

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2023-524108
(P2023-524108A)

(43)公表日 令和5年6月8日(2023.6.8)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/0783(2010.01)	C 1 2 N	5/0783	Z N A	4 B 0 2 9
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 K	35/17		4 B 0 6 5
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 C 0 8 4
A 6 1 K	38/20 (2006.01)	A 6 1 K	38/20		4 C 0 8 7
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全482頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-566653(P2022-566653)	(71)出願人	519006377		
(86)(22)出願日	令和3年5月4日(2021.5.4)		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4年12月28日(2022.12.28)		ス, インコーポレイテッド		
(86)国際出願番号	PCT/US2021/030655		アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9		
(87)国際公開番号	WO2021/226085		4 0 7 0 サン カルロス インダストリ		
(87)国際公開日	令和3年11月11日(2021.11.11)		アル ロード 8 2 5 スイート 4 0 0		
(31)優先権主張番号	63/019,907	(74)代理人	100079108		
(32)優先日	令和2年5月4日(2020.5.4)		弁理士 稲葉 良幸		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100109346		
(31)優先権主張番号	63/146,400		弁理士 大貫 敏史		
(32)優先日	令和3年2月5日(2021.2.5)	(74)代理人	100117189		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		弁理士 江口 昭彦		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA	(74)代理人	100134120		
	最終頁に続く		弁理士 内藤 和彦		
		(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】 改良された腫瘍反応性T細胞の選択

(57)【要約】
本発明は、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT発現に基づいてTILを事前選択するための方法、ならびに増強された腫瘍特異的致死能力（例えば、増強された細胞傷害性）を有する治療用TIL集団を産生するためにそれらの事前選択されたPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを拡張するための方法を提供する。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療用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集団を取得すること、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PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することと、

（c）前記PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、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の増殖が、約1～7、8、9、10、または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、前記産生することと、

（d）前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の増殖に追加されるAPCの数が、ステップ（c）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の増殖が、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、治療用TIL集団であり、前記急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記産生することと、

（e）ステップ（d）から取得された前記治療用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、を含む、前記方法。

【請求項 2】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療用TIL集団に拡張するための方法であって、

f）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、前記対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得すること、及び／または受容することと、

g）（a）の前記第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することと、

h）前記PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び任意で抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、約1～7、8、9、10、または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、前記産生することと、

i）前記第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む細胞培養培地と接触させることにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の増殖が、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、治療用TIL集団である、前記産生することと、

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

10

20

30

40

50

、前記方法。

【請求項 3】

ステップ（c）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（d）における前記培養培地中の APC の数が、ステップ（c）における前記培養培地中の APC の数よりも多い、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

ステップ（c）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（d）における前記培養培地中の APC の数が、ステップ（c）における前記培養培地中の APC の数に等しい、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記 PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／または TIGIT 陽性 TIL が、PD-1 高、CD39 高／低、CD38 低、CD103 高／低、CD101 低、LAG3 高、TIM3 高、及び／または TIGIT 高 TIL である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

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

（a）PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／または TIGIT 陽性であるように選択されている第 1 の TIL 集団であって、腫瘍消化により対象からの腫瘍試料を処理し、前記 PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／または TIGIT 陽性 TIL を選択することにより取得可能な前記第 1 の TIL 集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第 1 の増殖を行って、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 の増殖が、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 の増殖が、約 1～7、8、9、10、または 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、前記産生することと、

（b）前記第 2 の TIL 集団に追加の IL-2、OKT-3、及び APC を含む前記第 2 の TIL 集団の細胞培養培地と接触させることによって、急速な第 2 の増殖を行って、第 3 の TIL 集団を産生することであって、前記急速な第 2 の増殖における APC の数が、ステップ（a）の APC の数の少なくとも 2 倍であり、前記急速な第 2 の増殖が、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、治療用 TIL 集団であり、前記急速な第 2 の増殖が、第 2 のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記産生することと、

（c）ステップ（b）から取得された前記治療用 TIL 集団を採取することと、を含む、前記方法。

【請求項 7】

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

（a）第 1 の TIL 集団を、IL-2、OKT-3、及び任意で抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で培養することにより、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／または TIGIT 陽性であるように選択されている前記第 1 の TIL 集団のプライミングによる第 1 の増殖を行って、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 の増殖が、約 1～7、8、9、10、または 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 を含む細胞培養培地と接触させることにより、急速な第 2 の増殖を行って、第 3 の TIL 集団を産生することであって、前記急速な第 2 の増殖が、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、治療用 TIL 集団である、前記産生することと、

10

20

30

40

50

(c) ステップ (b) から取得された前記治療用 T I L 集団を採取することと、を含む、前記方法。

【請求項 8】

ステップ (a) において、前記細胞培養培地が抗原提示細胞 (A P C) をさらに含み、ステップ (b) における前記培養培地中の A P C の数が、ステップ (a) における前記培養培地中の A P C の数よりも多い、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ (a) において、前記細胞培養培地が、抗原提示細胞 (A P C) をさらに含み、ステップ (b) における前記培養培地中の A P C の数が、ステップ (a) における前記培養培地中の A P C の数に等しい、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

前記 P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T 陽性 T I L が、P D - 1 高、C D 3 9 高、C D 3 8 低、C D 1 0 3 高、C D 1 0 1 低、L A G 3 高、T I M 3 高、及び／または T I G I T 高 T I L である、請求項 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 11】

ステップ (b) の前記選択、または請求項 6 もしくは 7 に記載の方法、ステップ (a) の前記選択が、フローサイトメトリー (例えば、F A C S を含む)、抗体系ビーズ選択、及び抗体系磁気ビーズ選択からなる群から選択される選択方法を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 12】

ステップ (b) の前記選択、または請求項 6 もしくは 7 に記載の方法、ステップ (a) の前記選択が、フローサイトメトリー (例えば、F A C S を含む) を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 13】

ステップ (b) の前記選択、または請求項 6 もしくは 7 に記載の方法、ステップ (a) の前記選択が、(i) 前記第 1 の T I L 集団を、P D - 1 の I g V ドメインの外側の N 末端ループによって P D - 1 に結合する過剰のモノクローナル抗 P D - 1 I g G 4 抗体に曝露するステップと、(i i) フルオロフォアに複合した過剰の抗 I g G 4 抗体を追加するステップと、(i i i) 前記フルオロフォアに基づいて流動系細胞選別を行って、P D - 1 に富む T I L 集団を取得するステップと、を含む、請求項 1 または 2 または 1 2 に記載の方法。

【請求項 14】

P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T 陽性 T I L の前記選択が、少なくとも 1×10^6 の P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T 陽性 T I L が存在するまで生じる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 15】

前記第 1 の T I L 集団を培養するための前記細胞培養培地が、2-メルカプトエタノールを含む、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 16】

前記第 2 の T I L 集団を培養するための前記細胞培養培地が、2-メルカプトエタノールを含む、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 17】

前記第 1 の T I L 集団及び前記第 2 の T I L 集団を培養するための前記細胞培養培地が、2-メルカプトエタノールを含む、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 18】

前記 P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T 陽性 T I L が、それぞれ、抗 P D - 1、抗 C D 3 9、抗 C D 3 8

10

20

30

40

50

、抗CD103、抗CD101、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGIT抗体複合ビーズを使用して選択される、請求項1または2または6または7に記載の方法。

【請求項19】

前記PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILが、それぞれ、抗PD-1、抗CD39、抗CD38、抗CD103、抗CD101、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGIT抗体複合磁気ビーズを使用して選択される、請求項1または2または6または7に記載の方法。

【請求項20】

前記PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILが、それぞれ、抗PD-1、抗CD39、抗CD38、抗CD103、抗CD101、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGIT抗体複合ビーズと結合し、前記PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陰性TILが、それぞれ、抗PD-1、抗CD39、抗CD38、抗CD103、抗CD101、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGIT抗体複合ビーズと結合しない、請求項18または19に記載の方法。

【請求項21】

前記モノクローナル抗PD-1 IgG4抗体が、ニボルマブ、またはそのバリエーション、断片、もしくは複合体である、請求項13に記載の方法。

【請求項22】

前記抗IgG4抗体が、クローン抗ヒトIgG4、クローンHP6023である、請求項21に記載の方法。

【請求項23】

前記急速な第2の増殖におけるAPCの数対前記プライミングによる第1の増殖におけるAPCの数が、約1.5:1～約20:1の範囲から選択される比率である、請求項1または2または6または7に記載の方法。

【請求項24】

前記比率が、約1.5:1～約10:1の範囲から選択される、請求項23に記載の方法。

【請求項25】

前記比率が、約2:1～約5:1の範囲から選択される、請求項23に記載の方法。

【請求項26】

前記比率が、約2:1～約3:1の範囲から選択される、請求項23に記載の方法。

【請求項27】

前記比率が、約2:1である、請求項23に記載の方法。

【請求項28】

前記プライミングによる第1の増殖におけるAPCの数が、約 1×10^8 APC～約 3.5×10^8 APCの範囲から選択され、前記急速な第2の増殖におけるAPCの数が、約 3.5×10^8 APC～約 1×10^9 APCの範囲から選択される、請求項1または2または6または7に記載の方法。

【請求項29】

前記プライミングによる第1の増殖におけるAPCの数が、約 1.5×10^8 APC～約 3×10^8 APCの範囲から選択され、前記急速な第2の増殖におけるAPCの数が、約 4×10^8 APC～約 7.5×10^8 APCの範囲から選択される、請求項1または2または6または7に記載の方法。

【請求項30】

前記プライミングによる第1の増殖におけるAPCの数が、約 2×10^8 APC～約 2.5×10^8 APCの範囲から選択され、前記急速な第2の増殖におけるAPCの数が、約 4.5×10^8 APC～約 5.5×10^8 APCの範囲から選択される、請求項1または2または6または7に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

約 2.5×10^8 APC が、前記プライミングによる第 1 の増殖に追加され、 5×10^8 APC が、前記急速な第 2 の増殖に追加される、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記第 2 の TIL 集団中の TIL の数の、前記第 1 の TIL 集団中の TIL の数に対する比率が、約 1.5 : 1 ~ 約 100 : 1 である、請求項 1 ~ 3 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 3】

前記第 2 の TIL 集団中の TIL の数の、前記第 1 の TIL 集団中の TIL の数に対する比率が、約 50 : 1 である、請求項 1 ~ 3 1 のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 3 4】

前記第 2 の TIL 集団中の TIL の数の、前記第 1 の TIL 集団中の TIL の数に対する比率が、約 25 : 1 である、請求項 1 ~ 3 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 5】

前記第 2 の TIL 集団中の TIL の数の、前記第 1 の TIL 集団中の TIL の数に対する比率が、約 20 : 1 である、請求項 1 ~ 3 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 6】

前記第 2 の TIL 集団中の TIL の数の、前記第 1 の TIL 集団中の TIL の数に対する比率が、約 10 : 1 である、請求項 1 ~ 3 1 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 3 7】

