

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11) 公表番号

特表2024-510505

(P2024-510505A)

(43)公表日 令和6年3月7日(2024.3.7)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17	4 B 0 6 5	
C 1 2 N	5/078(2010.01)	C 1 2 N	5/078	4 C 0 8 7	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全594頁) 最終頁に続く
(21)出願番号 特願2023-557374(P2023-557374)		(71)出願人		519006377	
(86)(22)出願日 令和4年3月21日(2022.3.21)				アイオバンス バイオセラピューティク	
(85)翻訳文提出日 令和5年11月15日(2023.11.15)				ス, インコーポレイテッド	
(86)国際出願番号 PCT/US2022/021224				アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9	
(87)国際公開番号 WO2022/198141				4 0 7 0 サン カルロス インダストリ	
(87)国際公開日 令和4年9月22日(2022.9.22)				アル ロード 8 2 5 スイート 4 0 0	
(31)優先権主張番号 63/163,730		(74)代理人		100079108	
(32)優先日 令和3年3月19日(2021.3.19)				弁理士 稲葉 良幸	
(33)優先権主張国・地域又は機関		(74)代理人		100109346	
米国(US)				弁理士 大貫 敏史	
(31)優先権主張番号 63/255,657		(74)代理人		100117189	
(32)優先日 令和3年10月14日(2021.10.14)				弁理士 江口 昭彦	
(33)優先権主張国・地域又は機関		(74)代理人		100134120	
米国(US)				弁理士 内藤 和彦	
(31)優先権主張番号 63/280,536		(72)発明者		シンプソン・アベルソン, ミッシェル,	
				最終頁に続く	

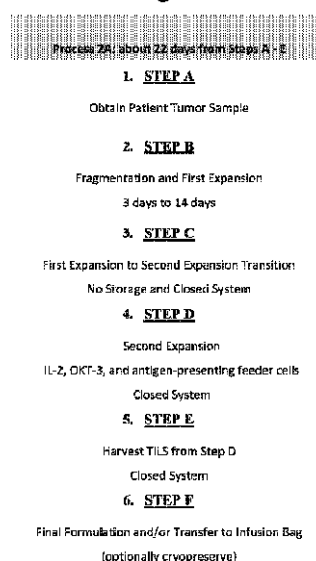
(54)【発明の名称】 CD39／CD69選択に関連した腫瘍浸潤リンパ球（TIL）拡張及びTILにおける遺伝子ノックアウトのための方法

(57) 【要約】

(i) CD39^{L0}/CD69^{L0}及び／またはCD39/CD69二重陰性、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i) 及び(ii) の組み合わせであるTILが、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、対象のTILは、(i) CD39^{L0}/CD69^{L0}及び／またはCD39/CD69二重陰性、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i) 及び(ii) 発現(例えば、(i) CD39^{L0}/CD69^{L0}及び／またはCD39/CD69二重陰性、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i) 及び(ii) 濃縮TIL集団の組み合わせ)の組み合わせのために選択されたTIL集団を遺伝子操作することによって産生される。そのような遺伝子修飾されたTILを産生するための拡張方法、及びかかるTILを使用する治療方法もまた、本明細書に提供される。

【選択図】 図1

Figure 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

修飾された腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

（a）前記対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

（b）（a）の前記第1のTIL集団からCD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性TILを選択して、CD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

（c）任意選択で、前記CD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を閉鎖系に付加するステップと、

（d）前記CD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～14日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ（c）からステップ（d）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

（e）前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～14日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

（f）ステップ（e）から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ（e）からステップ（f）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（g）ステップ（f）からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（f）から（g）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

（h）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（g）からの前記採取された第3のTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

（i）治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ（h）の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

（j）前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ（i）の前の任意の時点で、前記CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団及び／または前記第2のTIL集団及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 2】

修飾された腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

（a）前記対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

（b）任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

（c）前記第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK21

10

20

30

40

50

10183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～14日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～14日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(e)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(f)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの前記採取された第3のTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(g)の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

(i) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(h)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項3】

修飾された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 前記対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 前記第1のTIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～14日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/ま

たはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～14日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(e)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(f)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの前記採取された第3のTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(g)の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

(i) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(h)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項4】

修飾された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 前記対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 前記第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スキュテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～14日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スキュテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～14日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステッ

10

20

30

40

50

ブ（d）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

（e）ステップ（e）から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（f）ステップ（f）からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（e）から（f）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

（g）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（f）からの前記採取された第3のTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

（h）治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ（g）の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

（i）前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ（h）の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項5】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

（a）前記対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

（b）（a）の前記第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

（c）任意選択で、前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を閉鎖系に付加するステップと、

（d）CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ（c）からステップ（d）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

（e）前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

（f）ステップ（e）から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ（e）からステップ（f）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（g）ステップ（f）からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（f）から（g）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

（h）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（g）からの前記採取されたTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

（i）治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ（h）の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

(j) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(i)の前の任意の時点で、前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び/または前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項6】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 前記対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

10

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 前記第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

20

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

30

(e) ステップ(e)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(f)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの前記採取されたTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(g)の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

40

(i) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(h)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項7】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 前記対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

50

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 前記第1のTIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～14日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(e)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(f)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの前記採取されたTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(g)の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

(i) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(h)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項8】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 前記対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 前記第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～

1 1日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7~14日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

10

(e) ステップ(e)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(f)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

20

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの前記採取されたTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(g)の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

(i) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(h)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

30

【請求項9】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者もしくは前記対象における前記がんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) (a)の前記第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) 任意選択で、前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を閉鎖系に付加するステップと、

40

(d) 前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3~11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(e) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を

50

産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(f) ステップ(e)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(g) ステップ(f)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(h) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(g)からの前記採取されたTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(i) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(h)の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

(j) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(i)の前の任意の時点で、前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び/または前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項10】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者もしくは前記対象における前記がんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 前記第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

10

20

30

40

50

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ (f) からの前記採取された T I L 集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の前記第 3 の T I L 集団を、ステップ (g) の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

(i) 前記投与された第 3 の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された T I L を含むように、前記投与するステップ (h) の前の任意の時点で、前記第 1 の T I L 集団、前記第 2 の T I L 集団、及び／または前記第 3 の T I L 集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 1 1】

腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者もしくは前記対象における前記がんからの腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第 1 の T I L 集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 前記第 1 の T I L 集団を、I L - 2 を含む細胞培養培地中で培養することによって第 1 の拡張を行い、第 2 の T I L 集団を産生するステップであって、前記第 1 の拡張が、任意選択で、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第 1 の拡張が、約 3 ~ 1 1 日間行われて、前記第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ (b) からステップ (c) への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第 2 の T I L 集団を産生するステップと、

(d) 前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地を追加の I L - 2、O K T - 3、抗原提示細胞 (A P C)、及びタンパク質キナーゼ B (A K T) 阻害剤で補充することによって第 2 の拡張を行い、任意選択で、前記 A K T 阻害剤が、イパタセルチブ、G S K 6 9 0 6 9 3、G S K 2 1 4 1 7 9 5、G S K 2 1 1 0 1 8 3、A Z D 5 3 6 3、G D C - 0 0 6 8、A T 7 8 6 7、C C T 1 2 8 9 3 0、M K - 2 2 0 6、B A Y 1 1 2 5 9 7 6、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び／または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団である第 3 の T I L 集団を産生するステップであって、前記第 2 の拡張が、約 7 ~ 1 1 日間行われて、前記第 3 の T I L 集団を取得し、前記第 3 の T I L 集団が、治療的 T I L 集団であり、前記第 2 の拡張が、任意選択で、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ (c) からステップ (d) への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第 3 の T I L 集団を産生するステップと、

(e) ステップ (d) から取得された前記第 3 の T I L 集団を採取するステップであって、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ (e) からの前記採取された第 3 の T I L 集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ (e) から (f) への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ (f) からの前記採取された T I L 集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の前記第 3 の T I L 集団を、ステップ (g) の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

(i) 前記投与された第 3 の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された T I L を含むように、前記投与するステップ (h) の前の任意の時点で、前記第 1 の T I L 集団、前記第 2 の T I L 集団、及び／または前記第 3 の T I L 集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 1 2】

腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患

10

20

30

40

50

者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者もしくは前記対象における前記がんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 前記第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの前記採取されたTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(g)の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

(i) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(h)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項13】

修飾された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 前記対象または前記患者から腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含

む、前記切除するステップと、

(b) 前記腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、

(c) 前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第1のTIL集団を取得するステップと、

(d) (c)の前記第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(e) 任意選択で、前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を閉鎖系に付加するステップと、

(f) 前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3~11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(g) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7~11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(h) ステップ(g)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(g)からステップ(h)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(i) ステップ(h)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(h)から(i)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(j) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(i)からの前記採取されたTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(k) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(g)の前記注入バッグから前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、

(l) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(k)の前の任意の時点で、前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団、前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項14】

修飾された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 前記対象または前記患者から腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、前記切除するステップと、

(b) 前記腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、

(c) 前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第1のTIL集団を取得するステップと、

(d) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(e) 前記第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、前記AK

10

20

30

40

50

T 阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

10

(f) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(g) ステップ(f)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(h) ステップ(g)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(g)から(h)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

20

(i) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(h)からの前記採取されたTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(l) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(h)の前記注入バッグから前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、

(k) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(l)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

30

【請求項15】

修飾された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 前記対象または前記患者から腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、前記切除するステップと、

(b) 前記腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、

(c) 前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第1のTIL集団を取得するステップと、

40

(d) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(e) 前記第1のTIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(f) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690

50

693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

10

(g) ステップ(f)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(h) ステップ(g)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(g)から(h)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(i) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(h)からの前記採取されたTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(j) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(h)の前記注入バッグから前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、

20

(k) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(l)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項16】

修飾された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 前記対象または前記患者から腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、前記切除するステップと、

30

(b) 前記腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、

(c) 前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第1のTIL集団を取得するステップと、

(d) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(e) 前記第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～14日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

40

(f) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690

50

693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

10

(g) ステップ(f)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(h) ステップ(g)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(g)から(h)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(i) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(h)からの前記採取されたTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(j) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(h)の前記注入バッグから前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、

20

(k) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(l)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項17】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記対象もしくは前記患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

30

(b) (a)の前記第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(d) 前記第1の細胞培養培地中で前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団の初期拡張(またはプライミングによる第1の拡張)を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、前記第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択でOKT-3(抗CD3抗体)、及び任意選択で抗原提示細胞(APC)を含み、前記プライミングによる第1の拡張が、1～8日の期間にわたって起こる、前記第2のTIL集団を取得するステップと、

40

(e) 第2の細胞培養培地中で前記第2のTIL集団の急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)、及びAPCを含み、前記急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第2の拡張が、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を取得するステップと、

(f) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(g) 前記第3のTIL集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、

50

(h) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(g)の前の任意の時点で、前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び/または前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項18】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記対象もしくは前記患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) 前記第1のTIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3(抗CD3抗体)、任意選択で抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって初期拡張(またはプライミングによる第1の拡張)を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1~8日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(a)からステップ(b)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(c) 第2の細胞培養培地中で前記第2のTIL集団の急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)、及びAPCを含み、前記急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第2の拡張が、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を取得するステップと、

(d) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(e) 前記第3のTIL集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、

(f) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(e)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項19】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記対象もしくは前記患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) 第1の細胞培養培地中で前記第1のTIL集団の初期拡張(またはプライミングによる第1の拡張)を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、前記第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択でOKT-3(抗CD3抗体)、及び任意選択で抗原提示細胞(APC)を含み、前記プライミングによる第1の拡張が、1~8日の期間にわたって起こる、前記第2のTIL集団を取得するステップと、

(c) 第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2

、OKT-3（抗CD3抗体）、APC、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含み、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、前記第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^L及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、前記急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第2の拡張が、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

10

（d）前記第3のTIL集団を採取するステップと、

（e）前記第3のTIL集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、

（f）前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ（e）の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項20】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

20

（a）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記対象もしくは前記患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

（b）前記第1のTIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、任意選択で抗原提示細胞（APC）、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによって初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^L及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～8日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ（a）からステップ（b）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

30

（c）第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、APC、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含み、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、前記第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^L及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、前記急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第2の拡張が、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

40

（d）前記第3のTIL集団を採取するステップと、

（e）前記第3のTIL集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前

50

記患者に投与するステップと、

(f) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(e)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項21】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 前記対象または前記患者における前記がんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、前記切除するステップと、

(b) 前記腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップ、または前記腫瘍を腫瘍消化物に処理するステップと、

(c) 前記腫瘍断片の前記第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) 前記腫瘍断片を、第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(d) 前記第1の細胞培養培地中で前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団の初期拡張(またはプライミングによる第1の拡張)を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、前記第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択でOKT-3(抗CD3抗体)、及び任意選択で抗原提示細胞(APC)を含み、前記プライミングによる第1の拡張が、1～8日の期間にわたって起こる、前記第2のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第2の細胞培養培地中で前記第2のTIL集団の急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)、及びAPCを含み、前記急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第2の拡張が、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を取得するステップと、

(f) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(g) 前記第3のTIL集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、

(h) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(g)の前の任意の時点で、前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び／または前記第2のTIL集団及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項22】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 前記対象または前記患者における前記がんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、前記切除するステップと、

(b) 前記腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップ、または前記腫瘍を腫瘍消化物に処理するステップと、

(c) 前記第1のTIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3(抗CD3抗体)、任意選択で抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによって初期拡張(またはプライミングによる第1

10

20

30

40

50

の拡張)を行い、任意選択で、前記 A K T 阻害剤が、イパタセルチブ、G S K 6 9 0 6 9 3、G S K 2 1 4 1 7 9 5、G S K 2 1 1 0 1 8 3、A Z D 5 3 6 3、G D C - 0 0 6 8、A T 7 8 6 7、C C T 1 2 8 9 3 0、M K - 2 2 0 6、B A Y 1 1 2 5 9 7 6、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、C D 3 9^{L0} / C D 6 9^{L0} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団である第 2 の T I L 集団を産生するステップであって、前記第 1 の拡張が、任意選択で、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記プライミングによる第 1 の拡張が、約 1 ~ 8 日間行われて、前記第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ (a) からステップ (b) への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第 2 の T I L 集団を産生するステップと、

10

(d) 第 2 の細胞培養培地中で前記第 2 の T I L 集団の急速な第 2 の拡張を行い、第 3 の T I L 集団を取得するステップであって、前記第 2 の細胞培養培地が、I L - 2、O K T - 3 (抗 C D 3 抗体)、及び A P C を含み、前記急速拡張が、14 日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第 2 の拡張が、前記急速な第 2 の拡張の開始後 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日または 10 日にわたって進行することができる、前記第 3 の T I L 集団を取得するステップと、

(e) 前記第 3 の T I L 集団を採取するステップと、

(f) 前記第 3 の T I L 集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、

(g) 前記投与された第 3 の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された T I L を含むように、前記投与するステップ (f) の前の任意の時点で、前記第 1 の T I L 集団、前記第 2 の T I L 集団、及び / または前記第 3 の T I L 集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

20

【請求項 23】

腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 前記対象または前記患者における前記がんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第 1 の T I L 集団を含む、前記切除するステップと、

30

(b) 前記腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップ、または前記腫瘍を腫瘍消化物に処理するステップと、

(c) 第 1 の細胞培養培地中で前記第 1 の T I L 集団の初期拡張 (またはプライミングによる第 1 の拡張)を行い、第 2 の T I L 集団を取得するステップであって、前記第 1 の細胞培養培地が、I L - 2、任意選択で O K T - 3 (抗 C D 3 抗体)、及び任意選択で抗原提示細胞 (A P C) を含み、前記プライミングによる第 1 の拡張が、1 ~ 8 日の期間にわたって起こる、前記第 2 の T I L 集団を取得するステップと、

(d) 第 2 の細胞培養培地中で急速な第 2 の拡張を行い、第 3 の T I L 集団を取得して、第 3 の T I L 集団を産生するステップであって、前記第 2 の細胞培養培地が、I L - 2、O K T - 3 (抗 C D 3 抗体)、A P C、及びタンパク質キナーゼ B (A K T) 阻害剤を含み、任意選択で、前記 A K T 阻害剤が、イパタセルチブ、G S K 6 9 0 6 9 3、G S K 2 1 4 1 7 9 5、G S K 2 1 1 0 1 8 3、A Z D 5 3 6 3、G D C - 0 0 6 8、A T 7 8 6 7、C C T 1 2 8 9 3 0、M K - 2 2 0 6、B A Y 1 1 2 5 9 7 6、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、前記第 3 の T I L 集団が、C D 3 9^{L0} / C D 6 9^{L0} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団であり、前記急速拡張が、14 日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第 2 の拡張が、前記急速な第 2 の拡張の開始後 1 日、2 日、3 日、4 日、5 日、6 日、7 日、8 日、9 日、または 10 日にわたって進行することができる、前記第 3 の T I L 集団を産生するステップと、

40

(e) 前記第 3 の T I L 集団を採取するステップと、

50

(f) 前記第3のTIL集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、

(g) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(f)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項24】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 前記対象または前記患者における前記がんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、前記切除するステップと、

(b) 前記腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップ、または前記腫瘍を腫瘍消化物に処理するステップと、

(c) 前記第1のTIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3(抗CD3抗体)、任意選択で抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによって初期拡張(またはプライミングによる第1の拡張)を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1〜8日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(a)からステップ(b)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)、APC、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含み、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、前記第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、前記急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第2の拡張が、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(f) 前記第3のTIL集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、

(g) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(f)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項25】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者もしくは前記対象における前記がんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) (a)の前記第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) 前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、前記プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われ、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団より数が多い、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 任意選択で、前記第2のTIL集団をOKT-3で再刺激するステップと、

(e) 前記第2のTIL集団を遺伝子修飾して、修飾された第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の集団がCD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性TILを含むように、前記修飾された第2のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む、前記修飾された第2のTIL集団を産生するステップと、

(f) 前記修飾された第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記急速な第2の拡張が、約14日以内の第2の期間行われ、治療的TIL集団を取得し、前記第3の集団がCD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性TILを含むように、前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する前記遺伝子修飾を含む治療的TIL集団である、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(g) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(h) 前記第3のTIL集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項26】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者もしくは前記対象における前記がんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 前記第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団より数が多い、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(c) 任意選択で、前記第2のTIL集団をOKT-3で再刺激するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団を遺伝子修飾して、修飾された第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の集団がCD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD3

9 / C D 6 9 二重陰性 T I L を含むように、前記修飾された第 2 の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む、前記修飾された第 2 の T I L 集団を産生するステップと、

(e) 前記修飾された第 2 の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び A P C を含む第 2 の培養培地中で培養することによって急速な第 2 の拡張を行い、第 3 の T I L 集団を産生するステップであって、前記急速な第 2 の拡張が、約 1 4 日以内の第 2 の期間行われ、治療的 T I L 集団を取得し、前記第 3 の集団が C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性 T I L を含むように、前記第 3 の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する前記遺伝子修飾を含む治療的 T I L 集団である、前記第 3 の T I L 集団を産生するステップと、

10

(f) 前記第 3 の T I L 集団を採取するステップと、

(g) 前記第 3 の T I L 集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 2 7】

腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者もしくは前記対象における前記がんからの腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第 1 の T I L 集団を取得及び / または受容するステップと、

(b) 前記第 1 の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 (A P C) を含む第 1 の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第 1 の拡張を行い、第 2 の T I L 集団を産生するステップであって、前記プライミングによる第 1 の拡張が第 1 のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第 1 の拡張が約 1 ~ 1 1 日の第 1 の期間行われて、前記第 2 の T I L 集団を取得し、前記第 2 の T I L 集団は前記第 1 の T I L 集団よりも数が多い、前記第 2 の T I L 集団を産生するステップと、

20

(c) 任意選択で、前記第 2 の T I L 集団を O K T - 3 で再刺激するステップと、

(d) 前記第 2 の T I L 集団を遺伝子修飾して、修飾された第 2 の T I L 集団を産生するステップであって、前記第 2 の集団が C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性 T I L を含むように、前記修飾された第 2 の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む、前記修飾された第 2 の T I L 集団を産生するステップと、

30

(e) 前記修飾された第 2 の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、A P C、及びタンパク質キナーゼ B (A K T) 阻害剤を含む第 2 の培養培地中で培養することによって急速な第 2 の拡張を行い、任意選択で、前記 A K T 阻害剤が、イパタセルチブ、G S K 6 9 0 6 9 3、G S K 2 1 4 1 7 9 5、G S K 2 1 1 0 1 8 3、A Z D 5 3 6 3、G D C - 0 0 6 8、A T 7 8 6 7、C C T 1 2 8 9 3 0、M K - 2 2 0 6、B A Y 1 1 2 5 9 7 6、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団である第 3 の集団の T I L を産生するステップであって、前記急速な第 2 の拡張が、約 1 4 日以内の第 2 の期間行われ、治療的 T I L 集団を取得し、前記第 3 の集団が前記 C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性 T I L を含むように、前記第 3 の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する前記遺伝子修飾を含む治療的 T I L 集団である、前記第 3 の集団を産生するステップと、

40

(f) 前記第 3 の T I L 集団を採取するステップと、

(g) 前記第 3 の T I L 集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 2 8】

腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患

50

者または対象においてそれを行う方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記患者もしくは前記対象における前記がんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 前記第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO} / CD69^{LO}及び／またはCD39 / CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団より数が多い、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(c) 任意選択で、前記第2のTIL集団をOKT-3で再刺激するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団を遺伝子修飾して、修飾された第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の集団がCD39^{LO} / CD69^{LO}及び／またはCD39 / CD69二重陰性TILを含むように、前記修飾された第2のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む、前記修飾された第2のTIL集団を産生するステップと、

(e) 前記修飾された第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、APC、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO} / CD69^{LO}及び／またはCD39 / CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記急速な第2の拡張が約14日以下の第2の期間行われて、治療的TIL集団を取得し、前記第3の集団がCD39^{LO} / CD69^{LO}及び／またはCD39 / CD69二重陰性TILを含むように、前記第3のTIL集団が、CD39 / CD69の発現を低減する前記遺伝子修飾を含む治療的TIL集団である、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(f) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(g) 前記第3のTIL集団の治療上有効な部分を前記がんを有する前記対象または前記患者に投与するステップと、を含む、前記方法。

【請求項29】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された前記腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(b) ステップ(a)の前記第1のTIL集団からCD39^{LO} / CD69^{LO}及び／またはCD39 / CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO} / CD69^{LO}及び／またはCD39 / CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得することと、

(c) 前記CD39^{LO} / CD69^{LO}及び／またはCD39 / CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表

面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～7／8日の第1の期間行われ、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団より数が多い、前記第2のTIL集団を産生することと、

(d) 前記第2のTIL集団をIL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の拡張に追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数の少なくとも2倍であり、前記急速な第2の拡張が、約1～11日の第2の期間行われ、治療的TIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、前記治療的TIL集団であり、前記急速な第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記第3のTIL集団を産生することと、

10

(e) ステップ(d)から取得された前記治療的TIL集団を採取することと、

(f) ステップ(e)からの前記採取されたTIL集団を注入バッグに移すことと、

(g) 前記治療的TIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(e)の前の任意の時点で、前記CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団及び／または前記第2のTIL集団及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。

【請求項30】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された前記腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

20

(b) 前記第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～7／8日の第1の期間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団より数が多い、前記第2のTIL集団を産生することと、

30

(c) 前記第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の拡張に追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数の少なくとも2倍であり、前記急速な第2の拡張が、約1～11日の第2の期間行われ、治療的TIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、前記治療的TIL集団であり、前記急速な第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記第3のTIL集団を産生することと、

40

(d) ステップ(d)から取得された前記治療的TIL集団を採取することと、

(e) ステップ(e)からの前記採取したTIL集団を注入バッグに移すことと、

(f) 前記治療的TIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(e)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団、前記第2のTIL集団、及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。

【請求項31】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取

50

得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された前記腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(b) 前記第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の拡張が第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が約1～7/8日の第1の期間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団は前記第1のTIL集団よりも数が多い、前記第2のTIL集団を産生することと、

(c) 前記第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、APC、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤は、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の拡張に追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数の少なくとも2倍であり、前記急速な第2の拡張が、約1～11日の第2の期間行われ、治療的TIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、前記治療的TIL集団であり、前記急速な第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記第3のTIL集団を産生することと、

(d) ステップ(d)から取得された前記治療的TIL集団を採取することと、

(e) ステップ(e)からの前記採取したTIL集団を注入バッグに移すことと、

(f) 前記治療的TIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(e)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び／または前記第2のTIL集団及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。

【請求項32】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された前記腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(b) 前記第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～7/8日の第1の期間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団より数が多い、前記第2のTIL集団を産生することと、

(c) 前記第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、APC、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤は、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及び

ホノキオールからなる群から選択され、 $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 及び／または $CD39/CD69$ 二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の拡張に追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数の少なくとも2倍であり、前記急速な第2の拡張が、約1～11日の第2の期間行われ、治療的TIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、前記治療的TIL集団であり、前記急速な第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記第3のTIL集団を産生することと、

(d) ステップ(d)から取得された前記治療的TIL集団を採取することと、

(e) ステップ(e)からの前記採取したTIL集団を注入バッグに移すことと、

(f) 前記治療的TIL集団が、 $CD39$ 及び $CD69$ の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(e)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び／または前記第2のTIL集団及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。

10

【請求項33】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が、

(a) 前記腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者におけるがんから切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

20

(b) (a)の前記第1のTIL集団から $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 及び／または $CD39/CD69$ 二重陰性TILを選択して、 $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 及び／または $CD39/CD69$ 二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) 任意選択で、前記 $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 及び／または $CD39/CD69$ 二重陰性濃縮TIL集団を閉鎖系に付加するステップと、

(d) 前記 $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 及び／または $CD39/CD69$ 二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～14日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

30

(e) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～14日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(f) ステップ(e)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

40

(g) ステップ(f)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(f)から(g)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(h) 前記第3のTIL集団が、 $CD39$ 及び $CD69$ の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(f)の前の任意の時点で、前記 $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 及び／または $CD39/CD69$ 二重陰性濃縮TIL集団及び／または前記第2のTIL集団及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

50

【請求項 3 4】

腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を治療的 T I L 集団に拡張する方法であって、前記方法が

、
（a）前記腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者におけるがんから切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を取得及び／または受容するステップと、

（b）任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

（c）I L - 2 及びタンパク質キナーゼ B（A K T）阻害剤を含む細胞培養培地中で前記第 1 の T I L 集団を培養することによって第 1 の拡張を行い、任意選択で、前記 A K T 阻害剤が、イパタセルチブ、G S K 6 9 0 6 9 3、G S K 2 1 4 1 7 9 5、G S K 2 1 1 0 1 8 3、A Z D 5 3 6 3、G D C - 0 0 6 8、A T 7 8 6 7、C C T 1 2 8 9 3 0、M K - 2 2 0 6、B A Y 1 1 2 5 9 7 6、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テハラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、C D 3 9^{L O}／C D 6 9^{L O}及び／またはC D 3 9／C D 6 9二重陰性濃縮 T I L 集団である第 2 の T I L 集団を産生するステップであって、前記第 1 の拡張が、任意選択で、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第 1 の拡張が、約 3 ～ 1 4 日間行われて、前記第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ（b）からステップ（c）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第 2 の T I L 集団を産生するステップと、

（d）前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地を追加の I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞（A P C）で補充することによって第 2 の拡張を行い、第 3 の T I L 集団を産生するステップであって、前記第 2 の拡張が、約 7 ～ 1 4 日間行われて、前記第 3 の T I L 集団を取得し、前記第 3 の T I L 集団が、治療的 T I L 集団であり、前記第 2 の拡張が、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（c）からステップ（d）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第 3 の T I L 集団を産生するステップと、

（e）ステップ（d）から取得された前記第 3 の T I L 集団を採取するステップであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（f）ステップ（e）からの前記採取された第 3 の T I L 集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（e）から（f）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

（g）前記第 3 の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された T I L を含むように、前記採取するステップ（f）の前の任意の時点で、前記第 1 の T I L 集団及び／または前記第 2 の T I L 集団及び／または前記第 3 の T I L 集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 3 5】

腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を治療的 T I L 集団に拡張する方法であって、前記方法が

、
（a）前記腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者におけるがんから切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を取得及び／または受容するステップと、

（b）任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

（c）前記第 1 の T I L 集団を、I L - 2 を含む細胞培養培地中で培養することによって第 1 の拡張を行い、第 2 の T I L 集団を産生するステップであって、前記第 1 の拡張が、任意選択で、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第 1 の拡張が、約 3 ～ 1 4 日間行われて、前記第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ（c）からステップ（d）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第 2 の T I L 集

団を産生するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7~14日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

10

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

20

(g) 前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(f)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び/または前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項36】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が、

(a) 前記腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象または前記患者におけるがんから切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

30

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 前記第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3~14日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

40

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラ

50

リン、及びホノキオールからなる群から選択され、 $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 及び／または $CD39/CD69$ 二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～14日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(g) 前記第3のTIL集団が、 $CD39$ 及び $CD69$ の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(f)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び／または前記第2のTIL集団及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。

【請求項37】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が

(a) 前記腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

(b) (a)の前記第1のTIL集団から $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 及び／または $CD39/CD69$ 二重陰性TILを選択して、(i) $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 及び／または $CD39/CD69$ 二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) 任意選択で、前記 $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 及び／または $CD39/CD69$ 二重陰性濃縮TIL集団を閉鎖系に付加するステップと、

(d) $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 及び／または $CD39/CD69$ 二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと

(e) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(f) ステップ(e)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(g) ステップ(f)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(f)から(g)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(h) 前記第3のTIL集団が、 $CD39$ 及び $CD69$ の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(f)の前の任意の時点で、前記 $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 及び／または $CD39/CD69$ 二重陰性濃縮T

10

20

30

40

50

IL 集団及び／または前記第 2 の TIL 集団及び／または前記第 3 の TIL 集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 38】

腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を治療的 TIL 集団に拡張する方法であって、前記方法が、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から第 1 の TIL 集団を取得するステップと、

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) IL-2 及びタンパク質キナーゼ B (AKT) 阻害剤を含む細胞培養培地中で前記第 1 の TIL 集団を培養することによって第 1 の拡張を行い、任意選択で、前記 AKT 阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CC128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39LO/CD69LO 及び／または CD39/CD69 二重陰性濃縮 TIL 集団である第 2 の TIL 集団を産生するステップであって、前記第 1 の拡張が、任意選択で、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第 1 の拡張が、約 3～11 日間行われて、前記第 2 の TIL 集団を取得し、ステップ (b) からステップ (c) への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第 2 の TIL 集団を産生するステップと、

(d) 前記第 2 の TIL 集団の前記細胞培養培地を追加の IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞 (APC) で補充することによって第 2 の拡張を行い、第 3 の TIL 集団を産生するステップであって、前記第 2 の拡張が、約 7～11 日間行われて、前記第 3 の TIL 集団を取得し、前記第 2 の拡張が、任意選択で、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ (c) からステップ (d) への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第 3 の TIL 集団を産生するステップと、

(e) ステップ (e) から取得された前記第 3 の TIL 集団を採取するステップであって、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ (f) からの前記採取された第 3 の TIL 集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ (e) から (f) への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ (f) からの前記採取された TIL 集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の前記第 3 の TIL 集団を、ステップ (g) の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

(i) 前記投与された第 3 の TIL 集団が、CD39 及び CD69 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された TIL を含むように、前記投与するステップ (h) の前の任意の時点で、前記第 1 の TIL 集団及び／または前記第 2 の TIL 集団及び／または前記第 3 の TIL 集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 39】

腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を治療的 TIL 集団に拡張する方法であって、前記方法が、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から第 1 の TIL 集団を取得するステップと、

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) IL-2 を含む細胞培養培地中で前記第 1 の TIL 集団を培養することによって第 1 の拡張を行い、第 2 の TIL 集団を産生するステップであって、前記第 1 の拡張が、

任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～14日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(e)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(f)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの前記採取されたTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(g)の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

(i) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(h)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び/または前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項40】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7~14日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

10

(e) ステップ(e)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(f)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの前記採取されたTIL集団を含む前記注入バッグを凍結保存するステップと、

20

(h) 治療上有効な投与量の前記第3のTIL集団を、ステップ(g)の前記注入バッグから前記対象に投与するステップと、

(i) 前記投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記投与するステップ(h)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び/または前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項41】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が、

30

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) (a)の前記第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) 任意選択で、前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を閉鎖系に付加するステップと、

(d) 前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3~11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

40

(e) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7~11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記

50

系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(f) ステップ(e)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(g) ステップ(f)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(h) 前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(f)の前の任意の時点で、前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び/または前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

10

【請求項42】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イバタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テハラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3~11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

20

30

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7~11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

40

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(g) 前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(e)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び/または前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項43】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が、

50

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(g) 前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(e)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び／または前記第2のTIL集団及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項44】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)へ

の移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7~11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

10

(e) ステップ(d)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

20

(g) 前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(e)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び/または前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項45】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が、

(a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、前記切除するステップと、

30

(b) 前記腫瘍を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、

(c) 前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第1のTIL集団を取得するステップと、

(d) (c)の前記第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(e) 任意選択で、前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を閉鎖系に付加するステップと、

40

(f) IL-2を含む細胞培養培地中でCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3~11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(g) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7~11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する

50

密閉容器内で行われ、ステップ（f）からステップ（g）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

（h）ステップ（g）から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ（g）からステップ（h）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（i）ステップ（h）からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（h）から（i）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

（j）前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ（h）の前の任意の時点で、前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び/または前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

10

【請求項46】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が、

（a）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、前記切除するステップと、

20

（b）前記腫瘍を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、

（c）前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第1のTIL集団を取得するステップと、

（d）任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

（e）IL-2及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イバタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テハラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3～11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

30

（f）前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7～11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（e）からステップ（f）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

40

（g）ステップ（f）から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ（f）からステップ（g）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（h）ステップ（g）からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（g）から（h）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

（i）前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ（g）の前の任意の時

50

点で、前記第 1 の T I L 集団及び／または前記第 2 の T I L 集団及び／または前記第 3 の T I L 集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 4 7】

腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を治療的 T I L 集団に拡張する方法であって、前記方法が、

（a）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第 1 の T I L 集団を含む、前記切除するステップと、

（b）前記腫瘍を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、

（c）前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第 1 の T I L 集団を取得するステップと、

（d）任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

（e）I L - 2 を含む細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を培養することによって第 1 の拡張を行い、第 2 の T I L 集団を産生するステップであって、第 1 の拡張が、任意選択で、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第 1 の拡張が、約 3 ～ 1 1 日間行われて、前記第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ（e）からステップ（f）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第 2 の T I L 集団を産生するステップと、

（f）前記第 2 の T I L 集団の前記細胞培養培地を追加の I L - 2、O K T - 3、抗原提示細胞（A P C）、及びタンパク質キナーゼ B（A K T）阻害剤で補充することによって第 2 の拡張を行い、任意選択で、前記 A K T 阻害剤が、イパタセルチブ、G S K 6 9 0 6 9 3、G S K 2 1 4 1 7 9 5、G S K 2 1 1 0 1 8 3、A Z D 5 3 6 3、G D C - 0 0 6 8、A T 7 8 6 7、C C T 1 2 8 9 3 0、M K - 2 2 0 6、B A Y 1 1 2 5 9 7 6、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、C D 3 9^{L O}／C D 6 9^{L O}及び／または C D 3 9／C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団である第 3 の T I L 集団を産生するステップであって、前記第 2 の拡張が、約 7 ～ 1 1 日間行われて、前記第 3 の T I L 集団を取得し、前記第 3 の T I L 集団が、治療的 T I L 集団であり、前記第 2 の拡張が、任意選択で、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（e）からステップ（f）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第 3 の T I L 集団を産生するステップと、

（g）ステップ（f）から取得された前記第 3 の T I L 集団を採取するステップであって、ステップ（f）からステップ（g）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

（h）ステップ（g）からの前記採取された第 3 の T I L 集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（g）から（h）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

（i）前記第 3 の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された T I L を含むように、前記採取するステップ（g）の前の任意の時点で、前記第 1 の T I L 集団及び／または前記第 2 の T I L 集団及び／または前記第 3 の T I L 集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項 4 8】

腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を治療的 T I L 集団に拡張する方法であって、前記方法が、

（a）対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第 1 の T I L 集団を含む、前記切除するステップと、

（b）前記腫瘍を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、

(c) 前記複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、前記第1のTIL集団を取得するステップと、

(d) 任意選択で、前記腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(e) IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記第1の拡張が、約3~11日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(f) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の拡張が、約7~11日間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、前記第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(g) ステップ(f)から取得された前記第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記採取するステップと、

(h) ステップ(g)からの前記採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(g)から(h)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記移すステップと、

(i) 前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(g)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び/または前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項49】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) (a)の前記第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(d) 前記第1の細胞培養培地中で前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD

39 / CD69 二重陰性濃縮 TIL 集団の初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、第2の TIL 集団を取得するステップであって、前記第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択で OKT-3（抗 CD3 抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（APC）を含み、前記プライミングによる第1の拡張が、1～8日の期間にわたって起こる、前記第2の TIL 集団を取得するステップと、

（e）第2の細胞培養培地中で前記第2の TIL 集団の急速な第2の拡張を行い、第3の TIL 集団を取得するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗 CD3 抗体）、及び APC を含み、前記急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第2の拡張が、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3の TIL 集団を取得するステップと、

10

（f）前記第3の TIL 集団を採取するステップと、

（g）前記第3の TIL 集団が、CD39 及び CD69 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された TIL を含むように、前記採取するステップ（f）の前の任意の時点で、前記 CD39^{LO} / CD69^{LO} 及び / または CD39 / CD69 二重陰性濃縮 TIL 集団及び / または前記第2の TIL 集団及び / または前記第3の TIL 集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項50】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的 TIL 集団に拡張する方法であって、前記方法が

20

、
（a）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞と TIL 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1の TIL 集団を取得及び / または受容するステップと、

（b）IL-2、任意選択で OKT-3（抗 CD3 抗体）、任意選択で抗原提示細胞（APC）、及びタンパク質キナーゼ B（AKT）阻害剤を含む細胞培養培地中で前記第1の TIL 集団を培養することによって初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、任意選択で、前記 AKT 阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホ

30

ノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO} / CD69^{LO} 及び / または CD39 / CD69 二重陰性濃縮 TIL 集団である第2の TIL 集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～8日間行われて、前記第2の TIL 集団を取得し、ステップ（a）からステップ（b）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2の TIL 集団を産生するステップと、

40

（c）第2の細胞培養培地中で前記第2の TIL 集団の急速な第2の拡張を行い、第3の TIL 集団を取得するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗 CD3 抗体）、及び APC を含み、前記急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第2の拡張が、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3の TIL 集団を取得するステップと、

（d）前記第3の TIL 集団を採取するステップと、

（e）前記第3の TIL 集団が、CD39 及び CD69 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された TIL を含むように、前記採取するステップ（d）の前の任意の時点で、前記第1の TIL 集団及び / または前記第2の TIL 集団及び / または前記第3の TIL 集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

50

【請求項51】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的 TIL 集団に拡張する方法であって、前記方法が

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 第1の細胞培養培地中で前記第1のTIL集団の初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、前記第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（APC）を含み、前記プライミングによる第1の拡張が、1～8日の期間にわたって起こる、前記第2のTIL集団を取得するステップと、

(c) 第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、APC、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含み、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、前記第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^L及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、前記急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第2の拡張が、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

10

20

(d) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(e) 前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ（d）の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び／または前記第2のTIL集団及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項52】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

30

(b) IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、任意選択で抗原提示細胞（APC）、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^L及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～8日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ（a）からステップ（b）への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

40

(c) 第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、APC、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含み、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オ

50

リドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、前記第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、前記急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第2の拡張が、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(d) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(e) 前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(d)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び/または前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

10

【請求項53】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が、

a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、前記切除するステップと、

(b) 前記腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化するステップと、

(c) 前記腫瘍断片または腫瘍消化物中の前記第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

20

(d) CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(e) 前記第1の細胞培養培地中で前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団の初期拡張(またはプライミングによる第1の拡張)を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、前記第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択でOKT-3(抗CD3抗体)、及び任意選択で抗原提示細胞(APC)を含み、前記プライミングによる第1の拡張が、1~8日の期間にわたって起こる、前記第2のTIL集団を取得するステップと、

30

(f) 第2の細胞培養培地中で前記第2のTIL集団の急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)、及びAPCを含み、前記急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第2の拡張が、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を取得するステップと、

(g) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(h) 前記採取された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(f)の前の任意の時点で、前記CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び/または前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

40

【請求項54】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が、

a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、前記切除するステップと、

50

(b) 前記腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化するステップと、

(c) IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、任意選択で抗原提示細胞（APC）、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～8日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(a)からステップ(b)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

10

(d) 第2の細胞培養培地中で前記第2のTIL集団の急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及びAPCを含み、前記急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第2の拡張が、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を取得するステップと、

20

(e) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(f) 前記採取された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(e)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び/または前記第2のTIL集団及び/または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項55】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が

a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、前記切除するステップと、

30

(b) 前記腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化するステップと、

(c) 第1の細胞培養培地中で前記第1のTIL集団の初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、前記第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（APC）を含み、前記プライミングによる第1の拡張が、1～8日の期間にわたって起こる、前記第2のTIL集団を取得するステップと、

(d) 第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、APC、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含み、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、前記第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、前記急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第2の拡張が、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

40

50

(e) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(f) 前記採取された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(e)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び／または前記第2のTIL集団及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項56】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法であって、前記方法が

a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、前記腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または前記がんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、前記切除するステップと、

(b) 前記腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化するステップと、

(c) IL-2、任意選択でOKT-3(抗CD3抗体)、任意選択で抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによって初期拡張(またはプライミングによる第1の拡張)を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、前記第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～8日間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、ステップ(a)からステップ(b)への移行が、任意選択で、前記系を開くことなく起こる、前記第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、前記第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)、APC、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含み、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、前記第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、前記急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、前記急速な第2の拡張が、前記急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、前記第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) 前記第3のTIL集団を採取するステップと、

(f) 前記採取された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(e)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び／または前記第2のTIL集団及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む、前記方法。

【請求項57】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された前記腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(b) ステップ(a)の前記第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び

／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得することと、

(c) 前記CD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団は前記第1のTIL集団よりも数が多い、前記第2のTIL集団を産生することと、

(d) 前記第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の細胞培養培地と接触させることによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の拡張が、約1～11日の第2の期間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が治療的TIL集団である、前記第3のTIL集団を産生することと、

(e) ステップ(c)から取得された前記治療的TIL集団を採取することと、

(f) 前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(e)の前の任意の時点で、前記CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団及び／または前記第2のTIL集団及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。

【請求項58】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された前記腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(b) 前記第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団より数が多い、前記第2のTIL集団を産生することと、

(c) 前記第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の細胞培養培地と接触させることによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の拡張が約1～11日の第2の期間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が治療的TIL集団である、前記第3のTIL集団を産生することと、

(d) ステップ(c)から取得された前記治療的TIL集団を採取することと、

(e) 前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(d)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び／または前記第2のTIL集団及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。

【請求項59】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された前記腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(b) IL-2、任意選択でOKT-3を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で前記第1のTIL集団を培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の拡張が約1～11日間の第1の期間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団は前記第1のTIL集団よりも数が多い、前記第2のTIL集団を産生することと、

(c) 前記第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、APC、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤は、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の拡張が、約1～11日の第2の期間行われ、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団である、前記第3のTIL集団を産生することと、

(d) ステップ(c)から取得された前記治療的TIL集団を採取することと、

(e) 前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(d)の前の任意の時点で、前記第1のTIL集団及び／または前記第2のTIL集団及び／または前記第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。

【請求項60】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、前記対象におけるがんから切除された前記腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(b) 前記第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞（APC）、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団より数が多い、前記第2のTIL集団を産生することと、

(c) 前記第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、APC、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤は、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の拡張が、約1～11日の第2の期間行われ、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団である、前記第3のTIL集団を産生することと、

(d) ステップ(c) から取得された前記治療的 TIL 集団を採取することと、

(e) 前記第3の TIL 集団が、CD39 及び CD69 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された TIL を含むように、前記採取するステップ(d)の前の任意の時点で、前記第1の TIL 集団及び／または前記第2の TIL 集団及び／または前記第3の TIL 集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。

【請求項61】

前記プライミングによる第1の拡張ステップにおいて、前記細胞培養培地が、抗原提示細胞(APC)をさらに含み、前記急速な第2の拡張ステップにおける前記培養培地中の APC の数が、前記プライミングによる第1の拡張ステップにおける前記培養培地中の APC の数より多い、請求項49～60のいずれかに記載の方法。

【請求項62】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的 TIL 集団に拡張するための方法であって、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞と TIL 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1の TIL 集団を取得及び／または受容することと、

(b) (a) の前記第1の TIL 集団から CD39^{LO} / CD69^{LO} 及び／または CD39 / CD69 二重陰性 TIL を選択して、CD39^{LO} / CD69^{LO} 及び／または CD39 / CD69 二重陰性濃縮 TIL 集団を取得することと、

(c) IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む第1の細胞培養培地中で前記 CD39^{LO} / CD69^{LO} 及び／または CD39 / CD69 二重陰性濃縮 TIL 集団を培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2の TIL 集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われ、前記第2の TIL 集団を取得し、前記第2の TIL 集団が、前記第1の TIL 集団より数が多い、前記第2の TIL 集団を産生することと、

(d) 任意選択で、前記第2の TIL 集団を OKT-3 で再刺激することと、

(e) 前記第2の TIL 集団を遺伝子修飾して、修飾された第2の TIL 集団を産生することであって、前記修飾された第2の TIL 集団が、CD39 及び CD69 の発現を低減する遺伝子修飾を含む、前記修飾された第2の TIL 集団を産生することと、

(f) 前記修飾された第2の TIL 集団を、IL-2、OKT-3、及び APC を含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、第3の TIL 集団を産生することであって、前記急速な第2の拡張が、約14日以内の第2の期間行われ、治療的 TIL 集団を取得し、前記第3の TIL 集団が、CD39 及び CD69 の発現を低減する前記遺伝子修飾を含む治療的 TIL 集団である、前記第3の TIL 集団を産生することと、

(g) 前記第3の TIL 集団を採取することと、を含む、前記方法。

【請求項63】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的 TIL 集団に拡張するための方法であって、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞と TIL 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1の TIL 集団を取得及び／または受容することと、

(b) 前記第1の TIL 集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼ B(AKT) 阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、前記 AKT 阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO} / CD69^{LO} 及び／または CD39 / CD69 二重陰性濃縮 TIL 集団である第2の TIL 集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透

10

20

30

40

50

過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団より数が多い、前記第2のTIL集団を産生することと、

(c) 任意選択で、前記第2のTIL集団をOKT-3で再刺激することと、

(d) 前記第2のTIL集団を遺伝子修飾して、修飾された第2のTIL集団を産生することであって、前記修飾された第2のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む、前記修飾された第2のTIL集団を産生することと、

(e) 前記修飾された第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の拡張が、約14日以内の第2の期間行われ、治療的TIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する前記遺伝子修飾を含む治療的TIL集団である、前記第3のTIL集団を産生することと、

(f) 前記第3のTIL集団を採取することと、を含む、前記方法。

【請求項64】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(b) 前記第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の拡張が第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が約1～11日の第1の期間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団は前記第1のTIL集団よりも数が多い、前記第2のTIL集団を産生することと、

(c) 任意選択で、前記第2のTIL集団をOKT-3で再刺激することと、

(d) 前記第2のTIL集団を遺伝子修飾して、修飾された第2のTIL集団を産生することであって、前記修飾された第2のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む、前記修飾された第2のTIL集団を産生することと、

(e) 前記修飾された第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、APC、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の拡張が約14日以下の第2の期間行われて、治療的TIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する前記遺伝子修飾を含む治療的TIL集団である、前記第3のTIL集団を産生することと、

(f) 前記第3のTIL集団を採取することと、を含む、前記方法。

【請求項65】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(b) 前記第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD

10

20

30

40

50

5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団が、前記第1のTIL集団より数が多い、前記第2のTIL集団を産生することと、

(c) 任意選択で、前記第2のTIL集団をOKT-3で再刺激することと、

(d) 前記第2のTIL集団を遺伝子修飾して、修飾された第2のTIL集団を産生することであって、前記修飾された第2のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む、前記修飾された第2のTIL集団を産生することと、

(e) 前記修飾された第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、APC、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、前記AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の拡張が約14日以下の第2の期間行われて、治療的TIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する前記遺伝子修飾を含む治療的TIL集団である、前記第3のTIL集団を産生することと、

(f) 前記第3のTIL集団を採取することと、を含む、前記方法。

【請求項66】

前記がんが、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌(頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)を含む)、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される、請求項1～67のいずれか1項に記載の方法。

【請求項67】

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 第1のCD39/CD69二重陰性及び/またはCD39^{LO}/CD69^{LO}濃縮TIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、前記プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、前記第2のTIL集団を取得し、前記第2のTIL集団は前記第1のTIL集団よりも数が多い、前記第2のTIL集団を産生することと、

(b) 前記第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の細胞培養培地と接触させることにより、急速な第2の拡張を行って、第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の拡張が、約1～11日の第2の期間行われて、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療的TIL集団である、前記第3のTIL集団を産生することと、

(c) ステップ(b)から取得された前記第3のTIL集団を採取することと、

(d) 前記採取された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記採取するステップ(c)の前の任意の時点で、前記CD39/CD69二重陰性及び/またはCD39^{LO}/CD69^{LO}濃縮TIL集団、前記第2のTIL集団、及び/または前記第3のTIL集団を遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。

【請求項68】

10

20

30

40

50

ステップ（a）において、前記細胞培養培地が抗原提示細胞（APC）をさらに含み、ステップ（b）における前記培養培地中のAPCの数が、ステップ（b）における前記培養培地中のAPCの数より多い、請求項67に記載の方法。

【請求項69】

T細胞を拡張する方法であって、

（a）第1のTIL集団を培養することによってドナーから取得された前記第1のTIL集団のプライミングによる第1の拡張を行って成長をもたらし、第1のT細胞集団の活性化をプライミングすることであって、前記第1のTIL集団が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}濃縮TIL集団である、前記第1のT細胞集団の活性化をプライミングすることと、

10

（b）ステップ（a）においてプライミングされた前記第1のTIL集団の前記活性化が減衰し始めた後に、前記第1のTIL集団の急速な第2の拡張を、前記第1のTIL集団の集団を培養することにより行って成長をもたらし、前記第1のT細胞集団の前記活性化を促進して第2のT細胞集団を取得することと、

（c）前記第2のT細胞集団を採取することと、

（d）前記採取された第2のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団を遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。

【請求項70】

T細胞を拡張する方法であって、

20

（a）ドナーにおける腫瘍の1つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料からの第1のT細胞集団のプライミングによる第1の拡張を、前記第1のT細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、前記第1のT細胞集団の活性化をプライミングすることであって、前記第1のT細胞集団が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}濃縮T細胞集団である、前記第1のT細胞集団の活性化をプライミングすることと、

（b）ステップ（a）においてプライミングされた前記第1のT細胞集団の前記活性化が減衰し始めた後に、前記第1のT細胞集団の第2の急速拡張を、前記第1のT細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、前記第1のT細胞集団の前記活性化を促進して第2のT細胞集団を得ることと、

30

（c）前記第2のT細胞集団を採取することと、

（d）前記採取された第2のT細胞集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、前記第1のT細胞集団及び／または前記第2のTIL集団を遺伝子修飾することと、を含む、前記方法。

【請求項71】

前記修飾が、前記第1の拡張からの前記第2のTIL集団、または前記第2の拡張からの前記第3のTIL集団、またはその両方で実行される、請求項1～12、29～45、または57～60のいずれかに記載の方法。

【請求項72】

前記修飾が、前記プライミングによる第1の拡張からの前記第2のTIL集団、または前記急速な第2の拡張からの前記第3のTIL集団、またはその両方で実行される、請求項13～20、25～28、46～56、及び62～67のいずれかに記載の方法。

40

【請求項73】

前記修飾が、前記第1の拡張からの前記第2のTIL集団、及び前記第2の拡張前の前記第2のTIL集団で実行される、請求項1～12、29～45または57～60のいずれかに記載の方法。

【請求項74】

前記修飾が、前記プライミングによる第1の拡張からの前記第2のTIL集団、及び前記急速な第2の拡張前の前記第2のTIL集団、またはその両方で実行される、請求項13～20、25～28、46～56及び62～67のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 75】

前記修飾が、前記第2の拡張からの前記第3のTIL集団で実行される、請求項1～12、29～45または57～60のいずれかに記載の方法。

【請求項 76】

前記修飾が、前記急速な第2の拡張から前記第3のTIL集団で実行される、請求項13～20、25～28、46～56及び62～67のいずれかに記載の方法。

【請求項 77】

前記修飾が、前記採取の後に実行される、請求項1～20、25～60、及び62～69のいずれかに記載の方法。

【請求項 78】

前記第1の拡張が、約11日の期間にわたって行われる、請求項1～12、29～45または57～60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 79】

前記プライミングによる第1の拡張が、約11日の期間にわたって行われる、請求項13～28または49～69のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 80】

前記IL-2が、前記第1の拡張において、前記細胞培養培地中に1000 IU/mL～6000 IU/mLの初期濃度で存在する、請求項1～12、29～45または57～60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 81】

前記IL-2が、前記プライミングによる第1の拡張において、前記細胞培養培地中に1000 IU/mL～6000 IU/mLの初期濃度で存在する、請求項5～8または14～22のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 82】

前記第2の拡張ステップにおいて、前記IL-2が、1000 IU/mL～6000 IU/mLの初期濃度で存在し、前記OKT-3抗体が、約30 ng/mLの初期濃度で存在する、請求項1～12、29～45または57～60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 83】

前記急速な第2の拡張ステップにおいて、前記IL-2が、1000 IU/mL～6000 IU/mLの初期濃度で存在し、前記OKT-3抗体が、約30 ng/mLの初期濃度で存在する、請求項13～28または49～69のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 84】

前記第1の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項1～12、29～45または57～60に記載の方法。

【請求項 85】

前記プライミングによる第1の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項13～28または49～69のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 86】

前記第2の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項1～12、29～45または57～60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 87】

前記急速な第2の拡張が、ガス透過性容器を使用して行われる、請求項13～28または49～69に記載の方法。

【請求項 88】

前記第1の拡張の前記細胞培養培地が、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項1～12、29～45または57～60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 89】

前記プライミングによる第1の拡張の前記細胞培養培地が、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインを

10

20

30

40

50

さらに含む、請求項 13～28 または 49～69 に記載の方法。

【請求項 90】

前記第 2 の拡張の前記細胞培養培地が、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項 1～12、29～45 または 57～60 のいずれか 1 項のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 91】

前記急速な第 2 の拡張の前記細胞培養培地が、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む、請求項 13～28 または 49～69 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 92】

前記第 3 の TIL 集団を前記患者に投与する前に、骨髓非破壊的リンパ球枯渇レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項 1～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 93】

前記骨髓非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で 2 日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で 3 日間投与するステップを含む、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 94】

前記骨髓非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で、及びフルダラビンを $25 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で 2 日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で 3 日間投与するステップを含む、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 95】

前記骨髓非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で、及びフルダラビンを $25 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で 2 日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg/m}^2/\text{日}$ の用量で 1 日間投与するステップを含む、請求項 92 に記載の方法。

【請求項 96】

前記シクロホスファミドが、メスナとともに投与される、請求項 93～95 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 97】

前記患者への前記 TIL の投与の翌日に開始する IL-2 レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項 1～24 または 92～96 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 98】

前記患者への前記 TIL の投与と同じ日に開始する IL-2 レジメンで前記患者を治療するステップをさらに含む、請求項 1～24 または 92～96 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 99】

前記 IL-2 レジメンが、許容範囲まで 8 時間毎に 15 分間のボラス静脈内注入として投与される、 $600,000$ もしくは $720,000 \text{ IU/kg}$ のアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリエーションを含む高用量 IL-2 レジメンである、請求項 97 または 98 に記載の方法。

【請求項 100】

治療上有効な TIL 集団が投与され、約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} TIL を含む、請求項 1～24 または 92～96 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 101】

前記プライミングによる第 1 の拡張及び急速な第 2 の拡張が、21 日以内の期間にわたって行われる、請求項 13～28 または 49～69 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 102】

前記ブライミングによる第1の拡張及び急速な第2の拡張が、16日または17日以内の期間にわたって行われる、請求項13～28または49～69のいずれか1項に記載の方法。

【請求項103】

前記ブライミングによる第1の拡張が、7日または8日以内の期間にわたって行われる、請求項13～28または49～69のいずれか1項に記載の方法。

【請求項104】

前記急速な第2の拡張が、11日以内の期間にわたって行われる、請求項13～28または49～69のいずれか1項に記載の方法。

【請求項105】

前記第1の拡張及び前記第2の拡張が、各々11日の期間内に個別に行われる、請求項1～12、29～45または57～60のいずれか1項に記載の方法。

【請求項106】

ステップ(a)～(f)が、約26日以内で行われる、請求項21～24または61のいずれか1項に記載の方法。

【請求項107】

前記遺伝子修飾されたTILが、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、及びTOXを含む群から選択される免疫チェックポイント遺伝子のうちの1つ以上の発現を低減する、追加の遺伝子修飾をさらに含む、請求項1～106のいずれか1項に記載の方法。

【請求項108】

前記1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子が、PD-1、CBL-B、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、Cish、TIGIT、TET2、TGFβ、及びPKAを含む群から選択される、請求項107に記載の方法。

【請求項109】

前記遺伝子修飾されたTILが、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、前記治療的TIL集団の少なくとも一部において増強させる追加の遺伝子修飾をさらに含み、前記免疫チェックポイント遺伝子(複数可)が、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2細胞内ドメイン(ICD)、及び/またはNOTCHリガンドmDLL1を含む群から選択される、請求項1～108のいずれかに記載の方法。

【請求項110】

前記遺伝子修飾するステップが、前記1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼを使用して行われる、請求項1～109のいずれかに記載の方法。

【請求項111】

前記遺伝子修飾が、CRISPR法、TALE法、ジンクフィンガー法、及びそれらの組み合わせから選択される1つ以上の方法を使用して行われる、請求項1～110のいずれかに記載の方法。

【請求項112】

前記方法が、CRISPR法を含む、請求項111に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 1 3】

前記 C R I S P R 法が、C R I S P R / C a s 9 法である、請求項 1 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

前記遺伝子修飾が、T A L E 法を含む、請求項 1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

前記遺伝子修飾が、ジンクフィンガー法を含む、請求項 1 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、前記腫瘍試料を酵素培地中でインキュベートすることを含む、請求項 1 ～ 1 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1 7】

前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、前記腫瘍試料を機械的に破壊して前記腫瘍試料を解離することをさらに含む、請求項 1 ～ 1 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することが、密度勾配分離を使用して前記解離された腫瘍試料を精製することをさらに含む、請求項 1 ～ 1 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記酵素培地が、D N a s e を含む、請求項 1 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

前記酵素培地が、3 0 単位 / m L の D N a s e を含む、請求項 1 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記酵素培地が、コラゲナーゼを含む、請求項 1 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記酵素培地が、1 . 0 m g / m L のコラゲナーゼを含む、請求項 1 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 2 3】

採取された前記治療的 T I L 集団が、対象に治療上有効な投与量を投与する際に使用するのに十分な T I L を含む、請求項 1 ～ 1 2 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記治療上有効な投与量が、約 1×10^9 ～ 約 9×10^{10} T I L を含む、請求項 1 ～ 1 2 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記 A P C が、末梢血単核細胞 (P B M C) である、請求項 1 ～ 1 2 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 6】

ステップ (e) で採取された前記治療的 T I L 集団が、前記第 1 及び / または第 2 の T I L 集団と比較して増加した C D 8 + 細胞の亜集団を示す、請求項 1 ～ 1 2 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記 P B M C が、約 1 : 2 5 T I L : P B M C の比で補充される、請求項 1 ～ 1 2 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 8】

ステップにおける前記第 1 の拡張及びステップにおける前記第 2 の拡張が、各々 1 1 日 ～ 1 2 日の期間内に個別に行われる、請求項 1 ～ 1 2 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 9】

ステップ (a) ～ (e) 、 (f) 、または (g) が、約 1 0 日 ～ 約 2 4 日で行われる、請求項 1 ～ 1 2 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 0】

10

20

30

40

50

ステップ (a) ~ (e)、(f)、または (g) が、約 15 日 ~ 約 24 日で行われる、請求項 1 ~ 129 のいずれかに記載の方法。

【請求項 131】

ステップ (a) ~ (e)、(f)、または (g) が、約 20 日 ~ 約 24 日で行われる、請求項 1 ~ 130 のいずれかに記載の方法。

【請求項 132】

ステップ (a) ~ (e)、(f)、または (g) が、約 20 日 ~ 約 22 日で行われる、請求項 1 ~ 131 のいずれかに記載の方法。

【請求項 133】

前記第 2 の TIL 集団が、前記第 1 の TIL 集団よりも数が少なくとも 50 倍多い、請求項 1 ~ 132 のいずれかに記載の方法。

【請求項 134】

請求項 1 ~ 133 に記載の方法のうちのいずれかに記載の TIL 集団。

【請求項 135】

請求項 1 ~ 134 に記載の方法のうちのいずれかに記載の TIL 集団を含む、組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021 年 3 月 19 日に出願された米国仮特許出願第 63 / 163, 730 号、2021 年 10 月 14 日に出願された同第 63 / 255, 657 号、及び 2021 年 11 月 17 日に出願された同第 63 / 280, 536 号の優先権を主張するものであり、これらの各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【0002】

腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の養子自家移入を使用した巨大な不応性がんの治療は、予後不良の患者の治療に対する強力なアプローチとなる。Gattinoni, et al., Nat. Rev. Immunol. 2006, 6, 383-393。TIL は T 細胞に支配され、IL-2 ベースの TIL 拡張とそれに続く「急速拡張プロセス」(REP) は、その速度及び効率のために TIL 拡張の好ましい方法になっている。Dudley, et al., Science 2002, 298, 850-54、Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-57、Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-39、Riddell, et al., Science 1992, 257, 238-41、Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42。黒色腫における TIL 療法への応答を改善し、TIL 療法を他の腫瘍タイプに拡大するための多くのアプローチが限られた成功を収めており、この分野は依然として困難である。Goff, et al., J. Clin. Oncol. 2016, 34, 2389-97、Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-39、Rosenberg, et al., Clin. Cancer Res. 2011, 17, 4550-57。単一免疫チェックポイント阻害剤との併用研究も記載されているが、さらなる研究が進行中であり、追加の治療方法が必要である (Kverneland, et al., Oncotarget, 2020, 11 (22), 2092-2105)。

【0003】

さらに、現行の TIL の製造及び治療プロセスは、長さ、コスト、無菌性の懸念、及び本明細書に記載される他の要因によって制限されているため、他のチェックポイント阻害剤療法に対して不応性である患者を治療する可能性は厳しく制限されている。実行可能な治療選択肢がほとんどまたはまったく残っていない患者を治療する際に使用するのに適した TIL 製造プロセス及びかかるプロセスに基づく治療法を提供することが緊急に必要である。本発明は、TIL を生成する際に使用するための短縮された製造プロセスを提供す

ることによって、この必要性を満たす。

【0004】

本発明は、本明細書に記載のCD39／CD69事前選択、CD39／CD69ノックアウト、またはそれらの組み合わせを受けたTILによるがんの治療のための治療効果が増加した治療的TIL集団を調製するために、TILを調製するための改善及び／または短縮されたプロセス及び方法を提供する。

【発明の概要】

【0005】

(i) CD39／CD69二重陰性、(ii) CD39／CD69二重ノックアウト（例えば、CD39／CD69の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾された）、または(iii) (i)及び(ii)の組み合わせであるTILが、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、対象のTILは、(i) CD39／CD69二重陰性、(ii) CD39／CD69二重ノックアウト（例えば、CD39／CD69の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾された）、または(iii) (i)及び(ii)の組み合わせのために選択されたTIL集団を遺伝子操作することによって産生される。そのような遺伝子修飾されたTILを産生するための拡張方法、及びかかるTILを使用する治療方法もまた、本明細書に提供される。

【0006】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) (a)の第1のTIL集団からCD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性TILを選択して、CD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) 任意選択で、CD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を閉鎖系に付加するステップと、

(d) CD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(e) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(f) ステップ(e)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(g) ステップ(f)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(f)から(g)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(h) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(g)からの採取された第3のTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(i) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(h)の注入バッグから対

象に投与するステップと、

(j) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(i)の前の任意の時点で、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び/または第2のTIL集団及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0007】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、当該方法は、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スキュテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3〜14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7〜14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(e)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ(f)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの採取された第3のTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象に投与するステップと、

(i) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(h)の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0008】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、当該方法は、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 第1のTIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(e)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ(f)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの採取された第3のTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象に投与するステップと、

(i) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(h)の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0009】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スキュテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7~14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

10

(e) ステップ(e)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ(f)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの採取された第3のTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

20

(h) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象に投与するステップと、

(i) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(h)の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0010】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

30

(b) (a)の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) 任意選択で、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を閉鎖系に付加するステップと、

(d) CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3~11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

40

(e) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7~11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(f) ステップ(e)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、

50

ステップ（e）からステップ（f）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

（g）ステップ（f）からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（f）から（g）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

（h）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（g）からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

（i）治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ（h）の注入バッグから対象に投与するステップと、

（j）投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ（i）の前の任意の時点で、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

10

【0011】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

（a）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

20

（b）任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

（c）第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ（b）からステップ（c）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

30

（d）第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（c）からステップ（d）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

（e）ステップ（e）から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

40

（f）ステップ（f）からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（e）から（f）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

（g）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（f）からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

（h）治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ（g）の注入バッグから対象に投与するステップと、

（i）投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ（h）の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を任意選

50

択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0012】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

（a）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

（b）任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

（c）IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ（b）からステップ（c）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

（d）第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞（APC）、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～14日間行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（c）からステップ（d）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

（e）ステップ（e）から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

（f）ステップ（f）からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（e）から（f）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

（g）凍結保存プロセスを使用して、ステップ（f）からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

（h）治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ（g）の注入バッグから対象に投与するステップと、

（i）投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ（h）の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0013】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

（a）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

（b）任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

（c）第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2

206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(e)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ(f)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象に投与するステップと、

(i) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(h)の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0014】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) (a)の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、PD-1濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) 任意選択で、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を閉鎖系に付加するステップと、

(d) CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(e) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7~11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(f) ステップ(e)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(g) ステップ(f)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(h) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(g)からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(i) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(h)の注入バッグから対象に投与するステップと、

(j) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(i)の前の任意の時点で、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び/または第2のTIL集団及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0015】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3~11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7~11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる

10

20

30

40

50

、移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象に投与するステップと、

(i) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(h)の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0016】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象に投与するステップと、

(i) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(h)の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0017】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

10

20

30

40

50

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象に投与するステップと、

(i) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(h)の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0018】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 対象または患者から腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、切除するステップと、

(b) 腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、

(c) 複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第1のTIL集団を取得するステップと、

10

20

30

40

50

(d) (c) の第 1 の T I L 集団から C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性 T I L を選択して、C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団を取得するステップと、

(e) 任意選択で、C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団を閉鎖系に付加するステップと、

(f) C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団を、I L - 2 を含む細胞培養培地中で培養することによって第 1 の拡張を行い、第 2 の T I L 集団を産生するステップであって、第 1 の拡張が、任意選択で、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第 1 の拡張が、約 3 ~ 1 1 日間行われて、第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ (e) からステップ (f) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第 2 の T I L 集団を産生するステップと、

(g) 第 2 の T I L 集団の細胞培養培地を追加の I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡張を行い、第 3 の T I L 集団を産生するステップであって、第 2 の拡張が、約 7 ~ 1 1 日間行われて、第 3 の T I L 集団を取得し、第 2 の拡張が、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ (f) からステップ (g) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第 3 の T I L 集団を産生するステップと、

(h) ステップ (g) から取得された第 3 の T I L 集団を採取するステップであって、ステップ (g) からステップ (h) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(i) ステップ (h) からの採取された第 3 の T I L 集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ (h) から (i) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(j) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ (i) からの採取された T I L 集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(k) 治療上有効な投与量の第 3 の T I L 集団を、ステップ (g) の注入バッグからがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(l) 投与された第 3 の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された T I L を含むように、投与するステップ (k) の前の任意の時点で、C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団、第 2 の T I L 集団及び / または第 3 の T I L 集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0019】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 対象または患者から腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第 1 の T I L 集団を含む、切除するステップと、

(b) 腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、

(c) 複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第 1 の T I L 集団を取得するステップと、

(d) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(e) 第 1 の T I L 集団を、I L - 2 及びタンパク質キナーゼ B (A K T) 阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第 1 の拡張を行い、任意選択で、A K T 阻害剤が、イパタセルチブ、G S K 6 9 0 6 9 3、G S K 2 1 4 1 7 9 5、G S K 2 1 1 0 1 8 3、A Z D 5 3 6 3、G D C - 0 0 6 8、A T 7 8 6 7、C C T 1 2 8 9 3 0、M K - 2 2 0 6、B A Y 1 1 2 5 9 7 6、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団である第 2 の T I L 集団を産生するステップであって、第 1 の拡張が、任意選択で、第 1 のガ

10

20

30

40

50

ス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(f) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(g) ステップ(f)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(h) ステップ(g)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(g)から(h)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(i) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(h)からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(l) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(h)の注入バッグからがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(k) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(l)の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0020】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 対象または患者から腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、切除するステップと、

(b) 腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、

(c) 複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第1のTIL集団を取得するステップと、

(d) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(e) 第1のTIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(f) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CC128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

10

20

30

40

50

(g) ステップ (f) から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ (f) からステップ (g) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(h) ステップ (g) からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ (g) から (h) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(i) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ (h) からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(l) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ (h) の注入バッグからがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(k) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ (l) の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0021】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 対象または患者から腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、切除するステップと、

(b) 腫瘍を、複数の腫瘍断片に処理するステップと、

(c) 複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第1のTIL集団を取得するステップと、

(d) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(e) 第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB (AKT) 阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3〜14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(f) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞 (APC)、及びタンパク質キナーゼB (AKT) 阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7〜11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ (e) からステップ (f) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(g) ステップ (f) から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ (f) からステップ (g) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

10

20

30

40

50

(h) ステップ (g) からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ (g) から (h) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(i) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ (h) からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(l) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ (h) の注入バッグからがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(k) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ (l) の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

10

【0022】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) (a) の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

20

(c) CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(d) 第1の細胞培養培地中でCD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団の初期拡張 (またはプライミングによる第1の拡張) を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、第2のTIL集団が、第1のTIL集団よりも数が少なくとも5倍多く、第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択でOKT-3 (抗CD3抗体)、及び任意選択で抗原提示細胞 (APC) を含み、プライミングによる第1の拡張が、1～8日の期間にわたって起こる、第2のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、第3のTIL集団が、急速拡張の開始から7～8日後に第2のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多く、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3 (抗CD3抗体)、及びAPCを含み、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2のTIL拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、第3のTIL集団を取得するステップと、

30

(f) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(g) 第3のTIL集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(h) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ (g) の前の任意の時点で、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

40

【0023】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

50

(b) 第1のTIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、任意選択で抗原提示細胞（APC）、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1～8日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(a)からステップ(b)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

10

(c) 第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及びAPCを含み、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2の拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、第3のTIL集団を取得するステップと、

20

(d) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(e) 第3のTIL集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(f) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(e)の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0024】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

30

(b) 第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団の初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（APC）を含み、プライミングによる第1の拡張が、1～8日の期間にわたって起こる、第2のTIL集団を取得するステップと、

(c) 第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、APC、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含み、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2の拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、第3のTIL集団を産生するステップと、

40

(d) 第3のTIL集団を採取するステップと、

50

(e) 第3のTIL集団の治療上有効な部分のがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(f) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(e)の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0025】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 第1のTIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3(抗CD3抗体)、任意選択で抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって初期拡張(またはプライミングによる第1の拡張)を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1〜8日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(a)からステップ(b)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(c) 第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)、APC、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2の拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(e) 第3のTIL集団の治療上有効な部分のがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(f) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(e)の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0026】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、

切除するステップと、

(b) 腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップ、または腫瘍を腫瘍消化器に処理するステップと、

(c) 腫瘍断片の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) 腫瘍断片を、第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(d) 第1の細胞培養培地中でCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団の初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、第2のTIL集団が、第1のTIL集団よりも数が少なくとも5倍多く、第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（APC）を含み、プライミングによる第1の拡張が、1～8日の期間にわたって起こる、第2のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、第3のTIL集団が、急速拡張の開始から7～8日後に第2のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多く、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及びAPCを含み、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2のTIL拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができ、第3のTIL集団を取得するステップと、

(f) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(g) 第3のTIL集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(h) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ（g）の前の任意の時点で、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び/または第2のTIL集団及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0027】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、切除するステップと、

(b) 腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップ、または腫瘍を腫瘍消化器に処理するステップと、

(c) 第1のTIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、任意選択で抗原提示細胞（APC）、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによって初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1～8日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ（a）からステップ（b）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、

第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及びAPCを含み、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2の拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、第3のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(f) 第3のTIL集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(g) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(f)の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0028】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、切除するステップと、

(b) 腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップ、または腫瘍を腫瘍消化器に処理するステップと、

(c) 第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団の初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞(APC)を含み、プライミングによる第1の拡張が、1～8日の期間にわたって起こる、第2のTIL集団を取得するステップと、

(d) 第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、APC、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含み、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2の拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(f) 第3のTIL集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(g) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(f)の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0029】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

10

20

30

40

50

(a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、切除するステップと、

(b) 腫瘍を腫瘍断片に断片化するステップ、または腫瘍を腫瘍消化器に処理するステップと、

(c) 第1のTIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、任意選択で抗原提示細胞（APC）、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによって初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1～8日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(a)からステップ(b)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、APC、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含み、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2の拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(f) 第3のTIL集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、

(g) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(f)の前の任意の時点で、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0030】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法であって、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) (a)の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む第1の細胞培養培地中でCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産

10

20

30

40

50

生するステップであって、プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団が、第1のTIL集団より数が多い、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 任意選択で、第2のTIL集団をOKT-3で再刺激するステップと、

(e) 第2のTIL集団を遺伝子修飾して、修飾された第2のTIL集団を産生するステップであって、第2の集団がCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを含むように、修飾された第2のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む、修飾された第2のTIL集団を産生するステップと、

10

(f) 修飾された第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の拡張が、約14日以下の第2の期間行われて、治療的TIL集団を取得し、第3のTIL集団が、第3の集団がCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを含むように、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む治療的TIL集団である、第3のTIL集団を産生するステップと、

(g) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(h) 第3のTIL集団の治療上有効な部分のがんを有する対象または患者に投与するステップと、を含む、方法を提供する。

20

【0031】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び/または受容するステップと、

(b) 第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団が、第1のTIL集団より数が多い、第2のTIL集団を産生するステップと、

30

(c) 任意選択で、第2のTIL集団をOKT-3で再刺激するステップと、

(d) 第2のTIL集団を遺伝子修飾して、修飾された第2のTIL集団を産生するステップであって、第2の集団がCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを含むように、修飾された第2のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む、修飾された第2のTIL集団を産生するステップと、

40

(e) 修飾された第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、急速な第2の拡張が、約14日以内の第2の期間行われて、治療的TIL集団を取得し、第3の集団がCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを含むように、第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む治療的TIL集団である、第3のTIL集団を産生する

50

ステップと、

(f) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(g) 第3のTIL集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、を含む。

【0032】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、プライミングによる第1の拡張が第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が約1～11日の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団は第1のTIL集団よりも数が多い、第2のTIL集団を産生するステップと、

(c) 任意選択で、第2のTIL集団をOKT-3で再刺激するステップと、

(d) 第2のTIL集団を遺伝子修飾して、修飾された第2のTIL集団を産生するステップであって、第2の集団がCD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性TILを含むように、修飾された第2のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む、修飾された第2のTIL集団を産生するステップと、

(e) 修飾された第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、APC、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3の集団のTILを産生するステップであって、急速な第2の拡張が、約14日以内の第2の期間行われて、治療的TIL集団を取得し、第3の集団がCD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性TILを含むように、第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む治療的TIL集団である、第3の集団を産生するステップと、

(f) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(g) 第3のTIL集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、を含む。

【0033】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の集団を投与することを含む、がんの治療を必要とする患者または対象においてそれを行う方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞（APC）、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD6

9^{L0}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団が、第1のTIL集団より数が多い、第2のTIL集団を産生するステップと、

(c) 任意選択で、第2のTIL集団をOKT-3で再刺激するステップと、

(d) 第2のTIL集団を遺伝子修飾して、修飾された第2のTIL集団を産生するステップであって、第2の集団がCD39^{L0}／CD69^{L0}及び／またはCD39／CD69二重陰性TILを含むように、修飾された第2のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む、修飾された第2のTIL集団を産生するステップと、

(e) 修飾された第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、APC、及びタンパク質キナーゼB (AKT) 阻害剤を含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{L0}／CD69^{L0}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3の集団のTILを産生するステップであって、急速な第2の拡張が、約14日以内の第2の期間行われて、治療的TIL集団を取得し、第3の集団がCD39^{L0}／CD69^{L0}及び／またはCD39／CD69二重陰性TILを含むように、第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む治療的TIL集団である、第3の集団を産生するステップと、

(f) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(g) 第3のTIL集団の治療上有効な部分をがんを有する対象または患者に投与するステップと、を含む。

【0034】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(b) ステップ(a)の第1のTIL集団からCD39^{L0}／CD69^{L0}及び／またはCD39／CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{L0}／CD69^{L0}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得することと、

(c) CD39^{L0}／CD69^{L0}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞 (APC) を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1～7/8日の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団が、第1のTIL集団より数が多い、第2のTIL集団を産生することと、

(d) 第2のTIL集団をIL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の拡張に追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数の少なくとも2倍であり、急速な第2の拡張が、約1～11日の第2の期間行われて、治療的TIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、急速な第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第3のTIL集団を産生することと、

(e) ステップ(d)から取得された治療的TIL集団を採取することと、

(f) ステップ (e) からの採取された T I L 集団を注入バッグに移すことと、

(g) 治療的 T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された T I L を含むように、採取するステップ (e) の前の任意の時点で、C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団及び / または第 2 の T I L 集団及び / または第 3 の T I L 集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む。

【0035】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療的 T I L 集団に拡張するための方法であって、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を取得及び / または受容することと、

(b) 第 1 の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、抗原提示細胞 (A P C)、及びタンパク質キナーゼ B (A K T) 阻害剤を含む第 1 の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第 1 の拡張を行い、任意選択で、A K T 阻害剤が、イパタセルチブ、G S K 6 9 0 6 9 3、G S K 2 1 4 1 7 9 5、G S K 2 1 1 0 1 8 3、A Z D 5 3 6 3、G D C - 0 0 6 8、A T 7 8 6 7、C C T 1 2 8 9 3 0、M K - 2 2 0 6、B A Y 1 1 2 5 9 7 6、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団である第 2 の T I L 集団を産生することであって、プライミングによる第 1 の拡張が、第 1 のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第 1 の拡張が、約 1 ~ 7 / 8 日の第 1 の期間行われて、第 2 の T I L 集団を取得し、第 2 の T I L 集団が、第 1 の T I L 集団より数が多い、第 2 の T I L 集団を産生することと、

(c) 第 2 の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び A P C を含む第 2 の培養培地中で培養することによって急速な第 2 の拡張を行い、第 3 の T I L 集団を産生することであって、急速な第 2 の拡張に追加される A P C の数が、ステップ (b) において追加される A P C の数の少なくとも 2 倍であり、急速な第 2 の拡張が、約 1 ~ 1 1 日の第 2 の期間行われて、治療的 T I L 集団を取得し、第 3 の T I L 集団が、治療的 T I L 集団であり、急速な第 2 の拡張が、第 2 のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第 3 の T I L 集団を産生することと、

(d) ステップ (d) から取得された治療的 T I L 集団を採取することと、

(e) ステップ (e) からの採取した T I L 集団を注入バッグに移すことと、

(f) 治療的 T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された T I L を含むように、採取するステップ (e) の前の任意の時点で、第 1 の T I L 集団、第 2 の T I L 集団、及び / または第 3 の T I L 集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む。

【0036】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療的 T I L 集団に拡張するための方法であって、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を取得及び / または受容することと、

(b) 第 1 の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 (A P C) を含む第 1 の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第 1 の拡張を行い、第 2 の T I L 集団を産生することであって、プライミングによる第 1 の拡張が第 1 のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第 1 の拡張が約 1 ~ 7 / 8 日の第 1 の期間行われて、第 2 の T I L 集団を取得し、第 2 の T I L 集団は第 1 の T I L 集団よりも数が多い、第 2 の T I L 集団を産生することと、

(c) 第 2 の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、A P C、及びタンパク質キナーゼ

B (AKT) 阻害剤を含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤は、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の拡張に追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数の少なくとも2倍であり、急速な第2の拡張が、約1~11日の第2の期間行われて、治療的TIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、急速な第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第3のTIL集団を産生することと、

10

(d) ステップ(d) から取得された治療的TIL集団を採取することと、

(e) ステップ(e) からの採取したTIL集団を注入バッグに移すことと、

(f) 治療的TIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(e)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び/または第2のTIL集団及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む。

【0037】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

20

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び/または受容することと、

(b) 第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生することであって、プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1~7/8日の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団が、第1のTIL集団より数が多い、第2のTIL集団を産生することと、

30

(c) 第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、APC、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤は、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の拡張に追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数の少なくとも2倍であり、急速な第2の拡張が、約1~11日の第2の期間行われて、治療的TIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、急速な第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第3のTIL集団を産生することと、

40

(d) ステップ(d) から取得された治療的TIL集団を採取することと、

50

(e) ステップ (e) からの採取した T I L 集団を注入バッグに移すことと、

(f) 治療的 T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された T I L を含むように、採取するステップ (e) の前の任意の時点で、第 1 の T I L 集団及び／または第 2 の T I L 集団及び／または第 3 の T I L 集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む。

【0038】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療的 T I L 集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者におけるがんから切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) (a) の第 1 の T I L 集団から C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び／または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性 T I L を選択して、C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び／または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団を取得するステップと、

(c) 任意選択で、C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び／または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団を閉鎖系に付加するステップと、

(d) C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び／または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団を、I L - 2 を含む細胞培養培地中で培養することによって第 1 の拡張を行い、第 2 の T I L 集団を産生するステップであって、第 1 の拡張が、任意選択で、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第 1 の拡張が、約 3 ~ 1 4 日間行われて、第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ (c) からステップ (d) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第 2 の T I L 集団を産生するステップと、

(e) 第 2 の T I L 集団の細胞培養培地を追加の I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡張を行い、第 3 の T I L 集団を産生するステップであって、第 2 の拡張が、約 7 ~ 1 4 日間行われて、第 3 の T I L 集団を取得し、第 3 の T I L 集団が、治療的 T I L 集団であり、第 2 の拡張が、任意選択で、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第 3 の T I L 集団を産生するステップと、

(f) ステップ (e) から取得された第 3 の T I L 集団を採取するステップであって、ステップ (e) からステップ (f) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(g) ステップ (f) からの採取された第 3 の T I L 集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ (f) から (g) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(h) 第 3 の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された T I L を含むように、採取するステップ (f) の前の任意の時点で、C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び／または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団及び／または第 2 の T I L 集団及び／または第 3 の T I L 集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0039】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療的 T I L 集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者におけるがんから切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 第 1 の T I L 集団を、I L - 2 及びタンパク質キナーゼ B (A K T) 阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第 1 の拡張を行い、任意選択で、A K T 阻害剤が、イパタセルチブ、G S K 6 9 0 6 9 3、G S K 2 1 4 1 7 9 5、G S K 2 1 1 0 1 8

3、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スキュテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(g) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(f)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0040】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者におけるがんから切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 第1のTIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スキュテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、

10

20

30

40

50

採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(g) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(f)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0041】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象または患者におけるがんから切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スキュテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スキュテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(g) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(f)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0042】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、

該方法は、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

(b) (a)の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、(i)CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) 任意選択で、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を閉鎖系に付加するステップと、

(d) CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(e) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(f) ステップ(e)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(g) ステップ(f)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(f)から(g)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(h) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(f)の前の任意の時点で、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び/または第2のTIL集団及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0043】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

(b) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7~11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(e)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ(f)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象に投与するステップと、

(i) 投与された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、投与するステップ(h)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0044】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得するステップと、

(b) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3~11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7~14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(e)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ(f)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ (f) からの採取された T I L 集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の第 3 の T I L 集団を、ステップ (g) の注入バッグから対象に投与するステップと、

(i) 投与された第 3 の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された T I L を含むように、投与するステップ (h) の前の任意の時点で、第 1 の T I L 集団及び／または第 2 の T I L 集団及び／または第 3 の T I L 集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【 0 0 4 5 】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療的 T I L 集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象から切除された腫瘍から第 1 の T I L 集団を取得するステップと、

(b) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 第 1 の T I L 集団を、I L - 2 及びタンパク質キナーゼ B (A K T) 阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第 1 の拡張を行い、任意選択で、A K T 阻害剤が、イパタセルチブ、G S K 6 9 0 6 9 3、G S K 2 1 4 1 7 9 5、G S K 2 1 1 0 1 8 3、A Z D 5 3 6 3、G D C - 0 0 6 8、A T 7 8 6 7、C C T 1 2 8 9 3 0、M K - 2 2 0 6、B A Y 1 1 2 5 9 7 6、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、C D 3 9 L O / C D 6 9 L O 及び／または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団である第 2 の T I L 集団を産生するステップであって、第 1 の拡張が、任意選択で、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第 1 の拡張が、約 3 ~ 1 1 日間行われて、第 2 の T I L 集団を取得し、ステップ (b) からステップ (c) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第 2 の T I L 集団を産生するステップと、

(d) 第 2 の T I L 集団の細胞培養培地を追加の I L - 2、O K T - 3、抗原提示細胞 (A P C)、及びタンパク質キナーゼ B (A K T) 阻害剤で補充することによって第 2 の拡張を行い、任意選択で、A K T 阻害剤が、イパタセルチブ、G S K 6 9 0 6 9 3、G S K 2 1 4 1 7 9 5、G S K 2 1 1 0 1 8 3、A Z D 5 3 6 3、G D C - 0 0 6 8、A T 7 8 6 7、C C T 1 2 8 9 3 0、M K - 2 2 0 6、B A Y 1 1 2 5 9 7 6、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} 及び／または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団である第 3 の T I L 集団を産生するステップであって、第 2 の拡張が、約 7 ~ 1 4 日間行われて、第 3 の T I L 集団を取得し、第 3 の T I L 集団が、治療的 T I L 集団であり、第 2 の拡張が、任意選択で、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ (c) からステップ (d) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第 3 の T I L 集団を産生するステップと、

(e) ステップ (e) から取得された第 3 の T I L 集団を採取するステップであって、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ (f) からの採取された第 3 の T I L 集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ (e) から (f) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ (f) からの採取された T I L 集団を含む注入バッグを凍結保存するステップと、

(h) 治療上有効な投与量の第 3 の T I L 集団を、ステップ (g) の注入バッグから対象に投与するステップと、

(i) 投与された第 3 の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された T I L を含むように、投与するステップ (h) の前の任意の

10

20

30

40

50

時点で、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0046】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

（a）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

（b）（a）の第1のTIL集団からCD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

（c）任意選択で、CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を閉鎖系に付加するステップと、

（d）CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ（c）からステップ（d）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

（e）第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

（f）ステップ（e）から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ（e）からステップ（f）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

（g）ステップ（f）からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（e）から（f）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

（h）第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ（f）の前の任意の時点で、CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0047】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

（a）外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

（b）任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

（c）第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団であ

る第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

10

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(g) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(e)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

20

【0048】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

30

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

40

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

50

(g) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(e)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0049】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(c) 第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) ステップ(d)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(f) ステップ(e)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(g) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(e)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0050】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、

切除するステップと、

(b) 腫瘍を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、

(c) 複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第1のTIL集団を取得するステップと、

(d) (c)の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(e) 任意選択で、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を閉鎖系に付加するステップと、

(f) CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3〜11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(g) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(h) ステップ(g)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(g)からステップ(h)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(i) ステップ(h)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(h)から(i)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(j) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(h)の前の任意の時点で、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び/または第2のTIL集団及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0051】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、切除するステップと、

(b) 腫瘍を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、

(c) 複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第1のTIL集団を取得するステップと、

(d) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(e) 第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3〜11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択

で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(f) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7~11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(g) ステップ(f)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(h) ステップ(g)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(g)から(h)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(i) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(g)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0052】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、切除するステップと、

(b) 腫瘍を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、

(c) 複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第1のTIL集団を取得するステップと、

(d) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(e) 第1のTIL集団を、IL-2を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3~11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(f) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7~11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(g) ステップ(f)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

(h) ステップ(g)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(g)から(h)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

10

20

30

40

50

(i) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(g)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0053】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、切除するステップと、

10

(b) 腫瘍を複数の腫瘍断片または腫瘍消化物に処理するステップと、

(c) 複数の腫瘍断片を酵素的に消化して、第1のTIL集団を取得するステップと、

(d) 任意選択で、腫瘍断片または腫瘍消化物を閉鎖系に付加するステップと、

(e) 第1のTIL集団を、IL-2及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～11日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

20

(f) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤で補充することによって第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、任意選択で、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生するステップと、

30

(g) ステップ(f)から取得された第3のTIL集団を採取するステップであって、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取するステップと、

40

(h) ステップ(g)からの採取された第3のTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(g)から(h)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、

(i) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(g)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0054】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

50

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) (a)の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(d) 第1の細胞培養培地中でCD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団の初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（APC）を含み、プライミングによる第1の拡張が、1～8日の期間にわたって起こる、第2のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及びAPCを含み、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2の拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、第3のTIL集団を取得するステップと、

(f) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(g) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(f)の前の任意の時点で、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0055】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 第1のTIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、任意選択で抗原提示細胞（APC）、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1～8日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(a)からステップ(b)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(c) 第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及びAPCを含み、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2の拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、第3のT

IL 集団を取得するステップと、

(d) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(e) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(d)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0056】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団の初期拡張(またはプライミングによる第1の拡張)を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択でOKT-3(抗CD3抗体)、及び任意選択で抗原提示細胞(APC)を含み、プライミングによる第1の拡張が、1～8日の期間にわたって起こる、第2のTIL集団を取得するステップと、

(c) 第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)、APC、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含み、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2の拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(e) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(d)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0057】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または対象もしくは患者からの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容するステップと、

(b) 第1のTIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3(抗CD3抗体)、任意選択で抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地中で培養することによって初期拡張(またはプライミングによる第1の拡張)を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、プライ

ミングによる第1の拡張が、約1～8日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(a)からステップ(b)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(c) 第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3 (抗CD3抗体)、APC、及びタンパク質キナーゼB (AKT) 阻害剤を含み、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2の拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、第3のTIL集団を産生するステップと、

10

(d) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(e) 第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(d)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び/または第2のTIL集団及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

20

【0058】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、切除するステップと、

(b) 腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化するステップと、

(c) 腫瘍断片または腫瘍消化物中の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

30

(d) CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を、第1の細胞培養培地と接触させるステップと、

(e) 第1の細胞培養培地中でCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団の初期拡張(またはプライミングによる第1の拡張)を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択でOKT-3 (抗CD3抗体)、及び任意選択で抗原提示細胞(APC)を含み、プライミングによる第1の拡張が、1～8日の期間にわたって起こる、第2のTIL集団を取得するステップと、

(f) 第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3 (抗CD3抗体)、及びAPCを含み、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2の拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、第3のTIL集団を取得するステップと、

40

(g) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(h) 採取された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(f)の前の任意の時点で、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団及び/または第2のTIL集団及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子

50

修飾するステップと、を含む。

【0059】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、切除するステップと、

(b) 腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化するステップと、

(c) 第1のTIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、任意選択で抗原提示細胞（APC）、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによって初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1～8日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(a)からステップ(b)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

(d) 第2の細胞培養培地中で第2のTIL集団の急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、及びAPCを含み、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2の拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日または10日にわたって進行することができる、第3のTIL集団を取得するステップと、

(e) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(f) 採取された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(e)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び/または第2のTIL集団及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0060】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、切除するステップと、

(b) 腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化するステップと、

(c) 第1の細胞培養培地中で第1のTIL集団の初期拡張（またはプライミングによる第1の拡張）を行い、第2のTIL集団を取得するステップであって、第1の細胞培養培地が、IL-2、任意選択でOKT-3（抗CD3抗体）、及び任意選択で抗原提示細胞（APC）を含み、プライミングによる第1の拡張が、1～8日の期間にわたって起こる、第2のTIL集団を取得するステップと、

(d) 第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3（抗CD3抗体）、APC、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含み、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141

795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2の拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、第3のTIL集団を産生するステップと、

(e) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(f) 採取された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(e)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び/または第2のTIL集団及び/または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

10

【0061】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張する方法を提供し、該方法は、

a) 対象または患者におけるがんから腫瘍を切除するステップであって、腫瘍が、任意選択で、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、またはがんから腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段からの第1のTIL集団を含む、切除するステップと、

20

(b) 腫瘍を腫瘍断片または腫瘍消化物に断片化するステップと、

(c) 第1のTIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3(抗CD3抗体)、任意選択で抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによって初期拡張(またはプライミングによる第1の拡張)を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、任意選択で、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1~8日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(a)からステップ(b)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生するステップと、

30

(d) 第2の細胞培養培地中で急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を取得して、第3のTIL集団を産生するステップであって、第2の細胞培養培地が、IL-2、OKT-3(抗CD3抗体)、APC、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含み、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、第3のTIL集団が、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、急速拡張が、14日以内の期間にわたって行われ、任意選択で、急速な第2の拡張が、急速な第2の拡張の開始後1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日にわたって進行することができる、第3のTIL集団を産生するステップと、

40

(e) 第3のTIL集団を採取するステップと、

(f) 採取された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(e)の前の任意の時点で、第1のTIL集団及び/または第2のTIL集団及び/または第3のTIL集団

50

を任意選択で遺伝子修飾するステップと、を含む。

【0062】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

（a）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

（b）ステップ（a）の第1のTIL集団からCD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性TILを選択して、CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得することと、

（c）CD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団は第1のTIL集団よりも数が多い、第2のTIL集団を産生することと、

（d）第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の細胞培養培地と接触させることによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の拡張が、約1～11日の第2の期間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が治療的TIL集団である、第3のTIL集団を産生することと、

（e）ステップ（c）から取得された治療的TIL集団を採取することと、

（f）第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ（e）の前の任意の時点で、CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団及び／または第2のTIL集団及び／または第3のTIL集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む。

【0063】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

（a）腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

（b）第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞（APC）、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生することであって、プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団が、第1のTIL集団より数が多い、第2のTIL集団を産生することと、

（c）第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の細胞培養培地と接触させることによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の拡張が約1～11日の第2の期間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が治療的TIL集団である、第3のTIL集団を産生することと、

(d) ステップ(c) から取得された治療的 TIL 集団を採取することと、

(e) 第3の TIL 集団が、CD39 及び CD69 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された TIL を含むように、採取するステップ(d)の前の任意の時点で、第1の TIL 集団及び／または第2の TIL 集団及び／または第3の TIL 集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む。

【0064】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的 TIL 集団に拡張するための方法であって、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第1の TIL 集団を取得及び／または受容することと、

(b) IL-2、任意選択で OKT-3 を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で第1の TIL 集団を培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2の TIL 集団を産生することであって、プライミングによる第1の拡張が約1～11日間の第1の期間行われて、第2の TIL 集団を取得し、第2の TIL 集団は第1の TIL 集団よりも数が多い、第2の TIL 集団を産生することと、

(c) 第2の TIL 集団を、IL-2、OKT-3、APC、及びタンパク質キナーゼ B(AKT)阻害剤を含む細胞培養培地と接触させることによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤は、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮 TIL 集団である第3の TIL 集団を産生することであって、急速な第2の拡張が、約1～11日の第2の期間行われて、第3の TIL 集団を取得し、第3の TIL 集団が、治療的 TIL 集団である、第3の TIL 集団を産生することと、

(d) ステップ(c) から取得された治療的 TIL 集団を採取することと、

(e) 第3の TIL 集団が、CD39 及び CD69 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された TIL を含むように、採取するステップ(d)の前の任意の時点で、第1の TIL 集団及び／または第2の TIL 集団及び／または第3の TIL 集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む。

【0065】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的 TIL 集団に拡張するための方法であって、

(a) 腫瘍から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理するか、または対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することによって、対象におけるがんから切除された腫瘍から第1の TIL 集団を取得及び／または受容することと、

(b) 第1の TIL 集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼ B(AKT)阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮 TIL 集団である第2の TIL 集団を産生することであって、プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、第2の TIL 集団を取得し、第2の TIL 集団が、第1の TIL 集団より数が多い、第2の TIL 集団を産生することと、

(c) 第2の TIL 集団を、IL-2、OKT-3、APC、及びタンパク質キナーゼ

B (A K T) 阻害剤を含む第2の細胞培養培地と接触させることによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、A K T 阻害剤は、イパタセルチブ、G S K 6 9 0 6 9 3、G S K 2 1 4 1 7 9 5、G S K 2 1 1 0 1 8 3、A Z D 5 3 6 3、G D C - 0 0 6 8、A T 7 8 6 7、C C T 1 2 8 9 3 0、M K - 2 2 0 6、B A Y 1 1 2 5 9 7 6、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、C D 3 9^{LO} / C D 6 9^{LO} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団である第3の T I L 集団を産生することであって、急速な第2の拡張が、約1~11日の第2の期間行われて、第3の T I L 集団を取得し、第3の T I L 集団が、治療的 T I L 集団である、第3の T I L 集団を産生することと、

(d) ステップ(c) から取得された治療的 T I L 集団を採取することと、

10

(e) 第3の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾された T I L を含むように、採取するステップ(d)の前の任意の時点で、第1の T I L 集団及び / または第2の T I L 集団及び / または第3の T I L 集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む。

【0066】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張ステップにおいて、細胞培養培地は、抗原提示細胞 (A P C) をさらに含み、急速な第2の拡張ステップにおける培養培地中の A P C の数は、プライミングによる第1の拡張ステップにおける培養培地中の A P C の数より多い。

【0067】

20

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療的 T I L 集団に拡張するための方法であって、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1の T I L 集団を取得及び / または受容することと、

(b) (a) の第1の T I L 集団から C D 3 9^{LO} / C D 6 9^{LO} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性 T I L を選択して、C D 3 9^{LO} / C D 6 9^{LO} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団を取得することと、

(c) I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 (A P C) を含む第1の細胞培養培地中で C D 3 9^{LO} / C D 6 9^{LO} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団を培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2の T I L 集団を産生することであって、プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1~11日の第1の期間行われて、第2の T I L 集団を取得し、第2の T I L 集団が、第1の T I L 集団より数が多い、第2の T I L 集団を産生することと、

30

(d) 任意選択で、第2の T I L 集団を O K T - 3 で再刺激することと、

(e) 第2の T I L 集団を遺伝子修飾して、修飾された第2の T I L 集団を産生することであって、修飾された第2の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む、修飾された第2の T I L 集団を産生することと、

(f) 修飾された第2の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び A P C を含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、第3の T I L 集団を産生することであって、急速な第2の拡張が、約14日以内の第2の期間行われて、治療的 T I L 集団を取得し、第3の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む治療的 T I L 集団である、第3の T I L 集団を産生することと、

40

(g) 第3の T I L 集団を採取することと、を含む。

【0068】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療的 T I L 集団に拡張するための方法であって、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第

50

1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(b) 第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞(APC)、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生することであって、プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団が、第1のTIL集団より数が多い、第2のTIL集団を産生することと、

10

(c) 任意選択で、第2のTIL集団をOKT-3で再刺激することと、

(d) 第2のTIL集団を遺伝子修飾して、修飾された第2のTIL集団を産生することであって、修飾された第2のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む、修飾された第2のTIL集団を産生することと、

(e) 修飾された第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の拡張が、約14日以内の第2の期間行われて、治療的TIL集団を取得し、第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む治療的TIL集団である、第3のTIL集団を産生することと、

20

(f) 第3のTIL集団を採取することと、を含む。

【0069】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(b) 第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、プライミングによる第1の拡張が第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が約1～11日の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団は第1のTIL集団よりも数が多い、第2のTIL集団を産生することと、

30

(c) 任意選択で、第2のTIL集団をOKT-3で再刺激することと、

(d) 第2のTIL集団を遺伝子修飾して、修飾された第2のTIL集団を産生することであって、修飾された第2のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む、修飾された第2のTIL集団を産生することと、

(e) 修飾された第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、APC、及びタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤を含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる第3の集団のTIL、すなわち、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、急速な第2の拡張が約14日以下の第2の期間行われ、TILの治療集団が、CD39/CD69/またはCD69/二重陰性TILの発現を低下する遺伝子修飾を含む第3のTIL集団を取得する第3の集団である第3の集団を産生することと、

40

50

(f) 第3のTIL集団を採取することと、を含む。

【0070】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または患者もしくは対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(b) 第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、抗原提示細胞（APC）、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む第1の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる群から選択され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団である第2のTIL集団を産生することであって、プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団が、第1のTIL集団より数が多い、第2のTIL集団を産生することと、

(c) 任意選択で、第2のTIL集団をOKT-3で再刺激することと、

(d) 第2のTIL集団を遺伝子修飾して、修飾された第2のTIL集団を産生することであって、修飾された第2のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む、修飾された第2のTIL集団を産生することと、

(e) 修飾された第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、APC、及びタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤を含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、任意選択で、AKT阻害剤が、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリチゲニン、スクテラリン、及びホノキオールからなる第3の集団のTIL、すなわち、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団であり、急速な第2の拡張が約14日以下の第2の期間行われ、TILの治療集団が、CD39/CD69/またはCD69/二重陰性TILの発現を低下する遺伝子修飾を含む第3のTIL集団を取得する第3の集団である第3の集団を産生することと、

(f) 第3のTIL集団を採取することと、を含む。

【0071】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒトパピローマウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される。

【0072】

本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、

(a) 第1のCD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}濃縮TIL集団を、IL-2、任意選択でOKT-3を含み、かつ任意選択で抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団は第1のTIL集団よりも数が多い、第2のTIL集団を産生することと、

(b) 第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の細胞培養

培地と接触させることにより、急速な第2の拡張を行って、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の拡張が、約1～11日の第2の期間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団である、第3のTIL集団を産生することと、

(c) ステップ(b)から取得された第3のTIL集団を採取することと、

(d) 採取された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、採取するステップ(c)の前の任意の時点で、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}濃縮TIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を遺伝子修飾することと、を含む。

10

【0073】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)において、細胞培養培地は、抗原提示細胞(APC)をさらに含み、ステップ(c)における培養培地中のAPCの数は、ステップ(b)における培養培地中のAPCの数よりも多い。

【0074】

T細胞を拡張する方法であって、

(a) 第1のTIL集団を培養することによってドナーから取得された第1のTIL集団のプライミングによる第1の拡張を行って成長をもたらし、第1のT細胞集団の活性化をプライミングすることであって、第1のTIL集団が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}濃縮TIL集団である、第1のT細胞集団の活性化をプライミングすることと、

20

(b) ステップ(a)においてプライミングされた第1のTIL集団の活性化が減衰し始めた後に、第1のTIL集団の急速な第2の拡張を、第1のTIL集団の集団を培養することにより行って成長をもたらし、第1のT細胞集団の活性化を促進して第2のT細胞集団を取得することと、

(c) 第2のT細胞集団を採取することと、

(d) 採取された第2のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、第1のTIL集団及び／または第2のTIL集団を遺伝子修飾することと、を含む。

【0075】

T細胞を拡張する方法であって、

(a) ドナーにおける腫瘍の1つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料からの第1のT細胞集団のプライミングによる第1の拡張を、第1のT細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、第1のT細胞集団の活性化をプライミングすることであって、第1のT細胞集団が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}濃縮T細胞集団である、第1のT細胞集団の活性化をプライミングすることと、

(b) ステップ(a)においてプライミングされた第1のT細胞集団の活性化が減衰し始めた後に、第1のT細胞集団の第2の急速拡張を、第1のT細胞集団を培養することにより行って成長をもたらし、第1のT細胞集団の活性化を促進して第2のT細胞集団を得ることと、

40

(c) 第2のT細胞集団を採取することと、

(d) 採取された第2のT細胞集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように、第1のT細胞集団及び／または第2のTIL集団を遺伝子修飾することと、を含む。

【0076】

いくつかの実施形態では、修飾は、第1の拡張からの第2のTIL集団、または第2の拡張からの第3のTIL集団、またはその両方で実行される。

【0077】

いくつかの実施形態では、修飾は、プライミングによる第1の拡張からの第2のTIL

50

集団、または急速な第2の拡張からの第3のTIL集団、またはその両方で実行される。

【0078】

いくつかの実施形態では、修飾は、第1の拡張からの第2のTIL集団、及び第2の拡張前の第2のTIL集団で実行される。

【0079】

いくつかの実施形態では、修飾は、プライミングによる第1の拡張からの第2のTIL集団、及び急速な第2の拡張前の第2のTIL集団、またはその両方で実行される。

【0080】

いくつかの実施形態では、修飾は、第2の拡張からの第3のTIL集団で実行される。

【0081】

いくつかの実施形態では、修飾は、急速な第2の拡張からの第3のTIL集団で実行される。

【0082】

いくつかの実施形態では、修飾は、採取後に実行される。

【0083】

いくつかの実施形態では、第1の拡張は、約11日の期間にわたって行われる。

【0084】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張は、約11日の期間にわたって行われる。

【0085】

いくつかの実施形態では、IL-2は、第1の拡張において、細胞培養培地中に1000 IU/mL~6000 IU/mLの初期濃度で存在する。

【0086】

いくつかの実施形態では、IL-2は、プライミングによる第1の拡張において、細胞培養培地中に1000 IU/mL~6000 IU/mLの初期濃度で存在する。

【0087】

いくつかの実施形態では、第2の拡張ステップにおいて、IL-2は、1000 IU/mL~6000 IU/mLの初期濃度で存在し、OKT-3抗体は、約30 ng/mLの初期濃度で存在する。

【0088】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張ステップ、IL-2は、1000 IU/mL~6000 IU/mLの初期濃度で存在し、OKT-3抗体は、約30 ng/mLの初期濃度で存在する。

【0089】

いくつかの実施形態では、第1の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。

【0090】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。

【0091】

いくつかの実施形態では、第2の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。

【0092】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張は、ガス透過性容器を使用して行われる。

【0093】

いくつかの実施形態では、第1の拡張の細胞培養培地は、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。

【0094】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張の細胞培養培地は、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。

10

20

30

40

50

【0095】

いくつかの実施形態では、第2の拡張の細胞培養培地は、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。

【0096】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張の細胞培養培地は、IL-4、IL-7、IL-15、IL-21、及びそれらの組み合わせからなる群から選択されるサイトカインをさらに含む。

【0097】

いくつかの実施形態では、この方法は、第3のTIL集団を患者に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。 10

【0098】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを 60 mg/m^2 /日の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを 25 mg/m^2 /日の用量で3日間投与するステップを含む。

【0099】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを 60 mg/m^2 /日の用量で、フルダラビンを 25 mg/m^2 /日の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを 25 mg/m^2 /日の用量で3日間投与するステップを含む。 20

【0100】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを 60 mg/m^2 /日の用量で、フルダラビンを 25 mg/m^2 /日の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを 25 mg/m^2 /日の用量で1日間投与するステップを含む。 20

【0101】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。

【0102】

いくつかの実施形態では、この方法は、TILを患者に投与した翌日から開始するIL-2レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。

【0103】

いくつかの実施形態では、この方法は、TILを患者に投与したのと同じ日に開始するIL-2レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。 30

【0104】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、許容範囲まで8時間毎に15分間のボラス静脈内注入として投与される、600, 000もしくは720, 000 IU/kgのアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリエーションを含む高用量IL-2レジメンである。

【0105】

いくつかの実施形態では、治療上有効なTIL集団が投与され、約 2.3×10^{10} ~ 約 13.7×10^{10} TILを含む。

【0106】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張及び急速な第2の拡張は、21日以内の期間にわたって行われる。 40

【0107】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張及び急速な第2の拡張は、16日または17日以内の期間にわたって行われる。

【0108】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張は、7日または8日以内の期間にわたって行われる。

【0109】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張は、11日以内の期間にわたって行われる 50

。

【0110】

いくつかの実施形態では、第1の拡張及び第2の拡張は、各々、11日の期間内で個別に行われる。

【0111】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)～(f)は、約26日の期間内で行われる。

【0112】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾されたTILは、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、Cish、TGFB β 、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、及びTOXを含む群から選択される免疫チェックポイント遺伝子のうちの1つ以上の発現を低減する、追加の遺伝子修飾をさらに含む。

【0113】

いくつかの実施形態では、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子は、PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、Cish、TGFB β 、及びPKAを含む群から選択される。

【0114】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾されたTILは、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的TIL集団の少なくとも一部において増強させる追加の遺伝子修飾をさらに含み、免疫チェックポイント遺伝子(複数可)は、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2細胞内ドメイン(ICD)、及び/またはNOTCHリガンドmDLL1を含む群から選択される。

【0115】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾ステップは、該1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼを使用して行われる。

【0116】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾は、CRISPR法、TALE法、ジンクフィンガー法、及びそれらの組み合わせから選択される1つ以上の方法を使用して行われる。

【0117】

いくつかの実施形態では、方法は、CRISPR法を含む。

【0118】

いくつかの実施形態では、CRISPR法は、CRISPR/Cas9法である。

【0119】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾は、TALE法を含む。

【0120】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾は、ジンクフィンガー法を含む。

【0121】

いくつかの実施形態では、対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することは、腫瘍試料を酵素培地中でインキュベートすることを含む。

【0122】

いくつかの実施形態では、対象から取得された腫瘍試料を腫瘍消化物に処理することは、腫瘍試料を機械的に破壊して腫瘍試料を解離することをさらに含む。

10

20

30

40

50

【0123】

いくつかの実施形態では、対象から取得された腫瘍試料を処理することは、密度勾配分離を使用して解離された腫瘍試料を精製することをさらに含む。

【0124】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、DNaseを含む。

【0125】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、30単位/mLのDNaseを含む。

【0126】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、コラゲナーゼを含む。

【0127】

いくつかの実施形態では、酵素培地は、1.0mg/mLのコラゲナーゼを含む。

【0128】

いくつかの実施形態では、採取された治療的TIL集団は、治療上有効な投与量を対象に投与する際に使用するのに十分なTILを含む。

【0129】

いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 1×10^9 ～約 9×10^{10} のTILを含む。

【0130】

いくつかの実施形態では、APCは、末梢血単核細胞(PBMC)を含む。

【0131】

いくつかの実施形態では、ステップ(e)で採取された治療的TIL集団は、第1及び/または第2のTIL集団と比較して増加したCD8+細胞の亜集団を示す。

【0132】

いくつかの実施形態では、PBMCは、約1:25のTIL:PBMCの比で補充される。

【0133】

いくつかの実施形態では、ステップにおける第1の拡張及びステップにおける第2の拡張は、各々、11～12日の期間内で個別に行われる。

【0134】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)～(e)、(f)または(g)は、約10日～約24日で行われる。

【0135】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)～(e)、(f)または(g)は、約15日～約24日で行われる。

【0136】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)～(e)、(f)または(g)は、約20日～約24日で行われる。

【0137】

いくつかの実施形態では、ステップ(a)～(e)、(f)または(g)は、約20日～約22日で行われる。

【0138】

いくつかの実施形態では、第2のTIL集団は、第1のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多い。

【0139】

本発明はまた、本明細書に記載される方法のうちのいずれかによるTIL集団を提供する。

【0140】

本発明はまた、本明細書に記載される方法のうちのいずれかによるTIL集団を含む組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

10

20

30

40

50

【0141】

【図1】ステップA～Fの概要を提供する例示的なGen2（プロセス2A）チャート。

【図2A】TIL製造のためのGen2（プロセス2A）の実施形態のプロセスフローチャート。

【図2B】TIL製造のためのGen2（プロセス2A）の実施形態のプロセスフローチャート。

【図2C】TIL製造のためのGen2（プロセス2A）の実施形態のプロセスフローチャート。

【図3】凍結保存されたTILの例示的な製造プロセス（約22日）の実施形態の図を示す。

【図4】TIL製造のための22日プロセスである、Gen2（プロセス2A）の実施形態の図を示す。

【図5】TIL製造のためのプロセス1C及びGen2（プロセス2A）の例示的な実施形態からのステップA～Fの比較表。

【図6】TIL製造のためのプロセス1Cの実施形態とGen2（プロセス2A）の実施形態との詳細な比較。

【図7】例示的なGen3型TIL製造プロセス。

【図8A】TIL製造のための2Aプロセス（およそ22日プロセス）とGen3プロセス（およそ14日～16日プロセス）の実施形態との比較を示す。

【図8B】ステップA～F（およそ14日～16日プロセス）の概要を提供する例示的なGen3プロセスチャート。

【図8C】3つのプロセスバリエーションの各々について、ステップA～F（およそ14日～16日プロセス）の概要とともに3つの例示的なGen3プロセスを提供するチャート。

【図8D】ステップA～Fの概要を提供する例示的な修正Gen2様プロセス（およそ22日プロセス）。

【図8E】TIL製造のための2Aプロセス（およそ22日プロセス）とGen3プロセス（およそ14日～22日プロセス）の実施形態との比較を示す。

【図8F】例示的なプロセス（a）CD39／CD69二重陰性、（b）CD39／CD69二重ノックアウト、またはステップA～F（およそ14日～22日プロセス）の概要を提供する（i）及び（ii）TIL拡張法Gen3チャートの組み合わせ。

【図8G】（a）CD39／CD69二重陰性、（b）CD39／CD69二重ノックアウト、または本明細書に記載の事前選択を用いる（i）及び（ii）TIL拡張方法の組み合わせの例示的な実施形態。

【図9】Gen2（プロセス2A）とGen3プロセスとの比較のための実験フローチャートを提供する。

【図10】様々なGen2（プロセス2A）とGen3.1プロセス実施形態との比較を示す。

【図11】Gen2、Gen2.1及びGen3.0プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。

【図12】Gen3.1と称される、Gen3プロセスの実施形態のための培地条件の概要。

【図13】Gen2、Gen2.1及びGen3.0プロセスの実施形態の様々な特徴を説明する表。

【図14】Gen2及びGen3.0プロセスの実施形態の様々な特徴を比較する表。

【図15】記載された拡張プロセスの様々な実施形態における培地の使用を提供する表。

【図16】Gen3プロセス（16日プロセス）の例示的な実施形態の概略図。

【図17】Gen3拡張プラットフォームを使用して造血器悪性腫瘍からT細胞を拡張するための方法の例示的な実施形態の概略図。

【図18】構造I-A及びI-Bを提供する。円筒は、個々のポリペプチド結合ドメイン

10

20

30

40

50

を指す。構造 I-A 及び I-B は、例えば、4-1 B B L または 4-1 B B に結合する抗体から誘導される 3 つの線形に結合した T N F R S F 結合ドメインを含み、これらを折り畳んで三価タンパク質を形成し、次いでこれを I g G 1-F c (C H 3 及び C H 2 ドメインを含む) によって第 2 の三価タンパク質に結合し、次いでこれを使用して、三価タンパク質のうちの 2 つをジスルフィド結合 (小さい長楕円) によって一緒に結合し、構造を安定化し、6 つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示される T N F R S F 結合ドメインは、例えば、親水性残基及び柔軟性のための G l y 及び S e r 配列、ならびに溶解性のための G l u 及び L y s を含み得るリンカーによって結合された V_H 鎖及び V_L 鎖を含む、s c F v ドメインであり得る。

10

【図 19】G e n 3 プロセス (16 日プロセス) の例示的な実施形態の概略図。

【図 20】G e n 3. 1 プロセス (16 日プロセス) の例示的な実施形態のプロセス概要を提供する。

【図 21】G e n 3. 1 試験プロセス (16 ~ 17 日プロセス) の例示的な実施形態の概略図。

【図 22】G e n 3 プロセス (16 日プロセス) の例示的な実施形態の概略図。

【図 23 A】例示的な G e n 2 プロセス及び例示的な G e n 3 プロセスの比較表。

【図 23 B】例示的な G e n 2 プロセス及び例示的な G e n 3 プロセスの比較表。

【図 24】G e n 3 プロセス (16 / 17 日プロセス) の調製タイムラインの例示的な実施形態の概略図。

20

【図 25】G e n 3 プロセス (14 ~ 16 日プロセス) の例示的な実施形態の概略図。

【図 26 A】G e n 3 プロセス (16 日プロセス) の例示的な実施形態の概略図。

【図 26 B】G e n 3 プロセス (16 日プロセス) の例示的な実施形態の概略図。

【図 27】G e n 3 プロセス (16 日プロセス) の例示的な実施形態の概略図。

【図 28】G e n 2、G e n 2. 1、及び G e n 3 プロセス (16 日プロセス) の実施形態の比較。

【図 29】G e n 2、G e n 2. 1、及び G e n 3 プロセス (16 日プロセス) の実施形態の比較。

【図 30】G e n 3 実施形態の構成要素。

【図 31】G e n 3 実施形態のフローチャート比較 (G e n 3. 0、G e n 3. 1 対照、G e n 3. 1 試験)。

30

【図 32】G e n 3 プロセス (16 ~ 17 日プロセス) の例示的な実施形態の構成要素が示される。

【図 33】承認基準表。

【図 34】実施例 15 のワークフローの概略図。

【図 35】実施例 17 のワークフローの概略図。

【図 36】T I L 拡張、生存率、及び T 細胞分布に対する A K T i 処置の効果の評価。

【図 37】対照及び A K T i 処置した T I L における T 細胞サブセットの評価。

【図 38】対照及び A K T i 処置した T I L におけるサイトカイン及びケモカイン受容体発現の評価。

40

【図 39】対照及び A K T i 処置した C D 8 + T I L における C D 6 9 及び C D 3 9 の単一及び二重陽性集団ならびに単一及び二重陰性集団の分布の評価。

【図 40】C D 6 9 - C D 3 9 - 及び C D 6 9 + C D 3 9 + C D 8 + T I L に対する抑制性受容体及び転写因子の発現の評価。

【図 41】一晚刺激後の対照及び A K T i 処置した T I L におけるマーカー発現の評価。

【図 42】対照及び A K T i 処置した T I L の細胞傷害性の評価。

【0142】

配列表の簡単な説明

配列番号 1 は、ムロモナブの重鎖のアミノ酸配列である。

【0143】

50

配列番号 2 は、ムロモナブの軽鎖のアミノ酸配列である。

【0144】

配列番号 3 は、組換えヒト IL-2 タンパク質のアミノ酸配列である。

【0145】

配列番号 4 は、アルデスロイキンのアミノ酸配列である。

【0146】

配列番号 5 は、IL-2 形態である。

【0147】

配列番号 6 は、ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列である。

【0148】

配列番号 7 は、IL-2 形態である。

【0149】

配列番号 8 は、ムチンドメインポリペプチドである。

【0150】

配列番号 9 は、組換えヒト IL-4 タンパク質のアミノ酸配列である。

【0151】

配列番号 10 は、組換えヒト IL-7 タンパク質のアミノ酸配列である。

【0152】

配列番号 11 は、組換えヒト IL-15 タンパク質のアミノ酸配列である。

【0153】

配列番号 12 は、組換えヒト IL-21 タンパク質のアミノ酸配列である。

【0154】

配列番号 13 は、IL-2 配列である。

【0155】

配列番号 14 は、IL-2 ムテイン配列である。

【0156】

配列番号 15 は、IL-2 ムテイン配列である。

【0157】

配列番号 16 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR1 __ IL-2 である。

【0158】

配列番号 17 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR2 である。

【0159】

配列番号 18 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR3 である。

【0160】

配列番号 19 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR1 __ IL-2 カバットである。

【0161】

配列番号 20 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR2 カバットである。

【0162】

配列番号 21 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR3 カバットである。

【0163】

配列番号 22 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR1 __ IL-2 クロチアである。

【0164】

配列番号 23 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR2 クロチアである。

【0165】

配列番号 24 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR3 クロチアである。

【0166】

配列番号 25 は、IgG・IL2R67A・H1 の HCDR1 __ IL-2 IMGT である。

10

20

30

40

50

- 【0167】
配列番号26は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 2 I M G T である。
- 【0168】
配列番号27は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 3 I M G T である。
- 【0169】
配列番号28は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の V_H 鎖である。
- 【0170】
配列番号29は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の重鎖である。
- 【0171】
配列番号30は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 1 カバットである。 10
- 【0172】
配列番号31は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 2 カバットである。
- 【0173】
配列番号32は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 3 カバットである。
- 【0174】
配列番号33は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 1 c h o t h i a である。
- 【0175】
配列番号34は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 2 c h o t h i a である。
- 【0176】
配列番号35は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 3 c h o t h i a である。 20
- 【0177】
配列番号36は、V_L 鎖である。
- 【0178】
配列番号37は、軽鎖である。
- 【0179】
配列番号38は、軽鎖である。
- 【0180】
配列番号39は、軽鎖である。
- 【0181】
配列番号40は、ヒト4-1BBのアミノ酸配列である。 30
- 【0182】
配列番号41は、マウス4-1BBのアミノ酸配列である。
- 【0183】
配列番号42は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（P F - 0 5 0 8 2 5 6 6）の重鎖である。
- 【0184】
配列番号43は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（P F - 0 5 0 8 2 5 6 6）の軽鎖である。
- 【0185】
配列番号44は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（P F - 0 5 0 8 2 5 6 6）の重鎖可変領域（V_H）である。 40
- 【0186】
配列番号45は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（P F - 0 5 0 8 2 5 6 6）の軽鎖可変領域（V_L）である。
- 【0187】
配列番号46は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（P F - 0 5 0 8 2 5 6 6）の重鎖CDR1である。
- 【0188】
配列番号47は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（P F - 0 5 0 8 2 5 6 6）の重鎖CDR2である。 50

【0189】

配列番号48は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（PF-05082566）の重鎖CDR3である。

【0190】

配列番号49は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（PF-05082566）の軽鎖CDR1である。

【0191】

配列番号50は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（PF-05082566）の軽鎖CDR2である。

【0192】

配列番号51は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウトミルマブ（PF-05082566）の軽鎖CDR3である。

【0193】

配列番号52は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の重鎖である。

【0194】

配列番号53は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の軽鎖である。

【0195】

配列番号54は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の重鎖可変領域（VH）である。

【0196】

配列番号55は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の軽鎖可変領域（VL）である。

【0197】

配列番号56は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の重鎖CDR1である。

【0198】

配列番号57は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の重鎖CDR2である。

【0199】

配列番号58は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の重鎖CDR3である。

【0200】

配列番号59は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の軽鎖CDR1である。

【0201】

配列番号60は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の軽鎖CDR2である。

【0202】

配列番号61は、4-1BBアゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（BMS-663513）の軽鎖CDR3である。

【0203】

配列番号62は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のFcドメインである。

【0204】

配列番号63は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0205】

配列番号64は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0206】

配列番号65は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

10

20

30

40

50

- 【 0 2 0 7 】
配列番号 6 6 は、T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 2 0 8 】
配列番号 6 7 は、T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 2 0 9 】
配列番号 6 8 は、T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 2 1 0 】
配列番号 6 9 は、T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 2 1 1 】
配列番号 7 0 は、T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。 10
- 【 0 2 1 2 】
配列番号 7 1 は、T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 2 1 3 】
配列番号 7 2 は、T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 2 1 4 】
配列番号 7 3 は、T N F R S F アゴニスト融合タンパク質の F c ドメインである。
- 【 0 2 1 5 】
配列番号 7 4 は、T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 2 1 6 】
配列番号 7 5 は、T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。 20
- 【 0 2 1 7 】
配列番号 7 6 は、T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。
- 【 0 2 1 8 】
配列番号 7 7 は、4 - 1 B B リガンド (4 - 1 B B L) アミノ酸配列である。
- 【 0 2 1 9 】
配列番号 7 8 は、4 - 1 B B L ポリペプチドの可溶性部分である。
- 【 0 2 2 0 】
配列番号 7 9 は、4 - 1 B B アゴニスト抗体 4 B 4 - 1 - 1 バージョン 1 の重鎖可変領域 (V_H) である。
- 【 0 2 2 1 】
配列番号 8 0 は、4 - 1 B B アゴニスト抗体 4 B 4 - 1 - 1 バージョン 1 の軽鎖可変領域 (V_L) である。 30
- 【 0 2 2 2 】
配列番号 8 1 は、4 - 1 B B アゴニスト抗体 4 B 4 - 1 - 1 バージョン 2 の重鎖可変領域 (V_H) である。
- 【 0 2 2 3 】
配列番号 8 2 は、4 - 1 B B アゴニスト抗体 4 B 4 - 1 - 1 バージョン 2 の軽鎖可変領域 (V_L) である。
- 【 0 2 2 4 】
配列番号 8 3 は、4 - 1 B B アゴニスト抗体 H 3 9 E 3 - 2 の重鎖可変領域 (V_H) である。 40
- 【 0 2 2 5 】
配列番号 8 4 は、4 - 1 B B アゴニスト抗体 H 3 9 E 3 - 2 の軽鎖可変領域 (V_L) である。
- 【 0 2 2 6 】
配列番号 8 5 は、ヒト O X 4 0 のアミノ酸配列である。
- 【 0 2 2 7 】
配列番号 8 6 は、マウス O X 4 0 のアミノ酸配列である。
- 【 0 2 2 8 】
配列番号 8 7 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体タポリキシズマブ (M E D I 50

－ 0 5 6 2 ）の重鎖である。

【 0 2 2 9 】

配列番号 8 8 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（M E D I
－ 0 5 6 2 ）の軽鎖である。

【 0 2 3 0 】

配列番号 8 9 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（M E D I
－ 0 5 6 2 ）の重鎖可変領域（V_H）である。

【 0 2 3 1 】

配列番号 9 0 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（M E D I
－ 0 5 6 2 ）の軽鎖可変領域（V_L）である。

【 0 2 3 2 】

配列番号 9 1 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（M E D I
－ 0 5 6 2 ）の重鎖 C D R 1 である。

【 0 2 3 3 】

配列番号 9 2 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（M E D I
－ 0 5 6 2 ）の重鎖 C D R 2 である。

【 0 2 3 4 】

配列番号 9 3 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（M E D I
－ 0 5 6 2 ）の重鎖 C D R 3 である。

【 0 2 3 5 】

配列番号 9 4 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（M E D I
－ 0 5 6 2 ）の軽鎖 C D R 1 である。

【 0 2 3 6 】

配列番号 9 5 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（M E D I
－ 0 5 6 2 ）の軽鎖 C D R 2 である。

【 0 2 3 7 】

配列番号 9 6 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体タボリキシズマブ（M E D I
－ 0 5 6 2 ）の軽鎖 C D R 3 である。

【 0 2 3 8 】

配列番号 9 7 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の重鎖である。

【 0 2 3 9 】

配列番号 9 8 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖である。

【 0 2 4 0 】

配列番号 9 9 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の重鎖可変領域（V_H）である。

【 0 2 4 1 】

配列番号 1 0 0 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖可変領域（V_L）である。

【 0 2 4 2 】

配列番号 1 0 1 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の重鎖 C D R 1 である。

【 0 2 4 3 】

配列番号 1 0 2 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の重鎖 C D R 2 である。

【 0 2 4 4 】

配列番号 1 0 3 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の重鎖 C D R 3 である。

【 0 2 4 5 】

配列番号 1 0 4 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖 C D R 1 である。

10

20

30

40

50

【 0 2 4 6 】

配列番号 1 0 5 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖 C D R 2 である。

【 0 2 4 7 】

配列番号 1 0 6 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖 C D R 3 である。

【 0 2 4 8 】

配列番号 1 0 7 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖である。

【 0 2 4 9 】

配列番号 1 0 8 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖である。

10

【 0 2 5 0 】

配列番号 1 0 9 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖可変領域 (V_H) である。

【 0 2 5 1 】

配列番号 1 1 0 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【 0 2 5 2 】

配列番号 1 1 1 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖 C D R 1 である。

【 0 2 5 3 】

配列番号 1 1 2 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖 C D R 2 である。

20

【 0 2 5 4 】

配列番号 1 1 3 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖 C D R 3 である。

【 0 2 5 5 】

配列番号 1 1 4 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖 C D R 1 である。

【 0 2 5 6 】

配列番号 1 1 5 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖 C D R 2 である。

30

【 0 2 5 7 】

配列番号 1 1 6 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖 C D R 3 である。

【 0 2 5 8 】

配列番号 1 1 7 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の重鎖可変領域 (V_H) である。

【 0 2 5 9 】

配列番号 1 1 8 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の軽鎖可変領域 (V_L) である。

40

【 0 2 6 0 】

配列番号 1 1 9 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の重鎖 C D R 1 である。

【 0 2 6 1 】

配列番号 1 2 0 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の重鎖 C D R 2 である。

【 0 2 6 2 】

配列番号 1 2 1 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 H u 1 1 9 - 1 2 2 の重鎖 C D R 3 である。

【 0 2 6 3 】

50

配列番号 122 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu119-122 の軽鎖 CDR1 である。

【0264】

配列番号 123 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu119-122 の軽鎖 CDR2 である。

【0265】

配列番号 124 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu119-122 の軽鎖 CDR3 である。

【0266】

配列番号 125 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の重鎖可変領域 (V_H) である。 10

【0267】

配列番号 126 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【0268】

配列番号 127 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の重鎖 CDR1 である。

【0269】

配列番号 128 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の重鎖 CDR2 である。 20

【0270】

配列番号 129 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の重鎖 CDR3 である。

【0271】

配列番号 130 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の軽鎖 CDR1 である。

【0272】

配列番号 131 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の軽鎖 CDR2 である。

【0273】 30

配列番号 132 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 Hu106-222 の軽鎖 CDR3 である。

【0274】

配列番号 133 は、OX40 リガンド (OX40L) アミノ酸配列である。

【0275】

配列番号 134 は、OX40L ポリペプチドの可溶性部分である。

【0276】

配列番号 135 は、OX40L ポリペプチドの代替可溶性部分である。

【0277】

配列番号 136 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 008 の重鎖可変領域 (V_H) である。 40

【0278】

配列番号 137 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 008 の軽鎖可変領域 (V_L) である。

【0279】

配列番号 138 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 011 の重鎖可変領域 (V_H) である。

【0280】

配列番号 139 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 011 の軽鎖可変領域 (V_L) である。 50

【0281】

配列番号140は、OX40アゴニストモノクローナル抗体021の重鎖可変領域（V_H）である。

【0282】

配列番号141は、OX40アゴニストモノクローナル抗体021の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0283】

配列番号142は、OX40アゴニストモノクローナル抗体023の重鎖可変領域（V_H）である。

【0284】

配列番号143は、OX40アゴニストモノクローナル抗体023の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0285】

配列番号144は、OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。

【0286】

配列番号145は、OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0287】

配列番号146は、OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。

【0288】

配列番号147は、OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0289】

配列番号148は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。

【0290】

配列番号149は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。

【0291】

配列番号150は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0292】

配列番号151は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0293】

配列番号152は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。

【0294】

配列番号153は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）である。

【0295】

配列番号154は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0296】

配列番号155は、ヒト化OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0297】

配列番号156は、OX40アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域（V_H）で

10

20

30

40

50

ある。

【0298】

配列番号157は、OX40アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域（V_L）である。

【0299】

配列番号158は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖アミノ酸配列である。

【0300】

配列番号159は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【0301】

配列番号160は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。 10

【0302】

配列番号161は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

【0303】

配列番号162は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0304】

配列番号163は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0305】

配列番号164は、PD-1阻害剤ニボルマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。 20

【0306】

配列番号165は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0307】

配列番号166は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0308】

配列番号167は、PD-1阻害剤ニボルマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0309】

配列番号168は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの重鎖アミノ酸配列である。

【0310】

配列番号169は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。 30

【0311】

配列番号170は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。

【0312】

配列番号171は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

【0313】

配列番号172は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0314】

配列番号173は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。 40

【0315】

配列番号174は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0316】

配列番号175は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0317】

配列番号176は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列であ 50

る。

【0318】

配列番号177は、PD-1阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0319】

配列番号178は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖アミノ酸配列である。

【0320】

配列番号179は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【0321】

配列番号180は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。

10

【0322】

配列番号181は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

【0323】

配列番号182は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0324】

配列番号183は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。

20

【0325】

配列番号184は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0326】

配列番号185は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0327】

配列番号186は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0328】

配列番号187は、PD-L1阻害剤デュルバルマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。

30

【0329】

配列番号188は、PD-L1阻害剤アベルマブの重鎖アミノ酸配列である。

【0330】

配列番号189は、PD-L1阻害剤アベルマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【0331】

配列番号190は、PD-L1阻害剤アベルマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。

【0332】

配列番号191は、PD-L1阻害剤アベルマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。

40

【0333】

配列番号192は、PD-L1阻害剤アベルマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0334】

配列番号193は、PD-L1阻害剤アベルマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0335】

配列番号194は、PD-L1阻害剤アベルマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0336】

配列番号195は、PD-L1阻害剤アベルマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。

50

- 【0337】
配列番号196は、PD-L1阻害剤アベルマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。
- 【0338】
配列番号197は、PD-L1阻害剤アベルマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。
- 【0339】
配列番号198は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの重鎖アミノ酸配列である。
- 【0340】
配列番号199は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの軽鎖アミノ酸配列である。
- 【0341】
配列番号200は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。 10
- 【0342】
配列番号201は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。
- 【0343】
配列番号202は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。
- 【0344】
配列番号203は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。 20
- 【0345】
配列番号204は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。
- 【0346】
配列番号205は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。
- 【0347】
配列番号206は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。
- 【0348】
配列番号207は、PD-L1阻害剤アテゾリズマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。 30
- 【0349】
配列番号208は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの重鎖アミノ酸配列である。
- 【0350】
配列番号209は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。
- 【0351】
配列番号210は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの重鎖可変領域（V_H）アミノ酸配列である。
- 【0352】
配列番号211は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの軽鎖可変領域（V_L）アミノ酸配列である。 40
- 【0353】
配列番号212は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。
- 【0354】
配列番号213は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。
- 【0355】
配列番号214は、CTLA-4阻害剤イピリムマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。 50

る。

【0356】

配列番号215は、CTL A-4阻害剤イピリムマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0357】

配列番号216は、CTL A-4阻害剤イピリムマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0358】

配列番号217は、CTL A-4阻害剤イピリムマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0359】

配列番号218は、CTL A-4阻害剤トレメリムマブの重鎖アミノ酸配列である。

【0360】

配列番号219は、CTL A-4阻害剤トレメリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【0361】

配列番号220は、CTL A-4阻害剤トレメリムマブの重鎖可変領域(V_H)アミノ酸配列である。

【0362】

配列番号221は、CTL A-4阻害剤トレメリムマブの軽鎖可変領域(V_L)アミノ酸配列である。

【0363】

配列番号222は、CTL A-4阻害剤トレメリムマブの重鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0364】

配列番号223は、CTL A-4阻害剤トレメリムマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0365】

配列番号224は、CTL A-4阻害剤トレメリムマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0366】

配列番号225は、CTL A-4阻害剤トレメリムマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0367】

配列番号226は、CTL A-4阻害剤トレメリムマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0368】

配列番号227は、CTL A-4阻害剤トレメリムマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0369】

配列番号228は、CTL A-4阻害剤ザリフレリマブの重鎖アミノ酸配列である。

【0370】

配列番号229は、CTL A-4阻害剤ザリフレリマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【0371】

配列番号230は、CTL A-4阻害剤ザリフレリマブの重鎖可変領域(V_H)アミノ酸配列である。

【0372】

配列番号231は、CTL A-4阻害剤ザリフレリマブの軽鎖可変領域(V_L)アミノ酸配列である。

【0373】

配列番号232は、CTL A-4阻害剤ザリフレリマブの重鎖CDR1アミノ酸配列で

10

20

30

40

50

ある。

【0374】

配列番号233は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの重鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0375】

配列番号234は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの重鎖CDR3アミノ酸配列である。

【0376】

配列番号235は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの軽鎖CDR1アミノ酸配列である。

【0377】

配列番号236は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの軽鎖CDR2アミノ酸配列である。

【0378】

配列番号237は、CTLA-4阻害剤ザリフレリマブの軽鎖CDR3アミノ酸配列である。

【発明を実施するための形態】

【0379】

I. 導入

(i) CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト（例えば、CD39/CD69の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾された）、または(iii) (i)及び(ii)の組み合わせであるTILが、本明細書に提供される。いくつかの実施形態では、対象のTILは、(i) CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト（例えば、CD39/CD69の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾された）、または(iii) (i)及び(ii)の組み合わせのために選択されたTIL集団を遺伝子操作することによって産生される。そのような遺伝子修飾されたTILを産生するための拡張方法、及びかかるTILを使用する治療方法もまた、本明細書に提供される。そのような遺伝子修飾されたTILを産生するための拡張方法、及びかかるTILを使用する治療方法もまた、本明細書に提供される。

【0380】

定義

他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同じである。本明細書で参照されるすべての特許及び刊行物は、参照によりそれらの全体が組み込まれる。

【0381】

本明細書で使用される「同時投与」、「同時投与すること」、「～と組み合わせて投与される」、「～と組み合わせて投与すること」、「同時(simultaneous)」及び「同時(concurrent)」という用語は、対象への2つ以上の医薬品有効成分（本発明のいくつかの実施形態では、例えば、複数のTIL）の投与を包含し、医薬品有効成分及び／またはそれらの代謝物の両方が、対象において同時に存在するようにする。同時投与には、別々の組成物での同時投与、別々の組成物での異なる時間での投与、または2つ以上の医薬品有効成分が存在する組成物での投与が含まれる。別々の組成物での同時投与及び両方の薬剤が存在する組成物での投与が好ましい。

【0382】

「インビボ」という用語は、対象の体内で起こる事象を指す。

【0383】

「インビトロ」という用語は、対象の体外で起こる事象を指す。インビトロアッセイには、生きている細胞または死んでいる細胞が用いられる細胞ベースのアッセイが包含され

10

20

30

40

50

、無傷の細胞が用いられない無細胞アッセイも含み得る。

【0384】

「エクスビボ」という用語は、対象の体から除去された細胞、組織、及び／または器官に対する治療または処置の実施を伴う事象を指す。適切には、細胞、組織、及び／または器官は、外科手術または治療の方法で対象の体に戻され得る。

【0385】

「急速拡張」という用語は、1週間の期間にわたって少なくとも約3倍（または4、5、6、7、8、もしくは9倍）、より好ましくは1週間の期間にわたって少なくとも約10倍（または20、30、40、50、60、70、80、もしくは90倍）、あるいは最も好ましくは1週間の期間にわたって少なくとも約100倍の抗原特異的TILの数の増加を意味する。本明細書では、いくつかの急速拡張プロトコルが説明されている。

10

【0386】

本明細書における「腫瘍浸潤リンパ球」または「TIL」とは、対象の血流を離れて腫瘍に移動した白血球として最初に取得された細胞の集団を意味する。TILには、CD8⁺細胞傷害性T細胞（リンパ球）、Th1及びTh17 CD4⁺T細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、ならびにM1マクロファージが含まれるが、これらに限定されない。TILには、一次TIL及び二次TILの両方が含まれる。「一次TIL」は、本明細書に概説されるように患者組織試料から得られるもの（「新たに採取された」と称されることもある）であり、「二次TIL」は、本明細書で考察される拡張または増殖された任意のTIL細胞集団であり、バルクTIL及び拡張TIL（「REP TIL」または「post-REP TIL」）が含まれるが、これらに限定されない。TIL細胞集団には、遺伝子修飾TILが含まれ得る。

20

【0387】

TILは、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義されるか、または腫瘍に浸潤して治療を達成するそれらの能力によって機能的に定義されるかのいずれかであり得る。TILは、一般に、CD4、CD8、TCR $\alpha\beta$ 、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1、及びCD25のうちの1つ以上のバイオマーカーの発現によって分類され得る。さらに及び代替的に、TILは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力により機能的に定義され得る。TILは、効力によってさらに特徴付けられ得、例えば、インターフェロン（IFN）放出が、約50 pg/mLを超える、約100 pg/mLを超える、約150 pg/mLを超える、または約200 pg/mLを超える場合、TILは強力であるとみなされ得る。例えば、インターフェロン（IFN γ ）放出が、約50 pg/mLを超える、約100 pg/mLを超える、約150 pg/mLを超える、または約200 pg/mLを超える、約300 pg/mLを超える、約400 pg/mLを超える、約500 pg/mLを超える、約600 pg/mLを超える、約700 pg/mLを超える、約800 pg/mLを超える、約900 pg/mLを超える、約1000 pg/mLを超える場合、TILは強力であるとみなされ得る。

30

【0388】

「CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL」または「CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL集団」または前述のうちのいずれかの文法的変型は、参照されるTILまたはTIL集団が取得される任意のTIL/TIL集団と比較して、平均して、細胞表面タンパク質CD39及びCD69の検出不能な、低い、または低下したレベルを示すTILまたはTIL集団を意味する。

40

【0389】

「CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}濃縮TIL」または「CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}濃縮TIL集団」または前述のうちのいずれかの文法的変型は、参照TILまたはTIL集団が取得される任意のTIL/TIL集団と比較して、平均して、検出不能な、低い、または低下したレベルの細胞表面タンパク質CD39及びCD69を有するTILが濃縮されたT

50

IL または TIL 集団を意味する。任意の濃縮手段を使用して、CD39 / CD69 二重陰性及び / または CD39^{LO} / CD69^{LO} 濃縮 TIL を取得することができ、CD39 / CD69 二重陰性及び / または CD39^{LO} / CD69^{LO} TIL の選別または選択が含まれる。

【0390】

本明細書における「細胞の集団」（TIL を含む）とは、共通の形質を共有するいくつかの細胞を意味する。一般に、集団は、概して $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ の数の範囲であり、異なる TIL 集団は、異なる数を含む。例えば、IL-2 の存在下での一次 TIL の初期成長は、およそ 1×10^8 細胞のバルク TIL の集団をもたらす。REP 拡張は、一般に、注入用の $1.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^{10}$ 細胞の集団を提供するために行われる。

10

【0391】

本明細書における「凍結保存された TIL」とは、一次、バルク、または拡張 (REP TIL) のいずれかの TIL が、約 $-150^\circ\text{C} \sim -60^\circ\text{C}$ の範囲で処理及び保管されることを意味する。凍結保存のための一般的な方法は、実施例を含む本明細書の他の場所にも記載されている。明確にするために、「凍結保存された TIL」は、一次 TIL のソースとして使用される可能性のある凍結組織試料と区別することができる。

【0392】

本明細書における「解凍された凍結保存 TIL」とは、以前に凍結保存され、その後、細胞培養温度または TIL が患者に投与され得る温度を含むがこれらに限定されない、室温以上に戻るように処理された TIL の集団を意味する。

20

【0393】

TIL は、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義されるか、または腫瘍に浸潤して治療を達成するそれらの能力によって機能的に定義されるかのいずれかであり得る。TIL は、一般に、CD4、CD8、TCR $\alpha\beta$ 、CD27、CD28、CD56、CCR7、CD45Ra、CD95、PD-1、及び CD25 のうちの 1 つ以上のバイオマーカーの発現によって分類され得る。さらに及び代替的に、TIL は、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力により機能的に定義され得る。

【0394】

「凍結保存培地 (cryopreservation media)」または「凍結保存培地 (cryopreservation medium)」という用語は、細胞の凍結保存に使用できる任意の培地を指す。かかる培地は、7% ~ 10% の DMSO を含む培地を含むことができる。例示的な培地には、CryoStor CS10、Hypert hermasol、及びそれらの組み合わせが含まれる。「CS10」という用語は、Stemcell Technologies または Biolife Solutions から入手した凍結保存培地を指す。CS10 培地は、商品名「CryoStor (登録商標) CS10」と称され得る。CS10 培地は、DMSO を含む無血清の動物成分を含まない培地である。

30

【0395】

「セントラルメモリー T 細胞」という用語は、ヒトでは CD45RO+ であり、CCR7 (CCR7 高) 及び CD62L (CD62 高) を構成的に発現する T 細胞のサブセットを指す。セントラルメモリー T 細胞の表面表現型には、TCR、CD3、CD127 (IL-7R)、及び IL-15R も含まれる。セントラルメモリー T 細胞の転写因子には、BCL-6、BCL-6B、MBD2、及び BMI1 が含まれる。セントラルメモリー T 細胞は、TCR トリガー後、エフェクター分子として IL-2 及び CD40L を主に分泌する。セントラルメモリー T 細胞は、血液中の CD4 コンパートメントで優勢であり、ヒトではリンパ節及び扁桃腺において比例して濃縮される。

40

【0396】

「エフェクターメモリー T 細胞」という用語は、セントラルメモリー T 細胞と同様に CD45RO+ であるが、CCR7 の構成的発現を失い (CCR7 低)、CD62L 発現が

50

不均一であるかまたは低い（CD62L^低）、ヒトまたは哺乳動物T細胞のサブセットを指す。セントラルメモリーT細胞の表面表現型には、TCR、CD3、CD127（IL-7R）、及びIL-15Rも含まれる。セントラルメモリーT細胞の転写因子には、Blimp1が含まれる。エフェクターメモリーT細胞は、インターフェロンガンマ、IL-4、及びIL-5を含む、抗原刺激後に高レベルの炎症性サイトカインを急速に分泌する。エフェクターメモリーT細胞は、血液中のCD8コンパートメントで優勢であり、ヒトでは肺、肝臓、及び腸において比例して濃縮される。CD8+エフェクターメモリーT細胞は、大量のパーフォリンを担持する。

【0397】

「閉鎖系」という用語は、外部環境に対して閉鎖されている系を指す。細胞培養法に適した任意の閉鎖系を、本発明の方法で用いることができる。閉鎖系には、例えば、密閉G容器が含まれるが、これに限定されない。腫瘍セグメントが閉鎖系に付加されると、TILを患者に投与する準備ができるまで、系は外部環境に開かれない。

10

【0398】

腫瘍を破壊するためのプロセスを説明するために本明細書で使用する「断片化すること」、「断片」、及び「断片化された」という用語は、腫瘍組織を破碎、スライス、分割、及び細切するなどの機械的断片化法、ならびに腫瘍組織の物理的構造を破壊するための任意の他の方法を含む。

【0399】

「末梢血単核細胞」及び「PBMC」という用語は、リンパ球（T細胞、B細胞、NK細胞）及び単球を含む、丸い核を有する末梢血細胞を指す。抗原提示細胞として使用される場合（PBMCは抗原提示細胞の一種である）、末梢血単核細胞は、好ましくは、照射された同種異系末梢血単核細胞である。

20

【0400】

「末梢血リンパ球」及び「PBL」という用語は、末梢血から拡張したT細胞を指す。いくつかの実施形態では、PBLは、ドナーからの全血またはアフエーシス産物から分離される。いくつかの実施形態では、PBLは、CD3+CD45+のT細胞表現型などのT細胞表現型の正または負の選択によって、ドナー由来の全血またはアフエーシス産物から分離される。

【0401】

「抗CD3抗体」という用語は、成熟T細胞のT細胞抗原受容体におけるCD3受容体に対するヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む、抗体またはそのバリエーション、例えば、モノクローナル抗体を指す。抗CD3抗体には、ムロモナブとしても知られるOKT-3が含まれる。抗CD3抗体には、T3及びCD3εとしても知られるUHC1クローンも含まれる。他の抗CD3抗体には、例えば、オテリキシズマブ、テプリズマブ、及びビシリズマブが含まれる。

30

【0402】

「OKT-3」（本明細書では「OKT3」とも称される）という用語は、成熟T細胞のT細胞抗原受容体におけるCD3受容体に対するヒト、ヒト化、キメラ、またはマウス抗体を含む、モノクローナル抗体またはそのバイオシミラーもしくはバリエーションを指し、市販の形態、例えば、OKT-3（30ng/mL、MACS GMP CD3 pure、Miltenyi Biotech, Inc., San Diego, CA, USA）及びムロモナブ、またはそれらのバリエーション、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、またはバイオシミラーを含む。ムロモナブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を表1に示す（配列番号1及び配列番号2）。OKT-3を産生することができるハイブリドーマは、American Type Culture Collectionに寄託され、ATCC受託番号CRL8001が割り当てられている。OKT-3を産生することができるハイブリドーマは、European Collection of Authenticated Cell Cultures（ECACC）にも寄託され、カタログ番号86022706が割り当てられている。

40

50

【 0 4 0 3 】

【 表 1 】

表 1. ムロモナブのアミノ酸配列 (例示的な O K T - 3 抗体)。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 1 ムロモナブ重鎖	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY INPSRGYTN	60
	NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVVYCARYY DDHYCLDYWG QGTTTLTVSSA	120
	KTTAPSVYPL APVCGGTGGS SVTLGCLVKG YFPEPVTLTW NSGSLSSGVH TFPAVLQSDL	180
	YTLSSSVTVT SSTWPSQSIT CNVAHPASST KVDKKIEPRP KSCDKTETCP PCPAPPELLGG	240
	PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN	300
	STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYCKKVSNKA LPAPIEKTTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE	360
	LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSGDSFFLY SKLTVDKSRW	420
	QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	450
配列番号 2 ムロモナブ軽鎖	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCASASSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAH	60
	FRSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG TKLEINRADT APTVSIFPPS	120
	SEQLTSGGAS VVCFLNNFYP KDINVKWKID GSERQNGVLN SWTDQDSKDS TYSMSSTLT	180
	TKDEYERHNS YTCEATHKTS TSPIVKGFNR NEC	213

10

【 0 4 0 4 】

「IL-2」(本明細書では「IL2」とも称される)という用語は、インターロイキン-2として知られるT細胞成長因子を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリエーションを含む、IL-2のすべての形態を含む。IL-2は、例えば、Nelson, J. Immunol. 2004, 172, 3983-88及びMalek, Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 453-79に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-2のアミノ酸配列を表2に示す(配列番号3)。例えば、IL-2という用語は、アルデスロイキン(PROLEUKIN、単回使用バイアル当たり2200万IUで複数の供給業者から市販されている)などのヒト組換えIL-2形態、ならびにCellGenix, Inc., Portsmouth, NH, USA (CELLGRO GMP)またはProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USAによって市販されている組換えIL-2形態(カタログ番号CYT-209-b)及び他のベンダーからの他の商用同等物を包含する。アルデスロイキン(デス-アラニル-1、セリン-125ヒトIL-2)は、およそ15kDaの分子量を有する非グリコシル化ヒト組換えIL-2形態である。本発明での使用に好適なアルデスロイキンのアミノ酸配列を表2に示す(配列番号4)。IL-2という用語はまた、ペグ化IL2プロドラッグベンパガルデスロイキン(NKTR-214、平均6個のリジン残基が[(2,7-ビス{[メチルポリ(オキシエチレン)]カルバモイル}-9H-フルオレン-9-イル)メトキシ]カルボニル)で置換されたN⁶である、配列番号4のようなペグ化ヒト組換えIL-2を含む、本明細書に記載のIL-2のペグ化形態も包含し、Nektar Therapeutics (South San Francisco, CA, USA)から入手可能であるか、または国際特許出願公開第WO2018/132496 A1号の実施例19に記載の方法、または米国特許出願公開第US2019/0275133 A1号の実施例1に記載の方法など、当該技術分野で知られている方法によって調製することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なベンパガルデスロイキン(NKTR-214)及び他のペグ化IL-2分子は、米国特許出願公開第US2014/0328791 A1号及び国際特許出願公開第WO2012/065086 A1号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適な複合化IL-2の代替形態は、米国特許第4,766,106号、同第5,206,344号、同第5,089,261号、及び同第4,902,502号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。本発明での使用に好適なIL-2の製剤は、米国特許第6,706,289号に記載されており、その開示は参照により本明細書

20

30

40

50

に組み込まれる。

【0405】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、Synthorx, Inc. から入手可能なTHOR-707である。本発明での使用に好適なTHOR-707及びIL-2の追加の代替形態の調製ならびに特性は、米国特許出願公開第US 2020/0181220 A1号及び同第US 2020/0330601 A1号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、単離及び精製IL-2ポリペプチドと、K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72、及びY107から選択されるアミノ酸位置で単離及び精製IL-2ポリペプチドに結合する複合部分と、を含む、インターロイキン2 (IL-2) 複合体であり、アミノ酸残基の番号付けは配列番号5に対応する。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72、及びY107から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、T37、R38、T41、F42、F44、Y45、E61、E62、E68、P65、V69、L72、及びY107から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、T37、T41、F42、F44、Y45、P65、V69、L72、及びY107から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、R38及びK64から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、E61、E62、及びE68から選択される。いくつかの実施形態では、アミノ酸位置は、E62である。いくつかの実施形態では、K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72、及びY107から選択されるアミノ酸残基は、リジン、システイン、またはヒスチジンにさらに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、システインに変異する。いくつかの実施形態では、アミノ酸残基は、リジンに変異する。いくつかの実施形態では、K35、T37、R38、T41、F42、K43、F44、Y45、E61、E62、E68、K64、P65、V69、L72、及びY107から選択されるアミノ酸残基は、非天然アミノ酸にさらに変異する。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、N6-アジドエトキシ-L-リジン (AzK)、N6-プロパルギルエトキシ-L-リジン (PraK)、BCN-L-リジン、ノルボルネンリジン、TCO-リジン、メチルテトラジンリジン、アリルオキシカルボニルリジン、2-アミノ-8-オキソノナン酸、2-アミノ-8-オキソオクタン酸、p-アセチル-L-フェニルアラニン、p-アジドメチル-L-フェニルアラニン (pAMF)、p-ヨード-L-フェニルアラニン、m-アセチルフェニルアラニン、2-アミノ-8-オキソノナン酸、p-プロパルギルオキシフェニルアラニン、p-プロパルギル-L-フェニルアラニン、3-メチル-L-フェニルアラニン、L-ドーパ、フッ素化フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、p-アジド-L-フェニルアラニン、p-アシル-L-フェニルアラニン、p-ベンゾイル-L-フェニルアラニン、p-プロモフェニルアラニン、p-アミノ-L-フェニルアラニン、イソプロピル-L-フェニルアラニン、O-アリルチロシン、O-メチル-L-チロシン、O-4-アリル-L-チロシン、4-プロピル-L-チロシン、ホスホノチロシン、トリ-O-アセチル-GlcNAc p-セリン、L-ホスホセリン、ホスホノセリン、L-3-(2-ナフチル)アラニン、2-アミノ-3-((2-((3-(ベンジルオキシ)-3-オキソプロピル)アミノ)エチル)セラニル)プロパン酸、2-アミノ-3-(フェニルセラニル)プロパン酸、またはセレノシステインを含む。いくつかの実施形態では、IL-2複合体は、野生型IL-2ポリペプチドと比較して、IL-2受容体 α (IL-2R α) サブユニットに対する減少した親和性を有する。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型IL-2ポリペプチドと比較して、IL-2R α に対する結合親和性の約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、または99%を超える減少である。いくつかの実施形態では、減少した親和性は、野生型IL-2ポリペプチドと比較して、約1倍、2倍、3倍、4

10

20

30

40

50

倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、30倍、50倍、100倍、200倍、300倍、500倍、1000倍以上である。いくつかの実施形態では、複合部分は、IL-2とIL-2R α との結合を損なうかまたは遮断する。いくつかの実施形態では、複合部分は、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、水溶性ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリ(プロピレングリコール)(PPG)、エチレングリコール及びプロピレングリコールのコポリマー、ポリ(オキシエチル化ポリオール)、ポリ(オレフィンアルコール)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリルアミド)、ポリ(ヒドロキシアルキルメタクリレート)、ポリ(サッカライド)、ポリ(α -ヒドロキシ酸)、ポリ(ビニルアルコール)、ポリホスファゼン、ポリオキサゾリン(POZ)、ポリ(N-アクリロイルモルホリン)、またはそれらの組み合わせを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、PEGを含む。いくつかの実施形態では、PEGは、直鎖状PEGまたは分岐状PEGである。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリサッカライドを含む。いくつかの実施形態では、ポリサッカライドは、デキストラン、ポリシアル酸(PSA)、ヒアルロン酸(HA)、アミロース、ヘパリン、ヘパランサルフェート(HS)、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン(HES)を含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、グリカンを含む。いくつかの実施形態では、水溶性ポリマーの各々は、独立して、ポリアミンを含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、アルブミン、トランスフェリン、またはトランスサイレチンを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、Fc部分を含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、IgGのFc部分を含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、タンパク質の各々は、独立して、XTENペプチド、グリシンリッチホモアミノ酸ポリマー(HAP)、PASポリペプチド、エラスチン様ポリペプチド(ELP)、CTPペプチド、またはゼラチン様タンパク質(GLK)ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、単離及び精製IL-2ポリペプチドは、グルタミル化によって修飾される。いくつかの実施形態では、複合部分は、単離及び精製IL-2ポリペプチドと直接的に結合される。いくつかの実施形態では、複合部分は、リンカーを介して単離及び精製されたIL-2ポリペプチドと間接的に結合される。いくつかの実施形態では、リンカーは、ホモ二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ホモ二官能性リンカーは、ロマンツ試薬ジチオビス(スクシンイミジルプロピオネート)DSP、3'-3'-ジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオネート)(DTSSP)、ジスクシンイミジルスベラート(DSS)、ビス(スルホスクシンイミジル)スベラート(BS)、ジスクシンイミジルタータラート(DST)、ジスルホスクシンイミジルタータラート(スルホDST)、エチレングリコビス(スクシンイミジルスクシネート)(EGS)、ジスクシンイミジルグルタラート(DSG)、N,N'-ジスクシンイミジルカーボナート(DSC)、ジメチルアジピミデート(DMA)、ジメチルピメリミデート(DMP)、ジメチルスベリミデート(DMS)、ジメチル-3,3'-ジチオビスプロピオンイミデート(DTBP)、1,4-ジ-(3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド)ブタン(DPDPB)、ビスマレイミドヘキサン(BMH)、ハロゲン化アリール含有化合物(DFDNB)、例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンまたは1,3-ジフルオロ-4,6-ジニトロベンゼン、4,4'-ジフルオロ-3,3'-ジニトロフェニルスルホン(DFDNPS)、ビス-[β -(4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィド(BASED)、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、1,4-ブタンジオールジグリシジルエーテル、アジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、o-トルイジン、3,3'-ジメチルベンジジン、ベンジジン、 α , α' -p-ジアミノジフェニル、ジヨード-p-キシレンスルホン酸、N,N'-エチレン-ビス(ヨードアセトアミド)、またはN,N'

