 중의 인슐린(또는 인슐린 대체물)의 농도가, 약 1mg/L 내지 (약) 2.5mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 5mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 7.5mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 10mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 12.5mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 15mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 17.5mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 5mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 7.5mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 10mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 12.5mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 15mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 17.5mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 7.5mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 10mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 12.5mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 15mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 17.5mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 10mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 12.5mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 15mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 17.5mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 12.5mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 15mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 17.5mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 12.5mg/L 내지 (약) 15mg/L, (약) 12.5mg/L 내지 (약) 17.5mg/L, (약) 12.5mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 12.5mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 12.5mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 12.5mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 12.5mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 15mg/L 내지 (약) 17.5mg/L, (약) 15mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 15mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 15mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 15mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 15mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 17.5mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 17.5mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 17.5mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 17.5mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 17.5mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 20mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 20mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 20mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 20mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 22.5mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 22.5mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 22.5mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 25mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, 또는 (약) 27.5mg/L 내지 (약) 30mg/L가 되도록 하는 것이다. 일부 구현예에서, 배지 중의 인슐린 또는 인슐린 대체물의 농도는 (약) 10mg/L이다. 일부 구현예에서, 배지 중의 인슐린 또는 인슐린 대체물의 농도는 (약) 7.5mg/L 내지 (약) 12.5mg/L이다.

[0613] 일부 구현예에서, 상기 보충제, 예를 들어 제 1 보충제는 하나 이상의 원하는 성분들을 함유하는 기존의 보충제에 L-글루타민을 추가하거나 혼합하여 제조된다. 일부 구현예에서, L-글루타민은 혈청 대체 보충제, 예를 들어 면역 세포 혈청 대체물(ThermoFisher, #A2598101)에 추가되거나 또는 그것과 혼합된다. 일부 구현예에서, 상기 L-글루타민은 문헌 「Smith et al. Clin Transl Immunology. 2015 Jan; 4(1): e31」에 기술된 면역 세포 혈청 대체물에 추가되거나 그것과 혼합된다. 일부 구현예에서, 상기 보충제 중의 L-글루타민의 농도는 (약) 10mM 내지 (약) 30mM, (약) 10mM 내지 (약) 50mM, (약) 10mM 내지 (약) 70mM, (약) 10mM 내지 (약) 90mM, (약) 10mM 내지 (약) 110mM, (약) 10mM 내지 (약) 130mM, (약) 10mM 내지 (약) 150mM, (약) 10mM 내지 (약) 170mM, (약) 30mM 내지 (약) 50mM, (약) 30mM 내지 (약) 70mM, (약) 30mM 내지 (약) 90mM, (약) 30mM 내지 (약) 110mM, (약) 30mM 내지 (약) 130mM, (약) 30mM 내지 (약) 150mM, (약) 30mM 내지 (약) 170mM, (약) 50mM 내지 (약) 70mM, (약) 50mM 내지 (약) 90mM, (약) 50mM 내지 (약) 110mM, (약) 50mM 내지 (약) 130mM, (약) 50mM 내지 (약) 150mM, (약) 50mM 내지 (약) 170mM, (약) 70mM 내지 (약) 90mM, (약) 70mM 내지 (약) 110mM, (약) 70mM 내지 (약) 130mM, (약) 70mM 내지 (약) 150mM, (약) 70mM 내지 (약) 170mM, (약) 90mM 내지 (약) 110mM, (약) 90mM 내지 (약) 130mM, (약) 90mM 내지 (약) 150mM, (약) 90mM 내지 (약) 170mM, (약) 110mM 내지 (약) 130mM, (약) 110mM 내지 (약) 150mM, (약) 110mM 내지 (약) 170mM, (약) 130mM 내지 (약) 150mM, (약) 130mM 내지 (약) 170mM, 또는 (약) 150mM 내지 (약) 170mM이다. 일부 구현예에서, 상기 보충제 중의 L-글루타민의 농도는 (약) 80mM이다.

[0614] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 성장 인자를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자는 표피 성장 인자(EGF)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자는 섬유 아세포 성장 인자(FGF)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자는 인슐린-유사 성장 인자(IGF)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자는 신경 성장 인자(NGF)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자는 혈소판-유도된 성장

인자(PDGF)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 성장 인자는 트랜스포밍 성장 인자(transforming growth factor; TGF)를 포함한다.

- [0615] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 호르몬(예를 들어 성장 호르몬, 인슐린, 하이드로코르티손, 트리요오도티로닌, 에스트로겐, 안드로겐, 프로게스테론, 프롤락틴, 여포 자극 호르몬, 가스트린 방출 펩티드)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 알파-글로불린 또는 베타-글로불린을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 펩티드 또는 펩티드 분획(예를 들어 동물, 미생물 또는 식물로부터 유래된 단백질 가수 분해물)을 포함한다.
- [0616] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 지질은 콜레스테롤을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 지질은 스테로이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 지질은 지방산(예를 들어 팔미테이트, 스테아레이트, 올리에이트, 리놀리에이트)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 지질은 에탄올아민을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 지질은 콜린을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 지질은 이노시톨(inositol)을 포함한다.
- [0617] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 전이금속을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 전이금속은 아연을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 전이금속은 구리를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 전이금속은 크롬을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 전이금속은 요오드를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 전이금속은 코발트를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 전이금속은 셀레늄을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 전이금속은 마그네슘을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 전이금속은 폴리브덴을 포함한다.
- [0618] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 비타민을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 비타민은 지용성 비타민(예를 들어 비타민 A, 비타민 D, 비타민 E, 비타민 K)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 비타민은 수용성 비타민(예를 들어 B1, B2, B6, B₁₂, C, 엽산)을 포함한다.
- [0619] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 폴리아민을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 폴리아민은 푸트레신(putrescine)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 폴리아민은 스페미딘(spermidine)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 폴리아민은 스페르민(spermine)을 포함한다.
- [0620] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 환원제(reductant)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 환원제는 2-머캅토에탄올을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 환원제는 알파-티오글리세롤을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 환원제는 글루타티온(glutathione)을 포함한다.
- [0621] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 보호 첨가제(protective additive)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 보호 첨가제는 카복시메틸 셀룰로스를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 보호 첨가제는 폴리비닐 피롤리돈을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 보호 첨가제는 플루로닉 F-68(pluronic F-68)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 보호 첨가제는 트윈 80(Tween 80)을 포함한다.
- [0622] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 부착 인자(adhesion factor)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 부착 인자는 피브로넥틴(fibronectin)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 부착 인자는 라미닌(laminin)을 포함한다.
- [0623] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 하나 이상의 항산화제, 하나 이상의 알부민 또는 알부민 대체물, 하나 이상의 지질 제제, 하나 이상의 인슐린 또는 인슐린 대체물, 하나 이상의 트랜스페린 또는 트랜스페린 대체물, 하나 이상의 미량 원소, 및 하나 이상의 글루코코르티코이드 중의 하나 이상이다. 일부 구현예에서, 상기 항산화제는 N-아세틸-L-시스테인, 2-머캅토에탄올 또는 D,L-토코페롤 아세테이트, 또는 그들의 유도체 또는 혼합물을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 인간 혈청 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 지질은 Human Ex-Cite® 또는 에탄올아민 또는 그들의 유도체 또는 혼합물을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 인간 아연 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 트랜스페린은 인간 철-포화된 트랜스페린이다. 일부 구현예에서, 상기 미량 원소는 Se⁴⁺이다. 일부 구현예에서, 상기 글루코코르티코이드는 하이드로코르티손이다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는 농축된다.
- [0624] 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 추가 성분은 하나 이상의 항산화제, 및 하나 이상의 알부민 또는 알부민 대체물, 하나 이상의 지질 제제, 하나 이상의 인슐린 또는 인슐린 대체물, 하나 이상의 트랜스페린 또는 트랜스페린 대체물, 하나 이상의 미량 원소, 및 하나 이상의 글루코코르티코이드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 성분을 포함한다.

지 (약) 22mg/L, (약) 14 mg/L 내지 (약) 24mg/L, (약) 14 mg/L 내지 (약) 26mg/L, (약) 14 mg/L 내지 (약) 28mg/L, (약) 14 mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 16mg/L 내지 (약) 18mg/L, (약) 16mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 16mg/L 내지 (약) 22mg/L, (약) 16mg/L 내지 (약) 24mg/L, (약) 16mg/L 내지 (약) 26mg/L, (약) 16mg/L 내지 (약) 28mg/L, (약) 16mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 18mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 18mg/L 내지 (약) 22mg/L, (약) 18mg/L 내지 (약) 24mg/L, (약) 18mg/L 내지 (약) 26mg/L, (약) 18mg/L 내지 (약) 28mg/L, (약) 18mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 20mg/L 내지 (약) 22mg/L, (약) 20mg/L 내지 (약) 24mg/L, (약) 20mg/L 내지 (약) 26mg/L, (약) 20mg/L 내지 (약) 28mg/L, (약) 20mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 22mg/L 내지 (약) 24mg/L, (약) 22mg/L 내지 (약) 26mg/L, (약) 22mg/L 내지 (약) 28mg/L, (약) 22mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 24mg/L 내지 (약) 26mg/L, (약) 24mg/L 내지 (약) 28mg/L, (약) 24mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 26mg/L 내지 (약) 28mg/L, (약) 26mg/L 내지 (약) 30mg/L, 또는 (약) 28mg/L 내지 (약) 30mg/L로 되도록 하는 것이다.

[0629] 일부 구현예에서, 보충제는 액체이다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는 냉동되지 않거나 보관을 위해서 냉동하는 것이 권장되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는 알부민, N-아세틸-L-시스테인(NAC) 및 에탄올아민을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는 알부민, N-아세틸-L-시스테인(NAC) 및 에탄올아민을 포함하되, 상기 알부민, N-아세틸-L-시스테인(NAC) 및/또는 에탄올아민의 농도는 보충제가 기본 배지(예를 들어 본원에서 기술되는 것들)과 조합된 후 알부민, N-아세틸-L-시스테인(NAC) 및/또는 에탄올아민의 농도가 본원에서 기술된 것과 실질적으로 동일하게 되도록 한다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 인간 유래된 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 인간 혈장 또는 혈청으로부터의 인간 유도된 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는 액체이며, 상당한 양의 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)을 포함하지 않는다.

[0630] 일부 구현예에서, 추가 보충제는, 예를 들어 제 2 보충제가 기본 배지와 조합되어 상기 하나 이상의 추가 성분을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 추가 보충제, 예를 들어 제 2 보충제는 OpTmizer® 보충제(ThermoFisher, part of A1048503)이거나 또는 이를 포함한다.

[0631] 일부 구현예에서, 상기 보충제는 (약) 2배 내지 (약) 100배 농축된다. 일부 구현예에서, 상기 보충제는 (약) 40배 제형이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지의 용적은 제 1 보충제 및, 일부 경우 하나 이상의 추가 보충제를 포함한, 적어도 하나의 보충제의 (약) 20mL 내지 30mL, 예를 들어 25 ± 2mL로 보충된다.

[0632] **C. 무혈청 배지**

[0633] 일부 구현예에서, 무혈청 배지는 합성 아미노산(예를 들어 디펩티드 형태의 L-글루타민, 예를 들어 L-알라닐-L-글루타민), 유리된 형태의 글루타민(예를 들어 L-글루타민)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산(예를 들어 디펩티드 형태의 L-글루타민, 예를 들어 L-알라닐-L-글루타민)은 세포를 포함하는 세포 배양물에서 유리된 형태의 글루타민(예를 들어 L-글루타민)로 전환될 수 있으며, 이때 상기 배지는 혈청-유리이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 인간 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 면역 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 유전자 조작된 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 유전자 조작된 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 제조용 수용체(예를 들어 키메라 항원 수용체)를 발현하도록 유전자 조작된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포를 발현하는 키메라 항원 수용체(CAR)이다.

[0634] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 추가로 적어도 하나의 단백질을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 합성 아미노산을 포함하되, 상기 합성 아미노산(예를 들어 디펩티드 형태의 L-글루타민, 예를 들어 L-알라닐-L-글루타민)은 세포, 유리된 형태의 글루타민(예를 들어 L-글루타민), 및 적어도 하나의 단백질을 포함하는 세포 배양물에서 유리된 형태의 글루타민(예를 들어 L-글루타민)로 전환될 수 있으며, 이때 상기 배지는 혈청-유리이다.

[0635] 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 안정화된 형태의 글루타민(예를 들어 L-글루타민)이다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 수용액(예를 들어 무혈청 배지) 중에서 글루타민(예를 들어 L-글루타민) 보다 더 안정하다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 무혈청 배지에서 상당한 양의 글루타민을 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 상당한 양의 피롤리돈 카복실산 또는 암모니아를 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 무혈청 배지 중에서 적어도 (약) 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 또는 14일동안 상당한 양의 글루타민(예를 들어 L-글루타민)을 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 무혈청 배지 중에서 적어도 (약) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주동안 상당한 양의 글루타민(예를 들어 L-글루타민)을 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 무혈청 배지 중에서 적어도 (약) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월동안 상당한 양의 글루타민(예를 들어 L-글루타민)을 생성하지

않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 무혈청 배지 중에서 적어도 (약) 1, 2, 3, 4, 또는 5년동안 상당한 양의 글루타민(예를 들어 L-글루타민)을 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 무혈청 배지 중에서 적어도 (약) 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 또는 14일동안 상당한 양의 피롤리돈 카복실산 또는 암모니아를 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 무혈청 배지 중에서 적어도 (약) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주동안 상당한 양의 피롤리돈 카복실산 또는 암모니아를 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 무혈청 배지 중에서 적어도 (약) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월동안 상당한 양의 피롤리돈 카복실산 또는 암모니아를 생성하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 무혈청 배지 중에서 적어도 (약) 1, 2, 3, 4, 또는 5년동안 상당한 양의 피롤리돈 카복실산 또는 암모니아를 생성하지 않는다.

[0636] 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 수용액(예를 들어 무혈청 배지) 중에서 가용성이다. 일부 구현예에서, 상기 수용액 중의 아미노산의 용해도는 유리된 형태의 글루타민(예를 들어 L-글루타민) 보다 높다.

[0637] 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 세포 내로 운반될 수 있으며, 이때 유리된 형태의 글루타민(예를 들어 L-글루타민)으로 전환될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 면역 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 유전자 조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 유전자 조작된 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 재조합 수용체(예를 들어 키메라 항원 수용체)를 발현하도록 유전자 조작된다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 T 세포를 발현하는 키메라 항원 수용체(CAR)이다.

[0638] 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 디펩티드이다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 트리펩티드이다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 디펩티드 형태의 L-글루타민(예를 들어 L-알라닐-L-글루타민)이다.

[0639] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민(즉, L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 (약) 0.5mM-5mM이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민(즉, L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 (약) 2mM이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민(즉, L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 (약) 0.5mM-1mM, 0.5mM-1.5mM, 0.5mM-2mM, 0.5mM-2.5mM, 0.5mM-3mM, 0.5mM-3.5mM, 0.5mM-4mM, 0.5mM-4.5mM, 0.5mM-5mM, 1mM-1.5mM, 1mM-2mM, 1mM-2.5mM, 1mM-3mM, 1mM-3.5mM, 1mM-4mM, 1mM-4.5mM, 1mM-5mM, 1.5mM-2mM, 1.5mM-2.5mM, 1.5mM-3mM, 1.5mM-3.5mM, 1.5mM-4mM, 1.5mM-4.5mM, 1.5mM-5mM, 2mM-2.5mM, 2mM-3mM, 2mM-3.5mM, 2mM-4mM, 2mM-4.5mM, 2mM-5mM, 2.5mM-3mM, 2.5mM-3.5mM, 2.5mM-4mM, 2.5mM-4.5mM, 2.5mM-5mM, 3mM-3.5mM, 3mM-4mM, 3mM-4.5mM, 3mM-5mM, 3.5mM-4mM, 3.5mM-4.5mM, 3.5mM-5mM, 4mM-4.5mM, 4mM-5mM, 또는 4.5mM-5mM(각각 포함)이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민(즉, L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 (약) 5mM-7.5mM, 5mM-10mM, 5mM-12.5mM, 5mM-15mM, 5mM-17.5mM, 5mM-20mM, 7.5mM-10mM, 7.5mM-12.5mM, 7.5mM-15mM, 7.5mM-17.5mM, 7.5mM-20mM, 10mM-12.5mM, 10mM-15mM, 10mM-17.5mM, 10mM-20mM, 12.5mM-15mM, 12.5mM-17.5mM, 12.5mM-20mM, 15mM-17.5mM, 15mM-20mM, 또는 17.5mM-20mM(각각 포함)이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민(즉, L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 (약) 0.5mM, 1mM, 1.5mM, 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM, 4mM, 4.5mM, 또는 5mM이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민(즉, L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 (약) 2mM이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민(즉, L-알라닐-L-글루타민)의 농도는 최대 (약) 2mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM, 4mM, 4.5mM, 5mM, 5.5mM, 6mM, 6.5mM, 7mM, 7.5mM, 8mM, 8.5mM, 9mM, 9.5mM, 10mM, 12.5mM, 15mM, 17.5mM, 또는 20mM이다.

[0640] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 L-글루타민의 유리 형태(즉, L-글루타민)의 농도는 약 0.5 mM-5mM이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 L-글루타민의 유리 형태(즉, L-글루타민)의 농도는 (약) 2mM이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 L-글루타민의 유리 형태(즉, L-글루타민)의 농도는 (약) 0.5mM-1mM, 0.5mM-1.5mM, 0.5mM-2mM, 0.5mM-2.5mM, 0.5mM-3mM, 0.5mM-3.5mM, 0.5mM-4mM, 0.5mM-4.5mM, 0.5mM-5mM, 1mM-1.5mM, 1mM-2mM, 1mM-2.5mM, 1mM-3mM, 1mM-3.5mM, 1mM-4mM, 1mM-4.5mM, 1mM-5mM, 1.5mM-2mM, 1.5mM-2.5mM, 1.5mM-3mM, 1.5mM-3.5mM, 1.5mM-4mM, 1.5mM-4.5mM, 1.5mM-5mM, 2mM-2.5mM, 2mM-3mM, 2mM-3.5mM, 2mM-4mM, 2mM-4.5mM, 2mM-5mM, 2.5mM-3mM, 2.5mM-3.5mM, 2.5mM-4mM, 2.5mM-4.5mM, 2.5mM-5mM, 3mM-3.5mM, 3mM-4mM, 3mM-4.5mM, 3mM-5mM, 3.5mM-4mM, 3.5mM-4.5mM, 3.5mM-5mM, 4mM-4.5mM, 4mM-5mM, 또는 4.5mM-5mM(각각 포함)이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 L-글루타민의 유리 형태(즉, L-글루타민)의 농도는 (약) 5mM-7.5mM, 5mM-10mM, 5mM-12.5mM, 5mM-15mM, 5mM-17.5mM, 5mM-20mM, 7.5mM-10mM, 7.5mM-12.5mM, 7.5mM-15mM, 7.5mM-17.5mM, 7.5mM-20mM, 10mM-12.5mM, 10mM-15mM, 10mM-17.5mM, 10mM-20mM, 12.5mM-15mM, 12.5mM-17.5mM, 12.5mM-20mM, 15mM-17.5mM, 15mM-20mM, 또는 17.5mM-20mM(각각 포함)이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배

650mg/L, (약) 150mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 250mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 300mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 350mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 400mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 450mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 200mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 300mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 350mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 400mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 450mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 250mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 350mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 400mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 450mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 300mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 350mg/L 내지 (약) 400mg/L, (약) 350mg/L 내지 (약) 450mg/L, (약) 350mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 350mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 350mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 350mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 350mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 400mg/L 내지 (약) 450mg/L, (약) 400mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 400mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 400mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 400mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 400mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 450mg/L 내지 (약) 500mg/L, (약) 450mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 450mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 450mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 450mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 500mg/L 내지 (약) 550mg/L, (약) 500mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 500mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 500mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 550mg/L 내지 (약) 600mg/L, (약) 550mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 550mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 600mg/L 내지 (약) 650mg/L, (약) 600mg/L 내지 (약) 750mg/L, (약) 650mg/L 내지 (약) 750mg/L이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 트랜스페린의 농도는 (약) 100mg/L이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 트랜스페린의 농도는 (약) 50mg/L 내지 150mg/L이다.

[0645]

일부 구현예에서, 상기 보충제는 인슐린 또는 인슐린 대체물(예를 들어 본원에서 기술된 것들)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 인슐린은 인간으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 상기 인슐린은 재조합 인슐린이다. 일부 구현예에서, 상기 인슐린은 재조합 인간 인슐린이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 상기 인슐린(또는 인슐린 대체물)의 농도는 (약) 1mg/L 내지 (약) 2.5mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 5mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 7.5mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 10mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 12.5mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 15mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 17.5mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 1mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 5mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 7.5mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 10mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 12.5mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 15mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 17.5mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 2.5mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 7.5mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 10mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 12.5mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 15mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 17.5mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 5mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 10mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 12.5mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 15mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 17.5mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 7.5mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 12.5mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 15mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 17.5mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 10mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 12.5mg/L 내지 (약) 15mg/L, (약) 12.5mg/L 내지 (약) 17.5mg/L, (약) 12.5mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 12.5mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 12.5mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 12.5mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 12.5mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 15mg/L 내지 (약) 17.5mg/L, (약) 15mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 15mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 15mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 15mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 15mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 17.5mg/L 내지 (약) 20mg/L, (약) 17.5mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 17.5mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 17.5mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 17.5mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 20mg/L 내지 (약) 22.5mg/L, (약) 20mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 20mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 20mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 22.5mg/L 내지 (약) 25mg/L, (약) 22.5mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, (약) 22.5mg/L 내지 (약) 30mg/L, (약) 25mg/L 내지 (약) 27.5mg/L, 또는 (약) 27.5mg/L 내지 (약) 30mg/L이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 상기 인슐린 또는 인슐린 대체물의

농도는 (약) 10mg/L이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 중의 상기 인슐린 또는 인슐린 대체물의 농도는 (약) 7.5mg/L 내지 (약) 12.5mg/L이다.

[0646] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 페놀 레드(phenol red)를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 페놀 레드를 포함한다.

[0647] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 선택적으로는 비타민, 유기산, 항산화제, 지질, 성장 인자, N-아세틸시스테인, 에탄올아민 및/또는 완충제를 함유하는, 무기 염, 설탕, 아미노산의 영양 혼합물을 포함한다. 그들의 예는 비타민, 유기산, 항산화제, 지질, 성장 인자, N-아세틸시스테인, 에탄올아민 및/또는 완충제를 비롯하여 본원에서 예를 들어 상기 섹션에서 기술된 것들을 포함한다.

[0648] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 하나 이상의 항산화제, 하나 이상의 알부민 또는 알부민 대체물, 하나 이상의 지질 제제(lipid agent), 하나 이상의 인슐린 또는 인슐린 대체물, 하나 이상의 트랜스페린 또는 트랜스페린 대체물, 하나 이상의 미량 원소(trace element), 하나 이상의 글루코코르티코이드(glucocorticoid), 하나 이상의 무기 염, 하나 이상의 에너지 소스(energy source), 하나 이상의 완충제, 하나 이상의 피루베이트 염(pyruvate salt), 하나 이상의 pH 지시약(indicator), 하나 이상의 아미노산, 및 하나 이상의 비타민 중의 하나 이상으로부터 선택된 하나 이상의 성분을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 항산화제는 N-아세틸-L-시스테인, 2-머캅토에탄올, 및 D,L-토코페롤 아세테이트, 또는 그들의 유도체 또는 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 인간 혈청 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 지질 제제는 Human Ex-Cyte® 및 에탄올아민이다. 일부 구현예에서, 상기 인슐린은 인간 아연 인슐린이다. 일부 구현예에서, 상기 트랜스페린은 인간 철-포화된 트랜스페린이다. 일부 구현예에서, 상기 글루코코르티코이드는 하이드로코르티손(hydrocortisone)이다. 일부 구현예에서, 무기 염 성분은 하나 이상의 칼슘염, 하나 이상의 칼륨염, 하나 이상의 마그네슘염, 하나 이상의 나트륨염, 하나 이상의 탄산염, 및 하나 이상의 인산염으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 무기 염을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 에너지 소스는 D-글루코스는이다. 일부 구현예에서, 상기 완충제는 HEPES이다. 일부 구현예에서, 상기 피루베이트 염은 나트륨 피루베이트이다. 일부 구현예에서, 상기 pH 지시약은 페놀 레드이다. 일부 구현예에서, 아미노산 성분은 글리신, L-알라닌, L-아스파라긴, L-시스테인, L-아스파르트산, L-글루탐산, L-페닐알라닌, L-히스티딘, L-이소류신, L-리신, L-류신, L-글루타민, L-아르기닌 HCL, L-메티오닌, L-프롤린, L-하이드록시프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-티로신, 및 L-발린, 및 그들의 염 및 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 비타민 성분은 비오틴, D-칼슘 판토테네이트, 콜린 클로라이드, 엽산(folic acid), i-이노시톨(i-inositol), 니아신아미드(niacinamide), 피리독살 HCl(pyridoxal HCl), 리보플라빈, 티아민 HCl, 및 비타민 B12, 및 그들의 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 비타민을 포함한다. 일부 구현예에서, 성분들은 N-아세틸-L-시스테인, 2-머캅토에탄올, 인간 혈청 알부민, D,L-토코페롤 아세테이트, Human Ex-Cyte®, 에탄올아민, 인간 아연 인슐린, 철-포화된 트랜스페린, Se^{4+} , 하이드로코르티손, Ca^{2+} , K^+ , Mg^{2+} , Na^+ , CO_3^{2-} , PO_4^{3-} , D-글루코스, HEPES, 나트륨 피루베이트, 페놀 레드, 글리신, L-알라닌, L-아스파라긴, L-시스테인, L-아스파르트산, L-글루탐산, L-페닐알라닌, L-히스티딘, L-이소류신, L-리신, L-류신, L-글루타민, L-아르기닌 HCL, L-메티오닌, L-프롤린, L-하이드록시프롤린, L-세린, L-트레오닌, L-트립토판, L-티로신, 및 L-발린, 비오틴, D-칼슘 판토테네이트, 콜린 클로라이드, 엽산, i-이노시톨, 니아신아미드, 피리독살 HCl, 리보플라빈, 티아민 HCl, 및 비타민 B12을 포함한다.

[0649] 일부 구현예에서, 기본 배지 및 적어도 하나의 보충제를 포함하는 무혈청 배지가 제공된다. 기본 배지 및 보충제의 각종 예들이 본원에, 예를 들어 상기 섹션에 기술되어 있다.

[0650] 일부 구현예에서, 상기 혈청-유리 제형은 (약) 90% 내지 (약) 97.5%(v/v)의 기본 배지, (약) 2.5% 내지 (약) 10%(v/v)의 보충제, 예를 들어 제 1 보충제 및/또는 제 2 보충제를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 혈청-유리 제형은 (약) 90% 내지 (약) 97.5%(v/v)의 기본 배지, (약) 1.25% 내지 (약) 5%(v/v)의 제 1 보충제, 및 (약) 1.25% 내지 (약) 5%(v/v)의 제 2 보충제를 포함한다.

[0651] 일부 구현예에서, 기본 배지, 제 1 보충제 및 제 2 보충제를 포함하는 무혈청 배지가 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 합성 아미노산(예를 들어 디펩티드 형태의 L-글루타민, 예를 들어 L-알라닌-L-글루타민)을 포함하는 무혈청 배지가 제공되며, 상기 기본 배지는 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민) 및/또는 단백질이 부재하거나 또는 실질적으로 부재한다. 일부 구현예에서, 상기 제 1 보충제는 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)을 포함하되, 상기 제 1 보충제는 글루타민이 그의 구성성분으로 된 후에 그리고 의도

된 용도(예를 들어 기본 배지용 보충제로서 사용되는)로 사용하기 전의 대부분의 시간동안 동결되거나 실온(예를 들어 20, 10, 15, 5, 0, -5, -10, -15, 또는 -20℃)하에서 저장된다. 일부 구현예에서, 상기 제 1 보충제는 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)을 포함하되, 상기 제 1 보충제는 배지(예를 들어 기본 배지)와의 결합 직전에 실온(예를 들어 20, 10, 15, 5, 0, -5, -10, -15, 또는 -20℃)하에서 저장된다. 일부 구현예에서, 상기 제 2 보충제는 알부민, N-아세틸-L-시스테인(NAC) 및/또는 에탄올아민을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제 2 보충제는 하나 이상의 항산화제, 하나 이상의 알부민 또는 알부민 대체물, 하나 이상의 지질 제제, 하나 이상의 인슐린 또는 인슐린 대체물, 하나 이상의 트랜스페린 또는 트랜스페린 대체물, 하나 이상의 미량 원소, 및 하나 이상의 글루코코르티코이드로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 성분을 포함한다.

[0652] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 하나 이상의 사이토카인을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 인간 재조합 사이토카인이다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 T 세포에 의해서 발현되고/되거나 그에 대해 내인성인 수용체에 결합하고/하거나 그에 결합될 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 다수의 4-알파-헬릭스 다발 패밀리의 사이토카인이거나 또는 그것을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 다수의 4-알파-헬릭스 다발 패밀리의 사이토카인은 제한되지는 않지만 인터루킨-2(IL-2), 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-7(IL-7), 인터루킨-9(IL-9), 인터루킨-12(IL-12), 인터루킨-15(IL-15), 과립구 콜로니 자극 인자(G-CSF), 및 과립구-대식세포 콜로니 자극 인자(GM-CSF)를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 IL-15이거나 또는 그것을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 IL-7이거나 또는 그것을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2이거나 또는 그것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 사이토카인은 IL-2를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 IL-2, IL-7 또는 IL-15로부터 선택된다.

[0653] 일부 구현예에서, 사이토카인의 농도는 (약) 1 IU/ml 내지 (약) 2,000 IU/ml, (약) 10 IU/ml 내지 (약) 100 IU/ml, (약) 50 IU/ml 내지 (약) 500 IU/ml, (약) 100 IU/ml 내지 (약) 200 IU/ml, (약) 500 IU/ml 내지 (약) 1400 IU/ml, (약) 250 IU/ml 내지 (약) 500 IU/ml, 또는 (약) 500 IU/ml 내지 (약) 2,500 IU/ml이다.

[0654] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 IL-2를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 IL-2(예를 들어 인간 재조합 IL-2)의 농도는 (약) 2 IU/ml 내지 (약) 500 IU/ml, (약) 10 IU/ml 내지 (약) 250 IU/ml, (약) 100 IU/ml 내지 (약) 500 IU/ml, 또는 (약) 100 IU/ml 내지 (약) 400 IU/ml이다. 특정 구현예에서, 상기 IL-2의 농도는 (약) 50 IU/ml, 75 IU/ml, 100 IU/ml, 125 IU/ml, 150 IU/ml, 175 IU/ml, 200 IU/ml, 225 IU/ml, 250 IU/ml, 300 IU/ml, 또는 400 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 상기 IL-2의 농도는 (약) 100 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 상기 IL-2의 농도는 (약) 200 IU/ml이다.

[0655] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 IL-7을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 IL-7, 예를 들어 인간 재조합 IL-7의 농도는 (약) 10 IU/ml 내지 (약) 5,000 IU/ml, (약) 500 IU/ml 내지 (약) 2,000 IU/ml, (약) 600 IU/ml 내지 (약) 1,500 IU/ml, (약) 500 IU/ml 내지 (약) 2,500 IU/ml, (약) 750 IU/ml 내지 (약) 1,500 IU/ml, 또는 (약) 1,000 IU/ml 내지 (약) 2,000 IU/ml이다. 특정 구현예에서, 상기 IL-7의 농도는 (약) 100 IU/ml, 200 IU/ml, 300 IU/ml, 400 IU/ml, 500 IU/ml, 600 IU/ml, 700 IU/ml, 800 IU/ml, 900 IU/ml, 1,000 IU/ml, 1,200 IU/ml, 1,400 IU/ml, 또는 1,600 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 상기 IL-7의 농도는 약 600 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 상기 IL-7의 농도는 약 1,200 IU/ml이다.

[0656] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 IL-15를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 IL-15, 예를 들어 인간 재조합 IL-15의 농도는 (약) 2 IU/ml 내지 (약) 500 IU/ml, (약) 0.1 IU/ml 내지 (약) 200 IU/ml, (약) 1 IU/ml 내지 (약) 50 IU/ml, (약) 5 IU/ml 내지 (약) 25 IU/ml, (약) 25 IU/ml 내지 (약) 50IU/ml, (약) 5 IU/ml 내지 (약) 15 IU/ml, 또는 (약) 10 IU/ml 내지 (약) 50 IU/ml이다. 특정 구현예에서, 상기 IL-15의 농도는 약 1 IU/ml, 2 IU/ml, 3 IU/ml, 4 IU/ml, 5 IU/ml, 6 IU/ml, 7 IU/ml, 8 IU/ml, 9 IU/ml, 10 IU/ml, 11 IU/ml, 12 IU/ml, 13 IU/ml, 14 IU/ml, 15 IU/ml, 20 IU/ml, 25 IU/ml, 30 IU/ml, 40 IU/ml, 50 IU/ml, 100 IU/ml, 또는 200 IU/ml이다. 특정 구현예에서, 상기 IL-15의 농도는 약 20 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 상기 IL-15의 농도는 약 100 IU/ml이다. 일부 구현예에서, 상기 IL-15의 농도는 약 200 IU/ml이다.

[0657] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 재조합 L-2, 재조합 IL-7, 및/또는 재조합 IL-15, 예를 들어 인간 재조합 IL-2, 인간 재조합 IL-7, 및/또는 인간 재조합 IL-15가 보충된 기본 배지를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 (약) 2 IU/ml 내지 (약) 500 IU/ml의 재조합 L-2, (약) 10 IU/ml 내지 (약) 5,000 IU/ml의 재조합 L-7, 및 (약) 2 IU/ml 내지 (약) 500 IU/ml의 재조합 L-15를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배

지는 (약) 50 IU/ml 내지 (약) 500 IU/ml의 재조합 L-2, (약) 100 IU/ml 내지 (약) 2,000 IU/ml의 재조합 L-7, 및 (약) 50 IU/ml 내지 (약) 500 IU/ml의 재조합 L-15를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 예를 들어 세포 조성물의 자극/활성화 및/또는 조작에 사용하기 위해서 (약) 50 IU/ml 내지 (약) 150 IU/ml의 재조합 L-2, (약) 500 IU/ml 내지 (약) 1,000 IU/ml의 재조합 L-7, 및 (약) 50 IU/ml 내지 (약) 150 IU/ml의 재조합 L-15를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 예를 들어 세포 조성물의 배양 또는 증폭에 사용하기 위해서 (약) 150 IU/ml 내지 (약) 250 IU/ml의 재조합 L-2, (약) 1,000 IU/ml 내지 (약) 1,500 IU/ml의 재조합 L-7, 및 (약) 150 IU/ml 내지 (약) 250 IU/ml의 재조합 L-15를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 조성물의 배양 또는 증폭에 사용된 상기 무혈청 배지는 상기 세포 조성물의 자극/활성화 및/또는 조작에 사용된 무혈청 배지 보다 높은 농도의 하나 이상의 사이토카인을 함유한다. 일부 구현예에서, 세포 조성물의 배양 또는 증폭에 사용된 무혈청 배지는 상기 세포 조성물의 자극/활성화 및/또는 조작에 사용된 무혈청 배지 보다 약 또는 적어도 약 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 또는 3.0배 높은 하나 이상의 사이토카인의 농도로 함유한다.

[0658] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 농축된 배지 제형이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 농축된 배지 제형이 아니다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 (약) 2배 내지 (약) 100배 농축된다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 (약) 10배 제형이다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 (약) 2°C 내지 8°C에서 저장될 수 있다.

[0659] 일부 구현예에서, 상기 배지는 L-글루타민, 디펩티드 형태의 글루타민 또는 다른 형태의 글루타민의 부가 보충제 없이 적어도 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일 또는 그 이상동안 세포를 배양할 수 있다.

[0660] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 세포의 증폭을 지원하거나 또는 촉진한다. 일부 구현예에서, 상기 배지는 세포의 생존력을 지원하거나 또는 촉진한다. 일부 구현예에서, 상기 배지는 세포의 활성화를 지원하거나 또는 촉진한다.

[0661] 일부 구현예에서, 상기 세포는 면역 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포는 기본 면역 세포(primary immune cell)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기본 면역 세포는 유전자 조작된 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 면역 세포는 CD4 및/또는 CD8 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 CD4 및/또는 CD8 T 세포는 유전자 조작된 T 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 T 세포는 재조합 수용체(예를 들어 키메라 항원 수용체)를 발현하도록 유전자 조작된다. 일부 구현예에서, 상기 T 세포는 T 세포를 발현하는 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함한다.

[0662] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지는 세포의 생존률, 증폭성, 및/또는 활성화를 지원하거나 또는 촉진시키되, 상기 무혈청 배지로 배양된 세포는 혈청-함유 배지, 예를 들어 약 5-10%의 인간 혈청을 함유하는 배지로 배양된 세포와 비교될 수 있는 기능적 특성(예를 들어 사이토카인(들)의 생존률, 증폭성, 및 생산성)을 성취한다.

[0663] **D. 무혈청 배지**

[0664] 혈청-울리 배지 제형을 제조하는 방법이 제공되며, 상기 방법은, (a) 세포 배양물에서 유리된 형태의 글루타민(L-글루타민)으로 전환될 수 있는 합성 아미노산을 포함하는 기본 배지; (b) 유리된 형태의 글루타민(L-글루타민)을 포함하는 제 1 보충제로서, 상기 제 1 보충제는 L-글루타민이 그의 성분으로 된 후 그리고 조합하기 전에 적어도 일부의 시간동안 동결된 것인 제 1 보충제를 조합하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 디펩티드 형태의 L-글루타민(예를 들어 L-알라닐-L-글루타민)이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 혈청-부재이다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지는 액체 제형이고/이거나 상기 조합 전에 동결되지 않고/않거나 저장에서 유지될 때 동결되는 상업적 프로토콜이 권장되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 제 1 보충제는, L-글루타민이 그의 성분으로 된 후 그리고 상기 기본 배지와 조합되기 전의 대부분의 시간동안 동결되었다. 일부 구현예에서, 상기 제 1 보충제는 상기 조합 이전에 동결되고 해동되었다.

[0665] 일부 구현예에서, 상기 제 1 보충제는, 상기 기본 배지와 조합되기 전 (약) 1주 이내, 예를 들어 (약) 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1일 이내에, 일반적으로는 (약) 12시간, 6시간, 2시간, 1시간 또는 30분 이내에 액체 제형으로서 해동된다. 일부 구현예에서, 상기 제 1 보충제는 짧게(예를 들어 6, 12, 16, 24, 36, 48시간 이내) 또는 상기 조합 직전에 동결된 상태로 유지된다. 일부 구현예에서, 상기 L-글루타민을 함유하는 상기 제 1 보충제는 상기 기본 배지와 조합되기 전 (약) 48, 24, 16, 12, 8, 4, 또는 2시간 미만동안 액체 제형이었다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 L-글루타민의 디펩티드이다. 일부 구현예에서, 상기 합성 아미노산은 L-알

라닐-L-글루타민이다.

[0666] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 제형은 상기 기본 배지 (약) 90% 내지 98.75%(v/v) 및 상기 제 1 보충제 (약) 1.25% 내지 10%(v/v)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 제형은 상기 기본 배지 (약) 90% 내지 97.5%(v/v) 및 상기 제 1 보충제 (약) 1.25% 내지 5%(v/v)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 제형은 상기 기본 배지 (약) 95%(v/v) 및 상기 제 1 보충제 (약) 2.5% ± 0.2%(v/v), 예를 들어 2.5%(v/v)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지의 1L는 상기 제 1 보충제 (약) 25mL로 보충된다.

[0667] 일부 구현예에서, 상기 방법은 추가로 제 2 보충제와 조합하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제 2 보충제는 하나 이상의 추가 성분, 예를 들어 하나 이상의 항산화제, 하나 이상의 알부민 또는 알부민 대체물, 하나 이상의 지질 제제, 하나 이상의 인슐린 또는 인슐린 대체물, 하나 이상의 트랜스페린 또는 트랜스페린 대체물, 하나 이상의 미량 원소, 및 하나 이상의 글루코코르티코이드를 비롯한 위에서 기술한 것들을 포함한다. 상기 제 2 보충제의 예시적인 성분들은 위에서 기술되었다.

[0668] 일부 구현예에서, 상기 제 2 보충제는 알부민, N-아세틸시스테인(NAC) 및 에탄올아민을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제 2 보충제는 알부민, N-아세틸시스테인(NAC) 및 에탄올아민을 포함하되, 알부민, NAC 및/또는 에탄올아민의 농도는, 상기 제 보충제가 기본 배지(예를 들어 본원에서 기술된 것들)와 조합된 후, 상기 알부민, NAC 및/또는 에탄올아민의 농도가 본원에서 기술된 것과 실질적으로 동일하게 되도록 하는 것이다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 인간 유도된 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 알부민은 인간 혈장 또는 혈청으로부터의 인간 유도된 알부민이다. 일부 구현예에서, 상기 제 2 보충제는 액체이고 상당량의 유리된 형태의 글루타민(즉, L-글루타민)을 포함하지 않는다.

[0669] 일부 구현예에서, 상기 제 2 보충제는 OpTmizer® 보충제(제조원: Thermofisher, A1048503의 일부)를 포함한다.

[0670] 일부 구현예에서, 상기 제 2 보충제는 액체이다. 일부 구현예에서, 상기 제 2 보충제는 저장을 위해 동결되지 않거나 동결되는 것이 권장되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 제형은 상기 제 2 보충제 약 1.25% 내지 5%(v/v), 예를 들어 (약) 2.5% ± 0.2%, 예를 들어 2.5% 또는 2.6%를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 기본 배지 1L는 상기 제 2 보충제 26mL로 보충된다.

[0671] 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 제형은 상기 기본 배지 약 90% 내지 97.5%(v/v), 상기 제 1 보충제 약 1.25% 내지 5%(v/v), 및 상기 제 2 보충제 약 1.25% 내지 5%(v/v)를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 무혈청 배지 제형은 상기 기본 배지 약 95%(v/v), 상기 제 1 보충제 약 2.5% ± 0.2%(v/v), 및 상기 제 2 보충제 약 2.5% ± 0.2%(v/v)를 포함한다.

[0672] **III. 재조합 수용체**

[0673] 본원에서 제공된, 예를 들어 섹션 I에서 기술된 방법에 의해서 처리, 가공, 조작되고/되거나 생산된 상기 세포는 재조합 단백질, 예를 들어 재조합 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR), 또는 T 세포 수용체(TCR)을 함유하거나 발현하거나, 또는 그것들을 함유하거나 발현하도록 조작된다. 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 방법은, 재조합 단백질을 발현하거나 함유하도록 조작되는 세포, 또는 이를 함유하고/하거나 그 세포에 대해 농축된 집단 또는 조성물을 생성하고/하거나 생성할 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포, 또는 T 세포의 집단 또는 조성물이 처리, 가공, 조작, 및/또는 생성된다.

[0674] 일부 구현예에서, 상기 세포는 유전자 조작을 통해서 도입된 하나 이상의 핵산을 포함하고, 그에 의해서 상기 핵산의 재조합 또는 유전자 조작된 생성물을 발현한다. 일부 구현예에서, 유전자 전달은 세포를 먼저 자극함으로써, 예를 들어 활성화된 세포의 형질 도입 후 예를 들어 사이토카인 또는 활성 마커의 발현에 의해 측정된 바와 같이 증식, 생존 및/또는 활성화 및 임상 적용에 충분한 수로 배양에서의 증폭과 같은 반응을 유도하는 자극과 세포를 조합함으로써 달성된다.

[0675] 상기 수용체 중에는 항원 수용체 및 그의 하나 이상의 성분을 함유하는 수용체가 있다. 상기 재조합 수용체는 키메라 수용체, 예를 들어 리간드-결합 도메인을 함유하거나 또는 그의 분획 및 세포내 신호전달 도메인 또는 영역, 기능성 비-TCR 항원 수용체, 키메라 항원 수용체(CAR), 및 T 세포 수용체(TCR), 예를 들어 재조합 또는 트랜스제닉 TCR(transgenic TCR), 키메라 자가항체 수용체(CAAR) 및 전술한 것들 중 임의의 성분들을 포함할 수 있다. 상기 재조합 수용체, 예를 들어 CAR은 일반적으로, 일부 측면에서는 링커 및/또는 막관통 도메인을 경유하여 하나 이상의 세포내 신호전달 성분과 연결된 세포의 항원(또는 리간드) 결합 도메인을 포함한다.

[0676] 1. 키메라 항원 수용체(CAR)

[0677] 일부 구현예에서, CAR은 예를 들어 암 마커 및/또는 설명된 항원과 같은 입양 치료에 의해 표적화될 특정 세포 유형에서 발현된 마커와 같은 특정 마커에 대해 특이성을 갖도록 구성된다. 따라서, CAR은 전형적으로 항체의 하나 이상의 항원-결합 단편, 도메인 또는 일부, 또는 하나 이상의 항체 가변 도메인 및/또는 항체 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 항체 분자의 항원-결합 부분 또는 부분들, 예를 들어 가변 중쇄(VH) 또는 그의 항원-결합 부분, 또는 모노클로날 항체(mAb)의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)로부터 유래된 단일-사슬 항체 단편(scFv)을 포함한다.

[0678] 일부 구현예에서, 특정 세포 유형의 표면에 발현되는 항원과 같은 특정 항원 (또는 마커 또는 리간드)에 대한 특이성을 갖는 CAR을 발현하는 T 세포와 같은 조작된 세포들이 제공된다. 일부 구현예에서, 항원은 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 이것은 탄수화물 또는 기타 분자이다. 일부 구현예에서, 항원은 정상 세포 또는 비-표적화 세포 또는 조직에 비해, 질병 또는 병태의 세포, 예를 들어 종양 또는 병원성 세포에서 선택적으로 발현되거나 과발현된다. 다른 구현예에서, 항원은 정상 세포 상에 발현되고 및/또는 조작된 세포 상에 발현된다.

[0679] 특정 구현예에서, 키메라 수용체와 같은 재조합 수용체는 세포질 신호전달 영역을 포함하는데, 이것은 T 세포에서 일차 활성화 신호를 유도할 수 있는 세포질(세포내) 영역과 같은 세포질 신호전달 도메인 또는 영역(세포내 신호전달 도메인 또는 영역이라고도 호환적으로 칭해짐), 예를 들어 T 세포 수용체(TCR) 성분의 세포질 신호전달 도메인 또는 영역 (예를 들어 CD3-제타(CD3ζ) 사슬의 제타 사슬의 세포질 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 변이체 또는 신호전달 부분) 및/또는 면역 수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 것을 포함한다.

[0680] 일부 구현예에서, 키메라 수용체는 리간드(예를 들어 항원) 항원에 특이적으로 결합하는 세포의 리간드-결합 도메인을 추가로 함유한다. 일부 구현예에서, 키메라 수용체는 항원에 특이적으로 결합하는 세포의 항원-인식 도메인을 함유하는 CAR이다. 일부 구현예에서, 항원과 같은 리간드는, 세포 표면에서 발현되는 단백질이다. 일부 구현예에서, CAR은 TCR-유사 CAR이고 항원은 처리된 펩티드 항원, 예를 들어 TCR과 같이 주요 조직적합성 복합체(MHC) 분자 관점에서 세포 표면에서 인식되는 세포내 단백질의 펩티드 항원이다.

[0681] CAR을 포함하는 예시적인 항원 수용체 및 이러한 수용체를 조작하고 세포내로 도입시키는 방법은, 예를 들어 국제공개번호 제WO2000/14257호, 제WO2013/126726호, 제WO2012/129514호, 제WO2014/031687호, 제WO2013/166321호, 제WO2013/071154호, 제WO2013/123061호, 미국특허출원 공개번호 제US2002/131960호, 제US2013/287748호, 제US2013/0149337호, 미국특허 제6,451,995호, 제7,446,190호, 제8,252,592호, 제8,339,645호, 제8,398,282호, 제7,446,179호, 제6,410,319호, 제7,070,995호, 제7,265,209호, 제7,354,762호, 제7,446,191호, 제8,324,353호, 및 제8,479,118호, 및 유럽특허출원 제EP2537416호에 개시된 것들 및/또는 문헌 「Sadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398」; 「Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338」; 「Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5): 633-39」; 「Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2): 160-75」에 개시된 것들을 포함한다. 일부 측면에서, 항원 수용체는 미국특허 제7,446,190호에 기재된 바와 같은 CAR 및 국제공개번호 제WO/2014055668 A1호에 기재된 것들을 포함한다. CAR의 예는 전술한 간행물, 예를 들어 국제공개번호 제WO2014031687호, 미국특허 제8,339,645호, 제7,446,179호, 미국특허출원 공개번호 제US2013/0149337호, 미국특허 제7,446,190호, 제8,389,282호, 문헌 「Kochenderfer et al., 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013)」; 「Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701」; 및 「Brentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5(177)」 중 어느 하나에 개시된 CAR을 포함한다. 또한, 국제공개번호 제WO2014/031687호, 미국특허 제8,339,645호, 제7,446,179호, 미국특허출원 공개번호 제US2013/0149337호, 미국특허 제7,446,190, 및 제8,389,282호 참조.

[0682] 일부 구현예에서, CAR은 특정 항원 (또는 마커 또는 리간드)에 대한 특이성을 가지고 구성되는데, 예를 들어 입양 요법에 의하여 표적화되는 특정 세포 유형에서 발현되는 항원, 예를 들어 암 마커 및/또는 완충 반응(dampening response)을 유도하려는 목적의 항원, 예를 들어 정상 세포 또는 비-질환 세포 유형 상에서 발현되는 항원이다. 따라서, CAR은 전형적으로 그의 세포의 부분에 하나 이상의 항원 결합 분자, 예를 들어 하나 이상의 항원-결합 단편, 도메인 또는 일부분, 또는 하나 이상의 항체 가변 도메인 및/또는 항체 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 항체 분자의 항원-결합 부분 또는 부분들을 포함하는데, 예를 들어 모노클로날 항체(mAb)의 가변 중쇄(VH) 및 가변 경쇄(VL)로부터 유래되는 단일-쇄 항원 단편(scFv)이다.

[0683] 일부 구현예에서, 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 항원 수용체와 같은 재조합 수용체의 일부로서 세포 상에서 발현된다. 항원 수용체 중에는 키메라 항원 수용체 (CAR)와 같은 기능성 비-TCR 항원 수용체가 있다. 일반적인

으로, 펩티드-MHC 복합체에 대한 TCR-유사 특이성을 나타내는 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 CAR은 또한 TCR-유사 CAR로 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR-유사 CAR의 MHC-펩티드 복합체에 특이적인 세포외 항원 결합 도메인은 하나 이상의 세포내 신호전달 요소와 연결되는데, 일부 측면에서 링커 및/또는 막관통 도메인(들)을 통해서이다. 일부 구현예에서, 이러한 분자는 전형적으로 TCR과 같은 천연 항원 수용체를 통한 신호, 및 임의로, 공동 자극 수용체와 조합되는 이러한 수용체를 통한 신호를 모방하거나 이와 비슷할 수 있다.

[0684] 일부 구현예에서, 재조합 수용체, 예를 들어 키메라 수용체(예를 들어 CAR)는 항원 (또는 리간드)에 결합, 예를 들어 특이적으로 결합하는 리간드-결합 도메인을 포함한다. 키메라 수용체에 의해 표적화되는 항원들 중에는, 입양 세포 요법을 통해 표적화될 질병, 병태 또는 세포 유형의 관점에서 발견되는 것들이 있다. 질병 및 병태 중에는, 증식성, 신생물성 및 악성 질환 및 장애가 있는데, 예를 들어 암 및 종양, 예를 들어 혈액학적 암, 면역계 암, 예를 들어 림프종, 백혈병 및/또는 골수종, 예를 들어 B, T 및 골수 백혈병, 림프종 및 다발성 골수종이다.

[0685] 일부 구현예에서, 항원 (또는 리간드)은 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 이는 탄수화물 또는 다른 분자이다. 일부 구현예에서, 항원 (또는 리간드)는 정상 또는 비-표적화된 세포 또는 조직과 비교하여 질병 또는 병태의 세포, 예를 들어 종양 또는 병원성 세포에서 선택적으로 발견되거나 과발현된다. 다른 구현예에서, 항원은 정상 세포에서 발견되거나 및/또는 조작된 세포에서 발견된다.

[0686] 일부 구현예에서, CAR은 세포의 표면 상에서 발견되는 항원, 예를 들어 온전한(intact) 항원을 특이적으로 인식하는 항체 또는 항원-결합 단편(예를 들어 scFv)을 함유한다.

[0687] 일부 구현예에서, 항원(또는 리간드)은 종양 항원 또는 암 마커이다. 일부 구현예에서, 항원(또는 리간드)은 $\alpha\text{v}\beta 6$ 인테그린($\alpha\text{v}\beta 6$ 인테그린), B 세포 성숙 항원(BCMA), B7-H3, B7-H6, 탄산 무수화 효소 9(CA9, 또한 CAIX 또는 G250으로도 알려짐), 암-고환 항원, 암/고환 항원 1B(CTAG, NY-ESO-1 및 LAGE-2로도 알려짐), 배암종 항원 (CEA), 사이클린, 사이클린 A2, C-C 모티프 케모카인 리간드 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸 4(CSPG4), 표피 성장 인자 단백질(EGFR), III 형 상피 성장 인자 수용체 돌연변이(EGFR vIII), 상피 당단백 2 (EPG-2), 상피 당단백 40(EPG-40), 에프린B2, 에프린 수용체 A2 (EPHa2), 에스트로겐 수용체, Fc 수용체 유사 5(FCRL5, Fc 수용체 상동체 5 또는 FCRH5로도 알려짐), 태아 아세틸콜린 수용체(태아 AchR), 엽산 결합 단백질 (FBP), 엽산 수용체 알파, 강글리오사이드 GD2, O-아세틸 화 GD2(OGD2), 강글리오사이드 GD3, 당단백질 100(gp100), 글리피칸-3(GPC3), G 단백질-결합 수용체 클래스 그룹 5 멤버 D(GPRC5D), Her2/neu(수용체 티로신 키나아제 erb-B2), Her3(erb-B3), Her4(erb-B4), erbB 이량체, 인간 고분자량-흑색종-관련 항원(HMW-MAA), 헤파티티스 B 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1(HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2(HLA-A2), IL-22 수용체 알파(IL-22R α), IL-13 수용체 알파 2(IL-13R $\alpha 2$), 키나아제 삽입 도메인 수용체(kdr), 카파 경쇄, L1 세포 부착 분자(L1-CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 류신 리치 리피드 함유 8 패밀리 멤버 A(LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종-관련 항원(MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, 메소텔린(MSLN), c-Met, 쥐과 사이토메갈로바이러스(CMV), 뮤신 1(MUC1), MUC16, 자연 킬러 그룹 2 멤버 D(NKG2D) 리간드, 멜란 A(MART-1), 신경 세포 접착 분자(NCAM), 종양 태아성 항원, 흑색종 우선 발현 항원(PRAME), 프로게스테론 수용체, 전립선 특이 항원, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선 특이 막 항원(PSMA), 수용체 티로신 키나아제 유사 희귀 수용체 1(ROR1), 서바이빈(survivin), 영양막 당단백질(TPBG, 5T4로도 알려짐), 종양-관련 당단백질 72(TAG72), 티로시나제 관련된 단백질 1(TRP1, TYRP1 또는 gp75로도 알려짐), 티로시나제 관련된 단백질 2(TRP2, 도파크롬 타우토퍼라제(dopachrome tautomerase), 도파크롬 델타-아이소머라제(dopachrome delta-isomerase) 또는 DCT로도 알려짐), 혈관 내피 장 인자 수용체(VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(VEGFR2), 윌름 종양 1(WT-1), 병원체-특이적 또는 병원체-발현된 항원, 또는 보편적 태그 관련 항원, 및/또는 비오틴화 분자, 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체에 의해 발견되는 분자이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화된 항원은 B 세포 악성종양과 관련된 항원을 포함하는데, 예를 들어 다수의 공지된 B 세포 마커 중 어느 하나이다. 일부 구현예에서, 항원은 CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig카파, Ig람다, CD79a, CD79b 또는 CD30이거나 이를 포함한다.