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 3 1 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記方法が、前記治療用 TIL 集団を採取するステップの後に、

前記採取された治療用 TIL 集団を注入バッグに移す追加のステップを行うことを含む、請求項 2 ~ 3 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 3 9】

前記プライミングによる第 1 の増殖が複数の別個の容器中で行われ、その別個の容器の各々において、前記第 2 の TIL 集団が、前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて前記第 1 の TIL 集団から取得され、前記第 3 の TIL 集団が、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて前記第 2 の TIL 集団から取得され、前記第 3 の TIL 集団から取得された前記治療用 TIL 集団が、前記複数の容器の各々から収集され、複合されて、前記採取された TIL 集団を生じさせる、請求項 1 ~ 3 8 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 4 0】

前記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、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記複数の別個の容器が、2 ~ 20 個の別個の容器を含む、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記複数の別個の容器が、2 ~ 10 個の別個の容器を含む、請求項 3 9 に記載の方法。

40

【請求項 4 3】

前記複数の別個の容器が、2 ~ 5 個の別個の容器を含む、請求項 3 9 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記別個の容器の各々が、第 1 のガス透過性表面積を含む、請求項 3 9 ~ 4 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 5】

前記プライミングによる第 1 の増殖ステップが、単一の容器内で行われる、請求項 1 ~ 3 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 6】

50

前記単一の容器が、第 1 のガス透過性表面積を含む、請求項 4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記細胞培養培地が、抗原提示細胞（APC）を含み、前記 APC が、約 1 細胞層～約 3 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 4 5 または 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記 APC が、約 1 . 5 細胞層～約 2 . 5 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記 APC が、約 2 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 4 8 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 APC が、約 3 細胞層～約 5 細胞層の厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 4 7 ～ 4 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 1】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 APC が、約 3 . 5 細胞層～約 4 . 5 細胞層の厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 APC が、約 4 細胞層の厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 5 1 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記プライミングによる第 1 の増殖が、第 1 のガス透過性表面積を含む第 1 の容器内で行われ、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記急速な第 2 の増殖が、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、請求項 2 ～ 4 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 4】

前記第 2 の容器が、前記第 1 の容器よりも大きい、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記細胞培養培地が、抗原提示細胞（APC）を含み、前記 APC が、約 1 細胞層～約 3 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 5 3 または 5 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記 APC が、約 1 . 5 細胞層～約 2 . 5 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記 APC が、約 2 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 APC が、約 3 細胞層～約 5 細胞層の平均厚さで、前記第 2 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 5 3 ～ 5 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5 9】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 APC が、約 3 . 5 細胞層～約 4 . 5 細胞層の平均厚さで、前記第 2 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

10

20

30

40

50

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 4 細胞層の平均厚さで、前記第 2 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記プライミングによる第 1 の増殖が第 1 の T I L 集団に対して行われる各容器について、前記急速な第 2 の増殖が、同じ容器内で、かかる第 1 の T I L 集団から産生された前記第 2 の T I L 集団に対して行われる、請求項 1 ～ 5 2 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 2】

各容器が、第 1 のガス透過性表面積を含む、請求項 6 1 に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記細胞培養培地が、抗原提示細胞（A P C）を含み、前記 A P C が、約 1 細胞層～約 3 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 1 . 5 細胞層～約 2 . 5 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 2 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 6 4 に記載の方法。

【請求項 6 6】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 3 細胞層～約 5 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 6 2 ～ 6 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 7】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 3 . 5 細胞層～約 4 . 5 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて、前記 A P C が、約 4 細胞層の平均厚さで、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化される、請求項 6 7 に記載の方法。

【請求項 6 9】

前記プライミングによる第 1 の増殖が、前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、第 1 の T I L 集団に対して行われる各容器について、前記容器が、第 1 のガス透過性表面積を含み、前記細胞培養培地が、抗原提示細胞（A P C）を含み、前記 A P C が、前記第 1 のガス透過性表面積上に層状化され、前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数に対する前記比率が、約 1 : 1 . 1 ～約 1 : 1 0 の範囲から選択される、請求項 1 ～ 6 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7 0】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数に対する前記比率が、約 1 : 1 . 2 ～約 1 : 8 の範囲から選択される、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数に対する前記比率が、約 1 : 1 . 3 ～約 1 : 7 の範囲から選択される、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均

10

20

30

40

50

層数の、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数に対する前記比率が、約 1 : 1.4 ~ 約 1 : 6 の範囲から選択される、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 73】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数に対する前記比率が、約 1 : 1.5 ~ 約 1 : 5 の範囲から選択される、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 74】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数に対する前記比率が、約 1 : 1.6 ~ 約 1 : 4 の範囲から選択される、請求項 69 に記載の方法。

10

【請求項 75】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数に対する前記比率が、約 1 : 1.7 ~ 約 1 : 3.5 の範囲から選択される、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 76】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数に対する前記比率が、約 1 : 1.8 ~ 約 1 : 3 の範囲から選択される、請求項 69 に記載の方法。

20

【請求項 77】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数に対する前記比率が、約 1 : 1.9 ~ 約 1 : 2.5 の範囲から選択される、請求項 69 に記載の方法。

【請求項 78】

前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数の、前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて層状化された前記 A P C の平均層数に対する前記比率が、約 1 : 2 である、請求項 69 に記載の方法。

30

【請求項 79】

2 ~ 3 日間の前記急速な第 2 の増殖のステップの後、前記細胞培養培地に追加の I L - 2 が補充される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 80】

凍結保存プロセスを使用して、前記治療用 T I L 集団を採取するステップにおいて、前記採取された T I L 集団を凍結保存することをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 81】

前記注入バッグを凍結保存するステップをさらに含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 82】

前記凍結保存プロセスが、採取された T I L 集団の、凍結保存培地に対する 1 : 1 比率を使用して行われる、請求項 80 または 81 に記載の方法。

【請求項 83】

前記抗原提示細胞が、末梢血単核細胞 (P B M C) である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 84】

前記 P B M C が、放射線照射されており、同種異系である、請求項 83 に記載の方法。

50

【請求項 85】

前記プライミングによる第1の増殖のステップにおいて、前記細胞培養培地が、末梢血単核細胞（P B M C）を含み、前記プライミングによる第1の増殖のステップにおける前記細胞培養培地中の前記 P B M C の総数が、 2.5×10^8 である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 86】

前記急速な第2の増殖のステップにおいて、前記細胞培養培地中の前記抗原提示細胞（A P C）が、末梢血単核細胞（P B M C）であり、前記急速な第2の増殖のステップにおいて前記細胞培養培地に追加される前記 P B M C の総数が、 5×10^8 である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 87】

前記抗原提示細胞が、人工抗原提示細胞である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 88】

前記治療用 T I L 集団を採取するステップにおける前記採取が、膜系細胞処理システムを使用して行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 89】

ステップ（d）における前記採取が、L O V O 細胞処理システムを使用して行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 90】

前記複数の断片が、前記プライミングによる第1の増殖のステップにおいて容器当たり約 60 個の断片を含み、各断片が、約 27 mm^3 の体積を有する、先行請求項のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 91】

前記複数の断片が、約 1300 mm^3 ～約 1500 mm^3 の総体積を伴う約 30 ～約 60 個の断片を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 92】

前記複数の断片が、約 1350 mm^3 の総体積を伴う約 50 個の断片を含む、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

前記複数の断片が、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、先行請求項のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 94】

前記細胞培養培地が、G 容器及び X u r i セルバッグからなる群から選択される容器内に提供される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 95】

ステップ（d）の 2 ～3 日後、前記細胞培養培地に、追加の I L - 2 が補充される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 96】

前記 I L - 2 濃度が、約 10,000 I U / m L ～約 5,000 I U / m L である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 97】

前記 I L - 2 濃度が、約 6,000 I U / m L である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 98】

前記採取された治療用 T I L 集団を注入バッグに移すステップにおける前記注入バッグが、H y p o T h e r m o s o l を含有する注入バッグである、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 99】

前記凍結保存培地が、ジメチルスルホキシド（D M S O）を含む、請求項 80 ～82 のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 100】

前記凍結保存培地が、7%～10%のDMSOを含む、請求項99に記載の方法。

【請求項 101】

前記プライミングによる第1の増殖のステップにおける前記第1の期間及び前記急速な第2の増殖のステップにおける前記第2の期間が、各々、5日、6日、7日、8日、9日、10日、または11日の期間内で個々に行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 102】

前記プライミングによる第1の増殖のステップの前記第1の期間が、5日、6日、または7日の期間内で行われる、請求項1～101のいずれかに記載の方法。

10

【請求項 103】

前記プライミングによる第1の増殖のステップの前記第1の期間が、8日、9日、10日、または11日の期間内で行われる、請求項1～101のいずれかに記載の方法。

【請求項 104】

前記急速な第2の増殖のステップの前記第2の期間が、7日、8日、または9日の期間内で行われる、請求項1～101のいずれかに記載の方法。

【請求項 105】

前記急速な第2の増殖のステップの前記第2の期間が、10日または11日の期間内で行われる、請求項1～101のいずれかに記載の方法。

【請求項 106】

前記プライミングによる第1の増殖のステップの前記第1の期間及び前記急速な第2の増殖のステップの前記第2の期間が、各々、7日の期間内で個々に行われる、請求項1～101のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 107】

前記プライミングによる第1の増殖のステップの前記第1の期間及び前記急速な第2の増殖のステップの前記第2の期間が、各々、11日の期間内で個々に行われる、請求項1～101のいずれかに記載の方法。

【請求項 108】

前記治療用TIL集団の前記採取をととした前記プライミングによる第1の増殖のステップが、約14日～約16日の期間内で行われる、請求項1～101のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 109】

前記治療用TIL集団の前記採取をととした前記プライミングによる第1の増殖のステップが、約15日～約16日の期間内で行われる、請求項1～101のいずれかに記載の方法。

【請求項 110】

前記治療用TIL集団の前記採取をととした前記プライミングによる第1の増殖のステップが、約14日の期間内で行われる、請求項1～101のいずれかに記載の方法。

【請求項 111】

前記治療用TIL集団の前記採取をととした前記プライミングによる第1の増殖のステップが、約15日の期間内で行われる、請求項1～101のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 112】

前記治療用TIL集団の前記採取をととした前記プライミングによる第1の増殖のステップが、約16日の期間内で行われる、請求項1～101のいずれかに記載の方法。

【請求項 113】

凍結保存プロセスを使用して、前記採取された治療用TIL集団を凍結保存するステップをさらに含み、前記治療用TIL集団の前記採取をととした前記プライミングによる第1の増殖のステップ及び凍結保存のステップが、16日以下のうちに行われる、請求項1～101のいずれかに記載の方法。

【請求項 114】

50

前記治療用 T I L 集団の採取のステップで採取された前記治療用 T I L 集団が、T I L の治療上有効な投与量に十分な前記 T I L を含む、請求項 1 ～ 1 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