10

20

30

40

50

-ヘキサメチレンビス(ヨードアセトアミド)を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーを含む。いくつかの実施形態では、ヘテロ二官能性リンカーは、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(sPDP)、長鎖N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(LC-sPDP)、水溶性長鎖N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(スルホ-LC-sPDP)、スクシンイミジロキカルボニル- α -メチル- α -(2-ピリジルジチオ)トルエン(sMPT)、スルホスクシンイミジル-6-[α -メチル- α -(2-ピリジルジチオ)トルアミド]ヘキサノエート(スルホ-LC-sMPT)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート(sMCC)、スルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシレート(スルホ-sMCC)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MB)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスルホスクシンイミドエステル(スルホ-MB)、N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(sIAB)、スルホスクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(スルホ-sIAB)、スクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(sMPB)、スルホスクシンイミジル-4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート(スルホ-sMPB)、N-(γ -マレイミドブチリルオキシ)スクシンイミドエステル(GMB)、N-(γ -マレイミドブチリルオキシ)スルホスクシンイミドエステル(スルホ-GMB)、スクシンイミジル6-((ヨードアセチル)アミノ)ヘキサノエート(sIAX)、スクシンイミジル6-[6-((ヨードアセチル)アミノ)ヘキサノイル)アミノ]ヘキサノエート(sLAXX)、スクシンイミジル4-((ヨードアセチル)アミノ)メチルシクロヘキサノ-1-カルボキシレート(sIAC)、スクシンイミジル6-((((4-ヨードアセチル)アミノ)メチル)シクロヘキサノ-1-カルボニル)アミノ)ヘキサノエート(sIACX)、p-ニトロフェニルヨードアセテート(NPIA)、カルボニル反応性及びスルフヒドリル反応性架橋剤、例えば、4-(4-N-マレイミドフェニル)酪酸ヒドラジド(MPBH)、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサノ-1-カルボキシルヒドラジド-8(M2C2H)、3-(2-ピリジルジチオ)プロピオニルヒドラジド(PDPH)、N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸(NHs-AsA)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸(スルホ-NHs-AsA)、スルホスクシンイミジル-

(4-アジドサリチルアミド)ヘキサノエート(スルホ-NHs-LC-AsA)、スルホスクシンイミジル-2-(p-アジドサリチルアミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオネート(sAsD)、N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート(HsAB)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート(スルホ-HsAB)、N-スクシンイミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート(sANPAH)、スルホスクシンイミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート(スルホ-sANPAH)、N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド(ANB-NO)、スルホスクシンイミジル-2-(m-アジド-o-ニトロベンズアミド)-エチル-1,3'-ジチオプロピオネート(sAND)、N-スクシンイミジル-4-(4-アジドフェニル)1,3'-ジチオプロピオネート(sADP)、N-スルホスクシンイミジル(4-アジドフェニル)-1,3'-ジチオプロピオネート(スルホ-sADP)、スルホスクシンイミジル4-(p-アジドフェニル)ブチレート(スルホ-sAPB)、スルホスクシンイミジル2-(7-アジド-4-メチルクマリン-3-アセトアミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオネート(sAED)、スルホスクシンイミジル7-アジド-4-メチルクマリン-3-アセテート(スルホ-sAMCA)、p-ニトロフェニルジアゾピルベート(pNPDP)、p-ニトロフェニル-2-ジアゾ-3,3,3-トリフルオロプロピオネート(PNP-DTP)、1-(p-アジドサリチルアミド)-4-(ヨードアセトアミド)ブタン(AsIB)、N-[4-(p-アジドサリチルアミド)ブチル]-3'-(2'-ピリジル

ジチオ) プロピオンアミド (APDP)、ベンゾフェノン-4-ヨードアセトアミド、p-アジドベンゾイルヒドラジド (ABH)、4-(p-アジドサリチルアミド) ブチルアミン (AsBA)、またはp-アジドフェニルグリオキサール (APG) を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択でジペプチドリナーを含む、切断可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、ジペプチドリナーは、Val-Cit、Phe-Lys、Val-Ala、またはVal-Lysを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、切断不可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意選択で、マレイミドカプロイル (mc)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (sMCC)、またはスルホスクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (スルホ-sMCC) を含むマレイミド基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、スパーサーをさらに含む。いくつかの実施形態では、スパーサーは、p-アミノベンジルアルコール (PAB)、p-アミノベンジルオキシカルボニル (PABC)、その誘導体、または類似体を含む。いくつかの実施形態では、複合部分は、IL-2 複合体の血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、追加の複合部分は、IL-2 複合体の血清半減期を延長することができる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適な IL-2 形態は、本明細書に記載の IL-2 形態のうちのいずれかの断片である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適な IL-2 形態は、米国特許出願公開第 US 2020/0181220 A1 号及び米国特許出願公開第 US 2020/0330601 A1 号に開示されているようにペグ化されている。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適な IL-2 形態は、ポリエチレングリコール (PEG) を含む複合部分に共有結合した N6-アジドエトキシー-リジン (AzK) を含む IL-2 ポリペプチドを含む、IL-2 複合体であり、IL-2 ポリペプチドは、配列番号 5 と少なくとも 80% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、AzK は、配列番号 5 内のアミノ酸位置に関して、K35 位、F42 位、F44 位、K43 位、E62 位、P65 位、R38 位、T41 位、E68 位、Y45 位、V69 位、または L72 位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、IL-2 ポリペプチドは、配列番号 5 に対して 1 残基の N 末端欠失を含む。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適な IL-2 形態は、IL-2 R アルファ鎖会合を欠いているが、中間親和性 IL-2 R ベータ-ガンマシグナル伝達複合体との正常な結合を保持している。

10

20

30

40

50

【0406】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適な IL-2 形態は、ポリエチレングリコール (PEG) を含む複合部分に共有結合した N6-アジドエトキシー-リジン (AzK) を含む IL-2 ポリペプチドを含む、IL-2 複合体であり、IL-2 ポリペプチドは、配列番号 5 と少なくとも 90% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、AzK は、配列番号 5 内のアミノ酸位置に関して、K35 位、F42 位、F44 位、K43 位、E62 位、P65 位、R38 位、T41 位、E68 位、Y45 位、V69 位、または L72 位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適な IL-2 形態は、ポリエチレングリコール (PEG) を含む複合部分に共有結合した N6-アジドエトキシー-リジン (AzK) を含む IL-2 ポリペプチドを含む、IL-2 複合体であり、IL-2 ポリペプチドは、配列番号 5 と少なくとも 95% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、AzK は、配列番号 5 内のアミノ酸位置に関して、K35 位、F42 位、F44 位、K43 位、E62 位、P65 位、R38 位、T41 位、E68 位、Y45 位、V69 位、または L72 位でアミノ酸を置換する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適な IL-2 形態は、ポリエチレングリコール (PEG) を含む複合部分に共有結合した N6-アジドエトキシー-リジン (AzK) を含む IL-2 ポリペプチドを含む、IL-2 複合体であり、IL-2 ポリペプチドは、配列番号 5 と少なくとも 98% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、AzK は、配列番号 5 内のアミノ酸位置に関して、K35 位、F42 位、F44 位、K43 位、E62 位、P65 位、R38 位、T41 位、E68 位、Y45 位、V69 位、または L72 位でアミノ酸を置換する。

【0407】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適な IL-2 形態は、ALKS-4230（配列番号6）としても知られるネムバロイキンアルファであり、Alkermes, Inc. から入手可能である。ネムバロイキンアルファは、ペプチジルリンカー（⁶⁰GG⁶¹）を介してヒトインターロイキン2断片（62-132）と融合し、ペプチジルリンカー（¹³³GS¹³⁸GGGS¹³⁸）を介してヒトインターロイキン2受容体α鎖断片（139-303）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で産生され、グリコシル化されている、ヒトインターロイキン2断片（1-59）、バリエント（Cys¹²⁵>Ser⁵¹）；G₂ペプチドリンカー（60-61）を介してヒトインターロイキン2（IL-2）（4-74）-ペプチド（62-132）と融合し、GS₃SP₃ペプチドリンカー（133-138）を介してヒトインターロイキン2受容体α鎖（IL2Rサブユニットアルファ、IL2Rα、IL2RA）（1-165）-ペプチド（139-303）と融合し、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞で産生され、アルファグリコシル化されている、ヒトインターロイキン2（IL-2）（75-133）-ペプチド[Cys¹²⁵（51）>Ser]-変異体（1-59）としても知られている。ネムバロイキンアルファのアミノ酸配列は、配列番号6に示されている。いくつかの実施形態では、ネムバロイキンアルファは、以下の翻訳後修飾を示す：以下の位置でのジスルフィド架橋：31-116、141-285、184-242、269-301、166-197、または166-199、168-199または168-197（配列番号6の番号付けを使用する）、及び以下の位置でのグリコシル化部位：配列番号6の番号付けを使用する、N187、N206、T212。ネムバロイキンアルファの調製及び特性、ならびに本発明での使用に好適な追加の代替形態のIL-2は、米国特許出願公開第2021/0038684 A1号及び米国特許第10,183,979号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、配列番号6と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも90%の配列同一性を有するタンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、配列番号6で示されるアミノ酸配列またはその保存的アミノ酸置換を有する。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、配列番号7のアミノ酸24~452、またはそのバリエント、断片、もしくは誘導体を含む融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、配列番号7のアミノ酸24~452と少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列、またはそのバリエント、断片、もしくは誘導体を含む融合タンパク質である。本発明での使用に好適な他のIL-2形態は、米国特許第10,183,979号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。任意選択で、いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適なIL-2形態は、ムチンドメインポリペプチドリンカーによって第2の融合パートナーと連結された第1の融合パートナーを含む融合タンパク質であり、第1の融合パートナーは、IL-1Rα、またはIL-1Rαと少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有し、IL-1Rαの受容体アンタゴニスト活性を有するタンパク質であり、第2の融合パートナーは、Fc領域を含む免疫グロブリンの全部または一部を含み、ムチンドメインポリペプチドリンカーは、配列番号8、または配列番号8と少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、融合タンパク質の半減期は、ムチンドメインポリペプチドリンカーの非存在下での第2の融合パートナーとの第1の融合パートナーの融合と比較して改善される。

【0408】

10

20

30

40

50

【表 2】

表 2. インターロイキンのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 3 組換えヒト IL-2 (rhIL-2)	MAPTSSSTKK TQLQLEHLLL DLQMILNGIN NYKNPKLTRM LTFKFYMPKK ATELKHLQCL EELKPLEEV LNAQSKNFH LRPDLISNI NVIVLELKGS ETTFMCEYAD ETATVEFLN RWITFCQSI STLT	60 120 134
配列番号 4 アルデスロイキン	PTSSTTKKTQ LQLEHLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
配列番号 5 IL-2 形態	APTSSSTKKT QLEHLLLDL LQMILNGINN YKNPKLTRML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVLN LAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGE TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT	60 120 133
配列番号 6 ネムバロイキン アルファ	SKNFHLRPRD LISNINVIVL ELKGETTFM CEYADETATI VFELNRWITF SQSIISTLTG GSSSTTKKTQ LQLEHLLDLQ MILNGINNYK NPKLTRMLTF KFYMPKKATE LKHLQCLEEB LKPLEEVLNL AQQSGGGSEL CDDDPPEIPH ATPKAMAYKE GTMLNCECKR GFRRKSGSL YMLCTGNSSH SSWDNQCQCT SSATRNNTKQ VTPQPEEQKE RKTTEMQSPM QPVDQASLPG HCREPPPWEN EATERIYHFV VGQMVYYQCV QGYRALHRGP AESVCKMTHG KTRWTQPQLI CTG	60 120 180 240 300 303
配列番号 7 IL-2 形態	MDAMKRLGCC VLLCGAVFV SARRPSGRKS SKMQAFRIWD VNQKTFYLRN NQLVAGYLQG PNVNLEEKID VVPIEPHALF LGIHGGKMCL SCVKSGDETR LQLEAVNITD LSENKQDKR FAFIRSDSGP TTSFESAACP GWFLCTAMEA DQPVSLTNMP DEGVMTKEY FQEDSGSGG ASSESSASSD GPHPVITESR ASSESSASSD GPHPVITESR EPKSSDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN KKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKQPRE PQVYTLPPSR EMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLSDSGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALENH YTQKSLSLSP GK	60 120 180 240 300 360 420 452
配列番号 8 ムチンドメイン ポリペプチド	SESSASSDGP HPVITP	16
配列番号 9 組換えヒト IL-4 (rhIL-4)	MHKCDITLQE IIKTLNSLTE QKTLCTELTV TDIFAASKNT TEKETFCRAA TVLRQFYSHH EKDTRCLGAT AQQFHRHKQL IRFLKRLDRN LWGLAGLNSC PVKEANQSTL ENFLERLKTI MREKYSKCSS	60 120 130
配列番号 10 組換えヒト IL-7 (rhIL-7)	MDCDIEGKDG KYESVLMVS IDQLDSMKE IGSNCLNNEF NFFKRHICDA NKEGMELFRA ARKLRQLKM NSTGDFDLHL LKVSEGTIL LNCTGQVKGR KPAALGEAQP TKSLEENKSL KEQKKLNDLC FLKRLLEIK TCWNKILMGT KEH	60 120 153
配列番号 11 組換えヒト IL-15 (rhIL-15)	MNWVNVISDL KKIEDLIQSM HIDATLYTES DVHPSCKVTA MKCFLELQV ISLESGDASI HDTVENLIIL ANNSLSSNGN VTESGCKECE BLEEKNIKEF LQSFVHVHQM FINTS	60 115
配列番号 12 組換えヒト IL-21 (rhIL-21)	MQDRHMIRMRL QLIDIVDLK NYVNDLVPEF LPAPEDVETN CEWSAFSCFQ KAQLKSANTG NNERIINVSI KKLKRKPST NAGRRQKERL TCPSCDSYBK KPPKEFLERF KSLLOKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

【0409】

いくつかの実施形態では、本発明での使用に好適な IL-2 形態は、相補性決定領域 HCDR1、HCDR2、HCDR3 を含む、重鎖可変領域 (V_H) と、LCDR1、LCDR2、LCDR3 を含む軽鎖可変領域 (V_L) と、V_H または V_L の CDR に移植された IL-2 分子またはその断片と、を含む抗体サイトカイン移植タンパク質を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性 T 細胞よりも T エフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域 HCDR1、HCDR2、HCDR3 を含む、重鎖可変領域 (V_H) と、LCDR1、LCDR2、LCDR3 を含む軽鎖可変領域 (V_L) と、V_H または V_L の CDR に移植された IL-2 分子またはその断片と、を含み、IL-2 分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性 T 細胞よりも T エフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、IL-2 レジメンは、米国特許出願公開第 2020/0270334 A1 号に記載されている抗体の投与を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域 HCDR1、HCDR2、HCDR3 を含む、重鎖可変領域 (V_H) と、LCDR1、LCDR2、LCDR3 を含む軽鎖可変領域 (V_L) と、V_H または V_L の CDR

Rに移植されたI L-2分子またはその断片と、を含み、I L-2分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性T細胞よりもTエフェクター細胞を優先的に拡張させ、抗体は、配列番号39を含むI g Gクラス軽鎖及び配列番号38を含むI g Gクラス重鎖、配列番号37を含むI g Gクラスの軽鎖及び配列番号29を含むI g Gクラスの重鎖、配列番号39を含むI g Gクラス軽鎖及び配列番号29を含むI g Gクラス重鎖、配列番号37を含むI g Gクラス軽鎖及び配列番号38を含むI g Gクラス重鎖からなる群から選択されるI g Gクラスの重鎖及びI g Gクラスの軽鎖をさらに含む。

【0410】

いくつかの実施形態では、I L-2分子またはその断片は、V_HのHCDR1に移植され、I L-2分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、I L-2分子またはその断片は、V_HのHCDR2に移植され、I L-2分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、I L-2分子またはその断片は、V_HのHCDR3に移植され、I L-2分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、I L-2分子またはその断片は、V_LのLCDR1に移植され、I L-2分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、I L-2分子またはその断片は、V_LのLCDR2に移植され、I L-2分子は、ムテインである。いくつかの実施形態では、I L-2分子またはその断片は、V_LのLCDR3に移植され、I L-2分子は、ムテインである。

10

【0411】

I L-2分子の挿入は、CDRのN末端領域もしくはその近く、CDRの中間領域、またはCDRのC末端領域もしくはその近くであり得る。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、CDRに組み込まれたI L-2分子を含み、I L-2配列はCDR配列をフレームシフトしない。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、CDRに組み込まれたI L-2分子を含み、I L-2配列はCDR配列のすべてまたは一部を置き換える。I L-2分子による置き換えは、CDRのN末端領域、CDRの中間領域、またはCDRのC末端領域もしくはその近くであり得る。I L-2分子による置き換えは、CDR配列のわずか1個もしくは2個のアミノ酸、またはCDR配列全体であり得る。

20

【0412】

いくつかの実施形態では、I L-2分子は、ペプチドリンカーなしで、CDR配列とI L-2配列との間に追加のアミノ酸なしで、CDRに直接的に移植される。いくつかの実施形態では、I L-2分子は、ペプチドリンカーを用いて、CDR配列とI L-2配列との間に1つ以上の追加のアミノ酸を伴って、CDRに間接的に移植される。

30

【0413】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のI L-2分子は、I L-2ムテインである。いくつかの事例では、I L-2ムテインは、R67A置換を含む。いくつかの実施形態では、I L-2ムテインは、配列番号14または配列番号15のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、I L-2ムテインは、米国特許出願公開第US2020/0270334 A1号の表1のアミノ酸配列を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0414】

いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号16、配列番号19、配列番号22及び配列番号25からなる群から選択されるHCDR1を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号7、配列番号10、配列番号13及び配列番号16からなる群から選択されるHCDR1を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号17、配列番号20、配列番号23、及び配列番号26からなる群から選択されるHCDR2からなる群から選択されるHCDR1を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号18、配列番号21、配列番号24、及び配列番号27からなる群から選択されるHCDR3を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号28のアミノ酸配列を含むV_H領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイ

40

50

トカイン移植タンパク質は、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 36 のアミノ酸配列を含む V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 28 のアミノ酸配列を含む V_H 領域及び配列番号 36 のアミノ酸配列を含む V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 29 のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号 39 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 38 のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号 37 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 38 のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号 39 のアミノ酸配列を含む軽鎖領域を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、米国特許出願公開第 2020/0270334 A 1 号の IgG・IL2F71A・H1 もしくは IgG・IL2R67A・H1、またはそのバリエーション、誘導体、もしくは断片、またはその保存的アミノ酸置換体、またはそれと少なくとも 80%、少なくとも 90%、少なくとも 95%、または少なくとも 98% の配列同一性を有するタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質の抗体成分は、免疫グロブリン配列、フレームワーク配列、またはパブリズマブの CDR 配列を含む。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、アルデスロイキンまたは同等の分子などであるがこれらに限定されない野生型 IL-2 分子よりも長い血清半減期を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、表 3 に記載される配列を有する。

10

20

【0415】
【表 3-1】

表 3：例示的なパブリズマブ抗体-I L-2 移植タンパク質の配列

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 13 IL-2	MYRMQLLS CI ALSLALVTNS APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML 60 TFKFYMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE 120 TTFMCEYADE TATIVEFLNR WITFCQSIIS TLT 153
配列番号 14 IL-2 ムテイン	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133
配列番号 15 IL-2 ムテイン	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTRML TAKFYMPKKA TELKHLQCLE 60

30

40

50

【表 3 - 2】

	EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLT 133	
配列番号 16 HCDR1_IL-2	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEBELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINIVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMSVG 145 DIWDDKKDY NPSLKS 16	
配列番号 17 HCDR2	SMITNWFYDV 10	
配列番号 18 HCDR3		
配列番号 19 HCDR1_IL-2 カバット	APTSSSTKKT QLQLEHLLLD LQMILNGINN YKNPKLTAML TFKFYMPKKA TELKHLQCLE 60 EELKPLEEVL NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLELKGSE TTFMCEYADE TATIVEFLNR 120 WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G 141 DIWDDKKDY NPSLKS 16	
配列番号 20 HCDR2 カバット	SMITNWFYDV 10	
配列番号 21 HCDR3 カバット		
配列番号 22 HCDR1_IL-2 クロチア	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEBELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINIVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM 142 WDDK 5	
配列番号 23 HCDR2 クロチア	SMITNWFYDV 10	
配列番号 24 HCDR3 クロチア		
配列番号 25 HCDR1_IL-2 IMGT	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMILN GINNYKNPKL TMLTFKFYM PKKATELKHL 60 QCLEEBELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINIVIVLEL KGSETTFMCE YADETATIVE 120 FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS 143 IWWDDKK 7	
配列番号 26 HCDR2 IMGT	ARSMITNWFY DV 12	
配列番号 27 HCDR3 IMGT		
配列番号 28 V _H	QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLLDL QMILNGINNY 60 KNPKLTAML FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV 120 IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL 180 EWLADIWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWFY 240 DVWGAGTTVT VSS 253 QMILNGINNY KNPCLTAML FKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR 60 PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG 120 WIRQPPGKAL EWLADIWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC 180 ARSMITNWFY DVWGAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV 240 TVSWNSGALT SGVHTFPAVL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDKR 300 VEPKSCDKTH TCPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTEVTCVVV AVSHEDPEVK 360 FNWYVDGVEV HNAKTKPRE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK 420 TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT 480 PEVLDSGDSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSMHEALHN HYTQKSLSLS PGK 533 KAQLSVGYMH 10	
配列番号 29 重鎖		
配列番号 30 LCDR1 カバット	DTSKLAS	7
配列番号 31 LCDR2 カバット		
配列番号 32 LCDR3 カバット	FQSGGYPFT 9	
配列番号 33 LCDR1 クロチア	QLSVGY	6
配列番号 34 LCDR2 クロチア	DTS	3

10

20

30

40

50

【表 3 - 3】

配列番号 35 LCDR3 クロチア	GSQYFF	6
配列番号 36 Vi	DIQMTQSPST LSASVGRVT ITCKAQLSVG YMHYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIK 106	60
配列番号 37 軽鎖	DIQMTQSPST LSASVGRVT ITCKAQLSVG YMHYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLT SKADYEKKHV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213	60 120 180
配列番号 38 軽鎖	QVTLRESGPA LVKPTQTTLT TCTFSGFSLA PTSSSTKKTQ LQLEHLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT AKFYMPKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL EWLADIWDD KKDYNPSLKS RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYVC ARSMITNWYF DVGWAGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVHTFPAYL QSSGLYSLSS VVTVPSSSLG TQTYICNVNH KPSNTKVDRK VEPKSCDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV AVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALAAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQGNVFS CSVMHEALHN HVTQKSLSL PGK 583	60 120 180 240 300 360 420 480 540
配列番号 39 軽鎖	DIQMTQSPST LSASVGRVT ITCKAQLSVG YMHYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLT SKADYEKKHV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213	60 120 180

10

30

40

50

【0416】

「IL-4」（本明細書では「IL4」とも称される）という用語は、インターロイキン4として知られるサイトカインを指し、これは、Th2 T細胞、ならびに好酸球、好塩基球、及び肥満細胞によって産生される。IL-4は、ナイーブヘルパーT細胞（Th0細胞）からTh2 T細胞への分化を調節する。Steinke and Borish, Respir. Res. 2001, 2, 66-70。IL-4によって活性化されると、Th2 T細胞は、その後、正のフィードバックループで追加のIL-4を産生する。IL-4は、B細胞増殖及びクラスII MHC発現も刺激し、B細胞からのIgE及びIgG₁発現へのクラス切り替えを誘導する。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-4は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA（カタログ番号CYT-211）及びThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA（ヒトIL-15組換えタンパク質、カタログ番号Gibco CTP0043）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-4のアミノ酸配列を表2に示す（配列番号9）。

【0417】

「IL-7」（本明細書では「IL7」とも称される）という用語は、インターロイキン7として知られるグリコシル化組織由来のサイトカインを指し、これは、間質細胞及び上皮細胞、ならびに樹状細胞から得ることができる。Fry and Mackall, Blood 2002, 99, 3892-904。IL-7は、T細胞の発達を刺激することができる。IL-7は、IL-7受容体アルファ及び共通ガンマ鎖受容体からなるヘテロ二量体であるIL-7受容体に結合し、これは、胸腺内でのT細胞発生及び末梢内での生存に重要な一連のシグナルである。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-7は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA（カタログ番号CYT-254）及びThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA（ヒトIL-15組換えタンパク質、カタログ番号Gibco PHC0071）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-7のアミノ酸配列を表2に示す（配列番号10）。

【0418】

「IL-15」（本明細書では「IL15」とも称される）という用語は、インターロイキン-15として知られるT細胞成長因子を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミ

ノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリエーションを含む、IL-2のすべての形態を含む。IL-15は、例えば、Fehniger and Caligiuri, Blood 2001, 97, 14-32に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。IL-15は、 β 及び γ シグナル伝達受容体サブユニットをIL-2と共有する。組換えヒトIL-15は、12.8 kDaの分子量を有する114個のアミノ酸（及びN末端メチオニン）を含む単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組換えヒトIL-15は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA（カタログ番号CYT-230-b）及びThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA（ヒトIL-15組換えタンパク質、カタログ番号34-8159-82）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-15のアミノ酸配列を表2に示す（配列番号11）。

10

【0419】

「IL-21」（本明細書では「IL21」とも称される）という用語は、インターロイキン-21として知られる多面発現性サイトカインタンパク質を指し、ヒト及び哺乳動物形態、保存的アミノ酸置換物、グリコフォーム、バイオシミラー、及びバリエーションを含む、IL-21のすべての形態を含む。IL-21は、例えば、Spolski and Leonard, Nat. Rev. Drug. Disc. 2014, 13, 379-95に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。IL-21は、主にナチュラルキラーT細胞及び活性化ヒトCD4⁺T細胞によって産生される。組換えヒトIL-21は、15.4 kDaの分子量を有する132個のアミノ酸を含む単一の非グリコシル化ポリペプチド鎖である。組換えヒトIL-21は、ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., East Brunswick, NJ, USA（カタログ番号CYT-408-b）及びThermoFisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA（ヒトIL-21組換えタンパク質、カタログ番号14-8219-80）を含む、複数の供給業者から市販されている。本発明での使用に好適な組換えヒトIL-21のアミノ酸配列を表2に示す（配列番号21）。

20

【0420】

「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」が示される場合、投与される本発明の組成物の正確な量は、患者（対象）の年齢、体重、腫瘍サイズ、感染または転移の程度、及び健康状態の個人差を考慮して、医師によって決定され得る。一般に、本明細書に記載される腫瘍浸潤リンパ球（例えば、二次TILまたは遺伝子改変された細胞傷害性リンパ球）は、体重1 kg当たり $10^4 \sim 10^{11}$ 細胞（例えば、体重1 kg当たり $10^5 \sim 10^6$ 、 $10^5 \sim 10^{10}$ 、 $10^5 \sim 10^{11}$ 、 $10^6 \sim 10^{10}$ 、 $10^6 \sim 10^{11}$ 、 $10^7 \sim 10^{11}$ 、 $10^7 \sim 10^{10}$ 、 $10^8 \sim 10^{11}$ 、 $10^8 \sim 10^{10}$ 、 $10^9 \sim 10^{11}$ 、または $10^9 \sim 10^{10}$ 細胞）（それらの範囲内のすべての整数値を含む）の投与量で投与され得る。TIL（場合によっては、遺伝子修飾細胞傷害性リンパ球を含む）組成物もまた、これらの投与量で複数回投与され得る。腫瘍TIL（場合によっては、遺伝子操作されたTILを含む）は、免疫療法で一般的に知られている注入技法を使用することによって投与することができる（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 1988, 319, 1676を参照）。特定の患者に最適な投薬量及び治療レジーム（regime）は、患者を疾患の兆候について監視し、適宜に治療を調整することによって、医学分野の技術者によって容易に決定され得る。

30

40

【0421】

「血液学的悪性腫瘍」、「血液系悪性腫瘍」という用語または関連する意味の用語は、血液、骨髓、リンパ節、及びリンパ系の組織を含むが、これらに限定されない、哺乳動物の造血組織及びリンパ組織のがん及び腫瘍を指す。血液学的悪性腫瘍は、「液体腫瘍」とも称される。血液学的悪性腫瘍には、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、慢性リンパ性リンパ腫（CLL）、小リンパ球性リンパ腫（SLL）、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）、多発性骨髓腫、急性単球性白血病（AMoL）、ホジキン

50

リンパ腫、及び非ホジキンリンパ腫が含まれ得るが、これらに限定されない。「B細胞血液学的悪性腫瘍」という用語は、B細胞を冒す血液学的悪性腫瘍を指す。

【0422】

「液体腫瘍」という用語は、本来流体である異常な細胞塊を指す。液体腫瘍癌には、白血病、骨髄腫、及びリンパ腫、ならびに他の血液学的悪性腫瘍が含まれるが、これらに限定されない。液体腫瘍から取得されたTILは、本明細書では骨髄浸潤リンパ球(MIL)とも称され得る。末梢血中で循環する液体腫瘍を含む液体腫瘍から得られるTILは、本明細書ではPBLとも称され得る。MIL、TIL、及びPBLという用語は、本明細書で互換的に使用され、細胞が由来する組織タイプに基づいてのみ異なる。

【0423】

本明細書で使用される「微小環境」という用語は、全体としての固形もしくは血液学的腫瘍微小環境、または微小環境内の細胞の個々のサブセットを指し得る。本明細書で 사용되는腫瘍微小環境は、Swartz, et al., Cancer Res., 2012, 72, 2473に記載されるように、「腫瘍性形質転換を促進し、腫瘍成長及び浸潤を支持し、腫瘍を宿主免疫から保護し、治療抵抗性を助長し、かつ優勢な転移を成功させるニッチを提供する、細胞、可溶性因子、シグナル伝達分子、細胞外マトリックス、及び機械的手がかり」の複合混合物を指す。腫瘍はT細胞によって認識されるべき抗原を発現するが、微小環境による免疫抑制のため、免疫系による腫瘍クリアランスはまれである。

【0424】

いくつかの実施形態では、本発明は、TIL集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本発明によるTILの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、TIL集団が提供され得、患者は、本発明によるTILの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド60mg/kg/日で2日間(TIL注入の27日前及び26日前)、ならびにフルダリン25mg/m²/日で5日間(TIL注入の27日前～23日前)である。いくつかの実施形態では、本発明による骨髄非破壊的化学療法及びTIL注入(0日目)後、患者は、生理学的許容範囲まで8時間毎に720,000IU/kgでIL-2の静脈内注入を受ける。

【0425】

実験的発見は、腫瘍特異的Tリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、制御性T細胞及び免疫系の競合要素(「サイトカインシンク」)を排除することによって治療有効性を増強する上で重要な役割を果たすことを示す。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本発明のTILを導入する前に、患者に対してリンパ球枯渇ステップ(「免疫抑制コンディショニング」と称されることもある)を利用する。

【0426】

「有効量」または「治療有効量」という用語は、疾患治療を含むが、これに限定されない、意図された用途を達成するのに十分である、本明細書に記載の化合物または化合物の組み合わせの量を指す。治療有効量は、意図される用途(インビトロもしくはインビボ)、または治療される対象及び病状(例えば、対象の体重、年齢、及び性別)、病状の重症度、または投与方法に応じて異なり得る。この用語は、標的細胞において特定の応答(例えば、血小板粘着及び/または細胞遊走の低減)を誘導する用量にも適用される。特定の用量は、選択された特定の化合物、従うべき投薬レジメン、化合物が他の化合物と組み合わせて投与されるか、投与のタイミング、それが投与される組織、及び化合物が運ばれる物理的送達系に応じて異なる。

【0427】

「治療」、「治療すること」、「治療する」などの用語は、所望の薬理学的及び/または生理学的効果を得ることを指す。その効果は、その疾患または症状を完全にまたは部分的に予防するという観点において予防的であり得、及び/または疾患及び/またはその疾患に起因する副作用の部分的または完全な治療という観点において治療的であり得る。「治療」は、本明細書で 사용되는場合、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を

10

20

30

40

50

包含し、(a) 疾患にかかりやすい可能性があるが、まだ疾患を有すると診断されていない対象に疾患が生じるのを予防すること、(b) 疾患を抑制すること、すなわち、その発症または進行を抑止すること、及び(c) 疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退行を引き起こし、及び／または1つ以上の疾患症状を軽減することを含む。「治療」は、疾患または状態がない場合でさえも、薬理学的効果を提供するための薬剤の送達を包含するようにも意図されている。例えば、「治療」は、病状がない場合、例えば、ワクチンの場合に免疫応答を誘発するか、または免疫を与えることができる組成物の送達を包含する。

【0428】

「異種」という用語は、核酸またはタンパク質の一部に関して使用される場合、核酸またはタンパク質が、自然界では互いに同じ関係では見出されない2つ以上の部分配列を含むことを示す。例えば、核酸は、典型的には、組換え的に産生され、新たな機能的核酸、例えば、ある供給源からのプロモーター及び別の供給源からのコード領域、または異なる供給源からのコード領域を作製するように配置された無関係の遺伝子由来の2つ以上の配列を有する。同様に、異種タンパク質は、そのタンパク質が、自然界では互いに同じ関係では見出されない2つ以上の部分配列を含むことを示す（例えば、融合タンパク質）。

【0429】

2つ以上の核酸またはポリペプチドの文脈における「配列同一性」、「同一性パーセント」と、及び「配列同一性パーセント」（もしくはそれらの同義語、例えば「99%同一」という用語は、同じであるか、または配列同一性の一部としていかなる保存的アミノ酸置換も考慮せずに、最大一致のために比較し整列させた場合（必要に応じてギャップを導入する）、特定のパーセンテージの同じヌクレオチドもしくはアミノ酸残基を有する2つ以上の配列または部分配列を指す。同一性パーセントは、配列比較ソフトウェアもしくはアルゴリズムを使用して、または目視検査によって測定することができる。アミノ酸またはヌクレオチド配列のアラインメントを取得するために使用され得る様々なアルゴリズム及びソフトウェアが当該技術分野で知られている。配列同一性パーセントの決定に好適なプログラムには、例えば、米国政府の国立生物工学情報センターのBLASTウェブサイトから入手可能なBLASTプログラム一式が含まれる。2つの配列間の比較は、BLASTNまたはBLASTPアルゴリズムのいずれかを使用して実行することができる。BLASTNは、核酸配列を比較するために使用され、BLASTPは、アミノ酸配列を比較するために使用される。DNASTARから入手可能なALIGN、ALIGN-2（Genentech, South San Francisco, California）、またはMegAlignは、配列を整列させるために使用することができる追加の公的に入手可能なソフトウェアプログラムである。当業者であれば、特定のアラインメントソフトウェアによって最大アラインメントに適切なパラメータを決定することができる。ある特定の実施形態では、アラインメントソフトウェアのデフォルトパラメータが使用される。

【0430】

本明細書で使用される場合、「バリエント」という用語は、参照抗体のアミノ酸配列内または隣接する特定の位置における1つ以上の置換、欠失、及び／または付加により参照抗体のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む抗体または融合タンパク質を包含するが、これらに限定されない。バリエントは、参照抗体のアミノ酸配列と比較して、そのアミノ酸配列に1つ以上の保存的置換を含み得る。保存的置換は、例えば、同様に荷電したまたは非荷電のアミノ酸の置換を含み得る。バリエントは、参照抗体の抗原に特異的に結合する能力を保持している。バリエントという用語は、ペグ化抗体またはタンパク質も含む。

【0431】

本明細書における「腫瘍浸潤リンパ球」または「TIL」とは、対象の血流を離れて腫瘍に移動した白血球として最初に取得された細胞の集団を意味する。TILには、CD8⁺細胞傷害性T細胞（リンパ球）、Th1及びTh17 CD4⁺T細胞、ナチュラルキラー細胞、樹状細胞、ならびにM1マクロファージが含まれるが、これらに限定されない

10

20

30

40

50

。T I Lには、一次T I L及び二次T I Lの両方が含まれる。「一次T I L」は、本明細書に概説されるように患者組織試料から得られるもの（「新たに採取された」と称されることもある）であり、「二次T I L」は、本明細書で考察されるように拡張または増殖された任意のT I L細胞集団であり、本明細書で考察されるバルクT I L、拡張T I L（「R E P T I L」）、ならびに「r e R E P T I L」が含まれるが、これらに限定されない。r e R E P T I Lは、例えば、第2の拡張T I Lまたは第2の追加の拡張T I L（例えば、r e R E P T I Lと称されるT I Lを含む、図8のステップDに記載されているものなど）を含み得る。

【0432】

T I Lは、一般に、細胞表面マーカーを使用して生化学的に定義されるか、または腫瘍に浸潤して治療を達成するそれらの能力によって機能的に定義されるかのいずれかであり得る。T I Lは、一般に、C D 4、C D 8、T C R α β、C D 2 7、C D 2 8、C D 5 6、C C R 7、C D 4 5 R a、C D 9 5、P D - 1、及びC D 2 5のうちの1つ以上のバイオマーカーの発現によって分類され得る。さらに及び代替的に、T I Lは、患者への再導入時に固形腫瘍に浸潤する能力により機能的に定義され得る。T I Lは、効力によってさらに特徴付けられ得、例えば、インターフェロン（I F N）放出が、約5 0 p g / m Lを超える、約1 0 0 p g / m Lを超える、約1 5 0 p g / m Lを超える、または約2 0 0 p g / m Lを超える場合、T I Lは強力であるとみなされ得る。例えば、インターフェロン（I F N γ）放出が、約5 0 p g / m Lを超える、約1 0 0 p g / m Lを超える、約1 5 0 p g / m Lを超える、または約2 0 0 p g / m Lを超える、約3 0 0 p g / m Lを超える、約4 0 0 p g / m Lを超える、約5 0 0 p g / m Lを超える、約6 0 0 p g / m Lを超える、約7 0 0 p g / m Lを超える、約8 0 0 p g / m Lを超える、約9 0 0 p g / m L、約1 0 0 0 p g / m Lを超える場合、T I Lは強力であるとみなされ得る。

【0433】

「デオキシリボヌクレオチド」という用語は、天然及び合成の、未修飾及び修飾デオキシリボヌクレオチドを包含する。修飾には、糖部分、塩基部分、及び／またはオリゴヌクレオチド中のデオキシリボヌクレオチド間の結合への変更が含まれる。

【0434】

「RNA」という用語は、少なくとも1つのリボヌクレオチド残基を含む分子を定義する。「リボヌクレオチド」という用語は、b - D - リボフラノース部分の2' 位にヒドロキシル基を有するヌクレオチドを定義する。RNAという用語には、二本鎖RNA、一本鎖RNA、部分的に精製されたRNAなどの単離されたRNA、本質的に純粋なRNA、合成RNA、組換え的に産生されたRNA、ならびに1つ以上のヌクレオチドの付加、欠失、置換、及び／または変化によって天然に存在するRNAとは異なる変化したRNAが含まれる。本明細書に記載のRNA分子のヌクレオチドはまた、非天然に存在するヌクレオチドまたは化学的に合成されたヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドなどの非標準ヌクレオチドを含み得る。これらの変化したRNAは、類似体または天然に存在するRNAの類似体と称され得る。

【0435】

「薬学的に許容される担体」または「薬学的に許容される賦形剤」という用語は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、ならびに不活性成分を含むよう意図されている。医薬品有効成分のためのかかる薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤の使用は、当該技術分野で周知である。任意の従来の薬学的に許容される担体または薬学的に許容される賦形剤が医薬品有効成分と適合しない場合を除いて、本発明の治療用組成物におけるその使用が企図される。他の薬物などの追加の医薬品有効成分を、記載された組成物及び方法に組み込むこともできる。

【0436】

「約」及び「およそ」という用語は、値の統計的に有意な範囲内を意味する。かかる範囲は、所与の値または範囲の1桁以内、好ましくは50%以内、より好ましくは20%以

10

20

30

40

50

内、なおより好ましくは10%以内、さらにより好ましくは5%以内であり得る。「約」または「およそ」という用語によって包含される許容偏差は、研究中の特定のシステムに依存し、当業者によって容易に理解され得る。さらに、本明細書で使用される場合、「約」及び「およそ」という用語は、寸法、サイズ、配合、パラメータ、形状、ならびに他の量及び特徴が正確でなく、かつ正確である必要はないが、公差、変換係数、四捨五入、測定誤差など、及び当業者に知られている他の要因を反映して、必要に応じて、およそであってもよく、及び／またはそれよりも大きくても小さくてもよいことを意味する。一般に、寸法、サイズ、配合、パラメータ、形状、または他の量もしくは特徴は、そのように明示的に述べられているかにかかわらず、「約」または「およそ」である。非常に異なるサイズ、形状、及び寸法の実施形態が記載された配置を採用し得ることに留意されたい。

10

【0437】

添付の特許請求の範囲で使用される場合、「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という移行用語は、元の形式及び補正された形式で、存在する場合、列挙されていない追加のクレーム要素またはステップが特許請求（複数可）の範囲から除外されるかに関して特許請求の範囲を定義する。「含む」という用語は、包括的または自由形式であるよう意図されており、いずれの追加の列挙されていない要素、方法、ステップ、または材料も除外しない。「からなる」という用語は、特許請求の範囲で指定されたもの以外のいずれの要素、ステップ、または材料も除外し、後者の場合、指定された材料（複数可）に通常関連する不純物も除外する。「から本質的になる」という用語は、特許請求の範囲を、特定の要素、ステップ、または材料（複数可）、及び特許請求された本発明の基本的及び新規の特徴（複数可）に実質的に影響を及ぼさないに限定する。本発明を具体化する本明細書に記載のすべての組成物、方法、及びキットは、代替の実施形態では、「含む」、「から本質的になる」、及び「からなる」という移行用語のうちのいずれかによってより具体的に定義され得る。

20

【0438】

「抗体」及びその複数形の「抗体」という用語は、免疫グロブリン全体及び任意の抗原結合断片（「抗原結合部分」）またはその一本鎖を指す。「抗体」はさらに、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重鎖（H）鎖及び2つの軽（L）鎖を含む糖タンパク質、またはその抗原結合部分を指す。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書では V_H と略される）及び重鎖定常領域で構成される。重鎖定常領域は、 $CH1$ 、 $CH2$ 、及び $CH3$ の3つのドメインで構成される。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書では V_L と略される）及び軽鎖定常領域で構成される。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、 CL で構成される。抗体の V_H 及び V_L 領域は、相補性決定領域（ CDR ）または超可変領域（ HVR ）と称され、フレームワーク領域（ FR ）と呼ばれる、より保存された領域が点在し得る、超可変性の領域にさらに細分化することができる。各 V_H 及び V_L は、アミノ末端からカルボキシ末端へと以下の順序で配列された3つの CDR 及び4つの FR で構成される： $FR1$ 、 $CDR1$ 、 $FR2$ 、 $CDR2$ 、 $FR3$ 、 $CDR3$ 、 $FR4$ 。重鎖及び軽鎖の可変領域は、1つまたは複数の抗原エпитープと相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）及び古典的な補体系の第1の成分（ Clq ）を含む宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。

30

40

【0439】

「抗原」という用語は、免疫応答を誘導する物質を指す。いくつかの実施形態では、抗原は、主要組織適合遺伝子複合体（ MHC ）分子によって提示される場合、抗体または TCR によって結合されることができる分子である。本明細書で使用される「抗原」という用語はまた、 T 細胞エピトープを包含する。抗原は、追加として免疫系によって認識されることができる。いくつかの実施形態では、抗原は、体液性免疫応答または細胞性免疫応答を誘導することができ、 B リンパ球及び／または T リンパ球の活性化につながる。場合によっては、これは、抗原が Th 細胞エピトープを含むか、またはそれに結合されることを必要とし得る。抗原はまた、1つ以上のエピトープ（例えば、 B -及び T -エピトープ

50

）を有し得る。いくつかの実施形態では、抗原は、好ましくは、典型的には非常に特異的かつ選択的な方法で、対応する抗体またはT C Rと反応し、他の抗原によって誘導される多数の他の抗体またはT C Rとは反応しない。

【0440】

「モノクローナル抗体」、「m A b」、「モノクローナル抗体組成物」という用語、またはそれらの複数形は、単一分子組成の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して単一の結合特異性及び親和性を示す。特定の受容体に特異的なモノクローナル抗体は、試験対象に好適な抗原を注入し、次いで、所望の配列または機能的特徴を有する抗体を発現するハイブリドーマを単離するという当該技術分野における知識及び技術を使用して作製することができる。モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、モノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離され、配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、かかるDNAの好ましい供給源として機能する。一旦単離されると、DNAは、発現ベクターに入れられ、次いで、E. coli細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髄腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトされて、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を取得することができる。抗体の組換え産生については、以下でより詳細に説明する。

【0441】

本明細書で使用される、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」（または単に「抗体部分」もしくは「断片」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長抗体の断片によって行われ得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合断片の例には、(i) V_L、V_H、C_L、及びC_H1ドメインからなる一価断片である、F a b断片、(ii) ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合された2つのF a b断片を含む二価断片である、F (a b')₂断片、(iii) V_H及びC_H1ドメインからなるF d断片、(iv) 抗体の単一アームのV_L及びV_HドメインからなるF v断片、(v) V_HまたはV_Lドメインからなり得るドメイン抗体(d A b)断片(Ward, et al., Nature, 1989, 341, 544-546)、ならびに(vi) 単離した相補性決定領域(CDR)が含まれる。F v断片の2つのドメイン、V_L及びV_Hは、別々の遺伝子によってコードされるが、これらは、組換え方法を使用して、V_L及びV_H領域が対合して、一本鎖F v(s c F v)として知られる一価分子を形成する単一タンパク質鎖としてそれらを作製することを可能にする合成リンカーによって接合され得、例えば、Bird, et al., Science 1988, 242, 423-426、及びHuston, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988, 85, 5879-5883)を参照されたい。かかるs c F v抗体はまた、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」という用語に包含されることを意図している。これらの抗体断片は、当業者に知られている従来の技法を使用して得られ、断片は、無傷の抗体と同じ方法で有用性についてスクリーニングされる。いくつかの実施形態では、s c F vタンパク質ドメインは、V_H部分及びV_L部分を含む。s c F v分子は、V_Lドメインがs c F v分子のN末端部分である場合、V_L-L-V_H、またはV_Hドメインがs c F v分子のN末端部分である場合、V_H-L-V_Lのいずれかとして示される。s c F v分子を作製し、好適なペプチドリンカーを設計するための方法は、米国特許第4,704,692号、米国特許第4,946,778号、R. Raag and M. Whitlow, "Single Chain Fvs." FASEB Vol 9:73-80 (1995) 及びR. E. Bird and B. W. Walker, Single Chain Antibody Variable Regions, TIBTECH, Vol 9:132-137 (1991)に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0442】

本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、フレームワーク及びCDR領域の両方が、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を含むことを意図している。さらに、抗体が定常領域を含む場合、定常領域はまた、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する。本発明のヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を含み得る（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的変異誘発によって、またはインビボでの体細胞変異によって導入される変異）。本明細書で使用される「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するCDR配列が、ヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を含むことを意図しない。

【0443】

「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、フレームワーク領域及びCDR領域の両方がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する単一の結合特異性を示す抗体を指す。いくつかの実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合したヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから取得されたB細胞を含むハイブリドーマによって産生される。

【0444】

本明細書で使用される「組換えヒト抗体」という用語は、組換え手段によって調製、発現、作成、または単離されるすべてのヒト抗体、例えば（a）ヒト免疫グロブリン遺伝子またはそれから調製されたハイブリドーマ（以下でさらに説明される）についてトランスジェニックまたはトランス染色体である動物（マウスなど）から単離された抗体、（b）ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、（c）組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体、及び（d）ヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列にスプライシングすることを含む、任意の他の手段によって調製、発現、作成、または単離された抗体を含む。かかる組換えヒト抗体は、フレームワーク及びCDR領域がヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかしながら、ある特定の実施形態では、かかる組換えヒト抗体は、インビトロ変異誘発（または、ヒトIg配列についてトランスジェニックな動物が使用される場合、インビボ体細胞変異誘発）に供され得、したがって、組換え抗体のV_H及びV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖細胞系V_H及びV_L配列に由来し、関連しているが、インビボでヒト抗体生殖細胞系レパートリー内に自然に存在しない可能性がある配列である。

【0445】

本明細書で使用される場合、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えば、IgMまたはIgG1）を指す。

【0446】

「抗原を認識する抗体」及び「抗原に特異的な抗体」という句は、本明細書では「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と交換可能に使用される。

【0447】

「ヒト抗体誘導體」という用語は、抗体と別の医薬品有効成分または抗体とのコンジュゲートを含む、ヒト抗体の任意の修飾形態を指す。「コンジュゲート」、「抗体薬物コンジュゲート」、「ADC」、または「免疫コンジュゲート」という用語は、別の治療部分にコンジュゲートされた抗体またはその断片を指し、これは当該技術分野において使用可能な方法を使用して、本明細書に記載の抗体にコンジュゲートされ得る。

【0448】

「ヒト化抗体」、「ヒト化抗体（複数）」、及び「ヒト化」という用語は、マウスなどの別の哺乳動物種の生殖細胞系に由来するCDR配列が、ヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を指すことを意図している。追加のフレームワーク領域の修飾は、ヒトフレームワーク配列内で行うことができる。非ヒト（例えば、マウス）抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場

10

20

30

40

50

合、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエントの超可変領域からの残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギなどの非ヒト種（ドナー抗体）または非ヒト霊長類の15超可変領域からの残基によって置き換えられる。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク（FR）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体には見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体の性能をさらに向上させるために行われる。一般に、ヒト化抗体は、超可変ループのすべてまたは実質的にすべてが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、FR領域のすべてまたは実質的にすべてがヒト免疫グロブリン配列のものである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的すべてを含むことになる。ヒト化抗体はまた、任意選択で、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含むであろう。さらなる詳細については、Jones, et al., Nature 1986, 321, 522-525、Riechmann, et al., Nature 1988, 332, 323-329、及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 1992, 2, 593-596を参照されたい。本明細書に記載される抗体はまた、エフェクター機能及び／またはFcR結合の改善（例えば、低減）を与えることが知られている任意のFcバリエーションを用いるように修飾され得る。Fcバリエーションは、例えば、国際特許出願公開第WO1988/07089A1号、同第WO1996/14339A1号、同第WO1998/05787A1号、同第WO1998/23289A1号、同第WO1999/51642A1号、同第WO99/58572A1号、同第WO2000/09560A2号、同第WO2000/32767A1号、同第WO2000/42072A2号、同第WO2002/44215A2号、同第WO2002/060919A2号、同第WO2003/074569A2号、同第WO2004/016750A2号、同第WO2004/029207A2号、同第WO2004/035752A2号、同第WO2004/063351A2号、同第WO2004/074455A2号、同第WO2004/099249A2号、同第WO2005/040217A2号、同第WO2005/070963A1号、同第WO2005/077981A2号、同第WO2005/092925A2号、同第WO2005/123780A2号、同第WO2006/019447A1号、同第WO2006/047350A2号、及び同第WO2006/085967A2号、ならびに米国特許第5,648,260号、同第5,739,277号、同第5,834,250号、同第5,869,046号、同第6,096,871号、同第6,121,022号、同第6,194,551号、同第6,242,195号、同第6,277,375号、同第6,528,624号、同第6,538,124号、同第6,737,056号、同第6,821,505号、同第6,998,253号、及び同第7,083,784号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるアミノ酸置換のうちのいずれか1つを含み得る。

【0449】

「キメラ抗体」という用語は、可変領域配列が1つの種に由来し、定常領域配列が別の種に由来する抗体、例えば、可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体を指すことを意図している。

【0450】

「二重特異性抗体（diabody）」は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片である。断片は、同じポリペプチド鎖（V_H-V_LまたはV_L-V_H）中に軽鎖可変ドメイン（V_L）に接続された重鎖可変ドメイン（V_H）を含む。同じ鎖上の2つのドメインをペアリングするには短すぎるリンカーを使用すると、ドメインは別のチェーンの相補ドメインとペアリングさせられ、2つの抗原結合部位が作成される。二重特異性抗体は、例えば、欧州特許第EP404,097号、国際特許公開第WO93/11161号、及びBolliger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 6444-6448においてより完全に記載されている。

【0451】

「グリコシル化」という用語は、抗体の修飾誘導体を指す。非グリコシル化抗体は、グリコシル化を欠いている。グリコシル化は、例えば、抗原に対する抗体の親和性を増加させるように変化され得る。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体配列内の1つ以上のグリコシル化部位を変化させることによって達成され得る。例えば、1つ以上の可変領域フレームワークのグリコシル化部位の排除をもたらす、1つ以上のアミノ酸置換を行ない、それによってその部位でのグリコシル化を排除することができる。米国特許第5,714,350号及び同第6,350,861号に記載されているように、非グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高める可能性がある。加えてまたは代替的に、改変した種類のグリコシル化を有する抗体、例えば、フコシル残基の量が低減した低フコシル化抗体または二分GlcNac構造が増加した抗体が作製され得る。かかるグリコシル化パターンの変化は、抗体の能力を増加させることが実証されている。かかる炭水化物修飾は、例えば、抗体をグリコシル化機構が変化した宿主細胞で発現させることによって達成され得る。グリコシル化機構が変化した細胞については、当該技術分野で説明されており、本発明の組換え抗体を発現させ、それによりグリコシル化が変化した抗体を産生する宿主細胞として使用され得る。例えば、Ms704、Ms705、及びMs709細胞株で発現される抗体が、それらの炭水化物上のフコースを欠くように、細胞株Ms704、Ms705、及びMs709は、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8（アルファ（1,6）フコシルトランスフェラーゼ）を欠く。Ms704、Ms705、及びMs709 FUT8-/-細胞株は、2つの置換ベクターを使用したCHO/DG44細胞中のFUT8遺伝子の標的破壊によって作成された（例えば、米国特許公開第2004/0110704号またはYamane-Ohnuki, et al., Biotechnol. Bioeng., 2004, 87, 614-622を参照）。別の例として、欧州特許第EP1,176,195号は、フコシルトランスフェラーゼをコードし、それによりかかる細胞株で発現される抗体が、アルファ1,6結合関連酵素を低減または排除することによって低フコシル化を示す、機能的に破壊されたFUT8遺伝子を有する細胞株を説明しており、抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンにフコースを付加するための酵素活性が低いか、または酵素活性を有しない細胞株、例えばラット骨髄腫細胞株YB2/0（ATCC CRL 1662）についても説明している。国際特許公開第WO03/035835号は、フコースをAsn(297)結合型炭水化物に付着させる能力が低減し、さらにその宿主細胞で発現される抗体の低フコシル化ももたらすバリエーションCHO細胞株、Lec13細胞について説明している（Shields, et al., J. Biol. Chem. 2002, 277, 26733-26740も参照）。国際特許公開第WO99/54342号は、糖タンパク質修飾グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、ベータ（1,4）-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII（GnTIII））を発現するように操作され、それにより操作された細胞株で発現される抗体が、二分性GlcNac構造の増加を示し、抗体のADCC活性の増加をもたらす、細胞株について記載している（Umana, et al., Nat. Biotech. 1999, 17, 176-180も参照）。代替的に、フコシダーゼ酵素を使用して、抗体のフコース残基を切断でき得る。例えば、フコシダーゼアルファ-1-フコシダーゼは、Tarentino, et al., Biochem. 1975, 14, 5516-5523に記載されているように、抗体からフコシル残基を除去する。

10

20

30

40

50

【0452】

「ペグ化」は、1つ以上のPEG基が抗体または抗体断片に付着する条件下で、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール（PEG）と反応させる、修飾抗体またはその断片を指す。ペグ化は、例えば、抗体の生物学的（例えば、血清）半減期を増加させることができる。好ましくは、ペグ化は、反応性PEG分子（または類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実行される。本明細書で使用される場合、「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ（C₁〜C₁₀）アルコキシーもしくはアリーールオキシーポリエチレングリコール、またはポリエチレングリコール-マレイミドなどの、他のタンパク質を誘導体化するために使

用されている P E G の形態のうちのいずれかを包含することが意図される。ペグ化される抗体は、非グリコシル化抗体であり得る。ペグ化のための方法は、当該技術分野で知られており、例えば欧州特許第 E P 0 1 5 4 3 1 6 号及び同第 E P 0 4 0 1 3 8 4 号、ならびに米国特許第 5, 8 2 4, 7 7 8 号（各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、本発明の抗体に適用することができる。

【 0 4 5 3 】

「バイオシミラー」という用語は、モノクローナル抗体またはタンパク質を含む、臨床的に不活性な成分にわずかな違いがあるにもかかわらず、米国で認可された参照バイオ製品と非常に類似しており、製品の安全性、純度、及び効力に関してバイオ製品と参照製品との間に臨床的に意味のある差異がない、バイオ製品を意味する。さらに、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。「バイオシミラー」という用語は、他の国及び地域の規制機関によっても同義的に使用されている。バイオ製品またはバイオ医薬品は、細菌または酵母などの生物源によって作製された、またはそれに由来する医薬品である。それらは、ヒトインスリンもしくはエリスロポエチンなどの比較的小さな分子、またはモノクローナル抗体などの複雑な分子からなり得る。例えば、参照 I L - 2 タンパク質がアルデスロイキン (P R O L E U K I N) である場合、アルデスロイキンに関して薬物規制当局によって承認されたタンパク質は、アルデスロイキンの「バイオシミラー」であるか、またはアルデスロイキンの「そのバイオシミラー」である。欧州では、類似のバイオまたは「バイオシミラー」医薬品は、欧州医薬品庁 (E M A) によって既に使用が許可されている別のバイオ医薬品に類似したバイオ医薬品である。欧州における同様の生物学的用途に関連する法的根拠は、補正された R e g u l a t i o n (E C) N o 7 2 6 / 2 0 0 4 の第 6 条及び D i r e c t i v e 2 0 0 1 / 8 3 / E C の第 1 0 (4) 条であり、したがって欧州では、バイオシミラーは、R e g u l a t i o n (E C) N o 7 2 6 / 2 0 0 4 の第 6 条及び D i r e c t i v e 2 0 0 1 / 8 3 / E C の第 1 0 (4) 条の下で、認可または認可申請の対象について認可、承認され得る。すでに認可されているオリジナルのバイオ医薬品は、欧州では「参照医薬品」と称されることがある。バイオシミラーとみなされる製品に対する要件のうちのいくつかは、バイオシミラー医薬品に関する C H M P ガイドラインに概説されている。さらに、モノクローナル抗体バイオシミラーに関連するガイドラインを含む製品固有のガイドラインは、E M A によって製品毎に提供され、そのウェブサイトで公開されている。本明細書に記載のバイオシミラーは、品質特徴、生物活性、作用機序、安全性プロファイル、及び／または有効性の点で、参照医薬品に類似している可能性がある。さらに、バイオシミラーは、参照医薬品と同じ状態を治療するために使用され得るか、または使用を意図され得る。したがって、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した品質特徴を有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した生物活性を有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した安全性プロファイルを有するとみなされ得る。代替的に、またはさらに、本明細書に記載のバイオシミラーは、参照医薬品と類似または非常に類似した効力を有するとみなされ得る。本明細書に記載されているように、欧州におけるバイオシミラーは、E M A によって認可された参照医薬品と比較される。しかしながら、場合によっては、バイオシミラーは、特定の研究で欧州経済領域外で認可されたバイオ医薬品 (E E A 認可されていない「コンパレーター」) と比較される場合がある。かかる研究には、例えば、特定の臨床研究及びインビボ非臨床研究が含まれる。本明細書で使用される場合、「バイオシミラー」という用語は、E E A 認可されていないコンパレーターと比較された、または比較され得るバイオ医薬品にも関する。特定のバイオシミラーは、抗体、抗体断片 (例えば、抗原結合部分)、及び融合タンパク質などのタンパク質である。タンパク質バイオシミラーは、ポリペプチドの機能に有意な影響を及ぼさない、アミノ酸構造にわずかな修飾 (例えば、アミノ酸の欠失、付加、及び／または置換を含む) を有するアミノ酸配列を有し得る。バイオシミラーは、

10

20

30

40

50

その参照医薬品のアミノ酸配列に対して97%以上、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み得る。バイオシミラーは、その違いが医薬品の安全性及び／または有効性の変化をもたらさないならば、1つ以上の翻訳後修飾、例えば、限定されないが、参照医薬品の翻訳後修飾とは異なる、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び／または切断を含み得る。バイオシミラーは、参照医薬品と同一または異なるグリコシル化パターンを有し得る。特に、排他的ではないが、バイオシミラーは、その違いが参照医薬品に関連する安全性の懸念に対処するか、対処することを意図している場合、異なるグリコシル化パターンを有し得る。加えて、バイオシミラーは、医薬品の安全性及び有効性が損なわれないならば、例えば、その強度、剤形、製剤、賦形剤、及び／または提示において参照医薬品から逸脱する可能性がある。バイオシミラーは、参照医薬品と比較して、例えば薬物動態（PK）及び／または薬力学的（PD）プロファイルの違いを含み得るが、それでも、認可される、または認可に適しているとみなされるように、参照医薬品と十分に類似しているとみなされる。特定の状況において、バイオシミラーは、参照医薬品と比較して異なる結合特徴を示し、異なる結合特徴は、EMAなどの規制当局によって類似のバイオ製品としての認可の障壁ではないとみなされる。「バイオシミラー」という用語は、他の国及び地域の規制機関によっても同義的に使用されている。

10

【0454】

II. 遺伝子編集プロセス

A. 概要：TIL拡張+遺伝子編集

本発明のいくつかの実施形態では、TIL集団（例えば、CD39／CD69陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}濃縮TIL集団）を拡張するための方法に関し、本方法は、それらの治療効果を増強するために、TILの少なくとも一部を遺伝子編集する1つ以上のステップを含む。本明細書で使用される場合、「遺伝子編集」、「遺伝子編集」、及び「ゲノム編集」は、DNAが細胞のゲノム内で永続的に修飾され、例えば、DNAが細胞のゲノム内で挿入、欠失、修飾、または置換される遺伝子修飾のタイプを指す。いくつかの実施形態では、遺伝子編集は、DNA配列の発現をサイレンシング（遺伝子ノックアウトと称されることもある）または阻害／低減（遺伝子ノックダウンと称されることもある）させる。他の実施形態では、遺伝子編集は、DNA配列の発現を増強させる（例えば、過剰発現を引き起こすことによって）。本発明の実施形態によれば、遺伝子編集技術は、TILの治療的集団の有効性を増強するために使用される。

20

30

【0455】

いくつかの実施形態では、TIL集団は、1つ以上の細胞表面受容体の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾される。例示的な実施形態では、細胞表面受容体は、CD39及び／またはCD69である。本明細書で使用される場合、「CD39」、「ENTPD1」、「ATPDase」、「NTPDase-1」、「SPG64」、及び「エクトヌクレオシドトリホスホヒドロラーゼ1」はすべて、トリホスホ及びジホスホヌクレオシドのγ-及びβ-リン酸残基のモノホスホヌクレオシド誘導体への加水分解を触媒する細胞表面酵素を指す。CD39の高い発現または活性は、免疫系ががんの進行を阻害するのを防ぐことができる。本明細書で使用される場合、「CD69」、「AIM」、「BL-AC/P26」、「CLEC2C」、「EA1」、「GP32/28」、「MLR-3」はすべて、CD69遺伝子によってコードされるヒト膜貫通C型レクチンタンパク質を指す。CD69は、免疫系の多くの細胞型で発現する活性化マーカーであり、リンパ球の増殖及びリンパ球におけるシグナル伝達に関与する。したがって、いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、CD39及びCD69の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾されたTILは、増加した抗腫瘍活性を示すと考えられる。TILは、本明細書に記載の遺伝子修飾方法を含む当該技術分野で知られている任意の好適な方法を使用して、CD39及びCD69の発現をサイレンシングまたは減少させるように修飾され得る。例示的な遺伝子修飾技法としては、例えば、本明細書に記載のCRISPR、TALE、及びジンクフィンガー法が挙げられる。

40

50

【0456】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾されたTIL集団は、CD39／CD69二重陰性発現について最初に事前選択され、CD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団は、その後、CD39及びCD69の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾される。いかなる特定の操作理論にも縛られることなく、かかるCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団は、その後、CD39及びCD69の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾され、対照TIL集団（例えば、CD39／CD69二重陰性発現について事前選択されていない及び／またはその後、CD39及びCD69の発現を低減するように修飾されたTIL集団）と比較して、強化された抗腫瘍活性を示すと考えられる。TILは、例えば、本明細書で提供されるCD39／CD69二重陰性事前選択法を含む任意の好適な方法を使用して、CD39／CD69二重陰性発現のために事前選択される。

10

【0457】

いくつかの実施形態では、その後、サイレンシングまたは減少したCD39及びCD69の発現を有する遺伝子修飾されたTIL集団を拡張して、CD39及びCD69の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾された治療的TIL集団の集団を作成する。任意の好適な拡張方法を使用して、遺伝子修飾されたTIL集団を拡張することができる。

【0458】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態に従って実行することができ、この方法は、TILの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。さらなる実施形態によれば、TILを治療的TIL集団に拡張するための方法は、PCT／US2017／058610、PCT／US2018／012605、またはPCT／US2018／012633（これらは参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている方法のうちのいずれかの実施形態に従って実行され、方法は、TILの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。したがって、本発明のある実施形態は、本明細書に記載される任意の実施形態に従って拡張された治療的TIL集団を提供し、治療的集団の少なくとも一部は遺伝子編集されており、例えば、注入バッグに移される治療的TIL集団の少なくとも一部は、永続的に遺伝子編集される。

20

30

【0459】

B．TIL拡張中の遺伝子編集のタイミング

いくつかの実施形態では、TIL集団は、本明細書に提供される拡張方法の過程で遺伝子修飾される。拡張方法（例えば、本明細書に記載の2Aプロセス及びGen3プロセス、または図34に示されるプロセス）は、概して、第1の拡張及び第2の拡張を含む。ある特定の実施形態では、TILは、拡張方法の第1の拡張の前に、CD39／CD69二重陰性発現について事前選択される。いくつかの実施形態では、このCD39／CD69二重陰性濃縮集団は、第1の拡張（例えば、本明細書に記載の2AまたはGen3プロセスの第1の拡張、または図34に示される第1の拡張）を受ける前に、CD39及びCD69の発現をサイレンシングまたは最小化するように遺伝子修飾される。いくつかの実施形態では、CD39及びCD69が濃縮された集団は、第1の拡張を受け、第1の拡張で産生された細胞は、第2の拡張（例えば、本明細書に記載される2AもしくはGen3プロセスの第2の拡張、または図34に示される第1の拡張）を受ける前に、CD39及びCD69の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾される。いくつかの実施形態では、CD39／CD69二重陰性濃縮集団は、第1の拡張及び第2の拡張を受け、第2の拡張の結果として産生されたTILは、CD39及びCD69の発現をサイレンシングまたは減少させるように遺伝子修飾される。

40

【0460】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法は、

50

(a) 患者または対象におけるがんからの腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料である第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(b) (a)の第1のTIL集団からCD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TILを選択して、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}濃縮TIL集団を取得することと、

(c) CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}濃縮TIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む第1の細胞培養培地中で培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が、約1～11日の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団が、第1のTIL集団より数が多い、第2のTIL集団を産生することと、

(d) 第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、急速な第2の拡張が、約14日以下の第2の期間行われ、治療的TIL集団を取得することと、

(e) 第3のTIL集団を採取することと、

(f) 採取された第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む遺伝子修飾されたTILを含むように方法中の任意の時点で、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}濃縮TIL集団を遺伝子修飾することと、を含む。

【0461】

上記の実施形態のステップ(f)に記載されるように、遺伝子修飾プロセスは、本方法における任意のTIL集団上で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法におけるステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ(a)～(e)のうちのいずれかの間に、TIL上で実行されてもよいことを意味する。ある特定の実施形態によれば、TILは、拡張方法中に収集され、収集されたTILは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、拡張プロセスを継続するために拡張方法に戻され（例えば、培養培地に戻され）、それにより治療的TIL集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。ある実施形態では、遺伝子編集プロセスは、TILを活性化し、活性化されたTILに対して遺伝子編集ステップを行い、本明細書に記載のプロセスに従って遺伝子編集TILを拡張することによって、拡張の前に実行されてもよい。

【0462】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ(a)～(g)を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、TIL拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、2つを超える拡張を含み得、第3または第4の拡張中にTILに対して遺伝子修飾ステップが実施され得ることなどが可能である。

【0463】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子修飾プロセスは、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団、第2の集団、及び第3の集団のうちの1つ以上からのTIL上で実行される。例えば、遺伝子修飾は、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団上で、またはCD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}集団から収集されたTILの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのTILをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。あるいは、遺伝子修飾は、第2もしくは第3の集団からのTIL上で、または第2もしくは第3の集団から収集されたTILの一部上で実行されてもよく、遺伝子修飾プロセスに続いて、それらのTILを

その後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。他の実施形態によれば、遺伝子修飾は、TILがまだ培養培地中にある間、及び拡張が実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも拡張から「除去」されるわけではない。

【0464】

他の実施形態によれば、遺伝子修飾プロセスは、第1の拡張からのTIL、または第2の拡張からのTIL、またはその両方で実行される。例えば、第1の拡張または第2の拡張中に、遺伝子修飾は、培養培地から収集されたTIL上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのTILは、その後、例えば、それらを培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

10

【0465】

他の実施形態によれば、遺伝子修飾プロセスは、第1の拡張後及び第2の拡張前にTILの少なくとも一部上で実行される。例えば、第1の拡張後に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたTIL上で実行され得、遺伝子修飾プロセスの後、それらのTILは、その後、例えば、それらを第2の拡張のための培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【0466】

代替実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、ステップ(c)の前（例えば、ステップ(a)～(b)のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ(d)の前（例えば、ステップ(a)～(c)のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、またはステップ(e)の前（例えば、ステップ(a)～(d)のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）に実行される。

20

【0467】

他の実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法は、

(a) 患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、

(b) 腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

(c) (a)の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得することと、

30

(d) IL-2及び任意選択でOKT-3（例えば、OKT-3は拡張プロセスの開始日に開始して細胞培地中に存在し得る）を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生することと、

(e) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、任意選択でOKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、第2の拡張が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生することと、

40

(f) ステップ(d)から取得された治療的TIL集団を採取することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、採取することと、

(g) ステップ(e)からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(e)から(f)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

(h) 採取されたTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を

50

含む遺伝子修飾されたT I Lを含むように、ステップ（g）において注入バッグに移す前の任意の時点で、C D 3 9^{L O}／C D 6 9^{L O}及び／またはC D 3 9／C D 6 9二重陰性濃縮T I L集団を任意選択で遺伝子修飾することと、を含む。

【0468】

上記の実施形態のステップ（g）に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ステップ（f）における注入バッグへの移送前のT I L拡張方法中の任意の時点で実行されてもよく、これは、遺伝子編集が、拡張方法のステップのうちのいずれかの前、最中、または後に、例えば、上記の方法で概説されたステップ（a）～（f）のうちのいずれかの間、または上記の方法で概説されたステップ（a）～（e）のうちのいずれかの前もしくは後に、T I L上で実行されてもよいことを意味する。ある特定の実施形態によれば、T I Lは、拡張方法中に収集され（例えば、拡張方法は、T I Lの少なくとも一部について「一時停止」され）、収集されたT I Lは、遺伝子編集プロセスに供され、場合によっては、その後、拡張プロセスを継続するために拡張方法に戻され（例えば、培地に戻され）、それにより最終的に注入バッグに移される治療的T I L集団の少なくとも一部が永続的に遺伝子編集される。ある実施形態では、遺伝子編集プロセスは、T I Lを活性化し、活性化されたT I Lに対して遺伝子編集ステップを行い、本明細書に記載のプロセスに従って遺伝子編集T I Lを拡張することによって、拡張の前に実行されてもよい。

10

【0469】

拡張プロセスの代替実施形態は、上記に示される方法とは異なり得ることに留意されたく、例えば、代替実施形態は、同じステップ（a）～（g）を有し得ないか、または異なる数のステップを有し得る。特定の実施形態にかかわらず、遺伝子編集プロセスは、T I L拡張方法中の任意の時点で実行されてもよい。例えば、代替実施形態は、2つを超える拡張を含み得、第3または第4の拡張中にT I Lに対して遺伝子編集が実施され得ることなどが可能である。

20

【0470】

いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第1の集団、第2の集団、及び第3の集団のうちの1つ以上からのT I L上で実行される。例えば、遺伝子編集は、第1のT I L集団上で、または第1の集団から収集されたT I Lの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのT I Lをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。あるいは、遺伝子編集は、第2もしくは第3の集団からのT I L上で、または第2もしくは第3の集団から収集されたT I Lの一部上で実行されてもよく、遺伝子編集プロセスに続いて、それらのT I Lをその後、拡張プロセスに戻してもよい（例えば、培養培地に戻してもよい）。他の実施形態によれば、遺伝子編集は、T I Lがまだ培養培地中にある間、及び拡張が実行されている間に行われ、すなわち、遺伝子編集を実施するために必ずしも拡張から「除去」されるわけではない。

30

【0471】

他の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第1の拡張からのT I L、または第2の拡張からのT I L、またはその両方で実行される。例えば、第1の拡張または第2の拡張中に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたT I L上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのT I Lは、その後、例えば、それらを培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

40

【0472】

他の実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、第1の拡張後及び第2の拡張前にT I Lの少なくとも一部上で実行される。例えば、第1の拡張後に、遺伝子編集は、培養培地から収集されたT I L上で実行され得、遺伝子編集プロセスの後、それらのT I Lは、その後、例えば、それらを第2の拡張のための培養培地に再導入することによって、拡張方法に戻され得る。

【0473】

代替実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、ステップ（c）の前（例えば、ステップ（a）～（b）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（d）の前（例

50

えば、ステップ（a）～（c）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、ステップ（e）の前（例えば、ステップ（a）～（d）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）、またはステップ（f）の前（例えば、ステップ（a）～（e）のうちのいずれかの前、最中、もしくは後）に実行される。

【0474】

OKT-3に関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（0日目）、または第1の拡張の1日目に開始するOKT-3を含んでもよく、その結果、遺伝子編集は、0日目及び／または1日目に細胞培養培地中でOKT-3に曝露した後にTIL上で実行される。他の実施形態によれば、細胞培養培地は、第1の拡張中及び／または第2の拡張中にOKT-3を含み、OKT-3が細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集が実行される。あるいは、細胞培養培地は、第1の拡張中及び／または第2の拡張中にOKT-3を含み、OKT-3が細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集が実行される。

10

【0475】

4-1BBアゴニストに関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（0日目）、または第1の拡張の1日目に開始する4-1BBアゴニストを含んでもよく、その結果、遺伝子編集は、0日目及び／または1日目に細胞培養培地中で4-1BBアゴニストに曝露した後にTIL上で実行されることも留意されたい。他の実施形態によれば、細胞培養培地は、第1の拡張中及び／または第2の拡張中に4-1BBアゴニストを含み、4-1BBアゴニストが細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集が実行される。あるいは、細胞培養培地は、第1の拡張中及び／または第2の拡張中に4-1BBアゴニストを含み、4-1BBアゴニストが細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集が実行される。

20

【0476】

IL-2に関しては、ある特定の実施形態によれば、細胞培養培地は、開始日（0日目）、または第1の拡張の1日目に開始するIL-2を含んでもよく、その結果、遺伝子編集は、0日目及び／または1日目に細胞培養培地中でIL-2に曝露した後にTIL上で実行されることも留意されたい。他の実施形態によれば、細胞培養培地は、第1の拡張中及び／または第2の拡張中にIL-2を含み、IL-2が細胞培養培地に導入される前に、遺伝子編集が実行される。あるいは、細胞培養培地は、第1の拡張中及び／または第2の拡張中にIL-2を含み、IL-2が細胞培養培地中に導入された後に、遺伝子編集が実行される。

30

【0477】

上述のように、OKT-3、4-1BBアゴニスト及びIL-2のうちの1つ以上は、第1の拡張の0日目または1日目に開始する細胞培地中に含まれてもよい。いくつかの実施形態によれば、OKT-3は、第1の拡張の0日目または1日目に開始する細胞培地中に含まれ、及び／または4-1BBアゴニストは、第1の拡張の0日目または1日目に開始する細胞培地中に含まれ、及び／またはIL-2は、第1の拡張の0日目または1日目に開始する細胞培地中に含まれる。ある実施例によれば、細胞培養培地は、第1の拡張の0日目または1日目に開始するOKT-3及び4-1BBアゴニストを含む。別の実施例によれば、細胞培養培地は、第1の拡張の0日目または1日目に開始するOKT-3、4-1BBアゴニスト、及びIL-2を含む。当然のことながら、本明細書に記載の様々な実施形態に記載されるように、OKT-3、4-1BBアゴニスト及びIL-2のうちの1つ以上を、拡張プロセス中の1つ以上の追加の時点で細胞培地に添加してもよい。

40

【0478】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法は、

（a）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、

（b）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

50

(c) (a) の第 1 の T I L 集団から C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性 T I L を選択して、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団を取得することと、

(d) I L - 2 を含み、任意選択で O K T - 3 及び / または 4 - 1 B B アゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を約 3 ~ 1 1 日間培養することによって第 1 の拡張を行い、第 2 の T I L 集団を産生することであって、第 1 の拡張が、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第 2 の T I L 集団を産生することと、

(e) O K T - 3 を添加し、約 1 ~ 3 日間培養することによって、第 2 の T I L 集団を刺激することであって、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、刺激することと、

(f) 第 2 の T I L 集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも 1 つの遺伝子エディターを第 2 の T I L 集団の細胞の一部に移入させることと、

(g) 第 2 の T I L 集団を約 1 日間静置することと、

(h) 第 2 の T I L 集団の細胞培養培地を追加の I L - 2、任意選択で O K T - 3 抗体、任意選択で O X 4 0 抗体、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡張を行い、第 3 の T I L 集団を産生することであって、第 2 の拡張が、約 7 ~ 1 1 日間行われて、第 3 の T I L 集団を取得し、第 2 の拡張が、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ (g) からステップ (h) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第 3 の T I L 集団を産生することと、

(i) ステップ (h) から取得された治療的 T I L 集団を採取して、採取された T I L 集団を提供することであって、ステップ (h) からステップ (i) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取された T I L 集団が、治療的 T I L 集団である、採取することと、

(j) 採取された T I L 集団を注入バッグに移すことであって、ステップ (h) から (i) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、第 2 の T I L 集団の細胞の一部への少なくとも 1 つの遺伝子エディターの無菌エレクトロポレーションが、その一部における複数の細胞を修飾して、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する、移すことと、を含む。

【0479】

いくつかの実施形態によれば、前述の方法は、凍結保存培地を使用して採取された T I L 集団を凍結保存することをさらに含む。いくつかの実施形態では、凍結保存培地はジメチルスルホキシド系凍結保存培地である。他の実施形態では、凍結保存培地は、C S 1 0 である。

【0480】

他の実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療的 T I L 集団に拡張するための方法は、

(a) 患者または対象におけるがんからの腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料である第 1 の T I L 集団を取得及び / または受容することと、

(b) (a) の第 1 の T I L 集団から C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性 T I L を選択して、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団を取得することと、

(c) C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び抗原提示細胞 (A P C) を含む第 1 の細胞培養培地中で培養することによってプライミングによる第 1 の拡張を行い、第 2 の T I L 集団を産生することであって、プライミングによる第 1 の拡張が、第 1 のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第 1 の拡張が、約 1 ~ 1 1 日の第 1 の期間行われて、第 2 の T I L 集団を取得し、第 2 の T I L 集団が、第 1 の T I L 集団より数が多い、第 2 の T I L 集団を産生することと、

(d) 任意選択で、第 2 の T I L 集団を O K T - 3 で再刺激することと、

(e) 第 2 の T I L 集団を遺伝子修飾して、修飾された第 2 の T I L 集団を産生することであって、修飾された第 2 の T I L 集団が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する遺伝子修飾を含む、修飾された第 2 の T I L 集団を産生することと、

(f) 修飾された第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2の培養培地中で培養することによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の拡張が、約14日以内の第2の期間行われて、治療的TIL集団を取得し、第3のTIL集団が、CD39及びCD69の発現を低減する遺伝子修飾を含む治療的TIL集団である、第3のTIL集団を産生することと、

(g) 第3のTIL集団を採取することと、を含む。

【0481】

いくつかの実施形態では、遺伝子修飾ステップは、クラスター化規則的散在短回文反復(CRISPR)系、転写活性化因子様エフェクター(TALE)系、またはジンクフィンガーシステムからなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子エディター系のエレクトロポレーション及び送達を含み、少なくとも1つの遺伝子エディター系は、修飾された第2のTIL集団においてCD39及び／またはCD69の発現を低減する。

【0482】

いくつかの実施形態によれば、前述の方法を使用して、がんを有するヒト対象の治療のために自己採取されたTIL集団を提供することができる。

【0483】

C. 遺伝子編集方法

上で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果(例えば、その細胞表面上の免疫調節融合タンパク質の発現)を増強するために遺伝子編集を介して遺伝子修飾された腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を提供する。本発明の実施形態は、1つ以上のタンパク質の発現の促進及び1つ以上のタンパク質の発現の阻害の両方、ならびにそれらの組み合わせのために、TIL集団へのヌクレオチド挿入(RNAまたはDNA)による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態は、TILを治療的集団に拡張するための方法も提供し、方法は、TILを遺伝子編集することを含む。TIL集団を遺伝子修飾するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術が存在し、それらは本発明による使用に好適である。

【0484】

いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、1つ以上のタンパク質の産生のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。ある実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入ステップを含む。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Levine, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 2006, 103, 17372-77、Zufferey, et al., Nat. Biotechnol. 1997, 15, 871-75、Dull, et al., J. Virology 1998, 72, 8463-71、及び米国特許第6,627,442号(それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Cepko and Pear, Cur. Prot. Mol. Biol. 1996, 9.9.1-9.9.16に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、DNA発現ベクターとしてまたは発現可能なRNAもしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、mRNA(例えば、キャップ及びポリA尾部を含むmRNA)として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。SB10、SB11、及びSB100xなどのサケ科型Tel様トランスポザーゼ(SBまたはSleeping Beautyトランスポザーゼ)を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入系、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Hackett, et al., Mol. Therapy 30

10

20

30

40

50

2010, 18, 674-83及び米国特許第6, 489, 458号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0485】

いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、1つ以上のタンパク質の産生または阻害（例えば、サイレンシング）のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、Tsong, Biophys. J. 1991, 60, 297-306及び米国特許出願公開第2014/0227237A1号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第5, 019, 034号、同第5, 128, 257号、同第5, 137, 817号、同第5, 173, 158号、同第5, 232, 856号、同第5, 273, 525号、同第5, 304, 120号、同第5, 318, 514号、同第6, 010, 613号、及び同第6, 078, 490号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの当該技術分野で知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TILをパルス電場で処理して、TILの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を有する、少なくとも3つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたDC電気パルス列をTILに適用するステップを含み、少なくとも3つのDC電気パルス列は、以下の特徴のうちの1つ、2つ、または3つを有する：（1）少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス振幅が互いに異なる、（2）少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス幅が互いに異なる、及び（3）少なくとも3つのパルスのうちの2つの第1のセットの第1のパルス間隔が、少なくとも3つのパルスのうちの2つの第2のセットの第2のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TILをパルス電場で処理して、TILの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を有する、少なくとも3つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたDC電気パルス列をTILに適用するステップを含み、少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TILをパルス電場で処理して、TILの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を有する、少なくとも3つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたDC電気パルス列をTILに適用するステップを含み、少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つの第1のセットの第1のパルス間隔が、少なくとも3つのパルスのうちの2つの第2のセットの第2のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TILをパルス電場で処理して、TILにおける細孔形成を誘導するステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を有する、少なくとも3つのDC電気パルス列をTILに適用するステップを含み、少なくとも3つのDC電気パルス列は、以下の特徴のうちの1つ、2つ、または3つを有する：（1）少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス振幅が互いに異なる、（2）少なくとも3つのパルス

10

20

30

40

50

のうちの少なくとも2つのパルス幅が互いに異なる、及び(3)少なくとも3つのパルスのうちの2つの第1のセットの第1のパルス間隔が、少なくとも3つのパルスのうちの2つの第2のセットの第2のパルス間隔とは異なり、これにより、誘導された細孔が比較的長期間にわたって持続され、TILの生存率が維持される。

【0486】

いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法(リン酸カルシウムDNA沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス)は、当該技術分野で知られており、Graham and van der Eb, *Virology* 1973, 52, 456-467、Wigler, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979, 76, 1373-1376、及びChen and Okayama, *Mol. Cell. Biol.* 1987, 7, 2745-2752、ならびに米国特許第5,593,875号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-n, n, n-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)及びジオレイルホスホチジルエタノールアミン(DOPE)の1:1(w/w)リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Rose, et al., *Biotechniques* 1991, 10, 520-525及びFelgner, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 7413-7417、ならびに米国特許第5,279,833号、同第5,908,635号、同第6,056,938号、同第6,110,490号、同第6,534,484号、及び同第7,687,070号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、米国特許第5,766,902号、同第6,025,337号、同第6,410,517号、同第6,475,994号、及び同第7,189,705号に記載の方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0487】

ある実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。かかるプログラム可能なヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することによって正確なゲノム編集を可能にし、すなわち、ゲノム内の特定のDNA配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの位置に標的し、標的配列での二本鎖切断の生成を媒介する。DNAの二本鎖切断は、その後、内因性修復機構を切断部位に動員して、非相同末端結合(NHEJ)または相同指向修復(HDR)のいずれかによるゲノム編集を媒介する。したがって、切断の修復は、標的遺伝子産物を破壊する(例えば、サイレンス、抑制、または増強する)挿入/欠失変異の導入をもたらす可能性がある。

【0488】

部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)、転写活性化因子様ヌクレアーゼ(TALEN)、及びCRISPR関連ヌクレアーゼ(例えば、CRISPR/Cas9)が含まれる。これらのヌクレアーゼシステムは、DNA認識のモードに基づいて大きく2つのカテゴリーに分類され得、ZFN及びTALENは、タンパク質-DNA相互作用を介して特定のDNA結合を達成するが、Cas9などのCRISPRシステムは、標的DNAと直接塩基対を形成する短いRNAガイド分子によって、かつタンパク質-DNA相互作用によって特定のDNA配列を標的とする。例えば、Cox et al., *Nature Medicine*, 2015, Vol. 21, No. 2を参照されたい。

【0489】

本発明のTIL拡張法に従って使用され得る遺伝子編集法の非限定的な例には、CRI

S P R 法、T A L E 法、及び Z F N 法が含まれ、これらの実施形態は以下でより詳細に説明される。いくつかの実施形態によれば、T I L を治療用集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス 2 A）に従って、または P C T / U S 2 0 1 7 / 0 5 8 6 1 0、P C T / U S 2 0 1 8 / 0 1 2 6 0 5、もしくは P C T / U S 2 0 1 8 / 0 1 2 6 3 3 に記載されるように実行することができ、方法は、増強された治療効果を提供することができる T I L を生成するために、C R I S P R 法、T A L E 法、または Z F N 法のうちの 1 つ以上によって、T I L の少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。いくつかの実施形態によれば、遺伝子編集された T I L は、インビトロでそれらを修飾されていない T I L と比較することによって、例えば、修飾されていない T I L と比較してインビトロでのエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、治療効果の改善について評価され得る。

10

【0490】

本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、C R I S P R システム、T A L E N システム、及び Z F N システムなどの遺伝子編集システムの送達のために使用される。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、フローエレクトロポレーションシステムである。本発明のいくつかの実施形態との使用に好適な、好適なフローエレクトロポレーションシステムの例は、市販の M a x C y t e S T X システムである。本発明との使用に好適であり得る、B T X - H a r v a r d A p p a r a t u s から入手可能な A g i l e P u l s e システムもしくは E C M 8 3 0、C e l l a x e s s E l e k t r a (C e l l e c t r i c o n)、N u c l e o f e c t o r (L o n z a / A m a x a)、G e n e P u l s e r M X c e l l (B I O R A D)、i P o r a t o r - 9 6 (P r i m a x)、または s i P O R T e r 9 6 (A m b i o n) などのいくつかの代替の市販エレクトロポレーション機器が存在する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、T I L 拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、本明細書に記載のパルスエレクトロポレーションシステムであり、T I L 拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。

20

【0491】

a. C R I S P R 法

T I L を治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス 2 A）に従って、または P C T / U S 2 0 1 7 / 0 5 8 6 1 0、P C T / U S 2 0 1 8 / 0 1 2 6 0 5、もしくは P C T / U S 2 0 1 8 / 0 1 2 6 3 3 に記載されるように実行することができ、この方法は、C R I S P R 法（例えば、C R I S P R / C a s 9 または C R I S P R / C p f 1）によって、T I L の少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、T I L 拡張プロセス中の C R I S P R 法の使用は、1 つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の細胞表面での少なくとも 1 つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、1 つ以上の免疫チェックポイント遺伝子を治療的 T I L 集団の少なくとも一部においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、T I L 拡張プロセス中の C R I S P R 法の使用は、1 つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の細胞表面での少なくとも 1 つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、1 つ以上の免疫チェックポイント遺伝子を治療的 T I L 集団の少なくとも一部において増強させる。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、I L - 1 2、I L - 1 5、及び I L - 2 1 からなる群から選択される。

30

40

【0492】

C R I S P R は、「C l u s t e r e d R e g u l a r l y I n t e r s p a c e d S h o r t P a l i n d r o m i c R e p e a t s（クラスター化された定期的な間隔をあけた短いパリンドロミックリピート）」の略語である。遺伝子編集のために C R I S P R システムを使用する方法は、本明細書では C R I S P R 法とも称される。C R I S P R 系は、クラス 1 及びクラス 2 の 2 つの主要なクラスに分類され得、これらは、異

50

なるタイプ及びサブタイプにさらに分類される。CRISPR系の分類は、特定の核酸を切断することができるエフェクターCasタンパク質に基づいている。クラス1CRISPR系では、エフェクターモジュールは、マルチタンパク質複合体からなるが、クラス2の系は、1つのエフェクタータンパク質のみを使用する。クラス1CRISPRには、I型、III型、及びIV型が含まれ、クラス2CRISPRには、II型、V型、及びVI型が含まれる。これらの型のCRISPR系のうちのいずれかは、本発明に従って使用され得るが、RNA及びCasタンパク質を組み込み、かつ本発明に従って使用されることが好ましいCRISPR系には、3つの型：I型（Cas3によって例示される）、II型（Cas9によって例示される）、及びIII型（Cas10によって例示される）がある。II型CRISPRは、最もよく特徴付けられている系のうちの1つである。

10

【0493】

CRISPR技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然防御機構から適合された。これらの生物は、CRISPR由来のRNA及びCas9を含む様々なCasタンパク質を使用して、外来侵入物のDNAを切り刻んで破壊することによって、ウイルス及び他の異物による攻撃を阻止する。CRISPRは、ヌクレオチド反復配列及びスペーサーの存在という2つの異なる特徴を有するDNAの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、CRISPR領域全体に分布しており、外来DNA（スペーサー）の短いセグメントが反復配列の間に散在している。II型CRISPR/Casシステムでは、スペーサーは、CRISPRゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短いCRISPR RNA（crRNA）に処理される。これらのcrRNAは、トランス活性化crRNA（tracrRNA）にアニーリングし、Casタンパク質による病原性DNAの配列特異的切断及びサイレンシングを指示する。Cas9タンパク質による標的認識には、crRNA内の「シード」配列、及びcrRNA結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチドを含むプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列が必要である。これにより、CRISPR/Casシステムが再標的されて、crRNAを再設計することにより、実質的にいずれのDNA配列も切断することができる。したがって、ある特定の形態によれば、Cas9は、crRNA-tracrRNA認識時にDNAを切断するRNA誘導DNAエンドヌクレアーゼとして機能する。天然システムにおけるcrRNA及びtracrRNAは、遺伝子操作で使用するために、およそ100ヌクレオチドの単一ガイドRNA（sgRNA）に簡略化され得る。sgRNAは、Cas結合に必要な足場配列と、修飾されるゲノム標的を定義するユーザ定義のおよそ17~20ヌクレオチドスペーサーとを含む合成RNAである。したがって、ユーザは、sgRNAに存在する標的配列を変更することによって、Casタンパク質のゲノム標的を変更することができる。CRISPR/Cas系は、Cas9エンドヌクレアーゼを発現するプラスミドとRNA成分（例えば、sgRNA）を同時送達することにより、ヒト細胞に直接運搬可能である。Casタンパク質の異なるバリエーション（例えば、Cpf1などのCas9のオルソログ）を使用して、標的の制限を低減することができる。

20

30

【0494】

いくつかの実施形態によれば、操作された、プログラム可能な、天然に存在しないIII型CRISPR-Cas系は、Cas9タンパク質及びTILにおいてDNA分子の標的配列を標的とし、それにハイブリダイズする少なくとも1つのガイドRNAを含み、DNA分子が少なくとも1つの免疫チェックポイント分子をコードし、TILが少なくとも1つの免疫チェックポイント分子を発現し、Cas9タンパク質がDNA分子を切断し、それによって、少なくとも1つの免疫チェックポイント分子の発現が改変され、Cas9タンパク質及びガイドRNAが、天然に一緒に存在しない。ある実施形態によれば、2つ以上の免疫チェックポイント分子の発現が改変される。ある実施形態によれば、ガイドRNA（複数可）は、tracrRNA配列に融合したガイド配列を含む。例えば、ガイドRNAは、crRNA-tracrRNAまたはsgRNAを含み得る。本発明の態様によれば、「ガイドRNA」、「単一ガイドRNA」及び「合成ガイドRNA」という用語は、互換的に使用され得、ガイド配列を含むポリヌクレオチド配列を指し、これは、標的部位を特

40

50

定するガイドRNA内の約17～20bpの配列である。

【0495】

Cas9と比較して改善されたオンターゲット特異性を有するCas9のバリエーションもまた、本発明の実施形態に従って使用され得る。そのようなバリエーションは、高忠実度Cas9と称され得る。ある実施形態によれば、デュアルニッカーゼアプローチを利用してよく、反対のDNA鎖を標的とする2つのニッカーゼは、標的DNA内でDSBを生成する（多くの場合、ダブルニッカーゼまたはデュアルニッカーゼCRISPR系と称される）。例えば、このアプローチは、2つのCas9ヌクレアーゼドメインのうちの1つの変異を伴い、Cas9をヌクレアーゼからニッカーゼに変えることを伴い得る。高忠実度Cas9の非限定的な例としては、eSpCas9、SpCas9-HF1及びHypaCas9が挙げられる。そのようなバリエーションは、非標的DNA部位における望ましくない変化を低減または排除し得る。例えば、Slaymaker IM, et al. Science. 2015 Dec 1、Kleinstiver BP, et al. Nature. 2016 Jan 6、及びRan et al., Nat Protoc. 2013 Nov; 8(11): 2281-2308（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

10

【0496】

追加として、特定の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2016/0102324号に開示されているものなどの、細胞へのCas9の遺伝子送達を改善し、標的特異性を改善する、Cas9足場を使用することができる。例えば、Cas9足場は、(D-[I/L]-G-X-X-S-X-G-W-A)によって定義されるRuvCモチーフ及び／または(Y-X-X-D-H-X-X-P-X-S-X-X-X-D-X-S)によって定義されるHNHモチーフを含んでよく、Xは、20個の天然に存在するアミノ酸のうちのいずれか1つを表し、[I/L]は、イソロイシンまたはロイシンを表す。HNHドメインは、標的dsDNAの一方の鎖をニッキングすることに関与し、RuvCドメインは、dsDNAの他方の鎖の切断に関与する。したがって、これらのドメインの各々は、PAMのすぐ近くのプロトスペーサー内の標的DNAの鎖をニックし、DNAの鈍い切断をもたらす。これらのモチーフを互いに組み合わせ、よりコンパクト及び／またはより特異的なCas9足場を作製してもよい。さらに、モチーフを使用して、分割されたCas9タンパク質（すなわち、RuvCドメインまたはHNHドメインのいずれかを含むCas9タンパク質またはCas9バリエーションの還元型または切断型）を作製してもよく、分割されたCas9タンパク質は、2つの別個のRuvCドメイン及びHNHドメインに分割され、標的DNAと一緒にまたは別個に処理することができる。

20

30

【0497】

特定の実施形態によれば、CRISPR法は、Cas9ヌクレアーゼ及び免疫チェックポイント遺伝子（複数可）の標的DNA配列に特異的なおよそ17～20ヌクレオチドの配列を含むガイドRNA（例えば、crRNA-tracrRNAまたはsgRNA）を導入することによって、TILにおける1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。ガイドRNAは、RNAとして、またはプロモーターの下でガイドRNAコード配列を有するプラスミドを形質転換することによって送達されてもよい。CRISPR/Cas酵素は、sgRNAにより定義された標的配列に基づいて、特定の位置に二本鎖切断（DSB）を導入する。DSBは、DNAの挿入または欠失（インデル）を頻繁に引き起こす機序である、非相同末端結合（NHEJ）によって細胞内で修復され得る。インデルは、多くの場合、フレームシフトをもたらす、例えば、標的遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）内で早期停止コドンを引き起こすことによって、機能対立遺伝子の喪失を引き起こす。ある特定の実施形態によれば、結果は、標的免疫チェックポイント遺伝子内の機能喪失変異である。

40

【0498】

あるいは、CRISPR/Cas酵素によって誘導されるDSBは、NHEJの代わり

50

に相同性指向修復（HDR）によって修復されてもよい。NHEJ媒介DSB修復は、しばしば遺伝子のオープンリーディングフレームを破壊するが、相同指向修復（HDR）を使用して、単一ヌクレオチド変化から大きな挿入までの範囲の特異的なヌクレオチド変化を生成することができる。ある実施形態によれば、HDRは、sgRNA（複数可）及びCas9またはCas9ニッカーゼを有するTILに所望の配列を含むDNA修復テンプレートを送達することによって、免疫チェックポイント遺伝子を遺伝子編集するために使用される。修復テンプレートは、好ましくは、所望の編集、ならびに標的遺伝子のすぐ上流及び下流の追加の相同配列（多くの場合、左及び右の相同アームと称される）を含む。

【0499】

特定の実施形態によれば、酵素的に不活性なバージョンのCas9（dead Cas9またはdCas9）は、開始を遮断することによって転写を抑制するために、転写開始部位を標的とし得る。したがって、標的とされた免疫チェックポイント遺伝子は、DSBを使用せずに抑制され得る。dCas9分子は、sgRNA標的化配列に基づいて標的DNAに結合する能力を保持している。本発明のある実施形態によれば、CRISPR法は、標的遺伝子（複数可）の転写を阻害または防止することによって、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。例えば、CRISPR法は、Kruppel関連ボックス（KRAB）ドメインなどの転写リプレッサードメインをCas9の酵素不活性バージョンに融合させ、それによって、例えば、免疫チェックポイント遺伝子の転写開始部位を標的とするdCas9-KRABを形成し、遺伝子の転写の阻害または防止をもたらすことを含み得る。好ましくは、リプレッサードメインは、転写開始部位の下流、例えば、約500bp下流のウィンドウを標的とする。CRISPR干渉（CRISPRi）と称され得るこのアプローチは、標的RNAの転写還元を介して堅牢な遺伝子ノックダウンをもたらす。

【0500】

特定の実施形態によれば、酵素的に不活性なバージョンのCas9（dead Cas9またはdCas9）は、転写を活性化するために、転写開始部位を標的とし得る。このアプローチは、CRISPR活性化（CRISPRa）と称され得る。ある実施形態によれば、CRISPR法は、標的遺伝子（複数可）の転写を活性化することによって1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を増加させることを含む。そのような実施形態によれば、標的とされた免疫チェックポイント遺伝子は、DSBを使用せずに活性化され得る。CRISPR法は、例えば、VP64などの転写活性化因子をdCas9に融合させ、それによって例えば、免疫チェックポイント遺伝子の転写開始部位を標的とするdCas9-VP64を形成することによって、転写活性化ドメインを転写開始部位に標的化することを含み得、遺伝子の転写の活性化をもたらす。好ましくは、活性化因子ドメインは、転写開始部位から上流のウィンドウ、例えば、約50～400bp下流を標的とする。

【0501】

本発明の追加の実施形態は、哺乳動物細胞における標的遺伝子の強力な活性化のために開発された活性化戦略を利用し得る。非限定的な例としては、エピトープタグ付きdCas9及び抗体活性化剤エフェクタータンパク質（例えば、SunTag系）の共発現、複数の異なる活性化ドメインに直列に融合したdCas9（例えば、dCas9-VP64）、またはdCas9-VP64と修飾された足場gRNA及び追加のRNA結合ヘルパー活性化因子（例えば、SAM活性化因子）との共発現が挙げられる。

【0502】

他の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第9,982,278号に開示されるように、CRISPR支援合理的タンパク質操作（CARPE）と称されるCRISPR媒介ゲノム編集方法を、本発明の実施形態に従って使用してもよい。CARPEは、一本鎖DNA（ssDNA）または二本鎖DNA（dsDNA）編集カセットからの指向性変異をゲノムに直接組み込む「ドナー」及び「デスティネーション」ライブラリーの生成を伴う。ドナーライブラリーの構築は、標的DNA配列にハイブリダイズするガイドRNA（gRNA）を用いて、合理的に設計された編集オリゴヌクレオチ

ドを細胞に同時形質転換することを伴う。編集オリゴヌクレオチドは、PAMの欠失または変異を、隣接遺伝子内の1つ以上の所望のコドンの変異とカップリングするように設計される。これにより、ドナーライブラリー全体を単一の形質転換で生成することができる。ドナーライブラリーは、編集オリゴヌクレオチドからの合成特徴、すなわち、遺伝子の3'末端に同時に組み込まれる第2のPAM欠失または変異を使用して、PCR反応などによる組換え染色体の増幅によって回収される。これは、PAM欠失に指向されたコドン標的変異を共有結合する。次いで、ドナーライブラリーを、デスチネーションgRNAベクターを有する細胞に同時形質転換して、合理的に設計されたタンパク質ライブラリーを発現する細胞の集団を作製する。

【0503】

10

他の実施形態によれば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9,982,278号に開示されるように、追跡可能なCRISPR濃縮組換えによるゲノム操作(Gen-TraceR)と称されるCRISPR媒介系を使用する、追跡可能な精密ゲノム編集のための方法を、本発明の実施形態に従って使用してもよい。Gen-TraceR方法及びベクターは、編集カセットを、単一のベクター上のgRNAをコードする遺伝子と組み合わせる。カセットは、所望の変異及びPAM変異を含有する。Cas9もコードし得るベクターは、細胞または細胞集団に導入される。これは、細胞または細胞集団におけるCRISPR系の発現を活性化し、gRNAにCas9を標的領域に動員させ、dsDNA切断が発生し、PAM変異の組み込みを可能にする。

【0504】

20

CRISPR法によりTILを永続的に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、CD39、CD69、PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2(TIM-3)、Cish、TGFB、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、及びTOXが含まれる。

30

【0505】

CRISPR法によりTILを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18、IL-21、NOTCH1/2細胞内ドメイン(ICD)、及び/またはNOTCHリガンドmDLL1が含まれる。

【0506】

CRISPR法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第8,697,359号、同第8,993,233号、同第8,795,965号、同第8,771,945号、同第8,889,356号、同第8,865,406号、同第8,999,641号、同第8,945,839号、同第8,932,814号、同第8,871,445号、同第8,906,616号、及び同第8,895,308号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。CRISPR/Cas9及びCRISPR/Cpf1を発現するためのプラスミドなどのCRISPR法を行うための資源は、GenScriptなどの企業から市販されている。

40

【0507】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のTIL集団の遺伝子修飾は、米国特許第US9790490号に記載されているCRISPR/Cpf1システムを使用して行うこ

50

とができ、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。C R I S P R / C p f 1系は、C p f 1関連C R I S P Rアレイが追加のt r a c r R N Aを必要とすることなく成熟したc r R N Aに処理されるという点で、C R I S P R - C a s 9系とは機能的に異なる。C R I S P R / C p f 1系で使用されるc r R N Aは、スパーサーまたはガイド配列及び直接反復配列を有する。この方法を使用して形成されるC p f 1 p - c r R N A複合体は、それ自体で標的D N Aを切断するのに十分である。

【0508】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を治療的T I L集団に拡張するための方法は、

（a）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のT I L集団を取得することと、

（b）任意選択で、腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（c）（a）の第1のT I L集団からC D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O}及び／またはC D 3 9 / C D 6 9二重陰性T I Lを選択して、C D 3 9 / C D 6 9二重陰性濃縮T I L集団を取得することと、

（d）I L - 2を含み、任意選択でO K T - 3及び／または4 - 1 B Bアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第1のT I L集団を約3～11日間培養することによって第1の拡張を行い、第2のT I L集団を産生することであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第2のT I L集団を産生することと、

（e）O K T - 3を添加し、約1～3日間培養することによって、第2のT I L集団を刺激することであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、刺激することと、

（f）第2のT I L集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも1つの遺伝子エディターを第2のT I L集団の複数の細胞に移入させることと、

（g）第2のT I L集団を約1日間静置することと、

（h）第2のT I L集団の細胞培養培地を追加のI L - 2、任意選択でO K T - 3抗体、任意選択でO X 4 0抗体、及び抗原提示細胞（A P C）で補充することによって第2の拡張を行い、第3のT I L集団を産生することであって、第2の拡張が、約7～11日間行われて、第3のT I L集団を取得し、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（g）からステップ（h）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のT I L集団を産生することと、

（i）ステップ（h）から取得された治療的T I L集団を採取して、採取されたT I L集団を提供することであって、ステップ（h）からステップ（i）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたT I L集団が、治療的T I L集団である、採取することと、

（j）採取されたT I L集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（i）から（j）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

（k）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたT I L集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップは、クラスター化規則的散在短回文反復（C R I S P R） / C a s 9系及びC R I S P R / C p f 1系からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも1つの遺伝子エディターは、C D 3 9及びC D 6 9の発現を低減する。

【0509】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を治療的T I L集団に拡張するための方法は、

（a）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のT I L集団を取得することと、

（b）任意選択で、腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（c）（a）の第1のT I L集団からC D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O}及び／またはC D 3

10

20

30

40

50

9 / C D 6 9 二重陰性 T I L を選択して、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団を取得することと、

(d) I L - 2 を含み、任意選択で O K T - 3 及び / または 4 - 1 B B アゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を約 3 ~ 1 1 日間培養することによって第 1 の拡張を行い、第 2 の T I L 集団を産生することであって、第 1 の拡張が、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第 2 の T I L 集団を産生することと、

(e) O K T - 3 を添加し、約 1 ~ 3 日間培養することによって、第 2 の T I L 集団を刺激して、第 2 の T I L 集団を取得することであって、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第 2 の T I L 集団を取得することと、

(f) 第 2 の T I L 集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも 1 つの遺伝子エディターを第 2 の T I L 集団の複数の細胞に移入させることと、

(g) 第 2 の T I L 集団を約 1 日間静置することと、

(h) 第 2 の T I L 集団の細胞培養培地を追加の I L - 2、任意選択で O K T - 3 抗体、任意選択で O X 4 0 抗体、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡張を行い、第 3 の T I L 集団を産生することであって、第 2 の拡張が、約 7 ~ 1 1 日間行われて、第 3 の T I L 集団を取得し、第 2 の拡張が、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ (g) からステップ (h) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第 3 の T I L 集団を産生することと、

(i) ステップ (h) から取得された治療的 T I L 集団を採取して、採取された T I L 集団を提供することであって、ステップ (h) からステップ (i) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取された T I L 集団が、治療的 T I L 集団である、採取することと、

(j) 採取された T I L 集団を注入バッグに移すことであって、ステップ (i) から (j) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

(k) 任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取された T I L 集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップは、クラスター化規則的散在短回文反復 (C R I S P R) / C a s 9 系及び C R I S P R / C p f 1 系からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも 1 つの遺伝子エディター系は、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減する。

【0510】

b. T A L E 法

T I L を治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態 (例えば、プロセス 2 A) に従って、または P C T / U S 2 0 1 7 / 0 5 8 6 1 0、P C T / U S 2 0 1 8 / 0 1 2 6 0 5、もしくは P C T / U S 2 0 1 8 / 0 1 2 6 3 3 に記載されるように実行することができ、この方法は、T A L E 法によって T I L の少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、T I L 拡張プロセス中の T A L E 法の使用は、細胞表面での少なくとも 1 つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、1 つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的 T I L 集団の少なくとも一部においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、T I L 拡張プロセス中の T A L E 法の使用は、細胞表面での少なくとも 1 つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、1 つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的 T I L 集団の少なくとも一部において増強させる。

【0511】

T A L E は、T A L E N (「転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ」) を含む、「T r a n s c r i p t i o n A c t i v a t o r - L i k e E f f e c t o r (転写活性化因子様エフェクター)」タンパク質の略語である。遺伝子編集のために T A L E システムを使用する方法は、本明細書では T A L E 法とも称され得る。T A L E は、植物病原菌 X a n t h o m o n a s 属由来の天然に存在するタンパク質であり、各々単一の塩

10

20

30

40

50

基対を認識する一連の33～35アミノ酸反復ドメインで構成されるDNA結合ドメインを含む。T A L E特異性は、反復可変二残基（RVD）として知られる2つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラーT A L E反復配列は、隣接するDNA配列を認識するために一緒に結合される。DNA結合ドメイン内の特定のRVDは、標的遺伝子座内の塩基を認識し、予測可能なDNA結合ドメインを組み立てるための構造的特徴を提供する。T A L EのDNA結合ドメインは、IIS型FokIエンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合して、標的可能なT A L Eヌクレアーゼを作製する。部位特異的変異を誘導するために、14～20塩基対のスペーサー領域によって分離された2つの個々のT A L E NアームがFokIモノマーを密接に接近させて二量体化し、標的とされる二本鎖切断を産生する。

10

【0512】

様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模な系統的研究により、T A L E反復配列を組み合わせて、実質的にすべてのユーザ定義配列を認識することができることが示されている。カスタムT A L Eアレイの迅速な組み立てを可能にする戦略には、ゴールデンゲート分子クローニング、高スループット固相組み立て、及びライゲーション非依存性クローニング技術が含まれる。カスタム設計されたT A L Eアレイも、Collectis Bioresearch (Paris, France)、Transposagen Biopharmaceuticals (Lexington, KY, USA)、及びLife Technologies (Grand Island, NY, USA)から市販されている。追加として、所望の標的のためのカスタムT A L Eフェクター反復アレイの設計を可能にし、また、予測されるT A L Eフェクター結合部位を提供する、T A L Eフェクターヌクレオチドターゲット2.0などのウェブベースのツールが利用可能である。Doyle, et al., Nucleic Acids Research, 2012, Vol. 40, W117-W122を参照されたい。本発明での使用に好適なT A L E法及びT A L E N法の例は、米国特許公開第US2011/0201118A1号、同第US2013/0117869A1号、同第US2013/0315884A1号、同第US2015/0203871A1号、同第US2016/0120906A1号に記載されており、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0513】

本発明のいくつかの実施形態によれば、T A L E法は、標的遺伝子（複数可）の転写を阻害または防止することによって、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。例えば、T A L E法は、KRAB-T A L Eを利用することを含み得、この方法は、転写Kruppel関連ボックス（KRAB）ドメインを、遺伝子の転写開始部位を標的とするDNA結合ドメインに融合することを含み、遺伝子の転写の阻害または防止につながる。

30

【0514】

他の実施形態によれば、T A L E法は、標的遺伝子（複数可）に変異を導入することによって1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。例えば、T A L E法は、FokIなどのヌクレアーゼエフェクタードメインをT A L E DNA結合ドメインに融合させ、T A L E Nをもたらすことを含む得る。FokIは、二量体として活性であり、したがって、この方法は、F O K Lヌクレアーゼドメインを隣接するゲノム標的部位に位置決めするためのT A L E N対を構築することを含み、DNA二本鎖切断を導入する。FokIの正しい位置決め及び二量体化後、二本鎖切断が完了し得る。二本鎖切断が導入されると、DNA修復は、高忠実度相同組換え対（HRR）（相同性指向修復またはHDRとしても知られる）またはエラーが発生しやすい非同源性末端結合（NHEJ）の2つの異なる機序を介して達成することができる。NHEJを介した二本鎖切断の修復は、好ましくは、DNA標的部位の欠失、挿入または置換をもたらす、すなわち、NHEJは、典型的には、切断部位での小さな挿入及び欠失の導入をもたらす、多くの場合、遺伝子機能をノックアウトするフレームシフトを誘導する。特定の実施形態によれば、T A L E N対は、遺伝子の最5'エクソンを標的とし、早期フレ

40

50

ームシフト変異または早期停止コドンを促進する。T A L E Nによって導入される遺伝子変異（複数可）は、好ましくは永続的である。したがって、いくつかの実施形態によれば、この方法は、二量体化T A L E Nを利用して、エラーが発生しやすいN H E Jを介して修復される部位特異的二本鎖切断を誘導し、標的免疫チェックポイント遺伝子に1つ以上の変異をもたらすことによって、免疫チェックポイント遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。

【0515】

追加の実施形態によれば、T A L E Nは、非ランダム点変異、標的欠失、またはDNA断片の付加などのH R Rを介して遺伝子改変を導入するために利用される。DNA二本鎖切断の導入は、好適なドナーDNAの存在下での相同組換えを介した遺伝子編集を可能にする。いくつかの実施形態によれば、この方法は、部位特異的二本鎖切断を誘導し、1つ以上の導入遺伝子をDNAに組み込むために、二量体化T A L E N及び遺伝子座特異的相同性アームを有するドナープラスミドを同時送達することを含む。

【0516】

他の実施形態によれば、米国特許公開第2011/0201118号に開示されているように、F o k I及びA v r X a 7に由来するハイブリッドタンパク質であるT A L E Nを、本発明の実施形態に従って使用してもよい。このT A L E Nは、A v r X a 7の標的ヌクレオチド及びF o k Iの二本鎖DNA切断活性に対する認識特異性を保持する。同じ方法を使用して、異なる認識特異性を有する他のT A L E Nを調製することができる。例えば、コンパクトT A L E Nは、DNA結合特異性を変化させ、特定の単一のd s DNA標的配列を標的とするために、R V Dの異なるセットを有するコアT A L E足場を操作することによって生成され得る。米国特許公開第2013/0117869号を参照されたい。触媒ドメインの選択は、DNA処理をもたらすために足場に付着させることができ、これは、触媒ドメインが、コアT A L E足場に融合されたときに、単一のd s DNA標的配列の近くでDNAを処理することができることを確実にするように操作され得る。ペプチドリンカーはまた、触媒ドメインを足場に融合させて、特定の単一のd s DNA配列を標的とするために二量体化を必要としない単一のポリペプチド鎖からなるコンパクトなT A L E Nを作製するように操作されてもよい。コアT A L E足場はまた、T A Lモノマーであり得る触媒ドメインをそのN末端に融合させることによって修飾され得、この触媒ドメインが別のT A Lモノマーに融合された別の触媒ドメインと相互作用する可能性を可能にし、それによって標的配列の近傍でDNAを処理する可能性が高い触媒エンティティを作製する。米国特許公開第2015/0203871号を参照されたい。このアーキテクチャは、1つのDNA鎖のみを標的とすることを可能にするが、これは古典的なT A L E Nアーキテクチャの選択肢ではない。

【0517】

本発明のある実施形態によれば、従来のR V Dを使用して、遺伝子発現を大幅に低減することができるT A L E Nを作製してもよい。ある実施形態では、4つのR V D、N I、H D、N N、及びN Gを使用して、それぞれ、アデニン、シトシン、グアニン、及びチミンを標的とする。これらの従来のR V Dを使用して、例えば、P D-1遺伝子を標的とするT A L E Nを作製することができる。従来のR V Dを使用するT A L E Nの例としては、G a u t r o n e t a l., M o l e c u l a r T h e r a p y : N u c l e i c A c i d s D e c. 2017, V o l. 9: 312-321 (G a u t r o n) (これは参照により本明細書に組み込まれる)に開示されているT 3 v 1及びT 1 T A L E Nが挙げられる。T 3 v 1及びT 1 T A L E Nは、P D-L 1結合部位が位置するP D C D 1遺伝子座の第2のエクソンを標的とし、P D-1産生を著しく低減することができる。ある実施形態では、T 1 T A L E Nは、標的配列番号238を使用することによってそれを行い、T 3 v 1 T A L E Nは、標的配列番号239を使用することによってそれを行う。

【0518】

他の実施形態によれば、T A L E Nは、G a u t r o nに開示されるような、標的遺伝

子に対するそれらの活性及び特異性を改善するために、非従来型 RVD を使用して修飾される。天然に存在する RVD は、超可変アミノ酸位置の潜在的な多様性レパートリーのごく一部のみをカバーする。非従来型 RVD は、天然の RVD の代替物を提供し、T A L E N によるオフサイト標的（標的配列に対していくつかのミスマッチを含むゲノム内の配列）の標的化を除外するために使用され得る、新規の固有の標的化特異性特徴を有する。非従来型 RVD は、Juillerat, et al., Scientific Reports 5, Article Number 8150 (2015)（これは参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるようなアレイの定義された位置における 2 つの超可変アミノ酸位置にアミノ酸の代替組み合わせを含む T A L E N の集合を生成及びスクリーニングすることによって同定され得る。次に、ミスマッチの位置に存在するヌクレオチドを区別する非従来型 RVD を選択してもよく、これにより、標的位置の適切な処理を依然として可能にしながら、オフサイト配列での T A L E N 活性を防止することができる。次いで、選択された非従来型 RVD は、T A L E N 内の従来の RVD を置き換えるために使用され得る。従来の RVD が非従来型 RVD に置き換えられた T A L E N の例としては、Gautron によって産生された T3v2 及び T3v3 PD-1 T A L E N が挙げられる。これらの T A L E N は、従来の RVD を使用した T A L E N と比較した場合、特異性が増加していた。

【0519】

追加の実施形態によれば、T A L E N を利用して、2 つの遺伝子の発現をサイレンシングまたは減少させるための遺伝子改変を導入してもよい。例えば、2 つの異なる遺伝子を標的とするために 2 つの別個の T A L E N を生成し、次いで一緒に使用してもよい。2 つの T A L E N によってそれぞれの遺伝子座及び潜在的なオフターゲット部位で生成される分子事象は、ハイスループット DNA 配列決定によって特徴付けられ得る。これにより、オフターゲット部位の分析、及び両方の T A L E N の使用から生じる可能性のある部位の特定が可能になる。この情報に基づいて、一緒に使用されても特異性及び活性が増加した T A L E N を操作するために、適切な従来型及び非従来型の RVD が選択され得る。例えば、Gautron は、T3v4 PD-1 及び TRAC T A L E N を併用して、強力なインビトロ抗腫瘍機能を維持したダブルノックアウト CAR T 細胞を産生することを開示する。

【0520】

いくつかの実施形態では、Gautron の方法または本明細書に記載の他の方法は、T I L を遺伝子編集するために用いられてもよく、この T I L は、次いで、本明細書に記載の手順のうちのいずれかによって拡張されてもよい。ある実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を治療的 T I L 集団に拡張するための方法は、

（a）CD3 及び CD28 活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得された T I L の第 1 の集団を 1 ～ 5 日間活性化するステップと、

（b）（a）の第 1 の T I L 集団から CD39^{LO} / CD69^{LO} 及び / または CD39 / CD69 二重陰性 T I L を選択して、CD39 / CD69 二重陰性濃縮 T I L 集団を取得するステップと、

（c）転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼのエレクトロポレーションを使用して第 1 の T I L 集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第 2 の T I L 集団を取得するステップであって、遺伝子編集が、第 2 の T I L 集団の細胞の一部において CD39 及び CD69 を低減する、第 2 の T I L 集団を取得するステップと、

（d）任意選択で、第 2 の T I L 集団をインキュベートするステップと、

（e）IL-2、及び任意選択で OKT-3 を含む細胞培養培地中で第 2 の T I L 集団を培養することによって第 1 の拡張を行い、第 3 の T I L 集団を産生するステップであって、第 1 の拡張が、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第 1 の拡張が、約 3 ～ 14 日間行われて、第 3 の T I L 集団を取得するステップと、

（f）第 3 の T I L 集団の細胞培養培地を追加の IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第 2 の拡張を行い、第 4 の T I L 集団を産生する

ステップであって、第2の拡張が、約7～14日間行われて、第4のTIL集団を取得し、第4のTIL集団が、治療的TIL集団である、第4のTIL集団を産生するステップと、

(g) ステップ(f) から取得された治療的TIL集団を採取するステップと、

(h) ステップ(g) からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(f) から(g) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含み、

(i) ステップ(a) ～(h) のうちの1つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。

【0521】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法は、

(a) CD3及びCD28活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたTILの第1の集団を1～5日間活性化するステップと、

(b) (a) の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) サイトポレーション培地中の転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼのエレクトロポレーションを使用して第1のTIL集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第2のTIL集団を取得するステップであって、遺伝子編集が、第2のTIL集団の細胞の一部においてCD39及びCD69の発現を低減する、第2のTIL集団を取得するステップと、

(d) 任意選択で、第2のTIL集団をインキュベートするステップと、

(e) IL-2、及び任意選択でOKT-3を含む細胞培養培地中で第2のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約6～9日間行われて、第3のTIL集団を取得するステップと、

(f) 第3のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第4のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約9～11日間行われて、第4のTIL集団を取得し、第4のTIL集団が、治療的TIL集団である、第4のTIL集団を産生するステップと、

(g) ステップ(f) から取得された治療的TIL集団を採取するステップと、

(h) ステップ(f) からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ(f) から(g) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含み、

(i) ステップ(a) ～(h) のうちの1つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。

【0522】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法は、

(a) CD3及びCD28活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたTILの第1の集団を1～5日間活性化するステップと、

(b) (a) の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

(c) サイトポレーション培地中の転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼのエレクトロポレーションを使用して第1のTIL集団の少なくとも一部を遺伝子編集して、第2のTIL集団を取得するステップであって、遺伝子編集が、第2のTIL集団の細胞の一部においてCD39及びCD69の発現を低減する、第2のTIL集団を取得するステップと、

(d) 任意選択で、第2のTIL集団をインキュベートするステップであって、インキ

10

20

30

40

50

ュベーションが、約 30～40℃で、約 5%の CO₂で行われる、インキュベートするステップと、

(e) IL-2、及び任意選択で OKT-3 を含む細胞培養培地中で第 2 の TIL 集団を培養することによって第 1 の拡張を行い、第 3 の TIL 集団を産生するステップであって、第 1 の拡張が、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第 1 の拡張が、約 6～9 日間行われて、第 3 の TIL 集団を取得するステップと、

(f) 第 3 の TIL 集団の細胞培養培地を追加の IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞 (APC) で補充することによって第 2 の拡張を行い、第 4 の TIL 集団を産生するステップであって、第 2 の拡張が、約 9～11 日間行われて、第 4 の TIL 集団を取得し、第 4 の TIL 集団が、治療的 TIL 集団である、第 4 の TIL 集団を産生するステップと、

10

(g) ステップ (f) から取得された治療的 TIL 集団を採取するステップと、

(h) ステップ (f) からの採取された TIL 集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ (f) から (g) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含み、

(i) ステップ (a)～(h) のうちの 1 つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。

【0523】

他の実施形態によれば、TALEN は特異的に設計されてもよく、これにより、遺伝子の特異的選択を標的とすることができる標的細胞 (複数可) 内の、より高い割合の DSB 事象が可能になる。米国特許公開第 2013/0315884 号を参照されたい。そのようなまれな切断エンドヌクレアーゼの使用は、トランスフェクトされた細胞内で標的遺伝子の二重不活性化を得る可能性を高め、T 細胞などの操作された細胞の産生を可能にする。さらに、変異誘発を増加させ、標的遺伝子不活性化を強化するために、追加の触媒ドメインを TALEN で導入することができる。米国特許公開第 2013/0315884 号に記載されている TALEN は、免疫療法に適するように T 細胞を操作するために首尾よく使用された。TALEN を使用して、単一の T 細胞内の少なくとも 2 つの遺伝子の不活性化を含む、T 細胞内の様々な免疫チェックポイント遺伝子を不活性化することもできる。米国特許公開第 2016/0120906 号を参照されたい。追加として、TALEN を使用して、参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第 2018/0021379 号に開示されるように、免疫抑制剤及び T 細胞受容体の標的をコードする遺伝子を不活性化することができる。さらに、TALEN は、米国特許公開第 2019/0010514 号 (これは参照により本明細書に組み込まれる) に開示されるように、ベータ 2-ミクログロブリン (B2M) 及び/またはクラス II 主要組織適合性複合体トランスアクチベーター (CIITA) の発現を阻害するために使用され得る。

20

30

【0524】

TALE 法により TIL を永続的に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、CD39、CD69、PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、Cish、TGFB β 、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、及び GUCY1B3 が含まれる。

40

【0525】

PD-1 遺伝子を標的とする TALE ヌクレアーゼの非限定的な例を、以下の表に提供する。これらの実施例では、標的化ゲノム配列は、15 bp のスペーサー (小文字で示される) によって分離された 2 つの 17 塩基対 (bp) の長い配列 (大文字で示される、半

50

分の標的と称される)を含有する。各半分の標的は、表に列挙される半分のT A L Eヌクレアーゼの反復によって認識される。したがって、特定の実施形態によれば、本発明によるT A L Eヌクレアーゼは、配列番号238及び配列番号239からなる群から選択される標的配列を認識し、切断する。T A L E N配列及び遺伝子編集方法はまた、上述のG a u t r o nに記載されている。

【0526】

【表4-1】

表44-T A L E N P D-1配列。

TALEN PD-1 No.1 配列	
標的 PD-1 配列 (配列番号 238)	TTCTCCCCAGCCCTGCT cgtggtgaccgaagg GGACAACGCCACCTTCA
反復 PD-1-左 (配列番号 240)	LTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIAS HDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALET VQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAI ASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQAL ETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQALLPVLC QAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQV VAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGK QALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLP VLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTP QQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHD GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGGRPALE
反復 PD-1-右 (配列番号 241)	LTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIAS NIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETV QALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQA HGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAI ASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQAL ETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLC QAHGLTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVV AIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQ ALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPV LCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQ QVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDG GKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGGRPALE

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

PD-1-左 TALEN (配列番号 244)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATA CGATGTTCCAGATTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGCACGC TCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGT TCGTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCACG GGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCA GCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGC GTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAA CAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGC GGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAA CTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGC AGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACT TGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGC AAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTG CCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCA GCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCT GTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGG TGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGA GACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCT TGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGG CAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC AGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGC TGTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGG AGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGC TTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCG GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCT GTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCG CCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTGACGGC GCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCT GGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACG GCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGC GGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTG TGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATC GCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGC

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

	GGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGAG CAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGC TGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCAC GGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGG TGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTG CTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCAT CGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAG CGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCACGGCTTGACCCCGGA GCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCG CTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCA CGGCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCG GCGGCAGGCCGGCGCTGGAGAGCATTGTTGCCCAGTTATCTCGC CCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGC CTTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAA AGGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCC GAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGT ACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCGGAAC AGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTT CATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCC AGGAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCCATCGA CTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACA ACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGA GGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGG TGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTT CGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCCAGCTGACCA GGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCCGTGCTGTCCGTG GAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCC TGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGAT CAACTTCGCGGCCGACTGATAA

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

PD-1-右 TALEN (配列番号 245)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGA CCGCCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGA TATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGG AGAAGATCAAACCGAAGGTTCGTTTCGACAGTGGCGCAGCACCA CGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTG CGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAG TATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAG CGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTG GAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTT ACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCG GCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACT GACGGGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCCCAGCAAGTCGTCGAA TCGCCAGCAATAACGGAGGGAAGCAAGCCCTCGAAACCGTGCA GCGGTTGCTTCCTGTGCTCTGCCAGGCCACGGCCTTACCCCTGA GCAGGTGGTGGCCATCGCAAGTAACATTGGAGGAAAGCAAGCC TTGGAGACAGTGCAGGCCCTGTTGCCCGTGCTGTGCCAGGCACA CGGCCTCACACCAGAGCAGGTGCTGGCCATTGCCTCCAACATCG GGGGAAACAGGCTCTGGAGACCGTCCAGGCCCTGCTGCCCGTC CTCTGTCAAGCTCACGGCCTGACTCCCCAACAAGTGGTCGCCAT CGCCTCTAATAACGGCGGGAAGCAGGCACTGGAAACAGTGCAG AGACTGCTCCCTGTGCTTTGCCAAGCTCATGGGTTGACCCCCCA ACAGGTCGTCGCTATTGCCTCAAACAACGGGGGCAAGCAGGCC CTTGAGACTGTGCAGAGGCTGTTGCCAGTGCTGTGTCAGGCTCA CGGGCTCACTCCACAACAGGTGGTCGCAATTGCCAGCAACGGCG GCGGAAAGCAAGCTCTTGAAACCGTGCAACGCCTCCTGCCCGTG CTCTGTCAGGCTCATGGCCTGACACCACAACAAGTCGTGGCCAT CGCCAGTAATAATGGCGGGAAACAGGCTCTTGAGACCGTCCAG AGGCTGCTCCCAGTGCTCTGCCAGGCACACGGGCTGACCCCCCA GCAGGTGGTGGCTATCGCCAGCAATAATGGGGGCAAGCAGGCC CTGGAAACAGTCCAGCGCCTGCTGCCAGTGCTTTGCCAGGCTCA CGGGCTCACTCCCGAACAGGTGCTGGCAATCGCCTCCAACGGAG GGAAGCAGGCTCTGGAGACCGTGCAAGAGACTGCTGCCCCGTCTG TGCCAGGCCCACGGACTCACACCTCAGCAGGTGCTCGCCATTGC CTCTAACAACGGGGGCAAACAAGCCCTGGAGACAGTGCAGCGG CTGTTGCCTGTGTTGTGCCAAGCCCACGGCTTGACTCCTCAACA AGTGGTCGCCATCGCCTCAAATGGCGGCGGAAACAAGCTCTG

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

	GAGACAGTGCAGAGGTTGCTGCCCCGTCCTCTGCCAAGCCCACGG CCTGACTCCCCAACAGGTCGTCGCCATTGCCAGCAACGGCGGAG GAAAGCAGGCTCTCGAAACTGTGCAGCGGCTGCTTCCTGTGCTG TGTCAGGCTCATGGGCTGACCCCCAGCAAGTGGTGGCTATTGC CTCTAACAATGGAGGCAAGCAAGCCCTTGAGACAGTCCAGAGG CTGTTGCCAGTGCTGTGCCAGGCCCACGGGCTCACACCCCAGCA GGTGGTCGCCATCGCCAGTAACGGCGGGGGCAAACAGGCATTG GAAACCGTCCAGCGCCTGCTTCCAGTGCTCTGCCAGGCACACGG ACTGACACCCGAACAGGTGGTGGCCATTGCATCCCATGATGGGG GCAAGCAGGCCCTGGAGACCGTGTCAGAGACTCCTGCCAGTGTTG TGCCAAGCTCACGGCCTCACCCCTCAGCAAGTCGTGGCCATCGC CTCAAACGGGGGGGGCCGGCCTGCACTGGAGAGCATTGTTGCCC AGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGAC CACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCCTGCGCTGGA TGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCCAGC TGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCA CAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAG ATCGCCCGGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGG TGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCAC CTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGG GCTCCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTAC TCCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCA GAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAAC CCCAACGAGTGGTGGAAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTT CAAGTTCCTGTTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGG CCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCC GTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAA GGCCGGCACCCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAAC AACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

TALEN PD-1 No.2 配列	
標的 PD-1 配列 (配列番号 239)	TACCTCTGTGGGGCCATctccctggcccccaggCGCAGATCAAAGAGA
反復 PD-1-左 (配列番号 242)	LTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHGLTPEQVVAIASH DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN GGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIAS NNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETV QRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAH GLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIAS HDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETV QALLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGGRPALE
反復 PD-1-右 (配列番号 243)	LTPEQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN GGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIAS NNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETV QRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASNIGGKQALETVQALLPVLCQAHG LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASH DGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQ RLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHG LTPEQVVAIASNNGGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPQQVVAIASN GGKQALETVQRLLPVLCQAHGLTPEQVVAIASHDGGKQALETVQR LLPVLCQAHGLTPQQVVAIASNNGGGRPALE
PD-1-左 TALEN (配列番号 246)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATTACCCATA CGATGTTCCAGATTACGCTATCGATATCGCCGATCTACGCACGC TCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGGAGAAGATCAAACCGAAGGT TCGTTTCGACAGTGGCGCAGCACCACGAGGCACTGGTCGGCCACG GGTTTACACACGCGCACATCGTTGCGTTAAGCCAACACCCGGCA GCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAGTATCAGGACATGATCGCAGC GTTGCCAGAGGCGACACACGAAGCGATCGTTGGCGTCGGCAAA CAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTGGAGGCCTTGCTCACGGTGGC GGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTTACAGTTGGACACAGGCCAA CTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCGGCGTGACCGCAGTGGAGGC

10

20

30

40

50

【表 4 - 7】

	AGTGCATGCATGGCGCAATGCACTGACGGGTGCCCCGCTCAACT TGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGC AAGCAGGCGCTGGAGACGGTGCAAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC AGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGC TGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGG AGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGC TTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGG CAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCC AGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGC TGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGG AGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGC TTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGG CAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCC AGCAATGGCGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGC TGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGG AGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGC TTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGG CAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGT GCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAGGTGGTGGCCATCGCC AGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGC TGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCCCAGCAG GTGGTGGCCATCGCCAGCAATAATGGTGGCAAGCAGGCGCTGG AGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGC TTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCCACGATGGCG GCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCGGCTGTTGCCGGTGCT GTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGCAGGTGGTGGCCATCG CCAGCCACGATGGCGGCAAGCAGGCGCTGGAGACGGTCCAGCG GCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACGGCTTGACCCCGGAGC AGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATATTGGTGGCAAGCAGGCGCT GGAGACGGTGCAAGGCGCTGTTGCCGGTGCTGTGCCAGGCCCACG GCTTGACCCCTCAGCAGGTGGTGGCCATCGCCAGCAATGGCGGC

10

20

30

40

50

【表 4 - 8】

	GGCAGGCCGGCGCTGGAGAGCATTGTTGCCAGTTATCTCGCCC TGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGACCACCTCGTCGCCT TGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCCTGCGCTGGATGCAGTGAAAAAG GGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCCAGCTGGTGAAGTCCGA GCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCACAAGCTGAAGTAC GTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAGATCGCCCCGGAACA GCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGGTGATGGAGTTCTTC ATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCACCTGGGCGGCTCCA GGAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGGGCTCCCCATCGAC TACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTACTCCGGCGGCTACAA CCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCAGAGGTACGTGGAG GAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAACCCCAACGAGTGGT GGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTTCAAGTTCCTGTTC GTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGGCCAGCTGACCAG GCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCCGTGCTGTCCGTGG AGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAAGGCCGGCACCCCT GACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAACAACGGCGAGATC AACTTCGCGGCCGACTGATAA
PD-1-右 TALEN (配列番号 247)	ATGGGCGATCCTAAAAAGAAACGTAAGGTCATCGATAAGGAGA CCGCCGCTGCCAAGTTCGAGAGACAGCACATGGACAGCATCGA TATCGCCGATCTACGCACGCTCGGCTACAGCCAGCAGCAACAGG AGAAGATCAAACCGAAGGTTTCGTTTCGACAGTGGCGCAGCACCA CGAGGCACTGGTCGGCCACGGGTTTACACACGCGCACATCGTTG CGTTAAGCCAACACCCGGCAGCGTTAGGGACCGTCGCTGTCAAG TATCAGGACATGATCGCAGCGTTGCCAGAGGCGACACACGAAG CGATCGTTGGCGTCGGCAAACAGTGGTCCGGCGCACGCGCTCTG GAGGCCTTGCTCACGGTGGCGGGAGAGTTGAGAGGTCCACCGTT ACAGTTGGACACAGGCCAACTTCTCAAGATTGCAAAACGTGGCG GCGTGACCGCAGTGGAGGCAGTGCATGCATGGCGCAATGCACT GACGGGTGCCCCGCTCAACTTGACCCCCGAGCAAGTCGTCGCAA TCGCCAGCCATGATGGAGGGAAGCAAGCCCTCGAAACCGTGCA GCGGTTGCTTCCTGTGCTCTGCCAGGCCACGGCCTTACCCCTCA GCAGGTGGTGGCCATCGCAAGTAACGGAGGAGGAAAGCAAGCC TTGGAGACAGTGCAGCGCCTGTTGCCCCGTGCTGTGCCAGGCACA CGGCCTCACACCAGAGCAGGTCGTGGCCATTGCCTCCCATGACG GGGGGAAACAGGCTCTGGAGACCGTCCAGAGGCTGCTGCCCCGT CCTCTGTCAAGCTCACGGCCTGACTCCCCAACAAGTGGTCGCCA

10

20

30

40

50

【表 4 - 9】

	TCGCCTCTAATGGCGGCGGGAAGCAGGCACTGGAAACAGTGCA GAGACTGCTCCCTGTGCTTTGCCAAGCTCATGGGTTGACCCCCC AACAGGTCGTCGCTATTGCCCTCAAACGGGGGGGGCAAGCAGGC CCTTGAGACTGTGCAGAGGCTGTTGCCAGTGCTGTGTCAGGCTC ACGGGCTCACTCCACAACAGGTGGTCGCAATTGCCAGCAACGGC GGCGGAAAGCAAGCTCTTGAAACCGTGCAACGCCTCCTGCCCCGT GCTCTGTCAGGCTCATGGCCTGACACCACAACAAGTCGTGGCCA TCGCCAGTAATAATGGCGGGAAACAGGCTCTTGAGACCGTCCAG AGGCTGCTCCCAGTGCTCTGCCAGGCACACGGGCTGACCCCCGA GCAGGTGGTGGCTATCGCCAGCAATATTGGGGGCAAGCAGGCC CTGGAAACAGTCCAGGCCCTGCTGCCAGTGCTTTGCCAGGCTCA CGGGCTCACTCCCCAGCAGGTCTGTGGCAATCGCCTCCAACGGCG GAGGGAAGCAGGCTCTGGAGACCGTGCAAGAGACTGCTGCCCGT CTTGTGCCAGGCCCACGGACTCACACCTGAACAGGTCTGTCGCCA TTGCCTCTCACGATGGGGGCAAACAAGCCCTGGAGACAGTGCA GCGGCTGTTGCCTGTGTTGTGCCAAGCCCACGGCTTGACTCCTC AACAAGTGGTCGCCATCGCCTCAAATGGCGGCGGAAAACAAGC TCTGGAGACAGTGCAGAGGTTGCTGCCCGTCTCTGCCAAGCCC ACGGCCTGACTCCCCAACAGGTCTGTCGCCATTGCCAGCAACAAC GGAGGAAAGCAGGCTCTCGAAACTGTGCAGCGGCTGCTTCCTGT GCTGTGTCAGGCTCATGGGCTGACCCCCGAGCAAGTGGTGGCTA TTGCCTCTAATGGAGGCAAGCAAGCCCTTGAGACAGTCCAGAGG CTGTTGCCAGTGCTGTGCCAGGCCCACGGGCTCACACCCAGCA GGTGGTCGCCATCGCCAGTAACAACGGGGGGCAAACAGGCATTG GAAACCGTCCAGCGCCTGCTTCCAGTGCTCTGCCAGGCACACGG ACTGACACCCGAACAGGTGGTGGCCATTGCATCCCATGATGGGG GCAAGCAGGCCCTGGAGACCGTGCAAGAGACTCCTGCCAGTGTTG TGCCAAGCTCACGGCCTCACCCCTCAGCAAGTCGTGGCCATCGC CTCAAACGGGGGGGGCCGGCCTGCACTGGAGAGCATTGTTGCCC AGTTATCTCGCCCTGATCCGGCGTTGGCCGCGTTGACCAACGAC CACCTCGTCGCCTTGGCCTGCCTCGGCGGGCGTCTGCGCTGGA TGCAGTGAAAAAGGGATTGGGGGATCCTATCAGCCGTTCCAGC TGGTGAAGTCCGAGCTGGAGGAGAAGAAATCCGAGTTGAGGCA CAAGCTGAAGTACGTGCCCCACGAGTACATCGAGCTGATCGAG ATCGCCCGGAACAGCACCCAGGACCGTATCCTGGAGATGAAGG TGATGGAGTTCTTCATGAAGGTGTACGGCTACAGGGGCAAGCAC CTGGGCGGCTCCAGGAAGCCCGACGGCGCCATCTACACCGTGG

10

20

30

40

50

【表 4 - 1 0】

	GCTCCCCATCGACTACGGCGTGATCGTGGACACCAAGGCCTAC TCCGGCGGCTACAACCTGCCCATCGGCCAGGCCGACGAAATGCA GAGGTACGTGGAGGAGAACCAGACCAGGAACAAGCACATCAAC CCCAACGAGTGGTGGGAAGGTGTACCCCTCCAGCGTGACCGAGTT CAAGTTCCTGTTCGTGTCCGGCCACTTCAAGGGCAACTACAAGG CCCAGCTGACCAGGCTGAACCACATCACCAACTGCAACGGCGCC GTGCTGTCCGTGGAGGAGCTCCTGATCGGCGGCGAGATGATCAA GGCCGGCACCCCTGACCCTGGAGGAGGTGAGGAGGAAGTTCAAC AACGGCGAGATCAACTTCGCGGCCGACTGATAA

10

【0527】

いくつかの実施形態では、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法は、

（a）CD3及びCD28活性化ビーズまたは抗体を使用して、患者から切除された腫瘍から取得されたTILの第1の集団を1～5日間活性化するステップと、

（b）（a）の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得するステップと、

20

（c）第1のTIL集団の少なくとも一部を遺伝子編集するステップであって、遺伝子編集が、サイトポレーション培地中のCD39及びCD69を標的とする転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼのエレクトロポレーションを使用して、第2のTIL集団を取得することを含み、遺伝子編集が、第2のTIL集団の細胞の一部においてCD39及びCD69の発現を低減する、遺伝子編集するステップと、

（d）任意選択で、第2のTIL集団をインキュベートするステップであって、インキュベーションが、約30～40℃で、約5%のCO₂で行われる、インキュベートするステップと、

（e）IL-2、及び任意選択でOKT-3を含む細胞培養培地中で第2のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第3のTIL集団を産生するステップであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約6～9日間行われて、第3のTIL集団を取得するステップと、

30

（f）第3のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡張を行い、第4のTIL集団を産生するステップであって、第2の拡張が、約9～11日間行われて、第4のTIL集団を取得し、第4のTIL集団が、治療的TIL集団である、第4のTIL集団を産生するステップと、

（g）ステップ（f）から取得された治療的TIL集団を採取するステップと、

（h）ステップ（f）からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すステップであって、ステップ（f）から（g）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すステップと、を含み、

40

（i）ステップ（a）～（h）のうちの1つ以上が、閉鎖した無菌系で行われる。

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL-12、IL-15、IL-18、及びIL-21からなる群から選択される。

【0528】

TALE法によりTILを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の他の非限定的な例には、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CXCR3、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18、IL

50

ー 21、NOTCH1／2細胞内ドメイン（ICD）、及び／またはNOTCHリガンドmDLL1が含まれる。

【0529】

TALE法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第8,586,526号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。これらの開示される例は、反復RVDを含有する2つ以上のTALE反復単位を有する天然に存在しないDNA結合ポリペプチド、TALEタンパク質の残基からなるN-キャップポリペプチド、及びTALEタンパク質の全長C末端領域の断片からなるC-キャップポリペプチドの使用を含む。

10

【0530】

TALEN介在性遺伝子組み込み及び不活性化を効率的に行うために使用することができ、本発明の実施形態に従って使用することができるTALEN設計及び設計戦略、活性評価、スクリーニング戦略、ならびに方法の例は、Valton, et al., Methods, 2014, 69, 151-170（これは参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。

【0531】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法は、

（a）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、

20

（b）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（c）（a）の第1のTIL集団からCD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性TILを選択して、CD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得することと、

（d）IL-2を含み、任意選択でOKT-3及び／または4-1BBアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3～11日間培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第2のTIL集団を産生することと、

（e）OKT-3を添加し、約1～3日間培養することによって、第2のTIL集団を刺激することであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、刺激することと、

30

（f）第2のTIL集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも1つの遺伝子エディターを第2のTIL集団の複数の細胞に移入させることと、

（g）第2のTIL集団を約1日間静置することと、

（h）第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、任意選択でOKT-3抗体、任意選択でOX40抗体、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、第2の拡張が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（f）からステップ（g）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生することと、

40

（i）ステップ（h）から取得された治療的TIL集団を採取して、採取されたTIL集団を提供することであって、ステップ（h）からステップ（i）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたTIL集団が、治療的TIL集団である、採取することと、

（j）採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（i）から（j）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

（k）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたTIL集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、CD39及びCD69の発現を低減するTALEヌ

50

クレアーゼ系の送達を含む。

【0532】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法は、

（a）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、

（b）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（c）（a）の第1のTIL集団からCD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性TILを選択して、CD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得することと、

（d）IL-2を含み、任意選択でOKT-3及び／または4-1BBアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3～11日間培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第2のTIL集団を産生することと、

（e）OKT-3を添加し、約1～3日間培養することによって、第2のTIL集団を刺激して、第2のTIL集団を取得することであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を取得することと、

（g）少なくとも1つの遺伝子エディターを第2のTIL集団の複数の細胞に移入させるための第2のTIL集団上での無菌エレクトロポレーションステップと、

（h）第2のTIL集団を約1日間静置することと、

（i）第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、任意選択でOKT-3抗体、任意選択でOX40抗体、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、第2の拡張が、約7～11日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（h）からステップ（i）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生することと、

（j）ステップ（i）から取得された第3のTIL集団を採取して、採取されたTIL集団を提供することであって、ステップ（i）からステップ（j）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたTIL集団が、治療的TIL集団である、採取することと、

（k）採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（j）から（k）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

（l）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたTIL集団を凍結保存することと、を含む、

エレクトロポレーションステップが、CD39及びCD69の発現を低減するTALEヌクレアーゼ系の送達を含む。

【0533】

c. ジンクフィンガー法

TILを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス2A）に従って、またはPCT／US2017／058610、PCT／US2018／012605、もしくはPCT／US2018／012633に記載されるように実行することができ、この方法は、ジンクフィンガーまたはジンクフィンガーヌクレアーゼ法によって、TILの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、TIL拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、細胞表面での少なくとも1つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的TIL集団の少なくとも一部においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、TIL拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、細胞表面での少なくとも1つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、任意選択で、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を治療的TIL集団の少なくとも一部

10

20

30

40

50

において増強させる。

【0534】

個々のジンクフィンガーは、保存された $\beta\beta\alpha$ 立体配置でおよそ30個のアミノ酸を含む。 α らせんの表面上のいくつかのアミノ酸は、典型的には、異なる選択性レベルでDNAの主溝の3bpと接触する。ジンクフィンガーは、2つのタンパク質ドメインを有する。第1のドメインは、DNA結合ドメインであり、真核生物転写因子を含み、ジンクフィンガーを含む。第2のドメインは、ヌクレアーゼドメインであり、FokI制限酵素を含み、DNAの触媒的切断を担っている。

【0535】

個々のZFNのDNA結合ドメインは、典型的には、3～6個の個々のジンクフィンガー反復配列を含み、各々9～18塩基対を認識することができる。ジンクフィンガードメインが目的の標的部位に特異的である場合、合計18塩基対を認識する3フィンガーZFNの対でさえ、理論的には、哺乳動物ゲノムの単一遺伝子座を標的とすることができる。新たなジンクフィンガーアレイを生成するための1つの方法は、既知の特異性を有するより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュラーアセンブリプロセスは、各々3塩基対のDNA配列を認識することができる3つの別個のジンクフィンガーを組み合わせ、9塩基対の標的部位を認識することができる3フィンガーアレイを生成することを含む。あるいは、オリゴマー化プールエンジニアリング(OPEEN)などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間のコンテキスト依存的相互作用を考慮したランダム化ライブラリーから新たなジンクフィンガーアレイを選択することができる。設計されたジンクフィンガーは市販されており、Sangamo Biosciences (Richmond, CA, USA)は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)と協同して、ジンクフィンガー構築のための独自のプラットフォーム(CompOZr(登録商標))を開発した。

【0536】

ジンクフィンガー法によりTILを永続的に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、Cish、TGFB、PKA、CBL-B、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、及びGUCY1B3が含まれる。

【0537】

ジンクフィンガー法によりTILを永続的に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18、IL-21、NOTCH1/2細胞内ドメイン(ICD)、及び/またはNOTCHリガンドmDLL1が含まれる。

【0538】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第6,534,261号、同第6,607,882号、同第6,746,838号、同第6,794,136号、同第6,824,978号、同第6,866,997号、同第6,933,113号、同第6,979,539号、同第7,013,219号、同第7,030,215号、同第7,220,719号、同第7,241,573号、同第7,241,574号、同第7,585,849号、同第7,595,376号、同第6,903,185号、

及び同第 6, 479, 626 号に記載されており、これらは参照により本明細書に組み込まれる。

【0539】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の他の例は、Beane, et al., Mol. Therapy, 2015, 23 1380-1390に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【0540】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を治療的 TIL 集団に拡張するための方法は、

(a) 患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第 1 の TIL 集団を取得することと、

(b) 腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

(c) (a) の第 1 の TIL 集団から CD39^{LO} / CD69^{LO} 及び / または CD39 / CD69 二重陰性 TIL を選択して、CD39 / CD69 二重陰性濃縮 TIL 集団を取得することと、

(d) IL-2 を含み、任意選択で OKT-3 及び / または 4-1BB アゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第 1 の TIL 集団を約 3 ~ 11 日間培養することによって第 1 の拡張を行い、第 2 の TIL 集団を産生することであって、第 1 の拡張が、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第 2 の TIL 集団を産生することと、

(e) OKT-3 を添加し、約 1 ~ 3 日間培養することによって、第 2 の TIL 集団を刺激して、第 2 の TIL 集団を取得することであって、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第 2 の TIL 集団を取得することと、

(f) 第 2 の TIL 集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも 1 つの遺伝子エディターを第 2 の TIL 集団の複数の細胞に移入させることと、

(g) 第 2 の TIL 集団を約 1 日間静置することと、

(h) 第 2 の TIL 集団の細胞培養培地を追加の IL-2、任意選択で OKT-3 抗体、任意選択で OX40 抗体、及び抗原提示細胞 (APC) で補充することによって第 2 の拡張を行い、第 3 の TIL 集団を産生することであって、第 2 の拡張が、約 7 ~ 11 日間行われて、第 3 の TIL 集団を取得し、第 2 の拡張が、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ (g) からステップ (h) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第 3 の TIL 集団を産生することと、

(i) ステップ (h) から取得された治療的 TIL 集団を採取して、採取された TIL 集団を提供することであって、ステップ (h) からステップ (i) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取された TIL 集団が、治療的 TIL 集団である、採取することと、

(j) 採取された TIL 集団を注入バッグに移すことであって、ステップ (i) から (j) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

(k) 任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取された TIL 集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、CD39 及び CD69 の発現を低減するジンクフィンガーヌクレアーゼ系の送達を含む。

【0541】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を治療的 TIL 集団に拡張するための方法は、

(a) 患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第 1 の TIL 集団を取得することと、

(b) 腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

(c) (a) の第 1 の TIL 集団から CD39^{LO} / CD69^{LO} 及び / または CD3

10

20

30

40

50

9 / C D 6 9 二重陰性 T I L を選択して、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性濃縮 T I L 集団を取得することと、

(d) I L - 2 を含み、任意選択で O K T - 3 及び / または 4 - 1 B B アゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第 1 の T I L 集団を約 3 ~ 1 1 日間培養することによって第 1 の拡張を行い、第 2 の T I L 集団を産生することであって、第 1 の拡張が、第 1 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第 2 の T I L 集団を産生することと、

(e) O K T - 3 を添加し、約 1 ~ 3 日間培養することによって、第 2 の T I L 集団を刺激することであって、ステップ (d) からステップ (e) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、刺激することと、

(f) 第 2 の T I L 集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも 1 つの遺伝子エディターを第 2 の T I L 集団の複数の細胞に移入させることと、

(g) 第 2 の T I L 集団を約 1 日間静置することと、

(h) 第 2 の T I L 集団の細胞培養培地を追加の I L - 2 、任意選択で O K T - 3 抗体、任意選択で O X 4 0 抗体、及び抗原提示細胞 (A P C) で補充することによって第 2 の拡張を行い、第 3 の T I L 集団を産生することであって、第 2 の拡張が、約 7 ~ 1 1 日間行われて、第 3 の T I L 集団を取得し、第 2 の拡張が、第 2 のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ (g) からステップ (h) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第 3 の T I L 集団を産生することと、

(i) ステップ (h) から取得された治療的 T I L 集団を採取して、採取された T I L 集団を提供することであって、ステップ (h) からステップ (i) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取された T I L 集団が、治療的 T I L 集団である、採取することと、

(j) 採取された T I L 集団を注入バッグに移すことであって、ステップ (i) から (j) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

(k) 任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取された T I L 集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減するジンクフィンガーヌクレアーゼ系の送達を含む。

【 0 5 4 2 】

D. 免疫チェックポイント

本発明の特定の実施形態によれば、T I L 集団は、T I L 集団における T I L 細胞の細胞表面で 1 つ以上の免疫調節組成物を発現し、T I L 集団における 1 つ以上の免疫チェックポイント遺伝子を遺伝子修飾するように遺伝子編集される。別の言い方をすると、細胞表面で 1 つ以上の免疫調節組成物を発現させるように T I L 集団を改変することに加えて、T I L の 1 つ以上の免疫チェックポイントをコードする T I L 内の DNA 配列が、T I L のゲノム内で永続的に修飾される、例えば、挿入される、欠失される、または置換される。免疫チェックポイントは、阻害経路または刺激経路を介して免疫応答を調節するリンパ球によって発現される分子である。がんの場合、免疫チェックポイント経路は、しばしば活性化されて抗腫瘍応答を阻害する、すなわち、悪性細胞によるある特定の免疫チェックポイントの発現は、抗腫瘍免疫を阻害し、がん細胞の成長を促進する。例えば、Mar

【 0 5 4 3 】

本明細書で使用される場合、免疫チェックポイント遺伝子は、免疫チェックポイント分子をコードする DNA 配列を含む。本発明の特定の実施形態によれば、T I L 拡張法中の遺伝子編集 T I L は、1 つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的 T I L 集団の少なくとも一部においてサイレンシングまたは減少させる。例えば、遺伝子編集は、

免疫反応を増強するために、PD-1またはCTLA-4などの阻害性受容体の発現をサイレンシングまたは減少させ得る。

【0544】

最も広く研究されているチェックポイントには、プログラムされた細胞死受容体-1 (PD-1) 及び細胞傷害性Tリンパ球関連分子-4 (CTLA-4) が含まれ、これらは、それらが阻害リガンドと相互作用するときに、主要なエフェクター機能（例えば、活性化、増殖、サイトカイン放出、細胞傷害性など）を阻害する免疫細胞上の阻害性受容体である。以下でさらに詳細に論じられるように、PD-1及びCTLA-4に加えて、多数のチェックポイント分子が免疫療法の潜在的な標的として浮上している。

