



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110099998 A

(43)申请公布日 2019.08.06

(21)申请号 201780080304.5

(74)专利代理机构 上海华诚知识产权代理有限公司 31300

(22)申请日 2017.10.26

代理人 李晓

(30)优先权数据

62/413,387 2016.10.26 US

62/413,283 2016.10.26 US

62/415,452 2016.10.31 US

(51)Int.Cl.

C12N 5/0783(2006.01)

A61K 35/17(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.06.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/058610 2017.10.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/081473 EN 2018.05.03

(71)申请人 艾欧凡斯生物治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 I·弗兰克 M·T·洛策

权利要求书6页 说明书71页 附图16页

(54)发明名称

冷冻保存的肿瘤浸润淋巴细胞的再刺激

(57)摘要

本公开提供了再刺激TIL群的方法,其使得TIL的表型改善及代谢健康增加,并提供了检测TIL群以确定再刺激后更有效输注的适合性的方法。

表 1.

肿瘤类型	氧化磷酸化 (pmol/分钟)	新鲜的产品		
		收获后	解冻后	再刺激后
淋巴黑色素瘤 (M1053T) REP	基础呼吸	17.5 ± 4.4	9.5 ± 4.9	22.5 ± 2.5
	SRC	19.3 ± 9.0	27.5 ± 12.1	16.8 ± 2.6
	SRC (基础的%)	210.6 ± 51.4	389.8 ± 127.4	174.7 ± 11.3
	糖酵解 (pmol/分钟)			
	基础糖酵解	31.1 ± 4.4	22.5 ± 1.2	103.1 ± 5.4
	糖酵解速率	26.4 ± 5.5	20.7 ± 2.2	15.9 ± 7.7
	糖酵解速率 (基础的%)	185.1 ± 17.6	192.0 ± 9.9	115.5 ± 7.4

1. 一种将肿瘤浸润淋巴细胞TIL扩增为治疗性TIL群的方法,其中,所述方法包括以下步骤:

(i) 从患者切除的肿瘤中获得第一TIL群;

(ii) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养所述第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;以及

(iii) 通过用另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞APC补充所述第二TIL群的细胞培养基进行第二次扩增,产生第三TIL群,其中,所述第三TIL群的数量比所述第二TIL群高至少100倍,并且其中,所述第二次扩增进行至少14天,获得所述第三TIL群,其中,所述第三TIL群是治疗性TIL群,所述治疗性TIL群相对于所述第二TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法还包括以下步骤:

(iv) 通过用另外的IL-2、另外的OKT-3和另外的APC补充所述第三TIL群的细胞培养基进行另外的第二次扩增,其中,所述另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(iii)中所得更大的治疗性TIL群,其中,所述更大的治疗性TIL群相对于所述第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中,在步骤(iii)之后,将细胞从细胞培养物中取出并在进行步骤(iv)之前冷冻保存在储存培养基中。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中,在进行步骤(iv)之前解冻所述细胞。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,重复步骤(iv)一至四次,在所述治疗性TIL群中获得足够的TIL,用于治疗有效剂量的TIL。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约40天至约50天的时间。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约42天至约48天的时间。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约42天至约45天的时间。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤(i)至(iii)或(iv)在约44天内进行。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,来自步骤(iii)或(iv)的细胞表达CD4、CD8和TCR $\alpha\beta$ 的水平与新鲜收获的细胞相似。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述抗原呈递细胞是外周血单核细胞PBMC。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中,在步骤(iii)的第9至17天中的任何一天,将所述PBMC添加至细胞培养物中。

13. 根据权利要求2至12所述的方法,其中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,步骤(iv)中所述治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自以下中的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中,所述效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,所述APC是人工APC(aAPC)。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法还包括用表达载体转导所述第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码高亲和力T细胞受体的核酸。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,所述方法还包括用表达载体转导所述第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码嵌合抗原受体CAR的核酸,所述嵌合抗原受体包含与T细胞信号传导分子的至少一个内结构域融合的单链可变片段抗体。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中,将所述治疗性TIL群输注到患者体内。

19. 根据权利要求1所述的方法,其中,步骤(iii)还包括从细胞培养基中移除细胞的步骤。

20. 根据权利要求1所述的方法,其中,重复步骤(iii)一至四次,在治疗性TIL群中获得足够的TIL,用于治疗有效剂量的TIL。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中,足够用于治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

22. 由权利要求1所述的方法制备的扩增的TIL群。

23. 由权利要求1所述的方法制备的扩增的TIL群,其中,与解冻的冷冻保存的TIL相比,扩增的TIL的基础糖酵解增加至少两倍。

24. 一种评估由权利要求1所述的方法制备的TIL细胞群的代谢活性的方法,包括测量细胞的基础糖酵解。

25. 一种评估由权利要求1所述的方法制备的TIL细胞群的代谢活性的方法,包括测量细胞的基础呼吸。

26. 一种评估由权利要求1所述的方法制备的TIL细胞群的代谢活性的方法,包括测量细胞的备用呼吸能力SRC。

27. 一种评估由权利要求1所述的方法制备的TIL细胞群的代谢活性的方法,包括测量细胞的糖酵解储备。

28. 一种将肿瘤浸润淋巴细胞TIL扩增为治疗性TIL群的方法,其中,所述方法包括以下步骤:

(i) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养来自从患者切除的肿瘤的第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;以及

(ii) 通过用另外的IL-2、Okt-3和抗原呈递细胞APC补充所述第二TIL群的细胞培养基进行第二次扩增,产生第三TIL群,其中,所述第三TIL群的数量比所述第二TIL群高至少100倍,并且其中,所述第二次扩增进行至少14天,获得所述第三TIL群,其中,所述第三TIL群是治疗性TIL群,所述治疗性TIL群相对于第二TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中,所述方法还包括以下步骤:

(iii) 通过用另外的IL-2、另外的Okt-3和另外的APC补充所述第三TIL群的细胞培养基进行所述第三TIL群的另外的第二次扩增,其中,所述另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(ii)中所得更大的治疗性TIL群,其中,所述更大的治疗性TIL群相对于第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中,在步骤(iii)之前,将来自步骤(ii)中的细胞培

培养基的细胞取出并冷冻保存在储存培养基中。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中,在步骤(iii)之前解冻所述细胞。

32. 根据权利要求28所述的方法,其中,重复步骤(ii)一至四次,在所述治疗性TIL群中获得足够的TIL,用于治疗有效剂量的TIL。

33. 根据权利要求32所述的方法,其中,足够用于治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

34. 根据权利要求28至33所述的方法,其中,所述APC是外周血单核细胞PBMC。

35. 根据权利要求29至34中任一项所述的方法,其中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自以下中的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中,所述效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

37. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞TIL,其中,所述方法包括以下步骤:

(i) 从患者切除的肿瘤中获得第一TIL群;

(ii) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养所述第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;

(iii) 通过用另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞APC补充所述第二TIL群的细胞培养基进行第二次扩增,产生第三TIL群,其中,所述第三TIL群的数量比所述第二TIL群高至少100倍,并且其中,所述第二次扩增进行至少14天,获得所述第三TIL群,其中,所述第三TIL群是治疗性TIL群,所述治疗性TIL群相对于所述第二TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;以及

(iv) 向患者施用治疗有效剂量的所述第三TIL群。

38. 根据权利要求37所述的方法,其中,所述方法还包括:在步骤(iv)之前,通过用另外的IL-2、另外的OKT-3和另外的APC补充第三TIL群的细胞培养基进行另外的第二次扩增,其中,所述另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(iii)中所得更大的治疗性TIL群,其中,相对于第三TIL群,所述更大的治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

39. 根据权利要求37所述的方法,其中,在步骤(ii)之后,在权利要求38所述的另外的第二次扩增之前,将细胞从细胞培养基中取出并冷冻保存在储存培养基中。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中,在权利要求38所述的另外的第二次扩增之前解冻细胞。

41. 根据权利要求37所述的方法,其中,重复步骤(iii)一至四次,在所述治疗性TIL群中获得足够的TIL,用于治疗有效剂量的TIL。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中,足够用于治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

43. 根据权利要求37至42中任一项所述的方法,其中,所述APC是外周血单核细胞PBMC。

44. 根据权利要求37至43中任一项所述的方法,其中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自以下中的一种以上特

征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

45. 根据权利要求44所述的方法,其中,所述效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

46. 根据权利要求37至45中任一项所述的方法,其中,所述癌症选自黑素瘤、宫颈癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌。

47. 一种治疗患有癌症的受试者的方法,包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞TIL,其中,所述方法包括以下步骤:

(i) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养来自从患者切除的肿瘤的第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;

(ii) 通过用另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞APC补充所述第二TIL群的细胞培养基进行第二次扩增,产生第三TIL群,其中,所述第三TIL群的数量比第二TIL群高至少100倍,并且其中,所述第二次扩增进行至少14天,获得所述第三TIL群,其中,所述第三TIL群是治疗性TIL群,所述治疗性TIL群相对于所述第二TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;以及

(iii) 向患者施用治疗有效剂量的所述治疗性TIL群。

48. 根据权利要求47所述的方法,其中,所述方法还包括:在步骤(iii)之前,通过用另外的IL-2、另外的OKT-3和另外的APC补充所述第三TIL群的细胞培养基进行另外的第二次扩增的步骤,其中,所述另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(ii)中所得更大的治疗性TIL群,其中,相对于所述第三TIL群,所述更大的治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

49. 根据权利要求47所述的方法,其中,在权利要求48所述的另外的第二次扩增之前,将来自步骤(ii)中的细胞培养基的细胞取出并冷冻保存在储存培养基中。

50. 根据权利要求49所述的方法,其中,在权利要求48所述的另外的第二次扩增之前解冻细胞。

51. 根据权利要求47的方法,其中,重复步骤(ii)一至四次,在所述治疗性TIL群中获得足够的TIL,用于治疗有效剂量的TIL。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中,足够用于治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

53. 根据权利要求47至52中任一项所述的方法,其中,所述APC是外周血单核细胞PBMC。

54. 根据权利要求47至53中任一项所述的方法,其中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自以下中的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中,所述效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

56. 根据权利要求47至55中任一项的方法,其中,所述癌症选自黑素瘤、宫颈癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌。

57. 一种检测TIL的方法,其中,所述方法包括以下步骤:

(i) 获得第一TIL群;

(ii) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养所述第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;以及

(iii) 通过用另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞APC补充所述第二TIL群的细胞培养基进行第二次扩增,产生第三TIL群,其中,所述第三TIL群的数量比所述第二TIL群的数量高至少50倍;

(iv) 收获、清洗和冷冻保存所述第三TIL群;

(v) 将冷冻保存的TIL储存在低温下;

(vi) 解冻所述第三TIL群,提供解冻的第三TIL群;以及

(vii) 通过用IL-2、OKT-3和APC补充第三TIL群的细胞培养基,对解冻的第三TIL群的一部分进行另外的第二次扩增,进行至少3天的reREP期,其中,进行第三次扩增,获得第四TIL群,其中,将第四TIL群中TIL数量与第三TIL群中TIL数量进行比较,获得比率;

(viii) 基于步骤(vii)中的所述比率,确定解冻的TIL群是否适合施用于患者;

(ix) 当步骤(viii)中确定第四TIL群中TIL数量与第三TIL群中TIL数量的比率大于5:1时,向患者施用治疗有效剂量的解冻的第三TIL群。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中,进行reREP期直至第四TIL群中TIL数量与第三TIL群中TIL数量的比率大于50:1。

59. 根据权利要求57所述的方法,其中,足够用于治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

60. 根据权利要求57至59中任一项所述的方法,其中,步骤(i)至(vii)进行约40天至约50天的时间。

61. 根据权利要求57至59中任一项所述的方法,其中,步骤(i)至(vii)进行约42天至约48天的时间。

62. 根据权利要求57至59中任一项所述的方法,其中,步骤(i)至(vii)进行约42天至约45天的时间。

63. 根据权利要求57至59中任一项所述的方法,其中,步骤(i)至(vii)在约44天内进行。

64. 根据权利要求57至63中任一项所述的方法,其中,来自步骤(iii)或(vii)的细胞表达CD4、CD8和TCR $\alpha\beta$ 的水平与新鲜收获的细胞相似。

65. 根据权利要求57所述的方法,其中,抗原呈递细胞是外周血单核细胞PBMC。

66. 根据权利要求65所述的方法,其中,在步骤(iii)的第9至第17天中的任何一天,将PBMC添加至细胞培养物中。

67. 根据权利要求57至66中任一项所述的方法,其中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,步骤(iii)或(vii)中更大的TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自以下中的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中,所述效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

69. 根据权利要求57至68中任一项所述的方法,其中,所述APC是人工APC(aAPC)。

70. 根据权利要求57至69中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括用表达载体转导

第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码高亲和力T细胞受体的核酸。

71. 根据权利要求70所述的方法,其中,所述转导步骤发生在步骤(i)之前。

72. 根据权利要求57至71中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码嵌合抗原受体CAR的核酸,所述嵌合抗原受体包含与T细胞信号传导分子的至少一个内结构域融合的单链可变片段抗体。

73. 根据权利要求72所述的方法,其中,所述转导步骤发生在步骤(i)之前。

74. 根据权利要求57至75中任一项所述的方法,其中,在步骤(vii)后检测TIL的活力。

75. 一种检测TIL的方法,其中,所述方法包括以下步骤:

(i) 获得冷冻保存的第一TIL群的一部分;

(ii) 解冻冷冻保存的第一TIL群的所述部分;

(iii) 通过在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞APC的细胞培养基中培养第一TIL群的所述部分进行第一次扩增,进行至少3天的reREP期,产生第二TIL群,其中,将来自第一TIL群的所述部分与第二TIL群进行比较,获得TIL数量之间的比率,其中,第二TIL群中TIL数量与第一TIL群的所述部分中TIL数量的比率大于5:1;

(iv) 基于步骤(iii)中的比率,确定第一TIL群是否适用于治疗性施用于患者;以及

(v) 当步骤(iv)中确定第二TIL群中TIL数量与第一TIL群中TIL数量的比率大于5:1时,将第一TIL群的剩余部分治疗性地施用给患者。

76. 根据权利要求75所述的方法,其中,第二TIL群中TIL数量与第一TIL群的所述部分中TIL数量的比率大于50:1。

77. 根据权利要求75或76所述的方法,其中,所述方法还包括根据前述权利要求中任一项所述的方法,扩增来自步骤(i)的冷冻保存的全部第一TIL群。

78. 根据权利要求75或76所述的方法,其中,所述方法还包括将来自步骤(i)的冷冻保存的全部第一TIL群施用于患者。

79. 根据权利要求75至77所述的方法,其中,所述方法还包括评估第二TIL群的代谢健康的步骤。

80. 根据权利要求75至78所述的方法,其中,所述方法还包括评估第二TIL群的表型的步骤。

81. 根据权利要求75至79所述的方法,其中,所述抗原呈递细胞是同种异体外周血单核细胞。

冷冻保存的肿瘤浸润淋巴细胞的再刺激

相关申请的交叉引用

本申请要求2016年10月26日提交的名称为“肿瘤浸润淋巴细胞的扩增及其使用方法”的美国临时专利申请号62/413,283和62/413,387以及2016年10月31日提交的名称为“冷冻保存肿瘤浸润淋巴细胞的再刺激”的美国临时专利申请号62/415,452的优先权,其全部内容在此引入作为参考。

背景技术

对于预后不良的患者来说,使用肿瘤浸润淋巴细胞(tumor infiltrating lymphocyte, TIL)过继转移治疗体积大、难治性的癌症是一种有效的治疗方法。Gattinoni等*Nat. Rev. Immunol.* 2006, 6, 383-393. 成功的免疫疗法需要大量的TIL,商业化需要稳健可靠的方法。由于细胞扩增的技术、物流和监管问题,这是一项需要实现的挑战。由于其速度和效率,基于IL-2的TIL扩增后随后进行“快速扩增方法”(rapid expansion process, REP)已成为TIL扩增的优选方法。Dudley等*Science* 2002, 298, 850-54; Dudley等*J. Clin. Oncol.* 2005, 23, 2346-57; Dudley等*J. Clin. Oncol.* 2008, 26, 5233-39; Riddell等*Science* 1992, 257, 238-41; Dudley等*J. Immunother.* 2003, 26, 332-42. REP可以在14天内使TIL扩增1000倍,尽管它需要通常来自多个供体的、大量过量(例如200倍)的经辐照的同种异体外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)作为饲养细胞(feeder cell),以及抗CD3抗体(OKT3)和高剂量的IL-2。Dudley等*J. Immunother.* 2003, 26, 332-42.

经过REP程序的TIL在黑色素瘤患者的宿主免疫抑制后产生了成功的过继细胞疗法。目前的输注接受参数依赖于TIL组成的读数(例如CD28、CD8或CD4阳性)以及REP产物的倍数扩增和活力。

然而,目前的REP方案以及当前的TIL扩增方案通常很少考虑到将被注入患者的TIL的健康状况。T细胞在从幼稚T细胞到效应T细胞的成熟过程中经历深刻的代谢转变(参见Chang等,*Nat. Immunol.* 2016, 17, 364, 在此明确地整体并入,特别是关于厌氧和有氧代谢的讨论和标志物)。例如幼稚T细胞依靠线粒体呼吸产生ATP,而成熟、健康的效应T细胞如TIL是高度糖酵解的,依靠有氧糖酵解提供它们增殖、迁移、活化和抗肿瘤功效所需的生物能量学底物。

此外,这些扩增的细胞群可以冷冻保存,从而易于使用、长期储存以用于多次再输注到患有复发性疾病的患者,以及其他考虑因素。然而,目前的输注接受参数依赖于TIL组成的读数以及基于扩增TIL的产品的倍数扩增和活力。这些措施很少考虑将被输注到患者体内的TIL的健康状况,并对冷冻保存对TIL群的影响知之甚少。

因此,本发明涉及扩增和再刺激TIL群的方法,其能改善TIL表型和增加TIL代谢健康,并且涉及检测TIL群以确定再刺激后更有效输注的适合性的方法。

发明内容

本发明提供了与可选的冷冻保存相结合的扩增更大的TIL群、有时是治疗性TIL群的方

法。

根据本公开,提供了将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,包括以下步骤:

(i) 从患者切除的肿瘤中获得第一TIL群;

(ii) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;以及

(iii) 通过用另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)补充第二TIL群的细胞培养基进行第二次扩增,产生第三TIL群,其中,第三TIL群的数量比第二TIL群高至少50倍或100倍,并且其中,第二次扩增进行至少14天,获得第三TIL群,其中,第三TIL群是治疗性TIL群,该治疗性TIL群相对于第二TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

在一些实施方式中,该方法还包括:

(iv) 通过用另外的IL-2、另外的OKT-3和另外的APC补充第三TIL群的细胞培养基进行另外的第二次扩增,其中,另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(iii)中所得更大的治疗性TIL群,其中,该更大的治疗性TIL群相对于第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

在一些实施方式中,在步骤(iii)之后,将细胞从细胞培养物中取出并在进行步骤(iv)之前冷冻保存在储存培养基中。

在一些实施方式中,在进行步骤(iv)之前解冻细胞。

在一些实施方式中,重复步骤(iv)一至四次,在治疗性TIL群中获得足够TIL,用于治疗有效剂量的TIL。

在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约40天至约50天的时间。在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约42天至约48天的时间。在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约42天至约45天的时间。在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)在约44天内进行。

在一些实施方式中,来自步骤(iii)或(iv)的细胞表达CD4、CD8和TCR $\alpha\beta$ 的水平与新鲜收获的细胞相似。

在一些实施方式中,抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方式中,在步骤(iii)的第9天至17天中的任何一天,将PBMC添加至细胞培养物中。

在一些实施方式中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,步骤(iv)中治疗性TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自以下中的一种以上特征: CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

在一些实施方式中,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

在一些实施方式中,APC是人工APC(aAPC)。

在一些实施方式中,该方法还包括用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码高亲和力T细胞受体的核酸。

在一些实施方式中,该方法还包括用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸,所述嵌合抗原受体包含与T细胞信号传导分子的至少一个内结构域融合的单链可变片段抗体。

在一些实施方式中,将治疗性TIL群输注到患者体内。

在一些实施方式中,步骤(iii)还包括从细胞培养基中移除细胞的步骤。

在一些实施方式中,重复步骤(iii)一至四次,以在治疗性TIL群中获得足够的TIL,用于治疗有效剂量的TIL。

在一些实施方式中,足够用于治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

本公开还提供了由权利要求1的方法制备的扩增的TIL群。

本公开还提供了由权利要求1的方法制备的扩增的TIL群,其中,与解冻的冷冻保存的TIL相比,扩增的TIL的基础糖酵解增加至少两倍。

本公开还提供了评估根据本文所述方法制备的TIL细胞群的代谢活性的方法,包括测量细胞的基础糖酵解。

本公开还提供了评估根据本文所述方法制备的TIL细胞群的代谢活性的方法,包括测量细胞的基础呼吸。

本公开还提供了评估根据本文所述方法制备的TIL细胞群的代谢活性的方法,包括测量细胞的备用呼吸能力(spare respiratory capacity, SRC)。

本公开还提供了评估根据本文所述方法制备的TIL细胞群的代谢活性的方法,包括测量细胞的糖酵解储备。

本公开还提供了将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为治疗性TIL群的方法,包括以下步骤:

(i) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养来自从患者切除的肿瘤的第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;以及

(ii) 通过用另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)补充第二TIL群的细胞培养基进行第二次扩增,产生第三TIL群,其中,第三TIL群的数量比第二TIL群高至少50倍或100倍,并且其中,第二次扩增进行至少14天,获得第三TIL群,其中,第三TIL群是治疗性TIL群,该治疗性TIL群相对于第二TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

在一些实施方式中,该方法还包括:

(iii) 通过用另外的IL-2、另外的OKT-3和另外的APC补充第三TIL群的细胞培养基进行所述第三TIL群的另外的第二次扩增,其中,另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(ii)中所得更大的治疗性TIL群,其中,所述更大的治疗性TIL群相对于第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

在一些实施方式中,在步骤(iii)之前,将来自步骤(ii)中的细胞培养基的细胞取出并冷冻保存在储存培养基中。

在一些实施方式中,在步骤(iii)之前解冻细胞。

在一些实施方式中,重复步骤(ii)一至四次,以在治疗性TIL群中获得足够的TIL,用于治疗有效剂量的TIL。

在一些实施方式中,足够用于治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

在一些实施方式中,APC是外周血单核细胞(PBMC)。

在一些实施方式中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,效应T细

胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自以下中的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

在一些实施方式中,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

本公开还提供了治疗患有癌症的受试者的方法,包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),包括以下步骤:

(i) 从患者切除的肿瘤中获得第一TIL群;

(ii) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;

(iii) 通过用另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)补充第二TIL群的细胞培养基进行第二次扩增,产生第三TIL群,其中,第三TIL群的数量比第二TIL群高至少50倍或100倍,并且其中,第二次扩增进行至少14天,获得第三TIL群,其中,第三TIL群是治疗性TIL群,该治疗性TIL群相对于第二TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;以及

(iv) 向患者施用治疗有效剂量的第三TIL群。

在一些实施方式中,该方法还包括:在步骤(iv)之前,通过用另外的IL-2、另外的OKT-3和另外的APC补充第三TIL群的细胞培养基进行另外的第二次扩增,其中,另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(iii)中所得更大的治疗性TIL群,其中,相对于第三TIL群,所述更大的治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

在一些实施方式中,在步骤(ii)之后,在根据本文所述方法的另外的第二次扩增之前,将细胞从细胞培养基中取出并冷冻保存在储存培养基中。

在一些实施方式中,在根据本文所述方法的另外的第二次扩增之前解冻细胞。

在一些实施方式中,重复步骤(iii)一至四次,以在治疗性TIL群中获得足够的TIL,用于治疗有效剂量的TIL。

在一些实施方式中,足够用于治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

在一些实施方式中,APC是外周血单核细胞(PBMC)。

在一些实施方式中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自以下中的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

在一些实施方式中,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

在一些实施方式中,癌症选自黑素瘤、宫颈癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌。

本公开还提供了治疗患有癌症的受试者的方法,包括施用扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),包括以下步骤:

(i) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养来自从患者切除的肿瘤的第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;

(ii) 通过用另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)补充第二TIL群的细胞培养基进行第二次扩增,产生第三TIL群,其中,第三TIL群的数量比第二TIL群高至少50倍或100倍,

并且其中,第二次扩增进行至少14天,获得第三TIL群,其中,第三TIL群是治疗性TIL群,该治疗性TIL群相对于第二TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;以及

(iii) 向患者施用治疗有效剂量的治疗性TIL群。

在一些实施方式中,该方法还包括:在步骤(iii)之前,通过用另外的IL-2、另外的OKT-3和另外的APC补充第三TIL群的细胞培养基进行另外的第二次扩增,其中,另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(ii)中所得更大的治疗性TIL群,其中,相对于第三TIL群,所述更大的治疗性TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。

在一些实施方式中,在根据本文所述的另外的第二次扩增之前,将细胞从步骤(ii)中的细胞培养基中取出并冷冻保存在储存培养基中。

在一些实施方式中,在根据本文所述的另外的第二次扩增之前解冻细胞。

在一些实施方式中,重复步骤(ii)一至四次,以在治疗性TIL群中获得足够的TIL,用于治疗有效剂量的TIL。

在一些实施方式中,足够用于治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

在一些实施方式中,APC是外周血单核细胞(PBMC)。

在一些实施方式中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自以下中的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

在一些实施方式中,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

在一些实施方式中,癌症选自黑素瘤、宫颈癌、头颈癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌。

本发明还提供了测定TIL活力的检测方法。本公开提供了通过将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为更大的TIL群来检测TIL活力的方法,包括以下步骤:

(i) 获得先前已扩增的第一TIL群;

(ii) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;以及

(iii) 通过用另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)补充第二TIL群的细胞培养基进行第二次扩增,产生第三TIL群,其中,第三TIL群的数量比第二TIL群高至少50倍或100倍,并且其中,第二次扩增进行至少14天,获得第三TIL群,其中,相对于第二TIL群,所述第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群,并且其中,进一步检测第三群的活力。

在一些实施方式中,该方法还包括:

(iv) 通过用另外的IL-2、另外的OKT-3和另外的APC补充第三TIL群的细胞培养基进行另外的第二次扩增,其中,另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(iii)中所得更大的TIL群,其中,相对于第三TIL群,所述更大的TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群,并且其中,进一步检测第三群的活力。

在一些实施方式中,在步骤(i)之前,将细胞冷冻保存。

在一些实施方式中,在进行步骤(i)之前解冻细胞。

在一些实施方式中,重复步骤(iv)一至四次,,获得足够的TIL用于分析。

在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约40天至约50天的时间。

在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约42天至约48天的时间。

在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约42天至约45天的时间。

在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)在约44天内进行。

在一些实施方式中,来自步骤(iii)或(iv)的细胞表达CD4、CD8和TCR $\alpha\beta$ 的水平与新鲜收获的细胞相似。

在一些实施方式中,抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。

在一些实施方式中,在步骤(iii)中,在第9天至第17天中的任何一天将PBMC添加至细胞培养物中。

在一些实施方式中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,步骤(iv)中的更大的TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

在一些实施方式中,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

在一些实施方式中,APC是人工APC(aAPC)。

在一些实施方式中,该方法还包括用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码高亲和力T细胞受体的核酸。

在一些实施方式中,转导步骤发生在步骤(i)之前。

在一些实施方式中,该方法还包括用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸,所述嵌合抗原受体包含与T细胞信号传导分子的至少一个内结构域融合的单链可变片段抗体。

在一些实施方式中,转导步骤发生在步骤(i)之前。

在一些实施方式中,检测TIL的活力。

在一些实施方式中,在冷冻保存后检测TIL的活力。

在一些实施方式中,在冷冻保存后和步骤(iv)后,检测TIL的活力。

根据本公开,一种检测TIL的活力和/或进一步施用于受试者的方法。在一些实施方式中,检测肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的方法包括以下步骤:

(i) 获得第一TIL群;

(ii) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;以及

(iii) 通过用另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)补充第二TIL群的细胞培养基进行第二次扩增,产生第三TIL群,其中,第三TIL群的数量比第二TIL群的数量高至少50倍;

(iv) 收获、清洗和冷冻保存第三TIL群;

(v) 将冷冻保存的TIL储存在低温下;

(vi) 解冻第三TIL群,提供解冻的第三TIL群;以及

(vii) 通过用IL-2、OKT-3和APC补充第三TIL群的细胞培养基,对解冻的第三TIL群的一部分进行另外的第二次扩增,进行至少3天的reREP期,其中,进行第三次扩增,获得第四TIL群,其中,将第四TIL群中TIL数量与第三TIL群中TIL数量进行比较,获得比率;

(viii) 基于步骤(vii)中的比率,确定解冻的TIL群是否适合施用于患者;

(ix) 当步骤(viii)中确定第四TIL群中TIL数量与第三TIL群中TIL数量的比率大于5:1时,向患者施用治疗有效剂量的解冻的第三TIL群。

在一些实施方式中,进行reREP期直至第四TIL群中TIL数量与第三TIL群中TIL数量的比率大于50:1。

在一些实施方式中,足够用于治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

在一些实施方式中,步骤(i)至(vii)进行约40天至约50天的时间。在一些实施方式中,步骤(i)至(vii)进行约42天至约48天的时间。在一些实施方式中,步骤(i)至(vii)进行约42天至约45天的时间。在一些实施方式中,步骤(i)至(vii)在约44天内进行。

在一些实施方式中,来自步骤(iii)或(vii)的细胞表达CD4、CD8和TCR $\alpha\beta$ 的水平与新鲜收获的细胞相似。在一些实施方式中,细胞是TIL。

在一些实施方式中,抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方式中,在步骤(iii)的第9天至第17天中的任何一天,将PBMC添加至细胞培养物中。

在一些实施方式中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,步骤(iii)或(vii)中更大的TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自以下中的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

在一些实施方式中,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

在一些实施方式中,APC是人工APC(aAPC)。

在一些实施方式中,用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码高亲和力T细胞受体的核酸。

在一些实施方式中,转导步骤发生在步骤(i)之前。

在一些实施方式中,用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸,所述嵌合抗原受体包含与T细胞信号传导分子的至少一个内结构域融合的单链可变片段抗体。

在一些实施方式中,转导步骤发生在步骤(i)之前。

在一些实施方式中,在步骤(vii)后检测TIL的活力。

本公开还提供了检测TIL的其他方法。在一些实施方式中,本公开提供了检测TIL的方法,包括以下步骤:

(i) 获得冷冻保存的第一TIL群的一部分;

(ii) 解冻冷冻保存的第一TIL群的所述部分;

(iii) 通过在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养第一TIL群的所述部分进行第一次扩增,进行至少3天的reREP期,产生第二TIL群,其中,将来自第一TIL群的所述部分与第二TIL群进行比较,获得TIL数量之间的比率,其中,第二TIL群中TIL数量与第一TIL群的所述部分中TIL数量的比率大于5:1;

(iv) 基于步骤(iii)中的比率,确定第一TIL群是否适用于治疗性施用于患者;

(v) 当步骤(iv)中确定第二TIL群中TIL数量与第一TIL群中TIL数量的比率大于5:1时,确定第一TIL群适用于治疗性施用。

在一些实施方式中,第二TIL群中TIL数量与第一TIL群的所述部分中TIL数量之比大于50:1。

在一些实施方式中,该方法还包括根据本文提供的任何实施方式中描述的方法,扩增来自步骤(i)的冷冻保存的全部第一TIL群。

在一些实施方式中,该方法还包括将来自步骤(i)的冷冻保存的全部第一TIL群施用于患者。

本公开还提供了用于检测TIL的其他方法。在一些实施方式中,本公开提供了检测TIL的方法,包括以下步骤:

(i) 获得冷冻保存的第一TIL群的一部分;

(ii) 解冻冷冻保存的第一TIL群的所述部分;

(iii) 通过在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养第一TIL群的所述部分进行第一次扩增,进行至少3天的reREP期,产生第二TIL群,其中,将来自第一TIL群的所述部分与第二TIL群进行比较,获得TIL数量之间的比率,其中,第二TIL群中TIL数量与第一TIL群的所述部分中TIL数量的比率大于5:1;

(iv) 基于步骤(iii)中的比率,确定第一TIL群是否适用于治疗性施用于患者;以及

(v) 当步骤(iv)中确定第二TIL群中TIL数量与第一TIL群中TIL数量的比率大于5:1时,将第一TIL群的剩余部分治疗性地施用于患者。

在一些实施方式中,第二TIL群中TIL数量与第一TIL群的所述部分中TIL数量的比率大于50:1。

在一些实施方式中,该方法还包括根据前述权利要求中任一项的方法,扩增来自步骤(i)的冷冻保存的全部第一TIL群。

在一些实施方式中,该方法还包括将来自步骤(i)的冷冻保存的全部第一TIL群施用于患者。

在一些实施方式中,该方法还包括评估第二TIL群的代谢健康的步骤。

在一些实施方式中,该方法还包括评估第二TIL群的表型的步骤。

在一些实施方式中,抗原呈递细胞是同种异体外周血单核细胞。

附图说明

图1:显示实施例1的结果。如表所示,在抗原再刺激快速扩增方案("reREP")之后,TIL显示出其糖酵解呼吸显著增强。SRC=备用呼吸能力。

图2:新鲜的TIL与解冻的TIL的组成的比较。对TIL的TCR $\alpha\beta$ 和CD56染色以界定T细胞和NK群。显示的数据是6个单独TIL的平均值。

图3:记忆表型由CD45RA和CCR7表达来界定。CD4和CD8TIL主要是效应记忆(EM)。这在解冻的TIL中保持不变。每个点都是一个分析的样本。在Wilcoxon配对符号秩检验中没有发现显著差异。

图4:新鲜的TIL与解冻的TIL之间的CD4、CD8、CD4+CD28+和CD8+CD28+频率的Pearson相关性。用上述标志物对细胞进行染色。每个点代表一个在x轴上具有新鲜值并且在y轴上具有解冻值的个体。使用线性回归分析绘制拟合线。

图5:新鲜的TIL与解冻的TIL上的可比较活化标志物。使用Wilcoxon配对符号秩检验发

现新鲜与解冻TIL的活化状态没有显著差异。每个点代表一个分析的样品,并显示为平均值 \pm SEM。

图6:冷冻保存和解冻后LAG-3染色的维持。A:CD8TIL的LAG-3染色。B:新鲜的TIL和解冻的TIL上CD4和CD8群的调节分子的频率%。CD8+TIM-3+和CD8+LAG-3+解冻TIL具有比新鲜TIL更低的%。曼-惠特尼统计检验。