治療上有効な投与量に十分な前記 T I L の数が、約 2.3×10^{10} ～ 約 13.7×10^{10} である、請求項 1 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおける前記第 3 の 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、請求項 1 ～ 1 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 1 7】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおける前記第 3 の T I L 集団が、16 日より長い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～5 倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供する、請求項 1 ～ 1 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記急速な第 2 の増殖のステップにおいて前記第 3 の T I L 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、前記プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて前記第 2 の T I L 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 C D 8 及び C D 2 8 発現を示す、請求項 1 ～ 1 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 1 1 9】

前記治療用 T I L 集団の前記採取のステップからの前記治療用 T I L 集団が患者に注入される、請求項 1 ～ 1 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

凍結保存プロセスを使用して、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をさらに含む、請求項 1 または 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

前記凍結保存プロセスが、採取された T I L 集団の、凍結保存培地に対する 1 : 1 比率を使用して行われる、請求項 1 2 0 に記載の方法。

【請求項 1 2 2】

前記抗原提示細胞が、末梢血単核細胞 (P B M C) である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 1 2 3】

前記 P B M C が、放射線照射されており、同種異系である、請求項 1 2 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 4】

前記抗原提示細胞が人工抗原提示細胞である、請求項 1 ～ 1 2 1 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記採取するステップが、膜系細胞処理システムを使用して行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 1 2 6】

前記採取するステップが、L O V O 処理システムを使用して行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 2 7】

前記複数の断片が、約 60 個の断片を含み、各断片が約 27 mm^3 の体積を有する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

前記複数の断片が、約 1300 mm^3 ～ 約 1500 mm^3 の総体積を伴う約 30 ～ 約 60 個の断片を含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

50

【請求項 1 2 9】

前記複数の断片が、約 1350 mm^3 の総体積を伴う約 50 個の断片を含む、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

前記複数の断片が、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、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記細胞培養培地が、G 容器及び Xuri セルバッグからなる群から選択される容器内に提供される、請求項 1 または 2 または 6 または 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 2】

前記 IL-2 濃度が、約 $10,000\text{ IU/mL}$ ～約 $5,000\text{ IU/mL}$ である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記 IL-2 濃度が、約 $6,000\text{ IU/mL}$ である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 4】

ステップ (d) における前記注入バッグが、HypoThermosphere を含有する注入バッグである、請求項 1 または 2 または 6 または 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記凍結保存培地が、ジメチルスルホキシド (DMSO) を含む、請求項 1 2 1 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記凍結保存培地が、7%～10%の DMSO を含む、請求項 1 3 5 に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

ステップ (c) における前記第 1 の期間及び前記第 2 の期間が、各々、5 日、6 日、または 7 日の期間内で個々に行われる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 8】

前記第 1 の期間が、5 日、6 日、または 7 日の期間内で行われる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3 9】

前記第 2 の期間が、10 日または 11 日の期間内で行われる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

前記第 1 の期間及び前記第 2 の期間が、各々、7 日の期間内で個々に行われる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

すべてのステップが、約 14 日～約 22 日の期間内で行われる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

すべてのステップが、約 14 日～約 21 日の期間内で行われる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

すべてのステップが、約 14 日～約 20 日の期間内で行われる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

すべてのステップが、約 14 日～約 19 日の期間内で行われる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

すべてのステップが、約 14 日～約 18 日の期間内で行われる、請求項 1 または 2 また

10

20

30

40

50

は 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

すべてのステップが、約 1 4 日～約 1 7 日の期間内で行われる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

すべてのステップが、約 1 4 日～約 1 6 日の期間内で行われる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

すべてのステップが、約 1 5 日～約 1 6 日の期間内で行われる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

すべてのステップが、約 1 4 日の期間内で行われる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

すべてのステップが、約 1 5 日の期間内で行われる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 5 1】

すべてのステップが、約 1 6 日の期間内で行われる、請求項 1 または 2 または 6 または 7 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

すべてのステップ及び凍結保存が、1 6 日以内に行われる、請求項 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

採取された前記治療用 T I L 集団が、治療上有効な投与量の前記 T I L に十分な T I L を含む、請求項 1 ～ 1 5 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

治療上有効な投与量に十分な T I L の数が、約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} である、請求項 1 5 3 に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

前記プライミングによる第 1 の増殖ステップにおける前記容器が、前記急速な第 2 の増殖のステップにおける前記容器よりも大きい、請求項 1 ～ 1 5 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 6】

前記第 3 の 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、請求項 1 ～ 1 5 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 7】

前記第 3 の T I L 集団が、1 6 日より長い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～5 倍以上のインターフェロンガンマ産生を提供する、請求項 1 ～ 1 5 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 8】

前記第 3 の T I L 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、前記第 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 C D 8 及び C D 2 8 発現を示す、請求項 1 ～ 1 5 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 5 9】

前記採取された T I L が、患者に注入される、請求項 1 ～ 1 5 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 6 0】

がんを有する対象を治療するための方法であって、

10

20

30

40

50

(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、前記対象から切除された腫瘍から第1のTIL集団を取得すること、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PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することと、

(c) 前記PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、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の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日行われ、前記第2のTIL集団を取得する、前記産生することと、

(d) 前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の増殖に追加される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の増殖が、約1～11日間行われ、前記第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、前記急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記産生することと、

(e) ステップ(c)から取得された前記治療用TIL集団を採取することと、

(f) ステップ(d)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) 治療上有効な投与量のステップ(e)からの前記TILを前記対象に投与することと、を含む、拡張した腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を投与することを含む、前記方法。

【請求項161】

ステップ(g)において治療上有効な投与量を投与するのに十分なTILの数が、約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} である、請求項160に記載の方法。

【請求項162】

前記PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILが、PD-1高、CD39高、CD38低、CD103高／低、CD101低、LAG3高、TIM3高、及び／またはTIGIT高TILである、請求項160または161に記載の方法。

【請求項163】

ステップ(b)の前記選択が、(i)前記第1のTIL集団を、PD-1のIgVドメインの外側のN末端ループによってPD-1に結合する過剰のモノクローナル抗PD-1 IgG4抗体に曝露するステップと、(ii)フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4抗体を追加するステップと、(iii)前記フルオロフォアに基づいて流動系細胞選別を行って、PD-1に富むTIL集団を取得するステップと、を含む、請求項160～162のいずれか1項に記載の方法。

【請求項164】

前記モノクローナル抗PD-1 IgG4抗体が、ニボルマブ、またはそのバリエーション、断片、もしくは複合体である、請求項163に記載の方法。

【請求項165】

前記抗IgG4抗体が、クローン抗ヒトIgG4、クローンHP6023である、請求項164に記載の方法。

【請求項166】

前記抗原提示細胞(APC)が、PBMCである、請求項165に記載の方法。

【請求項167】

10

20

30

40

50

ステップ（g）において治療上有効な投与量のTIL細胞を投与する前に、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが前記対象に投与されている、請求項160～166のいずれかに記載の方法。

【請求項168】

前記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 $60\text{ mg/m}^2/\text{日}$ 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5日間投与するステップを含む、請求項167に記載の方法。

【請求項169】

ステップ（g）における前記対象への前記TIL細胞の投与の翌日に開始する高用量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160～168のいずれかに記載の方法。

10

【請求項170】

前記高用量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、請求項169に記載の方法。

【請求項171】

ステップ（c）における前記第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、請求項160～170のいずれか1項に記載の方法。

【請求項172】

20

ステップ（d）における前記第3のTIL集団が、16日より長いプロセスにより調製される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、請求項160～171のいずれか1項に記載の方法。

【請求項173】

前記第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、前記第2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細胞と比較して、増加したCD8及びCD28発現を示す、請求項160～172のいずれか1項に記載の方法。

【請求項174】

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、請求項160～172のいずれかに記載の方法。

30

【請求項175】

前記がんが、黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、膠芽腫（GBMを含む）、及び胃腸癌からなる群から選択される、請求項160～172のいずれかに記載の方法。

【請求項176】

前記がんが、黒色腫である、請求項160～172のいずれかに記載の方法。

【請求項177】

40

前記がんが、HNSCCである、請求項160～172のいずれかに記載の方法。

【請求項178】

前記がんが、子宮頸癌である、請求項160～172のいずれかに記載の方法。

【請求項179】

前記がんが、NSCLCである、請求項160～172のいずれかに記載の方法。

【請求項180】

前記がんが、神経膠芽細胞腫（GBMを含む）である、請求項160～172のいずれかに記載の方法。

【請求項181】

前記がんが、胃腸癌である、請求項160～172のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 182】

前記がんが、高頻度変異癌である、請求項 160～172 のいずれかに記載の方法。

【請求項 183】

前記がんが、小児高頻度変異癌である、請求項 160～172 のいずれかに記載の方法。

【請求項 184】

前記プライミングによる第 1 の増殖が、第 1 の容器内で行われ、前記急速な第 2 の増殖が、第 2 の容器内で行われ、前記第 1 及び第 2 の容器の各々が、GREX-10 である、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 185】

前記プライミングによる第 1 の増殖が、第 1 の密閉容器内で行われ、前記急速な第 2 の増殖が、第 2 の密閉容器内で行われ、前記第 1 及び第 2 の密閉容器の各々が、GREX-100 である、請求項 1～184 のいずれかに記載の方法。

【請求項 186】

前記プライミングによる第 1 の増殖が、第 1 の密閉容器内で行われ、前記急速な第 2 の増殖が、第 2 の密閉容器内で行われ、前記第 1 及び第 2 の密閉容器の各々が、GREX-500 である、請求項 1～184 のいずれかに記載の方法。

【請求項 187】

前記対象が、以前に抗 PD-1 抗体で治療されている、請求項 160～183 のいずれかに記載の方法。

【請求項 188】

前記対象が、以前に抗 PD-1 抗体で治療されていない、請求項 160～183 のいずれかに記載の方法。

【請求項 189】

前記プライミングによる第 1 の増殖ステップが、第 1 の TIL 集団を抗 PD-1 抗体と接触させて、前記第 1 の TIL 集団において前記抗 PD-1 抗体と TIL 細胞との第 1 の複合体を形成し、次いで、前記第 1 の複合体を単離して、PD-1 陽性 TIL について選択または濃縮される前記第 1 の TIL 集団を取得することによって、PD-1 陽性 TIL について選択または濃縮される前記第 1 の TIL 集団に対して行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 190】

前記抗 PD-1 抗体が、Fc 領域を含み、前記第 1 の複合体を形成するステップの後に、かつ前記第 1 の複合体を単離するステップの前に、前記方法が、前記第 1 の複合体を前記抗 PD-1 抗体の前記 Fc 領域に結合する抗 Fc 抗体と接触させて、前記抗 Fc 抗体と前記第 1 の複合体との第 2 の複合体を形成するステップをさらに含み、前記第 1 の複合体を単離するステップが、前記第 2 の複合体を単離することにより行われる、請求項 189 に記載の方法。