【0545】

本発明のTILを永続的に遺伝子編集することによってサイレンシングまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子の非限定的な例には、PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、Cish、TGFβ、PKA、CBLB、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、BAFF (BR3)、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、及びGUCY1B3が含まれる。例えば、本発明のTILにおいてサイレンシングまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、PD-1、CTLA-4、LAG-3、TIM-3、Cish、TGFβ、及びPKAを含む群から選択されてもよい。BAFF (BR3) は、Bloom, et al., J. Immunother., 2018, in pressに記載されている。別の実施例によれば、本発明のTILにおいてサイレンシングまたは阻害され得る免疫チェックポイント遺伝子は、PD-1、LAG-3、TIM-3、CTLA-4、TIGIT、CISH、TGFβR2、PRA、CBLB、BAFF (BR3)、及びそれらの組み合わせを含む群から選択されてもよい。

【0546】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を治療的TIL集団に拡張するための方法は、

(a) 患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、

(b) 腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

(c) (a) の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得することと、

(d) IL-2を含み、任意選択でOKT-3及び/または4-1BBアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3～11日間培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第2のTIL集団を産生することと、

(e) OKT-3を添加し、約1～3日間培養することによって、第2のTIL集団を刺激することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、刺激することと、

(f) 第2のTIL集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも1つの遺伝子エディターを第2のTIL集団の複数の細胞に移入させることと、

(g) 第2のTIL集団を約1日間静置することと、

(h) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、任意選択でOKT-3抗体、任意選択でOX40抗体、及び抗原提示細胞 (APC) で補充することによって第2の

10

20

30

40

50

拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、第2の拡張が、約7～11日間行われ、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(g)からステップ(h)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生することと、

(i) ステップ(h)から取得された第3のTIL集団を採取して、採取されたTIL集団を提供することであって、ステップ(h)からステップ(i)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたTIL集団が、治療的TIL集団である、採取することと、

(j) 採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(i)から(j)への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

(k) 任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたTIL集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復(CRISPR)系、転写活性化因子様エフェクター(TALE)系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも1つの遺伝子エディター系が、CD39及びCD69の発現を低減する。

【0547】

1. PD-1

チェックポイント遮断の誘導のために最も研究されている標的のうちの1つは、T細胞調節因子のCD28スーパーファミリーのメンバーであるプログラム死受容体(PD1またはPD-1、PDCD1としても知られている)である。そのリガンドであるPD-L1及びPD-L2は、メラノーマを含む様々な腫瘍細胞上で発現する。PD-1とPD-L1との相互作用は、T細胞エフェクター機能を阻害し、慢性刺激の設定においてT細胞疲弊をもたらす、腫瘍微小環境においてT細胞アポトーシスを誘導する。PD1はまた、免疫監視からの腫瘍特異的エスケープにおいても役割を果たし得る。

【0548】

特定の実施形態によれば、TIL中のPD1の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態(例えば、プロセス2A、プロセスGen3、または図34に示される方法)に従って実行することができ、方法は、PD1の発現をサイレンシングまたは抑制することによって、TILの少なくとも一部を遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、PD1などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、CRISPR法、TALE法、またはジンクフィンガー法を使用して、TIL中のPD1の発現をサイレンシングまたは減少させることができる。

【0549】

2. CTLA-4

CTLA-4発現は、活性化T細胞上でのT細胞活性化時に誘導され、抗原提示細胞活性化抗原CD80及びCD86との結合について競合する。CTLA-4とCD80またはCD86との相互作用は、T細胞阻害を引き起こし、免疫応答のバランスを維持するのに役立つ。しかしながら、CD80またはCD86とのCTLA-4相互作用の阻害は、T細胞の活性化を延長し、したがって、がん抗原に対する免疫応答のレベルを増加させ得る。

【0550】

特定の実施形態によれば、TIL中のCTLA-4の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態(例えば、プロセス2A、プロセスGen3、または図34及び35に示される方法)に従って実行することができ、方法は、TILの少なくとも一部を遺伝子編集して、TILの細

10

20

30

40

50

胞表面において少なくとも1つの免疫調節組成物を発現し、TIL中のCTLA-4の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、CTLA-4などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、CRISPR法、TALE法、またはジンクフィンガー法を使用して、TIL中のCTLA-4の発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL-12、IL-15、及びIL-21からなる群から選択される。

10

【0551】

3. LAG-3

リンパ球活性化遺伝子-3 (LAG-3、CD223) は、主要組織適合複合体 (MHC) クラスIIのライゲーション後に、T細胞及びナチュラルキラー (NK) 細胞によって発現される。その機序は不明なままであるが、その調節は、T細胞機能に対して負の調節効果を引き起こし、組織損傷及び自己免疫を防止する。LAG-3及びPD-1は、TIL上でしばしば共発現及び上方制御され、免疫疲弊及び腫瘍成長につながる。したがって、LAG-3遮断は、抗腫瘍応答を改善する。例えば、Marin-Acevedo et al., Journal of Hematology & Oncology (2018) 11:39を参照されたい。

20

【0552】

特定の実施形態によれば、TIL中のLAG-3の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を治療的TIL集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態 (例えば、プロセス2A、プロセスGen3、または図34及び35に示される方法) に従って実行することができ、方法は、TILの少なくとも一部を遺伝子編集して、TILの細胞表面において少なくとも1つの免疫調節組成物を発現し、TIL中のLAG-3の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、LAG-3などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。特定の実施形態によれば、CRISPR法、TALE法、またはジンクフィンガー法を使用して、TILにおけるLAG-3の発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL-12、IL-15、及びIL-21からなる群から選択される。

30

【0553】

4. TIM-3

T細胞免疫グロブリン-3 (TIM-3) は、T細胞の直接的な負の調節因子であり、NK細胞及びマクロファージ上で発現する。TIM-3は、骨髄由来サプレッサー細胞 (MDSC) の増殖を誘導することにより、間接的に免疫抑制を促進する。そのレベルは、機能不全及び疲弊したT細胞で特に上昇することが見出されており、悪性腫瘍における重要な役割を示唆している。

40

【0554】

特定の実施形態によれば、TIL中のTIM-3の発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を治療的TIL集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態 (例えば、プロセス2A、プロセスGen3、または図34及び35に示される方法) に従って実行することができ、方法は、TILの少なくとも一部を遺伝子編集して、TILの細胞表面において少なくとも1つの免疫調節組成物を発現し、TIL中のTIM-3の発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、TIM-3などの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖

50

切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、C R I S P R法、T A L E法、またはジンクフィンガー法を使用して、T I L中のT I M-3の発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、I L-12、I L-15、及びI L-21からなる群から選択される。

【0555】

5. C i s h

サイトカインシグナル伝達 (S O C S) ファミリーのサプレッサーのメンバーである C i s hは、C D8+T細胞におけるT C R刺激によって誘導され、腫瘍に対するそれらの機能的不活性を阻害する。C D8+T細胞におけるC i s hの遺伝的欠失は、それらの拡大、機能的親和性、及びサイトカイン多機能性を増強し得、確立された腫瘍の顕著で持続的な退縮をもたらす。例えば、P a l m e r e t a l., J o u r n a l o f E x p e r i m e n t a l M e d i c i n e, 212 (12): 2095 (2015)を参照されたい。

【0556】

特定の実施形態によれば、T I L中のC i s hの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L)を治療的T I L集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態 (例えば、プロセス2A、プロセスG e n 3、または図34及び35に示される方法)に従って実行することができ、方法は、T I Lの少なくとも一部を遺伝子編集して、T I Lの細胞表面において少なくとも1つの免疫調節組成物を発現し、T I L中のC i s hの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、C i s hなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、C R I S P R法、T A L E法、またはジンクフィンガー法を使用して、T I L中のC i s hの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、I L-12、I L-15、及びI L-21からなる群から選択される。

【0557】

6. T G F β

T G F βシグナル伝達経路は、細胞増殖、分化、アポトーシス、運動性及び侵入、細胞外マトリックス産生、血管新生、ならびに免疫応答を調節することにおいて複数の機能を有する。T G F βシグナル伝達の調節解除は、腫瘍において頻繁に行われ、腫瘍の開始、発達及び転移において重要な役割を有する。微小環境レベルでは、T G F β経路は、発がん全体にわたる腫瘍成長及び転移のための好ましい微小環境を生成することに寄与する。例えば、N e u z i l l e t e t a l., P h a r m a c o l o g y & T h e r a p e u t i c s, V o l. 147, p p. 22-31 (2015)を参照されたい。

【0558】

特定の実施形態によれば、T I L中のT G F βの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L)を治療的T I L集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態 (例えば、プロセス2A、プロセスG e n 3、または図34及び35に示される方法)に従って実行することができ、方法は、T I Lの少なくとも一部を遺伝子編集して、T I Lの細胞表面において少なくとも1つの免疫調節組成物を発現し、T I L中のT G F βの発現をサイレンシングまたは減少させることを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、T G F βなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、C R I S P R法、T A L E法、またはジンクフィンガー法を使用して、T I L中のT G F βの発現を

サイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL-12、IL-15、及びIL-21からなる群から選択される。

【0559】

いくつかの実施形態では、TGFβR2 (TGFベータ受容体2) は、CRISPR/Cas9系を使用してTGFβR2をサイレンシングすることによって、または当該技術分野で知られている方法を使用してTGFβR2 優性陰性細胞外トラップを使用することによって抑制され得る。

【0560】

7. PKA

タンパク質キナーゼA (PKA) は、セリントレオニンタンパク質キナーゼスーパーファミリーの周知のメンバーである。cAMP依存性タンパク質キナーゼとしても知られるPKAは、cAMP結合時の活性化を介してGタンパク質結合受容体のシグナル伝達を媒介するマルチユニットプロテインキナーゼである。それは、代謝からイオンチャネル活性化、細胞成長及び分化、遺伝子発現及びアポトーシスまでの多種多様な細胞プロセスの制御に関与する。重要なことに、PKAは、多くの腫瘍の開始及び進行に関与している。例えば、Sapio et al., EXCLI Journal; 2014; 13: 843-855を参照されたい。

【0561】

特定の実施形態によれば、TIL中のPKAの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を治療的TIL集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態 (例えば、プロセス2A、プロセスGen3、または図34及び35に示される方法) に従って実行することができ、方法は、TILの少なくとも一部を遺伝子編集して、TILの細胞表面において少なくとも1つの免疫調節組成物を発現し、TIL中のPKAの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、PKAなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、CRISPR法、TALE法、またはジンクフィンガー法を使用して、TIL中のPKAの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL-12、IL-15、及びIL-21からなる群から選択される。

【0562】

8. CBLB

CBLB (またはCBL-B) は、E3ユビキチン-タンパク質リガーゼであり、T細胞活性化の負の制御因子である。Bachmaier, et al., Nature, 2000, 403, 211-216、Wallner, et al., Clin. Dev. Immunol. 2012, 692639。

【0563】

特定の実施形態によれば、TIL中のCBLBの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を治療的TIL集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態 (例えば、プロセス2A、プロセスGEN3、または図34及び35に示される方法) に従って実行することができ、方法は、TILの少なくとも一部を遺伝子編集して、TILの細胞表面において少なくとも1つの免疫調節組成物を発現し、TIL中のCBLBの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、CBLBなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、CRISPR法、TALE法、またはジンクフィンガー法を使用して、TIL中のPKAの発現をサイ

10

20

30

40

50

レンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL-12、IL-15、及びIL-21からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、CBLBは、TALENノックアウトを使用してサイレンシングされる。いくつかの実施形態では、CBLBは、TALE-KRAB転写阻害剤ノックインを使用してサイレンシングされる。これらの方法のさらなる詳細は、Boettcher and McManus, Mol. Cell Review, 2015, 58, 575-585に見出すことができる。

【0564】

9. TIGIT

Ig及びITIM（免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ）ドメインまたはTIGITを有するT細胞免疫受容体は、Ig様V型ドメインを有し、その細胞質ドメイン内にITIMを有する膜貫通糖タンパク質受容体である。Khalil, et al., Advances in Cancer Research, 2015, 128, 1-68, Yu, et al., Nature Immunology, 2009, Vol. 10, No. 1, 48-57。TIGITは、いくつかのT細胞及びナチュラルキラー細胞によって発現される。さらに、TIGITは、特にメラノーマを有する個体から、抗原特異的CD8+T細胞及びCD8+TIL上で過剰発現することが示されている。研究では、TIGIT経路が腫瘍免疫回避に寄与し、TIGIT阻害がポリクローナル及び抗原特異的刺激に応答して、T細胞の活性化及び増殖を増加させることが示されている。Khalil, et al., Advances in Cancer Research, 2015, 128, 1-68。さらに、PD-1またはTIM3のいずれかとのTIGITの共遮断は、マウスモデルにおいて固形腫瘍に対する相乗効果を示している。Id.; Kurtulus, et al., The Journal of Clinical Investigation, 2015, Vol. 125, No. 11, 4053-4062も参照されたい。

【0565】

特定の実施形態によれば、TIL中のTIGITの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス2A、プロセスGEN3、または図34及び35に示される方法）に従って実行することができ、方法は、TILの少なくとも一部を遺伝子編集して、TILの細胞表面において少なくとも1つの免疫調節組成物を発現し、TIL中のTIGITの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、TIGITなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、CRISPR法、TALE法、またはジンクフィンガー法を使用して、TIL中のTIGITの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL-12、IL-15、及びIL-21からなる群から選択される。

【0566】

10. TOX

胸腺細胞選択関連高移動度群（HMG）ボックス（TOX）は、HMGボックスDNA結合ドメインを含有する転写因子である。TOXは、配列非依存であるが構造依存的な方法でDNAに結合すると考えられるHMGボックススーパーファミリーのメンバーである。

【0567】

TOXは、腫瘍特異的CD8+T細胞機能障害またはT細胞枯渇の重要な調節因子として同定され、例えば、Scott, et al., Nature, 2019, 571, 2

10

20

30

40

50

70-274及びKhan, et al., Nature, 2019, 571, 211-218 (これらの両方は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるように、CD8⁺T細胞疲弊を転写的かつ後成的にプログラムすることが見出された。TOXはまた、Alfei, et al., Nature, 2019, 571, 265-269 (これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるように、慢性感染中のT細胞機能不全の進行及び疲弊したT細胞の維持に対する重要な因子であることが見出された。TOXは、腫瘍及び慢性ウイルス感染からの機能不全または疲弊したT細胞において高度に発現される。インビトロでのエフェクターT細胞におけるTOXの異所発現は、T細胞疲弊に関連する転写プログラムを誘導したが、T細胞におけるTOXの欠失は、T疲弊プログラムを廃止した。

10

【0568】

特定の実施形態によれば、TIL中のTOXの発現は、本発明の組成物及び方法に従ってサイレンシングまたは減少される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態(例えば、プロセス2A、プロセスGEN3、または図34及び35に示される方法)に従って実行することができ、方法は、TILの少なくとも一部を遺伝子編集して、TILの細胞表面において少なくとも1つの免疫調節組成物を発現し、TOXの発現をサイレンシングまたは抑制することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、TOXなどの免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、CRISPR法、TALE法、またはジンクフィンガー法を使用して、TIL中のTOXの発現をサイレンシングまたは抑制することができる。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL-12、IL-15、及びIL-21からなる群から選択される。

20

【0569】

E. 共刺激受容体または接着分子の過剰発現

追加の実施形態によれば、TIL拡張法中の遺伝子編集TILは、細胞表面における少なくとも1つの免疫調節組成物の発現を引き起こし、1つ以上の共刺激受容体、接着分子及び／またはサイトカインの発現を、治療的TIL集団の少なくとも一部において増強させる。例えば、遺伝子編集は、共刺激受容体、接着分子またはサイトカインの発現を増強させ得、これは、遺伝子修飾されていない共刺激受容体、接着分子またはサイトカインの発現と比較して、それが過剰発現されることを意味する。本発明のTILを永続的に遺伝子編集することによって増強された発現を示し得る共刺激性受容体、接着分子またはサイトカイン遺伝子の非限定的な例には、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18、IL-21、NOTCH1／2細胞内ドメイン(ICD)、及び／またはNOTCHリガンドmDLL1などのある特定のケモカイン受容体及びインターロイキンが含まれる。

30

【0570】

1. CCR

養子T細胞免疫療法が有効であるためには、T細胞をケモカインによって腫瘍内に適切に輸送する必要がある。腫瘍細胞によって分泌されるケモカイン、末梢に存在するケモカイン、及びT細胞によって発現されるケモカイン受容体との間の一致は、T細胞の腫瘍床への輸送を成功させるために重要である。

40

【0571】

特定の実施形態によれば、本発明の遺伝子編集方法を使用して、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3及びCX3CR1のうちの1つ以上などのTILにおけるある特定のケモカイン受容体の発現を増加させてもよい。CCRの過剰発現は、エフェクター機能及び養子移植後のTILの増殖を促進するのに役立ち得る。

【0572】

50

特定の実施形態によれば、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3及びCX3CR1のうちの1つ以上のTILにおける発現は、本発明の組成物及び方法に従って増強される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス2A、プロセスGen3、または図34及び35に示される方法）に従って実行することができ、方法は、TILの少なくとも一部を遺伝子編集して、TIL中のCCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3及びCX3CR1のうちの1つ以上の細胞表面において少なくとも1つの免疫調節組成物を発現し、発現を増強することを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの免疫調節組成物は、膜アンカーに融合したサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインは、IL-12、IL-15、IL-18、及びIL-21からなる群から選択される。

10

【0573】

以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、ケモカイン受容体遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、CRISPR法、TALE法、またはジンクフィンガー法を使用して、TILにおけるある特定のケモカイン受容体の発現を増強することができる。

【0574】

いくつかの実施形態では、CCR4及び／またはCCR5接着分子は、本明細書に記載のガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法を使用して、TIL集団に挿入される。ある実施形態では、CXCR2接着分子は、Forget, et al., Frontiers Immunology 2017, 8, 908またはPeng, et al., Clin. Cancer Res. 2010, 16, 5458（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるようなガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法を使用して、TIL集団に挿入される。

20

【0575】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法は、

（a）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、

（b）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

30

（c）（a）の第1のTIL集団からCD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性TILを選択して、CD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得することと、

（d）IL-2を含み、任意選択でOKT-3及び／または4-1BBアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3～11日間培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第2のTIL集団を産生することと、

（e）OKT-3を添加し、約1～3日間培養することによって、第2のTIL集団を刺激して、第2のTIL集団を取得することであって、第2のTIL集団が、第1のTIL集団よりも数が少なくとも50倍多く、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を取得することと、

40

（f）第2のTIL集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも1つの遺伝子エディターを第2のTIL集団の複数の細胞に移入させることと、

（g）第2のTIL集団を約1日間静置することと、

（h）第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、任意選択でOKT-3抗体、任意選択でOX40抗体、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、第2の拡張が、約7～11行われ、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（g）からステップ（h）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生することと、

50

(i) ステップ(h) から取得された第3のTIL集団を採取して、採取されたTIL集団を提供することであって、ステップ(h) からステップ(i) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたTIL集団が、治療的TIL集団である、採取することと、

(j) 採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(i) から(j) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

(k) 任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたTIL集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復(CRISPR)系、転写活性化因子様エフェクター(TALE)系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも1つの遺伝子エディター系が、CD39及びCD69の発現を低減し、さらに少なくとも1つの遺伝子エディター系が、第2のTIL集団の複数の細胞の細胞表面においてCXCR2接着分子を発現させるか、またはCXCR2接着分子が、ガンマレトロウイルスもしくはレンチウイルス法によって第1のTIL集団、第2のTIL集団、もしくは採取されたTIL集団に挿入される。

10

【0576】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法は、

(a) 患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、

20

(b) 腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

(c) (a) の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得することと、

(d) IL-2を含み、任意選択でOKT-3及び/または4-1BBアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3~11日間培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第2のTIL集団を産生することと、

(e) OKT-3を添加し、約1~3日間培養することによって、第2のTIL集団を刺激することであって、ステップ(d) からステップ(e) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、刺激することと、

30

(f) 第2のTIL集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも1つの遺伝子エディターを第2のTIL集団の複数の細胞に移入させることと、

(g) 第2のTIL集団を約1日間静置することと、

(h) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、任意選択でOKT-3抗体、任意選択でOX40抗体、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、第2の拡張が、約7~11日間行われ、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(g) からステップ(h) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生することと、

40

(i) ステップ(h) から取得された第3のTIL集団を採取して、採取されたTIL集団を提供することであって、ステップ(h) からステップ(i) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたTIL集団が、治療的TIL集団である、採取することと、

(j) 採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(i) から(j) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

(k) 任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたTIL集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復(CRISPR

50

系、転写活性化因子様エフェクター（T A L E）系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも1つの遺伝子エディター系が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減し、さらに少なくとも1つの遺伝子エディター系が、第2のT I L 集団の複数の細胞の細胞表面においてC C R 4 及び／またはC C R 5 接着分子を発現させるか、またはC X C R 2 接着分子が、ガンマレトロウイルスもしくはレンチウイルス法によって第1のT I L 集団、第2のT I L 集団、もしくは採取されたT I L 集団に挿入される。

【0577】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を治療的T I L 集団に拡張するための方法は、

（a）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のT I L 集団を取得することと、

（b）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（c）（a）の第1のT I L 集団からC D 3 9^{LO}／C D 6 9^{LO}及び／またはC D 3 9／C D 6 9 二重陰性T I L を選択して、C D 3 9／C D 6 9 二重陰性濃縮T I L 集団を取得することと、

（d）I L - 2 を含み、任意選択でO K T - 3 及び／または4 - 1 B B アゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第1のT I L 集団を約3～11日間培養することによって第1の拡張を行い、第2のT I L 集団を産生することであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第2のT I L 集団を産生することと、

（e）O K T - 3 を添加し、約1～3日間培養することによって、第2のT I L 集団を刺激して、第2のT I L 集団を取得することであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のT I L 集団を取得することと、

（f）第2のT I L 集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも1つの遺伝子エディターを第2のT I L 集団の複数の細胞に移入させることと、

（g）第2のT I L 集団を約1日間静置することと、

（h）第2のT I L 集団の細胞培養培地を追加のI L - 2、任意選択でO K T - 3 抗体、任意選択でO X 4 0 抗体、及び抗原提示細胞（A P C）で補充することによって第2の拡張を行い、第3のT I L 集団を産生することであって、第2の拡張が、約7～11日間行われ、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（g）からステップ（h）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のT I L 集団を産生することと、

（i）ステップ（h）から取得された第3のT I L 集団を採取して、採取されたT I L 集団を提供することであって、ステップ（h）からステップ（i）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたT I L 集団が、治療的T I L 集団である、採取することと、

（j）採取されたT I L 集団を注入バッグに移すことであって、ステップ（i）から（j）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

（k）任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取されたT I L 集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復（C R I S P R）系、転写活性化因子様エフェクター（T A L E）系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも1つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも1つの遺伝子エディター系が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減し、さらに少なくとも1つの遺伝子エディター系が、第2のT I L 集団の複数の細胞の細胞表面においてC C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子を発現させるか、または接着分子が、ガンマレトロウイルスもしくはレンチウイルス法によって第1のT I L 集団、第2のT I L 集団、もしくは採取されたT I L 集団に挿入される。

10

20

30

40

50

【0578】

2. インターロイキン

追加の実施形態によれば、本発明の遺伝子編集方法を使用して、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18及びIL-21のうちの1つ以上などのある特定のインターロイキンの発現を増加させてもよい。ある特定のインターロイキンは、T細胞のエフェクター機能を増加させ、腫瘍制御を媒介することが実証されている。

【0579】

特定の実施形態によれば、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18、及びIL-21のうちの1つ以上のTILにおける発現は、本発明の組成物及び方法に従って増強される。例えば、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、プロセス2A、プロセスGen3、または図34及び35に示される方法）に従って実行することができ、方法は、TILの少なくとも一部を、IL-2、IL-4、IL-7、IL-10、IL-15、IL-18及びIL-21のうちの1つ以上の発現を増強することによって遺伝子編集することを含む。以下でより詳細に記載されるように、遺伝子編集プロセスは、インターロイキン遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。例えば、CRISPR法、TALE法、またはジンクフィンガー法を使用して、TILにおけるある特定のインターロイキンの発現を増強することができる。

【0580】

いくつかの実施形態によると、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法は、

（a）患者から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、

（b）腫瘍断片を閉鎖系に付加することと、

（c）（a）の第1のTIL集団からCD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性TILを選択して、CD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得することと、

（d）IL-2を含み、任意選択でOKT-3及び／または4-1BBアゴニスト抗体を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3～11日間培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われる、第2のTIL集団を産生することと、

（e）OKT-3を添加し、約1～3日間培養することによって、第2のTIL集団を刺激して、第2のTIL集団を取得することであって、ステップ（d）からステップ（e）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を取得することと、

（f）第2のTIL集団を無菌エレクトロポレーションして、少なくとも1つの遺伝子エディターを移入させることと、

（g）第2のTIL集団を、第2のTIL集団内の複数の細胞内に約1日間静置することと、

（h）第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、任意選択でOKT-3抗体、任意選択でOX40抗体、及び抗原提示細胞（APC）で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、第2の拡張が、約7～11行われ、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ（g）からステップ（h）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生することと、

（i）ステップ（h）から取得された治療的TIL集団を採取して、採取されたTIL集団を提供することであって、ステップ（h）からステップ（i）への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こり、採取されたTIL集団が、治療的TIL集団である、採取することと、

(j) 採取された T I L 集団を注入バッグに移すことであって、ステップ (i) から (j) への移行が、任意選択で、系を開くことなく起こる、移すことと、

(k) 任意選択で、凍結保存培地を使用して、採取された T I L 集団を凍結保存することと、を含み、

エレクトロポレーションステップが、クラスター化規則的散在短回文反復 (C R I S P R) 系、転写活性化因子様エフェクター (T A L E) 系、またはジンクフィンガー系からなる群から選択される少なくとも 1 つの遺伝子エディター系の送達を含み、少なくとも 1 つの遺伝子エディター系が、C D 3 9 及び C D 6 9 の発現を低減し、さらに少なくとも 1 つの遺伝子エディター系が、第 2 の T I L 集団の複数の細胞の細胞表面において I L - 2、I L - 4、I L - 7、I L - 1 0、I L - 1 5、I L - 1 8、I L - 2 1、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子を発現させるか、またはインターロイキンが、ガンマレトロウイルスもしくはレンチウイルス法によって第 1 の T I L 集団、第 2 の T I L 集団、もしくは採取された T I L 集団に挿入される。

【0581】

D. タンパク質キナーゼ B (A K T) 阻害剤

いくつかの実施形態によれば、第 1 の拡張ステップ、第 2 の拡張ステップ、または第 1 の拡張ステップ及び第 2 の拡張ステップの両方は、培養培地中にプロテインキナーゼ B (A K T) 阻害剤 (A K T i) を添加することを含む。いくつかの実施形態によれば、プライミングによる第 1 の拡張ステップ、急速な第 2 の拡張、または第 1 の拡張ステップ及び急速な第 2 の拡張ステップの両方は、培養培地中にプロテインキナーゼ B (A K T) 阻害剤 (A K T i) を添加することを含む。

【0582】

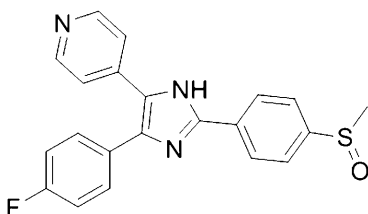
A K T 阻害剤

S B - 2 0 3 5 8 0

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、S B - 2 0 3 5 8 0 である。S B - 2 0 3 5 8 0 は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。4 - [4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - メチルスルフィニルフェニル) - 1 H - イミダゾール - 5 - イル] ピリジン

【0583】

【化 1】



【0584】

M K - 2 2 0 6

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、M K - 2 2 0 6 である。M K - 2 2 0 6 は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。8 - [4 - (1 - アミノシクロブチル) フェニル] - 9 - フェニル - 2 H - [1, 2, 4] トリアゾロ [3, 4 - f] [1, 6] ナフチリジン - 3 - オン

【0585】

10

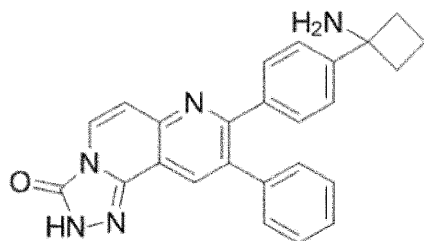
20

30

40

50

【化 2】



10

【 0 5 8 6 】

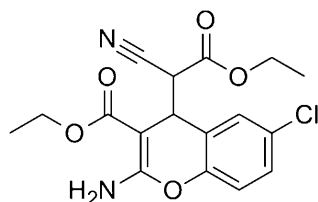
S C 7 9

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、S C 7 9 である。S C 7 9 は、のよう示される化学構造及び名称を有する。エチル 2 - アミノ - 6 - クロロ - 4 - (1 - シアノ - 2 - エトキシ - 2 - オキソエチル) - 4 H - クロメン - 3 - カルボキシレート

【 0 5 8 7 】

【化 3】

20



【 0 5 8 8 】

カピバセルチブ (A Z D 5 3 6 3)

30

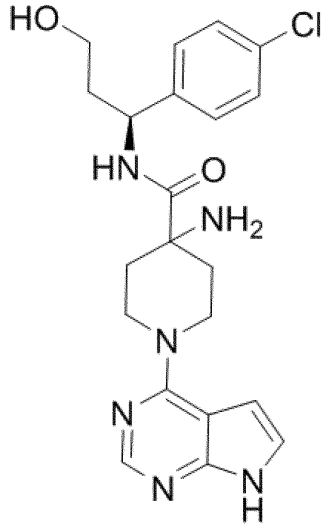
ある実施形態では、A K T 阻害剤は、カピバセルチブである。カピバセルチブは、以下のよう示される化学構造及び名称を有する。4 - アミノ - N - [(1 S) - 1 - (4 - クロロフェニル) - 3 - ヒドロキシプロピル] - 1 - (7 H - ピロロ [2 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イル) ピペリジン - 4 - カルボキサミド

【 0 5 8 9 】

40

50

【化 4】



10

【 0 5 9 0 】

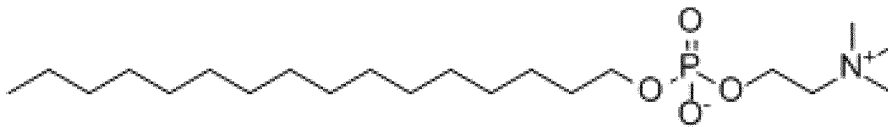
ミルテフォシン

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、ミルテフォシンである。ミルテフォシンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。ヘキサデシル 2 - (トリメチルアザニウム

20

【 0 5 9 1 】

【化 5】



30

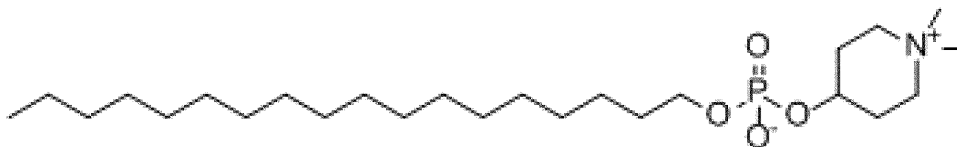
【 0 5 9 2 】

ペリフォシン

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、ペリフォシンである。ペリフォシンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。(1, 1-ジメチルピペリジン-1-イウム-4-イル) オクタデシルホスフェート

【 0 5 9 3 】

【化 6】



40

【 0 5 9 4 】

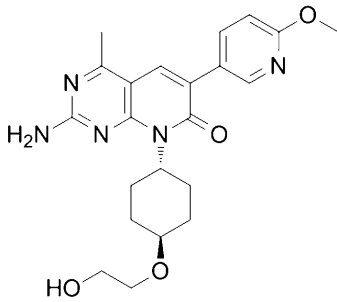
P F - 0 4 6 9 1 5 0 2

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、P F - 0 4 6 9 1 5 0 2 である。P F - 0 4 6 9 1 5 0 2 は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。2-アミノ-8-[4-(2-ヒドロキシエトキシ)シクロヘキシル]-6-(6-メトキシピリジン-3-イル)-4-メチルピリド[2,3-d]ピリミジン-7-オン

50

【 0 5 9 5 】

【 化 7 】



10

【 0 5 9 6 】

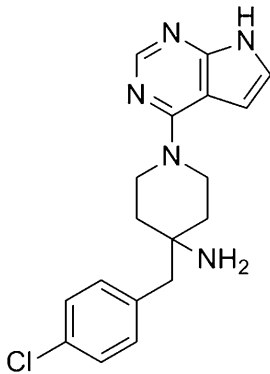
C C T 1 2 8 9 3 0

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、C C T 1 2 8 9 3 0 である。C C T 1 2 8 9 3 0 は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。4 - [(4 - クロロフェニル) メチル] - 1 - (7 H - ピロロ [2 , 3 - d] ピリミジン - 4 - イル) ピペリジン - 4 - アミン

【 0 5 9 7 】

【 化 8 】

20



30

【 0 5 9 8 】

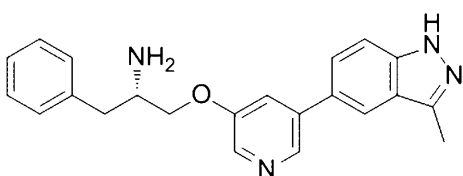
A - 6 7 4 5 6 3

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、A - 6 7 4 5 6 3 である。A - 6 7 4 5 6 3 は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。(2 S) - 1 - [5 - (3 - メチル - 2 H - インダゾール - 5 - イル) ピリジン - 3 - イル] オキシ - 3 - フェニルプロパン - 2 - アミン

【 0 5 9 9 】

【 化 9 】

40



50

【0600】

Archexin (RX-0201)

ある実施形態では、AKT阻害剤は、Archexinである。ある実施形態では、AKT阻害剤は、5'-gctgcatgattctccttg g c g 3'の配列を有するオリゴデオキシヌクレオチドである。

【0601】

オレアンドリン (PBI-05204)

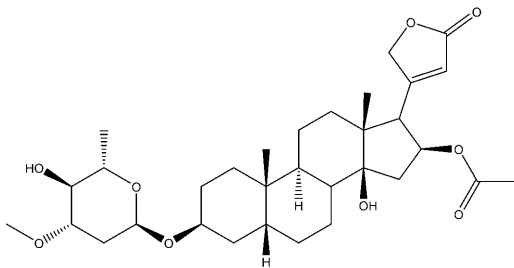
ある実施形態では、AKT阻害剤は、オレアンドリンである。オレアンドリンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。[(3S, 5R, 8R, 9S, 10S, 13R, 14S, 16S, 17R)-14-ヒドロキシ-3-[(2R, 4S, 5S, 6S)-5-ヒドロキシ-4-メトキシ-6-メチルオキサン-2-イル]オキシ-10, 13-ジメチル-17-(5-オキソ-2H-フラン-3-イル)-1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 16, 17-テトラデカヒドロシクロペンタ[a]フェナントレン-16-イル]アセテート

10

【0602】

【化10】

20



【0603】

AKT阻害剤VIIII

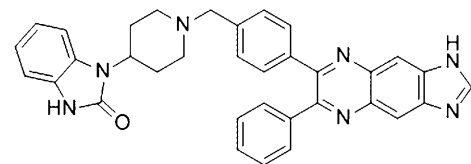
ある実施形態では、AKT阻害剤は、AKT阻害剤VIIIIである。AKT阻害剤VIIIIは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。3-[1-[4-(7-フェニル-3H-イミダゾ[4,5-g]キノキサリン-6-イル)フェニル]メチル]ペリジン-4-イル]-1H-ベンズイミダゾール-2-オン

30

【0604】

【化11】

40



【0605】

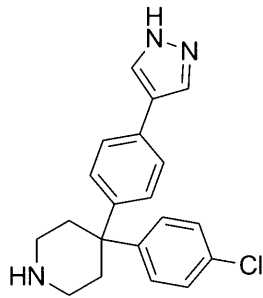
AT7867

ある実施形態では、AKT阻害剤は、AT7867である。AT7867は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。4-(4-クロロフェニル)-4-[4-(1H-ピラゾール-4-イル)フェニル]ペリジン

【0606】

50

【化 1 2】



10

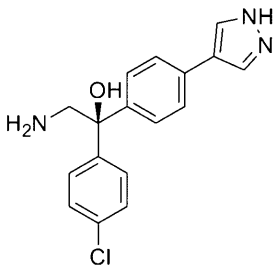
【0607】

A T 1 3 1 4 8

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、A T 1 3 1 4 8 である。A T 1 3 1 4 8 は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。(1 S) - 2 - アミノ - 1 - (4 - クロロフェニル) - 1 - [4 - (1 H - ピラゾール - 4 - イル) フェニル] エタノール

【0608】

【化 1 3】



20

【0609】

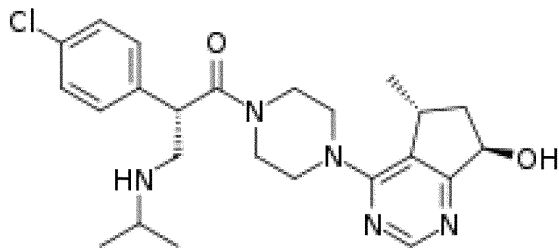
イパタセルチブ (G D C - 0 0 6 8)

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、イパタセルチブである。イパタセルチブは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。(S) - 2 - (4 - クロロフェニル) - 1 - (4 - ((5 R, 7 R) - 7 - ヒドロキシ - 5 - メチル - 6, 7 - ジヒドロ - 5 H - シクロペンタ [d] ピリミジン - 4 - イル) ピペラジン - 1 - イル) - 3 - (イソプロピルアミノ) プロパン - 1 - オン

30

【0610】

【化 1 4】



40

【0611】

T I C 1 0

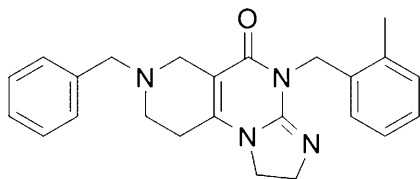
ある実施形態では、A K T 阻害剤は、T I C 1 0 である。T I C 1 0 は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。7 - ベンジル - 4 - (2 - メチルベンジル) - 1,

50

2, 6, 7, 8, 9-ヘキサヒドロイミダゾ [1, 2-a] ピリド [3, 4-e] ピリミジン-5 (4H)-オン

【0612】

【化15】



10

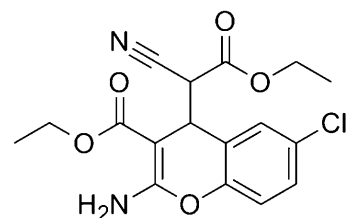
【0613】

SC79

ある実施形態では、AKT阻害剤は、SC79である。SC79は、のよう示される化学構造及び名称を有する。エチル 2-アミノ-6-クロロ-4-(1-シアノ-2-エトキシ-2-オキソエチル)-4H-クロメン-3-カルボキシレート

【0614】

【化16】



30

【0615】

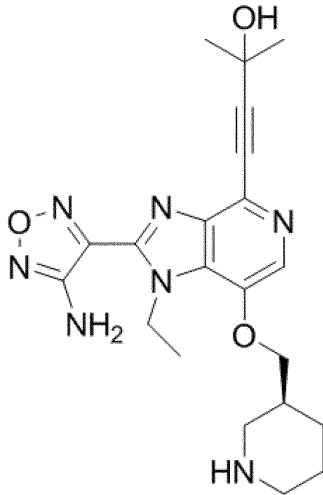
GSK690693

ある実施形態では、AKT阻害剤は、GSK690693である。GSK690693は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。4-[2-(4-アミノ-1,2,5-オキサジアゾール-3-イル)-1-エチル-7-[[(3S)-ピペリジン-3-イル]メトキシ]イミダゾ [4,5-c]ピリジン-4-イル]-2-メチルブタ-3-イン-2-オール

【0616】

40

【化 1 7】



10

【0 6 1 7】

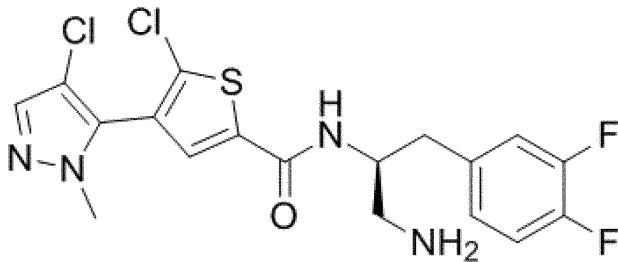
アフレセルチブ (G S K 2 1 1 0 1 8 3)

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、アフレセルチブである。アフレセルチブは、次のように示される化学構造及び名前を有する。N-[(2S)-1-アミノ-3-(3,4-ジフルオロフェニル)プロパン-2-イル]-5-クロロ-4-(4-クロロ-2-メチルピラゾール-3-イル)チオフェン-2-カルボキサミド

20

【0 6 1 8】

【化 1 8】



30

【0 6 1 9】

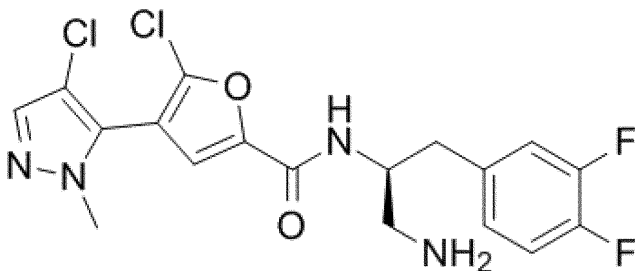
ウプロセルチブ (G S K 2 1 4 1 7 9 5)

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、ウプロセルチブである。ウプロセルチブは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。N-[(2S)-1-アミノ-3-(3,4-ジフルオロフェニル)プロパン-2-イル]-5-クロロ-4-(4-クロロ-2-メチルピラゾール-3-イル)フラン-2-カルボキサミド

40

【0 6 2 0】

【化 1 9】



50

【 0 6 2 1 】

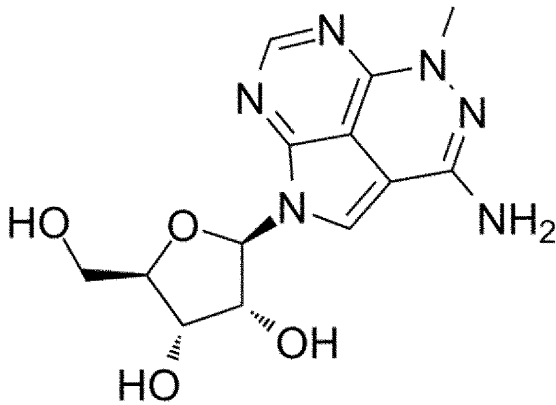
トリシリピン

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、トリシリピンである。トリシリピンは、以下のよう
に示される化学構造及び名称を有する。(2 R, 3 R, 4 S, 5 R) - 2 - (5 - アミ
ノ - 7 - メチル - 2, 6, 7, 9, 11 - ペンタザトリシクロ [6.3.1.04,12]
] ドデカ - 1 (12), 3, 5, 8, 10 - ペンタエン - 2 - イル) - 5 - (ヒドロキシ
メチル) オキサラン - 3, 4 - ジオール

【 0 6 2 2 】

【 化 2 0 】

10



20

【 0 6 2 3 】

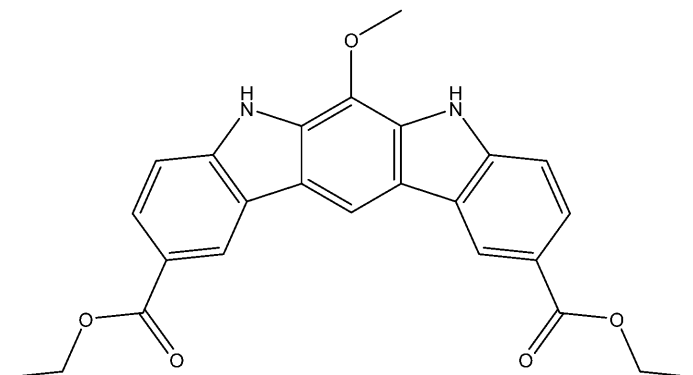
S R 1 3 6 6 8

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、S R 1 3 6 6 8 である。S R 1 3 6 6 8 は、次の
ように示される化学構造及び名称を有する。ジエチル 6 - メトキシ - 5, 7 - ジヒドロイ
ンドロ [2, 3 - b] カルバゾール - 2, 10 - ジカルボキシレート

【 0 6 2 4 】

【 化 2 1 】

30



40

【 0 6 2 5 】

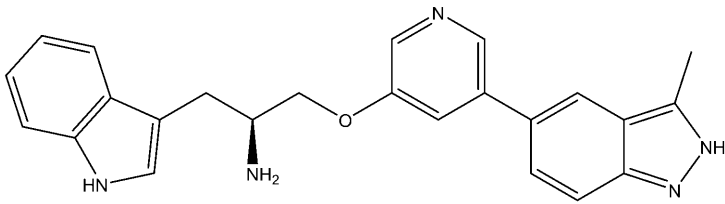
A - 4 4 3 6 5 4

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、A - 4 4 3 6 5 4 である。A - 4 4 3 6 5 4 は、
以下のように示される化学構造及び名称を有する。(2 S) - 1 - (1 H - インドール -
3 - イル) - 3 - [5 - (3 - メチル - 2 H - インダゾール - 5 - イル) ピリジン - 3 -
イル] オキシプロパン - 2 - アミン

【 0 6 2 6 】

50

【化 2 2】



【0 6 2 7】

10

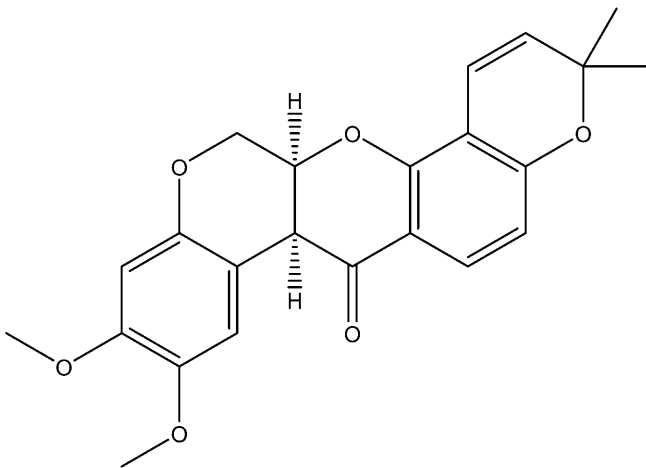
デゲリン

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、デゲリンである。デゲリンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。(1 S, 1 4 S) - 1 7, 1 8 - ジメトキシ - 7, 7 - ジメチル - 2, 8, 2 1 - トリオキサペンタシクロ [1 2 . 8 . 0 . 0 ³, 1 2 . 0 ⁴, 9 . 0 ¹⁵, 2 0] ドコサー - 3 (1 2), 4 (9), 5, 1 0, 1 5, 1 7, 1 9 - ヘプタエン - 1 3 - オン

【0 6 2 8】

【化 2 3】

20



30

【0 6 2 9】

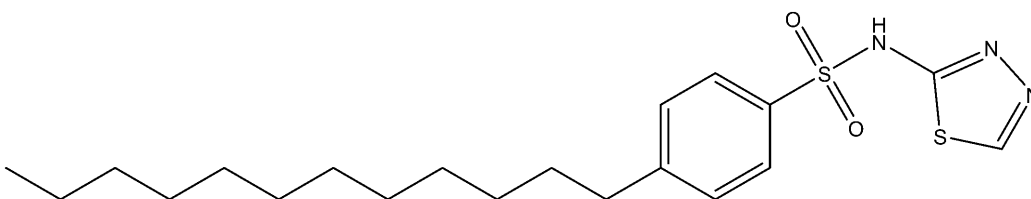
P H T - 4 2 7

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、P H T - 4 2 7 である。P H T - 4 2 7 は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。4 - ドデシル - N - (1, 3, 4 - チアジアゾール - 2 - イル) ベンゼンスルホンアミド

【0 6 3 0】

【化 2 4】

40

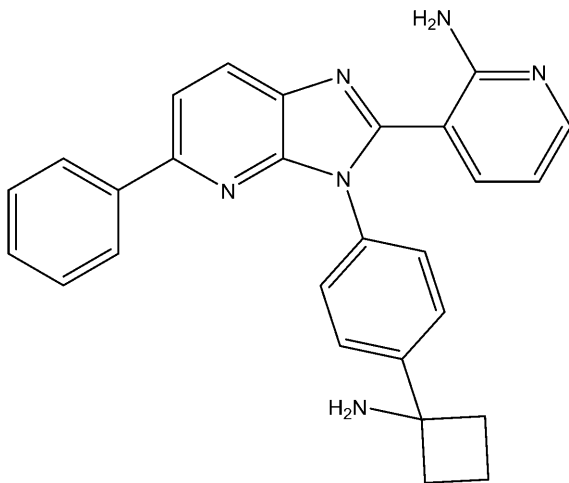


【0 6 3 1】

ミランセルチブ (A R Q - 0 9 2)

50

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、ミランセルチブである。ミランセルチブは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。3- [3- [4- (1-アミノシクロブチル) フェニル] -5-フェニルイミダゾ [4, 5-b] ピリジン-2-イル] ピリジン-2-アミン
 【0632】
 【化25】



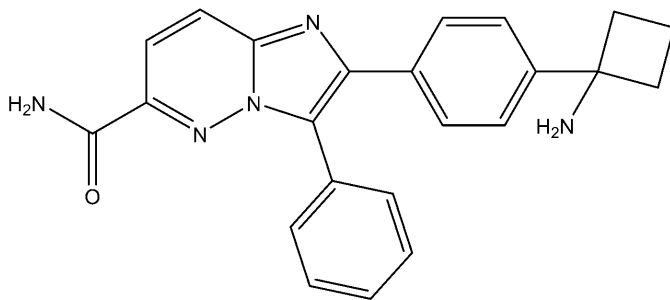
10

20

【0633】
 B A Y 1 1 2 5 9 7 6

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、B A Y 1 1 2 5 9 7 6である。B A Y 1 1 2 5 9 7 6は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。2- [4- (1-アミノシクロブチル) フェニル] -3-フェニルイミダゾ [1, 2-b] ピリダジン-6-カルボキサミド

【0634】
 【化26】



30

【0635】
 T A S - 1 1 7

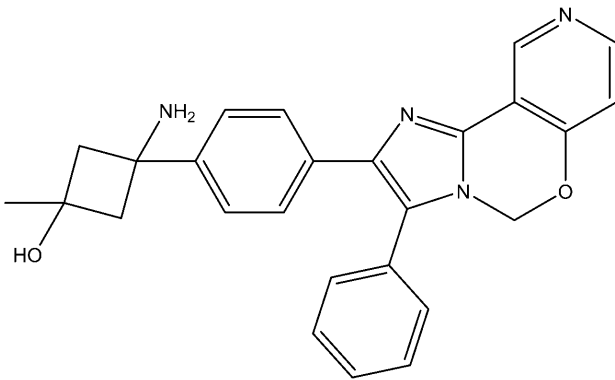
ある実施形態では、A K T 阻害剤は、T A S - 1 1 7である。T A S - 1 1 7は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。3-アミノ-1-メチル-3- [4- (5-フェニル-8-オキサ-3, 6, 12-トリアザトリシクロ [7. 4. 0. 02, 6] トリデカ-1 (9), 2, 4, 10, 12-ペンタエン-4-イル) フェニル] シクロブタン-1-オール

【0636】

40

50

【化 2 7】



10

【0 6 3 7】

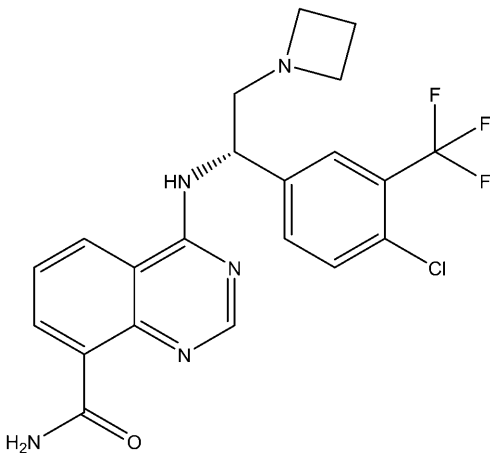
M S C 2 3 6 3 3 1 8 A

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、M S C 2 3 6 3 3 1 8 Aである。M S C 2 3 6 3 3 1 8 Aは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。4-[[[(1S)-2-(アゼチジン-1-イル)-1-[4-クロロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル]エチル]アミノ]キナゾリン-8-カルボキサミド

【0 6 3 8】

20

【化 2 8】



30

【0 6 3 9】

リン酸トリシリピン (V Q D-0 0 2)

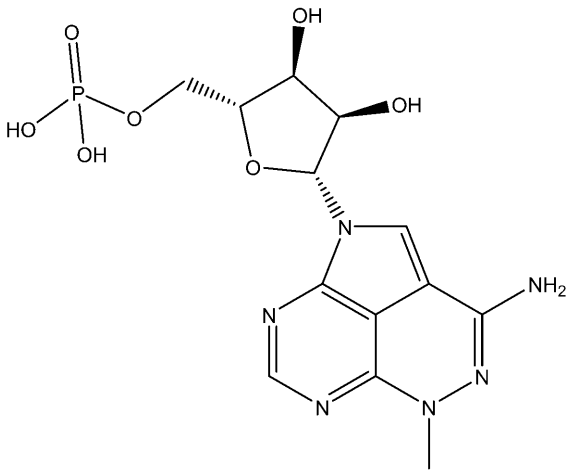
ある実施形態では、A K T 阻害剤は、リン酸トリシリピンである。リン酸トリシリピンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(5-アミノ-7-メチル-2, 6, 7, 9, 11-ペンタザトリシクロ[6.3.1.0.4, 12]ドデカ-1(12), 3, 5, 8, 10-ペンタエン-2-イル)-3, 4-ジヒドロキシオキソラン-2-イル]メチルリン酸二水素

40

【0 6 4 0】

50

【化 2 9】



10

【0 6 4 1】

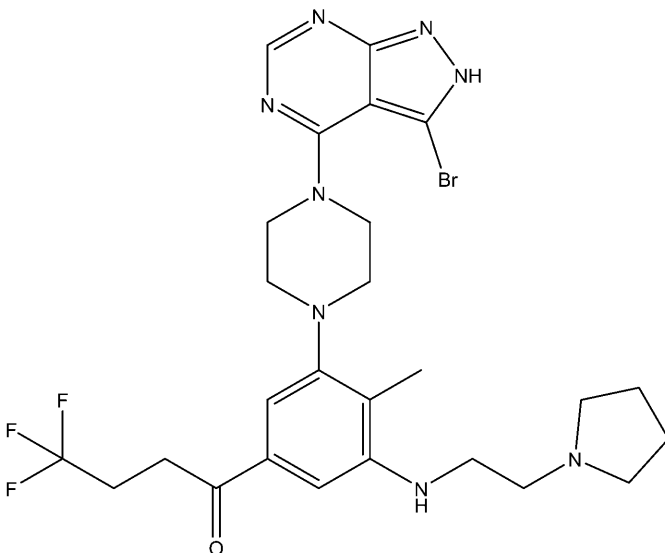
X L 4 1 8

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、X L 4 1 8 である。X L 4 1 8 は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。1- [3- [4- (3-ブromo-2 H-ピラゾロ [3, 4-d] ピリミジン-4-イル) ピペラジン-1-イル] -4-メチル-5- (2-ピロリジン-1-イルエチルアミノ) フェニル] -4, 4, 4-トリフルオロブタン-1-オン

20

【0 6 4 2】

【化 3 0】



30

40

【0 6 4 3】

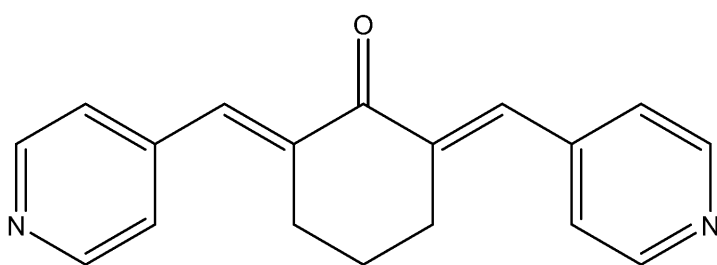
S C 6 6

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、S C 6 6 である。S C 6 6 は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。(2 E, 6 E) -2, 6-ビス (ピリジン-4-イルメチリデン) シクロヘキサン-1-オン

【0 6 4 4】

50

【化 3 1】



10

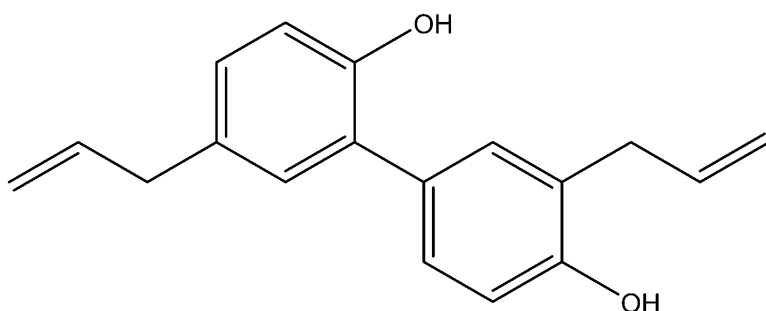
【0 6 4 5】

ホノキオール

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、ホノキオールである。ホノキオールは、以下のよう
に示される化学構造及び名称を有する。2 - (4 - ヒドロキシ - 3 - プロパ - 2 - エニ
ルフェニル) - 4 - プロパ - 2 - エニルフェノール

【0 6 4 6】

【化 3 2】



20

【0 6 4 7】

ベボリセルチブ (A R Q 7 5 1)

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、ベボリセルチブである。ベボリセルチブは、以下
のように示される化学構造及び名称を有する。N - [1 - [3 - [3 - [4 - (1 - アミ
ノシクロブチル) フェニル] - 2 - (2 - アミノピリジン - 3 - イル) イミダゾ [4 , 5
- b] ピリジン - 5 - イル] フェニル] ピペリジン - 4 - イル] - N - メチルアセトアミ
ド

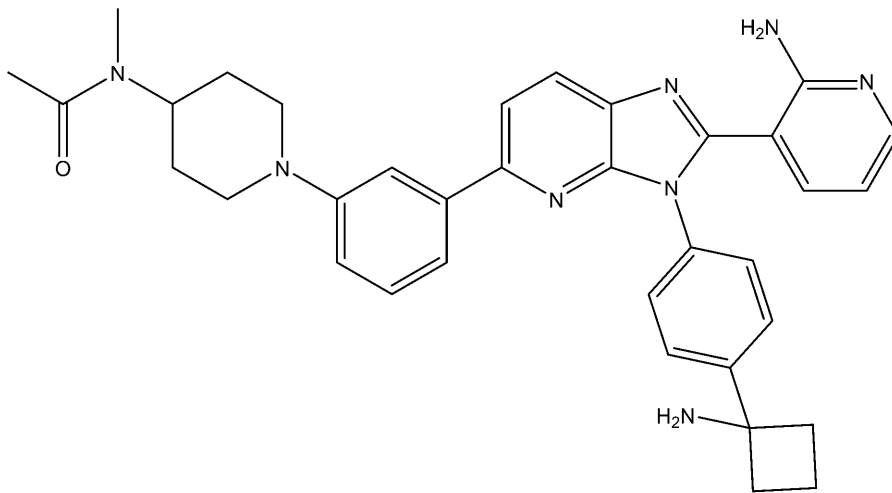
30

【0 6 4 8】

40

50

【化 3 3】



10

【0 6 4 9】

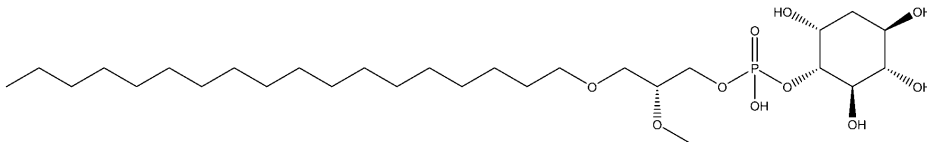
P X - 3 1 6

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、P X - 3 1 6 である。P X - 3 1 6 は、以下のよう
に示される化学構造及び名称を有する。〔(2 R) - 2 - メトキシ - 3 - オクタデコ
シプロピル〕〔(1 R, 2 R, 3 S, 4 R, 6 R) - 2, 3, 4, 6 - テトラヒドロキシ

20

【0 6 5 0】

【化 3 4】



30

【0 6 5 1】

A P I - 1

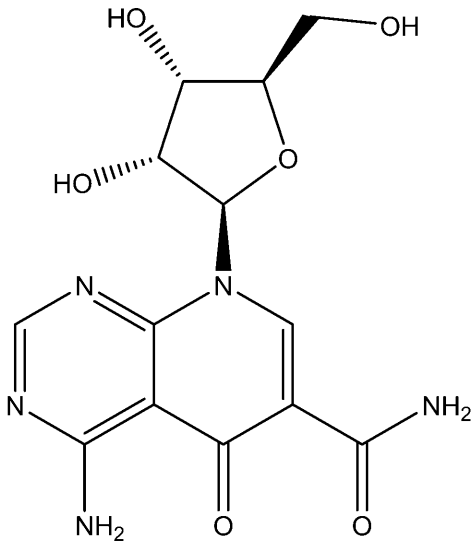
ある実施形態では、A K T 阻害剤は、A P I - 1 である。A P I - 1 は、以下のよう
に示される化学構造及び名称を有する。4 - アミノ - 8 - [(2 R, 3 R, 4 S, 5 R) -
3, 4 - ジヒドロキシ - 5 - (ヒドロキシメチル) オキサラン - 2 - イル] - 5 - オキソ
ピリド [2, 3 - d] ピリミジン - 6 - カルボキサミド

【0 6 5 2】

40

50

【化 3 5】



10

【 0 6 5 3】

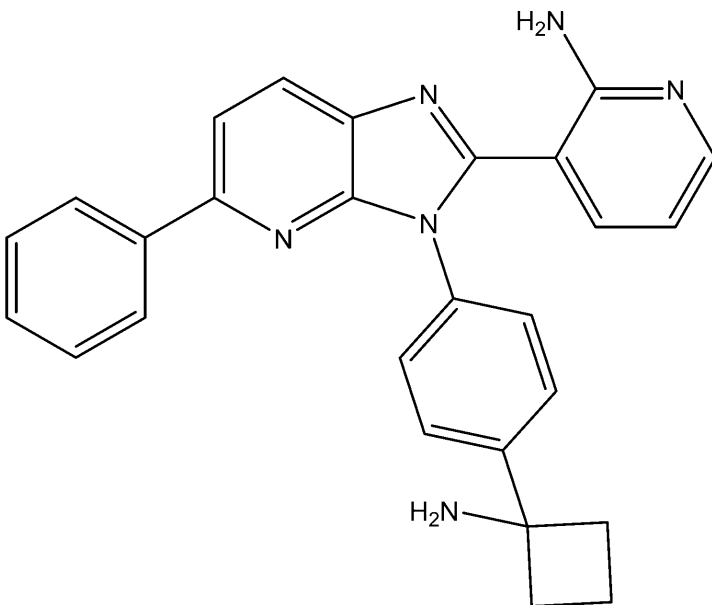
A L M 3 0 1

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、A L M 3 0 1 である。A L M 3 0 1 は、以下のよう
に示される化学構造及び名称を有する。3 - (3 - (4 - (1 - アミノシクロブチル)
フェニル) - 5 - フェニル - 3 H - イミダゾ [4 , 5 - b] ピリジン - 2 - イル) ピリジ
ン - 2 - アミン

20

【 0 6 5 4】

【化 3 6】



30

40

【 0 6 5 5】

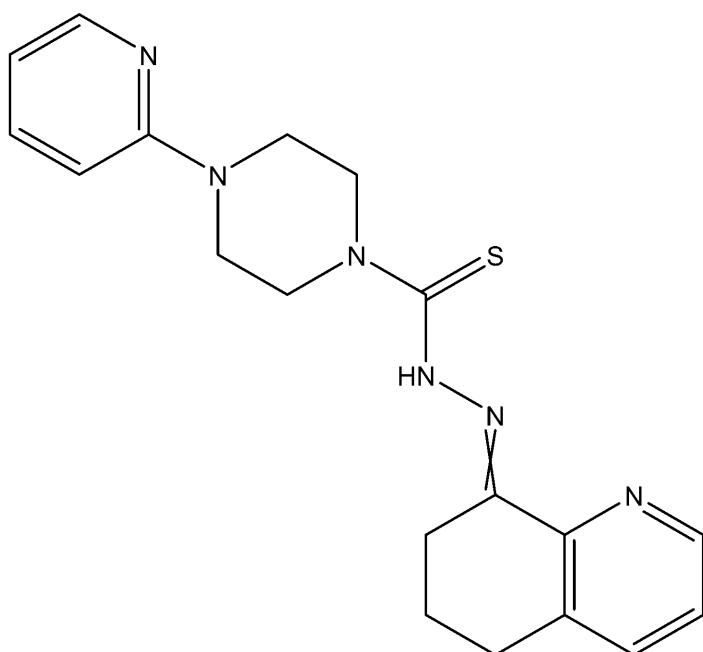
C O T I - 2

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、C O T I - 2 である。C O T I - 2 は、以下のよ
うに示される化学構造及び名称を有する。N - (6 , 7 - ジヒドロ - 5 H - キノリン - 8
- イリデンアミノ) - 4 - ピリジン - 2 - イルピペラジン - 1 - カルボチオアミド

【 0 6 5 6】

50

【化 3 7】



10

20

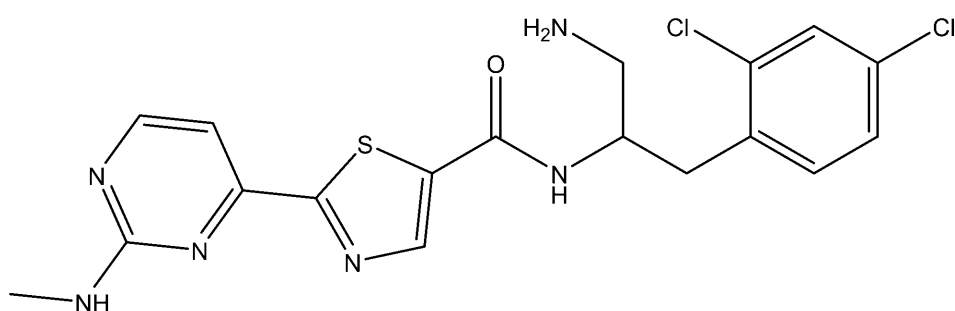
【 0 6 5 7 】

D C 1 2 0

ある実施形態では、AKT阻害剤は、DC120である。DC120は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。N-[1-アミノ-3-(2,4-ジクロロフェニル)プロパン-2-イル]-2-[2-(メチルアミノ)ピリミジン-4-イル]-1,3-チアゾール-5-カルボキサミド

【 0 6 5 8 】

【化 3 8】



30

【 0 6 5 9 】

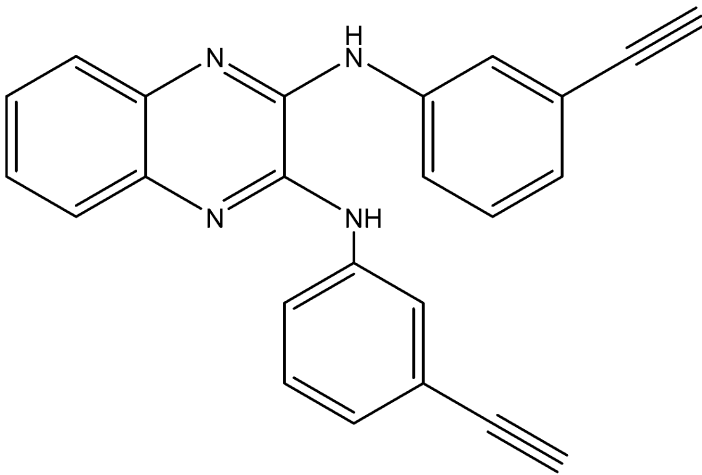
T D 5 2

ある実施形態では、AKT阻害剤は、TD52である。TD52は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。2-N, 3-N-ビス(3-エチニルフェニル)キノキサリン-2, 3-ジアミン

【 0 6 6 0 】

40

【化 3 9】



10

【0 6 6 1】

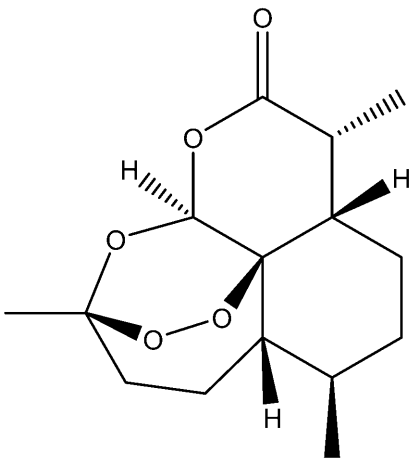
アルテミシニン

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、アルテミシニンである。アルテミシニンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。(1 R, 4 S, 5 R, 8 S, 9 R, 12 S, 13 R) - 1, 5, 9 - トリメチル - 11, 14, 15, 16 - テトラオキサテトラシクロ [10.3.1.0⁴, 1³.0⁸, 1³] ヘキサデカン - 10 - オン

20

【0 6 6 2】

【化 4 0】



30

【0 6 6 3】

ググルステロン

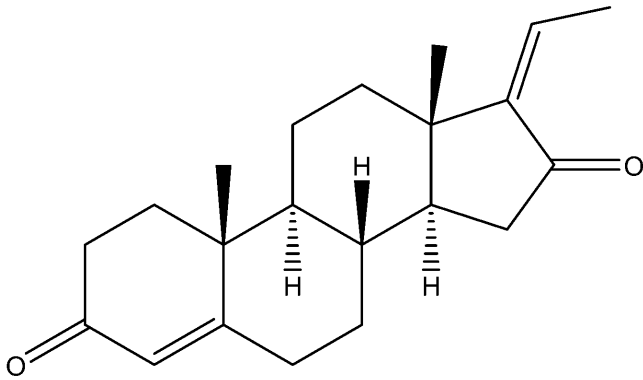
ある実施形態では、A K T 阻害剤は、ググルステロンである。ググルステロンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。(8 R, 9 S, 10 R, 13 S, 14 S, 17 Z) - 17 - エチリデン - 10, 13 - ジメチル - 1, 2, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, 15 - デカヒドロシクロペンタ [a] フェナントレン - 3, 16 - ジオン

40

【0 6 6 4】

50

【化 4 1】



10

【0665】

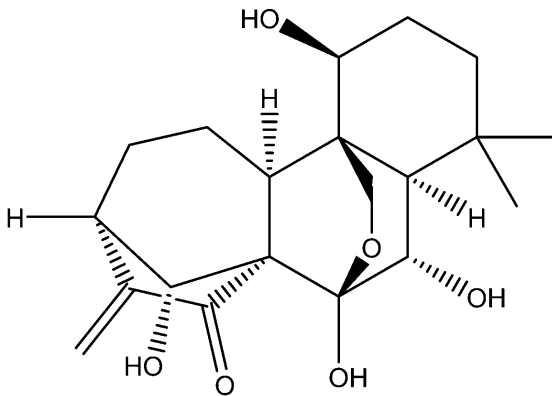
オリドニン (NSC-250682)

ある実施形態では、AKT阻害剤は、オリドニンである。オリドニンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。(1S, 2S, 5S, 8R, 9S, 10S, 11R, 15S, 18R)-9, 10, 15, 18-テトラヒドロキシ-12, 12-ジメチル-6-メチリデン-17-オキサペンタシクロ[7.6.2.1^{5,8}.0^{1,11}.0^{2,8}]オクタデカン-7-オン

20

【0666】

【化 4 2】



30

【0667】

セニセルチブ (AS-703569)

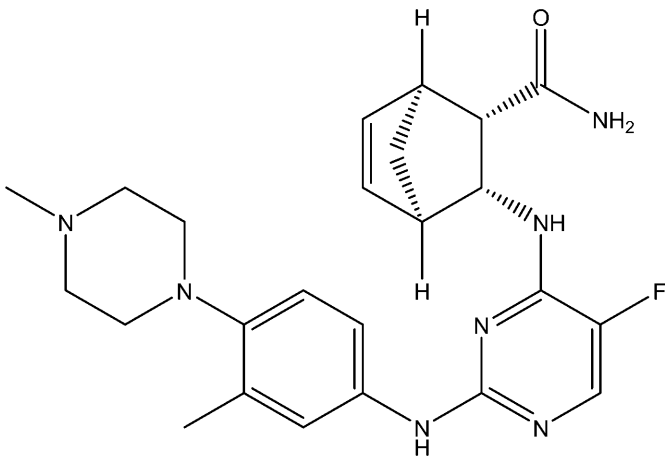
ある実施形態では、AKT阻害剤は、セニセルチブである。セニセルチブ n は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。(1S, 2S, 3R, 4R)-3-[[5-フルオロ-2-[3-メチル-4-(4-メチルピペラジン-1-イル)アミノ]ピリミジン-4-イル]アミノ]ピシクロ[2.2.1]ヘプタ-5-エン-2-カルボキサミド

40

【0668】

50

【化 4 3】



10

【0 6 6 9】

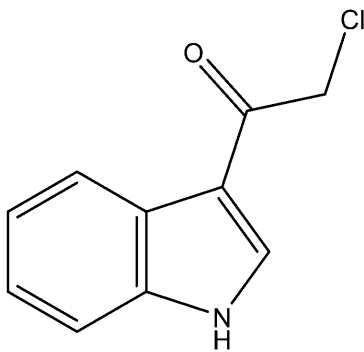
3 C A I

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、3 C A I である。3 C A I は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。2-クロロ-1-(1H-インドール-3-イル)エタノール

20

【0 6 7 0】

【化 4 4】



30

【0 6 7 1】

ボルセルチブ

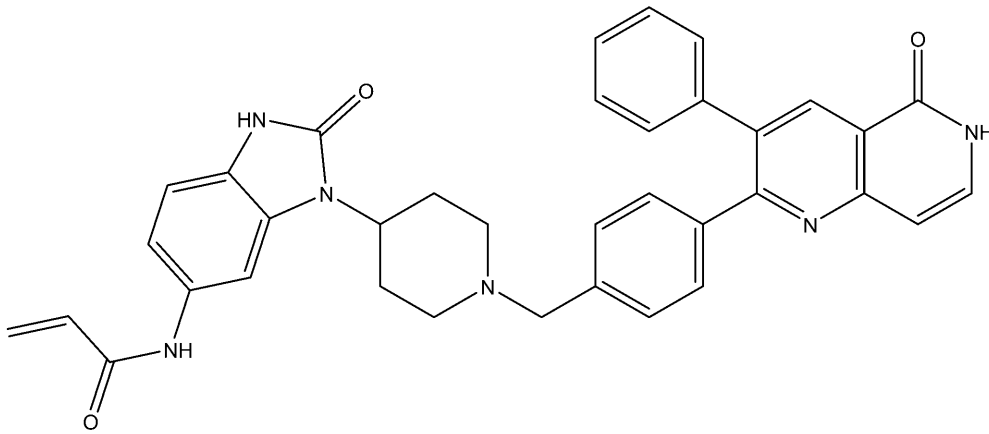
ある実施形態では、A K T 阻害剤は、ボルセルチブである。ボルセルチブは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。N-[2-オキソ-3-[1-[[4-(5-オキソ-3-フェニル-6H-1,6-ナフチリジン-2-イル)フェニル]メチル]ピペリジン-4-イル]-1H-ベンズイミダゾール-5-イル]プロパ-2-エンアミド

40

【0 6 7 2】

50

【化 4 5】



10

【0673】

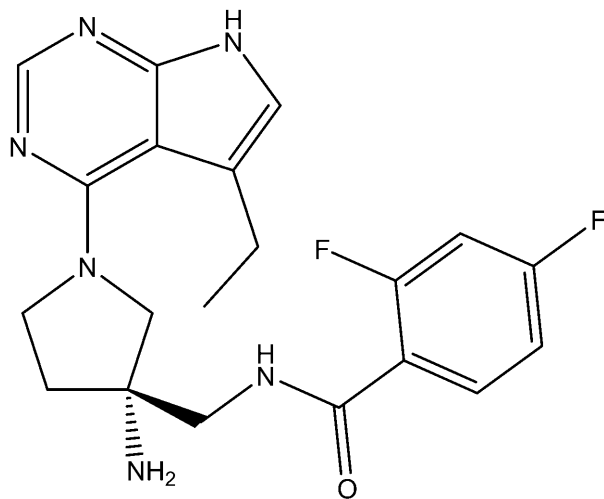
PF-AKT400

ある実施形態では、AKT阻害剤は、PF-AKT400である。PF-AKT400は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。N-[[[(3S)-3-アミノ-1-(5-エチル-7H-ピロロ[2,3-d]ピリミジン-4-イル)ピロリジン-3-イル]メチル]-2,4-ジフルオロベンズアミド

20

【0674】

【化 4 6】



30

【0675】

Hu7691

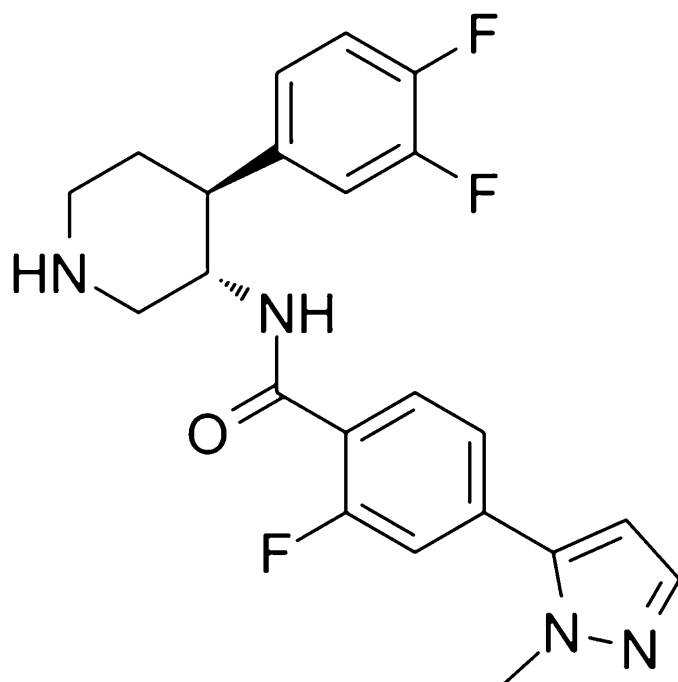
ある実施形態では、AKT阻害剤は、Hu7691である。Hu7691は、以下のように示される化学構造及び名称を有する。N-(3,4-ジフルオロフェニル)ピペリジン-3-イル)-2-フルオロ-4-(1-メチル-1H-ピラゾール-5-イル)ベンズアミド

40

【0676】

50

【化 4 7】



10

20

【0 6 7 7】

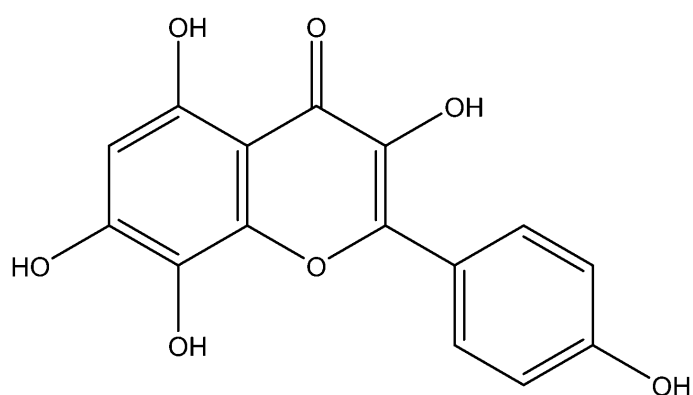
ヘルバセチン

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、ヘルバセチンである。ヘルバセチンは、以下のよう
に示される化学構造及び名称を有する。3, 5, 7, 8-テトラヒドロキシ-2-(4-
ヒドロキシフェニル)クロメン-4-オン

【0 6 7 8】

【化 4 8】

30



40

【0 6 7 9】

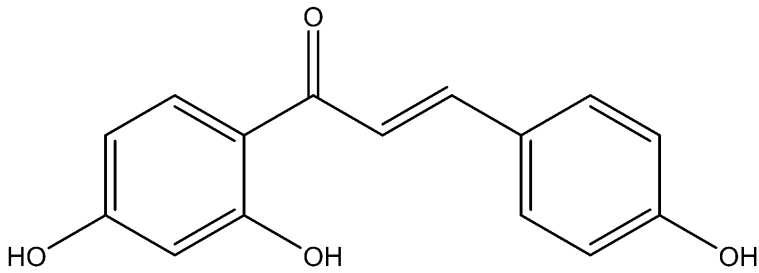
イソリキリチゲニン

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、イソリキリチゲニンである。イソリキリチゲニ
ンは、以下のように示される化学構造及び名称を有する。(E)-1-(2,4-ジヒドロ
キシフェニル)-3-(4-ヒドロキシフェニル)プロパ-2-エン-1-オン

【0 6 8 0】

50

【化 4 9】



10

【 0 6 8 1】

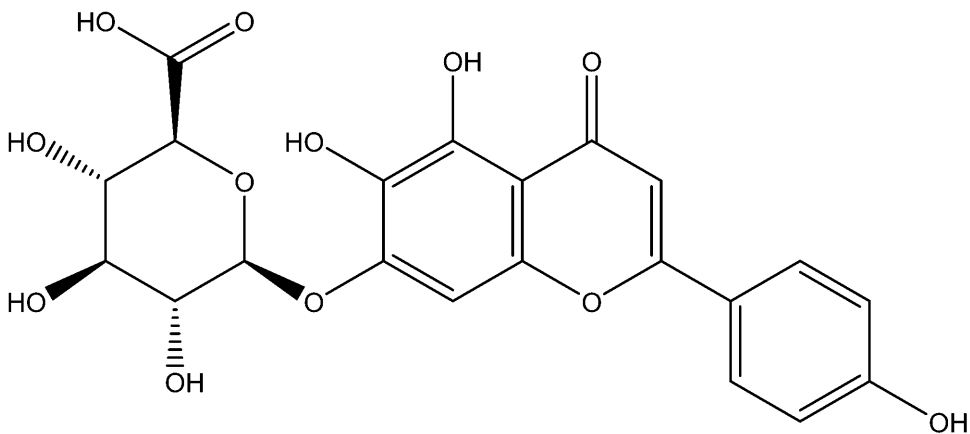
スクテラリン

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、スクテラリンである。スクテラリンは、以下のよう
 うに示される化学構造及び名称を有する。(2 S, 3 S, 4 S, 5 R, 6 S) - 6 - [5
 , 6 - ジヒドロキシ - 2 - (4 - ヒドロキシフェニル) - 4 - オキソクロメン - 7 - イル
] オキシ - 3 , 4 , 5 - トリヒドロキシオキサン - 2 - カルボン酸

【 0 6 8 2】

【化 5 0】

20



30

【 0 6 8 3】

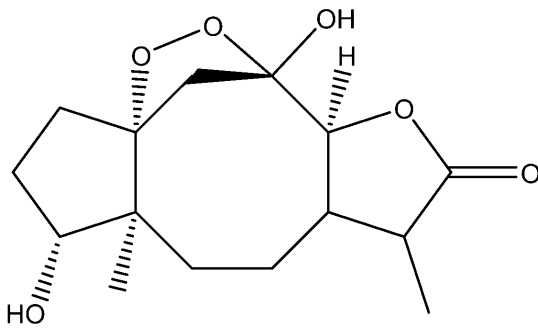
テヘラノリド

ある実施形態では、A K T 阻害剤は、テヘラノリドである。テヘラノリドは、以下のよ
 うに示される化学構造及び名称を有する。(1 R, 4 R, 5 S, 12 S, 13 S) - 4 ,
 13 - ジヒドロキシ - 5 , 9 - ジメチル - 11 , 14 , 15 - トリオキサテトラシクロ [11 . 2 . 1 . 0^{1,5} . 0^{8,12}] ヘキサデカン - 10 - オン

【 0 6 8 4】

40

【化 5 1】



10

【0685】

いくつかの実施形態では、AKT阻害剤は、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、ホノキオール、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。

【0686】

III. TIL製造プロセス2A

20

これらの特徴のうちのいくつかを含むプロセス2Aとして知られる例示的なTILプロセスが図2に示され、プロセス1Cに対する本発明のこの実施形態の利点のうちのいくつかが国際特許公開第WO2018/081473号に記載されている。プロセス2Aの実施形態を図1に示す。

【0687】

本明細書で考察されるように、本発明は、患者への移植前に凍結保存されたTILを再刺激して、それらの代謝活性、ひいては相対的健康を向上させることに関するステップ、及び当該代謝健康を試験する方法を含み得る。本明細書で一般に概説されるように、TILは、一般に、患者試料から採取され、患者への移植前にそれらの数を拡張するように操作される。いくつかの実施形態では、TILは、以下で考察されるように、任意で遺伝子操作され得る。

30

【0688】

いくつかの実施形態では、TILは、凍結保存され得る。解凍した時点で、それらが再刺激されて、患者への注入前に代謝を高めることができる。

【0689】

いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図で詳細に考察されるように、第1の拡張（REP前と称されるプロセス、ならびに図1にステップAとして示されるプロセスを含む）は、3～14日に短縮され、第2の拡張（REPと称されるプロセス、ならびに図1にステップBとして示されるプロセスを含む）は、7～14日に短縮される。いくつかの実施形態では、第1の拡張（例えば、図1にステップBとして記載される拡張）は、11日に短縮され、第2の拡張（例えば、図1にステップDとして記載される拡張）は、11日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図で詳細に考察されるように、第1の拡張と第2の拡張との組み合わせ（例えば、図1にステップB及びステップDとして記載される拡張）は、22日に短縮される。

40

【0690】

以下の「ステップ」表記A、B、Cなどは、図1を参照し、本明細書に記載のある特定の実施形態を参照する。以下及び図1におけるステップの順序は例示であり、ステップの任意の組み合わせまたは順序、ならびに追加のステップ、ステップの繰り返し、及び／またはステップの省略は、本出願及び本明細書に開示される方法によって企図される。

【0691】

50

A. ステップ A：患者の腫瘍試料を取得する

一般に、T I L は、最初に患者の腫瘍試料から取得され、その後、本明細書に記載されるさらなる操作のためにより大きい集団に拡張され、任意選択で凍結保存され、本明細書に概説されるように再刺激され、任意選択で T I L 健康の指標として表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【0692】

患者の腫瘍試料は、一般に外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段を介して、当該技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。いくつかの実施形態では、多病変サンプリングが使用される。いくつかの実施形態では、外科的切除、針生検、コア生検、小生検、または腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料を取得するための他の手段は、多病変サンプリングを含む（すなわち、患者の 1 つ以上の腫瘍部位及び／または場所、ならびに同じ場所または近接した 1 つ以上の腫瘍から試料を取得する）。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、肺組織のものであり得る。いくつかの実施形態では、有用な T I L は、非小細胞肺癌（N S C L C）から得られる。固形腫瘍は、皮膚組織のものであり得る。いくつかの実施形態では、有用な T I L は、黒色腫から取得される。

【0693】

取得された時点で、腫瘍試料は、一般に、鋭的解剖を使用して 1 ～約 8 mm³ の小片に断片化され、約 2 ～3 mm³ が特に有用である。いくつかの実施形態では、T I L は、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 緩衝液、2 mM グルタミン酸、10 mcg/mL ゲンタマイシン、30 単位/mL DNase、及び 1.0 mg/mL コラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（例えば、組織解離機を使用する）によって産生され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ 1 分間機械的に解離させ、続いて 5% CO₂ 中 37 °C で 30 分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離及びインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって産生することができる。このプロセスの最後に、細胞懸濁液中に多数の赤血球または死細胞が含まれている場合、F I C O L L 分岐親水性多糖類を使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。米国特許出願公開第 2012/0244133 A1 号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの当該技術分野で知られている代替の方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかが、T I L を拡張する方法またはがんを治療する方法について本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

【0694】

腫瘍解離酵素混合物には、1 つ以上の解離（消化）酵素、例えば、限定されないが、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはコラゲナーゼの種類を含む）、Accutase（商標）、Accumax（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、X I V 型プロテアーゼ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼ I（DNase）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【0695】

いくつかの実施形態では、解離酵素は、凍結乾燥酵素から再構成される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥酵素は、H B S S などの滅菌緩衝液の量で再構成される。

【0696】

いくつかの事例では、コラゲナーゼ（アニマルフリー 1 型コラゲナーゼなど）を、10 mL の滅菌 H B S S または別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、2892

10

20

30

40

50

PZ U／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、5 mL～15 mLの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナーゼストックは、約100 PZ U／mL～約400 PZ U／mLの範囲、例えば、約100 PZ U／mL～約400 PZ U／mL、約100 PZ U／mL～約350 PZ U／mL、約100 PZ U／mL～約300 PZ U／mL、約150 PZ U／mL～約400 PZ U／mL、約100 PZ U／mL、約150 PZ U／mL、約200 PZ U／mL、約210 PZ U／mL、約220 PZ U／mL、約230 PZ U／mL、約240 PZ U／mL、約250 PZ U／mL、約260 PZ U／mL、約270 PZ U／mL、約280 PZ U／mL、約289.2 PZ U／mL、約300 PZ U／mL、約350 PZ U／mL、または約400 PZ U／mLである。

10

【0697】

いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼは、1 mLの滅菌HBSSまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥ストック酵素は、175 DMC U／バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、再構成後の中性プロテアーゼストックは、約100 DMC／mL～約400 DMC／mLの範囲、例えば、約100 DMC／mL～約400 DMC／mL、約100 DMC／mL～約350 DMC／mL、約100 DMC／mL～約300 DMC／mL、約150 DMC／mL～約400 DMC／mL、約100 DMC／mL、約110 DMC／mL、約120 DMC／mL、約130 DMC／mL、約140 DMC／mL、約150 DMC／mL、約160 DMC／mL、約170 DMC／mL、約175 DMC／mL、約180 DMC／mL、約190 DMC／mL、約200 DMC／mL、約250 DMC／mL、約300 DMC／mL、約350 DMC／mL、または約400 DMC／mLである。

20

【0698】

いくつかの実施形態では、DNAse Iは、1 mLの滅菌HBSSまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥したストック酵素は、4 KU／バイアルの濃度であった。いくつかの実施形態では、再構成後のDNAse Iストックは、約1 KU／mL～10 KU／mL、例えば、約1 KU／mL、約2 KU／mL、約3 KU／mL、約4 KU／mL、約5 KU／mL、約6 KU／mL、約7 KU／mL、約8 KU／mL、約9 KU／mL、または約10 KU／mLの範囲である。

30

【0699】

いくつかの実施形態では、酵素のストックは可変であり、濃度を決定する必要がある。いくつかの実施形態では、凍結乾燥ストックの濃度を検証することができる。いくつかの実施形態では、消化カクテルに添加される酵素の最終量は、決定されたストック濃度に基づいて調整される。

【0700】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約4.7 mLの滅菌HBSS中に約10.2 uLの中性プロテアーゼ(0.36 DMC U／mL)、21.3 uLのコラゲナーゼ(1.2 PZ／mL)及び250 uLのDNAse I(200 U／mL)を含む。

【0701】

上に示されるように、いくつかの実施形態では、TILは、固形腫瘍に由来する。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、断片化されない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は断片化されず、全腫瘍として酵素消化に供される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNAse、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNAse、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で1～2時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNAse、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で1～2時間、37℃、5% CO₂で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNAse、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で1～2時間、37℃、5% CO₂で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晩消化される。

40

50

いくつかの実施形態では、腫瘍は、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で一定の回転を伴って一晚消化される。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わせられて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

【0702】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、滅菌緩衝液中の凍結乾燥酵素で再構成される。いくつかの実施形態では、緩衝液は、滅菌HBSSである。

【0703】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、コラゲナーゼを含む。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、コラゲナーゼIVである。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼの作業ストックは、 $100\text{mg}/\text{mL}$ の10倍作業ストックである。

10

【0704】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、DNAseを含む。いくつかの実施形態では、DNAseの作業ストックは、 $10,000\text{IU}/\text{mL}$ の10倍作業ストックである。

【0705】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ヒアルロニダーゼを含む。いくつかの実施形態では、ヒアルロニダーゼの作業ストックは、 $10\text{mg}/\text{mL}$ の10倍作業ストックである。

【0706】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、 $10\text{mg}/\text{mL}$ のコラゲナーゼ、 $1000\text{IU}/\text{mL}$ のDNAse、及び $1\text{mg}/\text{mL}$ のヒアルロニダーゼを含む。

20

【0707】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、 $10\text{mg}/\text{mL}$ のコラゲナーゼ、 $500\text{IU}/\text{mL}$ のDNAse、及び $1\text{mg}/\text{mL}$ のヒアルロニダーゼを含む。

【0708】

一般に、採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【0709】

いくつかの実施形態では、断片化は、例えば、解剖及び消化を含む物理的断片化を含む。いくつかの実施形態では、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は、解剖である。いくつかの実施形態では、断片化は、消化によるものである。いくつかの実施形態では、TILは、患者から取得された腫瘍試料を消化または断片化することから取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から最初に培養され得る。

30

【0710】

腫瘍が固形腫瘍であるいくつかの実施形態では、腫瘍試料が、例えば、ステップA（図1または図8に提供される）で取得された後、腫瘍は物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存前に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後に、いずれの凍結保存もない場合に起こる。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、10、20、30、40個またはそれ以上の断片または小片が、第1の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、30または40個の断片または小片が、第1の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、腫瘍は断片化され、40個の断片または小片が、第1の拡張のために各容器内に配置される。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約4～約50個の断片を含み、各断片は、約 27mm^3 の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 1300mm^3 ～約 1500mm^3 の総体積を伴う約30～約60個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 1350mm^3 の総体積を伴う約50個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約1グラム～約1.5グラムの総質量を伴う約50個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約4個の断片を含む。

40

【0711】

いくつかの実施形態では、TILは、腫瘍断片から取得される。いくつかの実施形態で

50

は、腫瘍断片は、鋭的解剖によって取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $1\text{ mm}^3 \sim 10\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $1\text{ mm}^3 \sim 8\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 1 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 2 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 3 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 4 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 5 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 6 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 7 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 8 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 9 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 10 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $1 \sim 4\text{ mm} \times 1 \sim 4\text{ mm} \times 1 \sim 4\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $2\text{ mm} \times 2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、 $4\text{ mm} \times 4\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ である。

10

【0712】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性、壊死性、及び／または脂肪性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の壊死性組織の量を最小化するために切除される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の脂肪性組織の量を最小化するために切除される。

【0713】

いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、腫瘍の内部構造を維持するために行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスでのこ引き動作を行うことなく行われる。いくつかの実施形態では、TILは、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、RPMI 1640 (2mM GlutaMAX、10mg/mL ゲンタマイシン、30U/mL DNase、及び1.0mg/mL コラゲナーゼ) であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離 (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ1分間機械的に解離され得る。その後、溶液が5% CO₂ 中37℃で30分間インキュベートされ、その後、およそ1分間再び機械的に破壊され得る。5% CO₂ 中37℃で30分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ1分間、3回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、3回目の機械的破壊後、5% CO₂ 中37℃でさらに30分間インキュベートするかにかかわらず、1回または2回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ficollを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

20

30

【0714】

いくつかの実施形態では、第1の拡張ステップの前に採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【0715】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料採取後に任意選択で凍結され、ステップBに記載される拡張に入る前に凍結保存され得、これは、以下でさらに詳細に説明され、図1及び図8にも例示される。

40

【0716】

1. 胸水T細胞及びTIL

いくつかの実施形態では、試料は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのT細胞またはTILの供給源は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、試料は、胸水由来試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のためのTILの供給源は、胸水由来試料である。例えば、米国特許公開第2014/0295426号に記載されている方法を参照

50

されたく、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0717】

いくつかの実施形態では、T I Lと思われる、及び／またはT I Lを含む任意の胸腔内液または胸水を利用することができる。かかる試料は、N S C L CもしくはS C L Cなどの原発性または転移性肺癌に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、別の臓器、例えば、乳房、卵巣、結腸、または前立腺に由来する二次転移性がん細胞に由来し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜浸出液である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜漏出液である。他の生体試料は、例えば、腹部からの腹水または脾嚢胞液を含む、T I Lを含有する他の漿液を含み得る。腹水及び胸腔内液は、非常に類似した化学系を伴い、腹部及び肺の両方が、悪性腫瘍における同じ物質の胸膜空間及び腹部空間に中皮線及び流体形態を有し、いくつかの実施形態では、かかる流体は、T I Lを含有する。開示される方法が胸水を利用するいくつかの実施形態では、同じ方法が、T I Lを含有する他の嚢胞液を使用して同様の結果で行われてもよい。

10

【0718】

いくつかの実施形態では、胸腔内液は、患者から直接除去された未処理の形態である。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、さらなる処理ステップの前に、E D T Aまたはヘパリンチューブなどの標準的な採血管に入れられる。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、さらなる処理ステップの前に、標準的なC e l l S a v e（登録商標）チューブ（V e r i d e x）に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、生存T I Lの数の減少を避けるために、患者から採取した直後にC e l l S a v eチューブに入れられる。生存T I Lの数は、4℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置されると、24時間以内に大幅に減少する可能性がある。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの除去後1時間、5時間、10時間、15時間、または最大24時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、4℃で、患者からの除去後1時間、5時間、10時間、15時間、または最大24時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

20

【0719】

いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸腔内液試料は、希釈され得る。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1：10である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1：9である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1：8である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1：5である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1：2である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1：1である。いくつかの実施形態では、希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、別の緩衝液、または生理学的に許容される希釈剤が含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの収集及び希釈の直後にC e l l S a v eチューブ内に入れられ、生存T I Lの減少を回避し、これは、4℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置された場合、24～48時間以内に有意に生じ得る。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後1時間、5時間、10時間、15時間、24時間、36時間、最大48時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、4℃で、患者からの除去及び希釈後1時間、5時間、10時間、15時間、24時間、36時間、最大48時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

30

40

【0720】

さらに他の実施形態では、胸腔内液試料は、さらなる処理ステップの前に、従来の手段によって濃縮される。いくつかの実施形態では、胸腔内液のこの前処理は、方法を実施する実験室への輸送のために、またはその後の分析のために（例えば、採取後24～48時間より後に）胸水を凍結保存しなければならない状況において好ましい。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、それが対象から採取された後に胸腔内液試料を遠心分離し、遠心分離物またはペレットを緩衝液中に再懸濁することによって調製される。いくつかの

50

実施形態では、胸腔内液試料は、輸送または後の分析及び／または処理のために凍結保存される前に、複数の遠心分離及び再懸濁に供される。

【0721】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、濾過法を使用することによって、さらなる処理ステップの前に濃縮される。いくつかの実施形態では、さらなる処理で使用される胸腔内液試料は、胸腔内液が膜を通過することを可能にするが腫瘍細胞を保持する、既知で本質的に均一な孔径を含むフィルターを通して流体を濾過することによって調製される。いくつかの実施形態では、膜の細孔の直径は、少なくとも4 μ Mであり得る。他の実施形態では、細孔直径は、5 μ M以上であり得、他の実施形態では、6、7、8、9、または10 μ Mのうちのいずれかであり得る。濾過後、膜によって保持されたTILを含む細胞を、膜から適切な生理学的に許容される緩衝液にすすいでもよい。次いで、このように濃縮されたTILを含む細胞は、方法のさらなる処理ステップで使用する事ができる。

10

【0722】

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸腔内液、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数のRBCを含む状況で、さらなる処理ステップの前に行われる。好適な溶解試薬には、単一の溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または溶解剤、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。好適な溶解システムは市販されており、BD Pharm Lyse（商標）システム（Becton Dickinson）が含まれる。他の溶解システムには、Versalyse（商標）システム、FACS Lyse（商標）システム（Becton Dickinson）、Immunoprep（商標）システム、またはErythrolyse IIシステム（Beckman Coulter, Inc.）、または塩化アンモニウムシステムが含まれる。いくつかの実施形態では、溶解試薬は、赤血球の効率的な溶解、ならびに胸水におけるTIL及びTILの表現型特性の保存のような主要な要件によって異なり得る。溶解のための単一の試薬を利用することに加えて、本明細書に記載の方法に有用な溶解システムは、第2の試薬、例えば、方法の残りのステップ中に溶解試薬の効果をクエンチまたは遅延させるもの、例えばStablyse（商標）試薬（Beckman Coulter, Inc.）を含むことができる。溶解試薬の選択または方法の好ましい実施に応じて、従来の固定試薬を使用することもできる。

20

30

【0723】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、未処理、希釈または多重遠心分離または処理された胸腔内液試料は、本明細書で提供されるようにさらに処理及び／または拡張される前に、約-140℃の温度で凍結保存される。

【0724】

2. CD39／CD69二重陰性及びCD39／CD69二重KOの事前選択選択

本発明のいくつかの方法によれば、TILは、第1の拡張前に（i）CD39／CD69二重陰性、（ii）CD39／CD69二重ノックアウト、または（iii）（i）及び（ii）の組み合わせであるように事前選択される。いくつかの実施形態では、PD-1についての任意選択の事前選択ステップも存在する。

40

【0725】

いくつかの実施形態では、最低3,000個のTILが、第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低3,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低4,000個のTILが、第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低4,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低5,000個のTILが、第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低5,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低6,000個のTILが、第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低6,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、

50

、最低 7, 000 個の TIL が、第 1 の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低 7, 000 個個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 8, 000 個の TIL が、第 1 の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低 8, 000 個個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 9, 000 個の TIL が、第 1 の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低 9, 000 個個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 10, 000 個の TIL が、第 1 の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低 10, 000 個個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 20, 000 個の TIL が、第 1 の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低 20, 000 個個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 30, 000 個の TIL が、第 1 の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低 30, 000 個個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 40, 000 個の TIL が、第 1 の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低 40, 000 個個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 50, 000 個の TIL が、第 1 の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低 50, 000 個個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 60, 000 個の TIL が、第 1 の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低 60, 000 個個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 70, 000 個の TIL が、第 1 の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低 70, 000 個個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 80, 000 個の TIL が、第 1 の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低 80, 000 個個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 90, 000 個の TIL が、第 1 の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低 90, 000 個個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 100, 000 個の TIL が、第 1 の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低 100, 000 個個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、細胞を、200, 000 個の密度まで成長または拡張させる。いくつかの実施形態では、細胞を、200, 000 個の密度まで成長または拡張させて、第 2 の拡張を開始するための約 2×10^8 個の TIL を提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、150, 000 個の密度まで成長または拡張させる。いくつかの実施形態では、細胞を、150, 000 個の密度まで成長または拡張させて、第 2 の拡張を開始するための約 2×10^8 個の TIL を提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、250, 000 個の密度まで成長または拡張させる。いくつかの実施形態では、細胞を、250, 000 個の密度まで成長または拡張させて、第 2 の拡張を開始するための約 2×10^8 個の TIL を提供する。いくつかの実施形態では、最小細胞密度は、第 2 の拡張を開始するための 10×10^6 個を与えるために、10, 000 個の細胞である。いくつかの実施形態では、第 2 の拡張を開始するための 10×10^6 個の播種密度は、 1×10^9 個を超える TIL をもたらし得る。

10

20

30

40

【0726】

いくつかの実施形態では、第 1 の拡張において使用するための TIL は、(i) CD39/CD69 二重陰性及び／または CD39^{LO}/CD69^{LO}、(ii) CD39/CD69 二重ノックアウト、または (iii) (i) 及び (ii) の組み合わせ（例えば、事前選択後、及び第 1 の拡張前）である。いくつかの実施形態では、第 1 の拡張において使用するための TIL は、少なくとも 75% (i) CD39/CD69 二重陰性及び／または CD39^{LO}/CD69^{LO}、(ii) CD39/CD69 二重ノックアウト、または (iii) (i) 及び (ii) の組み合わせ、少なくとも 80% (i) CD39/CD69 二重陰性及び／または CD39^{LO}/CD69^{LO}、(ii) CD39/CD69 二重ノックアウト、または (iii) (i) 及び (ii) の組み合わせ、少なくとも 85%

50

(i) CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i) 及び(ii) の組み合わせ、少なくとも90% (i) CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i) 及び(ii) の組み合わせ、少なくとも95% (i) CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i) 及び(ii) の組み合わせ、少なくとも98% (i) CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i) 及び(ii) の組み合わせ、または少なくとも99% (i) CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i) 及び(ii) の組み合わせ(例えば事前選択後及び第1の拡張前)である。

10

【0727】

いくつかの実施形態では、CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO} TILの事前選択は、一次細胞集団、全腫瘍消化物、及び／または全腫瘍細胞懸濁液TILを抗CD39抗体及び抗CD69抗体で染色することによって行われる。いくつかの実施形態では、抗CD39及び抗CD69抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトCD39及びCD69ポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトCD39及びCD69ポリクローナル抗体などである。いくつかの実施形態では、抗CD39及び抗CD69抗体は、モノクローナル抗体である。

20

【0728】

いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗CD39抗体は、CD39を発現する細胞の少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%に結合する。いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗CD69抗体は、CD69を発現する細胞の少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%に結合する。

【0729】

いくつかの実施形態では、患者は、抗PD-1抗体で治療されている。いくつかの実施形態では、対象は、抗PD-1抗体治療ナীবである。いくつかの実施形態では、対象は、抗PD-1抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、対象は、以前に化学療法剤で治療されている。いくつかの実施形態では、対象は、以前に化学療法剤で治療されているが、もはや化学療法剤で治療されていない。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後または抗PD-1抗体治療後である。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後であり、かつ抗PD-1抗体治療後である。いくつかの実施形態では、患者は、抗PD-1抗体治療ナীবである。いくつかの実施形態では、対象は、治療ナীবのがんを有するか、または化学療法治療後であるが、抗PD-1ナীবである。いくつかの実施形態では、対象は、治療ナীবであり、かつ化学療法治療後であるが、抗PD-1抗体治療ナীবである。

30

40

【0730】

いくつかの実施形態では、事前選択は、細胞選別法を使用して行われる。いくつかの実施形態では、細胞選別法は、フローサイトメトリー法、例えば、フロー活性化細胞選別法(FACS)である。いくつかの実施形態では、陰性は、FMOに基づいてゲーティングされる。いくつかの実施形態では、FACSゲートは、対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することにより、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受け入れるステップの後に設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、各選別に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、PBM Cの各試料に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、PBM Cの各試料に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、

50

P B M C から 10 日、20 日、30 日、40 日、50 日、または 60 日毎に設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、P B M C から 60 日ごとに設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、10 日、20 日、30 日、40 日、50 日、または 60 日毎に P B M C の各試料に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、60 日毎に P B M C の各試料に対して設定される。

【0731】

いくつかの実施形態では、事前選択は、第 1 の T I L 集団から (i) C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O}、(ii) C D 3 9 / C D 6 9 二重ノックアウト、または (iii) (i) 及び (ii) の組み合わせを選択して、少なくとも 11.27%~74.4% C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L である T I L 集団を第 1 の T I L 集団から選択することを含む、T I L 集団を取得することを伴う。いくつかの実施形態では、第 1 の T I L 集団は、少なくとも 10%~80% C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L、少なくとも 20%~80% C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L、少なくとも 20%~80% C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L、少なくとも 30%~80% C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L、少なくとも 40%~80% C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L、少なくとも 50%~80% C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L、少なくとも 10%~70% C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L、少なくとも 20%~70% C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L、少なくとも 30%~70% C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L、または少なくとも 40%~70% C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L である。

【0732】

いくつかの実施形態では、選択ステップ（例えば、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性細胞の事前選択及び／または選択）は、

(i) 第 1 の T I L 集団及び P B M C 集団を、C D 3 9 及び C D 6 9 に結合する過剰のモノクローナル抗 C D 3 9 I g G 及び抗 C D 6 9 I g G 抗体に曝露するステップと、

(ii) フルオロフォアにコンジュゲートした過剰の抗 I g G 抗体を添加するステップと、

(iii) 蛍光活性化細胞選別法 (F A C S) によって行われた場合の P B M C 集団で検出されたフルオロフォアの強度と比較した第 1 の T I L 集団中の C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L で検出されたフルオロフォアの強度に基づいて、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L 集団を取得するステップと、を含む。

【0733】

いくつかの実施形態では、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L 集団の少なくとも 70% が、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L である。いくつかの実施形態では、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 濃縮 T I L 集団の少なくとも 80% が、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} T I L である。いくつかの実施形態では、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 濃縮 T I L 集団の少なくとも 90% が、P D - 1 陽性 T I L である。いくつかの実施形態では、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 濃縮 T I L 集団の少なくとも 95% が、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9^{L O} / C D 6 9^{L O} 濃縮 T I L 集団の少なくとも 99% が、C

CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TILである。いくつかの実施形態では、CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}濃縮TIL集団の100%が、CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TILである。

【0734】

いくつかの実施形態では、図8のステップA2として例示される選択ステップは、(i)第1のTIL集団を過剰のモノクローナル抗CD39及び抗CD69 IgG抗体に曝露するステップと、(ii)フルオロフォアにコンジュゲートされた過剰の抗IgG抗体を追加するステップと、(iii)フルオロフォアに基づいてフローベースの細胞選別を行って、(i)CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}、(ii)CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii)(i)及び(ii)濃縮TIL集団の組み合わせを取得するステップと、を含む。

10

【0735】

いくつかの実施形態では、実施例15のゲーティング法が用いられる。腫瘍試料に由来するTILがCD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}であるかどうかを決定するために、当業者は、1人以上の健康なヒト対象からの血液試料から取得された末梢T細胞におけるCD39及び／またはCD69の発現レベルに対応する参照値を利用することができる。参照試料中のCD39/CD69陽性細胞は、蛍光から1つの対照を引き算したものと、一致する同位体対照とを使用して定義することができる。いくつかの実施形態では、健康な対象からのCD3+/CD39+/CD69+末梢T細胞(例えば、参照細胞)において測定されたCD39/CD69の発現レベルを使用して、腫瘍から取得されたTILにおけるCD39/CD69の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立する。閾値は、CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TILのCD39/CD69免疫染色の最大強度として定義することができる。そのため、CD39/CD69発現が閾値と同じかそれを下回るTILは、CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}細胞であるとみなすことができる。いくつかの事例では、CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TILは、全CD3+細胞の最大1%以下に相当するCD39/CD69免疫染色の最低強度を有するものを表す。他の事例では、CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TILは、全CD3+細胞の最大0.75%以下に相当するCD39/CD69免疫染色の最低強度を有するものを表す。いくつかの事例では、CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TILは、全CD3+細胞の最大0.50%以下に相当するCD39/CD69免疫染色の最低強度を有するものを表す。1つの事例では、CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TILは、全CD3+細胞の最大0.25%以下に相当するCD39/CD69免疫染色の最低強度を有するものを表す。

20

30

【0736】

いくつかの実施形態では、実施例16のタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤(AKTi)法が用いられる。いくつかの実施形態では、TIL集団は、AKT阻害剤を含む培地中で培養され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び／またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得する。いくつかの実施形態では、AKT阻害剤は、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、ホノキオール、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、AKT阻害剤は、イパタセルチブである。いくつかの実施形態では、TIL集団は、約0.1μM、約0.2μM、約0.3μM、約0.4μM、約0.5μM、約0.6μM、約0.7μM、約0.8μM、約0.9μM、約1μM、約1.1μM、約1.2μM、約1.3μM、約1.4μM、約1.5μM、約1.6μM、約1.7μM、約1.8μM、約1.9μM、約2μM、約2.1μM、約2

40

50

． 2 μ M、約 2． 3 μ M、約 2． 4 μ M、約 2． 5 μ M、約 2． 6 μ M、約 2． 7 μ M、約 2． 8 μ M、約 2． 9 μ M、約 3 μ M、約 3． 5 μ M、約 4 μ M、約 4． 5 μ M、または約 5 μ M のイパタセルチブを含む培地で培養される。

【 0 7 3 7 】

a．フルオロフォア

いくつかの実施形態では、一次 T I L 細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗 C D 3 9 及び抗 C D 6 9 抗体及びフルオロフォアに連結された抗 C D 3 抗体を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次 T I L 細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗 C D 3 9 及び抗 C D 6 9 抗体（例えば、P E、live / dead バイオレット）及び抗 C D 3 - F I T C を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次 T I L 細胞集団は、第 1 のフルオロフォアにコンジュゲートされた抗 C D 3 9 及び第 2 のフルオロフォアにコンジュゲートされた抗 C D 6 9 抗体、第 3 のフルオロフォアにコンジュゲートされた抗 C D 3 抗体、及び live / dead 青色染色（ThermoFisher, MA、カタログ番号 L 2 3 1 0 5 から市販されているものなど）を含むカクテルで染色され、第 1、第 2、及び第 3 の抗体は異なり、個別の検出が可能である。いくつかの実施形態では、抗 C D 3 9 及び抗 C D 6 9 抗体とのインキュベーション後、(i) C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び / または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O}、(i i) C D 3 9 / C D 6 9 二重ノックアウト、または (i i i) (i) 及び (i i) 細胞の組み合わせは、本明細書、例えば、図 8 E 及び / または図 8 F 及び / または図 8 G に記載される第 1 の拡張による拡張のために選択される。

10

20

【 0 7 3 8 】

いくつかの実施形態では、一次 T I L 細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗 C D 3 9 及び抗 C D 6 9 抗体及びフルオロフォアに連結された抗 C D 3 抗体を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次 T I L 細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗 C D 3 9 及び抗 C D 6 9 抗体（例えば、P E、live / dead バイオレット）及び抗 C D 3 - P E - C y 7 を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次 T I L 細胞集団は、抗 C D 3 9 - F I T C 及び抗 C D 6 9 - P E、抗 C D 3 - P E - C y 7、及び live / dead 青色染色（ThermoFisher, MA、カタログ番号 L 2 3 1 0 5）を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、抗 C D 3 9 及び抗 C D 6 9 抗体とのインキュベーション後、(i) C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び / または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O}、(i i) C D 3 9 / C D 6 9 二重ノックアウト、または (i i i) (i) 及び (i i) 細胞の組み合わせは、本明細書、例えば、図 8 E 及び / または図 8 F 及び / または図 8 G のプロセス C D 3 9 / C D 6 9 G E N 3 のステップ B に記載されるプライミングによる第 1 の拡張による拡張のために選択される。

30

【 0 7 3 9 】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアとしては、P E（フィコエリトリン）、A P C（アロフィコシアニン）、P e r C P（ペリジニクロフィルタンパク質）、D y L i g h t 4 0 5、A l e x a F l u o r 4 0 5、P a c i f i c B l u e、A l e x a F l u o r 4 8 8、F I T C（フルオレセインイソチオシアネート）、D y L i g h t 5 5 0、A l e x a F l u o r 6 4 7、D y L i g h t 6 5 0、及び A l e x a F l u o r 7 0 0 が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、P E - A l e x a F l u o r（登録商標）6 4 7、P E - C y 5、P e r C P - C y 5. 5、P E - C y 5. 5、P E - A l e x a F l u o r（登録商標）7 5 0、P E - C y 7、及び A P C - C y 7 が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、フルオレセイン色素が含まれるが、これに限定されない。フルオレセイン色素の例には、5 - カルボキシフルオレセイン、フルオレセイン - 5 - イソチオシアネート及び 6 - カルボキシフルオレセイン、5, 6 - ジカルボキシフルオレセイン、5 -（及び 6）- スルホフルオレセイン、スルホンフルオレセイン、スクシニルフルオレセイン、5 -（及び 6）- カルボキシ S N A R F - 1、カルボキシフルオレセインスルホネート、カルボキシフルオレセイン双性イオン、カルボキ

40

50

シフルオレセイン四級アンモニウム、カルボキシフルオレセインホスホネート、カルボキシフルオレセインGABA、5' (6') -カルボキシフルオレセイン、カルボキシフルオレセイン-cys-Cy5、ならびにフルオレセイングルタチオンが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、蛍光部分は、ローダミン色素である。ローダミン色素の例には、テトラメチルローダミン-6-イソチオシアネート、5-カルボキシテトラメチルローダミン、5-カルボキシロードール誘導体、カルボキシローダミン110、テトラメチル及びテトラエチルローダミン、ジフェニルジメチル及びジフェニルジエチルローダミン、ジナフチルローダミン、ローダミン101スルホニルクロリド (TEXAS RED (登録商標) の商品名で販売される) が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、蛍光部分は、シアニン色素である。シアニン色素の例には、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、及びCy7が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0740】

B. ステップB：第1の拡張

いくつかの実施形態では、本方法は、対象／患者への投与時に複製サイクルを増加させることができ、したがって、より古いTIL (すなわち、対象／患者への投与前により多くの複製ラウンドをさらに受けたTIL) よりも追加の治療的利益を提供し得る、若いTILを得ることを提供する。若いTILの特徴は、文献、例えば、Donia, et al., Scand. J. Immunol. 2012, 75, 157-167、Dudley, et al., Clin. Cancer Res. 2010, 16, 6122-6131、Huang, et al., J. Immunother. 2005, 28, 258-267、Besser, et al., Clin. Cancer Res. 2013, 19, OF1-OF9、Besser, et al., J. Immunother. 2009, 32: 415-423、Robbins, et al., J. Immunol. 2004, 173, 7125-7130、Shen, et al., J. Immunother., 2007, 30, 123-129、Zhou, et al., J. Immunother. 2005, 28, 53-62、及びTran, et al., J. Immunother., 2008, 31, 742-751に記載されており、それらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

【0741】

Tリンパ球及びBリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：V (可変)、D (多様性)、J (接合)、及びC (一定) は、免疫グロブリン及びT細胞受容体 (TCR) の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、T細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるTILを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたTILは、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたTILは、新たに採取されたTIL及び／または例えば、図1または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたTILは、新たに採取されたTIL及び／または図5及び／または図6に例示されるようにプロセス1Cと称される方法を使用して調製されたTILと比較して、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第1の拡張で取得されたTILは、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはT細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、T細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるT細胞受容体のうちの1つにある。いくつかの実施形態では、T細胞受容体 (TCR) アルファ及び／またはベータの発現が増加

30

40

50

する。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、TCR $\alpha\beta$ （すなわち、TCR α/β ）の発現が増加する。

【0742】

例えば、図1または図8のステップAに記載されるものなどの腫瘍断片の解剖または消化後に、結果として得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもTILの成長を好む条件下で、IL-2を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、6000IU/mLのIL-2を有する不活性化ヒトAB血清を含む培地中2mLのウェル中でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に3～14日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 バルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、7～14日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 バルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、10～14日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 バルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、約11日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 バルクTIL細胞を生じる。

【0743】

好ましい実施形態では、TILの拡張は、以下及び本明細書に記載の初期バルクTIL拡張ステップ（例えば、REP前と称されるプロセスを含み得る、図1または図8のステップBに記載のものなど）、続いて以下のステップD及び本明細書に記載の第2の拡張（ステップD、急速拡張プロトコル（REP）ステップと称されるプロセスを含む）、続いて任意の凍結保存、続いて以下及び本明細書に記載の第2のステップD（再刺激REPステップと称されるプロセスを含む）を使用して行われ得る。このプロセスから取得されたTILは、本明細書に記載の表現型特徴及び代謝パラメータについて任意で特徴付けられ得る。

【0744】

TIL培養物が24ウェルプレートで開始される実施形態では、例えば、Costar 24ウェル細胞培養クラスター、平底（Corning Incorporated, Corning, NY）を使用して、IL-2（6000IU/mL、Chiron Corp., Emeryville, CA）を含む2mLの完全培地（CM）中の 1×10^6 個の腫瘍消化細胞または1つの腫瘍断片を、各ウェルに播種することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $1\text{mm}^3 \sim 10\text{mm}^3$ である。

【0745】

いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、培養培地の略語である「CM」と称される。いくつかの実施形態では、ステップBのCMは、10%ヒトAB血清、25mM HEPES、及び10mg/mLゲンタマイシンを補充した、GlutaMAXを含むRPMI 1640からなる。培養物が40mL容量及び 10cm^2 ガス透過性シリコン底部（例えば、G-REX10、Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN）を有するガス透過性フラスコ内で開始される実施形態では、各フラスコに、IL-2を含む10～40mLのCM中の $10 \sim 40 \times 10^6$ 個の生きた腫瘍消化細胞または5～30個の腫瘍断片を装填した。G-REX10及び24ウェルプレートの両方を、5% CO₂中37℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から5日後、培地の半分を取り除き、新たなCM及びIL-2と交換し、5日後、培地の半分を2～3日毎に交換した。

【0746】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【0747】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion Basal Medium、CTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion SFM、CTS（商標）AIM-V Medium、CTS（商標）AIM-V SFM、LymphoONE（商標）T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最小必須培地（MEM）、イーグル基礎培地（BME）、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地（ α MEM）、グラスゴー最小必須培地（G-MEM）、RPMI 成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0748】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、CTS（商標）Optmizer T-Cell Expansion Serum Supplement、CTS（商標）Immune Cell Serum Replacement、1つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の抗生物質、及び1つ以上の微量元素のうちの1つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ge^{4+} 、 Se^{4+} 、 Br 、 T 、 Mn^{2+} 、 P 、 Si^{4+} 、 V^{5+} 、 Mo^{6+} 、 Ni^{2+} 、 Rb^+ 、 Sn^{2+} 、及び Zr^{4+} を含有する化合物からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または2-メルカプトエタノールをさらに含む。

20

【0749】

いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Immune Cell Serum Replacementは、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion Basal Medium、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFM、CTS（商標）AIM-V Medium、CST（商標）AIM-V SFM、LymphoONE（商標）T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最小必須培地（MEM）、イーグル基礎培地（BME）、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地（ α MEM）、グラスゴー最小必須培地（G-MEM）、RPMI 成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

30

【0750】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（vol%）は、総無血清または合成培地の約1体積%、2体積%、3体積%、4体積%、5体積%、6体積%、7体積%、8体積%、9体積%、10体積%、11体積%、12体積%、13体積%、14体積%、15体積%、16体積%、17体積%、18体積%、19体積%、または20体積%である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約3%である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約5%である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約10%である。

40

【0751】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、CTS（商標）Optmizer

50

(商標) T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific) である。CTS (商標) Optmizer (商標) のいずれの製剤も、本発明において有用である。CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、1 L の CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion Basal Medium と、26 mL の CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion Supplement との組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充されている。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、55 mM の 2-メルカプトエタノールとともに、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充されている。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充されており、培地中の 2-メルカプトエタノールの最終濃度は、55 μ M である。

10

【0752】

いくつかの実施形態では、合成培地は、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific) である。CTS (商標) Optmizer (商標) のいずれの製剤も、本発明において有用である。CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、1 L の CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion Basal Medium と、26 mL の CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion Supplement との組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、55 mM の 2-メルカプトエタノールとともに、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充されている。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55 mM の 2-メルカプトエタノール、及び 2 mM の L-グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55 mM の 2-メルカプトエタノール、及び 2 mM の L-グルタミンが補充されており、約 1000 IU/mL ~ 約 8000 IU/mL の IL-2 をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55 mM の 2-メルカプトエタノール、及び 2 mM の L-グルタミンが補充されており、約 3000 IU/mL の IL-2 をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55 mM の 2-メルカプトエタノール、及び 2 mM の L-グルタミンが補充されており、約 6000 IU/mL の IL-2 をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM に

20

30

40

50

は、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）及び55mMの2-メルカプトエタノールが補充されており、約1000IU/mL～約8000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）及び55mMの2-メルカプトエタノールが補充されており、約3000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）及び55mMの2-メルカプトエタノールが補充されており、約1000IU/mL～約6000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）及び約2mMのグルタミンが補充されており、約1000IU/mL～約8000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）及び約2mMのグルタミンが補充されており、約3000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）及び約2mMのグルタミンが補充されており、約6000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）が補充されており、培地中の2-メルカプトエタノールの最終濃度は、55μMである。

【0753】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約0.1mM～約10mM、0.5mM～約9mM、1mM～約8mM、2mM～約7mM、3mM～約6mM、または4mM～約5mMの濃度でグルタミン（すなわち、GlutaMAX（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約2mMの濃度でグルタミン（すなわち、GlutaMAX（登録商標））が補充されている。

【0754】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約5mM～約150mM、10mM～約140mM、15mM～約130mM、20mM～約120mM、25mM～約110mM、30mM～約100mM、35mM～約95mM、40mM～約90mM、45mM～約85mM、50mM～約80mM、55mM～約75mM、60mM～約70mM、または約65mMの濃度で2-メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約55mMの濃度で2-メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、培地中の2-メルカプトエタノールの最終濃度は、55μMである。

【0755】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際PCT公開第WO／1998／030679号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、1つ以上のアルブミ

ンまたはアルブミン代替物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の微量元素、及び1つ以上の抗生物質からなる群から選択される1つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベーターメルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、及び1つ以上の微量元素からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ge^{4+} 、 Se^{4+} 、 Br 、 T 、 Mn^{2+} 、 P 、 Si^{4+} 、 V^{5+} 、 Mo^{6+} 、 Ni^{2+} 、 Rb^+ 、 Sn^{2+} 、及び Zr^{4+} を含有する化合物からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、最小必須培地 (MEM)、イーグル基礎培地 (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地 (α MEM)、グラスゴー最小必須培地 (G-MEM)、RPMI 成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【0756】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約 $5 \sim 200 \text{ mg/L}$ の範囲であり、L-ヒスチジンの濃度は、約 $5 \sim 250 \text{ mg/L}$ であり、L-イソロイシンの濃度は、約 $5 \sim 300 \text{ mg/L}$ であり、L-メチオニンの濃度は、約 $5 \sim 200 \text{ mg/L}$ であり、L-フェニルアラニンの濃度は、約 $5 \sim 400 \text{ mg/L}$ であり、L-プロリンの濃度は、約 $1 \sim 1000 \text{ mg/L}$ であり、L-ヒドロキシプロリンの濃度は、約 $1 \sim 45 \text{ mg/L}$ であり、L-セリンの濃度は、約 $1 \sim 250 \text{ mg/L}$ であり、L-スレオニンの濃度は、約 $10 \sim 500 \text{ mg/L}$ であり、L-トリプトファンの濃度は、約 $2 \sim 110 \text{ mg/L}$ であり、L-チロシンの濃度は、約 $3 \sim 175 \text{ mg/L}$ であり、L-バリンの濃度は、約 $5 \sim 500 \text{ mg/L}$ であり、チアミンの濃度は、約 $1 \sim 20 \text{ mg/L}$ であり、還元型グルタチオンの濃度は、約 $1 \sim 20 \text{ mg/L}$ であり、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩の濃度は、約 $1 \sim 200 \text{ mg/L}$ であり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約 $1 \sim 50 \text{ mg/L}$ であり、インスリンの濃度は、約 $1 \sim 100 \text{ mg/L}$ であり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約 $0.000001 \sim 0.0001 \text{ mg/L}$ であり、アルブミン（例えば、ALBUMAX（登録商標）I）の濃度は、約 $5000 \sim 50,000 \text{ mg/L}$ である。

【0757】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、以下の表4の「1×培地中の濃度範囲」という見出しの下にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表4の「1×培地の好ましい実施形態」という見出しの下にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、以下の表4の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下にリストされたタイプ及び濃度の非微量元素部分成分を含む。

【0758】

【表 5】

表 4：非微量元素部分成分の濃度

成分	サプリメント中の 好ましい実施形態 (mg/L) (約)	1×培地中の 濃度範囲 (mg/L) (約)	1×培地中の 好ましい実施形態 (mg/L) (約)
グリシン	150	5-200	53
L-ヒスチジン	940	5-250	183
L-イソロイシン	3400	5-300	615
L-メチオニン	90	5-200	44
L-フェニルアラニン	1800	5-400	336
L-プロリン	4000	1-1000	600
L-ヒドロキシプロリン	100	1-45	15
L-セリン	800	1-250	162
L-スレオニン	2200	10-500	425
L-トリプトファン	440	2-110	82
L-チロシン	77	3-175	84
L-バリン	2400	5-500	454
チアミン	33	1-20	9
還元型グルタチオン	10	1-20	1.5
アスコルビン酸-2- PO ₄ (Mg 塩)	330	1-200	50
トランスフェリン (鉄飽和)	55	1-50	8
インスリン	100	1-100	10
亜セレン酸ナトリウム	0.07	0.000001-0.0001	0.00001
AlbuMAX(登録商標)I	83,000	5000-50,000	12,500

【0759】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約260～350mOsmolである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約280～310mOsmolである。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約3.7g/L、または約2.2g/Lの重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、L-グルタミン（最終濃度約2mM）、1つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（NEAA、最終濃度約100μM）、2-メルカプトエタノール（最終濃度約100μM）がさらに補充されていてもよい。

【0760】

いくつかの実施形態では、Smith, et al., Clin Transl Immunology, 4(1)2015 (doi:10.1038/cti.2014.31)に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、RPMIまたはCTS（商標）Optmizer（商標）を基礎細胞培地として使用し、0、2%、5%、または10%のいずれかのCTS（商標）Immune Cell Serum Replacementを補充した。

【0761】

いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーターメルカプトエタノール（BMEまたはβME、2-メルカプトエタノールとしても知られる、CAS 60-24-2）を欠いている。

【0762】

腫瘍断片の調製後、結果として得られた細胞（すなわち、断片）は、腫瘍及び他の細胞よりもTILの成長を好む条件下で、IL-2を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、6000 IU/mLのIL-2を有する不活性化ヒトAB血清を含む培地中2 mLのウェル中（または、いくつかの事例では、本明細書で概説されるように、APC細胞集団の存在下）でインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に10～14日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 個のバルクTIL細胞を生じる。いくつかの実施形態では、第1の拡張中の成長培地は、IL-2またはそのバリエーションを含む。いくつかの実施形態では、ILは、組換えヒトIL-2（rhIL-2）である。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1 mgバイアルにつき $20 \sim 30 \times 10^6$ IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1 mgバイアルにつき 20×10^6 IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1 mgバイアルにつき 25×10^6 IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1 mgバイアルにつき 30×10^6 IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、 $4 \sim 8 \times 10^6$ IU/mgのIL-2の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、 $5 \sim 7 \times 10^6$ IU/mgのIL-2の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、 6×10^6 IU/mgのIL-2の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、実施例5に記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約10,000 IU/mLのIL-2、約9,000 IU/mLのIL-2、約8,000 IU/mLのIL-2、約7,000 IU/mLのIL-2、約6000 IU/mLのIL-2、または約5,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約9,000 IU/mLのIL-2～約5,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約8,000 IU/mLのIL-2～約6,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約7,000 IU/mLのIL-2～約6,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約6,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約3000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約3000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL、または約8000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、1000～2000 IU/mL、2000～3000 IU/mL、3000～4000 IU/mL、4000～5000 IU/mL、5000～6000 IU/mL、6000～7000 IU/mL、7000～8000 IU/mL、または約8000 IU/mLのIL-2を含む。

【0763】

いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約500 IU/mLのIL-15、約400 IU/mLのIL-15、約300 IU/mLのIL-15、約200 IU/mL

10

20

30

40

50

LのIL-15、約180IU/mLのIL-15、約160IU/mLのIL-15、約140IU/mLのIL-15、約120IU/mLのIL-15、または約100IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約500IU/mLのIL-15～約100IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約400IU/mLのIL-15～約100IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約300IU/mLのIL-15～約100IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約200IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約180IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-15をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約180IU/mLのIL-15を含む。

10

【0764】

いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約20IU/mLのIL-21、約15IU/mLのIL-21、約12IU/mLのIL-21、約10IU/mLのIL-21、約5IU/mLのIL-21、約4IU/mLのIL-21、約3IU/mLのIL-21、約2IU/mLのIL-21、約1IU/mLのIL-21、または約0.5IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約20IU/mLのIL-21～約0.5IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約15IU/mLのIL-21～約0.5IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約12IU/mLのIL-21～約0.5IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約10IU/mLのIL-21～約0.5IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約5IU/mLのIL-21～約1IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、約2IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約0.5IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-21をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1IU/mLのIL-21を含む。

20

【0765】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、抗CD3アゴニスト抗体、例えば、OKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約30ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約0.1ng/mL、約0.5ng/mL、約1ng/mL、約2.5ng/mL、約5ng/mL、約7.5ng/mL、約10ng/mL、約15ng/mL、約20ng/mL、約25ng/mL、約30ng/mL、約35ng/mL、約40ng/mL、約50ng/mL、約60ng/mL、約70ng/mL、約80ng/mL、約90ng/mL、約100ng/mL、約200ng/mL、約500ng/mL、及び約1μg/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、0.1ng/mL～1ng/mL、1ng/mL～5ng/mL、5ng/mL～10ng/mL、10ng/mL～20ng/mLの間、20ng/mL～30ng/mL、30ng/mL～40ng/mL、40ng/mL～50ng/mL、及び50ng/mL～100ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、OKT-3抗体を含まない。いくつかの実施形態では、OKT-3抗体は、ムロモナブである。例えば、表1を参照されたい。

30

40

【0766】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に1つ以上のTNFRSFアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、4-1BBアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは4-1BBアゴニストであり、4-1BBアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、EU-101、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリエーション、バイオシミラー、及び組み合

50

わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、 $20 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 40 \mu\text{g}/\text{mL}$ の細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【0767】

いくつかの実施形態では、1つ以上のTNFRSFアゴニストに加えて、細胞培養培地は、IL-2を約 $3000 \text{ IU}/\text{mL}$ の初期濃度で、及びOKT-3を約 $30 \text{ ng}/\text{mL}$ の初期濃度でさらに含み、1つ以上のTNFRSFアゴニストが、4-1BBアゴニストを含む。

【0768】

いくつかの実施形態では、第1の拡張培養培地は、培養培地の略語である「CM」と称される。いくつかの実施形態では、それは、CM1（培養培地1）と称される。いくつかの実施形態では、CMは、10%ヒトAB血清、25mM HEPES、及び10mg/mLゲンタマイシンを補充した、GLUTAMAXを含むRPMI1640からなる。培養物が40mL容量及び 10 cm^2 ガス透過性シリコン底部（例えば、G-REX10、Wilson Wolf Manufacturing, New Brighton, MN）（図1）を有するガス透過性フラスコ内で開始される実施形態では、IL-2を含む10~40mLのCM中の $10 \sim 40 \times 10^6$ 個の生きた腫瘍消化細胞または5~30個の腫瘍断片を、各フラスコに入れた。G-REX10及び24ウェルプレートの両方を、5% CO_2 中37℃の加湿インキュベーター内でインキュベートし、培養開始から5日後、培地の半分を取り除き、新たなCM及びIL-2と交換し、5日後、培地の半分以上を2~3日毎に交換した。いくつかの実施形態では、CMは、実施例に記載されるCM1であり、実施例1を参照されたい。いくつかの実施形態では、第1の拡張は、初期細胞培養培地または第1の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、初期細胞培養培地または第1の細胞培養培地は、IL-2を含む。

【0769】

いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、第1の拡張（例えば、REP前と称されることもあるものを含み得る、図1または図8のステップBに記載されるものなどのプロセスを含む）プロセスは、3~14日に短縮される。いくつかの実施形態では、実施例で考察され、かつ図4及び図5に示されるように、例えば、図1または図8のステップBに記載される拡張も含む、第1の拡張（例えば、REP前と称されることもあるものを含み得る、図1または図8のステップBに記載されるものなどのプロセスを含む）は、7~14日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップBの第1の拡張は、10~14日に短縮される。いくつかの実施形態では、第1の拡張は、例えば、図1または図8のステップBに記載される拡張において考察されるように、11日に短縮される。

【0770】

いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、または14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、1日~14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、2日~14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、3日~14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、4日~14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、5日~14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、6日~14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、7日~14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、8日~14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、9日~14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、10日~14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、11日~14日間続行するこ

とができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、12日～14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、13日～14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、1日～11日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、2日～11日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、3日～11日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、4日～11日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、5日～11日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、6日～11日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、7日～11日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、8日～11日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、9日～11日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、10日～11日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、11日間続行することができる。

10

【0771】

いくつかの実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15、及び／またはIL-21の組み合わせは、第1の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15、及び／またはIL-21、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図1または図8による、かつ本明細書に記載されるステップBのプロセス中を含む、第1の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-15、及びIL-21の組み合わせは、第1の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-15、及びIL-21、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図1または図8による、かつ本明細書に記載されるステップBのプロセス中に含まれ得る。

20

【0772】

いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、第1の拡張（REP前と称されるプロセスを含む、例えば、図1または図8によるステップB）プロセスは、3～14日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップBの第1の拡張は、7～14日に短縮される。いくつかの実施形態では、ステップBの第1の拡張は、10～14日に短縮される。いくつかの実施形態では、第1の拡張は、11日に短縮される。

30

【0773】

いくつかの実施形態では、第1の拡張、例えば、図1または図8によるステップBは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がTIL拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、G-Rex-10またはG-Rex-100である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【0774】

1. サイトカイン及び他の添加物

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にIL-2を含む培養培地を使用する。

40

【0775】

あるいは、TILの急速拡張及び／または第2の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第US2017/0107490A1号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、IL-2、IL-15及びIL-21のうちの2つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、IL-2及びIL-15、IL-2及びIL-21、IL-15及びIL-21、ならびにIL-2またはIL-15及びIL-21が含まれ、後者は、多くの実施形態において特定の用途を見出す。サイトカインの組み合わせの使用は

50

、リンパ球、特にそこに記載されているようにT細胞の生成に特に有利に働く。

【0776】

いくつかの実施形態では、ステップBはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、OKT-3抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップBはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、4-1BBアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップBはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、OX-40アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。他の実施形態では、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体(PPAR)-ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター-1αアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第US2019/0307796 A1号(この開示は参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるように、ステップB中の培養培地で使用されてもよい。

10

【0777】

いくつかの実施形態では、ステップBはまた、培養培地中のタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤(AKTi)の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、TIL集団は、AKT阻害剤を含む培地中で培養され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得する。いくつかの実施形態では、AKT阻害剤は、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、ホノキオール、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、AKT阻害剤は、イパタセルチブである。いくつかの実施形態では、TIL集団は、約0.1μM、約0.2μM、約0.3μM、約0.4μM、約0.5μM、約0.6μM、約0.7μM、約0.8μM、約0.9μM、約1μM、約1.1μM、約1.2μM、約1.3μM、約1.4μM、約1.5μM、約1.6μM、約1.7μM、約1.8μM、約1.9μM、約2μM、約2.1μM、約2.2μM、約2.3μM、約2.4μM、約2.5μM、約2.6μM、約2.7μM、約2.8μM、約2.9μM、約3μM、約3.5μM、約4μM、約4.5μM、または約5μMのイパタセルチブを含む培地で培養される。

20

【0778】

C. ステップC: 第1の拡張から第2の拡張へと移行

いくつかの事例では、例えば、図1または図8に示されるステップBから取得されたTIL集団を含む、第1の拡張から取得されたバルクTIL集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して、直ちに凍結保存され得る。あるいは、第2のTIL集団と称される第1の拡張から取得されたTIL集団は、以下で考察されるように、第2の拡張(REPと称されることもある拡張を含み得る)に供され、その後、凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾TILが治療に使用される場合、第1のTIL集団(バルクTIL集団と称されることもある)または第2のTIL集団(いくつかの実施形態では、REP TIL集団と称される集団を含み得る)は、拡張前または第1の拡張後及び第2の拡張前に、好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

30

40

【0779】

いくつかの実施形態では、第1の拡張から(例えば、図1または図8に示されるステップBから)取得されたTILは、選択のために表現型決定されるまで保管される。いくつかの実施形態では、第1の拡張から(例えば、図1または図8に示されるステップBから)取得されたTILは保管されず、第2の拡張に直接進む。いくつかの実施形態では、第1の拡張から取得されたTILは、第1の拡張後及び第2の拡張前に凍結保存されない。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こってから約3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、または14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こってから約3日~14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から

50

第2の拡張への移行は、断片化が起こってから約4日～14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こってから約4日～10日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こってから約7日～14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こってから約14日で起こる。

【0780】

いくつかの実施形態では、第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こってから1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、または14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こってから1日～14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、2日～14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第3の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第4の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第5の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第6の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第7の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第8の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第9の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第10の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第11の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第12の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こってから13日～14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こってから14日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こってから1日～11日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～11日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第3の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～11日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第4の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～11日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第5の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～11日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第6の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～11日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第7の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～11日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第8の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～11日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第9の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～11日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第10の拡張への移行は、断片化が起こってから2日～11日で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こってから11日で起こる。

【0781】

いくつかの実施形態では、TILは、第1の拡張後及び第2の拡張前に保管されず、TILは、第2の拡張に直接進む（例えば、いくつかの実施形態では、図1及び／または図8に示されるステップBからステップDへの移行中に保管されない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖系内で起こる。いくつかの実施形態では、第1の拡張由来のTILである第2のTIL集団は、移行期間なしで第2の拡張に直接進む。

【0782】

いくつかの実施形態では、第1の拡張から第2の拡張への移行、例えば、図1または図8によるステップCは、閉鎖系バイオリクター内で行われる。いくつかの実施形態では

、本明細書に記載されるように、閉鎖系がTIL拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、G-R E X-10またはG-R E X-100バイオリアクターである。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【0783】

D. ステップD：第2の拡張

いくつかの実施形態では、TIL細胞集団は、採取及び初期バルク処理後、例えば、図1または図8に示される、ステップA及びステップB、ならびにステップCと称される移行後に数が拡張される。このさらなる拡張は、本明細書では第2の拡張と称され、これは、当該技術分野で一般に急速拡張プロセス（R E P）と称される拡張プロセス、ならびに図1または図8のステップDに示されるプロセスを含み得る。第2の拡張は、一般に、フィーダー細胞、サイトカイン源、及び抗CD3抗体を含むいくつかの成分を含む培養培地を使用して、ガス透過性容器内で達成される。

【0784】

いくつかの実施形態では、第2の拡張または第2のTIL拡張（R E Pと称されることもある拡張、ならびに図1のステップDに示されるプロセスを含み得る）は、当業者に知られている任意のTILフラスコまたは容器を使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、7日、8日、9日、10日、11日、12日、13日、または14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、約7日～約14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、約8日～約14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、約9日～約14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、約10日～約14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、約11日～約14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、約12日～約14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、約13日～約14日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、約14日間続行することができる。

【0785】

いくつかの実施形態では、第2の拡張は、本開示の方法（例えば、R E Pと称される拡張、ならびに図1または図8のステップDに示されるプロセスを含む）を使用して、ガス透過性容器内で行われ得る。例えば、TILは、インターロイキン-2（I L-2）またはインターロイキン-15（I L-15）の存在下で非特異的T細胞受容体刺激を使用して、急速に拡張され得る。非特異的T細胞受容体刺激は、例えば、抗CD3抗体、例えば約30 ng/mLのO K T 3、マウスモノクローナル抗CD3抗体（O r t h o-M c N e i l, R a r i t a n, N JもしくはM i l t e n y i B i o t e c h, A u b u r n, C Aから市販）またはU H C T-1（B i o L e g e n d, S a n D i e g o, C A, U S Aから市販）を含み得る。TILは、がんのエピトープ（複数可）などの抗原性部分を含む、第2の拡張中に1つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでTILのさらなる刺激を誘導するように拡張することができ、これは、ベクター、例えば、ヒト白血球抗原A2（H L A-A2）結合ペプチド、例えば、0.3 μM M A R T-1:26-35（27 L）またはg p l 0 0:209-217（210 M）から、任意選択で300 I U/mLのI L-2またはI L-15などのT細胞成長因子の存在下で任意で発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、N Y-E S O-1、T R P-1、T R P-2、チロシナーゼがん抗原、M A G E-A3、S S X-2、及びV E G F R 2、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。TILは、H L A-A2を発現する抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原（複数可）で再刺激することによっても急速に拡張され得る。あるいは、TILは、例えば、例として照射された自己リンパ球または照射されたH L A-A2+同種異系リンパ球及びI L-2でさらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第2の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、照射さ

れた自己リンパ球の存在下で、または照射されたHLA-A2+同種異系リンパ球及びIL-2を用いて起こる。

【0786】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約3000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1000IU/mL、約1500IU/mL、約2000IU/mL、約2500IU/mL、約3000IU/mL、約3500IU/mL、約4000IU/mL、約4500IU/mL、約5000IU/mL、約5500IU/mL、約6000IU/mL、約6500IU/mL、約7000IU/mL、約7500IU/mL、または約8000IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、1000~2000IU/mL、2000~3000IU/mL、3000~4000IU/mL、4000~5000IU/mL、5000~6000IU/mL、6000~7000IU/mL、7000~8000IU/mL、または8000IU/mLのIL-2を含む。

10

【0787】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、OKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約30ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約0.1ng/mL、約0.5ng/mL、約1ng/mL、約2.5ng/mL、約5ng/mL、約7.5ng/mL、約10ng/mL、約15ng/mL、約20ng/mL、約25ng/mL、約30ng/mL、約35ng/mL、約40ng/mL、約50ng/mL、約60ng/mL、約70ng/mL、約80ng/mL、約90ng/mL、約100ng/mL、約200ng/mL、約500ng/mL、及び約1μg/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、0.1ng/mL~1ng/mL、1ng/mL~5ng/mL、5ng/mL~10ng/mL、10ng/mL~20ng/mLの間、20ng/mL~30ng/mL、30ng/mL~40ng/mL、40ng/mL~50ng/mL、及び50ng/mL~100ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、OKT-3抗体を含まない。いくつかの実施形態では、OKT-3抗体は、ムロモナブである。

20

【0788】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に1つ以上のTNFRSFアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、4-1BBアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは4-1BBアゴニストであり、4-1BBアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、EU-101、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリエーション、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、0.1μg/mL~100μg/mLの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、20μg/mL~40μg/mLの細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

30

【0789】

いくつかの実施形態では、1つ以上のTNFRSFアゴニストに加えて、細胞培養培地は、IL-2を約3000IU/mLの初期濃度で、及びOKT-3を約30ng/mLの初期濃度でさらに含み、1つ以上のTNFRSFアゴニストが、4-1BBアゴニストを含む。

40

【0790】

いくつかの実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15、及び／またはIL-21の組み合わせは、第2の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15、及び／またはIL-21、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図1または図8による、かつ本明細書に記載されるステップDのプロセス中を含む、第2の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、IL-2、I

50

IL-15、及びIL-21の組み合わせは、第2の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-15、及びIL-21、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図1または図8による、かつ本明細書に記載されるステップDのプロセス中に含まれ得る。

【0791】

いくつかの実施形態では、第2の拡張は、IL-2、OKT-3、抗原提示フィーダー細胞、及び任意でTNFRSFアゴニストを含む補充された細胞培養培地において実施され得る。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、補充された細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、補充された細胞培養培地は、IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第2の細胞培養培地は、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC、抗原提示フィーダー細胞とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞（すなわち、抗原提示細胞）を含む細胞培養培地中で起こる。

10

【0792】

いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約500 IU/mLのIL-15、約400 IU/mLのIL-15、約300 IU/mLのIL-15、約200 IU/mLのIL-15、約180 IU/mLのIL-15、約160 IU/mLのIL-15、約140 IU/mLのIL-15、約120 IU/mLのIL-15、または約100 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約500 IU/mLのIL-15～約100 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約400 IU/mLのIL-15～約100 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約300 IU/mLのIL-15～約100 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約200 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-15をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-15を含む。

20

【0793】

いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約20 IU/mLのIL-21、約15 IU/mLのIL-21、約12 IU/mLのIL-21、約10 IU/mLのIL-21、約5 IU/mLのIL-21、約4 IU/mLのIL-21、約3 IU/mLのIL-21、約2 IU/mLのIL-21、約1 IU/mLのIL-21、または約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約20 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約15 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約12 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約10 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約5 IU/mLのIL-21～約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約2 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-21をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。

30

40

【0794】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞（APC）は、PBMCである。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第2の拡張におけるTILのPBMC及び／または抗原提示細胞に対する比は、約1：25、約1：50、約1：100、約1：125、約1：150、約1：175、約1：200、約1：225、約1：250、約1

50

：275、約1：300、約1：325、約1：350、約1：375、約1：400、または約1：500である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第2の拡張におけるTILのPBMCに対する比は、1：50～1：300である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第2の拡張におけるTILのPBMCに対する比は、1：100～1：200である。

【0795】

いくつかの実施形態では、REP及び／または第2の拡張は、バルクTILが150mLの培地中の100倍または200倍過剰の不活性化フィーダー細胞、30mg/mLのOKT3抗CD3抗体、及び3000IU/mLのIL-2と混合されているフラスコ内で行われる。細胞が代替の成長チャンバに移されるまで、培地交換が行われる（一般に、新鮮な培地との呼吸による3分の2の培地交換）。代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、G-REXフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【0796】

いくつかの実施形態では、実施例及び図で考察されるように、第2の拡張（REPプロセスと称されるプロセスを含み得る）は、7～14日に短縮される。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、11日に短縮される。

【0797】

いくつかの実施形態では、REP及び／または第2の拡張は、以前に記載されたT-175フラスコ及びガス透過性バッグ（Tran, et al., J. Immunother. 2008, 31, 742-51、Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42）またはガス透過性培養器具（G-REXフラスコ）を使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第2の拡張（急速拡張と称される拡張を含む）は、T-175フラスコ内で行われ、150mLの培地に懸濁された約 1×10^6 個のTILが、各T-175フラスコに添加され得る。TILは、3000IU/mLのIL-2及び30ng/mLの抗CD3を補充した、1：1のCMとAIM-V培地との混合物中で培養され得る。T-175フラスコは、5% CO₂中37℃でインキュベートされ得る。培地の半分が、3000IU/mLのIL-2を含む50/50培地を使用して5日目に交換され得る。いくつかの実施形態では、7日目に、2つのT-175フラスコからの細胞が3Lバッグ内で組み合わせられ得、5%ヒトAB血清及び3000IU/mLのIL-2を含む300mLのAIM-Vが、300mLのTIL懸濁液に添加された。各バッグ内の細胞の数を、毎日または隔日カウントし、新鮮な培地を添加して、 $0.5 \sim 2.0 \times 10^6$ 細胞/mLの間の細胞数を維持した。

【0798】

いくつかの実施形態では、第2の拡張（REPと称される拡張、ならびに図1または図8のステップDで参照される拡張を含み得る）は、100cmのガス透過性シリコン底部（G-REX-100、Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USAから市販されている）を有する500mL容量のガス透過性フラスコ内で行われ得る。 5×10^6 または 10×10^6 TILは、5%ヒトAB血清、3000IU/mLのIL-2、及び30ng/mLの抗CD3（OKT3）を補充した400mLの50/50培地中、PBMCで培養され得る。G-REX-100フラスコを、5% CO₂中37℃でインキュベートすることができる。5日目に、250mLの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、1500rpm（491×g）で10分間遠心分離される。TILペレットが、5%ヒトAB血清、3000IU/mLのIL-2を含む150mLの新鮮な培地で再懸濁され、元のG-REX-100フラスコに戻し追加され得る。TILがG-REX-100フラスコ内で連続的に拡張される場合、7日目に、各G-REX-100内のTILが、各フラスコに存在する300mLの培地に懸濁され得、細胞懸濁液が3つの100mLアリコートに分割され得、それを使用して、3つのG-REX-100フラスコに播種することができる。その後、5%ヒトAB血清及び3000IU/mLのIL-2を含む150mLのAIM-Vが各フラスコに添加され得る。G-REX-100フラスコが5% CO₂中37℃

でインキュベートされてもよく、4日後に、3000 IU/mLのIL-2を含む150 mLのAIM-Vが、各G-REX-100フラスコに添加されてもよい。培養14日目に、細胞が採取され得る。

【0799】

いくつかの実施形態では、第2の拡張（REPと称される拡張を含む）は、バルクTILが150 mLの培地中の100倍または200倍過剰の不活性化フィーダー細胞、30 mg/mLのOKT3抗CD3抗体、及び3000 IU/mLのIL-2と混合されているフラスコで行われる。いくつかの実施形態では、培地交換は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。いくつかの実施形態では、培地の3分の2が、新鮮な培地と呼吸によって交換される。いくつかの実施形態では、代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、G-REXフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

【0800】

いくつかの実施形態では、第2の拡張（REPと称される増殖を含む）が行われ、優れた腫瘍反応性のためにTILが選択されるステップをさらに含む。当該技術分野で知られている任意の選択方法が使用され得る。例えば、米国特許出願公開第2016/0010058A1号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている方法が、優れた腫瘍反応性のためのTILの選択に使用され得る。

【0801】

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準的なアッセイを使用して、第2の拡張（REP拡張と称される拡張を含む）後に行われ得る。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンプルー排除アッセイが、バルクTILの試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、TIL試料は、Cellometer K2自動セルカウンター（Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA）を使用して計数され、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準のCellometer K2 Image Cytometer Automatic Cell Counterプロトコルに従って決定される。

【0802】

いくつかの実施形態では、TILの第2の拡張（REPと称される拡張を含む）は、以前に記載されているT-175フラスコ及びガス透過性バッグ（Tran, et al., 2008, J Immunother., 31:742-751及びDudley, et al., 2003, J Immunother., 26:332-342）またはガス透過性G-REXフラスコを使用して行われ得る。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、フラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、ガス透過性G-REXフラスコを使用して行われる。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、T-175フラスコ内で行われ、約 1×10^6 個のTILが約150 mLの培地に懸濁され、これが各T-175フラスコに添加される。TILは、「フィーダー」細胞として1対100の比で放射線照射された（50 Gy）同種異系PBMCと培養され、細胞が、3000 IU/mLのIL-2及び30 ng/mLの抗CD3を補充した、1:1のCMとAIM-V培地との混合物（50/50培地）中で培養された。T-175フラスコを、5% CO₂中37°Cでインキュベートする。いくつかの実施形態では、培地の半分が、3000 IU/mLのIL-2を含む50/50培地を使用して5日目に交換される。いくつかの実施形態では、7日目に、2つのT-175フラスコからの細胞が3 Lバッグ内で組み合わせられ、5%ヒトAB血清及び3000 IU/mLのIL-2を含む300 mLのAIM-Vが、300 mLのTIL懸濁液に添加される。各バッグ内の細胞の数が毎日または隔日計数され得、新鮮な培地が添加されて、約0.5～約 2.0×10^6 細胞/mLの細胞数を維持することができる。

【0803】

いくつかの実施形態では、第2の拡張（REPと称される拡張を含む）は、100 cm²のガス透過性シリコン底部（G-REX-100、Wilson Wolf）を有する500 mL容量のフラスコ内で行われ、約 5×10^6 または 10×10^6 TILが、30

10

20

30

40

50

00 IU/mLのIL-2及び30 ng/mLの抗CD3を補充した、400 mLの50/50培地中、1対100の比で放射線照射された同種異系PBMCと培養される。G-R EX-100フラスコを、5% CO₂中37℃でインキュベートする。いくつかの実施形態では、5日目に、250 mLの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、1500 rpm (491 g)で10分間遠心分離される。その後、TILペレットが、3000 IU/mLのIL-2を含む150 mLの新鮮な50/50培地に再懸濁され、元のG-R EX-100フラスコに戻し追加され得る。TILがG-R EX-100フラスコ内で連続的に拡張される実施形態では、7日目に、各G-R EX-100内のTILを、各フラスコ内に存在する300 mLの培地に懸濁し、細胞懸濁液を3つの100 mLアリコートに分割し、それを使用して3つのG-R EX-100フラスコに播種する。その後、5% ヒトAB血清及び3000 IU/mLのIL-2を含む150 mLのAIM-Vが各フラスコに添加される。G-R EX-100フラスコが5% CO₂中37℃でインキュベートされ、4日後に、3000 IU/mLのIL-2を含む150 mLのAIM-Vが、各G-R EX-100フラスコに添加される。培養14日目に、細胞が採取される。

10

20

30

40

50

【0804】

Tリンパ球及びBリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：V（可変）、D（多様性）、J（接合）、及びC（一定）は、免疫グロブリン及びT細胞受容体（TCR）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、T細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるTILを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたTILは、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第2の拡張において取得されたTILは、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはT細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、T細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるT細胞受容体のうちの1つにある。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、TCRa b（すなわち、TCRα/β）の発現が増加する。

【0805】

いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地（例えば、CM2または第2の細胞培養培地と称されることもある）は、以下でさらに詳細に考察されるように、IL-2、OKT-3、ならびに抗原提示フィーダー細胞（APC）を含む。

【0806】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【0807】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion Basal Medium、CTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion SFM、CTS（商標）AIM-V Medium、CTS（商標）AIM-V SFM、LymphoONE（商標）T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最小必須培地（ME