图7:冷冻保存后,用于输注表型的显著稳定的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

图8:散点图显示了reREP TIL的表型特征。Q1显示了19.0%的CD45RA⁺/CCR7⁻;Q2显示了0.066%的CD45RA⁺/CCR7⁺;Q4显示了80.6%的CD45RA⁻/CCR7⁻;以及Q3显示了0.36%的CD45RA⁻/CCR7⁺。

图9:图表和数据显示了reREP TIL的表型特征,在第一次和第二次扩增阶段期间0.08%CD45RA⁺/CCR7⁻;0.03%CD45RA⁺/CCR7⁺;73.97%CD45RA⁻/CCR7⁻;以及25.91%CD45RA⁻/CCR7⁺在第14天、在第一次扩增后但在第二次扩增前。重复ReREP中CM或EM TIL的增殖。使用重复ReREP,测试中枢记忆(CM)TIL和效应记忆(EM)TIL的增殖能力。简而言之,将 1.3×10^6 个后-REP TIL(Post REP TIL)与 1.3×10^7 个PBMC饲养细胞(CFSE标记)、OKT3(30ng/nl)和rhIL-2(3000IU/ml)共培养,培养14天。在第14天,中枢记忆TIL和效应记忆TIL被分别门控对于L/D Aqua⁻/CFSE⁻/TCR α / β ⁻/CD45RA⁻/CCR7⁺和L/D Aqua⁻/CFSE⁻/TCR α / β ⁺/CD45RA⁻/CCR7⁻群并用流式细胞仪进行分类。细胞群的纯度为97%。然后将 1×10^4 个流动分选的CM或EM或未分选的TIL一式三份与 1×10^6 个PBMC饲养细胞、OKT3(30ng/nl)和IL-2(3000IU/ml)培养7天。计数并记录细胞。与效应记忆TIL相比,中枢记忆TIL更具增殖性。我们用更多后-REP TIL细胞系来重复这个实验。

图10A和10B:ReREP期间TIL的表型特征。将细胞关于Aqua⁻/TCR α / β ⁺/CD4⁺或CD8⁺门控以显示中枢记忆TIL(CD45RA⁺CCR7⁺)或效应记忆TIL(CD45RA⁻CCR7⁻)记忆表型。Student t检验用于计算统计学显著性。* $p < 0.05$, ns表示无显著性。

图11:TIL制备过程(在本文中有时称为1C过程)的示例性示意图。

图12:从非黑色素瘤肿瘤成功扩增TIL。数据显示了TIL(CD4⁺/CD8⁺)在非黑色素瘤肿瘤中的分布。

图13:非黑色素瘤TIL表达CD27和CD38,与年轻TIL一致。

图14:活化的TIL偏向效应记忆群。

图15:新鲜的TIL表型与reREP TIL表型。

具体实施方式

一、引言

利用通过快速扩增方案(REP)离体培养的TIL的过继细胞疗法已经在患有黑素瘤的患者中的宿主免疫抑制后产生了成功的过继细胞疗法。目前的输注接受参数依赖于TIL组成的读数(例如CD28、CD8或CD4阳性)以及REP产物的扩增数值倍数和活力。

目前的REP方案很少考虑将被输注到患者体内的TIL的健康状况。T细胞在其从幼稚T细胞到效应T细胞的成熟过程中经历了深刻的代谢转变(参见Chang等,Nat. Immunol. 2016, 17, 364,在此明确地整体并入,特别是对于厌氧和有氧代谢的讨论和标志物)。例如幼稚T细胞依靠线粒体呼吸产生ATP,而成熟、健康的效应T细胞如TIL是高度糖酵解的,依靠有氧糖

酵解提供它们增殖、迁移、活化和抗肿瘤功效所需的生物能量学底物。

先前论文报道,在转移前限制TIL中的糖酵解和促进TIL中的线粒体代谢是期望的,因为严重依赖糖酵解的细胞在过继转移时会遭受营养缺乏,这会导致大部分转移的细胞死亡。因此,本领域教导,促进线粒体代谢可能会促进体内寿命,并且事实上建议在诱导免疫应答之前使用糖酵解抑制剂。参见Chang等(Chang等,Nat. Immunol. 2016, 17 (364), 574-582)。

本发明的优选方面涉及用另外的再刺激方案增强REP的新方法,有时在本文中称为“再刺激快速扩增方案”或“reREP”,与新鲜收获的TIL或解冻的冷冻保存TIL相比,该方法令人惊讶地导致了用于再刺激TIL(本文有时称为“reTIL”)的记忆T细胞亚群(包括中枢记忆(CD45RA⁻CCR7⁺)或效应记忆(CD45RA⁻CCR7⁻)表型)的扩增,和/或糖酵解呼吸的显著增强。换言之,通过对冷冻保存TIL使用reREP程序(即,包括第一次扩增和第二次扩增的程序),患者可以接受高代谢活性的健康TIL,从而产生更有利的结果。

在一些实施方式中,本发明还涉及评价和量化代谢健康的这种增加的方法。因此,本发明提供了使用代谢的一种以上常规评价来检测TIL群的相对健康的方法,包括但不限于糖酵解、氧化磷酸化、备用呼吸能力(SRC)和糖酵解储备的速率和量。

此外,在一些实施方式中,本发明还涉及评价和量化代谢健康的这种增加的方法。因此,本发明提供了使用代谢的一种以上常规评价来检测TIL群的相对健康的方法,包括但不限于糖酵解、氧化磷酸化、备用呼吸能力(SRC)和糖酵解储备的速率和量。

此外,任选的另外评价包括但不限于ATP产生、线粒体质量和葡萄糖摄取。

在一些情况下,如本领域通常已知的,代谢健康增加的reREP细胞群被输注至患者。

二、定义

本文中的“肿瘤浸润淋巴细胞”或“TIL”是指最初作为白细胞获得的细胞群,其已经离开受试者的血流并迁移到肿瘤中。TIL包括但不限于CD8⁺细胞毒性T细胞(淋巴细胞)、Th1和Th17 CD4⁺ T细胞、天然杀伤细胞、树突细胞和M1巨噬细胞。TIL包括原代和次代TIL。“原代TIL”是从本文概述的患者组织样品获得的那些(有时称为“新鲜收获的”),并且“次代TIL”是如本文所讨论的已扩增或增殖的任何TIL细胞群,包括但不限于大量TIL(bulk TIL)、经扩增的TIL(“REP TIL”)以及如本文所讨论的“reREP TIL”。

TIL通常可以通过生物化学使用细胞表面标志物来定义,或通过其渗透肿瘤和影响治疗的能力在功能上来定义。TIL通常可以通过表达以下生物标志物中的一种以上来分类:CD4、CD8、TCR $\alpha\beta$ 、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1和CD25。另外,或者,TIL可以通过其重新引入患者时渗入实体瘤的能力来在功能上定义。TIL还可以通过效价来表征——例如,如果例如干扰素(IFN)的释放大于约50pg/mL、大于约100pg/mL、大于约150pg/mL或大于约200pg/mL,则TIL可被认为是有效的。干扰素可包括干扰素 γ (IFN γ)。

本文的“冷冻保存的TIL”是指在约-150°C至-60°C范围内进行处理和储存的原代、大量或扩增的TIL(REP TIL)。用于冷冻保存的一般方法也在本文其他地方描述,包括在实施例中。为清楚起见,“冷冻保存的TIL”能够与可用作原代TIL来源的冷冻组织样品区分开。

本文中“解冻的冷冻保存的TIL”是指先前被冷冻保存然后被处理以恢复至室温以上温度(包括但不限于细胞培养温度或可以将TIL施用于患者的温度)的TIL群。

本文中“细胞群”(包括TIL)是指许多共有共同特征的细胞。一般而言,群的数量通常为

1×10^6 至 1×10^{10} ,不同的TIL群包含不同的数量。例如,在IL-2存在下,原代TIL的初期生长会得到大约 1×10^8 个细胞的大量TIL群(bulk TIL population)。通常进行REP扩增以提供 1.5×10^9 至 1.5×10^{10} 个细胞用于输注。

通常,TIL最初从患者肿瘤样品(“原代TIL”)获得,然后如本文所述地扩增成更大的群用于进一步操作,任选地冷冻保存,如本文所述再刺激并任选地评价表型和代谢参数作为TIL健康的指示。

通常,收获的细胞悬浮液称为“原代细胞群”或“新鲜收获的”细胞群。

通常,如本文所讨论的,TIL最初通过如本文所讨论的从患者切除的肿瘤获得TIL的原代群(“原代细胞群”或“第一细胞群”)来制备。接着利用用IL-2培养细胞进行初始大量扩增,形成第二细胞群(本文有时称为“大量TIL群”或“第二群”)。

术语“细胞毒性淋巴细胞”包括细胞毒性T(CTL)细胞(包括 $CD8^+$ 细胞毒性T淋巴细胞和 $CD4^+$ T辅助淋巴细胞)、自然杀伤T(NKT)细胞和自然杀伤(NK)细胞。细胞毒性淋巴细胞可包括,例如由肿瘤相关抗原激活和/或用肿瘤特异性嵌合抗原受体或T细胞受体转导的外周血衍生的 α/β TCR阳性或 α/β TCR阳性T细胞,以及肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。

术语“中枢记忆T细胞”是指人细胞中为 $CD45R0^+$ 且组成型表达CCR7(CCR7hi)和CD62L(CD62hi)的T细胞子集。中枢记忆T细胞的表面表型还包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)和IL-15R。中枢记忆T细胞的转录因子包括BCL-6、BCL-6B、MBD2和BMI1。在TCR触发后,中枢记忆T细胞主要分泌IL-2和CD40L作为效应分子。中枢记忆T细胞在血液中的CD4区室中占优势,并且在人体中按比例富集在淋巴结和扁桃体。

术语“效应记忆T细胞”是指人或哺乳动物T细胞的子集,其与中枢记忆T细胞一样,为 $CD45R0^+$,但丧失CCR7的组成型表达(CCR7lo),并且CD62L的表达异质性或低(CD62Llo)。中枢记忆T细胞的表面表型还包括TCR、CD3、CD127(IL-7R)和IL-15R。中枢记忆T细胞的转录因子包括BLIMP1。效应记忆T细胞在抗原刺激后迅速分泌高水平的炎性细胞因子,包括干扰素- γ 、IL-4和IL-5。效应记忆T细胞在血液的CD8区室中占优势,并且在人体中在肺、肝和肠中按比例富集。 $CD8^+$ 效应记忆T细胞携带大量的穿孔素。术语“封闭系统”指的是对外部环境封闭的系统。适用于细胞培养方法的任何封闭系统均可用于本发明的方法。封闭系统包括例如但不限于封闭的G容器。一旦肿瘤碎片被添加到封闭系统中,系统就不会向外部环境开放,直至TIL准备好施用于患者。

术语“外周血单核细胞”和“PBMC”是指具有圆形细胞核的外周血细胞,包括淋巴细胞(T细胞、B细胞、NK细胞)和单核细胞。优选地,外周血单核细胞是同种异体外周血单核细胞。

术语“快速扩增”意指在一周的时间内抗原特异性TIL的数量增加至少约3倍(或4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍),更优选在一周的时间内增加至少约10倍(或20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍或90倍),或者最优选在一周的时间内增加至少约100倍。本文描述了许多快速扩增方案。

在一些实施方式中,本公开的方法还包括“pre-REP”阶段,在该阶段,来自肿瘤组织的肿瘤组织或细胞在标准实验室培养基(包括但不限于RPMI)中生长,并用诸如经辐照的饲养细胞和抗CD3抗体的试剂处理以达到期望的效果,例如,TIL数量的增加和/或含有所需细胞表面标志物或其他结构、生物化学或功能特征的细胞群的富集。pre-REP阶段可以使用实验室级试剂(假设实验室级试剂在后期REP阶段被稀释),使得更容易采用替代策略来促进TIL

生产。因此,在一些实施方式中,所公开的TLR激动剂和/或肽或肽模拟物可以在pre-REP阶段期间被包含在培养基中。在一些实施方式中,pre-REP阶段培养物可包括IL-2。

本发明的优选方面涉及用另外的再刺激方案增强REP的新方法,有时在本文中称为“再刺激快速扩增方案”或“reREP”,与新鲜收获的TIL或解冻的冷冻保存的TIL相比,该方法令人惊讶地导致了用于再刺激TIL(有时在本文中称为“reTIL”)的记忆T细胞亚群(包括记忆效应T细胞亚群)的扩增,和/或糖酵解呼吸的显著增强。换言之,通过对冷冻保存的TIL使用reREP程序,患者可以接收高代谢活性的健康TIL,从而产生更有利的结果。此类再刺激方案,在本文中也称为细胞群的另外“扩增”,在本文中将进一步详细描述。

本文用于描述破坏肿瘤的方法的术语“碎片化”(fragmenting)、“碎片化”(fragment)和“经碎片化”(fragmented)包括机械破碎方法,例如破碎、切片、分割和粉碎肿瘤组织,以及任何其他破坏肿瘤组织的物理结构的方法。术语“体内”是指发生在受试者体内的事件。

术语“体外”是指在受试者体外发生的事件。体外检测包括使用活细胞或死细胞的基于细胞的检测,并且还可以包括不使用完整细胞的无细胞检测。

术语“抗CD3抗体”是指抗体或其变体,例如,单克隆抗体和包括针对成熟T细胞的T细胞抗原受体中的CD3受体的人、人源化、嵌合或鼠抗体。抗CD3抗体包括OKT-3(也称为muromonab)和UCHT-1。其他抗CD3抗体包括例如otelixizumab、teplizumab和visilizumab。

术语“OKT-3”(在本文中也称为“OKT3”)是指单克隆抗体或其生物仿制药或其变体,包括针对成熟T细胞的T细胞抗原受体中的CD3受体的人、人源化、嵌合或鼠抗体,并且包括市售形式如OKT-3(30ng/mL,MACS GMP CD3纯,Miltenyi Biotech,Inc.,San Diego,CA,USA)和muromonab或其变体、保守氨基酸取代、糖型(glycoforms)或生物仿制药。Muromonab的重链和轻链的氨基酸序列在表1中给出(SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2)。能够产生OKT-3的杂交瘤保藏在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection),并且其分配的ATCC登录号为CRL 8001。能够产生OKT-3的杂交瘤也保藏在欧洲认证细胞培养物保藏中心(ECACC)中,并且其分配的目录号为86022706。

表1 Muromonab的氨基酸序列

识别码	序列(单字母氨基酸符号)
SEQ ID NO: 1 Muromonab 重链	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTNY 60 NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA 120 KTTAPSVYPL APVCGGTTGS SVTLGCLVKG YFPEPVTITW NSGSLSSGVH TPAVLQSDL 180 YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKEPRP KSCDKTHTCP PCPAPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIK KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 450
SEQ ID NO: 2 Muromonab 轻链	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH 60 FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS 120 SEQLTSGGAS VVCFLNRFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLTL 180 TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKSFNR NEC 213

术语“IL-2”(在本文中也称为“IL2”)是指称为白细胞介素-2的T细胞生长因子,包括所

有形式的IL-2,包括人和哺乳动物形式,保守氨基酸取代、糖型、生物仿制药及其变体。IL-2描述于例如Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88和Malek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79,其公开内容在此引入作为参考。适用于本发明的重组人IL-2的氨基酸序列在表2中给出(SEQ ID NO:3)。例如,术语IL-2包括人类重组形式的IL-2,例如,阿地白介素(PROLEUKIN,可从多个供应商商购,每个单独使用的小瓶2200万IU),以及可从美国新罕布什尔州朴茨茅斯的CellGenix, Inc. (CELLGRO GMP)或美国新泽西州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd. (目录号CYT-209-b)商购的重组形式的IL-2和其他供应商的其他商业等价物。阿地白介素(des-alanyl-1,丝氨酸-125人IL-2)是IL-2的非糖基化人重组形式,分子量约为15kDa。适用于本发明的阿地白介素的氨基酸序列在表2中给出(SEQ ID NO:4)。术语IL-2还包括如本文所述的聚乙二醇化形式的IL-2,包括聚乙二醇化的IL2前药NKTR-214,可从美国加利福尼亚州南旧金山的Nektar Therapeutics公司商购。适用于本发明的NKTR-214和聚乙二醇化IL-2描述于美国专利申请公开号US2014/0328791A1和国际专利申请公开号W02012/065086A1中,其公开内容在此引入作为参考。适用于本发明的缀合的IL-2的替代形式描述于美国专利4,766,106、5,206,344、5,089,261和4,902,502中,其公开内容在此引入作为参考。适用于本发明的IL-2制剂描述于美国专利号6,706,289中,其公开内容在此引入作为参考。

表2白细胞介素的氨基酸序列

识别码	序列(单字母氨基酸符号)	
SEQ ID NO: 3 重组人 IL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EELKPLEEV LNLAQSKNFH LRPRDLISNI NVIVLELKGES ETTFMCEYAD ETATIVEFLN RWITFCQSII STLT	60 120 134
SEQ ID NO: 4 阿地白介素	PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
SEQ ID NO: 5 重组人 IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKI MREKYSKCSS	60 120 130
SEQ ID NO: 6 重组人 IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KQYESVLMVS IDQLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMFLFRA ARKLRQFLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTTL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 153
SEQ ID NO: 7 重组人 IL-15 (rhIL-15)	MNWWNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLELQV ISLESGDASI HDTVENLIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE ELEEKNIKEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
SEQ ID NO: 8 重组人 IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMRL QLIDIVDQLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERINVSI KKLKRKPPST NAGRRQKHRL TCPSCDSYEK KPPKEFLERF KSLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

术语“IL-4”(在本文中也称为“IL4”)是指称为白细胞介素4的细胞因子,其由Th2T细胞和嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞产生。IL-4调节幼稚辅助性T细胞(Th0细胞)向Th2T细胞的分化。Steinke和Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70。在被IL-4激活后, Th2T细胞随后在正反馈环中产生另外的IL-4。IL-4还刺激B细胞增殖和II类MHC表达,并诱导B细胞转换为IgE和IgG1表达。适用于本发明的重组人IL-4可从多个供应商商购,包括美国新泽西

州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd. (目录号CYT-211) 和美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的ThermoFisher Scientific, Inc. (人IL-15重组蛋白, 目录号Gibco CTP0043)。适用于本发明的重组人IL-4的氨基酸序列在表2中给出 (SEQ ID NO:5)。

术语“IL-7” (在本文中也称为“IL7”) 是指称为白细胞介素7的糖基化组织衍生细胞因子, 其可以从基质细胞和上皮细胞以及树突状细胞中获得。Fry和Mackall, Blood 2002, 99, 3892-904。IL-7可以刺激T细胞的生长。IL-7与IL-7受体结合, IL-7受体是由IL-7受体 α 和常见 γ 链受体 (common gamma chain receptor) 组成的异二聚体, 其在一系列信号中对胸腺内的T细胞发育和外周存活具有重要作用。适用于本发明的重组人IL-4可从多个供应商商购, 包括美国新泽西州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd. (目录号CYT-254) 和美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的ThermoFisher Scientific, Inc. (人IL-15重组蛋白, 目录号Gibco PHC0071)。适用于本发明的重组人IL-7的氨基酸序列在表2中给出 (SEQ ID NO:6)。

术语“IL-15” (在本文中也称为“IL15”) 是指称为白细胞介素-15的T细胞生长因子, 并且包括所有形式的IL-2, 包括人和哺乳动物形式, 保守氨基酸取代、糖型、生物仿制药及其变体。IL-15描述于例如Fehniger和Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32中, 其公开内容在此引入作为参考。IL-15与IL-2共享 β 和 γ 信号传导受体亚单位。重组人IL-15是单个非糖基化多肽链, 含有114个氨基酸 (和N-末端甲硫氨酸), 分子量为12.8kDa。重组人IL-15可从多个供应商商购, 包括美国新泽西州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd. (目录号CYT-230-b) 和美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的ThermoFisher Scientific, Inc. (人IL-15重组蛋白, 目录号34-8159-82)。适用于本发明的重组人IL-15的氨基酸序列在表2中给出 (SEQ ID NO:7)。

术语“IL-21” (在本文中也称为“IL21”) 是指称为白细胞介素-21的多效细胞因子蛋白, 并且包括所有形式的IL-21, 包括人和哺乳动物形式, 保守氨基酸取代、糖型、生物仿制药及其变体。IL-21描述于例如Spolski和Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95, 其公开内容在此引入作为参考。IL-21主要由自然杀伤T细胞和活化的人CD4⁺T细胞产生。重组人IL-21是单个非糖基化多肽链, 含有132个氨基酸, 分子量为15.4kDa。重组人IL-21可从多个供应商商购, 包括美国新泽西州东布朗士维克的ProSpec-Tany TechnoGene Ltd. (目录号CYT-408-b) 和美国马萨诸塞州沃尔瑟姆的ThermoFisher Scientific, Inc. (人IL-21重组蛋白, 目录号14-8219-80)。适用于本发明的重组人IL-21的氨基酸序列在表2中给出 (SEQ ID NO:8)。

当指示“抗肿瘤有效量”、“肿瘤抑制有效量”或“治疗量”时, 待施用的本发明组合物的精确量可由医生确定, 考虑年龄、体重、肿瘤大小、感染或转移程度以及患者 (受试者) 状况的个体差异。通常可以说, 包含本文所述的经遗传修饰的细胞毒性淋巴细胞的药物组合物可以 10^4 至 10^{11} 个细胞/kg体重 (例如 10^5 至 10^6 、 10^5 至 10^{10} 、 10^5 至 10^{11} 、 10^6 至 10^{10} 、 10^6 至 10^{11} 、 10^7 至 10^{11} 、 10^7 至 10^{10} 、 10^8 至 10^{11} 、 10^8 至 10^{10} 、 10^9 至 10^{11} 或 10^9 至 10^{10} 个细胞/kg体重) 的剂量施用, 包括这些范围内的所有整数值。经遗传修饰的细胞毒性淋巴细胞组合物也可以这些剂量多次给药。经遗传修饰的细胞毒性淋巴细胞可以通过使用免疫疗法中通常已知的输注技术来施用 (参见例如Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988)。通过监测患者的疾病迹象并相应地调整治疗, 医学领域的技术人员可以容易地确定特定患者的最佳剂量和治疗方案。

术语“恶性血液病 (hematological malignancy)”是指造血和淋巴组织(包括但不限于血液、骨髓、淋巴结和淋巴系统的组织)的哺乳动物癌症和肿瘤。恶性血液病也称为“液体肿瘤”。恶性血液病包括但不限于急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞淋巴瘤(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、急性髓性白血病(AML)、慢性粒细胞白血病(CML)、急性单核细胞白血病(AMoL)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。术语“B细胞恶性血液病”是指影响B细胞的恶性血液病。

术语“实体瘤”是指通常不包含囊肿或液体区域的异常组织块。实体瘤可以是良性或恶性的。术语实体瘤癌症是指恶性、肿瘤性或癌性实体瘤。实体瘤癌症包括但不限于肉瘤、恶性上皮肿瘤和淋巴瘤,例如肺癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、直肠癌和膀胱癌。实体瘤的组织结构包括相互依赖的组织隔室,包括实质(癌细胞)和支持的基质细胞(癌细胞分散在其中并且可以提供支持的微环境)。

术语“液体肿瘤”是指本质上是流体的异常细胞团。液体肿瘤癌症包括但不限于白血病、骨髓瘤和淋巴瘤,以及其他血液恶性肿瘤。从液体肿瘤获得的TIL在本文中也可称为骨髓浸润淋巴细胞(MIL)。

如本文所用,术语“微环境”可以指整个实体或血液肿瘤微环境,或指微环境内的单个细胞的亚群。如本文所用,肿瘤微环境是指“细胞、可溶性因子、信号分子、细胞外基质,以及促进肿瘤转化、支持肿瘤生长和侵袭、保护肿瘤免受宿主免疫、促进治疗抵抗力并为显性转移灶的繁殖提供利基的机制线索”的复杂混合物,如Swartz等Cancer Res., 2012, 72, 2473中所述。尽管肿瘤表达应被T细胞识别的抗原,但由于微环境的免疫抑制,免疫系统很少清除肿瘤。

在一个实施方式中,本发明包括用rTIL群治疗癌症的方法,其中,在输注根据本发明的rTIL之前用非清髓性化学疗法预处理患者。在一些实施方式中,rTIL群可以提供有eTil群,其中,在输注根据本发明的rTIL和eTil之前,用非清髓性化疗进行预处理患者。在一个实施方式中,非清髓性化学疗法是环磷酰胺60mg/kg/天、持续2天(rTIL输注前第27和第26天)和氟达拉滨25mg/m²/天、持续5天(rTIL输注前第27至第23天)。在一个实施方式中,在根据本发明的非清髓性化学疗法和rTIL输注(在第0天)后,患者每8小时以720,000IU/kg静脉输注IL-2至生理耐受。

实验发现表明,过继转移肿瘤特异性T淋巴细胞之前的淋巴细胞耗竭(lymphodepletion)通过消除调节性T细胞和免疫系统的竞争元件(“细胞因子沉降”)而在增强治疗功效中起关键作用。因此,本发明的一些实施方式在引入本发明的rTIL之前对患者使用淋巴耗竭步骤(有时也称为“免疫抑制调节”)。

如本文所用,术语“共同施用”、“共同给药”、“与...组合施用”、“与...组合给药”、“同时”和“共同”包括向受试者施用两种以上活性药物成分(在本发明的一个优选实施方式中,例如至少一种钾通道激动剂与多种TIL组合),使得活性药物成分和/或它们的代谢物同时存在于受试者体内。共同施用包括同时施用不同的组合物,在不同时间施用不同的组合物,或施用其中存在两种以上活性药物成分的组合物。同时施用不同的组合物和施用其中存在两种药剂的组合物是优选的。

术语“有效量”或“治疗有效量”是指如本文所述的化合物或化合物组合的量足以实现预期应用,包括但不限于疾病治疗。治疗有效量可根据预期应用(体外或体内)或所治疗的

受试者和疾病状况(例如受试者的体重、年龄和性别)、疾病状况的严重程度或给药方式而变化。该术语还适用于将在靶细胞中诱导特定应答的剂量(例如血小板粘附和/或细胞迁移的减少)。具体剂量将取决于所选择的具体化合物、要遵循的给药方案、化合物是否与其他化合物联合给药、给药时间、给药组织以及携带化合物的物理递送系统。

术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”、“治疗(treat)”等是指获得所需的药理学和/或生理学作用。就完全或部分预防疾病或其症状而言,该作用可以是预防性的,和/或就部分或完全治愈疾病和/或由疾病引起的不良反应而言,该作用可以是治疗性的。如本文所用,“治疗”包括哺乳动物,特别是人类中疾病的任何治疗,包括:(a)在可能易患该疾病但尚未被诊断为患有该疾病的受试者中防止疾病发生;(b)抑制疾病,即阻止其发展或进展;以及(c)缓解疾病,即引起疾病消退和/或缓解一种以上疾病症状。“治疗”还意味着包括递送药剂以提供药理学作用,即使在没有疾病或病症的情况下也是如此。例如,“治疗”包括递送可在没有疾病的情况下引发免疫应答或赋予免疫力的组合物,例如在疫苗的情况下。

当涉及核酸或蛋白质的部分使用时,术语“异源”表示核酸或蛋白质包含两个以上在自然界中彼此不存在相同关系的子序列。例如核酸通常是重组产生的,具有来自无关基因的两个以上被排列以产生新的功能性核酸的序列,例如,来自一个来源的启动子和来自另一个来源的编码区,或来自不同来源的编码区。类似地,异源蛋白质表明该蛋白质包含两个以上在自然界中彼此不存在相同关系的子序列(例如融合蛋白)。

在两个以上核酸或多肽的情况下,术语“序列同一性”,“百分比同一性”和“序列百分比同一性”(或其同义词,例如“99%相同”)指,当比较和比对(如果需要的话,引入缺口)以获得最大对应性时,两个以上序列或子序列相同或具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基,不考虑任何保守氨基酸取代作为序列同一性的一部分。可以使用序列比较软件或算法或通过目视检查,来测量同一性百分比。本领域已知各种算法和软件可用于获得氨基酸或核苷酸序列的比对。确定序列同一性百分比的合适程序包括,例如可从美国政府的国家生物技术信息中心BLAST网站获得的BLAST程序套件。可以使用BLASTN或BLASTP算法进行两个序列之间的比较。BLASTN用于比较核酸序列,而BLASTP用于比较氨基酸序列。ALIGN、ALIGN-2(加利福尼亚州南旧金山Genentech)或可从DNASTAR获得的MegAlign是可用于比对序列的其他公共可用软件程序。本领域技术人员可以通过特定的比对软件确定用于最大比对的适当参数。在某些实施例中,使用比对软件的默认参数。

如本文所用,术语“变体”包括但不限于如下的抗体或融合蛋白:其通过在参考抗体的氨基酸序列内或附近的某些位置处的一个以上取代、缺失和/或添加而包含与参考抗体的氨基酸序列不同的氨基酸序列。与参考抗体的氨基酸序列相比,变体在其氨基酸序列中可包含一个以上保守取代。保守取代可涉及例如取代相似带电荷或不带电荷的氨基酸。该变体保留了特异性结合参考抗体的抗原的能力。术语“变体”还包括聚乙二醇化抗体或蛋白质。

术语“体内”是指发生在受试者体内的事件。

术语“体外”是指发生在受试者体外的事件。体外检测包括使用活细胞或死细胞的基于细胞的检测,并且还可以包括不使用完整细胞的无细胞检测。

术语“快速扩增”意指在一周的时间内抗原特异性TIL的数量增加至少约3倍(或4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍),更优选在一周的时间内增加至少约10倍(或20倍、30倍、40倍、50

倍、60倍、70倍、80倍或90倍),或者最优选在一周的时间内增加至少约100倍。下面概述了许多快速扩增方案。

三、冷冻保存的TIL的再刺激

如本文所讨论的,本发明涉及冷冻保存的TIL的再刺激以在移植入患者之前增加其代谢活性并因此增加相对健康,以及测试所述代谢健康的方法。如本文一般概述的,TIL通常取自患者样品并在移植入患者之前进行操作以扩大其数量。在一些实施方式中,TIL可任选地进行如下所述的遗传操作,然后冷冻保存。一旦解冻后,在输注到患者体内之前再次刺激它们以增加其代谢作用。

以下标记A、B、C等的“步骤”参考图11。下述的和图11中的步骤排序是示例性的,本申请和本文公开的方法预期步骤的任何组合或顺序,以及附加步骤、步骤的重复和/或步骤的省略。

A. 步骤A: 获得患者肿瘤样本

通常,TIL最初从患者肿瘤样品获得(“原代TIL”),然后如本文所述地扩增成更大的群用于进一步操作,任选地如本文所概述的冷冻保存、再刺激,并任选地评估表型和代谢参数作为TIL健康的指示。

可以使用本领域已知的方法获得患者肿瘤样品,通常通过手术切除、针吸活检或用于获得含有肿瘤和TIL细胞混合物的样品的其他手段。通常,肿瘤样品可以来自任何实体瘤,包括原发性肿瘤、侵袭性肿瘤或转移性肿瘤。肿瘤样品也可以是液体肿瘤,例如从血液恶性肿瘤获得的肿瘤。实体瘤可以是任何癌症类型,包括但不限于乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、结肠直肠癌、肺癌、脑癌、肾癌、胃癌和皮肤癌(包括但不限于鳞状细胞癌、基底细胞癌和黑色素瘤)。在一些实施方式中,有用的TIL获自恶性黑色素瘤肿瘤,因为据报道其具有特别高水平的TIL。

术语“实体瘤”是指通常不包含囊肿或液体区域的异常组织块。实体瘤可以是良性或恶性的。术语实体瘤癌症是指恶性、肿瘤性或癌性实体瘤。实体瘤癌症包括但不限于肉瘤、恶性上皮肿瘤和淋巴瘤,例如肺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、直肠癌和膀胱癌。在一些实施方式中,癌症选自宫颈癌、头颈癌、成胶质细胞瘤、卵巢癌、肉瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌。实体瘤的组织结构包括相互依赖的组织隔室,包括实质(癌细胞)和支持的基质细胞(癌细胞分散在其中并且可以提供支持的微环境)。

术语“恶性血液病”是指造血和淋巴组织(包括但不限于血液、骨髓、淋巴结和淋巴系统的组织)的哺乳动物癌症和肿瘤。恶性血液病也称为“液体肿瘤”。恶性血液病包括但不限于急性淋巴细胞白血病(ALL)、慢性淋巴细胞淋巴瘤(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、急性髓性白血病(AML)、慢性粒细胞白血病(CML)、急性单核细胞白血病(AMoL)、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤。术语“B细胞恶性血液病”是指影响B细胞的恶性血液病。

一旦获得肿瘤样品,通常使用锐利的工具切碎为 1mm^3 至约 8mm^3 的小碎片,其中约 $2\text{--}3\text{mm}^3$ 是特别有用的。使用酶促肿瘤消化液从这些碎片培养TIL。这种肿瘤消化液可以通过在酶培养基(例如Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640缓冲液、 2mM 谷氨酸盐、 10mcg/mL 庆大霉素、 30U/mL DNase和 1.0mg/mL 胶原酶)中孵育然后机械解离(例如使用组织解离剂)来产生。肿瘤消化液可以通过将肿瘤置于酶培养基中并将肿瘤机械解离约1分钟来产生,然

后在37℃、5%CO₂中孵育30分钟,然后在上述条件下进行机械解离和孵育的重复循环,直至仅存在小的组织碎片。在该过程结束时,如果细胞悬浮液含有大量红细胞或死细胞,则可以使用FICOLL分支亲水性多糖进行密度梯度分离以除去这些细胞。可以使用本领域已知的替代方法,例如美国专利申请公开号2012/0244133A1中描述的那些,其公开内容通过引用并入本文。任何前述方法都可以用于本文所述扩增TIL的方法或治疗癌症的方法的任何实施方式中。

在一些实施方式中,碎片化包括物理碎片化,包括例如切碎和消化。在一些实施方式中,碎片化是物理碎片化。在一些实施方式中,碎片化是切碎。在一些实施方式中,碎片化是通过消化。在一些实施方式中,可通过酶促肿瘤消化液和从患者获得的肿瘤碎片来对TIL进行初始培养。

在一些实施方式中,当肿瘤是实体瘤时,在获得肿瘤样品后肿瘤经历物理破碎,例如在图11的步骤A中。在一些实施方式中,碎片化发生在冷冻保存之前。在一些实施方式中,碎片化发生在在冷冻保存之后。在一些实施方式中,碎片化发生在获得肿瘤之后并且没有任何冷冻保存的情况下。在一些实施方式中,肿瘤是碎片化的,并且将2、3或4个片段或碎片放置在每个容器中用于第一次扩增。在一些实施方式中,肿瘤是碎片化的,并且每个容器中放置3或4个碎片或片用于第一次扩增。在一些实施方式中,肿瘤是碎片化的,且每个容器中放置4个碎片或片用于第一次扩增。