【請求項 191】

前記抗 PD-1 抗体が、EH12.2H7、PD1.3.1、SYM021、M1H4、A17188B、ニボルマブ (BMS-936558、Bristol-Myers Squibb; Opdivo (登録商標))、ペムブロリズマブ (ラムプロリズマブ、MK03475 または MK-3475、Merck; Keytruda (登録商標))、H12.1、PD1.3.1、NAT 105、ヒト化抗 PD-1 抗体 JS001 (Shanghai Junshi)、モノクローナル抗 PD-1 抗体 TSR-042 (Tesarro, Inc.)、ピジリズマブ (抗 PD-1 mAb CT-011、Medivation)、抗 PD-1 モノクローナル抗体 BGB-A317 (BeiGene)、及び／または抗 PD-1 抗体 SHR-1210 (Shanghai Hengrui)、ヒトモノクローナル抗体 REGN2810 (Regeneron)、ヒトモノクローナル抗体 MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb)、ヒト化抗 PD-1 IgG4 抗体 PDR001 (Novartis)、及び RMP1-14 (ラット IgG) -

10

20

30

40

50

B i o X c e l l カタログ番号 B P 0 1 4 6 からなる群から選択される、請求項 1 8 9 または 1 9 0 に記載の方法。

【請求項 1 9 2】

前記抗 P D - 1 抗体が、E H 1 2 . 2 H 7 である、請求項 1 8 9 または 1 9 0 に記載の方法。

【請求項 1 9 3】

前記抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブまたはペムブロリズマブとは異なるエピトープに結合する、請求項 1 8 9 または 1 9 0 に記載の方法。

【請求項 1 9 4】

前記抗 P D - 1 抗体が、E H 1 2 . 2 H 7 またはニボルマブと同じエピトープに結合する、請求項 1 8 9 または 1 9 0 に記載の方法。

【請求項 1 9 5】

前記抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブである、請求項 1 8 9 または 1 9 0 に記載の方法。

【請求項 1 9 6】

前記対象が、以前に第 1 の抗 P D 1 抗体で治療されており、前記プライミングによる第 1 の増殖ステップが、第 1 の T I L 集団を第 2 の抗 P D - 1 抗体と接触させて、前記第 1 の T I L 集団において前記第 2 の抗 P D - 1 抗体と T I L 細胞との第 1 の複合体を形成し、次いで、前記第 1 の複合体を単離して、P D - 1 陽性 T I L について選択または濃縮される前記第 1 の T I L 集団を取得することによって、P D - 1 陽性 T I L について選択または濃縮される前記第 1 の T I L 集団に対して行われ、前記第 2 の抗 P D - 1 抗体が、前記第 1 の T I L 集団で不溶化された前記第 1 の抗 P D - 1 抗体によって、前記第 1 の T I L 集団と結合することから遮断されない、請求項 1 6 0 ~ 1 8 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 9 7】

前記対象が、以前に第 1 の抗 P D 1 抗体で治療されており、前記プライミングによる第 1 の増殖ステップが、第 1 の T I L 集団を第 2 の抗 P D - 1 抗体と接触させて、前記第 1 の T I L 集団において前記第 2 の抗 P D - 1 抗体と T I L 細胞との第 1 の複合体を形成し、次いで、前記第 1 の複合体を単離し、P D - 1 陽性 T I L について選択または濃縮される前記第 1 の T I L 集団を取得することによって、P D - 1 陽性 T I L について選択または濃縮される前記第 1 の T I L 集団に対して行われ、前記第 2 の抗 P D - 1 抗体が、前記第 1 の T I L 集団で不溶化された前記第 1 の抗 P D - 1 抗体によって、前記第 1 の T I L 集団と結合することから遮断される、請求項 1 6 0 ~ 1 8 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 9 8】

前記第 1 の抗 P D - 1 抗体及び前記第 2 の抗 P D - 1 抗体が、F c 領域を含み、前記第 1 の複合体を形成するステップの後に、かつ前記第 1 の複合体を単離するステップの前に、前記方法が、前記第 1 の複合体を前記第 1 の抗 P D - 1 抗体の前記 F c 領域及び前記第 2 の抗 P D - 1 抗体の前記 F c 領域に結合する抗 F c 抗体と接触させて、前記抗 F c 抗体と前記第 1 の複合体との第 2 の複合体を形成するステップをさらに含み、前記第 1 の複合体を単離するステップが、前記第 2 の複合体を単離することにより行われる、請求項 1 9 6 または 1 9 7 に記載の方法。

【請求項 1 9 9】

前記対象が、以前に第 1 の抗 P D 1 抗体で治療されており、前記プライミングによる第 1 の増殖ステップが、(i) 第 1 の T I L 集団を第 2 の抗 P D - 1 抗体と接触させて、前記第 2 の抗 P D - 1 抗体と前記第 1 の T I L 集団との第 1 の複合体を形成することであって、前記第 2 の抗 P D - 1 抗体が、前記第 1 の T I L 集団で不溶化された前記第 1 の抗 P D - 1 抗体によって、前記 P D - 1 陽性 T I L と結合することから遮断され、前記第 1 の抗 P D - 1 抗体及び前記第 2 の抗 P D - 1 抗体が、F c 領域を含む、前記形成することと、(i i) 前記第 1 の複合体を前記第 2 の抗 P D - 1 抗体の前記 F c 領域と結合する抗 F c 抗体と接触させ、前記抗 F c 抗体と前記第 1 の複合体との第 2 の複合体を形成し、前記第 1 の T I L 集団で不溶化された前記第 1 の抗 P D - 1 抗体を前記抗 F c 抗体と接触させ

、前記抗Fc抗体と前記第1のTIL集団で不溶化された前記第1の抗PD-1抗体との第3の複合体を形成することと、(iii)前記第2及び第3の複合体を分離して、PD-1陽性TILについて選択または濃縮される前記第1のTIL集団を取得することと、によってPD-1陽性TILについて選択または濃縮される前記第1のTIL集団に対して行われる、請求項160～183のいずれかに記載の方法。

【請求項200】

患者から取得された腫瘍組織試料の消化物から選択されたPD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性細胞から調製された治療用腫瘍浸潤リンパ球(TIL)集団であって、前記治療用TIL集団が、増加した有効性及び／または増加したインターフェロンガンマ産生を提供する、前記治療用TIL集団。

10

【請求項201】

増加したインターフェロンガンマ産生を提供する、請求項200に記載の治療用TIL集団。

【請求項202】

増加した有効性を提供する、請求項200または請求項201に記載の治療用TIL集団。

【請求項203】

前記治療用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、請求項200～202のいずれかに記載の治療用TIL集団。

20

【請求項204】

前記治療用TIL集団が、16～22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、請求項200～203のいずれかに記載の治療用TIL集団。

【請求項205】

前記プライミングによる第1の増殖ステップが、少なくとも11.27%～74.4%のPD-1陽性TILを伴うPD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団に対して行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項206】

前記プライミングによる第1の増殖ステップが、
(i)前記第1のTIL集団及びPBMC集団を、PD-1のIgVドメインの外側のN末端ループによってPD-1に結合する過剰のモノクローナル抗PD-1 IgG4抗体に曝露するステップと、

30

(ii)フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4抗体を追加するステップと、

(iii)蛍光活性化細胞選別法(FACS)により行われた場合の前記PBMC集団の強度と比較した前記第1のTIL集団中の前記PD-1陽性TILの前記フルオロフォアの強度に基づいて、PD-1陽性TILについて選択または濃縮される前記第1のTIL集団を取得するステップと、によってPD-1陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団に対して行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。

40

【請求項207】

前記第1のTIL集団及び前記PBMC集団の両方における前記フルオロフォアの強度を使用して、それぞれPD-1陰性TIL、PD-1中間TIL、及びPD-1陽性TILに対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するためのFACSゲートを設定する、請求項206に記載の方法。

【請求項208】

前記FACSゲートが、ステップ(a)の後に設定される、請求項207に記載の方法。

【請求項209】

前記PD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILが、PD-1

50

高、LAG3高、TIM3高、及び／またはTIGIT高TILである、先行請求項のいずれか1項に記載の方法。

【請求項210】

PD-1陽性TILについて選択または濃縮される前記第1のTIL集団の少なくとも80%が、PD-1陽性TILであり、LAG3陽性TILについて選択または濃縮される前記第1のTIL集団の少なくとも80%が、LAG3陽性TILであり、TIM3陽性TILについて選択または濃縮される前記第1のTIL集団の少なくとも80%が、TIM3陽性TILであり、及び／またはTIGIT陽性TILについて選択または濃縮される前記第1のTIL集団の少なくとも80%が、TIGIT陽性TILである、先行請求項のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項211】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療用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集団を取得すること、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PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することであって、前記第1のTIL集団の少なくとも10%～80%の範囲が、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILである、前記取得することと、

20

（c）前記PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、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の増殖が、約1～7、8、9、10、または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、前記産生することと、

30

（d）前記第2のTIL集団の前記細胞培養培地に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、前記急速な第2の増殖に追加されるAPCの数が、ステップ（c）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の増殖が、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、治療用TIL集団であり、前記急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、前記産生することと、

（e）ステップ（d）から取得された前記治療用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、を含む、前記方法。

40

【請求項212】

ステップ（b）の前記選択が、

（i）前記第1のTIL集団及びPBMC集団を、PD-1のIgVドメインの外側のN末端ループによってPD-1に結合する過剰のモノクローナル抗PD-1 IgG4抗体に曝露するステップと、

（ii）フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4抗体を追加するステップと、

（iii）蛍光活性化細胞選別法（FACS）により行われた場合の前記PBMC集団の強度と比較した前記第1のTIL集団中の前記PD-1陽性TILの前記フルオロフォアの強度に基づいて、前記PD-1に富むTIL集団を取得するステップと、を含む、請求項211に記載の方法。

50

【請求項 2 1 3】

前記第 1 の集団及び前記 P B M C 集団の両方における前記フルオロフォアの強度を使用して、

i) それぞれ、P D - 1 陰性 T I L、P D - 1 低 T I L、P D - 1 中間 T I L、及び P D - 1 陽性 T I L、

i i) それぞれ、C D 3 9 陰性 T I L、C D 3 9 低 T I L、C D 3 9 中間 T I L、及び C D 3 9 陽性 T I L、

i i i) それぞれ、C D 3 8 陰性 T I L、C D 3 8 低 T I L、C D 3 8 中間 T I L、及び C D 3 8 陽性 T I L、

i v) それぞれ、C D 1 0 3 陰性 T I L、C D 1 0 3 低 T I L、C D 1 0 3 中間 T I L、及び C D 1 0 3 陽性 T I L、

v) それぞれ、C D 1 0 1 陰性 T I L、C D 1 0 1 低 T I L、C D 1 0 1 中間 T I L、及び C D 1 0 1 陽性 T I L、

v i) それぞれ、L A G 3 陰性 T I L、L A G 3 低 T I L、L A G 3 中間 T I L、及び L A G 3 陽性 T I L、

v i i) それぞれ、T I M 3 陰性 T I L、T I M 3 低 T I L、T I M 3 中間 T I L、及び T I M 3 陽性 T I L、及び／または

v i i i) それぞれ、T I G I T 陰性 T I L、T I G I T 低 T I L、T I G I T 中間 T I L、及び T I G I T 陽性 T I L に対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するための F A C S ゲートを設定する、請求項 2 1 2 に記載の方法。