[0688] 일부 구현예에서, 상기 CAR은 BCMA, 예를 들어 인간 BCMA에 특이적인 항-BCMA CAR이다. 마우스 항-인간 BCMA 항체 및 인간 항-인간 항체를 비롯하여 항-BCMA 항체를 함유하는 키메라 항원 수용체, 상기 키메라 수용체를 발현하는 세포는 종래 개시되었다[문헌 「Carpenter et al., Clin Cancer Res., 2013, 19(8):2048-2060」, 국제 공개공보 제W02016/090320호, 제W02016/090327호, 제W02010/104949A2호 및 제W02017/173256호 참조]. 일부 구현예에서, 상기 항원 또는 항원 결합 도메인은 BCMA이다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 BCMA에 특이적인 항체

또는 항체 단편으로부터 유도된 V_H 및 V_L 이다. 일부 구현예에서, BCMA를 결합하는 상기 항체 또는 항체 단편은 국제공개공보 제WO 2016/090327호 및 제WO 2016/090320호에 제시된 항체 또는 항체 단편으로부터의 V_H 및 V_L 를 함유한다.

[0689] 일부 구현예에서, 상기 항-BCMA CAR은 항원-결합 도메인, 예를 들어 국제공개공보 제WO 2016/090320호 및 제WO 2016/090327호에 기술된 항체로부터 유도된 가변 중쇄(V_H) 및/또는 가변 경쇄(V_L) 영역을 함유하는 scFv를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 항원-결합 도메인, 예를 들어 scFv는 SEQ ID NO: 30에 제시된 V_H 및 SEQ ID NO:31에 제시된 V_L 을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 항원-결합 도메인, 예를 들어 scFv는 SEQ ID NO: 32에 제시된 V_H 및 SEQ ID NO: 33에 제시된 V_L 을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 항원-결합 도메인, 예를 들어 scFv는 SEQ ID NO: 34에 제시된 V_H 및 SEQ ID NO: 35에 제시된 V_L 을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 항원-결합 도메인, 예를 들어 scFv는 SEQ ID NO: 27에 제시된 V_H 및 SEQ ID NO: 28에 제시된 V_L 을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 항원-결합 도메인, 예를 들어 scFv는 SEQ ID NO: 41에 제시된 V_H 및 SEQ ID NO: 42에 제시된 V_L 을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 항원-결합 도메인, 예를 들어 scFv는 SEQ ID NO: 43에 제시된 V_H 및 SEQ ID NO: 44에 제시된 V_L 을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 항원-결합 도메인, 예를 들어 scFv는 SEQ ID NO: 45에 제시된 V_H 및 SEQ ID NO: 46에 제시된 V_L 을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 V_H 또는 V_L 은 전술한 V_H 또는 V_L 서열 중의 임의의 것과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산의 서열을 가지며 BCMA에 대한 결합을 보유했다. 일부 구현예에서, 상기 V_H 영역은 상기 V_L 영역에 대한 아미노-말단이다. 일부 구현예에서, 상기 V_H 영역은 상기 V_L 영역에 대한 카복실-말단이다.

[0690] 일부 구현예에서, 항원 또는 항원 결합 도메인은 CD19이다. 일부 구현예에서, scFv는 CD19에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터 유도된 V_H 및 V_L 을 포함한다. 일부 구현예에서, CD19에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 마우스 유래 항체 예를 들어 FMC63 및 SJ25C1이다. 일부 구현예에서, 항체 또는 항체 단편은 인간 항체, 예를 들어 미국특허출원공개공보 제US 2016/0152723호에 기재된 항체이다.

[0691] 일부 구현예에서, 상기 CAR은 CD19, 예를 들어 인간 CD19에 특이적인 항-CD19 CAR이다. 일부 구현예에서, scFv 및/또는 V_H 도메인은 FMC63으로부터 유래한다. FMC63은 일반적으로 인간 기원의 CD19를 발현하는 Nalm-1 및 -16 세포에 대하여 만들어진 마우스 단일클론 IgG1 항체를 지칭한다[문헌 「Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302」 참조]. 일부 구현예에서, FMC63 항체는 각각, SEQ ID NO: 50 및 51에 제시된 CDR-H1 및 CDR-H2, 및 SEQ ID NO: 52 또는 66에 제시된 CDR-H3 및 SEQ ID NO: 47에 제시된 CDR-L1 및 48 또는 67에 제시된 CDR-L2 및 서열 49 또는 68에 제시된 CDR-L3을 포함한다. 일부 구현예에서, FMC63 항체는 SEQ ID NO: 53의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H) 및 SEQ ID NO: 54의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함한다.

[0692] 일부 구현예에서, 상기 FMC63 항체는 각각 SEQ ID NO: 50 및 51에 제시된 CDR-H1 및 CDR-H2, 및 SEQ ID NO: 52 또는 66에 제시된 CDR-H3 및 SEQ ID NO: 47에 제시된 CDR-L1 및 SEQ ID NO: 49 또는 68에 제시된 CDR-L3을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 FMC63 항체는 SEQ ID NO: 53의 아미노산 서열을 중쇄 가변 영역(V_H) 및 SEQ ID NO: 54의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 가변 중쇄 및 경쇄는 링커에 의해서 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 SEQ ID NO:70에 제시된다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 V_H , 링커 및 V_L 을 순서대로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 V_L , 링커 및 V_H 를 순서대로 포함한다. 일부 구현예에서, svFc는 SEQ ID NO: 69에 기재된 뉴클레오타이드 서열 또는 SEQ ID NO: 69와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 서열에 의해 코딩된다. 일부 구현예에서, scFv는 SEQ ID NO: 55에 기재된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 55와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.

[0693] 일부 구현예에서, scFv는 SJ25C1로부터 유래한다. SJ25C1은 인간 기원의 CD19를 발현하는 Nalm-1 및 -16 세포에 대하여 만들어진 마우스 단일클론 IgG1 항체이다[문헌 「Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*.

302」 참조]. 일부 구현예에서, SJ25C1 항체는 SEQ ID NO: 59-61에 각각 제시되는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3, 및 SEQ ID NO: 56-58에 각각 제시되는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3를 포함한다. 일부 구현예에서, SJ25C1 항체는 SEQ ID NO: 62의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V_H) 및 SEQ ID NO: 63의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V_L)을 포함한다.

[0694] 일부 구현예에서, svFv는 SEQ ID NO: 56의 CDR-L1 서열, SEQ ID NO: 57의 CDR-L2 서열, 및 SEQ ID NO: 58의 CDR-L3 서열을 함유하는 가변 경쇄 및/또는 SEQ ID NO: 59의 CDR-H1 서열, SEQ ID NO: 60의 CDR-H2 서열 및 SEQ ID NO: 61의 CDR-H3 서열을 포함하는 가변 중쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 SEQ ID NO: 62에 제시된 가변 중쇄 영역 및 SEQ ID NO: 63에 제시된 가변 경쇄 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 SEQ ID NO: 64에 기재된다. 일부 구현예에서, scFv는, 순서대로, VH, 링커, 및 VL를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는, 순서대로, VL, 링커, 및 VH를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 SEQ ID NO: 65에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 65와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.

[0695] 일부 구현예에서, 상기 항원은 CD20이다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 CD20에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터 유래된 V_H 및 V_L를 함유한다. 일부 구현예에서, CD20을 결합하는 항체 또는 항체 단편은 리투시맵 (Rituximab)이거나 그로부터 유도된 항체이고, 예를 들어 리투시맵 scFv이다.

[0696] 일부 구현예에서, 상기 항원은 CD22이다. 일부 구현예에서, 상기 scFv는 CD22에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터 유래된 V_H 및 V_L를 함유한다. 일부 구현예에서, CD22를 결합하는 항체 또는 항체 단편은 m971이거나 그로부터 유도된 항체이고, 예를 들어 m971이다.

[0697] 일부 구현예에서, 항원 또는 항원 결합 도메인은 GPRC5D이다. 일부 구현예에서, scFv는 GPRC5D에 특이적인 항체 또는 항체 단편으로부터 유도된 VH 및 VL을 포함한다. 일부 구현예에서, GPRC5D에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 국제공개공보 제W02016/090329호 및 제W02016/090312호에 기재된 항체 또는 항체 단편으로부터의 VH 및 VL이거나, 또는 이를 포함한다.

[0698] 일부 구현예에서, 상기 항체는, 2개의 항체 도메인 또는 영역, 예를 들어 중쇄 가변 (V_H) 영역 및 경쇄 가변 (V_L) 영역을 조인시키는 하나 이상의 링커를 포함하는, 항원-결합 단편, 예를 들어 scFv이다. 상기 링커는 전형적으로는 펩티드 링커, 예를 들어 가요성 및/또는 가용성 펩티드 링커이다. 상기 링커 중에는 글리신 및 세린이 풍부한 및/또는 일부 경우에는 트레오닌(threonine)이 풍부한 것들이 있다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 추가로 하전된 잔기 예를 들어 리신 및/또는 글루타메이트를 포함하고, 이것은 가용성을 개선시킬 수 있다. 상기 링커는 추가로 하나 이상의 프롤린을 포함한다. 일부 구현예에서, 글리신 및 세린 및/또는 트레오닌이 풍부한 상기 링커는 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 그러한 아미노산을 포함한다. 일부 구현예에서, 그들은 적어도 (약) 50%, 55%, 60%, 70%, 또는 75%의 글리신 및 세린 및/또는 트레오닌을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 실질적으로 전체적으로 글리신 및 세린 및/또는 트레오닌으로 구성된다. 상기 링커는 일반적으로는 약 5 내지 50개의 아미노산 길이, 전형적으로는 (약) 10 내지 50개의 아미노산 길이, 예를 들어 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개, 일부 구현예에서는 10 내지 25개의 아미노산 길이를 갖는다. 예시적인 링커는 서열 GGGGS(4GS; SEQ ID NO: 36) 또는 GGG(3GS; SEQ ID NO: 37)의 다양한 수의 반복, 예를 들어 상기 서열의 2, 3, 4, 및 5회 반복을 갖는 링커를 포함한다. 예시적인 링커는 SEQ ID NO: 38(GGGSGGGSGGGGS), SEQ ID NO: 39(GSTSGSGKPGSGEGSTKG) 또는 SEQ ID NO: 40(SRGGGGSGGGSGGGGSLEMA)에 제시된 서열을 갖거나 그것으로 구성된 것들을 포함한다.

[0699] 일부 구현예에서, 항원은 병원체-특이적이거나 또는 병원체-발현된 항원이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원은 바이러스 항원(예를 들어 HIV, HCV, HBV, 등으로부터의 바이러스 항원), 박테리아 항원, 및/또는 기생충 항원이다. 일부 구현예에서, CAR은 TCR-유사 항체를 함유하는데, 예를 들어 MHC-펩티드 복합체로서 세포 표면에 제시되는 종양-관련 항원과 같은 세포내 항원을 특이적으로 인식하는 항체 또는 항원-결합 단편(예를 들어 scFv)이다. 일부 구현예에서, MHC-펩티드 복합체를 인식하는 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 항원 수용체와 같은 재조합 수용체의 일부로서 세포 상에서 발현될 수 있다. 항원 수용체 중에는, 키메라 항원 수용체(CAR)와 같은 기능성 비-TCR 항원 수용체가 있다. 일반적으로, 펩티드-MHC 복합체에 대한 TCR-유사 특이

성을 나타내는 항체 또는 항원-결합 단편을 함유하는 CAR은 또한 TCR-유사 CAR로 지칭될 수 있다.

[0700] "주조직 적합성 복합체(major histocompatibility complex)"(MHC)에 대한 언급은, 일부 경우에 폴리펩티드의 펩티드 항원, 예를 들어 세포의 기계적 장치에 의하여 가공되는 펩티드 항원과 복합체화할 수 있는 다형성 펩티드 결합 위치 또는 결합 홈을 함유하는 단백질, 일반적으로 당단백질을 말한다. 일부 경우, MHC 분자는 T 세포 상의 항원 수용체, 예를 들어 TCR 또는 TCR-유사 항체에 의하여 인식 가능한 형태로 항원을 제시하기 위해, 예를 들어 펩티드와의 복합체로서, 즉 MHC-펩티드 복합체로서 세포 표면에 표시되거나 발현될 수 있다. 일반적으로, MHC 클래스 I 분자는 일부 경우 3 개의 α 도메인을 갖는 막에 존재하는 알파쇄 및 비-공유적으로 결합되는 $\beta 2$ 마이크로글로불린을 갖는 이종이량체이다. 일반적으로, MHC 클래스 II 분자는 통상 양자 모두 막에 존재하는 2 개의 막관통 당단백질인 α 및 β 로 구성된다. MHC 분자는 항원 결합 위치 또는 펩티드를 결합하기 위한 위치 및 적절한 항원 수용체에 의한 인식에 필요한 서열을 함유하는 MHC의 유효 부분을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, MHC 클래스 I 분자는 세포질에서 기원하는 펩티드를, MHC-펩티드 복합체가 T 세포에 의하여 인식되는, 예를 들어 일반적으로 CD8+ T 세포에 의하여, 그러나 어떤 경우 CD4+ T 세포에 의해 인식되는 세포 표면으로 전달한다. 일부 구현예에서, MHC 클래스 II 분자는 소포 시스템에서 기원하는 펩티드를, 이들이 통상 CD4+ T 세포에 의해 인식되는 세포 표면으로 전달한다. 일반적으로, MHC 분자는 마우스에서 H-2으로 그리고 인간에서는 인간 백혈구 항원(HLA)으로 총칭되는, 연결된 좌위 그룹에 의해 암호화된다. 따라서, 통상 인간 MHC는 또한 인간 백혈구 항원(HLA)으로 지칭될 수 있다.

[0701] 용어 "MHC-펩티드 복합체" 또는 "펩티드-MHC 복합체" 또는 이들의 변형은 예를 들어 일반적으로 MHC 분자의 결합 홈 또는 틈에서 펩티드의 비-공유 상호 작용에 의한, 펩티드 항원과 MHC 분자의 복합체 또는 결합을 말한다. 일부 구현예에서, MHC-펩티드 복합체는 세포 표면에 존재하거나 표시된다. 일부 구현예에서, MHC-펩티드 복합체는 항원 수용체, 예를 들어 TCR, TCR-유사 CAR 또는 이의 항원-결합 부분에 의해 특이적으로 인식될 수 있다.

[0702] 일부 구현예에서, 폴리펩티드의 펩티드, 예를 들어 펩티드 항원 또는 에피토프는, 예를 들어 항원 수용체에 의한 인식을 위하여, MHC 분자와 결합할 수 있다. 일반적으로, 펩티드는 폴리펩티드 또는 단백질과 같은 보다 긴 생물학적 분자의 단편으로부터 유래되거나 이에 기초한다. 일부 구현예에서, 펩티드는 전형적으로 약 8 내지 약 24 개의 길이이다. 일부 구현예에서, 펩티드는 MHC 클래스 II 복합체에서의 인식을 위해 9 내지 22 개의 아미노산 또는 약 그 정도의 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, 펩티드는 MHC 클래스 I 복합체에서의 인식을 위해 8 내지 13 개의 아미노산 또는 약 그 정도의 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, MHC-펩티드 복합체와 같은 MHC 분자의 관점에서 펩티드의 인식에 따라, TCR 또는 TCR-유사 CAR과 같은 항원 수용체는 T 세포 반응, 예를 들어 T 세포 증식, 사이토카인 생산, 세포독성 T 세포 반응 또는 다른 반응을 유도하는 T 세포에 대한 활성화 신호를 생성 또는 촉발한다.

[0703] 일부 구현예에서, TCR-유사 항체 또는 항원-결합 부분은 공지되어 있거나 공지된 방법에 의해 제조될 수 있다 [예를 들어 미국특허출원 공개공보 제US2002/0150914호; 제US2003/0223994호; 제US2004/0191260호; 제US2006/0034850호; 제US2007/00992530호; 제US2009/0226474호; 제US2009/0304679호; 및 국제공개공보 제WO03/068201호 참조].

[0704] 일부 구현예에서, MHC-펩티드 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 특정 MHC-펩티드 복합체를 함유하는 유효량의 면역원으로 숙주를 면역화함으로써 제조될 수 있다. 일부 경우, MHC-펩티드 복합체의 펩티드는 MHC에 결합할 수 있는 항원의 에피토프, 예를 들어 종양 항원, 예를 들어 범용 종양 항원, 골수 종 항원 또는 하기에 기술되는 다른 항원의 에피토프이다. 일부 구현예에서, 면역 반응을 이끌어 내기 위해 그 후 유효량의 면역원을 숙주에게 투여하는데, 여기서 면역원은 MHC 분자의 결합 홈에서 펩티드의 3-차원적 제시에 대한 면역 반응을 이끌어 내기에 충분한 시간동안 그들의 3-차원적 형태를 보유한다. 그 후, 숙주로부터 수집된 혈청을 분석하여 MHC 분자의 결합 홈에서 상기 펩티드의 3-차원적 제시를 인식하는 원하는 항체가 생성되는지를 결정한다. 일부 구현예에서, 생성된 항체는 그 항체가 MHC 분자 단독, 관심 대상 펩티드 단독 및 무관한 펩티드와 MHC와의 복합체로부터 대상 MHC-펩티드 복합체를 구별할 수 있음을 확인하기 위해 평가될 수 있다. 그 후, 원하는 항체는 분리될 수 있다.

[0705] 일부 구현예에서, MHC-펩티드 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원-결합 부분은 파지 항체 라이브러리와 같은 항체 라이브러리 디스플레이 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 돌연변이 Fab, scFv 또는 다른 항체 형태의 파지 디스플레이 라이브러리가 생성될 수 있으며, 여기서, 예를 들어 라이브러리 구성원은 CDR 또는 CDR들의 하나 이상의 잔기에서 돌연변이된다. 예를 들어 미국 공개 출원 US20020150914,

US2014/0294841; 및 [Cohen CJ et al. (2003) J Mol Recogn. 16:324-332] 참조.

[0706] 본 발명에서 용어 "항체"는 가장 넓은 의미로 사용되며, 폴리클로날 및 모노클로날 항체를 포함하고, 예를 들어 온전한 항체 및 기능적 (항원-결합) 항체 단편, 예를 들어 항원 결합 단편(Fab), F(ab')₂ Fab' 단편, Fv 단편, 재조합 IgG(rIgG) 단편, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 가변 중쇄(VH) 영역, 단일쇄 항체 단편, 예를 들어 단일쇄 가변 단편(scFv) 및 단일 도메인 항체(예를 들어 sdAb, sdFv, 나노바디) 단편이다. 상기 용어는 유전적으로 조작된 및/또는 달린 변형된 형태의 면역글로불린들, 예를 들어 인트라바디, 펩티바디, 키메라 항체, 완전 인간 항체, 인간화 항체, 및 헤테로 컨주게이트 항체, 다중 특이적, 예를 들어 이중 특이적 항체, 디아바디, 트리아바디 및 테트라바디, 탠덤 디-scFv, 탠덤 트리-scFv이다. 달리 언급하지 않는 한, 용어 "항체"는 그의 기능적 항체 단편을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 상기 용어는 또한 온전한 또는 전장 항체를 포함하는데, 예를 들어 IgG 및 그 서브 클래스, IgM, IgE, IgA 및 IgD를 포함하는 임의의 부류 또는 하위-부류의 항체이다.

[0707] "초가변 영역(hypervariable region)" 또는 "HVR"과 동의어인 용어 "상보성 결정 영역(complementarity determining region)" 및 "CDR"은 항원 특이성 및/또는 결합 친화도를 부여하는 항체 가변 영역 내의 비인접한 아미노산 서열을 지칭하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 각각의 중쇄 가변 영역에 3개의 CDR(CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) 및 각각의 경쇄 가변 영역에 3개의 CDR(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3)이 존재한다. "프레임워크 영역(framework region)" 및 "FR"은 중쇄 및 경쇄의 가변 영역의 CDR이 아닌 부분을 지칭하는 것으로 당업계에 공지되어 있다. 일반적으로, 각각의 전장 중쇄 가변 영역에 4 개의 FR(FR-H1, FR-H2, FR-H3 및 FRH4) 및 각각의 전장 경쇄 가변 영역에 4 개의 FR(FR-L1, FR-L2, FR-L3 및 FR-L4)이 존재한다.

[0708] 주어진 CDR 또는 FR의 정확한 아미노산 서열 경계는, 문헌 「Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD ("Kabat" 넘버링 체계); 「Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 ("Chothia" 넘버링 체계); 「MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732-745." ("Contact" 넘버링 체계); 「Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 ("IMGT" 넘버링 체계); 「Honegger A and Pluckthun A, "Yet another 넘버링 체계 for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70, ("Aho" 넘버링 체계); 및 「Martin et al., "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm," PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, ("AbM" 넘버링 체계)」를 비롯한 하기 다수의 잘 알려진 임의의 체계를 이용하여 쉽게 결정될 수 있다.

[0709] 주어진 CDR 또는 FR의 경계는 확인을 위해 사용되는 체계에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어 상기 Kabat 체계는 구조적 정렬을 기반으로 하는 반면, 상기 Chothia 체계는 구조적 정보를 기반으로 한다. Kabat 및 Chothia 체계 모두에 대한 넘버링은 삽입 문자, 예를 들어 "30a"로 설명되는 삽입 및 일부 항체에서 나타나는 결실을 갖는, 가장 일반적인 항체 영역 서열 길이를 기반으로 한다. 상기 2 개의 체계는 특정 삽입 및 결실("indel")을 상이한 위치에 배치하여, 차별적인 넘버링을 생성한다. 상기 Contact 체계는 복합체 결정 구조 분석을 기반으로 하고 Chothia 넘버링 체계와 여러 측면에서 유사하다. 상기 AbM 체계는 옥스퍼드 분자의 AbM 항체 모델링 소프트웨어에 의해 사용된 것을 기반으로 한 Kabat과 Chothia 정의 사이의 절충이다.

[0710] 하기 표 1은 Kabat, Chothia, AbM 및 Contact 체계 각각에 의해 확인된 바와 같은 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3 및 CDRH1, CDR-H2, CDR-H3의 예시적인 위치 경계를 열거한다. CDR-H1에서, Kabat 및 Chothia 넘버링 체계 모두를 이용하여 잔기 번호가 나열된다. FR들은 CDR들 사이에 배치되는데, 예를 들어 FR-L1은 CDR-L1 앞에 배치되고, FR-L2은 CDR-L1과 CDR-L2 사이에 배치되며, FR-L3은 CDR-L2과 CDR-L3 사이에 배치되는 식이다. 도시된 Kabat 넘버링 체계는 삽입을 H35A 및 H35B에 배치하기 때문에, Chothia CDR-H1 루프의 말단이 도시된 Kabat 넘버링 관례를 이용할 경우 루프의 길이에 따라 H32와 H34 사이에서 변하는 점이 주목된다.

표 1

다양한 넘버링 체계에 따른 CDR의 경계

[0711]

CDR	Kabat	Chothia	AbM	Contact
CDR-L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
CDR-L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
CDR-L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96

CDR-H1 (Kabat 넘버링 ¹)	H31--H35B	H26--H32.34	H26--H35B	H30--H35B
CDR-H1 (Chothia 넘버링 ²)	H31--H35	H26--H32	H26--H35	H30--H35
CDR-H2	H50--H65	H52--H56	H50--H58	H47--H58
CDR-H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

[0712] 1 - 문헌 「Kabat *et al.* (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD」

[0713] 2 - 문헌 「Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948」

[0714] 따라서, 달리 특정되지 않는 한, 주어진 항체 또는 이의 영역, 예를 들어 이의 가변 영역의 "CDR" 또는 "상보적 결정 영역" 또는 개별적인 특정 CDR(예를 들어 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3)은 상기 언급된 임의의 체계, 또는 기타 공지의 체계로 정의된 바와 같이 (또는 특정) 상보적 결정 영역을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어 특정 CDR(예를 들어 CDR-H3)이 주어진 VH 또는 VL 아미노산 서열에 있는 대응 CDR의 아미노산 서열을 함유한다고 할 경우, 상기 CDR은 상기 언급된 임의의 체계, 또는 기타 공지의 체계로 정의된 바와 같이, 가변 영역 내의 대응 CDR(예를 들어 CDR-H3) 서열을 갖는 것으로 이해된다. 일부 구현예에서, 특정 CDR 서열이 특정된다. 항체의 예시적인 CDR 서열은 다양한 넘버링 체계를 이용하여 기술되지만, 그것은 항체가 다른 상기 넘버링 체계 또는 당업자에게 공지된 다른 넘버링 체계 중의 어느 하나에 따라 기술된 CDR을 포함할 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0715] 유사하게, 달리 특정되지 않는 한, 주어진 항체 또는 이의 영역, 예를 들어 이의 가변 영역의 FR 또는 개별적인 특정 FR(들)(예를 들어 FR-H1, FR-H2, FR-H3, FR-H4)은 공지된 임의의 체계에 의해 정의된 바와 같이 (또는 특정) 프레임워크 영역을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 경우에, Kabat, Chothia, AbM 또는 Contact 방법, 또는 기타 공지의 체계에 의해 정의된 바와 같이 CDR 예를 들어 특정 CDR, FR 또는 FR들 또는 CDR들의 확인을 위한 체계가 특정된다. 다른 경우에, CDR 또는 FR의 특정 아미노산 서열이 제공된다.

[0716] 일부 구현예에 있어서, 항원-결합 단백질, 항체 및 그의 항원 결합 단편은 전장 항체의 항원을 특이적으로 인식한다. 일부 구현예에 있어서, 항체의 중쇄 및 경쇄는 전장일 수 있거나 항원-결합 부분(Fab, F(ab')₂, Fv 또는 단일쇄 Fv 단편(scFv))일 수 있다. 다른 구현예에 있어서, 항체 중쇄 불변 영역은 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE로부터 선택되고, 특히 예를 들어 IgG1, IgG2, IgG3, 및 IgG4로부터 선택되며, 더욱 특히 IgG1(예를 들어 인간 IgG1)이다. 또 다른 구현예에 있어서, 항체 경쇄 불변 영역은 예를 들어 카파 또는 람다로부터 선택되고, 특히 카파이다.

[0717] 상기 항체 중에는 항체 단편이 있다. "항체 단편"은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부분을 포함하는 온전한 항체 이외의 분자를 말한다. 항체 단편의 예는 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 디아바디; 선형 항체; 가변 중쇄(V_H) 영역, 단일-쇄 항체 분자, 예를 들어 scFv 및 단일 도메인 V_H 단일 항체; 및 항체 단편으로부터 형성되는 다중 특이적 항체를 포함한다. 특정 구현예에 있어서, 항체는 가변 중쇄 영역 및/또는 가변 경쇄 영역, 예를 들어 scFv를 포함하는 단일-쇄 항체 단편이다.

[0718] 용어 "가변 영역" 또는 "가변 도메인"은 항체와 항원의 결합에 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 말한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄의 가변 도메인(각각 V_H 및 V_L)은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각 도메인은 4 개의 보존된 구조 영역(FR) 및 3 개의 CDR을 포함한다[예를 들어 문헌 「Kindt *et al.* Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007)」 참조]. 단일 V_H 또는 V_L 도메인은 항원-결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정 항원에 결합하는 항체는, 각각 상보적 V_L 또는 V_H 도메인의 라이브러리를 스크리닝하기 위해 항원에 결합하는 항체로부터의 V_H 또는 V_L 도메인을 사용하여 단리될 수 있다[예를 들어 문헌 「Portolano *et al.*, J. Immunol. 150:880-887 (1993)」; 「Clarkson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991)」 참조].

[0719] 단일-도메인 항체는 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부분 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부분을 포함하는 항체 단편이다. 특정 구현예에 있어서, 단일-도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다. 일부 구현예에 있어서, CAR은 항원에, 예를 들어 종양 세포 또는 암세포와 같은 표적화되는 질병의 세포의 암 마커 또는

표면 항원, 예를 들어 본 발명에서 기술되거나 공지된 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체 중쇄 도메인을 포함한다.

- [0720] 항체 단편은 다양한 기술에 의해 제조될 수 있으며, 예를 들어 온전한 항체의 단백질 분해성 소화 및 재조합 숙주 세포에 의한 생산이 포함되지만 이에 한정되는 것은 아니다. 일부 구현예에 있어서, 항체는 재조합적으로-생산된 단편인데, 예를 들어 자연적으로 존재하지 않는 배열을 포함하는 단편, 예를 들어 펩티드 링커와 같은 합성 링커에 의해 결합되는 2 개 이상의 항체 영역 또는 사슬을 갖는 것들, 및/또는 자연적으로-존재하는 온전한 항체의 효소 소화에 의해 생성될 수 없는 것들이다. 일부 구현예에 있어서, 상기 항체 단편은 scFv이다.
- [0721] "인간화된" 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 아미노산 잔기가 비-인간 CDR로부터 유래된 것이며, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 아미노산 잔기가 인간 FR로부터 유래된 항체이다. 인간화 항체는 임의로 인간 항체로부터 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부분을 포함할 수 있다. 비-인간 항체의 "인간화된 형태"는 모태 비-인간 항체의 특이성 및 친화성을 유지하면서 통상 인간에 대한 면역원성을 감소시키기 위해 인간화를 거친 비-인간 항체의 변이체를 말한다. 일부 구현예에 있어서, 인간화 항체의 일부 FR 잔기는 예를 들어 항체 특이성 또는 친화성을 회복 또는 개선시키기 위하여 비-인간 항체(예를 들어 그로부터 CDR 잔기가 유도된 항체)로부터의 상응하는 잔기로 치환된다.
- [0722] 따라서, 일부 구현예에 있어서, TCR-유사 CAR을 포함하는 키메라 항원 수용체는 항체 또는 항체 단편을 함유하는 세포의 부분을 포함한다. 일부 구현예에 있어서, 상기 항체 또는 단편은 scFv를 포함한다. 일부 측면에서, 키메라 항원 수용체는 항체 또는 단편 및 세포내 신호전달 영역을 함유하는 세포의 부분을 포함한다. 일부 구현예에 있어서, 세포내 신호전달 영역은 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에 있어서, 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 도메인인, T 세포에서 1차 활성화 신호를 유도할 수 있는 신호전달 도메인, T 세포 수용체(TCR) 요소의 신호전달 도메인 및/또는 면역 수용체 티로신-기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 신호전달 도메인이거나 이를 포함한다.
- [0723] 일부 구현예에서, 상기 재조합 수용체 예를 들어 상기 CAR, 예를 들어 그의 항체 부분은 힌지 영역, 예를 들어 IgG4 힌지 영역 및/또는 C_{H1}/C_L 및/또는 Fc 영역과 같은 면역글로불린 불변 영역 또는 이의 변이체 또는 변형된 버전의 적어도 일부이거나 또는 이를 포함할 수 있는 스페이서를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체는 스페이서 및/또는 힌지 영역을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 불변 영역 또는 부분은 IgG4 또는 IgG1과 같은 인간 IgG이다. 일부 측면에서, 불변 영역의 일부는 항원-인식 성분, 예를 들어 scFv와 막관통 도메인 사이의 스페이서 영역으로서 작용한다. 상기 스페이서는 스페이서의 부재하에서와 비교하여 비교하여 항원 결합 후 세포의 반응성을 증가시키는 길이를 가질 수 있다.
- [0724] 일부 구현예에서, 스페이서는 길이가 12개의 아미노산 또는 약 12개의 아미노산이거나 또는 길이가 12개 이하의 아미노산이다. 예시적인 스페이서는 적어도 약 10 내지 229개의 아미노산, 약 10 내지 200개의 아미노산, 약 10 내지 175개의 아미노산, 약 10 내지 150개의 아미노산, 약 10 내지 125개의 아미노산, 약 10 내지 100개의 아미노산, 약 10 내지 75개의 아미노산, 약 10 내지 50개의 아미노산, 약 10 내지 40개의 아미노산, 약 10 내지 30개의 아미노산, 약 10 내지 20개의 아미노산 또는 약 10 내지 15개의 아미노산을 갖는 것들을 포함하고, 상기 열거된 범위 중 어느 하나의 끝점 사이의 임의의 정수를 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서 영역은 약 12개의 아미노산 또는 그 미만, 약 119개 아미노산 또는 그 미만, 또는 약 229개의 아미노산 또는 그 미만을 갖는다. 예시적인 스페이서는 IgG4 힌지 단독, C_{H2} 및 C_{H3} 도메인에 연결된 IgG4 힌지, 또는 C_{H3} 도메인에 연결된 IgG4 힌지를 포함한다. 예시적인 스페이서는 제한되지는 않지만 문헌 「Hudecek *et al.* (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153」, 「Hudecek *et al.* (2015) *Cancer Immunol Res.* 3(2): 125-135」 또는 국제공개공보 제W02014/031687호, 미국특허 제8,822,647호 또는 미국특허출원공개공보 제US2014/0271635호에 기술된 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서는 면역글로불린 경첩 영역, C_{H2} 및 C_{H3} 영역의 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 경첩, C_{H2} 및 C_{H3}의 하나 이상은 전체적으로 또는 부분적으로 IgG4 또는 IgG2로부터 유도된다. 일부 경우에, 상기 경첩, C_{H2} 및 C_{H3}은 IgG4로부터 유도된다. 일부 측면에서, 상기 경첩, C_{H2} 및 C_{H3}의 하나 이상은 키메라이고, IgG4 and IgG2로부터 유도된 서열을 함유한다. 일부 양상에서, 스페이서는 IgG4/2 키메라 경첩, IgG2/4 C_{H2}, 및 IgG4 C_{H3} 영역을 함유한다.
- [0725] 일부 구현예에서, 스페이서는 IgG4 및/또는 IgG2로부터 전부 또는 일부가 유래될 수 있고 하나 이상의 도메인에서 하나 이상의 단일 아미노산 돌연변이와 같은, 돌연변이를 함유할 수 있다. 일부 실시예에서, 아미노산 변형은 IgG4의 힌지 영역 중 세린(S)을 프롤린(P)으로 치환하는 것이다. 일부 구현예에서, 아미노산 변형은 전장

IgG4 Fc 서열의 C_H2 영역 중 위치 177에서의 N177Q 돌연변이 또는 전장 IgG4 Fc 서열의 C_H2 영역 중 위치 176에서의 N176Q와 같이, 글리코실화 이질성(glycosylation heterogeneity)을 감소시키기 위해 아스파라긴(N)을 글루탐산(Q)으로 치환하는 것이다.

[0726] 일부 구현예에서, 스페이서는 서열 ESKYGPPCPPCP(SEQ ID NO: 1에 기재)를 갖고, SEQ ID NO: 2에 기재된 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, 스페이서는 SEQ ID NO: 3에 기재된 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 스페이서는 SEQ ID NO: 4에 제시된 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 암호화된 스페이서는 SEQ ID NO: 29에 제시된 서열이거나 또는 그 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 불변 영역 또는 일부분은 IgD의 것이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 SEQ ID NO: 5에 기재된 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 스페이서는 SEQ ID NO: 1, 3, 4 또는 29 중 어느 하나와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상 또는 약 그 이상의 서열 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는다.

[0727] 일부 구현예에서, 불변 영역 또는 일부는 IgD의 것이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 SEQ ID 번호: 5에 제시된 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 스페이서는 SEQ ID 번호: 1, 3, 4 및 5 중 어느 하나와 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는다.

[0728] 항원 인식 도메인은 하나 이상의 세포내 신호전달 요소와 연결되는데, CAR의 경우에, 예를 들어 TCR 복합체와 같은 항원 수용체 복합체를 통하여 활성화를 모방하고 및/또는 다른 세포 표면 수용체를 통하여 신호를 전달하는 신호전달 요소이다. 따라서, 일부 구현예에서, 항원-결합 성분 (예를 들어 항체)은 하나 이상의 막관통 및 세포내 신호전달 도메인 또는 영역에 연결된다. 일부 구현예에 있어서, 막관통 도메인은 세포의 도메인에 융합된다. 일 구현예에 있어서, 수용체, 예를 들어 CAR의 도메인들 중 하나와 자연적으로 결합된 막관통 도메인이 사용된다. 일부 경우에, 막관통 도메인은 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호 작용을 최소화하기 위해, 동일한 또는 상이한 표면 막 단백질의 막관통 도메인에 이러한 도메인이 결합하는 것을 회피하도록 선택되거나, 아미노산 치환에 의하여 변형된다.

[0729] 일부 구현예에서 막관통 도메인은 천연원 또는 합성원으로부터 유도된다. 상기 유도원이 천연인 경우, 일부 측면에 있어서 상기 도메인은 임의의 막-결합 또는 막관통 단백질로부터 유도된다. 막관통 영역은 T 세포 수용체, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154의 알파, 베타 또는 제타 사슬로부터 유래된 것들을 포함하거나(즉, 적어도 그의 막관통 영역을 포함), 또는 일부 구현예에서 막관통 도메인은 합성인 것이다. 일부 측면에서, 합성 막관통 도메인은 주로 류신 및 발린과 같은 소수성 잔기를 포함한다. 일부 측면에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중체가 합성 막관통 도메인의 각 말단에서 발견될 것이다. 일부 구현예에 있어서, 결합은 링커, 스페이서 및/또는 막관통 도메인(들)에 의한다.

[0730] 세포내 신호전달 영역 중에는 천연 항원 수용체를 통한 신호, 공동 자극 수용체와 조합된 상기 수용체를 통한 신호 및/또는 공동 자극 수용체 단독을 통한 신호를 모방하거나 근사하는 것들이 있다. 일부 구현예에서, 일부 구현예에 있어서, 짧은 올리고-또는 폴리펩티드 링커, 예를 들어 길이가 2 내지 10 개 사이의 아미노산인 링커, 예를 들어 글리신 및 세린을 함유하는 것, 예를 들어 글리신-세린 이중체를 함유하는 링커가 존재하며, 막관통 도메인과 CAR의 세포질 신호전달 도메인과의 연결을 형성한다.

[0731] 수용체, 예를 들어 CAR은 일반적으로 적어도 하나의 세포내 신호전달 요소 또는 요소들을 포함한다. 일부 구현예에 있어서, 수용체는 T-세포 활성화 및 세포 독성을 매개하는 TCR CD3 사슬과 같은 TCR 복합체의 세포내 요소, 예를 들어 CD3 제타 사슬을 포함한다. 따라서, 일부 측면에서, ROR1-결합 항체는 하나 이상의 세포 신호 전달 모듈에 연결된다. 일부 구현예에 있어서, 세포 신호전달 모듈은 CD3 막관통 도메인, CD3 세포내 신호전달 도메인 및/또는 다른 CD 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에 있어서, 수용체, 예를 들어 CAR은 Fc 수용체 γ , CD8, CD4, CD25 또는 CD16과 같은 하나 이상의 추가 분자의 일부분을 더 포함한다. 예를 들어 일부 측면에서, CAR은 CD3-제타 (CD3- ζ) 또는 Fc 수용체 γ 와, CD8, CD4, CD25 또는 CD16 사이의 키메라 분자를 포함한다.

[0732] 일부 구현예에서, CAR의 연결(ligation)에 따라, CAR의 세포질 도메인 또는 세포내 신호전달 영역은 면역 세포, 예를 들어 CAR를 발현하도록 조작된 T 세포의 정상적인 이펙터 기능 또는 반응 중 적어도 하나를 활성화시킨다. 예를 들어 일부 관점에서는, CAR은 T 세포의 기능, 예를 들어 세포 용해 활성 또는 T-헬퍼 활성, 예를 들어 사이토카인 또는 다른 인자의 분비를 유도한다. 일부 구현예에 있어서, 항원 수용체 성분 또는 공동 자극 분자의 세포내 신호전달 영역의 절단된 부분 또는 영역은 온전한 면역자극 쇄를 대신하여 사용되는데, 예를 들어 그것

이 이펙터 기능 신호를 전달하는 경우에 그러하다. 일부 구현예에 있어서, 세포내 신호전달 영역, 세포내 도메인 또는 도메인들을 함유하는 영역은 T 세포 수용체(TCR)의 세포질 서열을 포함하고, 일부 측면에서는 천연의 상황에서 항원 수용체 결합 다음에 그러한 수용체와 협력하여 작용하고 신호전달을 개시하는 공-수용체의 서열을 포함하며, 및/또는 이러한 분자의 임의의 유도체 또는 변이체 및/또는 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열을 포함한다.

- [0733] 천연 TCR의 관점에서, 완전한 활성화는 일반적으로 TCR을 통한 신호전달뿐만 아니라 공동 자극 신호를 요구한다. 따라서, 일부 구현예에 있어서, 완전한 활성화를 촉진시키기 위해, 2차 또는 공-자극 신호를 발생시키는 위한 요소가 또한 CAR에 포함된다. 다른 구현예에 있어서, CAR은 공동 자극 신호를 생성하기 위한 요소를 포함하지 않는다. 일부 측면에서, 추가적인 CAR은 동일한 세포에서 발견되며, 2차 또는 공동 자극 신호를 생성하기 위한 요소를 제공한다.
- [0734] 일부 측면에서, T 세포 활성화는 2 부류의 세포질 신호전달 서열에 의하여 매개되는 것으로 기술된다: TCR을 통해 항원-의존성 1차 활성화를 개시하는 것들 (1차 세포질 신호전달 서열), 및 항원-비의존성 방식으로 작용하여 2차 또는 공-자극 신호를 제공하는 것들 (2차 세포질 신호전달 서열) 일부 측면에서, CAR은 그러한 신호전달 요소들 중 하나 또는 양자 모두를 포함한다.
- [0735] 일부 측면에서, CAR은 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절하는 1차 세포질 신호전달 서열을 포함한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호전달 서열은 면역 수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 알려진 신호전달 모티프를 함유할 수 있다. 1차 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예는 TCR 제타, FcR 감마 또는 FcR 베타로부터 유래된 것들을 포함한다. 일부 구현예에 있어서, CAR의 세포질 신호전달 분자(들)은 세포질 신호전달 도메인 또는 영역, 그들의 일부분, 또는 CD3 제타로부터 유래되는 서열을 함유한다.
- [0736] 일부 구현예에서, CAR은 공동 자극 수용체의 신호전달 영역 및/또는 막관통 일부분, 예를 들어 CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 및 ICOS를 포함한다. 일부 측면에서, 동일한 CAR은 신호전달 및 공동 자극 요소 양자 모두를 포함한다.
- [0737] 일부 구현예에서, 신호전달 영역은 하나의 CAR 내에 포함되는 반면, 공동 자극 요소는 또 다른 항원을 인식하는 다른 CAR에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, CAR은, 양자가 동일한 세포 상에서 발견되는, 활성화 또는 자극 CAR, 공동 자극 CAR을 포함한다[국제공개공보 제W02014/055668호 참조].
- [0738] 특정 구현예에서, 세포내 신호전달 영역은 CD3(예를 들어 CD3-제타) 세포내 도메인에 연결되는 CD28 막관통 및 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포내 신호전달 영역은 CD3 제타 세포내 도메인에 연결되는, 키메라 CD28 및 CD137(4-1BB, TNFRSF9) 공동-자극 도메인을 포함한다.
- [0739] 일부 구현예에서, CAR은, 세포질 부분에서, 하나 이상의, 예를 들어 2 이상의 공동 자극 도메인 및 활성화 도메인, 예를 들어 1차 활성화 도메인을 포함한다. 예시적인 CAR은 CD3-제타, CD28 및 4-1BB의 세포내 요소를 포함한다.
- [0740] 일부 경우, CAR은 제 1, 제 2 및/또는 제3 세대 CAR로 지칭된다. 일부 측면에서, 제 1 세대 CAR은 항원 결합시 CD3-쇄 유도 신호를 단독으로 제공하는 것이고; 일부 측면에서, 제 2-세대 CAR은 그러한 신호 및 공동 자극 신호를 제공하는 것으로서, 예를 들어 CD28 또는 CD137과 같은 하나의 공동 자극 수용체로부터의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 것이고; 일부 측면에서, 제3 세대 CAR은 일부 측면에서 상이한 공동 자극 수용체들의 복수의 공동 자극 도메인을 포함하는 것이다.
- [0741] 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 본원에서 기술된 항체 또는 단편을 함유하는 세포외 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 본원에서 기술된 항체 또는 단편을 함유하는 세포외 부분 및 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 단편은 scFv 또는 단일-도메인 VH 항체를 포함하고 세포내 도메인은 ITAM을 함유한다. 일부 측면에서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3-제타(CD3 ζ) 쇄의 제타 쇄의 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에 있어서, 키메라 항원 수용체는 세포 도메인과 세포내 신호전달 영역 사이에 배치된 막관통 도메인을 포함한다.
- [0742] 일부 측면에서, 막관통 도메인은 CD28의 막관통 부분을 포함한다. 세포외 도메인과 막관통 도메인은 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포외 도메인과 막관통은 스페이서, 본 발명에 설명된 스페이서에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 T 세포 공동 자극 분자의 세포내 도메인을 막관통 도메인과 세포내 신호전달 도메인 사이에 함유한다. 일부 측면에서, T 세포 공동 자극 분자는 CD28 또는

41BB이다.

[0743] 일부 구현예에서, CAR은 항체, 예를 들어 항체 단편, CD28 또는 그의 기능성 변이체의 막관통 부분이거나 상기 부분을 포함하는 막관통 도메인, 및 CD28 또는 그의 기능성 변이체의 신호전달 부분 및 CD3 제타 또는 그의 기능성 변이체의 신호전달 부분을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 항체, 예를 들어 항체 단편, 4-1BB 또는 그의 기능성 변이체의 막관통 부분이거나 상기 부분을 포함하는 막관통 도메인, 및 4-1BB 또는 그의 기능성 변이체의 신호전달 부분 및 CD3 제타 또는 그의 기능성 변이체의 신호전달 부분을 포함하는 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 이러한 몇 가지 구현예에서, 수용체는 추가로 Ig 분자, 예를 들면 인간 Ig 분자의 일부를 함유하는 스페이서, 예를 들면 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지, 예를 들면 힌지-온리(only) 스페이서를 추가로 포함한다.

[0744] 일부 구현예에서, 수용체, 예를 들어 CAR의 막관통 도메인은 인간 CD28 또는 그의 변이체의 막관통 도메인, 예를 들어 인간 CD28의 27-아미노산 막관통 도메인(수탁번호: P107471)이거나, 또는 SEQ ID NO: 8에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 8에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 막관통 도메인이다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체의 막관통-도메인 함유 부분은 SEQ ID NO: 9에 제시된 아미노산 서열 그에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0745] 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 T 세포 공동 자극 분자의 세포내 도메인을 함유한다. 일부 측면에서, T 세포 공동 자극 분자는 CD28 또는 4-1BB이다.

[0746] 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 영역은 인간 CD28의 세포내 공동 자극 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 변이체 또는 부분, 예를 들어 그의 41 아미노산 도메인 및/또는 천연 CD28 단백질의 186-187 위치에서 LL이 GG로 치환된 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 영역은 SEQ ID NO: 10 또는 11에 제시된 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 10 또는 11에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포내 영역은 4-1BB의 세포내 공동 자극 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 변이체 또는 부분, 예를 들어 인간 4-1BB(수탁번호 Q070111)의 42-아미노산 세포질 도메인, 또는 그의 기능적 변이체 또는 부분, 예를 들어 SEQ ID NO: 12에 제시된 아미노산 서열, 또는 SEQ ID NO: 12에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0747] 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 영역 및/또는 도메인은 인간 CD3 사슬, 선택적으로 CD3 제타 자극성 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 변이체, 예를 들어 인간 CD3 ζ (수탁번호: P209632)의 이소폼 3의 112 AA 세포질 도메인 또는 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함하며 이는 미국특허 제7,446,190호 또는 미국특허 제8,911,993호에 설명되어 있다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 영역은 SEQ ID NO: 13, 14, 또는 15에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 13, 14, 또는 15에 대해 적어도 또는 적어도 약 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을

[0748] 포함한다.

[0749] 일부 측면에서, 스페이서는 IgG의 힌지 영역만을 포함하며, 예를 들어 SEQ ID NO: 1에 기재된 힌지 온리 스페이서와 같은 IgG4 또는 IgG1의 힌지만을 함유한다. 다른 구현예에서, 스페이서는 Ig 힌지, 예를 들어 C_H2 및/또는 C_H3 도메인에 연결된 IgG4 힌지이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 예를 들어 SEQ ID NO: 3에 기재된 바와 같이, C_H2 및 C_H3 도메인에 연결된 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 예를 들어 SEQ ID NO: 4에 기재된 바와 같이, CH3 도메인에 연결된 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 글리신-세린이 풍부한 서열 또는 공지의 가요성 링커와 같은 다른 가요성 링커이거나 또는 이를 포함한다.

[0750] **2. T 세포 수용체(TCR)**

[0751] 일부 구현예에서, 표적 폴리펩티드, 예를 들어 종양, 바이러스 또는 자가면역 단백질의 항원의 펩티드 에피토프 또는 T 세포 에피토프를 인식하는 T 세포 수용체(TCR) 또는 그의 항원-결합 일부분을 발현하는, T 세포와 같은 조작된 세포가 제공된다.

- [0752] 일부 구현예에서, "T 세포 수용체" 또는 "TCR"은 가변 α 및 β 쇠(각각 TCR α 및 TCR β 로도 알려짐) 또는 가변 γ 및 δ 쇠(또한 TCR α 및 TCR β 로도 알려짐), 또는 이들의 항원-결합 부분을 함유하고, MHC 분자에 결합된 펩티드에 특이적으로 결합할 수 있는 분자이다. 일부 구현예에서, TCR은 $\alpha\beta$ 형태이다. 통상, $\alpha\beta$ 와 $\gamma\delta$ 형태로 존재하는 TCR은 일반적으로 구조적으로 유사하지만, 이들을 발현하는 T 세포는 별개의 해부학적 위치 또는 기능을 가질 수 있다. TCR은 세포 표면상에서 또는 가용성 형태로 발견된다. 일반적으로, TCR은, 일반적으로 구조적 적합성 복합체(MHC) 분자에 결합된 항원을 인식하는 역할을 하는 T 세포(또는 T 림프구)의 표면에서 발견된다.
- [0753] 달리 언급하지 않는 한, 용어 "TCR"은 완전 TCR 뿐만 아니라 그의 항원-결합 부분 또는 항원-결합 단편을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 일부 구현예에서, TCR은 온전한 또는 전장 TCR이고, 예를 들어 $\alpha\beta$ 형태 또는 $\gamma\delta$ 형태의 TCR이다. 일부 구현예에서, TCR은 전장 TCR 보다 짧지만 MHC 분자에서 결합된 특정 펩티드에 결합하는 항원-결합 부분이고, 예를 들어 MHC-펩티드 복합체에 결합한다. 일부 경우, TCR의 항원-결합 부분 또는 단편은 전장 또는 온전한 TCR의 구조적 도메인의 일부분만을 함유하지만, 여전히 상기 전장 TCR이 결합하는 MHC-펩티드 복합체와 같은 펩티드 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 경우, 항원-결합 부분은 특정 MHC-펩티드 복합체에 결합하기 위한 결합 위치를 형성하기에 충분한, TCR의 가변 도메인, 예를 들어 가변 α 쇠 및 가변 β 쇠를 함유한다. 일반적으로, TCR의 가변 쇠들은 펩티드, MHC 및/또는 MHC-펩티드 복합체의 인식에 관여하는 상보성 결정 영역을 함유한다.
- [0754] 일부 구현예에서, TCR의 가변 도메인은 추가 변 루프 또는 상보성 결정 영역(CDR)을 함유하는데, 이것이 일반적으로 항원 인식 및 결합 능력 및 특이성에 주로 기여한다. 일부 구현예에서, TCR의 CDR 또는 그들의 조합은 주어진 TCR 분자의 항원-결합 위치의 전부 또는 실질적으로 전부를 형성한다. TCR 쇠의 가변 영역 내 다양한 CDR은 일반적으로 구조 영역(FR)에 의해 분리되는데, 이는 CDR과 비교하여 TCR 분자 중에서 일반적으로 가변성이 덜 나타난다[예를 들어 문헌 「Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990」; 「Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988」; 또한 「also Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003」 참조]. 일부 구현예에서, CDR3이 항원 결합 또는 특이성을 책임지는 주 CDR이거나, 또는 항원 인식을 위해 및/또는 펩티드-MHC 복합체의 가공된 펩티드 부분과 상호 작용하기 위하여 주어진 TCR 가변 영역상의 3 개의 CDR 중에서 가장 중요하다. 일부 상황에서, 알파 사슬의 CDR1은 특정 항원 펩티드의 N-말단 부분과 상호작용할 수 있다. 일부 상황에서, 베타 쇠의 CDR1은 펩티드의 C-말단 부분과 상호 작용할 수 있다. 일부 상황에서, CDR2는 MHC-펩티드 복합체의 MHC 부분과의 상호 작용 또는 그의 인식을 책임지는 주 CDR에 가장 크게 기여하거나 그러한 CDR이다. 일부 구현예에서, β -쇠의 가변 영역은 추가적인 초변이 영역을 함유할 수 있는데(CDR4 또는 HVR4), 이는 일반적으로 항원 인식이 아닌 초항원(superantigen) 결합과 관련된다[문헌 「Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426」 참조].
- [0755] 일부 구현예에서, TCR은 또한 불변 도메인, 막관통 도메인 및/또는 짧은 세포질 꼬리를 함유할 수 있다[예를 들어 문헌 「Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997」 참조]. 일부 측면에서, TCR의 각 쇠는 하나의 N-말단 면역글로불린 가변 도메인, 하나의 면역글로불린 불변 도메인, 막관통 영역 및 C-말단에서 짧은 세포질 꼬리를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 신호전달을 매개하는 것과 관련된 CD3 복합체의 불변 단백질들과 관련된다.
- [0756] 일부 구현예에서, TCR 쇠는 하나 이상의 불변 도메인을 포함한다. 예를 들어 주어진 TCR 쇠(예를 들어 α -쇠 또는 β -쇠)의 세포의 부분은 세포 막에 인접하여 2 개의 면역글로불린-유사 도메인을 함유할 수 있는데, 예를 들어 가변 도메인(예를 들어 V α 또는 V β ; 통상 캐뵈(Kabat)의 번호매김[문헌 「Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed." 참조]에 기초하여 아미노산 1 내지 116, 및 불변 도메인(예를 들어 α -쇠 불변 도메인 또는 C α , 통상 카뵈 번호매김에 기초하여 쇠 중 117 내지 259 위치 또는 β 쇠 불변 도메인 또는 C β , 통상 카뵈에 기초하여 쇠 중 117 내지 295 위치)이다. 예를 들어 일부 경우, 2 개의 쇠에 의해 형성된 TCR의 세포외 부분은 2 개의 막-근위 불변 도메인 및 2 개의 막-말단 가변 도메인을 포함하는데, 가변 도메인 각각은 CDR을 함유한다. TCR의 불변 도메인은, 시스테인 잔기가 이황화 결합을 형성하여 그에 의해 TCR의 두 쇠를 연결하는 짧은 연결 서열을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 α 및 β 쇠 각각에 추가의 시스테인 잔기를 가질 수 있어서, TCR은 불변 도메인에서 2 개의 이황화 결합을 함유한다.
- [0757] 일부 구현예에서, TCR 쇠는 막관통 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서 막관통 도메인은 양전하를 띤다. 일부 경우에는, TCR 쇠는 세포질 꼬리를 함유한다. 일부 경우, 상기 구조는 TCR이 CD3 및 그의 서브 유닛과 같은 다른 분자와 결합하는 것을 허용한다. 예를 들어 막관통 영역을 갖는 불변 도메인을 함유하는 TCR은 세포막 내

의 단백질을 고정시키고 CD3 신호전달 장치 또는 복합체의 불변 서브 유닛과 결합할 수 있다. CD3 신호전달 서브 유닛(예를 들어 CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ 및 CD3 ζ 쇠)의 세포내 꼬리는 TCR 복합체의 신호전달 능력에 관계된 하나 이상의 면역 수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM을 함유한다.