在一些实施方式中,TIL获自肿瘤碎片。在一些实施方式中,通过锐利切碎获得肿瘤碎片。在一些实施方式中,肿瘤碎片在约1mm³和10mm³之间。在一些实施方式中,肿瘤碎片在约1mm³和8mm³之间。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约1mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约2mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约3mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约4mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约5mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约6mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约7mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约8mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约9mm³。在一些实施方式中,肿瘤碎片为约10mm³。

在一些实施方式中,TIL获自肿瘤消化液。在一些实施方式中,肿瘤消化液通过如下产生:在酶培养基中孵育,酶培养基例如但不限于RPMI 1640、2mM GlutaMAX、10mg/mL庆大霉素、30U/mL DNase和1.0mg/mL胶原酶,随后机械解离(GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA)。在将肿瘤置于酶培养基中后,可以将肿瘤机械解离约1分钟。然后将溶液在37℃、5%CO₂中孵育30分钟,然后再次机械破碎约1分钟。在37℃、5%CO₂中再次孵育30分钟后,可以第三次机械破坏肿瘤约1分钟。在一些实施方式中,在第三次机械破碎后,如果存在大块组织,则对样品施加1或2次另外的机械解离,在37℃、5%CO₂中孵育或不孵育另外30分钟。在一些实施方式中,在最终孵育结束时,如果细胞悬浮液含有大量红细胞或死细胞,则可以使用Ficoll进行密度梯度分离以除去这些细胞。

在一些实施方式中,在第一次扩增步骤之前收获的细胞悬浮液称为“原代细胞群”或“新鲜收获的”细胞群。

在一些实施方式中,细胞可以在收获样品后任选地冷冻并在进入步骤B之前冷冻储存,这将在下面进一步详细描述。

B. 步骤B: 第一次扩增

在一些实施方式中,可以使用初始大量TIL扩增步骤(例如,如图11所示的步骤B或第一

次扩增步骤;这可以包括称为preREP的扩增步骤),来进行TIL的第一次扩增(也称为第一次扩增或第一次TIL扩增),然后进行如下和于此所述的第二次扩增步骤(例如,如图11所示的步骤D;这可以包括所谓的快速扩增方案(REP)步骤作为示例),然后进行任选的冷冻保存(例如,如图11所示,在步骤D之后),然后进行如下和于此所述的另外的第二次扩增(例如,如图11所示的第二个步骤D,其可以包括有时被称为再刺激REP步骤的步骤)。从该方法获得的TIL可以任选地如本文所述地表征表型特征和代谢参数。在一些实施方式中,TIL在第一次扩增后被冷冻(即冷冻保存)(例如,如图11所示的步骤B)并储存直至表型选择,然后在进行一个或多个第二次扩增步骤之前解冻(例如,根据如图11所示的步骤D进行一次或多次扩增)。

在一些实施方式中,其中细胞在从肿瘤样品获得后被冷冻(例如,如图11所示的步骤A期间),在第一次扩增之前将细胞解冻(例如,如图11所示的步骤B)。

在TIL培养物在24孔板中开始的实施方式中,例如,使用Costar 24孔细胞培养簇、平底(Corning Incorporated, Corning, NY),每个孔可以接种2mL具有 1×10^6 个肿瘤消化细胞或一个肿瘤碎片的含IL-2(6000IU/mL;Chiron Corp., Emeryville, CA)完全培养基(CM)。在一些实施方式中,肿瘤碎片在约 1mm^3 和 10mm^3 之间。

在制备肿瘤碎片后,在有利于TIL在肿瘤和其它细胞上生长的条件下,在含有IL-2的血清中培养所得细胞(即碎片)。在一些实施方式中,肿瘤消化液在含有灭活的人AB血清(或在一些情况下,如本文所述,在aAPC细胞群存在下)和6000IU/mL IL-2的培养基的2mL孔中孵育。将该原代细胞群培养一段时间,通常为10至14天,产生大量TIL群,通常约 1×10^8 个大量TIL细胞。在一些实施方式中,第一次扩增期间的生长培养基包含IL-2或其变体。在一些实施方式中,IL是重组人IL-2(rhIL-2)。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有 20×10^6 IU/mg至 30×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有 20×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有 25×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施方式中,1mg小瓶的IL-2储备溶液具有 30×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为 4×10^6 IU/mg至 8×10^6 IU/mg IL-2。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为 5×10^6 IU/mg至 7×10^6 IU/mg IL-2。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为 6×10^6 IU/mg IL-2。在一些实施方式中,如实施例4中所述制备IL-2储备溶液。在一些实施方式中,第一扩增培养基包含约10,000IU/mL的IL-2,约9,000IU/mL的IL-2,约8,000IU/mL的IL-2,约7,000IU/mL IL-2,约6000IU/mL IL-2或约5,000IU/mL IL-2。在一些实施方式中,第一扩增培养基包含约9,000IU/mL的IL-2至约5,000IU/mL的IL-2。在一些实施方式中,第一扩增培养基包含约8,000IU/mL的IL-2至约6,000IU/mL的IL-2。在一些实施方式中,第一扩增培养基包含约7,000IU/mL的IL-2至约6,000IU/mL的IL-2。在一些实施方式中,第一扩增培养基包含约6,000IU/mL的IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-2。在一些实施方式中,细胞培养基包含约3000IU/mL的IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含约1000IU/mL,约1500IU/mL,约2000IU/mL,约2500IU/mL,约3000IU/mL,约3500IU/mL,约4000IU/mL,约4500IU/mL,约5000IU/mL,约5500IU/mL,约6000IU/mL,约6500IU/mL,约7000IU/mL,约7500IU/mL,或约8000IU/mL的IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含1000至2000IU/mL,2000至3000IU/mL,3000至4000IU/mL,4000至5000IU/mL,5000至6000IU/mL,6000至7000IU/mL,7000至8000IU/mL,或8000IU/mL IL-2。

在一些实施方式中,第一次扩增的培养基被称为“CM”(培养基的缩写)。在一些实施方式中,将其称为CM1(培养基1)。在一些实施方式中,CM由具有GlutaMAX的RPMI1640组成,补充有10%人AB血清、25mM HEPES和10mg/mL庆大霉素。在具有40mL容量和10cm²透气性硅底的透气性烧瓶(例如G-Rex10;Wilson Wolf Manufacturing,New Brighton,MN)中开始培养的实施方式中(图1),每个烧瓶在含有IL-2的10-40mL CM中装载 10×10^6 至 40×10^6 个活肿瘤消化细胞或5至30个肿瘤碎片。将G-Rex10和24孔板在37°C、5%CO₂的潮湿培养箱中培养,培养开始后5天,取出一半培养基,换上新鲜的CM和IL-2,并在第5天后,每2-3天更换一半的培养基。在一些实施方式中,CM是实施例中描述的CM1,参见实施例5。在一些实施方式中,第一次扩增发生在初始细胞培养基或第一细胞培养基中。在一些实施方式中,初始细胞培养基或第一细胞培养基包含IL-2。

在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行11天,12天,13天,14天,15天,16天,17天,18天,19天,20天或21天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行11天至21天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行12天至21天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行13天至21天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行14天至21天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行15天至21天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行16天至21天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行17天至21天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行18天至21天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行19天至21天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行20天至21天。在一些实施方式中,第一次TIL扩增可以进行21天。

C. 步骤C: 第一次扩增向第二次扩增的转变

在一些实施方式中,储存从第一次扩增(例如如图11中所示的步骤B)获得的TIL直至进行表型选择。在一些实施方式中,在第二次扩增之前,第一次扩增之后冷冻保存从第一次扩增获得的TIL。在一些实施方式中,TIL被冷冻保存,作为第一次扩增向第二次扩增转变的部分。例如,在一些实施方式中,如图11所示,在步骤B之后和步骤D之前冷冻保存TIL。在一些实施方式中,将TIL冷冻保存并解冻,作为第一次扩增向第二次扩增转变的部分。例如在一些实施方式中,TIL在步骤B之后冷冻保存,然后在进行步骤D之前解冻(如图11中所提供)。在一些实施方式中,从第一次扩增向第二次扩增的转变发生在从发生碎片化起约22天,23天,24天,25天,26天,27天,28天,29天或30天。在一些实施方式中,从第一次扩增到第二次扩增的转变发生在从发生碎片化起约22天至30天。在一些实施方式中,从第一次扩增到第二次扩增的转变发生在从发生碎片化起约24天至30天。在一些实施方式中,从第一次扩增到第二次扩增的转变发生在从发生碎片化起约26天至30天。在一些实施方式中,从第一次扩增到第二次扩增的转变发生在从发生碎片化起约28天至30天。在一些实施方式中,从第一次扩增到第二次扩增的转变发生在从发生碎片化起约30天。

D. 步骤D: 第二次扩增

在一些实施方式中,TIL的第二次扩增或第二次TIL扩增(其可包括有时称为REP的扩增)可使用本领域技术人员已知的任何TIL烧瓶或容器进行。在一些实施方式中,第二次TIL扩增可以进行14天,15天,16天,17天,18天,19天,20天,21天或22天。在一些实施方式中,第二次TIL扩增可进行约14天至约22天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可进行约14天至约20天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可进行约14天至约18天。在一些实施方式中,第二

TIL扩增可进行约14天至约16天。在一些实施方式中,第二TIL扩增可进行约14天。

在一些实施方式中,第二次扩增发生在经补充的细胞培养基中。在一些实施方式中,经补充的细胞培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞。在一些实施方式中,第二细胞培养基包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC;也称为抗原呈递饲养细胞)。

在一些实施方式中,TIL的第二次扩增(其中可以包括称为REP的扩增)可以使用如前所述的T-175烧瓶和透气袋(Tran KQ,Zhou J,Durflinger KH等2008,J Immunother.,31:742-751和Dudley ME,Wunderlich JR,Shelton TE等2003,J Immunother.,26:332-342)或透气性G-Rex烧瓶进行。在一些实施方式中,使用烧瓶进行第二次扩增。在一些实施方式中,使用透气性G-Rex烧瓶进行第二次扩增。对于使用T-175烧瓶的TIL第二次扩增,将约 1×10^6 TIL悬浮在约150mL培养基中,并将其加入各个T-175烧瓶中。将TIL与经辐照的(50Gy)作为“饲养”细胞的同种异体PBMC以1:100的比例培养,并将细胞在CM和AIM-V培养基(50/50培养基)的1:1混合物中培养,补充有3000IU/mL的IL-2和30ng/mL的抗CD3。将T-175烧瓶在37°C、5%CO₂中温育。在一些实施方式中,进入第二次扩增5天后,使用具有3000IU/mL IL-2的50/50培养基更换一半的培养基。在一些实施方式中,在第7天,将来自2个T-175烧瓶的细胞合并并在3L袋中,并将300mL含有5%人AB血清的AIM-V和3000IU/mL的IL-2加入到300mL TIL悬浮液中。可以每天或每两天对每个袋中的细胞数进行计数,并且可以添加新鲜培养基以使细胞计数保持在约 0.5×10^6 至约 2.0×10^6 个细胞/mL。

在一些实施方式中,TIL的第二次扩增(其可包括称为REP的扩增)可在容量为500mL、具有100cm²透气硅底部的透气性烧瓶(G-Rex 100,可从Wilson Wolf Manufacturing Corporation,New Brighton,MN,USA商购)中进行(图1),将约 5×10^6 或 10×10^6 TIL与经辐照的同种异体PBMC以1:100的比例在400mL 50/50培养基中培养,补充有3000IU/mL的IL-2和30ng/mL的抗CD3(OKT3)。G-Rex100烧瓶可在37°C、5%CO₂中孵育。在一些实施方式中,进入第二次扩增5天后,取出250mL上清液置于离心瓶中并以1500rpm(491×g)离心10分钟。然后用150mL含有5%人AB血清、3000IU/mL IL-2的新鲜培养基再悬浮TIL沉淀物,并将其加回到原G-Rex100烧瓶中。在TIL在G-Rex100烧瓶中连续扩增的实施方式中,在第7天,将各个G-Rex100中的TIL悬浮在各个烧瓶中存在的300mL培养基中,并将细胞悬浮液分成三个100mL等分试样,其可用于接种三个G-Rex100烧瓶。然后可以向每个烧瓶中加入150mL含有5%人AB血清和3000IU/mL IL-2的AIM-V。G-Rex100烧瓶可以在37°C、5%CO₂中孵育,4天后进行第二次扩增,可以在每个G-Rex100烧瓶中加入150mL含有3000IU/mL IL-2的AIM-V。在一些实施方式中,在培养的第14天收获细胞。

在一些实施方式中,TIL的第二次扩增(其可包括称为REP的扩增)可在透气性容器中进行。例如,在白细胞介素-2(IL-2)或白细胞介素-15(IL-15)存在下,使用非特异性T细胞受体刺激可以快速扩增TIL。在一个实施方式中,使用约 1×10^9 至约 1×10^{11} 个抗原呈递饲养细胞扩增TIL的数量。非特异性T细胞受体刺激可包括,例如约30ng/ml的OKT3,一种小鼠单克隆抗CD3抗体(可从Ortho-McNeil,Raritan,NJ或Miltenyi Biotech,Auburn,CA商购获得)。可选地在T细胞生长因子如300IU/mL IL-2或IL-15的存在下,可以通过用一种以上癌症抗原(包括其抗原部分,例如表位)在体外进一步刺激TIL以快速扩增TIL,所述抗原可任选地由载体表达,例如人白细胞抗原A2(HLA-A2)结合肽,例如0.3μM MART-1:26-35(27L)或gp100:209-217(210M)。其他合适的抗原可包括例如NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶癌抗

原、MAGE-A3、SSX-2和VEGFR2,或其抗原性部分。通过用脉冲到表达HLA-A2的抗原呈递细胞的癌症的相同抗原进行再刺激,也可以快速扩增TIL。或者,可以用例如经辐照的自体淋巴细胞或用经辐照的HLA-A2+同种异体淋巴细胞和IL-2进一步再刺激TIL。

在一些实施方式中,TIL的第二次扩增(其可包括称为REP的扩增)可在容量为500mL、具有100cm²透气性硅底部的透气烧瓶(G-Rex 100,可从Wilson Wolf Manufacturing Corporation,New Brighton,MN,USA商购获得)中进行,5×10⁶或10×10⁶TIL可与aAPC以1:100的比例在400mL 50/50培养基中培养,补充有5%人AB血清、3000IU/mL的IL-2和30ng/ml的抗CD3(OKT3)。G-Rex 100烧瓶可以在37℃,5%CO₂中孵育。在第5天,可以取出250mL上清液并置于离心瓶中并以1500rpm(491×g)离心10分钟。可以用150mL含有5%人AB血清、3000IU/mL IL-2的新鲜培养基再悬浮TIL沉淀物,并将其加回到原G-Rex 100烧瓶中。当TIL在G-Rex 100烧瓶中连续扩增时,在第7天,各个G-Rex 100中的TIL可以悬浮在各个烧瓶中存在的300mL培养基中,并且可以将细胞悬浮液分成3个100mL等分试样,其可以用于接种3个G-Rex 100烧瓶。然后可以向每个烧瓶中加入150mL含有5%人AB血清和3000IU/mL IL-2的AIM-V。G-Rex 100烧瓶可以在37℃、5%CO₂中孵育,4天后,可以向每个G-Rex100烧瓶中加入150mL具有3000IU/mL IL-2的AIM-V。可以在培养的第14天收获细胞。

在一个实施方式中,第二次扩增(包括称为REP的扩增)在烧瓶中进行,其中大量TIL与100或200倍过量的灭活饲养细胞、30mg/mL OKT3抗CD3抗体和3000IU/mL IL-2在150ml培养基中混合。完成培养基更换(通常用新鲜培养基通过气体交换(respiration)更换2/3培养基),直至细胞转移到替代生长室。替代生长室包括GRex烧瓶和透气性容器,如下面更充分讨论的。

在另一个实施方式中,进行第二次扩增(包括称为REP的扩增),并且还包括选择TIL以获得优异的肿瘤反应性的步骤。可以使用本领域已知的任何选择方法。例如,美国专利申请公开号2016/0010058A1中描述的方法,其公开内容通过引用并入本文,可用于选择TIL以获得优异的肿瘤反应性。

任选地,可以使用本领域已知的标准检测法,在第二次扩增(包括称为REP扩增的扩增)后,进行细胞活力检测。例如,可以对大量TIL样品进行台盼蓝排除检测,其选择性地标记死细胞并允许活力评估。在一些实施方式中,可以使用Cellometer K2自动细胞计数器(Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA)对TIL样品进行计数和检测活力。在一些实施方式中,根据例如实施例2中描述的Cellometer K2Image Cytometer Automatic Cell Counter方案确定活力。

在一些实施方式中,细胞在总的第二次扩增时间内生长7天、8天、9天、10天或11天,然后将其分割到多于一个容器或烧瓶。

在一些实施方式中,第二次扩增培养基(例如有时称为CM2或第二次细胞培养基)包含IL-2、OKT-3以及抗原呈递饲养细胞(APC),如下面更详细讨论的。

在一些实施方式中,抗原呈递饲养细胞是PBMC。在一些实施方式中,抗原呈递饲养细胞是人工抗原呈递饲养细胞。在一个实施方式中,第二次扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞的比例为约1至25,约1至50,约1至100,约1至125,约1至150,约1至175,约1至200,约1至225,约1至250,约1至275,约1至300,约1至325,约1至350,约1至375,约1至400,或约1至500。在一个实施方式中,第二次扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞的比例在1至50和1至300之间。在一个

实施方式中,第二次扩增中TIL与抗原呈递饲养细胞的比例在1至100和1至200之间。

一个实施方式中,本文所述的TIL扩增程序在第二次扩增(包括例如称为REP TIL扩增的扩增)期间需要过量的饲养细胞。在许多实施方式中,饲养细胞是从健康献血者的标准全血单位获得的外周血单核细胞(PBMC)。使用标准方法如Ficoll-Paque梯度分离获得PBMC。在一个实施方式中,使用人工抗原呈递(aAPC)细胞代替PBMC。

通常,通过辐照或热处理使同种异体PBMC失活,并将其用于REP程序。

在一些实施方式中,第一次扩增期间的生长培养基包含IL-2或其变体。在一些实施方式中,IL是重组人IL-2(rhIL-2)。在一些实施方式中,对于1mg小瓶,IL-2储备溶液具有 $20\text{--}30 \times 10^6$ IU/mg的比活性。在一些实施方式中,对于1mg小瓶,IL-2储备溶液具有 20×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施方式中,对于1mg小瓶,IL-2储备溶液具有 25×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施方式中,对于1mg小瓶,IL-2储备溶液具有 30×10^6 IU/mg的比活性。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为 $4\text{--}8 \times 10^6$ IU/mg IL-2。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为 $5\text{--}7 \times 10^6$ IU/mg IL-2。在一些实施方式中,IL-2储备溶液的终浓度为 6×10^6 IU/mg IL-2。在一些实施方式中,如实施例4中所述制备IL-2储备溶液。在一些实施方式中,第一扩增培养基包含约10,000 IU/mL的IL-2,约9,000 IU/mL的IL-2,约8,000 IU/mL的IL-2,约7,000 IU/mL的IL-2,约6000 IU/mL的IL-2或约5,000 IU/mL的IL-2。在一些实施方式中,第一扩增培养基包含约9,000 IU/mL的IL-2至约5,000 IU/mL的IL-2。在一些实施方式中,第一扩增培养基包含约8,000 IU/mL的IL-2至约6,000 IU/mL的IL-2。在一些实施方式中,第一扩增培养基包含约7,000 IU/mL的IL-2至约6,000 IU/mL的IL-2。在一些实施方式中,第一扩增培养基包含约6,000 IU/mL的IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基还包含IL-2。在一些实施方式中,细胞培养基包含约3000 IU/mL的IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含约1000 IU/mL,约1500 IU/mL,约2000 IU/mL,约2500 IU/mL,约3000 IU/mL,约3500 IU/mL,约4000 IU/mL,约4500 IU/mL,约5000 IU/mL,约5500 IU/mL,约6000 IU/mL,约6500 IU/mL,约7000 IU/mL,约7500 IU/mL,或约8000 IU/mL的IL-2。在一个实施方式中,细胞培养基包含1000至2000 IU/mL,2000至3000 IU/mL,3000至4000 IU/mL,4000至5000 IU/mL,5000至6000 IU/mL,6000至7000 IU/mL,7000至8000 IU/mL,或8000 IU/mL的IL-2。

在一些实施方式中,第二次扩增细胞培养基还包括抗CD3抗体。在一些实施方式中,细胞培养基包含OKT3抗体。在一些实施方式中,细胞培养基包含约30 ng/mL的OKT3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含约0.1 ng/mL,约0.5 ng/mL,约1 ng/mL,约2.5 ng/mL,约5 ng/mL,约7.5 ng/mL,约10 ng/mL,约15 ng/mL,约20 ng/mL,约25 ng/mL,约30 ng/mL,约35 ng/mL,约40 ng/mL,约50 ng/mL,约60 ng/mL,约70 ng/mL,约80 ng/mL,约90 ng/mL,约100 ng/mL,约200 ng/mL,约500 ng/mL和约1 μ g/mL的OKT3抗体。在一个实施方式中,细胞培养基包含0.1 ng/mL至1 ng/mL,1 ng/mL至5 ng/mL,5 ng/mL至10 ng/mL,10 ng/mL至20 ng/mL,20 ng/mL至30 ng/mL,30 ng/mL至40 ng/mL,40 ng/mL至50 ng/mL,50 ng/mL至100 ng/mL的OKT3抗体。

在一些实施方式中,抗CD3抗体与IL-2组合诱导TIL群中的T细胞活化和细胞分裂。用全长抗体以及Fab和F(ab')₂片段可以看到该作用,前者通常是优选的;参见例如Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719,其全部内容在此引入作为参考。如本领域技术人员所理解的,有许多可用于本发明的合适的抗人CD3抗体,包括来自各种哺乳动物的抗人CD3多克隆和单克隆抗体,包括但不限于鼠、人类、灵长类动物、大鼠和犬抗体。在特定实施方式中,使

用OKT3抗CD3抗体(可从Ortho-McNeil,Raritan,NJ或Miltenyi Biotech,Auburn,CA商购获得)。

在一些实施方式中,如本领域已知的,第二次扩增中的细胞在具有高剂量细胞因子特别是IL-2的培养基中生长。

或者,使用细胞因子的组合用于TIL的第二次扩增也是可能的,使用IL-2、IL-15和IL-21中的两种以上的组合,如国际公开号W02015/189356和国际公开号W02015/189357中一般概述的,在此明确地整体并入。因此,可能的组合包括IL-2和IL-15、IL-2和IL-21、IL-15和IL-21和IL-2、IL-15和IL-21,后者在许多实施方式中特别有用。细胞因子组合的使用特别有利于淋巴细胞(特别是如本文所述的T细胞)的产生。

E. 步骤D的可选重复:第二次扩增

在一些实施方式中,进行一次以上第二次扩增,即重复进行第二次扩增。例如,在一些实施方式中,如图11中所示的步骤D第二次扩增重复进行一次以上。在一些实施方式中,第二次扩增是指另外的第二次扩增。在第二次扩增被进行了不止一次的一些实施方式中(即,在重复第二次扩增的情况下),这可以包括被称为TIL快速扩增方案的过程。在一些实施方式中,在收获和第一次扩增后,TIL细胞群的数量增加。该过程在本领域通常称为快速扩增过程(REP),并且重复的第二次扩增可包括称为reREP的扩增。该总体方案通常可以使用透气性容器中包含许多组分的培养基来完成,所述组分包括饲养细胞、细胞因子来源和抗CD3抗体。在一些实施方式中,如上所述进行一次以上后续的第二次扩增。在一些实施方式中,在图11所提供的步骤E之前,如图11步骤D所提供的那样进行一个以次后续的第二次扩增。在一些实施方式中,如上所述进行一次、两次、三次、四次或更多次第二次扩增。在一些实施方式中,在图11的步骤E之前,如图11的步骤D中所提供的那样进行一次、两次、三次、四次或更多次第二次扩增。在一些实施方式中,如上所述进行两次第二次扩增。在一些实施方式中,在图11的步骤E之前,如图11的步骤D中所提供的进行两次第二次扩增。在一些实施方式中,如上所述进行三次第二次扩增。在一些实施方式中,在图11的步骤E之前,如图11的步骤D中所提供的那样进行三次第二次扩增。在一些实施方式中,如上所述进行四次第二次扩增。在一些实施方式中,在图11的步骤E之前,如图11的步骤D中所提供的那样进行四次第二次扩增。

在一些实施方式中,TIL的第二次扩增的重复(例如在图11的步骤D中)可以称为TIL的再刺激。在一些实施方式中,本发明包括再刺激步骤,即第二次扩增的重复(例如,重复图11步骤D的第二次扩增)。在一些实施方式中,对已经冷冻保存的细胞进行重复的第二次扩增(其可以包括称为再刺激步骤(“reREP”)的扩增)。在一些实施方式中,TIL在步骤D之后冷冻保存。在一些实施方式中,在步骤D中的初始第二次扩增后,可以在常规培养基中培养细胞,例如“静息”培养基,然后进行一次以上第二次扩增步骤。在一些实施方式中,静息培养基包含IL-2。在一些实施方式中,静息培养基不包含IL-2。在一些实施方式中,静息培养基是本领域已知的标准细胞培养基。在一些实施方式中,静息培养基是AIM-V、DMEM、DMEM/F12、MEM、RPMI、OptiMEM、IMDM或本领域已知的任何其他标准培养基,包括市售培养基。在一些实施方式中,静息培养基是AIM-V。

通常,如本文所讨论的,最初通过从患者切除的肿瘤获得TIL原代群(“原代细胞群”或“第一细胞群”)来制备TIL。接着是利用用IL-2培养细胞的初始大量扩增,形成第二细胞群

(本文有时称为“大量TIL群”或“第二群”)。在一些实施方式中,这也称为初始或第一次扩增。

然后在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递饲养细胞(APC)的细胞培养基中,对大量TIL群(例如,从例如图11步骤A获得的群)进行REP步骤,有时称为第一次扩增(例如,如图11步骤B中所述的第一次扩增),其中APC通常包含外周血单核细胞(PBMC;或者,如本文所讨论的,使用抗原呈递细胞),其中快速扩增(例如,如图11的步骤D中提供的第二次扩增)进行至少14天。如本文所讨论的,培养基还可以含有IL-2、IL-15和/或IL-23的组合而不是单独的IL-2。在一些实施方式中,这种后第二次扩增(例如图11的后步骤D)扩增的TIL群数量比第二TIL群(例如图11步骤B获得的TIL群)至少高50倍或100倍。在一些实施方式中,图11步骤D中第二次扩增后获得的TIL群数量比图11步骤B中第一次扩增获得的TIL高50倍或100倍。通过本领域已知的细胞计数方法测量TIL,包括本文提供的实施例中(包括实施例1、2和3)描述的那些方法。在一些实施方式中,使用K2细胞计数器对TIL计数。在一些实施方式中,使用Cellometer IC2Image细胞仪来对TIL计数。

在一些实施方式中,如本文所讨论的,第二次扩增后获得的TIL群(有时称为第三TIL群或REP细胞群)被从补充的细胞培养基(例如图11步骤D中使用的培养基或实施例中称为CM2的培养基)中除去,并且任选地在进行另外的第二次扩增步骤之前被冷冻保存在储存培养基(例如含有5%DMSO的培养基)中。

任选地,可在第二次扩增后和另外的第二次扩增之前,冷冻保存TIL。在一些实施方式中,在进行图11步骤D之后和在进行图11的另外的步骤D之前,冷冻保存TIL。在一些实施方式中,在进行另外的第二次扩增之前,解冻冷冻保存的TIL。在一些实施方式中,在进行如图11中提供的另外的步骤D之前,解冻冷冻保存的TIL。在一些实施方式中,在5%DMSO中冷冻保存TIL。在一些实施方式中,在细胞培养基加5%DMSO中冷冻保存TIL。或者,从补充的细胞培养基(例如图11步骤D中使用的培养基)中移除细胞,并在静息培养基中培养。这些培养基包括实施例1和5以及本文提供的其他实施例中描述的那些。在一些实施方式中,静息培养基可包括具有IL-2的培养基。在一些实施方式中,静息培养基可以是实施例中称为CM1的培养基。

在解冻的细胞或静息细胞上,使用包含IL-2、OKT-3和饲养细胞(例如抗原呈递细胞)的补充的细胞培养基(例如图11步骤D中提供的培养基),进行另外的第二次扩增(包括称为reREP的扩增),该细胞培养基通常包含外周血单核细胞(PBMC;或者,如本文所讨论地,使用抗原呈递细胞),其中,另外的第二次扩增进行至少14天。如本文所讨论的,培养基还可以含有IL-2、IL-15和/或IL-23的组合而不是单独的IL-2。

这使得TIL群被扩增,其特征在于,这些扩增的TIL相对于第二TIL群(例如大量起始TIL)表现出增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群。在一些实施方式中,这些扩增的TIL是从图11步骤D获得的TIL。

在一些实施方式中,记忆T细胞是组成型CCR7和CD62L的那些细胞。参见Sallusto等*Annu. Rev. Immunol.*, 2004, 22: 745-763,其全部内容通过引用并入本文。

因此,本发明提供了:基于使得代谢健康(例如糖酵解和呼吸作用)增加的后解冻(post-thaw)方法,在解冻时再次刺激冷冻保存的TIL的方法。在一些实施方式中,方法包括:提供解冻的冷冻保存的TIL群,然后对其进行处理以增加其代谢健康,以允许在输注到

患者体内时进行最佳治疗。

F. 步骤E:收获来自步骤D的TIL

在第二次扩增步骤后,可以收获细胞。在一些实施方式中,在一个、两个、三个、四个或更多个第二次扩增步骤后,收获TIL。在一些实施方式中,在一个、两个、三个、四个或更多个根据如图11提供的步骤D的第二次扩增步骤后,收获TIL。

可以以任何合适的和无菌的方式收获TIL,包括例如通过离心。用于TIL收获的方法是本领域熟知的,并且任何这样的已知方法可以与本发明方法一起使用。

G. 步骤F:最终配方和/或转移到输液袋

在如图11中示例性顺序提供的步骤A至E之后以及如上述和于此详述的概述完成后,将细胞转移至容器以用于对患者给药。在一些实施方式中,一旦使用上述扩增方法获得治疗足够数量的TIL,将它们转移至容器以用于对患者给药。

在一个实施方式中,本公开的使用APC扩增的TIL被用作药物组合物施用于患者。在一个实施方式中,药物组合物是TIL在无菌缓冲液中的悬浮液。本公开的使用PBMC扩增的TIL可以通过本领域已知的任何合适的途径施用。在一些实施方式中,T细胞作为单次动脉内或静脉内输注被施用,其优选持续约30至60分钟。其他合适的给药途径包括腹膜内、鞘内和淋巴管内。

1. 药物组合物、剂量和给药方案

在一个实施方式中,本公开的使用APC扩增的TIL作为药物组合物施用于患者。在一个实施方式中,药物组合物是TIL在无菌缓冲液中的悬浮液。本公开的使用PBMC扩增的TIL可以通过本领域已知的任何合适的途径施用。在一些实施方式中,T细胞作为单次动脉内或静脉内输注施用,其优选持续约30至60分钟。其他合适的给药途径包括腹膜内、鞘内和淋巴管内给药。

可以施用任何合适剂量的TIL。在一些实施方式中,合适剂量需要治疗足够数量的TIL。在一些实施方式中,施用约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} TIL,平均约 7.8×10^{10} TIL,特别是如果癌是黑素瘤。在一个实施方式中,施用约 1.2×10^{10} 至约 4.3×10^{10} 的TIL。在一些实施方式中,施用约 3×10^{10} 至约 12×10^{10} TIL。在一些实施方式中,施用约 4×10^{10} 至约 10×10^{10} TIL。在一些实施方式中,施用约 5×10^{10} 至约 8×10^{10} TIL。在一些实施方式中,施用约 6×10^{10} 至约 8×10^{10} TIL。在一些实施方式中,施用约 7×10^{10} 至约 8×10^{10} TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 7.8×10^{10} TIL,特别是当癌症是黑素瘤时。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 1.2×10^{10} 至约 4.3×10^{10} TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 3×10^{10} 至约 12×10^{10} TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 4×10^{10} 至约 10×10^{10} TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 5×10^{10} 至约 8×10^{10} TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 6×10^{10} 至约 8×10^{10} TIL。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 7×10^{10} 至约 8×10^{10} TIL。

在一些实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL的数量为约 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 $2 \times$

10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 和 9×10^{13} 。在一个实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL数量的范围为 1×10^6 至 5×10^6 、 5×10^6 至 1×10^7 、 1×10^7 至 5×10^7 、 5×10^7 至 1×10^8 、 1×10^8 至 5×10^8 、 5×10^8 至 1×10^9 、 1×10^9 至 5×10^9 、 5×10^9 至 1×10^{10} 、 1×10^{10} 至 5×10^{10} 、 5×10^{10} 至 1×10^{11} 、 5×10^{11} 至 1×10^{12} 、 1×10^{12} 至 5×10^{12} 以及 5×10^{12} 至 1×10^{13} 。在一些实施方式中,治疗有效剂量为约 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 和 9×10^{13} 。

在一些实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL浓度小于药物组合物的例如100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001%w/w、w/v或v/v。

在一些实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度大于组合物的90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、1.25%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%或0.0001%w/w、w/v或v/v。

在一些实施方式中,本发明的药物组合物中提供的TIL的浓度范围为组合物的约0.0001%至约50%,约0.001%至约40%,约0.01%至约30%,约0.02%至约29%,约0.03%至约28%,约0.04%至约27%,约0.05%至约26%,约0.06%至约25%,约0.07%至约24%,约0.08%至约23%,约0.09%至约22%,约0.1%至约21%,约0.2%至约20%,约0.3%至约19%,约0.4%至约18%,约0.5%至约17%,约0.6%至约16%,约0.7%至约15%,约0.8%至约14%,约0.9%至约12%或约1%至约10%w/w、w/v或v/v。

在一些实施方式中,本发明的药物组合中提供的TIL的浓度范围为组合物的约0.001%至约10%,约0.01%至约5%,约0.02%至约4.5%,约0.03%至约4%,约0.04%至约3.5%,约0.05%至约3%,约0.06%至约2.5%,约0.07%至约2%,约0.08%至约1.5%,约0.09%至约1%,约0.1%至约0.9%w/w、w/v或v/v。