【請求項 2 1 4】

前記 F A C S ゲートが、ステップ (a) の後に設定される、請求項 2 1 1 ~ 2 1 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1 5】

前記 P D - 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T 陽性 T I L が、P D - 1 高、L A G 3 高、T I M 3 高、及び／または T I G I T 高 T I L である、請求項 2 1 1 ~ 2 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1 6】

前記 P D - 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T に富む T I L 集団の少なくとも 8 0 % が、P D - 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T 陽性 T I L である、請求項 2 1 1 ~ 2 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1 7】

前記第 3 の T I L 集団が、前記容器内に少なくとも約 1×10^8 の T I L を含む、請求項 2 1 1 ~ 2 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1 8】

前記第 3 の T I L 集団が、前記容器内に少なくとも約 1×10^9 の T I L を含む、請求項 2 1 1 ~ 2 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 1 9】

前記プライミングによる第 1 の増殖における P D - 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T に富む T I L の数が、約 1×10^4 ~ 約 1×10^6 である、請求項 2 1 1 ~ 2 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2 0】

前記プライミングによる第 1 の増殖における P D - 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T に富む T I L の数が、約 5×10^4 ~ 約 1×10^6 である、請求項 2 1 1 ~ 2 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2 1】

前記プライミングによる第 1 の増殖における P D - 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T に富む T I L の数が、約 2×10^5 ~ 約 1×10^6 である、請求項 2 1 1 ~ 2 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 2 2 2】

ステップ（a）を行う前に、前記対象から切除された前記腫瘍からの前記第1のTIL集団を凍結保存するステップをさらに含む、請求項211～221のいずれか1項に記載の方法。

【請求項223】

腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療用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集団を取得すること、及び／または受容することと、

（b）（a）の第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することと、

（c）第1の細胞培養培地、IL-2、及び

i）抗原提示フィーダー細胞（APC）の第1の培養物から取得された第1の培養上清であって、前記第1の培養上清が、OKT-3を含む、前記第1の培養上清、または

ii）APC及びOKT-3のいずれかを含む第1のTIL細胞培養物中で前記第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の増殖を行うことであって、

前記プライミングによる第1の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日の第1の期間、第1のガス透過性表面積を含む第1の容器内で前記第1のTIL細胞培養物を培養することによって行われ、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、前記プライミングによる第1の増殖を行うことと、

（d）第2の細胞培養培地、IL-2、及び

i）APCの第2の培養物から取得された第2の培養上清であって、前記第2の培養上清が、OKT-3を含む、前記第2の培養上清、または

ii）APC及びOKT-3のいずれかを補充した第2のガス透過性表面積を含む第2の容器に前記第1のTIL細胞培養物を移すことによって、急速な第2の増殖を行って、

第2のTIL細胞培養物を形成することであって、前記急速な第2の増殖が、約1～11日の第2の期間前記第2のTIL細胞培養物を培養することによって行われ、第3のTIL集団を取得し、前記第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、前記第1のTIL細胞培養物が、前記第1の培養上清及びAPCの両方を含まず、前記第2のTIL細胞培養物が、前記第2の培養上清及び補充APCの両方を含まない、前記形成することと

（e）ステップ（d）から取得された前記治療用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、を含む、前記方法。

【請求項224】

ステップ（c）の前記プライミングによる第1の増殖において、前記第1のTIL細胞培養物が、前記第1の培養上清を含み、ステップ（d）の前記急速な第2の増殖において、前記第1のTIL細胞培養物にOKT-3及びAPCを補充して、前記第2のTIL細胞培養物を形成する、請求項223に記載のTILを拡張するための方法。

【請求項225】

ステップ（c）の前記プライミングによる第1の増殖において、前記第1のTIL細胞培養物が、OKT-3及びAPCを含み、ステップ（d）の前記急速な第2の増殖において、前記第1のTIL細胞培養物に前記第2の培養上清を補充して、前記第2のTIL細胞培養物を形成する、請求項223または224に記載のTILを拡張するための方法。

【請求項226】

ステップ（c）の前記プライミングによる第1の増殖において、前記第1のTIL細胞培養物が、前記第1の培養上清を含み、ステップ（d）の前記急速な第2の増殖において

、前記第 1 の T I L 細胞培養物に前記第 2 の培養上清を補充して、前記第 2 の T I L 細胞培養物を形成する、請求項 2 2 3 ～ 2 2 5 のいずれかに記載の T I L を拡張するための方法。

【請求項 2 2 7】

ステップ (c) で使用するための前記第 1 の培養上清を取得することが、

1) I L - 2 及び O K T - 3 を含む A P C 細胞培養培地を提供することと、

2) 1) からの前記 A P C 細胞培養培地中で少なくとも約 5×10^8 A P C を約 3 ～ 4 日間培養して、前記第 1 の培養上清を生成することと、

3) 2) の前記細胞培養から前記第 1 の培養上清を収集することと、を含む、請求項 2 2 3 ～ 2 2 6 のいずれかに記載の T I L を拡張するための方法。

10

【請求項 2 2 8】

ステップ (d) で使用するための前記第 2 の培養上清を取得することが、

1) I L - 2 及び O K T - 3 を含む A P C 細胞培養培地を提供することと、

2) 1) からの前記 A P C 細胞培養培地中で少なくとも約 1×10^7 A P C を約 3 ～ 4 日間培養して、前記第 2 の培養上清を生成することと、

3) 2) の前記細胞培養から前記第 2 の培養上清を収集することと、を含む、請求項 2 2 3 ～ 2 2 7 のいずれかに記載の T I L を拡張するための方法。

【請求項 2 2 9】

ステップ (d) の前記急速な第 2 の増殖が、

i) ステップ (d) における前記第 2 の期間の開始から約 3 または 4 日後に、前記第 2 の T I L 細胞培養物に追加の I L - 2 を補充するステップをさらに含む、請求項 2 2 3 ～ 2 2 8 のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 2 3 0】

前記 A P C が、前記対象に対して外因性である、請求項 2 2 3 ～ 2 2 9 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 3 1】

前記 A P C が、末梢血単核細胞 (P B M C) である、請求項 2 2 3 ～ 2 3 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 3 2】

ステップ (d) の前記急速な第 2 の増殖が、

i) 前記第 2 の期間の開始時、または約 3 もしくは 4 日後に、前記第 2 の T I L 細胞培養物を前記第 2 の容器から複数の第 3 の容器に移して、前記複数の第 3 の容器の各々において前記第 2 の T I L 細胞培養物の継代培養物を形成するステップと、

i i) 前記第 2 の期間の残りの間、前記複数の第 3 の容器の各々において前記第 2 の T I L 細胞培養物の前記継代培養物を培養するステップと、をさらに含む、請求項 2 2 3 ～ 2 3 1 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 2 3 3】

ステップ i) において、等量の前記第 2 の T I L 細胞培養物が、前記複数の第 3 の容器に移される、請求項 2 3 2 に記載の方法。

【請求項 2 3 4】

前記第 3 の容器の各々が、前記第 2 の容器とサイズが等しい、請求 2 3 2 または 2 3 3 に記載の方法。

40

【請求項 2 3 5】

前記第 3 の容器の各々が、前記第 2 の容器よりも大きい、請求項 2 3 2 または 2 3 3 に記載の方法。

【請求項 2 3 6】

前記第 3 の容器が、サイズが等しい、請求 2 3 2 ～ 2 3 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 3 7】

前記第 3 の容器が、前記第 2 の容器よりも大きい、請求項 2 3 6 に記載の方法。

【請求項 2 3 8】

50

前記第 3 の容器が、前記第 2 の容器よりも小さい、請求項 2 3 2 または 2 3 3 に記載の方法。

【請求項 2 3 9】

前記第 2 の容器が、G-Rex 100 M フラスコである、請求項 2 2 3 ～ 2 3 8 に記載の方法。

【請求項 2 4 0】

前記第 2 の容器が、G-Rex 100 M フラスコであり、前記複数の第 3 の容器の各々が、G-Rex 100 M フラスコである、請求項 2 3 9 に記載の方法。

【請求項 2 4 1】

前記複数の第 3 の容器が、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、及び 20 個の第 2 の容器からなる群から選択される、請求項 2 4 0 に記載の方法。

10

【請求項 2 4 2】

前記複数の第 2 の容器が、2 個の第 3 の容器である、請求項 2 4 0 に記載の方法。

【請求項 2 4 3】

ステップ i i) の前に、前記方法が、前記第 2 の T I L 細胞培養物の各継代培養物に追加の I L-2 を補充することをさらに含む、請求項 2 4 0 に記載の方法。

【請求項 2 4 4】

ステップ i i) の前に、前記方法が、前記第 2 の T I L 細胞培養物の各継代培養物に第 2 の細胞培養培地及び I L-2 を補充することをさらに含む、請求項 2 4 0 に記載の方法。

20

【請求項 2 4 5】

前記第 1 の細胞培養培地及び前記第 2 の細胞培養培地が、同じである、請求項 2 2 3 ～ 2 4 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 4 6】

前記第 1 の細胞培養培地及び前記第 2 の細胞培養培地が、異なる、請求項 2 2 3 ～ 2 4 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 4 7】

前記第 1 の細胞培養培地が D M 1 であり、前記第 2 の細胞培養培地が D M 2 である、請求項 2 2 3 ～ 2 4 4 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 2 4 8】

前記 T I L が、P D-1 陽性 (P D-1 +)、L A G 3 陽性 (L A G 3 + 陽性)、C D 3 8 陽性 (C D 3 8 +)、及び C D 1 0 1 陽性 (C D 1 0 1 +) として選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 4 9】

前記 T I L が、P D-1 高、L A G 3 高、C D 3 8 低、及び C D 1 0 1 低として選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 5 0】

前記 T I L が、P D-1 陽性 (P D-1 +)、L A G 3 陽性 (L A G 3 + 陽性)、及び C D 3 8 陽性 (C D 3 8 +) として選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 2 5 1】

前記 T I L が、P D-1 高、L A G 3 高、及び C D 3 8 低として選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 5 2】

前記 T I L が、P D-1 陽性 (P D-1 +)、L A G 3 陽性 (L A G 3 + 陽性)、及び C D 1 0 1 陽性 (C D 1 0 1 +) として選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 5 3】

前記 T I L が、P D-1 高、L A G-3 高、及び C D 1 0 1 低として選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

50

【請求項 254】

前記 T I L が、P D - 1 陽性 (P D - 1 +)、及び C D 3 8 陽性 (C D 3 8 +) として選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 255】

前記 T I L が、P D - 1 高、及び C D 3 8 低として選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 256】