[0758] 일부 구현예에서, TCR은 2 개의 쇠 α 및 β (또는 필요에 따라, γ 및 δ)의 이중이량체이거나 단일 쇠 TCR 컨스트럭트일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 이항화 결합 또는 이항화 결합들에 의해 연결된 2 개의 분리된 쇠(α 및 β 쇠 또는 γ 및 δ 쇠)를 함유하는 이중이량체이다.

[0759] 일부 구현예에서, TCR은 V α , β 쇠의 서열과 같은 공지된 TCR 서열(들)로부터 생성될 수 있는데, 이들에 대하여 실질적으로 전장 암호화 서열이 용이하게 이용 가능하다. 세포 공급원으로부터 V 쇠 서열을 포함하는 전장 TCR 서열을 얻는 방법은 잘 알려져 있다. 일부 구현예에서, TCR을 암호화하는 핵산은 다양한 원으로부터 얻어질 수 있는데, 예를 들어 주어진 세포 또는 세포들 내에서 또는 그로부터 분리된 TCR-암호화 핵산의 중합 효소 연쇄 반응(PCR) 증폭에 의하여 또는 공개적으로 입수 가능한 TCR DAN 서열을 합성함에 의하여 얻어질 수 있다.

[0760] 일부 구현예에서, TCR은 생물학적 원으로부터 얻어지는데, 예를 들어 세포로부터, 예를 들어 T 세포(예를 들어 세포 독성 T 세포), T 세포 하이브리도마 또는 다른 공개적으로 입수 가능한 원으로부터 얻어진다. 일부 구현예에서, T 세포는 생체내 분리된 세포로부터 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 흉선학적으로(thymically) 선택된 TCR이다. 일부 구현예에서, TCR은 신에피토프-제한(neoepitope-restricted) TCR이다. 일부 구현예에서, T-세포는 배양된 T-세포 하이브리도마 또는 클론일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR 또는 그의 항원-결합 부분 또는 그의 항원-결합 단편은 TCR의 서열 지식으로부터 합성 생성될 수 있다.

[0761] 일부 구현예에서, TCR은 표적 폴리펩티드 항원 또는 그의 표적 T 세포 에피토프에 대한 후보 TCR 라이브러리의 스크리닝하는 것으로부터 선별되거나 또는 동정된 TCR로부터 생성된다. TCR 라이브러리는 PBMCs, 비장 또는 다른 림프 기관에 존재하는 세포를 포함하여 대상체로부터 분리된 T 세포로부터 V α 및 V β 레퍼토리를 증폭함으로써 생성될 수 있다. 일부 경우에, T 세포는 종양-침윤 림프구(TIL)로부터 증폭될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR 라이브러리는 CD4+ 또는 CD8+ 세포로부터 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 건강한 대상체의 정상 T 세포원, 즉 정상 TCR 라이브러리로부터 증폭될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 질병이 있는 대상체의 T 세포원, 즉 질병이 있는 TCR 라이브러리로부터 증폭될 수 있다. 일부 구현예에서, 축퇴(degenerate) 프라이머는 인간으로부터 수득된 T 세포와 같은 샘플에서 예를 들어 RT-PCR에 의하여 V α 및 V β 의 유전자 레퍼토리를 증폭시키는데 사용된다. 일부 구현예에서, scTv 라이브러리는 증폭된 산물이 클로닝되거나 어셈블리 되어 링커에 의해 분리되는 나이브 V α 및 V β 라이브러리로부터 어셈블리 될 수 있다. 대상체 및 세포의 공급원에 따라 라이브러리는 HLA 대립형질-특이적일 수 있다. 또는, 일부 구현예에서, TCR 라이브러리는 모체 또는 스캐폴드 TCR 분자의 돌연변이화 또는 다양화에 의해 생성될 수 있다. 일부 측면에서, TCR은 예를 들어 α 또는 β 쇠의 돌연변이화에 의하여 지시된 진화(directed evolution)의 대상이된다. 일부 구현예에서, TCR의 CDR 내의 특정 잔기가 변경된다. 일부 구현예에서, 선별된 TCR은 친화적 성숙에 의해 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 항원 특이적 T 세포는, 예를 들어 펩티드에 대한 CTL 활성을 평가하기 위한 스크리닝에 의하여 선별될 수 있다. 일부 측면에서, TCR, 예를 들어 항원-특이적 T 세포 상에서 존재하는 TCR은, 예를 들어 결합 활성에 의하여, 예를 들어 상기 항원에 대한 특정 친화도 또는 결합력(avidity)에 의하여 선별될 수 있다.

[0762] 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 항원 수용체는 재조합 T 세포 수용체(TCR) 및/또는 자연적으로 존재하는 T 세포로부터 클로닝된 TCR을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 항원(예를 들어 암 항원)에 대한 고-친화성 T 세포 클론은 동정되고, 환자로부터 분리되며, 세포내로 도입된다. 일부 구현예에서, 표적 항원에 대한 TCR 클론은 인간 면역계 유전자(예를 들어 인간 백혈구 항원 시스템, 또는 HLA)로 조작된 트랜스제닉 마우스에서 생성되었다. 예를 들어 문헌 「Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res. 15:169-180」 및 「Cohen et al. (2005) J Immunol. 175:5799-5808」에 개시된 종양 항원을 참조한다. 일부 구현예에서, 파지 디스플레이가 표적 항원에 대한 TCR을 분리하는데 사용된다[예를 들어 문헌 「Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14:1390-1395」 및 「Li (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354」 참조].

[0763] 일부 구현예에서, TCR 또는 그의 항원-결합 부분은 변형되거나 조작된 것이다. 일부 구현예에서, 지시된 진화 방법이 이용되어, 특정 MHC-펩티드 복합체에 대한 보다 높은 친화성을 갖는 것과 같은 변화된 특성을 갖는 TCR을 생성시킨다. 일부 구현예에서, 지시된 진화는 디스플레이 방법, 예를 들어 비한정적인 예로서 효모 디스플레이[문헌 「Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92」 참조], 파지 디스플레이[문헌 「Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54」 참조], 또는 T

세포 디스플레이[문헌 「Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84」 참조]에 의하여 달성된다. 일부 구현예에서, 디스플레이 접근법은 공지된, 모체 또는 레퍼런스 TCR을 조작하는 것 또는 변형하는 것을 포함한다. 예를 들어 일부 경우에, 야생형 TCR은, 그 TCR에서 CDR의 하나 이상의 잔기가 돌연변이되는 돌연변이화 된 TCR을 생성하기 위한 주형으로서 사용될 수 있고, 원하는 변경된 성질을 갖는 돌연변이체, 예를 들어 원하는 표적 항원에 대한 더 높은 친화도의 돌연변이체가 선별된다.

[0764] 일부 구현예에서, 대상 TCR을 생산하거나 생성시키는 데 사용하기 위한 표적 폴리펩티드의 펩티드는 공지되어 있거나 당업자에 의하여 쉽게 확인될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR 또는 항원-결합 부분을 생성시키는데 사용하기에 적합한 펩티드는 대상 표적 폴리펩티드, 예를 들어 하기 기술되는 표적 폴리펩티드에서 HLA-제한 모티프의 존재에 기초하여 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 펩티드는 입수가능한 컴퓨터 예측 모델을 사용하여 확인된다. 일부 구현예에서, MHC 클래스 I 결합 위치를 예측하기 위한 모델로서, ProPred1[문헌 「Singh and Raghava (2001) Bioinformatics 17(12):1236-1237」 참조], 및 SYFPEITHI[문헌 「Schuler et al. (2007) Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, 409(1): 75-93 2007」 참조] 이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 일부 구현예에서, MHC-제한된 에피토프는 HLA-A0201인데, 이는 전체 코카시언의 대략 39-46%에서 발현되며, 따라서 TCR 또는 기타 MHC-펩티드 결합 분자를 제조하는데 사용하기 위한 MHC 항원의 적절한 선별을 대표한다.

[0765] 컴퓨터 예측 모델을 이용하여 HLA-A0201-결합 모티프 및 프로테아좀 및 면역-프로테아좀의 절단 위치는 공지되어 있다. MHC 클래스 I 결합 위치를 예측하기 위한 그러한 모델은 ProPred1[문헌 「Singh and Raghava, ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. BIOINFORMATICS 17(12):1236-1237 2001」 에 보다 자세히 기술됨], 및 SYFPEITHI[문헌 「Schuler et al. SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. in Immunoinformatics Methods in Molecular Biology, vol 409(1): 75-93 2007」 참조]를 들 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0766] 일부 구현예에서, TCR 또는 그의 항원 결합 부분은 결합 특성과 같은 하나 이상의 특성이 변경된, 재조합적으로 생산된 천연 단백질 또는 그들의 돌연변이된 형태일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 인간, 마우스, 래트 또는 다른 포유 동물과 같은 다양한 동물 종 중 하나로부터 유래될 수 있다. TCR은 세포-결합된 것 또는 가용성 형태일 수 있다. 일부 구현예에서, 제공되는 방법의 목적상, TCR은 세포 표면 상에 발현된 세포-결합된 형태이다.

[0767] 일부 구현예에서, TCR은 전장 TCR이다. 일부 구현예에서, TCR은 항원-결합 부분이다. 일부 구현예에서, TCR은 이량체 TCR (dTTCR)이다. 일부 구현예에서, TCR은 단일-쇄 TCR(sc-TCR)이다. 일부 구현예에서, dTCR 또는 scTCR은 국제공개공보 제W003/020763호, 제W004/033685호, 제W02011/044186호에 기재된 바와 같은 구조를 갖는다.

[0768] 일부 구현예에서, TCR은 막관통 서열에 상응하는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, TCR은 세포질 서열에 상응하는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, TCR은 CD3과 함께 TCR 복합체를 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, dTCR 또는 scTCR을 포함하는 임의의 TCR은 T 세포의 표면 상에 활성 TCR을 생성하는 신호전달 도메인에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 세포 표면에서 발현된다.

[0769] 일부 구현예에서, dTCR은, TCR α 쇠 가변 영역 서열에 상응하는 서열이 TCR α 쇠 불변 영역 세포 외 서열에 상응하는 서열의 N 말단에 융합된 제 1 폴리펩티드, 및 TCR β 쇠 가변 영역 서열에 상응하는 서열이 TCR β 쇠 불변 영역 세포외 서열에 상응하는 서열의 N 말단에 융합된 제 2 폴리펩티드를 함유하는데, 상기 제 1 및 제 2 폴리펩티드는 이황화 결합에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 결합은 본래의 이량체 α β TCR에 존재하는 본래의 내부-쇄 이황화 결합에 해당할 수 있다. 일부 구현예에서, 쇠간 이황화 결합은 천연 TCR에는 존재하지 않는다. 예를 들어 일부 구현예에서, dTCR 폴리펩티드 쌍의 불변 영역 세포외 서열에 하나 이상의 시스테인이 혼입될 수 있다. 일부 경우에, 천연 및 비-천연 이황화 결합이 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 막에 결합하기 위해 막관통 서열을 함유한다.

[0770] 일부 구현예에서, dTCR은, 가변 α 도메인, 불변 α 도메인 및 상기 불변 α 도메인의 C-말단에 부착된 제 1 이합체화 모티프를 함유하는 TCR α 쇠, 및 가변 β 도메인, 불변 β 도메인 및 상기 불변 β 도메인의 C-말단에 부착된 제 2 이합체화 모티프를 포함하는 TCR β 쇠를 함유하고, 상기 제 1 및 제 2 이합체화 모티프는 쉽게 상호 작용하여 상기 제 1 이합체화 모티프의 아미노산과 상기 제 2 이합체화 모티프의 아미노산 간 공유결합을 형성하여, TCR α 쇠와 TCR β 쇠를 함께 연결한다.

- [0771] 일부 구현예에서, TCR은 scTCR이다. 통상, scTCR은 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다[예를 들어 문헌 「Soo Hoo, W. F. et al. PNAS (USA) 89, 4759 (1992)」; 「Wulfing, C. and Pluckthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994)」; 「Kurucz, I. et al. PNAS (USA) 90 3830 (1993)」; 국제공개공보 제W096/13593호, 제W096/18105호, 제W099/60120호, 제W099/18129호, 제W003/020763호, 제W02011/044186호; 및 문헌 「Schlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996)」 참조]. 일부 구현예에서, scTCR은 도입된 비-천연(non-naive) 이황화 쇠간 결합을 함유하여 TCR 쇠들의 결합을 촉진시킨다[예를 들어 국제공개공보 제W003/020763호 참조]. 일부 구현예에서, scTCR은, 그의 C-말단에 융합된 이중의 류신 지퍼가 쇠 결합을 용이하게 하는 비-이황화 결합된 절단된 TCR이다(예를 들어 국제 공개 PCT WO 99/60120 참조). 일부 구현예에서, scTCR은 펩티드 링커를 통해 TCR β 가변 도메인에 공유 결합된 TCR α 가변 도메인을 함유한다[국제공개공보 제W099/18129호 참조].
- [0772] 일부 구현예에서, scTCR은, TCR α 쇠 가변 영역에 상응하는 아미노산 서열로 구성되는 제 1 분절, TCR β 쇠 불변 도메인 세포의 서열에 상응하는 아미노산 서열의 N 말단에 융합된 TCR β 쇠 가변 영역 서열에 상응하는 아미노산 서열로 구성되는 제 2 분절, 및 상기 제 1 분절의 C 말단을 상기 제 2 분절의 N 말단에 연결하는 링커 서열을 함유한다.
- [0773] 일부 구현예에서, scTCR은, α 쇠 세포의 불변 도메인 서열의 N 말단에 융합된 α 쇠 가변 영역 서열로 구성되는 제 1 분절, 및 β 쇠 세포의 불변 서열의 N 말단에 융합된 β 쇠 가변 영역 서열 및 막관통 서열로 구성되는 제 2 분절, 및, 필요에 따라 상기 제 1 분절의 C 말단을 상기 제 2 분절의 N 말단에 연결하는 링커 서열을 함유한다.
- [0774] 일부 구현예에서, scTCR은, β 쇠 세포의 불변 도메인 서열의 N 말단에 융합된 TCR β 쇠 가변 영역 서열로 구성되는 제 1 분절, 및 α 쇠 세포의 불변 서열의 N 말단에 융합된 α 쇠 가변 영역 서열 및 막관통 서열로 구성되는 제 2 분절, 및, 필요에 따라 상기 제 1 분절의 C 말단을 상기 제 2 분절의 N 말단에 연결하는 링
- [0775] 커 서열을 함유한다.
- [0776] 일부 구현예에서, 제 1 및 제 2 TCR 분절을 연결시키는 scTCR의 링커는 TCR 결합 특이성을 유지하면서 단일 폴리펩티드 가닥을 형성할 수 있는 임의의 링커일 수 있다. 일부 구현예에서, 링커 서열은 예를 들어 식-P-AA-P-를 가질 수 있는데, 여기서 P는 프롤린이고 AA는 그 아미노산이 글리신 및 세린 인 아미노산 서열을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 제 1 및 제 2 분절은 그들의 가변 영역 서열이 그러한 결합을 위해 배향되도록 쌍을 이룬다. 따라서 일부 경우에, 상기 링커는 상기 제 1 분절의 C 말단과 상기 제 2 분절의 N 말단간의 거리를 아우르는 충분한 길이를 가지거나 그 역도 마찬가지이지만, scTCR의 그 표적 리간드로의 결합을 차단하거나 감소시킬 만큼 너무 길지는 않다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 10 내지 45 개 아미노산, 예를 들어 10 내지 30 개 아미노산, 또는 26 내지 41 개 아미노산 잔기, 예를 들어 29, 30, 31 또는 32 개의 아미노산, 또는 약 그 정도의 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 식-PGGG-(SGGG)5-P-를 갖는데, 여기서 P는 프롤린, G는 글리신 및 S는 세린이다(SEQ ID NO: 48). 일부 구현예에서, 상기 링커는 서열 GSADDAKKDAKKDGKS(SEQ ID NO: 23)을 갖는다.
- [0777] 일부 구현예에서, scTCR은 α 쇠의 불변 도메인의 면역글로불린 영역의 잔기를, β 쇠의 불변 도메인의 면역글로불린 영역의 잔기에 연결하는 공유 이황화 결합을 함유한다. 일부 구현예에서, 천연 TCR에서 쇠간(interchain) 이황화 결합은 존재하지 않는다. 예를 들어 일부 구현예에서, scTCR 폴리펩티드의 제 1 및 제 2 분절의 불변 영역 세포의 서열 내로 하나 이상의 시스테인이 혼입될 수 있다. 일부 경우에, 천연 및 비-천연 이황화 결합 양자 모두가 바람직할 수 있다.
- [0778] 도입된 쇠간 이황화 결합을 함유하는 dTCR 또는 scTCR의 일부 구현예에서, 천연의 이황화 결합은 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 천연의 쇠간 이황화 결합을 형성하는 하나 이상의 천연 시스테인은 세린 또는 알라닌과 같은 다른 잔기로 치환된다. 일부 구현예에서, 도입된 이황화 결합은 상기 제 1 및 제 2 분절 상의 비-시스테인 잔기를 시스테인으로 돌연변이 시킴으로써 형성될 수 있다. TCR의 예시적인 비-천연 이황화 결합은 국제 공개 PCT 번호 W02006/000830에 기술되어 있다.
- [0779] 일부 구현예에서, TCR 또는 이의 항원-결합 단편은, 10⁻⁵ 내지 10⁻¹² M과 그 안의 모든 개별 값 및 범위 또는 약 그 정도의 표적 항원에 대한 평형 결합 상수를 갖는 친화도를 나타낸다. 일부 구현예에서, 표적 항원은 MHC-펩티드 복합체 또는 리간드이다.
- [0780] 일부 구현예에서, α 쇠 및 β 쇠와 같은 TCR을 암호화하는 핵산 또는 핵산들은 PCR, 클로닝 또는 다른 적절한 수단에 의해 증폭될 수 있고, 적합한 발현 벡터 또는 벡터들 내에 클로닝 될 수 있다. 발현 벡터는 임의의 적

합한 재조합 발현 벡터일 수 있으며, 임의의 적합한 숙주를 형질 전환 또는 형질주입 시키는데 사용될 수 있다. 적합한 벡터는 전과 및 증식을 위해 또는 발현을 위해, 또는 양자 모두를 위해 설계된 것들을 포함하며, 예를 들어 플라스미드 및 바이러스이다.

[0781] 일부 구현예에서, 벡터는 pUC 시리즈(Fermentas Life Sciences), pBluescript 시리즈(Stratagene, 미국 캘리포니아주 라호야 소재), pET 시리즈(Novagen, 미국 위스콘신주 매디슨 소재), pGEX 시리즈(Pharmacia Biotech, 스웨덴 웁살라 소재), 또는 pEX 시리즈(Clontech, 미국 캘리포니아주 팔로앨토 소재)의 벡터일 수 있다. 일부 경우에서, 박테리오파지 벡터, 예를 들어 λ G10, λ GT11, λ ZapII(Stratagene), λ EMBL4, 및 λ NM1149가 또한 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 식물 발현 벡터가 사용될 수 있으며, 이는 pBI01, pBI1012, pBI1013, pBI121 및 pBIN19(Clontech)를 포함한다. 일부 구현예에서, 동물 발현 벡터는 pEUK-C1, pMAM 및 pMAMneo(Clontech)를 포함한다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터, 예를 들어 레트로바이러스 벡터가 사용된다.

[0782] 일부 구현예에서, 재조합 발현 벡터는 표준 재조합 DNA 기법을 사용하여 제조할 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터는, 벡터가 DNA-또는 RNA-기반인지를 고려하여, 적절한 경우, 벡터가 도입될 숙주의 유형(예를 들어 박테리아, 균류, 식물 또는 동물)에 특이적인 조절 서열, 예를 들어 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터는 TCR 또는 항원-결합 부분(또는 기타 MHC-펩티드 결합 분자)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 비천연 프로모터를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 비-바이러스 프로모터 또는 바이러스 프로모터, 예를 들어 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, SV40 프로모터, RSV 프로모터, 및 무린 줄기세포 바이러스의 긴 말단 반복부에서 발견되는 프로모터일 수 있다. 공지된 다른 프로모터가 또한 고려된다.

[0783] 일부 구현예에서, T-세포 클론이 수득된 후, TCR 알파 및 베타 쇠가 단리되고 유전자 발현 벡터 내로 클로닝된다. 일부 구현예에서, TCR 알파 및 베타 유전자는 피코크리나바이러스 2A 리보솜 스킵 펩티드를 통해 연결되어, 두 쇠가 동시에 발현된다. 일부 구현예에서, TCR의 유전자 전달은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 통해 또는 트랜스포존을 통해 수행된다[예를 들어 문헌 「Baum et al. (2006) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 13:1050-1063」; 「Frecha et al. (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18:1748-1757」; 및 「Hackett et al. (2010) Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy. 18:674-683」 참조].

[0784] 일부 구현예에서, TCR을 암호화하는 벡터를 생성하기 위해, 대상 TCR을 발현하는 T 세포 클론으로부터 단리된 총 cDNA로부터 α 및 β 쇠를 PCR 증폭하고 발현 벡터에 클로닝한다. 일부 구현예에서, α 및 β 쇠는 동일한 벡터 내로 클로닝된다. 일부 구현예에서, α 및 β 쇠는 상이한 벡터로 클로닝된다. 일부 구현예에서, 생성된 α 및 β 쇠는 레트로바이러스 벡터, 예를 들어 렌티바이러스 벡터 내로 혼입된다.

[0785] **3. 키메라 자가-항체 수용체(CAAR)**

[0786] 일부 구현예에서, 재조합 수용체는 키메라 자가항체 수용체(CAAR)이다. 일부 구현예에서, CAAR은 자가항체에 특이적이다. 일부 구현예에서, CAAR을 발현하는 세포, 예를 들어 CARR을 발현하도록 조작된 T 세포는 자가항체-발현 세포에 특이적으로 결합하고 이를 죽이는 데 사용될 수 있지만, 정상 항체 발현 세포에는 그러하지 아니다. 일부 구현예에서, CAAR-발현 세포는 자가면역 질병과 같은 자기-항원의 발현과 관련된 자가면역 질병을 치료하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, CAAR-발현 세포는 궁극적으로 자가항체를 생산하고 그의 세포 표면 상에 자가항체를 표시하는 B 세포를 표적화할 수 있고, 이들 B 세포를 치료적 중재를 위한 질병-특이적 표적으로 표시할 수 있다. 일부 구현예에서, CAAR-발현 세포는 항원-특이적 키메라 자가항체 수용체를 사용하여 질병-유발 B 세포를 표적화함으로써 자가면역 질병에서 병원성 B 세포를 효율적으로 표적화하고 사멸시키는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체는 CAAR, 예를 들어 미국특허출원공보 제 2017/0051035호에 개시된 임의의 수용체이다.

[0787] 일부 구현예에서, CAAR은 자가항체 결합 도메인, 막관통 도메인, 및 세포내 신호전달 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 영역은 세포내 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포내 신호전달 영역은 1차 신호전달 도메인, T 세포에서 1차 활성화 신호를 유도할 수 있는 신호전달 도메인, T 세포 수용체 (TCR) 요소의 신호전달 도메인 및/또는 면역 수용체 티로신-계 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 신호전달 도메인이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 세포내 신호전달 영역은 2차 또는 공동 자극 신호전달 영역(2차 세포내 신호전달 영역)을 포함한다.

[0788] 일부 구현예에서, 자가항체 결합 도메인은 자가항원 또는 그의 단편을 포함한다. 자가항원의 선별은 표적화 될

자가항체의 유형에 달려 있다. 예를 들어 자가항원은, 그것이 특정 질병 상태, 예를 들어 자기면역 질병, 예를 들어 자가항체-매개 자가면역 질병과 관련된, B 세포와 같은 표적 세포상의 자가항체를 인식하기 때문에 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 자가면역 질병은 심상성 천포창(pemphigus vulgaris, PV)을 포함한다. 예시적인 자가항원은 데스모글레인 1(Dsg1) 및 Dsg3을 포함한다.

[0789] 4. 다중 표적화

[0790] 일부 구현예에서, 세포 및 방법은 세포 상에 2개 이상의 유전적으로 조작된 수용체의 발현과 같은 다중 표적화 전략을 포함하며, 각각 상이한 항원의 동일함을 인식하고 전형적으로 각각 상이한 세포내 신호전달 성분을 포함한다. 그러한 다중 표적화 전략은 예를 들어 국제공개공보 제W02014/055668 A1호(예를 들어 정상 세포와 같이 표적 상에 개별적으로 존재하지만 치료하고자 하는 질병 또는 병태의 세포에서만 함께 존재하는 두 개의 상이한 항원을 표적으로 하는 활성화 및 공동 자극 CAR의 조합을 기술함) 및 문헌 「Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (December, 2013)」 [활성화 CAR 및 억제 CAR을 발현하는 세포, 예를 들어 활성화 CAR이 정상 또는 비병출성 세포 모두에서 발현되는 하나의 항원 및 치료 대상의 질병 또는 병태의 세포에 결합하고, 억제성 CAR이 정상 세포 또는 치료를 원하지 않는 세포에서만 발현되는 다른 항원에 결합하는 것을 기술함]에 기술되어 있다.

[0791] 예를 들어 일부 구현예에서, 세포는 일반적으로 제 1 수용체, 예를 들어 제 1 항원에 의해 인식되는 항원에 대한 특이적 결합시 세포에 활성화하거나 또는 자극하는 신호를 유도할 수 있는 제 1 유전적으로 조작된 항원 수용체(예를 들어 CAR 또는 TCR)을 발현하는 수용체를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 일반적으로 제 2 수용체에 의해 인식되는 제 2 항원에 특이적으로 결합시 면역 세포에 공동 자극 신호를 유도할 수 있는 제 2 유전자 조작 항원 수용체(예를 들어 CAR 또는 TCR), 예를 들어 키메라 공동 자극 수용체를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제 1 항원 및 제 2 항원은 동일하다. 일부 구현예에서, 제 1항원 및 제 2 항원은 상이하다.

[0792] 일부 구현예에서, 제 1 및/또는 제 2 유전적으로 조작된 항원 수용체(예를 들어 CAR 또는 TCR)은 세포에 활성화하거나 또는 자극하는 신호를 유도할 수 있다. 일부 구현예에서, 수용체는 ITAM 또는 ITAM-유사 모티프를 함유하는 세포내 신호전달 성분을 포함한다. 일부 구현예에서, 제 1 수용체에 의해 유도된 활성화는 신호전달 또는 ITAM 인산화 및/또는 ITAM 매개 신호전달 캐스케이드의 개시와 같은 면역 반응의 개시를 초래하는 세포에서의 단백질 발현의 변화(예 : CD4 또는 CD8 등), NF-κB 및/또는 AP-1과 같은 하나 이상의 전사 인자의 활성화, 및/또는 NF-κB 및/또는 AP-1과 같은 유전자 발현의 유도 사이토카인, 증식 및/또는 생존과 같은 인자를 포함한다.

[0793] 일부 구현예에서, 제 1 및/또는 제 2 수용체는 CD28, CD137(4-1BB), OX40 및/또는 ICOS와 같은 공동 자극 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, 제 1 및 제 2 수용체는 상이한 공동 자극 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 함유한다. 하나의 구현예에서, 제 1 수용체는 CD28 공동 자극 신호전달 영역을 포함하고, 제 2 수용체는 4-1BB 보조-자극 신호전달 영역을 함유하거나 그 역도 마찬가지이다.

[0794] 일부 구현예에서, 제 1 및/또는 제 2 수용체는 ITAM 또는 ITAM-유사 모티프를 포함하는 세포내 신호전달 도메인 및 공동 자극 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 모두 함유한다.

[0795] 일부 구현예에서, 제 1 수용체는 TAM 또는 ITAM-유사 모티프를 함유하는 세포내 신호전달 도메인을 함유하고, 제 2 수용체는 공동 자극 수용체의 세포내 신호전달 도메인을 함유한다. 동일한 세포에서 유도된 활성화하거나 또는 자극하는 신호와 조합된 공동 자극 신호는 증가된 유전자 발현, 사이토카인 및 다른 인자의 분비 및 세포 사멸과 같은 T 세포 매개된 이펙터와 같은 견고하고 지속적인 면역 반응과 같은 면역 반응을 유발하는 신호이다.

[0796] 일부 구현예에서, 제 1 수용체만의 결합 또는 제 2 수용체만의 결합은 어느 것도 강력한 면역 반응을 유도하지 않는다. 일부 양상에서, 단지 하나의 수용체가 결합된다면, 세포는 항원에 대해 내성을 갖거나 비반응성이거나, 또는 억제되고/되거나 인자를 증식시키거나 분비하도록 유도되거나 작용기 기능을 수행하지 않는다. 그러나, 일부 이러한 구현예에서, 제 1 및 제 2 항원을 발현하는 세포의 만남과 같이 다수의 수용체가 결합되었을 때, 예를 들어 하나 이상의 사이토카인의 분비, 증식, 지속성에 의해 지시되는 바와 같이, 및/또는 표적 세포의 세포 독성 사멸과 같은 면역 이펙터 기능을 수행하는 것과 같은, 완전한 면역 활성화 또는 자극과 같은 원하는 반응이 달성된다.

[0797] 일부 구현예에서, 2개의 수용체는 세포에 대한 활성화 및 억제 신호를 각각 유도하여 수용체 중 하나에 의한 그의 항원에의 결합이 세포를 활성화시키거나 반응을 유도하지만 제 2 억제 수용체에 의한 결합 이 항원에 대한 신호는 그 반응을 억제하거나 약화시키는 신호를 유도한다. 예를 들어 활성화 CAR과 억제 CAR 또는 iCAR의 조

합이다. 이러한 전략은 예를 들어 활성화 CAR이 질병 또는 병태에서 발현되는 항원에 결합 하나 정상 세포에서도 발현되며, 억제 수용체는 정상 세포에서 발현되는 별도의 항원에 결합하지만 질병이나 병태가 있는 세포가 아니다.

[0798] 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 세포는 추가로 억제 CAR(iCAR; iCAR)[문헌 「Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (2013)」 참조], 예를 들어 질병 또는 병태와 관련된 것과는 상이하고/하거나 그에 특이적인 항원을 인식하는 CAR로서, 그에 의해서 질병-표적화 CAR을 통해서 분배된 활성화 신호는 억제 CAR을 그의 리간드에 조합함으로써 감소되거나 또는 억제되어, 예를 들어 오프-표적 효과(off-target effects)를 감소시킨다.

[0799] 일부 구현예에서, 2개의 수용체는 세포에 대한 활성화 및 억제 신호를 각각 유도하여 그의 항원에 대한 수용체 중의 하나의 리게이션(ligation)이 세포를 활성화시키거나 반응을 유도하지만 그의 항원에 대한 제 2 억제 수용체의 리게이션이 그 반응을 억제하거나 약화시키는 신호를 유도한다. 예를 들어 활성화 CAR과 억제 CAR 또는 iCAR의 조합이다. 이러한 전략은 예를 들어 그와 관련된 오프-표적 효과를 감소시키는데 사용될 수 있으며, 여기서 활성화 CAR이 질병 또는 병태에서 발현되는 항원에 결합 하나 정상 세포에서도 발현되며, 억제 수용체는 정상 세포에서 발현되는 별도의 항원에 결합하지만 질병이나 병태가 있는 세포가 아니다.

[0800] 일부 양상에서, 키메라 수용체는 억제 CAR(예를 들어 iCAR)이거나 또는 그것을 포함하고, 면역 반응, 예를 들어 세포 중의 ITAM- 및/또는 공동 자극-촉진 반응을 약화시키거나 또는 억제하는 세포내 성분들을 포함한다. 상기 세포내 신호전달 성분들의 예는, PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, PGE2 수용체, A2AR를 비롯한 EP2/4 아데노신 수용체를 포함한, 면역 체크포인트 분자 상에서 발견된 것들이다. 일부 양상에서, 조작된 세포는 상기 억제 분자의 또는 그로부터 유도된 신호전달 도메인을 포함하는 억제 CAR을 포함하여, 그것이 예를 들어 활성화 및/또는 공동 자극 CAR에 의해서 유발된 세포의 반응을 약화시키게 한다.

[0801] 일부 구현예에서, 다중 표적화 전략은 특정 질병 또는 병태와 관련된 항원이 비 병사성 세포(non-diseased cell)에서 발현되고/되거나 일시적(예를 들어 유전자 조작과 관련된 자극시)으로 또는 영구적으로 조작된 세포 자체에서 발현되는 경우에 사용된다. 이러한 경우, 2개의 분리된 개별적 항원 수용체의 연결을 요구함으로써, 특이성, 선별성 및/또는 효능이 개선될 수 있다.

[0802] 일부 구현예에서, 복수의 항원, 예를 들어 제 1항원 또는 제 2항원은 암세포에서와 같이 표적화 되는 세포, 조직 또는 질병 또는 병태 상에 발현된다. 한 양상에서, 세포, 조직, 질병 또는 질병 상태는 다발성 골수종 또는 다발성 골수종 세포이다. 일부 구현예에서, 복수의 항원 중 하나 이상은 일반적으로 정상 또는 비병사성 세포 또는 조직 및/또는 조작된 세포 자체와 같은 세포 치료법으로 표적화하는 것이 바람직하지 않은 세포에서 또한 발현된다. 이러한 구현예에서, 세포의 반응을 달성하기 위해 다중 수용체의 연결을 요구함으로써, 특이성 및/또는 효능이 달성된다.

[0803] **B. 핵산, 벡터 및 유전자 조작방법**

[0804] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 T 세포는 재조합 수용체를 발현하도록 유전자 조작된다. 일부 구현예에서, 상기 조작은 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 도입함으로써 수행된다. 또한 재조합 수용체를 암호화하는 뉴클레오티드, 및 상기 핵산 및/또는 뉴클레오티드를 함유하는 벡터 또는 컨스트럭트(construct)가 제공된다.

[0805] 일부 경우에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열은 신호 펩티드를 암호화하는 신호 서열을 함유한다. 일부 측면에서, 신호 서열은 천연 폴리펩티드로부터 유래된 신호 펩티드를 암호화할 수 있다. 다른 측면에서, 신호 서열은 SEQ ID NO: 24에 제시된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되고 SEQ ID NO: 25에 제시된 GMCSFR 알파 사슬의 예시적인 신호 펩티드와 같은 이종성 또는 비-고유 신호 펩티드를 암호화할 수 있다. 일부 경우에, 재조합 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 서열은 신호 펩티드를 암호화하는 신호 서열을 함유한다. 신호 펩티드의 비제한적인 예로는, 예를 들어 SEQ ID NO: 25에 제시되고 SEQ ID NO: 24에 기재된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화되는 GMCSFR 알파 사슬 신호 펩티드, 또는 SEQ ID NO: 26에 제시된 CD8 알파 신호 펩티드를 들 수 있다.

[0806] 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 재조합 수용체의 발현을 조절하기 위해 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터를 함유한다. 일부 예에서, 폴리뉴클레오티드는 재조합 수용체의 발현을 조절하기 위해 작동 가능하게 연결된 2 개, 3 개 또는 그 이상의 프로모터를 함유한다.

[0807] 핵산 분자가 2 개 이상의 상이한 폴리 펩티드 사슬, 예를 들어 재조합 수용체 및 마커를 암호화하는 특정 경우

에, 폴리펩티드 사슬의 각각은 별도의 핵산 분자에 의해 암호화될 수 있다. 예를 들어 2 개의 분리된 핵산이 제공되고, 각각은 세포내에서 발현을 위해 세포내로 개별적으로 전달되거나 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 및 마커를 암호화하는 핵산은 동일한 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site; IRES) 또는 자가 절단 펩티드 또는 선택적으로 T2A, P2A, E2A 또는 F2A인 리보솜 스킵핑을 일으키는 펩티드를 암호화하는 핵산에 의해 선택적으로 분리된다. 일부 구현예에서, 마커를 암호화하는 핵산 및 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 두 개의 상이한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 마커를 암호화하는 핵산 및 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 세포의 계층 내의 상이한 위치에 존재하거나 삽입된다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 레트로바이러스 형질도입, 형질주입(transfection) 또는 형질전환에 의해 배양된 세포를 함유하는 조성물로 도입된다.

[0808] 폴리뉴클레오티드가 제 1 및 제 2 핵산 서열을 함유하는 일부 구현예에서, 상이한 폴리펩티드 사슬 각각을 암호화하는 코딩 서열들은 동일하거나 상이한 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 분자는 2 이상의 상이한 폴리펩티드 사슬의 발현을 유도하는 프로모터를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 핵산 분자는 멀티시스트론(바이시스트론 또는 트리시스트론, 예를 들어 미국특허 제6,060,273호 참조)일 수 있다. 일부 구현예에서, 전사 단위는 단일 프로모터로부터의 메시지에 의해 유전자 산물(예를 들어 마커를 암호화하고 재조합 수용체를 암호화하는 것)의 동시 발현을 허용하는, IRES(내부 리보솜 진입 부위)를 함유하는 바이시스트론 유닛으로서 조작될 수 있다. 별법으로, 일부 경우에서, 단일 프로모터는 자가-절단 펩티드(예를 들어 2A 서열들) 또는 프로테아제 인식 부위(예를 들어 퓨린)을 암호화하는 서열에 의해 서로 분리된 2 또는 3 개의 유전자들(예를 들어 마커 암호화 및 재조합 수용체 암호화)을 하나의 오픈 리딩 프레임(ORF)에 함유하는, RNA의 발현을 지시할 수 있다. ORF는 따라서 번역 도중(2A의 경우) 또는 번역 후에 개별적인 단백질로 가공되는, 단일 폴리펩티드를 암호화한다. 일부 경우에서, T2A와 같은 펩티드는, 리보솜으로 하여금 2A 요소의 C-말단에서 펩티드 결합 합성을 생략하도록(리보솜 스킵핑) 할 수 있는데 이에 의해, 2A 서열의 말단과 다음 펩티드의 하류 사이가 분리된다[예를 들어 문헌 「de Felipe, Genetic Vaccines and Ther. 2:13 (2004)」 및 「de Felipe et al. Traffic 5:616-626 (2004)」 참조]. 다양한 2A 요소가 알려져 있다. 본원에 개시된 방법 및 시스템에 사용가능한 2A 서열의 비제한적인 예로는, 구제역 바이러스(F2A, 예를 들어 SEQ ID NO: 21), 말의 A형 비염 바이러스(E2A, 예를 들어 SEQ ID NO: 20), Thoesa asigna 바이러스(T2A, 예를 들어 SEQ ID NO: 6 또는 17), 및 돼지의 테스코바이러스-1(P2A, 예를 들어 SEQ ID NO: 18 또는 19)을 들 수 있으며 이에 관해서는 미국 특허출원공개공보 제US2007/0116690호에 기재되어 있다.

[0809] 본원에 기재된 임의의 재조합 수용체는 임의의 조합 또는 배열로 재조합 수용체를 코딩하는 하나 이상의 핵산 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화될 수 있다. 예를 들어 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 폴리뉴클레오티드는 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 상이한 폴리펩티드, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나의 벡터 또는 구조물은 마커를 코딩하는 핵산 서열을 함유하고, 별도의 벡터 또는 구조물은 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 코딩하는 핵산 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 마커를 암호화하는 핵산 및 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 두 개의 상이한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산은 마커를 암호화하는 핵산의 하류에 존재한다.

[0810] 일부 구현예에서, 벡터 골격은 하나 이상의 마커(들)를 암호화하는 핵산 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 마커(들)는 형질도입 마커, 대리 마커 및/또는 선별 마커이다.

[0811] 일부 구현예에서, 마커는 형질도입 마커 또는 대리 마커이다. 형질도입 마커 또는 대리 마커는 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 도입된 세포를 검출하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 형질도입 마커는 세포의 변형을 나타낼 수 있거나 또는 세포의 변형을 확인할 수 있다. 일부 구현예에서, 대리 마커는 세포 표면에서 재조합 수용체, 예를 들어 CAR과 세포 표면에서 동시 발현되도록 만들어진 단백질이다. 특정 구현예에서 그러한 대리 마커는 거의 또는 전혀 활성을 갖지 않도록 변형된 표면 단백질이다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열은 마커를 암호화하는 핵산에 작동가능하게 연결되고, T2A, P2A, E2A 또는 F2A와 같은 2A 서열과 같은 리보솜 스킵핑을 야기하는 펩티드 또는 자가-절단 펩티드를 암호화하는 핵산 또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES)에 의해 선택적으로 분리된다. 외래 마커 유전자는 어떤 경우에는 조작된 세포와 관련하여 세포의 검출 또는 선별을 가능하게하고 경우에 따라 세포 자살을 촉진시킬 수 있다.

[0812] 예시적인 대리 마커는 절단된 형태의 세포 표면 폴리펩티드 예를 들어 비-작용성이고 신호 또는 전장 형태의 세포 표면 폴리펩티드에 의해서 통상적으로 형질도입된 신호를 형질도입하지 않거나 형질도입할 수 없고/없거나

내재화할 수 없는 절단된 형태를 포함할 수 있다. 예시적인 절단된 세포 표피 폴리펩티드는 절단된 형태의 성장 인자 또는 다른 수용체, 예를 들어 절단된 인간 표피 성장 인자 수용체 2(예시적인 절단된 세포 표피 폴리펩티드(tHER2), 절단된 인간 표피 성장 인자 수용체(EGFRt, exemplary EGFRt sequence set forth in SEQ ID NO: 7 또는 16에 제시된 예시적인 EGFRt 서열) 또는 전립선 특이적 막 항원(PSMA) 또는 그의 변형된 형태를 포함한다. EGFRt는 항체 세톡시맵(Erbixutax®) 또는 기타 치료용 항-EGFL 항체 또는 결합 분자에 의해 인식되는 에피토프를 포함할 수 있으며, 이는 키메라 항원 수용체(CAR)와 같은 재조합 수용체 및 EGFRt 구조물에 의해 조작된 세포를 동정 또는 선별하거나 및/또는 상기 수용체를 발현하는 세포들을 제거 또는 분리하는데 이용될 수 있다[미국특허 제8,802,374호 및 문헌 「Liu et al., Nature Biotech. 2016 April; 34(4): 430-434」 참조]. 일부 측면에서, 예를 들어 대리 마커와 같은 마커는, CD34, NGFR, CD19 또는 절단된 CD19, 예를 들어 절단된 비-인간 CD19, 또는 표피 성장 인자 수용체(예를 들어 tEGFR)의 전부 또는 일부(예를 들어 절단된 형태)를 포함한다. 일부 구현예에서, 마커를 암호화하는 핵산은 절단 가능한 링커 서열, 예를 들어 T2A와 같은 링커 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어 마커, 및 선택적으로 링커 서열은 국제공개공보 제W02014031687호에 개시된 임의의 것일 수 있다. 예를 들어 마커는 T2A 절단가능한 링커 서열과 같은 링커 서열에 선택적으로 연결된 절단된 EGFR(tEGFR)일 수 있다. 절단된 EGFR(예를 들어 tEGFR)에 대한 예시적인 폴리펩티드는 SEQ ID NO: 7 또는 16에 제시된 아미노산 서열 또는 SEQ ID NO: 7 또는 16에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0813] 일부 구현예에서, 마커는 녹색 형광 단백질 (GFP), 증강된 녹색 형광 단백질 (EGFP), 예를 들어 수퍼-폴드 GFP, 적색 형광 단백질 (RFP)과 같은 형광 단백질, 예를 들어 tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed 또는 DsRed2, 시안 형광 단백질 (CFP), 청색 녹색 형광 단백질 (BFP), 증강된 청색 형광 단백질 (EBFP), 및 황색 형광 단백질 (YFP)과 같은 형광 단백질 및 상기 형광 단백질의 중 변이체, 단량체 변이체, 및 코돈-최적화되고/되거나 증강된 변이체를 비롯한, 변이체들이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 마커는 루시페라제, 대장균 유래의 lacZ 유전자, 알칼라인 포스파타제, 분비된 배아 알칼리성 포스파타제 (SEAP), 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제 (CAT)이거나 이를 포함한다. 예시적인 발광 리포터 유전자에는 루시페라제(luc), β-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(CAT), β-글루쿠코리니다제(GUS) 또는 그의 변이체가 포함된다.

[0814] 일부 구현예에서, 마커는 선별 마커이다. 일부 구현예에서, 선별 마커는 외인성 제제 또는 약물에 내성을 부여하는 폴리펩티드이거나 또는 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 선별 마커는 항생제 내성 유전자이다. 일부 구현예에서, 선별 마커는 항생제 내성 유전자로서 포유동물 세포에 대해 항생제 내성을 부여한다. 일부 구현예에서, 선별 마커는 푸로마이신 내성 유전자, 하이그로 마이신 내성 유전자, 블라스티시딘 (Blasticidin) 내성 유전자, 네오마이신 내성 유전자, 제네티신 내성 유전자 또는 제오신 내성 유전자 또는 그의 변형된 형태이거나 또는 이를 포함한다.

[0815] 일부 구현예에서, 재조합 핵산은, 예를 들어 유인원 바이러스 40(SV40), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스 (AAV)로부터 유래한 벡터와 같은 재조합 감염성 바이러스 입자를 사용하여, 세포내로 전달된다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터, 예를 들어 감마-레트로바이러스 벡터를 사용하여, T 세포내로 전달된다[예를 들어 문헌 「Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25」 ; 「Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46」 ; 「Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93」 ; 「Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557」 참조].

[0816] 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터는 긴 말단 반복부 서열(LTR), 예를 들어 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MoMLV), 골수 증식성 육종 바이러스(MPSV), 뮤린 배아 줄기세포 바이러스(MESV), 뮤린 줄기세포 바이러스(MSCV), 또는 비장 병소 형성 바이러스(SFFV)로부터 유래한 레트로바이러스 벡터를 가질 수 있다. 대부분의 레트로바이러스 벡터는 뮤린 레트로바이러스로부터 유래한다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 임의의 조류 또는 포유류 세포 공급원으로부터 유래한 것을 포함한다. 레트로바이러스는 통상적으로 양쪽성이며, 이는 이들이 인간을 포함하는 여러 종의 숙주 세포를 감염시킬 수 있음을 의미한다. 하나의 구현예에서, 발현될 유전자는 레트로바이러스 gag, pol 및/또는 env 서열을 대체한다. 다수의 예시적 레트로바이러스 시스템이 기재된 바 있다[예를 들어 미국특허 제5,219,740호; 제6,207,453호; 제5,219,740호; 문헌 「Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14」 ; 「Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852」 ; 「Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037」 ; 및 「Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109」 참조].

- [0817] 렌티바이러스 형질도입 방법은 공지되어 있다. 예시적 방법은, 예를 들어 문헌 「Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701」; 「Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637-1644」; 「Verhoeven et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114」 및 「Cavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505」에 기재되어 있다.
- [0818] 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 전기천공을 통해 T 세포내로 전달된다[예를 들어 문헌 「Chicaybam et al., (2013) PLoS ONE 8(3): e60298」 및 「Van Tedeloo et al., (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437」 참조]. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 트랜스포지션(transposition)를 통해 T 세포내로 전달된다[예를 들어 문헌 「Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437」; 「Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74」; 및 「Huang et al., (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126」 참조]. 면역 세포에서 유전 물질을 도입 하여, 발현시키는 다른 방법으로는 인산칼륨 형질주입[예를 들어 문헌 「Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.」에 기재된 바와 같음], 원형질체 융합, 양이온성 리포솜 매개 형질주입; 텅스텐 입자 촉진 미립자 충격[문헌 「Johnston, Nature, 346: 776-777(1990)」]; 및 스트론튬 인산 염 DNA 공-침전[문헌 「Brash et al., Mol Cell Biol, 7: 2031-2034(1987)」 참조]을 포함한다.
- [0819] 재조합 산물을 암호화하는 핵산의 전달을 위한 다른 접근법 및 벡터에는, 예를 들어 국제공개공보 제 WO2014/055668호 및 미국특허 제7,446,190호에 기재된 것들이 있다.
- [0820] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 T 세포는 증식 도중 또는 증식 후에 예를 들어 T 세포 수용체(TCR) 또는 키 메라 항원 수용체(CAR)로 형질주입될 수 있다. 원하는 수용체 유전자의 도입을 위한 이러한 형질주입은 예를 들어 임의의 적합한 레트로바이러스 벡터로 수행될 수 있다. 그 후, 유전적으로 변형된 세포 집단은 초기 자극 (예를 들어 항-CD3/항-CD28 자극)으로부터 유리될 수 있고, 이어서, 예를 들어 새로 도입된 수용체를 통하여 제 2 유형의 자극으로 자극될 수 있다. 이 제 2 유형의 자극은 펩티드/MHC 분자 형태의 항원 자극, 유전적으로 도입된 수용체의 동족(가교성) 리간드(예를 들어 CAR의 천연 리간드) 또는(예를 들어 수용체 내 불변 영역을 인식 함으로써) 새로운 수용체의 구조 내에 직접 결합하는 기타 리간드(항체 등)를 포함할 수 있다. 예를 들어 문헌 「Cheadle et al, "Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy" Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66」 또는 「Barrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014).」를 참조한다.
- [0821] 일부 경우에, 세포, 예를 들어 T 세포가 활성화되는 것을 요하지 않는 벡터가 사용될 수 있다. 이러한 일부 경우에서, 세포는 활성화 전에 선별 및/또는 형질도입될 수 있다. 따라서, 세포는, 세포의 배양 전에 또는 후에, 그리고 경우에 따라서는 상기 배양과 동시에 적어도 일부의 상기 배양도중에 조작될 수 있다.
- [0822] 부가적인 핵산들 중에서도, 예를 들어 도입을 위한 유전자로는 예를 들어 전달된 세포의 생존능 및/또는 기능을 촉진함으로써 치료 효능을 향상시키는 것들; 예를 들어 생체내 생존 또는 국소화를 위해, 세포의 선별 및/또는 평가를 위한 유전자 마커를 제공하기 위한 유전자; 문헌 「Lupton S. D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991)」에 설명된 바와 같이 생체내 음성 선별에 민감한 세포; 및 T2A, P2A, E2A를 만들어냄으로써, 안정성을 향상시키는 유전자를 들 수 있다. 예를 들어 우세한(dominant) 양성 선별가능한 마커와 음성 선별가능한 마커를 융합시켜 유도된 이중기능성 선별가능한 융합 유전자의 사용에 대해 설명한 문헌 「Lupton S. D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991)」에 설명된 바와 같이 생체내 음성 선별에 민감한 세포; 및 T2A, P2A, E2A를 만들어냄으로써, 안정성을 향상시키는 유전자를 들 수 있다. 또한 예를 들어 Lupton 등의 국제출원 제 PCT/US91/08442호 및 제PCT/US94/05601호를 참조한다. 또한 Riddell 등의 미국특허 제6,040,177호의 칼럼 14-17를 참조한다.
- [0823] **IV. 치료방법**
- [0824] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 방법, 예를 들어 섹션 I에 기재된 방법에 의해서 생성된 농축된 T 세포의 산출 조성물은 세포 요법제, 예를 들어 입양 세포 요법제로서 투여된다. 조작된 세포는 다양한 치료, 진단 및 예방 표시에 유용하다. 예를 들어 조작된 세포 또는 상기 조작된 세포를 포함하는 조성물은 대상체에서 다양한 질병 또는 병태를 치료하는데 유용하다. 상기 방법 및 용도는 예를 들어 질병, 병태, 또는 장애, 예를 들어 종양 또는 암을 갖는 대상체에게 상기 조작된 세포, 또는 그를 포함하는 조성물의 투여를 포함한 치료학적 방법 및 용도를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 조작된 세포 및 그를 포함하는 조성물은 상기 질병 또는 장애의 치료를 수행하는데 효과적인 양으로 투여된다. 용도는 상기 치료학적 방법을 수행하기 위해서 상기 방법 및 치료에서 상기 조작된 세포 또는 조성물의 사용 및 약제의 제조를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 상기 질병 또는 병태를 갖거나 또는 갖는 것으로 의심받는 대상체에게 상기 조작된 세포, 또는 그를 포함하는 조성물을 투여함으로써 실행된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 그에 의해서 대상체의 질병 또는 병태 또는 장애를 치료

한다.