在一些实施方式中,本发明的药物组合中提供的TIL的量等于或小于10g,9.5g,9.0g,8.5g,8.0g,7.5g,7.0g,6.5g,6.0g,5.5g,5.0g,4.5g,4.0g,3.5g,3.0g,2.5g,2.0g,1.5g,1.0g,0.95g,0.9g,0.85g,0.8g,0.75g,0.7g,0.65g,0.6g,0.55g,0.5g,0.45g,0.4g,0.35g,0.3g,0.25g,0.2g,0.15g,0.1g,0.09g,0.08g,0.07g,0.06g,0.05g,0.04g,0.03g,0.02g,0.01g,0.009g,0.008g,0.007g,0.006g,0.005g,0.004g,0.003g,0.002g,0.001g,0.0009g,0.0008g,0.0007g,0.0006g,0.0005g,0.0004g,0.0003g,0.0002g或0.0001g。

在一些实施方式中,本发明的药物组合中提供的TIL的量大于0.0001g,0.0002g,0.0003g,0.0004g,0.0005g,0.0006g,0.0007g,0.0008g,0.0009g,0.001g,0.0015g,0.002g,0.0025g,0.003g,0.0035g,0.004g,0.0045g,0.005g,0.0055g,0.006g,0.0065g,0.007g,0.0075g,0.008g,0.0085g,0.009g,0.0095g,0.01g,0.015g,0.02g,0.025g,0.03g,0.035g,0.04g,0.045g,0.05g,0.055g,0.06g,0.065g,0.07g,0.075g,0.08g,0.085g,0.09g,0.095g,0.1g,0.15g,0.2g,0.25g,0.3g,0.35g,0.4g,0.45g,0.5g,0.55g,0.6g,0.65g,0.7g,0.75g,0.8g,0.85g,0.9g,0.95g,1g,1.5g,2g,2.5,3g,3.5,4g,4.5g,5g,5.5g,6g,6.5g,7g,7.5g g,8g,8.5g,9g,9.5g或10g。

本发明的药物组合中提供的TIL在宽剂量范围内是有效的。确切的剂量取决于给药途径、给药化合物的形式、待治疗对象的性别和年龄、待治疗对象的体重,以及主治医师的偏好和经验。如果合适,也可以使用临床确定的TIL剂量。使用本文方法施用的药物组合物的量,例如TIL的剂量,将取决于所治疗的人或哺乳动物、病症或病症的严重程度、施用率、活性药物成分的处置和处方医生的自由裁量权。

在一些实施方式中,TIL可以单剂量施用。这种给药可以通过注射,例如静脉内注射。在一些实施方式中,TIL可以多剂量施用。剂量可以是每年一次、两次、三次、四次、五次、六次或六次以上。剂量可以是每月一次、每两周一次、每周一次或每隔一天一次。只要有必要,TIL的给药可以继续。

[0001] 在一些实施方式中,TIL的有效剂量为约 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 和 9×10^{13} 。在一些实施方式中,TIL的有效剂量范围为 1×10^6 至 5×10^6 、 5×10^6 至 1×10^7 、 1×10^7 至 5×10^7 、 5×10^7 至 1×10^8 、 1×10^8 至 5×10^8 、 5×10^8 至 1×10^9 、 1×10^9 至 5×10^9 、 5×10^9 至 1×10^{10} 、 1×10^{10} 至 5×10^{10} 、 5×10^{10} 至 1×10^{11} 、 5×10^{11} 至 1×10^{12} 、 1×10^{12} 至 5×10^{12} 和 5×10^{12} 至 1×10^{13} 。

在一些实施方式中,TIL的有效剂量为约0.01mg/kg至约4.3mg/kg,约0.15mg/kg至约

3.6mg/kg,约0.3mg/kg至约3.2mg/kg,约0.35mg/kg至约2.85mg/kg,约0.15mg/kg至约2.85mg/kg,约0.3mg/kg至约2.15mg/kg,约0.45mg/kg至约1.7mg/kg,约0.15mg/kg至约1.3mg/kg,约0.3mg/kg至约1.15mg/kg,约0.45mg/kg至约1mg/kg,约0.55mg/kg至约0.85mg/kg,约0.65mg/kg至约0.8mg/kg,约0.7mg/kg至约0.75mg/kg,约0.7mg/kg至约2.15mg/kg,约0.85mg/kg至约2mg/kg,约1mg/kg至约1.85mg/kg,约1.15mg/kg至约1.7mg/kg,约1.3mg/kg至约1.6mg/kg,约1.35mg/kg至约1.5mg/kg,约2.15mg/kg至约3.6mg/kg,约2.3mg/kg至约3.4mg/kg,约2.4mg/kg至约3.3mg/kg,约2.6mg/kg至约3.15mg/kg,约2.7mg/kg至约3mg/kg,约2.8mg/kg至约3mg/kg,或约2.85mg/kg至约2.95mg/kg。

在一些实施方式中,TIL的有效剂量为约1mg至约500mg,约10mg至约300mg,约20mg至约250mg,约25mg至约200mg,约1mg至约50mg,约5mg至约45mg,约10mg至约40mg,约15mg至约35mg,约20mg至约30mg,约23mg至约28mg,约50mg至约150mg,约60mg至约140mg,约70mg至约130mg,约80mg至约120mg,约90mg至约110mg,或约95mg至约105mg,约98mg至约102mg,约150mg至约250mg,约160mg至约240mg,约170mg至约230mg,约180mg至约220mg,约190mg至约210mg,约195mg至约205mg,或约198至约207mg。

有效量的TIL可以通过任何可接受的具有类似用途的药剂的给药方式以单剂量或多剂量给药,包括鼻内和透皮途径,通过动脉内注射、静脉内、腹膜内、肠胃外、肌肉、皮下、局部、移植或吸入。

H. 可选的细胞活力分析

任选地,可以使用本领域已知的标准检测法在步骤B第一次扩增后进行细胞活力检测。例如,可以对大量TIL的样品进行台盼蓝排除检测,其选择性地标记死细胞并允许活力评估。用于测试活力的其他检测可包括但不限于Alamar蓝检测;和MTT检测。

1. 细胞计数、活力、流式细胞术

在一些实施方式中,进行细胞计数和/或测量活力。标记物(例如但不限于CD3、CD4、CD8和CD56)以及本文公开或描述的任何其他标志物的表达可以使用FACSCanto™流式细胞仪(BD Biosciences)通过流式细胞术用抗体(例如但不限于可从BD Biosciences(BD Biosciences, San Jose, CA)商购的那些)测量。可以使用一次性c-芯片血细胞计数器(VWR, Batavia, IL)手动计数细胞,并且可以使用本领域已知的任何方法评估活力,包括但不限于台盼蓝染色。

在一些情况下,可以使用下面讨论的方案立即冷冻保存大量TIL群。或者,可以对大量TIL群进行REP,然后如下所述进行冷冻保存。类似地,在将经遗传修饰的TIL用于治疗的情况下,可以对大量TIL群或REP TIL群进行遗传修饰以用于合适的治疗。

2. 细胞培养

在一个实施方式中,用于扩增TIL的方法可包括使用约5,000mL至约25,000mL的细胞培养基,约5,000mL至约10,000mL的细胞培养基,或约5,800mL至约8,700mL的细胞培养基。在一个实施方式中,使用不超过一种类型的细胞培养基来扩增TIL的数量。可以使用任何合适的细胞培养基,例如AIM-V细胞培养基(L-谷氨酰胺、50μM硫酸链霉素和10μM硫酸庆大霉素)细胞培养基(Invitrogen, Carlsbad CA)。在这方面,本发明的方法有利地减少了扩增TIL数量所需的培养基量和培养基类型的数量。在一个实施方式中,扩增TIL的数量可以包括以不超过每三一次或每四天一次的频率将新鲜细胞培养基添加到细胞(也称为喂养细胞)。用透

气性容器扩增细胞数量通过降低扩增细胞所需的喂养频率,简化了扩增细胞数量所需的程序。

在一个实施方式中,第一和/或第二透气性容器中的细胞培养基未经过滤。使用未经过滤的细胞培养基可以简化扩增细胞数量所需的程序。在一个实施方式中,第一和/或第二透气性容器中的细胞培养基缺少 β -巯基乙醇(BME)。

在一个实施方式中,该方法的持续时间包括:从哺乳动物获得肿瘤组织样品;在含有细胞培养基的第一透气性容器中培养肿瘤组织样品;从肿瘤组织样品中获得TIL;使用aAPC在含有细胞培养基的第二透气性容器中扩增TIL数量持续约14至约42天,例如约28天。

在一个实施方式中,在透气性容器中扩增TIL。使用本领域已知的方法、组合物和装置,包括在美国专利申请公开号2005/0106717A1中描述的那些,其公开内容通过引用并入本文,使用PBMC在透气性容器中扩增TIL。在一个实施方式中,在透气性袋中扩增TIL。在一个实施方式中,使用能在透气袋中扩增TIL细胞的扩增系统来扩增TIL,例如Xuri细胞扩增系统W25(GE Healthcare)。在一个实施方式中,使用能在透气性袋中扩增TIL细胞的细胞扩增系统扩增TIL,例如WAVE生物反应器系统,也称为Xuri细胞扩增系统W5(GE Healthcare)。在一个实施方式中,细胞扩增系统包括透气性细胞袋,其体积选自以下组成的组:约100mL,约200mL,约300mL,约400mL,约500mL,约600mL,约700mL,约800mL,约900mL,约1L,约2L,约3L,约4L,约5L,约6L,约7L,约8L,约9L,和约10L。在一个实施方式中,可以在G-Rex烧瓶(可从Wilson Wolf Manufacturing商购获得)中扩增TIL。这些实施方式允许细胞群从约 5×10^5 个细胞/cm²扩增为 10×10^6 个细胞/cm²至 30×10^6 个细胞/cm²。在一个实施方式中,在不向细胞添加新鲜细胞培养基(也称为喂养细胞)的情况下进行该扩增。在一个实施方式中,只要培养基在GRex烧瓶中位于约10cm的高度,就不喂养。在一个实施方式中,不饲养但是添加一种以上细胞因子。在一个实施方式中,细胞因子可以作为丸剂(bolus)添加而无需将细胞因子与培养基混合。此类容器、装置和方法在本领域中是已知的并且已经用于扩增TIL,并且包括描述于美国专利申请公开号US2014/0377739A1、国际公开号W02014/210036A1、美国专利申请公开号US2013/0115617A1、国际公开号W02013/188427A1、美国专利申请公开号US2011/0136228A1、美国专利号US8,809,050B2、国际公开号W02011/072088A2、美国专利申请公开号US2016/0208216A1、美国专利申请公开号US2012/0244133A1、国际公开号W02012/129201A1、美国专利申请公开号US2013/0102075A1、美国专利号US8,956,860B2、国际公开号W02013/173835A1、美国专利申请公开号US2015/0175966A1的那些,其公开内容在此引入作为参考。这些方法也描述于Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35: 283-292.

TIL的可选基因工程化。

在一些实施方式中,TIL任选地经基因工程改造以包括另外的功能,包括但不限于高亲和力和T细胞受体(TCR),例如针对肿瘤相关抗原(例如MAGE-1、HER2或NY-ESO-1)的TCR,或结合肿瘤相关细胞表面分子(例如间皮素)或谱系限制的细胞表面分子(例如CD19)的嵌合抗原受体(CAR)。

I. TIL的可选冷冻保存

如上文步骤A至E中所讨论的,冷冻保存可在整个TIL扩增过程中的许多节点发生。在一些实施方式中,可以冷冻保存根据步骤B的第一次扩增后的大量TIL群或根据步骤D的一次以上第二次扩增后的扩增的TIL群。通常可以通过将TIL群置于冷冻溶液中来实现冷冻保

存,例如85%补体灭活的AB血清和15%二甲基亚砷(DMSO)。将溶液中的细胞置于冷冻小瓶中并在-80℃下储存24小时,任选地转移至气态氮冷冻机中进行冷冻保存。参见Sadeghi等, *Acta Oncologica* 2013,52,978-986。在一些实施方式中,TIL在5%DMSO中冷冻保存。在一些实施方式中,TIL在细胞培养基加5%DMSO中冷冻保存。在一些实施方式中,根据实施例8和9中提供的方法冷冻保存TIL。

适当时,将细胞从冰箱中取出并在37℃水浴中解冻至约4/5的溶液被解冻。通常将细胞再悬浮于完全培养基中并任选洗涤一次以上。在一些实施方式中,可以如本领域已知地对解冻的TIL进行计数并评估活力。

J. 扩增的TIL的表型特征

在一些实施方式中,分析TIL在扩增后多种表型标志物的表达,包括本文和实施例中描述的那些。在一个实施方式中,研究一种以上表型标志物的表达。在一些实施方式中,在步骤B中的第一次扩增后,分析TIL的表型特征。在一些实施方式中,在步骤C的转变期间,分析TIL的表型特征。在一些实施方式中,在根据步骤C的转变期间和冷冻保存后,分析TIL的表型特征。在一些实施方式中,在根据步骤D的第二次扩增后,分析TIL的表型特征。在一些实施方式中,在根据步骤D的两次以上扩增后,分析TIL的表型特征。在一些实施方式中,标志物选自TCRab、CD57、CD28、CD4、CD27、CD56、CD8a、CD45RA、CD8a、CCR7、CD4、CD3、CD38和HLA-DR组成的组。在一些实施方式中,标志物选自TCRab、CD57、CD28、CD4、CD27、CD56和CD8a组成的组。在一个实施方式中,标志物选自CD45RA,CD8a,CCR7,CD4,CD3,CD38和HLA-DR组成的组。在一些实施方式中,研究一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种、十三种或十四种标志物的表达。在一些实施方式中,研究来自每组的一种以上标志物的表达。在一些实施方式中,新鲜的TIL与解冻的TIL相比维持了HLA-DR、CD38和CD69表达中的一种以上(即,未显示统计学上显著的差异)。在一些实施方式中,TIL的活化状态在解冻的TIL中维持。

在一个实施方式中,测量一种以上调节性标志物的表达。在一些实施方式中,调节性标志物选自CD137、CD8a、Lag3、CD4、CD3、PD1、TIM-3、CD69、CD8a、TIGIT、CD4、CD3、KLRG1和CD154组成的组。在一些实施方式中,调节标志物选自CD137、CD8a、Lag3、CD4、CD3、PD1和TIM-3组成的组。在一些实施方式中,调节标志物选自CD69、CD8a、TIGIT、CD4、CD3、KLRG1和CD154组成的组。在一些实施方式中,与新鲜TIL相比,在解冻的TIL中调节性分子的表达降低。在一些实施方式中,与新鲜TIL相比,在解冻的TIL中调节性分子LAG-3和TIM-3的表达降低。在一些实施方式中,CD4、CD8、NK、TCRαβ的表达没有显著差异。在一些实施方式中,与解冻的TIL相比,新鲜TIL中CD4、CD8、NK、TCRαβ的表达和/或记忆标志物没有显著差异。

在一些实施方式中,记忆标志物选自CCR7和CD62L。

在一些实施方式中,与解冻的TIL相比,新鲜的TIL的存活率为至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或至少98%。在一些实施方式中,新鲜的和解冻的TIL的存活率均大于70%,大于75%,大于80%,大于85%,大于90%,大于95%或大于98%。在一些实施方式中,新鲜和解冻产品的存活率均大于80%,大于81%,大于82%,大于83%,大于84%,大于85%,大于86%,大于87%,大于88%,大于89%或大于90%。在一些实施方式中,新鲜和解冻产品的存活率均大于86%。

在一个实施方式中,还可以使用细胞因子释放检测方法,来评估再刺激的TIL的细胞因

子释放。在一些实施方式中,可评估TIL响应于OKT3刺激或与自体肿瘤消化液共培养的干扰素-7 (IFN-7) 分泌。例如在采用OKT3刺激的实施方式中,彻底洗涤TIL,并在预先涂有0.1或1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 磷酸盐缓冲盐水稀释的OKT3的96孔平底板中,用 1×10^5 个细胞在0.2mL的CM中制备双份的孔。孵育过夜后,收获上清液,通过ELISA (P Pierce/Endogen, Woburn, MA) 测量上清液中的IFN-7。对于共培养实验,将 1×10^5 个TIL细胞置于具有自体肿瘤细胞(1:1比例)的96孔板中。孵育24小时后,收获上清液,并例如通过ELISA可以定量检测IFN-7释放。

细胞表面生物标志物的流式细胞术分析:将TIL样品等分用于细胞表面标志物的流式细胞术分析,参见实施例7、8和9。

在一些实施方式中,评估TIL的各种调节性标志物。在一些实施方式中,调节标志物选自TCR α/β 、CD56、CD27、CD28、CD57、CD45RA、CD45RO、CD25、CD127、CD95、IL-2R、CCR7、CD62L、KLRG1和CD122组成的组。在一些实施方式中,调节性标志物是TCR α/β 。在一些实施方式中,调节性标志物是CD56。在一些实施方式中,调节性标志物是CD27。在一些实施方式中,调节性标志物是CD28。在一些实施方式中,调节性标志物是CD57。在一些实施方式中,调节性标志物是CD45RA。在一些实施方式中,调节性标志物是CD45RO。在一些实施方式中,调节性标志物是CD25。在一些实施方式中,调节性标志物是CD127。在一些实施方式中,调节性标志物是CD95。在一些实施方式中,调节性标志物是IL-2R。在一些实施方式中,调节性标志物是CCR7。在一些实施方式中,调节性标志物是CD62L。在一些实施方式中,调节性标志物是KLRG1。在一些实施方式中,调节性标志物是CD122。

K. 扩增的TIL的代谢健康

与新鲜收获的TIL和/或解冻后的TIL相比,再刺激的TIL的特征在于基础糖酵解的显著增强。

与PBMC饲养细胞相比,可以评估用aEM3aAPC扩增的TIL的备用呼吸能力(SRC)和糖酵解储备。Seahorse XF细胞线粒体压力测试通过使用靶向线粒体中电子传递链组分的呼吸调节剂直接测量细胞的耗氧率(OCR)来测量线粒体功能。连续注射测试化合物(寡霉素、FCCP以及鱼藤酮和抗霉素A的混合物,如下所述)以分别测量ATP产生、最大呼吸和非线粒体呼吸。然后使用这些参数和基础呼吸来计算质子泄漏和备用呼吸能力。每种调节剂靶向电子传递链的一种特定组分。寡霉素抑制ATP合成酶(复合物V),并且注射寡霉素后OCR的减少与细胞ATP产生相关的线粒体呼吸相关。碳酰氰-4(三氟甲氧基)苯腙(FCCP)是一种解偶联剂,可破坏质子梯度并破坏线粒体膜电位。结果是,电子流过电子传输链不受抑制,并且氧最大程度地被复合物IV所消耗。然后,FCCP刺激的OCR可用于计算备用呼吸容量,其被定义为最大呼吸和基础呼吸之间的差值。备用呼吸能力(SRC)是细胞响应增加的能量需求的能力的度量。第三次注射是鱼藤酮(一种复合物I抑制剂)和抗霉素A(一种复合物III抑制剂)的混合物。这种组合可以关闭线粒体呼吸,并能够计算由线粒体外的过程驱动的非线粒体呼吸。

在一些实施方式中,代谢检测是基础呼吸。通常,第二次扩增TIL或另外的第二次扩增TIL(例如在图11步骤D中描述的那些,包括被称为reREP TIL的TIL)的基础呼吸率是新鲜收获的TIL的基础呼吸率的至少50%,至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少97%,至少98%,或至少99%。在一些实施方式中,基础呼吸率为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约50%至约99%。在一些实施方式中,基础呼吸率为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约60%至约99%。在一些实施方式中,基础

呼吸率为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约70%至约99%。在一些实施方式中,基础呼吸率为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约80%至约99%。在一些实施方式中,基础呼吸率为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约90%至约99%。在一些实施方式中,基础呼吸率为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约95%至约99%。在一些实施方式中,第二次TIL扩增或另外的第二次TIL扩增(例如图11步骤D中描述的那些,包括被称为reREP TIL的TIL)具有的基础呼吸速率与新鲜收获的TIL的基础呼吸速率在统计学上无显著差异。

通常,第二次扩增TIL或另外的第二次扩增TIL,例如步骤D中的那些(包括例如,经历了另外的第二次扩增的被称为reREP的TIL) TIL的备用呼吸能力至少是新收获的TIL的基础呼吸率的至少50%,至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少97%,至少98%,或至少99%。在一些实施方式中,备用呼吸能力为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约50%至约99%。在一些实施方式中,备用呼吸能力为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约50%至约99%。在一些实施方式中,备用呼吸能力为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约60%至约99%。在一些实施方式中,备用呼吸能力为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约70%至约99%。在一些实施方式中,备用呼吸能力为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约80%至约99%。在一些实施方式中,备用呼吸能力为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约90%至约99%。在一些实施方式中,备用呼吸能力为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约95%至约99%。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或另外的第二次扩增TIL(例如在图11步骤D中描述的那些,包括被称为reREP TIL的TIL)具有的备用呼吸能力与新鲜收获的TIL的基础呼吸速率在统计学无显著差异。

通常,第二次扩增TIL或另外的第二次扩增TIL(例如在图11步骤D中描述的那些,包括被称为reREP TIL的TIL)具有的备用呼吸能力至少是新收获的TIL的基础呼吸率的至少50%,至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少97%,至少98%,或至少99%。在一些实施方式中,测量的代谢检测是糖酵解储备。在一些实施方式中,代谢检测是糖酵解储备。在一些实施方式中,代谢检测是备用呼吸能力。为了测量细胞(呼吸)代谢,用线粒体呼吸和糖酵解抑制剂处理细胞,以测定TIL的代谢图谱,由以下测量组成:基线氧化磷酸化(通过OCR测量)、备用呼吸能力、基线糖酵解活性(通过ECAR测量)和糖酵解储备。使用可以测定在阻断线粒体ATP产生时细胞进行糖酵解的能力的Seahorse Combined Mitochondrial/Glycolysis Stress Test Assay(包括可从Agilent[®]商购的试剂盒),进行代谢图谱检测。在一些实施方式中,使细胞缺乏葡萄糖,然后注射葡萄糖,然后注射应激剂(stress agent)。在一些实施方式中,应激剂选自寡霉素、FCCP、鱼藤酮、抗霉素A和/或2-脱氧葡萄糖(2-DG)组成的组,以及它们的组合。在一些实施方式中,以10mM加入寡霉素。在一些实施方式中,以10mM加入FCCP。在一些实施方式中,以2.5mM加入鱼藤酮。在一些实施方式中,以2.5mM加入抗霉素A。在一些实施方式中,以500mM加入2-脱氧葡萄糖(2-DG)。在一些实施方式中,测量糖酵解能力、糖酵解储备和/或非糖酵解酸化。一般来说,TIL的糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸率的至少50%,至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少97%,至少98%,或至少99%。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约50%至约99%。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约60%至约99%。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率

的约70%至约99%。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约80%至约99%。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约90%至约99%。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约95%至约99%。

在一些实施方式中,代谢检测是基础糖酵解。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或另外的第二次扩增,例如步骤D中的那些(包括例如经历了另外的第二次扩增的被称为reREP的TIL)的基础糖酵解增加至少2倍,至少3倍,至少4倍,至少5倍,至少6倍,至少7倍,至少8倍,至少9倍或至少10倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或另外的第二次扩增,例如步骤D中的那些(包括例如经历了另外的第二次扩增的被称为reREP的TIL)的基础糖酵解增加约2倍至约10倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或另外的第二次扩增,例如步骤D中的那些(包括例如经历了另外的第二次扩增的被称为reREP的TIL)的基础糖酵解增加约2倍至约8倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或另外的第二次扩增,例如步骤D中的那些(包括例如经历了另外的第二次扩增的被称为reREP的TIL)的基础糖酵解增加约3倍至约7倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或另外的第二次扩增,例如步骤D中的那些(包括例如经历了另外的第二次扩增的被称为reREP的TIL)的基础糖酵解增加约2倍至约4倍。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或另外的第二次扩增,例如步骤D中的那些(包括例如经历了另外的第二次扩增的被称为reREP的TIL)的基础糖酵解增加约2倍至约3倍。

通常,第二次扩增TIL或另外的第二次扩增TIL例如步骤D中的那些(包括例如经历了另外的第二次扩增的被称为reREP的TIL)的基础糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的至少50%,至少55%,至少60%,至少65%,至少70%,至少75%,至少80%,至少85%,至少90%,至少95%,至少97%,至少98%,或至少99%。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约50%至约99%。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约60%至约99%。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约70%至约99%。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约80%至约99%。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约90%至约99%。在一些实施方式中,糖酵解储备为新鲜收获的TIL的基础呼吸速率的约95%至约99%。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或另外的第二次扩增TIL(例如图11的步骤D中的那些,包括被称为reREP TIL的TIL)的备用呼吸能力与新鲜收获的TIL的基础呼吸率无统计学差异。

颗粒酶B产生:颗粒酶B是TIL杀死靶细胞的能力的另一种量度。根据制造商的说明书,使用Human Granzyme B DuoSet ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, MN),还对使用针对CD3、CD28和CD137/4-1BB的抗体如上所述进行再刺激的培养基上清液的颗粒酶B水平进行了评估。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或另外的第二次扩增TIL(例如图11的步骤D中的那些,包括被称为reREP TIL的TIL)具有增加的颗粒酶B产生。在一些实施方式中,第二次扩增TIL或另外的第二次扩增TIL(例如图11的步骤D中的那些,包括被称为reREP TIL的TIL)具有增加的细胞毒性活性。

在一些实施方式中,本发明方法包括使用如上所述的方法评估TIL活力的检测。在一些实施方式中,如上所述扩增TIL,包括例如如图11中提供的。在一些实施方式中,在评估活力之前将TIL冷冻保存。在一些实施方式中,活力评估包括在进行第一次扩增、第二次扩增和

另外的第二次扩增之前,解冻TIL。在一些实施方式中,本方法提供用于评估细胞增殖、细胞毒性、细胞死亡和/或与TIL群的活力相关的其他方面的检测。活力可以通过上述任何TIL代谢检测法以及本领域已知的任何已知用于评估细胞活力的方法来测量。在一些实施方式中,本发明方法提供用于评估细胞增殖、细胞毒性、细胞死亡和/或与使用本文所述方法扩增的TIL活力相关的其他方面的检测,包括图11中举例说明的那些。

本发明还提供了用于确定TIL活力的检测方法。本公开提供了通过将肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)扩增为更大的TIL群来检测TIL活力的方法,所述方法包括:

(i) 获得先前已扩增的第一TIL群;

(ii) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;和

(iii) 通过用另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)补充第二TIL群的细胞培养基进行第二次扩增,产生第三TIL群,其中,第三TIL群的数量比第二TIL群高至少50倍或100倍,并且其中,第二次扩增进行至少14天,获得第三TIL群,其中,相对于第二TIL群,第三TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群,并且其中,进一步检测第三群的活力。

在一些实施方式中,该方法还包括:

(iv) 通过用另外的IL-2、另外的OKT-3和另外的APC补充第三TIL群的细胞培养基进行另外的第二次扩增,其中,另外的第二次扩增进行至少14天,获得比步骤(iii)中所得更大的TIL群,其中,相对于第三TIL群,所述更大的TIL群包含增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群,并且其中,进一步检测第三群的活力。

在一些实施方式中,在步骤(i)之前冷冻保存细胞。

在一些实施方式中,在进行步骤(i)之前解冻细胞。

在一些实施方式中,重复步骤(iv)一至四次,获得足够的TIL用于分析。

在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约40天至约50天的时间。

在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约42天至约48天的时间。

在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)进行约42天至约45天的时间。

在一些实施方式中,步骤(i)至(iii)或(iv)在约44天内进行。

在一些实施方式中,来自步骤(iii)或(iv)的细胞表达CD4、CD8和TCR $\alpha\beta$ 的水平与新鲜收获的细胞相似。

在一些实施方式中,抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。

在一些实施方式中,在步骤(iii)的第9天至第17天中的任何一天将PBMC添加至细胞培养物中。

在一些实施方式中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,步骤(iv)中的更大的TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自下组的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

在一些实施方式中,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达降低。

在一些实施方式中,APC是人工APC(aAPC)。

在一些实施方式中,该方法还包括用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码高亲和力T细胞受体的核酸。

在一些实施方式中,转导步骤发生在步骤(i)之前。

在一些实施方式中,该方法还包括用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸,所述嵌合抗原受体包含与T细胞信号传导分子的至少一个内结构域融合的单链可变片段抗体。

在一些实施方式中,转导步骤发生在步骤(i)之前。

在一些实施方式中,检测TIL的活力。

在一些实施方式中,在冷冻保存后检测TIL的活力。

在一些实施方式中,在冷冻保存后和步骤(iv)后,检测TIL的活力。

根据本公开,一种检测TIL的活力和/或进一步施用于受试者的方法。在一些实施方式中,检测肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的方法包括:

(i) 获得第一TIL群;

(ii) 通过在包含IL-2的细胞培养基中培养第一TIL群进行第一次扩增,产生第二TIL群;和

(iii) 通过用另外的IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)补充第二TIL群的细胞培养基进行第二次扩增,产生第三TIL群,其中,第三TIL群的数量比第二TIL群的数量高至少50倍;

(iv) 收获、清洗和冷冻保存第三TIL群;

(v) 将冷冻保存的TIL储存在低温下;

(vi) 解冻第三TIL群,提供解冻的第三TIL群;和

(vii) 通过用IL-2、OKT-3和APC补充第三TIL群的细胞培养基,对解冻的第三TIL群的一部分进行另外的第二次扩增,进行至少3天的reREP期,其中,进行第三次扩增,获得第四TIL群,其中,将第四TIL群中TIL数量与第三TIL群中TIL数量进行比较,获得比率;

(viii) 基于步骤(vii)中的比率,确定解冻的TIL群是否适合施用于患者;

(ix) 当步骤(viii)中确定第四TIL群中TIL数量与第三TIL群中TIL数量的比率大于5:1时,向患者施用治疗有效剂量的解冻的第三TIL群。

在一些实施方式中,进行reREP期直至第四TIL群中TIL数量与第三TIL群中TIL数量的比率大于50:1。

在一些实施方式中,足够用于治疗有效剂量的TIL的数量为约 2.3×10^{10} 至约 13.7×10^{10} 。

在一些实施方式中,步骤(i)至(vii)进行约40天至约50天的时间。在一些实施方式中,步骤(i)至(vii)进行约42天至约48天的时间。在一些实施方式中,步骤(i)至(vii)进行约42天至约45天的时间。在一些实施方式中,步骤(i)至(vii)在约44天内进行。

在一些实施方式中,来自步骤(iii)或(vii)的细胞表达CD4、CD8和TCR $\alpha\beta$ 的水平与新鲜收获的细胞相似。在一些实施方式中,细胞是TIL。

在一些实施方式中,抗原呈递细胞是外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方式中,在步骤(iii)的第9天至第17天中的任何一天将PBMC添加至细胞培养物中。

在一些实施方式中,相对于第三细胞群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞,步骤(iii)或(vii)中更大的TIL群中的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出选自以下中的一种以上特征:CD27表达、CD28表达、端粒更长、CD57表达增加和CD56表达降低。

在一些实施方式中,效应T细胞和/或中枢记忆T细胞表现出CD57表达增加和CD56表达

降低。

在一些实施方式中,APC是人工APC(aAPC)。

在一些实施方式中,用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码高亲和力T细胞受体的核酸。

在一些实施方式中,转导步骤发生在步骤(i)之前。

在一些实施方式中,用表达载体转导第一TIL群的步骤,所述表达载体包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸,所述嵌合抗原受体包含与T细胞信号传导分子的至少一个内结构域融合的单链可变片段抗体。

在一些实施方式中,转导步骤发生在步骤(i)之前。

在一些实施方式中,在步骤(vii)后检测TIL的活力。

本公开还提供了用于检测TIL的其他方法。在一些实施方式中,本公开提供了检测TIL的方法,包括以下步骤:

(i) 获得冷冻保存的第一TIL群的一部分;

(ii) 解冻冷冻保存的第一TIL群的所述部分;

(iii) 通过在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养第一TIL群的所述部分进行第一次扩增,进行至少3天的reREP期,产生第二TIL群,其中,将来自第一TIL群的所述部分与第二TIL群进行比较,获得TIL数量之间的比率,其中,第二TIL群中TIL数量与第一TIL群的所述部分中TIL数量的比率大于5:1;

(iv) 基于步骤(iii)中的比率,确定第一TIL群是否适用于治疗性施用于患者;

(v) 当步骤(iv)中确定第二TIL群中TIL数量与第一TIL群中TIL数量的比率大于5:1时,确定第一TIL群适合用于治疗性施用。

在一些实施方式中,第二TIL群中TIL数量与第一TIL群的所述部分中TIL数量之比大于50:1。

在一些实施方式中,该方法还包括根据本文提供的任何实施方式中描述的方法,扩增来自步骤(i)的冷冻保存的全部第一TIL群。

在一些实施方式中,该方法还包括将来自步骤(i)的冷冻保存的全部第一TIL群施用于患者。

在一些实施方式中,将冷冻保存的TIL解冻并进行第二次扩增,以确定细胞是否充分扩增。如果细胞扩增至至少5:1的比率,则TIL足够有活力用于施用于患者。如果细胞扩增至至少10:1的比率,则TIL足够有活力用于施用于患者。如果细胞扩增至至少15:1的比率,则TIL足够有活力用于施用于患者。如果细胞扩增至至少20:1的比率,则TIL足够有活力用于施用于患者。如果细胞扩增至至少25:1的比率,则TIL足够有活力用于施用于患者。如果细胞扩增至至少30:1的比率,则TIL足够有活力用于施用于患者。如果细胞扩增至至少35:1的比率,则TIL足够有活力用于施用于患者。如果细胞扩增至至少40:1的比率,则TIL足够有活力用于施用于患者。如果细胞扩增至至少45:1的比率,则TIL足够有活力用于施用于患者。如果细胞扩增至至少5:1的比率,则TIL足够有活力用于施用于患者。

本公开还提供了用于检测TIL的其他方法。在一些实施方式中,本公开提供了检测TIL的方法,包括以下步骤:

(i) 获得冷冻保存的第一TIL群的一部分;