前記 T I L が、P D - 1 陽性 (P D - 1 +)、及び C D 1 0 1 陽性 (C D 1 0 1 +) として選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 257】

前記 T I L が、P D - 1 高、及び C D 1 0 1 低として選択される、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 258】

前記選択が、フローサイトメトリー（例えば、F A C S を含む）、抗体系ビーズ選択、及び抗体系磁気ビーズ選択からなる群から選択される選択方法を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 259】

前記選択方法が、フローサイトメトリー（例えば、F A C S を含む）を含む、請求項 258 に記載の方法。

【請求項 260】

前記選択方法が、抗体系ビーズ選択を含む、請求項 258 に記載の方法。

【請求項 261】

前記選択方法が、抗体系磁気ビーズ選択を含む、請求項 258 に記載の方法。

【請求項 262】

前記選択が、2 ステップ選択を含み、

i) P D - 1 +、L A G 3 +、T I M 3 +、及び／または T I G I T + を選択する方法を含む第 1 の選択ステップと、

i i) C D 3 8 + 及び／または C D 1 0 1 + を選択する方法を含む第 2 の選択ステップと、を含む、先行請求項のいずれかに記載の方法。

【請求項 263】

前記第 1 の選択ステップが、P D - 1 高、L A G 3 高、T I M 3 高、及び／または T I G I T 高を選択する方法を含む、請求項 262 に記載の方法。

【請求項 264】

前記第 1 の選択ステップが、P D - 1 高または L A G 3 高を選択する方法を含む、請求項 262 に記載の方法。

【請求項 265】

前記第 2 の選択ステップが、C D 3 8 低及び／または C D 1 0 1 低を選択する方法を含む、請求項 263 または 264 に記載の方法。

【請求項 266】

前記第 1 の選択ステップが、フローサイトメトリー（例えば、F A C S を含む）を含み、前記第 2 の選択ステップが、フローサイトメトリー（例えば、F A C S を含む）を含む、請求項 262 ～ 265 に記載の方法。

【請求項 267】

前記第 1 の選択ステップが、抗体系ビーズ選択を含み、前記第 2 の選択ステップが、フローサイトメトリー（例えば、F A C S を含む）を含む、請求項 262 ～ 265 に記載の方法。

【請求項 268】

前記第 1 の選択ステップが、抗体系磁気ビーズ選択を含み、前記第 2 の選択ステップが、フローサイトメトリー（例えば、F A C S を含む）を含む、請求項 262 ～ 265 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 269】

前記第1の選択ステップが、抗体系ビーズ選択または抗体系磁気ビーズ選択を含み、前記第2の選択ステップが、抗体系ビーズ選択または抗体系磁気ビーズ選択を含む、請求項262～265に記載の方法。

【請求項 270】

PD-1+、LAG3+、TIM3+、及び／またはTIGIT+TILの前記抗体系ビーズ選択に使用されるビーズが、それぞれ、抗PD-1、抗LAG3、抗TIM3及び／または抗TIGIT抗体複合ビーズである、請求項269に記載の方法。

【請求項 271】

CD38+またはCD101+TILの前記抗体系ビーズ選択に使用されるビーズが、それぞれ、抗CD38または抗CD101抗体複合ビーズである、請求項269または270に記載の方法。

10

【請求項 272】

PD-1+、LAG3+、TIM3+、及び／またはTIGIT+TILの前記抗体系磁気ビーズ選択に使用されるビーズが、それぞれ、抗PD-1、抗LAG3、抗TIM3及び／または抗TIGIT抗体複合磁気ビーズである、請求項269～271のいずれかに記載の方法。

【請求項 273】

CD38+またはCD101+TILの前記抗体系磁気ビーズ選択に使用されるビーズが、それぞれ、抗CD38または抗CD101抗体複合磁気ビーズである、請求項269～272のいずれかに記載の方法。

20

【請求項 274】

前記PD-1+、LAG3+、TIM3+、及びTIGIT+TILが、それぞれ、抗PD-1、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGIT抗体複合ビーズと結合し、前記PD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陰性TILが、それぞれ、前記抗PD-1、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGIT抗体複合ビーズと結合しない、請求項269～273のいずれかに記載の方法。

【請求項 275】

前記プライミングによる第1の増殖ステップが、患者または対象から取得された腫瘍試料の消化物から選択または濃縮される第1のTIL集団に対して行われる、先行請求項のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 276】

前記消化物が、酵素の混合物を用いて行われる、請求項275に記載の方法。

【請求項 277】

前記酵素の混合物が、中性プロテアーゼ、コラゲナーゼ、及びDNaseを含む、請求項276に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

40

本出願は、2020年5月4日に出願された米国仮特許出願第63／019,907号、及び2021年2月5日に出願された米国仮特許出願第63／146,400号に対する優先権を主張し、これらの開示は、すべての目的のために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）の養子移入を使用した巨大な難治性がんの治療は、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。免疫療法を成功させるには多数のTILが必要であり、商品化には堅牢かつ信頼性の高いプロセスが必要であ

50

る。これは、細胞増殖に関する技術、物流、及び規制上の問題のために達成することが困難であった。IL-2系TIL増殖とそれに続く「急速な増殖プロセス」(REP)は、その速度及び効率のためにTIL増殖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。REPは、フィーダー細胞としての、多くの場合、複数のドナーに由来する照射された同種異系末梢血単核細胞(PBMC、単核細胞(MNC)としても知られる)の大過剰(例えば、200倍)、ならびに抗CD3抗体(OKT3)及び高用量のIL-2を必要とするが、14日間にわたってTILの1,000倍の増殖をもたらし得る。Dudley, et al., J. Immunother. 2003, 26, 332-42。REP手順を受けたTILは、黒色腫を有する患者の宿主免疫抑制に続いて、養子細胞療法を成功させた。現在の注入受容パラメータは、TILの組成(例えば、CD28、CD8、またはCD4陽性)の読み取り値、ならびにREP製品の倍率増殖及び生存率に依存している。

10

20

30

40

50

【0003】

現在のTILの製造プロセスは、長さ、コスト、滅菌性の懸念、及び本明細書に記載される他の要因により制限されているため、かかるプロセスを商品化するための可能性は厳しく制限されている。例えば、TILの特徴付けが行われているが、TILは、抑制性受容体プログラム化細胞死1(PD-1、CD279としても既知)を含む様々な受容体を発現することが示されており(Gros, A., et al., Clin Invest. 124(5):2246-2259(2014)を参照)、治療用TIL集団の開発におけるこの情報の有用性は、まだ完全には実現されていない。複数の臨床センターでヒト患者に使用するための商業規模の製造及び規制当局の承認に適した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、増強された腫瘍特異的致死能力(例えば、増強された細胞傷害性)を有するTILを取得するために、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT発現に基づいてTILを事前選択するための方法を提供することにより、この必要性を満たす。

【発明の概要】

【0004】

本発明は、TILを拡張し、治療用TIL集団を産生するための方法を提供し、PD-1+、CD39+、CD103+、CD101+、LAG3+、TIM3+、及び／またはTIGIT+状態の事前選択ステップを含む。

【0005】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用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、及び／または受容することと

(b) (a)の第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することと、

(c) PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、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の増殖が

、約 1～7、8、9、10、または 11 日の第 1 の期間行われ、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、産生することと、

(d) 第 2 の T I L 集団の細胞培養培地に追加の I L - 2、O K T - 3、及び A P C を補充することにより、急速な第 2 の増殖を行って、第 3 の T I L 集団を産生することであって、急速な第 2 の増殖に追加される A P C の数が、ステップ (c) 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 の増殖が、約 1～11 日の第 2 の期間行われ、第 3 の T I L 集団を取得し、第 3 の T I L 集団が、治療用 T I L 集団であり、急速な第 2 の増殖が、第 2 のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、産生することと、

(e) ステップ (d) から取得された治療用 T I L 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、を含む、方法を提供する。

10

【0006】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療用 T I L 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することにより、対象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) (a) の第 1 の T I L 集団から P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T 陽性 T I L を選択して、P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T に富む T I L 集団を取得することと、

20

c) P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T に富む T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び任意で抗原提示細胞 (A P C) を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第 1 の増殖を行って、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 の増殖が、約 1～7、8、9、10、または 11 日の第 1 の期間行われ、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、産生することと、

d) 第 2 の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び A P C を含む細胞培養培地と接触させることにより、急速な第 2 の増殖を行って、第 3 の T I L 集団を産生することであって、急速な第 2 の増殖が、約 1～11 日の第 2 の期間行われ、第 3 の T I L 集団を取得し、第 3 の T I L 集団が、治療用 T I L 集団である、産生することと、

30

e) ステップ (d) から取得された治療用 T I L 集団を採取することと、を含む、方法を提供する。

【0007】

いくつかの実施形態では、ステップ (c) 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、ステップ (d) における培養培地中の A P C の数は、ステップ (c) における培養培地中の A P C の数よりも多い。

【0008】

いくつかの実施形態では、ステップ (c) 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、ステップ (d) における培養培地中の A P C の数は、ステップ (c) における培養培地中の A P C の数に等しい。

40

【0009】

いくつかの実施形態では、P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T 陽性 T I L が、P D - 1 高、C D 3 9 高／低、C D 3 8 低、C D 1 0 3 高／低、C D 1 0 1 低、L A G 3 高、T I M 3 高、及び／または T I G I T 高 T I L である。

【0010】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療用 T I L 集団に拡張するための方法であって、

(a) P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T 陽性であるように選択されている第 1 の T I L 集団であって

50

、腫瘍消化により対象からの腫瘍試料を処理し、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択することにより取得可能な当該第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、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の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日の第1の期間行われ、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、産生することと、

（b）第2のTIL集団に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2のTIL集団の細胞培養培地と接触させることによって、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、速な第2の増殖におけるAPCの数が、ステップ（a）のAPCの数の少なくとも2倍であり、急速な第2の増殖が、約1～11日の第2の期間行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、産生することと、

（c）ステップ（b）から取得された治療用TIL集団を採取することと、を含む、方法を提供する。

【0011】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療用TIL集団に拡張するための方法であって、

（a）第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び任意で抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で培養することにより、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性であるように選択されている第1のTIL集団のプライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日の第1の期間行われ、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、産生することと、

（b）第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む細胞培養培地と接触させることにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の増殖が、約1～11日の第2の期間行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団である、産生することと、

（c）ステップ（b）から取得された治療用TIL集団を採取することと、を含む、方法を提供する。

【0012】

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（b）における培養培地中のAPCの数は、ステップ（a）における培養培地中のAPCの数よりも多い。

【0013】

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（b）における培養培地中のAPCの数は、ステップ（a）における培養培地中のAPCの数に等しい。

【0014】

いくつかの実施形態では、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILが、PD-1高、CD39高、CD38低、CD103高、CD101低、LAG3高、TIM3高、及び／またはTIGIT高TILである。

【0015】

いくつかの実施形態では、ステップ（b）の選択またはステップ（a）の選択が、フローサイトメトリー（例えば、FACSを含む）、抗体系ビーズ選択、及び抗体系磁気ビーズ選択からなる群から選択される選択方法を含む。