- [0825] 특정 구현예에서, 하나 이상의 세포 조성물, 예를 들어 본원에서 기술된 산출 세포 조성물은 세포 요법제로서 투여된다. 특정 구현예에서, 본원에 제공된 상기 방법은 세포 요법제로서 투여되는 단일 생물학적 샘플로부터 단리, 선별 및/또는 농축된 투입 세포로부터 농축된 T 세포의 단일 산출 조성물을 생성한다. 특정 구현예에서, 상기 단일 산출 조성물은 농축된 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 조성물이다. 입양 세포 요법제용 세포의 투여방법은 공지되어 있으며 상기 제공된 방법 및 조성물과 관련하여 사용될 수 있다. 예를 들어 입양 T 세포 요법은 로젠 베르그(Rosenberg)의 미국특허출원공개공보 제US2003/0170238호 및 미국특허 제4,690,915호, 문헌 「Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85」에 기술되어 있으며, 문헌 「Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933」, 「Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9」, 「Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338」을 참조할 수 있다. 치료되는 질병 또는 병태는 항원의 발현이 질병 상태 또는 장애의 병인과, 예를 들어 지병, 상태 또는 장애와 같은 원인이되거나, 악화시키거나 그렇지 않으면 관여된, 관련되고 및/또는 병인과 관련된 임의의 것일 수 있다. 예시적인 질병 및 상태는 세포의 악성 또는 형질 전환(예를 들어 암), 자가 면역 또는 염증성 질병, 또는 전염성 질병과, 예를 들어 박테리아, 바이러스 또는 다른 병원체에 야기되는, 관련된 질병 또는 병태를 포함 할 수 있다. 치료 될 수있는 다양한 질병 및 상태와 관련된 항원을 포함하는 예시적인 항원은 위에서 기술된 임의의 항원을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 키메라 항원 수용체 또는 트랜스제닉 TCR은 질병 또는 병태와 관련된 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0826] 치료되는 질병 또는 병태는 항원의 발현이 질병 상태 또는 장애의 병인과, 예를 들어 지병, 상태 또는 장애와 같은 원인이되거나, 악화시키거나 그렇지 않으면 관여된, 관련되고 및/또는 병인과 관련된 임의의 것일 수 있다. 예시적인 질병 및 상태는 세포의 악성 또는 형질 전환(예를 들어 암), 자가 면역 또는 염증성 질병, 또는 전염성 질병과, 예를 들어 박테리아, 바이러스 또는 다른 병원체에 야기되는, 관련된 질병 또는 병태를 포함 할 수 있다. 치료 될 수있는 다양한 질병 및 상태와 관련된 항원을 포함하는 예시적인 항원은 위에서 기술된 임의의 항원을 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 키메라 항원 수용체 또는 트랜스제닉 TCR은 질병 또는 병태와 관련된 항원에 특이적으로 결합한다.
- [0827] 상기 질병, 병태 및 장애 중에는, 종양, 예를 들어 고형 종양, 혈액학적 악성종양, 및 흑색종이 있고, 국소화된 및 전이성 종양, 감염성 질병, 예를 들어 바이러스 또는 기타 병원체로의 감염, 예를 들어 HIV, HCV, HBV, CMV, HPV, 및 기생충 질병, 및 자가면역 및 염증성 질병이 있다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 종양, 암, 악성 종양, 신생물, 또는 다른 증식성 질병 또는 장애이다. 이러한 질병은 제한되지는 않지만 백혈병, 림프종, 예를 들어 급성 골수성(또는 골수성) 백혈병(AML), 만성 골수성(또는 골수성) 백혈병(CML), 급성 림프성(또는 림프 모구성), 만성 림프성 백혈병(CLL), 털세포 백혈병(HCL), 소형 림프구성 림프종(SLL), 맨틀 세포 림프종(MCL), 한계 부위 림프종, 버킷 림프종, 호지킨 림프종(HL), 비호지킨 림프종(NHL), 미분화 대형세포 림프종(ALCL), 여포성 림프종, 난치성 여포성 림프종, 미만성 대형 만성 B세포 림프종(DLBCL) 및 다발성 골수종(MM)을 포함한다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 급성 림프 구성 백혈병(ALL), 성인 ALL, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 비호지킨 림프종(NHL) 및 미만성 대형 B세포 림프종(DLBCL) 중에서 선택된 B 세포 악성 종양이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 NHL이고 NHL은 공격성 NHL, 미만성 대형 B세포 림프종(DLBCL), NOS(드 노보 및 무통성으로부터 전환), 원발성 종격동 대형 B세포 림프종(PMBCL), T 세포/조각구 풍부 대형 B 세포 림프종(TCHRBCL), 버킷 림프종, 맨틀 세포 림프종(MCL) 및/또는 여포성 림프종(FL), 선택적으로 여포성 림프종 등급 3B(FL3B)이다.
- [0828] 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 감염성 질병 또는 병태, 예를 들어 바이러스, 레트로바이러스, 박테리아, 및 원충 감염, 면역결핍, 사이토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus)(EBV), 아데노바이러스, BK 폴리오마바이러스(polyomavirus)이나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 자가면역 또는 염증성 질병 또는 병태, 예를 들어 관절염, 예를 들어 류머티즘성 관절염(RA), I형 당뇨병, 전신 홍반성 낭창(SLE), 염증성 장 질병, 건선, 경피증, 자가면역 갑상선 질병, 그레이브스병(Grave's disease), 크론병(Crohn's disease) 다발성 경화증, 천식, 및/또는 이식 관련 질병 또는 병태이다.
- [0829] 일부 구현예에서, 질병 또는 병태와 관련된 항원은 $\alpha v\beta 6$ 인테그린(avb6 인테그린), B 세포 성숙 항원(BCMA), B7-H3, B7-H6, 탄산 무수화 효소 9(CA9, 또한 CAIX 또는 G250으로도 알려짐), 암-고환 항원, 암/고환 항원 1B(CTAG, NY-ESO-1 및 LAGE-2로도 알려짐), 배암종 항원(CEA), 사이클린, 사이클린 A2, C-C 모터프 케모카인 리간드 1(CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, 콘드로틴 설페이트 프로테오글리칸 4(CSPG4), 표피 성장 인자 단백질(EGFR), III 형 상피 성장 인자 수용체 돌연변이(EGFR vIII), 상피 당단백 2(EPG-2), 상피 당단백 40(EPG-40), 에프린B2, 에프린 수용체

A2(EpHa2), 에스트로젠 수용체, Fc 수용체 유사 5(FcRL5, Fc 수용체 상동체 5 또는 FCRH5로도 알려짐), 테아아세틸콜린 수용체(테아 AchR), 엽산 결합 단백질(FBP), 엽산 수용체 알파, 강글리오사이드 GD2, 0-아세틸화 GD2(OGD2), 강글리오사이드 GD3, 당단백질 100(gp100), 글피피칸-3(GPC3), G 단백질 결합 수용체 부류 C 그룹 5 멤버 D(GPCR5D), Her2/neu(수용체 티로신 키나아제 erb-B2), Her3(erb-B3), Her4(erb-B4), erbB 이량체, 인간 고분자량-흑색종-관련 항원(HMW-MAA), 헤파티티스 B 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1(HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2(HLA-A2), IL-22 수용체 알파(IL-22R α), IL-13 수용체 알파 2(IL-13R α2), 키나아제 삽입 도메인 수용체(kdr), 카파 경쇄, L1 세포 부착 분자(L1-CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 류신 리치 리피드 함유 8 패밀리 멤버 A(LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종-관련 항원(MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, 메소텔린(MSLN), c-Met, 쥐과 사이토메갈로바이러스(CMV), 뮤신 1(MUC1), MUC16, 자연 킬러 그룹 2 멤버 D(NKG2D) 리간드, 멜란 A(MART-1), 신경 세포 접착 분자(NCAM), 중앙태아성 항원, 흑색종 우선 발현 항원(PRAME), 프로게스테론 수용체, 전립선 특이 항원, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선 특이 막항원(PSMA), 수용체 티로신 키나아제 유사 희귀 수용체 1(ROR1), 서바이빈(survivin), 영양막 당단백질(TPBG, 5T4로도 알려짐), 중앙-관련 당단백질 72(TAG72), 티로시나제 관련된 단백질 1(TRP1, TYRP1 또는 gp75로도 알려짐), 티로시나제 관련된 단백질 2(TRP2, 도파크롬 타우토머라제, 도파크롬 델타-아이소머라제 또는 DCT), 혈관 내피 장 인자 수용체(VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(VEGFR2), 윌름 종양 1(WT-1), 병원체-특이적 또는 병원체-발현된 항원, 또는 보편적 태그 관련 항원, 및/또는 비오틴화 분자, 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체에 의해 발현되는 분자이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에 있어서, 수용체에 의해 표적화된 항원은 B 세포 악성종양과 관련된 항원을 포함하는데, 예를 들어 다수의 공지된 B 세포 마커 중 어느 하나이다. 일부 구현예에 있어서, 항원은 CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig카파, Ig람다, CD79a, CD79b 또는 CD30이거나 이를 포함한다.

[0830] 일부 구현예에서, 상기 질병 또는 병태는 B 세포 악성 종양이다. 일부 구현예에서, 상기 B 세포 악성 종양은 백혈병 또는 림프종이다. 일부 측면에서, 상기 질병 또는 병태는 급성 림프구성 백혈병(ALL), 성인 ALL, 만성 림프구성 백혈병(CLL), 비호지킨 림프종(NHL) 또는 미만성 대형 B세포 림프종(DLBCL)이다. 일부 경우, 상기 질병 또는 병태는 NHL, 예를 들어 공격성 NHL, 미만성 대형 B세포 림프종(DLBCL), NOS(드 노보 및 무통성으로부터 전환), 원발성 종격동 대형 B세포 림프종(PMBCL), T 세포/조각구 풍부 대형 B 세포 림프종(TCHRBCL), 버킷 림프종, 맨틀 세포 림프종(MCL) 및/또는 여포성 림프종(FL), 선택적으로 여포성 림프종 등급 3B(FL3B)인 NHL이거나 그것을 유도하는 것이다. 일부 측면에서, 재조합 수용체, 예를 들어 CAR은, 상기 질병 또는 병태와 관련된 항원에 특이적으로 결합하거나 또는 상기 B 세포 악성 종양과 관련된 병변 환경의 세포에서 발현된다. 일부 구현예에서 수용체에 의해 표적화된 항원은 다수의 공지된 B 세포 마커 중 임의의 것과 같은 B 세포 악성 종양과 관련된 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화된 항원은 CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig κ, Ig λ, CD79a, CD79b 또는 CD30, 또는 그의 조합물이다.

[0831] 일부 구현예에서, 상기 질병 또는 병태는 골수종, 예를 들어 다발성 골수종이다. 일부 측면에서, 상기 재조합 수용체, 예를 들어 CAR은 상기 질병 또는 병태와 관련된 항원에 특이적으로 결합하거나 또는 상기 다발성 골수종과 관련된 병변 환경의 세포에서 발현된다. 일부 구현예에서 상기 수용체에 의해서 표적화된 항원은 다발성 골수종과 관련된 항원을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 항원, 예를 들어 제 1 또는 부가 항원, 예를 들어 상기 질병-특이적 항원 및/또는 관련된 항원은 다발성 골수종, 예를 들어 B 세포 성숙 항원(BCMA), G 단백질-커플링된 수용체 클래스 C 그룹 5 멤버 D(G protein-coupled receptor class C group 5 member D; GPCR5D), CD38 (사이클릭 ADP 리보스 하이드로라제), CD138(신데칸-1, 신데칸, SYN-1), CS-1(CS1, CD2 서브세트 1, CRACC, SLAMF7, CD319, 및 19A24), BAFF-R, TACI 및/또는 FcRH5 상에서 발현된다. 다른 예시적인 다발성 골수종 항원은 CD56, TIM-3, CD33, CD123, CD44, CD20, CD40, CD74, CD200, EGFR, β2-마이크로글로불린, HM1.24, IGF-1R, IL-6R, TRAIL-R1, 및 액티빈 수용체 유형(activin receptor type) IIA(ActRIIA)를 포함한다. [문헌 「Benson and Byrd, J. Clin. Oncol. (2012) 30(16): 2013-15; Tao and Anderson, Bone Marrow Research (2011):924058」; 「Chu et al., Leukemia (2013) 28(4):917-27」; 「Garfall et al., Discov Med. (2014) 17(91):37-46」 참조]. 일부 구현예에서, 상기 항원은 항원은 림프종, 골수종, AIDS-관련 림프종 및/또는 이식 후 림프 증식에 존재하는 것들, 예를 들어 CD38을 포함한다. 이러한 항원에 대한 항체 또는 항원 결합 단편은 공지되어 있으며, 예를 들어 미국특허 제8,153,765호; 제8,603,477호, 제8,008,450호; 미국특허출원공개공보 제US2012/0189622호 또는 제US2010/0260748호; 국제공개공보 제WO2006099875호, 제WO2009080829호 또는 제WO2012092612호 또는 제WO2014210064호에 기술된 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 항체 또는 그의 항원-결합 단편(예를 들어 scFv)은 다중 특이적 항체, 다중 특이적 키메라 수용체, 예를 들어 다중 특이적 CAR, 및/또는 다중 특이적 세포에 함유되어 있다.

[0832] 일부 구현예에서, 상기 질병 또는 장애는 G 단백질-커플링된 수용체 클래스 C 그룹 5 멤버 D(G protein-coupled

receptor class C group 5 member D; GPRC5D)의 발현 및/또는 B 세포 성숙 항원(BCMA)의 발현과 관련된다.

- [0833] 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는 B-세포-관련된 장애이다. 상기 제공된 방법의 일부 임의의 구현예에서, BCMA와 관련된 질병 또는 장애는 자가 면역 질병 또는 장애이다. 상기 제공된 방법의 일부 임의의 구현예에서, 상기 자가 면역 질병 또는 장애는, 제한되지는 않지만, 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 루푸스 신염, 염증성 장 질환, 류마티스 관절염(예를 들어 청소년 류마티스 관절염), ANCA 관련 혈관염, 특발성 혈소판 감소증 자반증(idiopathic thrombocytopenia purpura; ITP), 혈전성 혈소판 감소증 자반증(thrombotic thrombocytopenia purpura; TTP), 자가 면역 혈소판 감소증, 차 가스 병(Chagas' disease), 그레이브 병(Grave's disease), 베게너의 육아종증(Wegener's granulomatosis), 다발성 동맥염, 스요그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 천포창(pemphigus vulgaris), 경피증, 다발성 경화증, 건선, IgA 신증, IgM 다발성 신경 병증, 혈관염, 당뇨병, 레이노드 증후군(Reynaud's syndrome), 항-인지질 증후군(anti-phospholipid syndrome), 굿패스트처 질환(Goodpasture's disease), 가와사키 질환(Kawasaki disease), 자가 면역 용혈성 빈혈(autoimmune hemolytic anemia), 중증 근무력증(myasthenia gravis) 또는 진행성 사구체 신염을 포함한다.
- [0834] 일부 구현예에서, 상기 질병 또는 병태는 암이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 GPRC5D-발현 암이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 형질세포 악성 종양(plasma cell malignancy)이고 상기 형질세포 악성 종양은 다발성 골수종(MM) 또는 형질세포종(plasmacytoma)이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 다발성 골수종(MM)이다. 일부 구현예에서, 상기 암은 재발성/불응성 다발성 골수종(relapsed/refractory multiple myeloma)이다.
- [0835] 일부 구현예에서, 항원은 병원체-특이적 또는 병원체-발현된 항원이거나, 또는 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 항원은 바이러스 항원(예를 들어 HIV, HCV, HBV 등으로부터의 바이러스 항원), 박테리아 항원 및/또는 기생충 항원이다.
- [0836] 일부 구현예에서, 세포 요법, 예를 들어 입양 T 세포 요법은 자가조직 전달 (autologous transfer)에 의하여 수행되는데, 자가조직 전달에서 세포는 상기 세포 요법을 받는 대상체로부터 또는 그러한 대상체로부터 유래한 샘플로부터 분리 및/또는 달리는 제조된다. 따라서, 일부 측면에서, 세포는 대상체, 예를 들어 치료를 필요로 하는 환자로부터 유래하고, 상기 세포는, 분리 및 가공 다음에 동일한 대상체에게 투여된다.
- [0837] 일부 구현예에서, 세포 요법, 예를 들어 입양 T 세포 요법은 동종이계 전달 (allogeneic transfer)에 의해 수행되는데, 동종이계 전달에서 세포는 상기 세포 요법을 받거나 궁극적으로 받는 대상체, 예를 들어 제 1 대상체 이외의 대상체로부터 분리 및/또는 달리는 제조된다. 그러한 구현예에서, 세포는 그 후 동일한 종의 상이한 대상체, 예를 들어 제 2 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 제 1 및 제 2 대상체는 유전적으로 동일하다. 일부 구현예에서, 제 1 및 제 2 대상체는 유전적으로 유사하다. 일부 구현예에서, 제 2 대상체는 제 1 대상체와 동일한 HLA 클래스 또는 수퍼타입을 발현한다.
- [0838] 예를 들어 세포는 볼루스 주입, 주사, 예를 들어 정맥내 또는 피하 주사, 안내 주사, 눈 주위 주사, 망막하 주사, 유리체내 주사, 경 중격 주사, 공막하 주사, 맥락막내 주사, 전방내 주사, 결막하 주사 (subconjunctival injection), 결막하 주사 (subconjunctival injection), 안각건하 주사, 안구후 주사, 안구 주위 주사 또는 후방 공막 부근 전달에 의한 임의의 적절한 수단에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 이들은 비경구, 폐내 및 비내, 및 국소 치료가 필요한 경우, 병변내 투여에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 단일 볼루스 투여에 의해 소정의 투여량이 투여된다. 일부 구현예에서, 이는, 예를 들어 3일 이하의 기간에 걸쳐, 세포의 다회의 볼루스 투여 또는 세포의 연속 주입 투여에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 세포 복용량의 투여 또는 임의의 추가적인 요법, 예를 들어 림프구고갈 요법, 중재 요법 및/또는 병용 요법은 외래 환자 전달을 통해 수행된다.
- [0839] 질병의 예방 또는 치료를 위해, 적절한 투여량은 치료될 질병의 유형, 세포 또는 재조합 수용체의 유형, 질병의 중증도 및 경과, 세포가 예방적 또는 치료적 목적으로 투여되는지 여부, 이전의 치료, 대상체의 임상 기록 및 세포에 대한 반응, 주치의의 재량에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물 및 세포는 한 번에 또는 일련의 치료를 통해 적절하게 대상체에게 투여된다.
- [0840] 일부 구현예에서, 세포는 항체 또는 조작된 세포 또는 수용체, 세포 독성 또는 치료제와 같은 제제와 같은 또 다른 또는 추가의 치료적 중재와의 병용 치료의 일부로서, 예를 들어 이와 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가 치료제와 함께 또는 또 다른 치료적 중재와 관련하여, 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 공동 투여된다. 일부 상황에서, 세포 집단이 하나 이상의 추가 치료제의 효과를 향상시키거나, 그 반대의 경우도 그러하도록, 충분히 근접한 시간에 또 다른 치료와 공동 투여된다.

일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가 치료제 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가적인 치료제 후에 투여된다. 하나 이상의 추가 제제는, 예를 들어 지속성을 향상시키기 위해, IL-2와 같은 사이토카인을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 방법은 화학요법 제제의 투여를 포함한다.

- [0841] 일부 구현예에서, 상기 방법은, 예를 들어 투여 전에 중앙 부담을 감소시키기 위하여 화학요법 제제, 예를 들어 컨디셔닝 화학요법 제제의 투여를 포함한다.
- [0842] 일부 측면에서, 면역고갈 (immunodepleting)(예를 들어 림프구고갈) 요법을 하는 전처치 (preconditioning) 대상체는 입양 세포 요법 (ACT)의 효과를 향상시킬 수 있다.
- [0843] 따라서, 일부 구현예에서, 상기 방법은 세포 요법의 개시 전에 대상체에게 전처치 시제를 투여하는 것을 포함하는데, 예를 들어 림프구고갈 또는 화학치료 시제, 예를 들어 사이클로포스파마이드, 플루다라빈 또는 이의 조합이다. 예를 들어 상기 대상체는 세포 요법의 개시 보다 적어도 2일 전에, 예를 들어 적어도 3, 4, 5, 6, 또는 7일 이전에 전처치 제제를 투여받는다. 일부 구현예에서, 상기 대상체는 세포 요법의 개시 보다 최대 7일 전에, 예를 들어 최대 6, 5, 4, 3 또는 2일 이전에 전처치 제제를 투여받는다.
- [0844] 일부 구현예에서, 대상체는 20mg/kg 내지 100mg/kg 사이, 또는 40mg/kg 내지 80mg/kg 사이 또는 약 그 정도의 투여량으로 사이클로포스파마이드를 이용하여 전처치된다. 일부 측면에서, 상기 대상체는 60mg/kg의 또는 약 그 정도의 사이클로포스파마이드로 전처치된다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파마이드는 단일 투여로 투여되거나 또는 복수 회 투여로, 예를 들어 매일, 격일로 또는 매 3일에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파마이드는 하루 또는 이틀간 1일 1회 투여된다. 일부 구현예에서, 림프구고갈 시제가 사이클로포스파마이드를 포함하는 경우, 대상체는 사이클로포스파마이드가 복용량 (약) 100mg/m² 내지 500mg/m², 예를 들어 (약) 200mg/m² 내지 400mg/m², 또는 250mg/m² 내지 350mg/m²의 복용량으로 투여된다. 일부 구체예에서, 대상체는 약 300mg/m²의 사이클로포스파마이드가 투여된다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파마이드는 단일 투여로 투여되거나 또는 복수 회 투여로, 예를 들어 매일, 격일로 또는 매 3일에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파마이드는 예를 들어 1-5일간, 예를 들어 3 내지 5일간 매일 투여된다. 일부 구체예에서, 대상체는 세포 요법의 개시 이전에, 3일간 매일, 약 300mg/m²의 사이클로포스파마이드가 투여된다.
- [0845] 일부 구현예에서, 림프구고갈 시제가 플루다라빈을 포함하는 경우, 대상체는 플루다라빈이 (약) 1mg/m² 내지 100mg/m², 예를 들어 (약) 10mg/m² 내지 75mg/m², 15mg/m² 내지 50mg/m², 20mg/m² 내지 40mg/m², 또는 24mg/m² 내지 35mg/m²의 복용량으로 투여된다. 일부 구체예에서, 대상체는 약 30mg/m²의 플루다라빈이 투여된다. 일부 구현예에서, 플루다라빈은 단일 투여로 투여되거나 또는 복수 회 투여로, 예를 들어 매일, 격일로 또는 매 3일에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 플루다라빈은 예를 들어 1-5일간, 예를 들어 3 내지 5일간 매일 투여된다. 일부 구체예에서, 대상체는 세포 요법의 개시 이전에, 3일간 매일, 약 30mg/m²의 플루다라빈이 투여된다.
- [0846] 일부 구현예에서, 림프구고갈 제제는 제제들의 조합, 예를 들어 사이클로포스파마이드 및 플루다라빈의 조합을 포함한다. 따라서, 상기 제제의 조합물은 임의의 투여량 또는 투여 스케줄로 사이클로포스파마이드를 포함할 수 있는데, 예를 들어 전술한 바와 같고, 상기 조합물은 임의의 투여량 또는 투여 스케줄로 플루다라빈을 포함할 수 있는데, 예를 들어 전술한 바와 같다. 예를 들어 일부 측면에서, 제 1 투여 또는 후속 투여 전에 60mg/kg (~ 2g/m²)의 사이클로포스파마이드 및 3 내지 5 투여량의 25mg/m²의 플루다라빈을 투여받는다.
- [0847] 세포의 투여 다음에, 일부 구현예에서, 조작된 세포 집단의 생물학적 활성을, 예를 들어 다수의 공지된 방법 중 임의의 방법에 의해 측정한다. 생체내의 경우, 예를 들어 영상화에 의해, 또는 생체외의 경우, 예를 들어 ELISA 또는 유세포 측정법에 의해 평가할 매개변수는 조작되거나, 천연의 T 세포 또는 다른 면역 세포의 항원에 대한 특이적 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, 조작된 세포가 표적 세포를 붕괴시키는 능력은, 예를 들어 문헌 [Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)], 및 [Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)]에 기재된 세포독성 분석과 같이, 당업계에 공지된 임의의 적절한 방법을 사용하여, 측정할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포의 생물학적 활성은 CD 107a, IFN γ , IL-2 및 TNF와 같은 하나 이상의 사이토카인의 발현 및/또는 분비를 분석함으로써 측정한다. 일부 측면에서, 생물학적 활성은 중앙 부담 또는 부하의 감소와 같은 임상 결과를 평가함으로써 측정한다.
- [0848] 특정 구현예에서, 조작된 세포는 치료적 또는 예방법적 효능을 증가시키는 임의의 많은 방법으로 추가로 변형된

다. 예를 들어 집단에 의해 발현된 조작된 CAR 또는 TCR은 직접적으로 또는 링커를 통해 간접적으로 표적화 모이어티에 접합될 수 있다. 화합물, 예를 들어 CAR 또는 TCR을 표적화 모이어티에 접합시키는 실시법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어 문헌 [Wadwa et al, J Drug Targeting 3: 111(1995)] 및 미국 특허 제 5,087,616호를 참조한다.

[0849] 일부 구현예에서, 세포는 항체 또는 조작된 세포 또는 수용체 또는 시제(예를 들어 세포 독성제 또는 치료제) 등의 또 다른 치료적 중재와 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로, 조합 치료의 일부로서 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가 치료제와 함께 또는 또 다른 치료적 중재와 관련하여, 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 공동 투여된다. 일부 상황에서, 세포 집단이 하나 이상의 추가 치료제의 효과를 향상시키거나, 그 반대의 경우도 그러하도록, 충분히 근접한 시간에 또 다른 치료와 공동 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가 치료제 전에 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가적인 치료제 후에 투여된다. 하나 이상의 추가 제제는, 예를 들어 지속성을 향상시키기 위해, IL-2와 같은 사이토카인을 포함한다.

[0850] **A. 투약(dosing)**

[0851] 일부 구현예에서, 세포의 복용량, 예를 들어 섹션 I-G에서와 같이 본원에서 기술된 산출 세포(output cell)는 제공된 방법에 따라, 및/또는 제공된 제조 물질 또는 조성물에 따라 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 복용량의 크기 또는 시점은 대상체의 특정 질병 또는 질병 상태의 함수로서 결정된다. 일부 경우에, 특정 질병에 대한 투여량의 크기 또는 투여 시기는 제공된 설명에 비추어 경험적으로 결정될 수 있다.

[0852] 일부 구현예에서, 세포의 복용량은 (약) 2×10^5 개의 세포/kg 내지 (약) 2×10^6 개의 세포/kg, 예를 들어 (약) 4×10^5 개의 세포/kg 내지 (약) 1×10^6 개의 세포/kg 또는 (약) 6×10^5 개의 세포/kg 내지 (약) 8×10^5 개의 세포/kg를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 복용량은 대상체의 체중 킬로그램 당 2×10^5 개 이하의 세포(예를 들어 항원-발현, 예를 들어 CAR-발현 세포) (세포/kg), 예를 들어 이하 (약) 3×10^5 개의 세포/kg, 이하 (약) 4×10^5 개의 세포/kg, 이하 (약) 5×10^5 개의 세포/kg, 이하 (약) 6×10^5 개의 세포/kg, 이하 (약) 7×10^5 개의 세포/kg, 이하 (약) 8×10^5 개의 세포/kg, 이하 (약) 9×10^5 개의 세포/kg, 이하 (약) 1×10^6 개의 세포/kg, 또는 이하 (약) 2×10^6 개의 세포/kg를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 복용량은 대상체의 체중 킬로그램 당 적어도 (약) 2×10^5 개의 세포(예를 들어 항원-발현, 예를 들어 CAR-발현 세포) (세포/kg), 예를 들어 적어도 (약) 3×10^5 개의 세포/kg, 적어도 (약) 4×10^5 개의 세포/kg, 적어도 (약) 5×10^5 개의 세포/kg, 적어도 (약) 6×10^5 개의 세포/kg, 적어도 (약) 7×10^5 개의 세포/kg, 적어도 (약) 8×10^5 개의 세포/kg, 적어도 (약) 9×10^5 개의 세포/kg, 적어도 (약) 1×10^6 개의 세포/kg, 또는 적어도 (약) 2×10^6 개의 세포/kg를 포함한다.

[0853] 특정 구현예에서, 세포, 또는 세포 서브 유형의 개별 집단은 대상체에게, 10만개 또는 약 10만개 내지 1000억개 또는 약 1000억개의 세포 범위 및/또는 대상체의 체중 kg당 세포의 양으로, 예를 들어 10만개 또는 약 10만개 내지 500억개 또는 약 500억개의 세포(예를 들어 500만개 또는 약 500만개의 세포, 2500만개 또는 약 2500만개의 세포, 5억개 또는 약 5억개의 세포, 10억개 또는 약 10억개의 세포, 50억개 또는 약 50억개의 세포, 200억개 또는 약 200억개의 세포, 300억개 또는 약 300억개의 세포, 400억개 또는 약 400억개의 세포, 또는 상기 값 중의 임의의 두 값으로 한정된 범위), 100만개 또는 약 100만개 내지 500억개 또는 약 500억개의 세포(예를 들어 500만개 또는 약 500만개의 세포, 2500만개 또는 약 2500만개의 세포, 5억개 또는 약 5억개의 세포, 10억개 또는 약 10억개의 세포, 50억개 또는 약 50억개의 세포, 200억개 또는 약 200억개의 세포, 300억개 또는 약 300억개의 세포, 400억개 또는 약 400억개의 세포, 또는 상기 값 중의 임의의 두 값으로 한정된 범위), 예를 들어 1000만개 또는 약 1000만개 내지 1000억개 또는 약 1000억개의 세포(예를 들어 2000만개 또는 약 2000만개의 세포, 3000만개 또는 약 3000만개의 세포, 4000만개 또는 약 4000만개의 세포, 6000만개 또는 약 6000만개의 세포, 7000만개 또는 약 7000만개의 세포, 8000만개 또는 약 8000만개의 세포, 9000만개 또는 약 9000만개의 세포, 100억개 또는 약 100억개의 세포, 250억개 또는 약 250억개의 세포, 500억개 또는 약 500억개의 세포, 750억개 또는 약 750억개의 세포, 900억개 또는 약 900억개의 세포 또는 상기 값 중 임의의 두 값으로 한정된 범위), 및 경우에 따라 1억개 또는 약 1억개 내지 500억개 또는 약 500억개의 세포(예를 들어 1억 2000만개 또는 약 1억 2000만개의 세포, 2억 5000만개 또는 약 2억 5000만개의 세포, 3억 5000만개 또는 약 3억 5000만개의 세포, 6억 5000만개 또는 약 6억 5000만개의 세포, 8억개 또는 약 8억개의 세포, 9억개 또는 약 9억개의 세포, 30억개 또는 약 30억개의 세포, 300억개 또는 약 300억개의 세포, 450억개 또는 약 450억개의 세포) 또는 이러

한 범위 사이의 임의의 값 및/또는 대상체의 체중 kg당 값으로 투여된다. 투여량은 질병 또는 장애 및/또는 환자 및/또는 다른 치료에 대한 특정 속성에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 복용량이 대상체의 신체 표면적 또는 체중에 결속되거나 이를 기초로 하지 않도록, 세포의 복용량은 세포의 일정 복용량 또는 세포의 고정 복용량이다.

[0854] 일부 구현예에서, 예를 들어 상기 대상체가 인간인 경우, 상기 복용량은 (약) 1×10^6 내지 (약) 5×10^8 개의 세포, 예를 들어 (약) 2×10^6 , 5×10^6 , 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 1.5×10^8 , 또는 5×10^8 개의 총 세포의 범위, 또는 상기 수치값 중의 임의의 2개 사이의 범위에서, 약 5×10^8 개 미만의 총 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 세포, T 세포, 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 포함한다. 일부 구현예에서, 예를 들어 상기 대상체가 인간인 경우, 상기 복용량은 (약) 2.5×10^7 내지 (약) 1.2×10^9 개의 세포, 예를 들어 (약) 2.5×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 , 1.5×10^8 , 8×10^8 , 또는 1.2×10^9 개의 총 세포의 범위, 또는 상기 수치값 중의 임의의 2개 사이의 범위에서, (약) 1×10^6 개 미만의 총 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 세포, T 세포, 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 (약) 2×10^9 개 미만의 총 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 세포, T 세포, 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를 포함한다.

[0855] 일부 구현예에서, 유전자 조작 세포의 복용량은 1×10^5 개 또는 약 1×10^5 개 내지 5×10^8 개 또는 약 5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 개 또는 약 1×10^5 개 내지 2.5×10^8 개 또는 약 2.5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 개 또는 약 1×10^5 개 내지 1×10^8 개 또는 약 1×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 개 또는 약 1×10^5 개 내지 5×10^7 개 또는 약 5×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 개 또는 약 1×10^5 개 내지 2.5×10^7 개 또는 약 2.5×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 개 또는 약 1×10^5 개 내지 1×10^7 개 또는 약 1×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 개 약 1×10^5 개 내지 5×10^6 개 또는 약 5×10^6 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 개 또는 약 1×10^5 개 내지 2.5×10^6 개 또는 약 2.5×10^6 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^5 개 또는 약 1×10^5 개 내지 1×10^6 개 또는 약 1×10^6 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 개 또는 약 1×10^6 개 내지 5×10^8 개 또는 약 5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 개 또는 약 1×10^6 개 내지 2.5×10^8 개 또는 약 2.5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 개 또는 약 1×10^6 개 내지 1×10^8 개 또는 약 1×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 개 또는 약 1×10^6 개 내지 5×10^7 개 또는 약 5×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 개 또는 약 1×10^6 개 내지 2.5×10^7 개 또는 약 2.5×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 개 또는 약 1×10^6 개 내지 1×10^7 개 또는 약 1×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^6 개 또는 약 1×10^6 개 내지 5×10^6 개 또는 약 5×10^6 개의 전체 CAR-발현 T 세포, from at or about 1×10^6 개 내지 at or about 2.5×10^6 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^6 개 또는 약 2.5×10^6 개 내지 5×10^8 개 또는 약 5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^6 개 또는 약 2.5×10^6 개 내지 2.5×10^8 개 또는 약 2.5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^6 개 또는 약 2.5×10^6 개 내지 1×10^8 개 또는 약 1×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^6 개 또는 약 2.5×10^6 개 내지 5×10^7 개 또는 약 5×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^6 개 또는 약 2.5×10^6 개 내지 2.5×10^7 개 또는 약 2.5×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^6 개 또는 약 2.5×10^6 개 내지 1×10^7 개 또는 약 1×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^6 개 또는 약 2.5×10^6 개 내지 5×10^6 개 또는 약 5×10^6 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 5×10^6 개 또는 약 5×10^6 개 내지 5×10^8 개 또는 약 5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 5×10^6 개 또는 약 5×10^6 개 내지 2.5×10^8 개 또는 약 2.5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 5×10^6 개 또는 약 5×10^6 개 내지 1×10^8 개 또는 약 1×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 5×10^6 개 또는 약 5×10^6 개 내지 5×10^7 개 또는 약 5×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 5×10^6 개 또는 약 5×10^6 개 내지 2.5×10^7 개 또는 약 2.5×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 5×10^6 개 또는 약 5×10^6 개 내지 1×10^7 개 또는 약 1×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^7 개 또는 약 1×10^7 개 내지 5×10^8 개 또는 약 5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포

포, 1×10^7 개 또는 약 1×10^7 개 내지 2.5×10^8 개 또는 약 2.5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^7 개 또는 약 1×10^7 개 내지 1×10^8 개 또는 약 1×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^7 개 또는 약 1×10^7 개 내지 5×10^7 개 또는 약 5×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^7 개 또는 약 1×10^7 개 내지 2.5×10^7 개 또는 약 2.5×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^7 개 또는 약 2.5×10^7 개 내지 5×10^8 개 또는 약 5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^7 개 또는 약 2.5×10^7 개 내지 2.5×10^8 개 또는 약 2.5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^7 개 또는 약 2.5×10^7 개 내지 1×10^8 개 또는 약 1×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^7 개 또는 약 2.5×10^7 개 내지 5×10^7 개 또는 약 5×10^7 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 5×10^7 개 또는 약 5×10^7 개 내지 5×10^8 개 또는 약 5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 5×10^7 개 또는 약 5×10^7 개 내지 2.5×10^8 개 또는 약 2.5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 5×10^7 개 또는 약 5×10^7 개 내지 1×10^8 개 또는 약 1×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^8 개 또는 약 1×10^8 개 내지 5×10^8 개 또는 약 5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 1×10^8 개 또는 약 1×10^8 개 내지 2.5×10^8 개 또는 약 2.5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 2.5×10^8 개 또는 약 2.5×10^8 개 내지 5×10^8 개 또는 약 5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 조작 세포의 복용량은 2.5×10^7 개 또는 약 2.5×10^7 개 내지 1.5×10^8 개 또는 약 1.5×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포, 예를 들어 5×10^7 개 또는 약 5×10^7 개 내지 1×10^8 개 또는 약 1×10^8 개의 전체 CAR-발현 T 세포를 포함한다.

[0856] 일부 구현예에서 유전자 조작된 세포의 복용량은 적어도 (약) 1×10^5 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 2.5×10^5 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 5×10^5 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 1×10^6 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 2.5×10^6 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 1×10^7 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 2.5×10^7 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 1×10^8 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 1.5×10^8 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 5×10^6 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 1×10^7 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 2.5×10^7 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 5×10^7 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 1×10^8 개의 CAR-발현 세포, 적어도 (약) 2.5×10^8 개의 CAR-발현 세포, 또는 적어도 (약) 5×10^8 개의 CAR-발현 세포를 포함한다.

[0857] 일부 구현예에서, 세포 요법은 각각 포함하기로, (약) 1×10^5 내지 (약) 5×10^8 개의 총 재조합 수용체-발현 세포, 총 T 세포, 또는 총 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC) 수, (약) 5×10^5 내지 (약) 1×10^7 개의 총 재조합 수용체-발현 세포, 총 T 세포, 또는 총 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC) 수, 또는 (약) 1×10^6 내지 (약) 1×10^7 개의 총 재조합 수용체-발현 세포, 총 T 세포, 또는 총 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC) 수를 포함하는 투여량의 투여를 포함한다. 일부 구현예에 있어서, 상기 세포 요법은 적어도 (약) 1×10^5 개의 총 재조합 수용체-발현 세포, 총 T 세포, 또는 총 말초 혈액 단핵구 세포(PBMC) 수를 포함하는 세포 투여량의 투여를 포함하는데, 예를 들어 적어도 (약) 1×10^6 개, 적어도 (약) 1×10^7 개, 적어도 (약) 1×10^8 개의 그러한 세포를 포함한다. 일부 구현예에 있어서, 상기 수는 CD3-발현 또는 CD8-발현의 총 수에 관한 것이며, 일부 경우, 재조합 수용체-발현(예를 들어 CAR-발현) 세포에 관한 것이다. 일부 구현예에 있어서, 상기 세포 요법은 각각 포함하기로, (약) 1×10^5 내지 (약) 5×10^8 개의 CD3-발현 또는 CD8-발현 총 T 세포 또는 CD3-발현 또는 CD8-발현 재조합 수용체-발현 세포, (약) 5×10^5 내지 (약) 1×10^7 개의 CD3-발현 또는 CD8-발현 총 T 세포 또는 CD3-발현 또는 CD8-발현 재조합 수용체-발현 세포, 또는 (약) 1×10^6 내지 (약) 1×10^7 개의 CD3-발현 또는 CD8-발현 총 T 세포 또는 CD3-발현 또는 CD8-발현 재조합 수용체-발현 세포 수를 포함하는 투여량의 투여를 포함한다. 일부 구현예에 있어서, 상기 세포 요법은 각각 포함하기로, (약) 1×10^5 내지 (약) 5×10^8 개의 총 CD3-발현/CAR-발현 또는 CD8-발현/CAR-발현 세포, (약) 5×10^5 내지 (약) 1×10^7 개의 총 CD3-발현/CAR-발현 또는 CD8-발현/CAR-발현 세포, 또는 (약) 1×10^6 내지 (약) 1×10^7 개의 총 CD3-발현/CAR-발현 또는 CD8-발현/CAR-발현 세포 수를 포함하는 투여량의 투여를

포함한다.

- [0858] 일부 구현예에 있어서, 상기 투여량 중 T 세포는 CD4-발현 T 세포, CD8-발현 T 세포 또는 CD4-발현 및 CD8-발현 T 세포를 포함한다.
- [0859] 일부 구현예에 있어서, 예를 들어 대상체가 인간인 경우, 예를 들어 CD4-발현 및 CD8-발현 T 세포를 포함하는 투여량에서, 상기 투여량 중의 CD8-발현 T 세포는 (약) 1×10^6 내지 (약) 5×10^8 개의 총 재조합 수용체 (예를 들어 CAR)-발현 CD8-발현 세포를 포함하는데, 예를 들어 (약) 5×10^6 내지 (약) 1×10^8 개의 그러한 세포, 예를 들어 1×10^7 , 2.5×10^7 , 5×10^7 , 7.5×10^7 , 1×10^8 , 1.5×10^8 , 또는 5×10^8 개의 총 그러한 세포, 또는 전술한 수치들 중 임의의 2 수치 사이의 개수이다. 일부 구현예에 있어서, 환자는 다회 투여량을 투여받고, 투여량 각각 또는 총 투여량은 전술한 수치들 중 어느 하나 이내일 수 있다. 일부 구현예에 있어서, 상기 세포 투여량은 각각 포함하기로, (약) 1×10^7 내지 (약) 0.75×10^8 개의 총 재조합 수용체-발현 CD8-발현 T 세포, (약) 1×10^7 내지 (약) 2.5×10^7 개의 총 재조합 수용체-발현 CD8-발현 T 세포, (약) 1×10^7 내지 0.25×10^8 개의 총 재조합 수용체-발현 CD8-발현 T 세포의 투여를 포함한다. 일부 구현예에 있어서, 상기 세포 투여량은 약 1×10^7 , 2.5×10^7 , 5×10^7 , 7.5×10^7 , 1×10^8 , 1.5×10^8 , 2.5×10^8 , 또는 5×10^8 개의 총 재조합 수용체-발현 CD8-발현 T 세포의 투여를 포함한다.
- [0860] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 재조합 수용체-발현 T 세포의 투여량은 단일 투여로 대상체에게 투여되거나 2주, 1개월, 3개월, 6개월, 1년 이상의 기간동안 단지 1회 투여된다.
- [0861] 입양 세포 요법과 관련하여, 주어진 "투여량"의 투여는 단일 조성물로서의 주어진 양 또는 수의 세포의 투여 및/또는 단일의 중단되지 않은 투여, 예를 들어 단회 주사 또는 연속 주입을 포함하며, 또한, 주어진 양 또는 개수의 세포를 분할 투여량으로서 또는 복수 조성물로서, 3일 이하와 같은 특정 기간동안 투여하는 것을 포함한다. 따라서, 일부 상황에서, 투여량은 단일 시점에서 주어지거나 개시되는 특정 세포 수의 단일 또는 연속 투여이다. 그러나 어떤 경우에는 투여량을 3일 이내의 기간동안 복수회 주사 또는 주입하여 투여하며, 예를 들어 3일동안 또는 2일동안 하루 1회 투여하거나 또는 1일의 기간동안 복수회 주입한다.
- [0862] 따라서, 일부 측면에서, 투여량의 세포는 단일 의약조성물로서 투여된다. 일부 구현예에서, 투여량의 세포는 투여량의 세포를 집합적으로 함유하는 복수의 조성물을 통해 투여된다.
- [0863] 일부 구현예에서, "분할 투여량(split dose)"이란 용어는 분할되어 하루 이상에 걸쳐 투여되는 투여량을 말한다. 이러한 유형의 투여는 본 발명의 방법에 포함되며 단일 투여량으로 간주된다.
- [0864] 따라서, 세포의 투여량은 분할 투여량으로서, 예를 들어 경시적으로 분할 투여량으로서 투여된다. 예를 들어 일부 구현예에 있어서, 투여량은 2일 또는 3일에 걸쳐 대상체에게 투여될 수 있다. 투여량을 분할하는 예시적인 방법은 제 1 일에 투여량의 25%를 투여하고 제 2일에 투여량의 나머지 75%를 투여하는 것을 포함한다.
- [0865] 다른 구현예에 있어서, 제 1 투여량의 33%는 제 1 일에 투여되고 나머지 67%는 제 2일에 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 투여량의 10%는 제 1 일에 투여되고, 투여량의 30%는 제 2 일에 투여되고, 투여량의 60%는 제 3 일에 투여된다. 일부 구현예에 있어서, 분할 투여량은 3일을 초과하여 이루어지지 않는다.
- [0866] 일부 구현예에서, 투여량의 세포는 각각 투여량 중 일부의 세포를 함유하는 복수개의 조성물 또는 용액의 투여에 의하여 투여될 수 있는데, 예를 들어 제 1 및 제 2 조성물 또는 용액, 필요에 따라 더 다수의 조성물 또는 용액의 투여에 의하는 것이다. 일부 측면에서, 각각 상이한 세포 집단 및/또는 서브-유형을 함유하는 복수개의 조성물은, 필요에 따라 특정 기간 내에 개별적이거나 독립적으로 투여된다. 예를 들어 세포의 집단 또는 서브-유형은, 각각 CD8+ 및 CD4+ T 세포 및/또는 각각 CD8+/-농축된 및 CD4+/-농축된 집단, 예를 들어 각각 재조합 수용체를 발현하도록 유전자 조작 세포들을 각기 포함하는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 투여량의 투여는 CD8+ T 세포의 투여량 또는 CD4+ T 세포의 투여량을 포함하는 제 1 조성물의 투여, 및 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포의 다른 투여량을 포함하는 제 2 조성물의 투여를 포함한다.
- [0867] 일부 구현예에서, 조성물 또는 투여량의 투여, 예를 들어 복수 개의 세포 조성물의 투여는 세포 조성물을 개별적으로 투여하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 개별적인 투여는 동시에 또는 어느 순서로든 순차적으로, 수행된다. 일부 구현예에서, 투여량은 제 1 조성물 및 제 2 조성물을 포함하고, 제 1 조성물 및 제 2 조성물은 0 내지 12시간 간격으로, 0 내지 6시간 간격으로 또는 0 내지 2시간 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 제 1

조성물의 투여 개시 및 제 2 조성물의 투여 개시는 2시간 이하의 간격으로, 1시간 이하의 또는 30 분 이하의, 15분 이하의, 10분 이하의 또는 5분 이하의 간격으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 제 1 조성물의 투여 개시 및/또는 완료 및 제 2 조성물의 투여의 완료 및/또는 개시는 2 시간 이하, 1시간 이하, 또는 30분 이하, 15분 이하, 10분 이하 또는 5분 이하의 간격으로 수행된다.

[0868] 일부 조성물에서, 제 1 조성물, 예를 들어 투여량 중 제 1 조성물은 $CD4^+$ T 세포를 포함한다. 일부 조성물에서, 제 1 조성물, 예를 들어 투여량 중 제 1 조성물은 $CD8^+$ T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 제 1 조성물은 제 2 조성물 이전에 투여된다.

[0869] 일부 구현예에서, 세포의 투여량 또는 조성물은 정의된 비율 또는 표적 비율의 재조합 수용체를 발현하는 $CD8^+$ 세포에 대한 재조합 수용체를 발현하는 $CD4^+$ 세포, 및/또는 $CD8^+$ 세포에 대한 $CD4^+$ 세포를 포함하는데, 여기의 비율은 선택적으로 대략 1:1 또는 대략 1:3 내지 대략 3:1 사이로, 예를 들어 대략 1:1이다. 일부 측면에서, 표적 비율 또는 원하는 비율의 상이한 세포 집단(예를 들어 $CD4^+$: $CD8^+$ 비율 또는 $CAR^+ CD4^+$: $CAR^+ CD8^+$ 비율, 예를 들어 1:1)을 갖는 조성물 또는 투여량의 투여는 상기 집단 중 하나를 함유하는 세포 조성물을 투여한 후 상기 집단 중 다른 것을 포함하는 개별적인 세포 조성물을 투여하는 것을 포함하는데, 여기서 투여는 상기 표적 비율 또는 원하는 비율로 또는 대략 그러한 비로 이루어진다. 일부 양태에서, 세포의 복용량 또는 조성물을 정해진 비율로 투여하면 T 세포 요법의 증폭, 지속성 및/또는 항종양 활성을 개선시킨다.

[0870] 일부 구현예에서, 대상체 세포의 다중 복용량, 예를 들어 2회 이상 복용량 또는 다중 연속 복용량을 받는다. 일부 구현예에서, 2회 복용량이 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 대상체는 연속 복용량을 받으며, 예를 들어 제 2 복용량은 제 1 복용량 이후 대략 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21 일에 투여된다. 일부 구현예에서, 다중 연속 복용량은, 추가의 복용량 또는 복용량들이 연속 복용량 투여 이후 투여되도록, 제 1 복용량 이후 투여된다. 일부 양태에서, 추가적인 복용량으로 대상체에 투여되는 세포의 수는 제 1 복용량 및/또는 연속 복용량과 동일하거나 이와 유사하다. 일부 구현예에서, 추가적인 복용량 또는 복용량은 이전의 복용량보다 더 크다.

[0871] 일부 측면에서, 제 1 및/또는 연속 복용량의 크기는 하나 이상의 기준에 기초하여 결정되는데, 예를 들어 화학 요법과 같은 선행 치료에 대한 환자의 반응, 대상체의 질병 부담, 예를 들어 종양 부하, 벌크, 크기 또는 정도, 세기, 또는 전이 유형, 단계 및/또는 독성 결과, 예를 들어 CRS, 대식세포 활성화 증후군, 종양 용해 증후군, 신경독성, 및/또는 투여되는 세포 및/또는 재조합 수용체에 대한 숙주 면역 반응을 일으킬 가능성 또는 발생 정도(incidence)에 기초한다.

[0872] 일부 양태에서, 제 1 복용량의 투여와 연속 복용량의 투여 사이의 시간은 약 9 내지 약 35 일, 약 14 내지 약 28일, 또는 15 내지 27 일이다. 일부 구현예에서, 연속 복용량의 투여는 제 1 복용량의 투여 이후 약 14 일 초과 및 약 28 일 미만의 시점이다. 일부 양태에서, 제 1 및 연속 복용량 사이의 시간은 약 21 일이다. 일부 구현예에서, 추가의 복용량 또는 복용량들, 예를 들어 연속 복용량은 연속 복용량 투여 이후 투여된다. 일부 양태에서, 추가적인 연속 복용량 또는 복용량은 이전 복용량의 투여 이후 적어도 약 14 일 및 약 28 일 미만에 투여된다. 일부 구현예에서, 추가적인 복용량은 이전 복용량 이후 약 14일 미만에, 예를 들어 이전 복용량의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 13일에 투여된다. 일부 구현예에서, 복용량은 이전 복용량 이후 약 14 일 미만으로 투여되지 않고 및/또는 복용량은 이전 복용량 이후 약 28 일 초과로 투여되지 않는다.

[0873] 일부 구현예에서, 세포의 복용량, 예를 들어 재조합 수용체-발현 세포는 T세포의 제 1 복용량 및 T세포의 연속 복용량을 포함하는 2 가지 복용량(예를 들어 이중 복용량)을 포함하고, 이러한 제 1 복용량 및 제 2 복용량 중 하나 또는 둘 모두는 T세포의 분할 복용량의 투여를 포함한다.

[0874] 일부 구현예에서, 세포의 복용량은 일반적으로 질병 부담을 감소시키는데 효과적인 정도로 충분히 크다.

[0875] 일부 구현예에서, 세포는 원하는 투여량으로 투여되는데, 이는 일부 측면에 있어서 원하는 투여량 또는 세포 수 또는 세포 유형(들) 및/또는 원하는 세포 유형의 비율을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 상기 세포의 투여량은 전체 세포 수 (또는 체중 kg당 세포 수) 및 개개의 서브-유형 집단의 원하는 비율, 예를 들어 $CD4^+$ 대 $CD8^+$ 비율에 기초한다. 일부 구현예에서, 상기 세포의 투여량은 개개 집단에서 세포의, 또는 개개의 세포 유형의 원하는 전체 세포 수 (또는 체중 kg 당 세포 수)에 기초한다. 일부 구현예에서, 상기 투여량은 이러한 특징의 조합에 기초하는데, 예를 들어 원하는 전체 세포 수, 원하는 비율, 및 개개 집단에서 원하는 전체 세포 수와

같은 특징이다.

- [0876] 일부 구현예에서, 세포 집단 또는 서브-유형, 예를 들어 CD8⁺ 및 CD4⁺ T 세포는 원하는 전체 세포의 투여량, 예를 들어 원하는 T 세포의 투여량의 용인되는 차이로, 또는 차이 이내로 투여된다. 일부 측면에서, 원하는 투여량은 원하는 세포의 수 또는 세포가 투여되는 대상체의 체중 단위 당 원하는 세포의 수로서, 예를 들어 세포/kg이다. 일부 측면에서, 원하는 투여량은 최소한의 세포 수 또는 체중 단위당 최소한의 세포 수이거나, 또는 그보다 많다. 일부 측면에서, 원하는 투여량으로 투여된 전체 세포 중에서, 각 집단 또는 서브-유형은 원하는 결과 비율로(예를 들어 CD4⁺ 대 CD8⁺ 비율), 또는 그 근처에 존재하는데, 예를 들어 그러한 비율의 특정 용인 차이 내이거나 오류내이다.
- [0877] 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 각 세포 집단 또는 서브-유형의 원하는 투여량, 예를 들어 CD4⁺ 세포의 원하는 투여량 및/또는 CD8⁺ 세포의 원하는 투여량의 용인되는 차이로 또는 그 이내로 투여된다. 일부 측면에서, 원하는 투여량은 상기 서브-유형 또는 집단의 원하는 세포 수, 또는 상기 세포가 투여되는 대상체의 체중 단위당 원하는 그러한 세포의 수, 예를 들어 세포/kg이다. 일부 측면에서, 원하는 투여량은 최소한의 세포 수 또는 체중 단위당 최소한의 세포 수이거나, 또는 그보다 많다.
- [0878] 따라서, 일부 구현예에서, 투여량은 전체 세포의 원하는 고정 투여량 및 원하는 비율에 기초하고, 및/또는 하나 이상의, 예를 들어 각각 개별적인 서브-유형 또는 서브-집단의 원하는 고정 투여량에 기초한다. 따라서, 일부 구현예에서, 투여량은 T 세포의 원하는 고정 또는 최소 투여량 및 원하는 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 비에 기초하고 및/또는 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포의 원하는 고정 또는 최소 투여량에 기초한다.
- [0879] 일부 구현예에서, 세포는 다수의 세포 집단 또는 서브-유형, 예를 들어 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포 또는 서브 유형의 원하는 결과 비의 용인 범위에서 또는 그 이내에서 투여된다. 일부 측면에서, 원하는 비는 특정 비율일 수 있고 또는 비율의 범위일 수 있다. 예를 들어 일부 구현예에서, 원하는 비율(예를 들어 CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 비율)은 (약) 1:5 내지 (약) 5:1 (또는 약 1:5 보다 크고, 약 5:1 보다 작음), 또는 (약) 1:3 내지 (약) 3:1 (또는 약 1:3 보다 크고, 약 3:1 보다 작음), 예를 들어 (약) 2:1 내지 (약) 1:5 (또는 약 1:5 보다 크고, 약 2:1 보다 작음)이고, 예를 들어 (약) 5:1, 4.5:1, 4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9: 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4, 1:4.5, 또는 1:5이다. 일부 측면에서, 상기 용인되는 차이는 상기 원하는 비의 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4% 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 및 이들 범위 사이의 임의의 수치를 포함하여 그 이내이다.
- [0880] 특정 구현예에서, 세포의 수 및/또는 농도는 제조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 세포의 수를 지칭한다. 다른 구현예에서, 상기 세포의 수 및/또는 농도는 투여된 모든 세포, T 세포 또는 말초 혈액 단핵구(PBMC)의 수 또는 농도를 말한다.
- [0881] 일부 측면에서, 투여량의 크기는 하나 이상의 기준에 기초하여 결정되는데, 예를 들어 화학요법과 같은 선행 치료에 대한 환자의 반응, 대상체의 질병 부담, 예를 들어 종양 부하, 벌크, 크기 또는 정도, 세기, 또는 전이 유형, 단계 및/또는 독성 결과, 예를 들어 CRS, 대식세포 활성화 증후군, 종양 용해 증후군, 신경독성, 및/또는 투여되는 세포 및/또는 제조합 수용체에 대한 숙주 면역 반응을 일으킬 가능성 또는 발생정도에 기초한다.
- [0882] 일부 구현예에서, 상기 방법은 또한 하나 이상의 추가적인 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 세포 복용량 및/또는 림프구교갈 요법을 투여하는 단계를 포함하거나, 및/또는 상기 방법의 하나 이상의 단계가 반복된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가적인 복용량은 초기 복용량과 동일하다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가적인 복용량은 초기 복용량과 상이하며, 예를 들어 초기 복용량보다, 예를 들어 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 이상 높거나, 또는 예를 들어 초기 복용량 보다 예를 들어 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배 또는 10배 이상 낮다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가적인 복용량의 투여는 초기 치료 또는 임의의 선행 치료에 대한 대상체의 반응, 대상체에서의 질병 부담, 예를 들어 종양 부하, 벌크, 크기 또는 정도, 세기, 또는 전이 유형, 단계 및/또는 독성 결과, 예를 들어 CRS, 대식세포 활성화 증후군, 종양 용해 증후군, 신경독성, 및/또는 투여되는 세포 및/또는 제조합 수용체에 대한 숙주 면역 반응을 일으킬 가능성 또는 발생정도에 기초하여 결정된다.
- [0883] **B. 반응, 효능 및 생존**

- [0884] 일부 구현예에서, 본원에서 제공된 방법, 예를 들어 섹션-I에서 기술된 방법에 의해서 생성된, 세포, 예를 들어 산출 세포가 대상체에 투여되고, 상기 대상체는 반응, 생존율, 및/또는 독성의 신호 또는 증후에 대해 모니터링 된다.
- [0885] 일부 구현예에서, 세포의 조성물, 예를 들어 CAR+ CD4+ 및 CD8+ T 세포를 함유하는 치료학적 세포 조성물로 치료된 대상체의 35% 이상, 40% 이상 또는 50% 이상이 차도(CR)을 보이고/이거나 상기 방법에 따라 치료된 대상체의 50% 이상, 60% 이상 또는 70% 이상은 객관적 반응률(ORR)을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료된 대상체의 적어도 (약) 50%, 대상체의 적어도 (약) 60%, 대상체의 적어도 (약) 70%, 대상체의 적어도 (약) 80% 또는 대상체의 적어도 (약) 90%는 CR을 나타내거나/내거나 객관적 반응(OR)을 나타낸다. 일부 구현예에서, 효과적인 치료를 위해 평가된 기준은 총괄 반응속도(overall response rate; ORR), 완전 반응률(complete response; CR), 반응 기간(duration of response; DOR), 증식-부재 생존율(progression-free survival; PFS), 및/또는 총괄 생존율(overall survival; OS)을 포함한다.
- [0886] 일부 구현예에서, 제공되는 방법에 따라 치료되는 대상체의 적어도 40% 또는 적어도 50%는 완전 완화(CR)를 달성하고, (약) 3 개월, 6 개월 또는 12 개월 이상의 무진행 생존(PFS) 및/또는 전체 생존(OS)을 나타내고; 평균적으로, 상기 방법에 따라 치료되는 대상체는 (약) 6 개월, 12 개월, 또는 18개월의 중간 PFS 또는 OS를 나타내고; 및/또는 대상체는 요법 이후 적어도 (약) 6, 12, 18 개월 이상동안 PFS 또는 OS를 나타낸다.
- [0887] 일부 측면에서, 무-진행 생존(PFS)은 질병, 예를 들어 암의 치료 중 또는 그 후에, 대상체가 그 질병을 앓고 있으나 더 악화되지는 않는 시간의 길이로서 설명된다. 일부 측면에서 객관적 반응(OR)은 측정 가능한 반응으로 설명된다. 일부 양태에서, 객관적 반응률(ORR)은 CR 또는 PR을 달성한 환자의 비율로서 설명된다. 일부 측면에서 전체 생존율(OS)은, 진단 날짜나 질병, 예를 들어 암에 대한 치료 개시 중 어느 하나로부터 상기 질병으로 진단된 대상체가 여전히 생존하는 시간의 길이로서 설명된다. 일부 측면에서, 무-사건 생존(EFS)은 암 치료가 종료된 후, 대상체가, 상기 치료가 방해되거나 지체되려 하였던 사건 또는 특정 합병증 없이 남아있는 시간의 길이로서 설명된다. 이러한 사건은 암이 회귀하거나 특정한 병태가 개시되는 것을 포함할 수 있는데, 예를 들어 뼈까지 퍼진 암으로부터의 뼈 통증이나 사망이다.
- [0888] 일부 구현예에서, 반응의 지속(DOR) 시간 측정은 종양 반응의 기록부터 질병 진행까지의 시간을 포함한다. 일부 구현예에서, 반응을 평가하는 파라미터는 지속 반응, 예를 들어 요법의 개시로부터 일정 기간 이후 지속되는 반응을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 지속 반응은 요법의 개시 이후 대략 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 또는 24 개월에서의 반응률에 의해 지시된다. 일부 구현예에서, 반응은 3 개월 초과 또는 6 개월 초과동안 지속된다.
- [0889] 일부 구현예에서, 상기 방법에 의해서 생성된 세포의 용량 또는 조성물을 투여하는 것은 대안의 방법에 의해서 발생된 세포를 사용하는 비교 가능한 방법으로 관찰될 감소에 비하여, 질병 또는 질병 상태의 부담, 예를 들어 종양 세포의 수, 종양의 크기, 환자 생존 기간 또는 무-사건 생존을 보다 큰 정도로 및/또는 더 긴 기간동안 감소시킨다. 일부 구현예에서, 대상체에서의 질병 또는 질병 상태의 부담은 검출, 평가 또는 측정된다. 질병 부담은 일부 측면에서, 대상체에서 또는 대상체의 기관, 조직 또는 체액, 예를 들어 혈액 또는 혈청에서 질병 또는 질병-관련 세포의 전체 수를 검출함으로써 검출될 수 있다. 일부 측면에서, 대상체의 생존, 특정 기간 내의 생존율, 생존 범위, 무-사건 또는 무-증상 생존 또는 무-재발 생존의 존재 또는 기간이 평가된다. 일부 구현예에서, 질병 또는 질병 상태의 임의의 병태가 평가된다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태의 임의의 증상이 평가된다. 일부 구현예에서, 질병 또는 질병 상태 부담의 척도가 특정된다.
- [0890] 일부 구현예에서, 대상체의 무-사건 생존률 또는 전체 생존률은, 상기 제공된 방법, 예를 들어 대안의 방법에 의해서 발생된 세포와 비교되는, 섹션-I에 기술된 방법으로부터 생성된 세포를 투여함으로써 개선된다. 예를 들어 일부 구현예에서, 상기 투여 다음 6 개월에 상기 방법으로 치료된 대상체들에 대한 무-사건 생존율 또는 확률은 40% 또는 약 40% 이상, 50% 또는 약 50% 이상, 60% 또는 약 60% 이상, 70% 또는 약 70% 이상, 80% 또는 약 80% 이상, 90% 또는 약 90% 이상, 또는 95% 또는 약 95% 이상이다. 일부 측면에서, 전체 생존율은 40% 또는 약 40% 이상, 50% 또는 약 50% 이상, 60% 또는 약 60% 이상, 70% 또는 약 70% 이상, 80% 또는 약 80% 이상, 90% 또는 약 90% 이상, 또는 95% 또는 약 95% 이상이다. 일부 구현예에서, 상기 방법으로 치료된 대상체는 무-사건 생존, 무-재발 생존, 또는 6개월 또는 약 6개월 이상, 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10년 이상 까지 생존을 나타낸다. 일부 구현예에서, 진행까지의 시간이 향상되는데, 예를 들어 진행까지의 시간은 6개월 또는 약 6개월 이상 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10년 이상이다.
- [0891] 일부 구현예에서, 상기 방법에 의한 치료 이후, 재발 가능성은, 다른 방법, 예를 들어 대상체가 대안의 방법에

의해서 생성된 세포를 함유하는 세포 요법제를 받는 방법과 비교하여, 감소된다. 예를 들어 일부 구현예에서, 제 1 투여 다음 6 개월에 재발 가능성은 80% 또는 약 80% 미만, 70% 또는 약 70% 미만, 60% 또는 약 60% 미만, 50% 또는 약 50% 미만, 40% 또는 약 40% 미만, 30% 또는 약 30% 미만, 20% 또는 약 20% 미만 또는 10% 또는 약 10% 미만이다.