M)、イーグル基礎培地(BME)、RPMI1640、F-10、F-12、最小必須培地(α MEM)、グラスゴー最小必須培地(G-MEM)、RPMI成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

【0808】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、CTS(商標)Optmizer T-Cell Expansion Serum Supplement、CTS(商標)Immune Cell Serum Replacement、1つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の抗生物質、及び1つ以上の微量元素のうちの1つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ge^{4+} 、 Se^{4+} 、 Br 、 T 、 Mn^{2+} 、 P 、 Si^{4+} 、 V^{5+} 、 Mo^{6+} 、 Ni^{2+} 、 Rb^+ 、 Sn^{2+} 、及び Zr^{4+} を含有する化合物からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び/または2-メルカプトエタノールをさらに含む。

10

20

【0809】

いくつかの実施形態では、CTS(商標)Optmizer(商標)T-cell Immune Cell Serum Replacementは、CTS(商標)Optmizer(商標)T-cell Expansion Basal Medium、CTS(商標)Optmizer(商標)T-cell Expansion SFM、CTS(商標)AIM-V Medium、CST(商標)AIM-V SFM、LymphoONE(商標)T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、最小必須培地(MEM)、イーグル基礎培地(BME)、RPMI1640、F-10、F-12、最小必須培地(α MEM)、グラスゴー最小必須培地(G-MEM)、RPMI成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

30

【0810】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度(vol%)は、総無血清または合成培地の約1体積%、2体積%、3体積%、4体積%、5体積%、6体積%、7体積%、8体積%、9体積%、10体積%、11体積%、12体積%、13体積%、14体積%、15体積%、16体積%、17体積%、18体積%、19体積%、または20体積%である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約3%である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約5%である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約10%である。

40

【0811】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、CTS(商標)Optmizer(商標)T-cell Expansion SFM(ThermoFisher Scientific)である。CTS(商標)Optmizer(商標)のいずれの製剤も、本発明において有用である。CTS(商標)Optmizer(商標)T-cell Expansion SFMは、1LのCTS(商標)Optmizer(商標)T-cell Expansion Basal Mediumと、26mLのCTS(商標)Optmizer(商標)T-Cell Expansion Supplementとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、CTS(商標)Optmizer(商標)T-cell Expansion SFMには

50

、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）が補充されている。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、55mMの2-メルカプトエタノールとともに、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）が補充されている。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）が補充されており、培地中の2-メルカプトエタノールの最終濃度は、55 μ Mである。

10

【0812】

いくつかの実施形態では、合成培地は、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFM（ThermoFisher Scientific）である。CTS（商標）Optmizer（商標）のいずれの製剤も、本発明において有用である。CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMは、1LのCTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion Basal Mediumと、26mLのCTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion Supplementとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、55mMの2-メルカプトエタノールとともに、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）が補充されている。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）、55mMの2-メルカプトエタノール、及び2mMのL-グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）、55mMの2-メルカプトエタノール、及び2mMのL-グルタミンが補充されており、約1000 IU/mL～約8000 IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）、55mMの2-メルカプトエタノール、及び2mMのL-グルタミンが補充されており、約3000 IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）、55mMの2-メルカプトエタノール、及び2mMのL-グルタミンが補充されており、約6000 IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）及び55mMの2-メルカプトエタノールが補充されており、約1000 IU/mL～約8000 IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）及び55mMの2-メルカプトエタノールが補充されており、約3000 IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS

20

30

40

50

(商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 及び55mMの2-メルカプトエタノールが補充されており、約1000IU/mL~約6000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 及び約2mMのグルタミンが補充されており、約1000IU/mL~約8000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 及び約2mMのグルタミンが補充されており、約3000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 及び約2mMのグルタミンが補充されており、約6000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充されており、培地中の2-メルカプトエタノールの最終濃度は、55µMである。

10

20

【0813】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約0.1mM~約10mM、0.5mM~約9mM、1mM~約8mM、2mM~約7mM、3mM~約6mM、または4mM~約5mMの濃度でグルタミン (すなわち、GlutaMAX (登録商標)) が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約2mMの濃度でグルタミン (すなわち、GlutaMAX (登録商標)) が補充されている。

【0814】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約5mM~約150mM、10mM~約140mM、15mM~約130mM、20mM~約120mM、25mM~約110mM、30mM~約100mM、35mM~約95mM、40mM~約90mM、45mM~約85mM、50mM~約80mM、55mM~約75mM、60mM~約70mM、または約65mMの濃度で2-メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約55mMの濃度で2-メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、培地中の2-メルカプトエタノールの最終濃度は、55µMである。

30

【0815】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際PCT公開第WO/1998/030679号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、1つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の微量元素、及び1つ以上の抗生物質からなる群から選択される1つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び/またはベータ-メルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代

40

50

替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、及び1つ以上の微量元素からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ge^{4+} 、 Se^{4+} 、 Br 、 T 、 Mn^{2+} 、 P 、 Si^{4+} 、 V^{5+} 、 Mo^{6+} 、 Ni^{2+} 、 Rb^+ 、 Sn^{2+} 、及び Zr^{4+} を含有する化合物からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、最小必須培地 (MEM)、イーグル基礎培地 (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地 (α MEM)、グラスゴー最小必須培地 (G-MEM)、RPMI 成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

10

【0816】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約 $5 \sim 200 \text{ mg/L}$ の範囲であり、L-ヒスチジンの濃度は、約 $5 \sim 250 \text{ mg/L}$ であり、L-イソロイシンの濃度は、約 $5 \sim 300 \text{ mg/L}$ であり、L-メチオニンの濃度は、約 $5 \sim 200 \text{ mg/L}$ であり、L-フェニルアラニンの濃度は、約 $5 \sim 400 \text{ mg/L}$ であり、L-プロリンの濃度は、約 $1 \sim 1000 \text{ mg/L}$ であり、L-ヒドロキシプロリンの濃度は、約 $1 \sim 45 \text{ mg/L}$ であり、L-セリンの濃度は、約 $1 \sim 250 \text{ mg/L}$ であり、L-スレオニンの濃度は、約 $10 \sim 500 \text{ mg/L}$ であり、L-トリプトファンの濃度は、約 $2 \sim 110 \text{ mg/L}$ であり、L-チロシンの濃度は、約 $3 \sim 175 \text{ mg/L}$ であり、L-バリンの濃度は、約 $5 \sim 500 \text{ mg/L}$ であり、チアミンの濃度は、約 $1 \sim 20 \text{ mg/L}$ であり、還元型グルタチオンの濃度は、約 $1 \sim 20 \text{ mg/L}$ であり、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩の濃度は、約 $1 \sim 200 \text{ mg/L}$ であり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約 $1 \sim 50 \text{ mg/L}$ であり、インスリンの濃度は、約 $1 \sim 100 \text{ mg/L}$ であり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約 $0.000001 \sim 0.0001 \text{ mg/L}$ であり、アルブミン (例えば、AlbuMAX (登録商標) I) の濃度は、約 $5000 \sim 50,000 \text{ mg/L}$ である。

20

30

【0817】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表4の「1×培地中の濃度範囲」という見出しの下にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表4の「1×培地の好ましい実施形態」という見出しの下にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表4の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【0818】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約 $260 \sim 350 \text{ mOsmol}$ である。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約 $280 \sim 310 \text{ mOsmol}$ である。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約 3.7 g/L 、または約 2.2 g/L の重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、L-グルタミン (最終濃度約 2 mM)、1つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸 (NEAA、最終濃度約 $100 \mu\text{M}$)、2-メルカプトエタノール (最終濃度約 $100 \mu\text{M}$) がさらに補充されていてもよい。

40

【0819】

いくつかの実施形態では、Smith, et al., Clin Transl Immunology, 4 (1) 2015 (doi:10.1038/cti.2014.31) に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、RPMI または CTS (商標) OpTmizer (商標) を基礎細胞培地として使用し、0、2%、5%

50

、または10%のいずれかのCTS（商標）Immune Cell Serum Replacementを補充した。

【0820】

いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーターメルカプトエタノール（BMEまたはβME、2-メルカプトエタノールとしても知られる、CAS 60-24-2）を欠いている。

【0821】

いくつかの実施形態では、第2の拡張、例えば、図1または図8によるステップDは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がTIL拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、G-R EX-10またはG-R EX-100である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【0822】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）TILを、第1の容器、例えば、G-R EX-100 MCS容器内での小規模培養で約3～7日間培養することによって急速なまたは第2の拡張を行うことと、その後、（b）小規模培養でのTILを、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-R EX-500-MCS容器に移し、小規模培養由来のTILを、第2の容器内でのより大規模な培養で約4～7日間培養することによって、培養のスケールアップを達成する。

【0823】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）TILを、第1の容器、例えば、G-R EX 100 MCS容器内での第1の小規模培養で約3～7日間培養することによって急速なまたは第2の拡張を行うことと、その後、（b）第1の小規模培養由来のTILを、第1の容器とサイズが等しい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたTILの一部が、第2の小規模培養で約4～7日間培養される。

【0824】

いくつかの実施形態では、第1の小規模TIL培養物は、TILの複数の約2～5亜集団に配分される。

【0825】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）TILを、第1の容器、例えば、G-R EX 100 MCS容器内での小規模培養で約3～7日間培養することによって急速なまたは第2の拡張を行うことと、その後、（b）小規模培養由来のTILを、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器、例えば、G-R EX-500 MCS容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたTILの一部が、より大規模な培養で約4～7日間培養される。

【0826】

いくつかの実施形態では、急速なまたは第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）TILを、第1の容器、例えば、G-R EX-100 MCS容器内での小規模培養で約5日間培養することによって急速なまたは第2の拡張を行うことと、その後、（b）小規模培養由来のTILを、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4

個の第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたT I Lの一部が、より大規模な培養で約6日間培養される。

【0827】

いくつかの実施形態では、急速または第2の拡張の分割時に、各第2の容器は、少なくとも 10^8 個のT I Lを含む。いくつかの実施形態では、急速または第2の拡張の分割時に、各第2の容器は、少なくとも 10^8 個のT I L、少なくとも 10^9 個のT I L、または少なくとも 10^{10} 個のT I Lを含む。例示的な一実施形態では、各第2の容器は、少なくとも 10^{10} 個のT I Lを含む。

10

【0828】

いくつかの実施形態では、第1の小規模T I L培養物は、複数の亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第1の小規模T I L培養物は、複数の約2~5亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第1の小規模T I L培養物は、複数の約2、3、4、または5亜集団に配分される。

【0829】

いくつかの実施形態では、急速または第2の拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のT I Lを含む。いくつかの実施形態では、急速または第2の拡張の完了後、1つ以上のT I Lの亜集団と一緒にプールして、治療有効量のT I Lを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、T I Lの各亜集団は、治療有効量のT I Lを含む。

20

【0830】

いくつかの実施形態では、急速または第2の拡張は、複数のステップに分割される前に、約3~7日間行われる。いくつかの実施形態では、急速または第2の拡張の分裂は、急速または第2の拡張の開始後約3日目、4日目、5日目、6日目、または7日目に起こる。

【0831】

いくつかの実施形態では、急速または第2の拡張の分裂は、第1の拡張（すなわち、R E P前拡張）の開始後の約7日目、8日目、9日目、10日目、11日目、12日目、13日目、14日目、15日目、または16日目、17日目、または18日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速または第2の拡張の分裂は、第1の拡張の開始後約16日目に起こる。

30

【0832】

いくつかの実施形態では、急速または第2の拡張は、分裂後約7~11日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速または第2の拡張は、分裂後約5日、6日、7日、8日、9日、10日、または11日間、さらに行われる。

【0833】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第2の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速または第2の拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第2の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速または第2の拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

40

【0834】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第2の拡張に使用される細胞培養培地は、I L-2、任意選択でO K T-3、及びさらに任意選択でA P Cを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第2の拡張に使用される細胞培養培地は、I L-2、O K T-3、及びさらに任意選択でA P Cを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第2の拡張に使用される細胞培養培地は、I L-2、O K T-3及びA P Cを含む。

【0835】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第2の拡張に使用される細胞培養培地は、第1の拡張中の細胞培養培地を、I L-2、任意選択でO K T-3及びさらに任意選択

50

で A P C を含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第 2 の拡張に使用される細胞培養培地は、第 1 の拡張中の細胞培養培地を、I L - 2、O K T - 3 及び A P C を含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第 2 の拡張に使用される細胞培養培地は、第 1 の拡張中の細胞培養培地を、I L - 2、任意選択で O K T - 3 及びさらに任意選択で A P C を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速または第 2 の拡張に使用される細胞培養培地は、第 1 の拡張中の細胞培養培地を、I L - 2、O K T - 3 及び A P C を含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【0836】

10

いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第 2 の拡張に使用される細胞培養培地は、I L - 2、及び任意選択で O K T - 3 を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第 2 の拡張に使用される細胞培養培地は、I L - 2 及び O K T - 3 を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第 2 の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速または第 2 の拡張に使用される細胞培養培地を、I L - 2 及び任意選択で O K T - 3 を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速または第 2 の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速または第 2 の拡張に使用される細胞培養培地を、I L - 2 及び O K T - 3 を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。

【0837】

20

いくつかの実施形態では、急速な膨張の分裂は、閉鎖系において起こる。

【0838】

いくつかの実施形態では、急速または第 2 の拡張中の T I L 培養物のスケールアップは、新鮮な細胞培養培地を T I L 培養物に添加すること（T I L を供給することとも称される）を含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地を T I L 培養物に頻繁に添加することを含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地を T I L 培養物に一定の間隔で添加することを含む。いくつかの実施形態では、新鮮な細胞培養培地は、一定の流れを介して T I L に供給される。いくつかの実施形態では、X u r i W 2 5 などの自動細胞拡張システムは、急速な膨張及び供給のために使用される。

【0839】

30

1. フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第 2 の拡張手順（例えば、図 1 または図 8 のステップ D に記載されるような拡張、ならびに R E P と称されるものを含む）は、R E P T I L 拡張中及び／または第 2 の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（P B M C）である。P B M C は、F i c o l l - P a q u e 勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。

【0840】

一般に、同種異系 P B M C は、照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、実施例に記載されるように、R E P 手順で使用され、これは、照射された同種異系 P B M C の複製無能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

40

【0841】

いくつかの実施形態では、14 日目の生細胞の総数が、R E P の 0 日目及び／または第 2 の拡張の 0 日目（すなわち、第 2 の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数より少ない場合、P B M C は、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載の T I L 拡張手順での使用が認められる。

【0842】

いくつかの実施形態では、7 日目及び 14 日目の O K T 3 及び I L - 2 の存在下で培養された生細胞の総数が、R E P の 0 日目及び／または第 2 の拡張の 0 日目（すなわち、第 2 の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、P B M C は、

50

複製能力がないとみなされ、本明細書に記載の T I L 拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、P B M C は、3 0 n g / m L の O K T 3 抗体及び 3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 の存在下で培養される。

【 0 8 4 3 】

いくつかの実施形態では、7 日目及び 1 4 日目の O K T 3 及び I L - 2 の存在下で培養された生細胞の総数が、R E P の 0 日目及び／または第 2 の拡張の 0 日目（すなわち、第 2 の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、P B M C は、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載の T I L 拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、P B M C は、5 ~ 6 0 n g / m L の O K T 3 抗体及び 1 0 0 0 ~ 6 0 0 0 I U / m L の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、1 0 ~ 5 0 n g / m L の O K T 3 抗体及び 2 0 0 0 ~ 5 0 0 0 I U / m L の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、2 0 ~ 4 0 n g / m L の O K T 3 抗体及び 2 0 0 0 ~ 4 0 0 0 I U / m L の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、2 5 ~ 3 5 n g / m L の O K T 3 抗体及び 2 5 0 0 ~ 3 5 0 0 I U / m L の I L - 2 の存在下で培養される。

【 0 8 4 4 】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、P B M C である。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第 2 の拡張における T I L の抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約 1 : 2 5 、約 1 : 5 0 、約 1 : 1 0 0 、約 1 : 1 2 5 、約 1 : 1 5 0 、約 1 : 1 7 5 、約 1 : 2 0 0 、約 1 : 2 2 5 、約 1 : 2 5 0 、約 1 : 2 7 5 、約 1 : 3 0 0 、約 1 : 3 2 5 、約 1 : 3 5 0 、約 1 : 3 7 5 、約 1 : 4 0 0 、または約 1 : 5 0 0 である。いくつかの実施形態では、第 2 の拡張における T I L の抗原提示フィーダー細胞に対する比は、1 : 5 0 ~ 1 : 3 0 0 である。いくつかの実施形態では、第 2 の拡張における T I L の抗原提示フィーダー細胞に対する比は、1 : 1 0 0 ~ 1 : 2 0 0 である。

【 0 8 4 5 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第 2 の拡張手順は、約 2.5×10^9 フィーダー細胞：約 100×10^6 T I L の比を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の第 2 の拡張手順は、約 2.5×10^9 フィーダー細胞：約 50×10^6 T I L の比を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第 2 の拡張手順は、約 2.5×10^9 フィーダー細胞：約 25×10^6 T I L を必要とする。

【 0 8 4 6 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第 2 の拡張手順は、第 2 の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（P B M C）である。P B M C は、F i c c o l l - P a q u e 勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（a A P C）細胞が P B M C の代わりに使用される。

【 0 8 4 7 】

一般に、同種異系 P B M C は、照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、図及び実施例に記載される例示的な手順を含む、本明細書に記載の T I L 拡張手順で使用される。

【 0 8 4 8 】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、P B M C の代替物として、または P B M C と組み合わせて、第 2 の拡張において使用される。

【 0 8 4 9 】

2. サイトカイン及び他の添加物

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特に I L - 2 を含む培養培地を使用する。

【 0 8 5 0 】

あるいは、T I L の急速拡張及び／または第 2 の拡張のためにサイトカインの組み合わ

10

20

30

40

50

せを使用することは、米国特許出願公開第US2017/0107490A1号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、IL-2、IL-15及びIL-21のうちの2つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、IL-2及びIL-15、IL-2及びIL-21、IL-15及びIL-21、ならびにIL-2、IL-15、及びIL-21が含まれ、後者は多くの実施形態において特定の用途を見出す。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにT細胞の生成に特に有利に働く。

【0851】

いくつかの実施形態では、ステップDはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、OKT-3抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップDはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、4-1BBアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップDはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、OX-40アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（PPAR）-ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター-1αアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第US2019/0307796 A1号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップD中の培養培地で使用されてもよい。

【0852】

いくつかの実施形態では、ステップDはまた、培養培地中のタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤（AKTi）の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、TIL集団は、AKT阻害剤を含む培地中で培養され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得する。いくつかの実施形態では、AKT阻害剤は、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、ホノキオール、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、AKT阻害剤は、イパタセルチブである。いくつかの実施形態では、TIL集団は、約0.1 μM、約0.2 μM、約0.3 μM、約0.4 μM、約0.5 μM、約0.6 μM、約0.7 μM、約0.8 μM、約0.9 μM、約1 μM、約1.1 μM、約1.2 μM、約1.3 μM、約1.4 μM、約1.5 μM、約1.6 μM、約1.7 μM、約1.8 μM、約1.9 μM、約2 μM、約2.1 μM、約2.2 μM、約2.3 μM、約2.4 μM、約2.5 μM、約2.6 μM、約2.7 μM、約2.8 μM、約2.9 μM、約3 μM、約3.5 μM、約4 μM、約4.5 μM、または約5 μMのイパタセルチブを含む培地で培養される。

【0853】

E. ステップE：TILを採取する

第2の拡張ステップ後、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、図1または図8に提供されるように、1、2、3、4つ、またはそれ以上の拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、図1または図8に提供されるように、2つの拡張ステップ後に採取される。

【0854】

TILは、例えば、遠心分離を含む、任意の適切な滅菌様式で採取され得る。TILを採取するための方法は、当該技術分野で周知であり、いずれかのかかる既知の方法が本プロセスで用いられ得る。いくつかの実施形態では、TILは、自動化システムを使用して採取される。

【0855】

細胞採取機及び/または細胞処理システムは、例えば、Fresenius Kabi、Tomtec Life Science、Perkin Elmer、及びInotech Biosystems International, Incを含む、様々な供

給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機が本方法とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、L O V Oシステム（F r e s e n i u s K a b iによって製造されたもの）などの細胞処理システムによるものである。「L O V O細胞処理システム」という用語は、細胞を含む溶液を、滅菌及び／または閉鎖系環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターをとおしてポンプ輸送し、連続フローを可能にし、細胞を処理して、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去する、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置も指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、滅菌閉鎖系内で、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、及び／または他の細胞処理ステップを行うことができる。

10

【0856】

いくつかの実施形態では、採取、例えば、図1または図8によるステップEは、閉鎖系バイオリアクターから行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がT I L拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、G - R E X - 1 0またはG - R E X - 1 0 0である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。

【0857】

いくつかの実施形態では、図1または図8によるステップEは、本明細書に記載のプロセスに従って行われる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例に記載の閉鎖系が用いられる。

20

【0858】

いくつかの実施形態では、T I Lは、実施例に記載の方法に従って採取される。いくつかの実施形態では、1日目～11日目の間のT I Lは、実施例における11日目のT I L採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、12日目～24日目の間のT I Lは、実施例における22日目のT I L採取のような、本明細書で言及されるステップにおいて記載される方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、本発明は、(i) C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／またはC D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O}、(ii) C D 3 9 / C D 6 9 二重ノックアウト、または(iii) (i) 及び(ii) T I Lの組み合わせについて、本明細書に記載の採取ステップに記載の治療的T I L集団またはT I L組成物を評価または選別することを提供する。(i) C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／またはC D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O}、(ii) C D 3 9 / C D 6 9 二重ノックアウト、または(iii) (i) 及び(ii)の組み合わせであるT I Lを選別するための方法は、参照により本明細書に組み込まれる米国出願第2019/0212332号に見出すことができる。いくつかの実施形態では、細胞選別は、Zhang, X et. al., Surface Free Energy Activated High-Throughput Cell Sorting, Analytical Chemistry (2014), 86:9350-9355に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。実施例15及び図35は、本発明の方法での使用に好適な選別プロトコルの追加の例示を提供する。

30

40

【0859】

F. ステップF：最終製剤及び輸液容器への移行

図1または図8に例示的な順序で提供され、かつ上及び本明細書で詳細に概説されるステップA～Eが完了した後、細胞は、注入バッグまたは無菌バイアルなどの患者への投与に使用するために容器に移される。いくつかの実施形態では、治療的に十分な数のT I Lが上記の拡張方法を使用して得られると、それらは、患者への投与に使用するために容器に移される。

【0860】

いくつかの実施形態では、本開示のA P Cを使用して拡張されたT I Lは、薬学的組成

50

物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中の T I L 懸濁液である。本開示の P B M C を使用して拡張された T I L は、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、T 細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ 30 ～ 60 分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。
【0861】

いくつかの実施形態では、本発明は、(a) 選別ステップ前に、(i) 腫瘍断片または試料中のバルク T I L、または第 1 の T I L 集団が、I L - 2 及び任意選択で腫瘍断片または試料から出る T I L を産生するための抗生物質の第 1 の組み合わせを含有する細胞培養培地中で培養され、(i i) 腫瘍断片または試料から出る少なくとも複数の T I L が腫瘍断片または試料から分離して、腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存する T I L、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後にそれとともに残存する任意の T I L の混合物を産生し、(i i i) 腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存する T I L、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後にそれとともに残存する任意の T I L の混合物を消化して、かかる混合物の消化物を産生する；(b) 混合物の消化物を選別して、T I L の C D 39 / C D 69 二重陰性及び / または C D 39^{L O} / C D 69^{L O} 集団を産生し、(b) 第 1 の拡張を、T I L の C D 39 / C D 69 二重陰性及び / または C D 39^{L O} / C D 69^{L O} 集団を使用して行うように修正されるように、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍断片または試料から出る T I L の少なくとも約 1 %、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 % 以上が、腫瘍断片または試料から分離されて、混合物を生成する。

【0862】

いくつかの実施形態では、本発明は、第 1 の拡張前に培養するステップが、約 1 日～約 3 日の期間で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【0863】

いくつかの実施形態では、本発明は、第 1 の拡張前に培養するステップが、約 1、2、3、4、5、6、または 7 日の期間で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【0864】

いくつかの実施形態では、本発明は、(a) 消化、選別及び第 1 の拡張ステップが、(i) 腫瘍断片または試料中のバルク T I L または第 1 の T I L 集団を、I L - 2 を含有する細胞培養培地中で培養することと、(i i) 腫瘍断片または試料から出る少なくとも複数の T I L を腫瘍断片または試料から分離して、腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存する T I L、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後にそれとともに残存する任意の T I L の混合物を産生することと、(i i i) 腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存する T I L、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後にそれとともに残存する任意の T I L の混合物を消化して、かかる混合物の消化物を産生することと、を含み、(i v) 混合物の消化物を選別して、T I L の C D 39 / C D 69 二重陰性及び / または C D 39^{L O} / C D 69^{L O} 集団を産生し、(b) 第 2 の拡張を、T I L の C D 39 / C D 69 二重陰性及び / または C D 39^{L O} / C D 69^{L O} 集団を用いて行うように修正されるように、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍断片または試料から出る T I L の少なくとも約 1 %、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、99 % 以上が、腫瘍断片または試料から分離されて、混合物を生成する。

【0865】

I V . G e n 3 T I L 製造プロセス

いかなる特定の理論にも限定されることなく、本発明の方法に記載される、T細胞の活性化をプライミングする、プライミングによる第1の拡張と、それに続くT細胞の活性化を促進する急速な第2の拡張により、「より若い」表現型を保持する拡張されたT細胞の調製が可能になると考えられ、したがって、本発明の拡張されたT細胞が、他の方法によって拡張されたT細胞よりも高いがん細胞に対する細胞傷害性を示すことが予想される。特に、本発明の方法によって教示される、抗CD3抗体（例えば、OKT-3）、IL-2、及び任意選択で抗原提示細胞（APC）への曝露によってプライミングされ、その後、追加の抗CD-3抗体（例えば、OKT-3）、IL-2、及びAPCへのその後の曝露によって促進されるT細胞の活性化が、培養下でT細胞の成熟を限定または回避し、成熟度の低い表現型を有するT細胞集団を産生し、これらのT細胞が、培養下での拡張によってあまり疲弊せず、より高いがん細胞に対する細胞傷害性を示すと考えられる。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）T細胞を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、（b）小規模培養でのT細胞を、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移し、小規模培養由来のT細胞を、第2の容器内でのより大規模な培養で約4～7日間培養することによって、培養のスケールアップを達成する。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）T細胞を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での第1の小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、（b）第1の小規模培養由来のT細胞を、第1の容器とサイズが等しい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたT細胞の一部が、第2の小規模培養で約4～7日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）T細胞を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、（b）小規模培養由来のT細胞を、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたT細胞の一部が、より大規模な培養で約4～7日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）T細胞を、第1の容器、例えば、G-R E X-100 M C S容器内での小規模培養で約4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、（b）小規模培養由来のT細胞を、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R E X-500 M C S容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたT細胞の一部が、より大規模な培養で約5日間培養される。

10

20

30

40

【0866】

いくつかの実施形態では、急速拡張の分割時に、各第2の容器は、少なくとも 10^8 個のTILを含む。いくつかの実施形態では、急速拡張の分割時に、各第2の容器は、少なくとも 10^8 個のTIL、少なくとも 10^9 個のTIL、または少なくとも 10^{10} 個のTILを含む。例示的な一実施形態では、各第2の容器は、少なくとも 10^{10} 個のTILを含む。

【0867】

いくつかの実施形態では、第1の小規模TIL培養物は、複数の亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第1の小規模TIL培養物は、複数の約2～5亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第1の小規模TIL培養物は、複数の約2、3、4、ま

50

たは5亜集団に配分される。

【0868】

いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のTILを含む。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、1つ以上のTILの亜集団と一緒にプールして、治療有効量のTILを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、TILの各亜集団は、治療有効量のTILを含む。

【0869】

いくつかの実施形態では、急速拡張は、複数のステップに分割される前に、約1～5日間行われる。いくつかの実施形態では、急速拡張の分裂は、急速拡張の開始後約1日目、2日目、3日目、4日目、または5日目に起こる。

10

【0870】

いくつかの実施形態では、急速拡張の分裂は、第1の拡張（すなわち、REP前拡張）の開始後約8日目、9日目、10日目、11日目、12日目、または13日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速拡張の分裂は、プライミングによる第1の拡張の開始後約10日目に起こる。別の例示的な一実施形態では、急速拡張の分裂は、第1の拡張の開始後約11日目に起こる。

【0871】

いくつかの実施形態では、急速拡張は、分裂後約4～11日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速拡張は、分裂後約3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、または11日間、さらに行われる。

20

【0872】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

【0873】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、IL-2、任意選択でOKT-3、及びさらに任意選択でAPCを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、IL-2、OKT-3、及びさらに任意選択でAPCを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、IL-2、OKT-3及びAPCを含む。

30

【0874】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第1の拡張中の細胞培養培地を、IL-2、任意選択でOKT-3及びさらに任意選択でAPCを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第1の拡張中の細胞培養培地を、IL-2、OKT-3及びAPCを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第1の拡張中の細胞培養培地を、IL-2、任意選択でOKT-3及びさらに任意選択でAPCを含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地は、第1の拡張中の細胞培養培地を、IL-2、OKT-3及びAPCを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

40

【0875】

いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、IL-2、及び任意選択でOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、IL-2及びOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地を、IL-2及び任意選択でOKT-3を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速拡張に使用される細胞培養培地を、IL-2及びOKT-3を含む新鮮な培養

50

培地で置き換えることによって生成される。

【0876】

いくつかの実施形態では、急速な膨張の分裂は、閉鎖系において起こる。

【0877】

いくつかの実施形態では、急速拡張中のTIL培養物のスケールアップは、新鮮な細胞培養培地をTIL培養物に添加すること（TILを供給することとも称される）を含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をTIL培養物に頻繁に添加することを含む。いくつかの実施形態では、供給は、新鮮な細胞培養培地をTIL培養物に一定の間隔で添加することを含む。いくつかの実施形態では、新鮮な細胞培養培地は、一定の流れを介してTILに供給される。いくつかの実施形態では、Xuri W25などの自動細胞拡張システムは、急速な膨張及び供給のために使用される。

10

【0878】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張は、プライミングによる第1の拡張によってもたらされるT細胞の活性化が減少、軽減、衰退、または沈静化し始めた後に行われる。

【0879】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張は、プライミングによる第1の拡張によってもたらされるT細胞の活性化が、正確にまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100%減少した後に行われる。

20

【0880】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張は、プライミングによる第1の拡張によってもたらされるT細胞の活性化が、正確にまたは約1%~100%の範囲のパーセンテージ減少した後に行われる。

30

【0881】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張は、プライミングによる第1の拡張によってもたらされるT細胞の活性化が、正確にまたは約1%~10%、10%~20%、20%~30%、30%~40%、40%~50%、50%~60%、60%~70%、70%~80%、80%~90%、または90%~100%の範囲のパーセンテージ減少した後に行われる。

【0882】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張は、プライミングによる第1の拡張によってもたらされるT細胞の活性化が、少なくとも正確にまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、または99%減少した後に行われる。

40

【0883】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張は、プライミングによる第1の拡張によってもたらされるT細胞の活性化が、最大で正確にまたは約1、2、3、4、5、6、7、

50

8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100%減少した後に行われる。

【0884】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張によってもたらされるT細胞の活性化の減少は、抗原による刺激に応答してT細胞によって放出されるインターフェロングammaの量の減少によって決定される。

10

【0885】

いくつかの実施形態では、T細胞のプライミングによる第1の拡張は、最大で正確にまたは約7日または約8日の期間中に行われる。

【0886】

いくつかの実施形態では、T細胞のプライミングによる第1の拡張は、最大で正確にまたは約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、または8日の期間中に行われる。

【0887】

いくつかの実施形態では、T細胞のプライミングによる第1の拡張は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、または8日の期間中に行われる。

20

【0888】

いくつかの実施形態では、T細胞の急速な第2の拡張は、最大で正確にまたは約11日の期間中に行われる。

【0889】

いくつかの実施形態では、T細胞の急速な第2の拡張は、最大で正確にまたは約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、または11日の期間中に行われる。

【0890】

いくつかの実施形態では、T細胞の急速な第2の拡張は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、または11日の期間中に行われる。

30

【0891】

いくつかの実施形態では、T細胞のプライミングによる第1の拡張は、正確にまたは約1日～正確にまたは約7日の期間中に行われ、T細胞の急速な第2の拡張は、正確にまたは約1日～正確にまたは約11日の期間中に行われる。

【0892】

いくつかの実施形態では、T細胞のプライミングによる第1の拡張は、最大で正確にまたは約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、または8日の期間中に行われ、T細胞の急速な第2の拡張は、最大で正確にまたは約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、または11日の期間中に行われる。

40

【0893】

いくつかの実施形態では、T細胞のプライミングによる第1の拡張は、正確にまたは約1日～正確にまたは約8日の期間中に行われ、T細胞の急速な第2の拡張は、正確にまたは約1日～正確にまたは約9日の期間中に行われる。

【0894】

いくつかの実施形態では、T細胞のプライミングによる第1の拡張は、8日の期間中に行われ、T細胞の急速な第2の拡張は、9日の期間中に行われる。

【0895】

いくつかの実施形態では、T細胞のプライミングによる第1の拡張は、正確にまたは約1日～正確にまたは約7日の期間中に行われ、T細胞の急速な第2の拡張は、正確にまた

50

は約1日～正確にまたは約9日の期間中に行われる。

【0896】

いくつかの実施形態では、T細胞のプライミングによる第1の拡張は、7日の期間中に行われ、T細胞の急速な第2の拡張は、9日の期間中に行われる。

【0897】

いくつかの実施形態では、T細胞は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）である。

【0898】

いくつかの実施形態では、T細胞は、骨髄浸潤リンパ球（MIL）である。

【0899】

いくつかの実施形態では、T細胞は、末梢血リンパ球（PBL）である。

10

【0900】

いくつかの実施形態では、T細胞は、がん罹患しているドナーから取得される。

【0901】

いくつかの実施形態では、T細胞は、がん罹患している患者から切除された腫瘍から取得されたTILである。

【0902】

いくつかの実施形態では、T細胞は、血液系悪性腫瘍に罹患している患者の骨髄から取得されたMILである。

【0903】

いくつかの実施形態では、T細胞は、ドナー由来の末梢血単核細胞（PBMC）から取得されたPBLである。いくつかの実施形態では、ドナーは、がん罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽細胞腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択されるがんである。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽細胞腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは、腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液体腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは、血液系悪性腫瘍に罹患している。

20

30

【0904】

本開示の特定の態様では、免疫エフェクター細胞、例えば、T細胞は、FICOLL分離などの当業者に知られている任意の数の技法を使用して対象から収集された血液の単位から得ることができる。好ましい一態様では、個体の循環血液由来の細胞は、アフエレーシスによって取得される。アフエレーシス産物は、典型的には、リンパ球、例えば、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球、赤血球、血小板を含む。一態様では、アフエレーシスによって収集された細胞が洗浄されて、血漿画分が除去され、任意選択で、その後の処理ステップのために細胞を適切な緩衝液または培地に入れられ得る。いくつかの実施形態では、細胞は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で洗浄される。代替の実施形態では、洗浄溶液は、カルシウムを欠き、マグネシウムを欠き得るか、またはすべてではないが多くの二価カチオンを欠き得る。一態様では、T細胞は、赤血球を溶解し、かつ単球を枯渇させることによって、例えば、PERCOLL勾配による遠心分離によって、または対向流遠心溶出法によって末梢血リンパ球から単離される。

40

【0905】

いくつかの実施形態では、T細胞は、ドナー由来のリンパ球が濃縮された全血またはアフエレーシス産物から分離されたPBLである。いくつかの実施形態では、ドナーは、がん罹患している。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮内膜癌、甲状腺癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイ

50

ルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽細胞腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択されるがんである。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭腫ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽細胞腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、及び腎細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ドナーは、腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、腫瘍は、液体腫瘍である。いくつかの実施形態では、腫瘍は、固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、ドナーは、血液系悪性腫瘍に罹患している。いくつかの実施形態では、PBLは、正または負の選択法を使用することによって、すなわち、T細胞表現型について、マーカー（複数可）、例えば、CD3+CD45+を使用してPBLを除去することによって、または非T細胞表現型細胞を除去してPBLを残すことによって、リンパ球が濃縮された全血またはアフエーシス産物から単離される。他の実施形態では、PBLは、勾配遠心分離によって単離される。ドナー組織からPBLを単離した時点で、PBLのプライミングによる第1の拡張は、本明細書に記載される方法のうちのいずれかのプライミングによる第1の拡張ステップに従って、プライミングによる第1の拡張培養下で好適な数の単離されたPBL（いくつかの実施形態では、およそ 1×10^7 PBL）を播種することによって開始され得る。

10

【0906】

これらの特徴のうちのいくつかを含む、プロセス3として知られる（本明細書ではGen3とも称される）例示的なTILプロセスが、図8（特に、例えば図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）に示され、本発明のこの実施形態の、Gen2を超える利点のうちのいくつかは、図1、2、8、30、及び31（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）に記載される。Gen3の実施形態は、図1、8、及び30（特に、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）に示される。プロセス2AまたはGen2またはGen2Aはまた、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許公開第2018/0280436号にも記載されている。Gen3プロセスはまた、国際特許公開第WO2020/096988号に記載されている。

20

30

【0907】

本明細書で考察され、かつ一般に概説されるように、TILは、患者試料から採取され、本明細書に記載され、かつGen3と称されるTIL拡張プロセスを使用して患者に移植する前に、それらの数を拡張するように操作される。いくつかの実施形態では、TILは、以下で考察されるように、任意で遺伝子操作され得る。いくつかの実施形態では、TILは、拡張前または拡張後に凍結保存され得る。解凍した時点で、それらが再刺激されて、患者への注入前に代謝を高めることができる。

【0908】

いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図において詳細に考察されるように、プライミングによる第1の拡張（本明細書において急速拡張前（REP前）と称されるプロセス、ならびに図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）においてステップBとして示されるプロセスを含む）は、1～8日に短縮され、急速な第2の拡張（本明細書において急速拡張プロトコル（REP）と称されるプロセス、ならびに図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）において示されるプロセスを含む）は、1～9日に短縮される。いくつかの実施形態では、以下ならびに実施例及び図において詳細に考察されるように、プライミングによる第1の拡張（本明細書において急速拡張前（REP前）と称されるプロセス、ならびに図8（特に、例えば図8A及び／または図

40

50

50

び／または図 8 F 及び／または図 8 G) においてステップ D に記載される拡張) は、9 日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) においてステップ B として記載される拡張) は、8 日間であり、急速な第 2 の拡張 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) においてステップ D に記載される拡張) は、10 日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) においてステップ B として記載される拡張) は、7 日間であり、急速な第 2 の拡張 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) においてステップ D に記載される拡張) は、7～10 日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) においてステップ B として記載される拡張) は、7 日間であり、急速な第 2 の拡張 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) においてステップ D に記載される拡張) は、8～10 日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) においてステップ B として記載される拡張) は、7 日に短縮され、急速な第 2 の拡張 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) においてステップ D に記載される拡張) は、7～9 日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張と急速な第 2 の拡張 (例えば、図 8 (特に、例えば図 1 B 及び／または図 8 C) においてステップ B 及びステップ D として記載される拡張) との組み合わせは、以下ならびに実施例及び図面において詳細に考察されるように、14～16 日間である。特に、本発明のある特定の実施形態が、IL-2 の存在下での抗 CD3 抗体、例えば、OKT-3 への曝露、または少なくとも IL-2 及び抗 CD3 抗体、例えば、OKT-3 の存在下での抗原への曝露によって TIL が活性化される、プライミングによる第 1 の拡張ステップを含むと考えられる。ある特定の実施形態では、上記のようにプライミングによる第 1 の拡張ステップで活性化される TIL は、第 1 の TIL 集団であり、すなわち、一次細胞集団である。

10

20

30

40

【0909】

以下の「ステップ」指定 A、B、C などは、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) における非限定的な例を参照し、本明細書に記載されるある特定の非限定的な実施形態を参照している。以下及び図 8 (特に、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) におけるステップの順序は例示的であり、ステップの任意の組み合わせまたは順序、ならびに追加のステップ、ステップの繰り返し、及び／またはステップの省略は、本出願及び本明細書に開示される方法によって企図される。

【0910】

50

A. ステップ A：患者の腫瘍試料を取得する

一般に、TILは、患者の腫瘍試料（「一次TIL」）から、またはTIL様の特徴を有する末梢血リンパ球を含む末梢血リンパ球などの循環リンパ球から最初に取得され、次いで、本明細書に記載されるように、さらなる操作のためにより大きな集団に拡張され、任意選択で凍結保存され、任意選択でTILの健康の指標として表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【0911】

患者の腫瘍試料は、一般に、外科的切除、針生検、または腫瘍細胞とTIL細胞との混合物を含有する試料を得るための他の手段により、当該技術分野で知られている方法を使用して得ることができる。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。固形腫瘍は、乳癌、膵臓癌、前立腺癌、結腸直腸癌、肺癌、脳癌、腎癌、胃癌、及び皮膚癌を含むが、これらに限定されない（扁平上皮癌、基底細胞癌、及び黒色腫を含むが、これらに限定されない）、任意の種類のがんであり得る。いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌、頭頸部癌（例えば、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽細胞腫（GBM）、胃腸癌、卵巣癌、肉腫、膵臓癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、及び非小細胞肺癌から選択される。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、悪性黒色腫腫瘍が特に高レベルのTILを有することが報告されているため、有用なTILは、悪性黒色腫腫瘍から取得される。

10

20

【0912】

取得された時点で、腫瘍試料は、一般に、鋭的解剖を使用して1～約8mm³の薄片に断片化され、約2～3mm³が特に有用である。TILは、酵素腫瘍消化物を使用してこれらの断片から培養される。かかる腫瘍消化物は、酵素培地（例えば、Roswell Park Memorial Institute（RPMI）1640緩衝液、2mMグルタミン酸、10mcg/mLゲンタマイシン、30単位/mL DNase、及び1.0mg/mL コラゲナーゼ）中でのインキュベーション、続いて、機械的解離（例えば、組織解離機を使用する）によって産生され得る。腫瘍消化物は、腫瘍を酵素培地に入れ、腫瘍をおよそ1分間機械的に解離させ、続いて5% CO₂中37℃で30分間インキュベートし、続いて小さな組織片のみが存在するまで、前述の条件下で機械的解離及びインキュベーションのサイクルを繰り返すことによって産生することができる。このプロセスの最後に、細胞懸濁液中に多数の赤血球または死細胞が含まれている場合、FICOLL分岐親水性多糖類を使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。米国特許出願公開第2012/0244133A1号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているものなどの当該技術分野で知られている代替の方法を使用することができる。前述の方法のうちのいずれかが、TILを拡張する方法またはがんを治療する方法について本明細書に記載される実施形態のうちのいずれかにおいて使用され得る。

30

【0913】

上に示されるように、いくつかの実施形態では、TILは、固形腫瘍に由来する。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は、断片化されない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍は断片化されず、全腫瘍として酵素消化に供される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNase、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNase、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で1～2時間消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNase、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で1～2時間、37℃、5% CO₂で消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ、DNase、及びヒアルロニダーゼを含む酵素混合物中で1～2時間、37℃、5% CO₂で回転を伴って消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、一定の回転を伴って一晚消化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、37℃、5% CO₂で一定の回転を伴って一晚消化さ

40

50

れる。いくつかの実施形態では、全腫瘍が酵素と組み合わせられて、腫瘍消化反応混合物が形成される。

【0914】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、滅菌緩衝液中の凍結乾燥酵素で再構成される。いくつかの実施形態では、緩衝液は、滅菌HBSSである。

【0915】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、コラゲナーゼを含む。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、コラゲナーゼIVである。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼの作業ストックは、100mg/mLの10倍作業ストックである。

【0916】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、DNaseを含む。いくつかの実施形態では、DNaseの作業ストックは、10,000IU/mLの10倍作業ストックである。

【0917】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、ヒアルロニダーゼを含む。いくつかの実施形態では、ヒアルロニダーゼの作業ストックは、10mg/mLの10倍作業ストックである。

【0918】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、10mg/mLのコラゲナーゼ、1000IU/mLのDNase、及び1mg/mLのヒアルロニダーゼを含む。

【0919】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、10mg/mLのコラゲナーゼ、500IU/mLのDNase、及び1mg/mLのヒアルロニダーゼを含む。

【0920】

一般に、腫瘍から取得された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに取得された」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。ある特定の実施形態では、新たに取得されたTIL細胞集団は、抗原提示細胞、IL-12、及びOKT-3を含む細胞培養培地に曝露される。

【0921】

いくつかの実施形態では、断片化には、例えば、解剖及び消化を含む物理的断片化が含まれる。いくつかの実施形態では、断片化は、物理的断片化である。いくつかの実施形態では、断片化は、解剖である。いくつかの実施形態では、断片化は、消化によるものである。いくつかの実施形態では、TILは、最初に、患者から取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から培養され得る。いくつかの実施形態では、TILは、最初に、患者から取得された酵素腫瘍消化物及び腫瘍断片から培養され得る。

【0922】

腫瘍が固形腫瘍であるいくつかの実施形態では、腫瘍試料が、例えば、ステップA（図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）に提供される）で取得された後、腫瘍は物理的断片化を受ける。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存前に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、凍結保存後に起こる。いくつかの実施形態では、断片化は、腫瘍を得た後に、いずれの凍結保存もない場合に起こる。いくつかの実施形態では、断片化ステップは、インビトロまたはエキスピボプロセスである。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、10、20、30、40個、またはそれ以上の断片または小片が、プライミングによる第1の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、30個または40個の断片または小片が、プライミングによる第1の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、腫瘍が断片化され、40個の断片または小片が、プライミングによる第1の拡張のために各容器に入れられる。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約4～約50個の断片を含み、各断片は、約27mm³の体積を有する。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約1300mm³～約1500mm³の総体積を伴う約30～約60個の断片を含む。いくつかの実施

10

20

30

40

50

形態では、複数の断片は、約 1350 mm^3 の総体積を伴う約 50 個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 1 グラム～約 1.5 グラムの総質量を伴う約 50 個の断片を含む。いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 4 個の断片を含む。

【0923】

いくつかの実施形態では、TIL は、腫瘍断片から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、鋭的解剖によって取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $1\text{ mm}^3 \sim 10\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $1\text{ mm}^3 \sim 8\text{ mm}^3$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 1 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 2 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 3 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 4 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 5 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 6 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 7 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 8 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 9 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 10 mm^3 である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $1 \sim 4\text{ mm} \times 1 \sim 4\text{ mm} \times 1 \sim 4\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $2\text{ mm} \times 2\text{ mm} \times 2\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $3\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 3\text{ mm}$ である。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、 $4\text{ mm} \times 4\text{ mm} \times 4\text{ mm}$ である。

【0924】

いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性、壊死性、及び／または脂肪性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の出血性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の壊死性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、各小片上の脂肪性組織の量を最小限に抑えるために断片化される。ある特定の実施形態では、腫瘍の断片化ステップは、インビトロまたはエキスピボ方法である。

【0925】

いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、腫瘍の内部構造を維持するために行われる。いくつかの実施形態では、腫瘍の断片化は、メスでのこ引き動作を行うことなく行われる。いくつかの実施形態では、TIL は、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、RPMI 1640 (2 mM GlutaMAX 、 10 mg/mL ゲンタマイシン、 30 U/mL DNase 、及び 1.0 mg/mL コラゲナーゼ) であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離 (GentleMACS , Miltenyi Biotec , Auburn, CA) によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ 1 分間機械的に解離され得る。その後、溶液が $5\% \text{ CO}_2$ 中 37°C で 30 分間インキュベートされ、その後、およそ 1 分間再び機械的に破壊され得る。 $5\% \text{ CO}_2$ 中 37°C で 30 分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ 1 分間、3 回目に機械的に破壊することができる。いくつかの実施形態では、大きい組織片が存在する場合、3 回目の機械的破壊後、 $5\% \text{ CO}_2$ 中 37°C でさらに 30 分間インキュベートするかにかかわらず、1 回または 2 回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、 Ficoll を使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【0926】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張ステップ前の細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに取得された」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。

【0927】

いくつかの実施形態では、細胞は、試料単離後（例えば、腫瘍試料を得た後及び／また

は腫瘍試料から細胞懸濁液を得た後)、任意選択で凍結され得、ステップ B に記載の拡張に入る前に凍結保存され得、これは以下でさらに詳細に説明されるとともに、図 8 (特に、例えば図 8 B) に例示される。

【0928】

1. コア／小生検由来の T I L

いくつかの実施形態では、T I L は、最初に、コア生検または同様の手順によって取得された患者腫瘍試料 (「一次 T I L」) から得られ、その後、本明細書に記載されるように、さらなる操作のためにより大きい集団に拡張され、任意で凍結保存され、任意で表現型及び代謝パラメータについて評価される。

【0929】

いくつかの実施形態では、患者の腫瘍試料は、一般に、小生検、コア生検、針生検、または腫瘍細胞と T I L 細胞との混合物を含有する試料を得るための他の手段により、当該技術分野で知られている方法を使用して取得することができる。一般に、腫瘍試料は、原発腫瘍、浸潤性腫瘍、または転移性腫瘍を含む、任意の固形腫瘍に由来し得る。腫瘍試料は、血液系悪性腫瘍から取得された腫瘍などの液体腫瘍であり得る。いくつかの実施形態では、試料は、複数の小さい腫瘍試料または生検に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の単一の腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の 1、2、3、または 4 つの腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。いくつかの実施形態では、試料は、同じ患者由来の複数の腫瘍からの複数の腫瘍試料を含むことができる。固形腫瘍は、肺癌及び／または非小細胞肺癌 (N S C L C) であり得る。

【0930】

一般に、腫瘍コアまたは断片から取得された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに取得された」または「新たに単離された」細胞集団と呼ばれる。ある特定の実施形態では、新たに取得された T I L 細胞集団は、抗原提示細胞、I L - 2、及び O K T - 3 を含む細胞培養培地に曝露される。

【0931】

いくつかの実施形態では、腫瘍が転移性であり、かつ原発性病変が過去に効率的に治療／除去された場合、転移性病変のうちの 1 つの除去が必要とされ得る。いくつかの実施形態では、最も侵襲性の低いアプローチは、皮膚病変、または利用可能な場合、首または腋窩領域のリンパ節を除去することである。いくつかの実施形態では、皮膚病変が除去されるか、またはその小生検が除去される。いくつかの実施形態では、リンパ節またはその小生検が除去される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、黒色腫である。いくつかの実施形態では、黒色腫の小生検は、ほくろまたはその一部を含む。

【0932】

いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検である。いくつかの実施形態では、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形の刃で取得される。いくつかの実施形態では、パンチ生検は、疑わしいほくろの周りの皮膚に押し込まれた円形の刃で得られる。いくつかの実施形態では、パンチ生検は、皮膚に押し込まれた円形の刃で得られ、丸い皮膚片が採取される。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検であり、腫瘍の丸い部分が採取される。

【0933】

いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検であり、ほくろまたは増殖全体が除去される。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検であり、ほくろまたは増殖全体が、正常に見える皮膚の小縁とともに除去される。

【0934】

いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、ほくろまたは増殖の最も不規則な部分のみが採取される。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、切開生検は、疑わしいほくろが非常に大

10

20

30

40

50

きい場合など、他の技法を達成することができない場合に使用される。

【0935】

いくつかの実施形態では、小生検は、肺生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、気管支鏡検査によって取得される。一般に、気管支鏡検査では、患者は麻酔をかけられ、小さい器具が鼻または口を通り、喉を下って気管支通路に入り、そこで小さい器具を使用していくつかの組織を採取する。気管支鏡検査によって腫瘍または成長に到達できないいくつかの実施形態では、経胸腔針生検が用いられ得る。一般に、経胸腔針生検の場合も、患者は麻酔をかけられ、針が皮膚をとおして疑わしい場所に直接挿入されて、小さい組織試料を採取する。いくつかの実施形態では、経胸壁針生検は、介入放射線医学（例えば、針をガイドするためのX線またはCT走査の使用）を必要とし得る。いくつかの実施形態では、小生検は、針生検によって取得される。いくつかの実施形態では、小生検は、超音波内視鏡検査によって得られる（例えば、照明を備えた内視鏡であり、口をとおして食道に配置される）。いくつかの実施形態では、小生検は、外科的に取得される。

10

【0936】

いくつかの実施形態では、小生検は、頭頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、切開生検であり、小さい組織片が異常に見える領域から切り取られる。いくつかの実施形態では、異常な領域に容易にアクセスできる場合、試料は、入院することなく採取され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍が口または喉のより深くにある場合、生検は、全身麻酔を用いて手術室で行われる必要があり得る。いくつかの実施形態では、小生検は、切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、全領域が除去される切除生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（FNA）である。いくつかの実施形態では、小生検は、細針吸引（FNA）であり、シリンジに取り付けられた非常に細い針を使用して、腫瘍または塊から細胞を抽出（吸引）する。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、パンチ生検であり、パンチ鉗子を使用して、疑わしい領域の一片を採取する。

20

【0937】

いくつかの実施形態では、小生検は、子宮頸部生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、膣鏡検査によって取得される。一般に、膣鏡検査は、拡大双眼鏡に取り付けられた照明付き拡大器具（膣鏡）の使用を採用し、その後、これを使用して、子宮頸部の表面の小さい切片を生検する。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／錐体生検である。いくつかの実施形態では、小生検は、円錐切除／錐体生検であり、子宮頸部からより大きい組織片を採取するために外来手術が必要になる場合がある。いくつかの実施形態では、錐体生検は、診断の確認を助けることに加えて、錐体生検が初期治療となり得る。

30

【0938】

「固形腫瘍」という用語は、通常、嚢胞または液体領域を含まない異常な組織塊を指す。固形腫瘍は、良性または悪性であり得る。「固形腫瘍癌」という用語は、悪性、腫瘍性、またはがん性の固形腫瘍を指す。固形腫瘍癌には、肺の癌が含まれる。いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。いくつかの実施形態では、がんは、非小細胞肺癌（NSCLC）である。固形腫瘍の組織構造には、実質（がん細胞）を含む相互依存的組織区画、及びがん細胞が分散しており、かつ支持微小環境を提供し得る支持間質細胞が含まれる。

40

【0939】

いくつかの実施形態では、腫瘍由来の試料は、細針吸引物（FNA）、コア生検、小生検（例えば、パンチ生検を含む）として取得される。いくつかの実施形態では、試料は、最初にG-R E X-10に入れられる。いくつかの実施形態では、1つまたは2つのコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にG-R E X-10に入れられる。いくつかの実施形態では、3、4、5、6、8、9、または10個以上のコア生検及び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にG-R E X-100に入れられる。いくつかの実施形態では、3、4、5、6、8、9、または10個以上のコア生検及

50

び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初に G-R E X-500 に入れられる。

【0940】

FNA は、例えば、黒色腫を含む皮膚腫瘍から取得することができる。いくつかの実施形態では、FNA は、転移性黒色腫を有する患者からの皮膚腫瘍などの皮膚腫瘍から取得される。いくつかの事例では、黒色腫を有する患者は、外科的治療を以前に受けたことがある。

【0941】

FNA は、例えば、NSCLC を含む肺腫瘍から得ることができる。いくつかの実施形態では、FNA は、非小細胞肺癌 (NSCLC) を有する患者由来の肺腫瘍などの肺腫瘍から取得される。いくつかの事例では、NSCLC を有する患者は、外科的治療を以前に受けたことがある。

【0942】

本明細書に記載の TIL は、FNA 試料から得られ得る。いくつかの事例では、FNA 試料は、18 ゲージ針～25 ゲージ針の範囲の細いゲージ針を使用して、患者から得られるか、または単離される。細いゲージ針は、18 ゲージ、19 ゲージ、20 ゲージ、21 ゲージ、22 ゲージ、23 ゲージ、24 ゲージ、または 25 ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者由来の FNA 試料は、少なくとも 400,000 個の TIL、例えば、400,000 個の TIL、450,000 個の TIL、500,000 個の TIL、550,000 個の TIL、600,000 個の TIL、650,000 個の TIL、700,000 個の TIL、750,000 個の TIL、800,000 個の TIL、850,000 個の TIL、900,000 個の TIL、950,000 個の TIL、またはそれ以上を含み得る。

【0943】

いくつかの事例では、本明細書に記載の TIL は、コア生検試料から取得される。いくつかの事例では、コア生検試料は、11 ゲージ針～16 ゲージ針の範囲の外科用または医療用針を使用して、患者から得られるか、または単離される。針は、11 ゲージ、12 ゲージ、13 ゲージ、14 ゲージ、15 ゲージ、または 16 ゲージであり得る。いくつかの実施形態では、患者由来のコア生検試料は、少なくとも 400,000 個の TIL、例えば、400,000 個の TIL、450,000 個の TIL、500,000 個の TIL、550,000 個の TIL、600,000 個の TIL、650,000 個の TIL、700,000 個の TIL、750,000 個の TIL、800,000 個の TIL、850,000 個の TIL、900,000 個の TIL、950,000 個の TIL、またはそれ以上を含み得る。

【0944】

一般に、採取された細胞懸濁液は、「一次細胞集団」または「新たに採取された」細胞集団と呼ばれる。

【0945】

いくつかの実施形態では、TIL は、腫瘍消化物から得られない。いくつかの実施形態では、固形腫瘍コアは、断片化されない。

【0946】

いくつかの実施形態では、TIL は、腫瘍消化物から取得される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、RPMI 1640 (2mM GlutaMAX、10mg/mL ゲンタマイシン、30U/mL DNase、及び 1.0mg/mL コラゲナーゼ) であるが、これに限定されない酵素培地中でのインキュベーション、続いて、機械的解離 (GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA) によって生成された。腫瘍を酵素培地に入れた後、腫瘍は、およそ 1 分間機械的に解離され得る。その後、溶液が 5% CO₂ 中 37℃ で 30 分間インキュベートされ、その後、およそ 1 分間再び機械的に破壊され得る。5% CO₂ 中 37℃ で 30 分間再びインキュベートした後、腫瘍を、およそ 1 分間、3 回目に機械的に破壊することができる。いくつかの

実施形態では、大きい組織片が存在する場合、3回目の機械的破壊後、5%CO₂中37℃でさらに30分間インキュベートするにかかわらず、1回または2回の追加の機械的解離が試料に適用された。いくつかの実施形態では、細胞懸濁液が多数の赤血球または死細胞を含む場合、最終インキュベーションの終わりに、Ficollを使用した密度勾配分離が行われて、これらの細胞を除去することができる。

【0947】

いくつかの実施形態では、第1のTIL集団を取得することは、多病変サンプリング法を含む。

【0948】

腫瘍解離酵素混合物には、1つ以上の解離（消化）酵素、例えば、限定されないが、コラゲナーゼ（任意のブレンドまたはコラゲナーゼの種類を含む）、Accutase（商標）、Accumax（商標）、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ（ディスパーゼ）、キモトリプシン、キモパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、XIV型プロテアーゼ（プロナーゼ）、デオキシリボヌクレアーゼI（DNase）、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びそれらの任意の組み合わせが含まれ得る。

【0949】

いくつかの実施形態では、解離酵素は、凍結乾燥酵素から再構成される。いくつかの実施形態では、凍結乾燥酵素は、ハンクス平衡塩溶液（HBSS）などの滅菌緩衝液の量で再構成される。

【0950】

いくつかの事例では、コラゲナーゼ（アニマルフリー1型コラゲナーゼなど）を、10mLの滅菌HBSSまたは別の緩衝液で再構成する。凍結乾燥ストック酵素は、2892 PZ U/バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、コラゲナーゼは、5mL～15mLの緩衝液中で再構成される。いくつかの実施形態では、再構成後のコラゲナーゼストックは、約100 PZ U/mL～約400 PZ U/mLの範囲、例えば、約100 PZ U/mL～約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL～約350 PZ U/mL、約100 PZ U/mL～約300 PZ U/mL、約150 PZ U/mL～約400 PZ U/mL、約100 PZ U/mL、約150 PZ U/mL、約200 PZ U/mL、約210 PZ U/mL、約220 PZ U/mL、約230 PZ U/mL、約240 PZ U/mL、約250 PZ U/mL、約260 PZ U/mL、約270 PZ U/mL、約280 PZ U/mL、約289.2 PZ U/mL、約300 PZ U/mL、約350 PZ U/mL、または約400 PZ U/mLである。

【0951】

いくつかの実施形態では、中性プロテアーゼは、1mLの滅菌HBSSまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥ストック酵素は、175 DMC U/バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態では、再構成後の中性プロテアーゼストックは、約100 DMC/mL～約400 DMC/mLの範囲、例えば、約100 DMC/mL～約400 DMC/mL、約100 DMC/mL～約350 DMC/mL、約100 DMC/mL～約300 DMC/mL、約150 DMC/mL～約400 DMC/mL、約100 DMC/mL、約110 DMC/mL、約120 DMC/mL、約130 DMC/mL、約140 DMC/mL、約150 DMC/mL、約160 DMC/mL、約170 DMC/mL、約175 DMC/mL、約180 DMC/mL、約190 DMC/mL、約200 DMC/mL、約250 DMC/mL、約300 DMC/mL、約350 DMC/mL、または約400 DMC/mLである。

【0952】

いくつかの実施形態では、DNase Iは、1mLの滅菌HBSSまたは別の緩衝液中で再構成される。凍結乾燥したストック酵素は、4 KU/バイアルの濃度であった。いくつかの実施形態では、再構成後のDNase Iストックは、約1 KU/mL～10 K

10

20

30

40

50

U / m L、例えば、約 1 K U / m L、約 2 K U / m L、約 3 K U / m L、約 4 K U / m L、約 5 K U / m L、約 6 K U / m L、約 7 K U / m L、約 8 K U / m L、約 9 K U / m L、または約 10 K U / m L の範囲である。

【0953】

いくつかの実施形態では、酵素のストックは変化する可能性があるため、凍結乾燥ストックの濃度を検証し、それに応じて消化カクテルに追加される酵素の最終量を修正する。

【0954】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約 4.7 m L の滅菌 H B S S 中に約 10.2 u l の中性プロテアーゼ (0.36 D M C U / m L)、21.3 u l のコラゲナーゼ (1.2 P Z / m L) 及び 250 u l の D N A s e I (200 U / m L) を含む。

【0955】

2. 胸水 T 細胞及び T I L

いくつかの実施形態では、試料は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のための T 細胞または T I L の供給源は、胸腔内液試料である。いくつかの実施形態では、試料は、胸水由来試料である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセスによる拡張のための T I L の供給源は、胸水由来試料である。例えば、米国特許公開第 2014 / 0295426 号に記載されている方法を参照されたく、これはすべての目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0956】

いくつかの実施形態では、T I L と思われる、及び / または T I L を含む任意の胸腔内液または胸水を利用することができる。かかる試料は、N S C L C もしくは S C L C などの原発性または転移性肺癌に由来し得る。いくつかの実施形態では、試料は、別の臓器、例えば、乳房、卵巣、結腸、または前立腺に由来する二次転移性がん細胞であり得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜浸出液である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用する試料は、胸膜漏出液である。他の生体試料は、例えば、腹部からの腹水または脾嚢胞液を含む、T I L を含有する他の漿液を含み得る。腹水及び胸腔内液は、非常に類似した化学系を伴い、腹部及び肺の両方が、悪性腫瘍における同じ物質の胸膜空間及び腹部空間に中皮線及び流体形態を有し、いくつかの実施形態では、かかる流体は、T I L を含有する。本開示が胸水を例示するいくつかの実施形態では、同じ方法が、胸腔内液または T I L を含有する他の嚢胞液を使用して同様の結果で実行されてもよい。

【0957】

いくつかの実施形態では、胸腔内液は、患者から直接除去された未処理の形態である。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、接触ステップの前に、E D T A またはヘパリンチューブなどの標準的な採血管に入れられる。いくつかの実施形態では、未処理の胸腔内液は、接触ステップの前に、標準的な C e l l S a v e (登録商標) チューブ (V e r i d e x) に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、生存 T I L の数の減少を避けるために、患者から採取した直後に C e l l S a v e チューブに入れられる。生存 T I L の数は、4 ° C であっても、未処理の胸腔内液中に放置されると、24 時間以内に大幅に減少する可能性がある。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの除去後 1 時間、5 時間、10 時間、15 時間、または最大 24 時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、4 ° C で、患者からの除去後 1 時間、5 時間、10 時間、15 時間、または最大 24 時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【0958】

いくつかの実施形態では、選択された対象からの胸腔内液試料は、希釈され得る。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が 1 : 10 である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が 1 : 9 である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が 1 : 8 である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が 1 : 5 である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が 1 : 2 である。いくつかの実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が 1 : 1 である。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

では、希釈剤には、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、別の緩衝液、または生理学的に許容される希釈剤が含まれる。いくつかの実施形態では、試料は、患者からの収集及び希釈の直後に Cell Save チューブ内に入れられ、生存 TIL の減少を回避し、これは、4℃であっても、未処理の胸腔内液中に放置された場合、24～48時間以内に有意に生じ得る。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、患者からの除去及び希釈後1時間、5時間、10時間、15時間、24時間、36時間、最大48時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、4℃で、患者からの除去及び希釈後1時間、5時間、10時間、15時間、24時間、36時間、最大48時間以内に適切な収集チューブ内に入れられる。

【0959】

10

さらに他の実施形態では、胸腔内液試料は、さらなる処理ステップの前に、従来の手段によって濃縮される。いくつかの実施形態では、胸腔内液のこの前処理は、方法を実施する実験室への輸送のために、またはその後の分析のために（例えば、採取後24～48時間より後に）胸水を凍結保存しなければならない状況において好ましい。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、それが対象から採取された後に胸腔内液試料を遠心分離し、遠心分離物またはペレットを緩衝液中に再懸濁することによって調製される。いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、輸送または後の分析及び／または処理のために凍結保存される前に、複数の遠心分離及び再懸濁に供される。

【0960】

20

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料は、濾過法を使用することによって、さらなる処理ステップの前に濃縮される。いくつかの実施形態では、接触ステップで使用される胸腔内液試料は、胸腔内液が膜を通過することを可能にするが腫瘍細胞を保持する、既知で本質的に均一な孔径を含むフィルターをとおして流体を濾過することによって調製される。いくつかの実施形態では、膜の細孔の直径は、少なくとも4μmであり得る。他の実施形態では、細孔直径は、5μm以上であり得、他の実施形態では、6、7、8、9、または10μmのうちのいずれかであり得る。濾過後、膜によって保持されたTILを含む細胞を、膜から適切な生理学的に許容される緩衝液にすすいでもよい。次いで、このように濃縮されたTILを含む細胞は、方法の接触ステップで 사용할 ことができる。

【0961】

30

いくつかの実施形態では、胸腔内液試料（例えば、未処理の胸腔内液を含む）、希釈胸腔内液、または再懸濁細胞ペレットは、試料中に存在する無核赤血球を特異的に溶解する溶解試薬と接触させる。いくつかの実施形態では、このステップは、胸腔内液がかなりの数のRBCを含む状況で、さらなる処理ステップの前に行われる。好適な溶解試薬には、単一の溶解試薬もしくは溶解試薬及びクエンチ試薬、または溶解剤、クエンチ試薬及び固定試薬が含まれる。好適な溶解システムは市販されており、BD Pharm Lyse（商標）システム（Becton Dickinson）が含まれる。他の溶解システムには、VersaLyse（商標）システム、FACS Lyse（商標）システム（Becton Dickinson）、Immunoprep（商標）システム、またはErythrolyse II システム（Beckman Coulter, Inc.）、または塩化アンモニウムシステムが含まれる。いくつかの実施形態では、溶解試薬は、赤血球の効率的な溶解、ならびに胸水におけるTIL及びTILの表現型特性の保存のような主要な要件によって異なり得る。溶解のための単一の試薬を利用することに加えて、本明細書に記載の方法に有用な溶解システムは、第2の試薬、例えば、方法の残りのステップ中に溶解試薬の効果をクエンチまたは遅延させるもの、例えばStablyse（商標）試薬（Beckman Coulter, Inc.）を含むことができる。溶解試薬の選択または方法の好ましい実施に応じて、従来の固定試薬を使用することもできる。

40

【0962】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、未処理、希釈または多重遠心分離または処理された胸腔内液試料は、本明細書で提供されるようにさらに処理及び／または拡張される前に、約-140℃の温度で凍結保存される。

50

【0963】

3. CD39 / CD69 二重陰性及び CD39 / CD69 二重 KO の事前選択

本発明のいくつかの方法によれば、TIL は、プライミングによる第1の拡張前に (i) CD39 / CD69 二重陰性及び / または CD39^{LO} / CD69^{LO}、(ii) CD39 / CD69 二重ノックアウト、または (iii) (i) 及び (ii) の組み合わせであるように事前選択される。いくつかの実施形態では、PD-1 についての任意選択の事前選択ステップも存在する。

【0964】

いくつかの実施形態では、最低3,000個のTILが、プライミングによる第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低3,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低4,000個のTILが、プライミングによる第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低4,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低5,000個のTILが、プライミングによる第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低5,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低6,000個のTILが、プライミングによる第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低6,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低7,000個のTILが、プライミングによる第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低7,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低8,000個のTILが、プライミングによる第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低8,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低9,000個のTILが、プライミングによる第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低9,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低10,000個のTILが、プライミングによる第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低10,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低20,000個のTILが、第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低20,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低30,000個のTILが、第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低30,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低40,000個のTILが、第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低40,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低50,000個のTILが、第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低50,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低60,000個のTILが、第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低60,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低70,000個のTILが、第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低70,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低80,000個のTILが、第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低80,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低90,000個のTILが、第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低90,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、最低100,000個のTILが、第1の拡張に播種するために必要とされる。いくつかの実施形態では、事前選択ステップは、最低100,000個個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、細胞を、200,000個の密度まで成長または拡張させる。いくつかの実施形態では、細胞を、200,000個の密度まで成長または拡張させて、急速な第2の拡張を開始するための約 2×10^8 個のTILを

10

20

30

40

50

提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、150,000個の密度まで成長または拡張させる。いくつかの実施形態では、細胞を、150,000個の密度まで成長または拡張させて、急速な第2の拡張を開始するための約 2×10^8 個のTILを提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、250,000個の密度まで成長または拡張させる。いくつかの実施形態では、細胞を、250,000個の密度まで成長または拡張させて、急速な第2の拡張を開始するための約 2×10^8 個のTILを提供する。いくつかの実施形態では、最小細胞密度は、急速な第2の拡張を開始するための 10×10^6 個を与えるために、10,000個の細胞である。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張を開始するための 10×10^6 個の播種密度は、 1×10^9 個を超えるTILをもたらす得る。

【0965】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張において使用するためのTILは、(i) CD39/CD69二重陰性及び/または $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i)及び(ii)の組み合わせ(例えば、事前選択後、及びプライミングによる第1の拡張前)である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張において使用するためのTILは、少なくとも75%(i) CD39/CD69二重陰性及び/または $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i)及び(ii)の組み合わせ、少なくとも80%(i) CD39/CD69二重陰性及び/または $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i)及び(ii)の組み合わせ、少なくとも85%(i) CD39/CD69二重陰性及び/または $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i)及び(ii)の組み合わせ、少なくとも90%(i) CD39/CD69二重陰性及び/または $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i)及び(ii)の組み合わせ、少なくとも95%(i) CD39/CD69二重陰性及び/または $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i)及び(ii)の組み合わせ、少なくとも98%(i) CD39/CD69二重陰性及び/または $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i)及び(ii)の組み合わせ、または少なくとも99%(i) CD39/CD69二重陰性及び/または $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ 、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii) (i)及び(ii)の組み合わせ(例えば事前選択後及びプライミングによる第1の拡張前)である。

【0966】

いくつかの実施形態では、CD39/CD69二重陰性及び/または $CD39^{LO}/CD69^{LO}$ TILの事前選択は、一次細胞集団、全腫瘍消化物、及び/または全腫瘍細胞懸濁液TILを抗CD39抗体及び抗CD69抗体で染色することによって行われる。いくつかの実施形態では、抗CD39及び抗CD69抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトCD39及びCD69ポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトCD39及びCD69ポリクローナル抗体などである。いくつかの実施形態では、抗CD39及び抗CD69抗体は、モノクローナル抗体である。

【0967】

いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗CD39抗体は、CD39を発現する細胞の少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%に結合する。いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗CD69抗体は、CD69を発現する細胞の少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、または少なくとも100%に結合する。

【0968】

いくつかの実施形態では、患者は、抗PD-1抗体で治療されている。いくつかの実施形

10

20

30

40

50

態では、対象は、抗PD-1抗体治療ナীবである。いくつかの実施形態では、対象は、抗PD-1抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、対象は、以前に化学療法剤で治療されている。いくつかの実施形態では、対象は、以前に化学療法剤で治療されているが、もはや化学療法剤で治療されていない。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後または抗PD-1抗体治療後である。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後であり、かつ抗PD-1抗体治療後である。いくつかの実施形態では、患者は、抗PD-1抗体治療ナীবである。いくつかの実施形態では、対象は、治療ナীবのがんを有するか、または化学療法治療後であるが、抗PD-1ナীবである。いくつかの実施形態では、対象は、治療ナীবであり、かつ化学療法治療後であるが、抗PD-1抗体治療ナীবである。

10

【0969】

いくつかの実施形態では、陰性は、FMOに基づいてゲーティングされる。いくつかの実施形態では、FACSゲートは、対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することにより、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受け入れるステップの後に設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、各選別に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、PBMCの各試料に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、PBMCの各試料に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、PBMCから10日、20日、30日、40日、50日、または60日毎に設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、PBMCから60日ごとに設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、10日、20日、30日、40日、50日、または60日毎にPBMCの各試料に対して設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、60日毎にPBMCの各試料に対して設定される。

20

【0970】

いくつかの実施形態では、事前選択は、第1のTIL集団から(i)CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}、(ii)CD39/CD69二重ノックアウト、または(iii)(i)及び(ii)の組み合わせを選択して、少なくとも11.27%~74.4% CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TILであるTIL集団を第1のTIL集団から選択することを含む、TIL集団を取得することを伴う。いくつかの実施形態では、第1のTIL集団は、少なくとも10%~80% CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}、少なくとも20%~80% CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}e TIL、少なくとも20%~80% CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL、少なくとも30%~80% CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL、少なくとも40%~80% CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL、少なくとも50%~80% CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL、少なくとも10%~70% CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL、少なくとも20%~70% CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL、少なくとも30%~70% CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL、または少なくとも40%~70% CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TILである。

30

40

【0971】

いくつかの実施形態では、選択ステップ（例えば、CD39/CD69二重陰性細胞の事前選択及び／または選択）は、

(i) 第1のTIL集団及びPBMC集団を、CD39及びCD69に結合する過剰のモノクローナル抗CD39 IgG及び抗CD69 IgG抗体に曝露するステップと、

(ii) フルオロフォアにコンジュゲートした過剰の抗IgG抗体を添加するステップと、

50

(i i i) 蛍光活性化細胞選別法 (F A C S) によって行われた場合の P B M C 集団で検出されたフルオロフォアの強度と比較した第 1 の T I L 集団中の C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} T I L で検出されたフルオロフォアの強度に基づいて、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性集団を取得するステップと、を含む。

【 0 9 7 2 】

いくつかの実施形態では、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} 濃縮 T I L 集団の少なくとも 7 0 % が、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} T I L である。いくつかの実施形態では、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} 濃縮 T I L 集団の少なくとも 8 0 % が、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} T I L である。いくつかの実施形態では、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} 濃縮 T I L 集団の少なくとも 9 0 % が、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} T I L である。いくつかの実施形態では、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} 濃縮 T I L 集団の少なくとも 9 5 % が、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} T I L である。いくつかの実施形態では、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} 濃縮 T I L 集団の少なくとも 9 9 % が、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} T I L である。いくつかの実施形態では、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} 濃縮 T I L 集団の 1 0 0 % が、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} T I L である。

【 0 9 7 3 】

いくつかの実施形態では、図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G におけるプロセス C D 3 9 / C D 6 9 G E N 3 のステップ A 3 として例示される選択ステップは、(i) 第 1 の T I L 集団を過剰のモノクローナル抗 C D 3 9 I g G 抗体及び抗 C D 6 9 I g G 抗体に曝露するステップと、(i i) フルオロフォアにコンジュゲートされた過剰の抗 I g G 抗体を追加するステップと、(i i i) フルオロフォアに基づいてフローベースの細胞選別を行って、(i) C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O}、(i i) C D 3 9 / C D 6 9 二重ノックアウト、または (i i i) (i) 及び (i i) 濃縮 T I L 集団の組み合わせを取得するステップと、を含む。

【 0 9 7 4 】

腫瘍試料に由来する T I L が C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} であるかどうかを決定するために、当業者は、1 人以上の健康なヒト対象からの血液試料から取得された末梢 T 細胞における C D 3 9 及び／または C D 6 9 の発現レベルに対応する参照値を利用することができる。参照試料中の C D 3 9 / C D 6 9 陽性細胞は、蛍光から 1 つの対照を引き算したものと、一致する同位体対照とを使用して定義することができる。いくつかの実施形態では、健康な対象からの C D 3 + / C D 3 9 + / C D 6 9 + 末梢 T 細胞 (例えば、参照細胞) において測定された C D 3 9 / C D 6 9 の発現レベルを使用して、腫瘍から取得された T I L における C D 3 9 / C D 6 9 の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立する。閾値は、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} T 細胞の C D 3 9 / C D 6 9 免疫染色の最大強度として定義することができる。そのため、C D 3 9 / C D 6 9 発現が閾値と同じかそれを下回る T I L は、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} 細胞であるとみなすことができる。いくつかの事例では、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} T I L は、全 C D 3 + 細胞の最大 1 % 以下に相当する C D 3 9 / C D 6 9 免疫染色の最低強度を有するものを表す。他の事例では、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} T I L は、全 C D 3 + 細胞の最大 0 . 7 5 % 以下に相当する C D 3 9 / C D 6 9 免疫染色の最低強度を有するものを表す。いくつかの事例では、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} T I L は、全 C D 3 + 細胞の最大 0 . 5 0 % 以下に相当する C D 3 9 / C D 6 9 免

疫染色の最低強度を有するものを表す。他の事例では、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TILは、全CD3＋細胞の最大0.25%以下に相当するCD39／CD69免疫染色の最低強度を有するものを表す。

【0975】

いくつかの実施形態では、実施例16のタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤(AKTi)法が用いられる。いくつかの実施形態では、TIL集団は、AKT阻害剤を含む培地中で培養され、CD39^{LO}／CD69^{LO}及び／またはCD39／CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得する。いくつかの実施形態では、AKT阻害剤は、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、ホノキオール、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、AKT阻害剤は、イパタセルチブである。いくつかの実施形態では、TIL集団は、約0.1μM、約0.2μM、約0.3μM、約0.4μM、約0.5μM、約0.6μM、約0.7μM、約0.8μM、約0.9μM、約1μM、約1.1μM、約1.2μM、約1.3μM、約1.4μM、約1.5μM、約1.6μM、約1.7μM、約1.8μM、約1.9μM、約2μM、約2.1μM、約2.2μM、約2.3μM、約2.4μM、約2.5μM、約2.6μM、約2.7μM、約2.8μM、約2.9μM、約3μM、約3.5μM、約4μM、約4.5μM、または約5μMのイパタセルチブを含む培地で培養される。

【0976】

b. フルオロフォア

いくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗CD39及び抗CD69抗体及びフルオロフォアに連結された抗CD3抗体を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗CD39及び抗CD69抗体(例えば、PE、live/deadバイオレット)及び抗CD3-FITCを含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、第1のフルオロフォアにコンジュゲートされた抗CD39及び第2のフルオロフォアにコンジュゲートされた抗CD69抗体、第3のフルオロフォアにコンジュゲートされた抗CD3抗体、及びlive/dead青色染色(ThermoFisher, MA、カタログ番号L23105から市販されているものなど)を含むカクテルで染色され、第1、第2、及び第3の抗体は異なり、個別の検出が可能である。いくつかの実施形態では、抗CD39及び抗CD69抗体とのインキュベーション後、(i)CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}、(ii)CD39／CD69二重ノックアウト、または(iii)(i)及び(ii)細胞の組み合わせは、本明細書、例えば、図8E及び／または図8F及び／または図8GのステップBに記載される第1の拡張による拡張のために選択される。

【0977】

いくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗CD39及び抗CD69抗体及びフルオロフォアに連結された抗CD3抗体を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、フルオロフォアに連結された抗CD39及び抗CD69抗体(例えば、PE、live/deadバイオレット)及び抗CD3-PE-Cy7を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗CD39-FITC及び抗CD69-PE、抗CD3-PE-Cy7、及びlive/dead青色染色(ThermoFisher, MA、カタログ番号L23105)を含むカクテルで染色される。いくつかの実施形態では、抗CD39及び抗CD69抗体とのインキュベーション後、(i)CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}、(ii)CD39／CD69二重ノックアウト、または(iii)(i)及び(ii)細胞の組み合わせは、本明細書、例えば、図8E及び／または図8F及び／または図8GのプロセスCD39／CD69 GEN3のステップ

Bに記載されるプライミングによる第1の拡張による拡張のために選択される。

【0978】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアとしては、PE（フィコエリトリン）、APC（アロフィコシアニン）、PerCP（ペリジニクロロフィルタンパク質）、DyLight 405、Alexa Fluor 405、Pacific Blue、Alexa Fluor 488、FITC（フルオレセインイソチオシアネート）、DyLight 550、Alexa Fluor 647、DyLight 650、及びAlexa Fluor 700が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、PE-Alexa Fluor（登録商標）647、PE-Cy5、PerCP-Cy5.5、PE-Cy5.5、PE-Alexa Fluor（登録商標）750、PE-Cy7、及びAPC-Cy7が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、フルオレセイン色素が含まれるが、これに限定されない。フルオレセイン色素の例には、5-カルボキシフルオレセイン、フルオレセイン-5-イソチオシアネート及び6-カルボキシフルオレセイン、5,6-ジカルボキシフルオレセイン、5-（及び6）-スルホフルオレセイン、スルホンフルオレセイン、スクシニルフルオレセイン、5-（及び6）-カルボキシSNARF-1、カルボキシフルオレセインスルホネート、カルボキシフルオレセイン双性イオン、カルボキシフルオレセイン四級アンモニウム、カルボキシフルオレセインホスホネート、カルボキシフルオレセインGABA、5'（6'）-カルボキシフルオレセイン、カルボキシフルオレセイン-cys-Cy5、ならびにフルオレセイングルタチオンが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、蛍光部分は、ローダミン色素である。ローダミン色素の例には、テトラメチルローダミン-6-イソチオシアネート、5-カルボキシテトラメチルローダミン、5-カルボキシロードール誘導体、カルボキシロードミン110、テトラメチル及びテトラエチルローダミン、ジフェニルジメチル及びジフェニルジエチルローダミン、ジナフチルローダミン、ローダミン101スルホニルクロリド（TEXAS RED（登録商標）の商品名で販売される）が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、蛍光部分は、シアニン色素である。シアニン色素の例には、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、及びCy7が含まれるが、これらに限定されない。

【0979】

4. 末梢血から末梢血リンパ球（PBL）を拡張する方法

PBL方法1。本発明のいくつかの実施形態では、PBLは、本明細書に記載のプロセスを使用して拡張される。本発明のいくつかの実施形態では、方法は、全血からPBMC試料を取得することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、非CD19+画分の負の選択を使用して、PBMCから純粋なT細胞を単離することによってT細胞を濃縮することを含む。いくつかの実施形態では、方法は、非CD19+画分の磁気ビーズベースの負の選択を使用して、PBMCから純粋なT細胞を単離することによってT細胞を濃縮することを含む。

【0980】

本発明のいくつかの実施形態では、PBL法1は、以下のように行われる：0日目に、凍結保存されたPBMC試料を解凍し、PBMCを計数する。T細胞を、ヒトPan T細胞単離キット及びLSカラム（Miltenyi Biotec）を使用して単離する。

【0981】

PBL方法2。本発明のいくつかの実施形態では、PBLは、全血からPBMC試料を得ることを含むPBL法2を使用して拡張される。PBMC由来のT細胞は、PBMCを37℃で少なくとも3時間インキュベートし、その後、非接着細胞を単離することによって濃縮される。

【0982】

本発明のいくつかの実施形態では、PBL法2は、以下のように行われる：0日目に、凍結保存されたPBMC試料を解凍し、PBMC細胞を、CM-2培地中の6ウェルプレ

ートに600万細胞／ウェルで播種し、37℃で3時間インキュベートする。3時間後、PBLである非接着細胞を取り出し、計数する。

【0983】

PBL方法3。本発明のいくつかの実施形態では、PBLは、末梢血からPBMC試料を得ることを含むPBL法3を使用して拡張される。B細胞は、CD19+選択を使用して単離され、T細胞は、PBMC試料の非CD19+画分の負の選択を使用して選択される。

【0984】

本発明のいくつかの実施形態では、PBL法3は、以下のように行われる：0日目に、末梢血から取得された凍結保存されたPBMCを解凍し、計数する。CD19+B細胞を、CD19 Multisortキット、ヒト(Miltenyi Biotec)を使用して選別する。非CD19+細胞画分のうち、T細胞を、ヒトPan T細胞単離キット及びLSカラム(Miltenyi Biotec)を使用して精製する。

【0985】

いくつかの実施形態では、PBMCは、全血試料から単離される。いくつかの実施形態では、PBMC試料は、PBLを拡張するための出発材料として使用される。いくつかの実施形態では、試料は、拡張プロセス前に凍結保存される。他の実施形態では、新鮮な試料が、PBLを拡張するための出発材料として使用される。本発明のいくつかの実施形態では、T細胞は、当該技術分野で知られている方法を使用してPBMCから単離される。いくつかの実施形態では、T細胞は、ヒトT汎細胞単離キット及びLSカラムを使用して単離される。本発明のいくつかの実施形態では、T細胞は、当該技術分野で知られている抗体選択方法、例えば、CD19の負の選択を使用して、PBMCから単離される。

【0986】

本発明のいくつかの実施形態では、PBMC試料は、非接着細胞を特定するのに有効な所望の温度である期間インキュベートされる。本発明のいくつかの実施形態では、インキュベーション時間は、約3時間である。本発明のいくつかの実施形態では、温度は、約37℃である。その後、非接着細胞は、上記のプロセスを使用して拡張される。

【0987】

いくつかの実施形態では、PBMC試料は、キナーゼ阻害剤またはITK阻害剤を含むレジメンで任意選択で前治療された対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、キナーゼ阻害剤またはITK阻害剤を含むレジメンで前治療された対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、PBMC試料は、キナーゼ阻害剤またはITK阻害剤を含むレジメンで前治療されており、少なくとも1ヶ月間、少なくとも2ヶ月間、少なくとも3ヶ月間、少なくとも4ヶ月間、少なくとも5ヶ月間、少なくとも6ヶ月間、または1年間、またはそれ以上治療を受けた対象または患者由来のものである。他の実施形態では、PBMCは、イブルチニブなどのITK阻害剤レジメンを現在受けている患者に由来する。

【0988】

いくつかの実施形態では、PBMC試料は、キナーゼ阻害剤またはITK阻害剤を含むレジメンで前治療されており、キナーゼ阻害剤またはイブルチニブなどのITK阻害剤での治療に不応性である対象または患者由来のものである。

【0989】

いくつかの実施形態では、PBMC試料は、キナーゼ阻害剤またはITK阻害剤を含むレジメンで前治療されたが、もはやキナーゼ阻害剤またはITK阻害剤での治療を受けていない対象または患者由来のものである。いくつかの実施形態では、PBMC試料は、キナーゼ阻害剤またはITK阻害剤を含むレジメンで前治療されたが、もはやキナーゼ阻害剤またはITK阻害剤での治療を受けておらず、少なくとも1ヶ月間、少なくとも2ヶ月間、少なくとも3ヶ月間、少なくとも4ヶ月間、少なくとも5ヶ月間、少なくとも6ヶ月間、または少なくとも1年間、またはそれ以上治療を受けていない対象または患者由来のものである。他の実施形態では、PBMCは、ITK阻害剤に以前に曝露されたが、少な

くとも3ヶ月、少なくとも6ヶ月、少なくとも9ヶ月、または少なくとも1年以内に治療されていない患者に由来する。

【0990】

本発明のいくつかの実施形態では、0日目に、細胞がCD19+について選択され、それに応じて選別される。本発明のいくつかの実施形態では、選択は、抗体結合ビーズを使用して行われる。本発明のいくつかの実施形態では、純粋なT細胞が、0日目にPBMCから単離される。

【0991】

本発明のいくつかの実施形態では、イブルチニブまたは他のITK阻害剤で前治療されていない患者の場合、10~15mLのバフィーコートは、約 5×10^9 のPBMCを産生し、これは、次いで、約 5.5×10^7 のPBLを産生する。

10

【0992】

本発明のいくつかの実施形態では、イブルチニブまたは他のITK阻害剤で前治療された患者の場合、拡張プロセスは、約 20×10^9 のPBLを産生する。本発明のいくつかの実施形態では、 40.3×10^6 のPBMCは、約 4.7×10^5 のPBLを産生する。

【0993】

前述の実施形態のうちのいずれにおいても、PBMCは、全血試料から、アフエレーションによって、バフィーコートから、またはPBMCを得るための当該技術分野で知られている任意の他の方法から得られ得る。

20

【0994】

いくつかの実施形態では、PBLは、米国特許出願公開第US2020/0347350 A1号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して調製される。

【0995】

5. 骨髄由来のPBMCから骨髄浸潤リンパ球(MIL)を拡張する方法

MIL方法3。本発明のいくつかの実施形態では、方法は、骨髄からPBMCを取得することを含む。0日目に、PBMCがCD3+/CD33+/CD20+/CD14+について選択され、選別され、非CD3+/CD33+/CD20+/CD14+細胞画分が超音波処理され、超音波処理された細胞画分の一部が選択された細胞画分に戻し追加される。

30

【0996】

本発明のいくつかの実施形態では、MIL法3は、以下のように行われる：0日目に、凍結保存されたPBMC試料を解凍し、PBMCを計数する。細胞を、CD3、CD33、CD20、及びCD14抗体で染色し、選別されたS3e細胞(Bio-Rad)を使用して選別する。細胞を、免疫細胞画分（またはMIL画分）（CD3+CD33+CD20+CD14+）及びAML芽球画分（非CD3+CD33+CD20+CD14+）の2つの画分に選別する。

【0997】

本発明のいくつかの実施形態では、PBMCは、骨髄から取得される。いくつかの実施形態では、PBMCは、アフエレーション、吸引、針生検、または当該技術分野で知られている他の同様の手段により骨髄から取得される。いくつかの実施形態では、PBMCは、新鮮である。他の実施形態では、PBMCは、凍結保存される。

40

【0998】

本発明のいくつかの実施形態では、MILは、10~50mLの骨髄穿刺液から拡張される。本発明のいくつかの実施形態では、10mLの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、20mLの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、30mLの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、40mLの骨髄穿刺液が患者から取得される。他の実施形態では、50mLの骨髄穿刺液が患者から取得される。

【0999】

50

本発明のいくつかの実施形態では、約 $10 \sim 50 \text{ mL}$ の骨髓穿刺液から産生された P B M C の数は、約 $5 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$ P B M C である。他の実施形態では、産生された P B M C の数は、約 7×10^7 P B M C である。

【1000】

本発明のいくつかの実施形態では、約 $5 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$ P B M C が、約 $0.5 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ M I L を産生する。本発明のいくつかの実施形態では、約 1×10^6 M I L が産生される。

【1001】

本発明のいくつかの実施形態では、骨髓穿刺液から誘導された 12×10^6 P B M C は、およそ 1.4×10^5 M I L を産生する。

【1002】

前述の実施形態のうちのいずれにおいても、P B M C は、全血試料から、骨髓から、アフレーシスによって、パフィーコートから、または P B M C を得るための当該技術分野で知られている任意の他の方法から得られ得る。

【1003】

いくつかの実施形態では、M I L は、米国特許出願公開第 U S 2020 / 0347350 A 1 号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載される方法を使用して調製される。

【1004】

B. ステップ B：プライミングによる第 1 の拡張

いくつかの実施形態では、本方法は、より古い T I L（すなわち、対象／患者への投与前により多くの複製ラウンドをさらに受けた T I L）よりも追加の治療的利益を提供し得る、より若い T I L を提供する。若い T I L の特徴は、文献、例えば、Donia, et al., Scand. J. Immunol. 2012, 75, 157-167、Dudley, et al., Clin. Cancer Res. 2010, 16, 6122-6131、Huang, et al., J. Immunother. 2005, 28, 258-267、Besser, et al., Clin. Cancer Res. 2013, 19, OF1-OF9、Besser, et al., J. Immunother. 2009, 32, 415-423、Robbins, et al., J. Immunol. 2004, 173, 7125-7130、Shen, et al., J. Immunother., 2007, 30, 123-129、Zhou, et al., J. Immunother. 2005, 28, 53-62、及び Tran, et al., J. Immunother., 2008, 31, 742-751 に記載されており、それらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1005】

例えば、図 8（特に、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C）のステップ A に記載されるものなどの腫瘍断片及び／または腫瘍断片の解剖または消化後に、結果として得られた細胞は、腫瘍及び他の細胞よりも T I L の成長を好む条件下で、I L - 2、O K T - 3、及びフィーダー細胞（例えば、抗原提示フィーダー細胞）を含む血清中で培養される。いくつかの実施形態では、I L - 2、O K T - 3、及びフィーダー細胞は、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片とともに培養開始時に（例えば、0 日目に）追加される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片は、1 容器当たり最大 60 個の断片及び $6000 \text{ IU} / \text{mL}$ の I L - 2 を含む容器内でインキュベートされる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に $1 \sim 8$ 日間培養され、その結果、バルク T I L 集団、一般に約 1×10^8 のバルク T I L 細胞を生じる。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に $1 \sim 7$ 日間培養され、その結果、バルク T I L 集団、一般に約 1×10^8 のバルク T I L 細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張は、 $1 \sim 8$ 日間起こり、その結果、バルク T I L 集団、一般に約 1×10^8 のバルク T I L 細胞を生じる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張は、 $1 \sim 7$ 日間起こり、その結果、バルク T I L 集団、一般に約

10

20

30

40

50

1×10^8 のバルク TIL 細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第 1 の拡張は、5 ～ 8 日間起こり、その結果、バルク TIL 集団、一般に約 1×10^8 のバルク TIL 細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第 1 の拡張は、5 ～ 7 日間起こり、その結果、バルク TIL 集団、一般に約 1×10^8 のバルク TIL 細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第 1 の拡張は、約 6 ～ 8 日間起こり、その結果、バルク TIL 集団、一般に、約 1×10^8 のバルク TIL 細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第 1 の拡張は、約 6 ～ 7 日間起こり、その結果、バルク TIL 集団、一般に、約 1×10^8 のバルク TIL 細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第 1 の拡張は、約 7 ～ 8 日間起こり、その結果、バルク TIL 集団、一般に、約 1×10^8 のバルク TIL 細胞を生じる。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第 1 の拡張は、約 7 日間起こり、その結果、バルク TIL 集団、一般に約 1×10^8 のバルク TIL 細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、このプライミングによる第 1 の拡張は、約 8 日間起こり、その結果、バルク TIL 集団、一般に約 1×10^8 のバルク TIL 細胞をもたらす。

10

20

30

40

50

【1006】

いくつかの実施形態では、TIL の拡張は、以下及び本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張ステップ（例えば、REP 前またはプライミング REP と称されるプロセスを含み得、0 日目及び／または培養開始からのフィーダー細胞を含有する、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G）のステップ B に記載されるものなど）、続いて以下のステップ D 及び本明細書に記載される急速な第 2 の拡張（ステップ D、急速拡張プロトコル（REP）ステップと称されるプロセスを含む）、続いて任意選択の凍結保存、続いて以下及び本明細書に記載される第 2 のステップ D（再刺激 REP ステップと称されるプロセスを含む）を使用して行うことができる。このプロセスから取得された TIL は、本明細書に記載の表現型特徴及び代謝パラメータについて任意で特徴付けられ得る。いくつかの実施形態では、腫瘍断片は、約 $1 \text{ mm}^3 \sim 10 \text{ mm}^3$ である。

【1007】

いくつかの実施形態では、第 1 の拡張培養培地は、培養培地の略語である「CM」と称される。いくつかの実施形態では、ステップ B の CM は、10 % ヒト AB 血清、25 mM Hepes、及び 10 mg/mL ゲンタマイシンを補充した、GlutaMAX を含む RPMI 1640 からなる。

【1008】

いくつかの実施形態では、240 個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、4 つ以下の容器に入れられた 240 個以下の腫瘍断片が存在する。いくつかの実施形態では、容器は、Grex 100 MCS フラスコである。いくつかの実施形態では、60 個以下の腫瘍断片が 1 つの容器に入れられる。いくつかの実施形態では、各容器は、1 容器当たり 500 mL 以下の培地を含む。いくつかの実施形態では、培地は、IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、培地は、6000 IU/mL の IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、培地は、抗原提示フィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、OKT-3 を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 30 ng/mL の OKT-3 を含む。いくつかの実施形態では、容器は、Grex 100 MCS フラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、6000 IU/mL の IL-2、30 ng の OKT-3、及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 6000 IU/mL の IL-2、30 ng/mL の OKT-3、及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【1009】

腫瘍断片の調製後、結果として得られた細胞（すなわち、一次細胞集団である断片）は、腫瘍及び他の細胞よりも TIL の成長を好み、かつ 0 日目の培養開始から TIL プライ

ミング及び加速された成長を可能にする条件下で、IL-2、抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む培地中で培養される。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物及び／または腫瘍断片は、6000 IU/mLのIL-2、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びOKT-3とインキュベートされる。この一次細胞集団は、数日間、一般に1～8日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張中の成長培地は、IL-2またはそのバリエーション、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、この一次細胞集団は、数日間、一般に1～7日間培養され、その結果、バルクTIL集団、一般に約 1×10^8 のバルクTIL細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張中の成長培地は、IL-2またはそのバリエーション、ならびに抗原提示フィーダー細胞及びOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、IL-2は、組換えヒトIL-2 (rhIL-2) である。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1 mgバイアルにつき $20 \sim 30 \times 10^6$ IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1 mgバイアルにつき 20×10^6 IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1 mgバイアルにつき 25×10^6 IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、1 mgバイアルにつき 30×10^6 IU/mgの比活性を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、 $4 \sim 8 \times 10^6$ IU/mgのIL-2の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、 $5 \sim 7 \times 10^6$ IU/mgのIL-2の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、 6×10^6 IU/mgのIL-2の最終濃度を有する。いくつかの実施形態では、IL-2ストック溶液は、実施例Cに記載されるように調製される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約10,000 IU/mLのIL-2、約9,000 IU/mLのIL-2、約8,000 IU/mLのIL-2、約7,000 IU/mLのIL-2、約6000 IU/mLのIL-2、または約5,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約9,000 IU/mLのIL-2～約5,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約8,000 IU/mLのIL-2～約6,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約7,000 IU/mLのIL-2～約6,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約6,000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、約3000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、IL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、約3000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL、または約8000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、1000～2000 IU/mL、2000～3000 IU/mL、3000～4000 IU/mL、4000～5000 IU/mL、5000～6000 IU/mL、6000～7000 IU/mL、7000～8000 IU/mL、または約8000 IU/mLのIL-2を含む。

【1010】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約500 IU/mLのIL-15、約400 IU/mLのIL-15、約300 IU/mLのIL-15、約200 IU/mLのIL-15、約180 IU/mLのIL-15、約160 IU/mLのIL-15、

mLのIL-15、約140IU/mLのIL-15、約120IU/mLのIL-15、または約100IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約500IU/mLのIL-15～約100IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約400IU/mLのIL-15～約100IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約300IU/mLのIL-15～約100IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約200IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、約180IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、IL-15をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、約180IU/mLのIL-15を含む。

10

【1011】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約20IU/mLのIL-21、約15IU/mLのIL-21、約12IU/mLのIL-21、約10IU/mLのIL-21、約5IU/mLのIL-21、約4IU/mLのIL-21、約3IU/mLのIL-21、約2IU/mLのIL-21、約1IU/mLのIL-21、または約0.5IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約20IU/mLのIL-21～約0.5IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約15IU/mLのIL-21～約0.5IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約12IU/mLのIL-21～約0.5IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約10IU/mLのIL-21～約0.5IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約5IU/mLのIL-21～約1IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、約2IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、約1IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、約0.5IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-21をさらに含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、約1IU/mLのIL-21を含む。

20

30

【1012】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、OKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、約30ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、約0.1ng/mL、約0.5ng/mL、約1ng/mL、約2.5ng/mL、約5ng/mL、約7.5ng/mL、約10ng/mL、約15ng/mL、約20ng/mL、約25ng/mL、約30ng/mL、約35ng/mL、約40ng/mL、約50ng/mL、約60ng/mL、約70ng/mL、約80ng/mL、約90ng/mL、約100ng/mL、約200ng/mL、約500ng/mL、及び約1μg/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、0.1ng/mL～1ng/mL、1ng/mL～5ng/mL、5ng/mL～10ng/mL、10ng/mL～20ng/mLの間、20ng/mL～30ng/mL、30ng/mL～40ng/mL、40ng/mL～50ng/mL、及び50ng/mL～100ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、15ng/mL～30ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、30ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、OKT-3抗体は、ムロモナブである。例えば、表1を参照されたい。

40

【1013】

50

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、細胞培養培地中に1つ以上のTNFRSFアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、4-1BBアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは4-1BBアゴニストであり、4-1BBアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、EU-101、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリエーション、バイオシミュラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ の細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、 $20 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 40 \mu\text{g}/\text{mL}$ の細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

10

【1014】

いくつかの実施形態では、1つ以上のTNFRSFアゴニストに加えて、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、IL-2を約 $3000 \text{ IU}/\text{mL}$ の初期濃度で、及びOKT-3を約 $30 \text{ ng}/\text{mL}$ の初期濃度でさらに含み、1つ以上のTNFRSFアゴニストが、4-1BBアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のTNFRSFアゴニストに加えて、プライミングによる第1の拡張細胞培養培地は、IL-2を約 $6000 \text{ IU}/\text{mL}$ の初期濃度で、及びOKT-3を約 $30 \text{ ng}/\text{mL}$ の初期濃度でさらに含み、1つ以上のTNFRSFアゴニストが、4-1BBアゴニストを含む。

【1015】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培養培地は、培養培地の略語である「CM」と称される。いくつかの実施形態では、それは、CM1（培養培地1）と称される。いくつかの実施形態では、CMは、10%ヒトAB血清、25mM HEPES、及び $10 \text{ mg}/\text{mL}$ ゲンタマイシンを補充した、GLUTAMAXを含むRPMI 1640からなる。いくつかの実施形態では、CMは、実施例に記載されるCM1である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張は、初期細胞培養培地または第1の細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張培地または初期細胞培養培地または第1の細胞培養培地は、IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞（本明細書ではフィーダー細胞とも称される）を含む。

20

【1016】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

30

【1017】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、CTS（商標）OpTmizer（商標）T-cell Expansion Basal Medium、CTS（商標）OpTmizer（商標）T-Cell Expansion SFM、CTS（商標）AIM-V Medium、CTS（商標）AIM-V SFM、LymphoONE（商標）T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最小必須培地（MEM）、イーグル基礎培地（BME）、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地（ α MEM）、グラスゴー最小必須培地（G-MEM）、RPMI成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

40

【1018】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、CTS（商標）OpTmizer T-Cell Expansion Serum Supplement、CTS（商標）Immune Cell Serum Replacement、1つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン

50

、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の抗生物質、及び1つ以上の微量元素のうちの1つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ge^{4+} 、 Se^{4+} 、 Br 、 T 、 Mn^{2+} 、 P 、 Si^{4+} 、 V^{5+} 、 Mo^{6+} 、 Ni^{2+} 、 Rb^+ 、 Sn^{2+} 、及び Zr^{4+} を含有する化合物からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または2-メルカプトエタノールをさらに含む。

10

【1019】

いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Immune Cell Serum Replacement は、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion Basal Medium、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM、CTS (商標) AIM-V Medium、CST (商標) AIM-V SFM、LymphoONE (商標) T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、最小必須培地 (MEM)、イーグル基礎培地 (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地 (α MEM)、グラスゴー最小必須培地 (G-MEM)、RPMI 成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

20

【1020】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度 (vol%) は、総無血清または合成培地の約1体積%、2体積%、3体積%、4体積%、5体積%、6体積%、7体積%、8体積%、9体積%、10体積%、11体積%、12体積%、13体積%、14体積%、15体積%、16体積%、17体積%、18体積%、19体積%、または20体積%である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約3%である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約5%である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約10%である。

30

【1021】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific) である。CTS (商標) Optmizer (商標) のいずれの製剤も、本発明において有用である。CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、1LのCTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion Basal Mediumと、26mLのCTS (商標) Optmizer (商標) T-Cell Expansion Supplementとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充されている。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、55mMの2-メルカプトエタノールとともに、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充されている。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Repla

40

50

cement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充されており、培地中の 2-メルカプトエタノールの最終濃度は、 $55\text{ }\mu\text{M}$ である。

【1022】

いくつかの実施形態では、合成培地は、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific) である。CTS (商標) Optmizer (商標) のいずれの製剤も、本発明において有用である。CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM は、1 L の CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion Basal Medium と、26 mL の CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion Supplement との組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、 55 mM の 2-メルカプトエタノールとともに、約 3% の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充されている。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3% の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、 55 mM の 2-メルカプトエタノール、及び 2 mM の L-グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3% の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、 55 mM の 2-メルカプトエタノール、及び 2 mM の L-グルタミンが補充されており、約 1000 IU/mL ~ 約 8000 IU/mL の IL-2 をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3% の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、 55 mM の 2-メルカプトエタノール、及び 2 mM の L-グルタミンが補充されており、約 3000 IU/mL の IL-2 をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3% の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、 55 mM の 2-メルカプトエタノール、及び 2 mM の L-グルタミンが補充されており、約 6000 IU/mL の IL-2 をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3% の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 及び 55 mM の 2-メルカプトエタノールが補充されており、約 1000 IU/mL ~ 約 8000 IU/mL の IL-2 をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3% の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 及び 55 mM の 2-メルカプトエタノールが補充されており、約 3000 IU/mL の IL-2 をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3% の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 及び 55 mM の 2-メルカプトエタノールが補充されており、約 1000 IU/mL ~ 約 6000 IU/mL の IL-2 をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3% の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 及び約 2 mM のグルタミンが補充されており、約 1000 IU/

10

20

30

40

50

mL～約8000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）及び約2mMのグルタミンが補充されており、約3000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）及び約2mMのグルタミンが補充されており、約6000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS（商標）Immune Cell Serum Replacement（SR）（ThermoFisher Scientific）が補充されており、培地中の2-メルカプトエタノールの最終濃度は、55μMである。

10

【1023】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約0.1mM～約10mM、0.5mM～約9mM、1mM～約8mM、2mM～約7mM、3mM～約6mM、または4mM～約5mMの濃度でグルタミン（すなわち、GlutaMAX（登録商標））が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約2mMの濃度でグルタミン（すなわち、GlutaMAX（登録商標））が補充されている。

【1024】

20

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約5mM～約150mM、10mM～約140mM、15mM～約130mM、20mM～約120mM、25mM～約110mM、30mM～約100mM、35mM～約95mM、40mM～約90mM、45mM～約85mM、50mM～約80mM、55mM～約75mM、60mM～約70mM、または約65mMの濃度で2-メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約55mMの濃度で2-メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、培地中の2-メルカプトエタノールの最終濃度は、55μMである。

【1025】

いくつかの実施形態では、参照により本明細書に組み込まれる国際PCT公開第WO／1998／030679号に記載されている合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、1つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の微量元素、及び1つ以上の抗生物質からなる群から選択される1つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／またはベーターメルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、及び1つ以上の微量元素からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分Ag⁺、Al³⁺、Ba²⁺、Cd²⁺、Co²⁺、Cr³⁺、Ge⁴⁺、Se⁴⁺、Br、T、Mn²⁺、P、Si⁴

30

40

50

+、 V^{5+} 、 Mo^{6+} 、 Ni^{2+} 、 Rb^{+} 、 Sn^{2+} 、及び Zr^{4+} を含有する化合物からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最小必須培地（MEM）、イーグル基礎培地（BME）、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地（ α MEM）、グラスゴー最小必須培地（G-MEM）、RPMI 成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

【1026】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約5～200mg/Lの範囲であり、L-ヒスチジンの濃度は、約5～250mg/Lであり、L-イソロイシンの濃度は、約5～300mg/Lであり、L-メチオニンの濃度は、約5～200mg/Lであり、L-フェニルアラニンの濃度は、約5～400mg/Lであり、L-プロリンの濃度は、約1～1000mg/Lであり、L-ヒドロキシプロリンの濃度は、約1～45mg/Lであり、L-セリンの濃度は、約1～250mg/Lであり、L-スレオニンの濃度は、約10～500mg/Lであり、L-トリプトファンの濃度は、約2～110mg/Lであり、L-チロシンの濃度は、約3～175mg/Lであり、L-バリンの濃度は、約5～500mg/Lであり、チアミンの濃度は、約1～20mg/Lであり、還元型グルタチオンの濃度は、約1～20mg/Lであり、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩の濃度は、約1～200mg/Lであり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約1～50mg/Lであり、インスリンの濃度は、約1～100mg/Lであり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約0.000001～0.0001mg/Lであり、アルブミン（例えば、AlbuMAX（登録商標）I）の濃度は、約5000～50,000mg/Lである。

【1027】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表4の「1×培地中の濃度範囲」という見出しの下にリストされた濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表4の「1×培地の好ましい実施形態」という見出しの下にリストされた最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表4の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下にリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

【1028】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約260～350mOsmolである。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約280～310mOsmolである。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約3.7g/L、または約2.2g/Lの重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、L-グルタミン（最終濃度約2mM）、1つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸（NEAA、最終濃度約100 μ M）、2-メルカプトエタノール（最終濃度約100 μ M）がさらに補充されていてもよい。

【1029】

いくつかの実施形態では、Smith, et al., Clin Transl. Immunology, 4(1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31)に記載の定義された培地が、本発明において有用である。簡潔には、RPMIまたはCTS（商標）Optmizer（商標）を基礎細胞培地として使用し、0、2%、5%、または10%のいずれかのCTS（商標）Immune Cell Serum Replacementを補充した。

【1030】

いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーターメルカプトエタノール（BMEまたは β ME、2-メルカプトエタノールとしても知られる、CAS 60-24-2）を欠いている。

10

20

30

40

50

施形態では、プライミングによる第1の拡張（例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）のステップBに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、REP前またはプライミングREPと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、3～7日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張（例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）のステップBに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、REP前またはプライミングREPと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、4～7日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張（例えば、図8（特に、例えば図8B及び／または図8C）のステップBに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、REP前またはプライミングREPと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、5～7日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張（例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）のステップBに記載されるものなどのプロセスを含み、これは、REP前またはプライミングREPと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、6～7日間である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張（例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）のステップBに提供されるものなどのプロセスを含み、これは、REP前またはプライミングREPと称されることもあるものを含み得る）プロセスは、実施例及び図において考察されるように、7日間である。

10

20

【 1 0 3 2 】

[illegible]

30

40

50

日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1のTIL拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから6日～7日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1のTIL拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから7日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1のTIL拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1のTIL拡張は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから7日間続行することができる。

10

【1033】

いくつかの実施形態では、TILのプライミングによる第1の拡張は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、または8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、1日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、1日～7日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、2日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、2日～7日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、3日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、3日～7日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、4日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、4日～7日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、5日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、5日～7日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、6日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、6日～7日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、7日～8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、7日間続行することができる。

20

【1034】

いくつかの実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15、及び／またはIL-21の組み合わせは、プライミングによる第1の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15、及び／またはIL-21、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）による、ならびに本明細書に記載されるステップBプロセス中を含む、プライミングによる第1の拡張中に含まれ得る。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-15、及びIL-21の組み合わせは、プライミングによる第1の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-15、及びIL-21、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）による、及び本明細書に記載されるステップBプロセス中に含まれ得る。

30

40

【1035】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）によるステップBは、閉鎖系バイオリアクターにおいて行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がTIL拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、G-R E X-10またはG-R E X-100である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、G-R E X

50

ー 1 0 0 である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、G - R E X - 1 0 である。

【 1 0 3 6 】

1. フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張手順（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G）からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む）は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろプライミングによる第 1 の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張手順（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G）からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む）は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ 4 ～ 8 日目の間の任意の時点でプライミングによる第 1 の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張手順（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G）からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む）は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ 5 ～ 8 日目の間の任意の時点でプライミングによる第 1 の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張手順（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G）からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む）は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ 6 ～ 8 日目の間の任意の時点でプライミングによる第 1 の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張手順（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G）からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む）は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）を必要とせず、むしろ 6 ～ 7 日目の間の任意の時点でプライミングによる第 1 の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張手順（例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／また

10

20

30

40

50

は図 8 F 及び／または図 8 G) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む)) は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とせず、むしろ 7 または 8 日目の間の任意の時点でプライミングによる第 1 の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張手順 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む)) は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とせず、むしろ 7 日目の間の任意の時点でプライミングによる第 1 の拡張中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるプライミングによる第 1 の拡張手順 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む)) は、T I L 拡張の開始時にフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とせず、むしろ 8 日目の間の任意の時点でプライミングによる第 1 の拡張中に追加される。

10

【1037】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第 1 の拡張手順 (例えば、図 8 (特に、例えば図 8 B) からのステップ B に記載されるもの、ならびに R E P 前またはプライミング R E P と称されるものなどの拡張を含む)) は、T I L 拡張の開始時及びプライミングによる第 1 の拡張中にフィーダー細胞 (本明細書では「抗原提示細胞」とも称される) を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞 (P B M C) である。P B M C は、F i c o l l - P a q u e 勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、 2.5×10^8 のフィーダー細胞が、プライミングによる第 1 の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、容器当たり 2.5×10^8 のフィーダー細胞が、プライミングによる第 1 の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、G R E X - 10 当たり 2.5×10^8 のフィーダー細胞が、プライミングによる第 1 の拡張中に使用される。いくつかの実施形態では、G R E X - 100 当たり 2.5×10^8 のフィーダー細胞が、プライミングによる第 1 の拡張中に使用される。

20

30

【1038】

一般に、同種異系 P B M C は、照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、実施例に記載されるように、R E P 手順で使用され、これは、照射された同種異系 P B M C の複製無能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

【1039】

いくつかの実施形態では、14 日目の総生細胞数が、プライミングによる第 1 の拡張の 0 日目に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、P B M C は、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載の T I L 拡張手順での使用が認められる。

【1040】

いくつかの実施形態では、7 日目の O K T 3 及び I L - 2 の存在下で培養された総生細胞数が、プライミングによる第 1 の拡張の 0 日目に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、P B M C は、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載の T I L 拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、P B M C は、 30 ng/mL の O K T 3 抗体及び 3000 IU/mL の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、 30 ng/mL の O K T 3 抗体及び 6000 IU/mL の I L - 2 の存在下で培養される。

40

【1041】

いくつかの実施形態では、7 日目の O K T 3 及び I L - 2 の存在下で培養された総生細胞数が、プライミングによる第 1 の拡張の 0 日目に培養された初期の生細胞数から増加し

50

なかった場合、P B M C は、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載の T I L 拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、P B M C は、 $5 \sim 60 \text{ ng/mL}$ の O K T 3 抗体及び $1000 \sim 6000 \text{ IU/mL}$ の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、 $10 \sim 50 \text{ ng/mL}$ の O K T 3 抗体及び $2000 \sim 5000 \text{ IU/mL}$ の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、 $20 \sim 40 \text{ ng/mL}$ の O K T 3 抗体及び $2000 \sim 4000 \text{ IU/mL}$ の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、 $25 \sim 35 \text{ ng/mL}$ の O K T 3 抗体及び $2500 \sim 3500 \text{ IU/mL}$ の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、 30 ng/mL の O K T 3 抗体及び 6000 IU/mL の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、 15 ng/mL の O K T 3 抗体及び 3000 IU/mL の I L - 2 の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M C は、 15 ng/mL の O K T 3 抗体及び 6000 IU/mL の I L - 2 の存在下で培養される。

10

20

30

40

50

【1042】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、P B M C である。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第2の拡張における T I L の抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約 $1:25$ 、約 $1:50$ 、約 $1:100$ 、約 $1:125$ 、約 $1:150$ 、約 $1:175$ 、約 $1:200$ 、約 $1:225$ 、約 $1:250$ 、約 $1:275$ 、約 $1:300$ 、約 $1:325$ 、約 $1:350$ 、約 $1:375$ 、約 $1:400$ 、または約 $1:500$ である。いくつかの実施形態では、第2の拡張における T I L の抗原提示フィーダー細胞に対する比は、 $1:50 \sim 1:300$ である。いくつかの実施形態では、第2の拡張における T I L の抗原提示フィーダー細胞に対する比は、 $1:100 \sim 1:200$ である。

【1043】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡張手順は、約 2.5×10^8 フィーダー細胞：約 100×10^6 T I L の比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡張手順は、約 2.5×10^8 フィーダー細胞：約 50×10^6 T I L の比を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡張手順は、約 2.5×10^8 フィーダー細胞：約 25×10^6 T I L を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡張は、約 2.5×10^8 フィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張は、急速な第2の拡張で使用するフィーダー細胞の数の4分の1、3分の1、12分の5、または半分を必要とする。

【1044】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張における培地は、I L - 2 を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張における培地は、 6000 IU/mL の I L - 2 を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張における培地は、容器当たり 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張における培地は、O K T - 3 を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 30 ng の O K T - 3 を含む。いくつかの実施形態では、容器は、G R E X 100 M C S フラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、 6000 IU/mL の I L - 2、 30 ng/mL の O K T - 3、及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 6000 IU/mL の I L - 2、 30 ng/mL の O K T - 3、及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 500 mL の培養培地及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞当たり $15 \mu\text{g}$ の O K T - 3 を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 500 mL の培養培地及び $15 \mu\text{g}$ の O K T - 3 を含む。いくつかの実施形態では、容器は、G R E X 100 M C S フラスコである。いくつかの実施形態では、培地は、 500 mL の培養培地、

6000 IU/mLのIL-2、30 ng/mLのOKT-3、及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり500 mLの培養培地、6000 IU/mLのIL-2、15 µgのOKT-3、及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり500 mLの培養培地及び 2.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞当たり15 µgのOKT-3を含む。

【1045】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡張手順は、第2の拡張中にTILを超える過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞(PBMC)である。PBMCは、Ficoll-Paque勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示(aAPC)細胞がPBMCの代わりに使用される。

10

【1046】

一般に、同種異系PBMCは、照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、図及び実施例に記載される例示的な手順を含む、本明細書に記載のTIL拡張手順で使用される。

【1047】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、PBMCの代替物として、またはPBMCと組み合わせて、プライミングによる第1の拡張において使用される。

20

【1048】

2. サイトカイン及び他の添加物

本明細書に記載の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にIL-2を含む培養培地を使用する。

【1049】

あるいは、TILのプライミングによる第1の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第US 2017/0107490 A1号(その開示は参照により本明細書に組み込まれる)に記載されているように、IL-2、IL-15及びIL-21のうちの2つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、IL-2及びIL-15、IL-2及びIL-21、IL-15及びIL-21、ならびにIL-2、IL-15、及びIL-21が含まれ、後者は多くの実施形態で特に有用である。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにT細胞の生成に特に有利に働く。例えば、表2を参照されたい。

30

【1050】

いくつかの実施形態では、ステップBはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、OKT-3抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含み得る。いくつかの実施形態では、ステップBはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、4-1BBアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップBはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、OX-40アゴニストの、培養培地への添加を含み得る。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体(PPAR)-ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーターI-アルファアゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第US 2019/0307796 A1号(この開示は参照により本明細書に組み込まれる)に記載されるように、ステップB中の培養培地で使用されてもよい。

40

【1051】

いくつかの実施形態では、ステップBはまた、培養培地中のタンパク質キナーゼB(AKT)阻害剤(AKTi)の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、TIL集団は、AKT阻害剤を含む培地中で培養され、CD39^{LO}/CD69^{LO}及び/またはCD39/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得する。いくつかの実施形態では、AKT阻害

50

剤は、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、ホノキオール、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、AKT阻害剤は、イパタセルチブである。いくつかの実施形態では、TIL集団は、約0.1 μ M、約0.2 μ M、約0.3 μ M、約0.4 μ M、約0.5 μ M、約0.6 μ M、約0.7 μ M、約0.8 μ M、約0.9 μ M、約1 μ M、約1.1 μ M、約1.2 μ M、約1.3 μ M、約1.4 μ M、約1.5 μ M、約1.6 μ M、約1.7 μ M、約1.8 μ M、約1.9 μ M、約2 μ M、約2.1 μ M、約2.2 μ M、約2.3 μ M、約2.4 μ M、約2.5 μ M、約2.6 μ M、約2.7 μ M、約2.8 μ M、約2.9 μ M、約3 μ M、約3.5 μ M、約4 μ M、約4.5 μ M、または約5 μ Mのイパタセルチブを含む培地で培養される。

10

【1052】

C. ステップC：プライミングによる第1の拡張から急速な第2の拡張への移行

場合によっては、例えば図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）に示されるようにステップBから取得されるTIL集団を含む、プライミングによる第1の拡張から取得されたバルクTIL母集団（REP前と称されることもある拡張を含み得る）は、急速な第2の拡張（これは、急速拡張プロトコル（REP）と称されることもある拡張を含み得る）に供され、次いで、以下で考察されるように凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾TILが療法に使用される場合、プライミングによる第1の拡張由来の拡張TIL集団または急速な第2の拡張由来の拡張TIL集団は、拡張ステップ前またはプライミングによる第1の拡張後及び急速な第2の拡張前に好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

20

【1053】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から（例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）に示されるステップBから）取得されたTILは、選択のために表現型決定されるまで保管される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から（例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）に示されるステップBから）取得されたTILは保存されず、急速な第2の拡張に直接進む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から取得されたTILは、プライミングによる第1の拡張後及び急速な第2の拡張前に凍結保存されない。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から第2の拡張への移行は、腫瘍の断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから約2日、3日、4日、5日、6日、7日、または8日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から急速な第2の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから約3日～7日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから約3日～8日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから約4日～7日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから約4日～8日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから約5日～7日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こった

30

40

50

とき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから約5日～8日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから約6日～7日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから約6日～8日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから約7日～8日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから約7日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から第2の拡張への移行は、断片化が起こったとき及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから約8日で起こる。

【 1 0 5 4 】

[illegible]

テップが開始されたときから7日で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から急速な第2の拡張への移行は、断片化が起こったとき、及び／またはプライミングによる第1の拡張ステップが開始されたときから8日で起こる。

【1055】

いくつかの実施形態では、TILは、初期第1の拡張後、及び急速な第2の拡張前に保存されず、TILは、急速な第2の拡張に直接進む（例えば、いくつかの実施形態では、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）に示されるようにステップBからステップDへの移行中の保存がない）。いくつかの実施形態では、移行は、本明細書に記載されるように、閉鎖系内で起こる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張由来のTILである第2のTIL集団は、移行期間なしで急速な第2の拡張に直接進む。

10

【1056】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から急速な第2の拡張への移行、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）によるステップCは、閉鎖系バイオリアクター内で行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がTIL拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、単一のバイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、用いられる単一のバイオリアクターは、例えば、GREX-10またはGREX-100である。いくつかの実施形態では、閉鎖系バイオリアクターは、単一のバイオリアクターである。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張から急速な第2の拡張への移行は、容器サイズのスケールアップを伴う。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張は、急速な第2の拡張よりも小さい容器内で行われる。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張は、GREX-100内で行われ、急速な第2の拡張は、GREX-500内で行われる。

20

【1057】

D. ステップD：急速な第2の拡張

いくつかの実施形態では、TIL細胞集団は、採取及びプライミングによる第1の拡張後、ステップA及びステップB、ならびに図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）に示されるように、ステップCと称される移行後に数がさらに拡張される。このさらなる拡張は、本明細書では急速な第2の拡張または急速拡張と称され、これは、当該技術分野で概して急速拡張プロセス（急速拡張プロトコルまたはREP、ならびに図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）のステップDに示されるプロセス）と称される拡張プロセスを含み得る。急速な第2の拡張は、一般に、フィーダー細胞、サイトカイン源、及び抗CD3抗体を含む、いくつかの成分を含む培養培地を使用して、ガス透過性容器内で達成される。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張開始の1日、2日、3日、または4日後（すなわち、Gen3プロセス全体の8、9、10、または11日目）に、TILは、より大容量の容器に移される。

30

40

【1058】

いくつかの実施形態では、TILの急速な第2の拡張（REPと称されることもある拡張、ならびに図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）のステップDに示されるプロセスを含み得る）は、当業者に知られている任意のTILフラスコまたは容器を使用して行うことができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、または10日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約2日～約9日間続行することができる。いくつかの実施形態では

50

、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約1日～約10日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約2日～約9日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約2日～約10日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約3日～約9日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約3日～約10日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約4日～約9日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約4日～約10日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約5日～約9日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約5日～約10日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約6日～約9日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約6日～約10日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約7日～約9日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約7日～約10日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約8日～約9日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約8日～約10日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約9日～約10日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約1日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約2日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約3日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約4日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約5日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約6日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約7日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約8日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約9日間続行することができる。いくつかの実施形態では、第2のTIL拡張は、急速な第2の拡張の開始後、約10日間続行することができる。

10

20

30

40

50

【1059】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張は、本開示の方法（例えば、REPと称される拡張、ならびに図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）のステップDに示されるプロセスを含む）を使用して、ガス透過性容器内で行うことができる。いくつかの実施形態では、TILは、IL-2、OKT-3、及びフィーダー細胞（本明細書では「抗原提示細胞」とも称される）の存在下での急速な第2の拡張において拡張される。いくつかの実施形態では、TILは、IL-2、OKT-3、及びフィーダー細胞の存在下での急速な第2の拡張において拡張され、フィーダー細胞は、プライミングによる第1の拡張において存在するフィーダー細胞の濃度の2倍、2.4倍、2.5倍、3倍、3.5倍、または4倍である最終濃度まで追加される。例えば、TILは、インターロイキン-2（IL-2）またはインターロイキン-15（IL-15）の存在下で非特異的T細胞受容体刺激を使用して、急速に拡張され得る。非特異的T細胞受容体刺激は、例えば、抗CD3抗体、例えば約30ng/mLのOKT3、マウスモノクローナル抗CD3抗体（Ortho-McNeil, Raritan, NJもしくはMiltenyi B

iotech, Auburn, CAから市販)またはUHC T-1 (BioLegend, San Diego, CA, USAから市販)を含み得る。TILは、がんのエピトープ(複数可)などの抗原性部分を含む、第2の拡張中に1つ以上の抗原を含むことによって、インビトロでTILのさらなる刺激を誘導するように拡張することができ、これは、ベクター、例えば、ヒト白血球抗原A2 (HLA-A2)結合ペプチド、例えば、0.3 μ M MART-1:26-35 (27L)またはgp100:209-217 (210M)から、任意選択で300 IU/mLのIL-2またはIL-15などのT細胞成長因子の存在下で任意で発現され得る。他の好適な抗原には、例えば、NY-ESO-1、TRP-1、TRP-2、チロシナーゼがん抗原、MAGE-A3、SSX-2、及びVEGFR2、またはそれらの抗原性部分が含まれ得る。TILは、HLA-A2を発現する抗原提示細胞にパルスされたがんの同じ抗原(複数可)で再刺激することによっても急速に拡張され得る。あるいは、TILは、例えば、例として照射された自己リンパ球または照射されたHLA-A2+同種異系リンパ球及びIL-2でさらに再刺激され得る。いくつかの実施形態では、再刺激は、第2の拡張の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、照射された自己リンパ球の存在下で、または照射されたHLA-A2+同種異系リンパ球及びIL-2を用いて起こる。

10

【1060】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約3000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1000 IU/mL、約1500 IU/mL、約2000 IU/mL、約2500 IU/mL、約3000 IU/mL、約3500 IU/mL、約4000 IU/mL、約4500 IU/mL、約5000 IU/mL、約5500 IU/mL、約6000 IU/mL、約6500 IU/mL、約7000 IU/mL、約7500 IU/mL、または約8000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、1000~2000 IU/mL、2000~3000 IU/mL、3000~4000 IU/mL、4000~5000 IU/mL、5000~6000 IU/mL、6000~7000 IU/mL、7000~8000 IU/mL、または8000 IU/mLのIL-2を含む。

20

【1061】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、OKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約30 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約0.1 ng/mL、約0.5 ng/mL、約1 ng/mL、約2.5 ng/mL、約5 ng/mL、約7.5 ng/mL、約10 ng/mL、約15 ng/mL、約20 ng/mL、約25 ng/mL、約30 ng/mL、約35 ng/mL、約40 ng/mL、約50 ng/mL、約60 ng/mL、約70 ng/mL、約80 ng/mL、約90 ng/mL、約100 ng/mL、約200 ng/mL、約500 ng/mL、及び約1 μ g/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、0.1 ng/mL~1 ng/mL、1 ng/mL~5 ng/mL、5 ng/mL~10 ng/mL、10 ng/mL~20 ng/mLの間、20 ng/mL~30 ng/mL、30 ng/mL~40 ng/mL、40 ng/mL~50 ng/mL、及び50 ng/mL~100 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、15 ng/mL~30 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約30 ng/mL~60 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約30 ng/mLのOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約60 ng/mLのOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、OKT-3抗体は、ムロモナブである。

30

40

【1062】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、IL-2を含む。いくつかの実施形態では、培地は、6000 IU/mLのIL-2を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実

50

施形態では、急速な第2の拡張における培地は、容器当たり 7.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、OKT-3を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張培地中に、容器当たり 500 mL の培養培地及び $30 \mu\text{g}$ の OKT-3 を含む。いくつかの実施形態では、容器は、G-REX-100 MCS フラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張培地中に、 6000 IU/mL の IL-2、 60 ng/mL の OKT-3、及び 7.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり 500 mL の培養培地、 6000 IU/mL の IL-2、 $30 \mu\text{g}$ の OKT-3、及び 7.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【1063】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、IL-2を含む。いくつかの実施形態では、培地は、 6000 IU/mL の IL-2 を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、培地は、容器当たり $5 \times 10^8 \sim 7.5 \times 10^8$ の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、OKT-3を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、容器当たり 500 mL の培養培地及び $30 \mu\text{g}$ の OKT-3 を含む。いくつかの実施形態では、容器は、G-REX-100 MCS フラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、 6000 IU/mL の IL-2、 60 ng/mL の OKT-3、及び $5 \times 10^8 \sim 7.5 \times 10^8$ の抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張における培地は、容器当たり 500 mL の培養培地、ならびに 6000 IU/mL の IL-2、 $30 \mu\text{g}$ の OKT-3、及び $5 \times 10^8 \sim 7.5 \times 10^8$ の抗原提示フィーダー細胞を含む。

【1064】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、細胞培養培地中に1つ以上の TNFRSF アゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSF アゴニストは、4-1BB アゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSF アゴニストは4-1BB アゴニストであり、4-1BB アゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、EU-101、融合タンパク質、ならびにそれらの断片、誘導体、バリエーション、バイオシミラー、及び組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、TNFRSF アゴニストは、 $0.1 \mu\text{g/mL} \sim 100 \mu\text{g/mL}$ の細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。いくつかの実施形態では、TNFRSF アゴニストは、 $20 \mu\text{g/mL} \sim 40 \mu\text{g/mL}$ の細胞培養培地中濃度を達成するのに十分な濃度で追加される。

【1065】

いくつかの実施形態では、1つ以上の TNFRSF アゴニストに加えて、細胞培養培地は、IL-2を約 3000 IU/mL の初期濃度で、及び OKT-3を約 30 ng/mL の初期濃度でさらに含み、1つ以上の TNFRSF アゴニストが、4-1BB アゴニストを含む。

【1066】

いくつかの実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15、及び／または IL-21 の組み合わせは、第2の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-7、IL-15、及び／または IL-21、ならびにそれらの任意の組み合わせは、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）による、ならびに本明細書に記載されるステップDプロセス中を含む、第2の拡張中に含まれる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-15、及び IL-21 の組み合わせは、第2の拡張中に組み合わせとして用いられる。いくつかの実施形態では、IL-2、IL-15、及び IL-21、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gによる、及び本明細書に記載されるステップDプロ

10

20

30

40

50

セス中に含まれ得る。

【1067】

いくつかの実施形態では、第2の拡張は、IL-2、OKT-3、抗原提示フィーダー細胞、及び任意でTNFRSFアゴニストを含む補充された細胞培養培地において実施され得る。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、補充された細胞培養培地中で起こる。いくつかの実施形態では、補充された細胞培養培地は、IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む。いくつかの実施形態では、第2の細胞培養培地は、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC、抗原提示フィーダー細胞とも称される）を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞（すなわち、抗原提示細胞）を含む細胞培養培地中で起こる。

10

【1068】

いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約500 IU/mLのIL-15、約400 IU/mLのIL-15、約300 IU/mLのIL-15、約200 IU/mLのIL-15、約180 IU/mLのIL-15、約160 IU/mLのIL-15、約140 IU/mLのIL-15、約120 IU/mLのIL-15、または約100 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約500 IU/mLのIL-15～約100 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約400 IU/mLのIL-15～約100 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約300 IU/mLのIL-15～約100 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約200 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-15をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-15を含む。

20

【1069】

いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約20 IU/mLのIL-21、約15 IU/mLのIL-21、約12 IU/mLのIL-21、約10 IU/mLのIL-21、約5 IU/mLのIL-21、約4 IU/mLのIL-21、約3 IU/mLのIL-21、約2 IU/mLのIL-21、約1 IU/mLのIL-21、または約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約20 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約15 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約12 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約10 IU/mLのIL-21～約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約5 IU/mLのIL-21～約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、第2の拡張培養培地は、約2 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約0.5 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、IL-21をさらに含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。

30

40

【1070】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞（APC）は、PBMCである。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第2の拡張におけるTILのPBMC及び／または抗原提示細胞に対する比は、約1：10、約1：15、約1：20、約1：25、約1：30、約1：35、約1：40、約1：45、約1：50、約1：75、約1：100、約1：125、約1：150、約1：175、約1：200、約1：225、約1：250、約1：275、約1：300、約1：325、約1：350、約1：375、約1：400、または約1：500である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／

50

または第2の拡張におけるTILのPBMCに対する比は、1:50~1:300である。いくつかの実施形態では、急速拡張及び／または第2の拡張におけるTILのPBMCに対する比は、1:100~1:200である。

【1071】

いくつかの実施形態では、REP及び／または急速な第2の拡張は、バルクTILが150mL培地中で100倍または200倍過剰の不活性化フィーダー細胞、30ng/mLのOKT3、抗CD3抗体、及び6000IU/mLのIL-2と混合されているフラスコ内で行われ、フィーダー細胞濃度は、プライミングによる第1の拡張におけるフィーダー細胞濃度の少なくとも1.1倍(1.1X)、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.8倍、2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、3.1倍、3.2倍、3.3倍、3.4倍、3.5倍、3.6倍、3.7倍、3.8倍、3.9倍、または4.0倍である。培地交換(一般に、使用済み培地の3分の2の吸引及び等量の新鮮な培地との交換による、3分の2培地交換)は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、GREXフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

10

【1072】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張(REPプロセスと称されるプロセスを含み得る)は、実施例及び図で論じられるように、7~9日間である。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、7日間である。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、8日間である。いくつかの実施形態では、第2の拡張は、9日間である。

20

【1073】

いくつかの実施形態では、第2の拡張(REPと称される拡張、ならびに図8(特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G)のステップDで参照される拡張を含み得る)は、100cmのガス透過性シリコン底部(GREX-100, Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USAから市販)を有する500mL容量のガス透過性フラスコ内で行うことができる。5×10⁶または10×10⁶TILは、5%ヒトAB血清、3000IU/mLのIL-2、及び30ng/mLの抗CD3(OKT3)を補充された400mLの50/50培地中でPBMCとともに培養され得る。GREX-100フラスコを、5%CO₂中37℃でインキュベートすることができる。5日目に、250mLの上清が除去され、遠心分離ボトルに入れられ、1500rpm(491×g)で10分間遠心分離される。TILペレットが、5%ヒトAB血清、6000IU/mLのIL-2を含む150mLの新鮮な培地で再懸濁され、元のGREX-100フラスコに戻し追加され得る。TILがGREX-100フラスコで連続して拡張される場合、10日目または11日目に、TILは、GREX-500などのより大きいフラスコに移され得る。培養14日目に、細胞が採取され得る。培養15日目に、細胞が採取され得る。培養16日目に、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、培地交換は、細胞が代替の成長チャンバに移されるまで行われる。いくつかの実施形態では、培地の3分の2は、使用済み培地の吸引及び等体積の新鮮な培地との交換によって交換される。いくつかの実施形態では、代替の成長チャンバには、以下でより完全に考察されるように、GREXフラスコ及びガス透過性容器が含まれる。

30

40

【1074】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される拡張プロセスで使用される培地は、無血清培地または合成培地である。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、血清含有培地のロット間の変動に部分的に起因する実験変動を防止及び／または減少させるために使用される。

【1075】

50

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、基礎細胞培地ならびに血清サプリメント及び／または血清代替物を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地には、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion Basal Medium、CTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion SFM、CTS（商標）AIM-V Medium、CTS（商標）AIM-V SFM、LymphoONE（商標）T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最小必須培地（MEM）、イーグル基礎培地（BME）、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地（ α MEM）、グラスゴー最小必須培地（G-MEM）、RPMI 成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地が含まれるが、これらに限定されない。

10

【1076】

いくつかの実施形態では、血清サプリメントまたは血清代替物には、CTS（商標）Optmizer T-Cell Expansion Serum Supplement、CTS（商標）Immune Cell Serum Replacement、1つ以上のアルブミンまたはアルブミン代用物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代用物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代用物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の抗生物質、及び1つ以上の微量元素のうちの1つ以上が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-ヒドロキシプロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、チアミン、還元型グルタチオン、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ge^{4+} 、 Se^{4+} 、 Br 、 T 、 Mn^{2+} 、 P 、 Si^{4+} 、 V^{5+} 、 Mo^{6+} 、 Ni^{2+} 、 Rb^+ 、 Sn^{2+} 、及び Zr^{4+} を含有する化合物からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び／または2-メルカプトエタノールをさらに含む。

20

【1077】

いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Immune Cell Serum Replacementは、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion Basal Medium、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFM、CTS（商標）AIM-V Medium、CST（商標）AIM-V SFM、LymphoONE（商標）T-Cell Expansion Xeno-Free Medium、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、最小必須培地（MEM）、イーグル基礎培地（BME）、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地（ α MEM）、グラスゴー最小必須培地（G-MEM）、RPMI 成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地を含むが、これらに限定されない、従来の成長培地とともに使用される。

30

【1078】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地中の総血清代替物濃度（vol%）は、総無血清または合成培地の約1体積%、2体積%、3体積%、4体積%、5体積%、6体積%、7体積%、8体積%、9体積%、10体積%、11体積%、12体積%、13体積%、14体積%、15体積%、16体積%、17体積%、18体積%、19体積%、または20体積%である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約3%である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約5%である。いくつかの実施形態では、総血清代替物濃度は、無血清または合成培地の総体積の約10%である。

40

【1079】

いくつかの実施形態では、無血清または合成培地は、CTS（商標）Optmizer（商標）T-cell Expansion SFM（ThermoFisher Sc

50

ientific)である。CTS (商標) OpTmizer (商標)のいずれの製剤も、本発明において有用である。

【1080】

CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMは、1LのCTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion Basal Mediumと、26mLのCTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Supplementとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMには、55mMの2-メルカプトエタノールとともに、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充されている。

10

【1081】

いくつかの実施形態では、合成培地は、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFM (ThermoFisher Scientific) である。CTS (商標) OpTmizer (商標)のいずれの製剤も、本発明において有用である。CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMは、1LのCTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion Basal Mediumと、26mLのCTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Supplementとの組み合わせであり、これらは使用前に一緒に混合される。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMには、55mMの2-メルカプトエタノールとともに、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充されている。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55mMの2-メルカプトエタノール、及び2mMのL-グルタミンが補充されている。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55mMの2-メルカプトエタノール、及び2mMのL-グルタミンが補充されており、約1000IU/mL~約8000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55mMの2-メルカプトエタノール、及び2mMのL-グルタミンが補充されており、約3000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific)、55mMの2-メルカプトエタノール、及び2mMのL-グルタミンが補充されており、約6000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 及び55mMの2-メルカプトエタノールが補充されており、約1000IU/mL~約8000IU/mLのIL-2をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) OpTmizer (商標) T-cell Expansion SFMには、約3%のCTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) が補充されている。

20

30

40

50

er Scientific) 及び 55mM の 2-メルカプトエタノールが補充されており、約 3000 IU/mL の IL-2 をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 及び 55mM の 2-メルカプトエタノールが補充されており、約 1000 IU/mL ~ 約 6000 IU/mL の IL-2 をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 及び約 2mM のグルタミンが補充されており、約 1000 IU/mL ~ 約 8000 IU/mL の IL-2 をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 及び約 2mM のグルタミンが補充されており、約 3000 IU/mL の IL-2 をさらに含む。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T-cell Expansion SFM には、約 3 % の CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement (SR) (ThermoFisher Scientific) 及び約 2mM のグルタミンが補充されており、約 6000 IU/mL の IL-2 をさらに含む。

10

20

【1082】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約 0.1mM ~ 約 10mM、0.5mM ~ 約 9mM、1mM ~ 約 8mM、2mM ~ 約 7mM、3mM ~ 約 6mM、または 4mM ~ 約 5mM の濃度でグルタミン (すなわち、GlutaMAX (登録商標)) が補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約 2mM の濃度でグルタミン (すなわち、GlutaMAX (登録商標)) が補充されている。

【1083】

いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約 5mM ~ 約 150mM、10mM ~ 約 140mM、15mM ~ 約 130mM、20mM ~ 約 120mM、25mM ~ 約 110mM、30mM ~ 約 100mM、35mM ~ 約 95mM、40mM ~ 約 90mM、45mM ~ 約 85mM、50mM ~ 約 80mM、55mM ~ 約 75mM、60mM ~ 約 70mM、または約 65mM の濃度で 2-メルカプトエタノールが補充されている。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地には、約 55mM の濃度で 2-メルカプトエタノールが補充されている。

30

【1084】

いくつかの実施形態では、国際特許出願公開第 WO1998/030679 号及び米国特許出願公開第 US2002/0076747 A1 号 (参照により本明細書に組み込まれる) に記載される合成培地は、本発明において有用である。その刊行物には、無血清真核細胞培養培地が記載されている。無血清真核細胞培養培地には、無血清培養下で細胞の成長を支持することができる無血清サプリメントを補充した基礎細胞培養培地が含まれる。無血清真核細胞培養培地サプリメントは、1つ以上のアルブミンまたはアルブミン代替物、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、1つ以上の微量元素、及び1つ以上の抗生物質からなる群から選択される1つ以上の成分を含むか、またはそれらを組み合わせることによって取得される。いくつかの実施形態では、合成培地は、L-グルタミン、重炭酸ナトリウム、及び/またはベーターメルカプトエタノールをさらに含む。いくつかの実施形態では、合成培地は、アルブミンまたはアルブミン代替物と、1つ以上のアミノ酸、1つ以上のビタミン、1つ以上のトランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、1つ以上の抗酸化剤、1つ以上のインスリンまたはインスリン代替物、1つ以上のコラーゲン前駆体、及び1つ以上の微量元素からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実

40

50

施形態では、合成培地は、アルブミンと、グリシン、 L -ヒスチジン、 L -イソロイシン、 L -メチオニン、 L -フェニルアラニン、 L -プロリン、 L -ヒドロキシプロリン、 L -セリン、 L -スレオニン、 L -トリプトファン、 L -チロシン、 L -バリン、チアミン、還元型グルタチオン、 L -アスコルビン酸-2-リン酸塩、鉄飽和トランスフェリン、インスリン、ならびに微量元素部分 Ag^+ 、 Al^{3+} 、 Ba^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Co^{2+} 、 Cr^{3+} 、 Ge^{4+} 、 Se^{4+} 、 Br 、 T 、 Mn^{2+} 、 P 、 Si^{4+} 、 V^{5+} 、 Mo^{6+} 、 Ni^{2+} 、 Rb^+ 、 Sn^{2+} 、及び Zr^{4+} を含有する化合物からなる群から選択される1つ以上の成分と、を含む。いくつかの実施形態では、基礎細胞培地は、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、最小必須培地 (MEM)、イーグル基礎培地 (BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、最小必須培地 (α MEM)、グラスゴー最小必須培地 (G-MEM)、RPMI 成長培地、及びイスコフ改変ダルベッコ培地からなる群から選択される。

10

【1085】

いくつかの実施形態では、合成培地中のグリシンの濃度は、約 $5 \sim 200 \text{ mg/L}$ の範囲であり、 L -ヒスチジンの濃度は、約 $5 \sim 250 \text{ mg/L}$ であり、 L -イソロイシンの濃度は、約 $5 \sim 300 \text{ mg/L}$ であり、 L -メチオニンの濃度は、約 $5 \sim 200 \text{ mg/L}$ であり、 L -フェニルアラニンの濃度は、約 $5 \sim 400 \text{ mg/L}$ であり、 L -プロリンの濃度は、約 $1 \sim 1000 \text{ mg/L}$ であり、 L -ヒドロキシプロリンの濃度は、約 $1 \sim 45 \text{ mg/L}$ であり、 L -セリンの濃度は、約 $1 \sim 250 \text{ mg/L}$ であり、 L -スレオニンの濃度は、約 $10 \sim 500 \text{ mg/L}$ であり、 L -トリプトファンの濃度は、約 $2 \sim 110 \text{ mg/L}$ であり、 L -チロシンの濃度は、約 $3 \sim 175 \text{ mg/L}$ であり、 L -バリンの濃度は、約 $5 \sim 500 \text{ mg/L}$ であり、チアミンの濃度は、約 $1 \sim 20 \text{ mg/L}$ であり、還元型グルタチオンの濃度は、約 $1 \sim 20 \text{ mg/L}$ であり、 L -アスコルビン酸-2-リン酸塩の濃度は、約 $1 \sim 200 \text{ mg/L}$ であり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約 $1 \sim 50 \text{ mg/L}$ であり、インスリンの濃度は、約 $1 \sim 100 \text{ mg/L}$ であり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約 $0.000001 \sim 0.0001 \text{ mg/L}$ であり、アルブミン (例えば、AlbuMAX (登録商標) I) の濃度は、約 $5000 \sim 50,000 \text{ mg/L}$ である。

20

【1086】

いくつかの実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表4の「1×培地中の濃度範囲」という見出しの下のに列挙された濃度範囲で存在する。他の実施形態では、合成培地中の非微量元素部分成分は、表4の「1×培地の好ましい実施形態」という見出しの下のに列挙された最終濃度で存在する。他の実施形態では、合成培地は、無血清サプリメントを含む基礎細胞培地である。これらの実施形態のうちのいくつかでは、無血清サプリメントは、表4の「サプリメント中の好ましい実施形態」という見出しの下のにリストされたタイプ及び濃度の非微量部分成分を含む。

30

【1087】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約 $260 \sim 350 \text{ mOsmol}$ である。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約 $280 \sim 310 \text{ mOsmol}$ である。いくつかの実施形態では、合成培地には、最大約 3.7 g/L 、または約 2.2 g/L の重炭酸ナトリウムが補充されている。合成培地には、 L -グルタミン (最終濃度約 2 mM)、1つ以上の抗生物質、非必須アミノ酸 (NEAA、最終濃度約 $100 \mu\text{M}$)、2-メルカプトエタノール (最終濃度約 $100 \mu\text{M}$) でさらに補充されていてもよい。いくつかの実施形態では、Smith, et al., Clin. Transl. Immunology, 4 (1) 2015 (doi: 10.1038/cti.2014.31) に記載の合成培地が、本発明において有用である。簡潔には、RPMI または CTS (商標) Optmizer (商標) を基礎細胞培地として使用し、0、2%、5%、または10%のいずれかの CTS (商標) Immune Cell Serum Replacement を補充した。

40

【1088】

50

いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のガス透過性容器内の細胞培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のガス透過性容器内の細胞培地は、ベータメルカプトエタノール（BMEまたは β ME、2-メルカプトエタノールとしても知られる、CAS 60-24-2）を欠いている。

【1089】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張（REPと称される拡張を含む）が行われ、優れた腫瘍反応性のためにTILが選択されるステップをさらに含む。当該技術分野で知られている任意の選択方法が使用され得る。例えば、米国特許出願公開第2016/0010058A1号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている方法が、優れた腫瘍反応性のためのTILの選択に使用され得る。

10

【1090】

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準のアッセイを使用して、急速な第2の拡張（REP拡張と称される拡張を含む）後に行われ得る。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンプルー排除アッセイが、バルクTILの試料上で行われ得る。いくつかの実施形態では、TIL試料は、Cellometer K2自動セルカウンター（Nexcelom Bioscience, Lawrence, MA）を使用して計数され、生存率が決定され得る。いくつかの実施形態では、生存率は、標準のCellometer K2 Image Cytometer Automatic Cell Counterプロトコルに従って決定される。

20

【1091】

Tリンパ球及びBリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：V（可変）、D（多様性）、J（接合）、及びC（一定）は、免疫グロブリン及びT細胞受容体（TCR）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、T細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるTILを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたTILは、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第2の拡張において取得されたTILは、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはT細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、T細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるT細胞受容体のうちの1つにある。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、TCR $\alpha\beta$ （すなわち、TCR α/β ）の発現が増加する。

30

【1092】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張培養培地（例えば、CM2または第2の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、IL-2、OKT-3、ならびに抗原提示フィーダー細胞（APC）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張培養培地（例えば、CM2または第2の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、6000 IU/mLのIL-2、30 μ g/mLのOKT-3、ならびに 7.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞（APC）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張培養培地（例えば、CM2または第2の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、IL-2、OKT-3、ならびに抗原提示フィーダー細胞（APC）を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張培養培地（例えば、CM2または第2の細胞培養培地とも称される）は、以下でさらに詳細に論じられるように、6000 IU/mLのIL-2、30 μ g/mLのOKT-3、ならびに 7.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞（APC）を含む。

40

50

スコのOKT-3、ならびに 5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞（APC）を含む。

【1093】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）によるステップDは、閉鎖系バイオリアクターにおいて行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系がTIL拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、G-R EX-100またはG-R EX-500である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、G-R EX-100である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、G-R EX-500である。

10

【1094】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）TILを、第1の容器、例えば、G-R EX-100 MCS容器内での小規模培養で約3～7日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、（b）小規模培養でのTILを、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-R EX-500-MCS容器に移し、小規模培養由来のTILを、第2の容器内でのより大規模な培養で約4～7日間培養することによって、培養のスケールアップを達成する。

【1095】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）TILを、第1の容器、例えば、G-R EX-100 MCS容器内での第1の小規模培養で約3～7日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、（b）第1の小規模培養由来のTILを、第1の容器とサイズが等しい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたTILの一部が、第2の小規模培養で約4～7日間培養される。

20

【1096】

いくつかの実施形態では、第1の小規模TIL培養物は、TILの複数の約2～5亜集団に配分される。

30

【1097】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）TILを、第1の容器、例えば、G-R EX-100 MCS容器内での小規模培養で約3～7日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、（b）小規模培養由来のTILを、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器、例えば、G-R EX-500 MCS容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたTILの一部が、より大規模な培養で約4～7日間培養される。

40

【1098】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（a）TILを、第1の容器、例えば、G-R EX-100 MCS容器内での小規模培養で約5日間培養することによって急速なまたは第2の拡張を行うことと、その後、（b）小規模培養由来のTILを、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R EX-500 MCS容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移されたTILの一部が、より大規模な培養で約6日間培養される。

【1099】

50

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張の分割時に、各第2の容器は、少なくとも 10^8 個のTILを含む。いくつかの実施形態では、急速または第2の拡張の分割時に、各第2の容器は、少なくとも 10^8 個のTIL、少なくとも 10^9 個のTIL、または少なくとも 10^{10} 個のTILを含む。例示的な一実施形態では、各第2の容器は、少なくとも 10^{10} 個のTILを含む。

【1100】

いくつかの実施形態では、第1の小規模TIL培養物は、複数の亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第1の小規模TIL培養物は、複数の約2～5亜集団に配分される。いくつかの実施形態では、第1の小規模TIL培養物は、複数の約2、3、4、または5亜集団に配分される。

【1101】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張の完了後、複数の亜集団は、治療有効量のTILを含む。いくつかの実施形態では、急速または第2の拡張の完了後、1つ以上のTILの亜集団と一緒にプールして、治療有効量のTILを産生する。いくつかの実施形態では、急速拡張の完了後、TILの各亜集団は、治療有効量のTILを含む。

【1102】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張は、複数のステップに分割される前に、約3～7日間行われる。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張の分裂は、急速または第2の拡張の開始後約3日目、4日目、5日目、6日目、または7日目に起こる。

【1103】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張の分裂は、第1の拡張（すなわち、REP前拡張）の開始後の約7日目、8日目、9日目、10日目、11日目、12日目、13日目、14日目、15日目、または16日目、17日目、または18日目に起こる。例示的な一実施形態では、急速または第2の拡張の分裂は、第1の拡張の開始後約16日目に起こる。

【1104】

いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張は、分裂後約7～11日間、さらに行われる。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張は、分裂後約5日、6日、7日、8日、9日、10日、または11日間、さらに行われる。

【1105】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地と同じ成分を含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂後の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地とは異なる成分を含む。

【1106】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地は、IL-2、任意選択でOKT-3、及びさらに任意選択でAPCを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地は、IL-2、OKT-3、及びさらに任意選択でAPCを含む。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地は、IL-2、OKT-3及びAPCを含む。

【1107】

いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地は、第1の拡張中の細胞培養培地を、IL-2、任意選択でOKT-3及びさらに任意選択でAPCを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地は、第1の拡張中の細胞培養培地を、IL-2、OKT-3及びAPCを含む新鮮な培養培地で補充することによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂前の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地は、第1の拡張中の細胞

10

20

30

40

50

培養培地を、IL-2、OKT-3及びAPCを含む新鮮な細胞培養培地で置き換えることによって生成される。

【1108】

いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地は、IL-2、及び任意選択でOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地は、IL-2及びOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地を、IL-2及び任意選択でOKT-3を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。いくつかの実施形態では、分裂後の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地は、分裂前の急速な第2の拡張に使用される細胞培養培地を、IL-2及びOKT-3を含む新鮮な培養培地で置き換えることによって生成される。

10

【1109】

1. フィーダー細胞及び抗原提示細胞

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される急速な第2の拡張手順（例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）のステップDに記載されるような拡張、ならびにREPと称されるものを含む）は、REP TIL拡張中及び／または急速な第2の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、健康な献血者由来の標準の全血単位から得られる末梢血単核細胞（PBMC）である。PBMCは、Ficoll-Paque勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。

20

【1110】

一般に、同種異系PBMCは、照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、実施例に記載されるように、REP手順で使用され、これは、照射された同種異系PBMCの複製無能力を評価するための例示的なプロトコルを提供する。

【1111】

いくつかの実施形態では、7日目または14日目の総生細胞数が、REPの0日目及び／または第2の拡張の0日目（すなわち、第2の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、PBMCは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のTIL拡張手順での使用が認められる。

30

【1112】

いくつかの実施形態では、7日目及び14日目のOKT3及びIL-2の存在下で培養された総生細胞数が、REPの0日目及び／または第2の拡張の0日目（すなわち、第2の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、PBMCは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のTIL拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、PBMCは、30 ng/mLのOKT3抗体及び3000 IU/mLのIL-2の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、PBMCは、60 ng/mLのOKT3抗体及び6000 IU/mLのIL-2の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、PBMCは、60 ng/mLのOKT3抗体及び3000 IU/mLのIL-2の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、PBMCは、30 ng/mLのOKT3抗体及び6000 IU/mLのIL-2の存在下で培養される。

40

【1113】

いくつかの実施形態では、7日目及び14日目のOKT3及びIL-2の存在下で培養された総生細胞数が、REPの0日目及び／または第2の拡張の0日目（すなわち、第2の拡張の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、PBMCは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のTIL拡張手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、PBMCは、30～60 ng/mLのOKT3抗体及び1000～6000 IU/mLのIL-2の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、PBMCは、30～60 ng/mLのOKT3抗体及び2000～5000 IU/mLのIL-

50

2の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M Cは、30～60 ng/mLのO K T 3抗体及び2000～4000 IU/mLのI L - 2の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M Cは、30～60 ng/mLのO K T 3抗体及び2500～3500 IU/mLのI L - 2の存在下で培養される。いくつかの実施形態では、P B M Cは、30～60 ng/mLのO K T 3抗体及び6000 IU/mLのI L - 2の存在下で培養される。