10

20

30

40

50

【0016】

いくつかの実施形態では、ステップ（b）の選択またはステップ（a）の選択が、フローサイトメトリー（例えば、FACSを含む）を含む。

【0017】

いくつかの実施形態では、ステップ（b）の選択またはステップ（a）の選択が、（i）第1のTIL集団を、PD-1のIgVドメインの外側のN末端ループによってPD-1に結合する過剰のモノクローナル抗PD-1 IgG4抗体に曝露するステップと、（ii）フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4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流動系細胞選別を行って、PD-1に富むTIL集団を取得するステップと、を含む。

10

【0018】

いくつかの実施形態では、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILの選択が、少なくとも 1×10^6 のPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILが存在するまで生じる。

【0019】

いくつかの実施形態では、第1のTIL集団を培養するための細胞培養培地が、2-メルカプトエタノールを含む。

【0020】

いくつかの実施形態では、第2のTIL集団を培養するための細胞培養培地が、2-メルカプトエタノールを含む。

20

【0021】

いくつかの実施形態では、第1のTIL集団及び第2のTIL集団を培養するための細胞培養培地が、2-メルカプトエタノールを含む。

【0022】

いくつかの実施形態では、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILが、それぞれ、抗PD-1、抗CD39、抗CD38、抗CD103、抗CD101、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGIT抗体複合ビーズを使用して選択される。

【0023】

いくつかの実施形態では、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILが、それぞれ、抗PD-1、抗CD39、抗CD38、抗CD103、抗CD101、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGIT抗体複合磁気ビーズを使用して選択される。

30

【0024】

いくつかの実施形態では、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILが、それぞれ、抗PD-1、抗CD39、抗CD38、抗CD103、抗CD101、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGIT抗体複合ビーズと結合し、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陰性TILが、それぞれ、抗PD-1、抗CD39、抗CD38、抗CD103、抗CD101、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGIT抗体複合ビーズと結合しない。

40

【0025】

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗PD-1 IgG4抗体は、ニボルマブ、またはそのバリエーション、断片、もしくは複合体である。

【0026】

いくつかの実施形態では、抗IgG4抗体は、クローン抗ヒトIgG4、クローンHP6023である。

【0027】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖におけるAPCの数対プライミングによる

50

第 1 の増殖における APC の数が、約 $1.5 : 1 \sim 20 : 1$ の範囲から選択される比率である。

【0028】

いくつかの実施形態では、比率は、約 $1.5 : 1 \sim 10 : 1$ の範囲から選択される。

【0029】

いくつかの実施形態では、比率は、約 $2 : 1 \sim 5 : 1$ の範囲から選択される。

【0030】

いくつかの実施形態では、比率は、約 $2 : 1 \sim 3 : 1$ の範囲から選択される。

【0031】

いくつかの実施形態では、比率は、約 $2 : 1$ である。

10

【0032】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖における APC の数が、約 1×10^8 APC $\sim$ 約 3.5×10^8 APC の範囲から選択され、急速な第 2 の増殖における APC の数が、約 3.5×10^8 APC $\sim$ 約 1×10^9 APC の範囲から選択される。

【0033】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖における APC の数が、約 1.5×10^8 APC $\sim$ 約 3×10^8 APC の範囲から選択され、急速な第 2 の増殖における APC の数が、約 4×10^8 APC $\sim$ 約 7.5×10^8 APC の範囲から選択される。

【0034】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖における APC の数が、約 2×10^8 APC $\sim$ 約 2.5×10^8 APC の範囲から選択され、急速な第 2 の増殖における APC の数が、約 4.5×10^8 APC $\sim$ 約 5.5×10^8 APC の範囲から選択される。

20

【0035】

いくつかの実施形態では、約 2.5×10^8 APC が、プライミングによる第 1 の増殖に追加され、 5×10^8 APC が、急速な第 2 の増殖に追加される。

【0036】

いくつかの実施形態では、第 2 の TIL 集団中の TIL の数の第 1 の TIL 集団中の TIL の数に対する比率は、約 $1.5 : 1 \sim 100 : 1$ である。

【0037】

いくつかの実施形態では、第 2 の TIL 集団中の TIL の数の第 1 の TIL 集団中の TIL の数に対する比率は、約 $50 : 1$ である。

30

【0038】

いくつかの実施形態では、第 2 の TIL 集団中の TIL の数の第 1 の TIL 集団中の TIL の数に対する比率は、約 $25 : 1$ である。

【0039】

いくつかの実施形態では、第 2 の TIL 集団中の TIL の数の第 1 の TIL 集団中の TIL の数に対する比率は、約 $20 : 1$ である。

【0040】

いくつかの実施形態では、第 2 の TIL 集団中の TIL の数の第 1 の TIL 集団中の TIL の数に対する比率は、約 $10 : 1$ である。

40

【0041】

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。

【0042】

いくつかの実施形態では、方法が、治療用 TIL 集団を採取するステップの後に、

【0043】

採取された治療用 TIL 集団を注入バッグに移す追加のステップを行うことを含む。

【0044】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖が複数の別個の容器中で行わ

50

れ、その別個の容器の各々において、第2のTIL集団が、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて第1のTIL集団から取得され、第3のTIL集団が、急速な第2の増殖のステップにおいて第2のTIL集団から取得され、第3のTIL集団から取得された治療用TIL集団が、複数の容器の各々から収集され、複合されて、採取されたTIL集団を生じさせる。

【0045】

いくつかの実施形態では、複数の別個の容器は、少なくとも2個の別個の容器を含む。

【0046】

いくつかの実施形態では、複数の別個の容器は、2～20個の別個の容器を含む。

【0047】

いくつかの実施形態では、複数の別個の容器は、2～10個の別個の容器を含む。

【0048】

いくつかの実施形態では、複数の別個の容器は、2～5個の別個の容器を含む。

【0049】

いくつかの実施形態では、別個の容器の各々は、第1のガス透過性表面積を含む。

【0050】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖ステップが、単一の容器内で行われる。

【0051】

いくつかの実施形態では、単一の容器は、第1のガス透過性表面積を含む。

【0052】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて、細胞培養培地は、抗原提示細胞（APC）を含み、APCは、約1細胞層～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。

【0053】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて、APCは、約1.5細胞層～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。

【0054】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて、APC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。

【0055】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖のステップにおいて、APCは、約3細胞層～約5細胞層の厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化される。

【0056】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖のステップにおいて、APCは、約3.5細胞層～約4.5細胞層の厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化される。

【0057】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖のステップにおいて、APCは、約4細胞層の厚さで第1のガス透過性表面積上に層状化される。

【0058】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて、プライミングによる第1の増殖は、第1のガス透過性表面積を含む第1の容器内で行われ、急速な第2の増殖のステップにおいて、急速な第2の増殖は、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。

【0059】

いくつかの実施形態では、第2の容器は、第1の容器よりも大きい。

【0060】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて、細胞培養培地は、抗原提示細胞（APC）を含み、APCは、約1細胞層～約3細胞層の平均厚

10

20

30

40

50

さで第 1 のガス透過性表面積上に層状化される。

【 0 0 6 1 】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、A P C は、約 1 . 5 細胞層～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。

【 0 0 6 2 】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、A P C 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。

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖のステップにおいて、A P C は、約 3 細胞層～約 5 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。

【 0 0 6 4 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖のステップにおいて、A P C は、約 3 . 5 細胞層～約 4 . 5 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。

【 0 0 6 5 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖のステップにおいて、A P C は、約 4 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。

【 0 0 6 6 】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖が第 1 の T I L 集団に対して行われる各容器について、急速な第 2 の増殖は、同じ容器内で、かかる第 1 の T I L 集団から産生された第 2 の T I L 集団に対して行われる。

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態では、各容器は、第 1 のガス透過性表面積を含む。

【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、細胞培養培地は、抗原提示細胞（A P C）を含み、A P C は、約 1 細胞層～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。

【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、A P C は、約 1 . 5 細胞層～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。

【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、A P C 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。

【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖のステップにおいて、A P C は、約 3 細胞層～約 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。

【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖のステップにおいて、A P C は、約 3 . 5 細胞層～約 4 . 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。

【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖のステップにおいて、A P C は、約 4 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。

【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて、プライミングによる第 1 の増殖が第 1 の T I L 集団に対して行われる各容器について、容器は、第 1 のガス透過性表面積を含み、細胞培養培地は、抗原提示細胞（A P C）を含み、A P C は、第 1 のガス透過性表面積上に層状化され、プライミングによる第 1 の増殖のステップにおいて層状化された A P C の平均層数の、急速な第 2 の増殖のステップにおいて層状化された A P C の平均層数に対する比率は、約 1 : 1 . 1 ～約 1 : 1 0 の範囲から選択さ

10

20

30

40

50

れる。

【0075】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数の、急速な第2の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数に対する比率は、約1:1.2~約1:8の範囲から選択される。

【0076】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数の、急速な第2の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数に対する比率は、約1:1.3~約1:7の範囲から選択される。

【0077】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数の、急速な第2の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数に対する比率は、約1:1.4~約1:6の範囲から選択される。

【0078】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数の、急速な第2の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数に対する比率は、約1:1.5~約1:5の範囲から選択される。

【0079】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数の、急速な第2の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数に対する比率は、約1:1.6~約1:4の範囲から選択される。

【0080】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数の、急速な第2の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数に対する比率は、約1:1.7~約1:3.5の範囲から選択される。

【0081】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数の、急速な第2の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数に対する比率は、約1:1.8~約1:3の範囲から選択される。

【0082】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数の、急速な第2の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数に対する比率は、約1:1.9~約1:2.5の範囲から選択される。

【0083】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数の、急速な第2の増殖のステップにおいて層状化されたAPCの平均層数に対する比率は、約1:2である。

【0084】

いくつかの実施形態では、2~3日間の急速な第2の増殖のステップの後、細胞培養培地に追加のIL-2が補充される。

【0085】

いくつかの実施形態では、本方法は、凍結保存プロセスを使用して、治療用TIL集団を採取するステップにおいて、採取されたTIL集団を凍結保存することをさらに含む。

【0086】

いくつかの実施形態では、方法は、注入バッグを凍結保存するステップをさらに含む。

【0087】

いくつかの実施形態では、凍結保存プロセスは、採取されたTIL集団の、凍結保存培地に対する1:1比率を使用して行われる。

【0088】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は末梢血単核細胞(PBMC)である。

10

20

30

40

50

【0089】

いくつかの実施形態では、P B M Cは放射線照射されており、同種異系である。

【0090】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて、細胞培養培地は、末梢血単核細胞（P B M C）を含み、プライミングによる第1の増殖のステップにおける細胞培養培地中のP B M Cの総数は、 2.5×10^8 である。