[0892] C. 독성

[0893] 특정 구현예에서, 본원에서 제공된 방법, 예를 들어 섹션-I에서 기술된 방법에 의해서 생성된 세포, 예를 들어 산출 세포(output cell)가 대상체에 투여되고, 상기 대상체는 독성의 신호 또는 증후에 대해 모니터링된다.

[0894] 특정 구현예에서, 세포, 예를 들어 제공된 방법에 의해서 생성된 산출 세포의 용량 또는 조성물은, 예를 들어 대안의 세포 요법제, 예를 들어 대안의 방법에 의해서 생성된 CAR+ T 세포 조성물의 투여와 비교하여, 낮은 독성 비율 및/또는 낮은 독성 수준, 독성 결과 또는 병태, 독성-촉진 프로파일, 요인, 또는 성질, 예를 들어 사이토카인 방출 증후군 (CRS) 또는 신경독성과 관련되거나 이를 나타내는 병태 또는 결과를 초래한다.

[0895] 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법들에 의해서 생성된 세포들을 투여하는 것은 예를 들어 특정 다른 세포 요법제, 및/또는 대안의 방법에 의해서 생성된 세포들과 비교하여, 신경독성(NT), 사이토카인 방출 증후군(CRS)과 같은 독성 또는 독성 결과의 높은 비율 또는 가능성을 초래하지 않거나, 또는 독성 또는 독성 결과의 비율 또는 가능성을 감소시킨다. 일부 구현예에서, 상기 제공된 방법들에 의해서 생성된, 세포들, 예를 들어 산출 세포들을 투여하는 것은 중증 NT(sNT), 중증 CRS(sCRS), 대식세포 활성화 증후군, 중앙 용해 증후군, 3일 이상의 적어도 (약) 섭씨 38도의 발열 및 적어도 (약) 20mg/dL의 CRP 혈장 수준의 위험을 야기하지 않거나, 증가시키지 않는다. 일부 구현예에서, 제공된 방법에 따라 치료되는 대상체의 (약) 30%, 35%, 40%, 50%, 55%, 60% 이상은 임의의 등급의 CRS 또는 임의의 등급의 신경독성을 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 치료되는 대상체의 적어도 50%(예를 들어 치료되는 대상체의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 이상)은 등급 2 이상의 사이토카인 방출 증후군(CRS) 및/또는 등급 2 이상의 신경독성을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 방법에 따라 치료되는 대상체의 적어도 50%(예를 들어 치료되는 대상체의 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 이상)은 중증 독성 결과(예를 들어 중증 CRS 또는 중증 신경독성)을 나타내지 않거나, 예를 들어 등급 3 이상의 신경독성을 나타내지 않고 및/또는 중증 CRS를 나타내지 않거나, 또는 치료 후 특정 기간 내에, 예를 들어 세포의 투여 후 1주, 2주, 또는 1개월 이내에 이러한 독성을 나타내지 않는다. 일부 구현예에서, 특정 독성을 결정하기 위해 평가되는 파라미터로는 부작용(AE), 복용량-제한 독성(DLT), CRS 및 NT를 포함한다.

[0896] 키메라 항원 수용체를 발현하는 T 세포를 이용한 치료와 같은 입양 T 세포 요법제의 투여는 사이토카인 방출 증후군 및 신경독성과 같은 독성 효과 또는 결과를 유도할 수 있다. 일부 구현예에서, 이러한 효과 또는 결과는 관찰된 독성의 기초가 되는 순환하는 사이토카인의 높은 수준과 유사하다.

[0897] 일부 측면에서, 독성 결과는 사이토카인 방출 증후군 (CRS) 또는 중증 CRS (sCRS)와 연관되거나 또는 이를 나타낸다. CRS, 예를 들어 sCRS는 입양 T 세포 요법 이후 및 다른 생물학적 제품을 대상자에게 투여한 이후 발생할 수 있다[문헌 「Davila et al., Sci Transl Med 6, 224ra25 (2014); Brentjens et al., Sci. Transl. Med. 5, 177ra38 (2013); Grupp et al., N. Engl. J. Med. 368, 1509-1518 (2013); and Kochenderfer et al., Blood 119, 2709-2720 (2012); Xu et al., Cancer Letters 343 (2014) 172-78.」 참조].

[0898] 전형적으로, CRS는 예를 들어 T 세포, B 세포, NK 세포, 단구 및/또는 대식세포에 의해 매개되는 과장된 전신 면역 반응에 의해 유발된다. 이러한 세포는 사이토카인 및 케모카인과 같은 많은 양의 염증성 매개체를 방출할 수 있다. 사이토카인은 급성 염증 반응을 유발하거나 내피 기관 손상을 유도하여 미세 혈관 누출, 심부전 또는 사망을 초래할 수 있다. 중증의, 생명을 위협하는 CRS는 폐 침윤 및 폐 손상, 신부전 또는 과중된 혈관내 응고를 유발할 수 있다. 다른 중증의 생명을 위협하는 독성에는 심장 독성, 호흡 곤란, 신경독성 및/또는 간부전이 포함될 수 있다.

[0899] CRS는 항-염증성 요법 예를 들어 항-IL-6 요법, 예를 들어 항-IL-6 항체, 예를 들어 토실리주맙, 또는 항생제 또는 기재된 다른 시제를 사용하여 치료될 수 있다. CRS의 결과, 징후 및 병태는 공지되어 있으며, 본원에 설명된 병태를 포함한다. 일부 구현예에서, 특정 투여량 요법 또는 투여가 주어진 CRS-관련 결과, 병태 또는 병태에 영향을 미치지 않거나 영향을 미치는 경우, 특정 결과, 징후 및 병태 및/또는 양 또는 정도가 특정될 수 있다.

[0900] CAR- 발현 세포를 투여하는 맥락에서, CRS는 CAR을 발현하는 세포를 주입한 후 전형적으로 6-20 일에 나타난다 [문헌 「Xu et al., Cancer Letters 343 (2014) 172-78.」 참조]. 일부 경우에, CRS는 CAR T 세포 주입 후 6

일 미만 또는 20 일 이후에 발생한다. CRS 발병률 및 시기는 주입시의 베이스라인 사이토카인 수준 또는 종양 부하량과 관련될 수 있다. 일반적으로, CRS는 인터페론(IFN)- γ , 종양 괴사 인자(TNF)- α , 및/또는 인터루킨(IL)-2의 혈청 농도 상승을 포함한다. CRS에서 신속하게 유도될 수 있는 다른 사이토카인은 IL-1 β , IL-6, IL-8 및 IL-10이다.

[0901] CRS와 관련된 예시적인 결과는 발발열, 경직, 오한, 저혈압, 호흡 곤란, 급성 호흡 곤란 증후군 (ARDS), 뇌병변 증, ALT/AST 상승, 신부전, 심장 질병, 저산소증, 신경 장애 및 사망을 포함한다. 신경학적 합병증으로는 섬망, 발작-유사 행동, 혼동, 단어 찾기 어려움, 실어증, 및/또는 둔감(obtunded)하게 된다. 다른 CRS 관련 결과에는 피로, 메스꺼움, 두통, 발작, 빈맥, 근육통, 발진, 급성 혈관 누출 증후군, 간 기능 장애 및 신부전이 포함된다. 일부 양태에서, CRS는 혈청 페리틴, d-이합체, 아미노트랜스퍼라제, 락테이트 디하이드로게나제 및 트리글리세라이드와 같은 하나 이상의 요인의 증가, 또는 저섬유소원혈증(hypofibrinogenemia)또는 간비장비대(hepatosplenomegaly)와 관련이 있다.

[0902] sCRS 발병 위험이 더 높은 환자를 예측하기 위해 CRS 발병과 관련이 있는 것으로 나타난 CRS 기준이 개발되었다 [문헌 「Davilla et al. Science translational medicine. 2014;6(224):224ra25」 참조]. 인자로는 발발열, 저산소증, 저혈압, 신경학적 변화, 염증성 사이토카인, 예를 들어 7종의 사이토카인(IFN γ IL-5, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프랙탈카인, 및 GM-CSF)의 혈청 수준 상승과 같이 이의 치료-유도된 상승이 예비치료 종양 부담 및 sCRS 병태 모두와 잘 연관될 수 있는 것을 포함한다. CRS의 진단 및 관리에 관한 다른 지침이 알려져 있다[예를 들어 문헌 「Lee et al, Blood. 2014;124(2):188-95」 참조]. 일부 구현예에서, CRS 등급을 반영하는 기준은 하기 표 2에 기재된 기준이다.

표 2

CRS에 대한 예시적 등급 기준

[0903]

등급	증상의 설명
1 경미	생명을 위협하지 않으며, 오직 해열제 및 구토 방지제와 같은 증상적 치료만 필요(예를 들어 발열, 메스꺼움, 피로, 두통, 근육통, 불쾌감)
2 중등도	중등도의 증재를 필요로 하며 이에 반응함: - 산소 요구량 < 40%, 또는 - 체액 단일 승압제(vasopressor)의 낮은 투약에 반응하는 저혈압, 또는 - 등급 2의 장기 독성(CTCAE v4.0)
3 중증	공격형 증재를 필요로 하며 이에 반응함: - 산소 요구량 \geq 40%, 또는 - 단일 승압제의 높은 복용량을 필요로 하는 저혈압(예를 들어 노르에피네프린 \geq 20 μ g/kg/분, 도파민 \geq 10 μ g/kg/분, 페닐에프린 \geq 200 μ g/kg/분, 또는 에피네프린 \geq 10 μ g/kg/분 또는 - 다중 승압제를 필요로 하는 저혈압(예를 들어 바소프레신+상기 제제 중 하나, 또는 \geq 20 μ g/kg/분 노르에피네프린에 상당하는 조합 승압제), 또는 - 등급 3 장기 독성 또는 등급 4 아미노기전이변증(transaminitis)(CTCAE v4.0)
4 생명 위협	생명-위협: - 인공호흡기 지원 요구, 또는 - 등급 4의 장기 독성(아미노기전이변증 제외)
5 치명적	사망

[0904] 일부 구현예에서, CRS 등급을 반영하는 기준은 하기 표 3에 상세히 기재된 것들이다.

표 3

CRS에 대한 예시적 등급 기준

[0905]

증상/신호	등급 1(경미)	등급 2(중등도)	등급 3(중증)	등급 4(생명-위협)
		CRS 등급은 가장 중증 징후(발열 제외)에 의해 정해짐		
온도 \geq 38.5 $^{\circ}$ C/101.3 $^{\circ}$ C	Any	Any	Any	Any

수축기 혈압 ≤ 90mmHg	N/A	유체 또는 단일 저용량 혈관 수압제에 반응	고용량 또는 다중 수압제를 필요로 함	생명-위협
SaO ₂ > 90%에 도달하는데 필요한 산소	N/A	FiO ₂ < 40%	FiO ₂ < 40%	인공 호흡기 지원 필요
장기 독성	N/A	등급 2	등급 3 또는 아미노기전이변증	등급 4(아미노기전이변증 제외)

[0906] 일부 구현예에서, 대상체는 세포 치료제 또는 세포 복용량의 투여 후 다음을 나타내면, 세포 요법 또는 세포 투여량의 투여에 반응하여, 또는 이에 2차적으로 "중증 CRS"("sCRS")가 발병된 것으로 간주된다: (1) 적어도 3일간 적어도 섭씨 38 도의 발열; (2) 다음 중 하나를 포함하는 사이토카인 상승 (a) 투여 직후 수준과 비교하여 다음의 7개의 사이토카인의 그룹 중 적어도 2 개에 대한 적어도 75배의 최대 배수 변화: 인터페론 감마(IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프랙탈카인, 및 IL-5 및/또는 (b) 투여 직후 수준과 비교하여 다음의 7 개의 사이토카인의 그룹 중 적어도 1 개에 대한 적어도 250배의 최대 배수 변화: 인터페론 감마(IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프랙탈카인, 및 IL-5; 및 (c) 적어도 하나의 독성의 임상 징후, 예를 들어 저혈압(적어도 하나의 정맥내 혈관활성 수압제 필요) 또는 저산소증 (PO₂ < 90%) 또는 하나 이상의 신경 장애(정신 상태 변화, 혼란 및 발작 포함) 일부 구현예에서, 중증 CRS는 예를 들어 표 2 또는 표 3에 제시된 등급 3 이상의 CRS를 포함한다.

[0907] 일부 구현예에서, 중증 CRS 또는 등급 3 이상의, 예를 들어 등급 4 이상의 CRS와 관련된 결과는 다음 중 하나 이상을 포함한다: 지속적인 발열, 2일 이상, 에컨대 3일 이상, 예를 들어 4일 이상, 또는 적어도 3일 연속 특정 온도의 발열, 예를 들어 섭씨 약 38도 이상의 발열; 약 38도 이상의 발열; 적어도 2가지 사이토카인(예를 들어 인터페론 감마(IFN γ), GM-CSF, IL-6, IL-10, Flt-3L, 프랙탈카인, 및 IL-5, 및/또는 종양 괴사인자 알파(TNF α)로 이루어진 군 중 적어도 2 가지)의 전처리 수준에 비교시, 사이토카인의 상승, 예를 들어 적어도 약 75배와 같은 최대 배수 변화, 또는 이러한 사이토카인 중 적어도 한 가지의 적어도 또는 적어도 약 250배와 같은 최대 배수 변화; 및/또는 독성의 적어도 하나의 임상 징후, 예를 들어 저혈압(예를 들어 적어도 하나의 정맥내 혈관활성 수압제에 의해 측정); 저산소증(예를 들어 약 90% 미만의 혈장 산소(PO₂) 수준); 및/또는 하나 이상의 신경 장애(정신 상태 변화, 혼란 및 발작 포함) 일부 구현예에서, 중증 CRS는 집중 치료실(ICU)에서의 관리 또는 치료를 필요로 하는 CRS를 포함한다.

[0908] 일부 구현예에서, CRS, 예를 들어 중증 CRS는 (1) 지속적인 발열 (적어도 3일간 적어도 섭씨 38도의 발열) 및 (2) 적어도 (약) 20mg/dL의 CRP 혈청 수준의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, CRS는 둘 이상의 수압제를 필요로 하는 저혈압 또는 기계적 호흡을 필요로 하는 호흡 부전을 포함한다. 일부 구현예에서, 수압제의 복용량은 제 2 또는 후속 투여에서 증가된다.

[0909] 일부 구현예에서, 중증 CRS 또는 등급 3의 CRS는 알라닌 아미노트랜스퍼라제의 증가, 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제의 증가, 오한, 열성 호흡기 감소증, 두통, 좌심실 기능 장애, 뇌병증, 뇌수종, 및/또는 떨림을 포함한다.

[0910] 다양한 결과를 측정 또는 검출하는 방법이 특정될 수 있다.

[0911] 일부 양태에서, 독성 결과는 신경독성이거나, 이와 관련이 있다. 일부 구현예에서, 신경독성의 임상 위험과 관련된 병태로는 혼동, 섬망, 실어증, 표현형 실어증, 둔화, 근육간대경련, 무기력, 의식 변화, 경련, 발작-유사 활동, 발작 (선택적으로 뇌파도[EEG]에 의해 확인), 베타 아밀로이드(A β 수준 증가, 글루타메이트 수준 증가, 및 산소 라디칼 수준 증가를 포함한다. 일부 구현예에서, 신경독성은 중증도에 기초하여(예를 들어 1-5 등급을 사용하여) 등급이 매겨진다[예를 들어 문헌 「Guido Cavaletti & Paola Marmiroli *Nature Reviews Neurology* 6, 657-666 (December 2010); National Cancer Institute-Common Toxicity Criteria version 4.03 (NCI-CTCAE v4.03)」 참조].

[0912] 일부 구체예에서, 신경 병태는 sCRS의 가장 초기 병태일 수 있다. 일부 구현예에서, 신경 병태는 세포 요법 주입 이후 5 내지 7일에 시작되는 것으로 보인다. 일부 구현예에서, 신경 변화의 지속 기간은 3 내지 19 일 범위일 수 있다. 일부 경우에, 신경 변화의 회복은 sCRS의 다른 병태가 소산된 이후 일어난다. 일부 구현예에서, 신경 변화의 소산 시간 또는 정도는 항-IL-6 및/또는 스테로이드(들)을 사용한 치료에 의해 재촉되지 않는다.

[0913] 일부 구현예에서, 대상체가 투여 이후, 다음의 병태 중 하나로부터 자가-관리(예를 들어 목욕, 착의 및 탈의, 섭식, 화장실 사용, 의약 복용)를 제한하는 병태를 나타내면, 대상체는 세포 요법 또는 이의 세포 복용량의 투여에 대해 반응하여, 또는 이에 2차적으로, "중증 신경독성"이 발병된 것으로 간주한다: 1) 말초 운동 신경의 염증 또는 퇴행을 포함한, 말초 운동 신경병증의 병태; 2) 말초 감각 신경의 염증 또는 퇴행을 포함하는 말초 감각 신경병증의 병태, 비정상 및 불쾌한 감각을 유발하는 감각 지각의 왜곡과 같은 감각 장애(dysesthesia), 신경 또는 신경 그룹을 따라 강렬한 통증 감각과 같은 신경통(neuralgia), 및/또는 자극이 없을 때, 따끔거림, 마비, 압력, 추위 및 따뜻함의 비정상적인 피부 감각을 유발하는 감각 뉴런의 기능 장애와 같은 지각 이상(paresthesia) 일부 구현예에서, 중증 신경독성은 예를 들어 표 4에 제시된 등급 3 이상의 신경 독성을 포함한다.

표 4

[0914] 신경 독성에 대한 예시적인 등급 기준

등급	증상의 설명
1 무증상 또는 경미	경미하거나 또는 무증상의 증상
2 중등도	식사 준비, 식료품 또는 의류 쇼핑, 전화 사용, 돈 관리와 같은 도구를 사용하는 일상 생활 활동(ADL)을 제한하는 증상의 존재
3 중증	목욕, 착의 및 탈의, 자가 섭식, 화장실 사용, 의약 복용과 같은 자기-관리ADL을 제한하는 증상의 존재
4 생명 위협	생명을 위협하고, 긴급한 중재를 필요로 하는 증상
5 치명적	사망

[0915] 일부 구현예에서, 상기 방법은 다른 방법과 비교하여 CRS 또는 신경독성과 관련된 병태를 감소시킨다. 일부 양태에서, 제공된 방법은 다른 방법과 비교하여, 중증 CRS 또는 등급 3 이상의 CRS와 관련된 병태, 결과 또는 인자를 포함하는 CRS와 관련된 병태, 결과 또는 인자를 감소시킨다. 예를 들어 본 발명의 방법에 따라 치료되는 대상체는 검출가능한 CRS, 예를 들어 중증 CRS 또는 등급 3 이상의 CRS의 병태, 결과 또는 인자, 예를 들어 표 2 또는 표 3에 제시된 임의의 병태, 결과 또는 인자를 가지지 않을 수 있고 및/또는 이러한 병태, 결과 또는 인자가 감소될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 따라 치료되는 대상체는, 다른 방법에 의해 치료되는 대상체와 비교하여, 신경독성의 병태, 예를 들어 사지 허약감 또는 둔함, 기억력, 시력, 및/또는 지적 능력의 상실, 통제불가능한 강박관념 및/또는 강박 행동, 망상, 두통, 및 운동 제어 상실, 인지 기능저하, 및 자율 신경계 기능 장애, 및 성기능 장애를 포함하는 인지 및 행동 문제가 감소될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 방법에 따라 치료되는 대상체는 말초 운동 신경병증, 말초 감각 신경병증, 감각 장애, 신경통 또는 지각 이상과 관련된 병태가 감소될 수 있다.

[0916] 일부 구현예에서, 상기 방법은 신경계 및/또는 뇌의 손상, 예를 들어 뉴런의 사멸을 포함하는 신경독성과 관련된 결과를 감소시킨다. 일부 양태에서, 상기 방법은 신경독성과 관련된 인자, 예를 들어 베타 아밀로이드(A β), 글루타메이트, 및 산소 라디칼의 수준을 감소시킨다.

[0917] 일부 구현예에서, 독성을 치료하기 위한 하나 이상의 중재 또는 시제, 예를 들어 독성-표적 요법은, 예를 들어 상기 언급된 임의의 구현예에 따라 측정된 바와 같이, 대상체가 지속되는 발열을 나타내는 것으로 결정되거나 또는 확정(예를 들어 먼저 결정되거나 확정)될 때 또는 그 직후에 투여된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 독성-표적 요법은 이러한 확정 또는 결정의 특정 기간 이내에, 예를 들어 이의 30 분, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 4 시간, 6 시간, 또는 8 시간 이내에 투여된다.

[0918] V. 조성물 및 제형

[0919] 또한, 본원에서 제공된 방법에 의해서 생성된 재조합 수용체를 발현하는 조작된 세포를 함유하는 조성물 및 제형이 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 및 제형은 본원에서 기술된, 예를 들어 섹션-I에서 기술된 방법에 의해서 생성된, 세포, 예를 들어 조성물 또는 투여량의 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 조성물 및 제형은 세포의 산출 조성물이거나, 또는 상기 조성물, 및 선택적으로는 사용을 위한 지침, 예를 들어 본원에서

기술된, 예를 들어 섹션 III에서 기술된 방법에 의해서 상기 조작된 세포를 대상체에게 투여하기 위한 지침을 함유한다.

[0920] 일부 구현예에서, 재조합 항원 수용체, 예를 들어 CAR 또는 TCR에 의해 조작된 세포를 포함하는 세포의 투여량이 의약 조성물 또는 제형과 같은 조성물 또는 제형으로서 제공된다. 특정 구현예에서, 상기 투여량은 본원에서 기술된, 예를 들어 섹션 I-G에서 기술된 산출 조성물의 세포를 함유한다. 특정 구현예에서, 상기 투여량은 본원에서 기술된, 예를 들어 섹션 I에서 기술된 방법에 의해서 생성된 세포들을 함유한다. 이러한 조성물은 예를 들어 질병, 병태 및 장애의 예방 또는 치료, 또는 검출, 진단 및 예후 방법에서와 같이, 제거된 방법 및/또는 제공된 제조 물질 또는 조성물과 함께 사용될 수 있다.

[0921] "약학적 제형"은, 내부에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 이러한 형태 내에서 유효하도록 하고, 제형이 투여되는 대상체에 허용 가능하지 않을 정도로 유독한 추가의 성분을 함유하지 않은 제제를 지칭한다.

[0922] "약학적으로 허용 가능한 담체"는, 대상체에 유독하지 않은, 활성 성분 이외의 약학적 제형 중 성분을 지칭한다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 완충액, 부형제, 안정화제 또는 보존제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0923] 일부 구현예에 있어서, 담체의 선별은 부분적으로는, 특정 세포 또는 제제 및/또는 투여 방법에 의해 결정된다. 따라서, 다양한 적합한 제형이 존재한다. 예를 들어 약학적 조성물은 보존제를 함유할 수 있다. 적합한 보존제는, 예를 들어 메틸파라벤, 프로필파라벤, 벤조산나트륨 및 염화벤잘코늄을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 2종 이상의 보존제의 혼합물이 사용된다. 보존제 또는 그의 혼합물은 통상적으로 총 조성물 중 약 0.00001중량% 내지 약 2중량%의 양으로 존재한다. 담체는, 예를 들어 문헌 「Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).」에 기재되어 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 일반적으로, 사용되는 투여량 및 농도에서 수용체에 유독하지 않은 것이며, 인산염, 시트르산염 및 다른 유기산과 같은 완충액; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제(예를 들어 염화옥타데실디메틸벤질 암모늄; 염화헥사메토늄, 염화벤잘코늄; 염화벤제토늄; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥사놀; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 미만의 잔기)의 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 소수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코스, 만노스 또는 덱스트린을 포함한 단당류, 이당류 및 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 당류; 나트륨과 같은 염-형성 반대-이온; 금속 복합체(예를 들어 Zn-단백질 복합체); 및/또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온성 계면활성제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0924] 일부 측면에서, 조성물 중에 완충제가 포함된다. 적합한 완충제는, 예를 들어 시트르산, 시트르산나트륨, 인산, 인산칼륨 및 다양한 다른 산 및 염을 포함한다. 일부 측면에서, 2종 이상의 완충제의 혼합물이 사용된다. 완충제 또는 그의 혼합물은 통상적으로 총 조성물 중 약 0001 중량% 내지 약 4 중량%의 양으로 존재한다. 투여 가능한 약학적 조성물의 제조 방법이 공지되어 있다. 예시적인 방법이, 예를 들어 문헌 「Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)」에 더욱 상세히 기재되어 있다.

[0925] 제형 또는 조성물은 또한, 세포 또는 제제에 의해 예방되거나 치료되는 특정 지표, 질병 또는 병태에 유용한 1종 이상의 활성 성분을 함유할 수 있는데, 여기서 상기 각 활성은 서로 유해한 영향을 주지 않는 것인 하나 이상의 활성 성분이다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 유효한 양으로 조합물 중에 적절히 존재한다. 따라서, 일부 구현예에서, 약학적 조성물은 화학치료제, 예를 들어 아스파라기나제, 부술판, 카르보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 겐시타빈, 하이드록시우레아, 메토트렉세이트, 파클리탁셀, 리톡시맵, 빈블라스틴, 빈크리스틴 등과 같은 다른 약학적 활성 제제를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제제 또는 세포는 염의 형태로, 예를 들어 약제학적으로 허용되는 염으로 투여된다. 제약학적으로 허용되는 적절한 산 부가염에는 염산, 브롬산, 인산, 메타인산, 질산 및 황산과 같은 무기산, 및 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 말산, 락트산, 푸마르산, 벤조산, 글리콜산, 글루콘산, 숙신산 및 아릴설폰산, 예를 들어 p-톨루엔설폰산과 같은 유기산이 포함된다.

[0926] 약학적 조성물은 일부 구현예에서, 질병 또는 병태의 치료 또는 예방에 유효한 양, 예를 들어 치료적 유효량 또는 예방법적 유효량의 제제 또는 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 치료 대상체의 주기적 평가에 의해, 치료 또는 예방법적 효능을 모니터링한다. 수일 또는 그 이상에 걸친 반복 투여에 대하여, 병태에 따라, 치료는 원하는 질병 징후에 대한 역제가 나타날 때까지 반복된다. 그러나, 다른 투여 요법이 유용할 수 있고 결정될 수

있다. 요망되는 투여량은 조성물의 단일 볼루스 투여, 조성물의 다회 볼루스 투여 또는 조성물의 연속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.

[0927] 제제 또는 세포는 예를 들어 볼루스 주입, 주사, 예를 들어 정맥내 또는 피하 주사, 안내 주사, 눈 주위 주사, 망막하 주사, 유리체내 주사, 경 중격 주사, 공막하 주사, 맥락막내 주사, 전방내 주사, 결막하 주사(subconjunctival injection), 결막하 주사(subconjunctival injection), 안각건하 주사, 안구후 주사, 안구 주위 주사 또는 후방 공막 부근 전달에 의한 임의의 적절한 수단에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 이들은 비경구, 폐내 및 비내, 및 국소 치료가 요망되는 경우, 병변내 투여에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 소정의 투여량이 세포 또는 제제의 단일 볼루스 투여에 의해, 예를 들어 3일 이하의 기간에 걸쳐, 제제 또는 세포의 다회의 볼루스 투여 또는 세포의 연속 주입 투여에 의해 투여된다.

[0928] 질병의 예방 또는 치료를 위해, 적절한 투여량은 치료될 질병의 유형, 제제 또는 제제들의 유형, 세포 또는 재조합 수용체의 유형, 질병의 중증도 및 경과, 제제 또는 세포가 예방적 또는 치료적 목적으로 투여되는 지 여부, 이전의 치료, 대상체의 임상 기록 및 제제 또는 세포에 대한 반응, 주치의의 재량에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에 있어서, 조성물 및 세포는 한 번에 또는 일련의 치료를 통해 적절하게 대상체에게 투여된다.

[0929] 세포 또는 제제는 표준 기술, 제형 및/또는 장치를 이용하여 투여된다. 조성물의 보관 및 투여를 위한 제형 및 장치, 예를 들어 시린지 및 바이알이 제공된다. 세포와 관련하여 투여는 동종 또는 이종일 수 있다. 예를 들어 한 대상체로부터 면역응답 세포 또는 전구세포(progenitors)를 획득하여 이를 동일 또는 상이한, 호환가능한 대상체에게 투여할 수 있다. 말초혈액에서 유래하는 면역응답 세포 또는 그의 자손(예를 들어 생체내, 생체의외 또는 시험관내 유래됨)은 카테터 투여, 전신 주사, 국소 주사, 정맥 주사 또는 비경구 투여를 비롯한 국소화된 주사를 통해 투여될 수 있다. 치료 조성물(예를 들어 유전자 변형된 면역응답 세포를 함유하는 의약 조성물 또는 신경독성 병태를 치료 또는 완화하는 제제)을 투여하는 경우, 일반적으로 주사가 가능한 단위 투여 제형(용액, 현탁액, 에멀전)으로서 제제화된다.

[0930] 일부 구현예에서 세포 집단 및 조성물은 표준 투여 기술, 예를 들어 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강내, 협강내(buccal), 설하 또는 좌측 투여 경로로 투여된다. 일부 구현예에서, 제제 또는 세포 집단은 비경구 투여된다. 본 발명에서 "비경구"라는 용어는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질내 및 복강내 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 제제 또는 세포 집단은 정맥내, 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달을 이용하여 대상체에게 투여된다.

[0931] 일부 구현예에서, 조성물이 멸균 액상 제제, 예를 들어 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액 또는 점성 조성물로서 제공되며, 이들은 일부 측면에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액상 제제는 보통 겔, 기타 점성 조성물 및 고체 조성물에 비해 제조하기가 더 쉽다. 이에 더해, 액상 조성물은 특히 주사에 의해, 투여하기가 다소 더 간편하다. 다른 한편으로, 점성 조성물은 특정 조직과의 보다 장기간 접촉을 제공하기 위해 적절한 점도 범위를 갖도록 제제화될 수 있다. 액상 및 점성 조성물은 예를 들어 물, 염수, 인산염 완충 염수, 폴리올(예를 들어 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜) 및 이들의 적절한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 배지일 수 있는 담체를 포함할 수 있다.

[0932] 예를 들어 적절한 담체, 희석제 또는 부형제, 예를 들어 멸균수, 생리식염수, 글루코스, 텍스트로스 등과 혼합된 용매에 세포 또는 제제를 혼입시킴으로써 주사가 가능한 멸균 용액을 제조할 수 있다.

[0933] 생체내 투여에 사용되는 제형은 일반적으로 멸균성이다. 예를 들어 멸균 여과막을 통한 여과에 의해 멸균을 쉽게 달성할 수 있다.

[0934] **VI. 제조 제품 및 키트**

[0935] 또한 본원에 제공된 방법에 의해서 제조된 재조합 수용체를 발현하는 조작된 세포를 함유하는 제조 제품 및 키트가 제공된다. 일부 구현예에서, 제조 제품은 본원에서 기술된, 예를 들어 섹션 I에서 기술된 방법에 의해서 제조된, 세포, 예를 들어 세포의 조성물 또는 투여량을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 제조 제품 및 키트는 세포의 산출 조성물이거나 또는 세포의 산출 조성물, 및 선택적으로 사용을 위한 지침, 예를 들어 본원에서 기술된, 예를 들어 섹션 III에서 기술된 방법에 의해서, 예를 들어 상기 조작된 지침을 대상체에게 투여하기 위한 지침을 함유한다.

[0936] 일부 구현예에서, 본원에서는 치료학적 유효량의 본원에서 기술된 임의의 세포를 포함하는 조성물, 및 질병 또

는 병태를 치료하기 위하여 대상체에 투여하기 위한 지침을 포함하는 제조 제품 및/또는 키트가 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 지침은 본원에서 제공되는 세포를 투여하기 위한 방법의 일부 또는 모든 구성요소들을 명시한다. 일부 구현예에서, 상기 지침은 세포 요법용 세포의 투여를 위한 특정 지침, 예를 들어 투여량, 시기, 선정 및/또는 투여를 위한 대상체의 식별 및 투여 조건을 명시한다. 일부 구현예에서, 상기 제조 제품 및/또는 키트는 추가로 림프구고갈 요법제용 제제를 포함하고, 선택적으로는 상기 림프구고갈 요법제를 투여하기 위한 지침을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 지침은 투여 조성물을 동반하는 라벨 또는 패키지 삽입물로서 포함될 수 있다.

[0937] 일부 구현예에서, 상기 제조 제품은 재조합 수용체를 발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 함유하는 조성물을 함유하는 용기, 임의로 바이알(vial)을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 제조 제품 또는 키트는 세포의 조성물을, 3:1 내지 1:3, 2.5:1 내지 1:2.5, 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.4:1 내지 1:1.4, 1.3:1 내지 1:1.3, 1.2:1 내지 1:1.2, 또는 1.1:1 내지 1:1.1의 CD4+ 세포 대 CD8+ T 세포의 비율로 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 세포의 조성물은 (약) 3:1, 2.8:1, 2.5:1, 2.25:1, 2:1, 1.8:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.8, 1:2, 1:2.25, 1:2.5, 1:2.8, 1:3의 CD4+ 세포 대 CD8+ T 세포의 비율을 갖는다. 특정 구현예에서, 상기 제조 제품 또는 키트는 세포의 조성물을, 3:1 내지 1:3, 2.5:1 내지 1:2.5, 2:1 내지 1:2, 1.5:1 내지 1:1.5, 1.4:1 내지 1:1.4, 1.3:1 내지 1:1.3, 1.2:1 내지 1:1.2, 또는 1.1:1 내지 1:1.1의 재조합 수용체를 발현하는 CD4+ 세포, 예를 들어 CAR, 대 재조합 수용체를 발현하는 CD8+ T 세포, 예를 들어 CAR의 비율로 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 세포의 조성물은 (약) 3:1, 2.8:1, 2.5:1, 2.25:1, 2:1, 1.8:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.8, 1:2, 1:2.25, 1:2.5, 1:2.8, 1:3의 재조합 수용체를 발현하는 CD4+ 세포, 예를 들어 CAR, 대 재조합 수용체를 발현하는 CD8+ T 세포, 예를 들어 CAR의 비율을 갖는다.

[0938] 일부 구현예에서, 상기 지침은 투여되는 세포의 투여량을 명시한다. 예를 들어 일부 구현예에서, 상기 지침에 명시된 투여량은 (약) 1×10^6 내지 (약) 3×10^8 개의 총 재조합 수용체(예를 들어 CAR)-발현 세포, 예를 들어 1×10^7 내지 (약) 2×10^8 개 범위의 그러한 세포, 예를 들어 (약) 1×10^7 , 5×10^7 , 1×10^8 또는 1.5×10^8 개 범위의 그러한 세포, 또는 상기 수치범위 중의 임의의 둘 이상의 범위를 포함한다. 일부 구현예에서, 환자는 다중 투여량을 투여받으며, 각각의 투여량 또는 총 투여량은 상기 수치범위의 임의의 범위내일 수 있다.

[0939] 일부 구현예에서, 상기 용기 예를 들어 바이알은 10×10^6 개 초과 또는 (약) 10×10^6 개 초과인 T 세포 또는 재조합 수용체-발현 T 세포, 15×10^6 개 초과인 T 세포 또는 재조합 수용체-발현 T 세포, 25×10^6 개 초과인 T 세포 또는 재조합 수용체-발현 T 세포를 포함한다. 일부 측면에서, 상기 바이알은 (약) 10×10^6 개 세포/mL 내지 (약) 70×10^6 개 세포/mL, (약) 10×10^6 개 세포/mL 내지 (약) 50×10^6 개 세포/mL, (약) 10×10^6 개의 세포/m 내지 (약) 25×10^6 개 세포/mL, (약) 10×10^6 개 세포/mL 내지 (약) 15×10^6 개의 세포/m, 15×10^6 개 세포/mL 내지 (약) 70×10^6 개 세포/mL, (약) 15×10^6 개 세포/mL 내지 (약) 50×10^6 개의 세포/m, (약) 15×10^6 개 세포/mL 내지 (약) 25×10^6 개 세포/mL, (약) 25×10^6 개 세포/mL 내지 (약) 70×10^6 개 세포/mL, (약) 25×10^6 개 세포/mL 내지 (약) 50×10^6 개 세포/mL, 및 (약) 50×10^6 개의 세포/m 내지 (약) 70×10^6 개 세포/mL를 포함한다.

[0940] 일부 구현예에서, 투여를 위해 집합적으로 명시된 상기 복수의 바이알 또는 복수의 세포 또는 단위 투여량의 세포는 (약) 1×10^5 내지 (약) 5×10^8 개의 총 재조합 수용체-발현 T 세포 또는 총 T 세포, 1×10^5 내지 (약) 1×10^9 개의 총 재조합 수용체-발현 T 세포 또는 총 T 세포, 또는 (약) 1×10^6 내지 (약) 1×10^{10} 개의 총 재조합 수용체-발현 T 세포 또는 총 T 세포(각각을 포함)를 포함하는 세포의 투여량을 포함한다. 일부 측면에서, 상기 제품은 하나 이상의 단위 투여량의 CD4+ 및 CD8+ T 세포 또는 CD4+ 수용체+ T 세포 및 CD8+수용체+ T 세포를 포함하되, 상기 단위 투여량은 (약) 1×10^7 내지 (약) 2×10^8 개의 재조합 수용체-발현 T 세포, (약) 5×10^7 내지 (약) 1.5×10^8 개의 재조합 수용체-발현 T 세포, (약) 5×10^7 개의 재조합 수용체-발현 T 세포, (약) 1×10^8 개의 재조합 수용체-발현 T 세포, 또는 (약) 1.5×10^8 개의 재조합 수용체-발현 T 세포를 포함하고, 상기 제품에서 정보는 복수의 단위 투여량 중 하나 및/또는 그러한 복수의 단위 투여량에 대응하는 부피의 투여를 명시한다.

- [0941] 일부 구현예에서, 상기 지침은 투여 요법(dosage regimen) 및 투여 시기를 명시할 수 있다. 예를 들어 일부 구현예에서, 상기 지침은 대상체에 다중 투여, 예를 들어 2회 이상의 세포 투여량을 투여하는 것을 명시할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 지침은 예를 들어 제 2 투여량은 제 1 투여 후 대략 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21일에 투여되는 것과 같은 다중 투여량의 투여 시기, 및/또는 각각의 투여에서의 투여량을 명시한다.
- [0942] 일부 구현예에서, 상기 지침은 세포 또는 세포 유형(들)의 투여량 또는 투여 횟수 및/또는 세포 유형의 비율, 예를 들어 개별적인 집단 또는 서브-유형, 예를 들어 CD4+ 대 CD8+의 비율을 명시한다. 일부 구현예에서, 상기 집단 또는 서브-유형, 예를 들어 CD8+ 세포 및 CD4+ 세포. 예를 들어 일부 구현예에서, 상기 지침은 상기 세포가
- [0943] (약) 5:1 내지 (약) 5:1(또는 약 1:5 초과 및 약 약 5:1 미만), 또는 (약) 1:3 내지 (약) 3:1(또는 약 1:3 초과 및 약 3:1 미만), 예를 들어 (약) 2:1 내지 (약) 1:5(또는 약 1:5 초과 및 약 2:1 미만), 예를 들어 (약) 5:1, 4.5:1, 4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9: 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4, 1:4.5, 또는 1:5의, 다중 세포 집단 또는 서브-유형, 예를 들어 CD4+ 및 CD8+ T 세포 또는 서브-유형의 산출 비율의 허용범위에서 또는 그 내에서 투여되는 것을 명시한다. 특정 구현예에서, 상기 지침은 농축된 CD4+ T 세포 및 농축된 CD8+ T 세포의 조성물이 원하는 비율로 조합되고 단일 세포 조성물로서 대상체에 투여되는 것을 명시한다. 특정 구현예에서, 상기 지침은 농축된 CD4+ T 세포 및 농축된 CD8+ T 세포의 조성물이 원하는 비율의 별도의 조성물로 투여되는 것을 명시한다. 일부 측면에서, 허용 오차(tolerated difference)는 이들 범위의 임의의 값을 포함하여 원하는 비율의 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4% 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50% 이내이다.
- [0944] **VII. 정의**
- [0945] 달리 정의되지 않는 한, 본 발명에 사용되는 분야의 모든 용어, 표기 및 다른 기술적 및 과학적 용어 또는 전문 용어는 청구 대상이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 의도된다. 일부 경우에서, 일반적으로 이해되는 의미의 용어는 본 명세서에서 명확성 및/또는 용이한 참조를 위해 정의되며, 본원에 이러한 정의가 포함된 경우에는 반드시, 당업계에서 일반적으로 이해되는 것 이상의 실질적인 차이를 나타내는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0946] 본 발명에서 사용되는바, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 분명히 다르게 지시하지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 예를 들어 "a" 또는 "an"은 "적어도 하나" 또는 "하나 이상"을 의미한다. 본 발명에서 기술된 측면 및 변형은 측면들 및 변형들"로 이루어지는" 및/또는 "필수적으로 그로 이루어지는"을 포함하는 것으로 이해된다.
- [0947] 본원에 걸쳐, 청구된 주제의 다양한 측면이 범위 형식에 제시된다. 범위 형식에서의 설명은 편의상 및 간략화를 위한 것이며 청구된 주제의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안됨을 이해해야 한다. 따라서, 범위의 설명은 가능한 모든 하위 범위 및 그 범위 내의 개별적인 수치를 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어 값의 범위가 제공되는 경우, 그 범위의 상한과 하한 사이의 각각의 개재된 값 및 언급된 범위 내 임의의 언급된 또는 개재된 값이 청구된 주제 내에 포함되는 것으로 이해된다. 이들과 같은 보다 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 보다 더욱 작은 범위에 포함될 수 있으며, 기술된 범위 내에서 특별히 배제된 한계에 따라 청구된 대상 내에 포함된다. 명시된 범위가 하나의 한계 또는 두 한계를 포함하는 경우, 포함된 한계들 중 하나 또는 둘 모두를 제외한 범위는 청구 대상에 포함된다. 이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.
- [0948] 본 발명에서 사용되는 "약"이라는 용어는 이 기술분야에서 당업자에게 쉽게 알려던 각각의 값에 대한 통상적인 오차 범위를 나타낸다. 본 발명에서 어떠한 값 또는 파라미터와 관련한 "약"의 언급은 그 값 또는 매개 변수 자체에 대한 구현예를 포함(및 설명)한다. 예를 들어 "약 X"을 언급하는 설명은 "X"에 대한 설명을 포함한다.
- [0949] 본 발명에서 사용되는바, 뉴클레오티드 또는 아미노산 위치가, 기재된 서열, 예를 들어 서열 목록에 기재된 서열 내 뉴클레오티드 또는 아미노산 위치"에 대응한다"는 것은, 표준 정렬 알고리즘, 예를 들어 GAP 알고리즘을 사용하여 상기 기재된 서열과 상동성을 최대화하는 정렬시 확인된 뉴클레오티드 또는 아미노산 위치를 말한다. 당업자는 서열을 정렬시킴으로써, 예를 들어 보존된 아미노산 잔기 및 동일한 아미노산 잔기를 가이드로서 사용하여 대응하는 잔기를 확인할 수 있다. 일반적으로, 대응하는 위치를 확인하기 위해, 가장 높은 정도의 매치가 얻어지도록 아미노산 서열을 정렬한다[예를 들어 문헌 「Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed.,

Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073」 참조].

- [0950] 본 발명에 사용되는바, 용어 "백터"는 그것이 연결된 다른 핵산을 전파시킬 수 있는 핵산 분자를 말한다. 상기 용어는 그것이 도입된 숙주 세포의 게놈에 혼입된 백터뿐만 아니라 자기 복제 핵산 구조로서의 백터를 포함한다. 특정 백터는 그들이 작동적으로 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 백터를 본 발명에서는 "발현 백터"라 지칭한다. 백터 중에는 레트로바이러스, 예를 들어 감마레트로바이러스 및 렌티 바이러스 백터와 같은 바이러스 백터가 있다.
- [0951] 용어 "숙주 세포", "숙주 세포주" 및 "숙주 세포 배양체"는 상호교환적으로 사용되며, 이러한 세포의 자손을 포함하여 외인성 핵산이 도입된 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 "형질전환체" 및 "형질전환된 세포"를 포함하는데, 여기에는 최초의 형질전환된 세포 및 계대의 수에 관계없이 그로부터 유래된 자손이 포함된다. 자손은 핵산 함량이 부모 세포와 완전히 동일하지는 않을 수 있고, 돌연변이를 포함할 수 있다. 본래의 형질전환된 세포에서 스크리닝되거나 선택된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손이 본 발명에 포함된다.
- [0952] 본 발명에서 사용되는 바, 세포 또는 세포 집단이 특정 마커에 대해 "양성"이라는 설명은 특정 마커, 통상 표면 마커의, 세포 상의 또는 세포내의 검출 가능한 존재를 말한다. 표면 마커를 언급할 때, 이 용어는 유세포 분석에 의하여 검출되는, 예를 들어 상기 마커에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 염색하고 상기 항체를 검출함으로써 검출되는 표면 발현의 존재를 말하는데, 여기서 상기 염색은, 다른 것은 동일한 조건 하에서 이소형-매치된 대조군으로 동일한 절차를 수행하여 검출된 염색을 실질적으로 초과하는 수준에서, 및/또는 상기 마커에 대하여 양성이라고 알려진 세포에 대한 것과 실질적으로 유사한 수준에서, 및/또는 상기 마커에 대하여 음성이라고 알려진 세포에 대한 것 보다 실질적으로 더 높은 수준에서 유세포 분석에 의하여 검출 가능하다.
- [0953] 본 발명에서 사용되는 바, 세포 또는 세포 집단이 특정 마커에 대해 "음성"이라는 설명은 특정 마커, 통상 표면 마커의, 세포 상에 또는 세포내의 실질적인 검출 가능한 존재의 부재를 말한다. 표면 마커를 언급할 때, 이 용어는 유세포 분석에 의하여 검출되는, 예를 들어 상기 마커에 특이적으로 결합하는 항체를 이용하여 염색하고 상기 항체를 검출함으로써 검출되는 표면 발현의 부재를 말하는데, 여기서 상기 염색은, 다른 것은 동일한 조건 하에서 이소형-매치된 대조군으로 동일한 절차를 수행하여 검출된 염색을 실질적으로 초과하는 수준에서 유세포 분석에 의하여 검출되지 않고, 및/또는 상기 마커에 대하여 양성이라고 알려진 세포에 대한 것 보다 실질적으로 낮은 수준에서, 및/또는 상기 마커에 대하여 음성이라고 알려진 세포에 대한 것과 실질적으로 유사한 수준에서 유세포 분석에 의하여 검출된다.
- [0954] 본 발명에서 사용되는바, 아미노산 서열(레퍼런스 폴리펩티드 서열)에 대해 사용되는 경우, "백분율(%) 아미노산 서열 상동성" 및 "백분율 상동성"은, 서열들과, 최대치의 백분율 서열 상동성을 얻기 위하여 필요하다면 도입되는 갭을 정렬한 후, 상기 기준 폴리펩티드 서열 내 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열(예를 들어 대상 항체 또는 단편) 내 아미노산 잔기의 백분율로서 정의되며, 상기 서열 상동성의 일부로서 어떠한 보존적 치환은 고려하지 않는다. 백분율 아미노산 서열 상동성을 결정하는 목적을 위한 서열정렬은 당해 분야의 기술의 범주 내에서 다양한 방식, 예를 들어 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 메갈리안(DNASTAR) 소프트웨어와 같은 공중이 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어를 이용하여 달성될 수 있다. 당업자는 비교되는 서열의 전체 길이에 대해 최대 정렬을 달성하는데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터를 적절히 결정할 수 있다.
- [0955] 아미노산 치환은 폴리펩티드에서 하나의 아미노산을 다른 아미노산으로 대체하는 것을 포함할 수 있다. 치환은 보존적 아미노산 치환 또는 비보존적 아미노산 치환일 수 있다. 아미노산 치환은 관심있는 결합 분자, 예를 들어 항체에 도입될 수 있고, 생성물은 원하는 활성, 예를 들어 유지/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝될 수 있다.
- [0956] 아미노산은 일반적으로 하기의 통상적인 측쇄 특성에 따라 분류될 수 있다:
- [0957] (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- [0958] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

- [0959] (3) 산성: Asp, Glu;
- [0960] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [0961] (5) 사슬 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro;
- [0962] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe
- [0963] 일부 구현예에서, 보존적 치환은 상기 클래스 중 하나의 구성원을 같은 클래스의 다른 구성원으로 교환하는 것을 수반할 수 있다. 일부 구현예에서, 비보존적 아미노산 치환은 상기 클래스 중 하나의 구성원을 다른 클래스로 교환하는 것을 수반할 수 있다.
- [0964] 본원에서 사용된 용어 '조성물'은 세포를 포함한, 둘 이상의 생성물, 물질, 또는 화합물의 혼합물을 지칭한다. 그것은 용액, 현탁액, 액체, 분말, 페이스트, 수성, 비-수성 또는 그들의 임의의 조합물일 수 있다.
- [0965] 본원에서 사용된 용어 '대상체'는 포유동물, 인간 또는 기타 동물, 전형적으로는 인간이다.
- [0966] 달리 정의되지 않는 한, 본 발명에 사용되는 분야의 모든 용어, 표기 및 다른 기술적 및 과학적 용어 또는 전문 용어는 청구 대상이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 의도된다. 일부 경우에서, 일반적으로 이해되는 의미의 용어는 본 명세서에서 명확성 및/또는 용이한 참조를 위해 정의되며, 본원에 이러한 정의가 포함된 경우에는 반드시, 당업계에서 일반적으로 이해되는 것 이상의 실질적인 차이를 나타내는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0967] **VIII. 예시적 구현예**
- [0968] 제공된 구현예 중에는 하기 구현예가 있다:
- [0969] 1. 조작된 세포의 조성물의 제조방법으로서, 상기 제조방법은,
 - [0970] (a) CD4+ T 세포의 조성물 및 CD8+ T 세포의 조성물을 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율로 조합함으로써(combine), 투입 조성물(input composition)을 생성하는 단계;
 - [0971] (b) 상기 투입 조성물을 자극 조건(stimulating condition)하에 인큐베이션함으로써(incubation), 자극된 조성물을 생성하는 단계로서; 상기 자극 조건은 TCR 복합체(TCR complex)의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자(costimulatory molecule)의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약(stimulatory reagent)의 존재를 포함하는 것인 단계
- [0972] 를 포함하고;
- [0973] 상기 투입 조성물은 적어도 100×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함하는,
- [0974] 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0975] 2. 구현예 1에서, 상기 산출 조성물 중의 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 대상체로부터의 1차 샘플로부터 농축되거나 또는 선택되고, 선택적으로 상기 산출 조성물 중의 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 대상체로부터의 1차 샘플로부터 별도로 농축되거나 또는 선택되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0976] 3. 구현예 1 또는 2에서, 상기 CD4+ T 세포의 조성물은 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 CD4+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0977] 4. 구현예 1 또는 2에서, 상기 CD8+ T 세포의 조성물은 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0978] 5. 조작된 세포의 조성물의 제조방법으로서, 상기 제조방법은,
 - [0979] 투입 조성물을 자극 조건하에 인큐베이션함으로써, 자극된 조성물을 생성하는 단계를 포함하되,
 - [0980] 상기 투입 조성물은 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율로 포함하고, 상기 투입 조성물은 적어도 100×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함하며;
 - [0981] 상기 자극 조건은 TCR 복합체의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함하는,

- [0982] 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0983] 6. 구현예 1 내지 5 중의 어느 하나에 있어서, 상기 인큐베이션은 무혈청 배지 중에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0984] 7. 구현예 1 내지 6 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은, CD4+ 세포 또는 CD8+ T 세포인 세포를 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95% 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0985] 8. 구현예 1 내지 7 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 100×10^6 내지 500×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0986] 9. 구현예 1 내지 8 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 (약) 300×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0987] 10. 구현예 9에 있어서, 상기 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 생존 세포인 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0988] 11. 구현예 1 내지 10 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 1×10^6 개 세포/mL 내지 5×10^6 개 세포/mL의 농도로 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0989] 12. 구현예 1 내지 11 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 (약) 3×10^6 개 세포/mL의 농도로 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0990] 13. 구현예 1 내지 12 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 1.5:1 내지 1:1.5의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0991] 14. 구현예 1 내지 14 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 1.2:1 내지 0.8:1의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0992] 15. 구현예 1 내지 14 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 (약) 1:1의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0993] 16. 구현예 1 내지 15 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성(surface positive)인 CD4+ 및 CD8+를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0994] 17. 구현예 16에 있어서, CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 세포 대 CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD8+ 세포의 비는 (약) 1.1:1인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0995] 18. 구현예 1 내지 17 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 및 CD8+ 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0996] 19. 구현예 18에 있어서, CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 세포 대 CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD8+ 세포의 비는 (약) 1.69:1인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0997] 20. 구현예 1 내지 19 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 CCR7에 대해 표면 양성이고 CD62L에 대해 표면 음성(surface negative)인 CD4+ 및 CD8+ 세포를, 선택적으로는 2.0:1 내지 1.5:1의 비율로 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0998] 21. 구현예 1 내지 20 중의 어느 하나에 있어서, 추가로 상기 자극된 조성물로부터 세포로 재조합 수용체를 도입시킴으로써 조작된 세포 조성물을 생성하되, 상기 도입은 상기 자극된 조성물의 세포를 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제제와 접촉시키는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [0999] 22. 구현예 21에 있어서, 상기 접촉은 벡터를 사용한 형질주입(transfection)에 의한 것으로, 상기 벡터는 전이인자(transposon)이고, 선택적으로는 슬리핑 뷰티(Sleeping Beauty; SB) 전이인자, 피기백(PiggyBac) 전이인자이거나; 또는 상기 접촉은 바이러스 벡터를 사용한 형질도입(transduction)에 의한 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1000] 23. 구현예 1 내지 22 중의 어느 하나에 있어서, 추가로 상기 자극된 조성물로부터 세포로 재조합 수용체를 도입시킴으로써 조작된 세포 조성물을 생성하되, 상기 도입은 상기 자극된 조성물의 세포를 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터로 형질도입하는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조

성물의 제조방법.