【1114】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、P B M Cである。いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、人工抗原提示フィーダー細胞である。いくつかの実施形態では、第2の拡張におけるT I Lの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、約1：10、約1：25、約1：50、約1：100、約1：125、約1：150、約1：175、約1：200、約1：225、約1：250、約1：275、約1：300、約1：325、約1：350、約1：375、約1：400、または約1：500である。いくつかの実施形態では、第2の拡張におけるT I Lの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、1：50～1：300である。いくつかの実施形態では、第2の拡張におけるT I Lの抗原提示フィーダー細胞に対する比は、1：100～1：200である。

【1115】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第2の拡張手順は、約 5×10^8 フィーダー細胞：約 100×10^6 T I Lの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第2の拡張手順は、約 7.5×10^8 フィーダー細胞：約 100×10^6 T I Lの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第2の拡張手順は、約 5×10^8 フィーダー細胞：約 50×10^6 T I Lの比を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第2の拡張手順は、約 7.5×10^8 フィーダー細胞：約 50×10^6 T I Lの比を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第2の拡張手順は、約 5×10^8 フィーダー細胞：約 25×10^6 T I Lを必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第2の拡張手順は、約 7.5×10^8 フィーダー細胞：約 25×10^6 T I Lを必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第2の拡張は、急速な第2の拡張の2倍の数のフィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡張が約 2.5×10^8 フィーダー細胞を必要とする場合、急速な第2の拡張は、約 5×10^8 フィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の拡張が約 2.5×10^8 フィーダー細胞を必要とする場合、急速な第2の拡張は、約 7.5×10^8 フィーダー細胞を必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第2の拡張は、プライミングによる第1の拡張の2倍（2.0倍）、2.5倍、3.0倍、3.5倍または4.0倍の数のフィーダー細胞を必要とする。

【1116】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の急速な第2の拡張手順は、急速な第2の拡張中に過剰のフィーダー細胞を必要とする。多くの実施形態では、フィーダー細胞は、同種異系の健康な献血者由来の標準の全血単位から取得される末梢血単核細胞（P B M C）である。P B M Cは、F i c o l l - P a q u e 勾配分離などの標準の方法を使用して取得される。いくつかの実施形態では、人工抗原提示（a A P C）細胞がP B M Cの代わりに使用される。いくつかの実施形態では、P B M Cは、プライミングによる第1の拡張に追加されたP B M Cの2倍の濃度で、急速な第2の拡張に追加される。

【1117】

一般に、同種異系P B M Cは、照射または熱処理のいずれかによって不活性化され、図及び実施例に記載される例示的な手順を含む、本明細書に記載のT I L拡張手順で使用される。

【1118】

いくつかの実施形態では、人工抗原提示細胞は、P B M Cの代替物として、またはP B M Cと組み合わせて、急速な第2の拡張において使用される。

【1119】

2. サイトカイン及び他の添加物

本明細書に記載の急速な第2の拡張方法は、一般に、当該技術分野で知られているように、高用量のサイトカイン、特にIL-2を含む培養培地を使用する。

【1120】

あるいは、TILの急速な第2の拡張のためにサイトカインの組み合わせを使用することは、米国特許出願公開第US2017/0107490A1号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように、IL-2、IL-15及びIL-21のうちの2つ以上の組み合わせを用いて追加として可能である。したがって、可能な組み合わせには、IL-2及びIL-15、IL-2及びIL-21、IL-15及びIL-21、ならびにIL-2、IL-15、及びIL-21が含まれ、後者は多くの実施形態で特に有用である。サイトカインの組み合わせの使用は、リンパ球、特にそこに記載されているようにT細胞の生成に特に有利に働く。

【1121】

いくつかの実施形態では、ステップD（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gから）はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、OKT-3抗体またはムロモナブの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップDはまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、4-1BBアゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。いくつかの実施形態では、ステップD（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gから）はまた、本明細書の他の箇所に記載されるように、OX-40アゴニストの、培養培地への添加を含んでもよい。加えて、チアゾリジンジオン化合物などの増殖因子活性化受容体（PPAR）-ガンマアゴニストを含む、ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体ガンマコアクチベーター-1 α アゴニストなどの添加剤は、米国特許出願公開第US2019/0307796 A1号（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように、ステップD（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gから）中の培養培地で使用されてもよい。

【1122】

いくつかの実施形態では、ステップDはまた、培養培地中のタンパク質キナーゼB（AKT）阻害剤（AKTi）の添加を含み得る。いくつかの実施形態では、TIL集団は、AKT阻害剤を含む培地中で培養され、CD3⁹LO/CD69⁹LO及び／またはCD3⁹/CD69二重陰性濃縮TIL集団を取得する。いくつかの実施形態では、AKT阻害剤は、イパタセルチブ、GSK690693、GSK2141795、GSK2110183、AZD5363、GDC-0068、AT7867、CCT128930、MK-2206、BAY1125976、ペリフォシン、オリドニン、ヘルバセチン、テヘラノリド、イソリキリゲニン、スクテラリン、ホノキオール、及びそれらの薬学的に許容される塩からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、AKT阻害剤は、イパタセルチブである。いくつかの実施形態では、TIL集団は、約0.1 μ M、約0.2 μ M、約0.3 μ M、約0.4 μ M、約0.5 μ M、約0.6 μ M、約0.7 μ M、約0.8 μ M、約0.9 μ M、約1 μ M、約1.1 μ M、約1.2 μ M、約1.3 μ M、約1.4 μ M、約1.5 μ M、約1.6 μ M、約1.7 μ M、約1.8 μ M、約1.9 μ M、約2 μ M、約2.1 μ M、約2.2 μ M、約2.3 μ M、約2.4 μ M、約2.5 μ M、約2.6 μ M、約2.7 μ M、約2.8 μ M、約2.9 μ M、約3 μ M、約3.5 μ M、約4 μ M、約4.5 μ M、または約5 μ Mのイパタセルチブを含む培地で培養される。

【1123】

E. ステップE：TILを採取する

急速な第2の拡張ステップ後、細胞が採取され得る。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／ま

たは図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) に提供されるように、1、2、3、4、またはそれ以上の拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、T I L は、例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) に提供されるように、2つの拡張ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、T I L は、2つの拡張ステップ、例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) に提供されるように、1回のプライミングによる第 1 の拡張及び 1 回の急速な第 2 の拡張の後に採取される。

【1124】

10

T I L は、任意の適切な滅菌様式で、例えば、遠心分離によって採取され得る。T I L を採取するための方法は、当該技術分野で周知であり、任意のかかる既知の方法が本プロセスとともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、T I L は、自動化システムを使用して採取される。

【1125】

細胞採取機及び／または細胞処理システムは、例えば、Fresenius Kabi、Tomtec Life Science、Perkin Elmer、及び Inotech Biosystems International, Inc を含む、様々な供給源から市販されている。任意の細胞ベースの採取機が本方法とともに用いられ得る。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、膜ベースの細胞採取機である。いくつかの実施形態では、細胞採取は、LOVO システム (Fresenius Kabi によって製造されたもの) などの細胞処理システムによるものである。「LOVO 細胞処理システム」という用語は、細胞を含む溶液を、滅菌及び／または閉鎖系環境で回転膜または回転フィルターなどの膜またはフィルターをとおしてポンプ輸送し、連続フローを可能にし、細胞を処理して、ペレット化せずに上清または細胞培養培地を除去する、任意のベンダーによって製造された任意の機器または装置も指す。いくつかの実施形態では、細胞採取機及び／または細胞処理システムは、滅菌閉鎖系内で、細胞分離、洗浄、流体交換、濃縮、及び／または他の細胞処理ステップを行うことができる。

20

【1126】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の拡張、例えば、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) によるステップ D は、閉鎖系バイオリアクターにおいて行われる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるように、閉鎖系が T I L 拡張のために用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが用いられる。いくつかの実施形態では、バイオリアクターが容器として用いられる。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、例えば、G-R E X-100 または G-R E X-500 である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、G-R E X-100 である。いくつかの実施形態では、用いられるバイオリアクターは、G-R E X-500 である。

30

【1127】

40

いくつかの実施形態では、図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) によるステップ E は、本明細書に記載のプロセスに従って行われる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるような閉鎖系が用いられる。

【1128】

いくつかの実施形態では、T I L は、本明細書に記載の方法に従って採取される。いくつかの実施形態では、14～16 日目の T I L が本明細書に記載の方法を使用して採取される。いくつかの実施形態では、T I L は、本明細書に記載の方法を使用して 14 日目に

50

採取される。いくつかの実施形態では、TILは、本明細書に記載の方法を使用して15日目に採取される。いくつかの実施形態では、TILは、本明細書に記載の方法を使用して16日目に採取される。

【1129】

いくつかの実施形態では、本発明は、(i) CD39/CD69二重陰性及び/または CD39^{LO}/CD69^{LO}、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または (iii) (i) 及び (ii) の組み合わせについて、本明細書に記載の採取ステップに記載の治療的TIL集団またはTIL組成物を評価または選別することを提供する。(i) CD39/CD69二重陰性及び/または CD39^{LO}/CD69^{LO}、(ii) CD39/CD69二重ノックアウト、または (iii) (i) 及び (ii) の組み合わせであるTILを選別するための方法は、参照により本明細書に組み込まれる米国出願第2019/0212332号に見出すことができる。いくつかの実施形態では、細胞選別は、Zhang, X et. al., Surface Free Energy Activated High-Throughput Cell Sorting, Analytical Chemistry (2014), 86:9350-9355に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。実施例15及び図41は、かかる方法を使用して選別するためのプロトコルの例を提供する。

10

【1130】

F. ステップF：最終製剤及び輸液容器への移行

図8（特に、例えば図8A及び/または図8B及び/または図8C及び/または図8D及び/または図8E及び/または図8F及び/または図8G）に例示的な順序で提供され、かつ上及び本明細書で詳細に概説されるステップA～Eが完了した後、細胞は、注入バッグまたは無菌バイアルなどの患者への投与に使用するために容器に移される。いくつかの実施形態では、治療的に十分な数のTILが上記の拡張方法を使用して得られると、それらは、患者への投与に使用するために容器に移される。

20

【1131】

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡張されたTILは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のTIL懸濁液である。本明細書に開示されるように拡張されたTILは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、TILは、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ30～60分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

30

【1132】

いくつかの実施形態では、本発明は、(a) プライミングによる第1の拡張前に、(i) 腫瘍断片または試料中のバルクTIL、または第1のTIL集団が、IL-2及び任意選択で腫瘍断片または試料から出るTILを産生するための抗生物質の第1の組み合わせを含有する細胞培養培地中で培養され、(ii) 腫瘍断片または試料から出る少なくとも複数のTILが腫瘍断片または試料から分離して、腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存するTIL、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後にそれとともに残存する任意のTILの混合物を産生し、(iii) 任意選択で、腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存するTIL、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後にそれとともに残存する任意のTILの混合物を消化して、かかる混合物の消化物を産生する；ならびに(b) プライミングによる第1の拡張を、混合物または混合物の消化物を使用して行うように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍断片または試料から出るTILの少なくとも約1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%以上が、腫瘍断片または試料から分離されて、混合物を生成する。

40

【1133】

いくつかの実施形態では、本発明は、プライミングによる第1の拡張前に培養するステ

50

ップが、約 1 日～約 3 日の期間で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1134】

いくつかの実施形態では、本発明は、プライミングによる第 1 の拡張前に培養するステップが、約 1、2、3、4、5、6、または 7 日の期間で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1135】

いくつかの実施形態では、本発明は、(a) プライミングによる第 1 の拡張に先行する CD39/CD69 二重陰性及び／または CD39^{LO}/CD69^{LO} 事前選択ステップ前に、(i) 腫瘍断片または試料中のバルク TIL または第 1 の TIL 集団を、IL-2 を含有する細胞培養培地中で培養して、腫瘍断片または試料から出る TIL を産生し、(ii) 腫瘍断片または試料から出る少なくとも複数の TIL を腫瘍断片または試料から分離して、腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存する TIL、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後にそれとともに残存する任意の TIL の混合物を産生し、(iii) 腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存する TIL、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後にそれとともに残存する任意の TIL の混合物を消化して、かかる混合物の消化物を産生する；ならびに (b) 混合物の消化物を使用して、CD39/CD69 二重陰性及び／または CD39^{LO}/CD69^{LO} 事前選択ステップを行い、CD39/CD69 二重陰性及び／または CD39^{LO}/CD69^{LO} TIL 集団を産生するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍断片または試料から出る TIL の少なくとも約 1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% 以上が、腫瘍断片または試料から分離されて、混合物を生成する。

【1136】

いくつかの実施形態では、本発明は、CD39/CD69 二重陰性及び／または CD39^{LO}/CD69^{LO} 事前選択ステップ前に培養するステップが、約 1 日～約 3 日の期間で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1137】

いくつかの実施形態では、本発明は、CD39/CD69 二重陰性及び／または CD39^{LO}/CD69^{LO} 事前選択ステップ前に培養するステップが、約 1、2、3、4、5、6、または 7 日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1138】

V. さらに Gen 2、Gen 3、及び他の TIL 製造プロセスの実施形態

A. PBMC フィーダー細胞比

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培養培地（例えば、図 8（特に、例えば、図 8A 及び／または図 8B 及び／または図 8C 及び／または図 8D 及び／または図 8E 及び／または図 8F 及び／または図 8G）は、抗 CD3 抗体、例えば、OKT-3 を含む。IL-2 と組み合わせた抗 CD3 抗体は、TIL 集団における T 細胞活性化及び細胞分裂を誘導する。この効果は、全長抗体、ならびに Fab 及び F(ab')₂ 断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）を参照されたい。

【1139】

いくつかの実施形態では、PBMC フィーダー層の数は、以下のように計算される：

T 細胞の体積（10 μm 直径）： $V = (4/3) \pi r^3 = 523.6 \mu m^3$

40 μm（4 細胞）の高さを有する G-REX-100（M）のカラム： $V = (4/3) \pi r^3 = 4 \times 10^{12} \mu m^3$

10

20

30

40

50

カラム B を充填するために必要な細胞数： $4 \times 10^{12} \mu\text{m}^3 / 523.6 \mu\text{m}^3 = 7.6 \times 10^8 \mu\text{m}^3 \times 0.64 = 4.86 \times 10^8$

四次元空間で最適に活性化され得る細胞の数： $4.86 \times 10^8 / 24 = 20.25 \times 10^6$

G-R E X-500 に外挿されるフィーダー及び T I L の数：T I L： 100×10^6 及びフィーダー： 2.5×10^9

【1140】

この計算では、 100 cm^2 の底部を有するシリンジ中での T I L の活性化のために二十面体形状を提供するのに必要な単核細胞の数の近似値が使用される。この計算は、J i n, e t. a l., J. I m m u n o t h e r. 2012, 35, 283-292 に記載されているように、N C I 実験データを密接に反映する T 細胞の閾値活性化について、約 5×10^8 の実験結果を導き出す。(C) では、乗数 (0.64) は、J a e g e r a n d N a g e l, S c i e n c e, 1992, 255, 1523-3 によって計算された等価球のランダム充填密度である。(D) において、除数 24 は、M u s i n, R u s s. M a t h. S u r v., 2003, 58, 794-795 に記載される、四次元空間内の同様のオブジェクトと接触する可能性のある等価球の数または「ニュートン数」である。

【1141】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞の数は、急速な第 2 の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、この方法は、急速な第 2 の拡張の細胞培養培地と比較しておよそ 50% 少ない抗原提示細胞を含む細胞培養培地中でプライミングによる第 1 の拡張を行うことを含む。

【1142】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡張中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞 (A P C) の数は、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数よりも多い。

【1143】

他の実施形態では、急速な第 1. 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数の、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 20 : 1 の範囲から選択される。

【1144】

他の実施形態では、急速な第 1. 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数の、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 10 : 1 の範囲から選択される。

【1145】

他の実施形態では、急速な第 1. 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数の、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 9 : 1 の範囲から選択される。

【1146】

他の実施形態では、急速な第 1. 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数の、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 8 : 1 の範囲から選択される。

【1147】

他の実施形態では、急速な第 1. 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数の、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 7 : 1 の範囲から選択される。

【1148】

他の実施形態では、急速な第 1. 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数の、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数に対する比は、正確にまた

10

20

30

40

50

は約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 6 : 1 の範囲から選択される。

【 1 1 4 9 】

他の実施形態では、急速な第1.1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約5:1の範囲から選択される。

【 1 1 5 0 】

他の実施形態では、急速な第1.1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約4:1の範囲から選択される。

【 1 1 5 1 】

他の実施形態では、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数のプライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約1.1 : 1 ~ 正確にまたは約3 : 1の範囲から選択される。

【 1 1 5 2 】

他の実施形態では、急速な第1.1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.9:1の範囲から選択される。

【 1 1 5 3 】

他の実施形態では、急速な第1.1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.8:1の範囲から選択される。

【 1 1 5 4 】

他の実施形態では、急速な第 1 . 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数の、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される A P C の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 7 : 1 の範囲から選択される。

【 1 1 5 5 】

他の実施形態では、急速な第1.1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.6:1の範囲から選択される。

【 1 1 5 6 】

他の実施形態では、急速な第 1 . 1 の拡張中に外因的に供給される APC の数の、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される APC の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 5 : 1 の範囲から選択される。

【 1 1 5 7 】

他の実施形態では、急速な第1.1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.4:1の範囲から選択される。

【 1 1 5 8 】

他の実施形態では、急速な第1.1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.3:1の範囲から選択される。

【 1 1 5 9 】

他の実施形態では、急速な第 1 . 1 の拡張中に外因的に供給される APC の数の、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される APC の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 2 : 1 の範囲から選択される。

【 1 1 6 0 】

他の実施形態では、急速な第1.1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.1:1の範囲から選択される。

【 1 1 6 1 】

他の実施形態では、急速な第1.1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2:1の範囲から選択される。

【 1 1 6 2 】

他の実施形態では、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約10:1の範囲から選択される。

【 1 1 6 3 】

他の実施形態では、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約5:1の範囲から選択される。

【 1 1 6 4 】

他の実施形態では、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1~正確にまたは約4:1の範囲から選択される。

【 1 1 6 5 】

他の実施形態では、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2：1～正確にまたは約3：1の範囲から選択される。

【 1 1 6 6 】

他の実施形態では、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1~正確にまたは約2.9:1の範囲から選択される。

【 1 1 6 7 】

他の実施形態では、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1~正確にまたは約2.8:1の範囲から選択される。

【 1 1 6 8 】

他の実施形態では、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.7:1の範囲から選択される。

【 1 1 6 9 】

他の実施形態では、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1~正確にまたは約2.6:1の範囲から選択される。

【 1 1 7 0 】

他の実施形態では、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1~正確にまたは約2.5:1の範囲から選択される。

【 1 1 7 1 】

他の実施形態では、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.4:1の範囲から選択される。

【 1 1 7 2 】

他の実施形態では、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数の、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2:1～正確にまたは約2.3:1の範囲から選択される。

【 1 1 7 3 】

他の実施形態では、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数のプライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数に対する比は、正確にまたは約2

： 1 ～ 正確にまたは約 2 . 2 : 1 の範囲から選択される。

【 1 1 7 4 】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡張中に外因的に供給される APC の数の、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される APC の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ～ 正確にまたは約 2 . 1 : 1 の範囲から選択される。

【 1 1 7 5 】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡張中に外因的に供給される APC の数のプライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される APC の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 である。

【 1 1 7 6 】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡張中に外因的に供給される APC の数のプライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される APC の数に対する比は、正確にまたは約 1 . 1 : 1、1 . 2 : 1、1 . 3 : 1、1 . 4 : 1、1 . 5 : 1、1 . 6 : 1、1 . 7 : 1、1 . 8 : 1、1 . 9 : 1、2 : 1、2 . 1 : 1、2 . 2 : 1、2 . 3 : 1、2 . 4 : 1、2 . 5 : 1、2 . 6 : 1、2 . 7 : 1、2 . 8 : 1、2 . 9 : 1、3 : 1、3 . 1 : 1、3 . 2 : 1、3 . 3 : 1、3 . 4 : 1、3 . 5 : 1、3 . 6 : 1、3 . 7 : 1、3 . 8 : 1、3 . 9 : 1、4 : 1、4 . 1 : 1、4 . 2 : 1、4 . 3 : 1、4 . 4 : 1、4 . 5 : 1、4 . 6 : 1、4 . 7 : 1、4 . 8 : 1、4 . 9 : 1、または 5 : 1 である。

【 1 1 7 7 】

他の実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される APC の数は、正確にまたは約 1×10^8 、 $1 . 1 \times 10^8$ 、 $1 . 2 \times 10^8$ 、 $1 . 3 \times 10^8$ 、 $1 . 4 \times 10^8$ 、 $1 . 5 \times 10^8$ 、 $1 . 6 \times 10^8$ 、 $1 . 7 \times 10^8$ 、 $1 . 8 \times 10^8$ 、 $1 . 9 \times 10^8$ 、 2×10^8 、 $2 . 1 \times 10^8$ 、 $2 . 2 \times 10^8$ 、 $2 . 3 \times 10^8$ 、 $2 . 4 \times 10^8$ 、 $2 . 5 \times 10^8$ 、 $2 . 6 \times 10^8$ 、 $2 . 7 \times 10^8$ 、 $2 . 8 \times 10^8$ 、 $2 . 9 \times 10^8$ 、 3×10^8 、 $3 . 1 \times 10^8$ 、 $3 . 2 \times 10^8$ 、 $3 . 3 \times 10^8$ 、 $3 . 4 \times 10^8$ 、または $3 . 5 \times 10^8$ APC であり、急速な第 2 の拡張中に外因的に供給される APC の数は、正確にまたは約 $3 . 5 \times 10^8$ 、 $3 . 6 \times 10^8$ 、 $3 . 7 \times 10^8$ 、 $3 . 8 \times 10^8$ 、 $3 . 9 \times 10^8$ 、 4×10^8 、 $4 . 1 \times 10^8$ 、 $4 . 2 \times 10^8$ 、 $4 . 3 \times 10^8$ 、 $4 . 4 \times 10^8$ 、 $4 . 5 \times 10^8$ 、 $4 . 6 \times 10^8$ 、 $4 . 7 \times 10^8$ 、 $4 . 8 \times 10^8$ 、 $4 . 9 \times 10^8$ 、 5×10^8 、 $5 . 1 \times 10^8$ 、 $5 . 2 \times 10^8$ 、 $5 . 3 \times 10^8$ 、 $5 . 4 \times 10^8$ 、 $5 . 5 \times 10^8$ 、 $5 . 6 \times 10^8$ 、 $5 . 7 \times 10^8$ 、 $5 . 8 \times 10^8$ 、 $5 . 9 \times 10^8$ 、 6×10^8 、 $6 . 1 \times 10^8$ 、 $6 . 2 \times 10^8$ 、 $6 . 3 \times 10^8$ 、 $6 . 4 \times 10^8$ 、 $6 . 5 \times 10^8$ 、 $6 . 6 \times 10^8$ 、 $6 . 7 \times 10^8$ 、 $6 . 8 \times 10^8$ 、 $6 . 9 \times 10^8$ 、 7×10^8 、 $7 . 1 \times 10^8$ 、 $7 . 2 \times 10^8$ 、 $7 . 3 \times 10^8$ 、 $7 . 4 \times 10^8$ 、 $7 . 5 \times 10^8$ 、 $7 . 6 \times 10^8$ 、 $7 . 7 \times 10^8$ 、 $7 . 8 \times 10^8$ 、 $7 . 9 \times 10^8$ 、 8×10^8 、 $8 . 1 \times 10^8$ 、 $8 . 2 \times 10^8$ 、 $8 . 3 \times 10^8$ 、 $8 . 4 \times 10^8$ 、 $8 . 5 \times 10^8$ 、 $8 . 6 \times 10^8$ 、 $8 . 7 \times 10^8$ 、 $8 . 8 \times 10^8$ 、 $8 . 9 \times 10^8$ 、 9×10^8 、 $9 . 1 \times 10^8$ 、 $9 . 2 \times 10^8$ 、 $9 . 3 \times 10^8$ 、 $9 . 4 \times 10^8$ 、 $9 . 5 \times 10^8$ 、 $9 . 6 \times 10^8$ 、 $9 . 7 \times 10^8$ 、 $9 . 8 \times 10^8$ 、 $9 . 9 \times 10^8$ 、または 1×10^9 APC である。

【 1 1 7 8 】

他の実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される APC の数は、正確にまたは約 $1 . 5 \times 10^8$ APC ～ 正確にまたは約 3×10^8 APC の範囲から選択され、急速な第 2 の拡張中に外因的に供給される APC の数は、正確にまたは約 4×10^8 APC ～ 正確にまたは約 $7 . 5 \times 10^8$ APC の範囲から選択される。

【 1 1 7 9 】

他の実施形態では、プライミングによる第 1 の拡張中に外因的に供給される APC の数は、正確にまたは約 2×10^8 APC ～ 正確にまたは約 $2 . 5 \times 10^8$ APC の範囲から選択され、急速な第 2 の拡張中に外因的に供給される APC の数は、正確にまたは約 $4 . 5 \times 10^8$ APC ～ 正確にまたは約 $5 . 5 \times 10^8$ APC の範囲から選択される。

【1180】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張中に外因的に供給されるAPCの数は、正確にまたは約 2.5×10^8 APCであり、急速な第2の拡張中に外因的に供給されるAPCの数は、正確にまたは約 5×10^8 APCである。

【1181】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目に追加されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、プライミングによる第1の拡張の7日目（例えば、方法の7日目）に追加されるPBMCの数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第1の拡張の0日目に抗原提示細胞を第1のTIL集団に追加することと、7日目に抗原提示細胞を第2のTIL集団に追加することを含み、0日目に追加される抗原提示細胞の数は、プライミングによる第1の拡張の7日目（例えば、方法の7日目）に追加される抗原提示細胞の数のおよそ50%である。

10

【1182】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるPBMCの数よりも多い。

【1183】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 1.0×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 4.5×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

20

【1184】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 1.5×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 3.5×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【1185】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 2×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 3×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【1186】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 2×10^6 APC / cm^2 の密度で培養フラスコに播種される。

30

【1187】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 1.0×10^6 、 1.1×10^6 、 1.2×10^6 、 1.3×10^6 、 1.4×10^6 、 1.5×10^6 、 1.6×10^6 、 1.7×10^6 、 1.8×10^6 、 1.9×10^6 、 2×10^6 、 2.1×10^6 、 2.2×10^6 、 2.3×10^6 、 2.4×10^6 、 2.5×10^6 、 2.6×10^6 、 2.7×10^6 、 2.8×10^6 、 2.9×10^6 、 3×10^6 、 3.1×10^6 、 3.2×10^6 、 3.3×10^6 、 3.4×10^6 、 3.5×10^6 、 3.6×10^6 、 3.7×10^6 、 3.8×10^6 、 3.9×10^6 、 4×10^6 、 4.1×10^6 、 4.2×10^6 、 4.3×10^6 、 4.4×10^6 、または 4.5×10^6 APC / cm^2 の密度で培養フラスコに播種される。

40

【1188】

他の実施形態では、急速な第2の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 2.5×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 7.5×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【1189】

他の実施形態では、急速な第2の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 3.5×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 6.0×10^6 APC / cm^2 の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【1190】

50

他の実施形態では、急速な第2の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 $4.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 正確にまたは約 $5.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【1191】

他の実施形態では、急速な第2の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 $4.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【1192】

他の実施形態では、急速な第2の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 $2.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、 $2.6 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、 $2.7 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、 2.8×10^6 、 2.9×10^6 、 3×10^6 、 3.1×10^6 、 3.2×10^6 、 3.3×10^6 、 3.4×10^6 、 3.5×10^6 、 3.6×10^6 、 3.7×10^6 、 3.8×10^6 、 3.9×10^6 、 4×10^6 、 4.1×10^6 、 4.2×10^6 、 4.3×10^6 、 4.4×10^6 、 4.5×10^6 、 4.6×10^6 、 4.7×10^6 、 4.8×10^6 、 4.9×10^6 、 5×10^6 、 5.1×10^6 、 5.2×10^6 、 5.3×10^6 、 5.4×10^6 、 5.5×10^6 、 5.6×10^6 、 5.7×10^6 、 5.8×10^6 、 5.9×10^6 、 6×10^6 、 6.1×10^6 、 6.2×10^6 、 6.3×10^6 、 6.4×10^6 、 6.5×10^6 、 6.6×10^6 、 6.7×10^6 、 6.8×10^6 、 6.9×10^6 、 7×10^6 、 7.1×10^6 、 7.2×10^6 、 7.3×10^6 、 7.4×10^6 、または $7.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【1193】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 1.0×10^6 、 1.1×10^6 、 1.2×10^6 、 1.3×10^6 、 1.4×10^6 、 1.5×10^6 、 1.6×10^6 、 1.7×10^6 、 1.8×10^6 、 1.9×10^6 、 2×10^6 、 2.1×10^6 、 2.2×10^6 、 2.3×10^6 、 2.4×10^6 、 2.5×10^6 、 2.6×10^6 、 2.7×10^6 、 2.8×10^6 、 2.9×10^6 、 3×10^6 、 3.1×10^6 、 3.2×10^6 、 3.3×10^6 、 3.4×10^6 、 3.5×10^6 、 3.6×10^6 、 3.7×10^6 、 3.8×10^6 、 3.9×10^6 、 4×10^6 、 4.1×10^6 、 4.2×10^6 、 4.3×10^6 、 4.4×10^6 、または $4.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 $2.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、 $2.6 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、 $2.7 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 、 2.8×10^6 、 2.9×10^6 、 3×10^6 、 3.1×10^6 、 3.2×10^6 、 3.3×10^6 、 3.4×10^6 、 3.5×10^6 、 3.6×10^6 、 3.7×10^6 、 3.8×10^6 、 3.9×10^6 、 4×10^6 、 4.1×10^6 、 4.2×10^6 、 4.3×10^6 、 4.4×10^6 、 4.5×10^6 、 4.6×10^6 、 4.7×10^6 、 4.8×10^6 、 4.9×10^6 、 5×10^6 、 5.1×10^6 、 5.2×10^6 、 5.3×10^6 、 5.4×10^6 、 5.5×10^6 、 5.6×10^6 、 5.7×10^6 、 5.8×10^6 、 5.9×10^6 、 6×10^6 、 6.1×10^6 、 6.2×10^6 、 6.3×10^6 、 6.4×10^6 、 6.5×10^6 、 6.6×10^6 、 6.7×10^6 、 6.8×10^6 、 6.9×10^6 、 7×10^6 、 7.1×10^6 、 7.2×10^6 、 7.3×10^6 、 7.4×10^6 、または $7.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【1194】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 $1.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 正確にまたは約 $4.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 $2.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 正確にまたは約 $7.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される密度で培養フラスコに播

種される。

【1195】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 $1.5 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ ～正確にまたは約 $3.5 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 $3.5 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ ～正確にまたは約 $6 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【1196】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 $2 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ ～正確にまたは約 $3 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 $4 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ ～正確にまたは約 $5.5 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の範囲から選択される密度で培養フラスコに播種される。

【1197】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 $2 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の拡張において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 $4 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の密度で培養フラスコに播種される。

【1198】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるPBM Cの数に対する比は、正確にまたは約1.1：1～正確にまたは約20：1の範囲から選択される。

【1199】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるPBM Cの数に対する比は、正確にまたは約1.1：1～正確にまたは約10：1の範囲から選択される。

【1200】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるPBM Cの数に対する比は、正確にまたは約1.1：1～正確にまたは約9：1の範囲から選択される。

【1201】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約1.1：1～正確にまたは約8：1の範囲から選択される。

【1202】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約1.1：1～正確にまたは約7：1の範囲から選択される。

【1203】

他の実施形態では、急速な第1.1の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約2：1～正確にまたは約6：1の範囲から選択される。

【1204】

10

20

30

40

50

【 1 2 0 5 】

【 1 2 0 6 】

【 1 2 0 7 】

【 1 2 0 8 】

【 1 2 0 9 】

【 1 2 1 0 】

【 1 2 1 1 】

【 1 2 1 2 】

【 1 2 1 3 】

【 1 2 1 4 】

他の実施形態では、急速な第 1. 1 の拡張の 7 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡張の 0 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2. 2 : 1 の範囲から選択される。

【1 2 1 5】

他の実施形態では、急速な第 1. 1 の拡張の 7 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡張の 0 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2. 1 : 1 の範囲から選択される。

【1 2 1 6】

他の実施形態では、急速な第 1. 1 の拡張の 7 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡張の 0 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2 : 1 の範囲から選択される。

【1 2 1 7】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡張の 7 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡張の 0 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 1 0 : 1 の範囲から選択される。

【1 2 1 8】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡張の 7 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡張の 0 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 5 : 1 の範囲から選択される。

【1 2 1 9】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡張の 7 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡張の 0 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 4 : 1 の範囲から選択される。

【1 2 2 0】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡張の 7 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡張の 0 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 3 : 1 の範囲から選択される。

【1 2 2 1】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡張の 7 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡張の 0 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2. 9 : 1 の範囲から選択される。

【1 2 2 2】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡張の 7 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡張の 0 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2. 8 : 1 の範囲から選択される。

【1 2 2 3】

他の実施形態では、急速な第 2 の拡張の 7 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数の、プライミングによる第 1 の拡張の 0 日目に外因的に供給される APC（例えば、P BMC を含む）の数に対する比は、正確にまたは約 2 : 1 ~ 正確にまたは約 2. 7 : 1 の範囲から選択される。

【1 2 2 4】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2．6：1の範囲から選択される。

【1225】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2．5：1の範囲から選択される。

【1226】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2．4：1の範囲から選択される。

【1227】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2．3：1の範囲から選択される。

【1228】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数のプライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2．2：1の範囲から選択される。

【1229】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2．1：1の範囲から選択される。

【1230】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数の、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約2：1である。

【1231】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数のプライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比は、正確にまたは約1．1：1、1．2：1、1．3：1、1．4：1、1．5：1、1．6：1、1．7：1、1．8：1、1．9：1、2：1、2．1：1、2．2：1、2．3：1、2．4：1、2．5：1、2．6：1、2．7：1、2．8：1、2．9：1、3：1、3．1：1、3．2：1、3．3：1、3．4：1、3．5：1、3．6：1、3．7：1、3．8：1、3．9：1、4：1、4．1：1、4．2：1、4．3：1、4．4：1、4．5：1、4．6：1、4．7：1、4．8：1、4．9：1、または5：1である。

【1232】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数は、正確にまたは約 1×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3×10^8 、 3.1×10^8 、 3.2×10^8 、

10

20

30

40

50

0^8 、 3.3×10^8 、 3.4×10^8 、または 3.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）であり、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 3.5×10^8 、 3.6×10^8 、 3.7×10^8 、 3.8×10^8 、 3.9×10^8 、 4×10^8 、 4.1×10^8 、 4.2×10^8 、 4.3×10^8 、 4.4×10^8 、 4.5×10^8 、 4.6×10^8 、 4.7×10^8 、 4.8×10^8 、 4.9×10^8 、 5×10^8 、 5.1×10^8 、 5.2×10^8 、 5.3×10^8 、 5.4×10^8 、 5.5×10^8 、 5.6×10^8 、 5.7×10^8 、 5.8×10^8 、 5.9×10^8 、 6×10^8 、 6.1×10^8 、 6.2×10^8 、 6.3×10^8 、 6.4×10^8 、 6.5×10^8 、 6.6×10^8 、 6.7×10^8 、 6.8×10^8 、 6.9×10^8 、 7×10^8 、 7.1×10^8 、 7.2×10^8 、 7.3×10^8 、 7.4×10^8 、 7.5×10^8 、 7.6×10^8 、 7.7×10^8 、 7.8×10^8 、 7.9×10^8 、 8×10^8 、 8.1×10^8 、 8.2×10^8 、 8.3×10^8 、 8.4×10^8 、 8.5×10^8 、 8.6×10^8 、 8.7×10^8 、 8.8×10^8 、 8.9×10^8 、 9×10^8 、 9.1×10^8 、 9.2×10^8 、 9.3×10^8 、 9.4×10^8 、 9.5×10^8 、 9.6×10^8 、 9.7×10^8 、 9.8×10^8 、 9.9×10^8 、または 1×10^9 APC（例えば、PBMCを含む）である。

【1233】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 1×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）～正確にまたは約 3.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択され、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 3.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）～正確にまたは約 1×10^9 APC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択される。

【1234】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 1.5×10^8 APC～約 3×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択され、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、約 4×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）～約 7.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択される。

【1235】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 2×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）～正確にまたは約 2.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択され、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 4.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）～正確にまたは約 5.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）の範囲から選択される。

【1236】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 2.5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）であり、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）の数は、正確にまたは約 5×10^8 APC（例えば、PBMCを含む）である。

【1237】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目に追加されるAPC（例えば、PBMCを含む）層の数は、急速な第2の拡張の7日目に追加されるAPC（例えば、PBMCを含む）層の数のおよそ半分である。ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第1の拡張の0日目に抗原提示細胞層を第1のTIL集団に追加することと、7日目に抗原提示細胞を第2のTIL集団に追加することとを含み、0日目に

10

20

30

40

50

追加される抗原提示細胞層の数は、7日目に追加される抗原提示細胞層の数のおよそ50%である。

【1238】

他の実施形態では、急速な第2の拡張の7日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）層の数は、プライミングによる第1の拡張の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBMCを含む）層の数よりも多い。

【1239】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、正確にまたは約2細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、正確にまたは約4細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

10

【1240】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、正確にまたは約1細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第3の拡張の7日目は、正確にまたは約2細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

【1241】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、正確にまたは約1.5細胞層～正確にまたは約2.5細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、正確にまたは約3細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

20

【1242】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、正確にまたは約1細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、正確にまたは約2細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

【1243】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、正確にまたは約1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、または3細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、正確にまたは約3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、または8細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

30

【1244】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、正確にまたは約1細胞層～正確にまたは約2細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、正確にまたは約3細胞層～正確にまたは約10細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

40

【1245】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、正確にまたは約2細胞層～正確にまたは約3細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、正確にまたは約4細胞層～正確にまたは約8細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBMCを含む）の存在下で起こる。

50

【1246】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、正確にまたは約2細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、正確にまたは約4細胞層～正確にまたは約8細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こる。

【1247】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、正確にまたは約1、2、または3細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、正確にまたは約3、4、5、6、7、8、9、または10細胞層の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こる。

10

【1248】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：10の範囲から選択される。

【1249】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：8の範囲から選択される。

20

【1250】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：7の範囲から選択される。

30

【1251】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：6の範囲から選択される。

40

【1252】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM Cを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、PBM Cを含む）の第2の層の数に対する比は、正確にまたは約1：1.1

50

【 1 2 5 3 】

【 1 2 5 4 】

【 1 2 5 5 】

【 1 2 5 6 】

【 1 2 5 7 】

【 1 2 5 8 】

【 1 2 5 9 】

他の実施形態では、プライミングによる第1の拡張の0日目は、APC（例えば、PBM Cを含む）の第1の層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC（例えば、PBM

MCを含む)の存在下で起こり、急速な第2の拡張の7日目は、APC(例えば、PBM Cを含む)の第2の層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC(例えば、PBM Cを含む)の存在下で起こり、第1のAPC(例えば、PBM Cを含む)層の数の第2の APC(例えば、PBM Cを含む)層の数に対する比は、約1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.1、1:2.2、1:2.3、1:2.4、1:2.5、1:2.6、1:2.7、1:2.8、1:2.9、1:3、1:3.1、1:3.2、1:3.3、1:3.4、1:3.5、1:3.6、1:3.7、1:3.8、1:3.9、1:4、1:4.1、1:4.2、1:4.3、1:4.4、1:4.5、1:4.6、1:4.7、1:4.8、1:4.9、1:5、1:5.1、1:5.2、1:5.3、1:5.4、1:5.5、1:5.6、1:5.7、1:5.8、1:5.9、1:6、1:6.1、1:6.2、1:6.3、1:6.4、1:6.5、1:6.6、1:6.7、1:6.8、1:6.9、1:7、1:7.1、1:7.2、1:7.3、1:7.4、1:7.5、1:7.6、1:7.7、1:7.8、1:7.9、1:8、1:8.1、1:8.2、1:8.3、1:8.4、1:8.5、1:8.6、1:8.7、1:8.8、1:8.9、1:9、1:9.1、1:9.2、1:9.3、1:9.4、1:9.5、1:9.6、1:9.7、1:9.8、1:9.9、または1:10から選択される。

10

【1266】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張におけるAPCの数は、約 $1.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 約 $4.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択され、急速な第2の拡張におけるAPCの数は、約 $2.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 約 $7.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される。

20

【1267】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張におけるAPCの数は、約 $1.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 約 $3.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択され、急速な第2の拡張におけるAPCの数は、約 $3.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 約 $6.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される。

【1268】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張におけるAPCの数は、約 $2.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 約 $3.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択され、急速な第2の拡張におけるAPCの数は、約 $4.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ ~ 約 $5.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ の範囲から選択される。

30

【1269】

B. 任意選択の細胞培地成分

1. 抗CD3抗体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の拡張方法で使用される培養培地(例えば、図1及び8(特に、例えば、図8B)を参照)は、抗CD3抗体を含む。IL-2と組み合わせた抗CD3抗体は、TIL集団におけるT細胞活性化及び細胞分裂を誘導する。この効果は、全長抗体、ならびにFab及びF(ab')₂断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、Tsoukas et al., J. Immunol. 1985, 135, 1719(参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)を参照されたい。

40

【1270】

当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及びイヌ抗体を含むが、これらに限定されない、様々な哺乳動物由来の抗ヒトCD3ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトCD3抗体が存在する。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体ムロモナブであるOKT3が使用される(Ortho-McNeil, Raritan, NJまたはMiltenyi Biotech, Auburn, CAから市販されている)。表1を参照されたい。

【1271】

当業者によって理解されるように、マウス、ヒト、霊長類、ラット、及びイヌ抗体を含

50

むが、これらに限定されない、様々な哺乳動物由来の抗ヒトCD3ポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む、本発明での使用が見出されるいくつかの好適な抗ヒトCD3抗体が存在する。いくつかの実施形態では、抗CD3抗体ムロモナブであるOKT3が使用される(Ortho-McNeil, Raritan, NJまたはMiltenyi Biotech, Auburn, CAから市販されている)。

【1272】

2. 4-1BB (CD137) アゴニスト

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張及び／または急速な第2の拡張の細胞培養培地は、TNFRSFアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、4-1BB (CD137) アゴニストである。4-1BBアゴニストは、当該技術分野で知られている任意の4-1BB結合分子であり得る。4-1BB結合分子は、ヒトまたは哺乳動物4-1BBに結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。4-1BBアゴニストまたは4-1BB結合分子は、任意のアイソタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY)、クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2)、またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。4-1BBアゴニストまたは4-1BB結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で 사용되는場合、結合分子という用語は、抗体(全長抗体を含む)、モノクローナル抗体(全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Fab断片、F(ab')断片、Fab発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびに4-1BBに結合する抗体の操作された形態、例えば、scFv分子も含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物に使用するための4-1BBアゴニストには、抗4-1BB抗体、ヒト抗4-1BB抗体、マウス抗4-1BB抗体、哺乳動物抗4-1BB抗体、モノクローナル抗4-1BB抗体、ポリクローナル抗4-1BB抗体、キメラ抗4-1BB抗体、抗4-1BBアドネクチン、抗4-1BBドメイン抗体、一本鎖抗4-1BB断片、重鎖抗4-1BB断片、軽鎖抗4-1BB断片、抗4-1BB融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、またはバイオシミラーが含まれる。アゴニスト抗4-1BB抗体は、強力な免疫応答を誘導することが知られている。Lee, et al., PLOS One 2013, 8, e69677。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、アゴニスト、抗4-1BBヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体(すなわち、単一の細胞株に由来する抗体)である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、EU-101(Eutilex Co. Ltd.)、ウトミルマブ、もしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、もしくはバイオシミラーである。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ウトミルマブもしくはウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、もしくはバイオシミラーである。

【1273】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストまたは4-1BB結合分子は、融合タンパク質である場合もある。いくつかの実施形態では、三量体または六量体4-1BBアゴニスト(3つまたは6つのリガンド結合ドメインを有する)などの多量体4-1BBアゴニストは、典型的に2つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体(4-1BBL)クラスター化及び内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。3つのTNFRSF結合ドメイン及びIgG1-Fcを含み、かつ任意選択でこれらの融合タンパク質のうちの2つ以上をさらに結合する三量体(三価)または六量体(もしくは六価)またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Gieffers, et al., Mol. Cancer Therapeutics 2013,

10

20

30

40

50

12, 2735-47に記載されている。

【1274】

アゴニスト4-1BB抗体及び融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式で4-1BB抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、抗体依存性細胞毒性 (cellular toxicity) (ADCC)、例えば、NK細胞細胞傷害性 (cytotoxicity) を抑制するアゴニスト4-1BBモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、抗体依存性細胞食作用 (ADCP) を抑制するアゴニスト4-1BBモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、補体依存性細胞傷害性 (CDC) を抑制するアゴニスト4-1BBモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、Fc領域機能性を抑制するアゴニスト4-1BBモノクローナル抗体または融合タンパク質である。

10

20

【1275】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒト4-1BB (配列番号40) に結合することを特徴とする。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ヒト4-1BBに結合する結合分子である (配列番号40)。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、マウス4-1BBに結合する結合分子である (配列番号41)。4-1BBアゴニストまたは結合分子が結合する4-1BB抗原のアミノ酸配列を表5に要約する。

【1276】

【表6】

表5. 4-1BB抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号40 ヒト4-1BB、 腫瘍壊死因子受容体 スーパーファミリー、 メンバー9 (ホモサビエンズ)	MGNHCYNIVA TLLVLNFER TRSLQDPCSN CPAGTFCDDN RNQICSPCPP NSFSSAGGQR 60 TCDICRQCKG VFRTRKECSS TSNAECDCTP GFHCLGAGCS MCBQDCKQGG ELTKKGCKDC 120 CFGTFNDQKR GICRPWTNCS LDGKSVLVNG TKERDVVCGP SPADLSPGAS SVTFPPAPARE 180 PGHSPQIISF FLALTSTALL FLLFFLTLEF SVVKRGRKKL LYIFKQPFMR PVQTTQBEDG 240 CSCRFPEEEE GGCEL 255
配列番号41 マウス4-1BB、 腫瘍壊死因子受容体 スーパーファミリー、 メンバー9 (ハツカネズミ)	MGNHCYNVVV IVLLLVGCEK VGAVQNSCDN CQPGTFCRKY NPVCKSCPPS TFSSIGGQPN 60 CNICRVCAGY FRFKKFCSSST HNAECECIEG FHCLGPQCTR CEKDCRPGQE LTKQGCKTCS 120 LGTFNDQNGT GVCRPWTNCS LDGRSVLKTG TTEKDVVCGP PVVSFSPSTT ISVTPEGGPG 180 GHSLQVLTLE LALTSALLLA LIFITLLFSV LKWIRKKFPH IFKQPFKKT GAAQEEDACS 240 CRCPQEEEGG GGGYEL 256

30

40

50

【1277】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス4-1BBに約100 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約90 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約80 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約70 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約60 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約50 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約40 pM以下の K_D で結合する、またはヒトもしくはマウス4-1BBに約30 pM以下の K_D で結合する4-1BBアゴニストを含む。

【1278】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 7.5×10^5 l/M・s以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 7.5×10^5 l/M・s以上の k_{assoc} で結合する、ヒ

トもしくはマウス4-1BBに約 $8 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $8.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $9 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $9.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、またはヒトもしくはマウス4-1BBに約 $1 \times 10^6 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する4-1BBアゴニストを含む。

【1279】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $2 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $2.1 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $2.2 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $2.3 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $2.4 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $2.5 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $2.6 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $2.7 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $2.8 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $2.9 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒトもしくはマウス4-1BBに約 $3 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、4-1BBアゴニストを含む。

【1280】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス及び方法は、ヒトもしくはマウス4-1BBに約10nM以下のIC₅₀で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約9nM以下のIC₅₀で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約8nM以下のIC₅₀で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約7nM以下のIC₅₀で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約6nM以下のIC₅₀で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約5nM以下のIC₅₀で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約4nM以下のIC₅₀で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約3nM以下のIC₅₀で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約2nM以下のIC₅₀で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約1nM以下のIC₅₀で結合する、4-1BBアゴニストを含む。

【1281】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、PF-05082566もしくはMOR-7480としても知られるウトミルマブ、またはその断片、誘導体、バリエーション、もしくはバイオシミラーである。ウトミルマブは、Pfizer, Inc. から入手可能である。ウトミルマブは、免疫グロブリンG2-ガンマ、抗[ホモサピエンスTNFRSF9（腫瘍壊死因子受容体（TNFR）スーパーファミリーメンバー9、4-1BB、T細胞抗原ILA、CD137）]、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウトミルマブのアミノ酸配列を表6に示す。ウトミルマブは、Asn59及びAsn292にグリコシル化部位、22-96位（V_H-V_L）、143-199位（C_H1-C_L）、256-316位（C_H2）、及び362-420位（C_H3）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、22'-87'位（V_H-V_L）及び136'-195'位（C_H1-C_L）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、IgG2Aアイソフォーム218-218、219-219、222-222、及び225-225位、IgG2A/Bアイソフォーム218-130、219-219、222-222、及び225-225位、ならびにIgG2Bアイソフォーム219-130（2）、222-222、及び225-225位に鎖間重鎖-重鎖ジスルフィド架橋、ならびにIgG2Aアイソフォーム130-213'（2）位、IgG2A/Bアイソフォーム218-213'位、及び130-213'位、ならびにIgG2Bアイソフォーム218-213'（2）位に鎖間重鎖-軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウトミルマブならびにそのバリエーション及び断片の調製及び特性は、米国

特許第 8, 821, 867 号、同第 8, 337, 850 号、及び同第 9, 468, 678 号、ならびに国際特許出願公開第 WO2012/032433A1（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。ウトミルマブの前臨床特徴は、Fisher, et al., Cancer Immunolog. & Immunother. 2012, 61, 1721-33 に記載されている。様々な血液学的及び固形腫瘍適応症におけるウトミルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所の clinicaltrials.gov 識別子 NCT02444793、NCT01307267、NCT02315066、及び NCT02554812 が含まれる。

【1282】

いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 42 によって示される重鎖及び配列番号 43 によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、それぞれ、配列番号 42 及び配列番号 43 に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab 断片、一本鎖可変断片 (scFv)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 42 及び配列番号 43 に示される配列と少なくとも 99% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 42 及び配列番号 43 に示される配列と少なくとも 98% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 42 及び配列番号 43 に示される配列と少なくとも 97% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 42 及び配列番号 43 に示される配列と少なくとも 96% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 42 及び配列番号 43 に示される配列と少なくとも 95% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1283】

いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、ウトミルマブの重鎖及び軽鎖 CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニスト重鎖可変領域 (VH) は、配列番号 44 に示される配列を含み、4-1BB アゴニスト軽鎖可変領域 (VL) は、配列番号 45 に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 44 及び配列番号 45 に示される配列と少なくとも 99% 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 44 及び配列番号 45 に示される配列と少なくとも 98% 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 44 及び配列番号 45 に示される配列と少なくとも 97% 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 44 及び配列番号 45 に示される配列と少なくとも 96% 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 44 及び配列番号 45 に示される配列と少なくとも 95% 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 44 及び配列番号 45 に示される配列と少なくとも 99% 同一である VH 領域及び VL 領域を含む scFv 抗体を含む。

【1284】

いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、それぞれ、配列番号 46、配列番号 47、及び配列番号 48 に示される配列を有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 49、配列番号 50、及び配列番号 51 に示される配列を有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【1285】

いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、ウトミルマブに関して薬物規制当

10

20

30

40

50

局によって承認された4-1BBアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して1つ以上の翻訳後修飾を含む4-1BB抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された4-1BBアゴニスト抗体であり、4-1BBアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。4-1BBアゴニスト抗体は、米国FDA及び／または欧州連合EMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウトミルマブである。

10

20

【1286】

【表7】

表6. ウトミルマブに関連する4-1BBアゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 42 ウトミルマブの重鎖	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMGK IYPGDSYTN 60 SPSFQGGVTI SADKSISTAY LQWSSLKASD TAMYYCARGY GIFDYWGQGT LVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS 180 LSSVTVFPSS NFGTQTYTCN VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPFV AGPSVFLFPP 240 KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVSV 300 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL 360 TCLVKGFPYS DIAVEWESNG QPENNYKTP PMLDSGSEFF LYSKLTVDKS RWQGNVFSC 420 SVMHEALHNNH YTKSLSLSP G 441
配列番号 43 ウトミルマブの軽鎖	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGNSNGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGLAVFG GGTCLTVLQ PKAAPSVTLF 120 PPSSEELQAN KATLVCLISD FYPGAVTVAW KADSSPVKAG VETTTPSKQS NNKYAASSYL 180 SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVAP TECS 214
配列番号 44 ウトミルマブの重鎖可変領域	EVQLVQSGAE VKKPGESLRI SCKGSGYSFS TYWISWVRQM PGKGLEWMG K IYPGDSYTN 60 YSPSFQGGVTI SADKSISTA YLQWSSLKAS DTAMYYCARG YGIFDYWGQ GTLTVSS 118
配列番号 45 ウトミルマブの軽鎖可変領域	SYELTQPPSV SVSPGQTASI TCSGDNIGDQ YAHWYQQKPG QSPVLVIYQD KNRPSGIPER 60 FSGNSNGNTA TLTISGTQAM DEADYYCATY TGFGLAVFG GGTCLTVL 108
配列番号 46 ウトミルマブの重鎖 CDR1	STYWIS 6
配列番号 47 ウトミルマブの重鎖 CDR2	KIYPGDSYTN YSPSFQG 17
配列番号 48 ウトミルマブの重鎖 CDR3	RGYGIFDY 8
配列番号 49 ウトミルマブの軽鎖 CDR1	SGDNIGDQYA H 11
配列番号 50 ウトミルマブの軽鎖 CDR2	QDKNRPS 7
配列番号 51 ウトミルマブの軽鎖 CDR3	ATYTGFGSLA V 11

30

40

【1287】

50

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、BMS-663513及び20H4.9.h4aとしても知られるモノクローナル抗体ウレルマブ、またはそれらの断片、誘導体、バリエーション、もしくはバイオシミラーである。ウレルマブは、Bristol Myers Squibb, Inc. 及び Creative Biolabs, Inc. から入手可能である。ウレルマブは、免疫グロブリンG4-カッパ、抗[ホモサピエンスTNFRSF9（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9、4-1BB、T細胞抗原ILA、CD137）]、ホモサピエンス（完全ヒト）モノクローナル抗体である。ウレルマブのアミノ酸配列を表7に示す。ウレルマブは、298位（及び298'）にN-グリコシル化部位、22-95位（V_H-V_L）、148-204位（C_H1-C_L）、262-322位（C_H2）、及び368-426位（C_H3）（22'-95'、148'-204'、262'-322'、及び368'-426'位）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、23'-88'位（V_H-V_L）及び136'-196'位（C_H1-C_L）（23'-88'及び136'-196'位）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、227-227'位及び230-230'位に鎖間重鎖-重鎖ジスルフィド架橋ならびに135-216'及び135'-216'に鎖間重鎖-軽鎖ジスルフィド架橋を含む。ウレルマブならびにそのバリエーション及び断片の調製及び特性は、米国特許第7,288,638号及び同第8,962,804号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ウレルマブの前臨床及び臨床特徴は、Segal, et al., Clin. Cancer Res. 2016に記載されており、<http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1272>で入手可能である。様々な血液学的及び固形腫瘍適応症におけるウレルマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のclinicaltrials.gov識別子NCT01775631、NCT02110082、NCT02253992、及びNCT01471210が含まれる。

【1288】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、配列番号52によって示される重鎖及び配列番号53によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片（scFv）、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列と少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号52及び配列番号53に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1289】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ウレルマブの重鎖及び軽鎖CDRまたは可変領域（VR）を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号54に示される配列を含み、4-1BBアゴニスト軽鎖可変領域（V_L）は、配列番号55に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも99%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも98%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号

54及び配列番号55に示される配列と少なくとも97%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも96%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも95%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、各々が、配列番号54及び配列番号55に示される配列と少なくとも99%同一であるV_H領域及びV_L領域を含むs c F v抗体を含む。

【1290】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、それぞれ、配列番号56、配列番号57、及び配列番号58に示される配列を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号59、配列番号60、及び配列番号61に示される配列を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【1291】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、ウレルマブに関して薬物規制当局によって承認された4-1BBアゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して1つ以上の翻訳後修飾を含む4-1BB抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された4-1BBアゴニスト抗体であり、4-1BBアゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。4-1BBアゴニスト抗体は、米国FDA及び／または欧州連合EMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ウレルマブである。

【1292】

10

20

30

40

50

【表 8】

表 7. ウレルマブに関連する 4-1BB アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 52 ウレルマブの 重鎖	QVQLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFSG GYYWSWIRQS PEKGLEWIGE INHGGYVTYN PSLESRVITIS VDTSKNQFSL KLSSVTAADT AVYYCARDYG PGNYDWYFDL WGRGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGK TYTCNVDEKPT SNTKVDKRV SKYGPCCPFC PAPEFLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSQE DPEVQFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQFNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKGLP SSIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSQEEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSR LTVDKSRWQE GNVFSCSVMH EALENHYTQK SLSLSLGLK	60 120 180 240 300 360 420 448
配列番号 53 ウレルマブの 軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWPPALTF CGGTVKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREKQVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDSTYSLSST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC	60 120 180 216
配列番号 54 ウレルマブの 可変重鎖	MKHLWFFLL LVAAPRWVLSQ VQLQQWGAGL LKPSETLSLT CAVYGGSFSG YYWSWIRQSP EKGLEWIGE NHGGYVTYNP SLESRVITIS DTSKNQFSLK LSSVTAADTA VYYCARDYGP	60 120
配列番号 55 ウレルマブの 可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPDITG EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RFGSGSGGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ	60 110
配列番号 56 ウレルマブの 重鎖 CDR1	GYYS	5
配列番号 57 ウレルマブの 重鎖 CDR2	EINHEGYYTY NPSLES	16
配列番号 58 ウレルマブの 重鎖 CDR3	DYGPNGYDWY FDL	13
配列番号 59 ウレルマブの 軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A	11
配列番号 60 ウレルマブの 軽鎖 CDR2	DASNRAT	7
配列番号 61 ウレルマブの 軽鎖 CDR3	QQRSDWPPAL T	11

【1293】

いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、1D8、3E1or、4B4 (BioLegend 309809)、H4-1BB-M127 (BD Pharmingen 552532)、BBK2 (Thermo Fisher MS621PABX)、145501 (Leinco Technologies B591)、ATCC 番号 HB-11248 として寄託された細胞株によって産生され、米国特許第 6,974,863 号に開示される抗体、5F4 (BioLegend 311503)、C65-485 (BD Pharmingen 559446)、米国特許出願公開第 US2005/0095244 号に開示される抗体、米国特許第 7,288,638 号に開示される抗体 (例えば、20H4.9-IgG1 (BMS-663031))、米国特許第 6,887,673 号に開示される抗体 (例えば、4E9 もしくは BMS-554271)、米国特許第 7,214,493 号に開示される抗体、米国特許第 6,303,121 号に開示される抗体、米国特許第 6,569,997 号に開示される抗体、米国特許第 6,905,685 号に開示される抗体 (例えば、4E9 もしくは BMS-554271)、米国特許第 6,362,325 号に開示される抗体 (例えば、1D8 もしくは BMS-469492、3H3 もしくは BMS-469497、または 3E1)、米国特許第 6,974,863 号に開示される抗体 (例えば、53A2)、米国特許第 6,210,669 号に開示される抗体 (例えば、1D8、3B8、もしくは 3E1)、米国特許第 5,928,893 号に開示される抗体、米国特許第 6,303,121 号に開示される抗体、米国特許第 6,569,997 号に開示される抗体、国際特許出願公開第 WO2012/1777

88号、同第WO2015/119923号、及び同第WO2010/042433号に開示される抗体、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、またはバイオシミラーからなる群から選択され、前述の特許または特許出願公開の各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【1294】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、国際特許出願公開第WO2008/025516A1号、同第WO2009/007120A1号、同第WO2010/003766A1号、同第WO2010/010051A1号、及び同第WO2010/078966A1号、米国特許出願公開第US2011/0027218A1号、同第US2015/0126709A1号、同第US2011/0111494A1号、同第US2015/0110734A1号、及び同第US2015/0126710A1号、ならびに米国特許第9,359,420号、同第9,340,599号、同第8,921,519号、及び同第8,450,460号に記載される4-1BBアゴニスト融合タンパク質であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1295】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、構造I-A（C末端Fc抗体断片融合タンパク質）もしくは構造I-B（N末端Fc抗体断片融合タンパク質）に示されるような4-1BBアゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、コンジュゲート、バリエーション、もしくはバイオシミラーである（図18を参照）。構造I-A及びI-Bにおいて、円筒は、個々のポリペプチド結合ドメインを指す。構造I-A及びI-Bは、例えば、4-1BB L（4-1BBリガンド、CD137リガンド（CD137L））、もしくは腫瘍壊死因子スーパーファミリーメンバー9（TNFSF9）または4-1BBに結合する抗体に由来する3つの直線的に連結されたTNFRSF結合ドメインを含み、これらが折り重なって三価タンパク質を形成し、その後、これがIgG1-Fc（CH3及びCH2ドメインを含む）によって第2の三価タンパク質に連結され、その後、これを使用して、三価タンパク質のうちの2つをジスルフィド結合（小さく長細い楕円）によって一緒に連結し、構造を安定化し、6つの受容体及びシグナル伝達タンパク質の細胞内シグナル伝達ドメインを一緒にして、シグナル伝達複合体を形成することができるアゴニストを提供する。円筒として示されるTNFRSF結合ドメインは、例えば、親水性残基及び柔軟性のためのGly及びSer配列、ならびに溶解性のためのGlu及びLysを含み得るリンカーによって結合されたVH鎖及びVL鎖を含む、scFvドメインであり得る。de Marco, Microbial Cell Factories, 2011, 10, 44、Ahmad, et al., Clin. & Dev. Immunol. 2012, 980250、Monnier, et al., Antibodies, 2013, 2, 193-208、または本明細書の他の場所に組み込まれている参照文献に記載されるものなどの任意のscFvドメイン設計が使用され得る。この形態の融合タンパク質構造は、米国特許第9,359,420号、同第9,340,599号、同第8,921,519号、及び同第8,450,460号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1296】

図18に示される構造I-Aの他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表8に見出される。Fcドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号62のアミノ酸17~230）、完全なヒンジドメイン（配列番号62のアミノ酸1~16）、またはヒンジドメインの一部（例えば、配列番号62のアミノ酸4~16）を含む。C末端Fc抗体を結合するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に好適なリンカーを含む、配列番号63~配列番号72に示される実施形態から選択され得る。

【1297】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 8. C 末端 F c 抗体断片融合タンパク質設計（構造 I - A）を有する、4 - 1 B B アゴニスト融合タンパク質を含む、T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 62 Fc ドメイン	KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLGQDWLNKG EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTLC LVKGFPYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSGGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK	60 120 180 230
配列番号 63 リンカー	GGPGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号 64 リンカー	GGSGSSKSCD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号 65 リンカー	GGPGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
配列番号 66 リンカー	GGSGSSSSSS SKSCDKTHTC PPCPAPE	27
配列番号 67 リンカー	GGPGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号 68 リンカー	GGSGSSSSSS SSSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号 69 リンカー	GGPGSSGSGS SDKTHTCPPC PAPE	24
配列番号 70 リンカー	GGPGSSGSGS DKTHTCPPCP APE	23
配列番号 71 リンカー	GGPSSSGSDK THTCPPCPAP E	21
配列番号 72 リンカー	GGSSSSSSSS GSDKTHTCPP CPAPE	25

10

20

【1 2 9 8】

図 1 8 に示される構造 I - B の他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表 9 に見出される。F c 抗体断片が構造 I - B にあるような T N R F S F 融合タンパク質の N 末端に融合される場合、F c モジュールの配列は、好ましくは、配列番号 7 3 に示されるものであり、リンカー配列は、好ましくは、配列番号 7 4 ~ 配列番号 7 6 に示される実施形態から選択される。

30

【1 2 9 9】

【表 1 0】

表 9. N 末端 F c 抗体断片融合タンパク質設計（構造 I - B）を有する、4 - 1 B B アゴニスト融合タンパク質を含む、T N F R S F アゴニスト融合タンパク質のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 73 Fc ドメイン	METDTLLLV LLLWVPAGNG DKHTCPFCP APPELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNKEYK CKVSNKALPA PIEKTSKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMH EALHNHYTQKS LSLSPG	60 120 180 240 246
配列番号 74 リンカー	SGSGSGSGSG S	11
配列番号 75 リンカー	SSSSSGSGS GS	12
配列番号 76 リンカー	SSSSSGSGS GSGSGS	16

40

【1 3 0 0】

いくつかの実施形態では、構造 I - A または I - B による 4 - 1 B B アゴニスト融合タンパク質は、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、ウレルマブの可変重鎖及び可変軽鎖

50

、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、表 10 に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリエント、及びバイオシミラーからなる群から選択される 1 つ以上の 4-1BB 結合ドメインを含む。

【1301】

いくつかの複合体実施形態では、構造 I-A または I-B による 4-1BB アゴニスト融合タンパク質は、4-1BB L 配列を含む 1 つ以上の 4-1BB 結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による 4-1BB アゴニスト融合タンパク質は、配列番号 77 による配列を含む 1 つ以上の 4-1BB 結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による 4-1BB アゴニスト融合タンパク質は、可溶性 4-1BB L 配列を含む 1 つ以上の 4-1BB 結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による 4-1BB アゴニスト融合タンパク質は、配列番号 78 による配列を含む 1 つ以上の 4-1BB 結合ドメインを含む。

10

【1302】

いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による 4-1BB アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号 43 及び配列番号 44 に示される配列と少なくとも 95% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む s c F v ドメインである 1 つ以上の 4-1BB 結合ドメインを含み、V_H ドメイン及び V_L ドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による 4-1BB アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号 54 及び配列番号 55 に示される配列と少なくとも 95% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む s c F v ドメインである 1 つ以上の 4-1BB 結合ドメインを含み、V_H ドメイン及び V_L ドメインはリンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による 4-1BB アゴニスト融合タンパク質は、各々が、表 10 に示される V_H 配列及び V_L 配列と少なくとも 95% 同一である V_H 配列及び V_L 配列を含む s c F v ドメインである 1 つ以上の 4-1BB 結合ドメインを含み、V_H ドメイン及び V_L ドメインはリンカーによって結合されている。

20

【1303】

30

40

50

【表 1 1】

表 1 0. 融合タンパク質における 4-1BB 結合ドメインとしてまたは
s c F v 4-1BB アゴニスト抗体として有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 77 4-1BBL	MEYASDASLD PEAPWPPAPR ARACRVLPWA LVAGLLLLLL LAAACAVFLA CPWAVSGARA 60 SPGSAASPRL REGPELSPDD PAGLLDLRQC MFAQLVAQNV LLIDGPLSWY SDPGLAGVSL 120 TGGLSYKEDT KELVVAKAGV YYVFFQLELR RVVAGEGSGS VSLALHLQPL RSAAGAAALA 180 LTVDLPPASS EARNSAFGFQ GRLLHLSAGQ RLGVELHTEA RARHAWQLTQ GATVLGLFRV 240 TPEIPAGLPS PRSE 254
配列番号 78 4-1BBL 可溶性 ドメイン	LRQGMFAQLV AQNVLLIDGP LSWYSDPGLA GVSLTGGLSY KEDTKELVVA KAGVYYVFFQ 60 LELRVVAGE GSGSVSLALH LQPLRSAAGA AALALTVDLP PASSEARNSA FGFQGRLLHL 120 SAGQRLGVHL HTEARARHAW QLTQGATVLG LFRVTPEIPA GLPSRSE 168
配列番号 79 4B4-1-1 バージョン 1 の 可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVS 118
配列番号 80 4B4-1-1 バージョン 1 の 可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGGIPS 60 RFGSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVVYQCQD GHSFPPTFGG GTKLEIK 107
配列番号 81 4B4-1-1 バージョン 2 の 可変重鎖	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFS SYWMHWVKQR PGQVLEWIGE INPGNGHTNY 60 NEKFKSKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARSF TTARGFAYWG QGTLVTVSA 119
配列番号 82 4B4-1-1 バージョン 2 の 可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQQKS HESPRLLIKY ASQSIGGIPS 60 RFGSGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVVYQCQD GHSFPPTFGG GTKLEIKR 108
配列番号 83 H39E3-2 の 可変重鎖	MDWTRILFL VAAATGAHSE VQLVESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSD YWMSWVRQAP 60 KGKLEWVADI KNDGSYTNYA PSLTNRFTIS RDNAKNSLYL QMNSLRABDT AVYYCARELT 120
配列番号 84 H39E3-2 の 可変軽鎖	MEAPAQLLFL LLLWLPTDTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSLL SSGNQKNYL 60 WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA 110

10

20

【1 3 0 4】

いくつか実施形態では、4-1BB アゴニストは、(i) 第 1 の可溶性 4-1BB 結合ドメイン、(ii) 第 1 のペプチドリンカー、(iii) 第 2 の可溶性 4-1BB 結合ドメイン、(iv) 第 2 のペプチドリンカー、及び (v) 第 3 の可溶性 4-1BB 結合ドメインを含む 4-1BB アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、N 末端及び／または C 末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、Fab または Fc 断片ドメインである。いくつか実施形態では、4-1BB アゴニストは、(i) 第 1 の可溶性 4-1BB 結合ドメイン、(ii) 第 1 のペプチドリンカー、(iii) 第 2 の可溶性 4-1BB 結合ドメイン、(iv) 第 2 のペプチドリンカー、及び (v) 第 3 の可溶性 4-1BB 結合ドメインを含む 4-1BB アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、N 末端及び／または C 末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、Fab または Fc 断片ドメインであり、可溶性 4-1BB ドメインは各々、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜ま

30

40

【1 3 0 5】

いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、(i) 第 1 の可溶性腫瘍壊死因子 (TNF) スーパーファミリーサイトカインドメイン、(ii) 第 1 のペプチドリンカー、(iii) 第 2 の可溶性 TNF スーパーファミリーサイトカインドメイン、(iv) 第 2 のペプチドリンカー、及び (v) 第 3 の可溶性 TNF スーパーファミリーサイトカインドメインを含む 4-1BB アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性 TNF スーパーファミリーサイトカインドメインは各々、茎領域を欠き、第 1 及び第 2 のペプチドリンカーは独立して、3～8 アミノ酸長であり、各 TNF スーパーファミリーサイトカイン

50

ドメインは、4-1BB結合ドメインである。

【1306】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、前述のV_Lドメインのうちのいずれかに連結された前述のV_Hドメインのうちのいずれかを含む4-1BBアゴニストscFv抗体である。

【1307】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、BPS Bioscience (San Diego, CA, USA) から市販されているBPS Bioscience 4-1BBアゴニスト抗体カタログ番号79097-2である。いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、Creative Biolabs (Shirley, NY, USA) から市販されているCreative Biolabs 4-1BBアゴニスト抗体カタログ番号MOM-18179である。

10

【1308】

3. OX40 (CD134) アゴニスト

いくつかの実施形態では、TNFRSFアゴニストは、OX40 (CD134) アゴニストである。OX40アゴニストは、当該技術分野で知られている任意のOX40結合分子であり得る。OX40結合分子は、ヒトまたは哺乳動物OX40に結合することができるモノクローナル抗体または融合タンパク質であり得る。OX40アゴニストまたはOX40結合分子は、任意のアイソタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、及びIgY）、クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、及びIgA2）、またはサブクラスの免疫グロブリン分子の免疫グロブリン重鎖を含み得る。OX40アゴニストまたはOX40結合分子は、重鎖及び軽鎖の両方を有し得る。本明細書で使用される場合、結合分子という用語は、抗体（全長抗体を含む）、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、ヒト、ヒト化またはキメラ抗体、及び抗体断片、例えば、Fab断片、F(ab')断片、Fab発現ライブラリーによって産生された断片、上記のうちのいずれかのエピトープ結合断片、ならびにOX40に結合する抗体の操作された形態、例えば、scFv分子も含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、完全ヒト抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、ヒト化抗体である抗原結合タンパク質である。いくつかの実施形態では、本明細書に開示される方法及び組成物に使用するためのOX40アゴニストには、抗OX40抗体、ヒト抗OX40抗体、マウス抗OX40抗体、哺乳動物抗OX40抗体、モノクローナル抗OX40抗体、ポリクローナル抗OX40抗体、キメラ抗OX40抗体、抗OX40アドネクチン、抗OX40ドメイン抗体、一本鎖抗OX40断片、重鎖抗OX40断片、軽鎖抗OX40断片、抗OX40融合タンパク質、及びそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、またはバイオシミラーが含まれる。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、アゴニスト、抗OX40ヒト化、または完全ヒトモノクローナル抗体（すなわち、単一の細胞株に由来する抗体）である。

20

30

【1309】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストまたはOX40結合分子は、融合タンパク質である場合もある。OX40Lに融合されたFcドメインを含むOX40融合タンパク質は、例えば、Sadun, et al., J. Immunother. 2009, 182, 1481-89に記載されている。いくつかの実施形態では、三量体または六量体OX40アゴニスト（3つまたは6つのリガンド結合ドメインを有する）などの多量体OX40アゴニストは、典型的に2つのリガンド結合ドメインを有するアゴニストモノクローナル抗体と比較して、優れた受容体（OX40L）クラスター化及び内部細胞シグナル伝達複合体形成を誘導し得る。3つのTNFRSF結合ドメイン及びIgG1-Fcを含み、かつ任意選択でこれらの融合タンパク質のうちの2つ以上をさらに結合する三量体（三価）または六量体（もしくは六価）またはそれ以上の融合タンパク質は、例えば、Giffers, et al., Mol. Cancer Therapeutics 20

40

50

13, 12, 2735-47に記載されている。

【1310】

アゴニストOX40抗体及び融合タンパク質は、強い免疫応答を誘導することが知られている。Curti, et al., Cancer Res. 2013, 73, 7189-98。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式でOX40抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、抗体依存性細胞毒性 (cellular toxicity) (ADCC)、例えば、NK細胞細胞傷害性 (cytotoxicity) を抑制するアゴニストOX40モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、抗体依存性細胞食作用 (ADCP) を抑制するアゴニストOX40モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、補体依存性細胞傷害性 (CDC) を抑制するアゴニストOX40モノクローナル抗体または融合タンパク質である。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Fc領域機能性を抑制するアゴニストOX40モノクローナル抗体または融合タンパク質である。

10

20

【1311】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒトOX40 (配列番号85) に結合することの特徴とする。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、ヒトOX40に結合する結合分子である (配列番号85)。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、マウスOX40に結合する結合分子である (配列番号86)。OX40アゴニストまたは結合分子が結合するOX40抗原のアミノ酸配列を表11に要約する。

【1312】

【表12】

表11. OX40抗原のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 85 ヒト OX40 (ホモサビエンズ)	MCVGARRLGR GPCAAALLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSG 60
	NTVCRPCGPG FYNDVVSSKP CKPCTWCNLR SGSEKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK 120
	PGVDCAPCPG GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPOETQ 180
	GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL 240
	RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEEQADA HSTLAKI 277
配列番号 86 マウス OX40 (ハツカネズミ)	MYVWVQQPTA LLLGLTLGV TARRLNCVKH TYPSEGHKCCR ECQPGHGMVS RCDHTRDTLC 60
	HPCETGFYNE AVNYDTCKQC TQCNHRSGSE LKQNCPTPTQD TVRCRCRPGTQ PRQDSGYKLG 120
	VDCVPCPPGH FSPGNQACK PWTNCTLSGK QTRHPASDSL DAVCEDRSLI ATLLWETQRP 180
	TFRPTTVQST TVWPRTSELP SPPTLVTPPEG PAFVLLGLG LGLLAPLTVL LALYLLRKAW 240
	RLPNTPKPCW GNSFRTPIQE EHTDAHFTLA KI 272

30

40

50

【1313】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスOX40に約100 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約90 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約80 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約70 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約60 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約50 pM以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約40 pM以下の K_D で結合する、またはヒトもしくはマウスOX40に約30 pM以下の K_D で結合するOX40アゴニストを含む。

【1314】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスOX40に約 7.5×10^5 l/M・s以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 7.5×10^5 l/M・s以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 8×10^5 l/M・s以上の k_{assoc} で結合する、ヒトも

しくはマウスOX40に約 $8.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $9 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $9.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、またはヒトもしくはマウスOX40に約 $1 \times 10^6 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合するOX40アゴニストを含む。

【1315】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.1 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.2 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.3 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.4 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.5 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.6 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.7 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.8 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約 $2.9 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒトもしくはマウスOX40に約 $3 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、OX40アゴニストを含む。

【1316】

いくつかの実施形態では、記載される組成物、プロセス、及び方法は、ヒトもしくはマウスOX40に約10nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約9nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約8nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約7nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約6nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約5nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約4nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約3nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約2nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウスOX40に約1nM以下の IC_{50} で結合する、OX40アゴニストを含む。

【1317】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、MED10562またはMED10562としても知られるタボリキシズマブである。タボリキシズマブは、AstraZeneca, Inc.の子会社であるMedImmuneから入手可能である。タボリキシズマブは、免疫グロブリンG1-カッパ、抗[ホモサピエンスTNFRSF4（腫瘍壊死因子受容体（TNFR）スーパーファミリーメンバー4、OX40、CD134）]、ヒト化及びキメラモノクローナル抗体である。タボリキシズマブのアミノ酸配列を表12に示す。タボリキシズマブは、301及び301'位にN-グリコシル化部位（フコシル化複合二分岐CHO型グリカンを含む）、22-95位（ V_H - V_L ）、148-204位（ C_H1 - C_L ）、265-325位（ C_H2 ）、及び371-429位（ C_H3 ）（及び22'-95'、148'-204'、265'-325'、及び371'-429'位）に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、23'-88'位（ V_H - V_L ）及び134'-194'位（ C_H1 - C_L ）（及び23'''-88'''及び134'''-194'''位）に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、230-230"及び233-233"位に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、ならびに224-214'及び224'-214'に鎖間重鎖-軽鎖ジスルフィド架橋を含む。様々な固形腫瘍適応症におけるタボリキシズマブの現在の臨床試験には、米国国立衛生研究所のclinicaltrials.gov識別子NCT02318394及びNCT02705482が含まれる。

【1318】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号87によって示される重鎖及び配列番号88によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴ

10

20

30

40

50

ニストは、それぞれ、配列番号 87 及び配列番号 88 に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、F a b 断片、一本鎖可変断片 (s c F v)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 87 及び配列番号 88 に示される配列と少なくとも 99 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 87 及び配列番号 88 に示される配列と少なくとも 98 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 87 及び配列番号 88 に示される配列と少なくとも 97 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 87 及び配列番号 88 に示される配列と少なくとも 96 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 87 及び配列番号 88 に示される配列と少なくとも 95 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

10

【1319】

いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニストは、タボリキシズマブの重鎖及び軽鎖 C D R または可変領域 (V R) を含む。いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニスト重鎖可変領域 (V H) は、配列番号 89 に示される配列を含み、O X 40 アゴニスト軽鎖可変領域 (V L) は、配列番号 90 に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 89 及び配列番号 90 に示される配列と少なくとも 99 % 同一である V H 領域及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 89 及び配列番号 90 に示される配列と少なくとも 98 % 同一である V H 領域及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 89 及び配列番号 90 に示される配列と少なくとも 97 % 同一である V H 領域及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 89 及び配列番号 90 に示される配列と少なくとも 96 % 同一である V H 領域及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 89 及び配列番号 90 に示される配列と少なくとも 95 % 同一である V H 領域及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニストは、各々が、配列番号 89 及び配列番号 90 に示される配列と少なくとも 99 % 同一である V H 領域及び V L 領域を含む s c F v 抗体を含む。

20

30

【1320】

いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニストは、それぞれ、配列番号 91、配列番号 92、及び配列番号 93 に示される配列を有する重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 94、配列番号 95、及び配列番号 96 に示される配列を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【1321】

いくつかの実施形態では、O X 40 アゴニストは、タボリキシズマブに関して薬物規制当局によって承認された O X 40 アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも 97 % の配列同一性、例えば、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して 1 つ以上の翻訳後修飾を含む O X 40 抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された O X 40 アゴニスト抗体であり、O X 40 アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。O X 40 アゴニスト抗体は、米国 F D A 及び／または欧州連合 E M A などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオ

40

50

シミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、タボリキシズマブである。

【1322】

【表13】

表12. タボリキシズマブに関連するOX40アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)					
配列番号 87 タボリキシズマブの重鎖	QVQLQESGPG LVKPSQTLSTL TCAVYGGSFSGYWNWIRKH PGKGLLEYIGY ISYNGITYHN	60	PSLKSRLTIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WQGGTLVTVS	120	SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS	180
	SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRVE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG	240	GPSVFLPPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY	300	NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE	360
	EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR	420	WQQGNVFSKS VMHEALENHY TQKSLSLSPG K	451		
配列番号 88 タボリキシズマブの軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQDIS NYLNWYQQKF GKAPKLLIY TSKLHSGVPS	60	RFGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQG GSALPWTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP	120	SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSLT	180
	LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGE	214				
配列番号 89 タボリキシズマブの重鎖可変領域	QVQLQESGPG LVKPSQTLSTL TCAVYGGSFSGYWNWIRKH PGKGLLEYIGY ISYNGITYHN	60	PSLKSRLTIN RDTSKNQYSL QLNSVTPEDT AVYYCARYKY DYDGGHAMDY WQGGTLVTVS	118		
配列番号 90 タボリキシズマブの軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQDIS NYLNWYQQKF GKAPKLLIY TSKLHSGVPS	60	RFGSGSGTD YTLTISSLQP EDFATYYCQG GSALPWTFGQ GTKVEIKR	108		
配列番号 91 タボリキシズマブの重鎖 CDR1	GSFSSGYWN	9				
配列番号 92 タボリキシズマブの重鎖 CDR2	YIGYISYNGI TYH	13				
配列番号 93 タボリキシズマブの重鎖 CDR3	RYKYDYDGGH AMDY	14				
配列番号 94 タボリキシズマブの軽鎖 CDR1	QDISNYLN	8				
配列番号 95 タボリキシズマブの軽鎖 CDR2	LLIYYTSKLE S	11				
配列番号 96 タボリキシズマブの軽鎖 CDR3	QQGSALEW	8				

【1323】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Pfizer, Inc. から入手可能な完全ヒト抗体である11D4である。11D4の調製及び特性は、米国特許第7,960,515号、同第8,236,930号、及び同第9,028,824号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。11D4のアミノ酸配列を表13に示す。

【1324】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号97によって示される重鎖及び配列番号98によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、それぞれ、配列番号97及び配列番号98に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片(scFv)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、

それぞれ、配列番号 97 及び配列番号 98 に示される配列と少なくとも 99 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 97 及び配列番号 98 に示される配列と少なくとも 98 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 97 及び配列番号 98 に示される配列と少なくとも 97 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 97 及び配列番号 98 に示される配列と少なくとも 96 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 97 及び配列番号 98 に示される配列と少なくとも 95 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1325】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、11D4 の重鎖及び軽鎖 CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニスト重鎖可変領域 (VH) は、配列番号 99 に示される配列を含み、OX40 アゴニスト軽鎖可変領域 (VL) は、配列番号 100 に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 99 及び配列番号 100 に示される配列と少なくとも 99 % 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 99 及び配列番号 100 に示される配列と少なくとも 98 % 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 99 及び配列番号 100 に示される配列と少なくとも 97 % 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 99 及び配列番号 100 に示される配列と少なくとも 96 % 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 99 及び配列番号 100 に示される配列と少なくとも 95 % 同一である VH 領域及び VL 領域を含む。

【1326】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、それぞれ、配列番号 101、配列番号 102、及び配列番号 103 に示される配列を有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 104、配列番号 105、及び配列番号 106 に示される配列を有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【1327】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、11D4 に関して薬物規制当局によって承認された OX40 アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも 97 % の配列同一性、例えば、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して 1 つ以上の翻訳後修飾を含む OX40 抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、11D4 である。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された OX40 アゴニスト抗体であり、OX40 アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、11D4 である。OX40 アゴニスト抗体は、米国 FDA 及び／または欧州連合 EMA などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、11D4 である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製

10

20

30

40

50

品は、１１Ｄ４である。

【１３２８】

【表１４】

表１３．１１Ｄ４に関連するＯＸ４０アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 97 11D4 の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVS Y ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRD NAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLF D YWGQ GTLVTVSSAS 120 TKGPSVFPLA PCSRSTSEST AALGCLVKDY FPEFVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL 180 YSLSSVVTVP SSNFGTQTYT CNVDHKPSNT KVDKTVKRC CVECPPCPAP PVAGPSVFLF 240 PPKPKDTLMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYVDGVE VHNAKTKPRE EQFNSTFRV 300 SVLT VVHQDW LNGKEYKCKV SNKGLPAPIE KTISKTKGQP REPQVYTLPP SREEMTKNQV 360 SLTCLVKGFY PSDIAVEWES NGQPENNYKT TTPMLDSGGS FFLYSLKLTVD KSRWQQGNVF 420 SCSVMEALH NHYTQKSLSL SPGK 444
配列番号 98 11D4 の軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQK E KAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQ YNSYPPTFGG GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC 214
配列番号 99 11D4 の重鎖 可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVS Y ISSSSSTIDY 60 ADSVKGRFTI SRD NAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARES GWYLF D YWGQ GTLVTVSS 118
配列番号 100 11D4 の軽鎖 可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQK E KAPKSLIYA ASSLQSGVPS 60 RFGSGSGSTD FTLTISSLQP EDFATYYCQ YNSYPPTFGG GTKVEIK 107
配列番号 101 11D4 の重鎖 CDR1	SYSMN 5
配列番号 102 11D4 の重鎖 CDR2	YISSSSSTID YADSVKG 17
配列番号 103 11D4 の重鎖 CDR3	ESGWYLF D Y 9
配列番号 104 11D4 の軽鎖 CDR1	RASQGISSWL A 11
配列番号 105 11D4 の軽鎖 CDR2	AASSLQS 7
配列番号 106 11D4 の軽鎖 CDR3	QQYNSYPPT 9

10

20

30

【１３２９】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、Pfizer, Inc. から入手可能な完全ヒト抗体である１８Ｄ８である。１８Ｄ８の調製及び特性は、米国特許第 7, 960, 515 号、同第 8, 236, 930 号、及び同第 9, 028, 824 号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。１８Ｄ８のアミノ酸配列を表 14 に示す。

【１３３０】

いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、配列番号 107 によって示される重鎖及び配列番号 108 によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、それぞれ、配列番号 107 及び配列番号 108 に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab 断片、一本鎖可変断片 (scFv)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 107 及び配列番号 108 に示される配列と少なくとも 99 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 107 及び配列番号 108 に示される配列と少なくとも 98 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 107 及び配列番号 108 に示される配列と少なくとも 97 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＯＸ４０アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 107 及び配列番号 108 に示される配列と少なくとも 96 % 同一

40

50

である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号107及び配列番号108に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1331】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、18D8の重鎖及び軽鎖CDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニスト重鎖可変領域(VH)は、配列番号109に示される配列を含み、OX40アゴニスト軽鎖可変領域(VL)は、配列番号110に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号109及び配列番号110に示される配列と少なくとも99%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号109及び配列番号110に示される配列と少なくとも98%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号109及び配列番号110に示される配列と少なくとも97%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号109及び配列番号110に示される配列と少なくとも96%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号109及び配列番号110に示される配列と少なくとも95%同一であるVH領域及びVL領域を含む。

10

【1332】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、それぞれ、配列番号111、配列番号112、及び配列番号113に示される配列を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号114、配列番号115、及び配列番号116に示される配列を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

20

【1333】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、18D8に関して薬物規制当局によって承認されたOX40アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して1つ以上の翻訳後修飾を含むOX40抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、18D8である。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたOX40アゴニスト抗体であり、OX40アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、18D8である。OX40アゴニスト抗体は、米国FDA及び／または欧州連合EMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、18D8である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、18D8である。

30

40

【1334】

50

【表 1 5】

表 1 4. 1 8 D 8 に関連する O X 4 0 アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 107 18D8 の重鎖	EVQLVESGGG LVQFGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTIV 120 TVSSASTKGP SVFPLAPCSR STSESTAALG CLVKDYFPEP VTSWNSGAL TSGVHTFPAV 180 LQSSGLYSLS SVVTVPSSNF GTQTYTCNVD HKPSNTKVDK TVERKCCVEC PPCPAPPVAG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN 300 STFRVVSFLT VVHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPAPIEKTIS KTKGQPREPQ VYTLPPSREE 360 MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPM LDSDGSPFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MHEALHNYHT QKSLSLSPGK 450
配列番号 108 18D8 の軽鎖	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQK RSNWPTFGQG TKVEIKRTVA APSVFIFPPS 120 DEQLKSGTAS VVCLLNNFYP REAKVQWKVD NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL 180 SKADYEKKKV YACEVTHQGL SSPVTKSFNR GEC 213
配列番号 109 18D8 の重鎖 可変領域	EVQLVESGGG LVQFGRSLRL SCAASGFTFD DYAMHWVRQA PGKGLEWVSG ISWNSGSIGY 60 ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRAED TALYYCAKDQ STADYYFYYG MDVWGQGTIV 120 TVSS 124
配列番号 110 18D8 の軽鎖 可変領域	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQK RSNWPTFGQG TKVEIK 106
配列番号 111 18D8 の重鎖 CDR1	DYAMH 5
配列番号 112 18D8 の重鎖 CDR2	GISWNSGSIG YADSVKG 17
配列番号 113 18D8 の重鎖 CDR3	DQSTADYYFY YGMDV 15
配列番号 114 18D8 の軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A 11
配列番号 115 18D8 の軽鎖 CDR2	DASNRAT 7
配列番号 116 18D8 の軽鎖 CDR3	QQRSNWPT 8

10

20

30

【1 3 3 5】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、G l a x o S m i t h K l i n e p l c . から入手可能なヒト化抗体である H u 1 1 9 - 1 2 2 である。H u 1 1 9 - 1 2 2 の調製及び特性は、米国特許第 9 , 0 0 6 , 3 9 9 号及び同第 9 , 1 6 3 , 0 8 5 号、ならびに国際特許公開第 W O 2 0 1 2 / 0 2 7 3 2 8 号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。H u 1 1 9 - 1 2 2 のアミノ酸配列を表 1 5 に示す。

【1 3 3 6】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、H u 1 1 9 - 1 2 2 の重鎖及び軽鎖 C D R または可変領域 (V R) を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニスト重鎖可変領域 (V _H) は、配列番号 1 1 7 に示される配列を含み、O X 4 0 アゴニスト軽鎖可変領域 (V _L) は、配列番号 1 1 8 に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 7 及び配列番号 1 1 8 に示される配列と少なくとも 9 9 % 同一である V _H 領域及び V _L 領域を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 7 及び配列番号 1 1 8 に示される配列と少なくとも 9 8 % 同一である V _H 領域及び V _L 領域を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 7 及び配列番号 1 1 8 に示される配列と少なくとも 9 7 % 同一である V _H 領域及び V _L 領域を含む。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 7 及び配列番号 1 1 8 に示される配列と少なくとも 9 6 % 同一である

40

50

V_H領域及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号117及び配列番号118に示される配列と少なくとも95%同一であるV_H領域及びV_L領域を含む。

【1337】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、それぞれ、配列番号119、配列番号120、及び配列番号121に示される配列を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号122、配列番号123、及び配列番号124に示される配列を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【1338】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Hu119-122に関して薬物規制当局によって承認されたOX40アゴニストバイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して1つ以上の翻訳後修飾を含むOX40抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、Hu119-122である。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出されたOX40アゴニスト抗体であり、OX40アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、Hu119-122である。OX40アゴニスト抗体は、米国FDA及び／または欧州連合EMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Hu119-122である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Hu119-122である。

【1339】

10

20

30

40

50

【表 16】

表 15. Hu119-122 に関連する OX40 アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)	
配列番号 117 Hu119-122 の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKGLVAA INSDGGSTYY PDTMERRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVSS	60 120
配列番号 118 Hu119-122 の 軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHY QKPGQAPRL LIYLAASLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号 119 Hu119-122 の 重鎖 CDR1	SHDMS	5
配列番号 120 Hu119-122 の 重鎖 CDR2	AINSDGGSTY YPDTMER	17
配列番号 121 Hu119-122 の 重鎖 CDR3	HYDDYYAWFA Y	11
配列番号 122 Hu119-122 の 軽鎖 CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
配列番号 123 Hu119-122 の 軽鎖 CDR2	LASNLES	7
配列番号 124 Hu119-122 の 軽鎖 CDR3	QHSRELPLT	9

10

20

【1340】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、GlaxoSmithKline plc. から入手可能なヒト化抗体である Hu106-222 である。Hu106-222 の調製及び特性は、米国特許第 9,006,399 号及び同第 9,163,085 号、ならびに国際特許公開第 WO2012/027328 号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。Hu106-222 のアミノ酸配列を表 16 に示す。

30

【1341】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、Hu106-222 の重鎖及び軽鎖 CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニスト重鎖可変領域 (V_H) は、配列番号 125 に示される配列を含み、OX40 アゴニスト軽鎖可変領域 (V_L) は、配列番号 126 に示される配列、及びその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 125 及び配列番号 126 に示される配列と少なくとも 99% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 125 及び配列番号 126 に示される配列と少なくとも 98% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 125 及び配列番号 126 に示される配列と少なくとも 97% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 125 及び配列番号 126 に示される配列と少なくとも 96% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 125 及び配列番号 126 に示される配列と少なくとも 95% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。

40

【1342】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、それぞれ、配列番号 127、配列番号 128、及び配列番号 129 に示される配列を有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 130、配

50

列番号 131、及び配列番号 132 に示される配列を有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、ならびにそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。

【1343】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、Hu106-222 に関して薬物規制当局によって承認された OX40 アゴニスト バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーモノクローナル抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列と少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99% または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ参照医薬品または参照バイオ製品と比較して 1 つ以上の翻訳後修飾を含む OX40 抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、Hu106-222 である。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可されたまたは認可を得るために提出された OX40 アゴニスト抗体であり、OX40 アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、Hu106-222 である。OX40 アゴニスト抗体は、米国 FDA 及び／または欧州連合 EMA などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Hu106-222 である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、Hu106-222 である。

【1344】

【表 17】

表 16. Hu106-222 に関連する OX40 アゴニスト抗体のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 125 Hu106-222 の 重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWRQA PGQGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISLKAED TAVYYCANPY YDYVSYAMD YWGQGTSTTV 120 SS 122
配列番号 126 Hu106-222 の 軽鎖可変領域	DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT TCKASQDVS TAVAWYQQKPK GKAPKLLIYS ASYLYTGVPS 60 RFSGSGSGTD FTFTISLLQP EDIATYYCQQ HYSTPRTFGQ GTKLEIK 107
配列番号 127 Hu106-222 の 重鎖 CDR1	DYSMH 5
配列番号 128 Hu106-222 の 重鎖 CDR2	WINTETGEPT YADDFKG 17
配列番号 129 Hu106-222 の 重鎖 CDR3	PYYDYVSYA MDY 13
配列番号 130 Hu106-222 の 軽鎖 CDR1	KASQDVSTAV A 11
配列番号 131 Hu106-222 の 軽鎖 CDR2	SASYLYT 7
配列番号 132 Hu106-222 の 軽鎖 CDR3	QQHYSTPRT 9

【1345】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニスト抗体は、MEDI6469 (9B12 と称される) である。MEDI6469 は、マウスモノクローナル抗体である。Weinberg, et al., J. Immunother. 2006, 29, 575-585

。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Weinberg, et al., J. Immunother. 2006, 29, 575-585に記載されているように、Biovest Inc. (Malvern, MA, USA) に寄託された9B12ハイブリドーマによって産生された抗体であり、その開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗体は、MEDI6469のCDR配列を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、MEDI6469の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。

【1346】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、L106 BD (Pharming en製品番号340420) である。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、抗体L106 (BD Pharmingen製品番号340420) のCDRを含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、抗体L106 (BD Pharmingen製品番号340420) の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、ACT35 (Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号20073) である。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、抗体ACT35 (Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号20073) のCDRを含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、抗体ACT35 (Santa Cruz Biotechnology、カタログ番号20073) の重鎖可変領域配列及び／または軽鎖可変領域配列を含む。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、InVivoMab、BioXcell Inc (West Lebanon, NH) から市販されているマウスモノクローナル抗体抗mCD134/mOX40 (クローンOX86) である。

【1347】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、国際特許出願公開第WO95/12673号、同第WO95/21925号、同第WO2006/121810号、同第WO2012/027328号、同第WO2013/028231号、同第WO2013/038191号、及び同第WO2014/148895号、欧州特許出願第EP0672141号、米国特許出願公開第US2010/136030号、同第US2014/377284号、同第US2015/190506号、及び同第US2015/132288号 (クローン20E5及び12H3を含む)、ならびに米国特許第7,504,101号、同第7,550,140号、同第7,622,444号、同第7,696,175号、同第7,960,515号、同第7,961,515号、同第8,133,983号、同第9,006,399号、及び同第9,163,085号に記載されるOX40アゴニストから選択され、その各々の開示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【1348】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、構造I-A (C末端Fc抗体断片融合タンパク質) もしくは構造I-B (N末端Fc抗体断片融合タンパク質) に示されるOX40アゴニスト融合タンパク質、またはそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、もしくはバイオシミラーである。構造I-A及びI-Bの特性は、上記及び米国特許第9,359,420号、同第9,340,599号、同第8,921,519号、及び同第8,450,460号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。図18に示される構造I-Aのポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表9に見出される。Fcドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン (配列番号62のアミノ酸17~230)、完全なヒンジドメイン (配列番号62のアミノ酸1~16)、またはヒンジドメインの一部 (例えば、配列番号62のアミノ酸4~16) を含む。C末端Fc抗体を結合するための好ましいリンカーは、追加のポリペプチドの融合に好適なリンカーを含む、配列番号63~配列番号72に示される実施形態から選択され得る。同様に、図18に示される構造I-Bのポリペプチドドメインのアミノ酸配列は、表10に見出される。Fc抗体断片が構造I-BにあるようなTNRF5F融合タンパク質のN末端に融合される場合、Fcモジュールの配列は、好ましくは、配列番号73に示されるものであり、

リンカー配列は、好ましくは、配列番号 74～配列番号 76 に示される実施形態から選択される。

【1349】

いくつかの複合体実施形態では、構造 I-A または I-B による OX40 アゴニスト融合タンパク質は、タボリキシズマブの可変重鎖及び可変軽鎖、11D4 の可変重鎖及び可変軽鎖、18D8 の可変重鎖及び可変軽鎖、Hu119-122 の可変重鎖及び可変軽鎖、Hu106-222 の可変重鎖及び可変軽鎖、表 17 に記載の可変重鎖及び可変軽鎖から選択される可変重鎖及び可変軽鎖、前述の可変重鎖及び可変軽鎖の任意の組み合わせ、ならびにそれらの断片、誘導体、複合体、バリエーション、及びバイオシミラーからなる群から選択される 1 つ以上の OX40 結合ドメインを含む。

10

【1350】

いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による OX40 アゴニスト融合タンパク質は、OX40L 配列を含む 1 つ以上の OX40 結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による OX40 アゴニスト融合タンパク質は、配列番号 133 による配列を含む 1 つ以上の OX40 結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による OX40 アゴニスト融合タンパク質は、可溶性 OX40L 配列を含む 1 つ以上の OX40 結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による OX40 アゴニスト融合タンパク質は、配列番号 134 による配列を含む 1 つ以上の OX40 結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による OX40 アゴニスト融合タンパク質は、配列番号 135 による配列を含む 1 つ以上の OX40 結合ドメインを含む。

20

【1351】

いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による OX40 アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号 89 及び配列番号 90 に示される配列と少なくとも 95% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む scFv ドメインである 1 つ以上の OX40 結合ドメインを含み、V_H ドメイン及び V_L ドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による OX40 アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号 99 及び配列番号 100 に示される配列と少なくとも 95% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む scFv ドメインである 1 つ以上の OX40 結合ドメインを含み、V_H ドメイン及び V_L ドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による OX40 アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号 109 及び配列番号 110 に示される配列と少なくとも 95% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む scFv ドメインである 1 つ以上の OX40 結合ドメインを含み、V_H ドメイン及び V_L ドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による OX40 アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号 127 及び配列番号 128 に示される配列と少なくとも 95% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む scFv ドメインである 1 つ以上の OX40 結合ドメインを含み、V_H ドメイン及び V_L ドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による OX40 アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号 125 及び配列番号 126 に示される配列と少なくとも 95% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む scFv ドメインである 1 つ以上の OX40 結合ドメインを含み、V_H ドメイン及び V_L ドメインは、リンカーによって結合されている。いくつかの実施形態では、構造 I-A または I-B による OX40 アゴニスト融合タンパク質は、各々が、表 17 に示される V_H 配列及び V_L 配列と少なくとも 95% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む scFv ドメインである 1 つ以上の OX40 結合ドメインを含み、V_H ドメイン及び V_L ドメインはリンカーによって結合されている。

30

40

【1352】

50

【表 18 - 1】

表 17. 融合タンパク質（例えば、構造 I-A 及び I-B）における OX40 結合ドメインとしてまたは s c F v OX40 アゴニスト抗体ドメインとして有用な追加のポリペプチドドメイン。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 133 OX40L	MERVQPLEEN VGNAARPRFE RNKLLVASV EQGLGLLLCF TYICLHFSAL QVSHRYPERIQ 60 SIKVQFTTEYK KBKGFILTSQ KEDBIMKVQN NSVIINCDF YLISLKGYS QBVNISLHYQ 120 KDBBFLFQLK KVRSVNSLMV ASLTYKDKVY LNVTTDNTSL DDHVNGBGL ILIHQNPGBF 180 CVL 183
配列番号 134 OX40L 可溶性 ドメイン	SHRYPRIQSE KVQFTBYKKE KGFILTSQKE DBIMKVQNS VIINCDFVL ISLKGYSQBE 60 VNISLHYQKD BBPLFQLKKV RSVNSLMVAS LTYKDKVYLN VTTDNTSLDD FHVNGGBLL 120 IHQNPGEFCV L 131
配列番号 135 OX40L 可溶性 ドメイン(代替)	YFRIQSIKVVQ FTEYKKEKGF ILTSQKEDEI MKVQNSVVI NCDGFYLIQL KGYFSQBVNI 60 SLHYQKDBBF LFQLKKVRSV NSLMVASLTY KDKVYLNVT DNTSLDDFHV NGGBLLIEQ 120 NFGFCVL 128
配列番号 136 008 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS NYTMNWRQA PGKLEWVSA ISGSGGSTYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAD CAVYCAKDR YSQVYALDY WQGQTLTVTS 120
配列番号 137 008 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNQYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYPNP TTFGGGTK 108
配列番号 138 011 の可変重鎖	EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFS DYTMMWRQA PGKLEWVSA ISGSGSTYYAD 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAD CAVYCAKDR YSQVYALDY WQGQTLTVTS 120
配列番号 139 011 の可変軽鎖	DIVMTQSPDS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNQYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYPNP TTFGGGTK 108
配列番号 140 021 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQFGGSLRL SCAASGFTFS SYAMNWRQA PGKLEWVSA ISYDGSNKYY 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAD CAVYCAKDR YICLPNALDY WQGQTLTVTS 120
配列番号 141 021 の可変軽鎖	DIQMTQSPVS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLL HSNQYNYLDW YLQKAGQSPQ LLIYLGSNRA 60 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCQQYYPNP TTFGGGTK 108
配列番号 142 023 の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQFGGSLRL SCAGSGFTFS SYAMNWRQA PGKLEWVSA IGTGGGTYYA 60 DSVNGRFTIS RDNSKNTLY LQMNSLRADT AVYCAKDR VMGLYWDYV WQGQTLTVTS 120
配列番号 143 023 の可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQKPK GQAPRLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGGTD FTLTISLEP EDFAVYCCQ RSNWFPAPG GTKVEIKR 108
配列番号 144 重鎖可変領域	EVQLQSGGPE LVKPGASVKM SCKASGYTFT SYVMHWVRQA PGQGLEWIGY INPYNDGTY 60 NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYCANYY GSSLMDYWG QGTSVTVSS 119
配列番号 145 軽鎖可変領域	DIQMTQITSS LSASLGDRYT ISCRASQDIS NYLWYQKPK DGTVKLLIYY TSLHSGVPS 60 RFGSGSGGTD YSLTISNLEQ EDIATYFCQQ GNTLPWTFGG GTKLEIKR 108
配列番号 146 重鎖可変領域	EVQLQSGGPE LVKPGASVKI SCKTSGYTFK DYTMMWRQA EGKLEWIGG IYFNNGGSTY 60 NQNFKDKATL TVDKSSSTAY MEFRSLTSED SAVYCARMG YHGDHLDYV WQAGTCTVTS 120 P 121
配列番号 147 軽鎖可変領域	DIVMTQSEKF MSTSLGDRVS TCKASQDVG AAVAWYQKPK GQSPKLLIYV ASTRHGTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLTDYFCQQ YINYPITFGG GTKLEIKR 108
配列番号 148 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGKLEWVSA INTETGEPTY 60 ADDYKGRFAP SLETSASTAY LQINNLKNEI CATYCANPY YDYVSYAMD YWGRCTGVTV 120 SS 122
配列番号 149 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT DYSMHWVRQA PGGLKWMGW INTETGEPTY 60 ADDFKGRFVF SLDTSVSTAY LQISLKAED CAVYCANPY YDYVSYAMD YWQGCCTVTV 120 SS 122
配列番号 150 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVMTQSEKF MSTSVRDRVS TCKASQDVG AAVAWYQKPK GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTLTISVQA BDLAIVYCCQ HYSTERTFGG GTKLEIK 107
配列番号 151 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVMTQSEKF MSTSVRDRVS TCKASQDVG AAVAWYQKPK GQSPKLLIYS ASYLYTGVPD 60 RFTGSGSGTD FTLTISVQA BDLAIVYCCQ HYSTERTFGG GTKLEIK 107
配列番号 152 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQFGGSLKL SCESNYEFP SHDMSVVRKT PEKRLBLVAA INSDGGSTYY 60 EDTMRRTFI SRDNTKNTLY LQMSSLRSED CALYCARHY DDYAWFAYW GQGTTLTVSA 120

10

20

30

40

50

【表 18-2】

配列番号 153 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASEYEFP SHDMSWVRQA PGKLELVAA INSDGGSTYY 60 PDTMERRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAD TAVYYCARHY DDYYAWFAYW GQGTMTVTSS 120
配列番号 154 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASKSVS TSGYSYMHY QKPGQPPKL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDAATY YCQHSRELPL TFGAGTKLEL K 111
配列番号 155 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKSVS TSGYSYMHY QKPGQAPRL LIYLASNLES 60 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRELPL TFGGGTKVEI K 111
配列番号 156 重鎖可変領域	MYLGLNYVFI VFLLNGVQSE VKLEESGGGL VQPGGSMKLS CAASGFTFSD AWMDWVRQSP 60 EKGLEWVAEI RSKANNHATY YAESVNGRFT ISRDDSKSSV YLQMNSLRAD DTGIYYCTWG 120 EVFYFDYWQ GTTLTVSS 138
配列番号 157 軽鎖可変領域	MRPSIQFLGL LLFWLEGAQC DIQMTQSPSS LSASLGKKVT ITCKSSQDIN KYIAWYQHQP 60 GKGPRLLIHY TSTLQPGIPS RFSGSGSGRD YSFSSISNLEP EDIATYVCLQ YDNLITFGAG 120 TKLELK 126

10

【1353】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、(i) 第1の可溶性OX40結合ドメイン、(ii) 第1のペプチドリンカー、(iii) 第2の可溶性OX40結合ドメイン、(iv) 第2のペプチドリンカー、及び(v) 第3の可溶性OX40結合ドメインを含むOX40アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、N末端及び／またはC末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、FabまたはFc断片ドメインである。いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、(i) 第1の可溶性OX40結合ドメイン、(ii) 第1のペプチドリンカー、(iii) 第2の可溶性OX40結合ドメイン、(iv) 第2のペプチドリンカー、及び(v) 第3の可溶性OX40結合ドメインを含むOX40アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、N末端及び／またはC末端に追加のドメインをさらに含み、追加のドメインは、FabまたはFc断片ドメインであり、可溶性OX40ドメインは各々、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜までである特定の距離を提供するが、OX40結合ドメインの一部ではない）を欠き、第1及び第2のペプチドリンカーは独立して、3～8アミノ酸長を有する。

20

30

【1354】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、(i) 第1の可溶性腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリーサイトカインドメイン、(ii) 第1のペプチドリンカー、(iii) 第2の可溶性TNFスーパーファミリーサイトカインドメイン、(iv) 第2のペプチドリンカー、及び(v) 第3の可溶性TNFスーパーファミリーサイトカインドメインを含むOX40アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性TNFスーパーファミリーサイトカインドメインは各々、茎領域を欠き、第1及び第2のペプチドリンカーは独立して、3～8アミノ酸長であり、TNFスーパーファミリーサイトカインドメインは、OX40結合ドメインである。

【1355】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、MEDI6383である。MEDI6383は、OX40アゴニスト融合タンパク質であり、米国特許第6,312,700号に記載されているように調製することができ、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

40

【1356】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、前述のVLドメインのうちのいずれかに連結された前述のVHドメインのうちのいずれかを含むOX40アゴニストscFv抗体である。

【1357】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Creative Biolabs

50

, Inc., Shirley, NY, USAから市販されているCreative Biolabs OX40アゴニストモノクローナル抗体MOM-18455である。

【1358】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、BioLegend, Inc., San Diego, CA, USAから市販されているOX40アゴニスト抗体クローンBer-ACT35である。

【1359】

C. 任意選択の細胞生存率分析

任意選択で、細胞生存率アッセイは、当該技術分野で知られている標準のアッセイを使用して、プライミングによる第1の拡張（初期バルク拡張と称されることもある）後に行われ得る。したがって、ある特定の実施形態では、方法は、プライミングによる第1の拡張後に細胞生存率アッセイを行うことを含む。例えば、死細胞を選択的に標識し、生存率の評価を可能にするトリパンプルー排除アッセイが、バルクTILの試料上で行われ得る。生存率の試験に使用する他のアッセイには、アラマンプルーアッセイ及びMTTアッセイが含まれるが、これらに限定されない。

10

【1360】

1. 細胞計数、生存率、フローサイトメトリー

いくつかの実施形態では、細胞数及び／または生存率が測定される。CD3、CD4、CD8、及びCD56などであるが、これらに限定されないマーカー、ならびに本明細書に開示または記載される任意の他のマーカーの発現は、FACSCanto（商標）フローサイトメーター（BD Biosciences）を使用して、例えば、BD Biosciences（BD Biosciences, San Jose, CA）から市販されているものであるが、これに限定されない抗体を用いたフローサイトメトリーによって測定され得る。細胞は、使い捨てのcチップ血球計数器（VWR, Batavia, IL）を使用して手動で計数することができ、生存率は、トリパンプルー染色を含むが、これに限定されない、当該技術分野で知られている任意の方法を使用して評価することができる。細胞生存率は、米国特許出願公開第2018/0282694号（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に基づいてアッセイされ得る。細胞生存率は、米国特許公開第2018/0280436号または国際特許公開第WO/2018/081473号（いずれもあらゆる目的のためにそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に基づいてアッセイすることもできる。

20

30

【1361】

いくつかの事例では、バルクTIL集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して直ちに凍結保存され得る。あるいは、以下で論じられるように、バルクTIL集団がREPに供されて、凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾TILが療法に使用される場合、バルクまたはREP TIL集団が好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

【1362】

2. 細胞培養

いくつかの実施形態では、上で考察され、図1及び8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）に例示されたものを含む、TILを拡張するための方法は、約5,000mL～約25,000mLの細胞培地、約5,000mL～約10,000mLの細胞培地、または約5,800mL～約8,700mLの細胞培地を使用することを含む得る。いくつかの実施形態では、培地は、無血清培地である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、第2の拡張における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の拡張及び第2の拡張（急速な第2の拡張とも称される）における培地は、両方とも無血清である。いくつかの実施形態では、TILの数を拡張することは、わずか1種類の細胞培養培地を使用する。任意の好適な細胞培養培地、例えば、AIM-V細胞培地（L-グルタミン、50μMの硫酸ストレプトマイシン、及び10μMの硫酸ゲンタマイ

40

50

シン)細胞培養培地 (Invitrogen, Carlsbad CA) が使用され得る。これに関して、本発明の方法は、TILの数を拡張するために必要な培地の量及び培地の種類の数を有利に減少させる。いくつかの実施形態では、TILの数を拡張することは、3日または4日に1回以下の頻度で細胞にフィードすることを含み得る。ガス透過性容器内で細胞の数を拡張することは、細胞を拡張するために必要なフィード頻度を減少させることによって、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化する。

【1363】

いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のガス透過性容器内の細胞培養培地は、濾過されていない。濾過されていない細胞培地の使用は、細胞の数を拡張するために必要な手順を簡素化することができる。いくつかの実施形態では、第1及び／または第2のガス透過性容器内の細胞培地は、ベーターメルカプトエタノール (BME) を欠いている。

10

【1364】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第1の拡張として約1～8日間、例えば約7日間、またはプライミングによる第1の拡張として約8日間にわたってIL-2、1X抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を含有する第1のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を培養することと、TILを第2のガス透過性容器に移し、IL-2、2X抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を含有する第2のガス透過性容器内でTILの数を約7～9日間、例えば約7日間、約8日間、または約9日間にわたって拡張することとを含む。

20

【1365】

いくつかの実施形態では、方法の期間は、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第1の拡張として、IL-2、1X抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を含有する第1のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を約1～7日間、例えば、約7日間にわたって培養することと、TILを第2のガス透過性容器に移し、IL-2、2X抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を含有する第2のガス透過性容器内でTILの数を約7～14日間、または約7～9日間、例えば、約7日間、約8日間、または約9日間、約10日間、または約11日間にわたって拡張することとを含む。

30

【1366】

いくつかの実施形態では、哺乳動物から腫瘍組織試料を取得することと、プライミングによる第1の拡張として、IL-2、1X抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を含有する第1のガス透過性容器内で腫瘍組織試料を約1～7日間、例えば、約7日間培養することと、TILを第2のガス透過性容器に移し、IL-2、2X抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を含有する第2のガス透過性容器内でTILの数を約7～11日間、例えば、約7日間、約8日間、約9日間、約10日間、または約11日間にわたって拡張することとを含む、方法の期間。

【1367】

いくつかの実施形態では、TILは、ガス透過性容器内で拡張される。ガス透過性容器は、米国特許出願公開第2005/0106717A1号に記載されるものを含む、当該技術分野で知られている方法、組成物、及びデバイスを使用して、PBMCを使用してTILを拡張するために使用されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TILは、ガス透過性バッグ内で拡張される。いくつかの実施形態では、TILは、Xuri Cell Expansion System W25 (GE Healthcare) などのガス透過性バッグ内のTILを拡張する細胞拡張システムを使用して拡張される。いくつかの実施形態では、TILは、Xuri Cell Expansion System W5 (GE Healthcare) としても知られるWAVE Bioreactor Systemなどのガス透過性バッグ内でTILを拡張する細胞拡張システムを使用して拡張される。いくつかの実施形態では、細胞

40

50

拡張システムは、約100mL、約200mL、約300mL、約400mL、約500mL、約600mL、約700mL、約800mL、約900mL、約1L、約2L、約3L、約4L、約5L、約6L、約7L、約8L、約9L、及び約10Lからなる群から選択される体積を有するガス透過性細胞バッグを含む。

【1368】

いくつかの実施形態では、TILは、G-R EXフラスコ(Wilson Wolf Manufacturingから市販されている)内で拡張され得る。かかる実施形態は、細胞集団が約 5×10^5 細胞/cm²から $10 \times 10^6 \sim 30 \times 10^6$ 細胞/cm²まで拡張するのを可能にする。いくつかの実施形態では、これは、フィードなしである。いくつかの実施形態では、これは、培地がG-R EXフラスコ内の約10cmの高さに存在する限り、フィードなしである。いくつかの実施形態では、これは、フィードなしであるが、1つ以上のサイトカインの追加を伴う。いくつかの実施形態では、サイトカインを培地と混合する必要なしに、サイトカインがボラスとして追加され得る。かかる容器、装置、及び方法は、当該技術分野で知られており、TILを拡張するために使用されており、米国特許出願公開第US2014/0377739A1号、国際公開第WO2014/210036A1号、米国特許出願公開第US2013/0115617A1号、国際公開第WO2013/188427A1、米国特許出願公開第US2011/0136228A1、米国特許第US8,809,050B2号、国際公開第WO2011/072088A2号、米国特許出願公開第US2016/0208216A1号、米国特許出願公開第US2012/0244133A1号、国際公開第WO2012/129201A1号、米国特許出願公開第US2013/0102075A1号、米国特許第US8,956,860B2号、国際公開第WO2013/173835A1号、米国特許出願公開第US2015/0175966A1号に記載されるものを含み、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。かかるプロセスも、Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35:283-292に記載されている。

【1369】

D. TILにおける遺伝子の任意選択のノックダウンまたはノックアウト

いくつかの実施形態では、本発明の拡張TILは、タンパク質発現を一過的に変化させるために、各々本明細書で提供されるように、閉鎖滅菌製造プロセス中を含む、拡張ステップ前、拡張ステップ中、または拡張ステップ後にさらに操作される。いくつかの実施形態では、一過的に変化したタンパク質発現は、一過性の遺伝子編集によるものである。いくつかの実施形態では、本発明の拡張TILは、TILにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子(TF)及び／または他の分子で処理される。いくつかの実施形態では、タンパク質発現を一過的に変化させることができるTF及び／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の変化及び／またはTIL集団における腫瘍抗原特異的T細胞の数の変化を提供する。

【1370】

ある特定の実施形態では、方法は、TIL集団を遺伝子編集することを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を遺伝子編集することを含む。

【1371】

いくつかの実施形態では、本発明は、1つ以上のタンパク質の発現の促進または1つ以上のタンパク質の発現の阻害、ならびに一組のタンパク質の促進及び別の組のタンパク質の阻害の両方の組み合わせの同時発生のために、リボ核酸(RNA)挿入、例えば、メッセンジャーRNA(mRNA)または低分子(もしくは短)干渉RNA(siRNA)のTIL集団への挿入などのヌクレオチド挿入による遺伝子編集を含む。

【1372】

いくつかの実施形態では、本発明の拡張TILは、タンパク質発現の一過性の変化を受ける。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図8(特に、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E

及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) に示されるように、ステップ A から取得された T I L 集団を含む、第 1 の拡張前のバルク T I L 集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図 8 (例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) に示されるように、例えば、ステップ B で拡張された T I L 集団におけるものを含む、第 1 の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図 8 に示されるように、ステップ B から取得され、ステップ C に含まれる T I L 集団である、例えば、第 1 の拡張と第 2 の拡張との間の移行中の T I L 集団 (例えば、本明細書に記載の第 2 の T I L 集団) におけるものを含む、第 1 の拡張後に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図 8 に示されるように、例えば、ステップ C から取得され、ステップ D でのその拡張前の T I L 集団を含む、第 2 の拡張前のバルク T I L 集団において起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図 8 に示されるように、例えば、ステップ D で拡張された T I L 集団 (例えば、第 3 の T I L 集団) を含む、第 2 の拡張中に起こる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、図 8 に示されるように、例えば、ステップ D での拡張から取得された T I L 集団を含む、第 2 の拡張後に起こる。

10

【1373】

いくつかの実施形態では、T I L 集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、T s o n g , B i o p h y s . J . 1 9 9 1 , 6 0 , 2 9 7 - 3 0 6 及び米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 2 2 7 2 3 7 A 1 号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、T I L 集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法 (リン酸カルシウム DNA 沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス) は、当該技術分野で知られており、G r a h a m a n d v a n d e r E b , V i r o l o g y 1 9 7 3 , 5 2 , 4 5 6 - 4 6 7 、W i g l e r , e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 1 9 7 9 , 7 6 , 1 3 7 3 - 1 3 7 6 、及び C h e n a n d O k a y a r e a , M o l . C e l l . B i o l . 1 9 8 7 , 7 , 2 7 4 5 - 2 7 5 2 、ならびに米国特許第 5 , 5 9 3 , 8 7 5 号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、T I L 集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質 N - [1 - (2 , 3 - ジオレイルオキシ) プロピル] - n , n , n - トリメチルアンモニウムクロリド (D O T M A) 及びジオレオイルホスホチジルエタノールアミン (D O P E) の 1 : 1 (w / w) リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、R o s e , e t a l . , B i o t e c h n i q u e s 1 9 9 1 , 1 0 , 5 2 0 - 5 2 5 及び F e l g n e r , e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 1 9 8 7 , 8 4 , 7 4 1 3 - 7 4 1 7 、ならびに米国特許第 5 , 2 7 9 , 8 3 3 号、同第 5 , 9 0 8 , 6 3 5 号、同第 6 , 0 5 6 , 9 3 8 号、同第 6 , 1 1 0 , 4 9 0 号、同第 6 , 5 3 4 , 4 8 4 号、及び同第 7 , 6 8 7 , 0 7 0 号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、T I L 集団におけるタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、米国特許第 5 , 7 6 6 , 9 0 2 号、同第 6 , 0 2 5 , 3 3 7 号、同第 6 , 4 1 0 , 5 1 7 号、同第 6 , 4 7 5 , 9 9 4 号、及び同第 7 , 1 8 9 , 7 0 5 号に記載されている方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

40

【1374】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、幹細胞メモリー T 細胞 (T S C M) の増加をもたらす。T S C M は、抗原を経験したセントラルメモリー T 細胞の

50

初期前駆細胞である。TSCMは、一般に、幹細胞を定義する長期生存、自己再生、及び多分化能を示し、一般に、効果的なTIL製品の生成に望ましいものである。TSCMは、養子細胞移植のマウスモデルにおいて他のT細胞サブセットと比較して増強された抗腫瘍活性を示している。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、高い割合のTSCMを含む組成を有するTIL集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TSCMパーセンテージの少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIL集団中のTSCMの少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、または10倍の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のTSCMを有するTIL集団をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%のTSCMを有する治療的TIL集団をもたらす。

10

20

【1375】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、抗原を経験したT細胞の幼若化をもたらす。いくつかの実施形態では、幼若化には、例えば、増加した増殖、増加したT細胞活性化、及び／または増加した抗原認識が含まれる。

【1376】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のTCRレパートリーを保存するために、T細胞の大部分における発現を変化させる。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のTCRレパートリーを変化させない。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、腫瘍由来のTCRレパートリーを維持する。

30

【1377】

いくつかの実施形態では、タンパク質の一過性の変化は、特定の遺伝子の発現の変化をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CD39、CD69、PD-1（PDCD1またはCC279とも称される）、TGFB β 2、CCR4/5、CCLB（CCL-B）、CISH、CCR（キメラ共刺激受容体）、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH1/2、ICD、CTLA-4、TIM3、LAG3、TIGIT、TET2、TGFB β 、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2（MCP-1）、CCL3（MIP-1 α ）、CCL4（MIP1- β ）、CCL5（RANTES）、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1、胸腺細胞選択関連高移動度群（HMG）ボックス（TOX）、アンキリンリピートドメイン11（ANKRD11）、BCL6コリプレッサー（BCOR）、及び／またはcAMPタンパク質キナーゼA（PKA）を含むが、これらに限定されない遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1、TGFB β 2、CCR4/5、CTLA-4、CCLB（CCL-B）、CISH、CCR（キメラ共刺激受容体）、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOT

40

50

CH1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、TET2、TGFβ、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、CSCR3、CCL2 (MCP-1)、CCL3 (MIP-1α)、CCL4 (MIP1-β)、CCL5 (RANTES)、CXCL1/CXCL8、CCL22、CCL17、CXCL1/CXCL8、VHL、CD44、PIK3CD、SOCS1、胸腺細胞選択関連高移動度群 (HMG) ボックス (TOX)、アンキリンリピートドメイン11 (ANKRD11)、BCL6 コリプレッサー (BCOR)、及び/または cAMP タンパク質キナーゼ A (PKA) からなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CD39 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CD69 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TGFB2 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR4/5 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CTLA-4 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CBLB を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、CISH を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR (キメラ共刺激受容体) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-2 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-12 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-15 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-21 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、NOTCH1/2 ICD を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIM3 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、LAG3 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIGIT を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TET2 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TGFβ を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR1 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR2 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR4 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR5 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CXCR1 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CXCR2 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CSCR3 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCL2 (MCP-1) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCL3 (MIP-1α) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCL4 (MIP1-β) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCL5 (RANTES) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CXCL1 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CXCL8 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCL22 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCL17 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、VHL を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CD44 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PIK3CD を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、SOCS1 を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、胸腺細胞選択関連高移動度群 (HMG) ボックス (TOX) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、アンキリンリピートドメイン11 (ANKRD11) を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、BCL6 コリプレッサー

10

20

30

40

50

(BCOR)を標的とする。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、cAMPタンパク質キナーゼA(PKA)を標的とする。

【1378】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、一過性タンパク質発現によって過剰発現されるケモカイン受容体は、CCL2(MCP-1)、CCL3(MIP-1 α)、CCL4(MIP1- β)、CCL5(RANTES)、CXCL1、CXCL8、CCL22、及び／またはCCL17を含むが、これらに限定されないリガンドを有する受容体を含む。

【1379】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CD39、CD69、PD-1、CTLA-4、CBLB、CISH、TIM-3、LAG-3、TIGIT、TET2、TGF β R2、及び／またはTGF β の発現の低下及び／または減少をもたらす(例えば、TGF β 経路の遮断をもたらすことを含む)。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CBLB(CBL-B)の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CISHの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIM-3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、LAG-3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIGITの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TET2の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TGF β R2の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TGF β の発現の低下及び／または減少をもたらす。

【1380】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、例えば、腫瘍部位へのTILの輸送または移動を改善するために、ケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR(キメラ共刺激受容体)の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CCR1、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR1、CXCR2、及び／またはCSCR3からなる群から選択されるケモカイン受容体の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【1381】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、インターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、IL-2、IL-12、IL-15、及び／またはIL-21からなる群から選択されるインターロイキンの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【1382】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、NOTCH1/2ICDの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、VHLの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CD44の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PIK3CDの発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、SOCS1の発現の増加及び／または過剰発現をもたらす。

【1383】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、cAMPタンパク質キナ

10

20

30

40

50

ーゼ A (PKA) の発現の低下及び／または減少をもたらす。

【1384】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CD39、CD69、PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFB β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CD39、CD69、PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFB β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される2つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1、ならびにLAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFB β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される1つの分子の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1、ならびにCTLA-4、LAG3、CISH、CBLB、TIM3、TIGIT、TET2及びそれらの組み合わせの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1、ならびにCTLA-4、LAG3、CISH、CBLB、TIM3、TIGIT、TET2、及びそれらの組み合わせのうちの1つの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1及びCTLA-4の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1及びLAG3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1及びCISHの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1及びCBLBの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CD39及びCD69の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1及びTIM3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1及びTIGITの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、PD-1及びTET2の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CTLA-4及びLAG3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CTLA-4及びCISHの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CTLA-4及びCBLBの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CTLA-4及びTIM3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CTLA-4及びTIGITの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CTLA-4及びTET2の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、LAG3及びCISHの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、LAG3及びCBLBの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、LAG3及びTIM3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、LAG3及びTIGITの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、LAG3及びTET2の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CISH及びCBLBの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CISH及びTIM3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、C

10

20

30

40

50

ISH及びTIGITの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CISH及びTET2の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CBLB及びTIM3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CBLB及びTIGITの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CBLB及びTET2の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIM3及びPD-1の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIM3及びLAG3の発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIM3及びCISHの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIM3及びCBLBの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIM3及びTIGITの発現の低下及び／または減少をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TIM3及びTET2の発現の低下及び／または減少をもたらす。

10

【1385】

いくつかの実施形態では、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される接着分子は、ガンマレトロウイルスまたはレンチウイルス法によって、第1のTIL集団、第2のTIL集団、または採取されたTIL集団に挿入される（例えば、接着分子の発現が増加する）。

20

【1386】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CD39、CD69、PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFB β R2、PKA、CBLB、BAFF（BR3）、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少、ならびにCCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、CD39、CD69、PD-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、CISH、CBLB、TIGIT、TET2、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される分子の発現の低下及び／または減少、ならびにCCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、及びそれらの組み合わせの発現の増加及び／または増強をもたらす。

30

【1387】

いくつかの実施形態では、発現が約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約80%、約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約80%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約85%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約90%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約99%減少する。

40

【1388】

いくつかの実施形態では、発現が約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%増加する。いくつか

50

かの実施形態では、発現が少なくとも約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、または約 95 % 増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、または約 95 % 増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 80 %、約 85 %、約 90 %、または約 95 % 増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 85 %、約 90 %、または約 95 % 増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 80 % 増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 85 % 増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 90 % 増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 95 % 増加する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 99 % 増加する。

【1389】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、TILにおけるタンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子 (TF) 及び／または他の分子でのTILの処理によって誘導される。いくつかの実施形態では、SQZベクターを含まないマイクロ流体プラットフォームが、タンパク質発現を一過的に変化させることができる転写因子 (TF) 及び／または他の分子の細胞内送達のために用いられる。かかる方法は、転写因子を含むタンパク質を、T細胞を含む様々な初代ヒト細胞に送達する能力を示す（これらは、米国特許出願公開第US2019/0093073 A1号、同第US2018/0201889 A1号、及び同第US2019/0017072 A1号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）。かかる方法は、TIL集団を、転写因子 (TF) 及び／または一過性タンパク質発現を誘導することができる他の分子に曝露するために本発明で用いることができ、一過性タンパク質発現を誘導することができる当該TF及び／または他の分子は、腫瘍抗原の発現の増加及び／またはTIL集団における腫瘍抗原特異的T細胞の数の増加をもたらす、それ故に、TIL集団の再プログラミング及び再プログラミングされていないTIL集団と比較して再プログラミングされたTIL集団の治療的有効性の増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、本明細書に記載されるように、TIL開始集団またはTIL前集団（すなわち、再プログラミング前の）集団と比較して、エフェクターT細胞及び／またはセントラルメモリーT細胞の亜集団の増加をもたらす。

【1390】

いくつかの実施形態では、転写因子 (TF) には、TCF-1、NOTCH1/2 ICD、及び／またはMYBが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、転写因子 (TF) は、TCF-1である。いくつかの実施形態では、転写因子 (TF) は、NOTCH1/2 ICDである。いくつかの実施形態では、転写因子 (TF) は、MYBである。いくつかの実施形態では、転写因子 (TF) は、さらなるTIL再プログラミングを誘導するために、市販のKNOCKOUT Serum Replacement (Gibco/ThermoFisher) などの誘導多能性幹細胞培養物 (iPSC) とともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子 (TF) は、さらなるTIL再プログラミングを誘導するために、iPSCカクテルとともに投与される。いくつかの実施形態では、転写因子 (TF) は、iPSCカクテルなしで投与される。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、TSCMのパーセンテージの増加をもたらす。いくつかの実施形態では、再プログラミングは、TSCMのパーセンテージの約5 %、約10 %、約15 %、約20 %、約25 %、約30 %、約35 %、約40 %、約45 %、約50 %、約55 %、約60 %、約65 %、約70 %、約75 %、約80 %、約85 %、約90 %、または約95 % TSCMの増加をもたらす。

【1391】

いくつかの実施形態では、上記のようにタンパク質発現を一過的に変化させる方法は、TILの集団を遺伝子修飾する方法と組み合わせられてもよく、1つ以上のタンパク質の産生のための遺伝子の安定した組み込みステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、TIL集団を遺伝子修飾するステップを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、第1のTIL集団、第2のTIL集団、及び／または第3のTIL集団を遺伝子修

10

20

30

40

50

飾することを含む。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、レトロウイルス形質導入ステップを含む。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、レンチウイルス形質導入ステップを含む。レンチウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Levine, et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. 2006, 103, 17372-77、Zufferey, et al., Nat. Biotechnol. 1997, 15, 871-75、Dull, et al., J. Virology 1998, 72, 8463-71、及び米国特許第6,627,442号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、ガンマレトロウイルス形質導入ステップを含む。ガンマレトロウイルス形質導入系は、当該技術分野で知られており、例えば、Cepko and Pear, Cur. Prot. Mol. Biol. 1996, 9.9.1-9.9.16に記載されており、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、トランスポゾン媒介遺伝子導入ステップを含む。トランスポゾン媒介遺伝子導入系は、当該技術分野で知られており、トランスポザーゼが、DNA発現ベクターとしてまたは発現可能なRNAもしくはタンパク質として提供される系を含み、これにより、トランスポザーゼ、例えば、mRNA（例えば、キャップ及びポリA尾部を含むmRNA）として提供されるトランスポザーゼの長期発現がトランスジェニック細胞で起こらないようになる。SB10、SB11、及びSB100xなどのサケ科型Tel様トランスポザーゼ（SBまたはSleeping Beautyトランスポザーゼ）を含む好適なトランスポゾン媒介遺伝子導入系、ならびに増加した酵素活性を有する操作された酵素は、例えば、Hackett, et al., Mol. Therapy 2010, 18, 674-83及び米国特許第6,489,458号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【1392】

いくつかの実施形態では、TIL中のタンパク質発現の一過性変化は、短干渉RNAまたはサイレンシングRNAとして知られることもある、低分子干渉RNA (siRNA) は、一般に19~25塩基対長の二本鎖RNA分子である。siRNAは、RNA干渉 (RNAi) において使用され、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現に干渉する。

【1393】

いくつかの実施形態では、タンパク質発現の一過性変化は、発現の低下である。いくつかの実施形態では、TILにおけるタンパク質発現の一過性の変化は、高パーセンテージの2'-OH置換（典型的にはフッ素または-OCF₃）を有する化学的に合成された非対称siRNA二重鎖である自己送達RNA干渉 (sdRNA) によって誘導され、これはテトラエチレングリコール (TEG) リンカーを使用してその3'末端でコレステロールに複合された、20ヌクレオチドアンチセンス (ガイド) 鎖及び13~15塩基センス (パッセンジャー) 鎖を含む。短干渉RNAまたはサイレンシングRNAとして知られることもある、低分子干渉RNA (siRNA) は、一般に19~25塩基対長の二本鎖RNA分子である。siRNAは、RNA干渉 (RNAi) において使用され、相補的なヌクレオチド配列を有する特定の遺伝子の発現に干渉する。sdRNAは、共有結合及び疎水的に修飾されたRNAi化合物であり、細胞に侵入するために送達媒体を必要としない。sdRNAは、一般に、最小限の二本鎖領域を有する非対称の化学修飾された核酸分子である。sdRNA分子は、典型的に一本鎖領域及び二本鎖領域を含み、分子の一本鎖領域及び二本鎖領域の両方に様々な化学修飾を含み得る。加えて、sdRNA分子は、本明細書に記載されているように、従来の高度なステロール型分子などの疎水性複合体に結合することができる。sdRNA及びかかるsdRNAを作製するための関連方法は、例えば、米国特許出願公開第US2016/0304873 A1号、同第US2019/0211337 A1号、同第US2019/0048341 A1号、及び同第US2019/0048341 A1号、ならびに米国特許第10,633,654号及び同第1

0, 913, 948 B2号（これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる）にも広く記載されている。sdRNA構造、化学、標的化位置、配列の好み等を最適化するために、sdRNA力価予測用のアルゴリズムが開発及び利用されている。これらの分析に基づいて、機能的なsdRNA配列は、一般に、1 μ Mの濃度で70%を超える発現の減少を有すると定義されており、確率は40%を超える。

【1394】

二本鎖DNA（dsRNA）は、一般に、RNAの相補鎖の対、一般にセンス（パッセンジャー）鎖及びアンチセンス（ガイド）鎖を含む任意の分子を定義するために使用することができ、一本鎖オーバーハング領域を含み得る。siRNAとは対照的に、dsRNAという用語は、一般に、ダイサーを含む切断酵素系の作用によりより大きいdsRNA分子から放出されるsiRNA分子の配列を含む前駆体分子を指す。

10

【1395】

いくつかの実施形態では、方法は、CCRを発現するように修飾されたTILを含むTIL集団におけるタンパク質発現の一過性変化を含み、例えば、テトラエチレングリコール（TEG）リンカーを使用して20ヌクレオチドアンチセンス（ガイド）鎖及び3'末端でコレステロールにコンジュゲートされた13～15塩基センス（パッセンジャー）鎖を含む、高いパーセンテージの2'-OH置換（典型的にはフッ素または-OC₂H₅）を有する化学的に合成された非対称siRNA二本鎖である、自己送達RNA干渉（sdRNA）の使用を含む。siRNA及びsdRNAを使用する方法は、Khvorova and Watts, Nat. Biotechnol. 2017, 35, 238-248、Byrne, et al., J. Ocul. Pharmacol. Ther. 2013, 29, 855-864、及びLigtenberg, et al., Mol. Therapy, 2018, 26, 1482-93（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている。いくつかの実施形態では、siRNAの送達は、エレクトロポレーションまたは細胞膜破壊（スクイーズまたはSQZ法など）を使用して達成される。いくつかの実施形態では、TIL集団へのsdRNAの送達は、エレクトロポレーション、SQZ、または他の方法を使用せず、代わりに、TIL集団が培地中1 μ M/10,000 TILの濃度でsdRNAに曝露される1～3日の期間を使用して達成される。ある特定の実施形態では、方法は、TIL集団を培地中1 μ M/10,000 TILの濃度のsdRNAに1～3日間曝露することを含む、TIL集団へのsiRNAまたはsdRNAの送達を含む。いくつかの実施形態では、TIL集団へのsdRNAの送達は、TIL集団が培地中10 μ M/10,000 TILの濃度でsdRNAに曝露される1～3日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、TIL集団へのsdRNAの送達は、TIL集団が培地中50 μ M/10,000 TILの濃度でsdRNAに曝露される1～3日の期間を使用して達成される。いくつかの実施形態では、TIL集団へのsdRNAの送達は、TIL集団が培地中0.1 μ M/10,000 TIL～50 μ M/10,000 TILの濃度でsdRNAに曝露される1～3日の期間を使用して達成され、sdRNAへの曝露は、培地に新鮮なsdRNAを添加することによって2、3、4、または5回行われる。他の好適なプロセスは、例えば、米国特許出願公開第US2011/0039914A1号、同第US2013/0131141A1号、及び同第US2013/0131142A1号、ならびに米国特許第9,080,171号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

30

40

【1396】

いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAは、製造中にTIL集団に挿入される。いくつかの実施形態では、sdRNAは、NOTCH1/2 ICD、PD-1、CTLA-4 TIM-3、LAG-3、TIGIT、TGFB β 、TGFB β 2、cAMPプロテインキナーゼA（PKA）、BAFF BR3、CISH、及び／またはCB

50

LBに干渉するRNAをコードする。いくつかの実施形態では、発現の減少は、例えば、フローサイトメトリー及び／またはqPCRによって評価される、遺伝子サイレンシングのパーセンテージに基づいて決定される。いくつかの実施形態では、発現が約5%、約10%、約10%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約75%、約80%、約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約80%、約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約85%、約90%、または約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約80%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約85%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約90%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約95%減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約99%減少する。

10

20

30

40

50

【1397】

siRNAの化学修飾に基づく自己送達可能なRNAi技術を本発明の方法とともに用いて、本明細書に記載されるように、sdRNAをTILに首尾よく送達することができる。非対称siRNA構造及び疎水性リガンドとの骨格修飾の組み合わせ（例えば、Ligtenberg, et al. Mol. Therapy, 2018, 26, 1482-93及び米国特許出願公開第2016/0304873 A1（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）を参照）は、sdRNAのヌクレアーゼ安定性を利用して、培養培地に単に添加することによって、追加の製剤及び方法なしに、sdRNAが培養された哺乳類細胞に浸透することを可能にする。この安定性により、単に培地中のsdRNAの活性濃度を維持することによって、標的遺伝子活性の一定レベルのRNAiを介した減少を支援することができる。理論に拘束されることはないが、sdRNAの骨格安定化は、非分裂細胞で数ヶ月間続く可能性のある遺伝子発現効果の延長された低減を提供する。

【1398】

いくつかの実施形態では、TILの95%を超えるトランスフェクション効率及び様々な特定のsiRNAまたはsdRNAによる標的の発現の減少が起こる。いくつかの実施形態では、いくつかの未修飾リボース残基を含むsiRNAまたはsdRNAは、RNAi効果の効力及び／または寿命を増加させるために、完全に修飾された配列で置き換えられた。いくつかの実施形態では、発現効果の減少は、12時間、24時間、36時間、48時間、5日間、6日間、7日間、または8日間以上維持される。いくつかの実施形態では、発現効果の減少は、TILのsiRNAまたはsdRNA処理後10日以上で低下する。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の70%を超える減少が維持される。いくつかの実施形態では、標的発現の発現の70%を超える減少が維持されるTIL。いくつかの実施形態では、PD-1/PD-L1経路における発現の減少により、TILがより強力なインビボ効果を示すことが可能になり、これは、いくつかの実施形態では、PD-1/PD-L1経路の抑制効果の回避に起因する。いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAによるPD-1の発現の減少は、TIL増殖の増加をもたらす。

【1399】

いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、標的遺伝子の発現の70%の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、標的遺伝子の発現の75%の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、標的遺伝子の発現の80%の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、標的遺伝子の発現の85%の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、標的遺伝子の発現の90%の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、標的遺伝

子の発現の95%の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、標的遺伝子の発現の99%の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約0.25 μM～約4 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約0.25 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約0.5 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約0.75 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約1.0 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約1.25 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約1.5 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約1.75 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約2.0 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約2.25 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約2.5 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約2.75 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約3.0 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約3.25 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約3.5 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約3.75 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。いくつかの実施形態では、本発明で使用されるsdRNA配列は、約4.0 μMの濃度で送達された場合、標的遺伝子の発現の減少を示す。

10

20

30

40

50

【1400】

いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNAオリゴヌクレオチド剤は、治療剤の安定性及び／または有効性を増加させ、かつ治療される細胞または組織へのオリゴヌクレオチドの効率的な送達をもたらすための1つ以上の修飾を含む。かかる修飾には、2'-O-メチル修飾、2'-O-フルロ修飾、ジホスホロチオエート修飾、2'F修飾ヌクレオチド、2'-O-メチル修飾、及び／または2'デオキシヌクレオチドが含まれ得る。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、例えば、ステロール、コレステロール、ビタミンD、ナフチル、イソブチル、ベンジル、インドール、トリプトファン、及び／またはフェニルを含む1つ以上の疎水性修飾を含むように修飾される。いくつかの実施形態では、化学修飾ヌクレオチドは、ホスホロチオエート、2'-O-メチル、2'デオキシ、疎水性修飾及びホスホロチオエートの組み合わせである。いくつかの実施形態では、糖が修飾され得、修飾された糖には、D-リボース、2'-O-アルキル（2'-O-メチル及び2'-O-エチルを含む）、すなわち、2'-アルコキシ、2'-アミノ、2'-S-アルキル、2'-ハロ（2'-フルオロを含む）、T-メトキシエトキシ、2'-アリルオキシ（ $-OCH_2CH=CH_2$ ）、2'-プロパルギル、2'-プロピル、エチニル、エテニル、プロペニル、及びシアノなどが含まれ得るが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、糖部分は、ヘキソースであり得、Augustyns, et al., Nucleic Acids Res. 1992, 18, 4711（この開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているようにオリゴヌクレオチドに組み込まれ得る。

【1401】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖 *s i R N A* または *s d R N A* オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖であり、すなわち、分子のいずれかの末端にも一本鎖配列が突出しておらず、すなわち、平滑末端である。いくつかの実施形態では、個々の核酸分子は、異なる長さであり得る。言い換えれば、本発明の二本鎖 *s i R N A* または *s d R N A* オリゴヌクレオチドは、その全長にわたって二本鎖ではない。例えば、2つの別個の核酸分子が使用される場合、アンチセンス配列を含むそれらの分子の一方、例えば、第1の分子は、それにハイブリダイズする（分子の一部を一本鎖のままにする）第2の分子よりも長い可能性がある。いくつかの実施形態では、単一の核酸分子が使用される場合、いずれかの末端の分子の一部は、一本鎖のままであり得る。

【1402】

いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖 *s i R N A* または *s d R N A* オリゴヌクレオチドは、ミスマッチ及び／またはループもしくはバルジを含むが、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約70%にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約80%にわたって二本鎖である。他の実施形態では、本発明の二本鎖 *s i R N A* または *s d R N A* オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約90%～95%にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖 *s i R N A* または *s d R N A* オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドの長さの少なくとも約96%～98%にわたって二本鎖である。いくつかの実施形態では、本発明の二本鎖オリゴヌクレオチドは、少なくともまたは最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、または15のミスマッチを含む。

【1403】

いくつかの実施形態では、*s i R N A* または *s d R N A* オリゴヌクレオチドは、例えば、米国特許第5,849,902号（その開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されているように3'または5'結合を修飾することによって、ヌクレアーゼから実質的に保護され得る。例えば、オリゴヌクレオチドは、「ブロッキング基」を含めることによって耐性にすることができる。本明細書で使用される場合、「ブロッキング基」という用語は、合成のための保護基またはカップリング基のいずれかとして（例えば、FITC、プロピル（ $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ ）、グリコール（ $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ ）ホスフェート（ PO_3^{2-} ）、リン酸水素、もしくはホスホロアミダイト）、オリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに結合され得る置換基（例えば、OH基以外）を指す。「ブロッキング基」は、修飾ヌクレオチド及び非ヌクレオチドエキソヌクレアーゼ耐性構造を含む、オリゴヌクレオチドの5'及び3'末端を保護する「末端ブロッキング基」または「エキソヌクレアーゼブロッキング基」も含み得る。

【1404】

いくつかの実施形態では、*s i R N A* または *s d R N A* 内の隣接するポリヌクレオチドの少なくとも一部分は、代替の結合、例えば、ホスホロチオエート結合によって結合されている。

【1405】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、*s i R N A* または *s d R N A* の細胞取り込みの少なくとも1、5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、または500パーセントの増強をもたらし得る。いくつかの実施形態では、C残基またはU残基の少なくとも一方が疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、複数のC及びUが疎水性修飾を含む。いくつかの実施形態では、C及びUの少なくとも10%、15%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または少なくとも95%が疎水性修飾を含み得る。いく

つかの実施形態では、C及びUのすべてが疎水性修飾を含む。

【1406】

いくつかの実施形態では、s i R N Aまたはs d R N A分子は、プロトン化可能なアミンの組み込みにより増強されたエンドソーム放出を示す。いくつかの実施形態では、プロトン化可能なアミンは、センス鎖（R I S C負荷後に廃棄される分子の一部）に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明のs i R N Aまたはs d R N A化合物は、二重鎖領域（10～15塩基長の効率的なR I S C侵入に必要）及び4～12ヌクレオチド長の一本鎖領域を13ヌクレオチド二重鎖とともに含む非対称化合物を含む。いくつかの実施形態では、6ヌクレオチドの一本鎖領域が用いられる。いくつかの実施形態では、s i R N Aまたはs d R N Aの一本鎖領域は、2～12個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合（ホスホロチオエート修飾と称される）を含む。いくつかの実施形態では、6～8個のホスホロチオエートヌクレオチド間結合が用いられる。いくつかの実施形態では、本発明のs i R N Aまたはs d R N A化合物は、安定性を提供し、かつR I S C侵入と互換性がある固有の化学修飾パターンを含む。ガイド鎖は、例えば、R I S C侵入に干渉することなく安定性を確認する任意の化学修飾によって修飾することもできる。いくつかの実施形態では、ガイド鎖における化学修飾パターンは、2' Fが修飾され、かつ5'末端がリン酸化されたC及びUヌクレオチドの大部分を含む。

10

【1407】

いくつかの実施形態では、s i R N Aまたはs d R N Aのヌクレオチドの少なくとも30%が修飾されている。いくつかの実施形態では、s i R N Aまたはs d R N Aのヌクレオチドの少なくとも30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%が修飾されている。いくつかの実施形態では、s i R N Aまたはs d R N Aのヌクレオチドの100%が修飾されている。

20

【1408】

いくつかの実施形態では、s i R N Aまたはs d R N A分子は、最小の二本鎖領域を有する。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、8～15ヌクレオチド長の範囲である。いくつかの実施形態では、二本鎖である分子の領域は、8、9、10、11、12、13、14、または15ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、二本鎖領域は、13ヌクレオチド長である。ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に100%の相補性が存在する場合もあれば、ガイド鎖とパッセンジャー鎖との間に1つ以上の不一致が存在する場合もある。いくつかの実施形態では、二本鎖分子の一端で、分子は、平滑末端であるか、または1ヌクレオチドのオーバーハングを有するかのいずれかである。分子の一本鎖領域は、いくつかの実施形態では、4～12ヌクレオチド長である。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、4、5、6、7、8、9、10、11または12ヌクレオチド長であり得る。いくつかの実施形態では、一本鎖領域は、4ヌクレオチド長未満または12ヌクレオチド長超であることもできる。ある特定の実施形態では、一本鎖領域は、6または7ヌクレオチド長である。

30

40

【1409】

いくつかの実施形態では、s i R N Aまたはs d R N A分子は、増加した安定性を有する。いくつかの事例では、化学修飾されたs i R N Aまたはs d R N A分子は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24時間以上、または24時間超（任意の中間値を含む）の培地中での半減期を有する。いくつかの実施形態では、s i R N Aまたはs d R N Aは、12時間以上の培地中での半減期を有する。

50

【1410】

いくつかの実施形態では、*siRNA*または*sdRNA*は、効力の増加及び／または毒性の低減のために最適化されている。いくつかの実施形態では、ガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖のヌクレオチド長、及び／またはガイド鎖及び／またはパッセンジャー鎖におけるホスホロチオエート修飾の数が、いくつかの態様では、RNA分子の効力に影響を与え得る一方で、2'-フルオロ(2'-F)修飾の2'-O-メチル(2'-OMe)修飾での置き換えは、いくつかの態様では、分子の毒性に影響を与え得る。いくつかの実施形態では、分子の2'-F含有量の減少は、分子の毒性を低減すると予測される。いくつかの実施形態では、RNA分子におけるホスホロチオエート修飾の数は、細胞への分子の取り込み、例えば、細胞への分子の受動的取り込みの効率に影響を及ぼし得る。いくつかの実施形態では、*siRNA*または*sdRNA*は、2'-F修飾を有しないが、それにもかかわらず、細胞取り込み及び組織浸透における同等の有効性を特徴とする。

10

【1411】

いくつかの実施形態では、ガイド鎖は、およそ18～19ヌクレオチド長であり、およそ2～14個のリン酸修飾を有する。例えば、ガイド鎖は、リン酸修飾された2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14個、または14個超のヌクレオチドを含み得る。ガイド鎖は、RISCの侵入に干渉することなく増加した安定性を付与する1つ以上の修飾を含み得る。ホスホロチオエート修飾ヌクレオチドなどのリン酸修飾ヌクレオチドは、3'末端にあるか、5'末端にあるか、またはガイド鎖全体に広がっている可能性がある。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の3'末端10ヌクレオチドは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のホスホロチオエート修飾ヌクレオチドを含む。ガイド鎖は、分子全体に位置し得る2'-F及び／または2'-OMe修飾も含み得る。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の1位のヌクレオチド(ガイド鎖の最も5'側のヌクレオチド)は、2'-OMe修飾及び／またはリン酸化されている。ガイド鎖内のC及びUヌクレオチドは、2'-F修飾されていてもよい。例えば、19ntガイド鎖の2～10位(または異なる長さのガイド鎖における対応する位置)のC及びUヌクレオチドは、2'-F修飾されていてもよい。ガイド鎖内のC及びUヌクレオチドは、2'-OMe修飾されている場合もある。例えば、19ntガイド鎖の11～18位(または異なる長さのガイド鎖における対応する位置)のC及びUヌクレオチドは、2'-OMe修飾されていてもよい。いくつかの実施形態では、ガイド鎖の最も3'側の末端のヌクレオチドは修飾されていない。ある特定の実施形態では、ガイド鎖内のC及びUの大部分は2'-F修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されている。他の実施形態では、1位及び11～18位のCまたはUは2'-OMe修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されている。他の実施形態では、位置1及び位置11～18のCsまたはUsは2'-OMe修飾されており、ガイド鎖の5'末端はリン酸化されており、2～10位のCまたはUは2'-F修飾されている。

20

30

【1412】

自己送達可能なRNAi技術は、追加の製剤または技法を必要とすることなくRNAi剤(*siRNA*、*sdRNA*、または他のRNAi剤のいずれか)で細胞を直接トランスフェクトする方法を提供する。トランスフェクションが困難な細胞株をトランスフェクトする能力、高いインピボ活性、及び使用の単純さは、従来の*siRNA*ベースの技法に優る重大な機能的利点を提示する組成物及び方法の特徴であり、したがって、*sdRNA*法は、本発明のTILにおける標的遺伝子の発現を減少させる方法に関連するいくつかの実施形態で用いられる。*sdRNA*法により、化学合成された化合物をエクスピボ及びインピボの両方で広範囲の一次細胞及び組織に直接送達することが可能になる。本明細書における本発明のいくつかの実施形態に記載の*sdRNA*は、Advirna LLC(Worcester, MA, USA)から市販されている。

40

【1413】

*siRNA*及び*sdRNA*は、疎水的に修飾された*siRNA*-アンチセンスオリゴヌクレオチドハイブリッド構造として形成され得、例えば、Byrne, et al., J

50

. Ocular Pharmacol. Therapeut., 2013, 29, 855-864 (その開示は参照により本明細書に組み込まれる) に開示されている。

【1414】

いくつかの実施形態では、s i RNA または s d RNA オリゴヌクレオチドは、滅菌エレクトロポレーションを使用して本明細書に記載の T I L に送達され得る。ある特定の実施形態では、方法は、s i RNA または s d RNA オリゴヌクレオチドを送達するために T I L 集団の滅菌エレクトロポレーションを含む。

【1415】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドは、膜貫通送達システムと組み合わせて細胞に送達され得る。いくつかの実施形態では、この膜貫通送達システムは、脂質、ウイル

10

【1416】

オリゴヌクレオチド及びオリゴヌクレオチド組成物は、本明細書に記載の T I L と接触し (例えば、接触させられ、本明細書では投与または送達されるとも称される)、T I L によって取り込まれる (T I L による受動的取り込みを含む)。s d RNA は、第 1 の拡張中 (例えば、ステップ B)、第 1 の拡張後 (例えば、ステップ C 中)、第 2 の拡張前または拡張中 (例えば、ステップ D の前またはステップ D 中)、ステップ D 後及びステップ E における採取前、ステップ F における採取中または採取後、ステップ F における最終製剤化及び/または注入バッグへの移行前または移行中、ならびにステップ F における任意選択の凍結保存ステップ前に、本明細書に記載の T I L に添加され得る。さらに、s d RNA は、ステップ F における任意の凍結保存ステップから解凍した後に添加され得る。いくつかの実施形態では、C D 3 9、C D 6 9、P D - 1、L A G - 3、T I M - 3、C I S H、C T L A - 4、T I G I T、T E T 2 及び C B L B を含む、本明細書に記載の 1 つ以上の s d RNA 標的遺伝子が、1 0 0 n M ~ 2 0 m M、2 0 0 n M ~ 1 0 m M、5 0 0 n m ~ 1 m M、1 μ M ~ 1 0 0 μ M、及び 1 μ M ~ 1 0 0 μ M からなる群から選択される濃度で T I L 及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、C D 3 9、C D 6 9、P D - 1、L A G - 3、T I M - 3、C I S H、C T L A - 4、T I G I T、T E T 2 及び C B L B を含む、本明細書に記載の 1 つ以上の s d RNA 標的遺伝子は、0 . 1 μ M s d RNA / 1 0 , 0 0 0 T I L / 1 0 0 μ L 培地、0 . 5 μ M s d RNA / 1 0 , 0 0 0 T I L / 1 0 0 μ L 培地、0 . 7 5 μ M s d RNA / 1 0 , 0 0 0 T I L / 1 0 0 μ L 培地、1 μ M s d RNA / 1 0 , 0 0 0 T I L / 1 0 0 μ L 培地、1 . 2 5 μ M s d RNA / 1 0 , 0 0 0 T I L / 1 0 0 μ L 培地、1 . 5 μ M s d RNA / 1 0 , 0 0 0 T I L / 1 0 0 μ L 培地、2 μ M s d RNA / 1 0 , 0 0 0 T I L / 1 0 0 μ L 培地、5 μ M s d RNA / 1 0 , 0 0 0 T I L / 1 0 0 μ L 培地、または 1 0 μ M s d RNA / 1 0 , 0 0 0 T I L / 1 0 0 μ L 培地からなる群から選択される量で T I L 及び他の薬剤を含む細胞培養培地に添加され得る。いくつかの実施形態では、C D 3 9、C D 6 9、P D - 1、L A G - 3、T I M - 3、C I S H、C T L A - 4、T I G I T、T E T 2 及び C B L B を含む、本明細書に記載の 1 つ以上の s d RNA 標的遺伝子は、R E P 前段階または R E P 段階中に 1 日 2 回、1 日 1 回、2 日毎、3 日毎、4 日毎、5 日毎、6 日毎、または 7 日毎に T I L 培養物に添加され得る。