(ii) 解冻冷冻保存的第一TIL群的所述部分；

(iii) 通过在包含IL-2、OKT-3和抗原呈递细胞(APC)的细胞培养基中培养第一TIL群的所述部分进行第一次扩增,进行至少3天的reREP期,产生第二TIL群,其中,将来自第一TIL群的所述部分与第二TIL群进行比较,获得TIL数量之间的比率,其中,第二TIL群中TIL数量与第一TIL群的所述部分中TIL数量的比率大于5:1;

(iv) 基于步骤(iii)中的比率,确定第一TIL群是否适用于治疗性施用于患者;以及

(v) 当步骤(iv)中确定第二TIL群中TIL数量与第一TIL群中TIL数量的比率大于5:1时,将第一TIL群的剩余部分治疗性地施用于患者。

在一些实施方式中,第二TIL群中TIL数量与第一TIL群的所述部分中TIL数量的比率大于50:1。

在一些实施方式中,该方法还包括根据前述权利要求中任一项的方法,扩增来自步骤(i)的冷冻保存的全部第一TIL群。

在一些实施方式中,该方法还包括将来自步骤(i)的冷冻保存的全部第一TIL群施用于患者。

在一些实施方式中,该方法还包括评估第二TIL群的代谢健康的步骤。

在一些实施方式中,该方法还包括评估第二TIL群的表型的步骤。

在一些实施方式中,抗原呈递细胞是同种异体外周血单核细胞。

L. 治疗患者的方法

治疗方法从初始TIL的收集和TIL的培养开始。这些方法在本领域中已经由例如Jin等(J. Immunotherapy, 2012, 35 (3) :283-292) 描述,其全部内容通过引用并入本文。以及在以下实施例部分进行描述。

本发明提供了先前未曾描述的用于生产TIL的新方法,例如,根据步骤A至F生产TIL。发现根据上述步骤A至F产生的扩增的TIL或如本文所述产生的扩增的TIL特别适用于治疗患有癌症的患者。使用TIL治疗癌症的一般方法已描述于Goff等,J. Clinical Oncology, 2016, 34 (20) :2389-239以及补充内容(supplemental content);其全部内容通过引用并入本文。类似地,根据本发明产生的TIL也可用于治疗癌症。在一些实施方式中,如先前描述的,从切除的转移性黑素瘤沉积物生长TIL(参见Dudley等,J Immunother., 2003, 26:332-342;其全部内容通过引用并入本文)。可以在无菌条件下解剖新鲜肿瘤。可以收集代表性样品用于正式病理分析。2mm³至3mm³的单个碎片。在一些实施方式中,每位患者获得5、10、15、20、25或30个样品。在一些实施方式中,每位患者获得20、25或30个样品。在一些实施方式中,每位患者获得20、22、24、26或28个样品。在一些实施方式中,每位患者获得24个样品。可以将样品置于24孔板的各个孔中,维持在具有高剂量IL-2(6,000IU/mL)的生长培养基中,并监测肿瘤的破坏和/或TIL的增殖。可以将处理后具有剩余活细胞的任何肿瘤酶促消化成单细胞悬浮液并如本文所述地冷冻保存。

在一些实施方式中,可以对扩增的TIL进行取样以进行表型分析(CD3、CD4、CD8和CD56),并在适当针对自体肿瘤进行测试。如果过夜共培养产生的干扰素- γ (IFN- γ)水平>200pg/mL和两倍背景,则可认为TIL是反应性的。(Goff等,J Immunother., 2010, 33: 840-847;其全部内容通过引用并入本文)。在一些实施方式中,可以选择具有自体反应性迹象或充分的生长模式的培养物,用于第二次扩增(例如根据图11步骤D提供的第二次扩增),

包括有时称为快速扩增 (REP) 的第二次扩增。在一些实施方式中,选择具有高自体反应性(例如在第二次扩增期间的高增殖)的扩增的TIL,用于另外的第二次扩增。在一些实施方式中,选择具有高自体反应性(例如如图11的步骤D中提供的第二次扩增期间的高增殖)的TIL,用于根据图11的步骤D的另外的第二次扩增。

在一些实施方式中,患者不直接进行ACT(过继细胞转移),例如在一些实施方式中,在肿瘤收获和/或第一次扩增后,不立即使用细胞。在此类实施方式中,可在第二次扩增步骤之前2天(例如,在一些实施方式中,在称为REP步骤的步骤的前2天),冷冻保存和解冻TIL。在此类实施方式中,可在第二次扩增步骤之前2天(例如,在一些实施方式中,如图11提供的步骤D的前2天),冷冻保存和解冻TIL。如在整个本申请的各种实施方式中所述,第二次扩增(包括称为REP的过程)在经辐照的饲养细胞(尽可能自体同源)以100:1比率的存在下,使用OKT3(抗CD3)抗体(Miltenyi Biotech, San Diego, CA)和IL-2(3,000IU/mL; Prometheus, San Diego, CA)(参见Dudley等, *J Immunother.*, 2003, 26:332-342; 通过引用整体并入本文)。在一些实施方式中,可以在第二个扩增步骤之前5天,冷冻保存并解冻TIL。在一些实施方式中,可以在第二个扩增步骤之前4天,冷冻保存并解冻TIL。在一些实施方式中,可以在第二个扩增步骤之前3天,冷冻保存并解冻TIL。在一些实施方式中,可以在第二个扩增步骤之前2天,冷冻保存并解冻TIL。在一些实施方式中,可以在第二个扩增步骤之前1天,冷冻保存并解冻TIL。在一些实施方式中,可以在第二个扩增步骤即刻前,冷冻保存和解冻TIL。

可以通过流式细胞术(FlowJo)以及通过本文所述的任何方法,分析输液袋TIL的冷冻保存样品的细胞表型的表面标志物CD3、CD4、CD8、CCR7和CD45RA(BD BioSciences),。通过使用标准酶联免疫吸附检测技术,测量血清细胞因子。血清IFN- γ 的升高定义为 ≥ 100 pg/mL且大于4-3基线水平。

1. 可选的患者淋巴细胞耗竭预处理

实验结果表明,过继转移肿瘤特异性T淋巴细胞之前的淋巴细胞耗竭通过消除调节性T细胞和免疫系统的竞争元件(“细胞因子沉降”)而在提高治疗功效中起关键作用。因此,本发明的一些实施方式在引入本发明的第二次扩增TIL或另外的第二次扩增TIL(例如在图11的步骤D中描述的那些,包括被称为reREP TIL的TIL)之前对患者使用淋巴耗竭步骤(有时也称为“免疫抑制调节”)。

通常,使用氟达拉滨和/或环磷酰胺(活性形式称为马磷酰胺)及其组合进行淋巴细胞耗竭。这种方法描述于Gassner et al., *Cancer Immunol Immunother.* 2011, 60(1):75-85, Muranski等, *Nat Clin Pract Oncol.*, 2006 3(12):668-681, Dudley等, *J Clin Oncol* 2008, 26:5233-5239和Dudley等, *J Clin Oncol.* 2005, 23(10):2346-2357, 所有这些文献都通过通过引用整体并入本文。

在一些实施方式中,氟达拉滨的浓度为0.5 μ g/ml-10 μ g/ml氟达拉滨(Sigma-Aldrich, MO, USA)。在一些实施方式中,氟达拉滨的浓度为1 μ g/ml氟达拉滨(Sigma-Aldrich, MO, USA)。在一些实施方式中,氟达拉滨治疗持续1天,2天,3天,4天,5天,6天或7天或更长时间。在一些实施方式中,氟达拉滨以10mg/kg/天,15mg/kg/天,20mg/kg/天,25mg/kg/天,30mg/kg/天,35mg/kg/天,40mg/kg/天或45mg/kg/天的剂量施用。在一些实施方式中,氟达拉滨治疗以35mg/kg/天持续2-7天。在一些实施方式中,氟达拉滨治疗以35mg/kg/天持续4-5天。在一些实施方式中,氟达拉滨治疗以25mg/kg/天持续4-5天。

在一些实施方式中,马磷酰胺(环磷酰胺的活性形式)的浓度为0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ -10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在一些实施方式中,马磷酰胺(环磷酰胺的活性形式)的浓度为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。在一些实施方式中,环磷酰胺治疗持续1天,2天,3天,4天,5天,6天或7天或更长时间。在一些实施方式中,环磷酰胺以100 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$,150 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$,175 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$,200 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$,225 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$,250 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$,275 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 或300 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 的剂量施用。在一些实施方式中,静脉内(即,i.v.)施用环磷酰胺。在一些实施方式中,环磷酰胺治疗以35 $\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 持续2-7天。在一些实施方式中,环磷酰胺治疗以250 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 静脉注射4-5天。在一些实施方式中,环磷酰胺治疗以250 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 静脉注射4天。

在一些实施方式中,氟达拉滨和环磷酰胺一起施用于患者。在一些实施方式中,以25 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 静脉注射施用氟达拉滨且以250 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 静脉注射施用环磷酰胺,持续4天。

该方案包括施用氟达拉滨(25 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$,静脉注射)和环磷酰胺(250 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$,静脉注射)持续4天。

2. 示例性治疗实施方式

在一些实施方式中,本公开提供了用肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群治疗癌症的方法,包括以下步骤:(a)从患者切除的肿瘤中获得第一TIL群;(b)在第一细胞培养基中进行第一TIL群的初始扩增,获得第二TIL群,其中,第二TIL群的数量比第一TIL群的数量高至少5倍,并且其中,第一细胞培养基包含IL-2;(c)在第二细胞培养基中,使用骨髓人工抗原呈递细胞(骨髓aAPC)群对第二TIL群进行快速扩增,获得第三TIL群,其中,在快速扩增开始7天后,第三TIL群的数量比第二TIL群的数量高至少50倍;并且其中,第二细胞培养基包含IL-2和OKT-3;(d)将第三TIL群的治疗有效部分施用于患有癌症的患者。在一些实施方式中,IL-2以约3000IU/mL的初始浓度且OKT-3抗体以约30ng/mL的初始浓度存在于第二细胞培养基中。在一些实施方式中,第一次扩增进行不超过14天的时间。在一些实施方式中,使用透气性容器进行第一次扩增。在一些实施方式中,使用透气性容器进行第二次扩增。在一些实施方式中,快速扩增中,第二TIL群与aAPC群的比率在1:80和1:400之间。在一些实施方式中,快速扩增中,第二TIL群与aAPC群的比率为约1:300。在一些实施方式中,待治疗的癌症选自黑素瘤、卵巢癌、宫颈癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、由人乳头瘤病毒引起的癌症、头颈癌、肾癌和肾细胞癌组成的组。在一些实施方式中,待治疗的癌症选自黑素瘤、卵巢癌和宫颈癌。在一些实施方式中,待治疗的癌症是黑素瘤。在一些实施方式中,待治疗的癌症是卵巢癌。在一些实施方式中,待治疗的癌症是宫颈癌。在一些实施方式中,治疗癌症的方法还包括在将第三TIL群施用于患者之前用非骨髓性淋巴细胞耗竭方案治疗患者的步骤。在一些实施方式中,非骨髓性淋巴细胞耗竭方案包括以60 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 的剂量施用环磷酰胺两天,然后以25 $\text{mg}/\text{m}^2/\text{天}$ 的剂量施用氟达拉滨五天的步骤。在一些实施方式中,高剂量IL-2方案包括:每8小时静脉内滴注600,000或720,000IU/kg的阿地白介素或其生物仿制药或变体15分钟,直至耐受。

3. 共同施用方法

在一些实施方式中,如本文步骤A至F中所述产生的TIL可以与一种以上免疫检查点调节剂组合施用,例如下文描述的抗体。例如,靶向PD-1并且可以与本发明的TIL共同施用的抗体包括例如但不限于nivolumab(BMS-936558,Bristol-Myers Squibb;Opdivo[®]),

pembrolizumab (lambrolizumab, MK03475或MK-3475, Merck; Keytruda[®]), 人源化抗PD-1抗体JS001 (ShangHai JunShi), 单克隆抗PD-1抗体TSR-042 (Tesarro, Inc.), Pidilizumab (抗PD-1mAb CT-011, Medivation), 抗PD-1单克隆抗体BGB-A317 (BeiGene) 和/或抗PD-1抗体SHR-1210 (ShangHai HengRui), 人单克隆抗体REGN2810 (Regeneron), 人单克隆抗体MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb), 和/或人源化抗PD-1IgG4抗体PDR001 (Novartis)。在一些实施方案中, PD-1抗体来自克隆: RMP1-14 (大鼠IgG) -BioXcell目录号BP0146。适用于根据本文所述步骤A至F产生的TIL的共同施用方法的其它合适的抗体是美国专利号8,008,449中公开的抗PD-1抗体, 其通过引用并入本文。在一些实施方案中, 抗体或其抗原结合部分特异性结合PD-L1并抑制其与PD-1的相互作用, 从而增加免疫活性。任何本领域已知的与PD-L1结合并破坏PD-1和PD-L1之间相互作用并刺激抗肿瘤免疫应答的抗体, 均适合用于根据本文所述步骤A至F产生的TIL的共同施用方法。例如, 靶向PD-L1并且处于临床试验中的抗体包括BMS-936559 (Bristol-Myers Squibb) 和MPDL3280A (Genentech)。靶向PD-L1的其他合适的抗体公开于美国专利号7,943,743中, 其通过引用并入本文。本领域普通技术人员将理解, 任何与PD-1或PD-L1结合、破坏PD-1/PD-L1相互作用并刺激抗肿瘤免疫反应的抗体, 均适合用于根据本文所述步骤A至F产生的TIL的共同施用方法。在一些实施方案中, 当患者具有难以用单独施用抗PD-1抗体治愈的癌症类型时, 施用根据步骤A至F产生的TIL组合的受试者被共同施用抗PD-1抗体。在一些实施方案中, 当患者患有重构黑素瘤 (refractory melanoma) 时, 向患者施用与抗PD-1组合的TIL。在一些实施方案中, 当患者患有非小细胞肺癌 (NSCLC) 时, 向患者施用与抗PD-1组合的TIL。

4. 过继性细胞转移 (Adoptive Cell Transfer)

过继性细胞转移 (ACT) 是一种非常有效的免疫治疗形式, 涉及将具有抗肿瘤活性的免疫细胞转移到癌症患者体内。ACT是涉及体外识别具有抗肿瘤活性的淋巴细胞、将这些细胞体外扩增至大量并将其输注到携带癌症的宿主中的一种治疗方法。用于过继转移的淋巴细胞可以来自切除肿瘤的基质 (肿瘤浸润淋巴细胞或TIL)。可以如本文所述制备用于ACT的TIL。在一些实施方案中, 例如根据图11中描述的方法制备TIL。如果它们经遗传工程改造以表达抗肿瘤T细胞受体 (TCR) 或嵌合抗原受体 (CAR)、富含混合淋巴细胞肿瘤细胞培养物 (MLTC) 或使用自体抗原呈递细胞和肿瘤衍生肽克隆, 它们也可以来自血液。淋巴细胞来源于要输注的患癌宿主的ACT称为自体ACT。美国公开号2011/0052530涉及进行过继性细胞疗法以促进癌症消退的方法, 主要用于治疗患有转移性黑素瘤的患者, 其被整体引用并入本文。

在一些实施方案中, TIL可以如本文所述施用。在一些实施方案中, TIL可以单剂量施用。这种施用可以通过注射, 例如静脉内注射。在一些实施方案中, TIL和/或细胞毒性淋巴细胞可以多剂量施用。剂量可以是每年一次, 两次, 三次, 四次, 五次, 六次或六次以上。剂量可以是每月一次, 每两周一次, 每周一次, 或每隔一天一次。只要需要, TIL和/或细胞毒性淋巴细胞的施用可以继续。

I、示例性实施方式

在一个实施方案中, 本发明提供了一种用于扩增肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的方法, 包括:

- (a) 从患者切除的肿瘤中获得第一TIL群;

(b) 在第一细胞培养基中,进行第一TIL群的初始扩增,获得第二TIL群,其中,第一细胞培养基包含IL-2;

(c) 进行第二TIL群的迅速扩增,其中,第三TIL群的数量比第二TIL群高至少100倍;并且其中,第二细胞培养基包含IL-2、OKT-3和外周血单个核细胞(PBMC),其中,快速扩增进行至少14天;

(d) 从第二细胞培养基中移除细胞,并任选地将细胞冷冻保存在储存培养基中,获得第三细胞群;

(e) 任选解冻第三细胞群;以及

(f) 在第三细胞培养基中,对第三TIL群进行第二次快速扩增,其中,第三细胞培养基包含IL-2、OKT-3和外周血单核细胞(PBMC),其中,第二次快速扩增进行至少14天,获得第四TIL群,其中,第四TIL群相对于第二TIL群表现出增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;

(g) 任选地,重复步骤(f)一次以上。

在一个实施方案中,本发明提供的所述再刺激的细胞表达CD4、CD8和TCR $\alpha\beta$ 的水平与新鲜收获的细胞相似。

在一个实施方案中,本发明提供的所述reREP培养基包含外周血单核细胞(PBMC)。

在一个实施方案中,本发明提供在第9至第17天的任何一天将所述PBMC加入TIL中。在一些实施方案中,本发明提供在第9、10、11、12、13、14、15、16和/或17天将所述PBMC加入TIL中。

在一个实施方案中,本发明提供的所述reREP培养基包含aAPC。

在一个实施方案中,本发明提供了用包含编码高亲和力T细胞受体的核酸的表达载体转导冷冻保存的TIL。

在一个实施方案中,本发明提供了用表达载体转导冷冻保存的TIL,所述表达载体包含编码嵌合抗原受体(CAR)的核酸,所述嵌合抗原受体包含与T细胞信号传导分子的内结构域融合的免疫球蛋白轻链。

在一个实施方案中,本发明提供将再刺激的TIL注入患者体内。

在一个实施方案中,本发明提供步骤(d)还包括从第二细胞培养基中移除细胞。

在一个实施方案中,本发明提供重复步骤(f)足够次数,获得足够的TIL用于所述TIL的治疗剂量。

在一个实施方案中,本发明提供了根据上述和于此所述方法制备的再刺激TIL群。

在一个实施方案中,本发明提供根据权利要求1的方法制备的再刺激的TIL群,其中与所述解冻的冷冻保存的TIL相比,所述再刺激的TIL基础糖酵解增加至少两倍。

在一个实施方案中,本发明提供了评估TIL细胞群的代谢活性的方法,包括测量所述细胞的基础糖酵解。

在一个实施方案中,本发明提供了评估TIL细胞群的代谢活性的方法,包括测量所述细胞的基础呼吸。

在一个实施方案中,本发明提供了评估TIL细胞群的代谢活性的方法,包括测量所述细胞的备用呼吸容量(SRC)。

在一个实施方案中,本发明提供了评估TIL细胞群的代谢活性的方法,包括测量所述细

胞的糖酵解储备。

在一个实施方案中,本发明提供了用肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)群治疗患者的癌症的方法,包括以下步骤:

- (a) 从所述患者获得原代TIL群;
- (b) 迅速扩增所述原代TIL群,形成扩增的TIL群;
- (c) 冷冻保存所述扩增的群,形成冷冻保存的TIL群;
- (d) 解冻所述冷冻保存的TIL群;
- (e) 在含有IL-2和抗CD3抗体的培养基中,培养所述冷冻保存的TIL群,形成reREP TIL群;以及
- (f) 向所述患者施用治疗有效量的reREP TIL细胞。

在一个实施方案中,本发明提供了扩增肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的方法,包括:

- (a) 从患者切除的肿瘤中获得第一TIL群;
- (b) 在第一细胞培养基中,进行第一TIL群的初始扩增,获得第二TIL群,其中,第一细胞培养基包含IL-2;
- (c) 进行第二TIL群的迅速扩增,其中,第三TIL群的数量比第二TIL群高至少100倍;并且其中,第二细胞培养基包含IL-2、OKT-3和外周血单核细胞(PBMC),其中,快速扩增进行至少14天;

(d) 从第二细胞培养基中移除细胞,并任选地将细胞冷冻保存在储存培养基中,获得第三细胞群;

(e) 任选地解冻第三细胞群;

(f) 在第三细胞培养基中,进行第三TIL群的第二次快速扩增,其中,第三细胞培养基包含IL-2、OKT-3和外周血单核细胞(PBMC),其中,第二次快速扩增进行至少14天,获得第四TIL群,其中,第四细胞群相对于第二TIL群表现出增加的效应T细胞和/或中枢记忆T细胞的亚群;以及

(g) 向所述患者施用治疗有效量的reREP TIL细胞。

在一个实施方案中,本发明提供步骤(d)还包括从第二细胞培养基中移除细胞。

在一个实施方案中,本发明提供重复步骤(f)足够次数,获得足够的TIL用于所述TIL的治疗剂量。

实施例

实施例1:再刺激方案

如本文所讨论的,收获或解冻REP中生长的TIL后,利用新鲜抗原再刺激发展再刺激方案和检测。

此实施例的目的是在再刺激检测中测试后-REP(post REP)肿瘤浸润淋巴细胞的增殖/扩增。用同种异体PBMC饲养细胞、抗CD3(克隆OKT3)抗体和白细胞介素-2(IL-2)再刺激后-REP TIL(根据图11的步骤D后TIL)。在第7天对活细胞计数并记录。

将后-REP TIL(根据图11的步骤D后TIL)输注到先前被淋巴细胞耗竭以促进TIL体内存活和扩增的患者中。一旦将TIL重新输注到患者体内,他们遇到抗原导致TIL的活化,但TIL根本上是短期的。在ACT期间通过接触抗原以及暴露于IL-2对TIL的再刺激,可能导致TIL增殖和肿瘤控制,或者由于缺乏适当的共刺激,可能经由细胞凋亡(活化诱导的细胞死亡)或

诱导非增殖(无免疫性)状态而导致耗尽(deletion)。不受理论束缚,用同种异体PBMC饲养细胞再刺激后-REP TIL(再刺激例如根据图11的步骤D后TIL)可以通过提供抗原刺激和TIL扩增所必需的细胞因子来模拟体内过程。通过饲养细胞MNC上的膜受体来激活后-REP TIL(根据图11的步骤D后TIL),膜受体与抗CD3(克隆OKT3)抗体结合并与REP烧瓶中的TIL交联,刺激TIL扩增。

再刺激检测中后-REP肿瘤浸润淋巴细胞的增殖/扩增

用同种异体PBMC饲养细胞、抗CD3(克隆OKT3)抗体和白细胞介素-2(IL-2)再刺激后-REP TIL(根据图11步骤D后TIL)。在第7天对活细胞计数并记录。

在一些实施例中,该过程还可以应用于测试或验证当前的REP方案。

表3:定义和缩写

缩写	定义
μl	微升
AOPI	吡啶橙碘化丙啶
BSC	生物安全柜
BSL2	生物安全等级 2
CM1	TIL 的完全培养基, # 1
CM2	TIL 的完全培养基, # 2; CM1 和 AIM-V 的 50: 50 混合物
GMP	生产质量管理规范
Gy	灰色
IPA	异丙醇
LN2	液氮
MNC; PBMC	单核细胞; 外周血单核细胞
ml	毫升
NA	不适用
NR	不需要
OKT3	MACS [®] GMP CD3 纯(克隆 OKT3) 抗体
PPE	个人防护设备
Pre-REP	来源于肿瘤碎片的初始 TIL 培养物
REP	快速扩增方案
SDBB	圣地亚哥血库
TIL	肿瘤浸润淋巴细胞

表4:材料

产品	规格	供应商	目录 #	存储
AIM-V	GMP	Gibco™/Life Technologies	087-0112DK	2-8°C
Cellometer ViaStain™ AOPI 染色液	NA	Nexcelom	CS2-0106	2-8°C
一次性血细胞计数器	NA	Nexcelom	CP2-001	RT
CM1	按照实施例 5 制备	NA	NA	2-8°C
GMP 重组人 IL-2 (rhIL-2)	按照实施例 4 制备的 6×10^6 IU/ml 储备溶液	CellGenix	1020-1000	-20°C
MACS® GMP CD3 纯(克隆 OKT3) 抗体	GMP	Miltenyi Biotec	170-076-116	2-8°C
50ml 锥形管	无菌	Any in use		RT
转移移液管	无菌	Any in use		RT
500ml 过滤系统	无菌	EMD/Millipore or equivalent	SCGPU05RE 或等同物	RT
24 孔组织培养板	无菌	Greiner or equivalent	662160 或等同物	RT
5ml、10ml 血清移液管	无菌	任何在用的		RT
移液器吸头	无菌	任何在用的		RT

表5: 样本

样本	规格	来源	参考编号	存储
冷冻保存和 γ 辐照的 MNC 饲养细胞 批次	存放在冰箱里	SDBB	NA	NA
后-REP TIL 细胞	新鲜或冷冻在冰箱	Iovance Biotechnologies	NA	NA

将后-REP (根据图11的步骤D后TIL) TIL输注到先前被淋巴细胞耗竭以促进TIL体内存活和扩增的患者中。一旦将TIL重新输注到患者体内,他们遇到抗原导致TIL活化,但TIL根本上是短期的。在ACT期间通过接触抗原以及暴露于IL-2对TIL的再刺激,可能导致TIL增殖和肿瘤控制,或者由于缺乏适当的共刺激,可能经由细胞凋亡(活化诱导的细胞死亡)或诱导非增殖(无免疫性)状态导致耗尽。我们的假设是:用同种异体PBMC饲养细胞再刺激后-REP TIL,通过提供抗原刺激和TIL扩增所必需的细胞因子,来模拟体内过程。通过饲养细胞MNC上的膜受体来激活后-REP TIL,膜受体与抗CD3(克隆OKT3)抗体结合并与REP烧瓶中的TIL交联,刺激TIL扩增。

步骤

将新鲜的后-REP (根据图11的步骤D后TIL) 或解冻的冷冻后-REP (根据图11的步骤D后TIL) TIL在CM1培养基中洗涤一次。将Re-REP (根据图11重复步骤D) 设置在24孔组织培养板中,CM2中具有 2×10^6 个MNC饲养细胞、30ng/ml OKT3、 1×10^4 个REP后TIL和3,000IU/ml rhIL-2。将培养物在5%CO₂、37°C加湿培养箱中培养7天,此时检测活细胞恢复和活力。基于活细胞计数计算TIL的倍数扩增。

ReREP-第0天

制备TIL

从新鲜的后-REP或冷冻的后-REP获得TIL。从培养箱中取出TIL培养物并转移至BSC。接下来,取出200 μ l使用Cellometer K2进行细胞计数。记录计数。

制备饲养细胞

该方案最低需要 20×10^6 个饲养细胞。通过SDBB冷冻的每个1ml小瓶在冷冻时具有 100×10^6 个活细胞。假设从LN2储存解冻后恢复50%,建议每批解冻至少两个饲养细胞小瓶,每个REP估计有 100×10^6 个活细胞。在解冻饲养细胞之前,对于每个测试的饲养细胞批次,预加热约50ml不含rhIL-2的CM2。将指定的饲养细胞批次小瓶从LN2储存中取出并置于冰上。将小瓶转移至组织培养室。将小瓶在37 $^{\circ}$ C水浴中解冻。将小瓶转移至BSC并用70%EtOH或IPA喷洒或擦拭。使用移液管将饲养小瓶的内容物立即转移到50mL锥形管中的50mL温热的CM2中。取出200 μ l使用Cellometer K2进行细胞计数。记录计数。将细胞以 $350 \times g$ 离心10分钟。在温热的CM2中具有 2×10^6 个细胞/ml加3000IU/ml rhIL-2,按所需体积吸取上清液和再悬浮的细胞。

制备CM2+3000IU/ml工作溶液

根据所需条件制备足够量的CM2。每个孔含有2ml的CM2。每孔用3000IU/mL的rhIL-2补充CM2。每100ml CM2需要取自 6×10^6 IU/mL的储备溶液50 μ l。

制备MACS[®]GMP CD3纯(OKT3)工作溶液

从4 $^{\circ}$ C冰箱中取出OKT3的储备溶液(1mg/ml)。在REP中使用终浓度为30ng/ml的OKT3。每个24孔中2ml的CM2培养基需要60ng的OKT3。一式三份培养TIL+饲养细胞、单独TIL以及单独饲养细胞的情况。对于每个测试的饲养批次,制备1000 μ l的1:1000稀释的1mg/ml OKT3,工作浓度为1 μ g/ml (1,000ng/ml)。对于9个孔,10000 μ l的1:1000稀释的1mg/ml OKT3。制备1 μ l的1mg/ml OKT3+999 μ l的具有3000IU/ml IL-2的CM2。

制备24孔板和共培养物

每个测试的ReREP需要24孔板的9个孔。

每个板均标记有实验名称、饲养批次#、后-REP TIL番号、日期和操作者首字母。每个板装有表8中列出的组分。加入每种组分,每孔加入总共2ml,并将板置于37 $^{\circ}$ C培养箱中。使用1ml移液器小心地将板混合3次。

表6:24孔板中的REP设置

24孔板的单孔加入顺序	TIL+饲养细胞+OKT3	TIL+OKT3	饲养细胞+OKT3
TIL细胞 ($1 \times 10^4/0.5$ ml), 在CM2+IL-2中	500 μ l	500 μ l	-
PBMC饲养细胞 ($2 \times 10^6/1$ ml), 在CM2+IL-2中	1000 μ l	-	1000 μ l
OKT3 (1000 ng/ml), 在CM2+IL-2中	60 μ l	60 μ l	60 μ l
CM2+IL-2	440 μ l	1440 μ l	940 μ l
总体积	2000 μ l	2000 μ l	2000 μ l

培养基交换——第5天

用3000IU/ml rhIL-2制备CM2。需要10ml。从每个孔中取出1ml培养基并弃去。用1ml移

液器将1ml温热的CM2(具有3000IU/mL rhIL-2)转移至每个孔中。将板放回培养箱中。

收获——第7天

使用1ml血清移液管,混合每个孔以破碎任何细胞团块。通过移液器吹吸彻底混合细胞悬浮液后,取出200 μ l使用Cellometer K2进行细胞计数。对TIL+饲养细胞+OKT3、TIL+OKT3以及饲养细胞+OKT3的所有情况进行计数并记录。

除了24孔ReREP之外,还在4个直立T25组织培养瓶中建立单独的reREP,T25组织培养瓶中在CM2中具有 1.3×10^7 个MNC饲养细胞、30ng/ml OKT3、 0.65×10^5 pre-REP TIL加上3,000IU/ml rhIL-2。注:请参考用于LN-144快速扩增方案的经辐照的同种异体饲养细胞的评价(实施例6)。

用于功能测定的细胞分配:

表7:检测

功能检测	细胞数目/培养上清液
流式细胞仪 分型	10^6
效价——P815effLuc-eGFP	40^6
颗粒酶-B、IFN- γ 的再刺激检测	5^6
代谢作用	2^6
TCR 测序	1^6
TIL+饲养细胞以及单独饲养细胞的存储培养上清液 用于 Multiplex ELISA	1 ml

评价/接受标准

表8:使用的接受标准

检测	接受标准
TIL扩增	用饲养细胞将后-REP TIL扩增至少50-200倍
单独的PBMC饲养细胞	饲养细胞的总存活数没有增加且降低至少20%

参考程序——包含在下面的实施例中

表9:参考程序

	名称	实施例编号
	用 Cellometer K2 细胞计数器对 TIL 培养物进行细胞计数和测定活力	实施例 2
	IL-2 储备溶液的制备 (CellGenix)	实施例 4
	CM 培养基配制	实施例 5
	用于 LN-144 快速扩增方案的经辐照的同种异体饲养细胞的评价	实施例 6
	后-REP 之后,肿瘤浸润淋巴细胞的扩展表型 (Extended Phenotype)	实施例 6
	验证后-REP 冷冻 FIL 产品	实施例 8 和实施例 9

实施例2:使用CELLOMETER K2细胞计数器对细胞培养物进行细胞计数和测定活力

此实施例提供了关于Cellometer K2Image Cytometer自动细胞计数器的操作如何实施的示例性说明。

范围:细胞培养物的细胞总数和活力的测定。

表10:定义

μl	微升
AOPI	吖啶橙碘化丙啶
BSC	生物安全柜
DPBS	Dulbecco 的磷酸盐缓冲盐水
ml	毫升
MNC	单核血细胞
NA	不适用
PBMC	外周血单核细胞
PPE	个人防护设备
Pre-REP	培养物的快速扩增方案之前的初始 TIL 培养
REP	快速扩增方案
TIL	肿瘤浸润淋巴细胞

步骤

制备细胞悬液

制备台盼蓝

台盼蓝终浓度为0.1%。制造商建议制备0.2%的储备溶液。当在Cellometer K2上使用台盼蓝时,将用PBS制备的储备溶液(0.4%)稀释至0.2%。台盼蓝用0.2-0.4微米过滤器过滤,并以小体积等分到标记的加盖管中。将细胞悬液与0.2%台盼蓝以1:1混合。

制备AOPI

当在Cellometer K2上使用AOPI时,获得AOPI溶液。用AOPI溶液以1:1对细胞样品进行染色。注:当对高浓度培养物进行计数时,在用台盼蓝或AOPI进行最终1:1稀释之前,在细胞培养基中稀释细胞样品。使用制造商建议的计数范围确定使用的最佳稀释度。

Cellometer K2设置

开启Cellometer K2设备。在关联的计算机显示器上选择Cellometer Image Cytometer图标。在软件的主屏上,选择下拉框中列出的其中一个Assay(检测)。当选定适当的Assay(检测)时,Cell Type(细胞类型)和Image Mode(图像模式)会自行填充。在“Sample(样品)”部分下,单击Set User/Sample ID(设置用户/样品ID)以打开另一个屏幕,输入样品的操作员信息。输入“User ID(用户ID)”。这包括用户的三个字母缩写。输入“Sample ID(样品ID)”。样本ID来自进入的样本信息。

设置稀释参数

当除了1:1混合之外没有进行其它稀释时,稀释因子是2。当在最终的1:1混合之前进行稀释时,稀释因子是先前稀释的2倍。稀释因子根据使用的混合物而更新。

细胞计数

除去Cellometer计数室载玻片(SD100)两侧的塑料背衬,并将其置于干净的无绒擦拭

物上。在制备细胞悬浮液后,取出一小部分样品并转移到多孔细胞培养板的孔或管中。当稀释样品时,使用细胞培养基进行稀释。将20 μ l细胞悬浮液加入多孔细胞培养板的孔或管中。将20 μ l 0.2%台盼蓝或AOPI溶液加入到20 μ l细胞悬浮液中,并将样品充分混合。测量20 μ l 1:1溶液并将其转移到计数室的一侧。注:避免触摸载玻片的清晰区域。根据需要,在载玻片的另一侧重复样品。将腔室插入Cellometer前面的槽中。对于AOPI细胞计数,在主屏上选择“Preview F1(预览F1)”以预览绿色荧光图像(活细胞)图像。对于台盼蓝计数,选择“Preview Brightfield(预览明场)”。聚焦轮用于使图像达到最佳聚焦。细胞具有明亮的中心和清晰的边缘。选择“Count(计数)”开始计数过程。结果显示在计算机屏幕上的计数结果弹出框中,显示计数过程的结果。

