



(12) Translation of
European patent specification

(11) NO/EP 3927370 B1

NORWAY

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01)
C12N 5/0784 (2010.01)

Norwegian Industrial Property Office

(45)	Translation Published	2024.08.19
(80)	Date of The European Patent Office Publication of the Granted Patent	2024.04.24
(86)	European Application Nr.	20711461.2
(86)	European Filing Date	2020.02.18
(87)	The European Application's Publication Date	2021.12.29
(30)	Priority	2019.02.19, US, 201962807644 P 2019.03.29, US, 201962826974 P 2019.11.27, US, 201962941610 P 2019.11.27, US, 201962941614 P
(84)	Designated Contracting States:	AL ; AT ; BE ; BG ; CH ; CY ; CZ ; DE ; DK ; EE ; ES ; FI ; FR ; GB ; GR ; HR ; HU ; IE ; IS ; IT ; LI ; LT ; LU ; LV ; MC ; MK ; MT ; NL ; NO ; PL ; PT ; RO ; RS ; SE ; SI ; SK ; SM ; TR
(73)	Proprietor	Turnstone Biologics Corp., 9310 Athena Circle, Suite 300, La Jolla, CA 92037, USA
(72)	Inventor	LANGER, Timothy J., 920 Broadway, 16th Floor, New York, New York 10010, USA CECCARELLI, Jacob, 920 Broadway, 16th Floor, New York, New York 10010, USA
(74)	Agent or Attorney	ZACCO NORWAY AS, Postboks 488, 0213 OSLO, Norge

(54)	Title	METHODS FOR PRODUCING AUTOLOGOUS T CELLS USEFUL TO TREAT CANCERS AND COMPOSITIONS THEREOF
(56)	References Cited:	WO-A1-2018/183485 WO-A1-2016/053339 US-A1- 2017 224 800 Y. LI ET AL: "MART-1-Specific Melanoma Tumor-Infiltrating Lymphocytes Maintaining CD28 Expression Have Improved Survival and Expansion Capability Following Antigenic Restimulation In Vitro", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 184, no. 1, 30 November 2009 (2009-11-30), pages 452-465, XP055210596, ISSN: 0022-1767, DOI: 10.4049/jimmunol.0901101 RAMI YOSSEF ET AL: "Enhanced detection of neoantigen-reactive T cells targeting unique and shared oncogenes for personalized cancer immunotherapy", JCI INSIGHT, vol. 3, no. 19, 4 October 2018 (2018-10-04), XP055542887, DOI: 10.1172/jci.insight.122467

Enclosed is a translation of the patent claims in Norwegian. Please note that as per the Norwegian Patents Acts, section 66i the patent will receive protection in Norway only as far as there is agreement between the translation and the language of the application/patent granted at the EPO. In matters concerning the validity of the patent, language of the application/patent granted at the EPO will be used as the basis for the decision. The patent documents published by the EPO are available through Espacenet (<http://worldwide.espacenet.com>) or via the search engine on our website here: <https://search.patentstyret.no/>

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for fremstilling av T-celler for anvendelse i en terapeutisk cellesammensetning, hvor T-cellene uttrykker en T-celle-reseptor (TCR) som gjenkjenner et antigen på overflaten av en målcelle, idet fremgangsmåten omfatter:

- 5 a. å behandle en biologisk prøve som inneholder en populasjon av T-lymfocytter som er oppnådd fra et donorsubjekt som har en tumor, for å fremstille en første populasjon av T-lymfocytter;
- b. å stimulere den første populasjon med ett eller flere første T-celle-stimulerende midler av lymfocytter under betingelser for ekspansjon av T-celler i populasjonen for å fremstille en andre populasjon av aktiverte T-celler,
10 hvor stimuleringen gjennomføres i et lukket system under anvendelse av serumfritt medium, hvor det ene eller de flere T-celle-stimulerende midler er eller omfatter rekombinant IL-2;
- c. co-kultivering av den andre populasjon av T-celler i nærvær av
15 antigenpresenterende celler som presenterer ett eller flere ikke-native peptider på et MHC (major histocompatibility complex) i et lukket system under anvendelse av serumfritt medium, idet nevnte ene eller flere ikke-native peptider er peptider som svarer til ikke-synonyme somatiske mutasjoner assosiert i subjektets tumor, for å fremstille en tredje populasjon
20 av celler som inneholder T-celler omfattende endogene T-celle-reseptorer som er reaktive på mutasjonskodende peptider av tumoren;
- d. å velge ut, fra den tredje populasjon av celler, den populasjon av T-celler som inneholder endogen TCR som er reaktiv på peptider som er til stede på APC-ene, basert på én eller flere oppreguleringsmarkører som uttrykkes på
25 reaktive eller aktiverte T-celler i et lukket system, for å fremstille en fjerde populasjon som inneholder de utvalgte T-celler; og
- e. å ekspandere den fjerde populasjon av utvalgte celler i nærvær av ett eller flere andre T-celle-stimulerende midler av lymfocytter under betingelser for å ekspandere T-celler i populasjonen i et lukket system under anvendelse av
30 serumfritt medium for å fremstille en sammensetning av ekspanderte T-celler for anvendelse som en terapeutisk cellesammensetning, hvor det ene eller de flere andre T-celle-stimulerende midler er eller omfatter rekombinant IL-2.

2. Fremgangsmåte ifølge krav 1, hvor:

- 5 (a) de antigenpresenterende celler er kjerneholdige celler, slik som dendritiske celler, mononukleære fagocytter, B-lymfocytter, endotelceller eller tymisk epitel, valgfritt hvor de antigenpresenterende celler er dendritiske celler; og/eller
- (b) de antigenpresenterende celler og/eller T-celler er autologe til subjektet.

3. Fremgangsmåte ifølge krav 1 eller krav 2, hvor T-cellene er CD4+-celler, CD8+-

10 celler eller CD4+-celler og CD8+-celler.

4. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, hvor:

- (A) det ene eller de flere første T-celle-stimulerende midler omfatter rekombinant IL-2, og hvor konsentrasjonen av rekombinant IL-2 er:
- 15 (i) fra 100 IU/mL til 6000 IU/mL;
- (ii) fra 300 IU/mL til 1000 IU/mL; eller
- (iii) på eller omkring 300 IU/mL; og/eller
- (B) det ene eller de flere andre T-celle-stimulerende midler omfatter rekombinant IL-2, og hvor konsentrasjonen av rekombinant IL-2 er:
- 20 (i) fra 100 IU/mL til 6000 IU/mL;
- (ii) fra 300 IU/mL til 1000 IU/mL; eller
- (iii) på eller omkring 300 IU/mL.

5. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-3, hvor:

- 25 (i) det ene eller de flere første T-celle-stimulerende midler omfatter rekombinant IL-2, og det rekombinante IL-2 er til stede i en mengde som er eller er omkring 6000 IU/mL; og/eller
- (ii) det ene eller de flere andre T-celle-stimulerende midler omfatter rekombinant IL-2, og det rekombinante IL-2 er til stede i en mengde som er
- 30 eller er omkring 6000 IU/mL.

6. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-5, hvor det ene eller de flere andre T-celle-stimulerende midler videre omfatter et anti-CD3-antistoff, valgfritt

OKT3, valgfritt hvor konsentrasjonen av anti-CD3-antistoffet er på eller omkring 50 ng/mL.

7. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-6, hvor det ene eller de
5 flere andre T-celle-stimulerende midler videre omfatter feeder-celler som er ikke-
delende perifere mononukleære blodceller (PBMC), valgfritt hvor feeder-cellene er
gammabestrålt.
8. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-7, hvor det ene eller de
10 flere ikke-native peptider lastes på antigenpresenterende celler ved hjelp av
peptidpuls, valgfritt hvor:
- (i) peptidpulsene utføres ved elektroporering;
 - (ii) det ene eller de flere ikke-aktive peptider er 5-30 aminosyrer, valgfritt 12-
25 aminosyrer, valgfritt på eller omkring 25 aminosyrer i lengde; og/eller
 - 15 (iii) det ene eller de flere ikke-native peptider:
 - (a) er en pool av peptider, og konsentrasjonen av peptider i poolen av
peptider for peptidpulsene er mellom på eller omkring 0,001 µg/mL og på eller
omkring 40 µg/mL, 0,01 µg/mL og på eller omkring 40 µg/mL, på eller
omkring 0,1 µg/mL og på eller omkring 40 µg/mL, på eller omkring 1 µg/mL
20 og på eller omkring 40 µg/mL, på eller omkring 0,01 µg/mL og på eller
omkring 10 µg/mL eller på eller omkring 1 µg/mL og på eller omkring 10
µg/mL; eller
 - (b) er et individuelt peptid, og konsentrasjonen av individuelle peptider for
peptidpulsene er mellom på eller omkring 0,00001 µg/mL og på eller omkring
25 1 µg/mL, på eller omkring 0,00001 µg/mL og på eller omkring 0,1 µg/mL, på
eller omkring 0,00001 µg/mL og på eller omkring 0,01 µg/mL, på eller
omkring 0,0001 µg/mL og på eller omkring 1 µg/mL, på eller omkring 0,0001
µg/mL og på eller omkring 0,1 µg/mL, på eller omkring 0,0001 µg/mL og på
eller omkring 0,1 µg/mL eller på eller omkring 0,0001 µg/mL og på eller
30 omkring 0,01 µg/mL, valgfritt hvor konsentrasjonen av individuelle peptider
av det ene eller de flere ikke-native peptider, i gjennomsnitt, er fra på eller
omkring 0,00001 µg/mL til på eller omkring 0,01 µg/mL eller konsentrasjonen
av individuelt peptid av det ene eller de flere ikke-native peptider, i

gjennomsnitt, er fra på eller omkring 0,0001 µg/mL og på eller omkring 0,001 µg/mL.

- 5 **9.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-8, hvor co-kultiveringsforholdet av antigenpresenterende celler til T-celler er mellom 20:1 og 1:1, mellom 15:1 og 1:1, mellom 10:1 og 1:1, mellom 5:1 og 1:1, mellom 2,5:1 og 1:1, mellom 1:20 og 1:1, mellom 1:15 og 1:1, mellom 1:10 og 1:1, mellom 1:5 og 1:1 eller mellom 1:2,5 og 1:1, valgfritt hvor co-kultiveringsforholdet av antigenpresenterende celler til T-celler er eller er omkring 1:1.
- 10 **10.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-9, hvor co-kultiveringen varer i 2 timer til 24 timer, valgfritt hvor co-kultiveringen varer i eller omkring 6 timer.
- 15 **11.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-10, hvor utvalget gjennomføres under anvendelse av en fluorescensbasert celledsorterer, valgfritt hvor:
- (i) den fluorescensbaserte celledsorterer er en automatisert strømcytometri-sorterer med høy kapasitet, valgfritt FX500-celledsorterer eller Miltenyi-Tyto-celledsorterer; og/eller
- 20 (ii) utvalget er på 1 gjennomløp, 2 gjennomløp, 3 gjennomløp eller 4 gjennomløp av den fluorescensbaserte celledsorterer; og/eller
- (iii) utvalget gjennomføres ved en hastighet på mellom 10.000 og 100.000 celler / sekund under anvendelse av en fluorescensbasert engangs-fluidikk-celledsorterer.
- 25 **12.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-11, hvor den ene eller de flere oppreguleringsmarkører velges fra gruppen bestående av CD107, CD107a, CD39, CD103, CD137 (4-1BB), CD59, CD69, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134 (OX40), CD258, CD256, PD-1, TIM-3 og LAG-3, valgfritt hvor den ene eller
- 30 de flere oppreguleringsmarkører velges fra gruppen bestående av CD107, CD107a, CD39, CD103, CD59, CD90, CD38, CD30, CD154, CD252, CD134, CD258 og CD256.

13. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-12, hvor den ene eller de flere oppreguleringsmarkører:

- (i) er CD134 og/eller CD137; eller
- (ii) omfatter i det minste to markører valgt blant CD107a og CD39, CD107a og CD103, CD107a og CD59, CD107a og CD90, CD107a og CD38, CD39 og CD103, CD39 og CD59, CD39 og CD90, CD39 og CD38, CD103 og CD59, CD103 og CD90, CD103 og CD38, CD59 og CD90, CD59 og CD38 og CD90 og CD38, valgfritt hvor den ene eller de flere T-celle-oppregeringsmarkører videre omfatter CD137, valgfritt hvor den ene eller de flere T-celle-oppregeringsmarkører omfatter i det minste to markører valgt blant CD107a og CD137, CD38 og CD137, CD103 og CD137, CD59 og CD137, CD90 og CD137 og CD38 og CD137.

14. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-13, hvor:

- (i) stimuleringen av den første populasjon varer 7 til 21 dager, valgfritt 7 til 14 dager; og/eller
- (ii) stimuleringen av den første populasjon i et lukket system anvender en gassgjennomtrengelig kulturbeholder; og/eller
- (iii) stimuleringen av den første populasjon i et lukket system gjennomføres under anvendelse av en bioreaktor.

15. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-14, hvor:

- (i) ekspanderingen av den fjerde populasjon varer 7 til 21 dager, valgfritt 7 til 14 dager; og/eller
- (ii) ekspanderingen av den fjerde populasjon gjennomføres i en gassgjennomtrengelig kulturbeholder; og/eller
- (iii) ekspanderingen av den fjerde populasjon gjennomføres under anvendelse av en bioreaktor.

16. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-15, hvor tiden fra behandling av de biologiske prøver som inneholder populasjonen av lymfocytter, til fremstilling av de ekspanderte T-celler, er mindre enn 30 dager.

17. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-16, hvor:

- (i) tumoren er en tumor av en epitelkreft;
- (ii) tumoren er en tumor av et melanom, plateepitelkreft, lungeadenokarsinom, blærekreft, småcellet lungekreft, spiserørskreft, kolorektalkreft (CRC), livmorhalskreft, hode- og halskreft, magekreft eller livmorkreft; eller
- (iii) tumoren er en tumor av en ikke-småcellet lungekreft (NSCLC), CRC, eggstokkreft, brystkreft, spiserørskreft, magekreft, bukspyttkjertelkreft, kolangiokarsinom-kreft, endometriekreft, valgfritt hvor brystkreften er HR+/Her2-brystkreft, trippel-negativ brystkreft (TNBC) eller HER2+-brystkreft.

18. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-17, hvor den biologiske prøve er en tumor, og populasjonen av lymfocytter fra den biologiske prøve er fra tumorinfiltrerende lymfocytter.

19. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-18, hvor:

- A) den første populasjon av lymfocytter behandles som tumorfragmenter fra en resekert tumor, valgfritt hvor den første populasjon av lymfocytter er ett eller flere tumorfragmenter fra den resekte tumor, ytterligere valgfritt hvor den første populasjon av lymfocytter sås for stimulering i det lukkede system på omkring 1 tumorfragment per 2 cm²; eller
- B) den første populasjon av lymfocytter behandles som en enkeltcellesuspensjon ved homogenisering og/eller enzymatisk fordøyelse av ett eller flere tumorfragmenter fra en resekert tumor, valgfritt hvor den enzymatisk fordøyelse er ved inkubasjon med en kollagenase, valgfritt kollagenase IV eller kollagenase I/II, ytterligere valgfritt hvor den første populasjon av lymfocytter sås for stimulering i det lukkede system på omkring 5×10^5 til på eller omkring 2×10^6 totale celler per 2 cm².

20. Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-19, som videre omfatter å høste celler som fremstilles ved hjelp av fremgangsmåten, valgfritt omfattende å

formulere de høstede celler med et kryobeskyttende middel.

- 21.** Fremgangsmåte ifølge et hvilket som helst av kravene 1-20, hvor populasjonen av T-celler av den terapeutiske sammensetning er i stand til å fremstille IFN-gamma
- 5 ved en konsentrasjon på mer enn på eller omkring 30 pg/mL, valgfritt mer enn på eller omkring 60 pg/mL, etter antigenspesifikk stimulering.