20

30

40

【1417】

s d RNA を含む本発明のオリゴヌクレオチド組成物は、例えば、細胞培養培地に s d RNA を高濃度で溶解し、かつ受動的取り込みが起こるのに十分な時間を許容することによって、拡張プロセス中に本明細書に記載の T I L と接触することができる。ある特定の実施形態では、本発明の方法は、T I L 集団を、本明細書に記載のオリゴヌクレオチド組成物と接触させることを含む。ある特定の実施形態では、この方法は、オリゴヌクレオチド、例えば、s d RNA を細胞培養培地に溶解することと、細胞培養培地を T I L 集団と

50

接触させることを含む。T I L は、本明細書に記載の第 1 の集団、第 2 の集団、及び／または第 3 の集団であり得る。

【1418】

いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチドの細胞への送達は、リン酸カルシウム、DMSO、グリセロールもしくはデキストラン、エレクトロポレーションを含む好適な技術分野で認識される方法によって、またはトランスフェクションによって、例えば、当該技術分野で知られている方法、例えば、米国特許第 4, 897, 355 号、同第 5, 459, 127 号、同第 5, 631, 237 号、同第 5, 955, 365 号、同第 5, 976, 567 号、同第 10, 087, 464 号、及び同第 10, 155, 945 号、ならびに Bergan, et al., Nucl. Acids Res. 1993, 21, 3567 (これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる) に記載される方法を使用して、カチオン性、アニオン性、もしくは中性脂質組成物またはリポソームを使用して増強され得る。

10

【1419】

いくつかの実施形態では、1つを超える s i R N A または s d R N A が、標的遺伝子の発現を減少させるために使用されるいくつかの実施形態では、CD39、CD69、PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3、CTLA-4、TIGIT、TET2 及び／または CISH を標的とする s i R N A または s d R N A のうちの 1 つ以上と一緒に使用される。いくつかの実施形態では、PD-1 s i R N A または s d R N A は、1つを超える遺伝子標的の発現を減少させるために、TIM-3、CBLB、LAG3、CTLA-4、TIGIT、TET2 及び／または CISH のうちの 1 つ以上とともに使用される。いくつかの実施形態では、LAG3 s i R N A または s d R N A は、両方の標的の遺伝子発現を減少させるために、CISH を標的とする s i R N A または s d R N A と組み合わせて使用される。いくつかの実施形態では、本明細書における CD39、CD69、PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3、CTLA-4、TIGIT、TET2 及び／または CISH のうちの 1 つ以上を標的とする s i R N A または s d R N A は、Advirna LLC (Worcester, MA, USA) または複数の他のベンダーから市販されている。

20

【1420】

いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A は、CD39、CD69、PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFB β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A は、CD39、CD69、PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFB β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、1つの s i R N A または s d R N A は、PD-1 を標的とし、別の s i R N A または s d R N A は、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、CISH、TGFB β R2、PKA、CBLB、BAFF (BR3)、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A は、CD39、CD69、PD-1、LAG-3、CISH、CBLB、TIM3、CTLA-4、TIGIT、TET2、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A は、PD-1、ならびに LAG3、CISH、CBLB、TIM3 のうちの 1 つ、及びそれらの組み合わせから選択される遺伝子を標的とする。いくつかの実施形態では、1つの s i R N A または s d R N A は、PD-1 を標的とし、1つの s i R N A または s d R N A は、LAG3 を標的とする。いくつかの実施形態では、1つの s i R N A または s d R N A は、PD-1 を標的とし、1つの s i R N A または s d R N A は、CISH を標的とする。いくつかの実施形態では、1つの s i R N A または s d R N A は、PD-1 を標的とし、1つの s i R N A または s d R N A は、CBLB を標的とする。いくつかの実施形態では、1つの s

30

40

50

50

つの s i R N A または s d R N A は、T I G I T を標的とし、1 つの s i R N A または s d R N A は、T E T 2 を標的とする。

【1 4 2 1】

本明細書で考察されたように、本発明の実施形態は、それらの治療効果を増強するために遺伝子編集を介して遺伝子修飾された腫瘍浸潤リンパ球（T I L）を提供する。本発明の実施形態は、1 つ以上のタンパク質の発現の促進及び1 つ以上のタンパク質の発現の阻害の両方、ならびにそれらの組み合わせのために、T I L 集団へのヌクレオチド挿入（R N A または D N A）による遺伝子編集を包含する。本発明の実施形態は、T I L を治療的集団に拡張するための方法も提供し、方法は、T I L を遺伝子編集することを含む。T I L 集団を遺伝子修飾するために使用され得るいくつかの遺伝子編集技術が存在し、それらは本発明による使用に好適である。かかる方法は、以下に記載の方法、ならびに本明細書の他の場所に記載のウイルス及びトランスポゾン方法を含む。いくつかの実施形態では、T I L、M I L、またはP B L を遺伝子修飾してC C R を発現させる方法はまた、かかる遺伝子の安定したノックアウトまたはかかる遺伝子の一過性ノックダウンのいずれかを介して遺伝子の発現を抑制する修飾を含んでもよい。

10

【1 4 2 2】

いくつかの実施形態では、この方法は、本明細書に記載の第1の集団、第2の集団、及び／または第3の集団におけるT I L 集団を遺伝子修飾する方法を含む。いくつかの実施形態では、T I L 集団を遺伝子修飾する方法は、1 つ以上のタンパク質の産生または阻害（例えば、サイレンシング）のために遺伝子の安定した組み込みステップを含む。いくつかの実施形態では、T I L 集団を遺伝子修飾する方法は、エレクトロポレーションステップを含む。エレクトロポレーション法は、当該技術分野で知られており、例えば、T s o n g, B i o p h y s. J. 1991, 60, 297-306 及び米国特許出願公開第2014/0227237 A1 号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。米国特許第5,019,034号、同第5,128,257号、同第5,137,817号、同第5,173,158号、同第5,232,856号、同第5,273,525号、同第5,304,120号、同第5,318,514号、同第6,010,613号、及び同第6,078,490号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるものなどの当該技術分野で知られている他のエレクトロポレーション法が使用され得る。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、滅菌エレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、パルスエレクトロポレーション法である。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、T I L をパルス電場で処理して、T I L の定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100 V / c m 以上の電界強度を有する、少なくとも3つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたD C 電気パルス列をT I L に適用するステップを含み、少なくとも3つのD C 電気パルス列は、以下の特徴のうちの1つ、2つ、または3つを有する：（1）少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス振幅が互いに異なる、（2）少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス幅が互いに異なる、及び（3）少なくとも3つのパルスのうちの2つの第1のセットの第1のパルス間隔が、少なくとも3つのパルスのうちの2つの第2のセットの第2のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、T I L をパルス電場で処理して、T I L の定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100 V / c m 以上の電界強度を有する、少なくとも3つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたD C 電気パルス列をT I L に適用するステップを含み、少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス振幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、T I L をパルス電場で処理して、T I L の定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100 V / c m 以上の電界強度を有する

20

30

40

50

、少なくとも3つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたDC電気パルス列をTILに適用するステップを含み、少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス幅が互いに異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TILをパルス電場で処理して、TILの定義及び制御された永続的または一時的変更を変える、操作する、または引き起こすステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を有する、少なくとも3つの単一オペレーターが制御する、独立してプログラムされたDC電気パルス列をTILに適用するステップを含み、少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つの第1のセットの第1のパルス間隔が、少なくとも3つのパルスのうちの2つの第2のセットの第2のパルス間隔とは異なる。いくつかの実施形態では、エレクトロポレーション法は、TILをパルス電場で処理して、TILにおける細孔形成を誘導するステップを含むパルスエレクトロポレーション法であり、100V/cm以上の電界強度を有する、少なくとも3つのDC電気パルス列をTILに適用するステップを含み、少なくとも3つのDC電気パルス列は、以下の特徴のうちの1つ、2つ、または3つを有する：(1)少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス振幅が互いに異なる、(2)少なくとも3つのパルスのうちの少なくとも2つのパルス幅が互いに異なる、及び(3)少なくとも3つのパルスのうちの2つの第1のセットの第1のパルス間隔が、少なくとも3つのパルスのうちの2つの第2のセットの第2のパルス間隔とは異なり、これにより、誘導された細孔が比較的長期間にわたって持続され、TILの生存率が維持される。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、リン酸カルシウムトランスフェクションステップを含む。リン酸カルシウムトランスフェクション法(リン酸カルシウムDNA沈殿、細胞表面コーティング、及びエンドサイトーシス)は、当該技術分野で知られており、Graham and vander Eb, Virology 1973, 52, 456-467、Wigler, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 1979, 76, 1373-1376、及びChen and Okayarea, Mol. Cell. Biol. 1987, 7, 2745-2752、ならびに米国特許第5,593,875号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、リポソームトランスフェクションステップを含む。リポソームトランスフェクション法、例えば、カチオン性脂質N-[1-(2,3-ジオレイルオキシ)プロピル]-n,n,n-トリメチルアンモニウムクロリド(DOTMA)及びジオレイルホスホチジルエタノールアミン(DOPE)の1:1(w/w)リポソーム製剤を用いる方法は、当該技術分野において既知であり、Rose, et al., Biotechniques 1991, 10, 520-525及びFelgner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 7413-7417、ならびに米国特許第5,279,833号、同第5,908,635号、同第6,056,938号、同第6,110,490号、同第6,534,484号、及び同第7,687,070号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、TIL集団を遺伝子修飾する方法は、米国特許第5,766,902号、同第6,025,337号、同第6,410,517号、同第6,475,994号、及び同第7,189,705号に記載の方法を使用するトランスフェクションステップを含み、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。TILは、本明細書に記載のTILの第1の集団、第2の集団、及び/または第3の集団であり得る。

10

20

30

40

50

【1423】

ある実施形態によれば、遺伝子編集プロセスは、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子での二本鎖または一本鎖切断の生成を媒介するプログラム可能なヌクレアーゼの使用を含み得る。かかるプログラム可能なヌクレアーゼは、特定のゲノム遺伝子座に切断を導入することによって正確なゲノム編集を可能にし、すなわち、ゲノム内の特定のDNA配列の認識に依存して、ヌクレアーゼドメインをこの位置に標的し、標的配列での二本鎖切断の生成を媒介する。DNAの二本鎖切断は、その後、内因性修復機構を切断部位に動員し

て、非相同末端結合（NHEJ）または相同指向修復（HDR）のいずれかによるゲノム編集を媒介する。したがって、切断の修復は、標的遺伝子産物を破壊する（例えば、サイレンス、抑制、または増強する）挿入／欠失変異の導入をもたらす可能性がある。

【1424】

部位特異的ゲノム編集を可能にするために開発されたヌクレアーゼの主要なクラスには、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様ヌクレアーゼ（TALEN）、及びCRISPR関連ヌクレアーゼ（例えば、CRISPR/Cas9）が含まれる。これらのヌクレアーゼシステムは、DNA認識のモードに基づいて大きく2つのカテゴリーに分類され得、ZFN及びTALENは、タンパク質-DNA相互作用を介して特定のDNA結合を達成するが、Cas9などのCRISPRシステムは、標的DNAと直接塩基対を形成する短いRNAガイド分子によって、かつタンパク質-DNA相互作用によって特定のDNA配列を標的とする。例えば、Cox et al., Nature Medicine, 2015, Vol. 21, No. 2を参照されたい。

【1425】

本発明のTIL拡張法に従って使用され得る遺伝子編集法の非限定的な例には、CRISPR法、TALEN法、及びZFN法が含まれ、これらは以下でより詳細に説明される。ある実施形態によれば、TILを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Gen2）に従って、または米国特許出願公開第US2020/0299644 A1号及び同第US2020/0121719 A1号、ならびに米国特許第10,925,900号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されるように実行することができ、方法は、増強された治療効果を提供することができるTILを生成するために、CRISPR法、TALEN法、またはZFN法のうちの1つ以上によって、TILの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。ある実施形態によれば、遺伝子編集されたTILは、インビトロでそれらを修飾されていないTILと比較することによって、例えば、修飾されていないTILと比較してインビトロでのエフェクター機能、サイトカインプロファイルなどを評価することによって、治療効果の改善について評価され得る。ある特定の実施形態では、この方法は、CRISPR法、TALEN法、及び／またはZFN法を使用してTIL集団を遺伝子編集することを含む。

【1426】

本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションは、CRISPRシステム、TALENシステム、及びZFNシステムなどの遺伝子編集システムの送達のために使用される。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、フローエレクトロポレーションシステムである。本発明のいくつかの実施形態との使用に好適な、好適なフローエレクトロポレーションシステムの例は、市販のMaxCyte STXシステムである。本発明との使用に好適であり得る、BTX-Harvard Apparatusから入手可能なAgilePulseシステムもしくはECM830、Cellaxess Elektra (Cellelectrics)、Nucleofector (Lonza/Amaxa)、GenePulser MXcell (BIO RAD)、iPorator-96 (Primax)、またはsiPORTer96 (Ambion)などのいくつかの代替の市販エレクトロポレーション機器が存在する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、TIL拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。本発明のいくつかの実施形態では、エレクトロポレーションシステムは、本明細書に記載のパルスエレクトロポレーションシステムであり、TIL拡張法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。

【1427】

TILを治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、Gen2）に従って、または米国特許出願公開第US2020/0299644 A1号及び同第US2020/0121719 A1号、ならびに米国特許第10,925,900号（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載され

ているように実施することができ、方法は、CRISPR法（例えば、CRISPR/Cas9またはCRISPR/Cpf1）によってTILの少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、TIL拡張プロセス中のCRISPR法の使用は、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的TIL集団の少なくとも一部分においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、TIL拡張プロセス中のCRISPR法の使用は、1つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的TIL集団の少なくとも一部分において増強させる。

【1428】

CRISPRは、clustered regularly interspaced short palindromic repeats（クラスター化された定期的に間隔をあけた短いパリンドロミックリピート）の略語である。遺伝子編集のためにCRISPRシステムを使用する方法は、本明細書ではCRISPR法とも称される。RNA及びCasタンパク質を組み込み、かつ本発明に従って使用され得るCRISPRシステムには、3つの型：I型、II型、及びIII型がある。II型CRISPR（Cas9によって例示される）は、最もよく特徴付けられているシステムのうちの1つである。

【1429】

CRISPR技術は、細菌及び古細菌（単細胞微生物のドメイン）の自然防御機構から適合された。これらの生物は、CRISPR由来のRNA及びCas9を含む様々なCasタンパク質を使用して、外来侵入物のDNAを切り刻んで破壊することによって、ウイルス及び他の異物による攻撃を阻止する。CRISPRは、ヌクレオチド反復配列及びスペーサーの存在という2つの異なる特徴を有するDNAの特殊な領域である。ヌクレオチドの反復配列は、CRISPR領域全体に分布しており、外来DNA（スペーサー）の短いセグメントが反復配列の間に散在している。II型CRISPR/Casシステムでは、スペーサーは、CRISPRゲノム遺伝子座内に組み込まれ、転写され、短いCRISPR RNA（crRNA）に処理される。これらのcrRNAは、トランス活性化crRNA（tracrRNA）にアニーリングし、Casタンパク質による病原性DNAの配列特異的切断及びサイレンシングを指示する。Cas9タンパク質による標的認識には、crRNA内の「シード」配列、及びcrRNA結合領域の上流にある保存されたジヌクレオチドを含むプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列が必要である。これにより、CRISPR/Casシステムが再標的されて、crRNAを再設計することにより、実質的にいずれのDNA配列も切断することができる。天然システムにおけるcrRNA及びtracrRNAは、遺伝子操作で使用するために、およそ100ヌクレオチドの単一ガイドRNA（sgRNA）に簡略化され得る。CRISPR/Casシステムは、Cas9エンドヌクレアーゼを発現するプラスミドと必要なcrRNA成分を同時送達することにより、ヒト細胞に直接運搬可能である。Casタンパク質の異なるバリエーション（例えば、Cpf1などのCas9のオルソログ）を使用して、標的の制限を低減することができる。

【1430】

CRISPR法によりTILを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、CD39、CD69、PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2（TIM-3）、Cish、TGFB β 、PKA、CBLB、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、及びBCORが含まれる。

【1431】

C R I S P R 法により T I L を永久に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、I L - 2、I L 1 2、I L - 1 5、及び I L - 2 1 が含まれる。

【1432】

C R I S P R 法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第 8, 6 9 7, 3 5 9 号、同第 8, 9 9 3, 2 3 3 号、同第 8, 7 9 5, 9 6 5 号、同第 8, 7 7 1, 9 4 5 号、同第 8, 8 8 9, 3 5 6 号、同第 8, 8 6 5, 4 0 6 号、同第 8, 9 9 9, 6 4 1 号、同第 8, 9 4 5, 8 3 9 号、同第 8, 9 3 2, 8 1 4 号、同第 8, 8 7 1, 4 4 5 号、同第 8, 9 0 6, 6 1 6 号、及び同第 8, 8 9 5, 3 0 8 号に記載されており、各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。C R I S P R / C a s 9 及び C R I S P R / C p f 1 を発現するためのプラスミドなどの C R I S P R 法を行うための資源は、G e n S c r i p t などの企業から市販されている。

10

【1433】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の T I L 集団の遺伝子修飾は、米国特許第 U S 9 7 9 0 4 9 0 号に記載されている C R I S P R / C p f 1 システムを使用して行うことができ、この開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1434】

T I L を治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態（例えば、G e n 2）に従って、または米国特許出願公開第 U S 2 0 2 0 / 0 2 9 9 6 4 4 A 1 号及び同第 U S 2 0 2 0 / 0 1 2 1 7 1 9 A 1 号、ならびに米国特許第 1 0, 9 2 5, 9 0 0 号に記載されているように実施することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれ、方法は、T A L E 法によって T I L の少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、T I L 拡張プロセス中の T A L E 法の使用は、1 つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的 T I L 集団の少なくとも一部分においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、T I L 拡張プロセス中の T A L E 法の使用は、1 つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的 T I L 集団の少なくとも一部分において増強させる。

20

【1435】

T A L E は、転写活性化因子様エフェクターヌクレアーゼ（T A L E N）を含む、転写活性化因子様エフェクタータンパク質を表す。遺伝子編集のために T A L E システムを使用する方法は、本明細書では T A L E 法とも称され得る。T A L E は、植物病原菌 X a n t h o m o n a s 属由来の天然に存在するタンパク質であり、各々単一の塩基対を認識する一連の 3 3 ~ 3 5 アミノ酸反復ドメインで構成される DNA 結合ドメインを含む。T A L E 特異性は、反復可変二残基（R V D）として知られる 2 つの超可変アミノ酸によって決定される。モジュラー T A L E 反復配列は、隣接する DNA 配列を認識するために一緒に結合される。DNA 結合ドメイン内の特定の R V D は、標的遺伝子座内の塩基を認識し、予測可能な DNA 結合ドメインを組み立てるための構造的特徴を提供する。T A L E の DNA 結合ドメインは、I I S 型 F o k I エンドヌクレアーゼの触媒ドメインに融合して、標的可能な T A L E ヌクレアーゼを作製する。部位特異的変異を誘導するために、1 4 ~ 2 0 塩基対のスペーサー領域によって分離された 2 つの個々の T A L E N アームが F o k I モノマーを密接に接近させて二量体化し、標的とされる二本鎖切断を産生する。

30

40

【1436】

様々な組み立て方法を利用したいくつかの大規模な系統的研究により、T A L E 反復配列を組み合わせて、実質的にすべてのユーザ定義配列を認識することができることが示されている。カスタム設計された T A L E アレイも、C e l l e c t i s B i o r e s e a r c h (P a r i s, F r a n c e)、T r a n s p o s a g e n B i o p h a r m a c e u t i c a l s (L e x i n g t o n, K Y, U S A)、及び L i f e T e c h n o l o g i e s (G r a n d I s l a n d, N Y, U S A) から市販されている。本

50

発明での使用に好適な T A L E 法及び T A L E N 法は、米国特許公開第 U S 2 0 1 1 / 0 2 0 1 1 1 8 A 1 号、同第 U S 2 0 1 3 / 0 1 1 7 8 6 9 A 1 号、同第 U S 2 0 1 3 / 0 3 1 5 8 8 4 A 1 号、同第 U S 2 0 1 5 / 0 2 0 3 8 7 1 A 1 号、及び同第 U S 2 0 1 6 / 0 1 2 0 9 0 6 A 1 号に記載されており、これらの各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1437】

T A L E 法により T I L を永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、C D 3 9、C D 6 9、P D - 1、C T L A - 4、L A G - 3、H A V C R 2 (T I M - 3)、C i s h、T G F β 、P K A、C B L - B、P P P 2 C A、P P P 2 C B、P T P N 6、P T P N 2 2、P D C D 1、B T L A、C D 1 6 0、T I G I T、T E T 2、C D 9 6、C R T A M、L A I R 1、S I G L E C 7、S I G L E C 9、C D 2 4 4、T N F R S F 1 0 B、T N F R S F 1 0 A、C A S P 8、C A S P 1 0、C A S P 3、C A S P 6、C A S P 7、F A D D、F A S、S M A D 2、S M A D 3、S M A D 4、S M A D 1 0、S K I、S K I L、T G I F 1、I L 1 0 R A、I L 1 0 R B、H M O X 2、I L 6 R、I L 6 S T、E I F 2 A K 4、C S K、P A G 1、S I T 1、F O X P 3、P R D M 1、B A T F、G U C Y 1 A 2、G U C Y 1 A 3、G U C Y 1 B 2、G U C Y 1 B 3、T O X、S O C S 1、A N K R D 1 1、及び B C O R が含まれる。

10

【1438】

T A L E 法により T I L を永久に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 2、C X C R 3、C X 3 C R 1、I L - 2、I L 1 2、I L - 1 5、及び I L - 2 1 が含まれる。

20

【1439】

T A L E 法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第 8, 5 8 6, 5 2 6 号に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。

【1440】

T I L を治療的集団に拡張するための方法は、本明細書に記載の方法のいずれかの実施形態に従って、または米国特許出願公開第 U S 2 0 2 0 / 0 2 9 9 6 4 4 A 1 号及び同第 U S 2 0 2 0 / 0 1 2 1 7 1 9 A 1 号、ならびに米国特許第 1 0, 9 2 5, 9 0 0 号に記載されているように実施することができ、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれ、方法は、ジンクフィンガーまたはジンクフィンガーヌクレアーゼ法によって T I L の少なくとも一部を遺伝子編集することをさらに含む。特定の実施形態によれば、T I L 拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、1 つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的 T I L 集団の少なくとも一部においてサイレンシングまたは減少させる。あるいは、T I L 拡張プロセス中のジンクフィンガー法の使用は、1 つ以上の免疫チェックポイント遺伝子の発現を、治療的 T I L 集団の少なくとも一部において増強させる。

30

【1441】

個々のジンクフィンガーは、保存された $\beta \beta \alpha$ 立体配置でおよそ 3 0 個のアミノ酸を含む。 α らせんの表面上のいくつかのアミノ酸は、典型的には、異なる選択性レベルで D N A の主溝の 3 b p と接触する。ジンクフィンガーは、2 つのタンパク質ドメインを有する。第 1 のドメインは、D N A 結合ドメインであり、真核生物転写因子を含み、ジンクフィンガーを含む。第 2 のドメインは、ヌクレアーゼドメインであり、F o k I 制限酵素を含み、D N A の触媒的切断を担っている。

40

【1442】

個々の Z F N の D N A 結合ドメインは、典型的には、3 ~ 6 個の個々のジンクフィンガー反復配列を含み、各々 9 ~ 1 8 塩基対を認識することができる。ジンクフィンガードメインが目的の標的部位に特異的である場合、合計 1 8 塩基対を認識する 3 フィンガー Z F N の対でさえ、理論的には、哺乳動物ゲノムの単一遺伝子座を標的とすることができる。

50

新たなジンクフィンガーアレイを生成するための1つの方法は、既知の特異性を有するより小さいジンクフィンガー「モジュール」を組み合わせることである。最も一般的なモジュラーアセンブリプロセスは、各々3塩基対のDNA配列を認識することができる3つの別個のジンクフィンガーを組み合わせ、9塩基対の標的部位を認識することができる3フィンガーアレイを生成することを含む。あるいは、オリゴマー化プールエンジニアリング（OPEN）などの選択ベースのアプローチを使用して、隣接するフィンガー間のコンテキスト依存的相互作用を考慮したランダム化ライブラリーから新たなジンクフィンガーアレイを選択することができる。操作されたジンクフィンガーは、Sangamo Biosciences (Richmond, CA, USA) 及びSigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から市販されている。

10

【1443】

ジンクフィンガー法によりTILを永続的に遺伝子編集することによってサイレンスまたは阻害され得る遺伝子の非限定的な例には、CD39、CD69、PD-1、CTLA-4、LAG-3、HAVCR2 (TIM-3)、Cish、TGFB β 、PKA、CBLB、PPP2CA、PPP2CB、PTPN6、PTPN22、PDCD1、BTLA、CD160、TIGIT、TET2、CD96、CRTAM、LAIR1、SIGLEC7、SIGLEC9、CD244、TNFRSF10B、TNFRSF10A、CASP8、CASP10、CASP3、CASP6、CASP7、FADD、FAS、SMAD2、SMAD3、SMAD4、SMAD10、SKI、SKIL、TGIF1、IL10RA、IL10RB、HMOX2、IL6R、IL6ST、EIF2AK4、CSK、PAG1、SIT1、FOXP3、PRDM1、BATF、GUCY1A2、GUCY1A3、GUCY1B2、GUCY1B3、TOX、SOCS1、ANKRD11、及びBCORが含まれる。

20

【1444】

ジンクフィンガー法によりTILを永久に遺伝子編集することによって増強され得る遺伝子の非限定的な例には、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15、及びIL-21が含まれる。

【1445】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の例は、米国特許第6,534,261号、同第6,607,882号、同第6,746,838号、同第6,794,136号、同第6,824,978号、同第6,866,997号、同第6,933,113号、同第6,979,539号、同第7,013,219号、同第7,030,215号、同第7,220,719号、同第7,241,573号、同第7,241,574号、同第7,585,849号、同第7,595,376号、同第6,903,185号、及び同第6,479,626号に記載されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

30

【1446】

ジンクフィンガー法によって標的遺伝子配列の発現を変化させるための、本発明の実施形態に従って使用され得るシステム、方法、及び組成物の他の例は、Beane, et al., Mol. Therapy, 2015, 23 1380-1390に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

40

【1447】

いくつかの実施形態では、TILは、高親和性TCR、例えば、MAGE-1、HER2、もしくはNY-ESO-1などの腫瘍関連抗原で標的とされるTCR、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、CD19）に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含むが、これらに限定されない追加の機能を含むように任意選択で遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、遺伝子操作を用いて、PD-1及びCTLA-4またはCD39及びCD69をコードする遺伝子などの特定の標的遺伝子のノックアウトを含む、TILを遺伝子編集することができる。ある特定

50

の実施形態では、この方法は、高親和性TCR、例えば、MAGE-1、HER2、もしくはNY-ESO-1などの腫瘍関連抗原で標的とされるTCR、または腫瘍関連細胞表面分子（例えば、メソセリン）もしくは系統制限細胞表面分子（例えば、CD19）に結合するキメラ抗原受容体（CAR）を含むようにTIL集団を遺伝子操作することを含む。適切には、TIL集団は、本明細書に記載の第1の集団、第2の集団及び／または第3の集団であり得る。

【1448】

E. TIL製造のための閉鎖系

本発明は、TIL培養プロセス中に閉鎖系の使用を提供する。かかる閉鎖系は、微生物汚染の防止及び／または低減を可能にし、より少数のフラスコの使用を可能にし、コスト削減を可能にする。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、2つの容器を使用する。

【1449】

かかる閉鎖系は当該技術分野でよく知られており、例えば、<http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>及び<https://www.fda.gov/BioLogicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Blood/ucm076779.htm>で見つけることができる。

【1450】

滅菌接続装置（STCD）は、互換性のある2本の管間の滅菌溶接をもたらす。この手順により、様々な容器と管径との滅菌接続が可能になる。いくつかの実施形態では、閉鎖系には、実施例に記載のルアーロック系及びヒートシール系が含まれる。いくつかの実施形態では、閉鎖系は、閉鎖系の無菌性及び閉鎖性を維持するために、滅菌条件下でシリンジを介してアクセスされる。いくつかの実施形態では、実施例に記載の閉鎖系が用いられる。いくつかの実施形態では、TILは、実施例において本明細書に記載される方法に従って、最終製品製剤容器に製剤化される。

【1451】

いくつかの実施形態では、閉鎖系は、腫瘍断片が得られてから、TILを患者に投与するかまたは凍結保存する準備が整うまで、1つの容器を使用する。いくつかの実施形態では、2つの容器が使用される場合、第1の容器は密閉G容器であり、TIL集団が遠心分離され、第1の密閉G容器を開かずに注入バッグに移される。いくつかの実施形態では、2つの容器が使用される場合、注入バッグは、HypoThermosoilを含有する注入バッグである。閉鎖系または閉鎖TIL細胞培養系は、腫瘍試料及び／または腫瘍断片が追加されると、系が外部からしっかりと密閉され、細菌、真菌、及び／またはいずれの他の微生物汚染も侵入しない閉鎖環境を形成することの特徴とする。

【1452】

いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約5%～約100%である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約5%～約95%である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約5%～約90%である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約10%～約90%である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約15%～約85%である。いくつかの実施形態では、微生物汚染の低減は、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約97%、約98%、約99%、または約100%である。

【1453】

閉鎖系は、微生物汚染の不在下で及び／または微生物汚染が大幅に低減された状態で、TILの成長を可能にする。

【1454】

さらに、TIL細胞培養環境のpH、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧は各々、細胞が培養されるにつれて変化する。したがって、細胞培養に適切な培地を循環させても、TIL増殖に最適な環境として閉鎖環境を常に一定に維持する必要がある。この目的のために、

閉鎖環境の培養液中の pH、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧の物理的要因がセンサーによって監視されること、そのシグナルが培養環境の入口に設置されたガス交換器を制御するために使用されること、及び閉鎖環境のガス分圧が細胞培養環境を最適化するように培養液の変化に応じてリアルタイムで調整されることが望ましい。いくつかの実施形態では、本発明は、閉鎖環境の pH、二酸化炭素分圧、及び酸素分圧を測定する監視装置を備えたガス交換器を閉鎖環境の入口に組み込み、かつ監視装置からのシグナルに基づいてガス濃度を自動的に調整することによって細胞培養環境を最適化する閉鎖細胞培養系を提供する。

【1455】

いくつかの実施形態では、閉鎖環境内の圧力は、連続的または断続的に制御される。すなわち、閉鎖環境内の圧力を、例えば、圧力維持装置によって変化させることができ、それ故に、空間が正圧状態で TIL の成長に好適であることを確実にするか、または負圧状態で流体の浸出を促進し、ひいては細胞増殖を促進する。さらに、負圧を断続的に加えることにより、閉鎖環境内の体積の一時的な収縮によって、閉鎖環境内の循環液体を均一かつ効率的に置き換えることが可能である。

【1456】

いくつかの実施形態では、TIL の増殖に最適な培養成分を置換または追加することができ、IL-2 及び／または OKT3 などの因子、ならびに組み合わせを追加することができる。

【1457】

F. TIL の任意選択の凍結保存

バルク TIL 集団（例えば、第 2 の TIL 集団）または拡張された TIL 集団（例えば、第 3 の TIL 集団）のいずれかを、任意選択で凍結保存することができる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、治療的 TIL 集団に起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、第 2 の拡張後に採取された TIL に起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、図 8（特に、例えば図 8A 及び／または図 8B 及び／または図 8C 及び／または図 8D 及び／または図 8E 及び／または図 8F 及び／または図 8G）の例示的なステップ F において TIL に起こる。いくつかの実施形態では、TIL は、注入バッグ内で凍結保存される。いくつかの実施形態では、TIL は、注入バッグに入れる前に凍結保存される。いくつかの実施形態では、TIL は、凍結保存され、注入バッグに入っていない。いくつかの実施形態では、凍結保存は、凍結保存培地を使用して行われる。いくつかの実施形態では、凍結保存培地は、ジメチルスルホキシド（DMSO）を含有する。これは、一般に、TIL 集団を凍結溶液、例えば、85% 補体不活性化 AB 血清及び 15% ジメチルスルホキシド（DMSO）に入れることによって達成される。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、 -80°C で 24 時間保存され、任意選択で凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Sadeghi, et al., *Acta Oncologica* 2013, 52, 978-986 を参照されたい。

【1458】

適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ 5 分の 4 が解凍されるまで 37°C の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意で 1 回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍された TIL は、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。

【1459】

いくつかの実施形態では、TIL 集団は、CS10 凍結保存培地（CryoStor 10、BioLife Solutions）を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、TIL 集団は、ジメチルスルホキシド（DMSO）を含有する凍結保存培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、TIL 集団は、1:1（体積：体積）比の CS10 及び細胞培養培地を使用して凍結保存される。いくつかの実施形態では、TIL 集団は、約 1:1（体積：体積）比の CS10 及び細胞培養培地を使用して凍結保存され、追加の IL-2 をさらに含む。

【1460】

上で考察され、図1及び／または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）に提供されるようなステップA～Eにおいて例示されるように、凍結保存は、TIL拡張プロセス全体の様々な時点で起こり得る。いくつかの実施形態では、第1の拡張後のTILの拡張集団（例えば、ステップBに従って提供される）または図1もしくは8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）のステップDによる1回以上の第2の拡張後のTILの拡張集団を凍結保存することができる。凍結保存は、一般に、TIL集団を凍結溶液、例えば、85%補体不活性化AB血清及び15%ジメチルスルホキシド（DMSO）に入れることによって達成され得る。溶液中の細胞が極低温バイアルに入れられ、-80℃で24時間保存され、任意選択で凍結保存のためにガス状窒素冷凍庫に移される。Sadeghi, et al., *Acta Oncologica* 2013, 52, 978-986を参照されたい。いくつかの実施形態では、TILは、5% DMSO中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、TILは、5% DMSOを加えた細胞培養培地中で凍結保存される。いくつかの実施形態では、TILは、実施例6に提供される方法に従って凍結保存される。

10

【1461】

適切な場合、細胞が冷凍庫から取り出され、溶液のおよそ5分の4が解凍されるまで37℃の水浴中で解凍される。細胞は、一般に、完全培地中に再懸濁され、任意で1回以上洗浄される。いくつかの実施形態では、解凍されたTILは、当該技術分野で知られているように計数され、生存率について評価され得る。

20

【1462】

場合によっては、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）からのステップBのTIL集団は、以下に論じられるプロトコルを使用して、直ちに凍結保存され得る。あるいは、バルクTIL集団を、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）からのステップC及びステップDに供し、その後、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）からのステップDの後に凍結保存することができる。同様に、遺伝子修飾されたTILが治療法に使用される場合、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）からのステップBまたはステップDのTIL集団を、好適な治療のために遺伝子修飾に供することができる。

30

【1463】

G. 拡張TILの表現型特徴

いくつかの実施形態では、TILは、本明細書及び実施例に記載されているものを含む、拡張後の多数の表現型マーカーの発現について分析される。いくつかの実施形態では、1つ以上の表現型マーカーの発現が調べられる。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）からのステップBにおける第1の拡張後に分析される。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）からのステップCにおける遷移中に分析される。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）からのステップCによる移行中及び凍結保存後に分析される。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、図1または8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／ま

40

50

たは図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) からのステップ D における第 2 の拡張後に分析される。いくつかの実施形態では、T I L の表現型特徴は、図 1 または 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) からのステップ D による 2 回以上の拡張後に分析される。

【1 4 6 4】

いくつかの実施形態では、マーカーは、C D 8 及び C D 2 8 からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、C D 8 の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、C D 2 8 の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、C D 8 及び／または C D 2 8 の発現は、他のプロセス (例えば、例えば図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) に提供される G e n 3 プロセス) と比較して、例えば図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) に提供される 2 A プロセスと比較して、現行の発明のプロセスに従って産生された T I L 上でより高い。いくつかの実施形態では、C D 8 の発現は、他のプロセス (例えば、例えば図 8 (特に、例えば図 8 B) に提供される G e n 3 プロセス) と比較して、例えば図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) に提供される 2 A プロセスと比較して、現行の発明のプロセスに従って産生された T I L 上でより高い。いくつかの実施形態では、C D 2 8 の発現は、他のプロセス (例えば、例えば図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) に提供される G e n 3 プロセス) と比較して、例えば図 8 (特に、例えば図 8 A) に提供される 2 A プロセスと比較して、現行の発明のプロセスに従って産生された T I L 上でより高い。いくつかの実施形態では、高い C D 2 8 発現は、より若く、より持続的な T I L 表現型を示す。いくつかの実施形態では、1 つ以上の調節マーカーの発現が測定される。

【1 4 6 5】

いくつかの実施形態では、C D 8 及び／または C D 2 8 に基づく第 1 の T I L 集団、第 2 の T I L 集団、第 3 の T I L 集団、または採取された T I L 集団の選択は、本明細書に記載の腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を拡張するための方法のいずれのステップ中にも行われない。

【1 4 6 6】

いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のパーセンテージは、他のプロセス (例えば、例えば図 8 (特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G) に提供される G e n 3 プロセス) と比較して、例えば図 8 (特に、例えば図 8 A) に提供される 2 A プロセスと比較して、現行の発明のプロセスに従って産生された T I L 上でより高い。いくつかの実施形態では、セントラルメモリー細胞のメモリーマーカーは、C C R 7 及び C D 6 2 L からなる群から選択される。

【1 4 6 7】

いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L メモリーサブセットは、異なるメモリーサブセットに分類され得る。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L は、ナイーブ (C D 4 5 R A + C D 6 2 L +) T I L を含む。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L は、セントラルメモリー (C M、C D 4 5 R A - C D 6 2 L +) T I L を含む。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L は、エフェクターメモリー (E M、C D 4 5 R A - C D 6 2 L -) T I L を含む。いくつかの実施形態では、C D 4 + 及び／または C D 8 + T I L は、R A + エフェクターメモリー／エフェクター (T E M R A / T E F F、C D 4 5 R A + C D 6 2 L +) T I L を含む。

【1 4 6 8】

いくつかの実施形態では、TILは、グランザイムB、パーフォリン、及びグラニュライシンからなる群から選択されるもう1つのマーカーを発現する。いくつかの実施形態では、TILは、グランザイムBを発現する。いくつかの実施形態では、TILは、パーフォリンを発現する。いくつかの実施形態では、TILは、グラニュライシンを発現する。
【1469】

いくつかの実施形態では、再刺激されたTILは、サイトカイン放出アッセイを使用して、サイトカイン放出についても評価され得る。いくつかの実施形態では、TILは、インターフェロンガンマ（IFN- γ ）分泌について評価され得る。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、ELISAアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）に提供されるように、ステップDの後の急速な第2の拡張ステップの後のELISAアッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、TILの健康は、IFN-ガンマ（IFN- γ ）分泌によって測定される。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、活性なTILを示す。いくつかの実施形態では、IFN- γ 産生の効力アッセイが用いられる。IFN- γ 産生は、細胞傷害能の別の尺度である。IFN- γ 産生は、CD3、CD28、及びCD137／4-1BBに対する抗体で刺激されたTILの培地中のサイトカインIFN- γ のレベルを決定することによって測定され得る。これらの刺激されたTILからの培地中のIFN- γ レベルは、IFN- γ 放出を測定することによって決定され得る。いくつかの実施形態では、例えば、図8（特に、例えば、図8A）に提供される2AプロセスのステップDと比較した、例えば、図8（特に、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）に提供される、例えば、Gen3プロセスのステップDにおけるIFN- γ 産生の増加は、ステップDのTILの細胞傷害能の増加を示す。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、1倍、2倍、3倍、4倍、または5倍以上増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、1倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、2倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、3倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、4倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、5倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ は、Quantikine ELISAキットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、IFN- γ は、エキスピボでのTIL中で測定される。いくつかの実施形態では、IFN- γ は、例えば図8Bの方法を含む、本発明の方法によって産生されたTILを含む、TILにおいてエキスピボで測定される。

【1470】

いくつかの実施形態では、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、または5倍以上のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも1倍多くのIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも2倍多くのIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも3倍多くのIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも4倍多くのIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含

【 1 4 7 1 】

50

50

10

20

30

40

50

50

本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも25,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも30,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも35,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも40,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも45,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも50,000pg/mL/5e5細胞のIFN- γ 分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。

10

20

30

40

50

【1473】

Tリンパ球及びBリンパ球の多様な抗原受容体は、限られた数であるが、多数の遺伝子セグメントの体細胞組換えによって産生される。これらの遺伝子セグメント：V（可変）、D（多様性）、J（接合）、及びC（一定）は、免疫グロブリン及びT細胞受容体（TCR）の結合特異性及び下流での適用を決定する。本発明は、T細胞レパートリー多様性を示し、かつ増加させるTILを生成するための方法を提供する。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたTILは、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって得られたTILは、新たに採取されたTIL及び／または例えば、図8（特に、例えば図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8G）に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたTILは、新たに採取されたTIL及び／または図8（特に、例えば図8A）に例示されるようにGen2と称される方法を使用して調製されたTILと比較して、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、第1の拡張で取得されたTILは、T細胞レパートリー多様性の増加を示す。いくつかの実施形態では、多様性の増加は、免疫グロブリン多様性及び／またはT細胞受容体多様性の増加である。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン重鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、免疫グロブリンにあり、免疫グロブリン軽鎖にある。いくつかの実施形態では、多様性は、T細胞受容体にある。いくつかの実施形態では、多様性は、アルファ、ベータ、ガンマ、及びデルタ受容体からなる群から選択されるT細胞受容体のうちの1つにある。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）アルファ及び／またはベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）アルファの発現が増加する。いくつかの実施形態では、T細胞受容体（TCR）ベータの発現が増加する。いくつかの実施形態では、TCRa β （すなわち、TCR α/β ）の発現が増加する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプロセス（例えば、Gen3プロセス）は、他のプロセス、例えば、試料中の固有のペプチドCDRの数

に基づく Gen 2 と称されるプロセスと比較して、より高いクローン多様性を示す。

【1474】

いくつかの実施形態では、TIL の活性化及び疲弊は、1 つ以上のマーカーを調べることによって決定され得る。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊は、多色フローサイトメトリーを使用して決定され得る。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、CD 39、CD 69、CD 3、PD-1、2B4/CD 244、CD 8、CD 25、BT LA、KLRG、TIM-3、CD 194/CCR 4、CD 4、TIGIT、CD 183、CD 69、CD 95、CD 127、CD 103、及び/またはLAG-3) からなる群から選択される1 つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、CD 39、CD 69、BT LA、CTLA-4、ICOS、Ki 67、LAG-3、PD-1、TIGIT、及び/またはTIM-3 からなる群から選択される1 つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、活性化及び疲弊のマーカーには、CD 39、CD 69、BT LA、CTLA-4、ICOS、Ki 67、LAG-3、CD 103+/CD 69+、CD 103+/CD 69-、PD-1、TIGIT 及び/またはTIM-3 からなる群から選択される1 つ以上のマーカーが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、T 細胞マーカー（活性化及び疲弊マーカーを含む）は、T 細胞の活性化、阻害、または機能を調べるために決定及び/または分析され得る。いくつかの実施形態では、T 細胞マーカーには、CD 39、CD 69、TIGIT、CD 3、FoxP3、Tim-3、PD-1、CD 103、CTLA-4、LAG-3、BT LA-4、ICOS、Ki 67、CD 8、CD 25、CD 45、CD 4、及び/またはCD 59 からなる群から選択される1 つ以上のマーカーが含まれ得るが、これらに限定されない。

【1475】

いくつかの実施形態では、3000 pg/10⁶ TIL 超~300000 pg/10⁶ TIL 以上のグランザイム B 分泌を示す TIL は、例えば、図 8 A 及び/または図 8 B 及び/または図 8 C 及び/または図 8 D 及び/または図 8 E 及び/または図 8 F 及び/または図 8 G を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、3000 pg/10⁶ TIL 超、5000 pg/10⁶ TIL 超、7000 pg/10⁶ TIL 超、9000 pg/10⁶ TIL 超、11000 pg/10⁶ TIL 超、13000 pg/10⁶ TIL 超、15000 pg/10⁶ TIL 超、17000 pg/10⁶ TIL 超、19000 pg/10⁶ TIL 超、20000 pg/10⁶ TIL 超、40000 pg/10⁶ TIL 超、60000 pg/10⁶ TIL 超、80000 pg/10⁶ TIL 超、100000 pg/10⁶ TIL 超、120000 pg/10⁶ TIL 超、140000 pg/10⁶ TIL 超、160000 pg/10⁶ TIL 超、180000 pg/10⁶ TIL 超、200000 pg/10⁶ TIL 超、220000 pg/10⁶ TIL 超、240000 pg/10⁶ TIL 超、260000 pg/10⁶ TIL 超、280000 pg/10⁶ TIL 超、300000 pg/10⁶ TIL 超またはそれ以上のグランザイム B 分泌を示す TIL は、例えば、図 8 A 及び/または図 8 B 及び/または図 8 C 及び/または図 8 D 及び/または図 8 E 及び/または図 8 F 及び/または図 8 G を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、3000 pg/10⁶ TIL 超のグランザイム B 分泌を示す TIL は、例えば、図 8 A 及び/または図 8 B 及び/または図 8 C 及び/または図 8 D 及び/または図 8 E 及び/または図 8 F 及び/または図 8 G を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、5000 pg/10⁶ TIL 超のグランザイム B 分泌を示す TIL は、例えば、図 8 A 及び/または図 8 B 及び/または図 8 C 及び/または図 8 D 及び/または図 8 E 及び/または図 8 F 及び/または図 8 G を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、7000 pg/10⁶ TIL 超のグランザイム B 分泌を示す TIL は、例えば、図 8 A 及び/または図 8 B 及び/または図 8 C 及び/または図 8 D 及び/または図 8 E 及び/または図 8 F 及び/または図 8 G を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、9

50

50

[illegible]

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

[illegible]

10

20

30

40

50

20

30

50

IL 集団と比較して、少なくとも 8 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張された TIL 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない TIL 集団と比較して、少なくとも 9 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張された TIL 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない TIL 集団と比較して、少なくとも 10 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張された TIL 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない TIL 集団と比較して、少なくとも 20 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張された TIL 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない TIL 集団と比較して、少なくとも 30 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張された TIL 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない TIL 集団と比較して、少なくとも 40 倍増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張された TIL 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない TIL 集団と比較して、少なくとも 50 倍増加する。

10

【1478】

いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌と比較して、少なくとも 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、または 5 倍以上低いレベルの TNF- α (すなわち、TNF-アルファ) 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌と比較して、少なくとも 1 倍低いレベルの TNF- α 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌と比較して、少なくとも 2 倍低いレベルの TNF- α 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌と比較して、少なくとも 3 倍低いレベルの TNF- α 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌と比較して、少なくとも 4 倍低いレベルの TNF- α 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌と比較して、少なくとも 5 倍低いレベルの TNF- α 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。

20

30

【1479】

いくつかの実施形態では、少なくとも 200 pg/mL / 5e5 細胞～約 10,000 pg/mL / 5e5 細胞以上の TNF- α (すなわち、TNF-アルファ) 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、少なくとも 500 pg/mL / 5e5 細胞～約 10,000 pg/mL / 5e5 細胞以上の TNF- α 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、少なくとも 1000 pg/mL / 5e5 細胞～約 10,000 pg/mL / 5e5 細胞以上の TNF- α 分泌が可能な TIL は、例えば、図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G の方法を含む、本発明の拡張方法によって産生された TIL である。いくつかの実施形態では、少なくとも 200

40

50

0 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも3000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも4000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも5000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも6000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも7000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも8000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。いくつかの実施形態では、少なくとも9000 pg/mL / 5e5細胞～約10,000 pg/mL / 5e5細胞以上のTNF-α分泌が可能なTILは、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILである。

10

20

30

40

50

【1480】

いくつかの実施形態では、IFN-γ及びグランザイムBのレベルを測定して、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、IFN-γ及びTNF-αのレベルを測定して、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、IFN-γ及びTNF-αのレベルを測定して、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILの表現型特徴を決定する。いくつかの実施形態では、IFN-γ、グランザイムB及びTNF-αのレベルを測定して、例えば、図8A及び／または図8B及び／または図8C及び／または図8D及び／または図8E及び／または図8F及び／または図8Gの方法を含む、本発明の拡張方法によって産生されたTILの表現型特徴を決定する。

【1481】

いくつかの実施形態では、表現型特徴付けは、凍結保存後に調べられる。

【1482】

H. 追加のプロセスの実施形態

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、（a）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理し、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団を第1のTIL集団から分離することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、（b）IL-2及びOKT-3を含む細胞培養培地中でCD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団を培養することによってプライミングによる第1の拡張を行うことであって、プライミングによる第1の拡張を約1～7日間または約1～8日間行って第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団が、第1のTIL集団よりも数が多い、プライミングによる第1の拡張を行うことと、（c）第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び外因性抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地と接触させて急速な第2の拡張を行って、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の拡張を約1～11日間または約1～10日間行って第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団である、第3のTIL集団を産生することと、（d）ステップ（c）から取得された治療的TIL集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（1）第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX 100 MCS 容器内での小規模培養で約3～4日間、または約2～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、（2）小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-R EX 500 MCS 容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第2の容器内で、小規模培養由来の第2のTIL集団が、より大規模な培養で約4～7日間、または約4～8日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（1）第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX 100 MCS 容器内での第1の小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、（2）第1の小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器とサイズが等しい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、第2の小規模培養で約4～7日間、または約4～8日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（1）第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX 100 MCS 容器内での小規模培養で約3～4日間、または約2～4日間培養することによって急速な第2の増殖を行うことと、その後、（2）第1の小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器、例えば、G-R EX 500 MCS 容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、より大規模な培養で約4～7日間、または約4～8日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、（1）第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX 100 MCS 容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、（2）第1の小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R EX 500 MCS 容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、より大規模な培養で約5～7日間培養される。

【1483】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、（a）対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に

10

20

30

40

50

処理し、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団を第1のTIL集団から分離することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、(b) IL-2及びOKT-3を含む細胞培養培地中でCD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団を培養することによってプライミングによる第1の拡張を行うことであって、プライミングによる第1の拡張を約1～8日間行って第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団が、第1のTIL集団よりも数が多い、プライミングによる第1の拡張を行うことと、(c) 第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び外因性抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地と接触させて急速な第2の拡張を行って、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の拡張を約1～8日間行って第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団である、第3のTIL集団を産生することと、(d) ステップ(c)から取得された治療的TIL集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX 100 MCS容器内での小規模培養で約2～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、(2) 小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-R EX 500 MCS容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第2の容器内で、小規模培養由来の第2のTIL集団が、より大規模な培養で約4～8日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX 100 MCS容器内での第1の小規模培養で約2～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、(2) 第1の小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器とサイズが等しい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、第2の小規模培養で約4～6日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX 100 MCS容器内での小規模培養で約2～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、(2) 第1の小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器、例えば、G-R EX 500 MCS容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、より大規模な培養で約4～6日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX 100 MCS容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の増殖を行うことと、その後、(2) 第1の小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R EX 500 MCS容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、より大規模な培養で約4～5日間培養される。

10

20

30

40

50

【1484】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理し、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団を第1のTIL集団から分離することによって、対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得することと、(b) IL-2及びOKT-3を含む細胞培養培地中でCD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団を培養することによってプライミングによる第1の拡張を行うことであって、プライミングによる第

1の拡張を約1～7日間行って第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団が、第1のTIL集団よりも数が多い、プライミングによる第1の拡張を行うことと、(c)第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び外因性抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地と接触させて急速な第2の拡張を行って、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の拡張を約1～11日間行って第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団である、第3のTIL集団を産生することと、(d)ステップ(c)から取得された治療的TIL集団を採取することと、を含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第2の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(1)第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX 100 MCS 容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、(2)小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりも大きい第2の容器、例えば、G-R EX 500 MCS 容器に移すこととによって、培養のスケールアップを達成し、第2の容器内で、小規模培養由来の第2のTIL集団が、より大規模な培養で約4～7日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(1)第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX 100 MCS 容器内での第1の小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、(2)第1の小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器とサイズが等しい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウトを達成し、各第2の容器内で、第1の小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、第2の小規模培養で約4～7日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(1)第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX 100 MCS 容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、(2)第1の小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりもサイズが大きい少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の第2の容器、例えば、G-R EX 500 MCS 容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、より大規模な培養で約4～7日間培養される。いくつかの実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(1)第2のTIL集団を、第1の容器、例えば、G-R EX 100 MCS 容器内での小規模培養で約4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、(2)第1の小規模培養由来の第2のTIL集団を、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R EX - g 500 MCS 容器に移して配分することとによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第2のTIL集団の一部が、より大規模な培養で約5日間培養される。

10

20

30

40

50

【1485】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、一次の第1の拡張が、CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL集団を、外因性抗原提示細胞(APC)をさらに含む培養培地と接触させることによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)における培養培地中のAPCの数が、ステップ(b)における培養培地中のAPCの数よりも多い、方法を提供する。

【1486】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)において培養培地に追加の外因性APCが補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1487】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるAPCの数の

、ステップ（b）において追加されるA P Cの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約20：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1488】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるA P Cの数の、ステップ（b）において追加されるA P Cの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約10：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1489】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるA P Cの数の、ステップ（b）において追加されるA P Cの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約9：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1490】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるA P Cの数の、ステップ（b）において追加されるA P Cの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約8：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1491】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるA P Cの数の、ステップ（b）において追加されるA P Cの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約7：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1492】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるA P Cの数の、ステップ（b）において追加されるA P Cの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約6：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1493】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるA P Cの数の、ステップ（b）において追加されるA P Cの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約5：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1494】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるA P Cの数の、ステップ（b）において追加されるA P Cの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約4：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1495】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるA P Cの数の、ステップ（b）において追加されるA P Cの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約3：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1496】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるA P Cの数の、ステップ（b）において追加されるA P Cの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.9：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1497】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるA P Cの数の

50

、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.8：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1498】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.7：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1499】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.6：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1500】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.5：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1501】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.4：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1502】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.3：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1503】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.2：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1504】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.1：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1505】

他の実施形態では、本発明は、急速な第1.1の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1506】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約10：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1507】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ス

10

20

30

40

50

テップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約5：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1508】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約4：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1509】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約3：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1510】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.9：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1511】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.8：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1512】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.7：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1513】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.6：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1514】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.5：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1515】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.4：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1516】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.3：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1517】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ス

50

テップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.2：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1518】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1～正確にまたは約2.1：1の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1519】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約2：1になるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1520】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数の、ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比が、正確にまたは約1.1：1、1.2：1、1.3：1、1.4：1、1.5：1、1.6：1、1.7：1、1.8：1、1.9：1、2：1、2.1：1、2.2：1、2.3：1、2.4：1、2.5：1、2.6：1、2.7：1、2.8：1、2.9：1、3：1、3.1：1、3.2：1、3.3：1、3.4：1、3.5：1、3.6：1、3.7：1、3.8：1、3.9：1、4：1、4.1：1、4.2：1、4.3：1、4.4：1、4.5：1、4.6：1、4.7：1、4.8：1、4.9：1、または5：1になるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1521】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の拡張において追加されるAPCの数が、正確にまたは約 1×10^8 、 1.1×10^8 、 1.2×10^8 、 1.3×10^8 、 1.4×10^8 、 1.5×10^8 、 1.6×10^8 、 1.7×10^8 、 1.8×10^8 、 1.9×10^8 、 2×10^8 、 2.1×10^8 、 2.2×10^8 、 2.3×10^8 、 2.4×10^8 、 2.5×10^8 、 2.6×10^8 、 2.7×10^8 、 2.8×10^8 、 2.9×10^8 、 3×10^8 、 3.1×10^8 、 3.2×10^8 、 3.3×10^8 、 3.4×10^8 、または 3.5×10^8 APCになるように、かつ急速な第2の拡張において追加されるAPCの数が、正確にまたは約 3.5×10^8 、 3.6×10^8 、 3.7×10^8 、 3.8×10^8 、 3.9×10^8 、 4×10^8 、 4.1×10^8 、 4.2×10^8 、 4.3×10^8 、 4.4×10^8 、 4.5×10^8 、 4.6×10^8 、 4.7×10^8 、 4.8×10^8 、 4.9×10^8 、 5×10^8 、 5.1×10^8 、 5.2×10^8 、 5.3×10^8 、 5.4×10^8 、 5.5×10^8 、 5.6×10^8 、 5.7×10^8 、 5.8×10^8 、 5.9×10^8 、 6×10^8 、 6.1×10^8 、 6.2×10^8 、 6.3×10^8 、 6.4×10^8 、 6.5×10^8 、 6.6×10^8 、 6.7×10^8 、 6.8×10^8 、 6.9×10^8 、 7×10^8 、 7.1×10^8 、 7.2×10^8 、 7.3×10^8 、 7.4×10^8 、 7.5×10^8 、 7.6×10^8 、 7.7×10^8 、 7.8×10^8 、 7.9×10^8 、 8×10^8 、 8.1×10^8 、 8.2×10^8 、 8.3×10^8 、 8.4×10^8 、 8.5×10^8 、 8.6×10^8 、 8.7×10^8 、 8.8×10^8 、 8.9×10^8 、 9×10^8 、 9.1×10^8 、 9.2×10^8 、 9.3×10^8 、 9.4×10^8 、 9.5×10^8 、 9.6×10^8 、 9.7×10^8 、 9.8×10^8 、 9.9×10^8 、または 1×10^9 APCになるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1522】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の拡張において追加されるAPCの数が、正確にまたは約 1×10^8 APC～正確にまたは約 3.5×10^8 APCの範囲から選択され、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数が、正確にまたは約 3.5×10^8 APC～正確にまたは約 1×10^9 APCの範囲から選択されるように修正された、上記

の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1523】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の拡張において追加されるAPCの数が、正確にまたは約 1.5×10^8 APC～正確にまたは約 3×10^8 APCの範囲から選択され、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数が、正確にまたは約 4×10^8 APC～正確にまたは約 7.5×10^8 APCの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1524】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の拡張において追加されるAPCの数が、正確にまたは約 2×10^8 APC～正確にまたは約 2.5×10^8 APCの範囲から選択され、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数が、正確にまたは約 4.5×10^8 APC～正確にまたは約 5.5×10^8 APCの範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1525】

他の実施形態では、本発明は、正確にまたは約 2.5×10^8 APCが一次の第1の拡張に追加され、かつ正確にまたは約 5×10^8 APCが急速な第2の増殖に追加されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1526】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核細胞(PBMC)であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1527】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が複数の別個の容器に分配され、それらの別個の容器の各々内で、第1のTIL集団がステップ(a)において取得され、第2のTIL集団がステップ(b)において取得され、第3のTIL集団がステップ(c)において取得され、ステップ(c)における複数の容器からの治療的TIL集団が組み合わせられて、ステップ(d)からの採取されたTIL集団を産生するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1528】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍が複数の別個の容器に均一に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1529】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が少なくとも2個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1530】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が2～20個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1531】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が2～15個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1532】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が2～10個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1533】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が2～5個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1534】

他の実施形態では、本発明は、複数の別個の容器が2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の別個の容器を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

50

【1535】

他の実施形態では、本発明は、プライミングによる第1の拡張がステップ（b）において第1のTIL集団で行われる各容器の場合、ステップ（c）における急速な第2の拡張が、同じ容器内でかかる第1のTIL集団から産生された第2のTIL集団で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1536】

他の実施形態では、本発明は、別個の容器の各々が第1のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1537】

他の実施形態では、本発明は、複数の腫瘍断片が単一の容器に分配されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1538】

他の実施形態では、本発明は、単一の容器が第1のガス透過性表面積を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1539】

他の実施形態では、本発明は、ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、プライミングによる第1の拡張が、ステップ（b）において、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団上で行われる各容器の場合、ステップ（c）における急速な第2の拡張が、同じ容器内でかかるCD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団から産生された第2のTIL集団のTIL上で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1540】

いくつかの実施形態では、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約1細胞層～正確にまたは約3細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。

30

【1541】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約1．5細胞層～正確にまたは約2．5細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1542】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約2細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1543】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約1．1、1．2、1．3、1．4、1．5、1．6、1．7、1．8、1．9、2、2．1、2．2、2．3、2．4、2．5、2．6、2．7、2．8、2．9、または3細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1544】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、APCが、正確にまたは約3細胞層～正確にまたは約10細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1545】

50

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、A P Cが、正確にまたは約 4 細胞層～正確にまたは約 8 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1546】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、A P Cが、正確にまたは約 3、4、5、6、7、8、9、または 10 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1547】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、A P Cが、正確にまたは約 4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、または 8 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1548】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、プライミングによる第 1 の拡張が、第 1 のガス透過性表面積を含む第 1 の容器内で行われ、ステップ（c）において、急速な第 2 の拡張が、第 2 のガス透過性表面積を含む第 2 の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1549】

他の実施形態では、本発明は、第 2 の容器が第 1 の容器よりも大きいように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1550】

他の実施形態では、ステップ（b）において、一次の第 1 の拡張が、第 1 の T I L 集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（A P C）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加される A P C の数が、ステップ（b）において追加される A P C の数よりも多く、ステップ（b）において、A P C が、正確にまたは約 1 細胞層～正確にまたは約 3 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。

【1551】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、A P C が、正確にまたは約 1.5 細胞層～正確にまたは約 2.5 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1552】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、A P C が、正確にまたは約 2 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1553】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、A P C が、正確にまたは約 1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、または 3 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1554】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、A P C が、正確にまたは約 3 細胞層～正確にまたは約 10 細胞層の平均厚さで第 2 のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1555】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、APCが、正確にまたは約4細胞層～正確にまたは約8細胞層の平均厚さで第2のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1556】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、APCが、正確にまたは約3、4、5、6、7、8、9、または10細胞層の平均厚さで第2のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1557】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、APCが、正確にまたは約4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、または8細胞層の平均厚さで第2のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1558】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、プライミングによる第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を含む第1の容器内で行われ、ステップ（c）において、急速な第2の拡張が、第1の容器内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1559】

他の実施形態では、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、第1のTIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約1細胞層～正確にまたは約3細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化される、方法を提供する。

【1560】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約1.5細胞層～正確にまたは約2.5細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1561】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約2細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1562】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、APCが、正確にまたは約1、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、または3細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1563】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、APCが、正確にまたは約3細胞層～正確にまたは約10細胞層の平均厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1564】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において、APCが、正確にまたは約4

10

20

30

40

50

細胞層～正確にまたは約 8 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1565】

他の実施形態では、本発明は、ステップ (c) において、APC が、正確にまたは約 3、4、5、6、7、8、9、または 10 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1566】

他の実施形態では、本発明は、ステップ (c) において、APC が、正確にまたは約 4、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、または 8 細胞層の平均厚さで第 1 のガス透過性表面積上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1567】

他の実施形態では、本発明は、ステップ (b) において、第 1 の TIL 集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞 (APC) で補充することにより一次の第 1 の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ (c) において追加される APC の数が、ステップ (b) において追加される APC の数よりも多く、ステップ (b) において層状化される APC の層の平均数の、ステップ (c) において層状化される APC の層の平均数に対する比が、正確にまたは約 1 : 1.1 ~ 正確にまたは約 1 : 10 の範囲から選択される、方法を提供する。

【1568】

他の実施形態では、本発明は、ステップ (b) において、第 1 の TIL 集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞 (APC) で補充することにより一次の第 1 の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ (c) において追加される APC の数が、ステップ (b) において追加される APC の数よりも多く、ステップ (b) において層状化される APC の層の平均数の、ステップ (c) において層状化される APC の層の平均数に対する比が、正確にまたは約 1 : 1.1 ~ 正確にまたは約 1 : 9 の範囲から選択される、方法を提供する。

【1569】

他の実施形態では、本発明は、ステップ (b) において、第 1 の TIL 集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞 (APC) で補充することにより一次の第 1 の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ (c) において追加される APC の数が、ステップ (b) において追加される APC の数よりも多く、ステップ (b) において層状化される APC の層の平均数の、ステップ (c) において層状化される APC の層の平均数に対する比が、正確にまたは約 1 : 1.1 ~ 正確にまたは約 1 : 8 の範囲から選択される、方法を提供する。

【1570】

他の実施形態では、本発明は、ステップ (b) において、第 1 の TIL 集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞 (APC) で補充することにより一次の第 1 の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ (c) において追加される APC の数が、ステップ (b) において追加される APC の数よりも多く、ステップ (b) において層状化される APC の層の平均数の、ステップ (c) において層状化される APC の層の平均数に対する比が、正確にまたは約 1 : 1.1 ~ 正確にまたは約 1 : 7 の範囲から選択される、方法を提供する。

【1571】

他の実施形態では、本発明は、ステップ (b) において、第 1 の TIL 集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞 (APC) で補充することにより一次の第 1 の拡張が行われる

ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ(c)において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:6の範囲から選択される、方法を提供する。

【1572】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞(APC)で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ(c)において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:5の範囲から選択される、方法を提供する。

【1573】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞(APC)で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ(c)において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:4の範囲から選択される、方法を提供する。

【1574】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞(APC)で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ(c)において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:3の範囲から選択される、方法を提供する。

【1575】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞(APC)で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ(c)において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1:1.1~正確にまたは約1:2の範囲から選択される、方法を提供する。

【1576】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞(APC)で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ(b)において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ(c)において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1:1.2~正確にまたは約1:8の範囲から選択される、方法を提供する。

【1577】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞(APC)で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ(c)において追加されるAPCの数が、ステップ(b)において追加されるAPC

の数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.3～正確にまたは約1：7の範囲から選択される、方法を提供する。

【1578】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.4～正確にまたは約1：6の範囲から選択される、方法を提供する。

10

【1579】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.5～正確にまたは約1：5の範囲から選択される、方法を提供する。

20

【1580】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.6～正確にまたは約1：4の範囲から選択される、方法を提供する。

【1581】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.7～正確にまたは約1：3.5の範囲から選択される、方法を提供する。

30

【1582】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.8～正確にまたは約1：3の範囲から選択される、方法を提供する。

40

【1583】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のTIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.

50

9～正確にまたは約1：2.5の範囲から選択される、方法を提供する。

【1584】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO} TIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：2の範囲から選択される、方法を提供する。

10

【1585】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO} TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1、1：1.2、1：1.3、1：1.4、1：1.5、1：1.6、1：1.7、1：1.8、1：1.9、1：2、1：2.1、1：2.2、1：2.3、1：2.4、1：2.5、1：2.6、1：2.7、1：2.8、1：2.9、1：3、1：3.1、1：3.2、1：3.3、1：3.4、1：3.5、1：3.6、1：3.7、1：3.8、1：3.9、1：4、1：4.1、1：4.2、1：4.3、1：4.4、1：4.5、1：4.6、1：4.7、1：4.8、1：4.9、1：5、1：5.1、1：5.2、1：5.3、1：5.4、1：5.5、1：5.6、1：5.7、1：5.8、1：5.9、1：6、1：6.1、1：6.2、1：6.3、1：6.4、1：6.5、1：6.6、1：6.7、1：6.8、1：6.9、1：7、1：7.1、1：7.2、1：7.3、1：7.4、1：7.5、1：7.6、1：7.7、1：7.8、1：7.9、1：8、1：8.1、1：8.2、1：8.3、1：8.4、1：8.5、1：8.6、1：8.7、1：8.8、1：8.9、1：9、1：9.1、1：9.2、1：9.3、1：9.4、1：9.5、1：9.6、1：9.7、1：9.8、1：9.9、または1：10から選択される、方法を提供する。

20

30

【1586】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO} TIL集団の細胞培養培地を追加の抗原提示細胞（APC）で補充することにより一次の第1の拡張が行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：10の範囲から選択される、方法を提供する。

40

【1587】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO} TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：9の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

50

【1588】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：8の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1589】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：7の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1590】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：6の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1591】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：5の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1592】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：4の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1593】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く

10

20

30

40

50

、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：3の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1594】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1～正確にまたは約1：2の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1595】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.2～正確にまたは約1：8の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1596】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.3～正確にまたは約1：7の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1597】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.4～正確にまたは約1：6の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1598】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.5～正確にまたは約1：5の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1599】

50

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO} TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.6～正確にまたは約1：4の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1600】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO} TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.7～正確にまたは約1：3.5の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1601】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO} TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.8～正確にまたは約1：3の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1602】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO} TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.9～正確にまたは約1：2.5の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1603】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO} TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われ、ステップ（c）において添加されるAPCの数が、ステップ（b）において添加されるAPCの数よりも多く、ステップ（b）において層状化されたAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されたAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：2の範囲から選択されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1604】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、一次の第1の拡張が、CD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO} TIL集団の細胞培養培地に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することによって行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法であって、ステップ（c）において追加されるAPCの数が、ステップ（b）において追加されるAPCの数よりも多く、ス

テップ（b）において層状化されるAPCの層の平均数の、ステップ（c）において層状化されるAPCの層の平均数に対する比が、正確にまたは約1：1.1、1：1.2、1：1.3、1：1.4、1：1.5、1：1.6、1：1.7、1：1.8、1：1.9、1：2、1：2.1、1：2.2、1：2.3、1：2.4、1：2.5、1：2.6、1：2.7、1：2.8、1：2.9、1：3、1：3.1、1：3.2、1：3.3、1：3.4、1：3.5、1：3.6、1：3.7、1：3.8、1：3.9、1：4、1：4.1、1：4.2、1：4.3、1：4.4、1：4.5、1：4.6、1：4.7、1：4.8、1：4.9、1：5、1：5.1、1：5.2、1：5.3、1：5.4、1：5.5、1：5.6、1：5.7、1：5.8、1：5.9、1：6、1：6.1、1：6.2、1：6.3、1：6.4、1：6.5、1：6.6、1：6.7、1：6.8、1：6.9、1：7、1：7.1、1：7.2、1：7.3、1：7.4、1：7.5、1：7.6、1：7.7、1：7.8、1：7.9、1：8、1：8.1、1：8.2、1：8.3、1：8.4、1：8.5、1：8.6、1：8.7、1：8.8、1：8.9、1：9、1：9.1、1：9.2、1：9.3、1：9.4、1：9.5、1：9.6、1：9.7、1：9.8、1：9.9、または1：10から選択される、方法を提供する。

10

【1605】

いくつかの実施形態では、本発明は、第2のTIL集団中のTILの数の、第1のTIL集団中のTILの数に対する比が、正確にまたは約50：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1606】

いくつかの実施形態では、本発明は、第2のTIL集団中のTILの数の、第1のTIL集団中のTILの数に対する比が、正確にまたは約25：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1607】

いくつかの実施形態では、本発明は、第2のTIL集団中のTILの数の、第1のTIL集団中のTILの数に対する比が、正確にまたは約20：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1608】

いくつかの実施形態では、本発明は、第2のTIL集団中のTILの数の、第1のTIL集団中のTILの数に対する比が、正確にまたは約10：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1609】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団の数が、第1のTIL集団よりも少なくとも正確にまたは約50倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1610】

他の実施形態では、本発明は、第2のTIL集団の数が、第1のTIL集団よりも少なくとも正確にまたは約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または50倍多いように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1611】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）における第2の期間の開始の正確にまたは約2日または正確にまたは約3日後に、細胞培養培地に追加のIL-2が補充されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1612】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（d）において採取されたTIL集団を凍結保存するステップをさらに含むように修正された、上記の該

50

当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1613】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（d）の後に、（e）ステップ（d）から採取したTIL集団を、任意選択でHypothermosolを含む注入バッグに移す追加のステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1614】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスを使用して、ステップ（e）において採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存するステップを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1615】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存プロセスが、1：1の採取されたTIL集団の凍結保存培地に対する比を使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1616】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が末梢血単核細胞（PBMC）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1617】

他の実施形態では、本発明は、PBMCが放射線照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1618】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において細胞培養に追加されるAPCの総数が 2.5×10^8 であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1619】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）において細胞培養に追加されるAPCの総数が 5×10^8 であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1620】

他の実施形態では、本発明は、APCがPBMCであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1621】

他の実施形態では、本発明は、PBMCが放射線照射され、かつ同種異系であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1622】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞が人工抗原提示細胞であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1623】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（d）での採取が膜ベースの細胞処理システムを使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1624】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（d）での採取がLOVO細胞処理システムを使用して行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1625】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約5～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1626】

50

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約10～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1627】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約15～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1628】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約20～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1629】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約25～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1630】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約30～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1631】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約35～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1632】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約40～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1633】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約45～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1634】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約50～正確にまたは約60個の断片を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1635】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、複数の断片が1容器当たり正確にまたは約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または60個の断片（複数可）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1636】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約27mm³の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1637】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約20mm³～正確にまたは約50mm³の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

20

30

40

50

【1638】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 21 mm^3 ～正確にまたは約 30 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1639】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 22 mm^3 ～正確にまたは約 29.5 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1640】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 23 mm^3 ～正確にまたは約 29 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1641】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 24 mm^3 ～正確にまたは約 28.5 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1642】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 25 mm^3 ～正確にまたは約 28 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1643】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 26.5 mm^3 ～正確にまたは約 27.5 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1644】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 21 、 22 、 23 、 24 、 25 、 26 、 27 、 28 、 29 、 30 、 31 、 32 、 33 、 34 、 35 、 36 、 37 、 38 、 39 、 40 、 41 、 42 、 43 、 44 、 45 、 46 、 47 、 48 、 49 、または 50 mm^3 の体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1645】

他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約 30 ～正確にまたは約 60 個の断片を含み、正確にまたは約 1300 mm^3 ～正確にまたは約 1500 mm^3 の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1646】

他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約 50 個の断片を含み、正確にまたは約 1350 mm^3 の総体積を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1647】

他の実施形態では、本発明は、複数の断片が正確にまたは約 50 個の断片を含み、正確にまたは約 1 グラム～正確にまたは約 1.5 グラムの総質量を有するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1648】

他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地が G 容器または Xuri セルバッグである容器内に提供されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1649】

他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中の IL-2 濃度が約 $10,000\text{ IU/mL}$ ～約 5000 IU/mL であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのい

10

20

30

40

50

ずれかに記載の方法を提供する。

【1650】

他の実施形態では、本発明は、細胞培養培地中のIL-2濃度が約6,000IU/mLであるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1651】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がジメチルスルホキシド(DMSO)を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1652】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が7%~10%DMSOを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1653】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)における第1の期間が正確にまたは約1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1654】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)における第2の期間が正確にまたは約1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、または11日の期間内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1655】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)における第1の期間及びステップ(c)における第2の期間が各々、正確にまたは約1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1656】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)における第1の期間及びステップ(c)における第2の期間が各々、正確にまたは約5日、6日、または7日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1657】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(b)における第1の期間及びステップ(c)における第2の期間が各々、正確にまたは約7日の期間内に個別に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1658】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)~(d)が合計で正確にまたは約14日~正確にまたは約18日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1659】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)~(d)が合計で正確にまたは約15日~正確にまたは約18日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1660】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)~(d)が合計で正確にまたは約16日~正確にまたは約18日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1661】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)~(d)が合計で正確にまたは約17日~正確にまたは約18日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1662】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約14日～正確にまたは約17日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1663】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約15日～正確にまたは約17日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1664】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約16日～正確にまたは約17日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1665】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約14日～正確にまたは約16日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1666】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約15日～正確にまたは約16日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1667】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約14日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1668】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約15日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1669】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約16日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1670】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約17日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1671】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約18日で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1672】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約14日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1673】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約15日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1674】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約16日

50

以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1675】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）～（d）が合計で正確にまたは約18日以内で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1676】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（d）で採取された治療的TIL集団が、TILの治療上有効な投与量に十分なTILを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1677】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量に十分なTILの数が、正確にまたは約 2.3×10^{10} ～正確にまたは約 13.7×10^{10} であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1678】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）における第3のTIL集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1679】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）における第3のTIL集団が、16日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍～5倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1680】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）における第3のTIL集団が、17日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍～5倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1681】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）における第3のTIL集団が、18日より長いプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも1倍～5倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1682】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（c）の第3のTIL集団から取得されたエフェクターT細胞及び／またはセントラルメモリーT細胞が、ステップ（b）の第2の細胞集団から取得されたエフェクターT細胞及び／またはセントラルメモリーT細胞と比較して増加したCD8及びCD28発現を示すように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1683】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器が密閉容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1684】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がG容器であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1685】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器がGREX-10であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1686】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器が G R E X - 1 0 0 であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1687】

他の実施形態では、本発明は、方法に列挙された各容器が G R E X - 5 0 0 であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1688】

他の実施形態では、本発明は、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法によって作製された腫瘍浸潤リンパ球（T I L）の治療的集団を提供する。

【1689】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（T I L）の治療的集団であって、治療的 T I L 集団が、抗原提示細胞（A P C）または O K T 3 を添加せずに T I L の第 1 の拡張が行われるプロセスによって調製された T I L と比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

10

【1690】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（T I L）の治療的集団であって、治療的 T I L 集団が、抗原提示細胞（A P C）を添加せずに T I L の第 1 の拡張が行われるプロセスによって調製された T I L と比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

20

【1691】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（T I L）の治療的集団であって、治療的 T I L 集団が、O K T 3 を添加せずに T I L の第 1 の拡張が行われるプロセスによって調製された T I L と比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【1692】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（T I L）の治療的集団であって、治療的 T I L 集団が、抗原提示細胞（A P C）を添加せず、かつ O K T 3 を添加せずに T I L の第 1 の拡張が行われるプロセスによって調製された T I L と比較して、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

30

【1693】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（T I L）の治療的集団であって、16日間より長いプロセスによってプロセスによって調製された T I L と比較して、治療的 T I L 集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

【1694】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（T I L）の治療的集団であって、17日間より長いプロセスによってプロセスによって調製された T I L と比較して、治療的 T I L 集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

40

【1695】

他の実施形態では、本発明は、患者の腫瘍組織から調製された腫瘍浸潤リンパ球（T I L）の治療的集団であって、18日間より長いプロセスによってプロセスによって調製された T I L と比較して、治療的 T I L 集団が、増加した有効性、増加したインターフェロンガンマ産生、及び／または増加したポリクローン性を提供する、治療的集団を提供する。

50

【1696】

他の実施形態では、本発明は、増加したインターフェロンガンマ産生を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的 TIL 集団を提供する。

【1697】

他の実施形態では、本発明は、増加したポリクローン性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載された治療的 TIL 集団を提供する。

【1698】

他の実施形態では、本発明は、増加した有効性を提供する、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的 TIL 集団を提供する。

【1699】

他の実施形態では、本発明は、治療的 TIL 集団が、16 日より長いプロセスによって調製された TIL と比較して、少なくとも 1 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的 TIL 集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的 TIL 集団が、17 日より長いプロセスによって調製された TIL と比較して、少なくとも 1 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的 TIL 集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的 TIL 集団が、18 日より長いプロセスによって調製された TIL と比較して、少なくとも 1 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的 TIL 集団を提供する。いくつかの実施形態では、TIL は、例えば、上記のステップ A～F に記載されるように、または上記のステップ A～F に従って（また、例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも 1 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【1700】

他の実施形態では、本発明は、治療的 TIL 集団が、16 日より長いプロセスによって調製された TIL と比較して、少なくとも 2 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的 TIL 集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的 TIL 集団が、17 日より長いプロセスによって調製された TIL と比較して、少なくとも 2 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的 TIL 集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的 TIL 集団が、18 日より長いプロセスによって調製された TIL と比較して、少なくとも 2 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的 TIL 集団を提供する。いくつかの実施形態では、TIL は、例えば、上記のステップ A～F に記載されるように、または上記のステップ A～F に従って（また、例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも 2 倍多いインターフェ

【1701】

他の実施形態では、本発明は、治療的 TIL 集団が、16 日より長いプロセスによって調製された TIL と比較して、少なくとも 3 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的 TIL 集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的 TIL 集団が、17 日より長いプロセスによって調製された TIL と比較して、少なくとも 3 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的 TIL 集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療的 TIL 集団が、18 日より長いプロセスによって調製された TIL と比較して、少なくとも 3 倍多いインターフ

ェロンガンマ産生が可能であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療的 T I L 集団を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、例えば、上記のステップ A ~ F に記載されるように、または上記のステップ A ~ F に従って（また、例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも 3 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【1702】

他の実施形態では、本発明は、抗原提示細胞（A P C）を添加せずに T I L の第 1 の拡張が行われるプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 1 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である腫瘍浸潤リンパ球（T I L）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、例えば、上記のステップ A ~ F に記載されるように、または上記のステップ A ~ F に従って（また、例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも 1 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

10

【1703】

他の実施形態では、本発明は、O K T 3 を添加せずに T I L の第 1 の拡張が行われるプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 1 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である腫瘍浸潤リンパ球（T I L）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、例えば、上記のステップ A ~ F に記載されるように、または上記のステップ A ~ F に従って（また、例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも 1 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

20

【1704】

他の実施形態では、本発明は、A P C を添加せずに T I L の第 1 の拡張が行われるプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 2 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である腫瘍浸潤リンパ球（T I L）の治療的集団を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、例えば、上記のステップ A ~ F に記載されるように、または上記のステップ A ~ F に従って（また、例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも 2 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

30

【1705】

他の実施形態では、本発明は、O K T 3 を添加せずに T I L の第 1 の拡張が行われるプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 2 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的 T I L 集団を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、例えば、上記のステップ A ~ F に記載されるように、または上記のステップ A ~ F に従って（また、例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G）に示されているように）、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも 2 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

40

【1706】

他の実施形態では、本発明は、A P C を添加せずに T I L の第 1 の拡張が行われるプロセスによって調製された T I L と比較して、少なくとも 3 倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的 T I L 集団を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、例えば、上記のステップ A ~ F に記載されるように、または上記のステップ A ~ F に従って（また、例えば、図 8（特に、例えば図 8 A 及び／または図 8 B 及び／または図 8 C 及び／または図 8 D 及び／または図 8 E 及び／または図 8 F 及び／または図 8 G）に示されて

50

いるように)、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも1倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

【1707】

他の実施形態では、本発明は、OKT3を添加せずにTILの第1の拡張が行われるプロセスによって調製されたTILと比較して、少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ産生が可能である治療的TIL集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、例えば、上記のステップA～Fに記載されるように、または上記のステップA～Fに従って(また、例えば、図8(特に、例えば図8A及び/または図8B及び/または図8C及び/または図8D及び/または図8E及び/または図8F及び/または図8G)に示されているように)、本明細書に記載される拡張プロセスに起因する少なくとも3倍多いインターフェロンガンマ産生が可能になる。

10

【1708】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が、小生検(例えば、パンチ生検を含む)、コア生検、コア針生検、または細針吸引物であるように修正された、上記の該当する前の段落のいずれかに記載の方法を提供する。

【1709】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア生検であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1710】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が細針吸引物であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1711】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片が小生検(例えば、パンチ生検を含む)であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1712】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍断片がコア針生検であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1713】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象由来の腫瘍組織の1つ以上の小生検(例えば、パンチ生検を含む)、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第1のTIL集団を得ることを含み、(ii)方法が、プライミングによる第1の拡張ステップを行う前に、IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3日間培養するステップを行うことを含み、(iii)方法が、約8日間にわたってプライミングによる第1の拡張を行うことを含み、かつ(iv)方法が、約11日間にわたって急速な第2の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約22日で完了する。

30

【1714】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象由来の腫瘍組織の1つ以上の小生検(例えば、パンチ生検を含む)、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から第1のTIL集団を得ることを含み、(ii)方法が、プライミングによる第1の拡張ステップを行う前に、IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3日間培養するステップを行うことを含み、(iii)方法が、約8日間にわたってプライミングによる第1の拡張を行うことを含み、かつ(iv)方法が、第2のTIL集団の培養物を約5日間培養し、培養物を最大5つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物を約6日間培養することによって、急速な第2の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大5つの継代培養物が各々、第2のTIL集団の培養が急速な第2の拡張で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第2のTIL集団の培養物は、最大5つの継代培養物間で均等に分けられる。

40

50

前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約 22 日で完了する。

【1715】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の TIL 集団が、対象由来の腫瘍組織の 1 ～約 20 個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1716】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の TIL 集団が、対象由来の腫瘍組織の 1 ～約 10 個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1717】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の TIL 集団が、対象由来の腫瘍組織の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1718】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の TIL 集団が、対象由来の腫瘍組織の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検、または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1719】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の TIL 集団が、対象由来の腫瘍組織の 1 ～約 20 個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1720】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の TIL 集団が、対象由来の腫瘍組織の 1 ～約 10 個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1721】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の TIL 集団が、対象由来の腫瘍組織の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1722】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の TIL 集団が、対象由来の腫瘍組織の 1、2、3、4、5、6、7、8、9、または 10 個のコア生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1723】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の TIL 集団が、対象由来の腫瘍組織の 1 ～約 20 個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1724】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の TIL 集団が、対象由来の腫瘍組織の 1 ～約 10 個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1725】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の TIL 集団が、対象由来の腫瘍組織の 1、2、3

50

、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1726】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1727】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約20個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1728】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1729】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1730】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のコア針生検から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1731】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1732】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1733】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1734】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL集団が、対象由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1735】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象由来の腫瘍組織の1～約10個のコア生検から第1のTIL集団を得ることを含み、(ii)方法が、CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL集団を第1のTIL集団から分離するステップを行う前に、IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3日間培養するステップを行うことを含み、(iii)方法が、CD39/CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む培養培地中で約8日間培養することによってプライミングによ

50

る第1の拡張ステップを行い、第2のTIL集団を取得することを含み、かつ(i v)方法が、第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む培養培地中で約11日間培養することによって急速な第2の拡張ステップを行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約22日で完了する。

【1736】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象由来の腫瘍組織の1~約10個のコア生検から第1のTIL集団を取得することを含み、(ii)方法が、CD39/CD69二重陰性及び/またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL集団を第1のTIL集団から分離するステップを行う前に、IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3日間培養するステップを行うことを含み、(iii)方法が、CD39/CD69二重陰性及び/またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む培養培地中で約8日間培養することによってプライミングによる第1の拡張ステップを行い、第2のTIL集団を取得することを含み、かつ(i v)方法が、第2のTIL集団の培養物を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む培養培地中で約5日間培養し、培養物を最大5つの継代培養物に分割し、かつ継代培養物の各々を、IL-2を含む培養培地中で約6日間培養することによって、急速な第2の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、最大5つの継代培養物が各々、第2のTIL集団の培養が急速な第2の拡張で開始される容器と同じサイズのまたはそれよりも大きい容器内で培養される。前述の実施形態のうちのいくつかでは、第2のTIL集団の培養物は、最大5つの継代培養物間で均等に分けられる。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約22日で完了する。

【1737】

他の実施形態では、本発明は、(i)方法が、対象由来の腫瘍組織の1~約10個のコア生検から第1のTIL集団を取得することを含み、(ii)方法が、CD39/CD69二重陰性及び/またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL集団を第1のTIL集団から分離するステップを行う前に、G-REX-100Mフラスコ内の0.5LのCM1培養培地中6000IU IL-2/mLを含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を約3日間培養するステップを行うことを含み、(iii)方法が、6000IU/mL IL-2、30ng/mL OKT-3、及び約10⁸個のフィーダー細胞を含む0.5LのCM1培養培地をCD39/CD69二重陰性及び/またはCD39^{LO}/CD69^{LO}TIL集団に添加し、約8日間培養することによって、プライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することを含み、かつ(i v)方法が、(a)第2のTIL集団を、3000IU/mL IL-2、30ng/mL OKT-3、及び5×10⁹個のフィーダー細胞を有する5LのCM2培養培地を含むG-REX500MCSフラスコに移し、約5日間培養し、(b)10⁹個のTILを、3000IU/mL IL-2を有する5LのAIM-V培地を含む最大5つのG-REX500MCSフラスコの各々に移すことによって培養物を最大5つの継代培養物に分割し、継代培養物を約6日間培養することによって、急速な第2の拡張を行うことを含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。前述の実施形態のうちのいくつかでは、方法のこれらのステップは、約22日で完了する。

【1738】

いくつかの実施形態では、本発明は、(a)腫瘍試料を対象から取得するステップ後に、(i)腫瘍試料中のバルクTILまたは第1のTIL集団を、IL-2を含有する細胞培養培地中で培養して、腫瘍断片または試料から出るTILを産生し、(ii)腫瘍断片または試料から出る少なくとも複数のTILを腫瘍断片または試料から分離して、腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存するTIL、及び腫瘍断片または試料から出て、分離後にそれとともに残存する任意のTILの混合物を産生し、(iii)腫瘍断片または試料、腫瘍断片または試料中に残存するTIL、及び腫瘍断片または試料から出て

、分離後にそれとともに残存する任意の T I L の混合物を消化して、かかる混合物の消化物を産生し、(i v) C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} T I L 集団をかかる混合物の消化物から分離する；ならびに (b) プライミングによる第 1 の拡張を、C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性及び／または C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} T I L 集団を培養することによって行うように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍断片または試料から出る T I L の少なくとも約 1 %、5 %、1 0 %、1 5 %、2 0 %、2 5 %、3 0 %、3 5 %、4 0 %、4 5 %、5 0 %、5 5 %、6 0 %、6 5 %、7 0 %、7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 9 % 以上が、腫瘍断片または試料から分離されて、混合物を生成する。

10

【 1 7 3 9 】

いくつかの実施形態では、本発明は、プライミングによる第 1 の拡張前に培養するステップが、約 1 日～約 3 日の期間で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 7 4 0 】

いくつかの実施形態では、本発明は、プライミングによる第 1 の拡張前に培養するステップが、約 1、2、3、4、5、6、または 7 日の期間で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 7 4 1 】

いくつかの実施形態では、本発明は、P D - 1 事前選択ステップ前に培養するステップが、約 1 日～約 3 日の期間で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【 1 7 4 2 】

いくつかの実施形態では、本発明は、P D - 1 事前選択ステップ前に培養するステップが、約 1、2、3、4、5、6、または 7 日の期間で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 7 4 3 】

いくつかの実施形態では、本発明は、C D 3 9 及び C D 6 9 事前選択ステップ前に培養するステップが、約 1 日～約 3 日の期間で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【 1 7 4 4 】

いくつかの実施形態では、本発明は、C D 3 9 及び C D 6 9 事前選択ステップ前に培養するステップが、約 1、2、3、4、5、6、または 7 日の期間で行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【 1 7 4 5 】

他の実施形態では、本発明は、T 細胞を拡張する方法であって、(a) 第 1 の T 細胞集団を培養することによってドナーから取得された第 1 の T 細胞集団のプライミングによる第 1 の拡張を行って成長をもたらし、第 1 の T 細胞集団の活性化をプライミングすることと、(b) ステップ (a) においてプライミングされた第 1 の T 細胞集団の活性化が減衰し始めた後、第 1 の T 細胞集団を培養することによって第 1 の T 細胞集団の急速な第 2 の拡張を行って成長をもたらし、第 1 の T 細胞集団の活性化を促進して第 2 の T 細胞集団を取得することと、(c) 第 2 の T 細胞集団を採取することと、を含む、T 細胞を拡張する方法を提供する。他の実施形態では、急速な第 2 の拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(a) 第 1 の T 細胞集団を、第 1 の容器、例えば、G - R E X - 1 0 0 M C S 容器内での小規模培養で約 3 ～ 4 日間培養することによって急速な第 2 の拡張を行うことと、その後、(b) 小規模培養での第 1 の T 細胞集団を、第 1 の容器よりも大きい第 2 の容器、例えば、G - R E X - 5 0 0 M C S 容器に移し、小規模培養由来の第 1 の T 細胞集団を、第 2 の容器内でのより大規模な培養で約 4 ～ 7 日間培養することによって、培養のスケールアップを達成する。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(a) 第 1 の T 細胞集団を、第 1 の容器、例えば、G - R E X - 1 0 0 M

40

50

C S 容器内での第 1 の小規模培養で約 3 ～ 4 日間培養することによって急速な第 2 の拡張を行うことと、その後、(b) 第 1 の小規模培養由来の第 1 の T 細胞集団を、第 1 の容器とサイズが等しい少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個の第 2 の容器に移して配分することによって、培養のスケールアウトを達成し、各第 2 の容器内で、第 1 の小規模培養由来のかかる第 2 の容器に移された第 1 の T 細胞集団の一部が、第 2 の小規模培養で約 4 ～ 7 日間培養される。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(a) 第 1 の T 細胞集団を、第 1 の容器、例えば、G-R E X-100 M C S 容器内での小規模培養で約 3 ～ 4 日間培養することによって急速な第 2 の拡張を行うことと、その後、(b) 小規模培養由来の第 1 の T 細胞集団を、第 1 の容器よりもサイズが大きい少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個の第 2 の容器、例えば、G-R E X-500 M C S 容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第 2 の容器内で、小規模培養由来のかかる第 2 の容器に移された第 1 の T 細胞集団の一部が、より大規模な培養で約 4 ～ 7 日間培養される。他の実施形態では、急速拡張ステップは、複数のステップに分けられて、(a) 第 1 の T 細胞集団を、第 1 の容器、例えば、G-R E X-100 M C S 容器内での小規模培養で約 4 日間培養することによって急速な第 2 の拡張を行うことと、その後、(b) 小規模培養由来の第 1 の T 細胞集団を、第 1 の容器よりもサイズが大きい 2、3、または 4 個の第 2 の容器、例えば、G-R E X-500 M C S 容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成し、各第 2 の容器内で、小規模培養由来のかかる第 2 の容器に移された第 1 の T 細胞集団の一部が、より大規模な培養で約 5 日間培養される。

10

20

【1746】

他の実施形態では、本発明は、急速な第 2 の拡張のステップが、複数のステップに分けられて、(a) 第 1 の T 細胞集団を、第 1 の容器、例えば、G-R E X-100 M C S 容器内での小規模培養で約 2 ～ 4 日間培養することによって急速な第 2 の拡張を行うことと、その後、(b) 小規模培養での第 1 の T 細胞集団を、第 1 の容器よりも大きい第 2 の容器、例えば、G-R E X 500 M C S 容器に移し、小規模培養由来の第 1 の T 細胞集団を、第 2 の容器内でのより大規模な培養で約 5 ～ 7 日間培養することによって、培養のスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1747】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、(a) 第 1 の T 細胞集団を、第 1 の容器、例えば、G-R E X 100 M C S 容器内での第 1 の小規模培養で約 2 ～ 4 日間培養することによって急速な第 2 の拡張を行うことと、その後、(b) 第 1 の小規模培養由来の第 1 の T 細胞集団を、第 1 の容器とサイズが等しい少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個の第 2 の容器に移して配分することによって、培養のスケールアウトを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第 2 の容器内で、第 1 の小規模培養由来のかかる第 2 の容器に移された第 1 の T 細胞集団の一部が、第 2 の小規模培養で約 5 ～ 7 日間培養される。

40

【1748】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、(a) 第 1 の T 細胞集団を、第 1 の容器、例えば、G-R E X 100 M C S 容器内での小規模培養で約 2 ～ 4 日間培養することによって急速な第 2 の拡張を行うことと、その後、(b) 小規模培養由来の第 1 の T 細胞集団を、第 1 の容器よりもサイズが大きい少なくとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または 20 個の第 2 の容器、例えば、G-R E X 500 M C S 容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第 2 の容

50

器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約5～7日間培養される。

【1749】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、
(a) 第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X 1 0 0 M C S 容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、
(b) 小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R E X 5 0 0 M C S 容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約5～6日間培養される。

10

【1750】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、
(a) 第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X 1 0 0 M C S 容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、
(b) 小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R E X 5 0 0 M C S 容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約5日間培養される。

20

【1751】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、
(a) 第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X 1 0 0 M C S 容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、
(b) 小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R E X 5 0 0 M C S 容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約6日間培養される。

30

【1752】

他の実施形態では、本発明は、急速拡張のステップが、複数のステップに分けられて、
(a) 第1のT細胞集団を、第1の容器、例えば、G-R E X 1 0 0 M C S 容器内での小規模培養で約3～4日間培養することによって急速な第2の拡張を行うことと、その後、
(b) 小規模培養由来の第1のT細胞集団を、第1の容器よりもサイズが大きい2、3、または4個の第2の容器、例えば、G-R E X 5 0 0 M C S 容器に移して配分することによって、培養のスケールアウト及びスケールアップを達成するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供し、各第2の容器内で、小規模培養由来のかかる第2の容器に移された第1のT細胞集団の一部が、より大規模な培養で約7日間培養される。

40

【1753】

他の実施形態では、本発明は、プライミングによる第1の拡張ステップが最大7日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1754】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の拡張ステップが最大8日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1755】

50

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）の急速な第2の拡張が最大9日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1756】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）の急速な第2の拡張が最大10日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1757】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）の急速な第2の拡張が最大11日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1758】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）におけるプライミングによる第1の拡張が7日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の拡張が最大9日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1759】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）におけるプライミングによる第1の拡張が7日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の拡張が最大10日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1760】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）におけるプライミングによる第1の拡張が7日または8日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の拡張が最大9日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1761】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）におけるプライミングによる第1の拡張が7日または8日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の拡張が最大10日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1762】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）におけるプライミングによる第1の拡張が8日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の拡張が最大9日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1763】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）におけるプライミングによる第1の拡張が8日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の拡張が最大8日の期間中に行われるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1764】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のT細胞集団がOKT-3及びIL-2を含む第1の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1765】

他の実施形態では、本発明は、第1の培養培地が4-1BBアゴニスト、OKT-3及びIL-2を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1766】

50

他の実施形態では、本発明は、第1の培養培地がO K T-3、I L-2及び抗原提示細胞（A P C）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1767】

他の実施形態では、本発明は、第1の培養培地が4-1 B Bアゴニスト、O K T-3、I L-2及び抗原提示細胞（A P C）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1768】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第1のT細胞集団がO K T-3、I L-2及び抗原提示細胞（A P C）を含む第2の培養培地中で培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1769】

他の実施形態では、本発明は、第2の培養培地が4-1 B Bアゴニスト、O K T-3、I L-2及び抗原提示細胞（A P C）を含むように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1770】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のT細胞集団が、第1のガス透過性表面を含む容器内の第1の培養培地中で培養され（ここで、第1の培養培地が、O K T-3、I L-2及び第1の抗原提示細胞（A P C）集団を含み、第1のA P C集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第1のA P C集団が、第1のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（b）において、第1のT細胞集団が、容器内の第2の培養培地中で培養される（ここで、第2の培養培地が、O K T-3、I L-2及び第2のA P C集団を含み、第2のA P C集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第2のA P C集団が、第1のガス透過性表面上に層状化され、第2のA P C集団が、第1のA P C集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1771】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のT細胞集団が、第1のガス透過性表面を含む容器内の第1の培養培地中で培養され（ここで、第1の培養培地が、4-1 B Bアゴニスト、O K T-3、I L-2及び第1の抗原提示細胞（A P C）集団を含み、第1のA P C集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第1のA P C集団が、第1のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（b）において、第1のT細胞集団が、容器内の第2の培養培地中で培養される（ここで、第2の培養培地が、O K T-3、I L-2及び第2のA P C集団を含み、第2のA P C集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第2のA P C集団が、第1のガス透過性表面上に層状化され、第2のA P C集団が、第1のA P C集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1772】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のT細胞集団が、第1のガス透過性表面を含む容器内の第1の培養培地中で培養され（ここで、第1の培養培地が、O K T-3、I L-2及び第1の抗原提示細胞（A P C）集団を含み、第1のA P C集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第1のA P C集団が、第1のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（b）において、第1のT細胞集団が、容器内の第2の培養培地中で培養される（ここで、第2の培養培地が、4-1 B Bアゴニスト、O K T-3、I L-2及び第2のA P C集団を含み、第2のA P C集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第2のA P C集団が、第1のガス透過性表面上に層状化され、第2のA P C集団が、第1のA P C集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1773】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のT細胞集団が、第1の

50

ガス透過性表面を含む容器内の第1の培養培地中で培養され（ここで、第1の培養培地が、4-1BBアゴニスト、OKT-3、IL-2及び第1の抗原提示細胞（APC）集団を含み、第1のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第1のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に層状化される）、ステップ（b）において、第1のT細胞集団が、容器内の第2の培養培地中で培養される（ここで、第2の培養培地が、4-1BBアゴニスト、OKT-3、IL-2及び第2のAPC集団を含み、第2のAPC集団が、第1のT細胞集団のドナーに対して外因性であり、第2のAPC集団が、第1のガス透過性表面上に層状化され、第2のAPC集団が、第1のAPC集団よりも多い）ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1774】

10

他の実施形態では、本発明は、第2のAPC集団中のAPCの数の、第1のAPC集団中のAPCの数に対する比が約2：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1775】

他の実施形態では、本発明は、第1のAPC集団中のAPCの数が約 2.5×10^8 であり、第2のAPC集団中のAPCの数が約 5×10^8 であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1776】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が、2層のAPCの平均厚さで第1のガス透過性表面上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1777】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第2のAPC集団が、4～8層のAPCから選択される平均厚さで第1のガス透過性表面上に層状化されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1778】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において第1のガス透過性表面上に層状化されたAPCの平均層数の、ステップ（a）において第1のガス透過性表面上に層状化されたAPCの平均層数に対する比が、2：1であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【1779】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が約 $1.0 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ ～約 $4.5 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1780】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が約 $1.5 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ ～約 $3.5 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【1781】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が約 $2.0 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ ～約 $3.0 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1782】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が正確にまたは約 $2.0 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1783】

50

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 2.5×10^6 APC/cm² ~ 正確にまたは約 7.5×10^6 APC/cm² の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1784】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 3.5×10^6 APC/cm² ~ 正確にまたは約 6.0×10^6 APC/cm² の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1785】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 4.0×10^6 APC/cm² ~ 正確にまたは約 5.5×10^6 APC/cm² の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1786】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 4.0×10^6 APC/cm² の密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1787】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が正確にまたは約 1.0×10^6 APC/cm² ~ 正確にまたは約 4.5×10^6 APC/cm² の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種され、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 2.5×10^6 APC/cm² ~ 正確にまたは約 7.5×10^6 APC/cm² の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1788】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が正確にまたは約 1.5×10^6 APC/cm² ~ 正確にまたは約 3.5×10^6 APC/cm² の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種され、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 3.5×10^6 APC/cm² ~ 正確にまたは約 6.0×10^6 APC/cm² の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1789】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が正確にまたは約 2.0×10^6 APC/cm² ~ 正確にまたは約 3.0×10^6 APC/cm² の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種され、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 4.0×10^6 APC/cm² ~ 正確にまたは約 5.5×10^6 APC/cm² の範囲から選択される密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1790】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（a）において、第1のAPC集団が正確にまたは約 2.0×10^6 APC/cm² の密度で第1のガス透過性表面に播種され、ステップ（b）において、第2のAPC集団が正確にまたは約 4.0×10^6 APC/cm² の密度で第1のガス透過性表面に播種されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1791】

他の実施形態では、本発明は、APCが末梢血単核細胞（PBMC）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1792】

他の実施形態では、本発明は、PBMCが放射線照射され、第1のT細胞集団のドナー

10

20

30

40

50

に対して外因性であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1793】

他の実施形態では、本発明は、T細胞が腫瘍浸潤リンパ球（TIL）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1794】

他の実施形態では、本発明は、T細胞が骨髄浸潤リンパ球（MIL）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1795】

他の実施形態では、本発明は、T細胞が末梢血リンパ球（PBL）であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1796】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団がドナーの全血からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1797】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団がドナーのアフェレーシス産物からの分離によって取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1798】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、T細胞表現型の正または負の選択によってドナーの全血またはアフェレーシス産物から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1799】

他の実施形態では、本発明は、T細胞表現型がCD3+及びCD45+であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1800】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団のプライミングによる第1の拡張を行う前に、T細胞がNK細胞から分離されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。他の実施形態では、T細胞は、第1のT細胞集団からのCD3-CD56+細胞の除去によって、第1のT細胞集団中のNK細胞から分離される。他の実施形態では、CD3-CD56+細胞は、CD3-CD56+細胞画分を除去し、かつ陰性画分を回収するゲーティング戦略を使用して、第1のT細胞集団を細胞選別に供することによって、第1のT細胞集団から除去される。他の実施形態では、前述の方法は、高いNK細胞パーセンテージを特徴とする第1のT細胞集団におけるT細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、高いCD3-CD56+細胞パーセンテージを特徴とする第1のT細胞集団におけるT細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のNK細胞の存在を特徴とする腫瘍組織におけるT細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のCD3-CD56+細胞を特徴とする腫瘍組織におけるT細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のNK細胞の存在を特徴とする腫瘍に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるT細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、多数のCD3-CD56+細胞の存在を特徴とする腫瘍に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるT細胞の拡張のために利用される。他の実施形態では、前述の方法は、卵巣癌に罹患している患者から取得された腫瘍組織におけるT細胞の拡張のために利用される。

30

40

【1801】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団由来の正確にまたは約 1×10^7 T細胞が容器内に播種されて、かかる容器内で一次の第1の拡張を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

50

【1802】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が複数の容器に分配され、各容器内で、第1のT細胞集団由来の正確にまたは約 1×10^7 T細胞が播種されて、かかる容器内で一次の第1の拡張を開始するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1803】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(c)において採取された第2のT細胞集団が治療的TIL集団であるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1804】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1805】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1～20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1806】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1～10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1807】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1808】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）、コア生検、コア針生検または細針吸引物から得られるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1809】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1つ以上のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1810】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1～20個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1811】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1～10個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1812】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18

10

20

30

40

50

、１９、または２０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８１３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個のコア生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８１４】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【１８１５】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８１６】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８１７】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【１８１８】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の細針吸引物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８１９】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１つ以上の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

30

【１８２０】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８２１】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１～１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８２２】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、または２０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

40

【１８２３】

他の実施形態では、本発明は、第１のＴ細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の１、２、３、４、５、６、７、８、９、または１０個の小生検（例えば、パンチ生検を含む）から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【１８２４】

50

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1つ以上のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1825】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1～20個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1826】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1～10個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

10

【1827】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1828】

他の実施形態では、本発明は、第1のT細胞集団が、ドナー由来の腫瘍組織の1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のコア針生検から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1829】

他の実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、i）IL-2を含む第1の細胞培養培地中で腫瘍試料を約3日間培養し、次いでCD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団を第1のTIL集団から分離することによって対象における腫瘍の1つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、（ii）IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む第2の細胞培養培地中でCD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団を培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、プライミングによる第1の拡張が第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライミングによる第1の拡張が約7日または8日間の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団は第1のTIL集団よりも数が多い、第2のTIL集団を産生することと、（iii）第2のTIL集団の第2の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及びAPCで補充することによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の拡張において追加されるAPCの数が、ステップ（ii）において追加されるAPCの数の少なくとも2倍であり、急速な第2の拡張が約11日間の第2の期間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が治療的TIL集団であり、急速な第2の拡張が第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、第3のTIL集団を産生することと、（iv）ステップ（iii）から取得された治療的TIL集団を採取することと、（v）ステップ（iv）からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すことと、を含む、方法を提供する。

30

40

【1830】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療的TIL集団に拡張するための方法であって、（i）IL-2を含む第1の細胞培養培地中で腫瘍試料を約3日間培養し、次いでCD39／CD69二重陰性及び／またはCD39^{LO}／CD69^{LO}TIL集団を第1のTIL集団から分離することによって対象における腫瘍の1つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、（ii）IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む第2の細胞培養培地中でCD39／CD69二重陰性及び／またはCD

50

39^{LO}/CD69^{LO}TIL集団を培養することによってプライミングによる第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、プライミングによる第1の拡張が約7日または8日間の第1の期間行われて、第2のTIL集団を取得し、第2のTIL集団は第1のTIL集団よりも数が多い、第2のTIL集団を産生することと、(iii)第2のTIL集団をIL-2、OKT-3、及びAPCを含む第3の細胞培養培地で補充することによって急速な第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の拡張が約11日間の第2の期間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が治療的TIL集団である、第3のTIL集団を産生することと、(iv)ステップ(iii)から取得された治療的TIL集団を採取することと、を含む、方法を提供する。

10

【1831】

他の実施形態では、本発明は、第2の期間の5日目の後に、培養物が2つ以上の継代培養物に分割され、各継代培養物に追加量の第3の培養培地が補充され、約6日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1832】

他の実施形態では、本発明は、第2の期間の5日目の後に、培養物が2つ以上の継代培養物に分割され、各継代培養物にIL-2を含む第4の培養培地が補充され、約6日間培養されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1833】

他の実施形態では、本発明は、第2の期間の5日目の後に、培養物が最大5つの継代培養物に分割されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

20

【1834】

他の実施形態では、本発明は、方法におけるすべてのステップが約22日で完了するように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1835】

他の実施形態では、本発明は、T細胞を拡張する方法であって、(i)第1のT細胞集団を培養することによって、ドナーにおける腫瘍の1つ以上の小生検、コア生検、または針生検から取得された腫瘍試料からの第1のT細胞集団のプライミングによる第1の拡張を行って成長をもたらし、第1のT細胞集団の活性化をプライミングすることと、(ii)ステップ(a)においてプライミングされた第1のT細胞集団の活性化が減衰し始めた後に、第1のT細胞集団を培養することによって第1のT細胞集団の急速な第2の拡張を行って成長をもたらし、第1のT細胞集団の活性化を促進して第2のT細胞集団を取得することと、(iv)第2のT細胞集団を採取することと、を含む、TIL培養細胞を拡張する方法を提供する。いくつかの実施形態では、腫瘍試料は、複数のコア生検から得られる。いくつかの実施形態では、複数のコア生検は、2、3、4、5、6、7、8、9及び10個のコア生検からなる群から選択される。

30

【1836】

いくつかの実施形態では、本発明は、第1、第2及び/または第3のTIL集団が、(a)CD39/CD69二重陰性及び/またはCD39^{LO}/CD69^{LO}、(b)CD39/CD69二重ノックアウト、または(c)(a)及び(b)TILの組み合わせについてソートされるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。(a)CD39/CD69二重陰性及び/またはCD39^{LO}/CD69^{LO}、(b)CD39/CD69二重ノックアウト、または本発明の方法による(i)及び(ii)の組み合わせであるTILを選別するのに好適な細胞選別システムは、米国出願第2019/0212332号に見出すことができ、これは参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、細胞選別は、Zhang, X et. al., Surface Free Energy Activated High-Throughput Cell Sorting, Analytical Chemistry (2

40

50

014), 86:9350-9355に記載されており、これは参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、細胞選別技術は、毎秒 5×10^7 細胞の容量を有する。いくつかの実施形態では、毎秒 5×10^7 細胞の容量は、22日目(例えば、TILの拡張後)での選別に有用である。いくつかの実施形態では、本発明は、治療的TIL集団またはTIL組成物が、1-REPまたは2-REPプロトコルのいずれかを使用して拡張されることを提供する(実施例15及び図41を参照)。いくつかの実施形態では、TIL集団は、増殖、生存率、表現型、機能、自己腫瘍殺傷、及びTCR $\alpha\beta$ レパートリーについて評価される。いくつかの実施形態では、上記の細胞選別方法を使用して試験するために、治療的TIL集団またはTIL組成物の一部をサンプリングしてもよい。

【1837】

いくつかの実施形態では、本発明は、T細胞またはTILが腫瘍消化物から取得されるように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載される方法。いくつかの実施形態では、腫瘍消化物は、例えば、RPMI1640、2mM Glutamax、10mg/mLゲンタマイシン、30U/mL DNase、及び1.0mg/mLコラゲナーゼであるが、これらに限定されない酵素培地中で腫瘍をインキュベートすること、続いて、機械的解離(GentleMACS, Miltenyi Biotec, Auburn, CA)によって生成される。いくつかの実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ(任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む)、Accutase(商標)、Accumax(商標)、ヒアルロニダーゼ、中性プロテアーゼ(ディスパーゼ)、キモトリプシン、キモパイン、トリプシン、カゼイナーゼ、エラスターゼ、パパイン、プロテアーゼタイプXIV(プロナーゼ)、デオキシリボヌクレアーゼI(DNase)、トリプシン阻害剤、任意の他の解離酵素またはタンパク質分解酵素、及びこれらの任意の組み合わせ等の1つ以上の解離(消化)酵素を含むが、これらに限定されない腫瘍解離酵素混合物の中に配置される。他の実施形態では、腫瘍は、コラゲナーゼ(任意のブレンドまたはタイプのコラゲナーゼを含む)、中性プロテアーゼ(ディスパーゼ)及びデオキシリボヌクレアーゼI(DNase)を含む腫瘍解離酵素混合物中に配置される。

【1838】

VI. 薬学的組成物、投与量、及び投薬レジメン

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡張及び/または遺伝子修飾された(CCRを発現するように遺伝子修飾されたTIL、MIL、またはPBLを含む)TIL、MIL、またはPBLは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のTIL懸濁液である。本開示のPBMCを使用して拡張されたTILは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、T細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ30~60分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【1839】

任意の好適な用量のTILが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんがNSCLCまたは黒色腫である場合、約 2.3×10^{10} ~約 13.7×10^{10} のTILが投与され、平均約 7.8×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、約 1.2×10^{10} ~約 4.3×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 3×10^{10} ~約 12×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 4×10^{10} ~約 10×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 5×10^{10} ~約 8×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 6×10^{10} ~約 8×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 7×10^{10} ~約 8×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 2.3×10^{10} ~約 13.7×10^{10} である。いくつかの実施形態では、特にがんが黒色腫である場合、治療上有効な投与量は、約 7.8×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、特にがんがNSCLCである場合、治療上有効な投与量は、約 7.8×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約1

・ $2 \times 10^{10} \sim 約 4 \cdot 3 \times 10^{10}$ の T I L である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、 $約 3 \times 10^{10} \sim 約 12 \times 10^{10}$ の T I L である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、 $約 4 \times 10^{10} \sim 約 10 \times 10^{10}$ の T I L である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、 $約 5 \times 10^{10} \sim 約 8 \times 10^{10}$ の T I L である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、 $約 6 \times 10^{10} \sim 約 8 \times 10^{10}$ の T I L である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、 $約 7 \times 10^{10} \sim 約 8 \times 10^{10}$ の T I L である。

【1840】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供される T I L の数は、 $約 1 \times 10^6$ 、 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} 、及び 9×10^{13} である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供される T I L の数は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、及び $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲内である。

【1841】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供される T I L の濃度は、例えば、薬学的組成物の 100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%、または 0.0001% w/w、w/v、または v/v 未満である。

【1842】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供される T I L の濃度は、薬学的組成物の 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、

2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、1.25%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%、または0.0001% w/w、w/v、またはv/v超である。

【1843】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの濃度は、薬学的組成物の約0.0001%～約50%、約0.001%～約40%、約0.01%～約30%、約0.02%～約29%、約0.03%～約28%、約0.04%～約27%、約0.05%～約26%、約0.06%～約25%、約0.07%～約24%、約0.08%～約23%、約0.09%～約22%、約0.1%～約21%、約0.2%～約20%、約0.3%～約19%、約0.4%～約18%、約0.5%～約17%、約0.6%～約16%、約0.7%～約15%、約0.8%～約14%、約0.9%～約12%、または約1%～約10% w/w、w/v、またはv/vの範囲内である。

10

【1844】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの濃度は、薬学的組成物の約0.001%～約10%、約0.01%～約5%、約0.02%～約4.5%、約0.03%～約4%、約0.04%～約3.5%、約0.05%～約3%、約0.06%～約2.5%、約0.07%～約2%、約0.08%～約1.5%、約0.09%～約1%、約0.1%～約0.9% w/w、w/v、またはv/vの範囲内である。

20

【1845】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの量は、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、または0.0001g以下である。

30

【1846】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの量は、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、2.5g、3g、3.5g、4g、4.5g、5g、5.5g、6g、6.5g、7g、7.5g、8g、8.5g、9g、9.5g、または10g超である。

40

【1847】

50

本発明の薬学的組成物中に提供されるTILは、広い投与量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するであろう。適切な場合、TILの臨床的に確立された投与量を使用される場合もある。TILの投与量などの本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、及び処方医師の裁量に依存するであろう。

【1848】

いくつかの実施形態では、TILは、単回用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射によるものであり得る。いくつかの実施形態では、TILは、複数回用量で投与され得る。投薬は、1年に1回、2回、3回、4回、5回、6回、または6回超であり得る。投薬は、月1回、2週間に1回、週1回、または隔日に1回であり得る。TILの投与は、必要な限り継続することができる。

【1849】

いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、及び 9×10^{13} である。いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、及び $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲内である。

【1850】

いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、約 0.01 mg/kg ～約 4.3 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 3.6 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 3.2 mg/kg 、約 0.35 mg/kg ～約 2.85 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 2.85 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 2.15 mg/kg 、約 0.45 mg/kg ～約 1.7 mg/kg 、約 0.15 mg/kg ～約 1.3 mg/kg 、約 0.3 mg/kg ～約 1.15 mg/kg 、約 0.45 mg/kg ～約 1 mg/kg 、約 0.55 mg/kg ～約 0.85 mg/kg 、約 0.65 mg/kg ～約 0.8 mg/kg 、約 0.7 mg/kg ～約 0.75 mg/kg 、約 0.7 mg/kg ～約 2.15 mg/kg 、約 0.85 mg/kg ～約 2 mg/kg 、約 1 mg/kg ～約 1.85 mg/kg 、約 1.15 mg/kg ～約 1.7 mg/kg 、約 1.3 mg/kg ～約 1.6 mg/kg 、約 1.35 mg/kg ～約 1.5 mg/kg 、約 2.15 mg/kg ～約 3.6 mg/kg 、約 2.3 mg/kg ～約 3.4 mg/kg 、約 2.4 mg/kg ～約 3.3 mg/kg 、約 2.6 mg/kg ～約 3.15 mg/kg 、約 2.7 mg/kg ～約 3 mg/kg 、約 2.8 mg/kg ～約 3 mg/kg 、または約 2.85 mg/kg ～約 2.95 mg/kg の範囲内である。

【1851】

いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、約 1 mg ～約 500 mg 、約 10

10

20

30

40

50

mg～約300mg、約20mg～約250mg、約25mg～約200mg、約1mg～約50mg、約5mg～約45mg、約10mg～約40mg、約15mg～約35mg、約20mg～約30mg、約23mg～約28mg、約50mg～約150mg、約60mg～約140mg、約70mg～約130mg、約80mg～約120mg、約90mg～約110mg、または約95mg～約105mg、約98mg～約102mg、約150mg～約250mg、約160mg～約240mg、約170mg～約230mg、約180mg～約220mg、約190mg～約210mg、約195mg～約205mg、または約198～約207mgの範囲内である。

【1852】

TILの有効量は、鼻腔内経路及び経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の認められた投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所、移植によって、または吸入によって、単回用量または複数回用量のいずれかで投与され得る。

【1853】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的TIL集団を含む注入バッグを提供する。

【1854】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的TIL集団及び薬学的に許容される担体を含む腫瘍浸潤リンパ球（TIL）組成物を提供する。

【1855】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のTIL組成物を含む注入バッグを提供する。

【1856】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的TIL集団の凍結保存された調製物を提供する。

【1857】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載の治療的TIL集団及び凍結保存された培地を含む腫瘍浸潤リンパ球（TIL）組成物を提供する。

【1858】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地がDMSOを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のTIL組成物を提供する。

【1859】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が7～10%のDMSOを含むように修正された、上記の前段落のうちのいずれかに記載のTIL組成物を提供する。

【1860】

他の実施形態では、本発明は、上記の前段落のうちのいずれかに記載のTIL組成物の凍結保存された調製物を提供する。

【1861】

いくつかの実施形態では、本開示の方法を使用して拡張されたTILは、薬学的組成物として患者に投与される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、滅菌緩衝液中のTIL懸濁液である。本開示のPBMCを使用して拡張されたTILは、当該技術分野で知られている任意の好適な経路によって投与され得る。いくつかの実施形態では、T細胞は、単回の動脈内または静脈内注入として投与され、これは、好ましくは、およそ30～60分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内投与が含まれる。

【1862】

任意の好適な用量のTILが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんがNSCLCである場合、約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} のTILが投与され、平均は約 7.8×10^{10} のTILである。いくつかの実施形態では、約 1.2×10^{10} ～約 4.3×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 3×10^{10} ～約 12×10^{10} のTILが投与される。いくつかの実施形態では、約 4×10^{10} ～

10

20

30

40

50

約 10×10^{10} の TIL が投与される。いくつかの実施形態では、約 5×10^{10} ～ 約 8×10^{10} の TIL が投与される。いくつかの実施形態では、約 6×10^{10} ～ 約 8×10^{10} の TIL が投与される。いくつかの実施形態では、約 7×10^{10} ～ 約 8×10^{10} の TIL が投与される。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 2.3×10^{10} ～ 約 13.7×10^{10} である。いくつかの実施形態では、特にがんが NSCLC である場合、治療上有効な投与量は、約 7.8×10^{10} TIL である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 1.2×10^{10} ～ 約 4.3×10^{10} TIL である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 3×10^{10} ～ 約 12×10^{10} TIL である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 4×10^{10} ～ 約 10×10^{10} TIL である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 5×10^{10} ～ 約 8×10^{10} TIL である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 6×10^{10} ～ 約 8×10^{10} TIL である。いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量は、約 7×10^{10} ～ 約 8×10^{10} TIL である。

10

【1863】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供される TIL の数は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、及び 9×10^{13} である。いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物で提供される TIL の数は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、及び $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲内である。

20

30

【1864】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供される TIL の濃度は、例えば、薬学的組成物の 100%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%、または $0.0001\% w/w$ 、 w/v 、または v/v 未満である。

40

【1865】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供される TIL の濃度は、薬学的組成物の 90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、19.75%、19.50%、19.25%、19%、18.75%、18.50%、18.25%、18%、17.75%、17.50%、17.25%、17%、16.75%、16.50%、16.25%、16%、15.75%、15.50%、15.25%、15%、14.75%、14.50%、14.25%、14%、13.75%、13.50%

50

、13.25%、13%、12.75%、12.50%、12.25%、12%、11.75%、11.50%、11.25%、11%、10.75%、10.50%、10.25%、10%、9.75%、9.50%、9.25%、9%、8.75%、8.50%、8.25%、8%、7.75%、7.50%、7.25%、7%、6.75%、6.50%、6.25%、6%、5.75%、5.50%、5.25%、5%、4.75%、4.50%、4.25%、4%、3.75%、3.50%、3.25%、3%、2.75%、2.50%、2.25%、2%、1.75%、1.50%、1.25%、1%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%、0.09%、0.08%、0.07%、0.06%、0.05%、0.04%、0.03%、0.02%、0.01%、0.009%、0.008%、0.007%、0.006%、0.005%、0.004%、0.003%、0.002%、0.001%、0.0009%、0.0008%、0.0007%、0.0006%、0.0005%、0.0004%、0.0003%、0.0002%、または0.0001% w/w、w/v、またはv/v超である。

10

【1866】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの濃度は、薬学的組成物の約0.0001%～約50%、約0.001%～約40%、約0.01%～約30%、約0.02%～約29%、約0.03%～約28%、約0.04%～約27%、約0.05%～約26%、約0.06%～約25%、約0.07%～約24%、約0.08%～約23%、約0.09%～約22%、約0.1%～約21%、約0.2%～約20%、約0.3%～約19%、約0.4%～約18%、約0.5%～約17%、約0.6%～約16%、約0.7%～約15%、約0.8%～約14%、約0.9%～約12%、または約1%～約10% w/w、w/v、またはv/vの範囲内である。

20

【1867】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの濃度は、薬学的組成物の約0.001%～約10%、約0.01%～約5%、約0.02%～約4.5%、約0.03%～約4%、約0.04%～約3.5%、約0.05%～約3%、約0.06%～約2.5%、約0.07%～約2%、約0.08%～約1.5%、約0.09%～約1%、約0.1%～約0.9% w/w、w/v、またはv/vの範囲内である。

【1868】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの量は、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、または0.0001g以下である。

30

40

【1869】

いくつかの実施形態では、本発明の薬学的組成物中に提供されるTILの量は、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

50

、0.1 g、0.15 g、0.2 g、0.25 g、0.3 g、0.35 g、0.4 g、0.45 g、0.5 g、0.55 g、0.6 g、0.65 g、0.7 g、0.75 g、0.8 g、0.85 g、0.9 g、0.95 g、1 g、1.5 g、2 g、2.5、3 g、3.5、4 g、4.5 g、5 g、5.5 g、6 g、6.5 g、7 g、7.5 g、8 g、8.5 g、9 g、9.5 g、または10 g超である。

【1870】

本発明の薬学的組成物中に提供されるTILは、広い投与量範囲にわたって有効である。正確な投与量は、投与経路、化合物が投与される形態、治療される対象の性別及び年齢、治療される対象の体重、ならびに主治医の選好及び経験に依存するであろう。適切な場合、TILの臨床的に確立された投与量が使用される場合もある。TILの投与量などの本明細書の方法を使用して投与される薬学的組成物の量は、治療されるヒトまたは哺乳動物、障害または状態の重症度、投与速度、医薬品有効成分の性質、及び処方医師の裁量に依存するであろう。

10

【1871】

いくつかの実施形態では、TILは、単回用量で投与され得る。かかる投与は、注射、例えば、静脈内注射によるものであり得る。いくつかの実施形態では、TILは、複数回用量で投与され得る。投薬は、1年に1回、2回、3回、4回、5回、6回、または6回超であり得る。投薬は、月1回、2週間に1回、週1回、または隔日に1回であり得る。TILの投与は、必要な限り継続することができる。

【1872】

いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、約 1×10^6 、 2×10^6 、 3×10^6 、 4×10^6 、 5×10^6 、 6×10^6 、 7×10^6 、 8×10^6 、 9×10^6 、 1×10^7 、 2×10^7 、 3×10^7 、 4×10^7 、 5×10^7 、 6×10^7 、 7×10^7 、 8×10^7 、 9×10^7 、 1×10^8 、 2×10^8 、 3×10^8 、 4×10^8 、 5×10^8 、 6×10^8 、 7×10^8 、 8×10^8 、 9×10^8 、 1×10^9 、 2×10^9 、 3×10^9 、 4×10^9 、 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 1×10^{10} 、 2×10^{10} 、 3×10^{10} 、 4×10^{10} 、 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 1×10^{11} 、 2×10^{11} 、 3×10^{11} 、 4×10^{11} 、 5×10^{11} 、 6×10^{11} 、 7×10^{11} 、 8×10^{11} 、 9×10^{11} 、 1×10^{12} 、 2×10^{12} 、 3×10^{12} 、 4×10^{12} 、 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 1×10^{13} 、 2×10^{13} 、 3×10^{13} 、 4×10^{13} 、 5×10^{13} 、 6×10^{13} 、 7×10^{13} 、 8×10^{13} 、及び 9×10^{13} である。いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、及び $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲内である。

20

30

【1873】

いくつかの実施形態では、TILの有効な投与量は、約0.01 mg/kg～約4.3 mg/kg、約0.15 mg/kg～約3.6 mg/kg、約0.3 mg/kg～約3.2 mg/kg、約0.35 mg/kg～約2.85 mg/kg、約0.15 mg/kg～約2.85 mg/kg、約0.3 mg/kg～約2.15 mg/kg、約0.45 mg/kg～約1.7 mg/kg、約0.15 mg/kg～約1.3 mg/kg、約0.3 mg/kg～約1.15 mg/kg、約0.45 mg/kg～約1 mg/kg、約0.55 mg/kg～約0.85 mg/kg、約0.65 mg/kg～約0.8 mg/kg、約0.7 mg/kg～約0.75 mg/kg、約0.7 mg/kg～約2.15 mg/kg、約0.85 mg/kg～約2 mg/kg、約1 mg/kg～約1.85 mg/kg、約1.15 mg/kg～約1.7 mg/kg、約1.3 mg/kg～約1.6 mg/kg、約1.35 mg/kg～約1.5 mg/kg、約2.15 mg/kg～約3.6 mg/kg、約2.

40

50

3 mg/kg ~ 約 3.4 mg/kg、約 2.4 mg/kg ~ 約 3.3 mg/kg、約 2.6 mg/kg ~ 約 3.15 mg/kg、約 2.7 mg/kg ~ 約 3 mg/kg、約 2.8 mg/kg ~ 約 3 mg/kg、または約 2.85 mg/kg ~ 約 2.95 mg/kg の範囲内である。

【1874】

いくつかの実施形態では、TIL の有効な投与量は、約 1 mg ~ 約 500 mg、約 10 mg ~ 約 300 mg、約 20 mg ~ 約 250 mg、約 25 mg ~ 約 200 mg、約 1 mg ~ 約 50 mg、約 5 mg ~ 約 45 mg、約 10 mg ~ 約 40 mg、約 15 mg ~ 約 35 mg、約 20 mg ~ 約 30 mg、約 23 mg ~ 約 28 mg、約 50 mg ~ 約 150 mg、約 60 mg ~ 約 140 mg、約 70 mg ~ 約 130 mg、約 80 mg ~ 約 120 mg、約 90 mg ~ 約 110 mg、または約 95 mg ~ 約 105 mg、約 98 mg ~ 約 102 mg、約 150 mg ~ 約 250 mg、約 160 mg ~ 約 240 mg、約 170 mg ~ 約 230 mg、約 180 mg ~ 約 220 mg、約 190 mg ~ 約 210 mg、約 195 mg ~ 約 205 mg、または約 198 ~ 約 207 mg の範囲内である。

10

【1875】

TIL の有効量は、鼻腔内経路及び経皮経路を含む、同様の有用性を有する薬剤の認められた投与様式のうちのいずれかによって、動脈内注射によって、静脈内、腹腔内、非経口、筋肉内、皮下、局所、移植によって、または吸入によって、単回用量または複数回用量のいずれかで投与され得る。

20

【1876】

VII. 患者を治療する方法

治療方法は、最初の TIL 収集及び TIL の培養から始まる。かかる方法は両方とも、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Jin et al., J. Immunotherapy, 2012, 35 (3): 283-292 によって当該技術分野で説明されている。治療方法の実施形態は、実施例を含む以下の節全体に記載されている。

【1877】

本明細書に記載の方法に従って、例えば、上記のステップ A ~ F に記載されるように、または上記のステップ A ~ F に従って（また例えば、図 1 及び／または図 8 に示されるように）産生される拡張 TIL は、がんを有する患者の治療における特定の用途を見出す（例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Goff, et al., J. Clinical Oncology, 2016, 34 (20): 2389-239、及び補足内容に記載される）。いくつかの実施形態では、TIL は、以前に記載されたように、転移性黒色腫の切除された沈着物から増殖された（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、Dudley, et al., J. Immunother., 2003, 26: 332-342 を参照されたい）。新鮮な腫瘍は、滅菌条件下で解剖され得る。代表的な試料は、正式な病理学的分析のために収集され得る。2 mm³ ~ 3 mm³ の単一断片が使用され得る。いくつかの実施形態では、患者当たり 5、10、15、20、25、または 30 個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり 20、25、または 30 個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり 20、22、24、26、または 28 個の試料が取得される。いくつかの実施形態では、患者当たり 24 個の試料が取得される。試料は、24 ウェルプレートの個々のウェル内に配置され、高用量 IL-2 (6,000 IU/mL) を含む成長培地中で維持され、腫瘍の破壊及び／または TIL の増殖について監視され得る。処理後に生細胞が残っている腫瘍は、本明細書に記載されるように、単一細胞懸濁液中に酵素的に消化され、凍結保存され得る。

30

40

【1878】

いくつかの実施形態では、成功裏に成長した TIL は、表現型分析 (CD3、CD4、CD8、及び CD56) のためにサンプリングされ、利用可能な場合、自己腫瘍に対して試験され得る。一晚の共培養によりインターフェロンガンマ (IFN-γ) レベルが 200 pg/mL を超え、バックグラウンドの 2 倍になった場合、TIL は反応性があるとみ

50

なされ得る。(Goff, et al., J Immunother., 2010, 33 : 840-847、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。いくつかの実施形態では、自己反応性または十分な成長パターンの証拠を有する培養物は、急速拡張 (REP) と称されることもある第2の拡張を含む、第2の拡張 (例えば、図1及び／または図8のステップDに従って提供される第2の拡張) のために選択され得る。いくつかの実施形態では、高い自己反応性 (例えば、第2の拡張中の高い増殖) を有する拡張 TIL が、追加の第2の拡張のために選択される。いくつかの実施形態では、高い自己反応性 (例えば、図1及び／または図8のステップDで提供されるような第2の拡張中の高い増殖) を有する TIL が、図1及び／または図8のステップDに従って、追加の第2の拡張のために選択される。

10

【1879】

注入バッグ TIL の凍結保存試料の細胞表現型は、表面マーカー CD3、CD4、CD8、CCR7、及び CD45RA (BD Biosciences) のフローサイトメトリー (例えば、FlowJo)、ならびに本明細書に記載の方法のうちのいずれかによって分析され得る。血清サイトカインは、標準的な酵素結合免疫吸着アッセイ技術を使用することにより測定された。血清 IFN- γ の上昇は、100 pg/mL 超及び 4-3 ベースラインレベルを超えると定義された。

【1880】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図1及び／または図8に例示される方法によって産生される TIL は、TIL の臨床効果の驚くべき改善を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図1及び／または図8に例示される方法によって産生される TIL は、例えば、図1及び／または図8に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって産生される TIL と比較して、増加した臨床効果を示す。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるもの以外の方法は、プロセス 1C 及び／または第1世代 (Gen 1) と称される方法を含む。いくつかの実施形態では、増加した有効性は、DCR、ORR、及び／または他の臨床応答によって測定される。いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法、例えば図1または図8に例示される方法によって産生される TIL は、例えば、図1及び／または図8に例示されるもの以外の方法を含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって産生される TIL と比較して、同様の応答時間及び安全性プロファイルを示す。

20

30

【1881】

いくつかの実施形態では、IFN- γ (IFN- γ) は、治療有効性及び／または増加した臨床的有效性を示す。いくつかの実施形態では、TIL で治療された対象の血液中の IFN- γ は、活性な TIL を示す。いくつかの実施形態では、IFN- γ 産生の効力アッセイが用いられる。IFN- γ 産生は、細胞傷害能の別の尺度である。IFN- γ 産生は、例えば、図1及び／または図8に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製された TIL で治療された対象のエキスピボでの血液、血清、または TIL 中のサイトカイン IFN- γ のレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、IFN- γ の増加は、本発明の方法によって産生された TIL で治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、IFN- γ は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された TIL で治療された患者と比較して、IFN- γ が1倍、2倍、3倍、4倍、または5倍以上増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1及び／または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された TIL で治療された患者と比較して、1倍増加する。いくつかの実施形態では、IFN- γ 分泌は、未治療の患者と比較して、及び／ま

40

50

たは例えば、図 1 及び／または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された T I L で治療された患者と比較して、3 倍増加する。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 及び／または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された T I L で治療された患者と比較して、4 倍増加する。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 及び／または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された T I L で治療された患者と比較して、5 倍増加する。いくつかの実施形態では、I F N - γ は、Q u a n t i k i n e E L I S A キットを使用して測定される。いくつかの実施形態では、I F N - γ は、例えば、図 1 及び／または図 8 に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製された T I L で治療された対象のエクスピボでの T I L において測定される。いくつかの実施形態では、I F N - γ は、例えば図 1 及び／または図 8 に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製された T I L で治療された対象の血液において測定される。いくつかの実施形態では、I F N - γ は、例えば、図 1 及び／または図 8 に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製された T I L で治療された対象の T I L 血清において測定される。いくつかの実施形態では、I F N - ガンマ (I F N - γ) は、がんの治療における治療有効性及び／または増加した臨床的有效性を示す。

10

【1882】

いくつかの実施形態では、例えば図 1 または図 8 に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製された T I L。いくつかの実施形態では、I F N - ガンマ (I F N - γ) は、治療有効性及び／または増加した臨床的有效性を示す。いくつかの実施形態では、T I L で治療された対象の血液中の I F N - γ は、活性な T I L を示す。いくつかの実施形態では、I F N - γ 産生の効力アッセイが用いられる。I F N - γ 産生は、細胞傷害能の別の尺度である。I F N - γ 産生は、例えば、図 1 及び／または図 8 に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製された T I L で治療された対象のエクスピボでの血液、血清、または T I L 中のサイトカイン I F N - γ のレベルを決定することによって測定することができる。いくつかの実施形態では、I F N - γ の増加は、本発明の方法によって産生された T I L で治療された患者における治療有効性を示す。いくつかの実施形態では、I F N - γ は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 及び／または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された T I L で治療された患者と比較して、I F N - γ が 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、または 5 倍以上増加する。

20

30

【1883】

いくつかの実施形態では、例えば図 1 及び／または図 8 に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製される T I L は、例えばプロセス 1 C 法と称される方法を含む、図 1 及び／または図 8 に例示されていないものを含む他の方法によって産生される T I L と比較して、増加したポリクロン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクロン性及び／または増加したポリクロン性は、治療有効性及び／または増加した臨床的有效性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクロン性は、T 細胞レパートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクロン性の増加は、本発明の方法によって産生された T I L の投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクロン性は、例えば、図 1 及び／または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製された T I L と比較して、1 倍、2 倍、10 倍、100 倍、500 倍、または 1000 倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクロン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図 1 及び／または図 8 に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの

40

50

以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、２倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、５００倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図１及び／または図８に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたＴＩＬで治療された患者と比較して、１０００倍増加する。

10

【１８８４】

有効性の尺度には、当該技術分野で知られており、本明細書にも記載されている、疾患制御率（ＤＣＲ）ならびに全応答率（ＯＲＲ）が含まれ得る。

【１８８５】

A. がんを治療する方法

本明細書に記載の組成物及び方法は、疾患を治療するための方法で使用され得る。いくつかの実施形態では、それらは、成人患者または小児患者における、がんなどの過剰増殖性障害の治療に使用するためのものである。それらは、本明細書及び以下の段落に記載される他の障害の治療にも使用され得る。

20

【１８８６】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、がんである。いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、固形腫瘍癌である。いくつかの実施形態では、固形腫瘍癌は、肛門癌、膀胱癌、乳癌（トリプルネガティブ乳癌を含む）、骨癌、ヒトパピローマウイルス（ＨＰＶ）によって引き起こされるがん、中枢神経系関連癌（上衣腫、髄芽腫、神経芽腫、松果体芽腫、及び未分化神経外胚葉性腫瘍を含む）、子宮頸癌（扁平上皮癌、腺扁平上皮癌、及び子宮頸部腺癌）、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、食道胃接合癌、胃癌、消化器癌、消化管間質腫瘍、神経膠芽細胞腫、神経膠腫、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（ＨＮＳＣＣ）を含む）、下咽頭癌、喉頭癌、鼻咽頭癌、中咽頭癌、及び咽頭癌）、腎臓癌、肝臓癌、肺癌（非小細胞肺癌（ＮＳＣＬＣ）及び小細胞肺癌）、黒色腫（ブドウ膜黒色腫、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫を含む）、中皮腫（悪性胸膜中皮腫を含む）、卵巣癌、膵臓癌（膵管腺癌を含む）、陰茎癌、直腸癌、腎癌、腎細胞癌、肉腫（ユーイング肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、ならびに他の骨及び軟部組織肉腫を含む）、甲状腺癌（未分化甲状腺癌を含む）、子宮癌、ならびに腫瘍からなる群から選択される。

30

【１８８７】

いくつかの実施形態では、過剰増殖性障害は、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、血液学的悪性腫瘍は、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、及び多発性骨髄腫からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、本発明は、がん患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＴＩＬ、ＭＩＬ、またはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。いくつかの実施形態では、本発明は、１つ以上のＣＣＲを発現するように修飾されたＭＩＬまたはＰＢＬを使用して、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、血液学的悪性腫瘍である。

40

【１８８８】

いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、または免疫療法を含む少な

50

くとも1つの前療法による治療に対して再発するか、または不応性である、固形腫瘍癌及び血液学的悪性腫瘍を含む、前述のがんのうちの1つである。いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、及び／または免疫療法を含む少なくとも2つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である、前述のがんのうちの1つである。いくつかの実施形態では、がんは、化学療法、放射線療法、及び／または免疫療法を含む少なくとも3つの以前の療法による治療に対して再発するか、または不応性である前述のがんのうちの1つである。

【1889】

いくつかの実施形態では、がんは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）癌である。したがって、MSI-H及びdMMR癌ならびに試験は、Kawakami, et al., Curr. Treat. Options Oncol. 2015, 16, 30に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【1890】

いくつかの実施形態では、本発明は、1つ以上のCCRを発現するように修飾されたTIL、MIL、またはPBLを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、1つ以上のCCRを発現するように修飾されたTIL、MIL、またはPBLを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、非ヒトである。いくつかの実施形態では、本発明は、1つ以上のCCRを発現するように修飾されたTIL、MIL、またはPBLを使用してがんを有する患者を治療する方法を含み、患者は、伴侶動物である。

20

【1891】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、BRAF阻害剤及び／またはMEK阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、エンコラフェニブ、ソラフェニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるBRAF阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、トラメチニブ、コビメチニブ、ビニメチニブ、セルメチニブ、ピマセルチニブ、レファメチニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるMEK阻害剤による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ベムラフェニブ、ダブラフェニブ、エンコラフェニブ、ソラフェニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるBRAF阻害剤、ならびにトラメチニブ、コビメチニブ、ビニメチニブ、セルメチニブ、ピマセルチニブ、レファメチニブ、及びそれらの薬学的に許容される塩または溶媒和物からなる群から選択されるMEK阻害剤による治療に対して不応性である。

30

【1892】

いくつかの実施形態では、本発明は、がん患者を治療する方法を含み、がんは、小児癌である。

40

【1893】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、がんは、ブドウ膜黒色腫である。

【1894】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、ブドウ膜黒色腫は、脈絡膜黒色腫、毛様体黒色腫、または虹彩黒色腫である。

【1895】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、神経芽腫である。

【1896】

50

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、肉腫である。

【1897】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、肉腫は、骨肉腫である。

【1898】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、肉腫は、軟部組織肉腫である。

【1899】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、軟部組織肉腫は、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、または未分化神経外胚葉性腫瘍（PNET）である。

【1900】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、小児癌は、中枢神経系（CNS）関連癌である。いくつかの実施形態では、小児癌は、化学療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、放射線療法による治療に対して不応性である。いくつかの実施形態では、小児癌は、ジヌツキシマブによる治療に対して不応性である。

【1901】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する患者を治療する方法を含み、CNS関連癌は、髄芽腫、松果芽腫、神経膠腫、上衣腫、または神経膠芽細胞腫である。

【1902】

本明細書に記載の組成物及び方法は、がんを治療するための方法において使用することができ、がんは、抗PD-1または抗PD-L1抗体による治療に対して不応性または耐性である。いくつかの実施形態では、患者は、抗PD-1または抗PD-L1抗体に対する一次不応性患者である。いくつかの実施形態では、患者は、抗PD-1または抗PD-L1抗体に対する事前の応答を示さない。いくつかの実施形態では、患者は、患者のがんの進行に続く、抗PD-1または抗PD-L1抗体に対する事前の応答を示す。いくつかの実施形態では、がんは、少なくとも1つの化学療法剤と組み合わせた抗CTLA-4抗体及び／または抗PD-1もしくは抗PD-L1抗体に対して不応性である。いくつかの実施形態では、以前の化学療法剤は、カルボプラチン、パクリタキセル、ペメトレキセド、及び／またはシスプラチンである。いくつかの実施形態では、化学療法剤（複数可）は、白金ダブルット化学療法剤である。いくつかの実施形態では、白金ダブルット療法は、シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第1の化学療法剤と、ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはナブ-パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第2の化学療法剤と、を含む。いくつかの実施形態では、白金ダブルット化学療法剤は、ペメトレキセドと組み合わせられている。

【1903】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、PD-L1陰性であり、及び／または本明細書の他の場所に記載されるように、腫瘍割合スコア（TPS）が1%未満でPD-L1を発現するがんを有する患者に由来する。

【1904】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-1または抗PD-L1抗体及び白金ダブルット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブルット療法は、

i) シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第1の化学療法剤と、

ii) ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはナブ-パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第2の化学療法剤と、を含む。

【1905】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-1または抗PD-L1抗体、ペメトレキセド、及び白金ダブレット療法を含む併用療法に対して不応性であり、白金ダブレット療法は、

i) シスプラチン及びカルボプラチンからなる群から選択される第1の化学療法剤と、
ii) ビノレルビン、ゲムシタビン、及びタキサン（例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、またはnab-パクリタキセルを含む）からなる群から選択される第2の化学療法剤と、を含む。

【1906】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-1抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-L1抗体で処理されている。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、治療ナীবである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-1抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、NSCLCは、抗PD-L1抗体で治療されていない。いくつかの実施形態では、NSCLCは、以前に化学療法剤で治療されている。いくつかの実施形態では、NSCLCは、以前に化学療法剤で治療されているが、もはや化学療法剤で治療されていない。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、抗PD-1/PD-L1ナীবである。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、低いPD-L1の発現を有する。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、治療ナীবのNSCLCを有するか、または化学療法治療後であるが、抗PD-1/PD-L1ナীবである。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、治療ナীবまたは化学療法治療後であるが、抗PD-1/PD-L1ナীবであり、低いPD-L1の発現を有する。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、ベースラインで巨大腫瘍病変を有する。いくつかの実施形態では、対象は、ベースラインで巨大腫瘍病変を有し、低いPD-L1の発現を有する。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、検出可能なPD-L1の発現を有しない。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、治療ナীবまたは化学療法治療後であるが、抗PD-1/PD-L1ナীবであり、検出可能なPD-L1の発現を有しない。いくつかの実施形態では、患者は、ベースラインで巨大腫瘍病変を有し、検出可能なPD-L1の発現を有しない。いくつかの実施形態では、NSCLC患者は、治療ナীবのNSCLCまたは化学療法後（例えば、化学療法剤後）であるが、PD-L1の発現が低く、及び/またはベースラインで巨大腫瘍病変を有する抗PD-1/PD-L1ナীবである。いくつかの実施形態では、最大腫瘍直径が横方向または冠状面のいずれかで測定された7cmより大きい場合、巨大腫瘍病変が示される。いくつかの実施形態では、巨大腫瘍病変は、20mm以上の短軸直径を有する腫れたリンパ節がある場合に示される。いくつかの実施形態では、化学療法剤は、NSCLCの標準治療の治療薬を含む。

【1907】

いくつかの実施形態では、PD-L1発現は、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、不応性NSCLC腫瘍を有する対象は、<1%の腫瘍割合スコア(TPS)を有する。いくつかの実施形態では、不応性NSCLC腫瘍を有する対象は、 $\geq 1\%$ TPSを有する。いくつかの実施形態では、不応性NSCLCを有する対象は、抗PD-1及び/または抗PD-L1抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗PD-1及び/または抗PD-L1抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性NSCLCを有する対象は、抗PD-L1抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、該抗PD-L1抗体治療の前に決定された。

【1908】

いくつかの実施形態では、例えば、図1または図8に記載されるものを含む、本発明の方法によって調製されるTILは、例えば、プロセス1C法と称される方法などの、図1または図8に例示されていないものを含む他の方法によって産生されるTILと比較して、増加したポリクローン性を示す。いくつかの実施形態では、有意に改善されたポリクローン性及び/または増加したポリクローン性は、がん治療に対する治療有効性及び/または増加した臨床的有效性を示す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、T細胞レ

10

20

30

40

50

パートリーの多様性を指す。いくつかの実施形態では、ポリクローン性の増加は、本発明の方法によって産生されたTILの投与に関する治療有効性を示すことができる。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、例えば、図1または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILと比較して、1倍、2倍、10倍、100倍、500倍、または1000倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、1倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、2倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、10倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、100倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、500倍増加する。いくつかの実施形態では、ポリクローン性は、未治療の患者と比較して、及び／または例えば、図1または図8に具体化されるもの以外の方法を含む、本明細書で提供されるもの以外の方法を使用して調製されたTILで治療された患者と比較して、1000倍増加する。

10

20

30

40

50

【1909】

いくつかの実施形態では、PD-L1発現は、本明細書に記載の1つのさらなる試験方法を使用して、腫瘍割合スコアによって決定される。いくつかの実施形態では、NSCLC腫瘍を有する対象または患者は、 $<1\%$ の腫瘍割合スコア(TPS)を有する。いくつかの実施形態では、NSCLC腫瘍は、 $\geq 1\%$ TPSを有する。いくつかの実施形態では、NSCLCを有する対象または患者は、抗PD-1及び／または抗PD-L1抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗PD-1及び／または抗PD-L1抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、NSCLCを有する対象または患者は、抗PD-L1抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗PD-L1抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性NSCLC腫瘍を有する対象または患者は、 $<1\%$ の腫瘍割合スコア(TPS)を有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性NSCLC腫瘍を有する対象または患者は、 $\geq 1\%$ TPSを有する。いくつかの実施形態では、不応性または耐性NSCLCを有する対象または患者は、抗PD-1及び／または抗PD-L1抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗PD-1及び／または抗PD-L1抗体治療の前に決定された。いくつかの実施形態では、不応性または耐性NSCLCを有する対象または患者は、抗PD-L1抗体で以前に治療されており、腫瘍割合スコアは、抗PD-L1抗体治療の前に決定された。

【1910】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、 1% 未満($TPS < 1\%$)のPD-L1タンパク質についての任意の強度での部分的または完全な膜染色を示す、抗PD-1または抗PD-L1療法の前に採取された患者からの腫瘍割合スコア(TPS)または生存腫瘍細胞のパーセンテージを示すNSCLCである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、 $<50\%$ 、 $<45\%$ 、 $<40\%$ 、 $<35\%$ 、 $<30\%$ 、 $<25\%$ 、 $<20\%$ 、 $<15\%$ 、 $<10\%$ 、 $<9\%$ 、 $<8\%$ 、 $<7\%$ 、 $<6\%$ 、 $<5\%$ 、 $<4\%$ 、 $<3\%$ 、 $<2\%$ 、 $<1\%$ 、 $<0.9\%$ 、 $<0.8\%$ 、 $<0.7\%$ 、 $<0.6\%$ 、 $<0.5\%$ 、 $<0.4\%$ 、 $<0.3\%$ 、 $<0.2\%$ 、 $<0.1\%$ 、 $<0.09\%$ 、 $<0.08\%$ 、 $<0.07\%$ 、 $<0.06\%$ 、 $<0.05\%$ 、 $<0.04\%$ 、 $<0.03\%$ 、 $<0.02\%$ 、及び $<0.01\%$ か

らなる群から選択されるTPSを示すNSCLCである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、約50%、約45%、約40%、約35%、約30%、約25%、約20%、約15%、約10%、約9%、約8%、約7%、約6%、約5%、約4%、約3%、約2%、約1%、約0.9%、約0.8%、約0.7%、約0.6%、約0.5%、約0.4%、約0.3%、約0.2%、約0.1%、約0.09%、約0.08%、約0.07%、約0.06%、約0.05%、約0.04%、約0.03%、約0.02%、及び約0.01%からなる群から選択されるTPSを示すNSCLCである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、0%~1%のTPSを示すNSCLCである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、0%~0.9%のTPSを示すNSCLCである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、0%~0.8%のTPSを示すNSCLCである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、0%~0.7%のTPSを示すNSCLCである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、0%~0.6%のTPSを示すNSCLCである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、0%~0.5%のTPSを示すNSCLCである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、0%~0.4%のTPSを示すNSCLCである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、0%~0.3%のTPSを示すNSCLCである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、0%~0.2%のTPSを示すNSCLCである。いくつかの実施形態では、NSCLCは、0%~0.1%のTPSを示すNSCLCである。TPSは、当該技術分野で知られている方法、例えば、Hirsch, et al., J. Thorac. Oncol., 2017, 12, 208-222に記載される方法、あるいはペムブロリズマブまたは他の抗PD-1もしくは抗PD-L1療法による治療前のTPSの決定に使用される方法によって測定され得る。米国食品医薬品局(U.S. Food and Drug Administration)によって承認されたTPSの測定のための方法を使用することもできる。いくつかの実施形態では、PD-L1は、エクソソームPD-L1である。いくつかの実施形態では、PD-L1は、循環腫瘍細胞上に見出される。

10

20

30

40

50

【1911】

いくつかの実施形態では、部分的な膜染色は、1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、またはそれ以上を含む。いくつかの実施形態では、完了した膜染色は、およそ100%の膜染色を含む。

【1912】

いくつかの実施形態では、PD-L1の試験は、患者の血清中のPD-L1のレベルを測定することを伴い得る。これらの実施形態では、患者の血清中のPD-L1の測定は、腫瘍の不均一性の不確実性及び連続生検の患者の不快感を除去する。

【1913】

いくつかの実施形態では、ベースラインまたは標準レベルと比較して、可溶性PD-L1の上昇は、NSCLCにおける予後の悪化と相関する。例えば、Okuma, et al., Clinical Lung Cancer, 2018, 19, 410-417、Vecchiarelli, et al., Oncotarget, 2018, 9, 17554-17563を参照されたい。いくつかの実施形態では、PD-L1は、エクソソームPD-L1である。いくつかの実施形態では、PD-L1は、循環腫瘍細胞上に発現される。

【1914】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌(NSCLC)の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、対象または患者は、

<1%のPD-L1の所定の腫瘍割合スコア(TPS)、

1%~49%のPD-L1のTPSスコア、または

1つ以上のドライバー変異の所定の非存在のうちの少なくとも1つを有し、

ドライバー変異は、EGFR変異、EGFR挿入、EGFRExon20、KRAS変

異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異（ROS1変異）、ROS1融合、RET変異、RET融合、ERBB2変異、ERBB2増幅、BRCA変異、MAP2K1変異、PIK3CA、CDKN2A、PTEN変異、UMD変異、NRAS変異、KRAS変異、NF1変異、MET変異、METスプライス及び／または変化したMETシグナル伝達、TP53変異、CREBBP変異、KMT2C変異、KMT2D変異、ARID1A変異、RB1変異、ATM変異、SETD2変異、FLT3変異、PTPN11変異、FGFR1変異、EP300変異、MYC変異、EZH2変異、JAK2変異、FBXW7変異、CCND3変異、及びGNA11変異からなる群から選択され、この方法は、

(a) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

10

(b) 第1のTIL集団を閉鎖系に付加することと、

(c) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(b)からステップ(c)への移行が、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生することと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、第2の拡張が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(c)からステップ(d)への移行が、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生することと、

20

(e) ステップ(d)から取得された治療的TIL集団を採取することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

(f) ステップ(e)からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(e)から(f)への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

(g) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存することと、

(h) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

30

【1915】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌(NSCLC)の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、この方法は、

(a) PD-L1のPD-L1発現及び腫瘍割合スコア(TPS)について患者の腫瘍を試験することと、

(b) 1つ以上のドライバー変異の所定の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、EGFR変異、EGFR挿入、EGFREクソン20、KRAS変異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異（ROS1変異）、ROS1融合、RET変異、RET融合、ERBB2変異、ERBB2増幅、BRCA変異、MAP2K1変異、PIK3CA、CDKN2A、PTEN変異、UMD変異、NRAS変異、KRAS変異、NF1変異、MET変異、METスプライス及び／または変化したMETシグナル伝達、TP53変異、CREBBP変異、KMT2C変異、KMT2D変異、ARID1A変異、RB1変異、ATM変異、SETD2変異、FLT3変異、PTPN11変異、FGFR1変異、EP300変異、MYC変異、EZH2変異、JAK2変異、FBXW7変異、CCND3変異、及びGNA11変異からなる群から選択される、試験することと、

40

(c) 患者が、約1%～約49%のPD-L1のTPSスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、

(d) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象ま

50

たは患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(e) 第1のTIL集団を閉鎖系に付加することと、

(f) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生することと、

(g) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、第2の拡張が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生することと、

(h) ステップ(d)から取得された治療的TIL集団を採取することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

(i) ステップ(e)からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(e)から(f)への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

(j) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存することと、

(k) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【1916】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌(NSCLC)の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、この方法は、