实施例3:CELLOMETER K2IMAGE CYTOMETER自动细胞计数器

该实施例描述了Cellometer K2Image Cytometer自动细胞计数器的操作程序。

1. 定义

μ l	微升
AOPI	吖啶橙丙锭碘
BSC	生物安全柜
DPBS	Dulbecco的磷酸盐缓冲盐水
mL	毫升
MNC	单核血细胞
NA	不适用
PBMC	外周血单核细胞
PPE	个人防护装备
Pre-REP	培养物的快速扩增方案之前的初始TIL培养
REP	快速扩增方案
TIL	肿瘤浸润淋巴细胞

7. 步骤

7.1 制备细胞悬液

7.1.1 制备台盼蓝

台盼蓝终浓度为0.1%。制造商建议制备0.2%的储备溶液。

7.1.1.1 当在Cellometer K2上使用台盼蓝时,将储备溶液(0.4%)用PBS稀释至0.2%。

7.1.1.2 用0.2-0.4微米过滤器过滤台盼蓝,并以小体积等分到标记的加盖管中。

7.1.1.3 将细胞悬液与0.2%台盼蓝以1:1混合。

7.1.2 制备AOPI

7.1.2.1 当在Cellometer K2上使用AOPI时,获得AOPI溶液。

7.1.2.2 用AOPI溶液以1:1对细胞样品染色。

注:当计数高浓度培养物时,在用台盼蓝或AOPI进行最终1:1稀释之前,在细胞培养基中稀释细胞样品。

使用制造商建议的计数范围确定使用的最佳稀释度。

7.2 Cellometer K2设置

7.2.1 开启Cellometer K2设备。

7.2.2在关联的计算机显示器上选择Cellometer Image Cytometer图标。

7.2.3在软件的主屏上,选择下拉框中列出的其中一个Assay (检测)。

7.2.3.1当选择适当的Assay (检测)时,Cell Type (细胞类型) 和Image Mode (图像模式) 会自行填充。

7.2.3.2在“Sample (样品)”部分下,选择Set User/Sample ID(设置用户/样品ID)以打开另一个屏幕,输入样品的操作员信息。

7.2.3.2.1输入“User ID (用户ID)”。

7.2.3.2.2输入“Sample ID (样品ID)”。样本ID来自进入的样本信息。

7.2.3.3设置稀释参数。

7.2.3.3.1当除了1:1混合物外没有进行其他稀释时,稀释因子为2。

7.2.3.3.2当在最终的1:1混合物之前进行稀释时,稀释因子是先前稀释的2倍。

7.2.3.3.3根据屏幕的稀释部分中使用的混合物,更新稀释因子。选择铅笔图标以显示对话框屏幕。

7.2.3.3.4验证了F1 Image (F1图像) 和F2Image (F2图像) 部分彼此相同。

7.2.3.3.5设置完成后选择“Save (保存)”按钮。

7.3细胞计数

7.3.1除去Cellometer计数室载玻片(SD100)两侧的塑料背衬,并将其置于干净的无尘擦拭物上。

7.3.2制备细胞悬浮液后,取出一小部分样品并转移到多孔细胞培养板的孔或管中。

7.3.3当稀释样品时,使用细胞培养基进行稀释。

7.3.4将20 μ l细胞悬浮液加入多孔细胞培养板的孔或管中。

7.3.5将20 μ l 0.2%台盼蓝或AOPI溶液加入到20 μ l细胞悬浮液中,并充分混合样品。

7.3.6测量20 μ l的1:1溶液并将其转移到计数室的一侧。

注意:避免触摸载玻片的清晰区域。

7.3.7根据需要,在载玻片的另一侧重复样品。7.3.8.将腔室插入Cellometer前面的槽中。

7.3.8对于AOPI细胞计数,在主屏幕上选择“Preview F1 (预览F1)”以预览绿色荧光图像(活细胞)图像。对于台盼蓝计数,选择“Preview Brightfield (预览明场)”。

7.3.9聚焦轮用于使图像达到最佳聚焦。细胞具有明亮的中心和清晰的边缘。

7.3.10选择“Count (计数)”开始计数过程。

7.3.11结果显示在计算机屏幕上的计数结果弹出框中,显示计数过程的结果。

实施例4:IL-2储备溶液 (CELLGENIX) 的制备

该实施例描述了IL-2储备溶液的示例性制备步骤。

定义/缩写

μ L:微升或 μ l

BSC:生物安全柜

BSL2:生物安全等级2

D-PBS:Dulbecco的磷酸盐缓冲盐水

G:容量规格 (Gauge)

GMP:生产质量管理规范

HAc:乙酸

HSA:人血清白蛋白

mL:毫升

NA:不适用

PPE:个人防护装备

rhIL-2; IL-2:重组人白细胞介素-2

COA:分析证书

6. 步骤

6.1 制备0.2%乙酸溶液 (HAc)。

6.1.1 将29mL无菌水加至50mL锥形管中。

6.1.2 将1mL 1N乙酸加至50mL锥形管中。

6.1.3 通过倒置管混合2-3次。

6.1.4 使用Steriflip过滤器过滤灭菌HAc溶液。

6.1.5 将溶液加盖、标注日期并标记“无菌0.2%乙酸溶液”。

6.1.6 溶液2个月后过期。在室温下储存。

6.2 制备PBS中的1%HSA。

6.2.1 在150mL无菌过滤装置中,向96mL PBS中加入4mL 25%HAS储备溶液。

6.2.2 过滤后的溶液。

6.2.3 加盖、标注日期并标记溶液“PBS中1%HSA”。

6.2.4 溶液2个月后过期。4℃储存。

6.3 记录制备的每瓶rhIL-2。

6.4 制备的rhIL-2储备溶液 (6×10^6 IU/mL终浓度)

6.4.1 每批rhIL-2不同,并且要求在制造商的分析证书 (COA) 中找到信息,例如:

6.4.1.1 每瓶rhIL-2的质量 (mg)

6.4.1.2 rhIL-2的比活 (IU/mg)

6.4.1.3 推荐的0.2%HAc重溶体积 (reconstitution volume) (mL)

6.4.2 使用下面的等式计算rhIL-2批次所需的1%HSA的体积:

$$\left(\frac{\text{小管质量 (mg)} \times \text{生物活性} \left(\frac{\text{IU}}{\text{mg}} \right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - \text{HAc 体积(mL)} = 1\% \text{ HSA 体积(mL)}$$

6.4.2.1 例如,根据CellGenix的rhIL-2批次10200121COA,1mg小瓶的比活为 25×10^6 IU/mg。它建议在2mL 0.2%HAc中重溶rhIL-2。

$$\left(\frac{1\text{mg} \times 25 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mg}}}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - 2\text{mL} = 2.167\text{mL HSA}$$

6.4.3 用酒精擦拭IL-2小瓶的橡胶塞。

6.4.4 使用连接在3mL注射器上的16G针头,将推荐体积的0.2%HAc注入小瓶中。

当撤回针头时,注意不要移动塞子。

6.4.5倒置小瓶3次并旋转直至所有粉末溶解。

6.4.6小心地取下塞子,并放在旁边的酒精擦拭物上。

6.4.7向小瓶中添加计算体积的1%HSA。

6.4.8用橡皮塞盖住小瓶。

6.5 rhIL-2溶液的储存

6.5.1对于短期储存(<72小时),将小瓶储存在4℃。

6.5.2对于长期储存(>72小时),将小瓶等分成较小的体积并储存在-20℃的冷冻瓶中直至准备使用。避免反复冻结/解冻。制备日期后6个月过期。

6.5.3 Rh-IL-2标签包括供应商和目录号、批号、有效期、操作员姓名、浓度和等分试样的体积。

实施例5:制备用于PRE-REP和REP过程的培养基

此实施例描述了制备用于方案的组织培养基的方法,所述方案涉及来自各种肿瘤类型的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的培养,肿瘤类型包括但不限于转移性黑素瘤、头颈部鳞状细胞癌、卵巢癌、三阴性乳腺癌和肺腺癌。在许多情况下,该培养基用于制备本申请和实施例中描述的任何TIL。

定义

μg:微克

μm:微米

μM:微摩尔

AIM-V®:无血清组织培养基(Thermo Fisher Scientific)

BSC:生物安全柜

CM1:完全培养基#1

CM2:完全培养基#2

CM3:完全培养基#3

CM4:完全培养基#4

IU或U:国际单位

mL:毫升

mM:毫摩尔

NA:不适用

PPE:个人防护用品

Pre-REP:前-快速扩增过程

REP:快速扩增过程

rhIL-2、IL-2:重组人白细胞介素-2

RPMI1640:Roswell Park Memorial Institute培养基,配方1640

SOP:标准操作程序

TIL:肿瘤浸润淋巴细胞

7步骤

7.1所有程序均在BSC(II类,A2类)中使用无菌技术完成。

- 7.1.1在使用前在罩子表面喷洒70%乙醇。
- 7.1.2所有物品和试剂在放入组织培养罩前均喷洒70%乙醇。
- 7.2等分200mM L-谷氨酰胺
- 7.2.1提供的L-谷氨酰胺的体积大于制备血清所需的体积(例如,100ml或500ml体积)。
- 7.2.2在37°C水浴中解冻瓶装L-谷氨酰胺。
- 7.2.3解冻后混合L-谷氨酰胺,因为它解冻后会沉淀。确保在等分试样之前所有沉淀物都已回到溶液。
- 7.2.4将5-10ml等分的L-谷氨酰胺置于无菌的15ml锥形管中。
- 7.2.5对管标记浓度、供应商、批号、等分日期和有效期。
- 7.2.6将管储存在-20°C并根据需要拿出以进行培养基制备。
- 7.3 CM1的制备
- 7.3.1从冷藏库中取出以下试剂,并在37°C水浴中加热:
- 7.3.1.1 RPMI1640
- 7.3.1.2 人AB血清
- 7.3.1.3 200mM L-谷氨酰胺
- 7.3.2将BME从4°C储存中取出并置于组织培养罩中。
- 7.3.3将庆大霉素储备溶液从室温储放入组织培养罩中。
- 7.3.4根据下表11,将每种成分以适合过滤的体积加入0.2 μ m过滤器单元的顶部,制备CM1培养基。

表11:CM1的制备

成分	最终浓度	最终体积 500 ml	最终体积 1L
RPMI1640	NA	450 ml	900 ml
人体 AB 血清, 热灭活 10%	50ml	100 ml	
200mM L-谷氨酰胺	2mM	5 ml	10 ml
55mM BME	55 μ M	0.5 ml	1 ml
50mg/ml 庆大霉素硫酸 盐	50 μ g/ml	0.5 ml	1 ml

7.3.5标记CM1培养基瓶的名称、制备者的首字母、过滤/制备日期、两周的有效期,储存在4°C直至组织培养所需。根据需要培养基等分到小体积瓶中。

7.3.6将任何剩余的RPMI1640、人AB血清或L-谷氨酰胺储存在4°C直至下一次制备培养基。

7.3.7将BME储备瓶放回4°C储存。

7.3.8将庆大霉素储备瓶放回适当的RT储存位置。

7.3.9由于培养基的缓冲能力有限,制备后不超过两周内丢弃CM1,或者当酚红pH值指示剂显示出极端pH变化(亮红色到粉红色)时。

7.3.10在使用当天,将所需量的CM1在37°C水浴中加热,并加入6000IU/ml IIL-2。

7.3.11 另外补充-根据需要

7.3.11.1 CM1 补充有 GlutaMAX[®]

7.3.11.1.1 通过用 2mM GlutaMAXTM 替代 2mM 谷氨酰胺 (最终浓度, 参见表 2) 制备 CM1。当完成时, 将培养基瓶标记添加“2mM GlutaMAX”以防止与 CM1 的标准制剂混淆。

7.3.11.2 CM1 补充有另外的抗生素/抗真菌剂

7.3.11.2.1 一些 CM1 制剂需要另外的抗生素或抗真菌剂以防止由某些肿瘤类型生长的 pre-REP TIL 的污染。

7.3.11.2.2 将抗生素/抗真菌剂加到如下表 12 中所示的最终浓度。

7.3.11.2.3 完成后, 通过添加另外的抗生素/抗真菌剂的名称来标记培养基瓶, 以防止与 CM1 的标准制剂混淆。

表 12: 根据需要, CM1 的另外的补充

补充	储备浓度	稀释	最终浓度
GlutaMAX TM	200mM	1: 100	2mM
青霉素/链霉素	10,000 U/ml 青霉素 10,000µg/ml 链霉素	1: 100	100 U/ml 青霉素 100 µg/ml 链霉素
两性霉素 B	250µg/ml	1: 100	2.5µg/ml

8.1 CM2 的制备

8.1.1 按照上述实施例, 从冰箱中取出准备好的 CM1 或准备新鲜的 CM1。

8.1.2 从冰箱中取出 AIM-V[®]。

8.1.3 将制备的 CM1 与等体积的 AIM-V[®] 混合在无菌培养基瓶中以制备所需的 CM2 量。

8.1.4 使用当天, 将 3000 IU/ml IL-2 加入 CM2 培养基中。

8.1.5 使用当天, 制备足够量的具有 3000 IU/ml IL-2 的 CM2。

8.1.6 标记 CM2 培养基瓶的名称、制备者的首字母、过滤/制备的日期、两周的有效期, 并储存在 4°C 直至组织培养所需。根据需要将培养基等分到小体积瓶中。

8.1.7 将任何没有 IL-2 的 CM2 送回冰箱, 将其在冰箱中储存至多两周, 或直到酚红 pH 值指示剂显示 pH 值发生极端变化 (亮红色到粉红色)。

8.2 CM3 的制备

8.2.1 在需要使用的当天准备好 CM3。

8.2.2 CM3 与 AIM-V[®] 培养基相同, 使用当天补充 3000 IU/ml IL-2。

8.2.3 通过将 IL-2 储备溶液直接添加到 AIM-V 的瓶子或袋子中, 制备足以满足实验需要的 CM3 量。轻轻摇晃混合均匀。加至 AIM-V 后立即将瓶子标记“3000 IU/ml IL-2”。当有过量 CM3 时, 将其在瓶中储存在 4°C, 标记有培养基名称、制备者的首字母、培养基的制备日期及其有效期 (制备后 7 天)。

8.2.4 在 4°C 下储存 7 天后, 丢弃补充有 IL-2 的培养基。

8.3 CM4 的制备

8.3.1 CM4 与 CM3 相同, 另外补充 2mM GlutaMAXTM (最终浓度)。

8.3.1.1 对于每 1L CM3, 加入 10ml 的 200mM GlutaMAXTM。

8.3.2 通过将IL-2储备溶液和GlutaMAX™储备溶液直接添加到AIM-V的瓶子或袋子中,制备足以满足实验需要的CM4量。轻轻摇晃混合均匀。

8.3.3 加入AIM-V后立即将瓶子标记“3000IL/ml IL-2和GlutaMAX”。

8.3.4 当有过量CM4时,将其在瓶中储存在4℃,标记有培养基名称、“GlutaMAX”、制备者的首字母、培养基的制备日期及其有效期(制备后7天)。

8.3.5 在4℃下储存7天后,丢弃补充有IL-2的培养基。

实施例6:用于LN-144快速扩增方案的经辐照的同种异体饲养细胞的评价

此实施例描述了用于鉴定单个批次的经 γ -辐照的外周单核细胞(PBMC,也称为MNC)的新的简化方法,所述经 γ -辐照的外周单核细胞在本文所述的示例性方法中用作同种异体饲养细胞。

每个经辐照的MNC饲养批次由一个单独供体制备。在纯化的抗CD3(克隆OKT3)抗体和白细胞介素-2(IL-2)存在下,单独筛选每个批次或供体在REP中扩增TIL的能力。此外,在不添加TIL的情况下,测试各饲养细胞批次,以验证接收的 γ 辐照剂量足以使它们复制机能不全。

定义

- AOP1——吡啶橙/碘化丙锭
- BSC——生物安全柜
- CD3——分化抗原簇3;T淋巴细胞的表面标志蛋白
- CF——离心力
- CM1——TIL的完全培养基,#1
- CM2——TIL的完全培养基,#2
- CMO——合同加工外包(Contract Manufacturing Organization)
- CO₂——二氧化碳
- EtOH——乙醇
- GMP——生产质量管理规范
- Gy——灰色
- IL-2——白细胞介素2
- IU——国际单位
- LN2——液氮
- Mini-REP——小型快速扩增方案(Mini-Rapid Expansion Protocol)
- mL——毫升
- MNC——单核细胞
- NA——不适用
- OKT3——MACS GMP CD3纯(克隆OKT3)抗体
- PPE——个人防护装备
- Pre-REP——快速扩增方案之前
- QS——适量;填充至该量
- REP——快速扩增方案
- TIL——肿瘤浸润淋巴细胞

- T25——25cm²组织培养瓶
- μg——微克
- μl——微升

设备、软件、材料

设备

- BSC (生物安全柜)
- 液氮冷冻机
- 温控水浴
- 带浮桶式转头的离心机
- 加湿组织培养箱
- 移液器辅助设备
- 2-20μl 移液器
- 20-200μl 移液器
- 100-1000μl 移液器
- 自动细胞计数器

材料

- 15ml 锥形离心管, 无菌
- 50ml 锥形离心管, 无菌
- CM1
- CM2
- AIM V Medium CTS (治疗级)
- 细胞计数器染色溶液
- IL-2
- MACS GMP CD3 纯 (克隆OKT3) 抗体
- 无菌一次性血清移液管
- 无菌一次性转移移液管
- 无菌移液器吸头
- 24孔组织培养板
- T25烧瓶 (Greiner#690175)
- 5.3.14. 拉链储存袋

步骤

背景

对于TIL扩增的REP (步骤D), 需要经 γ -辐照的生长停滞的MNC饲养细胞。饲养细胞MNC上的膜受体与抗CD3 (克隆OKT3) 抗体结合并在REP (步骤D) 烧瓶中与TIL交联, 刺激TIL扩增。通过取自个体供体的全血白细胞除去法 (leukapheresis), 制备饲养批次。在GMP条件下, 将白细胞除去法的产物在Ficoll-Hypaque上离心、洗涤、辐照并冷冻保存。

重要的是接受TIL治疗的患者不要注入活饲养细胞, 因为这可能导致移植物抗宿主病 (GVHD)。因此, 通过用 γ -辐照饲养细胞使细胞生长停滞, 这导致双链DNA断裂和再培养时MNC细胞的细胞活力丧失。

评价标准和实验设置

按两个标准评价饲养批次:1) 它们在共培养中扩增TIL的能力>100倍和2) 它们复制机能不全。

使用在直立T25组织培养瓶中生长的两种主要的pre-REP TIL系,以mini-REP形式测试饲养批次。针对两种不同的TIL系测试饲养批次,在REP中每种TIL系响应活化而增殖的能力是独特的。作为对照,许多经辐照的MNC饲养细胞与试验批次一起进行,这些经辐照的MNC饲养细胞历来被证明符合标准1)和2):1) 它们在共培养中扩增TIL的能力>100倍,2) 它们复制机能不全。

为了确保在单个实验中测试的所有批次都能获得相同的测试,使用相同的pre-REP TIL系的足够储备来测试所有条件和所有饲养批次。对于测试的每批饲养细胞,共有六个T25烧瓶:

- pre-REP TIL系#1 (2个烧瓶)
- pre-REP TIL系#2 (2个烧瓶)
- 饲养对照组 (2个烧瓶)

• 注:包含TIL系#1和#2的烧瓶评估了饲养批次扩增TIL的能力。饲养对照烧瓶评估了饲养批次的复制机能不全。

实验方案

第2/3天,解冻TIL系

按照实施例5制备CM2培养基,制备Pre-REP和REP培养基。在37°C水浴中加热CM2。制备40ml补充有3000IU/ml IL-2的CM2。保温直至使用。将不含IL-2的20ml预热的CM2放入两个50ml锥形管的每一个中,所述锥形管标记有所用TIL系的名称。从LN2存储器中取出两种指定的pre-REP TIL系并将小瓶转移至组织培养室。记录TIL系识别表。将解冻的小瓶置于37°C水浴中的密封拉链储存袋中,直至留下少量冰。用70%乙醇喷洒或擦拭解冻的小瓶并将小瓶转移至BSC。使用无菌转移液管将小瓶中的内容物立即转移到制备并标记的50ml锥形管内的20ml CM2中。使用不含IL-2的CM2QS(填充至该量)至40ml以洗涤细胞。以400×CF离心5分钟。吸取上清液并重悬于5ml温热的补充有3000IU/ml IL-2的CM2中。一式两份取出小等分试样(20μl),使用自动细胞计数器进行细胞计数。记录计数。计数时,将装有TIL细胞的50ml锥形管放入湿润的、37°C、5%CO₂培养箱中,盖帽松开以便进行气体交换。测定细胞浓度并在补充有3000IU/ml IL-2的CM2中将TIL稀释至1×10⁶个细胞/ml。在湿润的37°C培养箱中,在24孔组织培养板的2ml/孔中根据需要在多个孔中培养,直至mini-REP的第0天。在不同的24孔组织培养板中培养不同的TIL系,以避免混淆和潜在的交叉污染。

第0天,启动Mini-REP

为待测试的饲养批次数准备足够的CM2培养基(例如为了一次测试4个饲养批次,准备800ml的CM2培养基)。将实施例5中制备的一部分CM2等分并补充3000IU/ml IL-2以用于培养细胞(例如为了一次测试4个饲养批次,准备500ml含有3000IU/ml IL-2的CM2培养基)。如下所述,使用没有IL-2的CM2的剩余部分洗涤细胞。

制备TIL

7.3.2.4分别进行每个TIL系,以防止交叉污染,将具有TIL培养物的24孔板从培养箱中取出并转移至BSC。

7.3.2.5使用无菌移液管或100-1000 μ l移液器和吸头,从TIL的每个孔中取出约1ml培养基进行使用,并置于24孔组织培养板的未使用的孔中。这用于洗涤孔。

7.3.2.6使用新的无菌移液管或100-1000 μ l移液器和吸头,在孔中混合剩余培养基和TIL,以再悬浮细胞,然后将细胞悬液转移到标有TIL名称的50ml锥形管中并记录体积。

7.3.2.7用保留的培养基洗涤孔并将该体积转移到相同的50ml锥形管中。

7.3.2.8以400 \times CF旋转细胞以收集细胞沉淀。

7.3.2.9吸取培养基上清液,将细胞沉淀再悬浮于2-5ml含有3000IU/ml IL-2的CM2培养基中;使用的体积基于收获的孔的数量和沉淀的大小—体积足以确保浓度 $>1.3 \times 10^6$ 个细胞/ml。

7.3.2.10用血清移液管彻底混合细胞悬液并记录体积。

7.3.2.11取出200 μ l使用自动细胞计数器进行细胞计数。

7.3.2.12计数时,将含有TIL细胞的50ml锥形管置于湿润的、5%CO₂、37 $^{\circ}$ C培养箱中,盖帽松开以允许气体交换。

7.3.2.13记录计数。

7.3.2.14从培养箱中取出含有TIL细胞的50ml锥形管,并将细胞以 1.3×10^6 细胞/ml的浓度再悬浮于补充有3000IU/ml IL-2的温热CM2中。将帽松动的50ml锥形管放回培养箱中。

7.3.2.15如果需要,保留原24孔板以重新培养任何残留的TIL。

7.3.2.16对于第二TIL系,重复步骤7.3.2.4-7.3.2.15。

7.3.2.17在将TIL接种到T25烧瓶中进行实验即刻之前,按照下面的步骤7.3.2.35,将TIL以1:10稀释至终浓度 1.3×10^5 个细胞/ml。

准备MACS GMP CD3纯(OKT3)工作溶液

7.3.2.18从4 $^{\circ}$ C冰箱中取出OKT3(1mg/ml)的储备溶液并置于BSC中。

7.3.2.19在mini-REP的培养基中使用30ng/ml OKT3的终浓度。

7.3.2.20实验的每个T25烧瓶中的20ml需要600ng OKT3;对于每个20ml,这相当于60 μ l的10 μ g/ml溶液,或者对于每个饲养批次测试的所有6个烧瓶,相当于360 μ l。

7.3.2.21对于每个测试的饲养批次,制备400 μ l 1:100稀释的1mg/ml OKT3,工作浓度为10 μ g/ml(例如一次测试4个饲养批次,制成1600 μ l 1:100稀释的1mg/ml OKT3:16 μ l 1mg/ml OKT3+1.584ml含3000IU/ml IL-2的CM2培养基)

制备T25烧瓶

7.3.2.22在每个烧瓶上标记测试的TIL系名称、烧瓶重复数、饲养批号、日期和分析人员的姓名缩写。

7.3.2.23在制备饲养细胞之前,用CM2培养基填充烧瓶。

7.3.2.24在等待添加其余组分时,将烧瓶放入37 $^{\circ}$ C湿润的5%CO₂培养箱中,以保持培养基温暖。

7.3.2.25一旦制备了饲养细胞,将组分加入到每个烧瓶中的CM2中,如下表13烧瓶设置所示。

表13:烧瓶设置

组分	共培养瓶中的体积	对照组（仅饲养细胞）烧瓶的体积
CM2+3000IU/ml IL-2	18ml	19ml
MNC: 在 CM2+3000IU IL-2中 1.3×10^7 /ml (最终浓度 1.3×10^7 /瓶)	1ml	1ml
OKT3: 在 CM2+3000IU IL-2中 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$	$60 \mu\text{l}$	$60 \mu\text{l}$

组分	共培养瓶中的体积	对照组（仅饲养细胞）烧瓶的体积
TIL: 在加有3000IU IL-2的 CM2中 1.3×10^5 /ml (最终浓度 1.3×10^5 /瓶)	1ml	0

制备饲养细胞

7.3.2.26对于本方案,每批测试需要至少 78×10^6 个饲养细胞。通过SDBB冷冻的每个1ml小瓶在冷冻时具有 100×10^6 个活细胞。假设从LN2储存解冻后恢复50%,建议每批解冻至少两个1ml小瓶饲养细胞,得到估计 100×10^6 个活细胞用于每个REP。或者,如果在1.8ml小瓶中提供,则仅需一个小瓶就可以提供足够的饲养细胞。

7.3.2.27在解冻饲养细胞之前,每个待测试的饲养批次预加热约50ml不含IL-2的CM2。

7.3.2.28从LN2储存器中取出指定的饲料批次小瓶,放入拉链储存袋中并置于冰上。

将小瓶转移到组织培养室。

7.3.2.29将密封拉链储存袋中的小瓶浸入 37°C 水浴中解冻。

7.3.2.30从拉链袋中取出小瓶,用70%EtOH喷洒或擦拭,并将小瓶移至BSC。

7.3.2.31使用转移移液管,将饲养小瓶的内容物立即转移到50ml锥形管中的30ml温热CM2中。用少量CM2洗涤小瓶以除去小瓶中的任何残留细胞。

7.3.2.32在 $400 \times \text{CF}$ 下离心5分钟。

7.3.2.33吸走上清液并再悬浮于4ml温热的加有3000IU/ml IL-2的CM2中。

7.3.2.34取出 $200 \mu\text{l}$ 使用自动细胞计数器进行细胞计数。记录计数。

7.3.2.35以 1.3×10^7 个细胞/ml将细胞再悬浮于温热的加有3000IU/ml IL-2的CM2。

共培养设置

7.3.2.36将TIL细胞从 1.3×10^6 个细胞/ml稀释至 1.3×10^5 个细胞/ml。独立处理每个TIL系以防止交叉污染。

7.3.2.36.1将4.5ml CM2培养基加入15ml锥形管中。

7.3.2.36.2从培养箱中取出TIL细胞,用10ml血清移液管再悬浮TIL细胞。

7.3.2.36.3从 1.3×10^6 个细胞/ml的TIL悬浮液中取出0.5ml细胞,并加至15ml锥形管中的4.5ml培养基中。将TIL储存瓶放回培养箱。

7.3.2.36.4混合均匀。

7.3.2.36.5对第二TIL系,重复步骤7.3.2.36.1-7.3.2.36.4。

7.3.2.36.6当一次测试多个饲养批次时,在涂布TIL之前将每个饲养批次的TIL稀释至较低浓度。

7.3.2.37将单个饲养批次的装有预热培养基的烧瓶从培养箱转移到BSC。

7.3.2.38通过用1ml移液管尖端上下吹吸几次来混合饲养细胞,并将1ml (1.3×10^7 个细胞)转移到每个烧瓶中用于该饲养批次。

7.3.2.39向每个烧瓶中加入60 μ l OKT3工作储备溶液(10 μ g/ml)。

7.3.2.40将两个对照烧瓶放回培养箱。

7.3.2.41将每个TIL批次的1ml (1.3×10^5)转移至相应标记的T25烧瓶中。

7.3.2.42将烧瓶放回培养箱中并直立孵育。第5日之前不要扰动。

7.3.2.43所有测试的饲养批次均重复7.3.2.36-7.3.2.42。

7.3.3第5天,更换培养基

7.3.3.1制备具有3000IU/ml IL-2的CM2。每个烧瓶需要10ml。

7.3.3.2为防止交叉污染,一次处理一个饲养批次的烧瓶。从培养箱中取出烧瓶并转移到BSC,并注意不要扰动烧瓶底部的细胞层。

7.3.3.3从烧瓶中轻轻地取出10ml培养基并丢弃。

7.3.3.4对所有烧瓶重复,包括对照烧瓶。

7.3.3.5用10ml移液管,将10ml温热的具有3000IU/ml IL-2的CM2加到每个烧瓶中。

7.3.3.6将烧瓶放回培养箱中并直立孵育至第7天。

7.3.3.7对所有测试的饲养批次重复7.3.3.1-7.3.3.6。

7.3.4第7天,收获

7.3.4.1为防止交叉污染,一次处理一个饲养批次的烧瓶。

7.3.4.2从培养箱中取出烧瓶并转移至BSC,并注意不要扰动烧瓶底部的细胞层。

7.3.4.3不扰动生长在烧瓶底部的细胞地从每个试验瓶中取出10ml培养基,从每个对照烧瓶中取出15ml培养基。

7.3.4.4使用10ml血清移液管,将细胞再悬浮于剩余培养基中并充分混合以破碎任何细胞团块。

7.3.4.5在第7天记录每个烧瓶的体积。

7.3.4.6通过移液吹吸彻底混匀细胞悬液后,取出200 μ l进行细胞计数。

7.3.4.7使用适当的标准操作程序与自动细胞计数器设备对TIL计数。

7.3.4.8记录第7天的计数。

7.3.4.9对所有测试的饲养批次重复7.3.4.1-7.3.4.8。

7.3.4.10根据图2中列出的标准,评加饲养对照烧瓶的复制机能不全,并评价含有TIL的烧瓶从第0天开始的倍数扩增。

7.3.5第7天,继续饲养对照烧瓶至第14天

7.3.5.1在完成第7天的饲养对照烧瓶计数后,向每个对照烧瓶中加入15ml含有3000IU/ml IL-2的新鲜CM2培养基。

7.3.5.2将对照烧瓶放回培养箱中并直立培养至第14天。

7.3.6第14天,继续的(Extended)饲养对照烧瓶的不增殖

7.3.6.1为防止交叉污染,一次处理一个饲养批次的烧瓶。

7.3.6.2从培养箱中取出烧瓶并转移到BSC中,注意不要扰动烧瓶底部的细胞层。

7.3.6.3在不扰动烧瓶底部生长的细胞的情况下,从每个对照烧瓶中取出约17ml培养

基。

7.3.6.4使用5ml血清移液管,将细胞再悬浮于剩余的培养基中并充分混合以破碎任何细胞团块。

7.3.6.5记录每个烧瓶的体积。

7.3.6.6通过移液吹吸彻底混合细胞悬液后,取出200 μ l进行细胞计数。

7.3.6.7使用适当的标准操作程序与自动细胞计数器设备对TIL计数。

7.3.6.8记录第14天的计数。

7.3.6.9对所有测试的饲养批次重复7.3.4.1-7.3.4.8。

预期结果和接受标准

预期结果

γ 辐照的剂量足以使饲养细胞复制机能不全。预期所有批次都符合评价标准,并且还证明与第0天相比,REP培养第7天剩余的饲养细胞总存活数减少。

预期所有饲养批次都符合REP培养第7天TIL生长100倍扩增的评价标准。

预期饲养对照烧瓶的第14天计数继续第7天所见的非增殖趋势。

接受标准

对于测试的每批次饲养细胞的每个重复TIL系必须满足以下接受标准。

接受为两倍,如下所示(概述于图2,接受标准):

评估当在30ng/ml OKT3抗体和3000IU/ml IL-2存在下培养时,辐照剂量是否足以使MNC饲养细胞复制机能不全。

通过在REP的第7天和第14天通过自动细胞计数确定的总活细胞计数(TVC),来评估复制机能不全。

接受标准是“无生长”,意味着从REP的第0天投入培养的初始活细胞数开始,在第7天和第14天的总活细胞数没有增加。

评估饲养细胞支持TIL扩增的能力。

根据从REP第0天开始培养至REP第7天活细胞的倍数扩增,来测定TIL生长。

在第7天,通过自动细胞计数评估,TIL培养物达到最小100倍(即,大于在REP第0天投入培养的总活TIL细胞数的100倍)的扩增。

通常排除不满足上述这两个标准的MNC饲养批次。

任何满足接受标准但被判断为相对于与相同pre-REP TIL系并行测试的其他先前饲养批次扩增TIL的能力方面表现不佳的MNC饲养批次,如本领域技术人员所判断的那样可能会被排除在外。有关所用的接受标准,请参见下表14。

表14:接受标准

测试	接受标准
辐照MNC/复制机能不全	在第7天和第14天没有观察到生长
TIL扩增	每个TIL至少扩增100倍(最少 1.3×10^7 个活细胞)