- [1001] 24. 구현예 21 내지 23 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입은 무혈청 배지 중에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1002] 25. 구현예 21 내지 24 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 300×10^6 개 미만의 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1003] 26. 구현예 21 내지 25 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 50×10^6 개 내지 200×10^6 개의 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1004] 27. 구현예 21 내지 26 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 (약) 100×10^6 개의 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1005] 28. 구현예 21 내지 27 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 3×10^6 개 세포/mL 미만의 농도를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1006] 29. 구현예 21 내지 28 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 0.5×10^6 개 세포/mL 내지 2×10^6 개 세포/mL의 농도를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1007] 30. 구현예 21 내지 29 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 (약) 1×10^6 개 세포/mL의 농도를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1008] 31. 구현예 21 내지 30 중의 어느 하나에 있어서, 상기 재조합 수용체를 상기 자극된 조성물의 세포로 도입하기 전에 자극 조건하에 인큐베이션한 후 상기 자극된 조성물의 조성을 조정하는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1009] 32. 구현예 21 내지 32 중의 어느 하나에 있어서, 상기 자극된 조성물의 세포는 생존 세포인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1010] 33. 조작된 세포의 조성물의 제조방법으로서, 상기 제조방법은, 재조합 수용체를 T 세포 조성물의 세포로 도입하는 단계를 포함하되, 상기 T 세포 조성물은 적어도 또는 적어도 약 1×10^6 개의 생존 세포/mL의 농도로 포함하고, 상기 T 세포 조성물의 세포의 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%는 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1011] 34. 구현예 33에 있어서, 상기 T 세포 조성물의 농도는 5×10^6 개 미만의 생존 세포/mL인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1012] 35. 구현예 33 또는 34에 있어서, 상기 T 세포 조성물은 적어도 또는 적어도 약 또는 약 100×10^6 개의 생존 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1013] 36. 구현예 33 내지 35 중의 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포 조성물은 300×10^6 개 미만의 생존 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1014] 37. 구현예 33 내지 36 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입은, 상기 T 세포를 형질도입에 의해서 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터와 접촉시키는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1015] 38. 구현예 33 내지 37 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입은 무혈청 배지 중에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1016] 39. 구현예 33 내지 38 중의 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포 조성물의 하나 이상의 세포는 활성화되고/되거나 상기 IDL 수용체의 표면 발현을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1017] 40. 구현예 33 내지 39 중의 어느 하나에 있어서,
- [1018] 상기 세포 조성물의 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 또는 적어도 60%는,

- [1019] (i) HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L 및 4-1BB로 이루어진 군으로부터 선택된 표면 마커(surface marker)를 발현하고;
- [1020] (ii) IL-2, IFN-감마, TNF-알파로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인의 세포내 발현을 포함하고;
- [1021] (iii) 상기 세포 사이클의 G1 또는 나중 단계(later phase)에 있고/있거나;
- [1022] (iv) 증식(proliferating)할 수 있는 것
- [1023] 인 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1024] 41. 구현예 33 내지 40 중의 어느 하나에 있어서,
- [1025] 상기 도입 이전에, 상기 조성물의 세포는 자극 조건하에 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하는 투입 조성물을 인큐베이션하는 것을 포함하는 공정에 의해서 생성되고, 상기 자극 조건은 TCR 복합체의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1026] 42. 구현예 41에 있어서, 상기 도입은 무혈청 배지 중에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1027] 43. 조작된 세포 조성물의 제조방법으로서, 상기 제조방법은,
- [1028] (a) 투입 조성물을 자극 조건하에 인큐베이션함으로써, 자극된 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 투입 조성물은 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율을 포함하고 적어도 100×10^6 개의 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함하며, 상기 자극 조건은 TCR 복합체(TCR complex)의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함하는 것인 단계; 및
- [1029] (b) 재조합 수용체를 상기 자극된 조성물의 300×10^6 개 미만의 세포로 도입함으로써 조작된 세포 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 도입은 상기 자극된 조성물의 세포를 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터와 접촉시키는 것을 포함하는 것인 단계
- [1030] 를 포함하는, 조작된 세포 조성물의 제조방법.
- [1031] 44. 구현예 43에 있어서, 상기 인큐베이션 및/또는 상기 도입은 무혈청 배지 중에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1032] 45. 구현예 43 또는 44에 있어서, 상기 CD4+ 및 CD8+ T 세포는 생존 세포인 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1033] 46. 구현예 44에서, 상기 자극된 조성물로부터의 상기 세포는 생존 세포인 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1034] 47. 구현예 33 내지 46 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 2일 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 2일 이내에 개시되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1035] 48. 구현예 33 내지 47 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 36시간 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 36시간 이내에 개시되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1036] 49. 구현예 33 내지 48 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 30시간 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 30시간 이내에 개시되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1037] 50. 구현예 33 내지 49 중의 어느 하나에 있어서, 상기 조작된 세포의 증식 및/또는 증폭을 촉진시키는 조건하에 상기 조작된 T 세포를 배양하여 상기 조작된 T 세포를 포함하는 산출 조성물을 제조하는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1038] 51. 구현예 50에 있어서, 상기 배양은 무혈청 배지 중에서 수행하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1039] 52. 조작된 세포의 조성물의 제조방법으로서, 상기 제조방법은,
- [1040] (a) 투입 조성물을 자극 조건하에 인큐베이션함으로써, 자극된 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 투입 조성물

은 2:1 내지 1:2의 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율을 포함하고, 상기 투입 조성물은 적어도 100×10^6 개의 총 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 5×10^6 개 세포/mL 미만의 농도로 포함하며; 상기 자극 조건은 TCR 복합체(TCR complex)의 하나 이상의 성분의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인 및/또는 하나 이상의 공동 자극 분자의 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인을 활성화시킬 수 있는 자극 시약의 존재를 포함하는 것인 단계;

- [1041] (b) 재조합 수용체를 상기 자극된 조성물로부터 300×10^6 개 미만의 세포로 도입함으로써 조작된 세포 조성물을 생성하는 단계로서, 상기 도입은 상기 자극된 조성물의 세포를 상기 재조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 벡터와 접촉시키는 것을 포함하는 것인 단계; 및
- [1042] (c) 상기 조작된 조성물을 상기 조작된 세포의 증식 및/또는 증폭을 촉진시키는 조건하에서 배양함으로써, 상기 조작된 T 세포를 포함하는 산출 조성물을 제조하는 단계
- [1043] 를 포함하는, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1044] 53. 구현예 52에 있어서, 상기 인큐베이션, 도입, 및/또는 배양은 무혈청 배지 중에서 수행하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1045] 54. 구현예 41 내지 53 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 1.5:1 내지 1:1.5의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포, 1.2:1 내지 0.8:1의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포, 선택적으로는 (약) 1:1의 비율의 CD4+ 대 CD8+ T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1046] 55. 구현예 41 내지 54 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성(surface positive)인 CD4+ 및 CD8+를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1047] 56. 구현예 55에 있어서, CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 세포 대 CD45RA 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD8+ 세포의 비는 (약) 1.1:1인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1048] 57. 구현예 41 내지 56 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 및 CD8+ 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1049] 58. 구현예 57에 있어서, CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD4+ 세포 대 CD27 및 CCR7에 대해 표면 양성인 CD8+ 세포의 비는 (약) 1.69:1인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1050] 59. 구현예 41 내지 58 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 CCR7에 대해 표면 양성이고 CD62L에 대해 표면 음성(surface negative)인 CD4+ 및 CD8+ 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1051] 60. 구현예 43 내지 59 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 300×10^6 개 미만의 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1052] 61. 구현예 43 내지 60 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 50×10^6 개 내지 200×10^6 개의 세포, 선택적으로는 (약) 100×10^6 개의 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1053] 62. 구현예 43 내지 61 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 3×10^6 개 세포/mL 미만의 농도를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1054] 63. 구현예 43 내지 62 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입을 위해서, 상기 자극된 조성물은 0.5×10^6 개 세포/mL 내지 2×10^6 개 세포/mL, 선택적으로는 (약) 1×10^6 개의 세포/mL의 농도를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1055] 64. 구현예 43 내지 63 중의 어느 하나에 있어서, 상기 재조합 수용체를 상기 자극된 조성물의 세포로 도입하기 전에 자극 조건하에 인큐베이션한 후 상기 자극된 조성물의 조성물을 조정하는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1056] 65. 구현예 1 내지 64 중의 어느 하나에 있어서, 상기 인큐베이션은 하나 이상의 사이토카인의 존재하에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1057] 66. 구현예 65에 있어서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2, 재조합 IL-7, 및/또는 재조합 IL-15로부

터 선택되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

- [1058] 67. 구현예 66에 있어서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-2, 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7, 및/또는 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1059] 68. 구현예 66 또는 67에 있어서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-2, 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7, 및/또는 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1060] 69. 구현예 91 내지 68 중의 어느 하나에 있어서,
- [1061] 상기 자극된 조성물의 세포의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 또는 적어도 60%는,
- [1062] (i) HLA-DR, CD25, CD69, CD71, CD40L 및 4-1BB로 이루어진 군으로부터 선택된 표면 마커(surface marker)를 발현하고;
- [1063] (ii) IL-2, IFN-감마, TNF-알파로 이루어진 군으로부터 선택된 사이토카인의 세포내 발현을 포함하고;
- [1064] (iii) 상기 세포 사이클의 G1 또는 나중 단계(later phase)에 있고/있거나;
- [1065] (iv) 증식(proliferating)할 수 있는 것인,
- [1066] 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1067] 70. 구현예 1 내지 69 중의 어느 하나에 있어서, 상기 자극 시약은, TCR 복합체의 일원(member)에 특이적으로 결합하는, 선택적으로는 CD3에 특이적으로 결합하는 1차 제제(primary agent)를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1068] 71. 구현예 70에 있어서, 상기 자극 시약은 추가로, T 세포 공동 자극 분자에 특이적으로 결합하는 2차 제제(secondary agent)를 포함하고, 선택적으로 상기 공동 자극 분자는 CD28, CD137 (4-1-BB), OX40, 또는 ICOS로부터 선택되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1069] 72. 구현예 70 또는 71에 있어서, 상기 1차 제제 및/또는 2차 제제는 항체를 포함하고, 선택적으로 상기 자극 시약은 항-CD3 항체 및 항-CD28, 또는 그들의 항원-결합 단편과의 인큐베이션을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1070] 73. 구현예 71 또는 72에 있어서, 상기 1차 제제 및/또는 2차 제제는 고체 지지체의 표면 상에 존재하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1071] 74. 구현예 73에 있어서, 상기 고체 지지체는 비드(bead)이거나 또는 그를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1072] 75. 구현예 74에 있어서, 상기 비드는 (약) 3.5 μm 초과이지만 (약) 9 μm 이하 또는 (약) 8 μm 이하 또는 (약) 7 μm 이하 또는 (약) 6 μm 이하 또는 (약) 5 μm 이하의 직경을 갖는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1073] 76. 구현예 74 또는 75에 있어서, 상기 비드는 (약) 4.5 μm 의 직경을 갖는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1074] 77. 구현예 74 내지 76 중의 어느 하나에 있어서, 상기 비드는 불활성인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1075] 78. 구현예 74 내지 77 중의 어느 하나에 있어서, 상기 비드는 폴리스티렌 표면이거나 또는 그를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1076] 79. 구현예 74 내지 78 중의 어느 하나에 있어서, 상기 비드는 자성(magnetic)이거나 또는 초자성(superparamagnetic)인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1077] 80. 구현예 74 내지 79 중의 어느 하나에 있어서, 비드 대 세포의 상기 비율은 3:1 미만인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1078] 81. 구현예 74 내지 80 중의 어느 하나에 있어서, 비드 대 세포의 상기 비율은 (약) 2:1 내지 0.5:1인 것인, 조

작된 세포의 조성물의 제조방법.

- [1079] 82. 구현예 74 내지 81 중의 어느 하나에 있어서, 비드 대 세포의 상기 비율은 (약) 1:1인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1080] 83. 구현예 1 내지 82 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 자극 조건하에 48시간 미만동안 인큐베이션되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1081] 84. 구현예 1 내지 83 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 자극 조건하에 12시간 내지 36시간동안(경계 포함) 인큐베이션되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1082] 85. 구현예 1 내지 84 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 자극 조건하에 18시간 내지 30시간동안(경계 포함) 인큐베이션되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1083] 86. 구현예 1 내지 85 중의 어느 하나에 있어서, 상기 투입 조성물은 자극 조건하에 (약) 24시간동안 인큐베이션되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1084] 87. 구현예 23 내지 86 중의 어느 하나에 있어서, 상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 48시간 미만동안 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1085] 88. 구현예 23 내지 87 중의 어느 하나에 있어서, 상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 12시간 내지 36시간(경계 포함)동안 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1086] 89. 구현예 23 내지 88 중의 어느 하나에 있어서, 상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 18시간 내지 30시간(경계 포함)동안 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1087] 90. 구현예 23 내지 89 중의 어느 하나에 있어서, 상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 (약) 24시간동안 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1088] 91. 구현예 23 내지 90 중의 어느 하나에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터(retroviral vector)인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1089] 92. 구현예 23 내지 91 중의 어느 하나에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터(lentiviral vector) 또는 감마레트로바이러스 벡터(gammaretroviral vector)인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1090] 93. 구현예 23 내지 92 중의 어느 하나에 있어서, 상기 접촉, 선택적으로 형질도입은 형질도입 보조제(transduction adjuvant)의 부재하에서 수행인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1091] 94. 구현예 23 내지 93 중의 어느 하나에 있어서, 상기 도입은 하나 이상의 사이토카인의 존재하에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1092] 95. 구현예 94에 있어서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2, 재조합 IL-7, 및/또는 재조합 IL-15로부터 선택되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1093] 96. 구현예 94 또는 95에 있어서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-2, 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7, 및/또는 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1094] 97. 구현예 94 내지 96 중의 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-2, 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7, 및/또는 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1095] 98. 구현예 50 내지 97 중의 어느 하나에 있어서, 상기 배양의 적어도 일부는 혼합(mixing) 및/또는 관류(perfusion)로 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1096] 99. 구현예 98에 있어서, 상기 배양의 적어도 일부는 (약) 또는 적어도 500 mL/day, 600 mL/day, 700 mL/day, 750 mL/day, 800 mL/day, 900 mL/day, 1,000 mL/day, 1,200 mL/day, 1,400 mL/day, 1,500 mL/day, 1,600 mL/day, 1,800 mL/day, 및/또는 2,000 mL/day의 관류 속도로 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1097] 100. 구현예 98 또는 99에 있어서, 상기 배양의 적어도 제 1 부분은 (약) 또는 적어도 500 mL/day, 750 mL/day, 또는 1,000 mL/day의 관류 속도로 수행되고, 상기 배양의 적어도 제 2 부분은 (약) 또는 적어도 1,200

mL/day, 1,400 mL/day, 또는 1,500 mL/day의 관류 속도로 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

- [1098] 101. 구현예 98 내지 100 중의 어느 하나에 있어서, 상기 관류는 세포가 특정 밀도에 도달할 때 개시되고/되거나 증가되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1099] 102. 구현예 101에 있어서, 상기 특정 밀도는 (약) 또는 적어도 0.4×10^6 개의 세포, 0.5×10^6 개의 세포, 0.6×10^6 개의 세포, 0.8×10^6 개의 세포, 1.0×10^6 개의 세포, 1.2×10^6 개의 세포, 1.4×10^6 개의 세포, 1.6×10^6 개의 세포, 1.8×10^6 개의 세포, 2.0×10^6 개의 세포, 2.2×10^6 개의 세포, 또는 2.4×10^6 개의 세포인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1100] 103. 구현예 98 내지 102 중의 어느 하나에 있어서, 상기 관류는 상기 세포가 (약) 0.6×10^6 개 세포/mL의 밀도에 도달할 때 (약) 750 mL/day의 속도로 개시되고/되거나 증가되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1101] 104. 구현예 98에 있어서, 상기 관류는 상기 세포가 (약) 2.0×10^6 개의 세포/m의 밀도에 도달할 때 (약) 1500 mL/day의 속도로 개시되고/되거나 증가되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1102] 105. 구현예 50 내지 104 중의 어느 하나에 있어서, 상기 배양은 하나 이상의 사이토카인의 존재하에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1103] 106. 구현예 105에 있어서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 재조합 IL-2, 재조합 IL-7, 및/또는 재조합 IL-15으로부터 선택되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1104] 107. 구현예 105 또는 106에 있어서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 50 내지 400 IU/mL의 재조합 IL-2; 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7; 및/또는 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1105] 108. 구현예 105 내지 107 중의 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 사이토카인은 50 내지 400 IU/mL의 재조합 IL-2; 100 IU/mL 내지 1,000 IU/mL의 재조합 IL-7; 및 10 내지 200 IU/mL의 재조합 IL-15을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1106] 109. 구현예 50 내지 108 중의 어느 하나에 있어서, 상기 배양은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 3일 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 3일 이내에 개시되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1107] 110. 구현예 50 내지 109 중의 어느 하나에 있어서, 상기 배양은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 60시간 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 60시간 이내에 개시되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1108] 111. 구현예 50 내지 110 중의 어느 하나에 있어서, 상기 배양은, 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시후 48시간 이내에 및/또는 상기 투입 조성물의 상기 CD4+ T 세포 및 상기 CD8+ T 세포가 조합된 후 48시간 이내에 개시되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1109] 112. 구현예 50 내지 111 중의 어느 하나에 있어서, 상기 배양은, 적어도 상기 조성물이 T 세포의 임계치의 수를 포함할 때까지 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1110] 113. 구현예 112에 있어서, 상기 배양은, 상기 T 세포의 임계치의 수가 도달된 후 적어도 1일 동안 지속되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1111] 114. 구현예 113에 있어서, 상기 T 세포의 임계치의 수는 (약) 또는 적어도 1200×10^6 개의 세포인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1112] 115. 구현예 50 내지 114 중의 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포의 임계치의 수는 (약) 또는 적어도 3500×10^6 개의 세포인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1113] 116. 구현예 50 내지 115 중의 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포의 임계치의 수는 (약) 또는 적어도 5500×10^6 개의 세포인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1114] 117. 구현예 50 내지 116 중의 어느 하나에 있어서, 상기 배양 후 상기 산출 조성물의 세포를 수거하는 것을 포

합하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

- [1115] 118. 구현예 50 내지 117 중의 어느 하나에 있어서, 상기 배양 후 상기 산출 조성물의 세포를 수거하는 것을 포함하되, 상기 산출 조성물의 세포는 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시 후 적어도 9일 경과 후에 수거되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1116] 119. 구현예 50 내지 118 중의 어느 하나에 있어서, 상기 배양 후 상기 산출 조성물의 세포를 수거하는 것을 포함하되, 상기 산출 조성물의 세포는 자극 조건하의 상기 인큐베이션의 개시 후 적어도 10일 경과 후에 수거되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1117] 120. 구현예 118 또는 119에 있어서, 8일 내지 25일 이내인 상기 인큐베이션의 개시와 상기 산출 조성물의 세포 수거 사이의 시간의 95% 신뢰 구간을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1118] 121. 구현예 118 또는 119에 있어서, 9일 내지 21일 이내인 상기 인큐베이션의 개시와 상기 산출 조성물의 세포 수거 사이의 시간의 95% 신뢰 구간을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1119] 122. 구현예 118 또는 119에 있어서, 9일 내지 16일 이내인 상기 인큐베이션의 개시와 상기 산출 조성물의 세포 수거 사이의 시간의 95% 신뢰 구간을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1120] 123. 구현예 52 내지 122 중의 어느 하나에 있어서, 추가로 선택적으로는 약학적으로 허용가능한 부형제의 존재 하에 저온 보존(cryopreservation)동안 상기 산출 조성물의 세포를 제형화하고/하거나 대상체에 투여하는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1121] 124. 구현예 123에 있어서, 상기 산출 조성물의 세포는 저온 보호제(cryoprotectant)의 존재하에서 제형화되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1122] 125. 구현예 124에 있어서, 상기 저온 보호제는 DMSO를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1123] 126. 구현예 122 내지 124 중의 어느 하나에 있어서, 상기 산출 조성물의 상기 세포는 용기, 선택적으로는 바이알(vial) 또는 백(bag)에서 제형화되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1124] 127. 구현예 1 내지 126 중의 어느 하나에 있어서, 추가로 상기 인큐베이션 이전에 생물학적 샘플로부터 상기 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포를 단리시키는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1125] 128. 구현예 127에 있어서, 상기 단리는 CD4 및/또는 CD8의 표면 발현에 기초하여, 선택적으로는 양성 또는 음성 선별에 의해서 세포를 선별하는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1126] 129. 구현예 127 또는 128에 있어서, 상기 단리는 면역친화성-기반 선별(immunoaffinity-based selection)을 수행하는 것을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1127] 130. 구현예 127 내지 129 중의 어느 하나에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 대상체로부터 수득된 1차 T 세포를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1128] 131. 구현예 130에 있어서, 상기 대상체는 인간 대상체인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1129] 132. 구현예 127 내지 131 중의 어느 하나에 있어서, 상기 생물학적 샘플은 전혈 샘플(whole blood sample), 버피 코트 샘플(buffy coat sample), 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 비분획 T 세포 샘플(unfractionated T cell sample), 림프구 샘플, 백혈구 샘플, 성분 채집 생성물(apheresis product), 또는 백혈구 생성물(leukapheresis product)이거나 또는 그들을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1130] 133. 구현예 1 내지 132 중의 어느 하나에 있어서, 상기 제조함 수용체는 질병, 장애 또는 병태의 세포 또는 조직과 관련되고, 그에 특이적이고/이거나 그 위에서 발현되는 표적 항원에 결합할 수 있는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1131] 134. 구현예 133에 있어서, 상기 질병, 장애 또는 병태는 감염성 질병 또는 장애, 자가면역 질병, 염증성 질병, 또는 종양 또는 암인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1132] 135. 구현예 133 또는 134에 있어서, 상기 표적 항원은 종양 항원인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1133] 136. 구현예 133 내지 135 중의 어느 하나에 있어서, 상기 표적 항원은, 5T4, 8H9, avb6 인테그린, B7-H6, B 세포 성숙화 항원(BCMA), CA9, 암성-고환 항원, 탄산 무수화 효소 9(CAIX), CCL-1, CD19, CD20, CD22, CEA, B형 간염 표면 항원, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, 암배아성

항원(CEA), CE7, 사이클린, 사이클린 A2, c-Met, 이중 항원, EGFR, 상피 당단백질 2(epithelial glycoprotein 2, EPG-2), 상피 당단백질 40(EPG-40), EPHA2, 에프린B2(efrinB2), erb-B2, erb-B3, erb-B4, erbB 이합체들, EGFR vIII, 에스트로젠 수용체, 태아 AchR, 염산 수용체 알파, 염산 결합 단백질(FBP), FCRL5, FCRH5, 태아 아세틸콜린 수용체, G250/CAIX, GD2, GD3, gp100, Her2/neu(수용체 티로신 키나아제 erbB2), HMW- MAA, IL-22R-알파, IL-13 수용체 알파 2(IL-13R α 2), 키나아제 삽입 도메인 수용체(kdr), 카파 경쇄, 루이스 Y, L1-세포 접착 분자(L1-CAM), 흑색종-관련 항원(MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MART-1, 메소텔린, 쉼-CMV, 뮤신 1(mucin 1, MUC1), MUC16, NCAM, NKG2D, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, O-아세틸화 GD2(OGD2), 종양 태아성 항원(oncofetal antigen), 흑색종에서 우선적으로 발현되는 항원(PRAME), PSCA, 프로게스테론 수용체, 서바이빈, ROR1, TAG72, VEGF 수용체, VEGF-R2, 윌름스 종양 1(WT-1), 병원균-특이적 항원 및 범용 태그와 관련된 항원 중에서 선택되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

- [1134] 137. 구현예 1 내지 136 중의 어느 하나에 있어서, 상기 재조합 수용체는 기능성 비-TCR 항원 수용체 또는 TCR 또는 그들의 항원-결합 단편이거나 또는 그들을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1135] 138. 구현예 1 내지 137 중의 어느 하나에 있어서, 상기 재조합 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1136] 139. 구현예 1 내지 138 중의 어느 하나에 있어서, 상기 재조합 수용체는 항-BCMA CAR인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1137] 140. 구현예 138 또는 139에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 항원-결합 도메인을 포함하는 세포의 도메인을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1138] 141. 구현예 140에 있어서, 상기 항원-결합 도메인은 항체 또는 그의 항체 단편이거나 그들을 포함하고, 선택적으로는 단쇄 단편(single chain fragment)인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1139] 142. 구현예 141에 있어서, 상기 단편은 가요성 링커(flexible linker)에 의해서 연결된(joined) 항체 가변 영역을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1140] 143. 구현예 141 또는 142에 있어서, 상기 단편은 scFv를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1141] 144. 구현예 138 내지 143 중의 어느 하나에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 추가로 스페이스(spacer) 또는 힌지 영역(hinge region)을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1142] 145. 구현예 138 내지 144 중의 어느 하나에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 세포내 신호전달 영역(intracellular signaling region)을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1143] 146. 구현예 145에 있어서, 상기 세포내 신호전달 영역은 세포내 신호전달 도메인(intracellular signaling domain)을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1144] 147. 구현예 146에 있어서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 1차 신호전달 도메인(primary signaling domain), T 세포에서 1차 활성화 신호(primary activation signal)를 유도할 수 있는 신호전달 도메인, T 세포 수용체(TCR) 요소의 신호전달 도메인 및/또는 면역 수용체 티로신-계 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 신호전달 도메인이거나 또는 그들을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1145] 148. 구현예 146 또는 147에 있어서, 상기 세포내 신호전달 도메인은 CD3 ζ의 세포내 신호전달 도메인, 선택적으로는 CD3-제타(CD3 ζ) ζ, 또는 그의 신호전달 부분(signaling portion)이거나 또는 그들을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1146] 149. 구현예 145 내지 148 중의 어느 하나에 있어서, 상기 키메라 항원 수용체는 추가로 상기 세포의 도메인과 상기 세포내 신호전달 영역 사이에 배치된 막관통 도메인(transmembrane domain)을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1147] 150. 구현예 145 내지 149 중의 어느 하나에 있어서, 상기 세포내 신호전달 영역은 추가로 동시 자극 신호전달 영역(costimulatory signaling region)을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1148] 151. 구현예 150에 있어서, 상기 동시 자극 신호전달 영역은 T 세포 동시 자극 분자의 세포내 신호전달 도메인 또는 그의 신호전달 부분을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1149] 152. 구현예 150 또는 152에 있어서, 상기 동시 자극 신호전달 영역은 CD28, a 4-1BB 또는 ICOS의 세포내 신호

전달 도메인 또는 그의 신호전달 부분을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

- [1150] 153. 구현예 150 내지 152 중의 어느 하나에 있어서, 상기 동시 자극 신호전달 영역은 상기 막관통 도메인과 상기 세포내 신호전달 영역 사이에 있는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1151] 154. 구현예 113 내지 153 중의 어느 하나에 있어서, 상기 임계치의 수 또는 그 초과수의 세포를 포함하는 상기 산출 조성물은, 상기 제조방법의 반복의 (약) 85% 초과, (약) 90% 초과 또는 (약) 95% 초과 중에서 생성되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1152] 155. 구현예 1 내지 154 중의 어느 하나에 있어서,
- [1153] 상기 무혈청 배지는,
- [1154] 기본 배지 중의 디펩티드 형태의 L-글루타민 0.5 mM 내지 5 mM;
- [1155] L-글루타민 0.5 mM 내지 5 mM; 및
- [1156] 적어도 하나의 단백질을 포함하되,
- [1157] 상기 배지는 무혈청 배지인
- [1158] 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1159] 156. 구현예 155에 있어서, 상기 디펩티드 형태의 L-글루타민은 L-알라닐-L-글루타민인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1160] 157. 구현예 155 또는 156에 있어서, 상기 무혈청 배지 중의 상기 디펩티드 형태의 L-글루타민의 농도는 (약) 2 mM인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1161] 158. 구현예 155 내지 157 중의 어느 하나에 있어서, 상기 무혈청 배지 중의 L-글루타민의 농도는 (약) 2 mM인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1162] 159. 구현예 155 내지 158 중의 어느 하나에 있어서, 상기 적어도 하나의 단백질은 하나 이상의 알부민, 인슐린 또는 트랜스페린(transferrin), 선택적으로는 하나 이상의 인간 또는 재조합 알부민, 인슐린 또는 트랜스페린을 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1163] 160. 구현예 1 내지 150 중의 어느 하나의 제조방법에 의해서 제조된 조작된 세포를 포함하는 조성물.
- [1164] 161. 구현예 160에 있어서, 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 것인 조성물.
- [1165] 162. 구현예 160 또는 161에 있어서, 저온 보호제(cryoprotectant), 선택적으로는 DMSO를 포함하는 것인 조성물.
- [1166] 163. 구현예 160 내지 162 중의 어느 하나의 조성물, 및 산출 조성물을 대상체에 투여하기 위한 지침을 포함하는 제조 제품.
- [1167] 164. 구현예 163에 있어서, 상기 대상체는 질병 또는 병태를 갖고, 선택적으로 상기 재조합 수용체는 상기 질병 또는 병태의, 세포와 관련되거나 또는 그 위에서 발현하거나 또는 존재하는 항원을 특이적으로 인식하거나 또는 그에 특이적으로 결합하는 것인, 제조 제품.
- [1168] 165. 구현예 55 내지 159 중의 어느 하나에 있어서, 상기 배양의 적어도 일부동안, 상기 세포는 세포 생존율, 농도, 밀도, 수, 또는 그의 조합에 대해 모니터링되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1169] 166. 구현예 165에 있어서, 상기 모니터링은 광학 방법(optical method), 선택적으로 현미경에 의해서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1170] 167. 구현예 165 또는 166에 있어서, 상기 모니터링은 명 시야 현미경(bright field microscopy), 형광 현미경, 시차 간섭 콘트라스트 현미경(differential interference contrast microscopy), 위상 콘트라스트 현미경(phase contrast microscopy), 디지털 홀로그래피 현미경(DHM), 시차 디지털 홀로그래피 현미경(DDHM), 또는 이들의 조합에 의해서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1171] 168. 구현예 165 내지 167 중의 어느 하나에 있어서, 상기 모니터링은 시차 디지털 홀로그래피 현미경(DDHM)에 의해서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

- [1172] 169. 구현예 165 내지 168 중의 어느 하나에 있어서, 상기 모니터링은 상기 배양의 적어도 일부동안 간헐적으로 또는 연속적으로 수행되고, 선택적으로는 상기 배양도중에 적어도 매 1시간, 6시간, 12시간, 18시간, 24시간, 또는 26시간동안 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1173] 170. 구현예 165 내지 169 중의 어느 하나에 있어서, 상기 모니터링은, 상기 세포가 T 세포의 임계치의 수, 생존 T 세포의 임계치의 수, T 세포의 임계치의 농도 또는 생존 T 세포의 임계치의 농도에 도달할 때까지 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1174] 171. 구현예 165 내지 170 중의 어느 하나에 있어서, 상기 모니터링 및 배양은 폐쇄된 시스템(closed system)에서 수행되는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1175] 172. 구현예 50 내지 159 및 165 내지 171 중의 어느 하나에 있어서,
- [1176] 상기 산출 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 메모리 표현형(memory phenotype)이고;
- [1177] 상기 산출 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 중추 메모리 표현형이고/이거나;
- [1178] 상기 산출 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, 그랜자임(granzyme) B-, 및/또는 CD127+인
- [1179] 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1180] 173. 구현예 50 내지 159 및 165 내지 172 중의 어느 하나에 있어서,
- [1181] 상기 제조방법의 반복은 선택적으로는 상기 제조방법이 복수의 상이한 개별 대상체 중에서 실시되는 인간 생물학적 샘플로부터 복수의 산출 조성물을 생성하되, 상기 복수의 산출 조성물 중의 메모리 표현형의 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이고;
- [1182] 상기 복수의 산출 조성물 중의 중추 메모리 표현형의 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이며;
- [1183] 상기 복수의 산출 조성물 중에서 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, CD95+, 그랜자임 B-, 및/또는 CD127+인 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이고;
- [1184] 상기 복수의 산출 조성물 중에서 CCCR7+/CD45RA- 또는 CCR7+/CD45RO+인 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이며;
- [1185] 상기 복수의 산출 조성물의 조작된 CD4+ T 세포 중의 중추 메모리 CD4+ T 세포, 선택적으로는 CAR+CD4+ T 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이고;
- [1186] 상기 복수의 산출 조성물의 조작된 CD8+ T 세포 중의 중추 메모리 CD8+ T 세포, 선택적으로는 CAR+CD8+ T 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%이고/이거나;
- [1187] 상기 복수의 산출 조성물의 조작된 T 세포 중의 중추 메모리 T 세포, 선택적으로는 CD4+ 중추 메모리 T 세포 및 CD8+ 중추 메모리 T 세포, 선택적으로는 CAR+ T 세포의 평균 백분율은 약 40% 내지 약 65%, 약 40% 내지 약 45%, 약 45% 내지 약 50%, 약 50% 내지 약 55%, 약 55% 내지 약 60%, 또는 약 60% 내지 약 65%인
- [1188] 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1189] 174. 구현예 1 내지 159 및 165 내지 173 중의 어느 하나에 있어서,
- [1190] 상기 제조방법은, 복수의 상이한 개별 대상 중에서 수행되는 인간 생물학적 샘플의 적어도 약 80%, 약 90%, 약 95%, 약 97%, 약 99%, 약 100%, 또는 100%에서, 예비 결정된 특징, 선택적으로는 산출 조성물에서 CAR을 발현하

는 임계 수의 세포를 나타내는 산출 조성물을 생성하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.

- [1191] 175. 구현예 174에 있어서, 상기 복수의 상이한 개별 대상체는 질병 또는 병태를 갖는 대상체를 포함하는 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1192] 176. 구현예 175에 있어서, 상기 질병 또는 병태는 암인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1193] 177. 구현예 176에 있어서, 상기 암은 혈액 암, 선택적으로는 다발성 골수종인 것인, 조작된 세포의 조성물의 제조방법.
- [1194] 178. 구현예 160에 있어서,
- [1195] 상기 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 메모리 표현형이고;
- [1196] 상기 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 중추 메모리 표현형이며;
- [1197] 상기 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 CD27+, CD28+, CCR7+, CD45RA-, CD45RO+, CD62L+, CD3+, 그랜자임 B-, 및/또는 CD127+이고/이거나;
- [1198] 상기 산출 조성물 중의 세포의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 95% 초과는 CCR7+/CD45RA-이거나 CCR7+/CD45RO+인
- [1199] 것인, 조성물.
- [1200] IX. 실시예
- [1201] 다음의 실시예는 오직 설명의 목적으로 제공되는 것이며 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니다.
- [1202] **실시예 1: 항-BCMA CAR을 발현하는 조작된 T 세포의 치료 조성물을 제조하기 위한 방법**
- [1203] 항-BCMA 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 함유하는 1 차 T 세포의 조작된 조성물은 선택된 세포를 후속 공정 단계에 대해 정의된 비율로 배합하기 전에 샘플로부터 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 별도로 선별하는 것을 포함하는 예시적인 방법에 의해 제조하였다. CD4+ 및 CD8+ 세포의 별도의 조성물은 다발성 골수종(MM)을 갖는 대상체로부터의 것을 포함하여, 인간 백혈구 샘플로부터 분리된 PBMC로부터 선별되고, 상기 선별된 세포 조성물은 저온 동결되었다. 이어서, 선별된 CD4+ 및 CD8+ T 세포 조성물을 해동시키고, 1:1의 비율로 생존 CD4+ T 세포 대 생존 CD8+ T 세포를 혼합하여 자극, 형질도입 및 증폭을 위한 단계를 수행하였다.
- [1204] 약 3×10^6 개의 T 세포/mL의 밀도로 혼합된 세포 조성물로부터 대략 300×10^6 개의 T 세포/mL (150×10^6 개의 CD4+ 및 150×10^6 개의 CD8+ T 세포)를, 예시적인 무혈청 배지 중에서 1:1의 비드 대 세포 비율로 부착된 항-CD3 및 항-CD28 항체를 갖는 상자성 폴리스티렌-코팅된 비드의 존재하에 자극하였다(예를 들어 실시예 3 참조). 또한, 배지는 제조함 IL-2, IL-7 및 IL-15를 함유하였다. 자극은 18 내지 30시간 동안 배양하여 수행하였다.
- [1205] 인큐베이션 후, 자극된 세포 조성물로부터 약 100×10^6 개의 생존 세포를 세척하고, 제조함 IL-2, IL-7 및 IL-15를 함유하는 예시적인 무혈청 배지 중에서 재현탁시켰다. 형질도입 보조제는 첨가하지 않았다. 세포를 60분 동안 접촉하여 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입시킨 후, 약 37°C에서 약 18 내지 30시간 동안 인큐베이션하였다. CAR은 BCMA에 특이적인 scFv 항원-결합 도메인, CD28 막관통 영역, 4-1BB 공동 자극 신호전달 영역, 및 CD3-제타 유도된 세포내 신호전달 도메인을 함유하였다.
- [1206] 이어서, 형질도입된 세포를 인큐베이션 및 형질도입 단계 동안 사용된 IL-2, IL-7 및 IL-15의 농도의 2배를 함유하는 예시적인 약 500 mL의 무혈청 배지 중의 바이오투어(예를 들어, 락킹 바이오투어)로 운반함으로써 증폭을 위해 배양하였다. 이 예시적인 방법에서, 상기 배지는 폴록사머를 함유하지 않았다. (약) 0.6×10^6 개 초과 세포/mL의 임계치의 세포 밀도가 달성된 후, 배지를 주기적으로, 예를 들어 약 2 내지 약 15분 동안 1000mL의 부피로 첨가하고, 세포를 정상 락킹 조건(비-관류)하에 (약) 0.6×10^6 개 초과 세포/mL의 임계치의 생존 세포 밀도가 달성될 때까지 배양하였다. 생존 세포 밀도가 0.8×10^6 개 세포/mL를 초과하는 경우, 조합 충전/관류 단계가 개시되었는데, 여기서 제 1 배지는 상기 지시된 바와 같이 단계적으로 첨가되었고, 1000mL의 표적 부피까지

관류가 후술하는 바와 같이 개시되었다. 이어서, 배지를 계속 혼합하면서 반-연속 관류(semi-continuous perfusion)로 대체하였다. 관류 속도 및/또는 락킹 속도는 세포 밀도가 증가함에 따라 증폭 단계동안 적어도 1배 증가하였다. 관류 속도는 세포 밀도가 증가함에 따라 증폭 단계동안 적어도 1배 증가하였다. 배지는 생존 가능한 세포 밀도(일단 특정 밀도가 도달되면 더 높은 속도를 가짐)에 의해 결정된 1일 당 총 부피를 갖는 단계적 방식으로, 예를 들어 (더 높은 세포 농도에 도달할 때 더 높은 속도를 갖는) 1일 당 배양물에 첨가된 총 신선한 배지 약 750 mL 또는 1500 mL를 생성하고, 매 약 0.5시간 내지 매 약 1.5시간 또는 2시간 사이와 같이 주기적으로 매일 첨가되는 신선한 배지의 샷(shot)을 생성한다. 핵 형성 세포(TNC)의 총수가 적어도 또는 적어도 대략 3500×10^6 개에 도달한 후 1일에 또는 상기 TNC 수가 적어도 또는 적어도 대략 5500×10^6 개의 핵 형성 세포에 도달한 시점에서 수확하였다. 수확후, 항-CD3 및 항-CD28 항체 콘주게이트된 비드를 자기장에 노출시켜 세포 조성물로부터 제거하였다.

[1207] 이어서 세포를 제형화하고, 조성물의 분취량을 예를 들어 다운스트림 저장 또는 사용을 위해 용기로 옮겼다. 일부 구현예에서, 제형화된 조성물 또는 그의 일부는 예를 들어 세포 조성물의 저온 보존 및 저장에, 대상체에 대한 잠재적 투여에 적합한 동결 백(freezing bag)(예를 들어 저온 저장 동결 백)으로 운반하고/하거나, 그의 조성물 또는 일부를, 예를 들어 세포의 추가 분석을 위해 바이알 또는 다른 용기로 옮겼다. 세포는 다운스트림 해동에 적합한 조건하에 투여에 사용하기 위해서 저온 동결시켰다. 일부 경우에, 30mL 부피의 제형화된 세포가 개별 백에 사용되었다. 일부 경우에, 세포를 가변 총 세포 농도로 저온 보존하여, 예를 들어 투여용 세포의 맥락에서 각 투여량에서 CAR+ T 세포의 일정한 수 또는 농도를 허용하게 하였다. 일부 구현예에서, 표적 CAR+ CD3+ 세포수는 30mL 당 또는 백 당 약 또는 대략 원하는 수(예를 들어 (약) 37.5×10^6) CAR+CD3+ 세포이며, 이것은, 일부 구현예에서, 상이한 공여체 또는 환자로부터 생성된 조성물 중에서 총 세포 농도를 변화시키는 것을 포함한다.

[1208] 상기 샘플로부터 조작된 세포 조성물을 생성하기 위해 이러한 예시적인 공정을 사용하여, 다수의 골수종 환자의 범위로부터 수득된 개개의 백혈구 샘플에 대해, 수확을 통한 활성화의 개시으로부터의 공정의 일부의 지속기간은 7일 내지 10일이고, 이들 샘플 중 평균 기간은 대략 7.5일이라는 것이 측정되었다. 도 6a 및 도 6b는 각각 조작된 세포 조성물에서 CD4+CAR+ 세포(도 6a) 및 CD8+CAR+ 세포(도 6b)중에서 표시된 표현형(CD45RA 및 CCR7 표면 발현에 기초함)의 세포의 백분율에 대한 중간(수평 라인), 인터쿼타일 범위(박스), 및 1.5×인터쿼터 범위(위스커)를 나타낸다. 도 6c 및 6d는 각각 조작된 세포 조성물에서 CD4+CAR+ 세포(도 6c) 및 CD8+ CAR+ 세포(도 6d)중에서 표시된 표현형(CD27 및 CD28 표면 발현에 기초함)의 세포의 백분율에 대한 중간(수평 라인), 인터쿼타일 범위(박스), 및 1.5×인터쿼타일 범위(위스커)를 나타낸다.

[1209] **실시예 2: CD4+ 및 CD8+CAR-T 세포의 생성된 치료 조성물의 특징의 평가**

[1210] 항-BCMA CAR을 발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 함유하는 복수의 조작된 세포 조성물을 실시예 1에 기재된 예시적인 방법에 의해 건강한 공여체로부터 생성하였다. 세포를 제조할 인간 BCMA 시약을 사용하여 생존율, 항-BCMA CAR 발현 및 CAR 항원-특이적 자극에 대해 평가하였다. 예시적인 방법에 의해 제조된 조작된 세포 조성물은 카스파제 양성 세포 및 높은 세포 생존율(아크리딘 오렌지(acridine orange; AO) 및 프롤리듐 요오드화물 염색(propidium iodide staining)에 의해 측정됨)의 일관되게 낮은 백분율을 나타내었다. 추가로, CAR+ 세포의 백분율은 CD4+ 및 CD8+ 세포에서 유사하였다. IFN-감마, TNF-알파, IL2, 그랜자임 B를 비롯한 사이토카인의 생성, 및 조작된 세포 조성물을 항원 발현 표적 세포로 24 시간 인큐베이션한 후, 본 발명자들의 경험에서, 활성화된 세포 조성물과 일치하는 값으로 사이토카인을 제조하였다. 이러한 결과는 활성화된 CAR-조작된 세포가 실시예 1에 기재된 방법을 사용하여 일정하게 제조될 수 있음을 입증하였다.

[1211] **실시예 3: 세포를 조작하기 위한 공정에 사용하기 위한 무혈청 배지**

[1212] 치료 T 세포 조성물을 생성하기 위한 실시예 1에 기재된 예시적인 방법은 상기 T 세포를 증폭하는 활성화, 형질 도입 및 배양이 하기 (1) 내지 (3)으로부터 제조되는 무혈청 배지 중에서 제조되는 무혈청 배지 중에서 수행되는 단계들을 포함하였다: (1) 약 2 mM의 L-알라닐-L-글루타민(GlutaMax)을 함유하는 액체 기본 배지; (2) 사용하기 전에 동결상태가 유지된 80 mM 글루타민 및 혈청 대체 단백질을 함유하는 제 1 보충제; 및 (3) 액체 용액, 예를 들어 Optimizer Tm T-세포 증폭 보충제로서 제공되는 제 2 보충제(OpTmizer T-Cell Expansion Supplement).

[1213] 상기 기본 배지는 영양소 혼합물 및 완충액을 함유하였고 페놀 레드를 함유하지 않았다. 동결된 보충물을 해동시킨 후, 성분들을 제 1 보충제의 약 95.0% +/- 0.2%(v/v), 제 1 보충제의 약 2.5% +/- 0.2%(v/v) 및 제 2 보

층제의 약 2.5% +/- 0.2%(v/v)로 조합하여, 예시적인 무혈청 세포 성장 배지("SFM-a"로 표시됨)를 생성하였다. 동결된 보충제 중의 L-글루타민의 존재는, L-글루타민의 불안정성으로 인해 발생할 수 있는 무혈청 배지 제형에서 가변 글루타민 농도 및/또는 암모니아 농도를 증가시키기 위해 기본 배지에 첨가하기 전에 그의 안정성을 보장하였다. L-글루타민은 L-알라닌-L-글루타민의 존재로 인해 제 1 보충제에 가용성으로 유지되었다. 배지는 추가로 사이토킨, 예를 들어 IL-2, IL-7 및/또는 IL-15 로 보충하였다.

[1214] 조작된 T 세포의 70개의 개별 조성물은 전술한 예시적인 공정으로부터 생성되었다. 건강한 공여체 및 다발성 골수종 환자로부터 유래된 것을 포함하여, 각각의 79개의 제조 수행으로부터, 생존 세포의 총 수에 의해 결정되는 바와 같이, 배양동안 확고한 증폭이 관찰되었다. 모든 수행은 배양 개시의 6일 이내에 총 세포에서 5.5×10^9 개의 표적 임계치를 상회하는 세포 밀도를 갖는 세포 조성물을 제조할 수 있었다. 생존 세포의 수가 27배 이상 증가하는 것은 배양 개시 6일 이내에 모든 제조 작업에 대해 관찰되었고, 전체 5일까지는 상기 수행의 85% 이상이 상기 증폭에 도달하는 것으로 관찰되었다. 전체적으로, 이들 데이터는 건강한 공여체 및 환자 공여체로부터 유도된 세포에 대해 무혈청 배지 제형의 강력한 성능을 뒷받침한다.

[1215] **실시예 4: 혈청 배지를 포함하는 공정에 의해 제조된 CAR+ T 세포 조성물의 평가**

[1216] 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 유전적으로 조작된 인간 T 세포를 실시예 1에 기재된 바와 실질적으로 동일한 방법에 의해 예시적인 SFM-A의 존재하에 제조하였다. 이 연구에서, CAR-발현 T 세포를 생성하기 위해서, CD4+ 및 CD8+ T 세포를, 항-CD3/항-CD28 자성 비드의 존재하에 활성화되고, 약 1:1로 혼합된, 공여체 백혈구 샘플로부터 면역친화성-기재 풍부화에 의해 개별적으로 단리하고, 항-BCMA CAR을 암호화하는 바이러스 벡터로 형질도입하고, 약 37°C에서 인큐베이션에 의해서 배양하여 세포를 증폭시켰다. 세포를 증폭시키기 위한 활성화, 형질도입 및 배양은 각각 사이토카인의 존재하에 실시예 3에 기재된 5%(v/v) 인간 혈청-함유 배지 또는 SFM-A 배지에서 수행하였다. 생성된 조작된 T 세포 조성물의 예시적인 특징은 SFM-A 또는 혈청-함유 매질의 존재하에 동일한 공여체로부터 생성된 매칭된 세포 조성물 중에서 비교하였다.

[1217] **A. 생존력(Viability)**

[1218] 활성화 후, 활성화 및 형질도입 후, 및 6일까지 배양 개시(day = 0)후 각 일째에 T 세포의 생존율을 평가하였다. 배양 개시 후 2일째에 공정 초기에, 혈청-함유 배지와 비교하여 SFM-A의 존재하에 배양된 세포 조성물에서 더 낮은 세포수 및 생존율을 관찰하였다. 그러나, 증폭의 3일째에, SFM-A 및 혈청-함유 배지의 존재하에 배양된 세포들 간의 생존율을 비교할 수 있었다. 이러한 결과는, 예를 들어 세포가 공정의 초기 단계동안 무혈청 조건에 적응할 때 무혈청 배지의 존재하에서 T 세포 증폭의 지연과 일치한다. 초기 더 낮은 세포수에도 불구하고, SFM-A의 존재하의 세포의 배양은 5일 및 6일째에 약간 더 많은 수의 생존 세포 및 혈청-함유 배지에 필적하는 % 생존 세포를 생성하였다.

[1219] **B. CAR-T 세포 활성화**

[1220] T 세포 조성물 중의 CAR+ T 세포의 기능적 활성을 골지 억제제(Golgi inhibitor)의 존재하에 포르볼 미리스테이트 아세테이트(phorbol myristate acetate; PMA)/이오노마이신으로 자극 후 사이토카인 축적을 모니터링함으로써 평가하였다. 사이토카인의 다기능 축적은 표면 CD4, CD8 또는 항-BCMA CAR에 대해 동시-염색된 세포에서 IL-2, IFN-감마 및 TNF-알파에 대한 세포내 사이토카인 염색(ICS)에 의해 평가되었다. IL-2, IFN-감마 및 TNF-알파의 다기능성 축적에 의해 결정된 바와 같이, 기능적 CAR+CD4+ T 세포 또는 CAR+CD8+ T 세포의 필적하는 백분율은 혈청-함유 배지로 배양된 세포와 비교하여 SFM-A의 존재하에 배양된 세포에서 관찰되었다.

[1221] 사이토카인 IL-2, IFN-감마, TNF-알파 및 GM-CSF의 생성은 또한 생성된 항-BCMA CAR+ T 세포 조성물을 항원-발현 세포로 공동-배양한 후 루미넥스 멀티플렉스 분석을 사용하여 상청액에서 측정하였다. 염증성 사이토카인(IL-2, TNF-알파, GM-CSF 및 IFN-감마)의 분비는 혈청-함유 배지와 비교하여 SFM-A의 존재하에 생성된 배양물 중에서 필적하였다.

[1222] **C. 아포프토틱 마커**

[1223] 혈청-함유 배지 또는 예시적인 SFM-A를 사용하는 방법에 의해 생성된 항-BCMA CAR+ T 세포 조성물을 활성화 카스파제 3의 표면 발현에 대해 평가하였다. SFM-A의 존재하에 배양된 생성된 조작된 CD3+CAR+ 세포의 5% 미만은 활성화 카스파제-3에 대해 양성이었다. 활성화 카스파제-3에 대해 양성인 CD3+CAR+ 세포의 빈도는 혈청-함유 배지와 비교하여 SFM-A의 존재하에 배양될 때 예시적인 공여체로부터 생성된 매칭된 T 세포 조성물에서 더 낮았다.