(a) PD-L1のPD-L1発現及び腫瘍割合スコア(TPS)について患者の腫瘍を試験することと、

(b) 1つ以上のドライバー変異の所定の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、EGFR変異、EGFR挿入、EGFREクソン20、KRAS変異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異(ROS1変異)、ROS1融合、RET変異、RET融合、ERBB2変異、ERBB2増幅、BRCA変異、MAP2K1変異、PIK3CA、CDKN2A、PTEN変異、UMD変異、NRAS変異、KRAS変異、NF1変異、MET変異、METスプライス及び／または変化したMETシグナル伝達、TP53変異、CREBBP変異、KMT2C変異、KMT2D変異、ARID1A変異、RB1変異、ATM変異、SETD2変異、FLT3変異、PTPN11変異、FGFR1変異、EP300変異、MYC変異、EZH2変異、JAK2変異、FBXW7変異、CCND3変異、及びGNA11変異からなる群から選択される、試験することと、

(c) 患者が、約1%未満のPD-L1のTPSスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、

(d) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(e) 第1のTIL集団を閉鎖系に付加することと、

(f) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生することと、

(g) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生する

ことであって、第2の拡張が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生することと、

(h) ステップ(d)から取得された治療的TIL集団を採取することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

(i) ステップ(e)からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(e)から(f)への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

(j) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存することと、

(k) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【1917】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌(NSCLC)の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、この方法は、

(a) PD-L1のPD-L1発現及び腫瘍割合スコア(TPS)について患者の腫瘍を試験することと、

(b) 1つ以上のドライバー変異の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、EGFR変異、EGFR挿入、KRAS変異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異(ROS1変異)、ROS1融合、RET変異、またはRET融合からなる群から選択される、試験することと、

(c) 患者が、約1%～約49%のPD-L1のTPSスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、

(d) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(e) 第1のTIL集団を閉鎖系に付加することと、

(f) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生することと、

(g) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、第2の拡張が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生することと、

(h) ステップ(d)から取得された治療的TIL集団を採取することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

(i) ステップ(e)からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(e)から(f)への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

(j) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存することと、

(k) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【1918】

いくつかの実施形態では、本発明は、非小細胞肺癌(NSCLC)の治療を必要とする対象または患者に腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の集団を投与することによって、NSCLCを治療する方法を提供し、この方法は、

10

20

30

40

50

(a) PD-L1のPD-L1発現及び腫瘍割合スコア(TPS)について患者の腫瘍を試験することと、

(b) 1つ以上のドライバー変異の非存在について患者を試験することであって、ドライバー変異が、EGFR変異、EGFR挿入、KRAS変異、BRAF変異、ALK変異、c-ROS変異(ROS1変異)、ROS1融合、RET変異、またはRET融合からなる群から選択される、試験することと、

(c) 患者が、約1%未満のPD-L1のTPSスコアを有していることを判定し、また患者がドライバー変異を有しないことを判定することと、

(d) 対象から取得された腫瘍試料を複数の腫瘍断片に処理することによって、対象または患者から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得及び／または受容することと、

(e) 第1のTIL集団を閉鎖系に付加することと、

(f) IL-2を含む細胞培養培地中で第1のTIL集団を培養することによって第1の拡張を行い、第2のTIL集団を産生することであって、第1の拡張が、第1のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、第1の拡張が、約3～14日間行われて、第2のTIL集団を取得し、ステップ(e)からステップ(f)への移行が、系を開くことなく起こる、第2のTIL集団を産生することと、

(g) 第2のTIL集団の細胞培養培地を追加のIL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)で補充することによって第2の拡張を行い、第3のTIL集団を産生することであって、第2の拡張が、約7～14日間行われて、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療的TIL集団であり、第2の拡張が、第2のガス透過性表面積を提供する密閉容器内で行われ、ステップ(f)からステップ(g)への移行が、系を開くことなく起こる、第3のTIL集団を産生することと、

(h) ステップ(d)から取得された治療的TIL集団を採取することであって、ステップ(d)からステップ(e)への移行が、系を開くことなく起こる、採取することと、

(i) ステップ(e)からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すことであって、ステップ(e)から(f)への移行が、系を開くことなく起こる、移すことと、

(j) 凍結保存プロセスを使用して、ステップ(f)からの採取されたTIL集団を含む注入バッグを凍結保存することと、

(k) 治療上有効な投与量の第3のTIL集団を、ステップ(g)の注入バッグから対象または患者に投与することと、を含む。

【1919】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的TIL集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1920】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載のTIL組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1921】

他の実施形態では、本発明は、それぞれ、治療上有効な投与量の治療的TIL集団及び本明細書に記載のTIL組成物を投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1922】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、 60 mg/m^2 /日の用量で2日間のシクロホスファミドの投与に続いて、 25 mg/m^2 /日の用量で5日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1923】

他の実施形態では、本発明は、対象にTIL細胞を投与した翌日に開始する、高用量のIL-2レジメンで対象を治療するステップをさらに含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1924】

他の実施形態では、本発明は、高用量IL-2レジメンが、許容範囲まで8時間毎に15分間のボラス静脈内注入として投与される600,000または720,000IU/kgを含むように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1925】

他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1926】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、肺癌、膀胱癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌（頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を含む）、神経膠芽細胞腫（GBMを含む）、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

10

【1927】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽細胞腫（GBMを含む）、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1928】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

20

【1929】

他の実施形態では、本発明は、がんがHNSCCであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1930】

他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1931】

他の実施形態では、本発明は、がんがNSCLCであるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

30

【1932】

他の実施形態では、本発明は、がんが神経膠芽細胞腫（GBMを含む）であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1933】

他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1934】

他の実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1935】

他の実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載のがんを有する対象を治療するための方法を提供する。

40

【1936】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的TIL集団を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載の治療的TIL集団を提供する。

【1937】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量のTIL組成物を対象に投与することを含む、がんを有する対象を治療するための方法で使用するための、本明細書に記載のTIL組成物を提供する。

50

【1938】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または本明細書に記載の TIL 組成物を対象に投与する前に、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または本明細書に記載の TIL 組成物を提供する。

【1939】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、 60 mg/m^2 /日の用量で2日間のシクロホスファミドの投与に続いて、 25 mg/m^2 /日の用量で5日間のフルダラビンを投与するステップを含むように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

10

【1940】

他の実施形態では、本発明は、TIL 細胞を患者に投与した翌日から開始する、高用量 IL-2 レジメンで患者を治療するステップをさらに含むように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1941】

他の実施形態では、本発明は、高用量 IL-2 レジメンが、許容範囲まで8時間毎に15分間のボラス静脈内注入として投与される $600,000$ または $720,000\text{ IU/kg}$ を含むように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1942】

他の実施形態では、本発明は、がんが固形腫瘍であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

20

【1943】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、卵巣癌、子宮頸癌、非小細胞肺癌 (NSCLC)、肺癌、膀胱癌、乳癌、ヒト乳頭癌ウイルスによって引き起こされるがん、頭頸部癌 (頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) を含む)、神経膠芽細胞腫 (GBM を含む)、胃腸癌、腎癌、または腎細胞癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1944】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽細胞腫 (GBM を含む)、及び胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

30

【1945】

他の実施形態では、本発明は、がんが黒色腫であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1946】

他の実施形態では、本発明は、がんが HNSCC であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1947】

他の実施形態では、本発明は、がんが子宮頸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

40

【1948】

他の実施形態では、本発明は、がんが NSCLC であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1949】

他の実施形態では、本発明は、がんが、神経膠芽細胞腫であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1950】

他の実施形態では、本発明は、がんが胃腸癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

50

【1951】

他の実施形態では、本発明は、がんが高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1952】

他の実施形態では、本発明は、がんが小児の高頻度変異癌であるように修正された、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または TIL 組成物を提供する。

【1953】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療的 TIL 集団を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における本明細書に記載の治療的 TIL 集団の使用を提供する。

10

【1954】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の TIL 組成物を対象に投与することを含む、対象におけるがんを治療する方法における前段落のうちのいずれかに記載の TIL 組成物の使用を提供する。

【1955】

他の実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンを対象に投与することと、次いで治療上有効な投与量の、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または本明細書に記載の TIL 組成物を対象に投与することと、を含む、患者におけるがんを治療する方法における、本明細書に記載の治療的 TIL 集団または本明細書に記載の TIL 組成物の使用を提供する。

20

【1956】

B. PD-1 及び PD-L1 阻害剤との併用

いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供される TIL 療法は、治療的 TIL 集合単独による治療を含んでもよく、または TIL ならびに 1 つ以上の PD-1 及び／または PD-L1 阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。

【1957】

プログラム死 1 (PD-1) は、T 細胞、B 細胞、ナチュラルキラー (NK) T 細胞、活性化単球、及び樹状細胞によって発現される 288 アミノ酸の膜貫通免疫チェックポイント受容体タンパク質である。CD279 としても知られる PD-1 は、CD28 ファミリーに属し、ヒトでは第 2 染色体上の *Pdcd1* 遺伝子によってコードされる。PD-1 は、1 つの免疫グロブリン (Ig) スーパーファミリドメイン、膜貫通領域、ならびに免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ (ITIM) 及び免疫受容体チロシンベースのスイッチモチーフ (ITSM) を含む細胞内ドメインからなる。PD-1 とそのリガンド (PD-L1 及び PD-L2) は、Keir, et al., Annu. Rev. Immunol. 2008, 26, 677-704 に記載されるように、免疫寛容において重要な役割を果たすことが知られている。PD-1 は、T 細胞の免疫応答を負に調節する阻害シグナルを提供する。PD-L1 (B7-H1 または CD274 としても知られる) 及び PD-L2 (B7-DC または CD273 としても知られる) は、腫瘍細胞及び間質細胞上に発現され、PD-1 を発現する活性化 T 細胞が遭遇する可能性があり、T 細胞の免疫抑制につながる。PD-L1 は、ヒト第 9 染色体上の *Cd274* 遺伝子によってコードされる 290 アミノ酸の膜貫通タンパク質である。例えば、Topalian, et al., N. Eng. J. Med. 2012, 366, 2443-54 に記載される最近の臨床研究で実証されているように、PD-1 阻害剤、PD-L1 阻害剤、及び／または PD-L2 阻害剤の使用による、PD-1 とそのリガンド PD-L1 及び PD-L2 との間の相互作用をブロックすることで、免疫抵抗を克服することができる。PD-L1 は、多くの腫瘍細胞株上で発現されるが、PD-L2 は、主に樹状細胞及びいくつかの腫瘍株上で発現される。T 細胞 (活性化後に PD-1 を誘導的に発現する) に加えて、PD-1 は、B 細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、活性化単球、樹状細胞上でも発現される。

30

40

【1958】

50

いくつかの実施形態では、T I L 及び P D - 1 阻害剤は、N S C L C の治療のための併用療法または共療法として投与される。

【1959】

いくつかの実施形態では、N S C L C は、前療法を受けていない。いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、フロントライン療法または初期療法として投与される。いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、本明細書に記載の T I L と併用して、フロントライン療法または初期療法として投与される。

【1960】

いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、当該技術分野で知られている任意の P D - 1 阻害剤または P D - 1 遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載される P D - 1 阻害剤または遮断剤のうちの1つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、P D - 1 阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体である P D - 1 阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリエーション、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、P D - 1 阻害剤への本明細書での言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【1961】

いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、抗体（すなわち、抗 P D - 1 抗体）、F a b 断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（s c F v）である。いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、P D - 1 との結合について競合し、及び／または P D - 1 上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、P D - 1 との結合について競合し、及び／または P D - 1 上のエピトープに結合する。

【1962】

いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、ヒト P D - 1 に約 100 p M 以下の K D で結合する、ヒト P D - 1 に約 90 p M 以下の K D で結合する、ヒト P D - 1 に約 80 p M 以下の K D で結合する、ヒト P D - 1 に約 70 p M 以下の K D で結合する、ヒト P D - 1 に約 60 p M 以下の K D で結合する、ヒト P D - 1 に約 50 p M 以下の K D で結合する、ヒト P D - 1 に約 40 p M 以下の K D で結合する、ヒト P D - 1 に約 30 p M 以下の K D で結合する、ヒト P D - 1 に約 20 p M 以下の K D で結合する、ヒト P D - 1 に約 10 p M 以下の K D で結合する、またはヒト P D - 1 に約 1 p M 以下の K D で結合するものである。

【1963】

いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、ヒト P D - 1 に約 7.5×10^5 1 / M · s 以上の $k_{a s s o c}$ で結合する、ヒト P D - 1 に約 7.5×10^5 1 / M · s 以上の $k_{a s s o c}$ で結合する、ヒト P D - 1 に約 8×10^5 1 / M · s 以上の $k_{a s s o c}$ で結合する、ヒト P D - 1 に約 8.5×10^5 1 / M · s 以上の $k_{a s s o c}$ で結合する、ヒト P D - 1 に約 9×10^5 1 / M · s 以上の $k_{a s s o c}$ で結合する、ヒト P D - 1 に約 9.5×10^5 1 / M · s 以上の $k_{a s s o c}$ で結合する、またはヒト P D - 1 に約 1×10^6 1 / M · s 以上の $k_{a s s o c}$ で結合するものである。

【1964】

いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、ヒト P D - 1 に約 2×10^{-5} 1 / s 以下の $k_{d i s s o c}$ で結合する、ヒト P D - 1 に約 2.1×10^{-5} 1 / s 以下の $k_{d i s s o c}$ で結合する、ヒト P D - 1 に約 2.2×10^{-5} 1 / s 以下の $k_{d i s s o c}$ で結合する、ヒト P D - 1 に約 2.3×10^{-5} 1 / s 以下の $k_{d i s s o c}$ で結合する、ヒト P D - 1 に約 2.4×10^{-5} 1 / s 以下の $k_{d i s s o c}$ で結合する、ヒト P D - 1 に約 2.5×10^{-5} 1 / s 以下の $k_{d i s s o c}$ で結合する、ヒト P D - 1 に約 2.6×10^{-5} 1 / s 以下の $k_{d i s s o c}$ で結合する、またはヒト P D - 1 に約 2.7×10^{-5} 1 / s 以下の $k_{d i s s o c}$ で結合する、

s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.8 \times 10^{-5} \text{ 1/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.9 \times 10^{-5} \text{ 1/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒト PD-1 に約 $3 \times 10^{-5} \text{ 1/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合するものである。

【1965】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、約 10 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 9 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 8 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 7 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 6 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 5 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 4 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 3 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 2 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、または約 1 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害するものである。

【1966】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ニボルマブ (Bristol-Myers Squibb Co. から OPDIVO として市販されている)、またはそれらのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリエーションである。ニボルマブは、PD-1 受容体を遮断する完全ヒト IgG4 抗体である。いくつかの実施形態では、抗 PD-1 抗体は、免疫グロブリン G4 カップ、抗 (ヒト CD274) 抗体である。ニボルマブには、Chemical Abstracts Service (CAS) 登録番号 946414-94-4 が割り当てられており、5C4、BMS-936558、MDX-1106、及び ONO-4538 としても知られている。ニボルマブの調製及び特性は、米国特許第 8,008,449 号及び国際特許公開第 WO2006/121168 号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態のがんにおけるニボルマブの臨床的安全性及び有効性は、Wang, et al., Cancer Immunol. Res. 2014, 2, 846-56、Page, et al., Ann. Rev. Med., 2014, 65, 185-202、及び Weber, et al., J. Clin. Oncology, 2013, 31, 4311-4318 に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。ニボルマブのアミノ酸配列を表 18 に示す。ニボルマブは、22-96、140-196、254-314、360-418、22'-96'、140'-196'、254'-314'、及び 360'-418' における重鎖内ジスルフィド結合；23'-88'、134'-194'、23'-88'、及び 134'-194' における軽鎖内ジスルフィド結合；127-214'、127'-214' における重鎖-軽鎖間ジスルフィド結合；219-219' 及び 222-222' における重鎖-重鎖間ジスルフィド結合；ならびに 290、290' における N-グリコシル化部位 (H C H 2 84.4) を有する。

【1967】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、配列番号 158 によって与えられる重鎖及び配列番号 159 によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、それぞれ、配列番号 158 及び配列番号 159 に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab 断片、一本鎖可変断片 (scFv)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、

それぞれ、配列番号 158 及び配列番号 159 に示される配列と少なくとも 99% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 158 及び配列番号 159 に示される配列と少なくとも 98% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 158 及び配列番号 159 に示される配列と少なくとも 97% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 158 及び配列番号 159 に示される配列と少なくとも 96% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 158 及び配列番号 159 に示される配列と少なくとも 95% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1968】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ニボルマブの重鎖及び軽鎖 CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤重鎖可変領域 (V_H) は、配列番号 160 に示される配列を含み、PD-1 阻害剤軽鎖可変領域 (V_L) は、配列番号 161 に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 160 及び配列番号 161 に示される配列と少なくとも 99% 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 160 及び配列番号 161 に示される配列と少なくとも 98% 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 160 及び配列番号 161 に示される配列と少なくとも 97% 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 160 及び配列番号 161 に示される配列と少なくとも 96% 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 160 及び配列番号 161 に示される配列と少なくとも 95% 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。

【1969】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、それぞれ、配列番号 162、配列番号 163、及び配列番号 164 に示される配列を有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 165、配列番号 166、及び配列番号 167 に示される配列を有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／または PD-1 上の同じエピトープに結合する。

【1970】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ニボルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗 PD-1 バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、1 つ以上の翻訳後修飾を含む、PD-1 抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗 PD-1 抗体であり、抗 PD-1 抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。抗 PD-1 抗体は、米国 FDA 及び／または欧州連合の EMA などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なる

10

20

30

40

50

るものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ニボルマブである。

【1971】

【表19】

表18. ニボルマブに関連するPD-1阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 158 ニボルマブ 重鎖	QVQLVESGGG VVQPGKSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYV 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTTLVT VSSASTKGPS 120 VFPLAPCSRS TSESTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT SGVETFPFPAVL QSSGLYSLSS 180 VVTVPSSSLG TKTTCNVVDH KPSNTKVDKR VESKYGPCCP PCPAPEFLGG PSVFLFPPKP 240 KDTLMISRTPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQFN STYRVVSVLT 300 VLHQDWLNGK EYKCKVSNKG LPSSIETIS KAKGQPREPQ VYTLPPSQEE MTKNQVSLTC 360 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGSFFLY SRLTVDKSRW QEGNVFSCSV 420 MHEALHNHYT QKSLSLSLGK 440
配列番号 159 ニボルマブ 軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSLT 180 LSKADYEKKH VYACEVTHQ LSSPVTKSFN RGEK 214
配列番号 160 ニボルマブ 可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGKSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSKRYV 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND DYWGQGTTLVT VSS 113
配列番号 161 ニボルマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA 60 RFGSGSGGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ GTKVEIK 107
配列番号 162 ニボルマブ 重鎖 CDR1	NSGMH 5
配列番号 163 ニボルマブ 重鎖 CDR2	VIWYDGSKRY YADSVKG 17
配列番号 164 ニボルマブ 重鎖 CDR3	NDDY 4
配列番号 165 ニボルマブ 軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A 11
配列番号 166 ニボルマブ 軽鎖 CDR2	DASNRAT 7
配列番号 167 ニボルマブ 軽鎖 CDR3	QQSSNWPT 9

【1972】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約0.5mg/kg～約10mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約1.5mg/kg、約2mg/kg、約2.5mg/kg、約3mg/kg、約3.5mg/kg、約4mg/kg、約4.5mg/kg、約5mg/kg、約5.5mg/kg、約6mg/kg、約6.5mg/kg、約7mg/kg、約7.5mg/kg、約8mg/kg、約8.5mg/kg、約9mg/kg、約9.5mg/kg、または約10mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または

3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1973】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約200mg～約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約200mg、約220mg、約240mg、約260mg、約280mg、約300mg、約320mg、約340mg、約360mg、約380mg、約400mg、約420mg、約440mg、約460mg、約480mg、または約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【1974】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ニボルマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、2週間毎、3週間毎、4週間毎、5週間毎、または6週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【1975】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与され、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために、約1mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ3mg/kgを3週間毎に4用量、次いで240mgを2週間毎、または480mgを4週間毎に投与される。

30

【1976】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

40

【1977】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、2週間毎に約3mg/kgで、6週間毎に1mg/kgのイピリムマブとともに投与され

50

る。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、3週間毎に約360mgで、6週間毎に1mg/kgのイピリムマブ及び2サイクルのプラチナダブルット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、2週間毎に約240mgまたは4週間毎に480mg投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【1978】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、小細胞肺癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【1979】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために、3週間毎に約360mg/kg、6週間毎に1mg/kgのイピリムマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

30

【1980】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約3mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ約1mg/kgを3週間毎に4用量、次いで240mgを2週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約3mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ約1mg/kgを3週間毎に4用量、次いで240mgを2週間毎、480mgを4週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

40

【1981】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために投

50

与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、古典的ホジキンリンパ腫を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【1982】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、頭頸部の再発性または転移性扁平上皮癌を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【1983】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、局所進行性または転移性尿路上皮癌を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

30

【1984】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、40kg以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、2週間毎に約240mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、40kg以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、4週間毎に約480mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与する

40

50

ことができる。

【1985】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、40 kg未満の小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、2週間毎に約3 mg/kgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、40 kg以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、約3 mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ1 mg/kgを3週間毎に4用量、次いで240 mgを2週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、40 kg以上の成人及び小児患者における高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、約3 mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ1 mg/kgを3週間毎に4用量、次いで480 mgを4週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

20

【1986】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、2週間毎に約240 mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、4週間毎に約480 mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、約1 mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ3 mg/kgを3週間毎に4用量、次いで240 mgを2週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、肝細胞癌を治療するために、約1 mg/kgで投与され、続いて同じ日にイピリムマブ3 mg/kgを3週間毎に4用量、次いで480 mgを4週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

30

【1987】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために、2週間毎に約240 mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブは、食道扁平上皮癌を治療するために、4週間毎に約480 mgで投与される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ニボルマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

40

【1988】

他の実施形態では、PD-1阻害剤は、ペムブロリズマブ（Merck & Co., Inc. (Kenilworth, NJ, USA) からKEYTRUDAとして市販されている）、またはそれらの抗原結合断片、複合体、もしくはバリエーションを含む。ペムブロリズマ

50

ブには、C A S 登録番号 1 3 7 4 8 5 3 - 9 1 - 4 が割り当てられており、ラムプロリズマブ、M K - 3 4 7 5、及び S C H - 9 0 0 4 7 5 としても知られている。ペムプロリズマブは、免疫グロブリン G 4、抗（ヒトタンパク質 P D C D 1（プログラム細胞死 1））（ヒト-ハツカネズミモノクローナル重鎖）、ヒト-ハツカネズミモノクローナル軽鎖、二量体構造を有するジスルフィドを有する。ペムプロリズマブの構造は、免疫グロブリン G 4、抗（ヒトプログラム細胞死 1）；ヒト化マウスモノクローナル κ 軽鎖二量体（2 2 6 - 2 2 6 ' ' : 2 2 9 - 2 2 9 ' '）-ビスジスルフィドを有するヒト化マウスモノクローナル [2 2 8 - L - プロリン（H 1 0 - S > P）] γ 4 重鎖（1 3 4 - 2 1 8 '）-ジスルフィドとしても記載され得る。ペムプロリズマブの特性、使用、及び調製は、国際特許公開第 W O 2 0 0 8 / 1 5 6 7 1 2 A 1 号、米国特許第 8, 3 5 4, 5 0 9 号、なら
びに米国特許出願公開第 U S 2 0 1 0 / 0 2 6 6 6 1 7 A 1 号、同第 U S 2 0 1 3 / 0 1 0 8 6 5 1 A 1 号、及び同第 U S 2 0 1 3 / 0 1 0 9 8 4 3 A 2 に記載されており、それ
らの開示は参照により本明細書に組み込まれる。様々な形態のがんにおけるペムプロリズ
マブの臨床的安全性及び有効性は、F u e r s t, O n c o l o g y T i m e s, 2 0
1 4, 3 6, 3 5 - 3 6、R o b e r t, e t a l., L a n c e t, 2 0 1 4, 3 8
4, 1 1 0 9 - 1 7、及び T h o m a s, e t a l., E x p. O p i n. B i o l.
T h e r., 2 0 1 4, 1 4, 1 0 6 1 - 1 0 6 4 に記載されている。ペムプロリズマブ
のアミノ酸配列を表 1 9 に示す。ペムプロリズマブは、ジスルフィド架橋：2 2 - 9 6、
2 2 ' ' - 9 6 ' '、2 3 ' - 9 2 '、2 3 ' ' ' - 9 2 ' ' '、1 3 4 - 2 1 8 '、1
3 4 ' ' - 2 1 8 ' ' '、1 3 8 ' - 1 9 8 '、1 3 8 ' ' ' - 1 9 8 ' ' '、1 4 7 -
2 0 3、1 4 7 ' ' - 2 0 3 ' '、2 2 6 - 2 2 6 ' '、2 2 9 - 2 2 9 ' '、2 6 1 -
3 2 1、2 6 1 ' ' - 3 2 1 ' '、3 6 7 - 4 2 5、及び 3 6 7 ' ' - 4 2 5 ' '、なら
びにグリコシル化部位（N）：A s n - 2 9 7 及び A s n - 2 9 7 ' ' を含む。ペムプロ
リズマブは、F c 領域に安定化 S 2 2 8 P 変異を有する I g G 4 / カッパアイソタイプで
あり、この変異を I g G 4 ヒンジ領域に挿入すると、I g G 4 抗体で典型的に観察される
半分子の形成が防止される。ペムプロリズマブは、各重鎖の F c ドメイン内の A s n 2 9
7 で不均一にグリコシル化されており、無傷の抗体の分子量はおよそ 1 4 9 k D a になる
。ペムプロリズマブの優性グリコフォームは、フコシル化アガラクト二分性グリカンフォ
ーム（G O F）である。

10

20

30

40

50

【1 9 8 9】

いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、配列番号 1 6 8 によって与えられる重鎖
及び配列番号 1 6 9 によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、P D - 1
阻害剤は、それぞれ、配列番号 1 6 8 及び配列番号 1 6 9 に示される配列を有する重鎖及
び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、F a b 断片、一本鎖可変断片（s c F v）、バリ
アント、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、各々が、
それぞれ、配列番号 1 6 8 及び配列番号 1 6 9 に示される配列と少なくとも 9 9 % 同一で
ある重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、各々が、それ
ぞれ、配列番号 1 6 8 及び配列番号 1 6 9 に示される配列と少なくとも 9 8 % 同一である重
鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配
列番号 1 6 8 及び配列番号 1 6 9 に示される配列と少なくとも 9 7 % 同一である重鎖及び
軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号
1 6 8 及び配列番号 1 6 9 に示される配列と少なくとも 9 6 % 同一である重鎖及び軽鎖を
含む。いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 1 6 8
及び配列番号 1 6 9 に示される配列と少なくとも 9 5 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【1 9 9 0】

いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤は、ペムプロリズマブの重鎖及び軽鎖 C D R
または可変領域（V R）を含む。いくつかの実施形態では、P D - 1 阻害剤重鎖可変領域
（V H）は、配列番号 1 7 0 に示される配列を含み、P D - 1 阻害剤軽鎖可変領域（V L
）は、配列番号 1 7 1 に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつか
の実施形態では、P D - 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 1 7 0 及び配列番号 1

71に示される配列と少なくとも99%同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号170及び配列番号171に示される配列と少なくとも98%同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号170及び配列番号171に示される配列と少なくとも97%同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号170及び配列番号171に示される配列と少なくとも96%同一であるV_H及びV_L領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号170及び配列番号171に示される配列と少なくとも95%同一であるV_H及びV_L領域を含む。

【1991】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、それぞれ、配列番号172、配列番号173、及び配列番号174に示される配列を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号175、配列番号176、及び配列番号177に示される配列を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはPD-1上の同じエピトープに結合する。

【1992】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗PD-1バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、1つ以上の翻訳後修飾を含む、PD-1抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗PD-1抗体であり、抗PD-1抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。抗PD-1抗体は、米国FDA及び／または欧州連合のEMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ペムブロリズマブである。

【1993】

10

20

30

40

50

【表 20】

表 19. ペムブロリズマブに関連する PD-1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)						
配列番号 168 ペムブロリズマブ 重鎖	QVQLVQSGVE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	NYMYWVRQA	PGQGLEWMGG	INPSNGGTNF	60
	NEKFKNRVTI	TTDSSTTTAY	MELKSLQFDD	TAVYYCARRD	YRFDMGFDYW	GQGTITVTSS	120
	ASTKGPSVFP	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS	180
	GLYSLSVSVT	VPSSSLGTKT	YTCNVDEKPS	NTKVDKRVES	KYGPPCPPCP	APEFLGGPSV	240
	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	300
	RVVSVLTIVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	360
	NQVSLTCLVK	GFYPSTIAVE	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFFLYSRL	TVDKSRWQEG	420
	NVFSCSVMEH	ALHNHYTQKS	LSLSLGK				447
配列番号 169 ペムブロリズ マブ軽鎖	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASKGVS	TSGYSYLHWY	QQKPGQAPRL	LIYLAAYLES	60
	GVPARFSGSG	SGTDFTLTIS	SLEPEDFAVY	YCQHSRDLP	TFGGGTKEVI	KRTVAAPSVF	120
	IFPPSDEQLK	SGTASVVCCL	NNFYPREAKV	QWKVDNALQS	GNSQESVTEQ	DSKDSTYSLS	180
	STLTLSKADY	EKKHKVYACEV	THQGLSSPEVT	KSFNRGEC			218
配列番号 170 ペムブロリズマブ 可変重鎖	QVQLVQSGVE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	NYMYWVRQA	PGQGLEWMGG	INPSNGGTNF	60
	NEKFKNRVTI	TTDSSTTTAY	MELKSLQFDD	TAVYYCARRD	YRFDMGFDYW	GQGTITVTSS	120
配列番号 171 ペムブロリズマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPAT	LSLSPGERAT	LSCRASKGVS	TSGYSYLHWY	QQKPGQAPRL	LIYLAAYLES	60
	GVPARFSGSG	SGTDFTLTIS	SLEPEDFAVY	YCQHSRDLP	TFGGGTKEVI	K	111
配列番号 172 ペムブロリズマブ 重鎖 CDR1	NYMY						5
配列番号 173 ペムブロリズマブ 重鎖 CDR2	GINPSNGGTN FNEFK						16
配列番号 174 ペムブロリズマブ 重鎖 CDR3	RDYRFDMGFD Y						11
配列番号 175 ペムブロリズマブ 軽鎖 CDR1	RASKGVSTSG YSYLH						15
配列番号 176 ペムブロリズマブ 軽鎖 CDR2	LAAYLES						7
配列番号 177 ペムブロリズマブ 軽鎖 CDR3	QHSRDLP						9

【1994】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約 0.5 mg/kg ~ 約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 2 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 3 mg/kg、約 3.5 mg/kg、約 4 mg/kg、約 4.5 mg/kg、約 5 mg/kg、約 5.5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 6.5 mg/kg、約 7 mg/kg、約 7.5 mg/kg、約 8 mg/kg、約 8.5 mg/kg、約 9 mg/kg、約 9.5 mg/kg、または約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2 投与後 1、2、3、4、または 5 日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2 投与後 1、2、または 3 日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前 1、2、3、4、または 5 週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前 1、2、または 3 週間で（すなわち、対象または患

者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。

【1995】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、約200mg～約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ニボルマブは、約200mg、約220mg、約240mg、約260mg、約280mg、約300mg、約320mg、約340mg、約360mg、約380mg、約400mg、約420mg、約440mg、約460mg、約480mg、または約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2 投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペム
10
ブロリズマブ投与は、IL-2 投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1996】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ペムブロリズマブまたはそのバイオシミラーであり、ペムブロリズマブは、2週間毎、3週間毎、4週間毎、5週間毎、または6週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2 投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペム
20
ブロリズマブ投与は、IL-2 投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1997】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、黒色腫を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペム
30
ブロリズマブ投与は、IL-2 投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2 投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1998】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、NSCLCを治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、NSCLCを治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペム
40
ブロリズマブ投与は、IL-2 投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2 投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【1999】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、小細胞肺癌（SCLC）を治療するた
50

めに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、SCLCを治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、SCLCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【2000】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、HNSCCを治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、HNSCCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【2001】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（cHL）または原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫（PMBCL）を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（cHL）または原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫（PMBCL）を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。ペムブロリズマブは、古典的ホジキンリンパ腫（cHL）または原発性縦隔大細胞型B細胞リンパ腫（PMBCL）を治療するために、小児の場合、3週間毎に約2mg/kg（最大200mg）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

30

【2002】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、尿路上皮癌を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

40

【2003】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（

50

MSI-H) またはミスマッチ修復欠損 (dMMR) 癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MSI-H またはdMMR癌を治療するために、成人の場合、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MSI-H またはdMMR癌を治療するために、小児の場合、3週間毎に約2mg/kg (最大200mg) で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で (すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で (すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で (すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で (すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。

10

【2004】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性 (MSI-H) またはミスマッチ修復欠損結腸直腸癌 (dMMR CRC) を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MSI-H またはdMMR CRCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で (すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で (すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。

20

30

【2005】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、胃癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、胃癌を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で (すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で (すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。

40

【2006】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、食道癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、食道癌を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で (すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で (すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。

50

【2007】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮頸癌を治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【2008】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、肝細胞癌（HCC）を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、HCCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【2009】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、メルケル細胞癌（MCC）を治療するために、成人の場合、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MCCを治療するために、成人の場合、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、MCCを治療するために、小児の場合、3週間毎に約2mg/kg（最大200mg）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

30

40

【2010】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、腎細胞癌（RCC）を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、RCCを治療するために、6週間毎に約400mgで、経口で1日2回のアキシチニブ5mgとともに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態

50

では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【2011】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、子宮内膜癌を治療するために、MSI-HまたはdMMRではない腫瘍に対して、6週間毎に約400mgで、経口で1日1回のレンパチニブ20mgとともに投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

10

【2012】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高遺伝子変異量（TMB-H）癌を治療するために、成人の場合、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、TMB-H癌を治療するために、成人の場合、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、TMB-H癌を治療するために、小児の場合、3週間毎に約2mg/kg（最大200mg）で投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

20

【2013】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、皮膚扁平上皮癌（cSCC）を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、cSCCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

30

【2014】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）を治療するために、3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、TNBCを治療するために、6週間毎に約400mgで投与される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

40

【2015】

50

いくつかの実施形態では、患者または対象が成人である場合、すなわち、成人適応症の治療、及び6週間毎の400mgの追加の投薬レジメンが用いられ得る。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、3、4、または5日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブ投与は、IL-2投与後1、2、または3日で開始される。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブはまた、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）投与することができる。

【2016】

10

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、抗m-PD-1クローンJ43（カタログ番号BE0033-2）及びRMP1-14（カタログ番号BE0146）（Bio X Cell, Inc., West Lebanon, NH USA）などの市販の抗PD-1モノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗PD-1抗体が、当業者に知られている。

【2017】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、米国特許第8,354,509号または米国特許出願公開第2010/0266617 A1号、同第2013/0108651 A1号、同第2013/0109843 A2号に開示されている抗体であり、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、米国特許第8,287,856号、同第8,580,247号、及び同第8,168,757号、ならびに米国特許出願公開第2009/0028857 A1号、同第2010/0285013 A1号、同第2013/0022600 A1号、及び同第2011/0008369 A1号に記載されている抗PD-1抗体であり、それらの教示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、PD-1阻害剤は、米国特許第8,735,553 B1号に開示されている抗PD-1抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、CT-011としても知られるピジリズマブであり、これは米国特許第8,686,119号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

【2018】

30

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、米国特許第8,907,053号、同第9,096,642号、及び同第9,044,442号、ならびに米国特許出願公開第US2015/0087581号に記載されるものなどの小分子またはペプチドもしくはペプチド誘導体；米国特許出願公開第2015/0073024号に記載されるものなどの1,2,4-オキサジアゾール化合物及び誘導体；米国特許出願公開第US2015/0073042号に記載されるものなどの環状ペプチド模倣化合物及び誘導体；米国特許出願公開第US2015/0125491号に記載されるものなどの環状化合物及び誘導体；国際特許出願公開第WO2015/033301号に記載されるものなどの1,3,4-オキサジアゾール及び1,3,4-チアジアゾール化合物ならびに誘導体；国際特許出願公開第WO2015/036927号及びWO2015/04490号に記載されるものなどのペプチド系化合物及び誘導体、または米国特許出願公開第US2014/0294898号に記載されるものなどの大環状ペプチド系化合物及び誘導体であり得、各々の開示は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、Regeneron, Inc. から市販されているセンプリマブである。

40

【2019】

いくつかの実施形態では、TIL及びPD-L1阻害剤またはPD-L2阻害剤は、NSCLCの治療のための併用療法または共療法として投与される。

【2020】

いくつかの実施形態では、NSCLCは、前療法を受けていない。いくつかの実施形態

50

では、PD-L1阻害剤またはPD-L2阻害剤は、フロントライン療法または初期療法として投与される。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤またはPD-L2阻害剤は、本明細書に記載のTILと併用して、フロントライン療法または初期療法として投与される。

【2021】

いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のPD-L1もしくはPD-L2阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるPD-L1もしくはPD-L2阻害剤、アンタゴニスト、または遮断剤のうちの1つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、PD-L1及びPD-L2阻害剤に関して交換可能に使用される。誤解を避けるために、抗体であるPD-L1またはPD-L2阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリエーション、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、PD-L1またはPD-L2阻害剤への本明細書での言及は、化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

10

【2022】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の組成物、プロセス、及び方法は、PD-L1またはPD-L2阻害剤を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、小分子である。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、抗体（すなわち、抗PD-1抗体）、Fab断片を含むその断片、またはその一本鎖可変断片（scFv）である。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、ポリクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、PD-L1またはPD-L2阻害剤は、PD-L1もしくはPD-L2との結合について競合し、及び／またはPD-L1もしくはPD-L2上のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗体は、PD-L1もしくはPD-L2との結合について競合し、及び／またはPD-L1もしくはPD-L2上のエピトープに結合する。

20

【2023】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるPD-L1阻害剤は、化合物が、PD-L2受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でPD-L1と結合または相互作用するという点で、PD-L1に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、PD-L2受容体に対するより少なくとも約2倍高い濃度、約3倍高い濃度、約5倍高い濃度、約10倍高い濃度、約20倍高い濃度、約30倍高い濃度、約50倍高い濃度、約100倍高い濃度、約200倍高い濃度、約300倍高い濃度、または約500倍高い濃度である結合定数でPD-L1受容体に結合する。

30

【2024】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるPD-L2阻害剤は、化合物が、PD-L1受容体を含む他の受容体と結合または相互作用するよりも実質的に低い濃度でPD-L2と結合または相互作用するという点で、PD-L2に対して選択的である。特定の実施形態では、化合物は、PD-L1受容体に対するより少なくとも約2倍高い濃度、約3倍高い濃度、約5倍高い濃度、約10倍高い濃度、約20倍高い濃度、約30倍高い濃度、約50倍高い濃度、約100倍高い濃度、約200倍高い濃度、約300倍高い濃度、または約500倍高い濃度である結合定数でPD-L2受容体に結合する。

40

【2025】

いかなる理論にも縛られることなく、腫瘍細胞はPD-L1を発現し、T細胞はPD-1を発現すると考えられている。しかしながら、腫瘍細胞によるPD-L1の発現は、PD-1またはPD-L1の阻害剤または遮断剤の有効性には必要とされない。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞は、PD-L1を発現する。他の実施形態では、腫瘍細胞は、PD-L1を発現しない。いくつかの実施形態では、方法は、TILと組み合わせて、本明細書に記載されるものなどのPD-1及びPD-L1抗体の組み合わせを含むことができ

50

る。PD-1 及び PD-L1 抗体と TIL との組み合わせの投与は、同時または連続的であり得る。

【2026】

いくつかの実施形態では、PD-L1 及び／または PD-L2 阻害剤は、ヒト PD-L1 及び／または PD-L2 に約 100 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-L1 及び／または PD-L2 に約 90 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-L1 及び／または PD-L2 に約 80 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-L1 及び／または PD-L2 に約 70 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-L1 及び／または PD-L2 に約 60 pM 以下の KD で結合する、約 50 pM 以下の KD、ヒト PD-L1 及び／または PD-L2 に約 40 pM 以下の KD で結合する、またはヒト PD-L1 及び／または PD-L2 に約 30 pM 以下の KD で結合するものである。

10

【2027】

いくつかの実施形態では、PD-L1 及び／または PD-L2 阻害剤は、ヒト PD-L1 及び／または PD-L2 に約 7.5×10^5 1/M・s 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-L1 及び／または PD-L2 に約 8×10^5 1/M・s 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-L1 及び／または PD-L2 に約 8.5×10^5 1/M・s 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-L1 及び／または PD-L2 に約 9×10^5 1/M・s 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-L1 及び／または PD-L2 に約 9.5×10^5 1/M・s 以上の k_{assoc} で結合する、またはヒト PD-L1 及び／または PD-L2 に約 1×10^6 1/M・s 以上の k_{assoc} で結合するものである。

20

【2028】

いくつかの実施形態では、PD-L1 及び／または PD-L2 阻害剤は、ヒト PD-L1 もしくは PD-L2 に約 2×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 2.1×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 2.2×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 2.3×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 2.4×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 2.5×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 2.6×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-L1 もしくは PD-L2 に約 2.7×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒト PD-L1 もしくは PD-L2 に約 3×10^{-5} 1/s 以下の k_{dissoc} で結合するものである。

30

【2029】

いくつかの実施形態では、PD-L1 及び／または PD-L2 阻害剤は、約 10 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 9 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 8 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 7 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 6 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 5 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 4 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 3 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、約 2 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断もしくは阻害し、またはヒト PD-1 を遮断し、または約 1 nM 以下の IC50 でのヒト PD-1 へのヒト PD-L1 もしくはヒト PD-L2 の結合を遮断するものである。

40

【2030】

いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、MED14736 としても知られるデュルバルマブ（これは、AstraZeneca plc. の子会社である MedImm

50

une, LLC (Gaithersburg, Maryland) から市販されている)、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリエーションである。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、米国特許第 8,779,108 号または米国特許出願公開第 2013/0034559 号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブの臨床的有効性は、Page, et al., Rev. Med., 2014, 65, 185-202、Brahmer, et al., J. Clin. Oncol. 2014, 32, 5s (補足、要約 8021)、及び McDermott, et al., Cancer Treatment Rev., 2014, 40, 1056-64 に記載されている。デュルバルマブの調製及び特性は、米国特許第 8,779,108 号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。デュルバルマブのアミノ酸配列を表 20 に示す。デュルバルマブモノクローナル抗体は、22-96、22'-96'、23'-89'、23'-89'、135'-195'、135'-195'、148-204、148'-204'、215'-224、215'-224'、230-230'、233-233'、265-325、265'-325'、371-429、及び 371'-429' におけるジスルフィド結合、ならびに Asn-301 及び Asn-301' における N-グリコシル化部位を含む。

10

【2031】

いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、配列番号 178 によって与えられる重鎖及び配列番号 179 によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、それぞれ、配列番号 178 及び配列番号 179 に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab 断片、一本鎖可変断片 (scFv)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 178 及び配列番号 179 に示される配列と少なくとも 99% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 178 及び配列番号 179 に示される配列と少なくとも 98% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 178 及び配列番号 179 に示される配列と少なくとも 97% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 178 及び配列番号 179 に示される配列と少なくとも 96% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 178 及び配列番号 179 に示される配列と少なくとも 95% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

20

30

【2032】

いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、デュルバルマブの重鎖及び軽鎖 CDR または可変領域 (VR) を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤重鎖可変領域 (VH) は、配列番号 180 に示される配列を含み、PD-L1 阻害剤軽鎖可変領域 (VL) は、配列番号 181 に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 180 及び配列番号 181 に示される配列と少なくとも 99% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 180 及び配列番号 181 に示される配列と少なくとも 98% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 180 及び配列番号 181 に示される配列と少なくとも 97% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 180 及び配列番号 181 に示される配列と少なくとも 96% 同一である VH 及び VL 領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 180 及び配列番号 181 に示される配列と少なくとも 95% 同一である VH 及び VL 領域を含む。

40

【2033】

いくつかの実施形態では、PD-L1 阻害剤は、それぞれ、配列番号 182、配列番号

50

183、及び配列番号184に示される配列を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号185、配列番号186、及び配列番号187に示される配列を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはPD-L1上の同じエピトープに結合する。

【2034】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、ペムブロリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗PD-L1バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、1つ以上の翻訳後修飾を含む、PD-L1抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗PD-L1抗体であり、抗PD-L1抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。抗PD-L1抗体は、米国FDA及び／または欧州連合のEMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、デュルバルマブである。

【2035】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 2 0. デュルバルマブに関連する P D - L 1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 178 デュルバルマブ 重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRD NAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGEIAFDY WQGGLTLTVS 120 SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS 180 SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHKP SNTKVDKRV E PKSCDKTHTC PPCPAPEFEG 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPASI E KTI SKAKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTTP VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号 179 デュルバルマブ 軽鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN EIVLTQSPGT 60 LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFSGSGSGT 120 DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT 180 ASVVCLLNMF YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSL TLKADYEKH 240 KVYACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGE C 265
配列番号 180 デュルバルマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYWMSWVRQA PGKGLEWVAN IKQDGSEKYY 60 VDSVKGRFTI SRD NAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREG GWFGEIAFDY WQGGLTLTVS 120 S 121
配列番号 181 デュルバルマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP 60 DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSLPWTFG QGTKVEIK 108
配列番号 182 デュルバルマブ 重鎖 CDR1	RYWMS 5
配列番号 183 デュルバルマブ 重鎖 CDR2	NIKQDGSEKY YVDSVKG 17
配列番号 184 デュルバルマブ 重鎖 CDR3	EGGWFGELAF DY 12
配列番号 185 デュルバルマブ 軽鎖 CDR1	RASQRVSSSY LA 12
配列番号 186 デュルバルマブ 軽鎖 CDR2	DASSRAT 7
配列番号 187 デュルバルマブ 軽鎖 CDR3	QYGSPLPWT 9

【2 0 3 6】

いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤は、M S B 0 0 1 0 7 1 8 C (M e r c k K G a A / E M D S e r o n o から市販されている)としても知られるアベルマブ、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリエーションである。アベルマブの調製及び特性は、米国特許出願公開第 U S 2 0 1 4 / 0 3 4 1 9 1 7 A 1 号に記載されており、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アベルマブのアミノ酸配列を表 2 1 に示す。アベルマブは、2 2 - 9 6、1 4 7 - 2 0 3、2 6 4 - 3 2 4、3 7 0 - 4 2 8、2 2 ' ' - 9 6 ' '、1 4 7 ' ' - 2 0 3 ' '、2 6 4 ' ' - 3 2 4 ' '、及び 3 7 0 ' ' - 4 2 8 ' ' における重鎖内ジスルフィド結合 (C 2 3 - C 1 0 4) ; 2 2 ' - 9 0 '、1 3 8 ' - 1 9 7 '、2 2 ' ' ' - 9 0 ' ' '、及び 1 3 8 ' ' ' - 1 9 7 ' ' ' における軽鎖内ジスルフィド結合 (C 2 3 - C 1 0 4) ; 2 2 3 - 2 1 5 ' 及び 2 2 3 ' ' - 2 1 5 ' ' ' における重鎖 - 軽鎖内ジスルフィド結合 (h 5 - C L 1 2 6) ; 2 2 9 - 2 2 9 ' ' 及び 2 3 2 - 2 3 2 ' ' における重鎖 - 重鎖内ジスルフィド結合 (h 1 1、h 1 4) ; 3 0 0、3 0 0 ' ' における N - グリコシル化部位 (H C H 2 N 8 4

．４）；フコシル化複合体二分性ＣＨＯ型グリカン；ならびに４５０及び４５０'におけるＨ　Ｃ　Ｈ　Ｓ　　Ｋ　２　　Ｃ末端リジンクリッピングを有する。

【２０３７】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、配列番号１８８によって与えられる重鎖及び配列番号１８９によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Ｆａｂ断片、一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９９％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９８％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９７％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９６％同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１８８及び配列番号１８９に示される配列と少なくとも９５％同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【２０３８】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブの重鎖及び軽鎖ＣＤＲまたは可変領域（ＶＲ）を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤重鎖可変領域（ＶＨ）は、配列番号１９０に示される配列を含み、ＰＤ－Ｌ１阻害剤軽鎖可変領域（ＶＬ）は、配列番号１９１に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９９％同一であるＶ_H及びＶ_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９８％同一であるＶ_H及びＶ_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９７％同一であるＶ_H及びＶ_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９６％同一であるＶ_H及びＶ_L領域を含む。いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号１９０及び配列番号１９１に示される配列と少なくとも９５％同一であるＶ_H及びＶ_L領域を含む。

【２０３９】

いくつかの実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、それぞれ、配列番号１９２、配列番号１９３、及び配列番号１９４に示される配列を有する重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号１９５、配列番号１９６、及び配列番号１９７に示される配列を有する軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはＰＤ－Ｌ１上の同じエピトープに結合する。

【２０４０】

いくつかの複合体実施形態では、ＰＤ－Ｌ１阻害剤は、アベルマブに関して薬物規制当局によって承認された抗ＰＤ－Ｌ１バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの複合体実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも９７％の配列同一性、例えば、９７％、９８％、９９％、または１００％の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、１つ以上の翻訳後修飾を含む、ＰＤ－Ｌ１抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、１つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの１つ以上から選択される。いくつか

の実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗PD-L1抗体であり、抗PD-L1抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。抗PD-L1抗体は、米国FDA及び／または欧州連合のEMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アベルマブである。

10

【2041】

【表22】

表21. アベルマブに関連するPD-L1阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 188 アベルマブ 重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLLVTVSS 120 ASTKGPSVFEP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS 180 GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP KSCDKTHTCP PCPAPPELLGG 240 PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN 300 STYRVVSVLT VHLQDNLNKG EYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE 360 LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIEAVEWESNGQP ENNYKTTTPPV LDSDGGSFFLY SKLTVDKSRW 420 QQGNVFSCSV MEEALHNNHYT QKSLSLSPGK 450
配列番号 189 アベルマブ 軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNVSWYQQ HPGKAPKLMY YDVSNRPSGV 60 SNRFGSGKSG NTASLTISGL QAEDADYYC SSYTSSSTRV FGTGTVKTVL GQPKANPTVT 120 LFPPSSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTV AWKADGSPVK AGVETTKPSK QSNNKYAASS 180 YLSLTPEQWK SERSYSCQVT HEGSTVEKTV APTECS 216
配列番号 190 アベルマブ 可変重鎖	EVQLLESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVRQA PGKGLEWVSS IYPSGGITFY 60 ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARIK LGTVTTVDYW GQGTLLVTVSS 120
配列番号 191 アベルマブ 可変軽鎖	QSALTQPASV SGSPGQSITI SCTGTSSDVG GYNVSWYQQ HPGKAPKLMY YDVSNRPSGV 60 SNRFGSGKSG NTASLTISGL QAEDADYYC SSYTSSSTRV FGTGTVKTVL 110
配列番号 192 アベルマブ 重鎖 CDR1	SYIMM 5
配列番号 193 アベルマブ 重鎖 CDR2	SIYPSGGITF YADTVKG 17
配列番号 194 アベルマブ 重鎖 CDR3	IKLGTVTIVD Y 11
配列番号 195 アベルマブ 軽鎖 CDR1	TGTSSDVGYY NYVS 14
配列番号 196 アベルマブ 軽鎖 CDR2	DVSNRPS 7
配列番号 197 アベルマブ 軽鎖 CDR3	SSYTSSSTRV 10

20

30

40

【2042】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、MPDL3280AまたはRG7446としても知られるアテゾリズマブ (Roche Holding AG (Basel, Switzerland)) の子会社である Genentech, Inc. から TECEN

50

TRI Qとして市販されている)、またはその抗原結合断片、複合体、もしくはバリエーションである。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、米国特許第8,217,149号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、米国特許出願公開第2010/0203056A1号、同第2013/0045200A1号、同第2013/0045201A1号、同第2013/0045202A1号、または同第2014/0065135A1号に開示されている抗体であり、その開示は参照により本明細書に具体的に組み込まれる。アテゾリズマブの調製及び特性は、米国特許第8,217,149号に記載されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。アテゾリズマブのアミノ酸配列を表22に示す。アテゾリズマブは、22-96、145-201、262-322、368-426、22'-96'、145'-201'、262'-322'、及び368'-426'における重鎖内ジスルフィド結合(C23-C104); 23'-88'、134'-194'、23'''-88'''、及び134'''-194'''における軽鎖内ジスルフィド結合(C23-C104); 221-214'及び221'-214'における重鎖-軽鎖内ジスルフィド結合(h5-CL126); 227-227'及び230-230'における重鎖-重鎖内ジスルフィド結合(h11、h14); ならびに298及び298'におけるN-グリコシル化部位(HCH2N84.4>A)を有する。

【2043】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号198によって与えられる重鎖及び配列番号199によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、それぞれ、配列番号198及び配列番号199に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片(scFv)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号198及び配列番号199に示される配列と少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号198及び配列番号199に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号198及び配列番号199に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号198及び配列番号199に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号198及び配列番号199に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【2044】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、アテゾリズマブの重鎖及び軽鎖CDRまたは可変領域(VR)を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤重鎖可変領域(VH)は、配列番号200に示される配列を含み、PD-L1阻害剤軽鎖可変領域(VL)は、配列番号201に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号200及び配列番号201に示される配列と少なくとも99%同一であるVH領域及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号200及び配列番号201に示される配列と少なくとも98%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号200及び配列番号201に示される配列と少なくとも97%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号200及び配列番号201に示される配列と少なくとも96%同一であるVH及びVL領域を含む。いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号200及び配列番号201に示される配列と少なくとも95%同一であるVH及びVL領域を含む。

【2045】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、それぞれ、配列番号202、配列番号203、及び配列番号204に示される配列を有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号205、配列番号206、及び配列番号207に示される配列を有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／またはPD-L1上の同じエピトープに結合する。

【2046】

いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、アテゾリズマブに関して薬物規制当局によって承認された抗PD-L1バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも97%の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または100%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、1つ以上の翻訳後修飾を含む、PD-L1抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、1つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの1つ以上から選択される。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗PD-L1抗体であり、抗PD-L1抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。抗PD-L1抗体は、米国FDA及び／または欧州連合のEMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、アテゾリズマブである。

【2047】

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 2 2. アテゾリズマブに関連する P D - L 1 阻害剤のアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)						
配列番号 198 アテゾリズマブ 重鎖	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	DSWIHWVRQA	PGKGLEWVAV	ISPYGGSTYY	60
	ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCARRH	WPGGFDYWGQ	GTLTVVSSAS	120
	TKGPSVFPLA	PSSKSTSGGT	AALGCLVKDY	FPEPVTVSWN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGL	180
	YSLSSVVTVP	SSSLGTQTYI	CNVNHKPSNT	KVDKKVEPKS	CDKTHTCPPC	PAPELLGGPS	240
	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQYAST	300
	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSREEMT	360
	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTTTPVLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	420
	GNVFSCSVMH	EALHNEYTQK	SLSLSPGK				448
配列番号 199 アテゾリズマブ 軽鎖	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQDVS	TAVAWYQQKP	GKAPKLLIYS	ASFLYSGVPS	60
	RFSGSGSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	YLYHPATFGQ	GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP	120
	SDEQLKSGTA	SVVCLLNIFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSLT	180
	LSKADYEKKK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC			214
配列番号 200 アテゾリズマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG	LVQPGGSLRL	SCAASGFTFS	DSWIHWVRQA	PGKGLEWVAV	ISPYGGSTYY	60
	ADSVKGRFTI	SADTSKNTAY	LQMNSLRAED	TAVYYCARRH	WPGGFDYWGQ	GTLTVTSA	118
配列番号 201 アテゾリズマブ 可変軽鎖	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQDVS	TAVAWYQQKP	GKAPKLLIYS	ASFLYSGVPS	60
	RFSGSGSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	YLYHPATFGQ	GTKVEIKR		108
配列番号 202 アテゾリズマブ 重鎖 CDR1	GFTFSDSWIH						10
配列番号 203 アテゾリズマブ 重鎖 CDR2	AWISPYGGST YYADSVKG						18
配列番号 204 アテゾリズマブ 重鎖 CDR3	RHWPGGFDY						9
配列番号 205 アテゾリズマブ 軽鎖 CDR1	RASQDVSTAV A						11
配列番号 206 アテゾリズマブ 軽鎖 CDR2	SASFLYS						7
配列番号 207 アテゾリズマブ 軽鎖 CDR3	QQYLYHPAT						9

【2048】

いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤は、米国特許出願公開第 U S 2 0 1 4 / 0 3 4 1 9 1 7 A 1 号に記載されている抗体を含み、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。他の実施形態では、P D - L 1 への結合についてこれらの抗体のうちのいずれかと競合する抗体も含まれる。いくつかの実施形態では、抗 P D - L 1 抗体は、B M S - 9 3 5 5 5 9 としても知られる M D X - 1 1 0 5 であり、これは米国特許第 7, 9 4 3, 7 4 3 号に開示されており、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗 P D - L 1 抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第 7, 9 4 3, 7 4 3 号に開示されている抗 P D - L 1 抗体から選択される。

【2049】

いくつかの実施形態では、P D - L 1 阻害剤は、I N V I V O M A B 抗 m - P D - L 1 クローン 1 0 F . 9 G 2 (カタログ番号 B E 0 1 0 1、B i o X C e l l , I n c . , W e s t L e b a n o n , N H , U S A) などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗 P D - L 1 抗体は、A F F Y M E T R I X E B I O S C I E N C E (M I H 1) などの市販のモノクローナル抗体である。いくつかの市販の抗 P D

ー L 1 抗体が、当業者に知られている。

【2050】

いくつかの実施形態では、PD-L2阻害剤は、BIOLEGEND 24F.10C12マウスIgG2a、κアイソタイプ（カタログ番号329602 Biolegend, Inc., San Diego, CA）、SIGMA抗PD-L2抗体（カタログ番号SAB3500395, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO）、または当業者に知られている他の市販のPD-L2抗体などの市販のモノクローナル抗体である。

【2051】

C. CTLA-4阻害剤との併用

いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるTIL療法は、治療的TIL集合単独による治療を含んでもよく、またはTIL及び1つ以上のCTLA-4阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。

【2052】

細胞傷害性Tリンパ球抗原4（CTLA-4）は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、ヘルパーT細胞の表面で発現する。CTLA-4は、CD28依存性T細胞活性化の負の制御因子であり、適応免疫応答のチェックポイントとして機能する。T細胞共刺激タンパク質CD28と同様に、CTLA-4結合抗原は、細胞上でCD80及びCD86を提示する。CTLA-4は抑制シグナルをT細胞に伝達し、CD28は刺激シグナルを伝達する。ヒトCTLA-4に対するヒト抗体は、ウイルス感染及び細菌感染を治療または予防すること、ならびにがんを治療するためのものなど、多くの疾患状態における免疫刺激調節因子として記載されている（WO01/14424及びWO00/37504）。イピリムマブ（MDX-010）及びトレメリムマブ（CP-675, 206）を含むが、これらに限定されない、様々な種類の固形腫瘍の治療のためのいくつかの完全ヒト抗ヒトCTLA-4モノクローナル抗体（mAb）が、臨床試験で研究されている。

【2053】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、当技術分野で知られている任意のCTLA-4阻害剤またはCTLA-4遮断剤であり得る。特に、次の段落でより詳細に記載されるCTLA-4阻害剤または遮断剤のうちの1つである。「阻害剤」、「アンタゴニスト」、及び「遮断剤」という用語は、本明細書では、CTLA-4阻害剤に関して互換的に使用される。誤解を避けるために、抗体であるCTLA-4阻害剤への本明細書の言及は、化合物またはその抗原結合断片、バリエーション、複合体、もしくはバイオシミラーを指し得る。誤解を避けるために、CTLA-4阻害剤への本明細書の言及はまた、小分子化合物またはその薬学的に許容される塩、エステル、溶媒和物、水和物、共結晶、もしくはプロドラッグを指し得る。

【2054】

本発明の方法で使用するための好適なCTLA-4阻害剤には、抗CTLA-4抗体、ヒト抗CTLA-4抗体、マウス抗CTLA-4抗体、哺乳動物抗CTLA-4抗体、ヒト化抗CTLA-4抗体、モノクローナル抗CTLA-4抗体、ポリクローナル抗CTLA-4抗体、キメラ抗CTLA-4抗体、MDX-010（イピリムマブ）、トレメリムマブ、抗CD28抗体、抗CTLA-4アドネクチン、抗CTLA-4ドメイン抗体、一本鎖抗CTLA-4断片、重鎖抗CTLA-4断片、軽鎖抗CTLA-4断片、共刺激経路を刺激するCTLA-4の阻害剤、PCT公開第WO2001/014424号に開示される抗体、PCT公開第WO2004/035607号に開示される抗体、米国特許出願公開第2005/0201994号に開示される抗体、ならびに付与された欧州特許第EP 1212422 B1号に開示された抗体が含まれるが、これらに限定されず、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。さらなるCTLA-4抗体は、米国特許第5,811,097号、同第5,855,887号、同第6,051,227号、及び同第6,984,720号、PCT公開第WO01/14424号及び同第WO00/3

10

20

30

40

50

7504号、ならびに米国公開第2002/0039581号及び同第2002/086014号に記載されており、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。本発明の方法で 사용할 ことができる他の抗CTLA-4抗体には、例えば、WO98/42752、米国特許第6,682,736号及び同第6,207,156号、Hurwitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17):10067-10071(1998)、Camacho et al., J. Clin. Oncology, 22(145):Abstract No. 2505(2004)(抗体CP-675206)、Mokyr et al., Cancer Res., 58:5301-5304(1998)、ならびに米国特許第5,977,318号、同第6,682,736号、同第7,109,003号、及び同第7,132,281号に開示されるものが含まれ、これらの各々の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【2055】

さらなるCTLA-4阻害剤には、CD28抗原がその同族リガンドと結合する能力を妨害すること、CTLA-4がその同族リガンドと結合する能力を阻害すること、共刺激経路を介してT細胞応答を増強すること、B7がCD28及び／またはCTLA-4と結合する能力を破壊すること、B7が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、CD80がCD28及び／またはCTLA-4と結合する能力を破壊すること、CD80が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、CD86がCD28及び／またはCTLA-4と結合する能力を破壊すること、CD86が共刺激経路を活性化する能力を破壊すること、及び共刺激経路を一般に活性化されることから破壊することが可能である任意の阻害剤が含まれるが、これらに限定されない。これには、共刺激経路の他のメンバーのなかでもCD28、CD80、CD86、CTLA-4の小分子阻害剤、共刺激経路の他のメンバーのなかでもCD28、CD80、CD86、CTLA-4に対する抗体、共刺激経路の他のメンバーのなかでもCD28、CD80、CD86、CTLA-4に指向するアンチセンス分子、共刺激経路の他のメンバーのなかでもCD28、CD80、CD86、CTLA-4に指向するアドネクチン、他のCTLA-4阻害剤のなかでも共刺激経路の他のメンバーのなかでもCD28、CD80、CD86、CTLA-4のRNAi阻害剤(一本鎖及び二本鎖の両方)が必ず含まれる。

20

【2056】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、約 10^{-6} M以下、約 10^{-7} M以下、約 10^{-8} M以下、約 10^{-9} M以下、約 10^{-10} M以下、約 10^{-11} M以下、約 10^{-12} M以下、例えば、約 10^{-13} M~ 10^{-16} Mの間、またはエンドポイントとして前述の値のうちの任意の2つを有する任意の範囲内で、CTLA-4と結合する。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブのKdの10倍以下のKdでCTLA-4と結合する。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、同じアッセイを使用して比較した場合、イピリムマブとほぼ同じかまたはそれ以下(例えば、最大10倍低い、または最大100倍低い)のKdでCTLA-4と結合する。いくつかの実施形態では、CD80またはCD86とのCTLA-4結合のCTLA-4阻害剤による阻害のIC50値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれCD80またはCD86とのCTLA-4結合のイピリムマブ媒介阻害より10倍以下で大きい。いくつかの実施形態では、CD80またはCD86とのCTLA-4結合のCTLA-4阻害剤による阻害のIC50値は、同じアッセイを使用して比較した場合、それぞれCD80またはCD86とのCTLA-4結合のイピリムマブ媒介性阻害とほぼ同じかまたはそれ以下(例えば、最大10倍低い、または最大100倍低い)である。

30

40

【2057】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、好適な対照と比較して、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%、例えば、50%~75%、75%~90%、または90%~100%の間でCTLA-4の発現を阻害する、及び／または生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用

50

される。いくつかの実施形態では、CTLA-4 経路阻害剤は、好適な対照と比較して、少なくとも 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または 100%、例えば、50%~75%、75%~90%、または 90%~100% の間で CTLA-4 の CD80、CD86、またはその両方との結合を減少させることにより、CTLA-4 の生物学的活性を減少させるのに十分な量で使用される。対象となる薬剤の効果を評価または定量化する状況下における好適な対照は、典型的には、対象となる薬剤、例えば、CTLA-4 経路阻害剤に曝露されていないか、または治療されていない（または僅かな量に曝露されているか、または治療されている）同等の生物学的システム（例えば、細胞または対象）である。いくつかの実施形態では、生物学的システムは、それ自体の対照として機能し得る（例えば、生物学的システムは、薬剤への曝露または治療の前に評価され得、曝露または治療が開始または終了した後の状態と比較され得る。いくつかの実施形態では、歴史的対照が使用され得る。

10

【2058】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、イピリムマブ（Bristol-Myers Squibb Co. から Yervoy として市販されている）、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリエーションである。当該技術分野で知られているように、イピリムマブは、機能的ヒトレパートリーを生成するための重鎖及び軽鎖をコードするヒト遺伝子を有するトランスジェニックマウスに由来する完全ヒト IgG 1κ 抗体である、抗 CTLA-4 抗体を指す。イピリムマブは、その CAS 登録番号 477202-00-9 及び PCT 公開第 WO 01/14424 号で参照することもでき、その全体がすべての目的で参照により本明細書に組み込まれる。それは抗体 10DI として開示されている。具体的には、イピリムマブは、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域（配列番号 211 を含む軽鎖可変領域を有し、配列番号 210 を含む重鎖可変領域を有する）を含む。イピリムマブの薬学的組成物は、イピリムマブ及び 1 つ以上の希釈剤、ビヒクル、または賦形剤を含有するすべての薬学的に許容される組成物を含む。イピリムマブを含有する薬学的組成物の例は、国際特許出願公開第 WO 2007/67959 号に記載されている。イピリムマブは、静脈内（IV）投与され得る。

20

【2059】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、配列番号 208 によって与えられる重鎖及び配列番号 209 によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、それぞれ、配列番号 208 及び配列番号 209 に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab 断片、一本鎖可変断片（scFv）、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 208 及び配列番号 209 に示される配列と少なくとも 99% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 208 及び配列番号 209 に示される配列と少なくとも 98% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 208 及び配列番号 209 に示される配列と少なくとも 97% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 208 及び配列番号 209 に示される配列と少なくとも 96% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 208 及び配列番号 209 に示される配列と少なくとも 95% 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

30

40

【2060】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、イピリムマブの重鎖及び軽鎖の CD R または可変領域（VR）を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤重鎖可変領域（VH）は、配列番号 210 に示される配列を含み、CTLA-4 阻害剤軽鎖可変領域（VL）は、配列番号 211 に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 210 及び配列番号 211 に示される配列と少なくとも 99% 同一である VH 領域及び VL 領域

50

を含む。いくつかの実施形態では、CTL A-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 210 及び配列番号 211 に示される配列と少なくとも 98% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、CTL A-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 210 及び配列番号 211 に示される配列と少なくとも 97% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、CTL A-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 210 及び配列番号 211 に示される配列と少なくとも 96% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。いくつかの実施形態では、CTL A-4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 210 及び配列番号 211 に示される配列と少なくとも 95% 同一である V_H 領域及び V_L 領域を含む。

【2061】

いくつかの実施形態では、CTL A-4 阻害剤は、それぞれ、配列番号 212、配列番号 213、及び配列番号 214 に示される配列を有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 215、配列番号 216、及び配列番号 217 に示される配列を有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／または CTL A-4 上の同じエピトープに結合する。

【2062】

いくつかの実施形態では、CTL A-4 阻害剤は、イピリムマブに関して薬物規制当局によって承認された CTL A-4 バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも 97% の配列同一性、例えば、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、1 つ以上の翻訳後修飾を含む、抗 CTL A-4 抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。イピリムマブのアミノ酸配列を表 23 に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗 CTL A-4 抗体であり、抗 CTL A-4 抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。抗 CTL A-4 抗体は、米国 FDA 及び／または欧州連合の EMA などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、イピリムマブである。

【2063】

10

20

30

40

50

【表 2 4】

表 2 3. イピリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)							
配列番号 208 イピリムマブ 重鎖	QVQLVESGGG	VVQPGRSLRL	SCAASGFTFS	SYTMHWVRQA	PGKGLEWVTF	ISYDGNKYY	60	
	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAIYYCARTG	WLGPFDDYWGQ	GTLVTVSSAS	120	
	TKGPSVFPLA	PSSKSTSGGT	AALGCLVKDY	FPEPVTWSN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGL	180	
	YSLSSVTVTP	SSSLGTQTYI	CNVNEKPSNT	KVDKRVEPKS	CDKTH		225	
配列番号 209 イピリムマブ 軽鎖	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVG	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY	GAFSRATGIP	60	
	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPWTFG	QGTKVEIKRT	VAAPSVFIFP	120	
	PSDEQLKSGT	ASVVCLLNFF	YPREAKVQWK	VDNALQSGNS	QESVTEQDSK	DSTYSLSTL	180	
	TLKADYEKH	KVYACEVTHQ	GLSSPVTKSF	NRGEC			215	
配列番号 210 イピリムマブ 可変重鎖	QVQLVESGGG	VVQPGRSLRL	SCAASGFTFS	SYTMHWVRQA	PGKGLEWVTF	ISYDGNKYY	60	
	ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAIYYCARTG	WLGPFDDYWGQ	GTLVTVSS	118	
配列番号 211 イピリムマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVG	SSYLAWYQQK	PGQAPRLLIY	GAFSRATGIP	60	
	DRFSGSGSGT	DFTLTISRLE	PEDFAVYYCQ	QYGSSPWTFG	QGTKVEIK		108	
配列番号 212 イピリムマブ 重鎖 CDR1	GFTFSSYT						8	
配列番号 213 イピリムマブ 重鎖 CDR2	TFISYDGNK						10	
配列番号 214 イピリムマブ 重鎖 CDR3	ARTGWLGPFD Y						11	
配列番号 215 イピリムマブ 軽鎖 CDR1	QSVGSSY						7	
配列番号 216 イピリムマブ 軽鎖 CDR2	GAF						3	
配列番号 217 イピリムマブ 軽鎖 CDR3	QQYGSSPWT						9	

10

20

30

【2064】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約 0.5 mg/kg ~ 約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 2 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 3 mg/kg、約 3.5 mg/kg、約 4 mg/kg、約 4.5 mg/kg、約 5 mg/kg、約 5.5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 6.5 mg/kg、約 7 mg/kg、約 7.5 mg/kg、約 8 mg/kg、約 8.5 mg/kg、約 9 mg/kg、約 9.5 mg/kg、または約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前 1、2、3、4、または 5 週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前 1、2、または 3 週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

40

【2065】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約 200 mg ~ 約 500 mg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、約 200 mg、約 220 mg、約 240 mg、約 260 mg、約 2

50

80 mg、約300 mg、約320 mg、約340 mg、約360 mg、約380 mg、約400 mg、約420 mg、約440 mg、約460 mg、約480 mg、または約500 mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【2066】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、イピリムマブまたはそのバイオシミラーであり、イピリムマブは、2週間毎、3週間毎、4週間毎、5週間毎、または6週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

10

【2067】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、切除不能または転移性黒色腫を治療するために、3週間毎に約mg/kgで最大4用量投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

20

【2068】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、黒色腫のアジュバント治療のために、約10 mg/kgで3週間毎に4用量、続いて10 mg/kgで12週間毎に最大3年間投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【2069】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約1 mg/kgで投与され、直後に同じ日にニボルマブ3 mg/kgを3週間毎に4用量投与される。いくつかの実施形態では、4用量の組み合わせを完了した後、ニボルマブは、進行性腎細胞癌及び／または腎細胞癌の標準的な投薬レジメンに従って単剤として投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

30

【2070】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌を治療するために、約1 mg/kgで静脈内に30分間にわたって投与され、直後に同じ日にイピリムマブ3 mg/kgを静脈内に30分間にわたって3週間毎に4用量投与される。いくつかの実施形態では、4用量の組み合わせを完了した後、高頻度マイクロサテライト不安定性（MSI-H）またはミスマッチ修復欠損（dMMR）転移性結腸直腸癌の標準的な投薬レジメンに従って推奨されるように単剤としてニボルマブを投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象ま

40

50

たは患者から腫瘍試料を取得する前に) 開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 開始される。

【2071】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、肝細胞癌を治療するために、約3 mg / kgで静脈内に30分間にわたって投与され、直後に同じ日にニボルマブ1 mg / kgを静脈内に30分間にわたって3週間毎に4用量投与される。いくつかの実施形態では、4用量の組み合わせを完了した後、肝細胞癌のための標準的な投薬レジメンに従って単剤としてニボルマブを投与する。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 開始される。

10

【2072】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、6週間毎に約1 mg / kgで、2週間毎に3 mg / kgのニボルマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、転移性非小細胞肺癌を治療するために、6週間毎に約1 mg / kgで、3週間毎に360 mgのニボルマブ及び2サイクルのプラチナダブレット化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 開始される。

20

【2073】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、悪性胸膜中皮腫を治療するために、6週間毎に約1 mg / kgで、3週間毎に360 mgのニボルマブとともに投与される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 開始される。いくつかの実施形態では、イピリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で(すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に) 開始される。

30

【2074】

トレメリムマブ(CP-675, 206としても知られる)は、完全ヒトIgG2モノクローナル抗体であり、CAS番号745013-59-6を有する。トレメリムマブは、米国特許第6, 682, 736号(参照により本明細書に組み込まれる)において抗体11.2.1として開示されている。トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号218及び219に示す。トレメリムマブは、黒色腫及び乳癌を含む種々の腫瘍の治療のための臨床試験において研究されており、トレメリムマブは、0.01及び15 mg / kgの用量範囲で4週間または12週間毎に単回用量または複数回用量として静脈内投与される。本発明によって提供されるレジメンでは、トレメリムマブは、局所的に、特に皮内または皮下に投与される。皮内または皮下投与されるトレメリムマブの有効量は、典型的には、人当たり5~200 mg / 用量の範囲である。いくつかの実施形態では、トレメリムマブの有効量は、用量当たり人当たり10~150 mg / 用量の範囲である。いくつかの特定の実施形態では、トレメリムマブの有効量は、人当たり約10、25、37.5、40、50、75、100、125、150、175、または200 mg / 用量である。

40

【2075】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号218によって与えられる重鎖及び配列番号219によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CT

50

L A - 4 阻害剤は、それぞれ、配列番号 2 1 8 及び配列番号 2 1 9 に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、F a b 断片、一本鎖可変断片 (s c F v)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 1 8 及び配列番号 2 1 9 に示される配列と少なくとも 9 9 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 1 8 及び配列番号 2 1 9 に示される配列と少なくとも 9 8 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 1 8 及び配列番号 2 1 9 に示される配列と少なくとも 9 7 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 1 8 及び配列番号 2 1 9 に示される配列と少なくとも 9 6 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 1 8 及び配列番号 2 1 9 に示される配列と少なくとも 9 5 % 同一である重鎖及び軽鎖を含む。

10

【 2 0 7 6 】

いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、トレメリムマブの重鎖及び軽鎖の C D R または可変領域 (V R) を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤重鎖可変領域 (V _H) は、配列番号 2 2 0 に示される配列を含み、C T L A - 4 阻害剤軽鎖可変領域 (V _L) は、配列番号 2 2 1 に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 2 0 及び配列番号 2 2 1 に示される配列と少なくとも 9 9 % 同一である V _H 領域及び V _L 領域を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 2 0 及び配列番号 2 2 1 に示される配列と少なくとも 9 8 % 同一である V _H 領域及び V _L 領域を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 2 0 及び配列番号 2 2 1 に示される配列と少なくとも 9 7 % 同一である V _H 領域及び V _L 領域を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 2 0 及び配列番号 2 2 1 に示される配列と少なくとも 9 6 % 同一である V _H 領域及び V _L 領域を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 2 0 及び配列番号 2 2 1 に示される配列と少なくとも 9 5 % 同一である V _H 領域及び V _L 領域を含む。

20

【 2 0 7 7 】

いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、それぞれ、配列番号 2 2 2、配列番号 2 2 3、及び配列番号 2 2 4 に示される配列を有する重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 2 2 5、配列番号 2 2 6、及び配列番号 2 2 7 に示される配列を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／または C T L A - 4 上の同じエピトープに結合する。

30

【 2 0 7 8 】

いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、トレメリムマブに関して薬物規制当局によって承認された抗 C T L A - 4 バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 7 % の配列同一性、例えば、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、1 つ以上の翻訳後修飾を含む、抗 C T L A - 4 抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。トレメリムマブのアミノ酸配列を表 2 4 に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗 C T L A - 4 抗体であり、抗 C T L A - 4 抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。抗 C T L A - 4 抗体は、米国 F D A

40

50

及び／または欧州連合のEMAなどの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、トレメリムマブである。

【2079】

【表25】

表24. トレメリムマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)
配列番号 218 トレメリムマブ 重鎖	QVQLVESGGG VVQPGRSRLR SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWDGSKNYK 60 ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARDP RGATLYYYYY GMDVWGQGT 120 VTVSSASTKG PSVFPLAPCS RSTSESTAAL GCLVKDYFPE PVTVSWNSGA LTSGVHTFPA 180 VLQSSGLYSL SSVVTVPSN FGTQTYTCNV DHKPSNTKVD KTVRKCCVE CPPCPAPPVA 240 GPSVFLFPPK PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQF 300 NSTFRVSVL TVVHQDWLNG KEYKCKVSNK GLPAPIEKTI SKTKGQPREP QVYTLPPSRE 360 EMTKNQVSLT CLVKGFPSPD IAEWESNGQ PENNYKTPP MLDSDGSFFL YSKLTVDKSR 420 WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG K 451
配列番号 219 トレメリムマブ 軽鎖	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSLN SYLDWYQOKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS 60 RFGSGSGGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YYSTPFTFGP GTKVEIKRTV AAPSVFIIPP 120 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSSTLT 180 LSKADYEKHK VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK 214
配列番号 220 トレメリムマブ 可変重鎖	GVVQPGRSRLR LSCAASGFTF SSGMHWVRQ APGKGLEWVA VIWDGSKNY YADSVKGRFT 60 ISRDNSKNTL YLQMNSLRAE DTAVYYCARD PRGATLYYYY YGMDVWGQGT TVTVSSASTK 120 GPSVFPLAPC SRSTSESTA LGCLVKDYFP EPVTVSWNSG ALTSGVH 167
配列番号 221 トレメリムマブ 可変軽鎖	PSSLSASVGD RVTITCRASQ SINSYLDWYQ QKPGKAPKLL IYAASSLQSG VPSRFGSGSGS 60 GTDFTLTISS LQPEDFATYY CQQYYSTPFT FGPGTKVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS 120 GTASVVCLLN NFYPREAKV 139
配列番号 222 トレメリムマブ 重鎖 CDR1	GFTFSSYGMH 10
配列番号 223 トレメリムマブ 重鎖 CDR2	VIWDGSKNY YADSV 15
配列番号 224 トレメリムマブ 重鎖 CDR3	DPRGATLYYY YGMDV 16
配列番号 225 トレメリムマブ 軽鎖 CDR1	RASQSINSYL D 11
配列番号 226 トレメリムマブ 軽鎖 CDR2	AASSLQS 7
配列番号 227 トレメリムマブ 軽鎖 CDR3	QYYSTPFT 9

【2080】

いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約 0.5 mg/kg ~ 約 10 mg/kg の用量で投与される。いくつかの実施形態では、CTLA-4 阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約 0.5 mg/kg、約 1 mg/kg、約 1.5 mg/kg、約 2 mg/kg、約 2.5 mg/kg、約 3 mg/kg、約 3.5 mg/kg、約 4 mg/kg、約 4.5 mg/kg、約 5 mg/kg、約 5.5 mg/kg、約 6 mg/kg、約 6.5 mg/kg、約 7 mg/kg、約 7.5 mg/kg、約 8 mg/kg

kg、約8.5mg/kg、約9mg/kg、約9.5mg/kg、または約10mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【2081】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約200mg～約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、約200mg、約220mg、約240mg、約260mg、約280mg、約300mg、約320mg、約340mg、約360mg、約380mg、約400mg、約420mg、約440mg、約460mg、約480mg、または約500mgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【2082】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、トレメリムマブまたはそのバイオシミラーであり、トレメリムマブは、2週間毎、3週間毎、4週間毎、5週間毎、または6週間毎に投与される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。いくつかの実施形態では、トレメリムマブ投与は、切除前1、2、または3週間で（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）開始される。

【2083】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、Agenusからのザリフレリマブ、またはそのバイオシミラー、抗原結合断片、複合体、もしくはバリエーションである。ザリフレリマブは、完全ヒトモノクローナル抗体である。ザリフレリマブには、Chemical Abstracts Service (CAS) 登録番号2148321-69-9が割り当てられており、AGEN1884としても知られている。ザリフレリマブの調製及び特性は、米国特許第10,144,779号及び米国特許出願公開第US2020/0024350 A1号に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【2084】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号228によって与えられる重鎖及び配列番号229によって与えられる軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、それぞれ、配列番号228及び配列番号229に示される配列を有する重鎖及び軽鎖、またはそれらの抗原結合断片、Fab断片、一本鎖可変断片(scFv)、バリエーション、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号228及び配列番号229に示される配列と少なくとも99%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号228及び配列番号229に示される配列と少なくとも98%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号228及び配列番号229に示される配列と少なくとも97%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号228及び配列番号229に示される配列と少なくとも96%同一である重鎖及び軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号228及び配列番号229に示される配列と少なくとも95%同一である重鎖及び軽鎖を含む。

【2085】

いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、ザリフレリマブの重鎖及び軽鎖の C D R または可変領域 (V R) を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤重鎖可変領域 (V H) は、配列番号 2 3 0 に示される配列を含み、C T L A - 4 阻害剤軽鎖可変領域 (V L) は、配列番号 2 3 1 に示される配列、またはその保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 3 0 及び配列番号 2 3 1 に示される配列と少なくとも 9 9 % 同一である V H 領域及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 3 0 及び配列番号 2 3 1 に示される配列と少なくとも 9 8 % 同一である V H 領域及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 3 0 及び配列番号 2 3 1 に示される配列と少なくとも 9 7 % 同一である V H 領域及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 3 0 及び配列番号 2 3 1 に示される配列と少なくとも 9 6 % 同一である V H 領域及び V L 領域を含む。いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 2 3 0 及び配列番号 2 3 1 に示される配列と少なくとも 9 5 % 同一である V H 領域及び V L 領域を含む。

10

20

30

40

50

【2086】

いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、それぞれ、配列番号 2 3 1、配列番号 2 3 3、及び配列番号 2 3 4 に示される配列を有する重鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、それぞれ、配列番号 2 3 5、配列番号 2 3 6、及び配列番号 2 3 7 に示される配列を有する軽鎖 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 ドメイン、またはそれらの保存的アミノ酸置換と、を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、前述の抗体のうちのいずれかと結合するために競合し、及び／または C T L A - 4 上の同じエピトープに結合する。

【2087】

いくつかの実施形態では、C T L A - 4 阻害剤は、ザリフレリマブに関して薬物規制当局によって承認された C T L A - 4 バイオシミラーモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、参照医薬品または参照バイオ製品のアミノ酸配列に対して少なくとも 9 7 % の配列同一性、例えば、9 7 %、9 8 %、9 9 %、または 1 0 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、参照医薬品または参照バイオ製品と比較して、1 つ以上の翻訳後修飾を含む、抗 C T L A - 4 抗体を含み、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、1 つ以上の翻訳後修飾は、グリコシル化、酸化、脱アミド化、及び切断のうちの 1 つ以上から選択される。ザリフレリマブのアミノ酸配列を表 2 5 に示す。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、認可された、または認可のために提出された抗 C T L A - 4 抗体であり、抗 C T L A - 4 抗体は、参照医薬品または参照バイオ製品の製剤とは異なる製剤で提供され、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。抗 C T L A - 4 抗体は、米国 F D A 及び／または欧州連合の E M A などの薬物規制当局によって認可され得る。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。いくつかの実施形態では、バイオシミラーは、1 つ以上の賦形剤をさらに含む組成物として提供され、1 つ以上の賦形剤は、参照医薬品または参照バイオ製品に含まれる賦形剤と同じまたは異なるものであり、参照医薬品または参照バイオ製品は、ザリフレリマブである。

【2088】

【表 2 6】

表 2 5. ギリフレリマブのアミノ酸配列。

識別子	配列(一文字アミノ酸記号)						
配列番号 228 ギリフレリマブ 重鎖	EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYSMNWVRQA	PGKGLEWVSS	ISSSSSYIYY	60
	ADSVKGRFTI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVG	LMGPFDIWGQ	GTMVTVSSAS	120
	TKGPSVFPLA	PSSKSTSGGT	AALGCLVKDY	FPEPVTWSN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGL	180
	YSLSSVVTVP	SSSLGTQTYI	CNVNHKPSNT	KVDKRVPEKS	CDKTHTCPPC	PAPELLGGPS	240
	VFLFPPKPKD	TLMISRTPEV	TCVVDVDSHE	DPEVKENWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQYNST	300
	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY	TLPPSREEMT	360
	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGOPEN	NYKTTTPVLD	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	420
	GNVFSCSVMH	EALHNNHYTQK	SLSLSPGK				448
配列番号 229 ギリフレリマブ 軽鎖	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	RYLGWYQQKP	GQAPRLLIYG	ASTRATGIPD	60
	RFSGSGSGTD	FTLTITRLEP	EDFAVYQCQ	YGSSPWTFGQ	GTKVEIKRTV	AAPSVFIFPP	120
	SDEQLKSGTA	SVVCLLNIFY	PREAKVQWKV	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYSLSSLTLT	180
	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG	LSSPVTKSFN	RGEC			214
配列番号 230 ギリフレリマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG	LVKPGGSLRL	SCAASGFTFS	SYSMNWVRQA	PGKGLEWVSS	ISSSSSYIYY	60
	ADSVKGRFTI	SRDNAKNSLY	LQMNSLRAED	TAVYYCARVG	LMGPFDIWGQ	GTMVTVSS	118
配列番号 231 ギリフレリマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPGT	LSLSPGERAT	LSCRASQSVS	RYLGWYQQKP	GQAPRLLIYG	ASTRATGIPD	60
	RFSGSGSGTD	FTLTITRLEP	EDFAVYQCQ	YGSSPWTFGQ	GTKVEIK		107
配列番号 232 ギリフレリマブ 重鎖 CDR1	GFTFSSYS						8
配列番号 233 ギリフレリマブ 重鎖 CDR2	ISSSSSYI						8
配列番号 234 ギリフレリマブ 重鎖 CDR3	ARVGLMGPFDI						11
配列番号 235 ギリフレリマブ 軽鎖 CDR1	QSVSRY						6
配列番号 236 ギリフレリマブ 軽鎖 CDR	GAS						3
配列番号 237 ギリフレリマブ 軽鎖 CDR3	QQYGSSPWT						9

【2089】

さらなる抗CTLA-4抗体の例には、AGEN1181、BMS-986218、BCD-145、ONC-392、CS1002、REGN4659、及びADG116が含まれるが、これらに限定されず、これらは当業者に即知である。

【2090】

いくつかの実施形態では、抗CTLA-4抗体は、以下の特許公開のうちのいずれかに開示される抗CTLA-4抗体である：US2019/0048096A1、US2020/0223907、US2019/0201334、US2019/0201334、US2005/0201994、EP1212422B1、WO2018/204760、WO2018/204760、WO2001/014424、WO2004/035607、WO2003/086459、WO2012/120125、WO2000/037504、WO2009/100140、WO2006/09649、WO2005/092380、WO2007/123737、WO2006/029219、WO2010/0979597、WO2006/12168、及びWO1997/020574（これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる）。さらなるCTLA-4抗体は、米国特

許第5,811,097号、同第5,855,887号、同第6,051,227号、及び同第6,984,720号、PCT公開第WO01/14424号及び同第WO00/37504号、ならびに米国公開第2002/0039581号及び同第2002/086014号、及び／または米国特許第5,977,318号、同第6,682,736号、同第7,109,003号、及び同第7,132,281号に記載されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、抗CTLA-4抗体は、例えば、WO98/42752、米国特許第6,682,736号及び同第6,207,156号、Hurwitz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998 (95): 10067-10071 (1998)、Camacho et al., J. Clin. Oncol., 2004, 22, 145 (Abstr act No. 2505 (2004) (抗体CP-675206)、またはMokyr, et al., Cancer Res., 1998, 58, 5301-5304 (1998)に開示されており、これらの各々は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【2091】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、WO1996/040915（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されるCTLA-4リガンドである。

【2092】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、CTLA-4発現の核酸阻害剤である。例えば、抗CTLA-4RNAi分子は、PCT公開第WO1999/032619及びWO2001/029058、米国公開第2003/0051263号、同第2003/0055020号、同第2003/0056235号、同第2004/265839号、同第2005/0100913号、同第2006/0024798号、同第2008/0050342号、同第2008/0081373号、同第2008/0248576号、同第2008/055443号、及び／または米国特許第6,506,559号、同第7,282,564号、同第7,538,095号、及び同第7,560,438号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された分子の形態を取り得る。いくつかの事例では、抗CTLA-4RNAi分子は、欧州特許第EP1309726号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された二本鎖RNAi分子の形態を取る。いくつかの事例では、抗CTLA-4RNAi分子は、米国特許第7,056,704号及び同第7,078,196号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載された二本鎖RNAi分子の形態を取る。いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、国際特許出願公開第WO2004/081021（参照により本明細書に組み込まれる）に記載されたアプタマーである。

20

30

【2093】

他の実施形態では、本発明の抗CTLA-4RNAi分子は、米国特許第5,898,031号、同第6,107,094号、同第7,432,249号、及び同第7,432,250号、ならびに欧州出願第EP0928290号（参照により本明細書に組み込まれる）において記載されたRNA分子である。

【2094】

D. PD-1、PD-L1、及びCTLA-4阻害剤との併用

40

いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるTIL療法は、治療的TIL集合単独による治療を含んでもよく、またはTILならびに1つ以上のPD-1及び／またはPD-L1及び／またはCTLA-4阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。

【2095】

いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるTIL療法は、1つ以上のPD-1阻害剤と組み合わせた治療的TIL集合による治療を含む。いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるTIL療法は、1つ以上のPD-L1阻害剤と組み合わせた治療的TIL集合による治療を含む。いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるTIL療法は、1つ以上のCTLA-4阻害剤と組み合わせた治療的TIL集合による治療を含む。いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるTIL

50

療法は、1つ以上のPD-1阻害剤及び1つ以上のPD-L1阻害剤と組み合わせた治療的TIL集合による治療を含む。いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるTIL療法は、1つ以上のPD-L1阻害剤及び1つ以上のCTLA-4阻害剤と組み合わせた治療的TIL集合による治療を含む。いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるTIL療法は、1つ以上のCTLA-4阻害剤及び1つ以上のPD-1阻害剤と組み合わせた治療的TIL集合による治療を含む。いくつかの実施形態では、がんを有する患者に提供されるTIL療法は、1つ以上のPD-1阻害剤、1つ以上のPD-L1阻害剤、及び1つ以上のCTLA-4阻害剤と組み合わせた治療的TIL集合による治療を含む。本明細書に記載されるものなど、当該技術分野で知られている任意の好適なPD-1、PD-L1、またはCTLA-4阻害剤を使用してもよい。

10

【2096】

E. 患者のリンパ球枯渇プレコンディショニング

いくつかの実施形態では、本発明は、TIL集団でがんを治療する方法を含み、患者は、本開示によるTILの注入前に骨髄非破壊的化学療法で前治療される。いくつかの実施形態では、本発明は、骨髄非破壊的化学療法で前治療された患者のがんの治療に使用するためのTIL集団を含む。いくつかの実施形態では、TIL集団は、注入による投与用である。いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド60mg/kg/日で2日間（TIL注入の27日前及び26日前）、ならびにフルダラビン25mg/m²/日で5日間（TIL注入の27日前～23日前）である。いくつかの実施形態では、本開示による骨髄非破壊的化学療法及びTIL注入（0日目）後、患者は、生理学的許容範囲まで8時間毎に720,000IU/kgで静脈内的にIL-2（PROLEUKINとして市販されている、アルデスロイキン）の静脈内注入を受ける。ある特定の実施形態では、TIL集団は、IL-2と組み合わせてがんを治療する際に使用するためのものであり、IL-2は、TIL集団の後に投与される。

20

【2097】

実験的発見は、腫瘍特異的Tリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、制御性T細胞及び免疫系の競合要素（「サイトカインシンク」）を排除することによって治療有効性を増強する上で重要な役割を果たすことを示す。したがって、本発明のいくつかの実施形態は、本発明のTILを導入する前に、患者に対してリンパ球枯渇ステップ（「免疫抑制コンディショニング」と称されることもある）を利用する。

30

【2098】

一般に、リンパ球枯渇は、フルダラビンまたはシクロホスファミド（マホスファミドと称される活性形態）及びそれらの組み合わせの投与を使用して達成される。かかる方法は、Gassner, et al., Cancer Immunol. Immunother. 2011, 60, 75-85、Muranski, et al., Nat. Clin. Pract. Oncol., 2006, 3, 668-681、Dudley, et al., J. Clin. Oncol. 2008, 26, 5233-5239、及びDudley, et al., J. Clin. Oncol. 2005, 23, 2346-2357に記載されており、これらはすべて、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

40

【2099】

いくつかの実施形態では、フルダラビンは、0.5µg/mL～10µg/mLのフルダラビン濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、1µg/mLのフルダラビン濃度で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日以上投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、10mg/kg/日、15mg/kg/日、20mg/kg/日、25mg/kg/日、30mg/kg/日、35mg/kg/日、40mg/kg/日、または45mg/kg/日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、35mg/kg/日で2～7日間投与される。いくつかの実施形態では、フルダラビン治療は、35mg/kg/日で4～5日間投与される。いくつかの実施形態では、フ

50

ルダラビン治療は、 25 mg/kg ／日で4～5日間投与される。

【2100】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、 $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ ～ $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ の濃度で取得される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドの活性形態であるマホスファミドは、シクロホスファミドの投与により、 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ の濃度で取得される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日以上投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、 100 mg/m^2 ／日、 150 mg/m^2 ／日、 175 mg/m^2 ／日、 200 mg/m^2 ／日、 225 mg/m^2 ／日、 250 mg/m^2 ／日、 275 mg/m^2 ／日、または 300 mg/m^2 ／日の投与量で投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、静脈内（すなわち、i.v.）投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、 35 mg/kg ／日で2～7日間投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、 250 mg/m^2 ／日で4～5日間i.v.投与される。いくつかの実施形態では、シクロホスファミド治療は、 250 mg/m^2 ／日で4日間i.v.投与される。

10

【2101】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、患者にフルダラビンとシクロホスファミドと一緒に投与することによって行われる。いくつかの実施形態では、フルダラビンは、 25 mg/m^2 ／日でi.v.投与され、シクロホスファミドは、 250 mg/m^2 ／日で4日間にわたってi.v.投与される。

20

【2102】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを 60 mg/m^2 ／日の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを 25 mg/m^2 ／日の用量で5日間投与することによって行われる。

【2103】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを 60 mg/m^2 ／日の用量で2日間投与し、フルダラビンを 25 mg/m^2 ／日の用量で5日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の2日間に投与され、リンパ球枯渇は合計5日間で行われる。

【2104】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約 50 mg/m^2 ／日の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 25 mg/m^2 ／日の用量で5日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の2日間に投与され、リンパ球枯渇は合計5日間で行われる。

30

【2105】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約 50 mg/m^2 ／日の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 20 mg/m^2 ／日の用量で5日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の2日間に投与され、リンパ球枯渇は合計5日間で行われる。

【2106】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約 40 mg/m^2 ／日の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 20 mg/m^2 ／日の用量で5日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の2日間に投与され、リンパ球枯渇は合計5日間で行われる。

40

【2107】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを約 40 mg/m^2 ／日の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 15 mg/m^2 ／日の用量で5日間投与することによって行われ、シクロホスファミド及びフルダラビンは、両方とも最初の2日間に投与され、リンパ球枯渇は合計3日間で行われる。

【2108】

50

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇が、シクロホスファミドを $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で、フルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で2日間、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で3日間投与することによって行われる。

【2109】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、メスナは、 $15 \text{ mg} / \text{kg}$ で投与される。メスナが注入されるいくつかの実施形態では、連続的に注入される場合、メスナは、約2時間にわたってシクロホスファミドを注入することができ（-5日目及び/または-4日目）、次いで、各シクロホスファミド用量と同時に開始する24時間にわたって残りの22時間で $3 \text{ mg} / \text{kg} / \text{時間}$ の速度で注入することができる。

10

【2110】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、第3のTIL集団を患者に投与した翌日から開始するIL-2レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。

【2111】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、第3のTIL集団を患者に投与したのと同じ日に開始するIL-2レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。

【2112】

いくつかの実施形態では、リンパ球枯渇は、5日間のプレコンディショニング治療を含む。いくつかの実施形態では、該日は、-5日から-1日、または0日から4日として示される。いくつかの実施形態では、レジメンは、-5日目及び-4日目（すなわち、0日目及び1日目）にシクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、-5日目及び-4日目（すなわち、0日目及び1日目）に静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、-5日目及び-4日目（すなわち、0日目及び1日目）に $60 \text{ mg} / \text{kg}$ の静脈内シクロホスファミドを含む。いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナとともに投与される。いくつかの実施形態では、レジメンは、フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、 $25 \text{ mg} / \text{m}^2$ の静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、-5日目及び-1日目（すなわち、0～4日目）に $25 \text{ mg} / \text{m}^2$ の静脈内フルダラビンをさらに含む。いくつかの実施形態では、レジメンは、-5日目及び-1日目（すなわち、0～4日目）に $25 \text{ mg} / \text{m}^2$ の静脈内フルダラビンをさらに含む。

20

30

【2113】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で、フルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で5日間投与するステップを含む。

【2114】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で5日間投与するステップを含む。

【2115】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で3日間投与するステップを含む。

40

【2116】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で、フルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で2日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で3日間投与するステップを含む。

【2117】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で、フルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で2日間投与

50

し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で 1 日間投与するステップを含む。

【2118】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で 2 日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で 3 日間投与するステップを含む。

【2119】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンが、シクロホスファミドを $60 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で、フルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で 2 日間投与し、続いてフルダラビンを $25 \text{ mg} / \text{m}^2 / \text{日}$ の用量で 3 日間投与するステップを含む。

【2120】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 26 に従って投与される。

【2121】

【表 27】

表 26. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60 mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン $25 \text{ mg/m}^2 / \text{日}$	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

【2122】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 27 に従って投与される。

【2123】

【表 28】

表 27. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60 mg/kg	X	X							
メスナ(必要に応じて)	X	X							
フルダラビン $25 \text{ mg/m}^2 / \text{日}$	X	X	X	X					
TIL 注入					X				

【2124】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 28 に従って投与される。

【2125】

10

20

30

40

50

【表 2 9】

表 2 8. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X						
メスナ(必要に応じて)	X	X						
フルダラビン 25mg/m ² /日	X	X	X					
TIL 注入				X				

10

【2 1 2 6】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 2 9 に従って投与される。

【2 1 2 7】

【表 3 0】

表 2 9. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 60mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 25mg/m ² /日			X	X	X					
TIL 注入						X				

20

【2 1 2 8】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 3 0 に従って投与される。

30

【2 1 2 9】

【表 3 1】

表 3 0. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 30mg/m ² /日	X	X	X	X	X					
TIL 注入						X				

40

【2 1 3 0】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 3 1 に従って投与される。

【2 1 3 1】

50

【表 3 2】

表 3 1. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X							
メスナ(必要に応じて)	X	X							
フルダラビン 30mg/m ² /日	X	X	X	X					
TIL 注入					X				

10

【2 1 3 2】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 3 2 に従って投与される。

【2 1 3 3】

【表 3 3】

表 3 2. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X						
メスナ(必要に応じて)	X	X						
フルダラビン 30mg/m ² /日	X	X	X					
TIL 注入				X				

20

【2 1 3 4】

いくつかの実施形態では、骨髄非破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 3 3 に従って投与される。

【2 1 3 5】

【表 3 4】

表 3 3. 例示的なリンパ球枯渇及び治療レジメン。

日数	-5	-4	-3	-2	-1	0	1	2	3	4
シクロホスファミド 300mg/kg	X	X								
メスナ(必要に応じて)	X	X								
フルダラビン 30mg/m ² /日			X	X	X					
TIL 注入						X				

40

【2 1 3 6】

いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で 사용되는 TIL 注入は、本明細書に記載の任意の TIL 組成物であり得、また本明細書に記載されるような IL-2 レジメンの追加及び併用療法（PD-1 及び／または PD-L1 阻害剤など）の投与であり得る。

50

【2137】

F. IL-2レジメン

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、高用量IL-2レジメンを含み、高用量IL-2レジメンは、治療的TIL集団の治療有効分量を投与した翌日から静脈内投与されるアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリエーションを含み、アルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリエーションは、許容範囲まで8時間毎に最大14用量にわたって、 0.037 mg/kg または 0.044 mg/kg IU/kg （患者の体重）の用量で15分のボラス静脈内注入を使用して投与される。9日間の休止後、このスケジュールは、さらに14用量、合計最大28用量にわたって繰り返され得る。いくつかの実施形態では、IL-2は、1、2、3、4、5、または6用量で投与される。いくつかの実施形態では、IL-2は、最大6用量の最大投与量で投与される。

10

【2138】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、デクレッシェンドIL-2レジメンを含む。デクレッシェンドIL-2レジメンは、O'Day, et al., J. Clin. Oncol. 1999, 17, 2752-61、及びEton, et al., Cancer 2000, 88, 1703-9に記載されており、それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドIL-2レジメンは、6時間にわたって静脈内投与される $18 \times 10^6\text{ IU/m}^2$ アルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリエーション、続いて12時間にわたって静脈内投与される $18 \times 10^6\text{ IU/m}^2$ 、続いて24時間にわたって静脈内投与される $18 \times 10^6\text{ IU/m}^2$ 、続いて72時間かけて静脈内投与される $4.5 \times 10^6\text{ IU/m}^2$ を含む。この治療サイクルは、28日毎に最大4サイクル繰り返され得る。いくつかの実施形態では、デクレッシェンドIL-2レジメンは、1日目の $18,000,000\text{ IU/m}^2$ 、2日目の $9,000,000\text{ IU/m}^2$ 、3日目及び4日目の $4,500,000\text{ IU/m}^2$ を含む。

20

【2139】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、低用量IL-2レジメンを含む。Domínguez-Villar and Hafler, Nat. Immunology 2000, 19, 665-673、Hartemann, et al., Lancet Diabetes Endocrinol. 2013, 1, 295-305、及びRosenzweig, et al., Ann. Rheum. Dis. 2019, 78, 209-217（それらの開示は参照により本明細書に組み込まれる）に記載されている低用量IL-2レジメンを含む、当該技術分野で知られている任意の低用量IL-2レジメンを使用することができる。いくつかの実施形態では、低用量IL-2レジメンは、 m^2 当たり $18 \times 10^6\text{ IU}$ のアルデスロイキン、またはそのバイオシミラーもしくはバリエーションを24時間当たり5日間の連続的注入として、その後IL-2療法なしで2～6日間、その後任意選択でアルデスロイキンまたはそのバイオシミラーもしくはバリエーションを静脈内にさらに5日間、24時間当たり m^2 当たり $18 \times 10^6\text{ IU}$ の連続的注入として、その後任意選択でIL-2療法なしで3週間投与することを含み、その後追加のサイクルが投与され得る。

30

40

【2140】

いくつかの実施形態では、IL-2は、最大6用量の最大投与量で投与される。いくつかの実施形態では、高用量IL-2レジメンは、小児の使用に適合される。いくつかの実施形態では、最大6用量まで、8～12時間毎に $600,000\text{ 国際単位 (IU)/kg}$ のアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大6用量まで、8～12時間毎に $500,000\text{ 国際単位 (IU)/kg}$ のアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大6用量まで、8～12時間毎に $400,000\text{ 国際単位 (IU)/kg}$ のアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大6用量まで、8～12時間毎に $500,000\text{ 国際単位 (IU)/kg}$ のアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大6用量まで、8～12時間

50

毎に300,000国際単位(IU)/kgのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大6用量まで、8~12時間毎に200,000国際単位(IU)/kgのアルデスロイキンの用量が使用される。いくつかの実施形態では、最大6用量まで、8~12時間毎に100,000国際単位(IU)/kgのアルデスロイキンの用量が使用される。

【2141】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、0.10mg/日~50mg/日の用量で、1、2、4、6、7、14、または21日毎にペグ化IL-2を投与することを含む。いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、0.10mg/日~50mg/日の用量で、1、2、4、6、7、14、または21日毎に、ベンパガルデスロイキン、またはその断片、バリエーション、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

10

【2142】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、0.10mg/日~50mg/日の用量で、1、2、4、6、7、14、または21日毎に、THOR-707、またはその断片、バリエーション、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

【2143】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、TILの投与後に、ネムバロイキンアルファ、またはその断片、バリエーション、もしくはバイオシミラーの投与を含む。ある特定の実施形態では、患者にネムバロイキンを1日、2日、4日、6日、7日、14日または21日毎に、0.10mg/日~50mg/日の用量で投与される。

20

【2144】

いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、抗体骨格に移植されたIL-2断片の投与を含む。いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、IL-2低親和性受容体と結合する抗体-サイトカイン移植タンパク質の投与を含む。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域HCDR1、HCDR2、HCDR3を含む、重鎖可変領域(V_H)と、LCDR1、LCDR2、LCDR3を含む軽鎖可変領域(V_L)と、V_HまたはV_LのCDRに移植されたIL-2分子またはその断片と、を含み、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性T細胞よりもTエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、抗体サイトカイン移植タンパク質は、相補性決定領域HCDR1、HCDR2、HCDR3を含む、重鎖可変領域(V_H)と、LCDR1、LCDR2、LCDR3を含む軽鎖可変領域(V_L)と、V_HまたはV_LのCDRに移植されたIL-2分子またはその断片と、を含み、IL-2分子は、ムテインであり、抗体サイトカイン移植タンパク質は、制御性T細胞よりもTエフェクター細胞を優先的に拡張させる。いくつかの実施形態では、IL-2レジメンは、0.10mg/日~50mg/日の用量で、1、2、4、6、7、14または21日毎に、配列番号29及び配列番号38からなる群から選択される重鎖と、配列番号37及び配列番号39からなる群から選択される軽鎖と、を含む抗体、またはその断片、バリエーション、もしくはバイオシミラーを投与することを含む。

30

【2145】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体サイトカイン移植タンパク質は、アルデスロイキン(Proleukin(登録商標))または同等の分子などであるがこれらに限定されない野生型IL-2分子よりも長い血清半減期を有する。

40

【2146】

いくつかの実施形態では、骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンの前述の実施形態で使用されるTIL注入は、本明細書に記載の任意のTIL組成物であり得、また、TIL注入の代わりにMIL及びPBLの注入、ならびに本明細書に記載のIL-2レジメンの追加及び併用療法(PD-1及び/またはPD-L1阻害剤及び/またはCTLA-4阻害剤など)の投与を含み得る。

【実施例】

【2147】

50

本明細書に包含される実施形態は、これから以下の実施例を参照して説明される。これらの実施例は、例示のみを目的として提供されており、本明細書に包含される本開示は、決してこれらの実施例に限定されると解釈されるべきではなく、むしろ、本明細書で提供される教示の結果として明らかになるありとあらゆる変形を包含すると解釈されるべきである。

【2148】

実施例1：REP前プロセス及びREPプロセス用の培地の調製

この実施例は、様々な固形腫瘍に由来する腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の培養を含むプロトコルで使用するための組織培養培地の調製のための手順を説明する。この培地を、本出願及び他の実施例に記載のTILのうちのいずれかの調製に使用することができる。

10

【2149】

CM1の調製。以下の試薬を冷蔵から取り出し、それらを37℃の水浴中で温めた（RPMI1640、ヒトAB血清、200mM L-グルタミン）。ろ過される容量に適した0.2µmフィルターユニットの上部に各成分を添加することによって、以下の表34に従ってCM1培地を調製した。4℃で保存する。

【2150】

【表35】

表34. CM1の調製

20

成分	最終濃度	最終体積 500mL	最終体積 IL
RPMI1640	NA	450 mL	900 mL
ヒト AB 血清、 熱不活性化 10%	50 mL	100 mL	
200mM L-グルタミン	2 mM	5 mL	10 mL
55mM BME	55 µM	0.5 mL	1 mL
50mg/mL 硫酸ゲンタマイシン	50 µg/mL	0.5 mL	1 mL

30

【2151】

使用日に、37℃の水浴中で必要量のCM1を事前に温め、6000IU/mLのIL-2を追加した。

【2152】

表35に従って必要に応じて追加の補充を行った。

【2153】

40

50

【表 3 6】

表 3 5. 必要に応じたCM1の追加の補充。

サプリメント	ストック濃度	希釈	最終濃度
GlutaMAX(商標)	200 mM	1:100	2 mM
ペニシリン/ストレプトマイシン	10,000U/mL ペニシリン 10,000 μ g/mL ストレプトマイシン	1:100	100U/mL ペニシリン 100 μ g/mL ストレプトマイシン
アンホテリシン B	250 μ g/mL	1:100	2.5 μ g/mL

10

【2154】

CM2の調製

調製したCM1を冷蔵庫から取り出すか、または新鮮なCM1を調製した。AIM-V（登録商標）を冷蔵庫から取り出し、調製したCM1を滅菌培地ボトル内で同等体積のAIM-V（登録商標）と混合することによって、必要な量のCM2を調製した。使用日に3000IU/mLのIL-2をCM2培地に追加した。使用日に3000IU/mLのIL-2を含む十分な量のCM2を作製した。CM2培地ボトルにその名前、調製者のイニシャル、濾過／調製日、2週間の有効期限をラベル付けし、組織培養に必要なになるまで4℃で保存した。

20

【2155】

CM3の調製

使用が必要になった日にCM3を調製した。CM3は、AIM-V（登録商標）培地と同じであり、使用日に3000IU/mLのIL-2を補充した。IL-2ストック溶液をAIM-Vのボトルまたはバッグに直接追加することによって、実験のニーズに十分な量のCM3を調製した。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、AIM-Vに追加した直後に「3000IU/mL IL-2」とラベル付けする。過剰なCM3が存在する場合は、培地名、調製者のイニシャル、培地を調製した日、及びその有効期限（調製後7日）でラベル付けしたボトル内で4℃で保管した。4℃で7日間保管した後、IL-2を補充した培地を廃棄した。

30

【2156】

CM4の調製

CM4は、CM3と同じであり、2mM GlutaMAX（商標）（最終濃度）を追加で補充した。1LのCM3毎に、10mLの200mM GlutaMAX（商標）を添加する。IL-2ストック溶液及びGlutaMAX（商標）ストック溶液をAIM-Vのボトルまたはバッグに直接追加することによって、実験のニーズに十分な量のCM4を調製する。穏やかに振盪することによって十分に混合した。ボトルに、AIM-Vに追加した直後に「3000IU/mL IL-2及びGlutaMAX」とラベル付けした。過剰なCM4が存在する場合、培地名、「GlutaMAX」、及びその有効期限（調製後7日）でラベル付けしたボトル内で4℃で保管した。4℃で7日間保管した後、IL-2を補充した培地を廃棄した。

40

【2157】

実施例2：IL-2、IL-15、及びIL-21サイトカインカクテルの使用

この実施例は、本明細書の実施例のうちのいずれかのTILプロセスと組み合わせた、追加のT細胞成長因子として機能するIL-2、IL-15、及びIL-21サイトカインの使用を説明する。

【2158】

50

本明細書に記載のプロセスを使用して、T I Lは、培養の開始時に、実験の一方のアームにおいてI L-2の存在下で腫瘍から、及びもう一方のアームではI L-2の代わりにI L-2、I L-15、及びI L-21の組み合わせから成長させることができる。R E P前の完了時に、培養物を、拡張、表現型、機能（C D 1 0 7 a+及びI F N- γ ）、及びT C R V β レパートリーについて評価した。I L-15及びI L-21は、本明細書の他の場所及びS a n t e g o e t s , e t a l . , J . T r a n s l . M e d . , 2 0 1 3 , 1 1 , 3 7に記載されている。

【2159】

結果は、I L-2、I L-15、及びI L-21処理条件でのC D 4⁺及びC D 8⁺細胞の両方で、I L-2のみの条件と比較して増強したT I L拡張（>20%）が観察できることを示し得る。I L-2単独培養物と比較して、I L-2、I L-15、及びI L-21で処理した培養物から取得されたT I Lには、歪んだT C R V β レパートリーを伴う主にC D 8⁺集団への歪みがあった。I F N- γ 及びC D 1 0 7 aは、I L-2単独で処理したT I Lと比較して、I L-2、I L-15、及びI L-21で処理したT I Lで上昇した。

10

【2160】

実施例3：ガンマ線照射末梢単核細胞の個々のロットを適格性確認する

この実施例は、本明細書に記載の例示的な方法において同種異系フィーダー細胞として使用するためのガンマ線照射末梢単核細胞（P B M C、単核細胞またはM N Cとしても知られる）の個々のロットを適格性確認するための簡略化された手順を説明する。

20

【2161】

照射された各M N Cフィーダーロットは、個々のドナーから調製した。各ロットまたはドナーは、精製された抗C D 3（クローンO K T 3）抗体及びインターロイキン-2（I L-2）の存在下でR E P内のT I Lを拡張する能力について個々にスクリーニングした。さらに、フィーダー細胞の各ロットを、T I Lを添加せずに試験し、受けたガンマ線の線量がそれらを複製不全にするのに十分であることを確認した。

【2162】

T I LのR E Pには、ガンマ線を照射し、成長を停止させたM N Cフィーダー細胞が必要である。フィーダーM N Cの膜受容体は、抗C D 3（クローンO K T 3）抗体に結合し、R E Pフラスコ内のT I Lに架橋し、T I Lを刺激して拡張させる。フィーダーロットは、個々のドナーから採取した全血の白血球アフェレーシスから調製した。白血球アフェレーシス産物を、F i c o l l -H y p a q u e上で遠心分離し、洗浄し、照射し、G M P条件下で凍結保存した。

30

【2163】

T I L療法を受けた患者には、移植片対宿主病（G V H D）を引き起こす可能性があるため、生存可能なフィーダー細胞を注入しないことが重要である。したがって、フィーダー細胞は、細胞にガンマ線を照射することによって成長を停止させ、再培養時に二本鎖D N A切断が起こり、M N C細胞の細胞生存性が喪失する。

【2164】

フィーダーロットを、2つの基準：1）共培養でT I Lを100倍超拡張する能力、及び2）複製不全で評価した。

40

【2165】

フィーダーロットを、直立したT 25組織培養フラスコ内で培養された2つの主要なR E P前T I L株を利用して、m i n i -R E P形式で試験した。各T I L株は、R E Pでの活性化に応答して増殖する能力が独特であるため、フィーダーロットを、2つの異なるT I L株に対して試験した。対照として、上記の基準を満たすことが歴史的に示されている多くの照射されたM N Cフィーダー細胞を、試験ロットと並行して実行した。

【2166】

1回の実験で試験されたすべてのロットが同等の試験を受けることを保証するために、すべての条件及びすべてのフィーダーロットを試験するために、同じR E P前T I L株の

50

十分なストックが利用可能であった。

【2167】

試験したフィーダー細胞の各ロットに、合計6つのT25フラスコがあった：REP前TIL株#1（2フラスコ）、REP前TIL株#2（2フラスコ）、及びフィーダー対照（2フラスコ）。TIL株番号1及び番号2を含むフラスコは、フィーダーロットがTILを拡張する能力を評価した。フィーダー対照フラスコは、フィーダーロットの複製不全を評価した。

【2168】

A. 実験プロトコル

－2／3日目、TIL株の解凍CM2培地を調製し、37℃の水浴中でCM2を温める。3000IU/mLのIL-2を補充した40mLのCM2を調製する。使用まで保温する。IL-2を含まない20mLの予熱したCM2を、使用したTIL株の名前がラベル付けされた2本の50mLコニカルチューブの各々に入れる。LN2ストレージから2つの指定されたREP前TIL株を取り出し、バイアルを組織培養室に移した。少量の氷が残るまで、37℃の水浴内の密封されたジッパーストレージバッグ内にバイアルを入れて解凍した。

【2169】

無菌トランスファーピペットを使用して、各バイアルの内容物を、調製した、ラベル付けされた50mLのコニカルチューブ中の20mLのCM2に直ちに移した。細胞を洗浄し、400×CFで5分間遠心分離するために、IL-2なしのCM2を使用して40mLにQS。上清を吸引し、3000IU/mLのIL-2で補充された5mLの温かいCM2に再懸濁した。

【2170】

自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、少量のアリコート（20μL）を重複して取り出した。計数を記録した。カウントしながら、TIL細胞を含む50mLのコニカルチューブを、加湿した37℃、5% CO₂インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。細胞濃度を決定し、TILを、3000IU/mLのIL-2を補充したCM2中で 1×10^6 細胞/mLに希釈した。

【2171】

mini-REPの0日目まで、加湿した37℃のインキュベーターで必要な数のウェルにおいて、24ウェル組織培養プレートの1ウェル当たり2mLで培養した。混乱及び潜在的な相互汚染を避けるために、別々の24ウェル組織培養プレートで異なるTIL株を培養した。

【2172】

0日目、Mini-REPを開始する試験されるフィーダーロットの数に十分なCM2培地を調製した。（例えば、一度に4つのフィーダーロットを試験するために、800mLのCM2培地を調製した）。上記で調製したCM2の一部を分注し、それを細胞の培養のために3000IU/mLのIL-2で補充した。（例えば、一度に4つのフィーダーロットを試験するために、3000IU/mLのIL-2を含む500mLのCM2培地を調製する）。

【2173】

相互汚染を防ぐために各TIL株を別々に操作し、TIL培養物を入れた24ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、BSCに移した。

【2174】

無菌トランスファーピペットまたは100～1000μLピペッター及びチップを使用して、約1mLの培地を、使用されるTILの各ウェルから取り出し、24ウェル組織培養プレートの未使用のウェルに入れる。

【2175】

新鮮な無菌トランスファーピペットまたは100～1000μLピペッター及びチップを使用して、残りの培地をウェル内のTILと混合して細胞を再懸濁し、次いで細胞懸濁

10

20

30

40

50

液を、T I L ロット名のラベルが付いた 5 0 m L コニカルチューブに移し、容量を記録した。

【2 1 7 6】

予備の培地でウェルを洗浄し、その容量を同じ 5 0 m L コニカルチューブに移した。細胞を 4 0 0 × C F で回転させて、細胞ペレットを収集する。培地上清を吸引除去し、3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含有する 2 ~ 5 m L の C M 2 培地に細胞ペレットを再懸濁し（採取したウェルの数及びペレットのサイズに基づいて使用される容量）、容量は、 1.3×10^6 細胞 / m L を超える濃度を保証するのに十分である必要がある。

【2 1 7 7】

血清学的ピペットを使用して、細胞懸濁液を十分に混合し、容量を記録した。自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、2 0 0 μ L を取り出した。カウントしながら、T I L 細胞を含む 5 0 m L のコニカルチューブを、加湿した 5 % C O ₂、3 7 °C インキュベーターに入れ、ガス交換を可能にするためにキャップを緩めた。計数を記録した。

10

【2 1 7 8】

T I L 細胞を含有する 5 0 m L のコニカルチューブをインキュベーターから取り出し、3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 で補充された温かい C M 2 中、 1.3×10^6 細胞 / m L の濃度でそれらの細胞を再懸濁した。キャップを緩めた状態で、5 0 m L のコニカルチューブをインキュベーターに戻した。

【2 1 7 9】

第 2 の T I L 株について、上記のステップを繰り返した。

20

【2 1 8 0】

T I L を実験用の T 2 5 フラスコに入れる直前に、T I L を、以下の通り 1 : 1 0 に希釈して 1.3×10^5 細胞 / m L の最終濃度にした。

【2 1 8 1】

M A C S G M P C D 3 ピュア (O K T 3) 作用溶液を調製する O K T 3 のストック溶液 (1 m g / m L) を 4 °C の冷蔵庫から取り出し、B S C に入れた。mini-REP の培地では、最終濃度 3 0 n g / m L の O K T 3 を使用した。

【2 1 8 2】

実験の各 T 2 5 フラスコ内の 2 0 m L に対して 6 0 0 n g の O K T 3 が必要であり、これは、2 0 m L 毎に 6 0 μ L の 1 0 μ g / m L 溶液、または各フィーダーロットについて試験した 6 つのフラスコすべてで 3 6 0 μ L に相当する。

30

【2 1 8 3】

試験した各フィーダーロットについて、4 0 0 μ L の 1 : 1 0 0 希釈の 1 m g / m L O K T 3 を、1 0 μ g / m L の作業濃度で作製した（例えば、4 つのフィーダーロットを一度に試験する場合、1 6 0 0 μ L の 1 : 1 0 0 希釈の 1 m g / m L O K T 3 : 1 6 μ L の 1 m g / m L O K T 3 + 3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む 1 . 5 8 4 m L の C M 2 培地を作製する）。

【2 1 8 4】

T 2 5 フラスコを調製するフィーダー細胞を調製する前に、各フラスコにラベルを付け、フラスコに C M 2 培地を充填した。フラスコを 3 7 °C の加湿した 5 % C O ₂ インキュベーターに入れ、残りの成分を添加するのを待つ間、培地を保温した。一旦フィーダー細胞が調製されると、各フラスコ内の C M 2 に成分が添加される。

40

【2 1 8 5】

さらなる情報を表 3 6 に提供する。

【2 1 8 6】

【表 3 7】

表 3 6. 溶液情報。

構成要素	共培養フラスコ 内の容量	対照 (フィーダーのみ) フラスコ内の容量
CM2 + 3000 IU/mL IL-2	18mL	19mL
MNC: CM2+3000IU IL-2 中 1.3×10^7 /mL (最終濃度 1.3×10^7 /フラスコ)	1mL	1mL
OKT3: CM2 中 $10 \mu\text{L}/\text{mL}=3000\text{IU}$ IL-2	60 μL	60 μL
TIL: 3000IU の IL-2 を含む CM2 中 の 1.3×10^5 /mL (最終濃度 1.3×10^5 /フラスコ)	1mL	0

10

20

【2 1 8 7】

フィーダー細胞を調製する。このプロトコルについて試験されたロット当たり 7.8×10^6 フィーダー細胞の最小値が必要であった。SDBBによって凍結された各 1 mL バイアルは、凍結時に 1.00×10^6 個の生細胞を有していた。液体 N_2 ストレージからの解凍時の 50% の回収率を仮定すると、ロット当たり少なくとも 2 つの 1 mL バイアルのフィーダー細胞を解凍して、各 REP に推定 1.00×10^6 個の生細胞を与えることが推奨された。あるいは、1.8 mL バイアルで供給された場合、1 つのバイアルだけで十分なフィーダー細胞が提供された。

【2 1 8 8】

フィーダー細胞を解凍する前に、試験される各フィーダーロットに IL-2 を含まないおよそ 50 mL の CM2 を予熱した。指定されたフィーダーロットバイアルを LN_2 ストレージから取り出し、ジッパーストレージバッグに入れ、氷上に置いた。37°C の水浴に浸すことによって、閉じたジッパーストレージバッグ内のバイアルを解凍した。バイアルをジッパーストレージバッグから取り出し、70% EtOH でスプレーまたはワイプし、BSC に移した。

30

【2 1 8 9】

トランスファーピペットを使用して、フィーダーバイアルの内容物を、50 mL のコニカルチューブ中の 30 mL の温かい CM2 に直ちに移した。バイアルを少量の CM2 で洗浄して、バイアル内の残留細胞を除去し、 $400 \times \text{CF}$ で 5 分間遠心分離した。上清を吸引し、 $3000 \text{ IU}/\text{mL}$ の IL-2 を加えた 4 mL の温かい CM2 に再懸濁した。自動セルカウンターを使用して細胞を計数するために、200 μL を取り出した。計数を記録した。

40

【2 1 9 0】

$3000 \text{ IU}/\text{mL}$ の IL-2 を加えた温かい CM2 中、 1.3×10^7 細胞/mL で細胞を再懸濁した。TIL 細胞を 1.3×10^6 細胞/mL から 1.3×10^5 細胞/mL に希釈した。

【2 1 9 1】

共培養物を準備する。TIL 細胞を 1.3×10^6 細胞/mL から 1.3×10^5 細胞/mL に希釈した。4.5 mL の CM2 培地を 15 mL のコニカルチューブに添加した。インキュベーターから TIL 細胞を取り出し、10 mL の血清ピペットを使用して十分に

50

再懸濁した。1. 3×10^6 細胞/mL の T I L 懸濁液から 0.5 mL の細胞を取り出し、15 mL のコニカルチューブ中の 4.5 mL の培地に添加した。T I L ストックバイアルをインキュベーターに戻した。よく混ぜた。第 2 の T I L 株に対して繰り返した。

【2192】

単一フィーダーロット用に予熱した培地を入れたフラスコを、インキュベーターから B S C に移した。1 mL のピペットチップで数回上下にピペッティングすることによってフィーダー細胞を混合し、そのフィーダーロットの各フラスコに 1 mL (1.3×10^7 細胞) を移した。60 μ L の O K T 3 作用ストック (10 μ g/mL) を各フラスコに追加した。2 つの対照フラスコをインキュベーターに戻した。

【2193】

各 T I L ロットの 1 mL (1.3×10^5) を、対応するラベルの付いた T 2 5 フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、直立させてインキュベートした。5 日目まで乱さなかった。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【2194】

5 日目、培地変更 3000 I U/mL の I L - 2 を含む C M 2 を調製した。各フラスコに 10 mL が必要である。10 mL ピペットを使用して、3000 I U/mL の I L - 2 を含む 10 mL の温かい C M 2 を各フラスコに移した。フラスコをインキュベーターに戻し、7 日目まで直立させてインキュベートした。試験したすべてのフィーダーロットについて繰り返した。

【2195】

7 日目、採取インキュベーターからフラスコを取り出し、B S C に移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意する。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各試験フラスコから 10 mL の培地を取り出し、対照フラスコの各々から 15 mL の培地を取り出した。

【2196】

10 mL の血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊をすべて破壊した。ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞計数のために 200 μ L を取り出した。自動セルカウンター装置とともに適切な標準操作手順を使用して、T I L を計数した。7 日目に計数を記録した。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

【2197】

フィーダー対照フラスコは、複製不全について評価し、T I L を含むフラスコは、0 日目からの倍率拡張について評価した。

【2198】

7 日目、フィーダー対照フラスコの 14 日目までの継続フィーダー対照フラスコの 7 日目の計数を完了した後、3000 I U/mL の I L - 2 を含む 15 mL の新鮮な C M 2 培地を対照フラスコの各々に追加した。対照フラスコをインキュベーターに戻し、14 日目まで直立位置でインキュベートした。

【2199】

14 日目、フィーダー対照フラスコの長期非増殖インキュベーターからフラスコを取り出し、B S C に移し、フラスコの底部の細胞層を乱さないように注意した。フラスコの底部で成長する細胞を乱すことなく、各対照フラスコからおよそ 17 mL の培地を取り出した。5 mL の血清ピペットを使用して、残りの培地に細胞を再懸濁し、よく混合して細胞の塊をすべて破壊した。各フラスコについて、容量を記録した。

【2200】

ピペッティングすることによって細胞懸濁液を完全に混合した後、細胞計数のために 200 μ L を取り出した。T I L は、自動セルカウンター装置と併せて適切な標準操作手順を使用して計数し、計数を記録した。試験したすべてのフィーダーロットについて、この手順を繰り返した。

10

20

30

40

50

【2201】

B. 結果及び承認基準プロトコル

結果ガンマ線照射の線量は、フィーダー細胞を複製不全にするのに十分であった。すべてのロットは、評価基準を満たすことが予想され、また0日目と比較して、REP培養の7日目に残っているフィーダー細胞の総有効数の低減を示した。すべてのフィーダーロットは、REP培養の7日目までのTIL成長の100倍拡張の評価基準を満たすことが予想された。フィーダー対照フラスコの14日目の計数は、7日目に見られた非増殖傾向を継続すると予想された。

【2202】

承認基準フィーダー細胞の各ロットについて試験された各複製TIL株について、以下の承認基準が満たされた。承認基準は、以下の表37に示すように、2倍であった。

【2203】

【表38】

表37. 承認基準の実施形態。

試験	承認基準
MNCの照射及び複製不全	7日目及び14日目に成長は観察されなかった
TIL 拡張	各 TIL の少なくとも 100 倍の拡張(最低 1.3×10^7 個の生細胞)

【2204】

30 ng/mL の OKT3 抗体及び 3000 IU/mL の IL-2 の存在下で培養した場合に、MNCフィーダー細胞の複製を不全にするのに十分な放射線量を評価した。複製不全は、REPの7日目及び14日目の自動細胞計数によって決定された総生細胞数（TV C）によって評価した。

【2205】

承認基準は、「成長なし」であり、これは、REPの0日目に培養された最初の生細胞数から7日目及び14日目に総生細胞数が増加していないことを意味する。

【2206】

フィーダー細胞がTIL拡張をサポートする能力を評価した。TIL成長は、REPの0日目の培養開始からREPの7日目までの生細胞の倍率拡張の観点から測定された。自動細胞計数によって評価されるように、7日目に、TIL培養物は最低100倍の拡張を達成した（すなわち、REPの0日目に培養された生TIL細胞の総数の100倍超）。

【2207】

承認基準を満たさないMNCフィーダーロットの偶発性試験MNCフィーダーロットが上で概説された承認基準のうちのいずれかを満たさなかった場合は、以下のステップを実行してロットを再試験し、単純な実験者エラーを原因として除外する。

【2208】

ロットの衛星試験バイアルが2つ以上残っている場合は、ロットを再試験した。ロットの衛星試験バイアルが1つ残っているか、まったく残っていない場合、上記の承認基準に従ってロットは失敗であった。

【2209】

適格となるには、問題のロット及び対照ロットが、上記の承認基準を達成する必要があった。これらの基準を満たすと、ロットは使用のために放出される。

【2210】

実施例4：IL-2ストック溶液の調製

この実施例は、精製されて凍結乾燥された組換えヒトインターロイキン-2を、rh IL-2の使用を含むものを含む、本出願及び実施例に記載されるものすべてを含む、さら

なる組織培養プロトコルでの使用に好適なストック試料に溶解するプロセスを説明する。

【2211】

手順。0.2%酢酸溶液(HAc)を調製した。29mLの滅菌水を、50mLのコニカルチューブに移した。1mLの1N酢酸を、50mLのコニカルチューブに追加した。チューブを2~3回反転させながら十分に混合した。Steriflipフィルターを使用した濾過によってHAc溶液を滅菌した。

【2212】

PBS中の1% HSAを調製する。4mLの25% HSAストック溶液を、150mLの滅菌フィルターユニット内の96mLのPBSに追加した。溶液を濾過した。4℃で保管した。調製したrhIL-2の各バイアルについて、フォームに記入する。

10

【2213】

rhIL-2ストック溶液を調製した(最終濃度 $6 \times 10^6 \text{ IU/mL}$)。rhIL-2の各ロットは異なり、必要な情報は、以下のような製造業者の分析証明書(COA)に見出された: 1) バイアル当たりのrhIL-2の質量(mg)、2) rhIL-2の比活性(IU/mg)、及び3) 推奨0.2% HAc再構成体積(mL)。

【2214】

以下の等式を使用して、rhIL-2ロットに必要な1% HSAの体積を計算した。

【2215】

【数1】

20

$$\left(\frac{\text{バイアル質量(mg)} \times \text{生物活性} \left(\frac{\text{IU}}{\text{mg}} \right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - \text{HAcの体積(mL)} = 1\% \text{HSA体積(mL)}$$

【2216】

例えば、rhIL-2ロット10200121(Cellgenix)のCOAによると、1mgバイアルの比活性は、 $25 \times 10^6 \text{ IU/mg}$ である。rhIL-2を2mLの0.2% HAc中で再構成することが推奨される。

【2217】

30

【数2】

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

40

【2218】

IL-2バイアルのゴム栓をアルコールワイプで拭いた。3mLシリンジに取り付けた16G針を使用して、推奨体積の0.2% HAcをバイアルに注入した。針を抜くときに栓が外れないように注意した。バイアルを3回反転させ、すべての粉末が溶解するまで回転させた。栓を慎重に取り外し、アルコールワイプ上に置いた。計算された容量の1% HSAをバイアルに添加した。

【2219】

rhIL-2溶液の保管。短期保管(72時間未満)の場合、4℃でバイアルを保管した。長期保管(72時間超)の場合、バイアルをより小さい体積に等分し、使用の準備が

50

整うまで -20°C でクライオバイアル内で保管した。凍結／解凍サイクルを回避した。調製日から6ヶ月後に有効期限が切れた。Rh-IIL-2ラベルに、ベンダー及びカタログ番号、ロット番号、有効期限、オペレーターのイニシャル、濃度、ならびにアリコート体積を含めた。

【2220】

実施例5：凍結保存プロセス

この実施例では、CryoMed制御速度冷凍庫、モデル7454 (Thermo Scientific) を使用して、本明細書に記載の手順で調製したTILの凍結保存プロセス方法について説明する。

【2221】

使用した機器は以下の通りであった：アルミニウムカセットホルダーラック (CS750フリーザーバッグに対応)、750mLバッグ用凍結保存カセット、低圧 (22psi) 液体窒素タンク、冷蔵庫、熱電対センサー (バッグ用リボンタイプ)、及びCryostore CS750冷凍バッグ (Origon Scientific)。

【2222】

凍結プロセスは、核形成から -20°C まで 0.5°C の速度、及び -80°C の終了温度まで毎分 1°C の冷却速度を提供する。プログラムパラメータは、以下の通りである：ステップ1： -4°C で待つ、ステップ2： -4°C まで $1.0^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (試料温度)、ステップ3： -45°C まで $20.0^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (チャンバ温度)、ステップ4： -10.0°C まで $10.0^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (チャンバ温度)、ステップ5： -20°C まで $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (チャンバ温度)、及びステップ6： -80°C まで $1.0^{\circ}\text{C}/\text{分}$ (試料温度)。

【2223】

実施例6：合成培地を用いた腫瘍拡張プロセス

上記で開示されるプロセスは、CM1培地及びCM2培地を、合成培地 (例えば、CTS (商標) Optmizer (商標) T-Cell Expansion SFM、ThermoFisher、例えば、DM1及びDM2を含むで置き換えることによって行われ得る。

【2224】

実施例7：凍結保存TIL細胞療法の例示的GEN2産生

この実施例は、Iovance Biotherapeutics, Inc. のcGMP製造を説明する。現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、G-R EXフラスコ内のTIL細胞療法プロセス。この実施例は、現在の適正組織基準及び現在の適正製造基準に従った、G-R EXフラスコ内のTIL細胞療法プロセスの例示的なcGMP製造を説明する。

【2225】

10

20

30

40

50

【表 3 9】

表 3 8. プロセス拡張の例示的な計画。

推定日 (播種後)	活性	標的基準	予想される容器	推定総体積 (mL)
0	腫瘍解剖	G-REX-100MCS 当たり ≤50 個の望ましい腫瘍断片	G-REX-100MCS 1 フラスコ	≤1000
11	REP 播種	G-REX-500MCS 当たり 5~200×10 ⁶ 個の生細胞	G-REX-500MCS 1 フラスコ	≤5000
16	REP 分割	G-REX-500MCS 当たり 1×10 ⁹ 個の生細胞	G-REX-500MCS ≤5 フラスコ	≤25000
22	採取	全利用可能な細胞	3~4 つの CS-750 バッグ	≤530

10

【2 2 2 6】

【表 4 0】

表 3 9. フラスコ容積。

20

フラスコタイプ	作業体積/ フラスコ (mL)
G-REX-100MCS	1000
G-REX-500MCS	5000

【2 2 2 7】

0 日目の CM 1 培地の調製 B S C 内で、試薬を R P M I 1 6 4 0 培地ボトルに追加した。ボトル当たり追加された以下の試薬を追加した：不活化ヒト A B 血清（1 0 0 . 0 m L）、G l u t a M a x（商標）（1 0 . 0 m L）、硫酸ゲンタマイシン、5 0 m g / m L（1 . 0 m L）、2-メルカプトエタノール（1 . 0 m L）を加熱する

30

【2 2 2 8】

B S C から不要な材料を取り出した。B S C から培地試薬を抜き取り、配合された洗浄培地の調製のために硫酸ゲンタマイシン及び H B S S を B S C の中に残した。

【2 2 2 9】

I L - 2 アリコートを解凍した。すべての氷が融解するまで、1 つの 1 . 1 m L の I L - 2 アリコート（6 × 1 0 ⁶ I U / m L）（B R 7 1 4 2 4）を解凍した。I L - 2 : ロット番号及び有効期限を記録した。

40

【2 2 3 0】

I L - 2 ストック溶液を培地に移した。B S C 内で、1 . 0 m L の I L - 2 ストック溶液を、調製された CM 1 の 0 日目培地ボトルに移した。CM 1 の 0 日目培地 1 ボトル及び I L - 2（6 × 1 0 ⁶ I U / m L）1 . 0 m L を追加した。

【2 2 3 1】

G - R E X 1 0 0 M C S を B S C の中に通過させた。無菌的に G - R E X 1 0 0 M C S（W 3 0 1 3 1 3 0）を B S C の中に通過させた。

【2 2 3 2】

すべての完全な CM 1 の 0 日目培地を G - R E X 1 0 0 M C S フラスコにポンプで注入

50

した。組織断片円錐形またはG R e x 1 0 0 M C S。

【2233】

0日目の腫瘍洗浄培地の調製B S C内で、5.0mLのゲンタマイシン(W3009832またはW3012735)を1本の500mLのH B S S培地(W3013128)ボトルに追加した。ボトル当たりの追加：H B S S(500.0mL)、硫酸ゲンタマイシン、50mg/mL(5.0mL)。1Lの0.22ミクロンフィルターユニット(W1218810)をとおして調製されたゲンタマイシンを含有するH B S Sを濾過した。

【2234】

0日目の腫瘍処理腫瘍検体を取得し、即時に処理のために2~8℃における部屋に移した。腫瘍洗浄培地を等分した。腫瘍洗浄1は、8インチ鉗子(W3009771)を使用して行う。腫瘍を検体ボトルから取り出し、調製した「洗浄1」皿に移す。この後、腫瘍洗浄2及び腫瘍洗浄3が続く。腫瘍を測定し、評価した。腫瘍領域全体の30%未満が壊死及び／または脂肪組織であることが観察されたかどうかを評価した。該当する場合、クリーンアップ解剖を行う。腫瘍が大きく、外部の組織の30%未満が壊死／脂肪性であることが観察された場合、メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍の内側構造を温存しながら壊死／脂肪組織を除去することによって、「クリーンアップ解剖」を行った。腫瘍を切除した。メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍検体を均等で適切なサイズの断片(最大6つの中間断片)に切断した。中間腫瘍断片を移した。腫瘍断片を、およそ3×3×3mmのサイズの小片に切除した。乾燥を防止するために中間断片を保存した。中間断片の解剖を繰り返した。収集された切片の数を決定した。望ましい組織が残っている場合、「好ましい中間断片」6ウェルプレートから追加の好ましい腫瘍片を選択し、最大50片のために液滴を充填した。

10

20

【2235】

コニカルチューブを準備した。腫瘍片を50mLのコニカルチューブに移した。G-R E X 1 0 0 M C SのためのB S Cを準備した。インキュベーターからG-R E X 1 0 0 M C Sを取り出した。無菌的にG-R E X 1 0 0 M C SフラスコをB S Cの中に通過させた。腫瘍断片をG-R E X 1 0 0 M C Sフラスコに追加した。切片を均等に分配した。

【2236】

以下のパラメータにおいてG-R E X 1 0 0 M C Sをインキュベートした：G-R E X フラスコをインキュベートした：温度LEDディスプレイ：37.0±2.0℃、CO₂パーセンテージ：5.0±1.5 % CO₂。計算：培養の時間、下限=培養の時間+252時間、上限=培養の時間+276時間。

30

【2237】

プロセスが完了した後、いずれの残りの温められた培地も廃棄し、I L-2のアリコートを解凍した。

【2238】

11日目ー培地の調製インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度LEDディスプレイ：37.0±2.0℃、CO₂パーセンテージ：5.0±1.5 % CO₂。

【2239】

3本の1000mLのR P M I 1640培地(W3013112)ボトル及び3本の1000mLのA I M-V(W3009501)ボトルを、インキュベーター内で30分以上温めた。インキュベーターからR P M I 1640培地を取り出した。R P M I 1640培地を調製した。培地を濾過した。3つのI L-2の1.1mLのアリコート(6×106 I U/mL)(B R 71424)を解凍した。インキュベーターからA I M-V培地を取り出した。I L-2をA I M-Vに追加した。10LのL a b t a i n e r バッグ及びリピータポンプ移送セットを、B S Cの中に無菌的に移した。

40

【2240】

10LのL a b t a i n e r 培地バッグを準備した。B a x a ポンプを準備した。10LのL a b t a i n e r 培地バッグを準備した。培地を10LのL a b t a i n e r にポ

50

ンプで注入した。Labtainer バッグからポンプマティックを取り出した。

【2241】

培地を混合した。バッグを穏やかにマッサージして混合した。試料計画に従って培地をサンプリングした。20.0 mL の培地を取り出し、50 mL のコニカルチューブに入れた。細胞計数希釈管を準備した。BSC に、「細胞計数希釈液用」及びロット番号でラベル付けされた 4.5 mL の AIM-V 培地を、4 本の 15 mL コニカルチューブに追加した。試薬を BSC から 2 ~ 8 °C に移した。1 L 移送パックを準備した。（プロセス注記 5.11 に従って）BSC 溶接の外側で、「完全な CM2 の 11 日目培地」バッグに取り付けられた移送セットへの 1 L 移送パックを準備した。フィーダー細胞移送パックを準備した。完全な CM2 の 11 日目培地をインキュベートした。

10

【2242】

11 日目-TIL 採取前処理表。インキュベーターパラメータ：温度 LED ディスプレイ：37.0 ± 2.0 °C、CO₂ パーセンテージ：5.0 ± 1.5 % CO₂。インキュベーターから G-REX 100 MCS を取り出した。300 mL 移送パックを準備した。移送パックを G-REX 100 MCS に溶接した。

【2243】

TIL 採取及び TIL 採取の開始のためにフラスコを準備する。TIL が採取された。Gatherex を使用して、血液フィルターを介して細胞懸濁液を 300 mL の移送パックに移した。付着した細胞について膜を点検した。

【2244】

フラスコ膜をすすいだ。G-REX 100 MCS 上のクランプを閉じた。すべてのクランプが閉じられていることを確実にした。TIL 及び「上清」移送パックを熱融着した。TIL 懸濁液の体積を計算した。サンプリングのために上清移送パックを準備した。

20

【2245】

Bac-T 試料を引き出した。BSC 内で、1 L 「上清」移送パックからおおよそ 20.0 mL の上清を引き上げ、無菌 50 mL コニカルチューブに分注する。

【2246】

試料計画に従って Bac-T を接種した。適切なサイズのシリンジを使用して調製された Bac-T とラベル付けされた 50 mL コニカルから 1.0 mL の試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種した。

30

【2247】

TIL をインキュベートした。必要とされるまで、TIL 移送パックをインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。生存率 ÷ 2。生細胞濃度 ÷ 2。計数の上限及び下限を決定した。下限：生細胞濃度の平均 × 0.9。上限：生細胞濃度の平均 × 1.1。許容限界内の両方の計数を確認した。行われた 4 つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。

【2248】

TIL 懸濁液の調整された体積：細胞計数試料を取り出した後の TIL 懸濁液の調整された体積を計算する。総 TIL 細胞体積 (A)。取り出された細胞計数試料の体積 (4.0 mL) (B) 調整された総 TIL 細胞体積 $C = A - B$ 。

40

【2249】

総生 TIL 細胞を計算した。平均生細胞濃度 * : 総体積、総生細胞 : $C = A \times B$ 。

【2250】

フローサイトメトリーのための計算：総生 TIL 細胞数が、 4.0×10^7 個以上であった場合、フローサイトメトリー試料のために 1.0×10^7 個の細胞を取得するための体積を計算した。

【2251】

フローサイトメトリーに必要とされる総生細胞： 1.0×10^7 個の細胞。フローサイトメトリーに必要とされる細胞の体積：生細胞濃度を 1.0×10^7 個の細胞 A で割ったもの。

50

【2252】

2.0 × 10⁸ 個の生細胞に等しい T I L 懸濁液の体積を計算した。必要に応じて、取り出す T I L 細胞の過剰体積を計算し、過剰な T I L を取り出し、必要に応じて T I L をインキュベーターに入れた。必要に応じて、取り出された全過剰 T I L を計算した。

【2253】

凍結のための標的細胞濃度が 1.0 × 10⁸ 細胞/mL である過剰な T I L 細胞に追加する C S - 10 培地の量を計算した。必要に応じて、過剰な T I L を遠心分離した。コニカルチューブを観察し、C S - 10 を追加した。

【2254】

バイアルを充填した。1.0 mL の細胞懸濁液を、適切なサイズの凍結バイアルに等分した。残留体積を適切なサイズのクライオバイアルに等分した。体積が ≤ 0.5 mL である場合、体積が 0.5 mL になるまで C S 10 をバイアルに追加する。

10

【2255】

凍結保存のための 1 × 10⁷ 個の細胞を取得するために必要とされる細胞の体積を計算した。凍結保存のために試料を取り出した。T I L をインキュベーターに入れた。

【2256】

試料の凍結保存コニカルチューブを観察し、C S - 10 をゆっくりと追加し、追加された 0.5 mL の C S 10 の体積を記録した。

【2257】

11 日目 - フィーダー細胞フィーダー細胞を取得した。L N 2 冷凍庫から少なくとも 2 つの異なるロット番号を伴うフィーダー細胞の 3 つのバッグを取得した。解凍する準備が整うまで、細胞をドライアイス上で保管した。水浴または c r y o t h e r m を準備した。37.0 ± 2.0 °C の水浴または c y t o t h e r m において約 3 ~ 5 分間、または氷が消滅するまで、フィーダー細胞を解凍した。インキュベーターから培地を取り出した。解凍されたフィーダー細胞をプールした。フィーダー細胞を移送パックに追加した。シリンジから移送パックにフィーダー細胞を分注した。プールされたフィーダー細胞を混合し、移送パックをラベル付けした。

20

【2258】

移送パック内のフィーダー細胞懸濁液の総体積を計算した。細胞計数試料を取り出した。各試料に別個の 3 mL シリンジを使用して、不要注入ポートを使用してフィーダー細胞懸濁液移送パックから 4 × 1.0 mL の細胞計数試料を引き出した。各試料をラベル付けされたクライオバイアルに等分した。細胞計数を行い、増倍率を決定し、プロトコルを選択し、増倍率を入力した。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定し、限界内で確認した。

30

【2259】

フィーダー細胞懸濁液の調整された体積。細胞計数試料を取り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。総生フィーダー細胞を計算した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を取得した。必要に応じて追加のフィーダー細胞を解凍した。第 4 のフィーダー細胞バッグをジップトップバッグに入れ、37.0 ± 2.0 °C の水浴または c y t o t h e r m 内で約 3 ~ 5 分間解凍し、追加のフィーダー細胞をプールした。体積を測定した。シリンジ内のフィーダー細胞の体積を測定し、以下に記録した (B)。フィーダー細胞の新しい総体積を計算した。フィーダー細胞を移送パックに追加した。

40

【2260】

必要に応じて希釈液を調製し、4.5 mL の A I M - V 培地を 4 本の 15 mL コニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。各試料に対して別個の 3 mL シリンジを使用して、不要注入ポートを使用して、フィーダー細胞懸濁液移送パックから 4 × 1.0 mL の細胞計数試料を取り出した。細胞計数及び計算を行った。行われた 4 つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。フィーダー細胞懸濁液の体積を調整し、細胞計数試料を取り出した後のフィーダー細胞懸濁液の調整された体積を計算した。4.0 mL を差し引いた総フィーダー細胞体積が取り出された。5 × 10⁹ 個の生フィーダー細胞を取得するた

50

めに必要とされたフィーダー細胞懸濁液の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞体積を計算した。取り出す過剰なフィーダー細胞の体積を計算した。過剰なフィーダー細胞を取り出した。

【2261】

1. 0 mL シリンジ及び16 G 針を使用して、0.15 mL の OKT3 を引き上げ、OKT3 を追加した。フィーダー細胞懸濁液移送パックを熱融着した。

【2262】

11日目 G-R E X 充填及びシード設定 G-R E X 500 MCS。「完全な CM2 の11日目培地」をインキュベーターから取り出し、培地を G-R E X 500 MCS にポンプで注入した。4.5 L の培地を G-R E X 500 MCS にポンプで注入し、フラスコ上にマークされたラインまで充填した。必要に応じてフラスコを熱融着し、インキュベートした。フィーダー細胞の懸濁液移送パックを、G-R E X 500 MCS に溶接した。フィーダー細胞を G-R E X 500 MCS に追加した。熱融着した。TIL 懸濁液移送パックをフラスコに溶接した。TIL を G-R E X 500 MCS に追加した。熱融着した。G-R E X 500 MCS を $37.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ でインキュベートした。CO₂ パーセンテージ： $5.0 \pm 1.5\%$ CO₂。

10

【2263】

インキュベーション時間帯を計算した。16日目にインキュベーターから G-R E X 500 MCS を取り出すための適切な時間を決定するための計算を行った。下限：インキュベーションの時間+108時間。上限：インキュベーションの時間132時間。

20

【2264】

11日目の過剰 TIL 凍結保存。該当：過剰 TIL バイアルを凍結させた。凍結前に CRF が設定されていることを検証した。凍結保存を行った。バイアルを速度制御された冷凍庫から適切な保管場所に移した。凍結の完了時に、バイアルを CRF から適切な保管容器に移した。バイアルを適切な保管場所に移した。LN₂ における保管場所を記録した。

【2265】

16日目 培地の調製 AIM-V 培地を事前に温めた。培地バッグ1、2、及び3について培地が温められた時間を計算した。すべてのバッグが12~24時間の持続時間にわたって温められていることを確実にした。上清用の10 L の Lab tainer を設定した。ルアーコネクタを使用して、流体ポンプ移送セットのより大きな直径の端部を10 L の Lab tainer バッグのメス型ポートのうちの1つに取り付けた。上清用の10 L の Lab tainer を設定し、ラベル付けした。上清用の10 L の Lab tainer を設定した。BSC から取り出す前に、すべてのクランプが閉じられていることを確実にした。注記：上清バッグは、培地調製と同時に行為得る TIL 採取中に使用された。

30

【2266】

IL-2 を解凍した。すべての氷が融解するまで、CTS AIM V 培地の1バッグ当たり IL-2 (6×10^6 IU/mL) (BR71424) の 5×1.1 mL アリコート を解凍した。100.0 mL の GlutaMax (商標) を等分した。IL-2 を GlutaMax (商標) に追加した。配合用の CTS AIM V 培地バッグを準備した。配合用の CTS AIM V 培地バッグを準備した。ステージ Baxa ポンプ。培地を配合することを準備した。GlutaMax (商標) + IL-2 をバッグにポンプで注入した。パラメータを監視した：温度 LED ディスプレイ： $37.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、CO₂ パーセンテージ： $5.0 \pm 1.5\%$ CO₂。完全な CM4 の16日目培地を温めた。希釈液を調製した。

40

【2267】

16日目の REP 分割。インキュベーターパラメータを監視した：温度 LED ディスプレイ： $37.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、CO₂ パーセンテージ： $5.0 \pm 1.5\%$ CO₂。インキュベーターから G-R E X 500 MCS を取り出した。1 L の移送パックを準備し、TIL 懸濁液としてラベル付けし、1 L の重量を量った。

【2268】

50

G-R E X 5 0 0 M C S の減容。約 4 . 5 L の培養上清を G-R E X 5 0 0 M C S から 1 0 L の L a b t a i n e r に移した。

【 2 2 6 9 】

T I L 採取用のフラスコを準備した。上清を取り出した後に、赤色ラインへのすべてのクランプを閉じた。

【 2 2 7 0 】

T I L 採取の開始。フラスコを激しく叩き、培地を旋回させて細胞を解放し、すべての細胞が引き離されていることを確実にする。

【 2 2 7 1 】

T I L 採取。T I L 懸濁液移送パックにつながるすべてのクランプを解放した。G a t h e R e x を使用して、細胞懸濁液を T I L 懸濁液移送パックの中に移した。注記：すべての細胞及び培地が収集されるまで、傾斜した縁を必ず維持すること。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。G-R E X 5 0 0 M C S 上のクランプを閉じた。T I L を含む移送パックを熱融着した。上清を含む 1 0 L の L a b t a i n e r を熱融着した。細胞懸濁液を伴う移送パックの重量を記録し、細胞懸濁液を計算した。試料を取り出すための移送パックを準備した。細胞上清から試験試料を取り出した。

10

【 2 2 7 2 】

無菌性及び B a c T 試験サンプリング。調製した B a c T ラベル付けされた 1 5 m L のコニカルから 1 . 0 m L の試料を取り出した。細胞計数試料を取り出した。B S C 内で、各試料に別個の 3 m L シリンジを使用して、「T I L 懸濁液」移送パックから 4 × 1 . 0 m L の細胞計数試料を取り出した。

20

【 2 2 7 3 】

マイコプラズマ試料を取り出した。3 m L シリンジを使用して、T I L 懸濁液移送パックから 1 . 0 m L を取り出し、調製された「マイコプラズマ希釈液」とラベル付けされた 1 5 m L コニカルチューブに入れた。

【 2 2 7 4 】

播種用の移送パックを準備した。T I L をインキュベーターに入れた。細胞懸濁液を B S C から取り出し、必要とされるまでインキュベーターに入れた。細胞計数及び計算を行った。最初に、0 . 5 m L の細胞懸濁液を調製された 4 . 5 m L の A I M - V 培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈し、1 : 1 0 希釈液を生じた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。行われた 4 つすべての計数から平均生細胞濃度を決定した。T I L 懸濁液の調整された体積。細胞計数試料を取り出した後の T I L 懸濁液の調整された体積を計算した。5 . 0 m L を差し引いた総 T I L 細胞体積が試験のために取り出された。

30

【 2 2 7 5 】

総生 T I L 細胞を計算した。播種するフラスコの総数を計算した。注記：播種する G-R E X 5 0 0 M C S フラスコの最大数は 5 であった。播種するフラスコの計算された数が 5 つを超えた場合、5 つのみが利用可能な細胞懸濁液の体積全体を使用して播種された。

【 2 2 7 6 】

40

二次培養用のフラスコの数と計算した。準備されたバッグに加えて必要とされる培地バッグの数と計算した。計算されたように必要とされる 2 つの G-R E X - 5 0 0 M フラスコ毎に「C M 4 の 1 6 日目培地」の 1 つの 1 0 L バッグを準備した。追加の培地が調製され、温められている間に、続けて第 1 の G R E X - 5 0 0 M フラスコ（複数可）を播種した。計算された数の決定された追加の培地バッグを調製し、温めた。G-R E X 5 0 0 M C S を充填した。培地をポンプで注入するように準備し、4 . 5 L の培地を G-R E X 5 0 0 M C S にポンプで注入した。熱融着した。充填を繰り返した。フラスコをインキュベートした。新しい G-R E X 5 0 0 M C S フラスコに追加する T I L 懸濁液の標的体積を計算した。フラスコの計算された数が 5 つを超える場合、5 つのみが細胞懸濁液の体積全体を使用して播種されるであろう。播種用のフラスコを準備した。インキュベーターから

50

G-R E X 5 0 0 M C S を取り出した。ポンプで注入するための G-R E X 5 0 0 M C S を準備した。大型フィルターラインを除くすべてのクランプを閉じた。インキュベーターから T I L を取り出した。播種用の細胞懸濁液を調製した。(プロセス注記 5.11 に従って)「T I L 懸濁液」移送パックをポンプ入口ラインに滅菌溶接した。T I L 懸濁液バッグを秤の上に置いた。