评估在30ng/ml OKT3抗体和3000IU/ml IL-2的存在下培养时,辐照剂量是否足以使MNC饲养细胞复制机能不全。

10.2.2.1.1通过REP的第7天和第14天的自动细胞计数确定的总活细胞计数(TVC),来评估复制功能不全。

10.2.2.1.2接受标准是“无生长”，意味着从REP的第0天投入培养的初始活细胞数开始，在第7天和第14天的总活细胞数没有增加。

10.2.2.2评估饲养细胞支持TIL扩增的能力。

10.2.2.2.1根据从REP第0天开始培养至REP第7天活细胞的倍数扩增，来测量TIL生长。

10.2.2.2.1在第7天，通过自动细胞计数评估，TIL培养物达到最小100倍（即，大于在REP第0天投入培养的总活TIL细胞数的100倍）的扩增。

10.2.2.3当一批不符合上述两个标准时，该批次将根据下面第10.3节中列出的应急计划进行重新测试。

10.2.2.4对失败的批次进行重新测试后，任何不符合原评估和应急测试中两个接受标准的MNC饲养批次被排除在外。

10.2.2.5任何符合接受标准但被判断为相对于与相同pre-REP TIL系并行测试的其他先前饲养批次扩增TIL的能力方面表现不佳的MNC饲养批次被酌情排除。

不符合接受标准的MNC饲养批次的应急测试

10.3.1如果MNC饲养批次符合上面第10.2节中概述的任一接受标准，则采取以下步骤重新测试该批次以排除简单实验者错误的原因。

10.3.2如果该批次剩余两个以上的附属测试小瓶，那么该批次可以重新测试。如果该批次剩余一个或没有剩余附属测试小瓶，则根据上文第10.2节中列出的接受标准，该批次失败。

10.3.3两名经过培训的人员，包括评价该有问题的批次的原始人员，必须同时对该批次进行测试。

10.3.4重复第7.2至7.3节，重新评估该有问题的批次。

10.3.5每个人要测试该有问题的批次以及对照批次（如上面第7.2.4节所定义的）。

10.3.6为了合格，该有问题的批次和对照批次必须对于进行应急测试的两个人员都满足10.2节的接受标准。

10.3.7符合这些标准后，该批次可以如上面第10.2节所述接着被用于CMO。

实施例7：用于鉴定单个批次的经 γ 射线辐照的外周血单核细胞的程序

此实施例描述了鉴定单个批次的经 γ -辐照的外周血单核细胞(PBMC)的新的简化方法，所述经 γ -辐照的外周单核细胞在本文所述的示例性方法中用作同种异体饲养细胞。此实施例提供了评价经辐照的PBMC细胞批次用于临床生产TIL批次的方案。每个经辐照的PBMC批次均由个体供体制备。在超过100种鉴定方案的过程中，已经显示，在所有情况下，来自SDBB(圣地亚哥血库)的经辐照的PBMC批次可在REP的第7天扩增 >100 倍的TIL。该改进的鉴定方案旨在适用于来自SDBB的经辐照的供体PBMC批次，其仍必须进行测试以验证所接收的 γ 辐照剂量足以使其复制机能不全。一旦证明它们在14天的过程中保持复制机能不全，则认为供体PBMC批次是“合格的”以用于生产TIL临床批次。

关键术语和定义

μg ——微克

μl ——微升

AIM-V——市售细胞培养基生物安全柜

BSC——分化抗原簇

CD——TIL的完全培养基#2
CM2——补充有3000IU/ml IL-2的CM2
CM2IL2——合同加工外包
CO₂——二氧化碳
EtOH——乙醇
GMP——生产质量管理规范
Gy——灰色
IL——白细胞介素
IU——国际单位
LN₂——液氮
mL——毫升
NA——不适用
OKT3——抗CD3单克隆抗体名称
P20——2-20 μ l移液器
P200——20-200 μ l移液器
PBMC——外周血单核细胞
P1000——100-1000 μ l移液器
PPE——个人防护装备
REP——快速扩增方案
SDBB——圣地亚哥血库
TIL——肿瘤浸润淋巴细胞
T25——25cm²组织培养瓶
 $\times g$ ——“乘以重力”——相对离心力的量度
样本包括经辐照的供体PBMC (SDBB)。

步骤

背景

7.1.1对于TIL的当前标准REP,需要经 γ -辐照的生长停滞的PBMC。PBMC上的膜受体与抗CD3(克隆OKT3)抗体结合并与培养物中的TIL交联,刺激TIL扩增。用个体供体的全血白细胞除去法制备PBMC批次。在GMP条件下,将全血白细胞除去法的产物在Ficoll-Hypaque上离心、洗涤、辐照并冷冻保存。

重要的是接受TIL治疗的患者不能注射活的PBMC,因为这可能导致移植物抗宿主病(GVHD)。因此,通过给予细胞 γ -辐照使供体PBMC生长停滞,导致双链DNA断裂和再培养时PBMC的细胞活力丧失。

评价标准

7.2.1经辐照的PBMC批次的评价标准是:它们复制机能不全。

实验设置

7.3.1饲养批次以mini-REP形式进行测试,就好像它们与TIL共培养一样,使用直立的T25组织培养瓶。

7.3.1.1对照批次:历来被证明符合7.2.1标准的一批经辐照的PBMC作为对照与试验批

次一起进行试验。

7.3.2对于每批测试的辐照供体PBMC,重复的烧瓶进行试验。

实验方案

本方案中的所有组织培养工作均在BSC中使用无菌技术完成。

第0天

7.4.1为每批待测试的供体PBMC制备约90ml的CM2培养基。将CM2在37℃水浴中保持温热。

7.4.2解冻 6×10^6 IU/ml IL-2的等分试样。

7.4.3将CM2培养基放回BSC,用70%EtOH擦拭,然后放入罩中。对于每批测试的PBMC,将约60ml的CM2移至单独的无菌瓶中。将IL-2从解冻的 6×10^6 IU/ml储备溶液加到该培养基,终浓度为3000IU/ml。将该瓶标记为“CM2/IL2”(或类似)以将其与未补充的CM2区分开。

7.4.4为每批待测试的PBMC标记两个T25烧瓶。标签最少包括:

7.4.4.1批号

7.4.4.2烧瓶号(1或2)

7.4.4.3培养开始日期(第0天)

制备OKT3

7.4.5从4℃冰箱中取出抗CD3(OKT3)的储备溶液并置于BSC中。

7.4.6在mini-REP的培养基中使用终浓度为30ng/ml的OKT3。

7.4.7用1mg/ml储备溶液制备10 μ g/ml抗CD3(OKT3)工作溶液。放入冰箱直到需要。

7.4.7.1对于每个测试的PBMC批次,制备150 μ l 1:100稀释的抗CD3(OKT3)储备溶液。

例如,为了一次测试4个PBMC批次,通过将6 μ l的1mg/ml储备溶液加入到594 μ l补充有3000IU/ml IL-2的CM2中,制备600 μ l 10 μ g/ml抗CD3(OKT3)。

准备烧瓶

7.4.8将每瓶19ml CM2/IL-2加入到标记的T25烧瓶中,制备细胞时将烧瓶置于37℃、湿润的、5%CO₂培养箱中。

制备经辐照的PBMC

7.4.9单独处理每个供体PBMC批次,以避免批次可能的交叉污染。

7.4.10从LN₂存储器中取出要测试的PBMC批次的小瓶。在解冻前将它们置于-80℃或保持在干冰上。

7.4.11对于待解冻的每个批次,将30ml CM2(未补充IL-2)放入50ml锥形管中。用待解冻的PBMC的不同批号标记每个管。将管盖紧,且使用前将其置于37℃水浴中。根据需要,将50ml锥形管放回BSC,用70%EtOH擦拭,然后放入罩中。

7.4.12从冷藏库中取出样品瓶PBMC,置于37℃水浴中的浮管架中解冻。解冻直到小瓶中残留少量冰。

7.4.13用70%EtOH喷洒或擦拭解冻的小瓶并转移至BSC。

7.4.14使用无菌转移移液管,将小瓶中的内容物立即转移到50ml锥形管中的30ml CM2中。从管中取出约1ml培养基冲洗小瓶;将冲洗液放回50ml锥形管中。盖紧并轻轻旋转以洗涤细胞。

7.4.15在室温下以400 \times g离心5分钟。

7.4.16吸取上清液,用1000 μ l移液管尖端将细胞沉淀再悬浮于1ml温热的CM2/IL-2中。或者,在添加培养基之前,通过沿着空试管架拖动加盖的管再悬浮细胞沉淀。再悬浮细胞沉淀后,用CM2/IL-2培养基将体积调至4ml。记录体积。

7.4.17使用自动细胞计数器取出一小份等分试样(例如100 μ l)进行细胞计数。

7.4.17.1根据特定的自动细胞计数器SOP,一式两份进行计数。通常需要在进行细胞计数之前对PBMC进行稀释。建议的起始稀释度为1:10,但这可能会根据所用细胞计数器的类型而有所不同。

7.4.17.2记录计数。

7.4.18使用CM2/IL-2培养基按步骤7.4.15.2,将PBMC的浓度调节至 1.3×10^7 个细胞/ml。通过温和地旋转或使用血清移液管上下轻轻吹吸混合均匀。

设置培养烧瓶

7.4.19将两个标记的T25烧瓶从组织培养箱放回BSC。

7.4.20将10 μ g/ml抗CD3/OKT3的小瓶放回BSC。

7.4.21向每个烧瓶中加入1ml 1.3×10^7 PBMC细胞悬浮液。

7.4.22向每个烧瓶中加入60 μ l 10 μ g/ml抗CD3/OKT3。

7.4.23将带盖的烧瓶放回组织培养箱培养14天,不要扰动。

7.4.24将抗CD3/OKT3小瓶放回冰箱中,直至下一批需要。

7.4.25对每批待评估的PBMC重复步骤7.4.9-7.4.24。

第14天,测量PBMC的不增殖

7.4.26独立处理每批产品,小心地将重复的T25烧瓶放回BSC。

7.4.27对于每个烧瓶,使用新的10ml血清移液管,从每个烧瓶中取出约17ml,然后小心地拉起剩余的培养基以测量烧瓶中剩余的体积。记录体积。

7.4.28使用相同的血清移液管上下吹吸以混合样品。

7.4.29从每个烧瓶中取出200 μ l样品进行计数。

7.4.30使用自动细胞计数器计数细胞。

7.4.31对每批被评估的PBMC重复步骤7.4.26-7.4.31。

结果和接受标准

结果

10.1.1 γ 辐照剂量足以使饲养细胞复制机能不全。预期所有批次均符合评价标准,并证明与第0天相比,REP培养第14天剩余的饲养细胞总存活数减少。

接受标准

10.2.1每个经辐照的供体PBMC批次均符合以下接受标准:

10.2.2“无生长”——意味着第14天的活细胞总数小于REP第0天培养的初始活细胞数。

10.2.3如果一批不符合上述标准,则根据10.4节中概述的应急测试程序对该批次进行重新测试。

10.2.4对失败的批次进行重新测试后,任何原评估和应急测试中未达到接受标准的MNC饲养批次被排除。

不符合接受标准的PBMC批次的应急测试

10.4.1如果经辐照的供体PBMC批次不符合上述接受标准,则采取以下步骤重新测试该

批次,以排除简单的实验者错误作为其失败的原因。

10.4.2如果该批次剩余两个以上的附属小瓶,那么该批次将被重新测试。如果该批次中剩余一个或没有剩余附属小瓶,则根据上文第10.2节的接受标准,该批次失败。

10.4.3只要有可能,两名经过培训的人员(最好包括评估该批次的原始人员)独立地对两个独立的小瓶进行测试。这是应急测试的首选方法。除了单独的PBMC小瓶外,两个人员均可以使用相同的试剂。

10.4.3.1如果没有两名人员,则一人对失败批次的两个PBMC小瓶进行测试,独立地对每个小瓶进行测试。

10.4.4重复第7.4节“实验方案”,重新评估该有问题的批次。

10.4.5除了该有问题的批次外,每个进行应急测试的人员还测试对照批次。

10.4.5.1如果两名人员进行应急测试,则两名人员均独立测试对照批次。

10.4.5.2如果只有一人可以进行应急测试,则对照批次不必一式两份。

10.4.5.3为了合格,进行应急测试的PBMC批次必须两个对照批次和有问题的批次的两个重复都达到10.2节的接受标准。

10.4.5.4符合此标准后,将该批次按照第10.2节的规定释放,用于CMO。

实施例8:冷冻保存前后的比较

在开始样品制备和染色程序之前,制备样品和FMO对照的抗体混合物。将混合物在4℃下避光储存长达60天。请参阅下面的混合物制备部分。

表15:染色程序:

步骤	说明
1	从避光冰箱中取出 Aqua 染料等分试样。
2	向每个样品管中加入 3 mL 1×PBS。
3	以 300g 旋转管 5 分钟。
4	制备 Aqua 活/死染色。用 PBS 以 1: 200 稀释。每个样品和 FMO 对照管需要 25μL。 1: 200 = _____ μL Aqua + _____ mL PBS
5	吸取或倾析来自步骤 3 的上清液。
6	每个样品管中加入 25μL Aqua L/D。通过沿机架拖动再悬浮细胞。 孵育 15 分钟, 避光, 室温。
7	不洗涤, 往每个管中加入 50μL 适当的 Ab 混合物。
8	在室温下孵育管 15 分钟。
9	加入 3mL FACS 洗涤缓冲液
10	在 4℃ 下以 330g 旋转 5 分钟。
11	通过沿空试管架拖动使管再悬浮。
12	在 4℃ 下加入 100μL 1%PFA/PBS 溶液。
13	将样品在 4℃ 避光保存最多 72 小时。
14	在流式细胞仪上测试样品。

表16:分化板1 (DF1):

靶标	形式	克隆	供应商	目录号	滴度
TCRab	PE/Cy7	IP26	BioLegend	306720	3
CD57*	PerCP-Cy5.5	HNK-1	BioLegend	359622	2
CD28*	PE	CD28.2	BioLegend	302908	2
CD4	FITC	OKT4	eBioscience	11-0048-42	2
CD27*	APC-H7	M-T271	BD Biosciences	560222	3
CD56	APC	N901	Beckman Coulter	IM2474U	3
CD8a	PB	RPA-T8	BioLegend	301033	2
FACS 缓冲液					33

表17:分化板2 (DF2):

靶标	形式	克隆	供应商	目录号	滴度
CD45RA*	PE-Cy7	HI100	BD Biosciences	560675	1
CD8a	PerCP/Cy5.5	RPA-T8	BioLegend	301032	2
CCR7*	PE	150503	BD Biosciences	560765	5
CD4	FITC	OKT4	eBioscience	11-0048-42	2
CD3	APC/Cy7	HIT3a	BioLegend	300318	2
CD38*	APC	HB-7	BioLegend	356606	1
HLA-DR	PB	L243	BioLegend	307633	2
FACS 缓冲液					35

*表示应进行FMO (Fluorescence Minus One, 荧光减1) 对照。

表18:T细胞活化板1 (Tact1)

靶标	形式	克隆	供应商	目录号	滴度
CD137*	PE/Cy7	4B4-1	BioLegend	309818	2
CD8a	PerCP/Cy5.5	RPA-T8	BioLegend	301032	2
Lag3*	PE	3DS223H	eBioscience	12-2239-42	5
CD4	FITC	OKT4	BioLegend	317408	2
CD3	APC/Cy7	HIT3a	BioLegend	300318	1
PD1*	APC	EH12.2H7	BioLegend	329908	2
Tim-3*	BV421	F38-2E2	BioLegend	345008	2
FACS 缓冲液					34

表19:T细胞活化板2 (Tact2)

靶标	形式	克隆	供应商	目录号	滴度
CD69*	PE-Cy7	FN50	BD Biosciences	557745	3
CD8a	PerCP/Cy5.5	RPA-T8	BioLegend	301032	2
TIGIT*	PE	MBSA43	eBioscience	12-9500-42	3
CD4	FITC	OKT4	BioLegend	317408	2
CD3	APC/Cy7	HIT3a	BioLegend	300318	2
KLRG1*	Ax647	SA231A2	BioLegend	367704	1
CD154*	BV421	TRAP1	BD Biosciences	563886	3
FACS 缓冲液					34

*表示应进行FMO (荧光减1) 对照。

补偿对照 (Compensation Control)

1. 在11个管中加入一滴BD Comp磁珠。
2. 用DF1的发色团标记管1至7。
3. 用APCy7、BV421和Ax647标记管8到10。
4. 管11用于未标记的磁珠。
5. 每管加入5 μ L抗体。
6. 在室温下,避光孵育10至30分钟。
7. 用3mL FACS缓冲液洗涤。
8. 用500 μ L 1%PFA再悬浮。
9. 在每个管中加入一滴BD Comp负磁珠。
10. 4 $^{\circ}$ C避光储存。可以使用一周。

水对照 (Aqua control)

1. 在标有Aqua的管中加入一滴Arc阳性对照。
2. 向管中加入3 μ L解冻的水溶液。
3. 重复上述步骤6-10。在步骤9中使用负Arc磁珠。

表20: 设置

管	靶标	形式	滴度
1	TCRab	PE/Cy7	5
2	CD57	PerCP-Cy5.5	5
3	CD28	PE	5
4	CD4	FITC	5
5	CD27	APC-H7	5
6	CD56	APC	5
7	CD8a	PB	5
8	CD3	APC/Cy7	5
9	Tim-3	BV421	5
10	KLRG1	Ax647	5
11	未标记	n/a	n/a

实施例9: 在冷冻保存后的用于输注表型显著稳定的肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL)

摘要背景:

此实施例讨论了基于肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的癌症免疫疗法的开发, 其最终目标是开发治疗性TIL群。TIL的冷冻保存允许最终细胞产品以安全的方式运输, 具有较少的时间限制 (Axelsson S, Faresjo M, Hedman M, Ludvigsson J, Casas R: Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells are suitable for the assessment of immunological markers in type 1 diabetic children. *Cryobiology* 2008, 57:201-8)。

在此, 评估新鲜的TIL样品与冷冻/解冻的TIL样品的各个表型标志物的表达, 以评估冷冻保存的TIL是否发生表型变化 (参见例如Sadeghi A, Ullenhag G, Wagenius G, Tötterman TH, Eriksson F: Rapid expansion of T cells: Effects of culture and cryopreservation and importance of short-term cell recovery. *Acta Oncol.* 2013, 52:978-86)。

结果:

比较新鲜的与解冻的TIL, 没有观察到CD4、CD8、NK、TCR $\alpha\beta$ 表达或记忆标志物的显著差异。维持了由HLA-DR、CD38和CD69表达定义的TIL的活化状态, 而调节分子LAG-3和TIM-3的表达表现出轻微降低。此外, 新鲜的和解冻的产品的存活率均大于86%。

方法:

通过在IL-2 (6000IU/ml) 中培养黑素瘤肿瘤碎片,获得Pre-REP TIL。

使用经辐照的同种异体PBMC饲养细胞,在GREX-100烧瓶中用OKT3和IL-2启动快速扩增方案(Rep)细胞11-14天。

将培养的细胞在5%DMSO中冷冻保存。

使用由谱系、分化、活化和调节标志物组成的四个板,在IL-2中静息1至2小时后,进行新鲜的TIL和解冻的TIL的流式细胞术评估。

结论:

除了一些调节性分子的适度变化,冷冻保存不影响测量的TIL表型特征。我们正在研究在临床环境中使用冷冻保存的TIL的可能性。

实施例10:新鲜与ReREP TIL群中的记忆细胞子集

在先前的实验中,没有看到新鲜TIL群的中枢记忆子集(参见图8)。但是,ReREP后,有接近60%的中枢记忆细胞,如下表22所示。

根据原始数据,静息细胞的CD4群比非静息细胞略高。总体而言,CD8百分比高,如预期一样。CD8中的CM(中枢记忆-Q3)/EM(效应记忆-Q4)大约是60/40分割。CD8+CD28+表达引人注目。静息细胞具有更高的量。另见图9和10A-10B。另见图15。

实施例11:在黑素瘤患者中施用自体肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)

据显示,在黑素瘤患者中施用自体肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)表现出总体应答为:NCI为55%,Moffitt癌症中心为38%,MD安德森癌症中心为48%,以色列Ella癌症研究所Sheba为40%。在使用ACT的黑素瘤患者中观察到的持久应答可允许更广泛地应用于其他实体瘤。如本文所示,证明了生长TIL和开发其他实体瘤的TIL疗法的可行性。该实施例提供的数据显示了“来自非黑素瘤肿瘤的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的成功扩增和表征”,参见图12至图14。

来自膀胱癌、宫颈癌和肺癌的TIL的表型表征大于60-70%的CD8+ T细胞,而来自头部的TIL表现出CD8+和CD4+ T细胞的可变分布。从TNBC繁殖的TIL大于80%CD4+ T细胞。无论肿瘤如何,大多数培养物中CD56+NK细胞的含量低于20%。

通过如下制备TIL:

- a. 在HBSS中洗涤获得的肿瘤;
- b. 将肿瘤切成碎片(例如,2-3mm³碎片);
- c. 将肿瘤碎片置于含有血清和IL-2的培养基的G-REX10细胞培养瓶中;
- d. 在第7天和从第11天到第21天的每4-5天更换一次培养基;
- e. 评估细胞计数、活力和表型分析,然后冷冻保存用于未来目的,包括但不限于将来输送给患者以治疗肿瘤,如本文所述。

如本文所证明的,TIL来自肺癌、膀胱癌、头颈癌、宫颈癌和TNBC患者肿瘤。

此外,如本文所证明的,肺、膀胱和宫颈肿瘤显示出更大比例的CD8+ TIL。头颈部和TNBC肿瘤多为CD4+ TIL。此外,CD4+和CD8+ TIL的进一步表征证明了效应记忆表型细胞也是CD27+和CD28+。

提供以上提出的实施例是为了向本领域普通技术人员提供关于如何制备和使用本发明的组合物、系统和方法的实施方案的完整公开和描述,并不意图限制发明人认为是其发明的范围。对于本领域技术人员显而易见的用于实施本发明的上述模式的修改旨在落入所附权利要求的范围内。本说明书中提及的所有专利和出版物表示本发明所属领域的技术人

员的技术水平。本公开中引用的所有参考文献均以引用方式并入,其程度如同每篇参考文献已单独地通过引用整体并入。

所有标题和小节名称仅用于清楚和参照目的,并不以任何方式视为限制。例如,本领域技术人员将理解,根据本文描述的本发明的精神和范围,适当地组合来自不同标题和小节的各个方面的有效性。

本文引用的所有参考文献通过引用整体并入本文,并且出于所有目的,其程度如同每个单独的出版物或专利或专利申请被明确地和单独地指出通过引用整体并入用于所有目的。

在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对本申请进行许多修改和变化,这对本领域技术人员来说是显而易见的。这里描述的特定的实施方式和实施例仅作为示例提供,并且本申请仅受所附权利要求以及权利要求所赋予的等同物的全部范围的限制。

肿瘤类型	新鲜的产品		冷冻保存的产品	
	收获后	解冻后	解冻后	再刺激后
恶性黑色素瘤 (M1053T) REP	<u>氧化磷酸化 (pmol/分钟)</u>			
	17.5 ± 4.4	9.5 ± 4.9	22.5 ± 2.5	22.5 ± 2.5
	基础呼吸			
	19.3 ± 9.0	27.5 ± 12.1	16.8 ± 2.6	16.8 ± 2.6
	SRC			
	210.6 ± 51.4	389.8 ± 127.4	174.7 ± 11.3	174.7 ± 11.3
<u>糖酵解 (mpH/分钟)</u>				
31.1 ± 4.4	22.5 ± 1.2	103.1 ± 5.4	103.1 ± 5.4	
基础糖酵解				
26.4 ± 5.5	20.7 ± 2.2	15.9 ± 7.7	15.9 ± 7.7	
糖酵解储备				
185.1 ± 17.6	192.0 ± 9.9	115.5 ± 7.4	115.5 ± 7.4	
糖酵解储备 (基础的%)				