[1224] **D. 형질도입 빈도**

- [1225] 생성된 T 세포 조성물의 형질도입 빈도는 유세포 측정법에 의해 측정하였다. 항-BCMA CAR의 표면 발현은 CAR 특이적 시약을 사용하여 측정하였다. 예시적인 공여체-매치된 T 세포 조성물에서, SFM-A를 포함하는 방법에 의해 제조된 세포는 혈청-함유 배지를 포함하는 방법에 의해 생성된 세포와 비교하여 증가된 형질도입 효율을 나타내었다. 예시적인 실험에서, 형질도입 효율은 약 53% 내지 약 68%로 증가하였다.
- [1226] **실시예 5: 무혈청 배지 공정에 의해 생산된 CAR-발현 T 세포의 항-종양 효과**
- [1227] 항-BCMA CAR+ T 세포 조성물은 실질적으로 실시예 1 및 3에 기재된 바와 같이 예시적인 SFM-A를 포함하는 방법에 의해 제조하였다. 비교로서, 매치된 공여체로부터의 T 세포 조성물을 혈청-함유 배지를 사용하는 것을 제외하고는 유사한 공정에 의해 제조하였다. 생성된 CAR+ T 조성물의 항-종양 효과는 OPM2 인간 다발성 골수종 유포된 이종이식 마우스 모델을 포함하는 종양-함유 동물 모델에서 세포의 채택에 따른 종양을 모니터링함으로써 평가되었다.
- [1228] 종양-보유 마우스를 생산하기 위해서, 6 내지 8 주령의 암컷 NOD.Cg.Prkdc^{scid} IL2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) 마우스에 신축하게 luciferase(OPM2-ffluc)로 형질주입된 2×10^6 개의 OPM2(다발성 골수종) 세포를 주입하였다. 종양 크기는 생물발광 영상화를 사용하여 13일째에 모니터링하고, 14일째에 SFM-A를 포함하는 공정에 의해 또는 혈청-함유 배지를 포함하는 공정에 의해 생성된 항-BCMA CAR+ T 세포 조성물의 단일 정맥내(iv) 주입으로 투여하였다. 평가된 항-BCMA CAR+ T 세포 조성물은 동일한 인간 공여체로부터 생성되었다. 세포를 1×10^6 , 5×10^5 , 또는 2.5×10^5 개의 CAR-발현 T 세포의 투여량으로 투여하였다. CAR(mock)를 발현하지 않은 세포를 음성 대조군으로 사용하였다. 마우스의 종양 성장 및 생존을 세포의 투여 후 100일의 기간에 걸쳐 모니터링하였다.
- [1229] 입양으로 운반된 CAR-발현 세포의 항-종양 활성은 CAR T 세포 주사 후 다양한 날에 100일까지 바이오루미네선스 이미지화에 의해서 모니터링되었다. 바이오루미네선스 이미지화를 위해서, 마우스는 PBS($15 \mu\text{g/g}$ 체중)에 재현탁된 루시페린 기질(CaliperLife Sciences, Hopkinton, MA)의 복강내(ip) 주사하였다. 마우스를 마취시키고 본질적으로 국제공개공보 제W096/095895호에 기재된 바와 같이 이미지화하였다. 총 플럭스(광자/s)를 각 시점에서 측정하였다. 음성 대조군 처리된 마우스에 대해, 높은 종양 부담으로 인해, CAR-T 전달 후 22일 내지 26일 사이에 동물을 희생시켰다. SFM-A 또는 혈청-함유 배지 중 어느 하나로 제조된 CAR-발현 T 세포는 종양 성장 및 연장된 생존이 느려졌으며, 이는 일반적으로 모든 평가된 투여량에서 필적하였다.
- [1230] **실시예 6: 예시적인 공정 조건**
- [1231] 실시예 1에 기재된 예시적인 공정과 유사하지만, 상이한 공정 단계의 다양한 측면이 변화되는 예시적인 공정에 사용된 조건과 관련된 다양한 파라미터가 평가되었다. 상기 측면들은 활성화 밀도 및 인큐베이션 시간의 양태, 사용된 사이토카인(들)의 형질 및 농도, 및 이들 상이한 변화된 공정에 의해 생성된 세포 조성물의 관류 속도 결과를 평가하였다.
- [1232] 본 실시예 6의 각 방법은 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포가 공여 대상자로부터의 백혈구 샘플로부터 선별된 선별 단계를 포함하여, 생존 세포를 생존가능한 CD4+ 및 생존 CD8+ 세포의 약 1:1의 비율로 혼합하고, 이어서 항-CD3/항-CD28 자성 비드 및 무혈청 배지 중의 하나 이상의 사이토카인의 존재하에 혼합 세포를 활성화시킴으로써 각각 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 2개의 분리된 조성물을 생성하고, 예시적인 CAR을 암호화하는 바이러스 벡터와의 형질도입, 및 무혈청 배지에서 항-CD3/항-CD28 자성 비드 및 하나 이상의 사이토카인의 존재하에 배양하고, 이어서 상이한 공정 중에서 특정한 특정 파라미터를 갖는 제형 및 저온 보존을 수행하였다.
- [1233] **A. 활성화 인큐베이션 시간**
- [1234] 한 연구에서, 선별 후 및 형질도입 전(항-CD3/항-CD28-코팅된 비드, 사이토카인(들) 및 무혈청 배지)의 지속기간을 변화시켰다. 구체적으로, 인큐베이션을 24시간(n=3개의 개별 공여체로부터 n=5개의 세포 조성물) 또는 48시간(2개의 개별 공여체로부터 n=2개의 세포 조성물)동안 수행하였다.
- [1235] 상기 방법에 의해 생성된 최종 세포 조성물에서 T 세포의 형질도입의 효율은 CD3(항-CD3 시약을 사용하여) 및 CAR(제조항 BCMA-Fc 시약을 사용하여)의 표면 발현에 대한 염색에 의해 유세포측정법에 의해 평가하였다. 형질도입 개시 전에 인큐베이션의 24 시간 기간을 사용하는 방법에 의해 생성된 조작된 세포 조성물은 형질도입 개시 전에 인큐베이션의 48시간 지속기간을 사용하는 방법에 의해 생성된 세포 조성물과 비교하여 형질도입된 T(CD3+CAR+) 세포의 약 2 배 더 큰 백분율을 갖는 것으로 관찰되었다.
- [1236] 추가로, 상이한 배양 기간을 갖는 방법에 의해 제조된 조작된 세포를 K562-BCMA로 4일동안 공동 배양하였다. 증

식을 모니터링하기 위해, 증식 마커 염료 CELLTRACE VIOLET(CTV; ThermoFisher Scientific, Waltham MA)로 세포를 표지(label)하였다. 공동 배양 후, 세포를 항-BCMA CAR, CD4 및 CD8의 표면 발현에 대해 염색하고, 유세포 측정법으로 측정하였다.

[1237] 그 결과를 표 E1에 요약하였다. 평균 형광 강도(MFI)에 의해 결정되는 CAR+ 세포에서 더 큰 수준의 CAR 표면 발현, 및 CD4+ 및 CD8+ T 세포 모두에서, (감소된 CTV MFI로 나타난 CTV 염료에서 희석에 의해 측정되는) 이 분석에서 더 큰 정도의 항원-발현 세포-유도된 증식이, 48시간 인큐베이션을 이용하는 방법과 비교하여 항-CD3/항-CD28 자성 비드와 함께 24시간 예비-형질도입 인큐베이션을 사용하는 방법으로 생성된 조작된 세포 조성물에서 관찰되었다. 이러한 결과는 48시간 미만, 예를 들어 대략 24시간의 지속 시간의 사후-선별, 사전-형질도입 인큐베이션 기간을 포함하는 예시적인 방법에 의해 증가된 CAR 형질도입 효율 및 CAR 항원-특이적 기능성과 일치한다.

[1238] [표 E1]

[1239] K562-BCMA 표적 세포로의 인큐베이션 후 CAR 및 CTV 염색

	세포 유형	중양값 CAR MFI	중양값 CTV MFI
24 시간 자극	CD4+ T cells	14463	4057
	CD8+ T cells	16187	4116
48 시간 자극	CD4+ T cells	5659	22932
	CD8+ T cells	12862	8099

[1240]

[1241] **B. 활성화 세포 밀도**

[1242] 항-CD3/항-CD28 자성 비드, 사이토카인 및 배지와 함께 사전-형질도입 인큐베이션 동안의 세포 밀도의 효과는 또한 1.5×10^6 개 세포/mL의 초기 세포 밀도로 세포를 이용하여 인큐베이션이 개시되는 방법에 의해 생성된 조작된 세포 조성물, 대 인큐베이션이 세포 3×10^6 개 세포/mL로 개시되는 방법에 의해 생성된 것, 대 인큐베이션 단계가 각 경우에서 5×10^6 개 세포/mL의 초기 밀도로 세포로 개시되는 방법에 의해 생성된 것과 비교하여, 조작된 세포 조성물의 특징들을 비교함으로써 평가되었다. 각각의 경우 인큐베이션 기간은 약 24 시간이었다.

[1243] 이러한 방법에 의해 생성된 세포의 기능적 활성화에 대한 세포 밀도의 영향을 평가하기 위해, 이러한 세포는 생성된 항-BCMA CAR-T 세포를 7일 이상동안 항원 노출의 다중 라운드에 걸쳐 조사된 K562-BCMA 표적 세포와 공동-배양액에서 배양시킨 직렬 자극 분석을 수행하였다. 4 일째에, 세포를 수확하고, 계수하고, 세포수를 초기 시딩 밀도로 리셋한 후 동일한 배양 조건하에 새로운 표적 세포와 재배양하였다. T 세포를 4 및 7 일째에 수집하고, 상기 기재된 바와 같이 증식에 대해 평가하였다.

[1244] 일반적으로, 예비-형질도입 배양이 1.5×10^6 개 세포/mL 또는 3×10^6 개 세포/mL의 세포 밀도로 개시되는 방법은 다중 인간 공여체를 가로지르는 세포 조성물을 생성하는 것으로 관찰되었고, 이러한 분석에서, 인큐베이션 단계가 상기 5×10^6 개 세포/mL의 세포 밀도에서 개시되는 공정에 의해 생성된 예시적인 조작된 세포 조성물과 비교하여, 다중 라운드의 자극에 걸쳐 일관된 항원-특이적 기능성 및 증식능을 갖는다. 이러한 결과는 형질도입 전에 인큐베이션이 5×10^6 개 세포/mL 미만의 세포 밀도로 개시되는 방법에 의해 생성된 조작된 세포 조성물에서 다중 라운드의 자극에 대해 항원-특이적 기능을 발현하고 나타내는 능력에서 개선된 일관성을 나타낸다는 결론과 일치하였다.

[1245] -특이적 기능을 발현하고 나타내는 능력에서 개선된 일관성을 나타내는 결론과 일치하였다.

[1246] **C. 형질도입 조건**

[1247] 형질도입 조건의 영향을 평가하였다. 형질도입 조건의 변화와 함께 상기 기재된 방법에 의해 생성된 세포 조성물. 구체적으로, 상이한 공정에서, 형질 도입(예를 들어, 수직 원심분리기를 사용하여 1600g에서 60분동안), 및 형질도입 보조제를 갖거나 갖지 않는 형질도입을 수행하였다. 스피노클레이션을 사용한 형질도입은 스피노클레이션 없이 형질도입이 수행된 세포에 비해 CD3+CAR+ 세포의 상당히 더 큰 빈도를 갖는 것으로 관찰되었다. 형질도입 단계 동안 형질도입 보조제가 존재하지 않는 경우에도 유사한 형질도입 효율이 이들 공정에서 관찰되었다.

[1248] **실시예 7: 항-CD3/항-CD28 비드: 증폭동안의 세포 비율**

[1249] 실시예 1 및 실시예 6 에 기재된 것과 유사한 방법에 의해 제조된 조작된 세포의 특징에 충격을 가하여, 혈청 함유 배지가 증폭 단계에서 사용된 것을 제외하고는 실시예 1에 기재된 바와 같은 방법의 형질도입 인큐베이션 (확장) 단계동안 항-CD3/항-CD28 자성 비드 대 세포 비율을 변화시키는 것과 유사한 공정에 의해서 제조된 조작된 세포의 특징에 관한 영향이 1:1 또는 3:1 비율의 비드가 혈청 함유 배지 중의 세포 비율에 대해 비드가 되는 상기 증폭 단계에서 이용된다. 공정의 후-형질도입 증폭 단계동안, 세포의 조성물은 증폭, 생존력, 및 세포의 pH 및 락테이트 수준에 대해 매일 평가되었다. 이 분석에서, 상기 인큐베이션 단계가 3:1의 비드:세포 비율을 사용하여 수행된 세포는 접종 후 5일째에 더 큰 정도의 증폭을 보였다. 접종 후 3일 경과후 세포 생존율의 감소 경향을 나타내었다. 세포의 pH 및 락테이트 수준은 역상관된 것으로 관찰되었다. 1:1 비율로 인큐베이션된 세포에 대해, 세포외적 락테이트 축적 및 pH 감소는 세포가 계속 증폭하더라도 3일 후에 느려졌다. 3:1 비율로 인큐베이션된 세포에 대해, 세포의 락테이트 수준은 계속해서 축적되고, pH는 계속해서 3일까지 계속 떨어지고, 감소된 세포 생존능과 일치한다.

[1250] 세포에 대한 항-CD3/항-CD28 자기 비드의 상이한 비율을 갖는 조작된 세포를 생성하기 위한 방법을 평가하였다. 공여 대상체로부터의 백혈구 시료로부터 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 선별한 후, 1:1 또는 3:1 비드 대 세포 비율에서 항-CD3/항-CD28 자성 비드로 활성화하기 전에 대략 1:1의 비율로 세포를 혼합하여 혈청 함유 배지 중에서 세포를 혼합시키는 방법에 의해 조작된 세포 조성물을 생성하고, 예시적인 항-BCMA CAR를 사용한 형질도입 및 세포를 증폭시키는 배양을 실시하였다.

[1251] 조작된 조성물로부터의 세포를 유세포 측정법에 의해 조사하였다. 세포를 재조합 BCMA-Fc 시약을 사용하여 CAR 발현에 대해 염색하고, CD3, CD4, CD8 및 활성화 카스파제 3의 표면 발현에 대해, 세포 사멸의 예시적인 마커에 대해 염색하였다. 3:1 비드 대 세포 비율로 자극된 CD3+ 세포의 약 50% 는 활성화된 카스파제 3에 대해 양성이고, 약 절반은 항-BCMA CAR 발현에 대해 양성이었다. 대조적으로, 1:1 비율로 자극된 CD3+ 세포의 약 10%는 활성화 카스파제 3에 대해 양성이고, 그 중 31%는 CAR을 발현하였다. 활성화 카스파제 3에 대해 양성인 CD4+ 대 CD8+ 세포의 유사한 비율이 관찰되었다.

[1252] 이들 결과는 1:1의 항-CD3 및 항-CD28 항체 컨주게이트된 비드와 세포의 비율로 자극된 조작된 세포 조성물에서 개선된 생존능과 일치한다.

[1253] **실시예 8: CAR-T 세포를 함유하는 세포 조성물을 생성하기 위한 제조 공정 동안 사이토카인의 인크루전 (inclusion)**

[1254] 배지 중에 존재하는 사이토카인의 유형을 변화시키는 것을 제외하고는 실시예 1 및 실시예 6 에 기재된 것과 유사한 방법에 의해 제조된 조작된 세포의 특징에 대한 영향을 평가하였다. 항-BCMA CAR을 발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 함유하는 조작된 조성물은 IL-2, IL-7 및 IL-15의 상이한 조합의 존재하에 단리된 T 세포로부터 생성되었다.

[1255] CD4 + 및 CD8 + T 세포를 다발성 골수종을 갖는 환자로부터 유래된 샘플로부터 단리하였다. 세포를 항-CD3/항-CD28 자기 비드의 존재하에 자극시키고, 항-BCMA CAR을 암호화하는 바이러스 벡터로 형질도입시키고 배양하여 세포를 증폭시켰다. 자극, 형질도입 및 증폭의 각 단계는 사이토카인, IL-2 단독; IL-2, IL-7 및 IL-15; IL-2 및 IL-15; 또는 IL-2 및 IL-7의 존재하에 무혈청 배지에서 수행하였다.

[1256] 재조합 BCMA-Fc 시약을 사용하여 항-BCMA CAR의 발현을 위해, 그리고 CD3, CD4, CD8 및 활성화 카스파제 3의 표면 발현을 위한 유세포 측정법에 의해 조작된 조성물로부터 세포를 평가하였다.

[1257] CD3+CAR+ 세포의 높은 빈도는 상이한 사이토카인 조합의 존재하에 생성된 모든 조작된 세포 조성물에서 관찰되었다. 모든 3개의 사이토카인의 조합은 활성화 카스파제 3에 대해 양성인 CD3+ T 세포의 최저 및 가장 일관된 백분율을 나타냈다.

[1258] 항원-자극된 활성화는 세포내 사이토카인 염색(ICS)으로 평가하였다. 조작된 조성물로부터의 세포는 골지 억제제의 존재하에 BCMA를 발현하는 인간 다발성 골수종 세포주인 조사된 M1S 세포와 공동 배양되었다. 세포를 IL-2, IFN-감마, 또는 TNF-알파의 세포내 사이토카인 축적에 대해, 또는 모든 3개의 사이토카인의 다작용성 염색에 대해 평가하였다. 결과는 각 공여체로부터 제조된 조작된 세포 조성물이 기능성 CD4+CAR+ 및 CD8+ CAR+ T 세포를 함유함을 나타내었다. 내부 IL-2, IFN-감마, TNF-알파에 대해 양성인 항원 자극된 CD4+ 및 CD8+ 세포, 및 3가지 모두에 대해 양성인 다작용성 세포는 사이토카인의 각각의 조합으로 생성된 조작된 세포 조성물에서 관찰되

었다.

[1259] 조작된 조성물의 세포를 CD45RA, CCR7, CD27 및 CD28로 염색함으로써 유세포측정법에 의해 서브-표현형에 대해 평가하였다. CD45RA 및 CCR7 염색의 결과는 각 조건하에서 생성된 조작된 세포 조성물이 주로 CD45RA+CCR7+CD4+ 및 CD8+ T 세포로 구성되었음을 나타내었다. 낮은 수준의 ?CD45RA+CCR7-세포는 모든 조작된 세포 조성물에서 관찰되었다. CD27 및 CD28 염색의 결과는 각 조건하에서 생성된 조작된 세포 조성물이 대부분 CD27+CD28+CD4+ 및 CD8+ T 세포를 함유함을 나타내었다. 낮은 수준의 CD27-CD28-CD4+ 및 CD8+ T 세포가 모든 조작된 세포 조성물에서 관찰되었다.

[1260] **실시예 9 : 출발 조성물의 표현형과 CAR+ T 세포 조성물 중의 CD4+ 대 CD8+ CAR 발현 세포의 비율의 상관관계**

[1261] 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 자가 T 세포를 함유하는 CAR+ T 세포 조성물을 11개의 개별 공여체로부터 수집된 성분채집술로부터 생성하고 4개의 테스트 샘플을 각 공여체 샘플로부터 개별적으로 처리하였다. 하나의 공여체는 골수종 환자이며 나머지 공여체는 건강한 대상체였다. 각 성분채집술 샘플을 세척한 후, 각 샘플을 유세포 분석에 의해 세포사멸 마커를 사용하여 세포 생존율 및 CD4 및 CD8의 표면 발현에 대해 평가하여, 각 성분 채집술 샘플 실행에서 생존 CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율(CD4/CD8 비율)을 결정하였다.

[1262] CD4+ 및 CD8+ T 세포는 면역회화성-기반의 선별에 의해 성분채집술 샘플로부터 선별하였다. CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 생존 CD4+ 대 CD8+ 세포의 1:1 비율로 조합되었다. 조합된 세포의 샘플을 유세포 분석에 의해 세포사멸 특이적 마커를 사용하여 세포 생존율에 대해 및 CD4, CD8, CD45RA 및 CCR7이 포함된 마커의 표면 발현에 대해 평가하였다. 선별된 CD4 및 CD8 세포의 혼합물 내 생존 CD45RA+/CCR7+CD4+ 대 생존 CD45RA+/CCR7+CD8+의 비율(CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8의 비율)을 결정하였다.

[1263] CAR+ T 세포 조성물을 생성하기 위해, 조합된 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 사이토카인의 존재하에 항-CD3 및 항-CD28 항체-코팅된 비드와 함께 인큐베이션하여 활성화하고, 항-BCMA CAR를 인코딩하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입 하였다. CAR는 BCMA에 대해 특이적인 scFv 항원-결합 도메인, 스페이서, CD28 막관통 영역, 4-1BB 공동 자극 신호전달 영역, 및 세포 내 신호전달 도메인으로부터 유래된 CD3-제타를 포함하였다. 형질도입 이후, 세포를 증폭시킨 뒤 저온 보존에 의해 동결시켰다. 동결된 조성물을 해동시키고 BCMA-Fc 시약을 사용하여 유세포 분석에 의해 생존력, CD4 및 CD8의 표면 발현, 및 CAR 발현을 평가하였다. CD4+인 생존 CAR+ 세포 대 CD8+인 생존 CAR+ 세포의 비율 (CAR+ CD4/CD8 비율)을 결정하였다.

[1264] 성분채집술 샘플 내 CD4/CD8 비율, 또는 선별된 CD4 및 CD8 세포의 혼합물 내 CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 비율을, 사후, 조작된 CAR-T 세포 조성물 내 CAR+ CD4/CD8 비율에 대하여 비교하였다. 각 대상체로부터의 평균 비율의 상관관계 정도를 이변량 분석에 의해 평가하였고, 플로팅된 데이터에 대한 0.990 확률 영역을 나타내는 이변량 정규 타원이 각각 도 1a 및 1b에 도시된다. 표 E2A 및 표 E2B는 각각 도 1a 및 도 1b에 플로팅된 데이터에 대해 수행한 피어슨 상관 분석의 결과를 나타낸다.

[1265]

변수	평균값	표준편차	상관관계	유의 확률
출발 CD4/CD8 비율	1.57	0.42	-0.11	0.75
최종 CAR+ CD4/CD8 비율	1.35	1.00		

[1266]

변수	평균값	표준편차	상관관계	유의 확률
출발 CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 비율	1.52	1.09	0.99	<0.0001
최종 CAR+ CD4/CD8 비율	1.35	1.00		

[1267] 도 1a 및 표 2A에 도시된 바와 같이, 상기 실험에서 성분채집술 샘플로부터의 CD4+ 및 CD8+ T 세포 중 생존

CD4/CD8 비율은 최종 조성물 내 CAR+ CD4/CD8 비율과 상관관계를 가지지 않았다. 이러한 결과는, 전체 생존 세포 기준으로 활성화 전의 정제된 CD4 및 CD8 T 세포를 1:1 비율로 혼합해도 산출 T 세포 조성물 내 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 1:1 비율과 반드시 상관관계를 가지지 않는다는 관찰과 일치한다.

[1268] 도 1b 및 표 2B에 도시된 바와 같이, 상기 실험에서, 최종 T 세포 조성물 내 CAR+ CD4/CD8 비율은, CD4 및 CD8 세포의 혼합물 내 CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 비율에 의해 결정된 바와 같이, 출발 나이브-유사 세포 CD4/CD8 T 세포 비율과 양의 상관관계를 가진다. 특히, 도 1b의 결과는 피어슨 상관관계 계수 및 p 값 <00001에 기초하여 출발 샘플 내 CD45RA+/CCR7+/CD4+ 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ 세포의 비율과 T 세포 조성물 내 CAR+ CD4/CD8 비율의 상관관계가 높음을 도시한다. 이러한 상관관계는 투입 조성물 및 공정 실행간의 차이에도 불구하고 유지되었다. 이러한 예시적인 샘플 설정로부터 상기 모델 핏에 기초하여, 약 1.1:1의 CD45RA+/CCR7+/CD4+ 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+ 비율이 산출 T 세포 조성물에서 약 1:1의 CAR+ CD4/CD8 비율을 야기하는 것으로 결정되었다.

[1269] 이러한 데이터는, CD45RA+ 및 CCR7+ 표면 발현에 의해 결정된 것과 같은 나이브-유사 CD4+ 서브세트 대 나이브-유사 CD8+ T 세포 대상체의 비율을 제어함으로써, 산출 T 세포 조성물 내 CD4+ 세포 및 CD8+ 세포의 비율 및/또는 조성물을 제어 및/또는 조정할 수 있다는 가설을 뒷받침한다.

[1270] **실시예 10 : 출발 T 세포 집단의 표현형과 조작된 CAR+ T 세포 조성물 내 CAR+CD4+ 대 CAR+CD8+ T 세포의 비율의 상관관계**

[1271] 15명의 건강한 공여체 및 한 명의 1 명의 다발성 골수종 환자로부터 유래한 성분채집술 샘플로부터 전체 50개의 조작된 CAR+ T 세포 조성물을 생성하였다. CAR-T 조성물을 생성하기 위해, 생존 선별된 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 1:1 비율로 출발 세포 조성물로 조합한 뒤, 실시예 9에 기재된 바와 같이 활성화, 형질도입, 및 증폭하였다. 조합된 생존 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 출발 조성물로부터의 샘플을 유세포 분석에 의해 생존력에 대해 및 CD4, CD8, CD27, CD45RA, CCR7, 및 CD62L이 포함된 마커의 표면 발현에 대해 평가하였다.

[1272] 조작된 CAR+ T 세포 조성물의 샘플을 CAR 발현에 대해 및 CD4 및 CD8이 포함된 마커의 표면 발현에 대해 평가하였다. 동일한 공여체의 개별적인 CAR+ T 세포 조성물의 CD4+CAR+ T 세포 대 CD8+CAR+ T 세포의 비율 (CAR+CD4/CD8 비율)에 대해 계산된 평균이 실시예 9에 기재된 동일하지만, 특정한 공정 파라미터가 달라진 예시적인 공정을 사용하여 생성하였다. 평균 CAR+ CD4/CD8 비율을 조합된 생존 CD4+ 대 CD8+ 세포의 출발 조성물의 다양한 표현형과의 상관관계에 대해 분석하였다. 활성화 전에 선별된 CD4+ 및 CD8+ T-세포를 1:1 비율로 조합하는 것은 생성된 산출 세포 조성물 내 1:1의 CAR+ CD4/CD8 비율과 반드시 상관관계를 가지지 않았다.

[1273] 평균 CAR+ CD4/CD8 비율과 각 공여체로부터의 표현형의 상관관계의 정도를 이변량 분석에 의해 평가하였다. 0.950의 확률을 나타내는 이변량 정규 타원이 다음이 비율에 대해 도시된다: CD45RA+/CCR7+/CD4+ T 세포 대 CD45RA+/CCR7+/CD8+에 대한 비율(CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 비율; 도 2a); CD62L-/CCR7+/CD4+ 대 CD62L-/CCR7+/CD8+에 대한 비율(CD62L-/CCR7+ CD4/CD8 비율; 도 2b); 및 CD27+/CCR7+/CD4+ 대 CD27+/CCR7+/CD8+ 비율 (CD27+/CCR7+ CD4/CD8 비율; 도 2c). 표 E3은 도 2a-2c에 플로팅된 데이터에 대해 수행한 피어슨 상관 분석의 결과를 나타낸다.

표 E3: 예시적 표현형에 대한 이변량 정규 타원 P=0.950					
표현형	평균값	표준편차	상관관계	유의 확률	수
CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 비율	1.14	0.56	0.88	<0.0001	16
% CD62L-/CCR7+ CD4/CD8 비율	1.66	0.83	0.88	<0.0001	16
% CD27+/CCR7+ CD4/CD8 비율	2.01	0.91	0.93	<0.0001	16
산출 CAR+ CD4/CD8 비율	1.22	.80			

[1274] [1275] 상기 분석은, 실시예 9에 기재된 예시적인 프로토콜을 사용하여, CAR+ CD4/CD8 비율은 건강한 공여체에 대한 CD45RA+ /CCR7+ CD4/CD8 T-세포 비율과는 양의 상관관계가 있지만, 상기 실험에서, 1명의 환자 샘플에 대해서는 상관관계를 가지지 않음을 나타낸다. CAR+ CD4/CD8 비율은 건강한 공여체 및 환자 샘플 출발 세포 조성물 둘 모두에서 CD62L-/CCR7+ CD4/CD8 및 CD27+/CCR7+ CD4/CD8 비율과 양의 상관관계를 가지는 것으로 나타났다. 모델 핏에 기초하여, 계산 결과 169:1의 출발 CD27+/CCR7+ CD4/CD8 비율이 대략 1:1의 CAR+ CD4/CD8 비율을 가지

는 산출 세포 조성물을 생성할 것으로 예측되었다. 이러한 결과는 조작된 세포 조성물의 생성된 CAR+ CD4/CD8 비율을 제어 및/또는 예측하기 위해 출발 세포 조성물에서 CD27+CCR7+ CD4/CD8 비율이 조정될 수 있다는 결과와 일치한다.

[1276] **실시예 11 : 출발 조성물의 표현형에 기초한 CAR+ T 세포 조성물의 제조 공정**

[1277] 2명의 건강한 공여체 및 1명의 다발성 골수종 환자를 포함하여, 3명의 개별 공여체로부터 수집된 성분채집술로 CAR을 발현하는 자가 T 세포를 함유하는 10 개의 CAR+ T 세포 조성물을 생성하였다. CD4+ 및 CD8+ T 세포는 실시예 9에 기재된 바와 같이 성분채집술 샘플로부터 선별하였다. 성분채집술 샘플 및 선별된 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 유세포 분석에 의해 생존력, 및 CD27, CCR7, CD4, 및 CD8을 포함하는 표면 마커에 대하여 평가하였다. 선별된 CD4+ 및 CD8+ T 세포 가운데 CD27+/CCR7+ 세포의 빈도를 결정하였고, 각 공여체는 성분채집술 샘플 내 CD27+/CCR7+ CD4+ 세포 대 CD27+/CCR7+ CD8+ 세포의 상이한 비율을 나타냈다. 예를 들어, 환자 샘플은 CD27+/CCR7+ CD4+ 세포 대 CD27+/CCR7+ CD8+ 세포의 비율로 대략 12.2:1을 나타낸 반면, 2 명이 건강한 공여체 샘플은 CD27+/CCR7+ CD4+ 세포 대 CD27+/CCR7+ CD8+ 세포의 비율이 3.56:1 내지 2.15:1을 나타냈다. (1) 선별된 CD4+ 및 CD8+ 세포를 1:1 생존 CD4+ 대 CD8+ 비율 (생존 CD4/CD8)로 조합하거나 또는 (2) CD4+ 및 CD8+ 세포를 활성화 전에 CD27+/CCR7+CD4+ 세포 및 CD27+/CCR7+ CD8+ 세포 (CD27+/CCR7+ CD4/CD8)의 1.69:1 비율로 조합함으로써 투입 세포 조성물을 생성하였다. 투입 조성물로부터 총 300×10^6 개의 세포 또는 100×10^6 개의 세포를 실질적으로 실시예 9에 기재된 바와 같이 활성화, 형질도입, 및 증폭하여 산출 세포 조성물을 생성하였다.

[1278] 활성화 단계에서 전체 세포 개수는 CAR+ CD4/CD8 비율에영향을 미치지 않는 것으로 관찰되었다. 환자 샘플을 비롯하여, 약 169:1 비율로 혼합된 CD27+/CCR7+ CD4/CD8 세포를 함유하는 출발 조성물로부터 생성된 산출 세포 조성물은, 원하는 표적 비율인 1:1에 근접한 CAR+CD4/CD8 비율 (예를 들어, 대략 186:1 내지 1:186)을 나타냈다. 1:1 비율로 혼합된 생존 CD4/CD8 세포를 함유하는 투입 조성물로부터 생성된 산출 세포 조성물은, CD4+ 및 CD8+ 세포를 CD27+/CCR7+ CD4+ 세포 및 CD27+/CCR7+ CD8+ 세포의 169:1 비율로 함유하는 투입 조성물로부터 생성된 조성물과 비교하여, CAR+ CD4/CAR+ CD8 비율에서 더 큰 차이를 나타냈다. 상기 실험에서, 예시적인 공정에서 환자 재료를 사용하여 생성된 산출 조성물은 각각 100×10^6 개의 세포 또는 300×10^6 개의 세포가 활성화될 때, 대략 76 및 86의 CAR+ CD4/CAR+ CD8 비율을 나타냈다. 유사한 공정에서 표현형에 기초하여 혼합될 때, 예를 들어 CD27+CCR7+ CD4+: CD27+CCR7+ CD8+ T 세포가 169:1의 비율로 혼합된 경우, 최종 CAR+ CD4/CAR+ CD8 비율은 각각 100×10^6 개의 세포 또는 300×10^6 개의 세포가 활성화 될 때 각각 16 및 13이었다. 이러한 결과는 특정 표현형, 예를 들어 CD27+/CCR7+ 세포가 건강한 공여체 및 환자 샘플 둘 모두로부터 생성된 산출 조성물 내 생성된 CAR+ CD4/CAR+ CD8 비율과 상관관계를 가질 수 있는 발견과 일치한다.

[1279] **실시예 12: 출발 조성물의 표현형과 CAR+ T 세포 조성물 내 CD4+ 대 CD8+ CAR 발현 세포의 비율의 상관관계에 대한 질병을 가지는 대상체로부터 샘플의 평가**

[1280] 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 자가 T 세포를 함유하는 CAR+ T 세포 조성물을 다발성 골수종을 가지는 7 개의 개별 공여체로부터 수집된 성분채집술로부터 생성하였다.

[1281] CD4+ 및 CD8+ T 세포는 면역친화성-기반의 선별에 의해 성분채집술 샘플로부터 선별하였다. CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포는 생존 CD4+ 대 CD8+ 세포의 1:1 비율로 조합되었다. 조합된 세포의 샘플을 CD4, CD8, CD27, CD45RA, CCR7 및 CD62L이 포함된 마커의 표면 발현에 대하여 평가하였다. 선별된 CD4 및 CD8 세포의 혼합물에서, 다음의 세포 표현형의 비율을 결정하였다: (1) CD27+/CCR7+ CD4+ 세포 대 CD27+/CCR7+ CD8+ 세포의 비율(CD27+/CCR7+ CD4/CD8 비율), (2) CD45RA+/CCR7+ CD4+ 세포 대 CD45RA+/CCR7+ CD8+ 세포의 비율(CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 비율), 및 (3) CD62L-/CCR7+ CD4+ 세포 대 CD62L-/CCR7+ CD8+ 세포의 비율(CD62L-/CCR7+ CD4/CD8 비율)

[1282] 항-BCMA CAR을 발현하는 CAR+ T 세포 조성물을 생성된 세포의 활성화, 형질도입, 증폭 및 저온 보존을 포함하는, 실질적으로 실시예 9에 기재된 공정을 사용하여 생성하였다. 동결된 조성물을 해동시키고 BCMA-Fc 시약을 사용하여 유세포 분석에 의해 생존력, CD4 및 CD8의 표면 발현, 및 CAR 발현을 평가하였다. CD4+인 생존 CAR+ 세포 대 CD8+인 생존 CAR+ 세포의 비율 (CAR+ CD4/CD8 비율)을 결정하였다.

[1283] 선별된 CD4 및 CD8 세포의 혼합물 내 CD27+/CCR7+ CD4/CD8 비율, CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 비율, 또는 CD62L-/CCR7+ CD4/CD8 비율을, 사후, 조작된 CAR-T 세포 조성물 내 CAR+ CD4/CD8 비율에 대하여 비교하였다. 각 대상체로부터의 평균 비율의 상관관계 정도를 이변량 분석에 의해 평가하였고, 플로팅된 데이터에 대한 0.950 확

를 영역을 나타내는 이변량 정규 타원이 각각 도 3a-3C에 도시된다. 도시된 바와 같이, 피어슨 상관관계 분석에 기초하여 출발 샘플 내 CD27+/CCR7+ CD4/CD8 비율, CD45RA+/CCR7+ CD4/CD8 비율, 또는 CD62L-/CCR7+ CD4/CD8 비율과, T 세포 조성물 내 CAR+ CD4/CD8 비율은 상당한 상관관계를 가졌다. 표 E4A-E4C는 도 3a-3C에 플로팅된 데이터에 대해 수행한 상관 분석의 결과를 나타낸다. 유의성 <0.05은 *로 표시된다.

표현형 E4A: 이변량 정규 타원 P=0.950; 출발 샘플 및 산출 세포 조성물에서의 CD4/CD8 비율				
변수	평균값	표준편차	상관관계	유의 확률
출발 %CD27+CCR7+ CD4/CD8 비율	2.689438	1.788478	0.895786	0.0064*
CAR+ CD4/CD8 비율	2.560108	2.459516		

[1284]

표 E4B: 이변량 정규 타원 P=0.950; 출발 샘플 및 산출 세포 조성물에서의 CD4/CD8 비율				
변수	평균값	표준편차	상관관계	유의 확률
출발 %CD45RA+CCR7+ CD4/CD8 비율	1.394018	0.937173	0.86723	0.0115*
CAR+ CD4/CD8 비율	2.560108	2.459516		

[1285]

표 E4C: 이변량 정규 타원 P=0.950; 출발 샘플 및 산출 세포 조성물에서의 CD4/CD8 비율				
변수	평균값	표준편차	상관관계	유의 확률
출발 %CD62L-CCR7+ CD4/CD8 비율	2.179702	1.153181	0.88584	0.0079*
CAR+ CD4/CD8 비율	2.560108	2.456516		

[1286]

실시예 13: 배양 중 세포 생존율을 측정하기 위한 연속 인라인(In-line) 이미지화

[1287]

제조합 수용체의 발현을 위한 조작 과정에서 T 세포의 다양한 광학 파라미터를 인-라인(in-line) 시차 디지털 홀로그래피 현미경(DHM)을 사용하여 얻었다. 시차 DHM은, 예를 들어 세포수 및 생존율을 결정하기 위해, 이미지화된 물체를 정량적으로 기술하는 복수의 광학 또는 형태학적 특징을 수득하고, 물체 분할을 위해 고-콘트라스트 이미지를 갖는, 세포의 라벨 없는 이미지화를 허용한다.

[1288]

건강한 인간 공여체로부터의 1차 T 세포를, 일반적으로 상기 실시예 1 및 6에 기재된 바와 같이, 예시적인 조작 공정을 사용하여 항-BCMA 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하도록 조작하였다. 2개의 실험 수행(수행 1, 수행 2)을 수행하였다. 세포를 바이오리액터(예를 들어 락킹 동작 바이오리액터)에 전달함으로써 증폭을 위해 배양하였다. 배양은 반-연속 관류 및 연속적인 혼합으로 배지 대체를 포함하였다.

[1289]

홀로그래픽 이미지 및 세포의 광학 파라미터를 인-라인(in-line) 시차 DHM 이미지화 시스템(예를 들어 Ovizio iLine F(Ovizio Imaging Systems NV/SA, Brussels, Belgium))을 사용하여 대략 120 시간의 배양까지 연속적으로 포획하였다. 인-라인 시차 DHM 시스템은, 샘플이 바이오리액터로부터 튜빙 시스템을 통해 흐를 수 있도록 바이오리액터에 연결된 1회용 튜빙 시스템을 포함하며, 여기서 이미지화 시스템은 홀로그래픽 이미지 및 이를 통해 이동하는 세포의 광학 파라미터를 포착하고, 샘플을 바이오리액터로 복귀시킨다. 세포 생존력 및 생존 세포 계수(VCC)를 이미지로부터 결정하였다. 또한, 조작된 세포의 생존력을 자동화 세포계수기를 사용하여 수동 샘플링("수동 샘플링") 및 세포 계수에 의한 결과와 비교하여, 약 120시간 이하의 배양에 대해 다양한 시점에서 샘플링하였다. 시간 코스 분석 및 선형 회귀에 기초하여 두 방법을 비교하였다.

[1290]

도 4a 및 도 4b는 실험 수행 1(도 4a) 및 실험 2(도 4b)에서, 시차 DHM 또는 수동 샘플링에 의한 연속 모니터링을 사용하여 평가된 생존 세포 계수(VCC) 및 생존력의 비교를 나타낸다. 비교의 R2 및 기울기는 하기 표 E5에

[1291]

나타나 있다. 2가지 방법을 사용하여 측정된 VCC의 차이는 수동 샘플링 방법의 예상 편차 내에 있었다.

[1292] [표 E5] R 및 샘플링 방법 사이의 비교의 슬로프

실험	R ²		슬로프	
	VCC	생존율	VCC	생존율
수행 1	0.97	0.96	0.92	0.80
수행 2	0.99	0.98	0.94	0.98

[1293]

[1294] 결과는 연속적인 모니터링 및 수동 샘플링과 같은 VCC 및 생존율이 매우 상관되었다는 것을 보여주었다. 결과는 세포 조작 공정에서 세포의 증폭을 위한 배양동안 시차 DHM 에 의한 연속 모니터링의 유용성과 일치하였다.

[1295] **실시예 14: 연속 인라인 이미지화를 이용한 수동 및 자동 증폭의 비교**

[1296] 인-라인 이미지화 및 자동화된 관류에 의한 세포의 연속적인 모니터링을 갖는 완전히 자동화된 조작자-없는 세포 증폭 방법이 수동 증폭 방법과 비교되었다.

[1297] 건강한 인간 공여체로부터의 1차 T 세포를 활성화시키고, 예시적인 조작 공정을 사용하여 예시적인 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현시키기 위한 벡터로 형질도입하였다. 형질도입 후, 세포를 풀링하고 2개의 상이한 배양물, 시차 DHM 을 사용한 연속 인라인 이미지화에 기초한 하나의 자동화된 증폭, 및 하나의 수동 증폭 방법에 따라 접종하였다.

[1298] 자동 증폭 배양에서, 세포를 반-연속 관류 및 연속적인 혼합으로 배지 대체하면서, 락킹 동작 바이오리액터에서 배양하였다. 세포 생존능 및 생존 세포 계수(VCC)는 일반적으로 상기 실시예 13에 기재된 바와 같이 자동화된 시차 DHM 이미지화 시스템을 사용하여 모니터링하였다. 접종 시의 초기 VCC는 양 배양물(자동화 배양에 대한 0.12×10^6 개 세포/mL, 수동 배양에 대한 0.14×10^6 개 세포/mL)에 대해 유사하였다. 자동 증폭의 관류는 소프트웨어 알고리즘에 의해 계산된 VCC의 4시간 롤링 평균에 기초하고, 여기서 목표 VCC 보다 큰 VCC 평균이 방법의 진행을 위해 요구되었다. 표적 VCC는 3개의 관류 단계에 대해 0.6×10^6 개 세포/mL, 1×10^6 개 세포/mL 및 4×10^6 개 세포/mL였다. 접종 후 어떠한 추가적인 조작자 개입은 일어나지 않았다. 수동 증폭 배양에서, 관류를 일반적으로 상기 실시예 1에 기재된 바와 같이 1일 샘플로 실시하였다. 세포를 또한 유세포 분석법에 의해 마커의 세포 표면 발현에 대해 평가하였다.

[1299] 도 5에 도시된 바와 같이, 더 높은 T 세포 성장은 자동화된 증폭 시스템으로 관찰되었다. 유세포 측정법에 의해 평가되는 바와 같이, 연속 시차 DHM 이미지화 및 세포 표현형에 의해 평가된 바와 같은 세포 생존율은 자동화 대 수동 증폭 공정 사이에서 유사하였다.

[1300] 결과는 인간 조작자의 필요 없이 T 세포 조작 공정 동안 세포의 배양 및 모니터링을 위한 연속 DHM 영상화 및 자동화된 증폭 공정의 유용성과 일치하였다. 일부 측면에서, 이러한 방법은 1차 T 세포의 성장 동역학을 결정하는데 사용될 수 있고, 투여의 조작을 위한 세포를 수확하기 위한 시간을 결정할 수 있다.

[1301] **실시예 15: 예시적인 제조 공정에 의해 생성된 T 세포 조성물의 평가**

[1302] 본질적으로 실시예 1 에 기재된 바와 같이 예시적인 방법에서, 항-BCMA CAR 을 발현하는 자가조직 T 세포를 함유하는 50 CAR+ T 세포 조성물은 10명의 건강한 공여자 및 40개의 다발성 골수종 환자를 포함하여, 50개의 분리된 인간 대상체(각 대상자로부터의 하나의 성분 채집)로부터 수집된 무균증으로부터 생성되었다. CD4+ 및 CD8+ T 세포를 성분 채집 샘플로부터 선택하여 별도로 저온 보존하였다. 이어서, 세포를 해동시키고, CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 생존가능한 CD4+ 대 CD8+ 세포의 1:1 비율로 혼합하였다. 결합된 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 활성화시키고, CAR을 암호화하는 벡터로 형질도입시키고, 증폭시키고, 본질적으로 실시예 1에 기재된 바와 같이 저온 보존에 의해 동결시켰다.

[1303] 예시적인 대안적인 방법에서, 치료 T 세포 조성물은 55개의 개별적인 인간 암 대상자로부터의 백혈병 시료로부터 T 세포의 면역친화성-기반 선택을 포함하는 방법에 의해 생성되었다. 벌크 T 세포를 CAR, 증폭 및 저온 보존을 암호화하는 바이러스 벡터로 활성화 및 형질도입하였다.

[1304] 동결된 조성물 중의 세포를 해동시키고, 생존능을 위해 유세포계측법, 활성 카스파제 3(CAS)과 같은 세포 소멸성 마커의 발현, CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CCR7 및 CD45RA 및 CAR의 표면 발현에 의해 평가하였다. CD3+

세포의 백분율, 조성물 중의 CD3+CAR+ 세포에서의 CAR+ 아포프토틱 마커 음성 세포의 백분율, 및 조성물 중의 중추 메모리 CD4+ CAR+ 세포 및 중추 메모리 CD8+ CAR+ 세포의 백분율이 측정되었다. 제조 공정에 의해 생성된 조성물의 세포 표현형을 평가하고, 일부 측면에서 대안적인 방법에 의해 생성된 세포 조성물과 비교하였다.

[1305] 본 실시예의 제조 공정은, 그것이 수행되는 100%의 인간 생물학적 샘플에서, 환자에게 투여한 세포 조성물 투여에서 CAR 을 발현하는 세포의 임계치의 수를 포함하는, 소정의 미리 결정된 특징을 충족시키는 조작된 세포 조성물을 생성하였다. 도 6a 및 도 6b는, 40개의 다발성 골수종 대상자로부터의 샘플의 군으로부터 개별적으로 생성된 조성물에 대해서, 각각 상기 조성물 중의 CD4+CAR+ 세포(도 6a) 및 CD8+CAR+ 세포(도 6b) 중에서 상기 표시된 표현형의 세포의 백분율(CD45RA 및 CCR7 표면 발현에 기초함)에 대한 중간값(수평 라인), 인터쿼터 범위(박스), 및 1.5×인터쿼터 범위(위스커)을 도시한다. 도 6c 및 도 6d는, 40개의 다발성 골수종 대상자로부터의 샘플의 군으로부터 개별적으로 생성된 조성물에 대해서, 각각 상기 조성물 중의 CD4+CAR+ 세포(도 6c) 및 CD8+CAR+ 세포(도 6d) 중에서 상기 표시된 표현형의 세포의 백분율(CD45RA 및 CCR7 표면 발현에 기초함)에 대한 중간값(수평 라인), 인터쿼터 범위(박스), 및 1.5×인터쿼터 범위(위스커)을 도시한다. 이러한 예시적인 방법을 사용하여 다수의 골수종 환자의 범위로부터 수득된 개개의 백혈구 샘플에 대해, 이러한 샘플로부터 조작된 세포 조성물을 생성하기 위해, 수확을 통한 활성화의 개시으로부터의 공정 부분의 지속시간의 범위는 7 내지 10 일이고 이들 샘플들 사이의 평균 지속시간은 약 7.5일 인 것으로 관찰되었다. 또한, 상이한 샘플 중 공정의 과정에 걸쳐 누적 집단 배수의 평균수가 약 7.5인 것으로 결정되었다.

[1306] 본 연구에서, 예시적인 방법에 의해 제조된 세포 조성물 중의 조작된 T 세포 집단은 아포프토틱 마커를 발현하는 15% 미만의 세포를 포함하였고, 출발 샘플과 비교하여 중앙 메모리 표현형이 풍부하고, 예시적인 대안적인 방법을 사용하여 생성된 세포 조성물에 대해 풍부하였다.

[1307] **실시예 16: 항-BCMA CAR을 발현하는 조작된 T 세포의 치료 조성물을 생성하기 위한 방법**

[1308] 실시예 1에 기재된 방법과 유사한 예시적인 공정을 수행하여 항-BCMA 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 함유하는 조작된 조성물을 제조하였다. 1차 CD4+ 및 CD8+ 세포는 다발성 골수종(MM)을 갖는 대상체를 포함하는 인간 백혈구 시료로부터 PBMC를 함유하는 생물학적 시료로부터 농축되었고, 이를 포함한다. 농축된 CD4+ 및 농축된 CD8+ 세포 조성물을 개별적으로 저온 동결시키고, 후속적으로 해동시키고, 생존 CD4+ T 세포의 1:1의 비율로 생존 CD8+ T 세포에, 자극, 형질도입 및 증폭을 위한 단계를 수행하기 전에 혼합하였다.

[1309] 혼합된 세포 조성물로부터의 대략 300×10^6 개의 T 세포(예를 들어 150×10^6 개의 CD4+ 및 150×10^6 개의 CD8+ T 세포)를 약 3×10^6 개 세포/mL의 밀도로, 부착된 항-CD3 및 항-CD28 항체를 갖는 상자성 폴리스티렌-코팅된 비드의 존재하에 18 내지 30시간 동안, 재조합 IL-2, IL-7 및 IL-15를 함유하는 예시적인 무혈청 배지(예를 들어 실시예 3 참조)에서 1:1의 비드 대 세포 비율로 인큐베이션하였다.

[1310] 인큐베이션 후, 인큐베이션된 세포 조성물로부터 적어도 대략 100×10^6 개 및 최대로 대략 200×10^6 개의 생존 세포를, 사이토카인을 갖는 예시적인 무혈청 배지에서, 60분동안 스피노칼레이션에 의해 항-BCMA CAR을 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입시킨 후, 약 37°C에서 약 18 내지 30시간 동안 인큐베이션하였다. CAR 은 BCMA, CD28에 특이적인 scFv 항원-결합 도메인, CD28 막관통 영역, 4-1BB 공동자극 신호전달 영역, 및 CD3-제타 유래된 세포내 신호전달 도메인을 함유하였다.

[1311] 이어서 형질도입된 세포를 배양 및 형질도입 단계동안 사용된 IF-2, IF-7 및 IF-15의 농도의 2배를 함유하는 예시적인 무혈청 배지 약 500 mL 중의 바이오리액터(예를 들어, 요동 운동 바이오리액터)에서 배양함으로써 증폭시켰다. 배지는 폴록사머를 함유하지 않았다. (약) 0.6×10^6 개 세포/mL 초과인 세포 밀도가 달성된 것으로 간주된 후, 배지를 예를 들어 약 2 내지 약 15분동안 주기적으로 1000mL의 부피로 첨가하고 세포를 정상 락킹 조건(비-관류)하에 (약) 0.6×10^6 개 세포/mL 초과인 임계치의 생존 세포 밀도가 달성될 때까지 배양하였다. 생존 세포 밀도가 0.6×10^6 개 세포/mL 초과로 된 경우, 조합 충전/관류 단계가 개시되었는데, 이때 제 1 배지는 상기 지시된 바와 같이 단계적 방식으로 첨가되었고, 1000mL의 표적 부피까지, 이후 관류(perfusion)가 하기에 설명되는 바와 같이 개시되었다. 이어서 배지를 계속적인 혼합으로 반-연속 관류(semi-continuous perfusion)로 대체하였다. 관류 속도 및/또는 락킹 속도는 세포 밀도가 증가함에 따라 증폭단계동안 1배 이상 증가하였다. 관류 속도는 세포 밀도가 증가함에 따라 증폭 단계 동안 1배 이상 증가하였다. 배지는 생존가능한 세포 밀도(일단 특정 밀도가 도달되면 더 높은 속도를 가짐)에 의해 결정된 일일 당 총 부피를 갖는 단계적 방식으로, 예를 들어 (더 높은 세포 농도가 도달될 때 더 높은 속도를 갖는) 1일당 배양물에 첨가된 500mL 또는 약 750mL의 총

신선한 배지를 생성하였고, 상기 신선한 배지의 섯은 당일에 걸쳐서 주기적으로 예를 들어 매 0.5일 내지 약 매 1.5일 또는 2시간에 걸쳐서 이루어졌다. 핵 형성 세포(TNC)의 총 수가 적어도 약 1000×10^6 개에 도달하고, TNC 수가 적어도 약 2400×10^6 개에 도달했을 때 적어도 85%의 생존율을 갖는 시점에서 세포를 수확하였다. 수확 후, 항-CD3 및 항-CD28 항체 접합 비드를 세포 조성물로부터 제거하였다.

[1312] 이어서, 세포를 제형화하고, 조성물의 분취량을 예를 들어 다운스트림 저장 또는 사용을 위해 용기로 옮겼다. 일부 구현예에서, 제형화된 조성물 또는 그의 일부는 예를 들어 세포 조성물의 저온 보존 및 저장을 위해, 예를 들어 대상체에 대한 잠재적 투여를 위해 적합한 프리징 백(freezing bag)(예를 들어 CryoStore Freezing Bags)으로 운반하고/하거나 조성물 또는 그의 일부를, 예를 들어 세포의 추가 분석을 위해 바이알 또는 다른 용기로 운반하였다. 세포는 다운스트림 해동 및 투여를 위해 적합한 조건하에서와 같이 저온 동결상태였다.

[1313] 일부 경우에, 30 mL 부피의 제형화된 세포를 개별 백에 사용하였다. 일부 경우에, 세포를 가변 총 세포 농도로 저온 보존하여, 예를 들어, 투여용 세포의 맥락에서 각 투여량에서 CAR+ T 세포의 일정한 수 또는 농도를 허용하였다. 일부 구현예에서, 표적 CAR+ CD3+ 세포수는 30 mL 또는 백 당 대략 원하는 수(예를 들어 (약) 37.5×10^6 개)의 CAR+CD3+ 세포이며, 이것은 일부 구현예에서 상이한 공여체 또는 환자로부터 생성된 조성물 중에서 총 세포 농도를 변화시키는 것을 포함한다.

[1314] 본 실시예의 예시적인 방법은 다수의 인간 다발성 골수종 백혈병 시료로부터 조작된 T 세포 조성물을 생성하는 데 사용되었다. 세포 표현형의 반사, 기능 및 세포 조작을 포함하는 다양한 파라미터를 평가하였다. T 세포 순도, T 세포 계통 표현, 형질도입 빈도 및 기능성은 실시예 1에 기재된 바와 같은 방법을 사용하여 이들 백혈구 생성물에서 생성된 조성물과 실질적으로 유사한 것으로 관찰되었다.

[1315] 실시예 1의 예시적인 공정과 비교하여 본 실시예에서 예시적인 공정을 사용하여 생산하면서, 실시예 1의 예시적인 공정과 비교하여 본 실시예에서 예시적인 공정을 사용하여 생산하면서, 모집단 배가와 활성화 개시 및 수확 사이의 평균 지속시간을 예시한다. 일반적으로, 실시예 1의 것과 비교하여 본 실시예에서 예시적인 방법에 의해 제조된 조작된 세포 조성물에서 유사하거나 증가된 백분율의 중추 메모리-표현형 세포(및 유사하거나 감소된 백분율의 이펙터 메모리-표현형 세포)를 관찰하였다.

[1316] 본 발명은 예를 들어 본 발명의 다양한 양태를 예시하기 위해 제공되는 특정 개시된 구현예로 범위가 제한되도록 의도된 것이 아니다. 기재된 조성물 및 방법에 대한 다양한 변형은 본 명세서의 설명 및 교시로부터 명백해질 것이다. 이러한 변형은 본 개시의 진정한 범위 및 사상을 벗어나지 않고 실시될 수 있으며 본 개시의 범위 내에 속하도록 의도된 것이다.