【2277】

フラスコに T I L 懸濁液を播種した。計算された T I L 懸濁液の体積をフラスコにポンプで注入した。熱融着した。残りのフラスコを充填した。

【2278】

インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ：温度 L E D ディスプレイ：37.0 ± 2.0 °C、CO₂ パーセンテージ：5.0 ± 1.5 % CO₂。フラスコをインキュベートした。

【2279】

22 日目にインキュベーターから G-R E X 5 0 0 M C S を取り出す時間範囲を決定した。

【2280】

22 日目 洗浄緩衝液の調製 10 L の L a b t a i n e r バッグを準備した。B S C 内で、ルアー接続を介して 4 インチ血漿移送セットを 10 L の L a b t a i n e r バッグに取り付けた。10 L の L a b t a i n e r バッグを準備した。B S C から外に移す前に、すべてのクランプを閉じた。注記：採取される 2 つの G-R E X 5 0 0 M C S フラスコ毎に、1 つの 10 L L a b t a i n e r バッグを準備した。P l a s m a l y t e を 3 0 0 0 m L バッグにポンプで注入し、ポンプを反転させてバッグの位置を操作することによって、3 0 0 0 m L の O r i g e n バッグから空気を除去した。ヒトアルブミン 25 % を 3 0 0 0 m L のバッグに追加した。120.0 m L の最終体積のヒトアルブミン 25 % を取得する。

【2281】

I L - 2 希釈液を調製した。10 m L シリンジを使用して、L O V O 洗浄緩衝液バッグ上の無針注入ポートを使用して、5.0 m L の L O V O 洗浄緩衝液を取り出した。L O V O 洗浄緩衝液を 50 m L のコニカルチューブに分注した。

【2282】

等分された C R F ブランクバッグ L O V O 洗浄緩衝液。100 m L のシリンジを使用して、無針注入ポートから 70.0 m L の L O V O 洗浄緩衝液を引き上げた。

【2283】

すべての氷が融解するまで、1 つの 1.1 m L の I L - 2 (6 × 10⁶ I U / m L) を解凍した。50 μ L の I L - 2 ストック (6 × 10⁶ I U / m L) を「I L - 2 希釈液」とラベル付けされた 50 m L のコニカルチューブに追加した。

【2284】

凍結保存調製。5 つのクライオカセットを 2 ~ 8 °C に置き、最終製品の凍結保存のためにそれらを前調整した。

【2285】

細胞計数希釈液を調製した。B S C 内で、ロット番号及び「細胞計数希釈液用」でラベル付けされた 4.5 m L の A I M - V 培地を、4 本の別個の 15 m L コニカルチューブに追加した。細胞計数を準備した。4 つのクライオバイアルをバイアル番号 (1 ~ 4) でラベル付けした。使用される B S C の下でバイアルを保存した。

【2286】

22 日目 T I L 採取インキュベーターを監視した。インキュベーターパラメータ温度 L E D ディスプレイ：37 ± 2.0 °C、CO₂ パーセンテージ：5 % ± 1.5 %。インキュベーターから G-R E X 5 0 0 M C S フラスコを取り外した。T I L 収集バッグを準備し、ラベル付けした。余分な接続を密封した。減容：約 4.5 L の上清を G-R E X 5 0 0 M C S から上清バッグに移した。

10

20

30

40

50

【2287】

T I L採取用のフラスコを準備した。T I Lの収集を開始した。フラスコを激しく叩き、培地旋回させて細胞を解放した。すべての細胞が引き離されていることを確実にした。T I Lの収集を開始した。T I L懸濁液収集バッグにつながるすべてのクランプを解放した。T I L採取。G a t h e R e xを使用して、T I L懸濁液を3000 mLの収集バッグに移した。付着した細胞について膜を点検した。フラスコ膜をすすいだ。G - R e x 500 M C S上のクランプを閉じ、すべてのクランプが閉じていることを確実にした。細胞懸濁液をL O V Oソースバッグの中に移した。すべてのクランプを閉じた。熱融着した。4 × 1.0 mLの細胞計数試料を取り出した。

【2288】

細胞計数を行った。N C - 200及びプロセス注記5.14を利用して、細胞計数及び計算を行った。最初に、0.5 mLの細胞懸濁液を調製された4.5 mLのA I M - V培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈した。これは、1:10希釈液を生じた。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。計数の上限及び下限を決定した。行われた細胞計数の平均生存率、生細胞濃度、及び総有核細胞濃度を決定した。L O V Oソースバッグの重量を量った。総生T I L細胞を計算した。総有核細胞を計算した。

【2289】

マイコプラズマ希釈液を調製した。ルアー試料ポートを介して1つの上清バッグから10.0 mLを取り出し、15 mLコニカルに入れた。

【2290】

「T I L G - R E X採取」プロトコルを行い、最終製品の標的体積を決定した。使い捨てキットを装填した。濾液バッグを取り出した。濾液容量を入力した。濾液容器をベンチトップの上に置いた。P l a s m a L y t eを取り付けた。P l a s m a L y t eが取り付けられていることを検証し、P l a s m a L y t eが動いていることを観察した。ソース容器をチューブに取り付け、ソース容器が取り付けられていることを検証した。P l a s m a L y t eが動いていることを確認した。

【2291】

最終製剤及び充填標的体積／バッグの計算。ブランクバッグを配合するためのC S - 10及びL O V O洗浄緩衝液の体積を計算した。C R Fブランクを調製した。

【2292】

最終製品に追加するI L - 2の体積を計算した。所望される最終I L - 2濃度 (I U / mL) - 300 I U / mL。I L - 2作業ストック: 6×10^4 I U / mL。接続装置を組み立てた。4 S - 4 M 60をC C 2細胞接続に滅菌溶接した。C S 750クライオバッグを準備したハーネスに滅菌溶接した。C S - 10バッグを4 S - 4 M 60のスパイクに溶接した。I L - 2とともにT I L調製した。適切なサイズのシリンジを使用して、「I L - 2 6×10^4 」アリコートから決定されたI L - 2の量を取り出した。配合されたT I Lバッグをラベル付けした。配合されたT I Lバッグを装置に追加した。C S 10を追加した。シリンジを交換した。約10 mLの空気を100 mLのシリンジに引き込み、装置上の60 mLシリンジを交換した。C S 10を追加した。C S - 750バッグを準備した。細胞を分注した。

【2293】

最終製品バッグから空気を除去し、保持液を得た。最後の最終製品バッグが充填されると、すべてのクランプを閉じた。10 mLの空気を新しい100 mLシリンジに引き込み、装置のシリンジを交換する。保持液を50 mLコニカルチューブに分注し、管を「保持液」及びロット番号としてラベル付けした。各バッグについて空気除去ステップを繰り返した。

【2294】

目視検査を含み、凍結保存のための最終製品を調製した。凍結保存までクライオバッグを低温パック上で、または2 ~ 8 °Cで保持した。

10

20

30

40

50

【 2 2 9 5 】

細胞計数試料を取り出した。適切なサイズのピペットを使用して、2.0 mLの保持液を取り出し、細胞計数に使用されるように15 mLコニカルチューブに入れる。細胞計数及び計算を行った。注記：1つだけの試料を適切な希釈に希釈し、希釈が十分であることを検証した。追加の試料を適切な希釈倍率に希釈し、計数を進めた。行われた細胞計数の生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。注記：希釈は、細胞の期待濃度に基づいて調整され得る。生細胞濃度及び生存率の平均を決定した。計数の上限及び下限を決定した。IFN- γ を計算した。最終製品バッグを熱融着した。

【 2 2 9 6 】

以下の例示的試料計画に従って試料をラベル付けし、収集した。

【 2 2 9 7 】

【表 4 1】

表 4 0. 試料計画。

試料	容器の 数	各々に 追加する 試料体積	容器 タイプ
*マイコプラズマ	1	1.0 mL	15mL コニカル
内毒素	2	1.0 mL	2mL クライオバイアル
グラム染色	1	1.0 mL	2mL クライオバイアル
IFN- γ	1	1.0 mL	2mL クライオバイアル
フローサイトメトリー	1	1.0 mL	2mL クライオバイアル
**Bac-T 無菌性	2	1.0 mL	Bac-T ボトル
QC 保持	4	1.0 mL	2mL クライオバイアル
サテライトバイアル	10	0.5 mL	2mL クライオバイアル

【 2 2 9 8 】

無菌性及びBac-T試験。試験サンプリング。BSC内で、適切なサイズのシリンジを使用して収集された保持細胞懸濁液から1.0 mLの試料を取り出し、嫌気性ボトルに接種する。好気性ボトルについて上記を繰り返す。

【 2 2 9 9 】

最終製品の凍結保存。制御速度冷凍庫（CRF）を準備した。CRFが設定されていることを検証した。CRFプローブを設定した。最終製品及び試料をCRFに入れた。4℃ $\pm$ 1.5℃に達し、CRF実行を進めるために必要な時間を決定した。CRFが完了し、保管された。実行の完了後にCRFを停止させた。カセット及びバイアルをCRFから取り出した。保存のためにカセット及びバイアルを蒸気相LN₂に移した。保管場所を記録した。

【 2 3 0 0 】

最終医薬品の後処理及び分析には、以下の試験が含まれた：（22日目）フローサイトメトリーによる22日目REPのCD3+細胞の決定、（22日目）グラム染色法（GMP）、（22日目）ゲルクロットLALアッセイ（GMP）による細菌内毒素試験、（16日目）Bac-T滅菌アッセイ（GMP）、（16日目）TD-PCRによるマイコプラズマDNA検出（GMP）、許容される外観属性、（22日目）Bac-T滅菌アッセイ（

GMP) (22日目)、(22日目) IFN-ガンマアッセイ。本明細書に記載の他の効力アッセイもまた、TIL製品を分析するために用いられる。

【2301】

実施例8：GEN3拡張プラットフォームの例示的な実施形態

0日目

腫瘍洗浄培地を調製した。培地を開始前に温めた。5 mLのゲンタマイシン (50 mg / mL) を500 mLボトルのHBSSに添加した。5 mLの腫瘍洗浄培地を、OKT3希釈に使用する15 mLのコニカルチューブに添加した。フィーダー細胞バッグを調製した。フィーダー細胞をフィーダー細胞バッグに無菌で移し、使用するまで37℃で保管するか、または凍結させた。37℃の場合、フィーダー細胞をカウントした。凍結した場合は、解凍した後、フィーダー細胞をカウントした。

10

【2302】

フィーダー細胞濃度の最適範囲は、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞 / mLである。4.5 mLのAIM-Vを含む4つのコニカルチューブを準備した。各細胞計数について0.5 mLの細胞画分を追加した。総生フィーダー細胞数が 1×10^9 細胞以上であった場合、進んでフィーダー細胞濃度を調整した。フィーダー細胞の体積を計算し、第1のフィーダー細胞バッグから取り出して、 1×10^9 細胞を第2のフィーダー細胞バッグに添加した。

【2303】

p1000マイクロピペットを使用して、900 μ Lの腫瘍洗浄培地をOKT3アリコート (100 μ L) に移した。シリンジ及び滅菌技法を使用して、0.6 mLのOKT3を吸引し、第2のフィーダー細胞バッグに添加した。培地体積を全体積2 Lに調整した。第2のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。

20

【2304】

OKT3製剤の詳細：OKT3は、100 μ Lアリコート中のバイアル (1 mg / mL) からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。1 mLバイアル当たり約10 $\times$ アリコート。-80℃で保管した。0日目：15 μ g / フラスコ、すなわち500 mL中30 ng / mL $\sim$ 60 μ L 最大約1アリコート。

【2305】

5 mLの腫瘍洗浄培地を、過剰腫瘍片とラベル付けした6ウェルプレートのすべてのウェルに添加した。解剖中に腫瘍を水和状態に保持する際に、腫瘍洗浄培地をさらなる使用のために利用可能にした。50 mLの腫瘍洗浄培地を、各100 mmペトリ皿に追加した。

30

【2306】

解剖皿のふたの下で定規を参照として使用して、腫瘍を27 mm³ 断片 (3 $\times$ 3 $\times$ 3 mm) に解剖した。60個の断片に達するまで中間断片を解剖した。生成した最終断片の数に応じて、最終断片の総数を計数し、G-REX-100 MCS フラスコを調製した (一般に、1 フラスコ当たり60個の断片)。

【2307】

断片チューブ1 $\sim$ 断片チューブ4とラベル付けしたコニカルチューブ内に好ましい組織断片を保持した。起源とする断片チューブの数に応じて、フィーダー細胞懸濁液を播種するG-REX-100 MCS フラスコの数进行計算した。

40

【2308】

フィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出し、G-REX-100 MCS を播種する。D0 (0日目) とラベル付けする。

【2309】

G-REX-100 MCS 中の培養物への腫瘍断片の追加滅菌条件下で、腫瘍断片培養物 (D0) 1とラベル付けしたG-REX-100 MCS 及び断片チューブとラベル付けした50 mLのコニカルチューブのキャップを緩めた。開いた断片チューブ1を回転させ、同時にG-REX 100 MCS のキャップをわずかに持ち上げた。断片を含む培地を、

50

回転している間に G-R E X 1 0 0 M C S に追加した。G-R E X 1 0 0 M C S に移送された断片の数を記録した。

【2310】

断片が G R E X フラスコの底に配置された時点で、7 mL の培地を吸引し、7 つの 1 mL アリコートを作製した（拡張された特徴付け用に 5 mL、滅菌試料用に 2 mL）。拡張された特徴付け用の 5 つのアリコート（最終断片培養上清）を、必要になるまで -20℃ で保管した。

【2311】

1 本の嫌気性 B a c T / A l e r t ボトル及び 1 本の好気性 B a c T / A l e r t ボトルに各々 1 mL の最終断片培養上清を接種した。サンプリングしたフラスコ毎に繰り返す。

10

【2312】

7 日目～8 日目

フィーダー細胞バッグを調製した。凍結時に 37℃ の水浴中で 3～5 分間フィーダーバッグを解凍した。凍結している場合、フィーダー細胞を計数した。フィーダー細胞濃度の最適範囲は、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/mL である。4.5 mL の A I M - V を含む 4 つのコニカルチューブを準備した。各細胞計数について 0.5 mL の細胞画分を新しいクライオバイアル管に追加した。試料を十分に混合し、細胞計数を続けた。

【2313】

総生フィーダー細胞数が 2×10^9 細胞以上であった場合、次のステップに進んでフィーダー細胞濃度を調整した。フィーダー細胞の体積を計算し、第 1 のフィーダー細胞バッグから取り出して、 2×10^9 細胞を第 2 のフィーダー細胞バッグに追加した。

20

【2314】

p1000 マイクロピペットを使用して、900 µL の H B S S を 100 µL の O K T 3 アリコートに移す。上下に 3 回ピペッティングして混合する。2 つのアリコートを調製した。

【2315】

O K T 3 製剤の詳細：O K T 3 は、100 µL アリコート中のバイアル（1 mg/mL）からの元のストック濃度でアリコートされ、凍結されてもよい。1 mL バイアル当たり約 $10 \times$ アリコート。-80℃ で保管した。7 日目／8 日目：30 µg / フラスコ、すなわち 500 mL 中 60 ng/mL $\sim$ 120 µL 最大約 2 アリコート。

30

【2316】

シリンジ及び滅菌技法を使用して、0.6 mL の O K T 3 を吸引し、フィーダー細胞バッグに添加して、すべて添加されたことを確認した。培地量を合計 2 L に調整した。第 2 の O K T 3 アリコートで繰り返し、フィーダー細胞バッグに追加した。第 2 のフィーダー細胞バッグをインキュベーターに移した。

【2317】

フィーダー細胞懸濁液を含む G-R E X 1 0 0 M C S フラスコの準備。0 日目に生成された G-R E X フラスコの数に従って処理するために G-R E X - 1 0 0 M C S フラスコの数記録した。G-R E X フラスコをインキュベーターから取り出し、第 2 のフィーダー細胞バッグをインキュベーターから取り出した。

40

【2318】

フィーダー細胞懸濁液を添加する前の上清の除去：1 本の 10 mL シリンジを G-R E X 1 0 0 フラスコに接続し、5 mL の培地を引き上げた。5 つの 1 mL アリコート（拡張された特徴付け用に 5 mL）を作製し、治験依頼者からの要求があるまで、拡張された特徴付け用に 5 つのアリコート（最終断片培養上清）を -20℃ で保管した。各 G-R E X 1 0 0 フラスコにラベル付けし、繰り返した。

【2319】

フラスコの数に応じた、特徴付け用の 5～20 × 1 mL 試料：

● 5 mL = 1 フラスコ

50

- 10 mL = 2 フラスコ
- 15 mL = 3 フラスコ
- 20 mL = 4 フラスコ

【2320】

フィーダー細胞を G-R E X 1 0 0 M C S に播種し続け、G-R E X 1 0 0 M C S フラスコ毎に繰り返した。無菌移送法を使用して、各 G-R E X - 1 0 0 M C S フラスコに重量で 500 mL の第 2 のフィーダー細胞バッグを重力移送し（1 g = 1 mL と想定）、量を記録した。7 日目培養とラベル付けし、G-R E X 1 0 0 フラスコ毎に繰り返した。G-R E X - 1 0 0 M C S フラスコをインキュベーターに移した。

【2321】

10

10 ~ 11 日目

第 1 の G-R E X - 1 0 0 M C S フラスコを取り出し、滅菌条件を使用して、10 mL シリンジを使用して 7 mL の前処理培養上清を取り出した。7 つの 1 mL アリコートを作製した（拡張された特徴付け用に 5 mL、滅菌試料用に 2 mL）。

【2322】

フラスコを注意深く混合し、新たな 10 mL シリンジを使用して 10 mL の上清を取り出し、D 1 0 / 1 1 マイコプラズマ上清とラベル付けした 15 mL のチューブに移す。

【2323】

フラスコを注意深く混合し、新しい注射器を使用して、処理されるフラスコの数に応じて以下の量を除去した。

20

- 1 フラスコ = 40 mL
- 2 フラスコ = 20 mL / フラスコ
- 3 フラスコ = 13.3 mL / フラスコ
- 4 フラスコ = 10 mL / フラスコ

【2324】

合計 40 mL をすべてのフラスコから取り出し、「10 / 11 日目 Q C 試料」とラベル付けした 50 mL のコニカルチューブにプールし、必要になるまでインキュベーター内で保管すべきである。細胞計数を行い、細胞を割り当てた。

【2325】

必要になるまで -20 °C 以下で拡張された特徴付けのために 5 つのアリコート（前処理培養上清）を保管した。1 本の嫌気性 B a c T / A l e r t ボトル及び 1 本の好気性 B a c T / A l e r t ボトルに各々 1 mL の前処理培養上清を接種した。

30

【2326】

細胞懸濁液を G-R E X - 5 0 0 M C S に移し、G-R E X - 1 0 0 M C S 毎に繰り返した。滅菌条件を使用して、各 G-R E X - 1 0 0 M C S の内容物を G-R E X - 5 0 0 M C S に移し、一度に約 100 mL の液体移送を監視した。G-R E X - 1 0 0 M C S の容量が 500 mL に低減したとき、移送を停止した。

【2327】

移送ステップ中、10 mL シリンジを使用し、G-R E X - 1 0 0 M C S からシリンジに 10 mL の細胞懸濁液を引き上げた。培養中のフラスコの数に従って指示に従った。1 つのフラスコの場合：2 つのシリンジを使用して合計 20 mL を取り出した。フラスコが 2 つの場合：1 フラスコ当たり 10 mL を取り出した。フラスコが 3 つの場合：1 フラスコ当たり 7 mL を取り出した。フラスコが 4 つの場合：1 フラスコ当たり 5 mL を取り出した。細胞懸濁液を 1 本の一般的な 50 mL のコニカルチューブに移した。細胞計数ステップ及び Q C 試料までインキュベーター内で保管する。Q C に必要な細胞の総数は、約 2.0×10^6 細胞であった：4 × 0.5 mL の細胞数（細胞数を最初に希釈しなかった）。

40

【2328】

アッセイに必要な細胞の量は、以下の通りである。

1. 本明細書に記載されるものなどの効力アッセイ、または I F N - γ もしくはグランザイム B アッセイのための最小 1.0×10^6 細胞

50

2. マイコプラズマのための 1×10^6 細胞

3. CD3+ / CD45+ のためのフローサイトメトリーのための 5×10^6 細胞

【2329】

G-R E X - 5 0 0 M C S フラスコをインキュベーターに移した。

【2330】

QC 試料を調製した。この実施形態のアッセイには少なくとも 15×10^8 細胞が必要であった。アッセイは、細胞数及び生存率、マイコプラズマ (1×10^6 細胞 / 平均生存濃度)、フロー (5×10^6 細胞 / 平均生存濃度) 及び IFN- γ アッセイ (5×10^6 細胞 $\sim 1 \times 10^6$ 細胞を含み、 $8 \sim 10 \times 10^6$ 細胞が、IFN- γ アッセイに必要なである。

10

【2331】

10×10^6 細胞 / mL で凍結保存のための細胞画分の体積を計算し、調製するバイアルの数を計算した。

【2332】

16 ~ 17 日目

洗浄緩衝液の調製 (1% HSA PlasmaLyte A)。HSA 及び PlasmaLyte を 5 L バッグに移して、LOVO 洗浄緩衝液を作製した。滅菌条件を使用して、総体積 125 mL の 25% HSA を 5 L バッグに移した。10 mL または 40 mL の洗浄緩衝液を取り出し、「IL-2 6×10^4 IU / mL」チューブに移した (IL-2 を事前に調製した場合は 10 mL、IL-2 を新たに調製した場合は 40 mL)。

20

【2333】

PlasmaLyte + 1% HSA に添加する再構成 IL-2 の量を計算した：再構成 IL-2 の量 = (IL-2 の最終濃度 $\times$ 最終量) / IL-2 の比活性 (標準アッセイに基づく)。IL-2 の最終濃度は、 6×10^4 IU / mL であった。最終体積は、40 mL であった。

【2334】

再構成 IL-2 に必要な IL-2 の計算された初期体積を取り出し、「IL-2 6×10^4 IU / mL」チューブに移した。事前に調製したアリコートから 100 μ L の IL-2 6×10^6 IU / mL を、10 mL の LOVO 洗浄緩衝液を含有する「IL-2 6×10^4 IU / mL」とラベル付けしたチューブに追加した。

30

【2335】

約 4500 mL の上清を G-R E X - 5 0 0 M C S フラスコから取り出した。残りの上清を回転させ、細胞を細胞収集プールバッグに移した。すべての G-R E X - 5 0 0 M C S フラスコで繰り返した。

【2336】

60 mL の上清を除去し、マイコプラズマ検出を含む品質管理アッセイのために上清チューブに添加した。+2 ~ 8 $^{\circ}$ C で保管した。

【2337】

細胞収集細胞を計数した。4. 5 mL の AIM-V を含む 4 つの 15 mL コニカルチューブを準備する。これらは、事前に準備してもよい。最適な範囲は、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞 / mL である。(1 : 10 希釈が推奨された)。1 : 10 希釈の場合、事前に調製した 4500 μ L の AIM-V に、500 μ L の CF を追加する。希釈倍率を記録した。TC (総細胞) LOVO 前 (生 + 死) を計算した =

40

平均総細胞

濃度 (TC 濃度 LOVO 前)

(生 + 死)

X

ソースバッグの体積

TV C (総生細胞) LOVO 前 (生) を計算した =

平均総生細胞

50

濃度 (TVC LOVO前)
(生)

X

LOVOソースバッグの体積

【2338】

総細胞 (TC) 数が 5×10^9 超であった場合、 5×10^8 細胞を取り出して、MDA 保持試料として凍結保存する。 $5 \times 10^8 \div$ 平均 TC 濃度 (ステップ 14.44) = 取り出す体積

【2339】

総細胞 (TC) 数が 5×10^9 以下であった場合、 4×10^6 細胞を取り出して、MDA 保持試料として凍結保存する。 $4 \times 10^6 \div$ 平均 TC 濃度 = 取り出す体積。

10

【2340】

総細胞数が決定された場合、取り出す細胞の数は、 150×10^9 生細胞の保持を可能にすべきである。TVC LOVO前 5×10^8 もしくは 4×10^6 を確認するか、または該当なしである。取り出す細胞の体積量を計算した。

【2341】

バッグに残っている残りの総細胞を計算した。TC (総細胞) LOVO前を計算した。

[平均総細胞濃度 $\times$ 残りの体積 = 残りの TC LOVO前] を計算した。

【2342】

残存する細胞の総数に従って、表 41 の対応するプロセスを選択する。

20

【2343】

【表 42】

表 41. セルの総数。

総細胞:	保持液(mL)
$0 < \text{総細胞} \leq 31 \times 10^9$	115
$31 \times 10^9 < \text{総細胞} \leq 71 \times 10^9$	165
$71 \times 10^9 < \text{総細胞} \leq 110 \times 10^9$	215
$110 \times 10^9 < \text{総細胞} \leq 115 \times 10^9$	265

30

【2344】

使用したプロセスに対応して添加する IL-2 の量を選択する。次のように計算された体積: 保持量 $\times 2 \times 300 \text{ IU} / \text{mL} =$ 必要とされる IL-2 の IU。必要な IL-2 の IU $\div 6 \times 10^4 \text{ IU} / \text{mL} =$ LOVO後バッグに追加する IL-2 の体積。添加したすべての体積を記録した。さらなる分析のために試料をクライオバイアル内に得た。

40

【2345】

細胞製品を十分に混合した。該当する場合、凍結保存を含むさらなる処理のためにすべてのバッグを密封した。

【2346】

得られたクライオバイアル試料に対して、内毒素、IFN- γ 、無菌性、及び必要に応じて他のアッセイを行った。

【2347】

実施例 9: GEN2 及び GEN3 の例示的なプロセス

50

この実施例は、Gen 2 及び Gen 3 のプロセスを示す。Gen 2 プロセス及び Gen 3 プロセスの TIL は、一般に腫瘍の外科的切除によって個々の患者から得られ、その後、エキスピボで拡張された自己 TIL で構成されている。Gen 3 プロセスのプライミングによる第 1 の拡張ステップは、インターロイキン-2 (IL-2) 及びモノクローナル抗体 OKT3 の存在下での細胞培養であり、放射線照射された末梢血単核細胞 (PBMC) の足場上の T 細胞共受容体 CD3 を標的とする。

【2348】

Gen 2 TIL 製品の製造は、2つの相からなる：1) 急速拡張前 (REP 前) 及び 2) 急速拡張プロトコル (REP)。REP 前中に、切除腫瘍を、各寸法 2~3 mm の 50 個以下の断片に切断し、血清含有培養培地 (10% HuSAB を補充した RPMI 1640 培地) 及び 6,000 IU/mL のインターロイキン-2 (IL-2) で 11 日間培養した。11 日目に TIL を採取し、大規模二次 REP 拡張に導入した。REP は、5 日間の 3,000 IU/mL の rhIL-2 を補充した 5 L 体積の CM2 中の 150 µg のモノクローナル抗 CD3 抗体 (OKT3) を装填した 5×10^9 個の放射線照射された同種異系 PBMC フィーダー細胞の共培養における REP 前由来の 200×10^6 個以下の生細胞の活性化からなる。16 日目に、培養物の体積を 90% 減少させ、細胞画分を 1 フラスコ当たり 1×10^9 個以上の生リンパ球で複数の G-REX-500 フラスコに分割し、CM4 で 5 L に QS する。TIL をさらに 6 日間インキュベートする。REP を 22 日目に採取し、洗浄し、製剤化し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に -150°C で発送する。

【2349】

Gen 3 TIL 製品の製造は、3つの相からなる：1) プライミングによる第 1 の拡張プロトコル、2) 急速な第 2 の拡張プロトコル (急速拡張相または REP とも称される)、及び 3) 継代培養分割。プライミングによる第 1 の拡張 TIL 増殖を行うために、切除した腫瘍を各寸法 2~3 mm 以下の 120 個以下の断片に切断した。プライミングによる第 1 の拡張の 0 日目に、OKT-3 を装填したおよそ 2.5×10^8 個の照射された同種異系 PBMC フィーダー細胞のフィーダー層を、3つの 100 MCS 容器の各々内のおよそ 100 cm^2 の面積上に確立した。腫瘍断片を、各々が 500 mL の血清含有 CM1 培養培地及び 6,000 IU/mL のインターロイキン-2 (IL-2) 及び 15 µg の OKT-3 を含む 3つの 100 MCS 容器に分布し、その中で 7 日間培養した。7 日目に、OKT-3 を負荷したおよそ 5×10^8 個の同種異系の放射線照射された PBMC フィーダー細胞の追加のフィーダー細胞層を、3つの 100 MCS 容器の各々において腫瘍断片化培養相に組み込み、500 mL の CM2 培養培地及び 6,000 IU/mL の IL-2 及び 30 µg の OKT-3 で培養することによって REP を開始した。REP の開始を、100 MCS 容器への OKT3 を装填したフィーダー細胞の閉鎖系流体移送を使用して、同じ容器内のプライミングによる第 1 の拡張培養物全体を活性化することによって増強した。Gen 3 の場合、TIL のスケールアップまたは分割に、細胞培養物全体を閉鎖系流体移送によってより大きい容器にスケールアップし、移し (100 M フラスコから 500 M フラスコに)、追加の 4 L の CM4 培地を添加するプロセスステップを含めた。16 日目に REP 細胞を採取し、洗浄し、製剤化し、凍結保存した後に、注入のために臨床現場に -150°C で発送する。

【2350】

全体として、Gen 3 プロセスは、より短く、よりスケラブルであり、かつ簡単に修正可能な拡張プラットフォームであり、堅牢な製造及びプロセス比較可能性に適するように適応する。

【2351】

10

20

30

40

【表 4 3】

表 5 0. 例示的な Gen 2 及び例示的な Gen 3 製造プロセスの比較。

ステップ	プロセス(Gen2)	プロセス(Gen3)
REP 前- 0 日目	最大 50 個の断片、1 つの G- REX-100MCS 11 日 1L の CM1 培地 + IL-2 (6000 IU/mL)	全腫瘍最大 120 個の断片を最大 3 つのフ ラスコに均等に分割した。1 つのフラス コ:1~60 個の断片 2 つのフラスコ 61~89 個の断片 3 つのフラスコ:90~120 個の断片 500mL の CM1 培地中、7 日間 + IL-2 (6000 IU/mL) 2.5×10^8 フィーダー細胞/フラスコ 15ug OKT-3/フラスコ
REP 開始	REP に指向する、11 日目、 < 200×10^6 TIL (1)5L CM2 培地中の G-REX- 500MCS IL-2 (3000 IU/mL) 5×10^9 フィーダー細胞 150ug OKT-3	REP に指向する、7 日目、すべての細 胞、同じ G-REX-100MCS 500CM2 培地を添加する IL-2(6000IU/mL) 5×10^8 フィーダー細胞/フラスコ 30ug OKT-3/flask
TIL の増殖 またはスケ ールアップ	減容し、細胞画分を最大 5 つ の G-REX-500MCS に分割する 4.5L CM4 培地+IL- 2(3000IU/mL) $\geq 1 \times 10^9$ TVC/フラスコ 16 日目に分割する	各 G-REX-100MCS(1L)が 1 つの G-REX- 500MCS に移行する 4L の CM4 培地+IL-2(3000IU/mL)を添加 する 9~11 日目にスケールアップする
採取	22 日目に採取する LOVO-自動細胞洗浄機	16 日目に採取する LOVO 自動細胞洗浄機
最終製剤	凍結保存した製品 LN ₂ 中の 300IU/mL の IL2- CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN ₂ 中 300IU/mL の IL-2-CS10、 複数のアリコート
プロセス 時間	22 日	16 日

【2 3 5 2】

0 日目に、両方のプロセスについて、腫瘍を 3 回洗浄し、断片をランダム化し、2 つのプールに分けた（プロセス毎に 1 つのプール）。Gen 2 プロセスの場合、断片を、6, 000 IU/mL の rhIL-2 を含有する 1 L の CM1 培地を含む 1 つの G R E X 1 0 0 M C S フラスコに移した。Gen 3 プロセスでは、断片を、6, 000 IU/mL の rhIL-2、15 ug の OKT-3 及び 2.5×10^8 個のフィーダー細胞を含有する 500 mL の CM1 を含む 1 つの G-REX-100MCS フラスコに移した。Rep 開始日の TIL の播種は、各プロセスに従って異なる日に起こった。G-REX-100MCS フラスコを 90% 減容させた Gen 2 プロセスの場合、収集した細胞懸濁液を新たな G

ー R E X - 5 0 0 M C S に移して、I L - 2 (3 0 0 0 I U / m L) + 5 × 1 0 ⁹ フィーダー細胞及び O K T - 3 (3 0 n g / m L) を含有する C M 2 培地中で 1 1 日目に R E P を開始した。細胞が拡張し、プロトコルに従って 1 6 日目に I L - 2 (3 0 0 0 I U / m L) を有する C M 4 培地を含む複数の G - R E X - 5 0 0 M C S フラスコに分割した。その後、培養物を採取し、プロトコルに従って 2 2 日目に凍結保存した。G e n 3 プロセスの場合、R E P の開始は 7 日目に起こり、同じ G - R E X - 1 0 0 M C S を R E P の開始に使用した。簡潔には、I L - 2 (6 0 0 0 I U / m L) 及び 5 × 1 0 ⁸ 個のフィーダー細胞を 3 0 u g の O K T - 3 とともに含有する 5 0 0 m L の C M 2 培地を各フラスコに添加した。9 ~ 1 1 日目に、培養をスケールアップした。G - R E X 1 0 0 M の全体積 (1 L) を G - R E X - 5 0 0 M C S に移し、I L - 2 (3 0 0 0 I U / m L) を含有する 4 L の C M 4 を添加した。フラスコを 5 日間インキュベートした。培養物を採取し、1 6 日目に凍結保存した。

10

【 2 3 5 3 】

比較には、2 つの肺腫瘍 (L 4 0 5 4 及び L 4 0 5 5) と 1 つの黒色腫瘍 (M 1 0 8 5 T) の 3 つの異なる腫瘍を含めた。

【 2 3 5 4 】

L 4 0 5 4 及び L 4 0 5 5 の場合、C M 1 培地 (培養培地 1) 、C M 2 培地 (培養培地 2) 、及び C M 4 培地 (培養培地 4) を事前に調製し、4 ° C で保持した。C M 1 培地及び C M 2 培地を、培地を濾過した場合の細胞増殖と培地を濾過しなかった場合の細胞増殖を比較するために、濾過せずに調製した。

20

【 2 3 5 5 】

L 4 0 5 5 腫瘍の場合、R E P の開始及びスケールアップ時に、培地を事前に 3 7 ° C で最大 2 4 時間温めた。

【 2 3 5 6 】

結果達成された生細胞の総数について、G e n 3 の結果は G e n 2 の 3 0 % 以内であった。G e n 3 最終製品は、再刺激後により高い I N F - γ 産生を示した。G e n 3 最終製品は、存在する固有の全 C D R 3 配列によって測定される、増加したクローンの多様性を示した。G e n 3 最終製品は、より長い平均テロメア長を示した。

【 2 3 5 7 】

G e n 2 及び G e n 3 プロセスでの R E P 前及び R E P 拡張は、上記の手順に従った。各腫瘍について、2 つのプールに同数の断片を含めた。腫瘍のサイズが小さいため、1 フラスコ当たりの最大断片数は達成されなかった。総 R E P 前細胞 (T V C) を採取し、G e n 2 プロセスの場合は 1 1 日目に、G e n 3 プロセスの場合は 7 日目に計数した。2 つの R E P 前群を比較するために、細胞計数を培養物中に提供された断片の数で割り、1 断片当たりの平均生細胞を計算した。以下の表 5 1 に示されるように、G e n 2 プロセスは、G e n 3 プロセスと比較して、1 断片当たりより多くの細胞を一貫して成長させた。R E P 前 T V C を 7 で割り、その後、1 1 を掛けて計算した、1 1 日目に G e n 3 プロセスで予想される T V C 数の外挿計算。

30

【 2 3 5 8 】

40

50

【表 4 4】

表 5 1. R E P 前の細胞計数

腫瘍 ID	L4054		L4055*		M1085T	
プロセス	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
REP 前 TVC	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
断片数	21	21	24	24	16	16
REP 前における断片 当たりの平均 TVC	6.65E+06	2.06E+06	1.12E+06	5.75E+05	7.66E+05	2.18E+05
11 日目の REP 前に おける Gen3 外挿値	N/A	6.79E+07	N/A	2.17E+07	N/A	5.49E+06

10

* L 4 0 5 5、濾過されていない培地。

【 2 3 5 9】

G e n 2 及び G e n 3 プロセスの場合、T V C をプロセス条件毎に計数し、生細胞パーセントをプロセス日毎に生成した。採取時に、22日目（G e n 2）及び16日目（G e n 3）の細胞を収集し、T V C 数を確立した。その後、T V C を0日目に提供された断片の数で割り、1断片当たりの平均生細胞を計算した。倍率拡張を、採取したT V C を R E P 開始T V C で割ることによって計算した。表 5 2 に示されるように、G e n 2 と G e n 3 を比較すると、倍率拡張は L 4 0 5 4 の場合では同様であり、L 4 0 5 5 の場合、倍率拡張は G e n 2 プロセスの方が高かった。具体的には、この場合、培地を R E P 開始日の前に24温めた。M 1 0 8 5 T の場合の G e n 3 でもより高い倍率拡張が観察された。R E P T V C を16で割り、その後、22を掛けて計算した、22日目に G e n 3 プロセスで予想されるT V C 数の外挿計算。

20

【 2 3 6 0】

30

40

50

【表 4 5】

表 5 2. T I L 最終製品の総生細胞数及び倍率拡張。

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
プロセス	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
断片数	21	21	24	24	16	16
TVC/断片(採取時)	3.18E+09	8.77E+08	2.30E+09	3.65E+08	7.09E+08	4.80E+08
REP 開始	1.42E+08	4.32E+07	2.68E+07	1.38E+07	1.23E+07	3.50E+06
スケールアップ	3.36E+09	9.35E+08	3.49E+09	8.44E+08	1.99E+09	3.25E+08
採取	6.67E+10	1.84E+10	5.52E+10	8.76E+09	1.13E+10	7.68E+09
倍率拡張 採取/ REP 開始	468.4	425.9	2056.8	634.6	925.0	2197.2
22 日目の REP 採取に おける Gen3 外挿値	N/A	2.53E+10	N/A	1.20E+10	N/A	1.06E+10

* L 4 0 5 5、濾過されていない培地。

【2 3 6 1】

表 5 3：T I L 最終製品の生存率%：採取時に、最終 T I L R E P 製品を生存率%の放出基準と比較した。G e n 2 及び G e n 3 プロセスのすべての条件は、7 0 %の生存率基準を超えており、プロセス及び腫瘍間で同等であった。

【2 3 6 2】

採取時に、最終 T I L R E P 製品を生存率%の放出基準と比較した。G e n 2 及び G e n 3 プロセスのすべての条件は、7 0 %の生存率基準を超えており、プロセス及び腫瘍間で同等であった。

【2 3 6 3】

【表 4 6】

表 5 3. R E P の生存率 (T I L 最終製品)

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
プロセス	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
REP 開始	98.23%	97.97%	97.43%	92.03%	81.85%	68.27%
スケールアップ	94.00%	93.57%	90.50%	95.93%	78.55%	71.15%
採取	87.95%	89.85%	87.50%	86.70%	86.10%	87.45%

【2 3 6 4】

1 フラスコ当たりの断片の数が最大必要数未満であったため、採取日の推定細胞計数を腫瘍毎に計算した。推定は、臨床腫瘍が 0 日目に 2 つまたは 3 つのフラスコに播種するの

に十分な大きさであるという予想に基づいた。

【 2 3 6 5 】

【 表 4 7 】

表 5 4. G e n 3 プロセスでのフルスケール 2 及び 3 フラスコへの外挿推定細胞数計算。

腫瘍 ID	L4054		L4055		M1085T	
Gen3 プロセス	2 flasks	3 Flasks	2 flasks	3 Flasks	2 flasks	3 Flasks
推定採取	3.68E+10	5.52E+10	1.75E+10	2.63E+10	1.54E+10	2.30E+10

10

【 2 3 6 6 】

免疫表現型決定－T I L 最終製品の表現型マーカー比較。3つの腫瘍 L 4 0 5 4、L 4 0 5 5、及び M 1 0 8 5 T は、G e n 2 及び G e n 3 プロセスの両方で T I L 拡張を受けた。採取時に、R E P T I L 最終製品をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。すべての条件で、T C R a / b + 細胞パーセンテージは 9 0 % 超であった。

【 2 3 6 7 】

G e n 3 プロセスから採取した T I L は、G e n 2 プロセスから採取した T I L と比較して、より高い C D 8 及び C D 2 8 発現を示した。G e n 2 プロセスは、より高い C D 4 + パーセンテージを示した。

【 2 3 6 8 】

G e n 3 プロセスから採取した T I L は、G e n 2 プロセス由来の T I L と比較して、セントラルメモリー区画でより高い発現を示した。

【 2 3 6 9 】

活性化及び疲弊マーカーを 2 つの腫瘍 L 4 0 5 4 及び L 4 0 5 5 由来の T I L で分析して、G e n 2 及び G e n 3 T I L 拡張プロセス由来の最終 T I L 製品を比較した。活性化及び疲弊マーカーは、G e n 2 プロセスと G e n 3 プロセスとの間で同等であった。

【 2 3 7 0 】

再刺激時のインターフェロンガンマ分泌採取日、G e n 2 の場合は 2 2 日目、G e n 3 の場合は 1 6 日目に、T I L は、L 4 0 5 4 及び L 4 0 5 5 の場合、コーティングした抗 C D 3 プレートで一晩再刺激を受けた。M 1 0 8 5 T での再刺激は、抗 C D 3、C D 2 8、及び C D 1 3 7 ビーズを使用して行った。すべての条件で再刺激の 2 4 時間後に上清を収集し、上清を凍結させた。E L I S A による I F N γ 分析を、同じ E L I S A プレートを使用して両方のプロセス由来の上清で同時に評価した。分析した 3 つの腫瘍で、G e n 3 プロセス由来の I F N γ のより高い産生が観察された。

【 2 3 7 1 】

培養培地中の I L - 2 レベルの測定 G e n 2 プロセスと G e n 3 プロセスとの間の I L - 2 消費量を比較するために、腫瘍 L 4 0 5 4 及び L 4 0 5 5 で、R E P の開始時、スケールアップ時、及び採取日に細胞上清を収集した。細胞培養上清中の I L - 2 の量を、R & D 製の定量化 E L I S A キットによって測定した。一般的な傾向は、G e n 2 プロセスと比較して、G e n 3 プロセスでは I L - 2 濃度が高いままであることを示す。これは、プロセス全体を通して培地のキャリーオーバーと相まって G e n 3 の R E P 開始時の I L - 2 濃度がより高い (6 0 0 0 I U / m L) ことに起因する可能性がある。

【 2 3 7 2 】

代謝基質及び代謝物分析 D - グルコース及び L - グルタミンなどの代謝基質のレベルを、全培地消費量の代わりに測定した。乳酸及びアンモニアなどのそれらの相互代謝物を測定した。グルコースは、A T P の形態でエネルギーを産生するためにミトコンドリアによ

20

30

40

50

って利用される培地中の単糖である。グルコースが酸化されると、乳酸が産生される（乳酸塩は乳酸のエステルである）。乳酸塩は、細胞の指数関数的成長期中に強く産生される。高レベルの乳酸塩は、細胞培養プロセスに悪影響を及ぼす。

【2373】

L4054及びL4055の使用済み培地を、Gen2プロセス及びGen3プロセスの両方で、REP開始時、スケールアップ時、及び採取日に収集した。使用済み培地の収集は、Gen2の場合は11日目、16日目、及び22日目、Gen3の場合は7日目、11日目、及び16日目であった。上清を、グルコース、乳酸、グルタミン、GlutaMax（商標）、及びアンモニアの濃度についてCEDEXバイオアナライザーで分析した。

【2374】

L-グルタミンは、細胞培養培地製剤に必要な不安定な必須アミノ酸である。グルタミンにはアミンが含まれており、このアミド構造基は、窒素を細胞に輸送して送達することができる。L-グルタミンが酸化すると、細胞によって有毒なアンモニア副産物が産生される。L-グルタミンの分解に対抗するために、Gen2及びGen3プロセスの培地に、水溶液中でより安定しており、かつ自発的に分解しないGlutaMax（商標）を補充した。2つの腫瘍株では、Gen3アームは、プロセス中のL-グルタミン及びGlutaMax（商標）の減少、ならびにREP全体でアンモニアの増加を示した。Gen2アームでは、L-グルタミン及びGlutaMax（商標）の濃度が一定であり、アンモニア産生のわずかな増加が観察された。Gen2及びGen3のプロセスは、アンモニアについて採取日に同等であり、L-グルタミン分解にわずかな違いが見られた。

【2375】

テロメアは、Flow-FISHによって繰り返される。Flow-FISH技術を使用して、Gen2及びGen3プロセスでのL4054及びL4055のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（RTL）の決定を、DAKO製のフローサイトメトリ分析用Telomere PNAキット／FITCを使用して計算した。Gen3は、Gen2と同等のテロメア長を示した。

【2376】

CD3分析各プロセスで生成された細胞製品のクローン多様性を決定するために、L4054及びL4055の採取したTIL最終製品をサンプリングし、T細胞受容体のCDR3部分の配列決定によるクローン多様性分析についてアッセイした。

【2377】

表55は、採取したTIL細胞製品のL4054における共有される固有のCDR3配列パーセンテージに関するGen2とGen3との比較を示す。199個の配列がGen3最終製品とGen2最終製品との間で共有され、Gen3最終製品と共有されるGen2由来の固有のCDR3配列の上位80%の97.07%に相当する。

【2378】

【表48】

表55. L4054のGen2プロセスとGen3プロセスとの間で共有されるuCDR3配列の比較。

#uCDR3 (重複%)	すべての uCDR3		uCDR3 の上位 80%	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4054	8915	4355 (48.85%)	205	199 (97.07%)
Gen 3-L4054	-	18130	-	223

10

20

30

40

50

【 2 3 7 9 】

表 5 6 は、採取した T I L 細胞製品の L 4 0 5 5 における共有される固有の C D R 3 配列パーセンテージに関する G e n 2 と G e n 3 との比較を示す。1 8 3 3 個の配列が G e n 3 最終製品と G e n 2 最終製品との間で共有され、G e n 3 最終製品と共有される G e n 2 由来の固有の C D R 3 配列の上位 8 0 % の 9 9 . 4 5 % に相当する。

【 2 3 8 0 】

【表 4 9 】

表 5 6 . L 4 0 5 5 の G e n 2 プロセスと G e n 3 プロセスとの間で共有される u C D R 3 配列の比較。

10

#uCDR3 (重複%)	すべての uCDR3		uCDR3 の上位 80%	
	Gen 2	Gen 3	Gen 2	Gen 3
Gen 2-L4055	12996	6599 (50.77%)	1843	1833 (99.45%)
Gen 3-L4055	-	27246	-	2616

【 2 3 8 1 】

C M 1 及び C M 2 培地は、濾過せずに事前に調製し、腫瘍 L 4 0 5 5 の場合、G e n 2 及び G e n 3 プロセスで使用するまで 4 °C で保持した。

【 2 3 8 2 】

G e n 2 及び G e n 3 プロセスの R E P 開始日に、腫瘍 L 4 0 5 5 の場合、培地を 3 7 °C で事前に 2 4 時間温めた。

【 2 3 8 3 】

これらのプロセスで収集した上清中に L D H は測定されなかった。

【 2 3 8 4 】

M 1 0 8 5 T T I L 細胞計数を、K 2 c e l l o m e t e r 細胞カウンターを使用して実行した。

【 2 3 8 5 】

腫瘍 M 1 0 8 5 T では、代謝分析用の上清、活性化及び疲弊マーカー分析用の T I L 製品、テロメア長、及び C D 3 - T C R v b 分析などの試料は入手できなかった。

【 2 3 8 6 】

結論この実施例では、3 つの独立したドナー腫瘍組織を、機能的品質属性に加えて、拡張された表現型特徴付け、ならびに G e n 2 プロセス及び G e n 3 プロセス間の培地消費に関して比較する。

【 2 3 8 7 】

G e n 2 と G e n 3 の R E P 前及び R E P 拡張比較を、生成された全生細胞及び全有核細胞集団の生存率に関して評価した。採取日の T V C 細胞用量は、G e n 2 (2 2 日) と G e n 3 (1 6 日) との間で同等ではなかった。G e n 3 細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約 4 0 % であり、G e n 2 よりも低かった。

【 2 3 8 8 】

R E P 前採取は、7 日目ではなく 1 1 日目に起こり、R E P 採取は、1 6 日目ではなく 2 2 日目に起こると仮定して、G e n 3 プロセスの外挿細胞数を計算した。どちらの場合も、G e n 3 は、G e n 2 プロセスと比較して T V C の数値が近いことを示し、初期活性化により、T I L の成長が増強したことを示す。

【 2 3 8 9 】

G e n 3 プロセスでの追加フラスコ (2 つまたは 3 つ) の外挿値の場合、処理される腫瘍サイズがより大きいと仮定し、記載されるようにプロセス毎に必要な最大断片数に到達

20

30

40

50

する。22日目のGen 2プロセスと比較して、Gen 3プロセスの16日目の採取時にTV Cで同様の用量に到達可能であり得ることが観察された。この観察は重要であり、培養物の早期活性化がTIL処理時間を短縮したことを示す。

【2390】

Gen 2とGen 3のREP前及びREP拡張比較を、生成された全生細胞及び全有核細胞集団の生存率に関して評価した。採取日のTV C細胞用量は、Gen 2（22日）とGen 3（16日）との間で同等ではなかった。Gen 3細胞用量は、採取時に収集した全生細胞の約40%であり、Gen 2よりも低かった。

【2391】

表現型特徴付けに関して、Gen 2プロセスと比較してGen 3プロセスでの3つの腫瘍でより高いCD8+及びCD28+発現が観察された。

【2392】

Gen 3プロセスは、Gen 2プロセスと比較してわずかに高いセントラルメモリー区画を示した。

【2393】

Gen 2プロセス及びGen 3プロセスは、Gen 3プロセスの持続期間がより短いにもかかわらず、同等の活性化及び疲弊マーカーを示した。

【2394】

IFNガンマ（IFN γ ）産生は、分析した3つの腫瘍において、Gen 2と比較してGen 3最終製品において3倍高かった。このデータは、Gen 3プロセスがGen 2プロセスと比較して高機能でより強力なTIL製品を生成したことを示し、Gen 3でのCD8及びCD28発現がより高いことに起因する可能性がある。表現型特徴付けは、Gen 2プロセスと比較して3つの腫瘍でCD8+、CD28+発現へのGen 3の肯定的な傾向を示唆した。

【2395】

Gen 2とGen 3との間のTIL最終製品のテロメア長は同等であった。

【2396】

グルコース及び乳酸塩レベルは、Gen 2最終製品とGen 3最終製品との間で同等であり、プロセス日毎に減容除去が実行されなかったこと、及びGen 2と比較してプロセスにおける培地全体の体積が少ないことに起因して、Gen 3プロセスの培地の栄養素レベルが影響されなかったことを示唆する。

【2397】

全体として、Gen 3プロセスは、Gen 2プロセスと比較してほぼ2倍の処理時間の短縮を示し、これにより、Gen 3プロセスによって拡張されたTIL製品の売上原価（COG）の有意な削減がもたらされるであろう。

【2398】

IL-2消費は、Gen 2プロセスでのIL-2消費の一般的な傾向を示しており、Gen 3プロセスでは、古い培地が除去されなかったため、IL-2が高かった。

【2399】

Gen 3プロセスは、CDR3 TCR α b配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。

【2400】

Gen 3プロセスを使用して、REP前の0日目のフィーダー及びOKT-3の追加により、TILの初期活性化が可能になり、TIL成長が可能になった。

【2401】

表57は、現在のGen 2プロセスと比較したGen 3プロセスの様々な実施形態及び成果を説明する。

【2402】

10

20

30

40

50

【表 5 0】

表 5 7. 例示的な Gen 3 プロセス特徴。

ステップ	プロセス Gen2 の実施形態	プロセス Gen3 の実施形態
REP 前- 0 日目	50 個以下の断片 1X G-REX-100MCS 1L 培地 IL-2(6000IU/mL) 11 日	240 個以下の断片 60 個以下の断片/フラスコ 4 つ以下のフラスコ 2L 以下の培地(500mL/フラスコ) IL-2 (6000 IU/mL) 2.5×10 ⁸ 個のフィーダー細胞/フラスコ 15ug の OKT3/フラスコ
REP 開始	REP に指向した新鮮な TIL 11 日目 200e ⁶ 個以下の生細胞 5×10 ⁹ フィーダー細胞 G-REX-500MCS 5L CM2 培地+IL-2(3000IU/mL) 150 μg の OKT3	REP に指向した新鮮な TIL 7 日目 培養物全体を活性化する 5×10 ⁸ フィーダー細胞 30 μg の OKT3/フラスコ G-REX-100MCS 500mL 培地+IL-2(6000IU/mL)
TIL 継代培養 またはスケールアップ	5 つ以下の G-REX-500MCS 1×10 個以下の生細胞/フラスコ 5L/フラスコ 16 日目	4 つ以下の G-REX-500MCS 培養物全体をスケールアップする 4L/フラスコ 10~11 日目
採取	22 日目に採取 LOVO-自動細胞洗浄機 2 回の洗浄サイクル	16 日目に採取する LOVO-自動細胞洗浄機 5 回の洗浄サイクル
最終製剤	凍結保存した製品 LN ₂ 中の 300IU/mL の IL2- CS10、複数のアリコート	凍結保存した製品 LN ₂ 中 300IU/mL の IL-2-CS10 複数のアリコート
プロセス 時間	22 日	16 日

【2 4 0 3】

実施例 1 0：例示的な GEN 3 プロセス（GEN 3. 1 とも称される）

この実施例は、「TIL 拡張のための Gen 2 プロセスと Gen 3 プロセスとの間の比較可能性」に関するさらなる研究について説明する。Gen 3 プロセスを、表現型及び機能プロファイルを維持しながら、最終総生細胞（TV C）出力を増やすことを目的として、プロセスの初期に活性化ステップを含むように修正した。以下に記載されるように、Gen 3 実施形態をさらなる実施形態として修正し、本明細書におけるこの実施例では Gen 3. 1 と称する。

【2 4 0 4】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、Gen 3.1 TIL 製造プロセスは、以下の4つのオペレーター介入を有する。

1. 腫瘍断片の単離及び活性化：プロセスの0日目に腫瘍を解剖し、最終断片を各々約 $3 \times 3 \text{ mm}$ （合計で最大240個の断片）を生成し、1～4つのG-R EX 100 MCS フラスコ内で培養した。各フラスコは、最大60個の断片、6,000 IUのrhIL-2、 $15 \mu\text{g}$ のOKT3、及び 2.5×10^8 個の放射線照射した同種異系単核細胞を補充した500 mLのCM1またはDM1培地を含んだ。培養物を 37°C で6～8日間インキュベートした。

2である。TIL 培養再活性化：7～8日目に、いずれの場合も6,000 IUのrhIL-2、 $30 \mu\text{g}$ のOKT3、及び 5×10^8 個の放射線照射した同種異系単核細胞を補充したCM2またはDM1培地をゆっくり添加することによって、培養物を補充した。フラスコの底にある既存の細胞を乱さないように注意した。培養物を 37°C で3～4日間インキュベートした。

3. 培養のスケールアップ：10～11日目に生じる。培養のスケールアップ中に、G-R EX 100 MCSの全内容物を、いずれの場合も3,000 IU/mLのIL-2を補充した4 LのCM4またはDM2を含むG-R EX 500 MCS フラスコに移した。採取するまでフラスコを 37°C で5～6日間インキュベートした。

4. 採取／洗浄／製剤化：16～17日目に、フラスコを減容させ、プールする。細胞を濃縮し、1% HSAを含有するPlasmaLyte A pH 7.4で洗浄した。洗浄した細胞懸濁液を、CryoStor 10と1:1の比で配合し、300 IU/mLの最終濃度までrhIL-2を補充した。

【2405】

DPを制御された速度の凍結で凍結保存し、気相液体窒素中で保管した。＊完全標準TIL 培地1、2、または4（CM1、CM2、CM4）は、上記のように、合成培地（DM1またはDM2）と称されるCTS（商標）Optmizer（商標）T細胞無血清拡張培地の代用となり得た。

【2406】

プロセスの説明0日目に、腫瘍を3回洗浄し、その後、 $3 \times 3 \times 3$ の最終断片に断片化した。全腫瘍を断片化した時点で、最終断片を均等にランダム化し、3つのプールに分割した。1つのランダム化断片プールを各群に導入し、3つの実験マトリックス毎に同じ数の断片を添加した。

【2407】

全TIL 拡張プロセスにわたって、腫瘍L4063拡張を標準培地で行い、腫瘍L4064拡張を合成培地（CTS Optmizer）で行った。培地の成分を本明細書に記載する。

【2408】

CM1完全培地1：2 mM GlutaMax（商標）、10% ヒトAB血清、ゲンタマイシン（ $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）、2-メルカプトエタノール（ $55 \mu\text{M}$ ）を補充したRPMI+グルタミン。6000 IU/mLのIL-2を補充した最終培地製剤

【2409】

CM2完全培地2：50% CM1培地+50% AIM-V培地。6000 IU/mLのIL-2を補充した最終培地製剤

【2410】

CM4完全培地4：GlutaMax（商標）（2 mM）を補充したAIM-V。3000 IU/mLのIL-2を補充した最終培地製剤。

【2411】

CTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion Supplement（ $26 \text{ mL}/\text{L}$ ）を補充したCTS Optmizer CTS（商標）Optmizer（商標）T-Cell Expansion Basal Medium。

【2412】

10

20

30

40

50

DM1: CTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Supplement (26mL/L)、及びCTS (商標) Immune Cell SR (3%)をGlutaMax (商標) (2mM)とともに補充したCTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Basal Medium 6,000 IU/mLのIL-2を補充した最終製剤。

【2413】

DM2: CTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Supplement (26mL/L)、及びCTS (商標) Immune Cell SR (3%)をGlutaMax (商標) (2mM)とともに補充したCTS (商標) OpTmizer (商標) T-Cell Expansion Basal Medium 3,000 IU/mLのIL-2を補充した最終製剤。

10

【2414】

使用したすべてのタイプの培地、すなわち、完全培地 (CM) 及び合成培地 (DM) を事前に調製し、使用前日まで4℃で保持し、プロセス日前に事前に最長24時間にわたってインキュベーター内で37℃で温めた。

【2415】

TIL培養再活性化は、両方の腫瘍で7日目に起こった。スケールアップは、L4063では10日目、L4064では11日目に起こった。両方の培養物を採取し、16日目に凍結保存した。

【2416】

達成した結果Gen3.0プロセス及びGen3.1プロセスの細胞計数及び生存率%を決定した。すべての条件下での拡張は、この実施例に説明される詳細に従った。

20

【2417】

腫瘍毎に、断片を同数の3つのプールに分割した。腫瘍のサイズが小さいため、1フラスコ当たりの断片の最大数は達成されなかった。3つの異なるプロセスについて、総細胞及び細胞生存率を条件毎に評価した。細胞数を、7日目の再活性化のTVC、10日目 (L4064) または11日目 (L4063) のスケールアップのTVC、及び16/17日目の採取時のTVCとして決定した。

【2418】

7日目及び10/11日目の細胞計数をFIOで測定した。倍率拡張を、16/17日目の採取時のTVCを7日目の再活性化日のTVCで割ることによって計算した。3つの群を比較するために、採取日のTVCを、0日目の培養物中に添加した断片の数で割って、1断片当たりの生細胞の平均を計算した。

30

【2419】

L4063及びL4064について、細胞計数及び生存率アッセイを行った。Gen3.1-試験プロセスは、両方の腫瘍でGen3.0プロセスよりも多くの1断片当たりの細胞数をもたらした。

【2420】

総細胞数及び倍率拡張、プロセス中の生存率%再活性化時に、スケールアップして採取し、すべての条件で生存率%を行った。16/17日目の採取日に、最終TVCを生存率%の放出基準と比較した。評価したすべての条件は、70%の生存率基準を超え、プロセス及び腫瘍全体で同等であった。

40

【2421】

免疫表現型決定-TIL最終製品の表現型特徴付け。最終製品をフローサイトメトリー分析にかけ、純度、分化、及びメモリーマーカーを試験した。集団の割合は、すべての条件で、TCRα/β細胞、CD4+細胞、及びCD8+細胞で一貫していた。

【2422】

REP TILの拡張表現型分析を行った。TIL製品は、両方の腫瘍でGen3.0と比較してGen3.1条件でより高いCD4+細胞パーセンテージを示し、両方の条件でGen3.1条件と比較してGen3.0でより高いCD8+集団由来のCD28+細胞

50

胞パーセンテージを示した。

【2423】

Gen3.0プロセス及びGen3.1プロセスから採取したTILは、CD4+細胞及びCD8+細胞でのCD27及びCD56発現、ならびにCD4+ゲート細胞集団での同等のCD28発現と同等の表現型マーカーを示した。TIL最終製品のメモリーマーカーの比較：

【2424】

16日目に採取したTILの凍結試料を分析のために染色した。TILメモリーステータスは、Gen3.0プロセスとGen3.1プロセスとの間で同等であった。TIL最終製品の活性化及び疲弊マーカーの比較：

【2425】

活性化及び疲弊マーカーは、CD4+細胞及びCD8+細胞上でゲートされたGen3.0プロセスとGen3.1プロセスとの間で同等であった。

【2426】

再刺激時のインターフェロンガンマ分泌採取したTILは、L4063及びL4064用のコーティングされた抗CD3プレートで一晩再刺激を受けた。Gen3.0プロセスと比較して、分析した2つの腫瘍で、より高いGen3.1プロセスからのIFN γ 産生が観察された。

【2427】

培養培地中のIL-2レベルの測定すべての条件及びプロセス間のIL-2消費レベルを比較するために、細胞上清を、7日目の再活性化の開始時、10日目（L4064）／11日目（L4063）のスケールアップ時、及び16／17日目の採取及び凍結時に収集した。その後、上清を解凍し、分析した。細胞培養上清中のIL-2の量を、製造業者のプロトコルによって測定した。

【2428】

全体的なGen3プロセス及びGen3.1プロセスは、同じ培地条件で評価した全プロセス中のIL-2消費に関して同等であった。L4063及びL4064用に収集した使用済み培地のIL-2濃度（pg/mL）分析。

【2429】

代謝物分析使用済み培地の上清を、L4063及びL4064について、すべての条件で、7日目の再活性化の開始時、10日目（L4064）または11日目（L4063）のスケールアップ時、及び16／17日目の採取時に、L4063及びL4064から収集した。上清をCEDEXバイオアナライザーでグルコース、乳酸塩、グルタミン、Glutamax（商標）、及びアンモニアの濃度について分析した。

【2430】

合成培地は、完全培地（2g/L）と比較してより高いグルコース濃度4.5g/Lを有する。全体として、グルコースの濃度及び消費量は、各培地タイプ内でGen3.0プロセス及びGen3.1プロセスにおいて同等であった。

【2431】

乳酸塩の増加が観察され、乳酸塩の増加は、Gen3.0条件とGen3.1条件との間、及び再活性化拡張に使用した2つの培地（完全培地と合成培地）間で同等であった。

【2432】

いくつかの場合において、標準基礎培地は、2mMのL-グルタミンを含有し、培養条件下でL-グルタミンのL-グルタミン酸塩及びアンモニアへの自然分解を補うために、2mMのGlutamax（商標）で補充された。

【2433】

いくつかの場合において、使用した合成（無血清）培地は、基礎培地にL-グルタミンを含有せず、最終濃度が2mMになるまでGlutamax（商標）のみで補充された。Glutamax（商標）は、L-アラニンとL-グルタミンのジペプチドであり、水溶液中でL-グルタミンよりも安定しており、グルタミン酸塩及びアンモニアに自発的に分

10

20

30

40

50

解しない。代わりに、ジペプチドは、個々のアミノ酸に徐々に解離し、それにより、より低い十分な濃度のL-グルタミンを維持して、強力な細胞成長を維持する。

【2434】

いくつかの場合において、グルタミン濃度及びG l u t a M a x（商標）濃度は、スケールアップ日にわずかに減少したが、採取日には再活性化日と比較して同様またはより近いレベルへの増加を示した。L 4 0 6 4の場合、グルタミン濃度及びG l u t a M a x（商標）濃度は、全プロセス中、異なる条件間で同様の速度でわずかな分解を示した。

【2435】

アンモニア濃度は、2 mMのG l u t a M a x（商標）を含有する合成培地中で成長させた試料よりも、2 mMのグルタミン+2 mMのG l u t a M a x（商標）を含有する標準培地中で成長させた試料で高かった。さらに、予想通り、培養の過程にわたってアンモニアの段階的増加または蓄積があった。3つの異なる試験条件間でアンモニア濃度に差はなかった。

【2436】

F l o w - F I S Hによるテロメア反復：F l o w - F I S H技術を使用して、G e n 3プロセス及びG e n 3. 1プロセス下でのL 4 0 6 3及びL 4 0 6 4のテロメア反復の平均長を測定した。相対テロメア長（R T L）の決定を、D A K O製のフローサイトメトリー分析用T e l o m e r e P N Aキット／F I T Cを使用して計算した。テロメアアッセイを行った。試料のテロメア長を、対照細胞株（1301白血病）と比較した。対照細胞株は、長くて安定したテロメアを有する四倍体細胞株であり、相対テロメア長の計算を可能にする。両方の腫瘍で評価したG e n 3プロセス及びG e n 3. 1プロセスは、同等のテロメア長を示した。

【2437】

T C R V β レパートリー分析

各プロセスで生成された細胞製品のクローン多様性を決定するために、T I L最終製品をT細胞受容体のC D R 3部分の配列決定によるクローン多様性分析のためにアッセイした。

【2438】

3つのパラメータを3つの条件間で比較した。

●固有のC D R 3（u C D R 3）の多様性指数

●u C D R 3共有%

●u C D R 3の上位80%の場合：

○共有されるu C D R 3コピーの%を比較する

○固有のクローノタイプの頻度を比較する

【2439】

対照及びG e n 3. 1試験、T I Lで採取した細胞製品で共有される固有のC D R 3配列パーセンテージ：975個の配列がG e n 3試験最終製品とG e n 3. 1試験最終製品との間で共有され、G e n 3. 1と共有されるG e n 3由来の固有のC D R 3配列の上位80%の88%に相当する。

【2440】

対照及びG e n 3. 1試験、T I Lで採取した細胞製品で共有される固有のC D R 3配列パーセンテージ：2163個の配列がG e n 3試験最終製品とG e n 3. 1試験最終製品との間で共有され、G e n 3. 1と共有されるG e n 3由来の固有のC D R 3配列の上位80%の87%に相当する。

【2441】

異なるプロセスについて、16日目の採取時に収集した 1×10^6 個の細胞から特定された固有のC D 3配列の数。G e n 3. 1試験条件は、試料内の固有のペプチドC D Rの数に基づいて、G e n 3. 0と比較してわずかに高いクローン多様性を示した。

【2442】

シャノンエントロピー多様性指数は、比較のための信頼性の高い一般的なメトリックで

10

20

30

40

50

あり、両方の腫瘍に対する Gen 3. 1 条件は、Gen 3. 0 プロセスよりもわずかに高い多様性を示し、Gen 3. 1 試験条件の TCR V β レポートリーが Gen 3. 0 プロセスよりもポリクローナルであることを示唆する。

【2443】

加えて、Gen 3. 1 試験条件の TCR V β レポートリーは、腫瘍 L4063 及び L4064 の両方で Gen 3. 0 プロセスの対応するレポートリーと 87% を超える重複を示した。

【2444】

再活性化日の Gen 3. 1 試験 L4064 の使用済み培地の IL-2 濃度の値は、期待値を下回った (Gen 3. 1 対照及び Gen 3. 0 条件と同様であった)。

【2445】

低い値はピペッティングエラーに起因した可能性があったが、最小限の試料しか採取できなかったため、アッセイを繰り返すことができなかった。

【2446】

結論 0 日目のフィーダー及び OKT-3 を含む Gen 3. 1 試験条件は、Gen 3. 0 及び Gen 3. 1 対照と比較して、16 日目の採取時の細胞用量の TVC がより高いことを示した。Gen 3. 1 試験条件の TVC 最終製品は、Gen 3. 0 よりも約 2.5 倍高かった。

【2447】

試験した腫瘍試料の両方について、0 日目に OKT-3 及びフィーダーを添加した Gen 3. 1 試験条件は、採取時にフラスコの最大容量に達した。これらの条件下で、0 日目に最大 4 つのフラスコを開始した場合、最終細胞用量は、80~100 $\times$ 10⁹ TIL である可能性があった。

【2448】

最終 TIL 製品の純度、疲弊、活性化、及びメモリーマーカーを含む表現型特徴付けなどのすべての品質属性が、Gen 3. 1 試験と Gen 3. 0 プロセスとの間で維持された。

【2449】

最終 TIL 製品の IFN- γ 産生は、分析した 2 つの腫瘍において、Gen 3. 0 と比較して、0 日目にフィーダー及び OKT-3 を添加した Gen 3. 1 で 3 倍高く、Gen 3. 1 プロセスが強力な TIL 製品を生成したことを示唆する。

【2450】

試験条件にわたって、グルコースまたは乳酸塩レベルに差異は観察されなかった。培地条件にわたって、Gen 3. 0 プロセスと Gen 3. 1 プロセスとの間でグルタミン及びアンモニアに差異は観察されなかった。培地上の低レベルのグルタミンは、細胞増殖を制限しておらず、培地への GlutaMax (商標) のみの添加が、細胞を増殖させるのに必要な栄養素を与えるのに十分であることを示唆する。

【2451】

11 日目及び 10 日目のスケールアップは、それぞれ、プロセスの採取日に到達した細胞数に関して大きな差異を示さず、代謝物の消費量は、全プロセスにわたって両方の場合で同等であった。この観察結果は、Gen 3. 0 最適化プロセスが処理日に柔軟性を有し、それにより、製造スケジュールの柔軟性を促進することができることを示唆している。

【2452】

0 日目にフィーダー及び OKT-3 を添加した Gen 3. 1 プロセスは、Gen 3. 0 と比較して、CDR3 TCR α b 配列分析によって測定されたより高いクローン多様性を示した。

【2453】

図 32 は、Gen 3 プロセス (Gen 3 最適化プロセス) の実施形態を説明する。標準培地及び CTS Optimizer 無血清培地を、Gen 3 最適化プロセス TIL 拡張に使用することができる。CTS Optimizer の場合、培地の GlutaMax

10

20

30

40

50

(商標)を最終濃度4 mMに増加させるために無血清培地が推奨される。

【2454】

実施例15: CD39 / CD69 選択に関連した浸潤リンパ球 (TIL) 拡張及び TIL における遺伝子ノックアウトのためのプロセス

腫瘍の調製

新たに切除された腫瘍試料は、消化、選別及び Gen 2 製品生成に使用される。写真を撮り、パッケージから腫瘍を取り出し、バイアルを腫瘍の有無にかかわらず秤量し、腫瘍の質量を計算する。

【2455】

腫瘍消化のために腫瘍全体をおよそ4~6 mm³の断片に断片化する。拡張に使用されている細胞集団に応じて、腫瘍を、Gen 2 プロトコルを使用して、消化及び拡張させる。

10

【2456】

腫瘍消化のための酵素調製 (研究グレードの DNase、コラゲナーゼ及びヒアルロニダーゼを使用)

以下の消化酵素の各々について示されている滅菌 HBSS の量で凍結乾燥酵素を再構成する。これらの酵素は、10倍として調製される。上下に数回ピペット操作し、旋回させて、完全な再構成を確実にする。

【2457】

1 g のコラゲナーゼ IV (Sigma, MO, C5138) を 10 mL の HBSS で再構成する (100 mg / mL のストックを作製するため)。上下にピペティングすることにより混合して、溶解する。再構成後に溶解していない場合、37 °C の H₂O 浴中で5分間置く。1 mL のバイアルに分注する。これは、コラゲナーゼの 100 mg / mL の 10倍作用ストックである。

20

【2458】

DNase (Sigma, MO, D5025) ストック溶液 (10,000 IU / mL) を調製する。各ロットの DNase の単位は、添付のデータシートに提供される。HBSS の適切な量を計算して、100 mg の凍結乾燥 DNase ストックを再構成する。例えば、DNase ストックが 2000 U / mg である場合、ストック内の DNase の合計は、200,000 IU (2000 IU / mg X 100 mg) である。10,000 IU の作用ストックに希釈し、100 mg の DNase に 20 mL の HBSS を添加する (200,000 IU / 20 mL = 10,000 U / mL)。1 mL のバイアルに分注する。これは、DNase の 10,000 IU / mL の 10倍作用ストックである。

30

【2459】

ヒアルロニダーゼ 10 mg / mL (Sigma, MO, H2126) ストック溶液を調製する。500 mg のバイアルを 50 mL の HBSS で再構成して、10 mg / mL のストック溶液を作製する。1 mL のバイアルに分注する。これは、ヒアルロニダーゼの 10 mg / mL の 10倍作用ストックであった。

【2460】

ストック消化酵素を1倍に希釈する。1倍作用溶液を作製するために、コラゲナーゼ、DNase、及びヒアルロニダーゼをそれぞれ500 mL ずつ3.5 mL の HBSS に添加する。消化カクテルをCチューブに直接添加する。

40

【2461】

腫瘍消化のための酵素調製 (GMP コラゲナーゼ及び中性プロテアーゼを使用)

以下の消化酵素の各々について示されている滅菌 HBSS の量で凍結乾燥酵素を再構成する。ボトルの側面及びボトル開口部上の保護ホイルからのいかなる残留粉末も必ず捕捉すること。上下に数回ピペット操作し、旋回させて、完全な再構成を確実にする。

【2462】

コラゲナーゼ AF-1 (Nordmark, Sweden, N0003554) を 10 mL の滅菌 HBSS で再構成する。凍結乾燥されたストック酵素は、2892 PZ U

50

／バイアルの濃度である。再構成後に、コラゲナーゼストックは、289.2 PZ U／mLであった。

【2463】

中性プロテアーゼ (Nordmark, Sweden, N0003553) を1mLの滅菌HBSSで再構成する。凍結乾燥されたストック酵素は、175 DMC U／バイアルの濃度である。したがって (Therefore)、再構成後、中性プロテアーゼストックは、175 DMC／mLであった。

【2464】

DNAse I (Roche, Switzerland, 03724751) を1mLの滅菌HBSSで再構成する。凍結乾燥されたストック酵素は、4KU／バイアルの濃度である。したがって、再構成後、DNAseストックは、4KU／バイアルであった。

【2465】

作用GMP消化カクテルを調製する。10.2 μ Lの中性プロテアーゼ (0.36 DMC U／mL)、21.3 μ LのコラゲナーゼAF-1 (1.2 PZ／mL) 及び250 μ LのDNAse I (200U／mL) を4.7mLの滅菌HBSSに追加する。消化カクテルを直接Cチューブに入れる。

【2466】

腫瘍の処理及び消化

GentleMACS OctoDissociatorを使用する場合、腫瘍断片をGentleMACS C-Tube (Cチューブ) または上記の5mLの消化カクテル (HBSS中) 中の50mLのコニカルチューブに移す。2～3個の断片 (4～6mm) を各Cチューブに移す。

【2467】

各Cチューブ (Miltenyi Biotec, Germany, 130-096-334) をGentleMACS OctoDissociator (Miltenyi Biotec, Germany, 130-095-937) に移す。製造業者の指示に従って使用する。各腫瘍組織学には、腫瘍解離のための推奨プログラムがあることに留意する。それぞれの腫瘍組織学のために適切なプログラムを選択する。解離は、およそ1時間であった。

【2468】

GentleMACS OctoDissociatorが利用できない場合、標準のローテーターを使用する。2～3個の腫瘍断片を50mLのコニカルチューブ (漏れを防ぐためにパラフィルムで密封) に入れ、ローテーターに固定した。ローテーターを37℃、5% CO₂加湿インキュベーターに置き、1～2時間一定回転させる。あるいは、腫瘍断片は、一定回転させながら、室温で一晩消化され得る。

【2469】

消化後、OctoDissociatorまたはローテーターからCチューブを取り外す。0.22 μ mのストレーナーを滅菌ファルコンコニカルチューブに取り付ける。ピペットを使用して、Cチューブ／または50mLのコニカル (5mL) からのすべての内容を0.22 μ mのストレーナーを通して50mLのコニカルに通す。Cチューブ／50mLのコニカルを10mLのHBSSで洗浄し、ストレーナーに適用する。滅菌シリンジプランジャーの平らな先端を使用して、フィルターを通していかなる残りの消化されていない腫瘍も解離する。最大50mLのCM1またはHBSSを添加し、チューブにキャップをする。

【2470】

1500rpm、室温で5分間の遠心分離 (9の加速及び減速) により、試料をペレット化する。慎重に液体を取り除き、細胞計数及び生存率の評価のために、ペレットを5mLのCM1に再懸濁した。

【2471】

以下のために全腫瘍消化物を取り分ける：1. 細胞培養 (選択されていないTIL対照

10

20

30

40

50

） 2 . F M O フローサイトメトリー対照 3 . 全腫瘍消化物表現型アッセイを予め選別する
4 . 腫瘍反応性／細胞致死アッセイのために凍結させる。取り分けられた細胞の数は、総消化物収量及び腫瘍組織学に依存する。

【 2 4 7 2 】

破片除去キットを使用した消化物のクリーンアップ

破片は、破片除去溶液（M i l t e n y i B i o t e c , G e r m a n y 、カタログ番号 1 3 0 - 1 0 9 - 3 9 8 ）を製造業者の指示に従って使用して、腫瘍消化物から除去することができる。

【 2 4 7 3 】

腫瘍細胞懸濁液を 3 0 0 X g で 4 °C で 1 0 分間遠心分離し、上清を完全に吸引する。

10

【 2 4 7 4 】

以下の表に従って適切な量の冷却緩衝液を用いて細胞懸濁液を慎重に再懸濁し、細胞懸濁液を 1 5 m l のコニカルチューブに移す。ボルテックスしない。

【 2 4 7 5 】

【表 5 1 】

	再懸濁(PBS)	破片除去溶液	オーバーレイ (PBS)
0.5~1g の組織	6200- μ l	1800- μ l	4-ml
>0.5g の組織	3100- μ l	900- μ l	4-ml

20

【 2 4 7 6 】

適切な量の冷却破片除去溶液を添加し、5 m l のピペットを使用して 1 0 ~ 2 0 回ゆっくりと上下にピペッティングすることによりよく混合する。4 m l の冷却緩衝液で非常に穏やかに重層させた。P B S / D - P B S 相が細胞懸濁液を重層させて、相が混合されないことを確認するために、チューブを傾け、非常にゆっくりとピペッティングする。腫瘍細胞懸濁液を 3 0 0 0 X g で 4 °C で 1 0 分間、完全に加速し、完全に破壊して遠心分離する。3 つの相が形成されなければならない。上の 2 つの相を完全に吸引し、それらを破棄する。

30

【 2 4 7 7 】

下の相には、破片除去溶液及び細胞が含まれている。必ず、少なくとも追加した破片除去溶液と同じ量を底に残す。（すなわち、1 m l の溶液を添加した場合は、チューブの底に少なくとも 1 m l を残す）。

【 2 4 7 8 】

冷却緩衝液を用いて 1 5 m l にし、チューブを少なくとも 3 回反転させる。ボルテックスしない。1 0 0 0 X g で 4 °C で 1 0 分間遠心分離し、完全に加速し、完全に破壊する。細胞計数のために、H B S S または培地に細胞を再懸濁する。

【 2 4 7 9 】

細胞選別のために消化された腫瘍を染色する（エキスピボ及び拡張後選別の両方）

腫瘍消化物は、以下のプロトコルに従って、抗 C D 6 9 、抗 C D 3 9 、及び抗 C D 3 抗体を含むカクテルで染色される。計数後、細胞を 1 0 m l の H B S S に再懸濁する。

【 2 4 8 0 】

ペレットを F A C S 緩衝液（1 X H B S S 、1 m M E D T A 、2 % ウシ胎児血清）に再懸濁する。ペレットに添加される F A C S 緩衝液の量は、ペレットのサイズに基づいている。染色容量は、ペレットの約 3 倍の大きさでなければならない。したがって、3 0 0 μ l の細胞がある場合、緩衝液の量は、少なくとも 9 0 0 μ l でなければならない。

【 2 4 8 1 】

抗体添加の場合、各 1 0 0 μ l の量は、1 回の試験（抗体の滴定量）に相当する。すな

50

わち、1 mLの量がある場合、10倍の量の滴定抗体が必要である。100 μ Lの量当たり滴定量の抗CD3-PE-Cy7、抗CD69PE及び抗CD39 FITCの各抗体を添加する。細胞を氷上で30分間インキュベートする。インキュベーション中に光から保護する。インキュベーション中、数回攪拌する。細胞を20 mLのFACS緩衝液に再懸濁する。溶液を70ミクロンのセルストレーナーに通して新しい50 mLのコニカルに通す。400 X g、室温で5分間遠心分離する（9の加速及び減速）。吸引する。細胞を最大10e6/mL合計（生+死）でFACS緩衝液に再懸濁する。最小量は、300 μ Lである。滅菌ポリプロピレンFACSチューブまたは15 mLのコニカルチューブに移す。FACS選別用の3 mL/チューブ。選別された集団用に15 mL収集チューブを準備する。2 mLのFACS緩衝液をチューブに入れる。

10

【2482】

細胞計数及び生存率

細胞及び生存率のカウントを取得するための手順は、Nexcelom Cellometer K2または同等のセルカウンターを使用した。

【2483】

FACS選別（FX500スタートアップ手順）

注記：他のフローサイトメーターのプロトコルは異なり、機械使用についての製造業者の指示に従い、必要に応じて適応される。

【2484】

起動後、プロンプトが表示されたら、PBS/EDTA緩衝液の4つのバッグすべてを取り付ける。PEEKサンプルラインを取り付ける。プロセスの詳細な説明については、「LE-FX500オペレーターガイド」を参照されたい。

20

【2485】

機器を設定する。レーザー選択のプロンプトが表示されたら、3つすべてのレーザーを選択する。（488 nm、561 nm、及び638 nm）。フィルター設定を求めるプロンプトが表示されたら、「標準」ラジオボタンを選択する。自動キャリブレーションを実行する。キャリブレーションビーズをロードするようにプロンプトが表示されたら、15滴の自動セットアップビーズを5 mLの滅菌FACSチューブに添加する。次いで、プロンプトに従う。

【2486】

自動キャリブレーションの設定を選択するように指示される場合、「標準」ラジオボタンを選択した。キャリブレーションが完了するのを待っている間に、以下を準備する。

30

● 10 mLの滅菌脱イオン水を用いて5本の滅菌15 mLのコニカルチューブを準備する。

● 4 mLの滅菌脱イオン水を用いて5本の滅菌5 mLのFACSチューブを準備する。

● 12 mLの70% EtOHを含む5本の滅菌15 mLのコニカルチューブを準備する。

● 12 mLの10%次亜塩素酸ナトリウムを含む5本の滅菌15 mLのコニカルチューブを準備する。

【2487】

用いられる標準的な方法に従って、及び用いられるフルオロフォアに基づいて、細胞を選別する。

40

【2488】

試料収集

試料チャンバ及び収集チャンバが5°Cにあり、攪拌試料アイコンが選択されていることを確認する。スクリーンの上部の[サイトメーター (Cytometer)] タブ及び[収集 (Collection) 5°C] アイコンならびに[試料 (Sample) 5°C] アイコンをクリックする。[攪拌 (Agitate)] アイコンをクリックする。試料が補正されていることを確認する。スクリーンの上部の[補正 (Compensation)] タブをクリックする。

50

【2489】

P B M C 対照を含むチューブ（5 m l の F A C S チューブまたは 1 5 m l のコニカルのいずれか）を試料収集プラットフォームに配置する。試料収集圧力を 6 に設定した。試料収集を開始する。[ゲート及び統計（G a t e s a n d S t a t i s t i c s）] テーブルをクリックし、上記に見られる両方のドロップダウンメニューで 1 0 0 , 0 0 0 を選択する。

【2490】

細胞集団が正しくゲートされていることを検証する。B S C または F S C の設定の調整が必要であり得る。しかしながら、いずれの他のチャンネルについても電圧を調整しない。

【2491】

ゲートの調整が完了したら、記録せずに[停止（S t o p）]をクリックし、チューブを取り外す。次のチューブアイコンをクリックし、チューブを右クリックして、[名前の変更（R e n a m e）]を選択する。チューブに「P E f m o」とラベルを付ける。チューブを装填し、再生を押す。注記：このチューブには通常、あまり多くの細胞は存在しなかった。必要に応じてゲートを調整する。

【2492】

ゲートが満たされた場合、できるだけ多くの事象（または最大 2 0 , 0 0 0 の C D 3 事象）を記録する。この収集を高速化するために、試料圧力を 1 0 に設定することができる。

【2493】

収集を停止し、チューブを取り外す。以前に作製された滅菌 d H 2 0 の 1 5 m l コニカルチューブを試料プラットフォーム上に装填する。試料圧力として 1 0 を選択する。試料を 1 分間収集する。C D 3 ゲートに事象がなくなるまで繰り返す。d H 2 0 試料チューブを取り外して、廃棄した。メニスカスの下部と中間点に油性ペンで収集するチューブに線を引く。

【2494】

収集される試料を装填プラットフォーム上に追加する。設定を検証する。試料圧力として 4 を選択する。細胞が画面に表示されるのを待つ。約 1 5 秒。画分が表示されたら、一時停止する。3 つの画分のうち最も低い 2 つを最初に収集する。

【2495】

試料チャンバのドアを開き、1 5 m l の収集チャンバブロックをチャンバに装着する。収集緩衝液を含む収集チューブをチャンバブロックの中に装填する。キャップ付きチューブを数回反転させて、チューブの上部を収集緩衝液でコーティングする。B S C の表面上でチューブを軽くたたいて、チューブと蓋の上部から余分な緩衝液を取り除く。C D 3 9 - / C D 6 9 - （例えば、C D 3 9 ^{L O} / C D 6 9 ^{L O} 及び / または C D 3 9 / C D 6 9 二重陰性）画分を選択する。キャップを外し、チューブを試料チャンバブロックに入れる。チューブの位置に一致するように正しい右 / 左の向きを選択する。[ロード収集（L o a d C o l l e c t i o n）] アイコンをクリックする。

【2496】

1 秒当たりの全事象が 5 , 0 0 0 未満になるように、試料圧力を調整する。選別開始アイコンをクリックする。少なくとも 8 5 % の選別効率を維持するように試料圧力を調整する。5 0 , 0 0 0 件の C D 3 事象を記録する。試料がおよそ 2 / 3 の空に達したら、選別を停止する。最も多くの事象を含む収集された試料を取り除く。キャップを閉め、氷上または 4 °C で置く。最も高いパーセンテージの細胞の収集中に、より多くの細胞を収集することができるように、収集チャンバに少量の試料を残す。収集チューブにラベルを付け、キャップを取り外した。それを収集チャンバに入れる。

【2497】

選別収集の適切な左 / 右方向を選択する。収集チューブを装填する。再生、記録を押して、選別を開始する。試料のおよそ 1 / 3 が空になったら、選別を停止する。収集した画分を取り除く。キャップを閉め、氷上または 4 °C で置き、ホルダーの左側に C D 3 収集チ

10

20

30

40

50

ューブを入れる。

【2498】

左側をCD3用にし、右側の選別を空白にした。すべての試料が試料チューブからなくなるまで、選別を継続する。チューブが「枯渇」しても問題ない。試料チャンバから試料チューブを取り外し、廃棄する。収集チャンバから選別された画分を取り出す。チューブに蓋をし、チューブの上部近くの液滴を溶液に取り込むために、数回穏やかに反転させる。BSCの表面上でチューブを軽くたたいて、チューブと蓋の上部から余分な溶液を取り除く。チューブを氷上に置く。

【2499】

CD39^{LO}CD69^{LO}画分の純度パーセントを確認する。滅菌dH2Oの14mLのコニカルチューブを試料チャンバに入れる。[プローブ洗浄(Probe Wash)]アイコンをクリックする。繰り返す。dH2Oチューブを取り外し、陽性画分チューブを追加する。試料圧力値を10に変更する。次のチューブアイコンをクリックする。チューブに試料名及び「hi select」の名前を付ける。再生をクリックし、75のCD3陽性事象を記録する。すぐにチューブを停止し、試料チャンバからチューブを取り外す。

10

【2500】

残りの試料についてもこれらの手順を繰り返す。

【2501】

データをエクスポートする。

20

「fmo」チューブをダブルクリックして選択し、レポートを保存する。収集したチューブの各々に対して繰り返す。

【2502】

REP1開始

細胞の数が最も少ない条件を使用して、REP1開始の細胞の数を決定することができる。(選別中に決定された)CD3細胞の%を使用して、選別された試料と同じ数のCD3細胞で、選択されていないTIL集団において、REP1を開始するために必要とされる消化物全体の細胞の総数を計算する。REP1開始のための全消化細胞の総数=REP1に接種された選別された細胞の数/CD3細胞の%。

【2503】

30

およそ1000~100,000個の細胞CD3+細胞を、G-Rex10または同等のフラスコに、それぞれ、3000IU/mLのIL-2を含む、7mLまたは40mLのCM2(50%RPMI 1640+10%ヒト血清、glutamax、ゲンタマイシン、及び50%AimV)とともに11日間入れる。CD39^{LO}CD69^{LO}で選別された集団及び選択されていないTILに対して、少なくとも1つのG-Rex10フラスコが開始される。抗CD3(クローン:OKT-3)(30ng/mL)及びフィーダー(1:100比(TIL:フィーダー))を、培養開始時に各フラスコに添加する。

【2504】

プレート/フラスコ内の細胞を、11日間インキュベートし、培地の交換は行われない(REP1)。単一のREP条件は、細胞をさらに3~7日間培養し続け、次いで特性評価に進む。

40

【2505】

REP1の完了時に、G-Rex10の場合は、およそ30mLの培地を取り出す。上下にピペティングすることにより、細胞を残りの培地に再懸濁する。細胞を50mLのコニカルに入れ、1500rpmで5分間遠心分離する(9の加速及び減速)。

【2506】

計数及び生存率の評価については、培地を吸引し、細胞を10~20mLのCM2に再懸濁する。

【2507】

REP2開始

50

mini-REP2の開始のために、 1×10^5 細胞を、40mlのCM2培地及び3000 IU/mlのIL-2を含むG-REX10または同等物に入れた。抗CD3（クローン：OKT-3）（30 ng/ml）及びフィーダー（1：100比、TIL：フィーダー）を、培養開始時に添加した。

【2508】

「フルスケール実行」では、 $2 \times 10^6 - 3 \times 10^6$ 個の細胞を、G-REX100Mまたは同等物中の1LのCM2培地及び3000 IU/mlのIL-2中で拡張する。抗CD3（クローン：OKT-3）（30 ng/ml）及びフィーダー（1：100比、TIL：フィーダー）を、培養開始時に添加する。

【2509】

培地交換（小規模の場合）または培地交換＋分割（「フルスケール実行の場合」）は、REP2の5日目（プロセスの16日目）に実行される。フラスコを、およそ10ml（G-REX10）または100ml（G-REX100M）に減容し、CM2またはAIMV+3000 IU/mlのIL-2のいずれかで、40ml（G-REX10）または1L（G-REX100M）に補充した。「フルスケール実行」の場合、フラスコを、1：2に分割する。

【2510】

REP2の11日目（またはプロセスの22日目）に、フラスコを減容し、1500 rpm、室温で5分間遠心分離する（9の加速及び減速）。

【2511】

最終産物を、細胞数、生存率、表現型、サイトカイン産生、TCRVβレパートリー分析、及び腫瘍特異的反応性について評価する。

【2512】

図34は、実施例15に概説されるプロセスの概略図を提供する。

【2513】

実施例15の参考文献：

1. Rosenberg, S. A., et al., Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. Clin Cancer Res, 2011. 17 (13) : p. 4550-7.
2. Kvistborg, P., et al., TIL therapy broadens the tumor-reactive CD8(+) T cell compartment in melanoma patients. Oncoimmunology, 2012. 1 (4) : p. 409-418.
3. Simoni, Y., et al., Bystander CD8(+) T cells are abundant and phenotypically distinct in human tumour infiltrates. Nature, 2018. 557 (7706) : p. 575-579.
4. Schumacher, T. N. and R. D. Schreiber, Neoantigens in cancer immunotherapy. Science, 2015. 348 (6230) : p. 69-74.
5. Turcotte, S., et al., Phenotype and function of T cells infiltrating visceral metastases from gastrointestinal cancers and melanoma: implications for adoptive cell transfer therapy. J Immunol, 2013. 191 (5) : p. 2217-25.
6. Inozume, T., et al., Selection of CD8+PD-1+ lymphocytes in fresh human melanomas

10

20

30

40

50

enriches for tumor-reactive T cells. J Immunother, 2010. 33 (9) : p. 956-64.

7. Gros, A., et al., PD-1 identifies the patient-specific CD8 (+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors. J Clin Invest, 2014. 124 (5) : p. 2246-59.

8. Thommen, D. S., et al., A transcriptionally and functionally distinct PD-1 (+) CD8 (+) T cell pool with predictive potential in non-small-cell lung cancer treated with PD-1 blockade. Nat Med, 2018.

10

【2514】

実施例16：急速拡張プロトコル (REP) 中の AKT 阻害は、腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) の記憶特性及びサイトカイン産生を拡張し、メモリー前駆体幹細胞様 (CD39-CD69-) 細胞の集団を増加させる。

異なる適応症からの患者の腫瘍を受け取り、断片化し、TIL 製造のための拡張プロトコルに供した。異なる用量 (0.3 μ M 及び 1 μ M) の pan-AKT 阻害剤 (AKTi) イパタセルチブを、エキスピボ拡張中に培養物に添加した。TIL の拡張可能性、ならびに表現型及び機能的特性を最終 TIL 製品上で評価した。

20

【2515】

1 μ M 用量での AKTi 処置は、対照と比較して TIL の同等の拡張及び生存率をもたらしたが、分化の少ない CD39-CD69- 細胞の集団を2倍にした。この効果は、再刺激後でさえも存在し、これらの細胞は、CD38 ならびに転写因子 T-bet 及び Tox の発現の低下を示し、分化が少なく、消耗した表現型を示唆している。重要なことに、AKTi 処置は、IFN γ + TNF α + CD8 + T 細胞の頻度の増加をもたらし、これは、細胞傷害性の増加につながった。

【2516】

エキスピボ TIL 拡張中の AKTi 処置は、分化の少ないよりメモリー様の機能的な TIL の割合を増加させた。したがって、TIL 拡張中の AKT シグナル伝達を時間的に阻害することは、TIL の質を向上させ、臨床設定における TIL の持続性及び治療有効性を向上させるためのアプローチを表すことができる。

30

【2517】

実施例17：エキスピボ TIL 拡張中の AKT 阻害は、分化の少ない (CD39-CD69-) CD8 + T 細胞の集団を増加させながら、サイトカイン産生及び機能を増強する。背景

自己腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) を使用した養子細胞療法は、転移性黒色腫 (Sarnai et al., J Clin Oncol 2021; 39 (24) : 2656-66) 及び他の上皮悪性腫瘍を有する患者において持続的な応答を示している。最近、メモリー前駆体幹様 (CD39-CD69-) 表現型は、転移性黒色腫を有する患者のコホートにおいて完全な退縮及び TIL 持続性と関連付けられた (Krishna et al., Science 2020; 370 (6522) : 1328-34) ）。より分化が少なく、より幹様の属性を有する TIL を拡張する戦略は、向上した持続性、機能性、及びより良い抗腫瘍活性をもたらし得る。

40

【2518】

TIL におけるプロテインキナーゼ B (AKT) の薬理的阻害は、メモリー T 細胞に特徴的な転写、代謝、及び機能的特性を誘導することが示されている (Crompton et al., Cancer Res 2015; 75 (2) : 296-305) 。

【2519】

この研究は、エキスピボ TIL 拡張中の AKT 阻害が、向上したサイトカイン出力及び機能性を有する、より分化が少なく、より幹様の細胞の割合を増加させることができるか

50

どうかを調べるために実行された。

【2520】

方法

異なる適応症からの患者の腫瘍を受け取り、断片化し、TIL製造のための拡張プロトコルに供した。異なる用量（0.3 μ M及び1 μ M）のpan-AKT阻害剤（AKTi）イパタセルチブを、エクスピボ拡張中に培養物に添加した。研究の概略図については、図35を参照されたい。TILの拡張可能性、ならびに表現型及び機能的特性を最終TIL製品上で評価した。

【2521】

結果

図36は、AKTi処置が、T細胞比に影響を及ぼすことなく、TIL拡張及び生存率を維持したことを示す。TILは、未処置（CTRL、灰色のバー）のままにするか、またはpan-AKTiイパタセルチブの濃度を増加させて処置した。処置は、REP段階中のみ（青色のバー）またはREP前及びREP中（緑色のバー）のいずれかに加えた。図36Aは、22日間の拡張プロセスの終わりにおけるTILの倍率拡張及び生存率を示し、図36Bは、それぞれ、左パネル、中央パネル、及び右パネルに凍結保存された細胞における拡張プロセス後のCD8+、CD4+、及びCD4+（Foxp3+）細胞の頻度を示す。

【2522】

図37は、AKT阻害が、CD8+Temra細胞の頻度を増加させたことを示す。具体的には、図37は、処置後のCD8+（図37A）及びCD4+（図37B）TILにおけるTcm（CD45RA-CCR7+）、Tem（CD45RA-CCR7-）、及びTemra（CD45+CCR7-）細胞の頻度を示し、*P<0.05である。

【2523】

図38は、AKTi処置が、CD8+TILにおいてIL-7R及びCXCR3発現を増加させたことを示す。凍結保存された対照またはAKTi処置されたTILをフローサイトメトリーによって分析し、図38は、IL-7R+（図38A）及びCXCR3+CD8+（図38B）TILの代表的なヒストグラム及び頻度を示し、*P<0.05、**P<0.01である。

【2524】

図39は、AKT阻害が、CD69-CD39-CD8+TILの頻度を増加させたことを示す。CD8+TIL上のCD69及びCD39サブセットの頻度を分析し、フローサイトメトリーによって評価される、対照及びAKTi処置されたCD8+TILにおける、CD69及びCD39の単一及び二重陽性集団、ならびに単一及び二重陰性集団の分布を示し、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001である。

【2525】

図40は、CD69-CD39-CD8+TILの分化が少ないことを示す。CD69-CD39-及びCD69+CD39+CD8+TILに対する阻害性受容体及び転写因子の発現を評価した。図40Aは、CD69-CD39-CD8+及びCD69+CD39+CD8+TIL細胞におけるPD1、LAG3、TIM3、及びTIGIT、ならびにTbet、Eomes、Battf、及びTOXの頻度を示す。図40Bは、CD69-CD39-CD8+及びCD69+CD39+CD8+TILにおけるCD62L発現の代表的なヒストグラム及び頻度を示し、*P<0.05、**P<0.01、****P<0.0001である。

【2526】

図41は、AKTi処置したTILが、刺激後、CD69-CD39-細胞のより高い頻度、より低いTOX発現、及びより高いサイトカイン出力を維持したことを示す。一晚刺激後の対照及びAKTi処置したTILにおけるマーカー発現を評価した。凍結保存された対照及び1 μ MのAKTiでREP前及びREPの両方で処置されたTILを、1:5のビーズ対細胞比で抗CD3/CD28ビーズで一晩刺激した。図41Aは、CD69

10

20

30

40

50

－CD39－及びCD69＋CD39＋細胞の頻度、ならびにCD8＋TILにおける転写因子の発現を示し、図41Bは、対照及びAKTi処置したCD8＋TILにおけるサイトカインの発現を示し、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、*** $P < 0.001$ である。

【2527】

図42は、AKTi処置したTILが、反復刺激後に持続した同種異系環境において細胞傷害性の増加を示したことを示す。対照及びAKTi処置したTILの細胞傷害性を評価した。図42Aでは、凍結保存された対照及び1 μ MのAKTiでREP前及びREPの両方で処置されたTILを、10：1のエフェクター対標的細胞の比でKILR（登録商標）THP-1細胞（Eurofins Discover X, Fremont, CA, USA）と24時間共培養して、同種異系設定での細胞傷害性を測定した。図42Bでは、対照及びAKTi処置したTILを、1：1のビーズ対細胞の比で抗CD3／CD28ビーズにより5日毎に刺激した。第3の刺激の3日後、細胞を洗浄し、ビーズを除去し、細胞を、KILR THP-1細胞と10：1のエフェクター対標的細胞の比で24時間共培養した。

10

【2528】

結論

1 μ M用量でのAKTi処置は、対照と比較してTILの同等の拡張及び生存率をもたらしたが、分化の少ないCD39－CD69－細胞の集団を2倍にした。この効果は、再刺激後でさえも存在し、これらの細胞は、CD38ならびに転写因子Tbet及びToxの発現の低下を示し、分化が少なく、消耗した表現型を示唆している。重要なことに、AKTi処置は、IFN γ ＋TNF α ＋CD8＋T細胞の頻度の増加をもたらした、これは、細胞傷害性の増加につながった。

20

【2529】

エキスピボTIL拡張中のAKTi処置は、分化の少ないよりメモリー様の機能的なTILの割合を増加させた。したがって、TIL拡張中のAKTシグナル伝達を時間的に阻害することは、TILの質を向上させ、臨床設定におけるTILの持続性及び治療有効性を向上させるためのアプローチを表すことができる。

【2530】

上記の実施例は、当業者に対して、本発明の組成物、システム及び方法の実施形態の作製方法及び使用方法の完全な開示及び説明を提供するために提示されており、本発明者らが自身の発明とみなすものの範囲を限定することを意図しない。当業者に明らかな、本発明を実施するための上記のモードの修正は、添付の特許請求の範囲内にあることを意図している。本明細書で言及するすべての特許及び刊行物は、本発明が属する分野の当業者のレベルを示す。

30

【2531】

すべての見出し及びセクションの指定は、明確化及び参照の目的のみのために使用されており、いかなる方法でも限定するものとしてみなされない。例えば、当業者は、本明細書に記載の本発明の趣旨及び範囲に従って異なる見出し及びセクションから様々な態様を適宜組み合わせることの有用性を理解する。

40

【2532】

本明細書で引用されたすべての参考文献は、各個々の刊行物または特許もしくは特許出願がすべての目的のためにその全体が参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度にすべての目的のためにそれらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

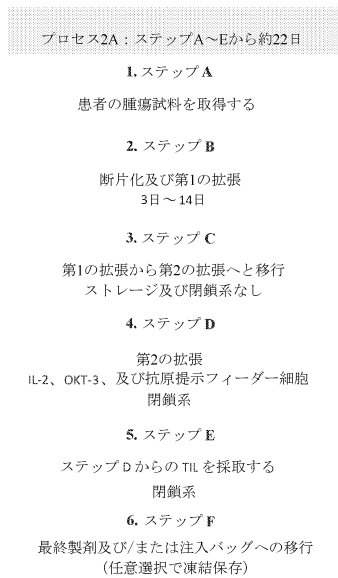
【2533】

当業者に明らかであるように、本出願の趣旨及び範囲から逸脱することなく、本出願の多くの修正及び変形が加えられてもよい。本明細書に記載の特定の実施形態及び実施例はほんの一例として提供されており、本出願は、特許請求の範囲が権利を与えられる等価物の全範囲に加えて、添付の特許請求の範囲の用語によってのみ限定されるべきである。

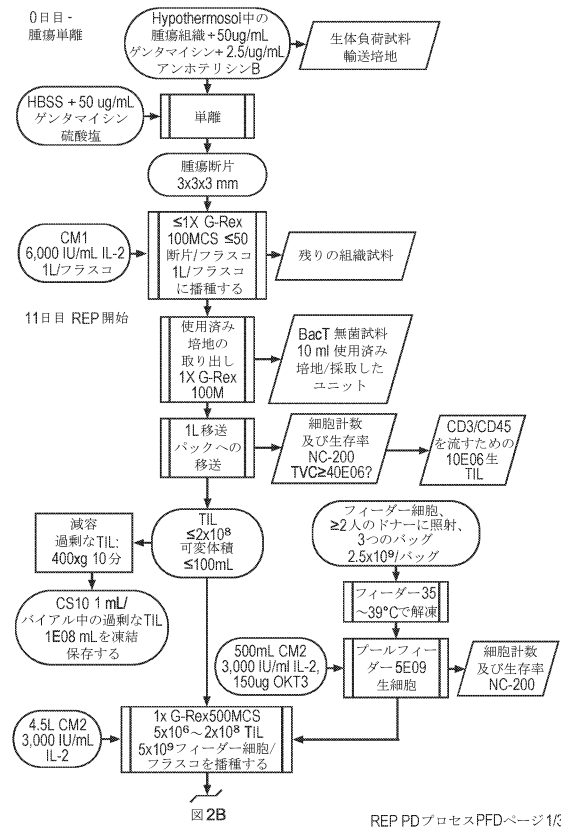
50

【図面】

【図 1】



【図 2 A】



10

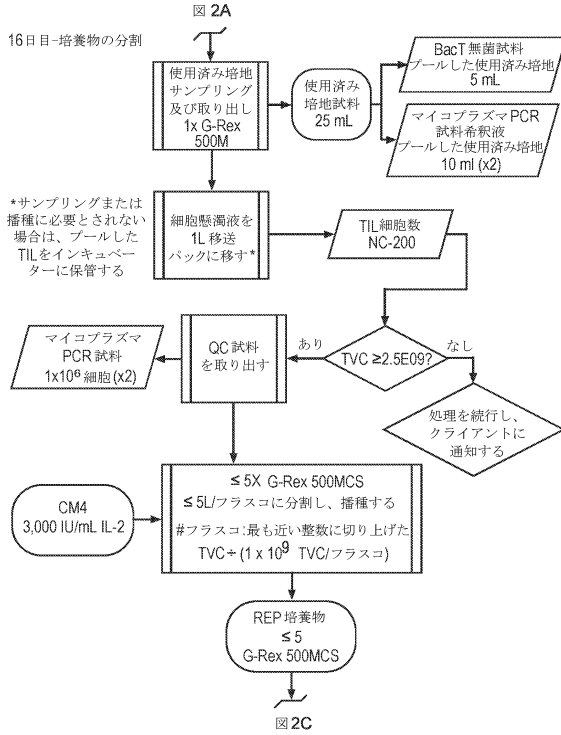
20

30

40

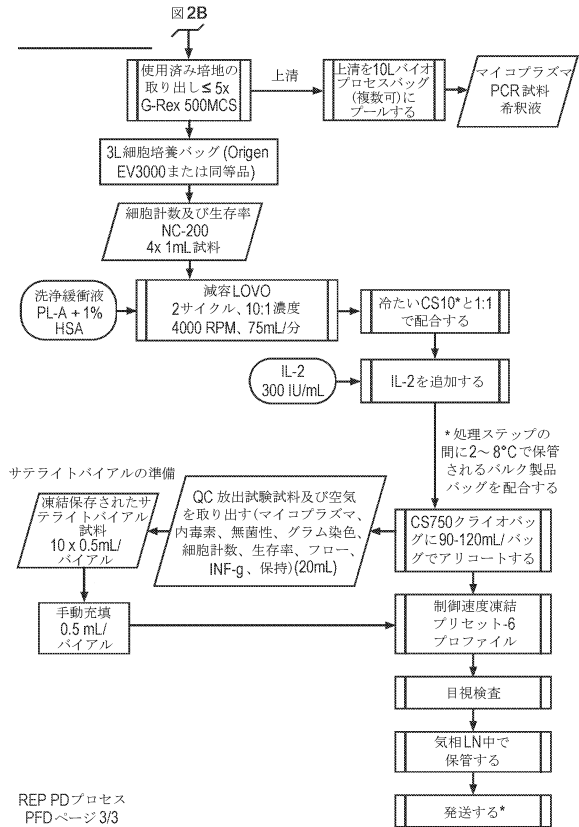
50

【図 2 B】



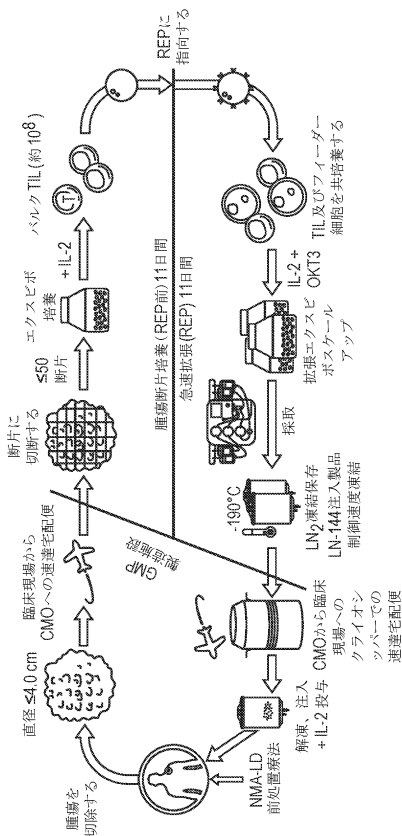
REP PDプロセス
PFD ページ 2/3

【図 2 C】

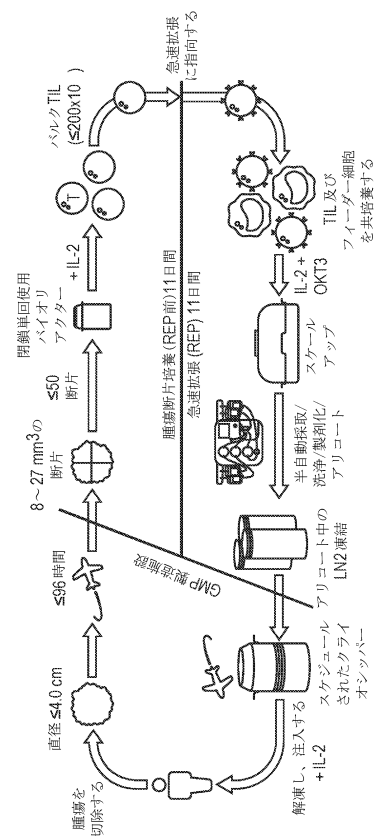


REP PDプロセス
PFD ページ 3/3

【図 3】



【図 4】



10

20

30

40

50

【図 5】

プロセス1C：ステップA～Eについて43～55日		プロセス2A：ステップA～Eから約22日	
1. ステップA 患者の腫瘍試料を取得する		1. ステップA 患者の腫瘍試料を取得する	
2. ステップB 断片化及び第1の拡張 11日～21日		2. ステップB 断片化及び第1の拡張 3日～14日	
3. ステップC 第1の拡張から第2の拡張への移行 選択までの任意選択のストレージ		3. ステップC 第1の拡張から第2の拡張への移行 ストレージなし及び閉鎖系	
4. ステップD 第2の拡張 IL-2、OKT-3、抗原提示フィーダー細胞 任意選択で1回以上繰り返す		4. ステップD 第2の拡張 IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞 閉鎖系	
5. ステップE ステップDからのTILを採取する		5. ステップE ステップDからのTILを採取する 閉鎖系	
6. ステップF 最終製剤及び/または注入バッグへの移行		6. ステップF 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択で凍結保存)	

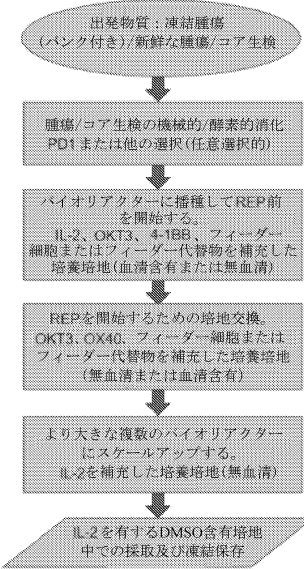
【図 6】

プロセス ステップ	プロセス1C実施形態	プロセス2A実施形態	利点
REP 前	● 10 個の GREX-10 フラスコ当たり 4 個の断片 ● 11～21 日間	● 1つの GREX-100M フラスコ当たり 40 個の断片 ● 11 日間	● フラスコ当たりの腫瘍断片の増加 ● 培養時間の短縮 ● ステップ数の削減 ● 閉鎖系に適している
REP 前から REP への 移行	● REP 前 TIL を選択の ために表現型決定 されるまで凍結し、 次いで解凍して REP に進む(約 30 日目) ● REP は、 $>40 \times 10^6$ TIL を必要とする	● REP 前 TIL は、 11 日目に直接 REP に移動する ● REP は、 $25 \sim 200 \times 10^6$ TIL を必要とする	● REP 前から REP プロセスの短縮 ● ステップ数の削減 ● 表現型決定選択の排除 ● 閉鎖系に適している
REP	● REP 0 日目に 6 つの GREX-100M フラスコ ● REP 0 日目に 5×10^6 TIL 及び 5×10^6 PBMC フィーダー/フラスコ ● REP 7 日目に 18～36 個のフラスコに 分割する ● 14 日間	● 11 日目に 1 つの GREX-500M フラスコ ● 11 日目に $25 \sim 200 \times 10^6$ TIL 及び 5×10^6 PBMC フィーダー ● 16 日目に 6 つ以下の GREX-500M フラスコに分割する ● 11 日間	● ステップ数の削減 ● REP 期間の短縮 ● フラスコ間の TIL の閉鎖系移送 ● 閉鎖系培地交換
採取	● 遠心分離によって 採取した TIL	● LOVO 自動細胞洗浄 システムを介して 採取した TIL	● ステップ数の削減 ● 自動細胞洗浄 ● 閉鎖系 ● 洗浄中の製品損失の低減
最終 製剤化	● Hypothermosol 中の 新鮮な製品 ● 単回注入バッグ ● 限定された発送 安定性	● LN ₂ 中で保管された PlasmaLyte-A + 1% HSA 及び CS10 中の 凍結保存製品 ● 複数のアリコート ● より長い発送安定性	● 発送の柔軟性 ● 柔軟な患者スケジューリング ● よりタイムリーな放出試験
全体の推定 プロセス 時間	● 43～55 日	● 22 日	● 患者へのより速い転向

10

20

【図 7】



0 日目：腫瘍/生検調製

0 日目：REP 前開始

5～8 日目：REP 開始

9～11 日目：REP スケールアップ

12～16 日目：採取

【図 8 A】

プロセス2A：ステップA～Eから約22日		プロセスGEN3：ステップA～Eから約14～18日	
ステップA 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択で、ステップB前に凍結され得る)	ステップA 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択で、ステップB前に凍結され得る)	ステップA 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択で、ステップB前に凍結され得る)	ステップA 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択で、ステップB前に凍結され得る)
ステップB 第1の拡張 (IL-2を含む培地による約3日～14日間 成長させた容器につき少なくとも40個の 断片への物理的断片化)	ステップB プライミングによる第1の拡張 (IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー 細胞を含む培地による約1日～7日間成長 させた容器当たり最大 60 個の断片の 物理的断片化)	ステップB プライミングによる第1の拡張 から急速な第2の拡張への移行 (ステップBのTILは、7日目に ステップDに直接移動)	ステップB プライミングによる第1の拡張 から急速な第2の拡張への移行 (IL-2、OKT-3、及び2倍の抗原提示 フィーダー細胞を含む成長培地培地 (medium)において成長したTIL；10～11日目 にスケールアップ及びさらなるIL-2を添加)
ステップC 第1の拡張から第2の拡張へと移行 (ステップBのTILは、ステップD、 任意にステップBの11日目に直接移動)	ステップC 第1の拡張から第2の拡張へと移行 (ステップBのTILは、ステップD、 任意にステップBの11日目に直接移動)	ステップC 第1の拡張から第2の拡張へと移行 (ステップBのTILは、ステップD、 任意にステップBの11日目に直接移動)	ステップC 第1の拡張から第2の拡張へと移行 (ステップBのTILは、ステップD、 任意にステップBの11日目に直接移動)
ステップD 第2の拡張 (密閉容器内にIL-2、OKT-3、及び抗原 提示フィーダー細胞を含む成長培地培地 (medium)において成長したTIL)	ステップD 第2の拡張 (密閉容器内にIL-2、OKT-3、及び抗原 提示フィーダー細胞を含む成長培地培地 (medium)において成長したTIL)	ステップD 急速な第2の拡張 (IL-2、OKT-3、及び2倍の抗原提示 フィーダー細胞を含む成長培地培地 (medium)において成長したTIL；10～11日目 にスケールアップ及びさらなるIL-2を添加)	ステップD 急速な第2の拡張 (IL-2、OKT-3、及び2倍の抗原提示 フィーダー細胞を含む成長培地培地 (medium)において成長したTIL；10～11日目 にスケールアップ及びさらなるIL-2を添加)
ステップE ステップDからのTILを採取する (閉鎖系を介して採取されたTIL)	ステップE ステップDからのTILを採取する (閉鎖系を介して採取されたTIL)	ステップE ステップDからのTILを採取する (閉鎖系を介して採取されたTIL)	ステップE ステップDからのTILを採取する (閉鎖系を介して採取されたTIL)
ステップF 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択で凍結保存)	ステップF 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択で凍結保存)	ステップF 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択で凍結保存)	ステップF 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択で凍結保存)

30

40

50

【図 8 B】

プロセス GEN 3：ステップ A～E から約 14～18 日
ステップ A 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択で、ステップ B 前に凍結され得る)
ステップ B ブライミングによる第 1 の拡張 (IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地による約 1 日～7 日間成長させた容器当たり最大 60 個の断片の物理的断片化)
ステップ C ブライミングによる第 1 の拡張から急速な第 2 の拡張への移行 (ステップ B の TIL は、7 日目にステップ D に直接移動)
ステップ D 急速な第 2 の拡張 (IL-2、OKT-3、及び 2 倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地 (medium) において成長した TIL；10～11 日目にスケールアップ及びさらなる IL-2 を添加)
ステップ E ステップ D からの TIL を採取する
ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択で凍結保存)

【図 8 C】

実施形態 GEN 3.0： ステップ A～E から約 14～18 日	実施形態 GEN 3.1 対照： ステップ A～E から約 14～18 日	実施形態 GEN 3.1 試験/F： ステップ A～E から約 14～18 日
ステップ A 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択で、ステップ B 前に凍結され得る)	ステップ A 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択で、ステップ B 前に凍結され得る)	ステップ A 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択で、ステップ B 前に凍結され得る)
ステップ B ブライミングによる第 1 の拡張 (IL-2 を含む培地による約 1 日～7/8 日間成長させた容器につき最大 60 個の断片の物理的断片化)	ステップ B ブライミングによる第 1 の拡張 (IL-2 及び OKT-3 を含む培地による約 1 日～7/8 日間成長させた容器につき最大 60 個の断片の物理的断片化)	ステップ B ブライミングによる第 1 の拡張 (IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地による約 1 日～7/8 日間成長させた容器につき最大 60 個の断片の物理的断片化)
ステップ C ブライミングによる第 1 の拡張から急速な第 2 の拡張への移行 (ステップ B の TIL は、7 日目/8 日目にステップ D に直接移動)	ステップ C ブライミングによる第 1 の拡張から急速な第 2 の拡張への移行 (ステップ B の TIL は、7 日目/8 日目にステップ D に直接移動)	ステップ C ブライミングによる第 1 の拡張から急速な第 2 の拡張への移行 (ステップ B の TIL は、7 日目/8 日目にステップ D に直接移動)
ステップ D 急速な第 2 の拡張 (IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地 (medium) において成長した TIL；10～11 日目にスケールアップ及びさらなる IL-2 を添加)	ステップ D 急速な第 2 の拡張 (IL-2、OKT-3、及び 2 倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地 (medium) において成長した TIL；10～11 日目にスケールアップ及びさらなる IL-2 を添加)	ステップ D 急速な第 2 の拡張 (IL-2、OKT-3、及び 2 倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地 (medium) において成長した TIL；10～11 日目にスケールアップ及びさらなる IL-2 を添加)
ステップ E ステップ D からの TIL を採取する	ステップ E ステップ D からの TIL を採取する	ステップ E ステップ D からの TIL を採取する
ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択で凍結保存)	ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択で凍結保存)	ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択で凍結保存)

【図 8 D】

修正した Gen 2 様プロセス：ステップ A～E から約 22 日
ステップ A 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択で、ステップ B 前に凍結され得、任意選択で、腫瘍試料は、コア/小生検であり得る)
ステップ B1 初期培養容器当たり最大 60 個の腫瘍断片または最大 10 個のコア/小生検の物理的断片化、IL-2 を含む成長培地中で 3 日間成長した TIL
ステップ B2 ブライミングによる第 1 の拡張 IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地中で 8 日間成長した TIL
ステップ C ブライミングによる第 1 の拡張から急速な第 2 の拡張への移行 (ステップ B の TIL は、11 日目にステップ D に直接移動する)
ステップ D 急速な第 2 の拡張 (IL-2、OKT-3、及び 50 倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地において成長した TIL、16 日目にスケールアップし、追加の IL-2 を追加する)
ステップ E ステップ D からの TIL を採取する
ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグに移す (任意選択で凍結保存する)

【図 8 E】

プロセス CD39/CD69 GEN 2A：ステップ A～E から約 22 日	プロセス CD39/CD69 GEN 3：ステップ A～E から約 14～22 日
ステップ A1 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択で、ステップ B 前に凍結され得る)	ステップ A1 患者の腫瘍試料を取得する (任意選択で、ステップ B 前に凍結され得る)
ステップ A2 腫瘍試料の消化/物理的分解	ステップ A2 腫瘍試料の消化/物理的分解
ステップ A3 (a) CD39/CD69 二重陰性、 (b) CD39/CD69 ^{LO} 、または (a) 細胞と (b) 細胞との組み合わせの事前選択	ステップ A3 (a) CD39/CD69 二重陰性、 (b) CD39/CD69 ^{LO} 、または (a) 細胞と (b) 細胞との組み合わせの事前選択
ステップ B 第 1 の拡張 (IL-2 を含む培地による約 3 日～14 日間成長させた容器当たり 1000-100,000 個の細胞)	ステップ B ブライミングによる第 1 の拡張 (IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む培地による約 1 日～11 日間成長させた容器当たり 1000-100,000 個の細胞)
ステップ C 第 1 の拡張から第 2 の拡張へと移行 (ステップ B の TIL は、ステップ D、任意にステップ B の 11 日目に直接移動)	ステップ C ブライミングによる第 1 の拡張から急速な第 2 の拡張への移行 (ステップ B の TIL は、7 日目～11 日目にステップ D に直接移動)
ステップ D 第 2 の拡張 (密閉容器内に IL-2、OKT-3、及び抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地 (medium) において成長した TIL)	ステップ D 急速な第 2 の拡張 (IL-2、OKT-3、及び 2 倍の抗原提示フィーダー細胞を含む成長培地培地 (medium) において成長した TIL；10 日目～11 日目にスケールアップ及びさらなる IL-2 を添加)
ステップ E ステップ D からの TIL を採取する (閉鎖系を介して採取された TIL)	ステップ E ステップ D からの TIL を採取する
ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択で凍結保存)	ステップ F 最終製剤及び/または注入バッグへの移行 (任意選択で凍結保存)

10

20

30

40

50

【図 1 1】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	最適化された Gen 3.0
REP前-0日目	50個以下の断片/1つのG-Rex 100MCS-11日	180個以下の断片/3つのG-Rex、事前配合されたCM1加温培地 100MCS-11日	新鮮または凍結腫瘍 1G-Rex当たり30以下の断片から最大60の断片を有する全腫瘍 100MCS最大4つのG-Rex、事前に配合された加温培地-7日間、REP前、フィーダー-2.5 E8細胞+OKT-3 (30ng/mL)
REP開始	REPに指向-11日目-200 E8 TIL 1つのG-Rex500MCS	REPに指向-11日目-200 E8 TIL 1つのG-Rex500MCS中の事前配合されたCM2加温培地	REPに指向-7日目-すべての細胞TIL-同じG-Rex100MCS(100MCS 最大4つのGREX)、標準培地または合成培地(無血清) フィーダー-5E8細胞+OKT-3(30ng/mL)を添加
TILの増殖またはスケールアップ	1-5つのG-Rex500MCS 16日目に分割する	2-5つのG-Rex500MCS 事前配合されたCM4加温培地 16日目に分割する	G-Rex100MCSから、TIL懸濁液をG-Rex500MCS、最大4つのGREX500MCSに移す。標準培地または合成培地(無血清) 10日目または11日目にスケールアップする
採取	22日目に採取する、 LOVO自動細胞洗浄機	22日目に採取する、 LOVO自動細胞洗浄機 (5回の洗浄サイクル)	14日目または16日目に採取する LOVO自動細胞洗浄機(5回の洗浄サイクル)
最終製剤	凍結保存した製品 LN ₂ 中の300IU/mlのIL2-CS10、 複数のアリコート	凍結保存した製品 LN ₂ 中の300IU/mlのIL2-CS10、 複数のアリコート	凍結保存した製品 LN ₂ 中の300IU/mlのIL2-CS10、 複数のアリコート
プロセス時間	22日	22日	16日

【図 1 3】

プロセス比較	主なプロセス変化	利点
Gen 2 : Gen 2.1	1つのフラスコの代わりに2つのフラスコを用いたプロセスを開始する 2つのG-Rex500MCSフラスコ間のREP開始のフィーダー層に分割する - 使用前に培地を事前に製剤化し、加温する	- 増加したTILレパトリーを用いた最終細胞計数(用量)の増加の可能性。 - プロセス中のプロセス冗長性
Gen 2.1 : Gen 3.1	- 新鮮または凍結腫瘍 14~16日のプロセス(22日から) - プロセス中の全フィーダー層を低減する 0日目に存在するフィーダー層及びOKT3 - 断片で開始したREP 100MCSスケールから500MCS - 複数のpre-REPのフラスコを計量する - 標準培地及び合成培地(無血清)	- 増加した有効性 - 改善された表現型 - 低下したプロセス時間 - 低減した試薬試験 - 低下したプロセス変動 - 合成された試薬 - 増加したレパトリー - 純度を低減する(フィーダー) - 同等またはより高い用量。

【図 1 5】

プロセス	Gen 2	Gen 3
L4064	標準培地	標準培地
L4065	標準培地	標準培地
M1085T	標準培地	標準培地

標準培地:
REP 前: CM1
REP 開始: CM2
分割またはスケールアップ: CM4

プロセス	Gen 3	Gen 3.1 合成	Gen 3.1
L4063	標準培地	標準培地	標準培地
L4064	合成培地	合成培地	合成培地

合成培地:
プロセスの各日におけるCTS Optimizer (無血清培地)

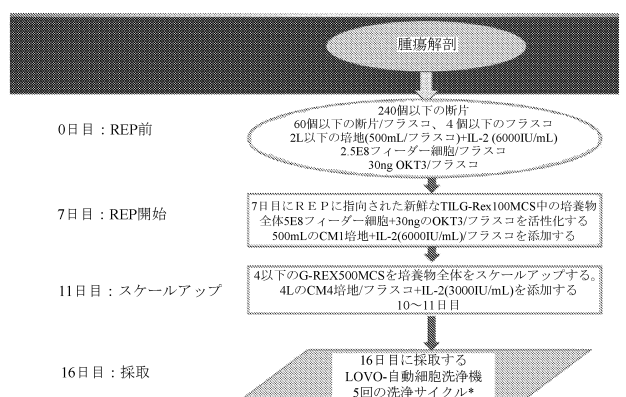
【図 1 2】

プロセス	条件	Gen 3.1
0日目-REP前開始	培地 CM1 IL-2 (6000 IU/mL) OKT-3 (30ng/mL) フィーダー (250 E+06)	500 mL * * *
7日目-REP開始	培地 CM2 IL-2 (6000 IU/mL) 7日目に追加された OKT-3 (30ng/mL) 7日目に追加されたフィーダー 日数での総フィーダー	500 mL * * 500 E+06 750 E+06
9-11日目-スケールアップ	G-Rex100MCSから、TIL懸濁液を1つのG-Rex500MCS(最大3つのGREX500MCS)に移す	あり
16日目-採取	LOVO自動細胞洗浄機	あり

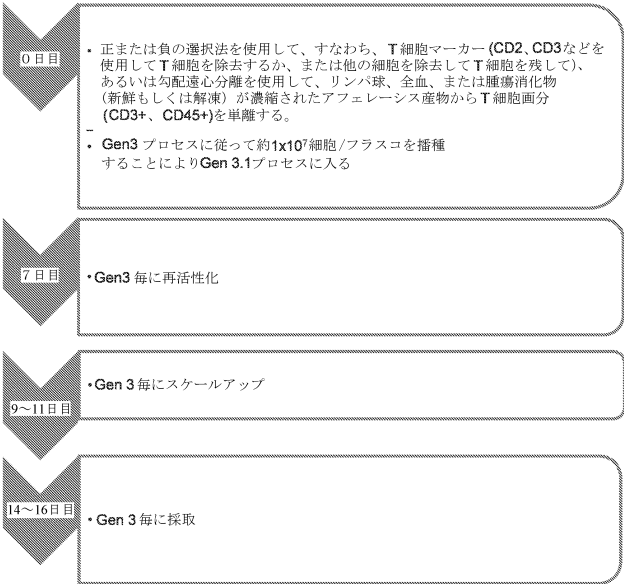
【図 1 4】

プロセス比較	主なプロセス変化	所望の改善	成功の判断基準	成果
Gen 2 : Gen 3.0	14~16日 - 最大4つのフラスコを用いてREPを開始する。 100MCSスケールから500MCS	- 増加した有効性 - 改善された表現型 - 低下したプロセス時間	- INF-gにより測定されるように有効性を増加する✓ - 同等の表現型✓ - 同等の用量✓ - 同等の純度✓ (フィーダー細胞) - クロノンの多様性を維持する✓	- Gen2を上回って増加した有効性 - CD8 細胞におけるCD28の改善した発現 - Gen 3.1における16日目までに達したフラスコの最大容量 - 低減したフィーダー細胞使用 - 増加した多様性

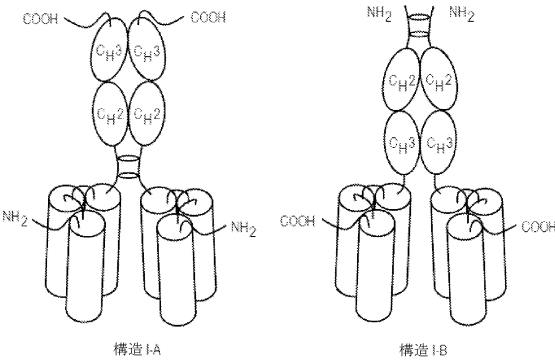
【図 1 6】



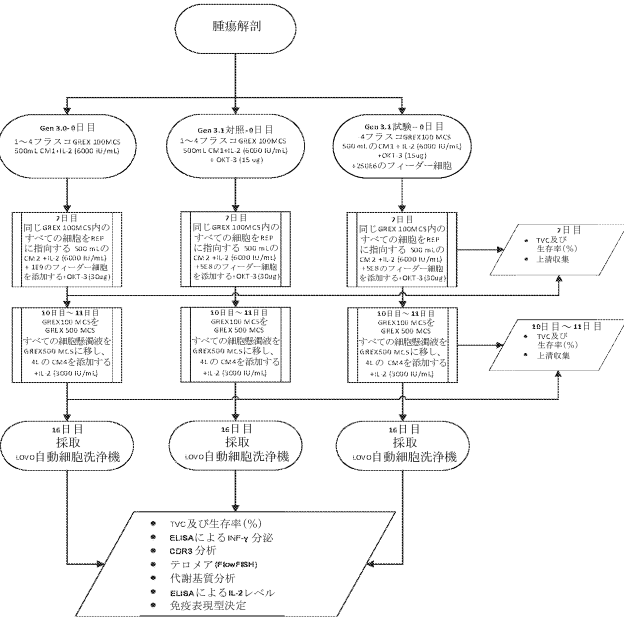
【図 17】



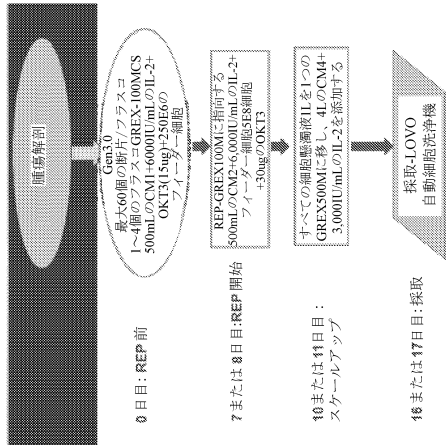
【図 18】



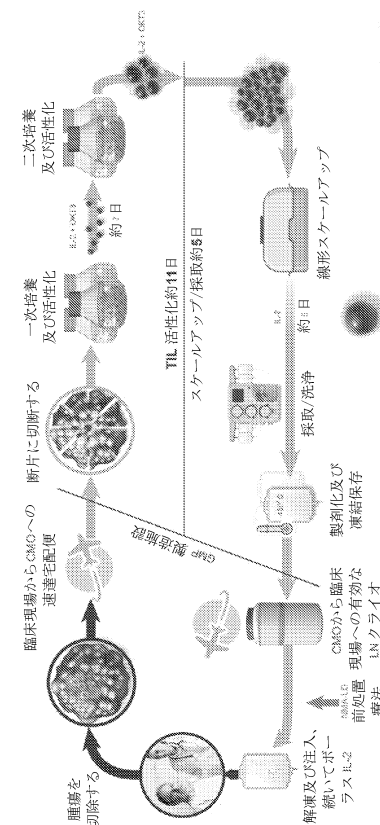
【図 19】



【図 2 1】



【図 2 2】



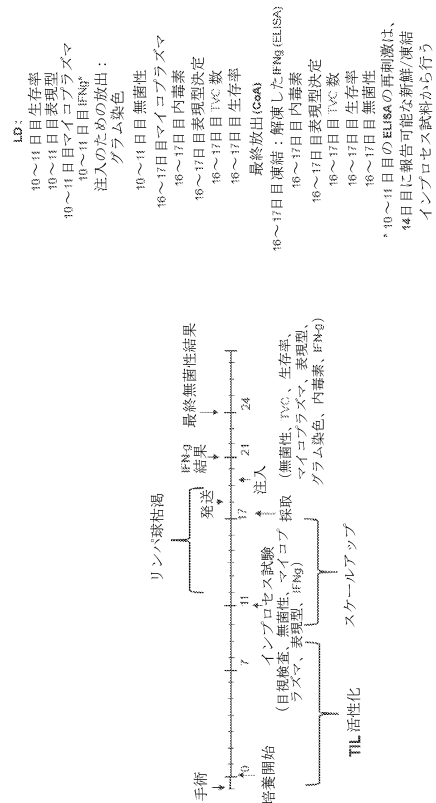
【図 2 3 A】

Gen 2		Gen 3
12日	16~17日	
腫瘍を切除する	腫瘍を配便	断片に切断する
腫瘍を配便	断片に切断する	一次培養及び活性化
断片に切断する	一次培養及び活性化	二次培養及び活性化
一次培養及び活性化	二次培養及び活性化	TIL 活性化約11日
二次培養及び活性化	TIL 活性化約11日	スケールアップ/採取約6日
TIL 活性化約11日	スケールアップ/採取約6日	採取/洗浄
スケールアップ/採取約6日	採取/洗浄	凍結保存
採取/洗浄	凍結保存	CHOから臨床現場への有効なシッパ

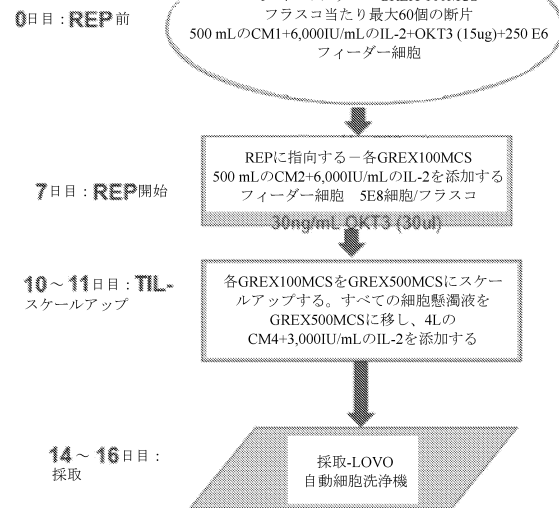
【図 2 3 B】

Gen 2		Gen 3
12日	16~17日	
腫瘍を切除する	腫瘍を配便	断片に切断する
腫瘍を配便	断片に切断する	一次培養及び活性化
断片に切断する	一次培養及び活性化	二次培養及び活性化
一次培養及び活性化	二次培養及び活性化	TIL 活性化約11日
二次培養及び活性化	TIL 活性化約11日	スケールアップ/採取約6日
TIL 活性化約11日	スケールアップ/採取約6日	採取/洗浄
スケールアップ/採取約6日	採取/洗浄	凍結保存
採取/洗浄	凍結保存	CHOから臨床現場への有効なシッパ

【図 24】



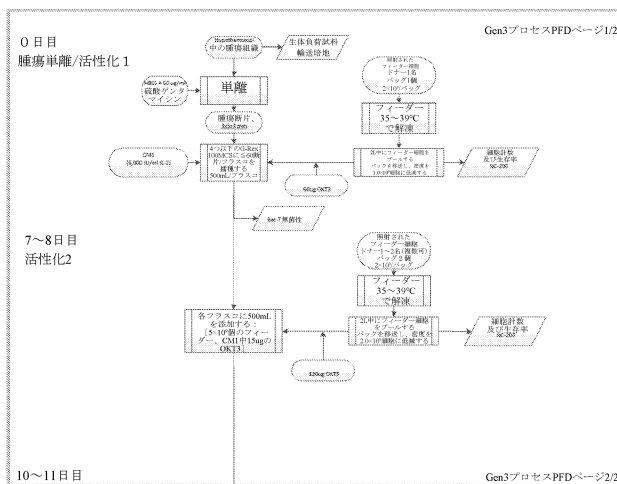
【図 25】



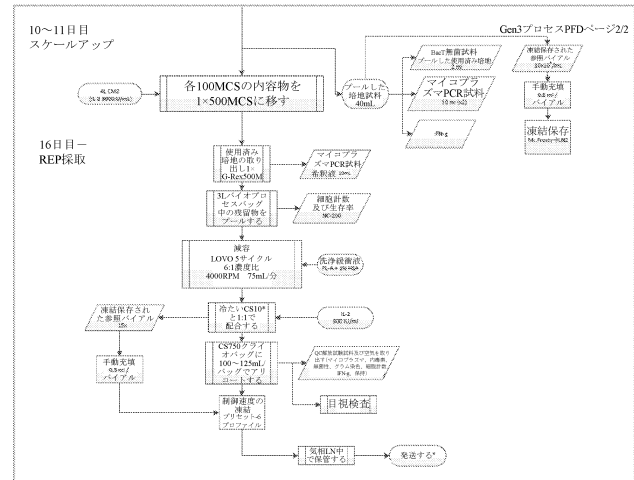
10

20

【図 26 A】



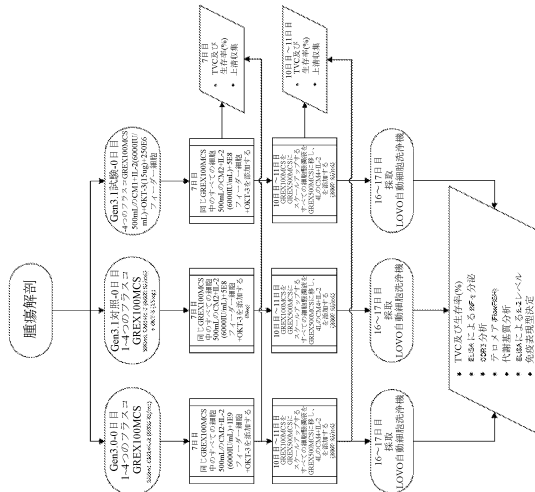
【圖 2 6 B】



30

40

【図 3 1】



【圖 3 2】

ステップ	Gen 3 プロセス 最適化
0 日目 腫瘍単離 及び活性化	240個以下の断片 60個以下の断片/フラスコ 4つ以下のフラスコ 2L以下の培地 (500mL/フラスコ) IL-2 (6000IU/mL) 2.5x10 ⁶ 個のフィーダー細胞/フラスコ 15ug OKT3/フラスコ
7-8 日目 再有効化	REPに指向した新鮮なTIL 培養物全体を活性化する 5x10 ⁶ 個のフィーダー細胞 30 ug OKT3/フラスコ G-Rex 100MCS 500mLの培地+IL-2を添加する(6000IU/mL)
10-11 日目 スケールアップ またはTIL 継代培養	4つ以下のG-REX 500MCS 1LをG-Rex 100MCSからG-Rex 500MCSに移して培養物 全体をスケールアップし、 4Lの培地+IL-2 (3000 IU/mL) /フラスコを添加する
16-17 日目 採取	採取 LOVO自動細胞洗浄機 Plasma/lyte 1% HSAで凍結保存: CS10

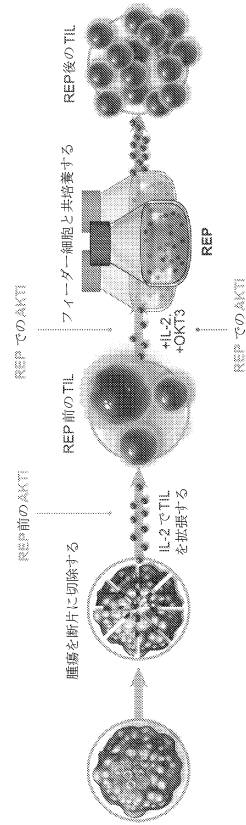
【図 3 3】

試験	合格判定基準	Gen 3.1試験対 Gen3.0 プロセス
細胞計数 (TVC)	Gen 3.1 > 30% からプロセス Gen 3.0	Met
生存率 %	≥70% の生存率	Met
免疫表現型決定 (%CD3+/ %CD45+)	Gen 3.1 と Gen 3.0 プロセスとの 間の ≤5% の差	Met
IFN γ 分泌	Gen 3.1 とからプロセス Gen3.0	Met

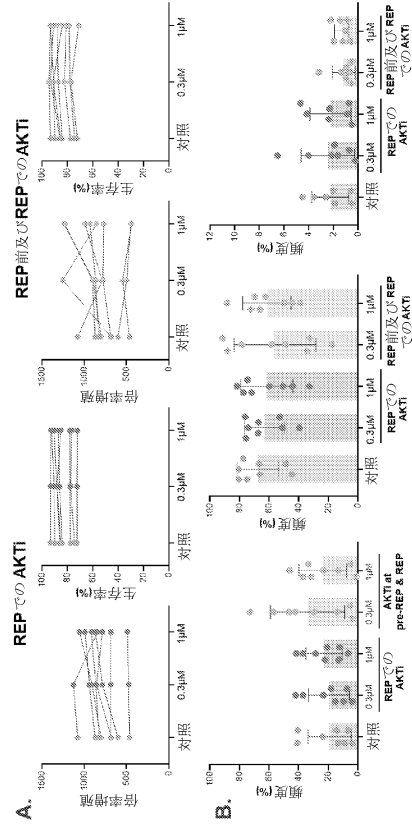
【圖 3 4】



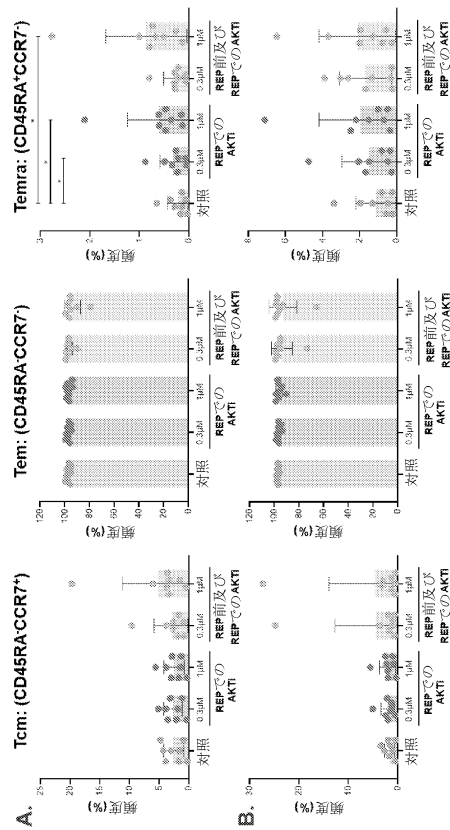
【図 3 5】



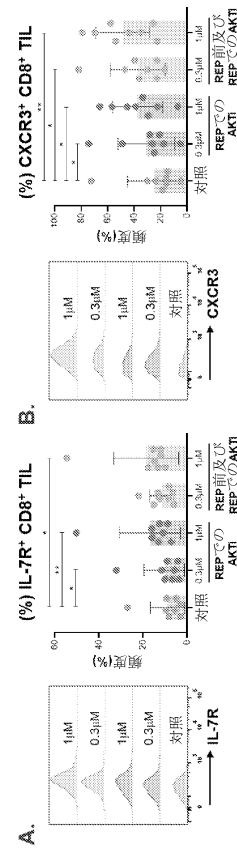
【図 3 6】



【図 3 7】



【図 3 8】



10

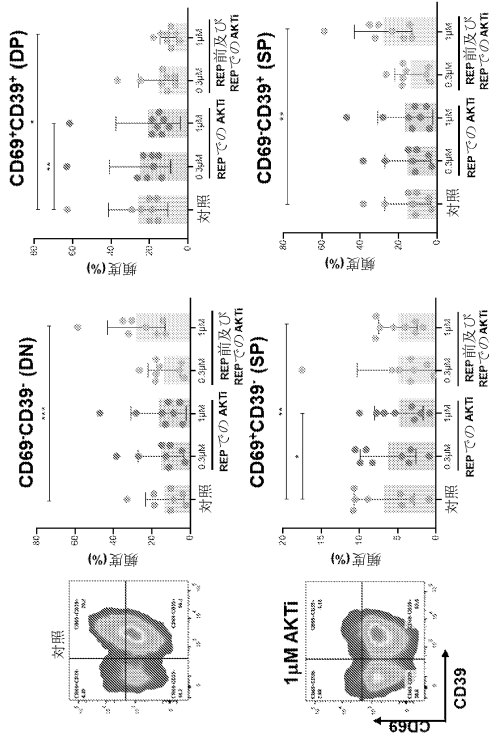
20

30

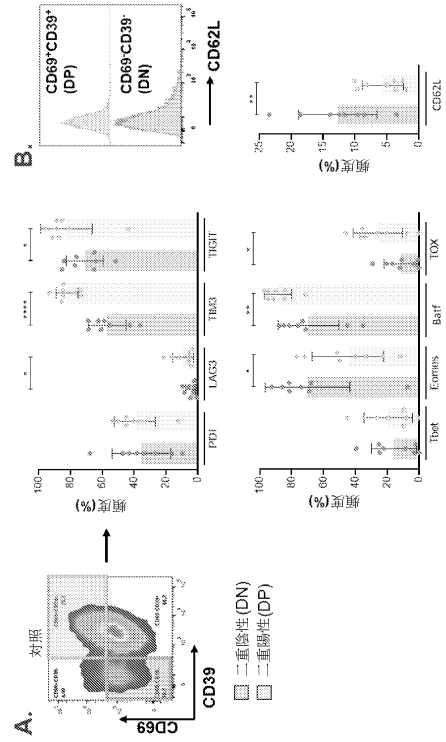
40

50

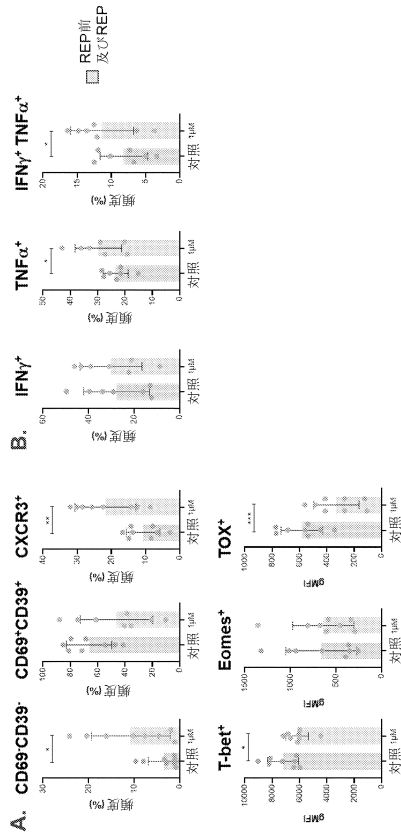
【図 3 9】



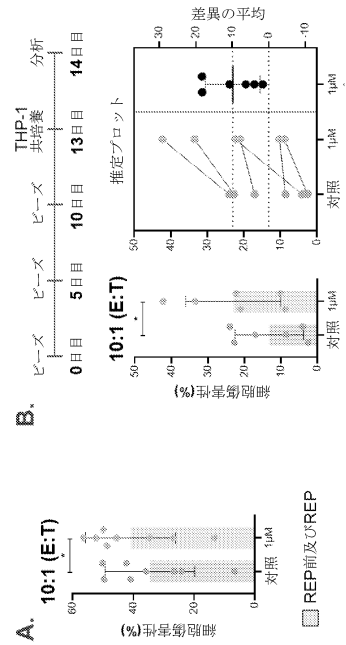
【図 4 0】



【図 4 1】



【図 4 2】



【図 4 3】



10

20

30

40

50

【配列表】

2024510505000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/021224

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. **C12N5/0783 C07K14/705 G01N33/50 A61K35/17 A61P35/00**
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C07K G01N A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, INSPEC, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Krishna Sri ET AL: "Stem-like CD8 T cells mediate response of adoptive cell immunotherapy against human cancer", Science (American Association for the Advancement of Science), 11 December 2020 (2020-12-11), pages 1328-1334, XP055856073, United States DOI: 10.1126/science.abb9847 Retrieved from the Internet: URL:https://www.science.org/doi/10.1126/science.abb9847 [retrieved on 2021-10-28]	1-28, 71-135
Y	the whole document figures 1,2	1-135



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

*** Special categories of cited documents :**

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 June 2022

Date of mailing of the international search report

01/07/2022

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2

NL - 2280 HV Rijswijk

Tel. (+31-70) 340-2040,

Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bayer, Martin

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2022/021224

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Krishna S: "ADOPTIVE CELL THERAPY RESPONSE IN MELANOMA IS MEDIATED BY STEM-LIKE CD8 T CELLS; Abstract 773", J. Immunother. Cancer, 10 December 2020 (2020-12-10), XP055932931, Retrieved from the Internet: URL:https://jitc.bmj.com/content/jitc/8/Su ppl_3/A463.2.full.pdf [retrieved on 2022-06-20]	1-28, 71-135
Y	the whole document Abstract 773	1-135
X	HELD WERNER ET AL: "Not All Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells Are Created Equal", CANCER CELL, CELL PRESS, US, vol. 39, no. 2, 8 February 2021 (2021-02-08), pages 145-147, XP086493273, ISSN: 1535-6108, DOI: 10.1016/J.CCELL.2021.01.015 [retrieved on 2021-02-08]	1-28, 71-135
Y	Abstract 773; the whole document figure 1	1-135
Y	WO 2019/210131 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 31 October 2019 (2019-10-31) figures 1,2 example 1 claims 1-214	1-135
Y	US 2018/207201 A1 (WARDELL SETH [US] ET AL) 26 July 2018 (2018-07-26) examples 1-11 figures 1-3 claims 1-20	1-135
X,P	WO 2022/055946 A1 (US HEALTH [US]) 17 March 2022 (2022-03-17) claims 1-29 examples 1-5	1-135

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2022/021224
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☐ forming part of the international application as filed: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713). 2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished. 3. Additional comments:		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/021224

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019210131 A1	31-10-2019	AU 2019257749 A1	22-10-2020
		BR 112020021660 A2	02-02-2021
		CA 3098303 A1	31-10-2019
		CN 112368003 A	12-02-2021
		EP 3784254 A1	03-03-2021
		JP 2021521846 A	30-08-2021
		KR 20210005138 A	13-01-2021
		MA 52533 A	03-03-2021
		SG 11202010319R A	27-11-2020
		TW 202014195 A	16-04-2020
		US 2021130779 A1	06-05-2021
		US 2022010278 A1	13-01-2022
		WO 2019210131 A1	31-10-2019
US 2018207201 A1	26-07-2018	AU 2018243355 A1	31-10-2019
		BR 112019020326 A2	28-04-2020
		CA 3057975 A1	04-10-2018
		CL 2019002769 A1	08-05-2020
		CL 2020002737 A1	05-03-2021
		CN 110785486 A	11-02-2020
		CO 2019011995 A2	18-02-2020
		CR 20190487 A	17-03-2020
		DK 3601533 T3	03-05-2021
		EC SP19077884 A	31-01-2020
		EP 3601533 A1	05-02-2020
		EP 3722415 A1	14-10-2020
		EP 3730608 A1	28-10-2020
		EP 3766964 A1	20-01-2021
		EP 3910055 A1	17-11-2021
		ES 2874335 T3	04-11-2021
		HR P20210677 T1	25-06-2021
		HU E054829 T2	28-10-2021
		JP 2020515257 A	28-05-2020
		JP 2021519582 A	12-08-2021
		KR 20190142342 A	26-12-2019
		LT 3601533 T	10-06-2021
		MD 3601533 T2	31-07-2021
		PE 20191841 A1	31-12-2019
		PH 12019502247 A1	29-06-2020
		PL 3601533 T3	16-08-2021
		PT 3601533 T	24-05-2021
		RS 61863 B1	30-06-2021
		SG 11201908994R A	30-10-2019
		SI 3601533 T1	30-09-2021
		TN 2019000273 A1	07-01-2021
		TW 201839129 A	01-11-2018
		US 11202803 B1	21-12-2021
		US 2018207201 A1	26-07-2018
		US 2018280436 A1	04-10-2018
		US 2018282694 A1	04-10-2018
		US 2018325954 A1	15-11-2018
		US 2019000882 A1	03-01-2019
		US 2019000883 A1	03-01-2019
		US 2019070222 A1	07-03-2019
		US 2019083536 A1	21-03-2019
		US 2019083538 A1	21-03-2019
		US 2019083539 A1	21-03-2019
		US 2019358259 A1	28-11-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2022/021224

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2019358260 A1	28-11-2019
		US 2019358261 A1	28-11-2019
		US 2020155601 A1	21-05-2020
		US 2020246384 A1	06-08-2020
		US 2020276241 A1	03-09-2020
		US 2020276242 A1	03-09-2020
		US 2020281978 A1	10-09-2020
		US 2020289569 A1	17-09-2020
		US 2020306306 A1	01-10-2020
		US 2020306307 A1	01-10-2020
		US 2021079348 A1	18-03-2021
		US 2021100842 A1	08-04-2021
		US 2021100843 A1	08-04-2021
		US 2021106625 A1	15-04-2021
		US 2021128620 A1	06-05-2021
		US 2021128621 A1	06-05-2021
		US 2021128622 A1	06-05-2021
		US 2021128623 A1	06-05-2021
		US 2021128624 A1	06-05-2021
		US 2021128625 A1	06-05-2021
		US 2021137984 A1	13-05-2021
		US 2021207091 A1	08-07-2021
		US 2021207092 A1	08-07-2021
		US 2021214685 A1	15-07-2021
		US 2021353677 A1	18-11-2021
		US 2021361712 A1	25-11-2021
		US 2021361713 A1	25-11-2021
		US 2021379111 A1	09-12-2021
		US 2022000923 A1	06-01-2022
		US 2022000924 A1	06-01-2022
		US 2022000925 A1	06-01-2022
		US 2022008469 A1	13-01-2022
		WO 2018182817 A1	04-10-2018
WO 2022055946	A1	17-03-2022	NONE

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 1 0 0	
(32)優先日	令和3年11月17日(2021.11.17)	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW アール。 アメリカ合衆国, フロリダ州 3 3 5 4 7, リティア, オークリーフ ラン ドライブ 1 5 9 0 8 (72)発明者 シャルティエークルト, セシル アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 3 0 1, パロ アルト, クーパー ストリート 1 3 5 7 (72)発明者 キュバス, ラファエル アメリカ合衆国, フロリダ州 3 3 6 4 7 タンパ パイン スラスト ウェイ 8 4 0 4 F ターム (参考) 4B065 AA94X AA94Y AB01 AC20 BA01 BA21 BB04 BB12 BB19 BB25 BB34 BB37 BB40 BC03 BC07 BC11 BD09 BD12 BD15 CA44 4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB64 CA04 DA20 MA16 MA66 NA14 ZB26	