图1

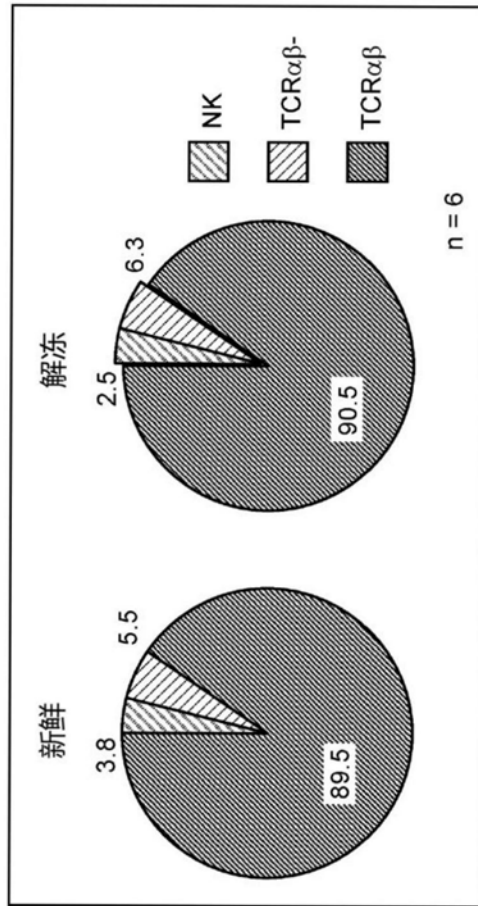


图2

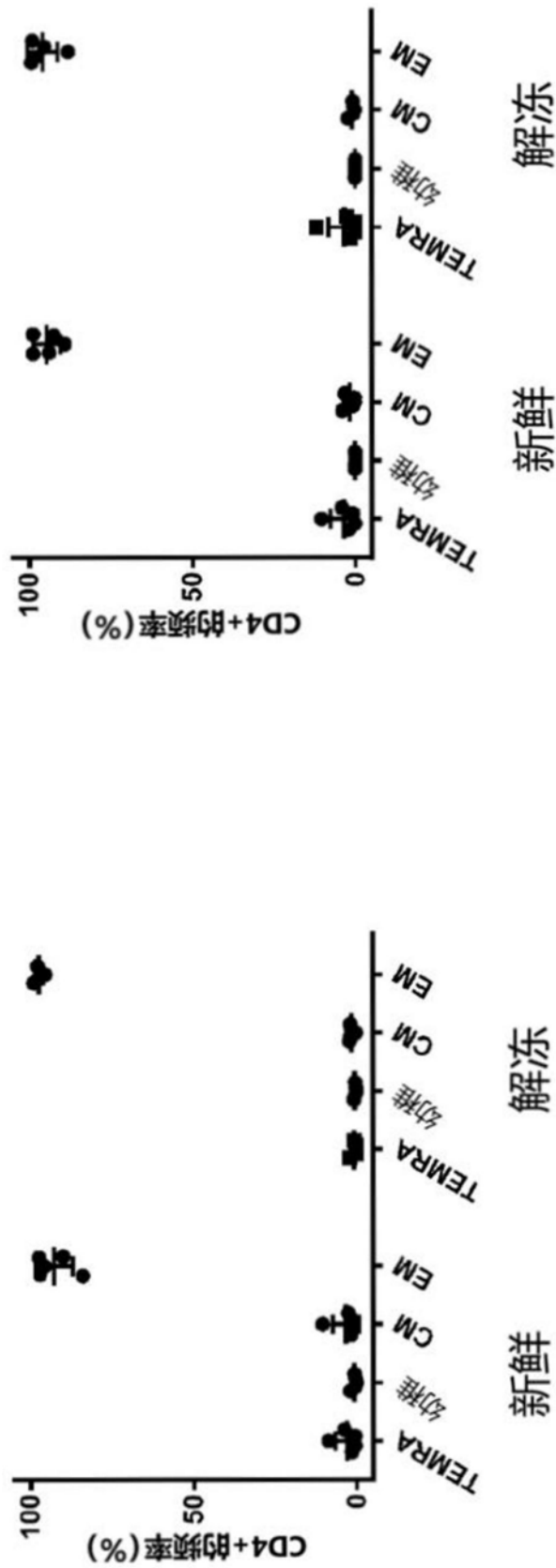


图3

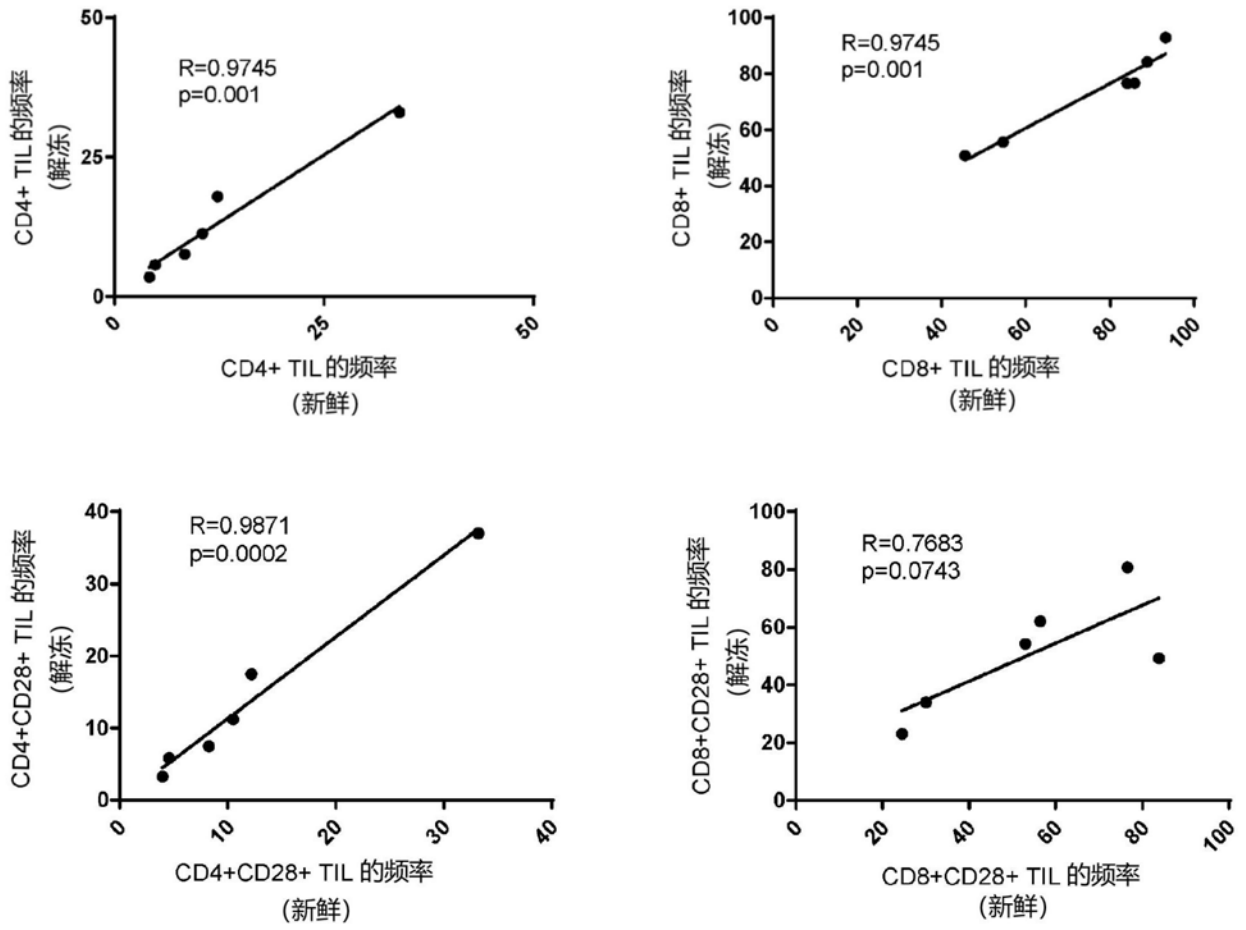


图4

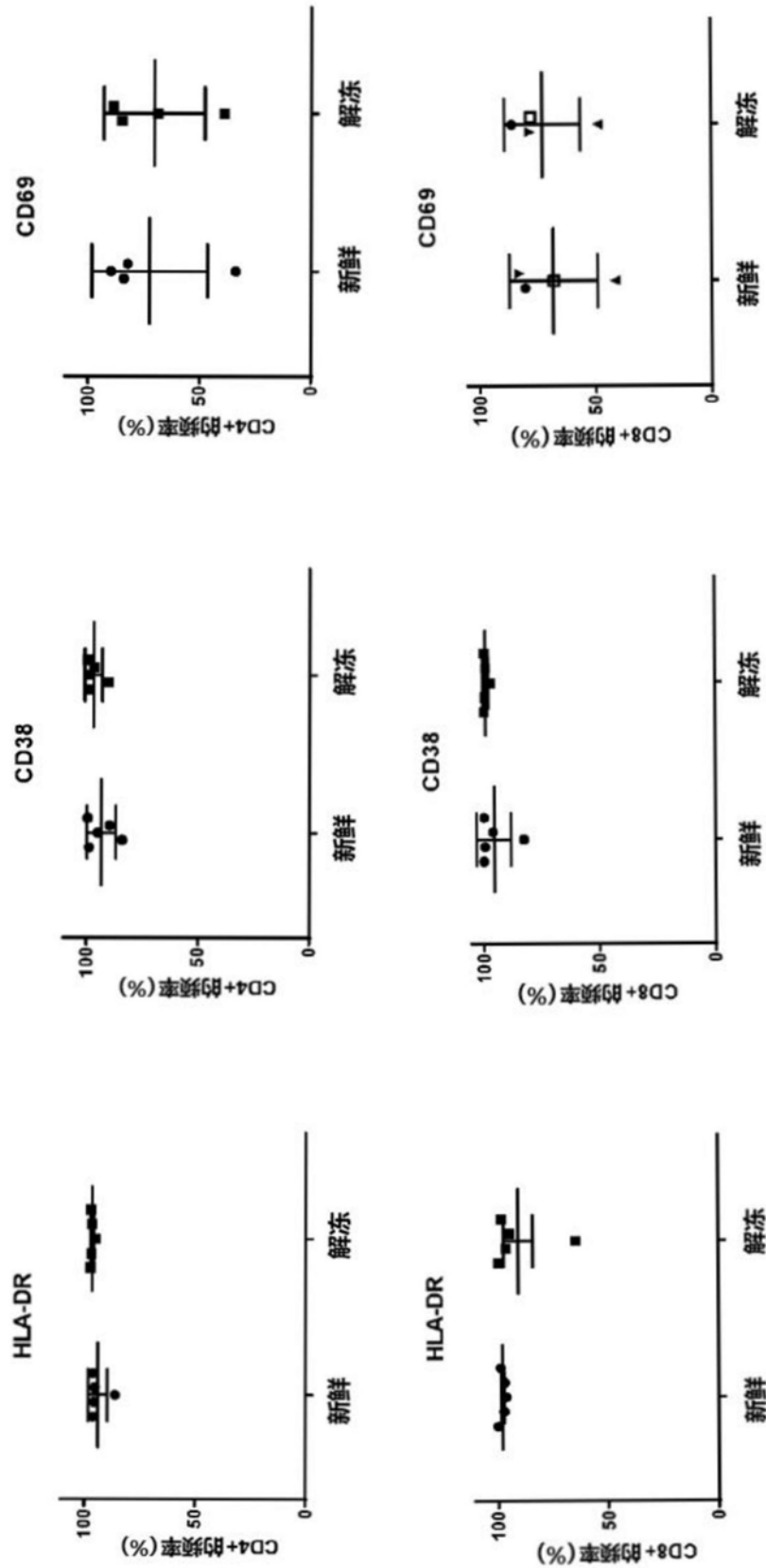


图5

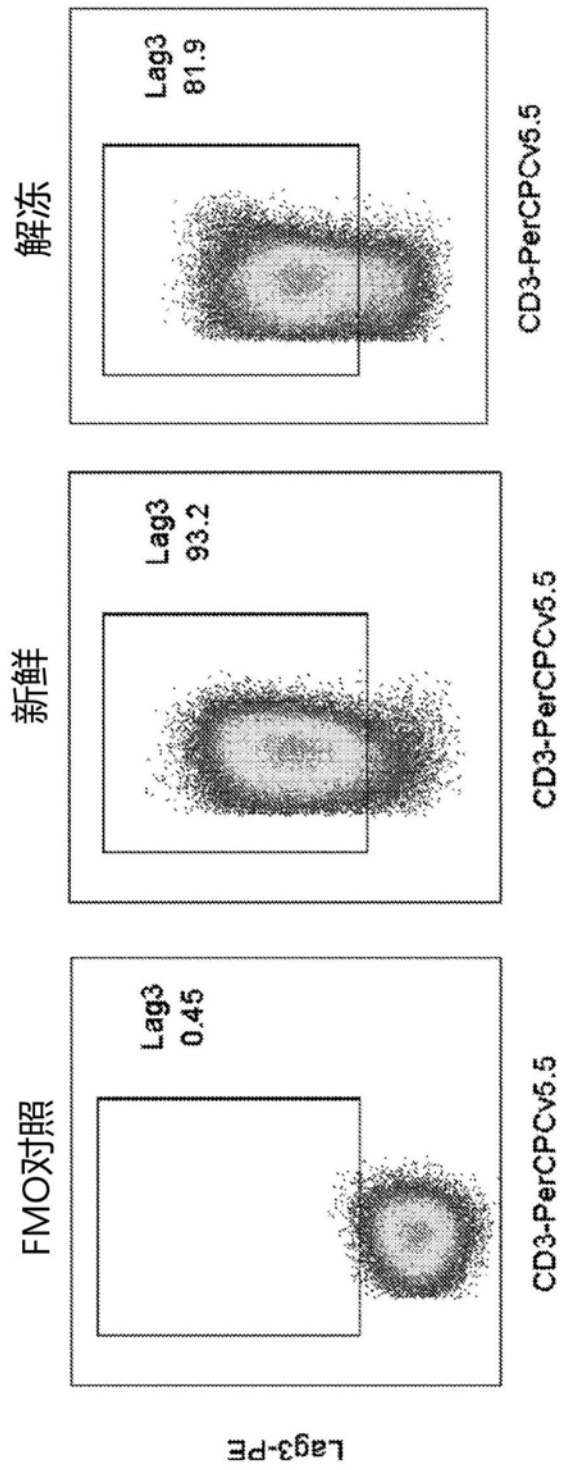


图6A

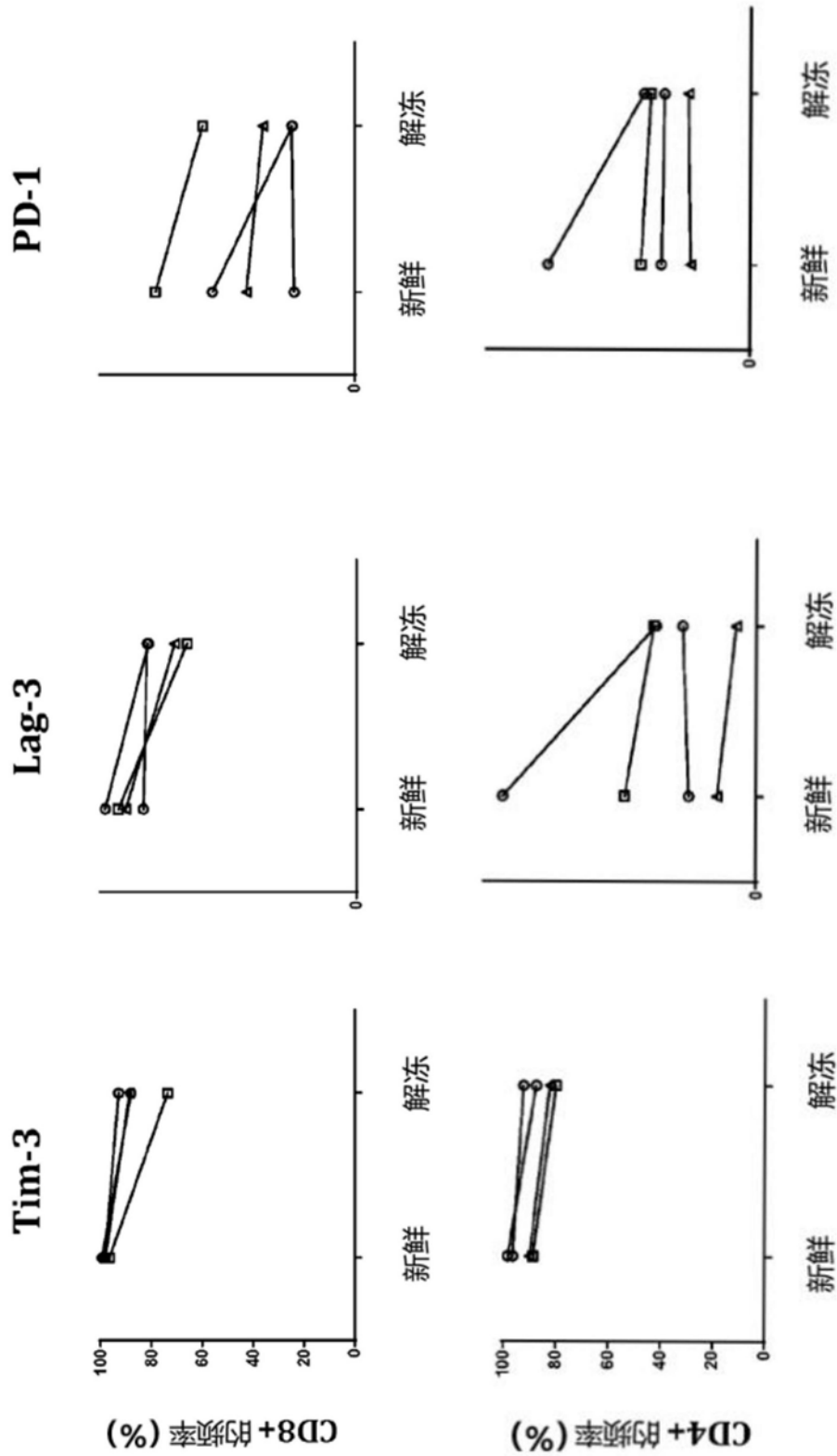


图6B



Ian Frank, Amanda Stramer, Michelle Blaskovich, Jyothi Sethuraman, Seth Wardell, Maria Fardis, Jim Bender, Anand Veerapathran, Michael T. Lotze Lion Biotechnologies, Inc.

冷冻保存后的用于输注表型的 显著稳定的肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL)

摘要背景: Lion Biotechnologies 专注于基于肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的癌症免疫疗法的开发和商业化。TIL 的冷冻保存允许以安全的方式运输最终细胞产品，具有较少的时间限制。迄今尚未进行使用冷冻保存的 TIL 的临床研究。冷冻和解冻细胞表面受体。在这里，我们测试了新鲜与冷冻/解冻的 TIL 样品，并评估了各个表型标志物的表达。

结果: 据观察，比较新鲜的 TIL 与解冻的 TIL，CD4、CD8、NK、TCR β 表达或记忆标志物无显著差异。由 HLA-DR、CD38 和 CD69 表达定义的 TIL 的活化状态是维持的，而调节分子 LAG-3 和 TIM-3 表现出轻微的表达降低。此外，新鲜的 TIL 和解冻的 TIL 产品的活力均大于 86%。

方法:

- 用 IL-2 (6000 IU/ml) 培养黑素瘤肿瘤碎片获得 preREP TIL
- 使用短辐照的同种异体 PBMC 饲养层细胞，在 GREX-100 烧瓶中用 OKT3 和 IL-2 启动快速扩增方案 (REP) 细胞 11 至 14 天
- 将培养的细胞冷冻保存在 5% DMSO 中
- 在 IL-2 中静息 1 至 2 小时后，使用由培养、分化、活化和调节标志物组成的四个板进行新鲜的 TIL 和解冻的 TIL 的流式细胞术评估

图1: 新鲜的 TIL 与解冻的 TIL 的组成。对 TIL 的 TCR β 和 CD56 染色以界定 T 细胞和 NK 群。显示的数据是 6 个单独 TIL 的平均值。



图2: 记忆表型由 CD45RA 和 CCR7 表达来界定。CD4 和 CD8 TIL 主要是效应记忆 (EM)。这在解冻的 TIL 中保持不变。每个点都是一个分析的样本。在 Wilcoxon 配对符号秩检验中未发现显著差异。

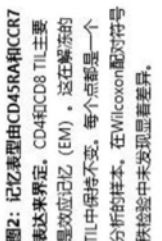


图3: 新鲜的 TIL 与解冻的 TIL 之间的 CD4、CD8、CD4+CD28+ 和 CD8+CD28+ 频率的 Pearson 相关性。用上述标志物对细胞进行染色。每个点代表一个在轴上具有新值并且在轴上具有解冻值的个体。使用线性回归分析被拟合曲线。

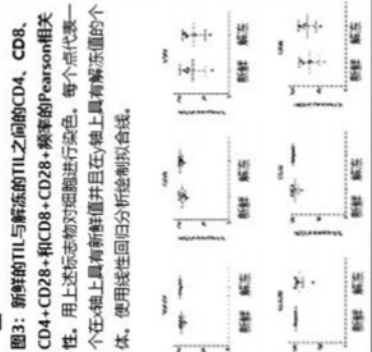


图4: 新鲜的 TIL 与解冻的 TIL 上的可比较活化标志物。使用 Wilcoxon 配对符号秩检验发现新鲜的 TIL 与解冻的活化状态没有显著差异。每个点代表一个分析的样品，并显示为平均值 \pm SEM。

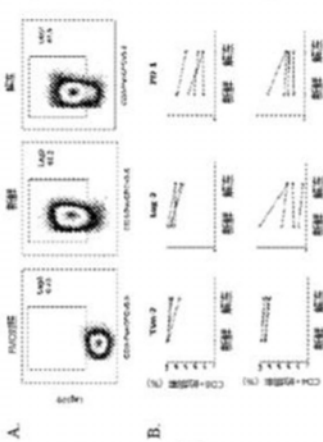
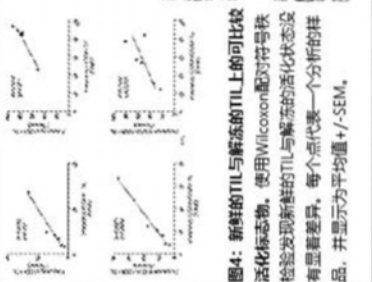


图5: 冷冻保存和解冻后 LAG-3 染色度的维持。A: CD8 TIL 的 LAG-3 染色。B: 新鲜的 TIL 和解冻的 TIL 上 CD4 和 CD8 群的调节分子的频率。C: CD8+TIM-3+ 和 CD8+LAG-3+ 解冻 TIL 具有比新鲜 TIL 更低的 %。曼-惠特尼统计检验。

结论: 除了一些调节性分子的适度变化，冷冻保存不影响测量的 TIL 表型特征。我们正在研究在临床环境中使用冷冻保存的 TIL 的可能性。

参考文献

1. Axelsson S, Faresejo M, Hedman M, Ludvigsson J, Casa R: Cryopreserved peripheral blood mononuclear cells are suitable for the assessment of immunological markers in type 1 diabetic children. *Cryobiology* 2008, 57:201-8
2. Sadeghi A, Ultenbag G, Wagenius G, Totterman TH, Eriksson F: Rapid expansion of T cell: Effects of culture and cryopreservation and importance of short-term cell recovery. *Acta Oncol.* 2013, 52:78-86.

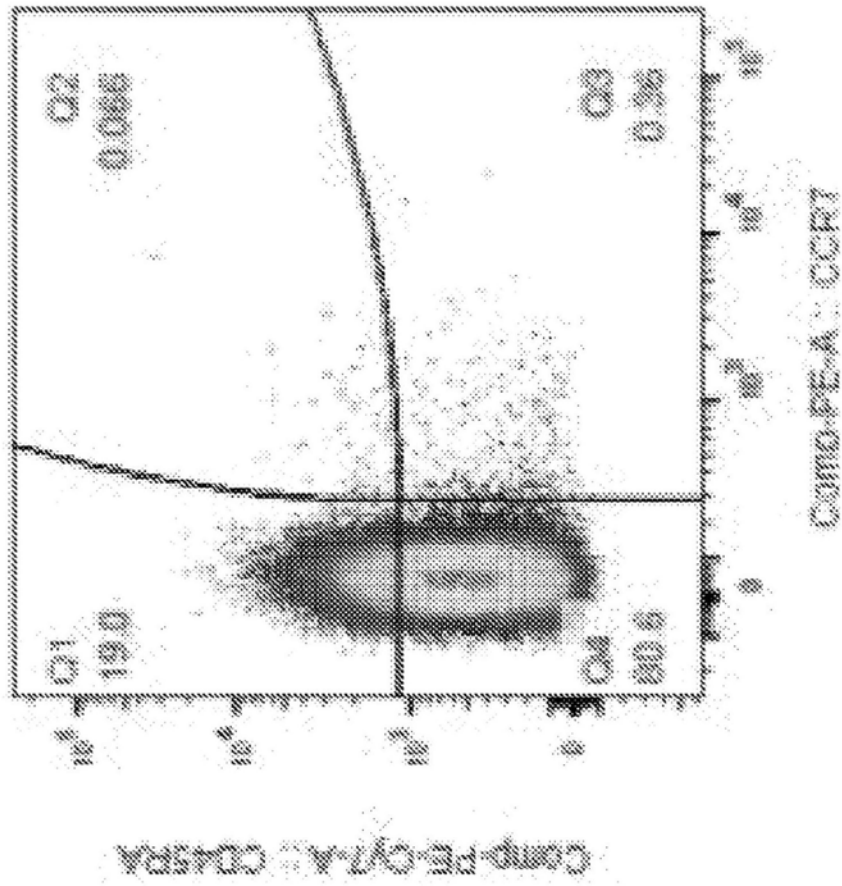


图8

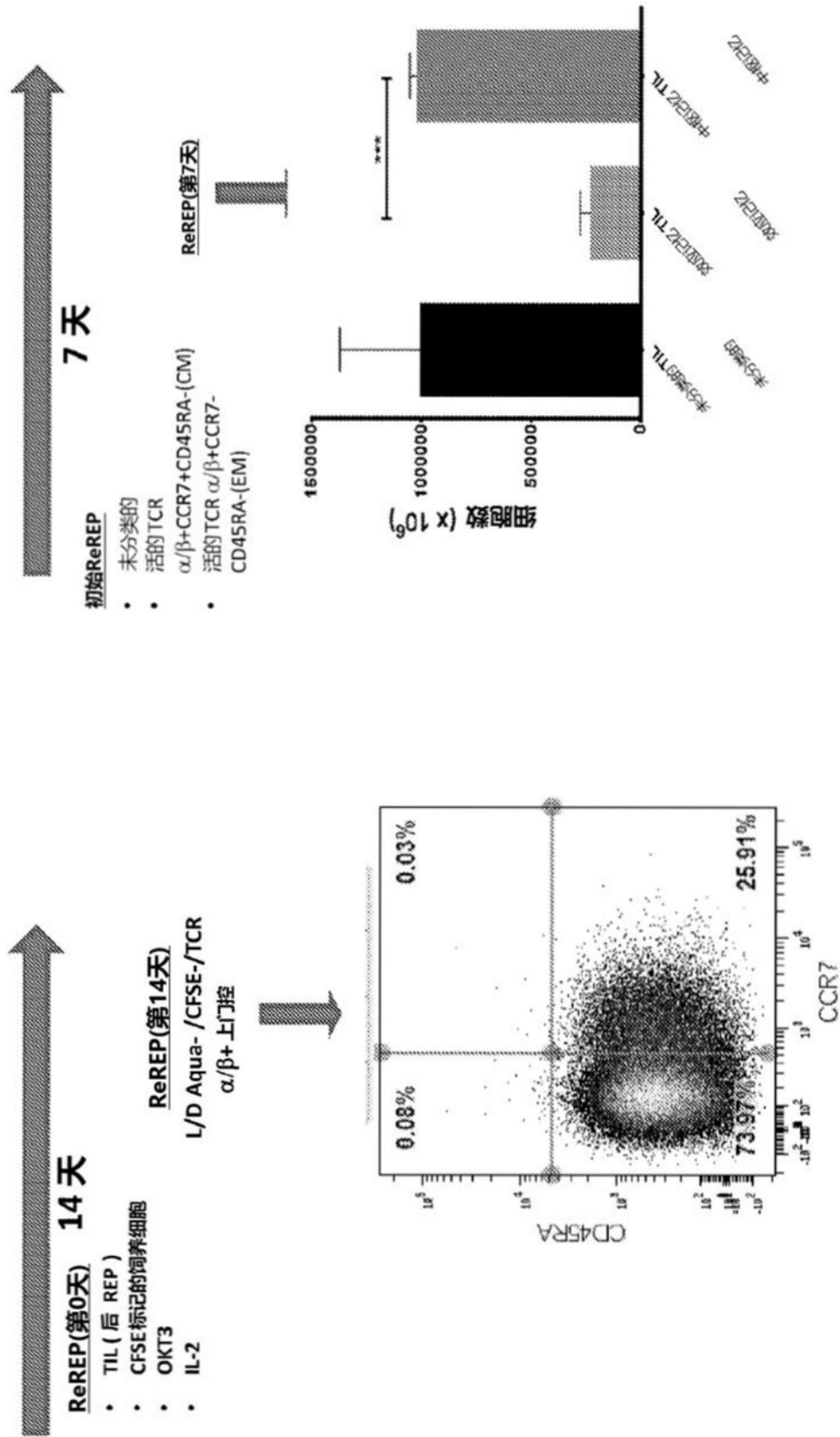


图9

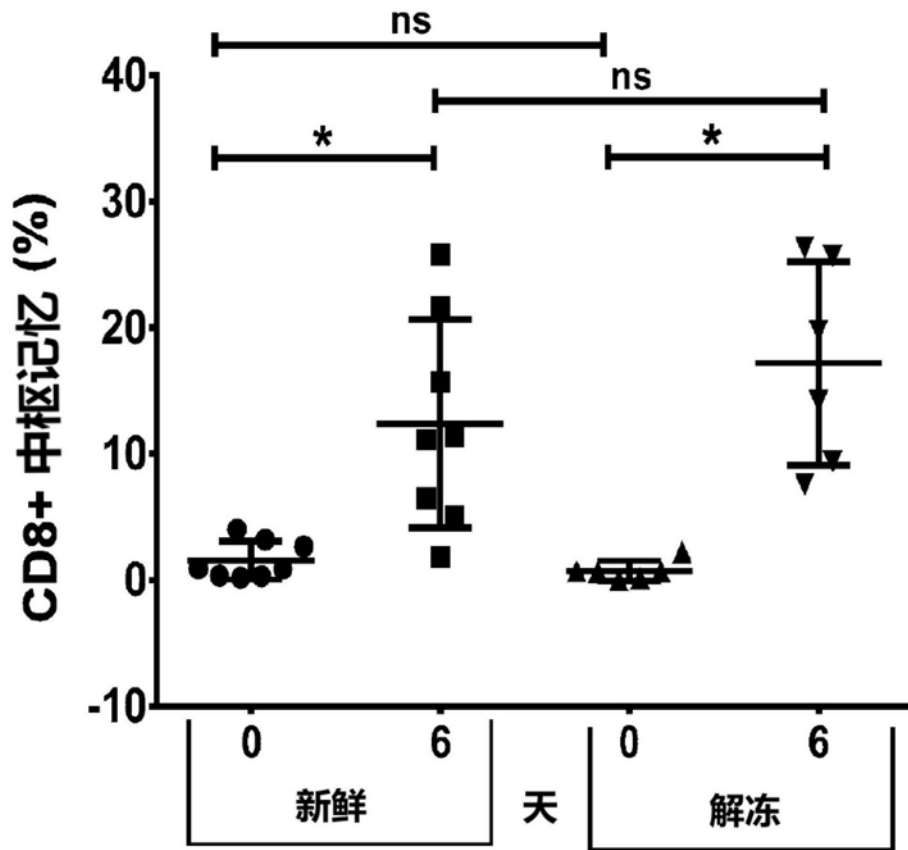


图10A

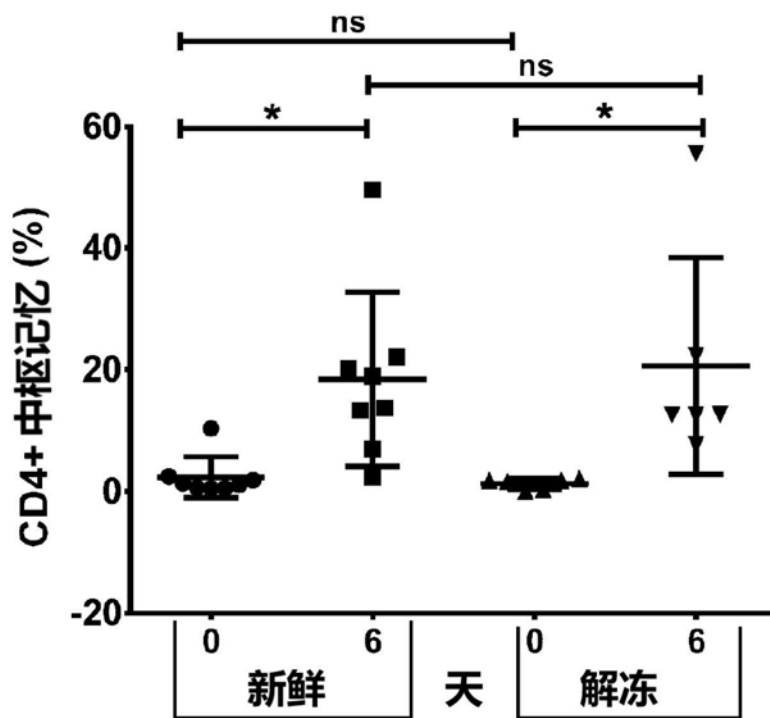


图10B

1C过程：步骤A-E的43-55天**1. 步骤A**

获得患者肿瘤样品

2. 步骤B

碎片化和第一次扩增
11至21天

3. 步骤C

第一次扩增向第二次扩增转变
可选的储存直至筛选

4. 步骤D

第二次扩增
IL-2, OKT-3, 抗原呈递饲养细胞
可选地重复一次以上

5. 步骤E

收获步骤D的TIL

6. 步骤F

最终配方和/或转移到输液袋

图11

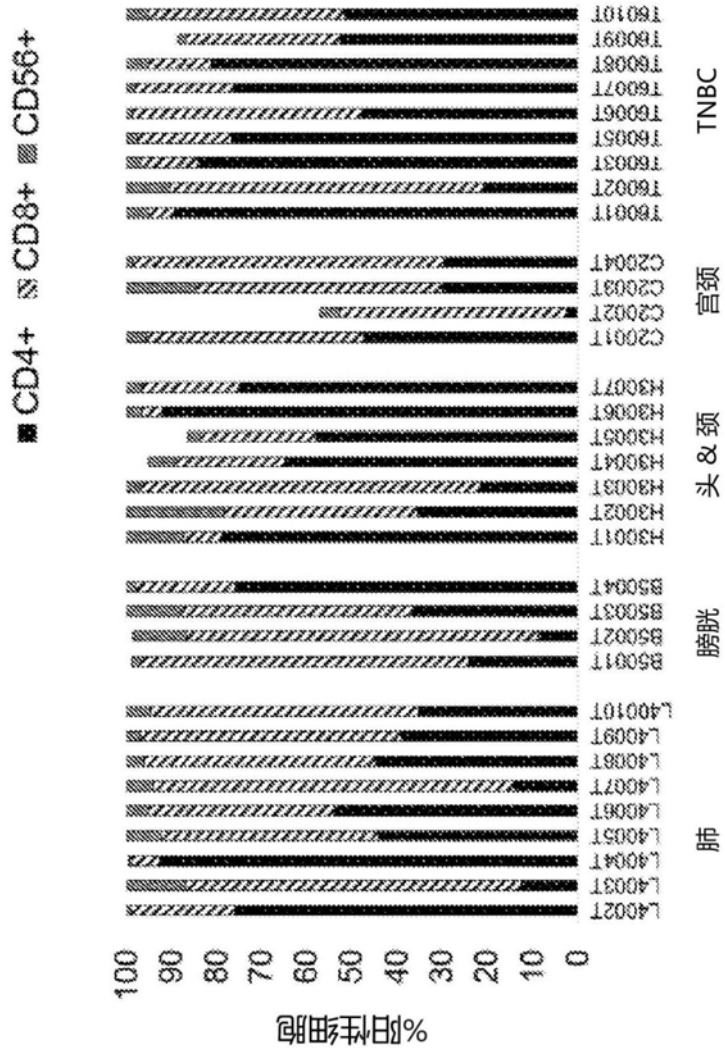


图12

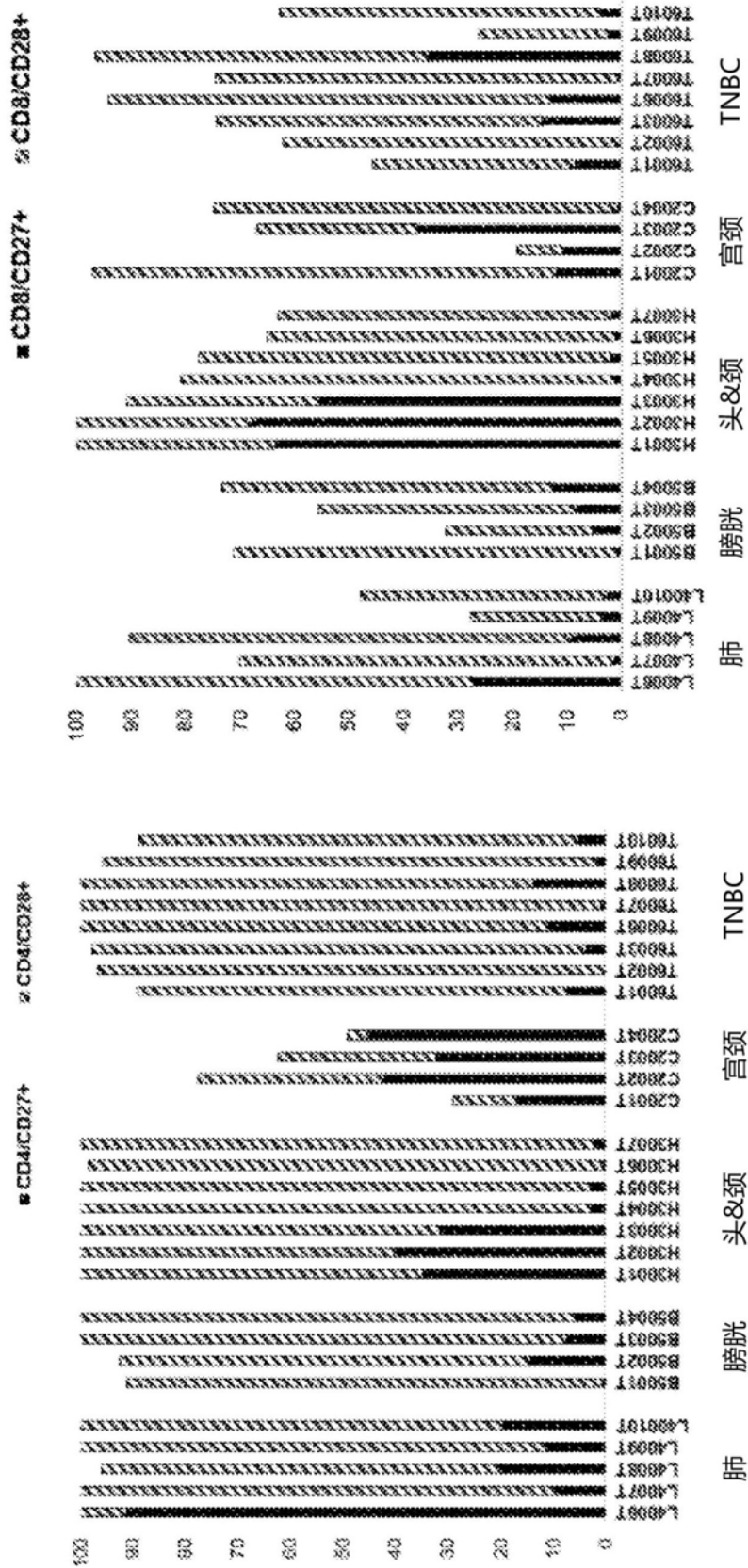


图13

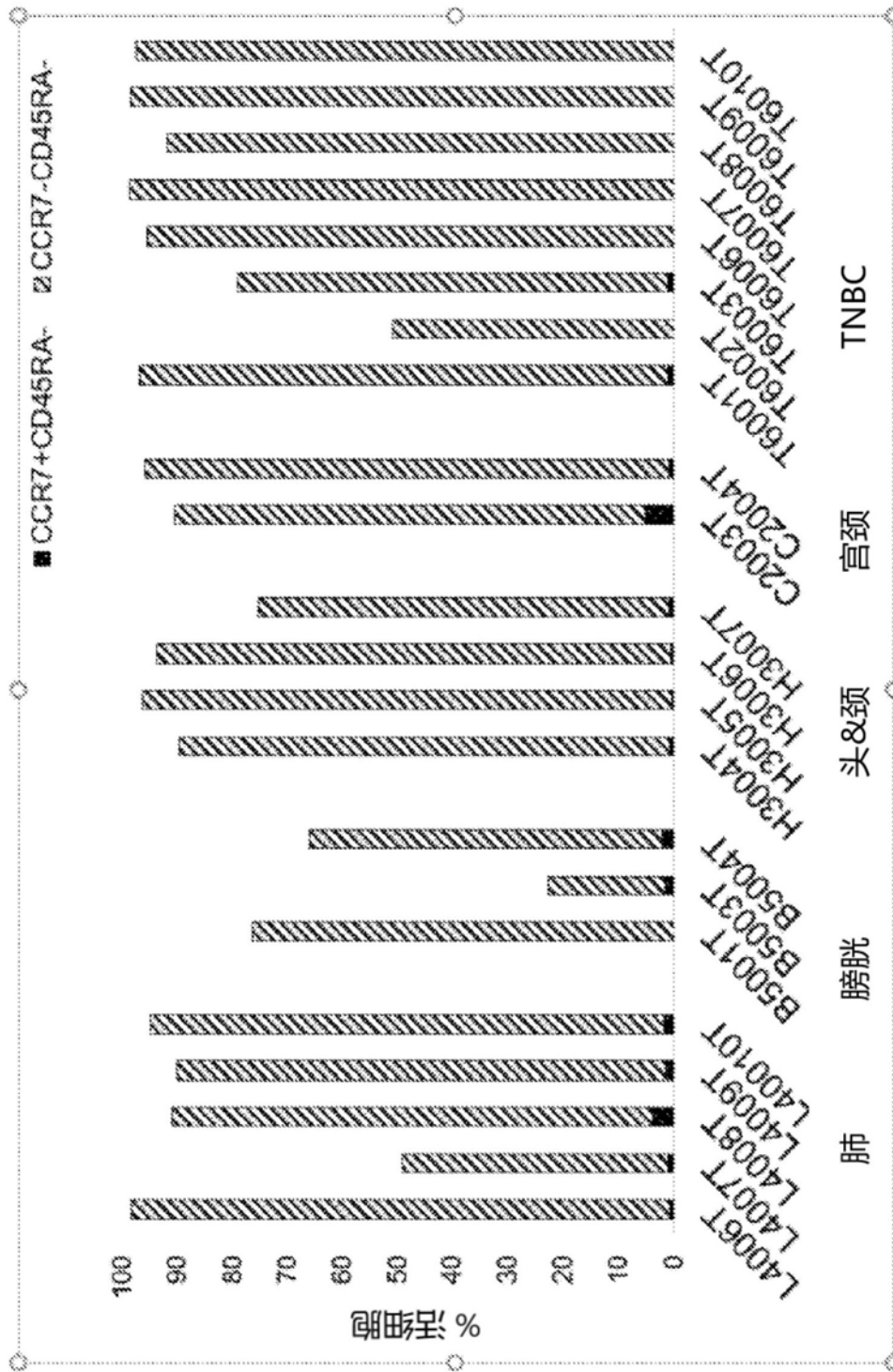


图14

管名称	SSRC	S/活	S/活	S/活/CD8	Q1: CCR7+, CD45RA+	S/活/CD8	Q2: CCR7-, CD45RA+	S/活/CD8	Q3: CCR7+, CD45RA-	S/活/CD8	Q4: CCR7-, CD45RA-	S/活/CD8	Q5: CD28-, CD57+	S/活/CD8	Q6: CD28+, CD57+	S/活/CD8	Q7: CD28+, CD57-	S/活/CD8	Q8: CD28-, CD57-	S/活/CD8
		CD4 亲本的频率	CD8 亲本的频率		亲本的频率		亲本的频率		亲本的频率		亲本的频率		亲本的频率		亲本的频率		亲本的频率		亲本的频率	
1.00E+08	非静息	3.01	95	0.53	0.53	0.53	0.69	52	46.9	2.16	0.23	7.87	89.8							
4.00E+08	非静息	2.83	95	0.47	0.69	56.7	42.2	2.51	0.32	8.19	89									
8.00E+08	非静息	2.85	95.6	0.34	0.58	55.4	43.6	2.26	0.29	8.37	89.1									
1.00E+08	静息	5.78	90.4	1.1	0.78	55.1	43	1.05	0.32	12.8	85.9									
4.00E+08	静息	5.74	90	0.86	0.82	61.1	37.2	1.11	0.32	13.6	85									
8.00E+08	静息	7.64	87.5	1.42	1.07	60.5	37	1.18	0.32	17.1	81.4									

图15