[1317] 명세서의 설명 및 교시 내용으로부터 명백해질 것이다. 이러한 변형은 본 발명의 진정한 범위 및 정신을 벗어나지 않고 실시될 수 있으며, 본 발명의 범위 내에 속하는 것으로 의도된다.

표 5

서열

[1318]

#	SEQUENCE	ANNOTATION
1	ESKYGPPCPPCP	스페이서 (IgG4 힌지) (aa)
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCTGCCCCCTTGCCCT	스페이서 (IgG4 힌지) (nt)
3	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGK	힌지-C _H 3 스페이서
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKLSLSLGK	힌지-C _H 2-C _H 3 스페이서
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGLAKATTAPATTRNTGRGGEKKKEKEEQEERETKTPECPSTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEGLLERHNSGSQSQRSLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSHEDSRLLNASRSLVSYVTDH	IgD- 힌지-Fc
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A

7	MLLVTSLLLCELPHPAFLLIPRKCVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSI SGLHLPLVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGVDV I I SGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQTKI I SNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPPREFVENSEC IQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNC IQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR
8	FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (수탁번호 P10747의 153-179)
9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFLPGPSKP FWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (수탁번호 P10747의 아미노산 114-179)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (P10747의 180-220)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (LL 내지 GG)
12	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFP EEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1의 아미노산 214-255)
13	RVKFSRSADAPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR	CD3 제타
14	RVKFSRSAEPPAYQQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR	CD3 제타
15	RVKFSRSADAPAYKQGNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMALPPR	CD3 제타
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSI SGLHLPLVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGVDV I I SGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQTKI I SNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPPREFVENSEC IQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNC IQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLLVVALGIGLFM	tEGFR
17	EGRGSLLTCGDVEENPGP	T2A
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-(SGGG)5-P- wherein P is proline, G is glycine and S is serine	링커
23	GSADDAKKDAKKDGKS	링커
24	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagtaccacaccagcattctctcctgatccca	GMCSFR 알파쇄신호서열
25	MLLVTSLLLCELPHPAFLLIP	GMCSFR 알파쇄신호서열
26	MALPVTALLLPLALLHA	CD8 alpha signal peptide
27	EVQLVQSGAEMKPKGASLKLCKASGYTFIDYVVYWMRQAPQGLES MWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSR LRSDDTAMYCARSDRGYMDYWGQGLTVVSS	Variable heavy (V _H) Anti-BCMA
28	QSALTQPASVSPGQSIASCTGTSSDVGWYQHPGKAPKLM IYEDSKRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYICSSNTRSSTLVFGGGTKLTVLG	가변 경쇄 (V _H) Anti-BCMA
29	ESKYGPPCPPAPPVAGPSVFLFPPKPKDMLI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSR LTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNYHQKSLSLSLGK	헨지-C _H 2-C _H 3 스페이서 호모 사피엔스
30	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFDYSINWVKRAPGKGLKWMGWINTETREPAYAYDFRGRFAFSLETSASTAYLQINNLKYEDTATYFCALDYSYAMDYWGQTSVTVSS	가변 중쇄 (V _H) Anti-BCMA
31	DIVLTQSPPSLAMS LGKRATISCRASEVTILGSHL IHWYQQKPKGQPPTLLIQLASNVQTGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEEDDVA VYYICLQSRITPRTFGGGTKLEIK	가변 경쇄 (V _H) Anti-BCMA
32	QIQLVQSGPDLKKPGETVKLSCKASGYTFNFGMNWVKAPGKGFKWMAWINTYTGESYFADDFKGRFAFSVETSATTAYLQINNLKTEDTATYFCARGEIYYGYDGGFA YWGQGLTVVSA	가변 중쇄 (V _H) Anti-BCMA
33	DVVMTQSHRFMSTSVGDRVSI TCRASQDVNTAVSWYQQKPGQSPKLLIFSA SRYRTGVPDRFTGSGSGADFTLTISSVQAEDLAVYYCQHYSTPWFVFGGGTKLDIK	가변 경쇄 (V _H) 항-BCMA
34	EVQLVQSGAEVKKPGEISLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMI IYPGDS DTRYSPSFQGHVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYICARYSGSFDNWGGGLTVVSS	가변 중쇄 (V _H) 항-BCMA
35	SYELTQPPSASGTPGQRTVMSCSGTSSNIGSHSVN WYQQLPGTAPKLLIYTNNQRPSGVPDRFSGSKGSASLAISGLQSEDEADYICAAWDGSLNGLVFGGGTKLTVLG	가변 경쇄 (V _H) 항-BCMA
36	GGGGS	링커

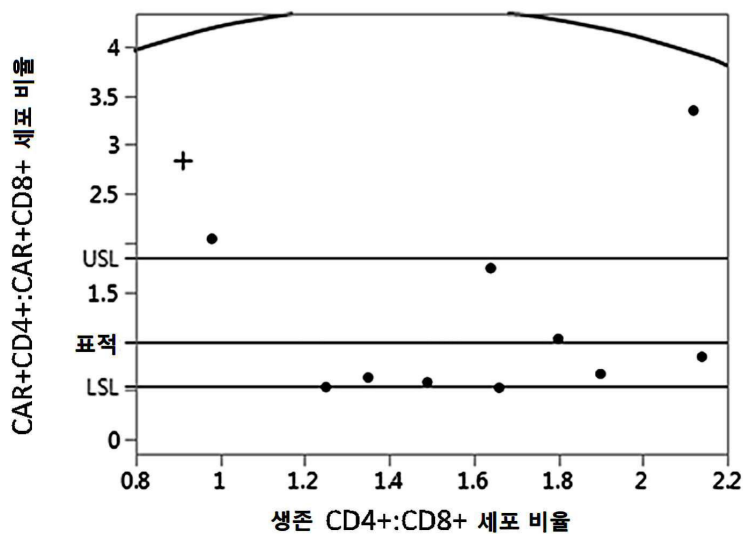
37	GGGS	링커
38	GGGSGGGGSGGGGS	링커
39	GSTSGGKPGSGEGSTKG	링커
40	SRGGGSGGGGSGGGGSLEMA	링커
41	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGRI IPILGIANYAQKFKQGRVTMTED TSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSYGSKSI VSYMDYWGQGLTLTVSS	가변 중쇄 (V _H) 항-BCMA
42	LPVLTQPPSTSGTPGQRTVTVSCGSSSNIGSNVFWYQQLPGTAPKLV IYRNNQRPSPGVPDRFSVSKSGTSAS LAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGTGTKVTVLG	가변 경쇄 (V _H) 항-BCMA
43	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI SWVRQAPGQGLEWMGRI IPILGTANYAQKFKQGRVTITAD ESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARSYGSYRWEDSWGQGLTLTVSS	가변 중쇄 (V _H) 항-BCMA
44	QAVLTQPPSASGTPGQRTV I SCGSSSNIGSNVFWYQQLPGTAPKLL IYSNNQRPSPGVPDRFSGSKSGTSAS LAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLASVYVFGTGTKVTVLG	가변 경쇄 (V _H) 항-BCMA
45	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTF TDYMHVWRQAPGQRLEWMGW INPNSGGTNYAQKFKQDRITVTRD TSSNTGYMELTRLRSDDTAVYYCARSPYSGVLDKWKQGLTLTVSS	가변 중쇄 A(V _H) 항-BCMA
46	QSVLTQPPSVSGAPGQRTV I SCTGSSSNIGAGFDVHWYQQLPGTAPKLL IYGNRNRPSPGVPDRFSGSKSGTSA SLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSGYVFGTGTKVTVLG	가변 경쇄 (V _H) 항-BCMA
47	RASQDISKYLN	CDR L1
48	SRLHSGV	CDR L2
49	GNTLPYTFG	CDR L3
50	DYGV	CDR H1
51	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
52	YAMDYWG	CDR H3
53	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLVGIWGSETTYNSALKSRLTIKDN SKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS	V _H
54	DIQMTQTSSLSASLGRVTI SCRASQDISKYLN WYQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSL TISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT	V _L
55	DIQMTQTSSLSASLGRVTI SCRASQDISKYLN WYQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSL TISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT GSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLQESGPGLVAPSQSLSVT CTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLVGIWGSETTYNSALKSRLTIKDN SKSQVFLKMNSLQTDDTAIYY CAKHYYYGGSYAMDYWGQTSVTVSS	scFv
56	KASQNVGTNVA	CDR L1
57	SATYRNS	CDR L2
58	QYNYRYPY	CDR L3
59	SYWMN	CDR H1
60	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
61	KTISSVDFYFDY	CDR H3
62	EVKLQQSGAELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTAD KSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKT I SSVVDFYFDYWGQTTVTVSS	V _H
63	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTL TITNVQSKDLADYFCQQYNYRYPYTSGGGKLEIKR	V _L
64	GGGSGGGGSGGGGS	링커
65	EVKLQQSGAELVRPGSSVKI SCKASGYAFSSYWMNWVKRPGQGLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGQATLTAD KSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKT I SSVVDFYFDYWGQTTVTYSSGGGSGGGGSDIELTQSPK FMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQKPGQSPKPLIYSATYRNSGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNVQSKD LADYFCQQYNYRYPYTSGGGKLEIKR	scFv
66	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
67	HTSRLHS	LC-CDR2
68	QQGNTLPYT	LC-CDR3
69	gacatccagatgaccagaccacctccagcctgagcgcagcctggcgaccgggtgaccatcagctgccggg ccagccaggacatcagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgaccgaccctcaagctgctgatcta ccacaccagccggctgcacagcggcgtgccagccggtttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctg accatctccaacctggaacaggaagatatcgccacctactttgccagcagggaacacactgccctacacct ttggcggcggaacaaagctggaaatcaccggcagcactccggcagcggcaagcctggcagcggcgaggcag caccaggcggcaggtgaagctgcaggaaagcggccctggcctggtggccccagccagagcctgagcgtgacc tgcacctgagcggcgtgagcctgccgactacggcgtgagctggatccggcagccccaggaaggcctgg aatggctggcgctgatctggggcagcgagaccacctactacaacagcgcctgaagagccggctgacctcat caaggacaacagcaagagccaggtgttctgaagatgaacagcctgcagaccgacgacaccgccatctactac tgcgccaagcactactactacggcggcagctacgcatggactactggggccaggccaccagcgtgaccgtga gcagc	scFv를 암호화하는 서열
70	X1PPX2PX1 is glycine, cysteine or arginine X2 is cysteine or threonine	힌지

71	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	링커
72	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAAKKAGVNNGNPLDAVQQ	스트랩타비딘종: 우스트랩토마이스스 아비디니아 UniProt No. P22629
73	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	최소 스트랩타비딘종: 우스트랩토마이스스 아비디니아
74	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY IGAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	돌연변이 단백질 스트랩타비딘 Ile44-Gly45-Ala46-Arg47종: 우스트랩토마이스스 아비디니아
75	WSHPQFEK	스트랩-태그® II
76	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	트윈-스트랩-태그
77	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	트윈-스트랩-태그
78	WSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	트윈-스트랩-태그
79	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY IGAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	돌연변이 단백질 스트랩타비딘 Ile44-Gly45-Ala46-Arg47종: 우스트랩토마이스스 아비디니아
80	-Trp-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa-	스트랩타비딘-결합 펩티드Xaa는 아미노산이고; Yaa는 Gly 또는 Glu이고; Zaa는 Gly, Lys 또는 Arg이다.
81	Trp-Arg-His-Pro-Gln-Phe-Gly-Gly	스트랩타비딘 결합 펩티드, 스트랩-태그®
82	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(Xaa) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-	스트랩타비딘-결합 펩티드Xaa의 순차모듈은 임의의 아미노산이고; n은 8 또는 12이다.
83	Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys-(GlyGlyGlySer) _n -Trp-Ser-His-Pro-Gln-Phe-Glu-Lys	스트랩타비딘-결합 펩티드의 순차 모듈 n은 2 또는 3이다.
84	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	트윈-스트랩-태그
85	SAWSHPQFEKGGGSGGGSGGGSWSHPQFEK	트윈-스트랩-태그
86	DPSKDSKAQVSAAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY VTAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAAKKAGVNNGNPLDAVQQ	돌연변이 단백질 스트랩타비딘 Val44-Thr45-Ala46-Arg47종: 우스트랩토마이스스 아비디니아
87	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY VTAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	돌연변이 단백질 스트랩타비딘 Val44-Thr45-Ala46-Arg47종: 우스트랩토마이스스 아비디니아
88	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTY VTAR GNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	돌연변이 단백질 스트랩타비딘 Val44-Thr45-Ala46-Arg47종: 우스트랩토마이스스 아비디니아
89	His-Pro-Gln-Phe	스트랩타비딘-결합 펩티드

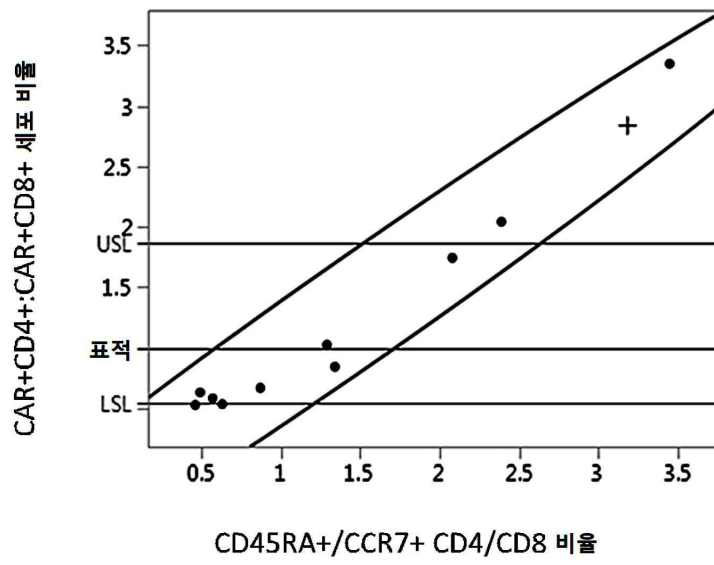
90	Oaa-Xaa-His-Pro-Gln-Phe-Yaa-Zaa	스트랩타비딘-결합 펩티드Oaa는 Trp, Lys 또는 Arg이고; Xaa는 아미노산이며; Yaa는 Gly 또는 Glu이고; Zaa는 Gly, Lys 또는 Arg이다.
91	DPSKDSKAQVSAEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALGTYY IG ARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAASIDAAKKAGVNNGNPLDAVQQ	돌연변이 단백질 스트랩타비딘 Ile44-Gly45-Ala46-Arg47중: 우스트렙토마이시스 아비디나이
92	EAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALGTYY VT ARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	돌연변이 단백질 스트랩타비딘 Val144-Thr45-Ala46-Arg47 and Glu117, Gly120, Try121 (돌연변이 단백질 m1-9)중: 우스트렙토마이시스 아비디나이
93	DPSKDSKAQVSAEAGITGTWYNQLGSTFIV VT AGADGALGTYYVTARGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEENAGYSTLVGHDTFTKVKPSAAS	돌연변이 단백질 스트랩타비딘 Val144-Thr45-Ala46-Arg47 및 Glu117, Gly120, Try121 (돌연변이 단백질 m1-9)중: 우스트렙토마이시스 아비디나이
94	MEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS	최소 스트랩타비딘 중: 우스트렙토마이시스 아비디나이

도면

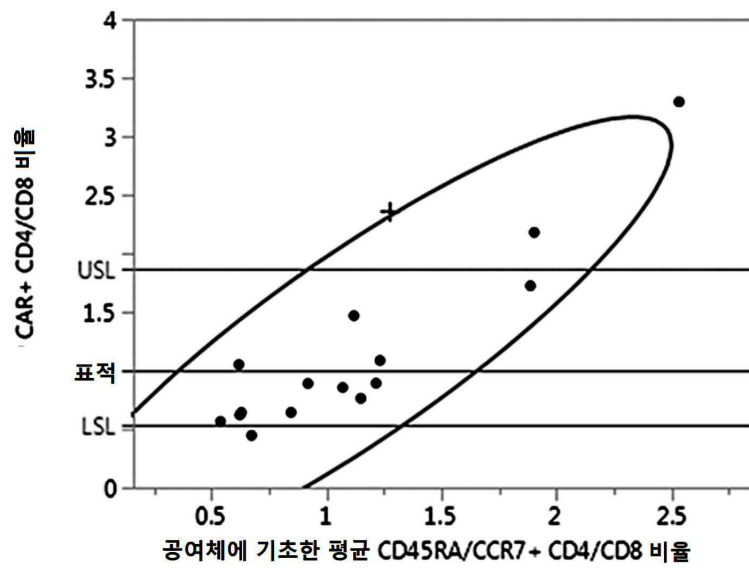
도면1a



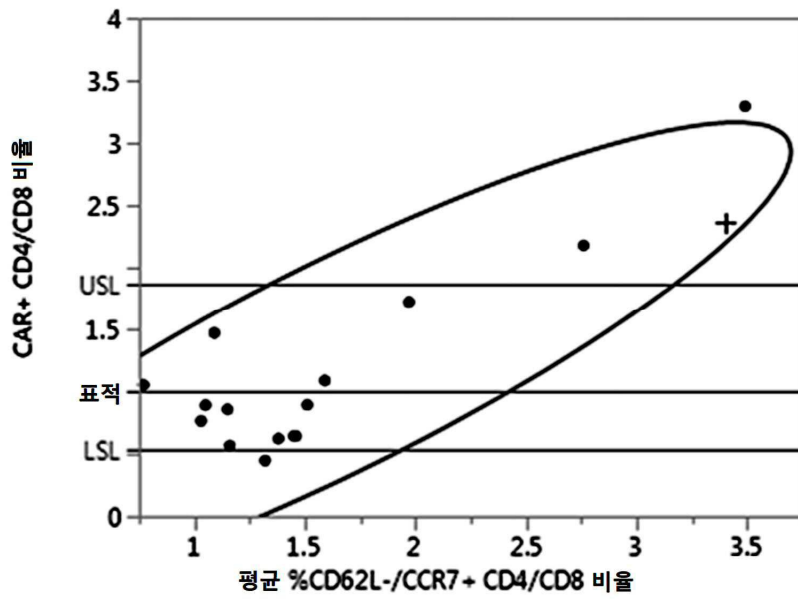
도면1b



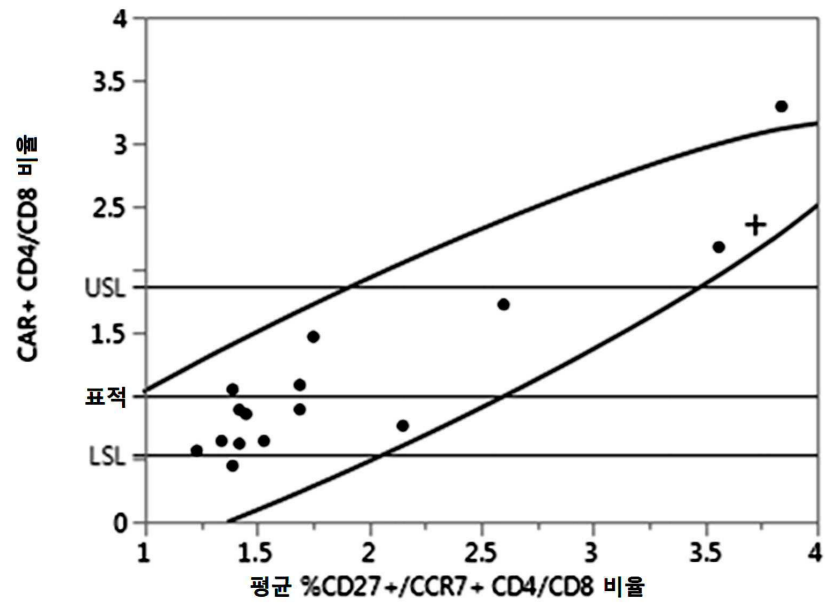
도면2a



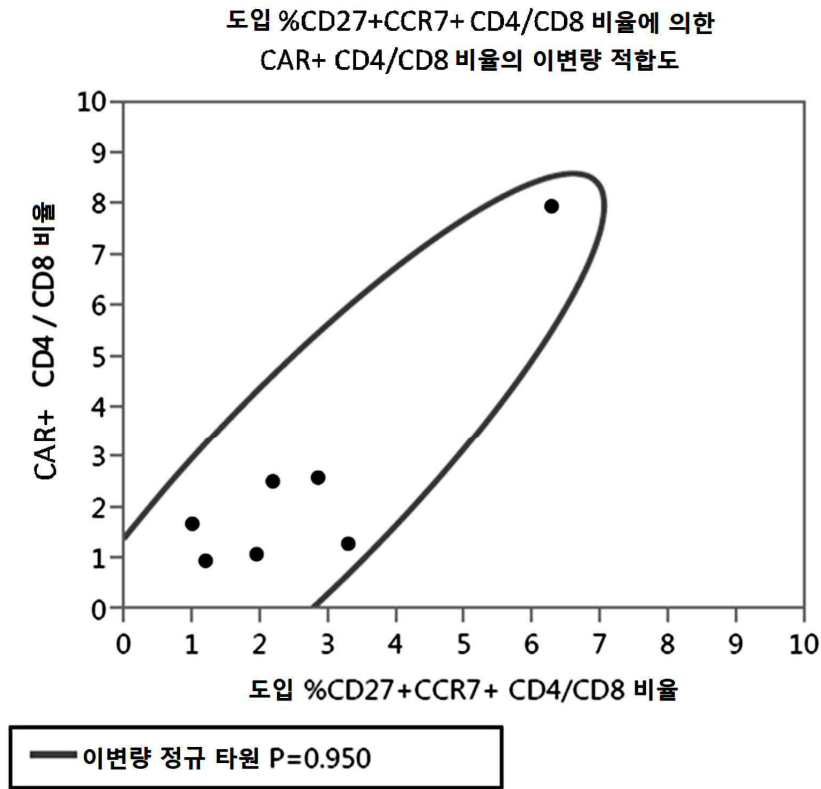
도면2b



도면2c

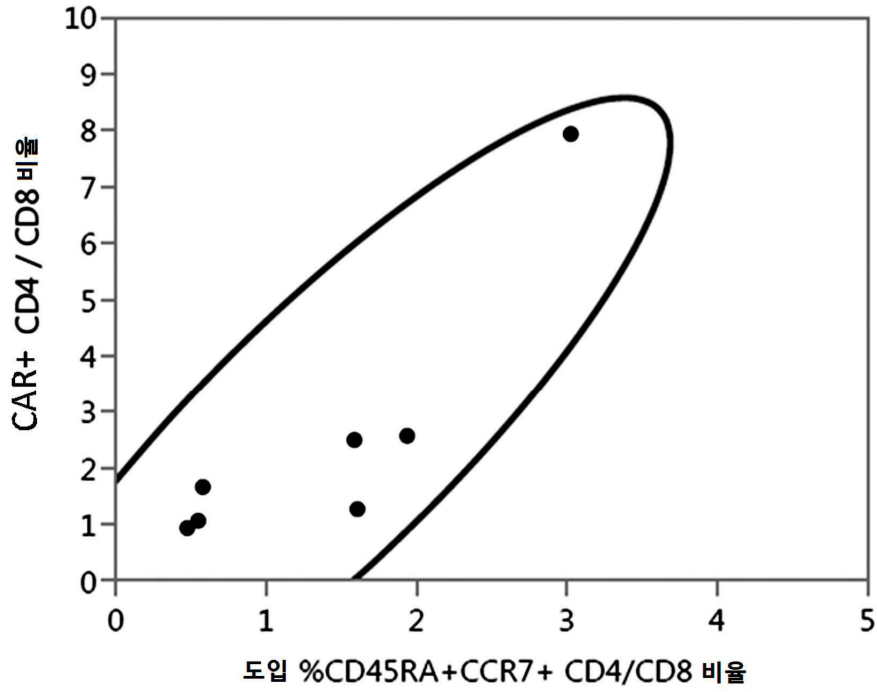


도면3a



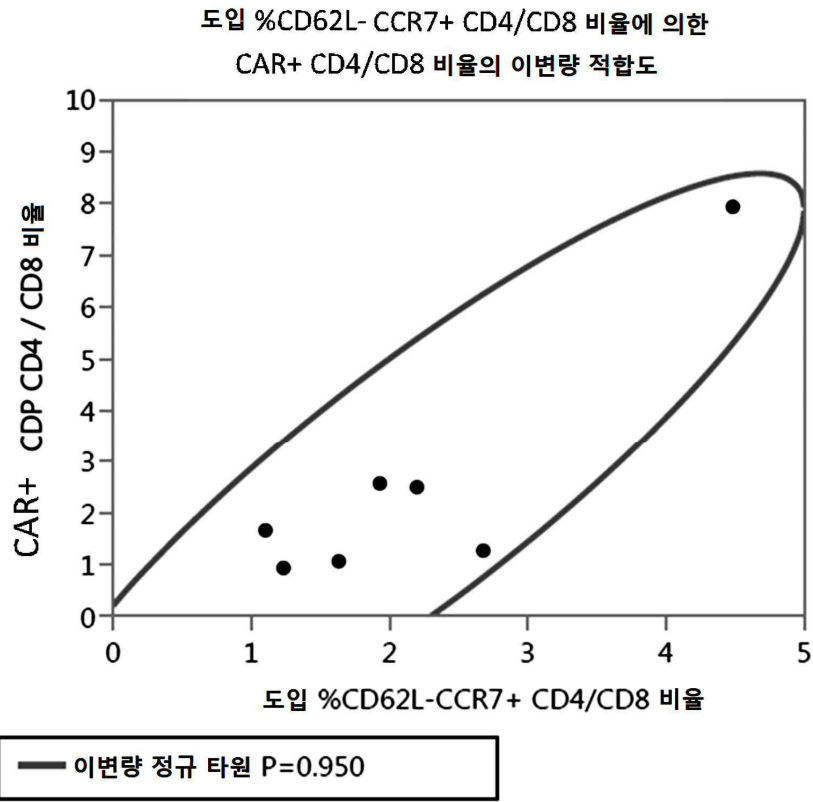
도면3b

도입 %CD45RA+CCR7+ CD4/CD8 비율에 의한
CAR+ CD4/CD8 비율의 이변량 적합도

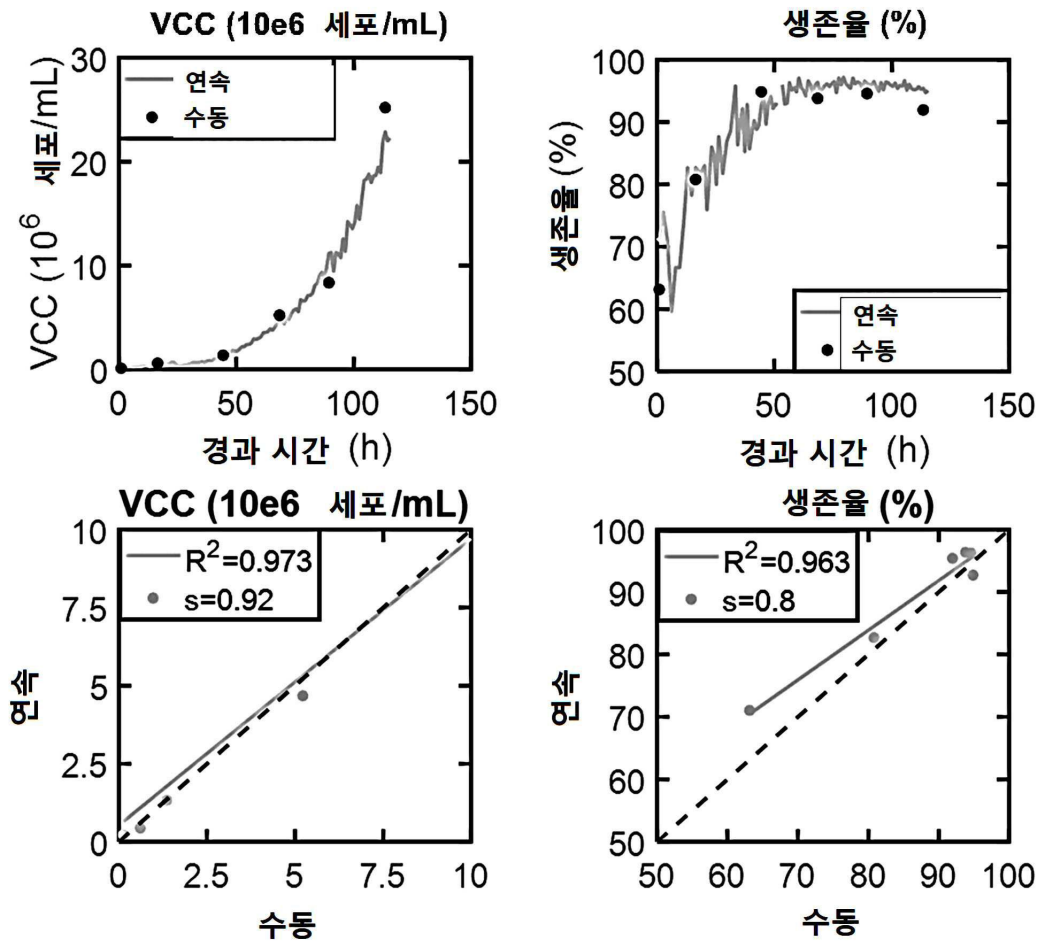


— 이변량 정규 타원 P=0.950

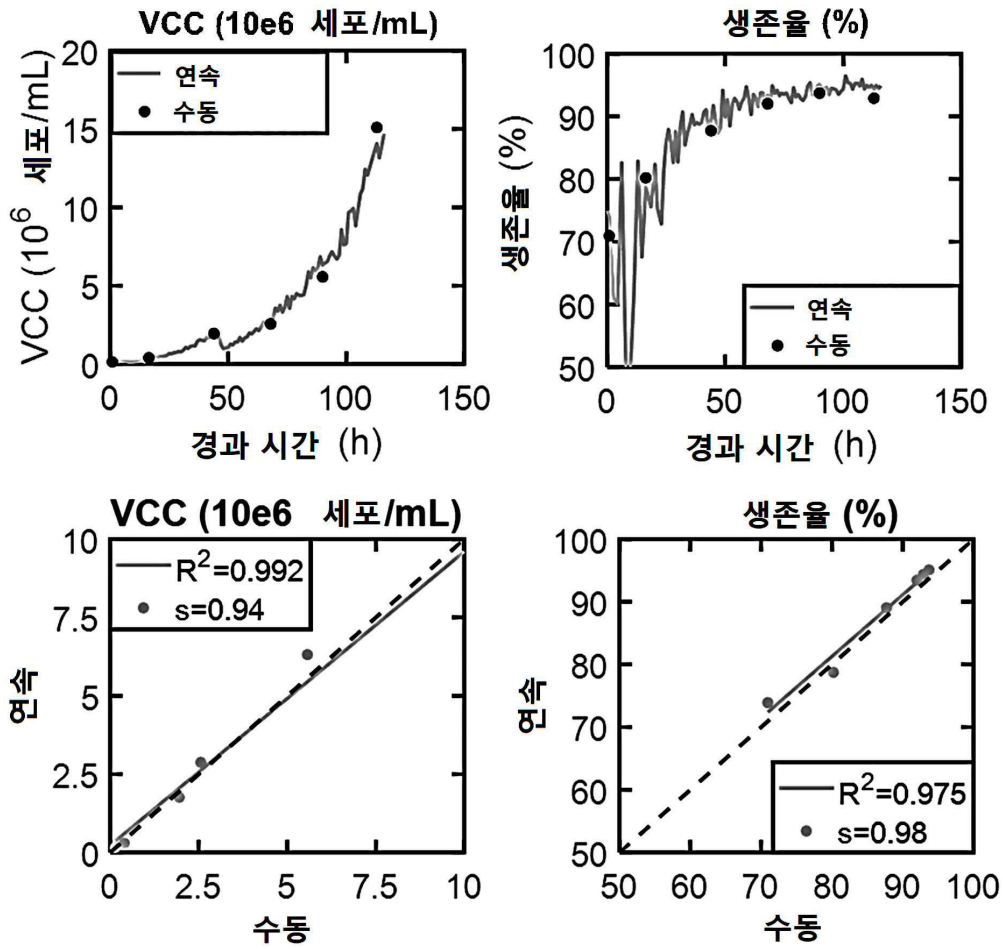
도면3c



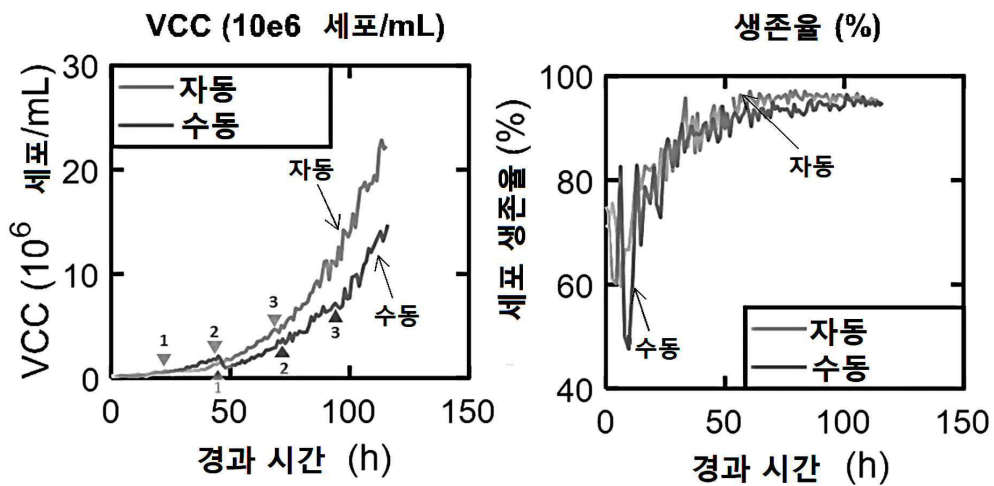
도면4a



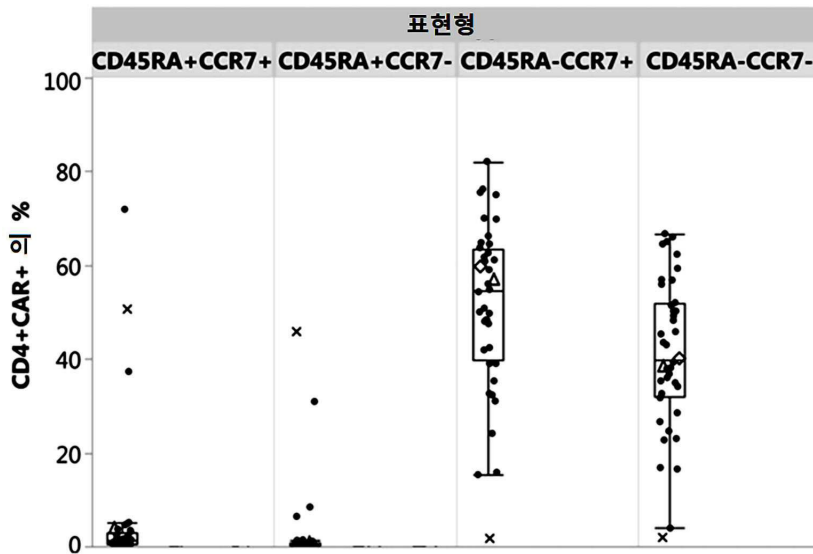
도면4b



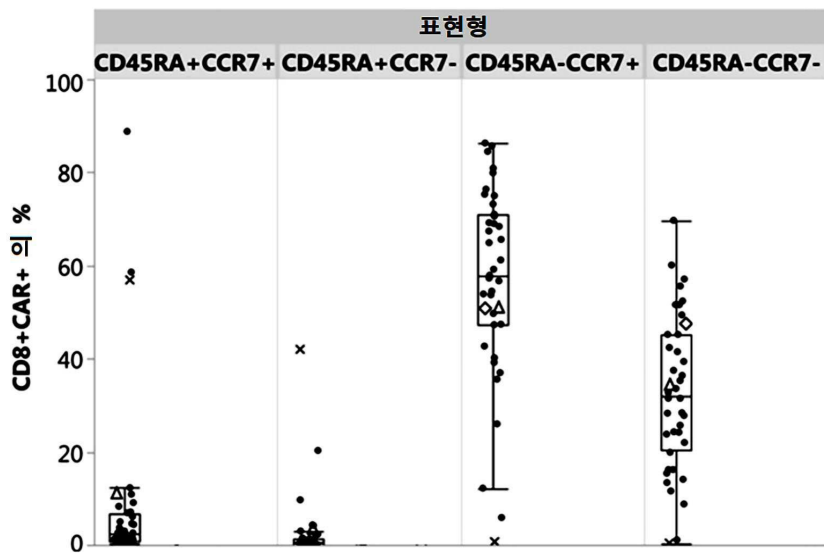
도면5



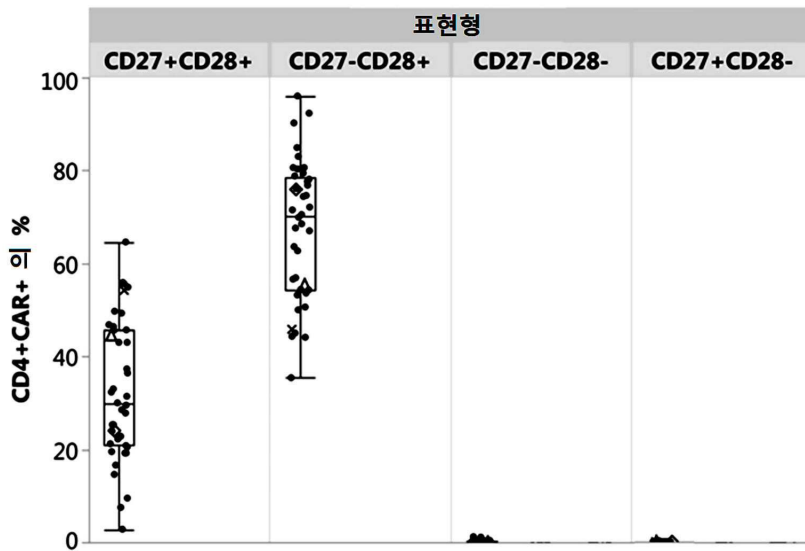
도면6a



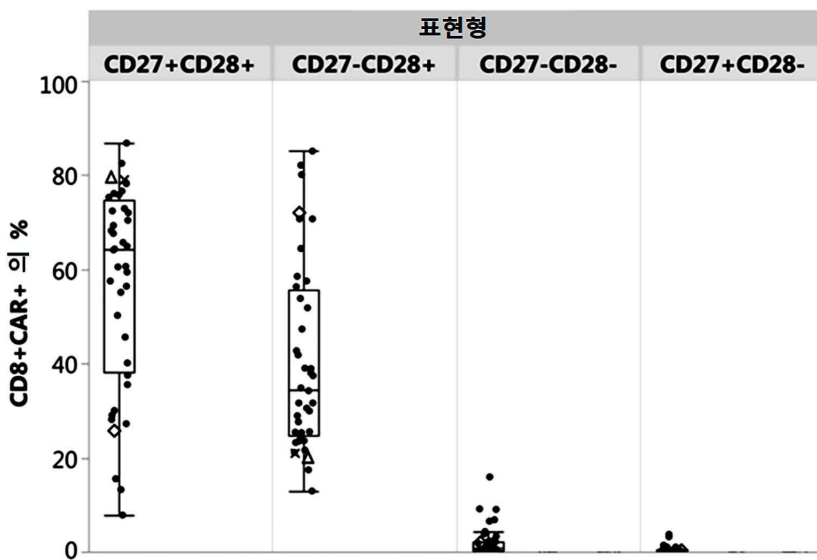
도면6b



도면6c



도면6d



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> JUNO THERAPEUTICS, INC.

MUJACIC, Mirna

RAHARDJO, Ayu

BEAUCHESNE, Pascal

<120> PROCESS FOR PRODUCING A COMPOSITION OF
ENGINEERED T CELLS

<130> 735042014340

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> 62/596,774

<151> 2017-12-08

<150> 62/614,965

<151> 2018-01-08

<150> 62/716,971

<151> 2018-08-09

<150> 62/721,604

<151> 2018-08-22

<150> 62/740,903

<151> 2018-10-03

<150> 62/754,564

<151> 2018-11-01

<150> 62/774,165

<151> 2018-11-30

<150> 62/774,855

<151> 2018-12-03

<160> 94

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Spacer (IgG4hinge)

<400> 1

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Spacer (IgG4hinge)

<400> 2

gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcctt

36

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hinge-CH3 spacer

<400> 3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg

1 5 10 15

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

20 25 30

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

35 40 45

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

50 55 60

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

65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

85 90 95

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

100 105 110

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

115

<210> 4

<211> 229

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hinge-CH2-CH3 spacer

<400> 4

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 20 25 30
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 35 40 45
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

 50 55 60
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 85 90 95
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser
 100 105 110
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 130 135 140
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 165 170 175
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu

 180 185 190
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 195 200 205
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 210 215 220
 Leu Ser Leu Gly Lys
 225
 <210> 5
 <211> 282
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> IgD-hinge-Fc

<400> 5

Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys

35 40 45

Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro

50 55 60

Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln

65 70 75 80

Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly

85 90 95

Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val

100 105 110

Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly

115 120 125

Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn

130 135 140

Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro

145 150 155 160

Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys

165 170 175

Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser

180 185 190

Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu

195 200 205

Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro

210 215 220
 Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser
 225 230 235 240
 Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
 245 250 255
 Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg

260 265 270
 Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His
 275 280

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T2A

<400> 6

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp
 1 5 10 15
 Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg
 20

<210> 7

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> tEGFR

<400> 7

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
 1 5 10 15
 Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
 20 25 30
 Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
 35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
 50 55 60

 Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
 65 70 75 80
 Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
 85 90 95
 Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
 100 105 110
 Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
 115 120 125

 Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
 130 135 140
 Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
 145 150 155 160
 Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
 165 170 175
 Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
 180 185 190

 Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
 195 200 205
 Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
 210 215 220
 Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
 225 230 235 240
 Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
 245 250 255

 Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
 260 265 270
 His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
 275 280 285
 Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His

290 295 300
 Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
 305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala
 325 330 335
 Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly
 340 345 350

Ile Gly Leu Phe Met
 355

<210> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28

<300>

<308> UniProt P10747

<309> 1989-07-01

<400> 8

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
 20 25

<210> 9

<211> 66

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28

<300>

<308> UniProt P10747

<309> 1989-07-01

<400> 9

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn
 1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu
 20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
 35 40 45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
 50 55 60

Trp Val

65

<210> 10

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28

<300>

<308> UniProt P10747

<309> 1989-07-01

<400> 10

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40

<210> 11

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28

<400> 11

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
 1 5 10 15

Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
 20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 35 40

<210> 12

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 4-1BB

<300>

<308> UniProt Q07011.1

<309> 1995-02-01

<400> 12

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
 1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe
 20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

 35 40

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 13

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 14

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 14

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110

<210> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 15

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 16

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> tEGFR

<400> 16

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu

1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile

20 25 30

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe

Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro
 290 295 300
 Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala
 305 310 315 320
 Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met

325 330 335

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T2A

<400> 17

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
 1 5 10 15

Gly Pro

<210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P2A

<400> 18

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
 1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P2A

<400> 19

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> E2A

<400> 20

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 21

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> F2A

<400> 21

Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gln Arg Asp Gly Tyr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 28

<211> 105

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable light (VL) Anti-BCMA

<400> 28

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Ser Ile Ala Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Trp Tyr
 20 25 30
 Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Glu Asp Ser
 35 40 45

Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly
 50 55 60
 Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala
 65 70 75 80
 Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Asn Thr Arg Ser Ser Thr Leu Val Phe Gly
 85 90 95
 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105

<210> 29

<211> 228

<212> PRT

<213>

> Homo sapiens

<220>

<221> PEPTIDE

<222> (0)...(0)

<223> Hinge-CH2-CH3 spacer

<400> 29

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val
 1 5 10 15
 Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 20 25 30
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 35 40 45
 Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 50 55 60
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr
 65 70 75 80
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 85 90 95
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
 100 105 110
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 115 120 125
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
 130 135 140
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 145 150 155 160
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 165 170 175
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
 180 185 190
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 195 200 205
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 210 215 220

Ser Leu Gly Lys

225

<210> 30

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable heavy (VH) Anti-BCMA

<400> 30

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1	5	10	15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Ser Ile Asn Trp Val Lys Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met			
	35	40	45
Gly Trp Ile Asn Thr Glu Thr Arg Glu Pro Ala Tyr Ala Tyr Asp Phe			
	50	55	60
Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr			

65	70	75	80
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Tyr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys			
	85	90	95
Ala Leu Asp Tyr Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser			
	100	105	110
Val Thr Val Ser Ser			

115

<210> 31

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable light (VL) Anti-BCMA

<400> 31

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

1 5 10 15
 Lys Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Thr Ile Leu
 20 25 30
 Gly Ser His Leu Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Thr Leu Leu Ile Gln Leu Ala Ser Asn Val Gln Thr Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp

65 70 75 80
 Pro Val Glu Glu Asp Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser Arg
 85 90 95
 Thr Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 32

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable heavy (VH) Anti-BCMA

<400> 32

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Asp Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Thr Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Phe
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Trp Met
 35 40 45
 Ala Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Tyr Phe Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Val Glu Thr Ser Ala Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

<400> 34

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30

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

Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60

Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Ser Gly Ser Phe Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 35

<211> 111

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable light (VL) Anti-BCMA

<400> 35

Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Met Ser Cys Ser Gly Thr Ser Ser Asn Ile Gly Ser His
 20 25 30

Ser Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

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

<210> 39

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 39

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 40

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 40

Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Glu Met Ala

20

<210> 41

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable heavy (VH) Anti-BCMA

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Glu Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ser Gly Tyr Ser Lys Ser Ile Val Ser Tyr Met Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 42
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Variable light (VL) Anti-BCMA
 <400> 42
 Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Thr Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Val Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 Val Val Phe Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Val
 35 40 45
 Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Val Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95
 Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly

100 105 110

<210> 43

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable heavy (VH) Anti-BCMA

<400> 43

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Ser Gly Tyr Gly Ser Tyr Arg Trp Glu Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 44

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable light (VL) Anti-BCMA

<400> 44

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

1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Val Phe Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

 Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95
 Ser Ala Ser Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110
 <210> 45
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Variable heavy (VH) Anti-BCMA
 <400> 45
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 Gln Asp Arg Ile Thr Val Thr Arg Asp Thr Ser Ser Asn Thr Gly Tyr
 65 70 75 80

 Met Glu Leu Thr Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
 Ala Arg Ser Pro Tyr Ser Gly Val Leu Asp Lys Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 46

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Variable light (VL) Anti-BCMA

<400> 46

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30

Phe Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 47

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L1

<400> 47

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L2

<400> 48

Ser Arg Leu His Ser Gly Val

1 5

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L3

<400> 49

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly

1 5

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H1

<400> 50

Asp Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 51

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H2

<400> 51

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 52

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H3

<400> 52

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly

1 5

<210> 53

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH

<400> 53

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr

20 25 30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 54

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 54

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr

100 105

<210> 55

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 55

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr
 20 25 30

 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln
 65 70 75 80
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
 85 90 95

 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly
 100 105 110
 Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys
 115 120 125
 Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser
 130 135 140
 Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser
 145 150 155 160

 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile
 165 170 175
 Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu
 180 185 190
 Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn
 195 200 205
 Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr
 210 215 220

 Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L1

<400> 56

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1 5 10

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L2

<400> 57

Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser

1 5

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L3

<400> 58

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 59

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H1

<400> 59

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 60

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H2

<400> 60

Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 61

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H3

<400> 61

Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 62

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH

<400> 62

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 63

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 63

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr
 85 90 95

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 64

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 65

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 65

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser
 130 135 140

Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Val Thr Cys
 145 150 155 160

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 165 170 175

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn
 180 185 190

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 195 200 205

Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe
 210 215 220

Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys
 225 230 235 240

Leu Glu Ile Lys Arg
 245

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> HC-CDR3

<400> 66

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
 1 5 10

<210>

67

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LC-CDR2

<400> 67

His Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LC-CDR3

<400> 68

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 69

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence encoding scFv

<400> 69

gacatccaga tgaccagac cacctccagc ctgagcgcca gcctgggcca cggggtgacc 60
atcagctgcc gggccagcca ggacatcagc aagtacctga actggtatca gcagaagccc 120

gacggcaccg tcaagctgct gatctaccac accagccggc tgcacagcgg cgtgcccagc 180
cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagcctga ccatctcaa cctggaacag 240
gaagatateg ccacctactt ttgccagcag ggcaacacac tgcctacac ctttggcggc 300
ggaacaaagc tggaaatcac cggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcgag 360
ggcagcacca agggcgaggt gaagctgcag gaaagcggcc ctggcctggt ggccccagc 420
cagagcctga gcgtgacctg caccgtgagc ggcgtgagcc tgcccacta cggcgtgagc 480
tggatccggc agccccagc gaagggcctg gaatggctgg gcgtgatctg gggcagcgag 540
accacctact acaacagcgc cctgaagagc cggctgacca tcatcaagga caacagcaag 600

agccaggtgt tctgaagat gaacagcctg cagaccgacg acaccgcat ctactactgc 660
gccaagcact actactacgg cggcagctac gccatggact actggggcca gggcaccagc 720
gtgacctga gcagc 735

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa = Gly, Cys or Arg

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa = Cys or Thr

<400> 70

Xaa Pro Pro Xaa Pro

1 5

<210> 71

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 71

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 72

<211> 159

<212> PRT

<213> Streptomyces avidinii

<220>

<223> Streptavidin

<300>

<308> UniProt No. P22629

<309> 1991-08-01

<400> 72

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly

1 5 10 15

Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr

20 25 30

Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser Ala Val Gly

35 40 45

Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro

50 55 60

Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys

65 70 75 80

Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr

85 90 95

Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser

100 105 110

Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp

115 120 125

Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys

130 135 140

Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln

145 150 155

<210> 73

<211> 126

<212> PRT

<213> Streptomyces avidinii

<220>

<223> Minimal streptavidin

<400> 73

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu Ser

20 25 30
 Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
 35 40 45
 Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
 50 55 60
 Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
 65 70 75 80
 Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu
 85 90 95
 Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val

100 105 110
 Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 115 120 125

<210> 74

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47

<400> 74

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
 1 5 10 15
 Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly

20 25 30
 Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
 35 40 45
 Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val
 50 55 60
 Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser
 65 70 75 80
 Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu

85 90 95
 Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val
 100 105 110
 Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 115 120 125

<210> 75

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Strep-tag II

<400> 75

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

1 5

<210> 76

<211> 28

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Twin-Strep-tag

<400> 76

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25

<210> 77

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Twin-Strep-tag

<400> 77

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20

<210> 78

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Twin-Strep-tag

<400> 78

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25

<210> 79

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47

<400> 79

Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile

20 25 30

Gly Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr

35 40 45

Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr

50 55 60

Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp

65 70 75 80

Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp

85 90 95
 Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu
 100 105 110
 Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 115 120 125

<210> 80

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Streptavidin-binding peptide

<220>

<221> VARIANT

<222> (2)...(2)

<223> Xaa = any amino acid

<220>

<221> VARIANT

<222> (7)...(7)

<223> Xaa = Gly or Glu

<220>

<221> VARIANT

<222> (8)...(8)

<223> Xaa = Gly, Lys or Arg

<400> 80

Trp Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa

1 5

<210> 81

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Streptavidin binding peptide, Strep-tag

<400> 81

Trp Arg His Pro Gln Phe Gly Gly

1 5

<210> 82

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequential modules of streptavidin-binding peptide

<220>

<221> VARIANT

<222> (9)...(9)

<223> Xaa = any amino acid

<220>

<221> REPEAT

<222> (9)...(9)

<223> Repeated 8 or 12 times

<400> 82

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Xaa Trp Ser His Pro Gln Phe Glu

1 5 10 15

Lys

<210> 83

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequential modules of streptavidin-binding peptide

<220>

<221> REPEAT

<222> (9)...(12)

<223> Repeated 2 or 3 times

<400> 83

Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro

1 5 10 15

Gln Phe Glu Lys

20

<210> 84

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Twin-Strep-tag

<400> 84

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25 30

<210> 85

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Twin-Strep-tag

<400> 85

Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Ser Ala Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys

20 25 30

<210> 86

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47

<400> 86

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly

1 5 10 15

Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr
 20 25 30

Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly
 35 40 45

Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 50 55 60

Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 65 70 75 80

Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 85 90 95

Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 100 105 110

Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 115 120 125

Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys
 130 135 140

Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln
 145 150 155

<210> 87

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47

<400> 87

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe
 1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr
 20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp
 35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val

115	120	125
<210> 89		
<211> 4		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Streptavidin-binding peptide		
<400> 89		
His Pro Gln Phe		
1		
<210> 90		
<211> 8		
<212> PRT		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Streptavidin-binding peptide		
<220>		
<221> VARIANT		
<222> (1)...(1)		
<223> Xaa = Trp, Lys or Arg		
<220>		
<221> VARIANT		
<222> (2)...(2)		
<223> Xaa = any amino acid		
<220>		
<221> VARIANT		
<222> (7)...(7)		
<223> Xaa = Gly or Glu		
<220>		
<221> VARIANT		
<222> (8)...(8)		
<223> Xaa = Gly, Lys or Arg		
<400> 90		

Xaa Xaa His Pro Gln Phe Xaa Xaa

1 5

<210> 91

<211> 159

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Ile44-Gly45-Ala-46-Arg47

<400> 91

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly

1 5 10 15

Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr

20 25 30

Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Ile Gly Ala Arg Gly

35 40 45

Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro

50 55 60

Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys

65 70 75 80

Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr

85 90 95

Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser

100 105 110

Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu Val Gly His Asp

115 120 125

Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser Ile Asp Ala Ala Lys

130 135 140

Lys Ala Gly Val Asn Asn Gly Asn Pro Leu Asp Ala Val Gln Gln

145 150 155

<210> 92

<211> 126

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47 and

Glul17, Gly120, Try121 (mutein m1-9)

<400> 92

Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe

1 5 10 15

Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr

20 25 30

Ala Arg Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp

35 40 45

Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val

50 55 60

Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser

65 70 75 80

Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu

85 90 95

Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val

100 105 110

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

115 120 125

<210> 93

<211> 139

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Mutein Streptavidin Val44-Thr45-Ala46-Arg47 and

Glul17, Gly120, Try121 (mutein m1-9)

<400> 93

Asp Pro Ser Lys Asp Ser Lys Ala Gln Val Ser Ala Ala Glu Ala Gly

1 5 10 15

Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr Phe Ile Val Thr

20 25 30
 Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Val Thr Ala Arg Gly
 35 40 45
 Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr Asp Ser Ala Pro
 50 55 60
 Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr Val Ala Trp Lys
 65 70 75 80

Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp Ser Gly Gln Tyr
 85 90 95
 Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp Leu Leu Thr Ser
 100 105 110
 Gly Thr Thr Glu Glu Asn Ala Gly Tyr Ser Thr Leu Val Gly His Asp
 115 120 125
 Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
 130 135

<210> 94

<211> 127

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Minimal streptavidin

<400> 94

Met Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp Tyr Asn Gln Leu Gly Ser Thr
 1 5 10 15
 Phe Ile Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly Ala Leu Thr Gly Thr Tyr Glu
 20 25 30
 Ser Ala Val Gly Asn Ala Glu Ser Arg Tyr Val Leu Thr Gly Arg Tyr
 35 40 45
 Asp Ser Ala Pro Ala Thr Asp Gly Ser Gly Thr Ala Leu Gly Trp Thr
 50 55 60
 Val Ala Trp Lys Asn Asn Tyr Arg Asn Ala His Ser Ala Thr Thr Trp
 65 70 75 80

Ser Gly Gln Tyr Val Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr Gln Trp
85 90 95
Leu Leu Thr Ser Gly Thr Thr Glu Ala Asn Ala Trp Lys Ser Thr Leu
100 105 110
Val Gly His Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Pro Ser Ala Ala Ser
115 120 125