【0091】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖のステップにおいて、細胞培養培地中の抗原提示細胞（A P C）は、末梢血単核細胞（P B M C）であり、急速な第2の増殖のステップにおいて細胞培養培地に追加されるP B M Cの総数は、 5×10^8 である。

10

【0092】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、人工抗原提示細胞である。

【0093】

いくつかの実施形態では、治療用T I L集団を採取するステップにおける採取は、膜系細胞処理システムを使用して行われる。

【0094】

いくつかの実施形態では、ステップ（d）における採取は、L O V O細胞処理システムを使用して行われる。

【0095】

いくつかの実施形態では、複数の断片は、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて1容器当たり約60個の断片を含み、各断片は、約 27 mm^3 の体積を有する。

20

【0096】

いくつかの実施形態では、複数の断片は、約 1300 mm^3 ～約 1500 mm^3 の総体積を伴う約30～約60個の断片を含む。

【0097】

いくつかの実施形態では、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。

【0098】

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。

30

【0099】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、G容器及びX u r iセルバッグからなる群から選択される容器内に提供される。

【0100】

いくつかの実施形態では、ステップ（d）における2～3日後に、細胞培養培地は、追加のI L - 2を補充される。

【0101】

いくつかの実施形態では、I L - 2濃度は約10,000 I U / m L～約5,000 I U / m Lである。

【0102】

40

いくつかの実施形態では、I L - 2濃度は約6,000 I U / m Lである。

【0103】

いくつかの実施形態では、採取した治療用T I L集団を注入バッグに移すステップにおける注入バッグは、H y p o T h e r m o s o lを含有する注入バッグである。

【0104】

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（D M S O）を含む。

【0105】

いくつかの実施形態では、凍結保存培地は7%～10%のD M S O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の増殖のステップにおける第1の期

50

間及び急速な第2の増殖のステップにおける第2の期間は、各々、5日、6日、7日、8日、9日、10日、または11日の期間内で個々に行われる。

【0107】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップの第1の期間は、5日、6日、または7日の期間内で行われる。

【0108】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップの第1の期間は、8日、9日、10日、または11日の期間内で行われる。

【0109】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖のステップの第2の期間は、7日、8日、または9日の期間内で行われる。

10

【0110】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖のステップの第2の期間は、10日または11日の期間内で行われる。

【0111】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップの第1の期間及び急速な第2の増殖のステップの第2の期間は、各々、7日の期間内に個々に行われる。

【0112】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖のステップの第1の期間及び急速な第2の増殖のステップの第2の期間は、各々、11日の期間内に個々に行われる。

20

【0113】

いくつかの実施形態では、治療用TIL集団の採取をとおしたプライミングによる第1の増殖のステップは、約14日～約16日の期間内で行われる。

【0114】

いくつかの実施形態では、治療用TIL集団の採取をとおしたプライミングによる第1の増殖のステップは、約15日～約16日の期間内で行われる。

【0115】

いくつかの実施形態では、治療用TIL集団の採取をとおしたプライミングによる第1の増殖のステップは、約14日の期間内で行われる。

【0116】

いくつかの実施形態では、治療用TIL集団の採取をとおしたプライミングによる第1の増殖のステップは、約15日の期間内で行われる。

30

【0117】

いくつかの実施形態では、治療用TIL集団の採取をとおしたプライミングによる第1の増殖のステップは、約16日の期間内で行われる。

【0118】

いくつかの実施形態では、方法は、凍結保存プロセスを使用して、採取された治療用TIL集団を凍結保存するステップをさらに含み、治療用TIL集団の採取をとおしたプライミングによる第1の増殖のステップ及び凍結保存のステップは、16日以下のうちに行われる。

40

【0119】

いくつかの実施形態では、治療用TIL集団の採取のステップで採取された治療用TIL集団は、TILの治療上有効な投与量に十分なTILを含む。

【0120】

いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量に十分なTILの数は約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} である。

【0121】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖のステップにおける第3のTIL集団は、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。

50

【0122】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖のステップにおける第3のTIL集団は、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。

【0123】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖のステップにおいて第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細胞は、プライミングによる第1の増殖のステップにおいて第2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細胞と比較して、増加したCD8及びCD28発現を示す。

10

【0124】

いくつかの実施形態では、治療用TIL集団の採取のステップからの治療用TIL集団が患者に注入される。

【0125】

いくつかの実施形態では、方法は、凍結保存プロセスを使用して、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さらに含む。

【0126】

いくつかの実施形態では、凍結保存プロセスは、採取されたTIL集団の、凍結保存培地に対する1：1比率を使用して行われる。

【0127】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は末梢血単核細胞（PBMC）である。

20

【0128】

いくつかの実施形態では、PBMCは放射線照射されており、同種異系である。

【0129】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞は、人工抗原提示細胞である。

【0130】

いくつかの実施形態では、採取ステップは、膜系細胞処理システムを使用して行われる。

【0131】

いくつかの実施形態では、採取ステップは、LOVO細胞処理システムを使用して行われる。

30

【0132】

いくつかの実施形態では、複数の断片は、約60個の断片を含み、各断片は、約27mm³の体積を有する。

【0133】

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。

【0134】

いくつかの実施形態では、複数の断片は、約1350mm³の総体積を伴う約50個の断片を含む。

40

【0135】

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。

【0136】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、G容器及びXuriセルバッグからなる群から選択される容器内に提供される。

【0137】

いくつかの実施形態では、IL-2濃度は約10,000IU/mL～約5,000IU/mLである。

【0138】

50

いくつかの実施形態では、IL-2濃度は約6,000 IU/mLである。

【0139】

いくつかの実施形態では、ステップ(d)における注入バッグは、HypoThermosoilを含有する注入バッグである。

【0140】

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)を含む。

【0141】

いくつかの実施形態では、凍結保存培地は7%~10%のDMSOを含む。

【0142】

いくつかの実施形態では、ステップ(c)における第1の期間及び第2の期間は、各々、5日、6日、または7日の期間内で個々に行われる。 10

【0143】

いくつかの実施形態では、第1の期間は、5日、6日、または7日の期間内で行われる。

【0144】

いくつかの実施形態では、第2の期間は、10日または11日の期間内で行われる。

【0145】

いくつかの実施形態では、第1の期間及び第2の期間は、各々、7日の期間内で個別に行われる。

【0146】

いくつかの実施形態では、すべてのステップは、約14日~約22日の期間内で行われる。 20

【0147】

いくつかの実施形態では、すべてのステップは、約14日~約21日の期間内で行われる。

【0148】

いくつかの実施形態では、すべてのステップは、約14日~約20日の期間内で行われる。

【0149】

いくつかの実施形態では、すべてのステップは、約14日~約19日の期間内で行われる。 30

【0150】

いくつかの実施形態では、すべてのステップは、約14日~約18日の期間内で行われる。

【0151】

いくつかの実施形態では、すべてのステップは、約14日~約17日の期間内で行われる。

【0152】

いくつかの実施形態では、すべてのステップは、約14日~約16日の期間内で行われる。 40

【0153】

いくつかの実施形態では、すべてのステップは、約15日~約16日の期間内で行われる。

【0154】

いくつかの実施形態では、すべてのステップは、約14日の期間内で行われる。

【0155】

いくつかの実施形態では、すべてのステップは、約15日の期間内で行われる。

【0156】

いくつかの実施形態では、すべてのステップは、約16日の期間内で行われる。

【0157】

いくつかの実施形態では、すべてのステップ及び凍結保存は、16日以内に行われる。

【0158】

いくつかの実施形態では、採取された治療用TIL集団は、治療上有効な投与量のTILに十分なTILを含む。

【0159】

いくつかの実施形態では、治療上有効な投与量に十分なTILの数は約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} である。

【0160】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖ステップにおける容器が、急速な第2の増殖のステップにおける容器よりも大きい。

【0161】

いくつかの実施形態では、第3のTIL集団は、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。

【0162】

いくつかの実施形態では、第3のTIL集団は、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。

【0163】

いくつかの実施形態では、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細胞は、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。

【0164】

いくつかの実施形態では、採取されたTILは、患者に注入される。

【0165】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する対象を治療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、及び／または受容することと

(b) (a)の第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することと、

(c) PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、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の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日行われ、第2のTIL集団を取得する、産生することと、

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の増殖に追加される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の増殖が、約1～11日間行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、産生することと、

(e) ステップ(c)から取得された治療用TIL集団を採取することと、

(f) ステップ(d)からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すことと、

(g) 治療上有効な投与量のステップ(e)からのTILを対象に投与することと、

10

20

30

40

50

を含む、拡張した腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を投与することを含む、方法を提供する。

【0166】

いくつかの実施形態では、ステップ（g）において治療上有効な投与量を投与するのに十分なTILの数が、約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} である。

【0167】

いくつかの実施形態では、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILが、PD-1高、CD39高、CD38低、CD103高／低、CD101低、LAG3高、TIM3高、及び／またはTIGIT高TILである。

【0168】

いくつかの実施形態では、ステップ（b）の選択が、（i）第1のTIL集団を、PD-1のIgVドメインの外側のN末端ループによってPD-1に結合する過剰のモノクローナル抗PD-1 IgG4抗体に曝露するステップと、（ii）フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4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流動系細胞選別を行って、PD-1に富むTIL集団を取得するステップと、を含む。

【0169】

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗PD-1 IgG4抗体は、ニボルマブ、またはそのバリエーション、断片、もしくは複合体である。

【0170】

いくつかの実施形態では、抗IgG4抗体は、クローン抗ヒトIgG4、クローンHP6023である。

【0171】

いくつかの実施形態では、抗原提示細胞（APC）はPBMCである。

【0172】

いくつかの実施形態では、ステップ（g）において治療上有効な投与量のTIL細胞を投与する前に、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが対象に投与されている。

【0173】

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5日間投与するステップを含む。

【0174】

いくつかの実施形態では、この方法は、ステップ（g）における対象へのTIL細胞の投与の翌日に開始する高用量IL-2レジメンで患者を治療するステップをさらに含む。

【0175】

いくつかの実施形態では、高用量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または720,000 IU/kgを含む。

【0176】

いくつかの実施形態では、ステップ（c）における第3のTIL集団は、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。

【0177】

いくつかの実施形態では、ステップ（d）における第3のTIL集団は、16日間より長いプロセスにより調製される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。

【0178】

いくつかの実施形態では、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細胞は、第2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細胞と比較して、増加したCD8及びCD28発現を示す。

10

20

30

40

50

【0179】

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、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）、膠芽腫（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。

【0180】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、神経膠芽細胞腫（GBMを含む）、及び胃腸癌からなる群から選択される。

【0181】

いくつかの実施形態では、がんは、黒色腫である。

10

【0182】

いくつかの実施形態では、がんは、HNSCCである。

【0183】

いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌である。

【0184】

いくつかの実施形態では、がんは、NSCLCである。

【0185】

いくつかの実施形態では、がんは、神経膠芽細胞腫（GBMを含む）である。

【0186】

いくつかの実施形態では、がんは、胃腸癌である。

20

【0187】

いくつかの実施形態では、がんは、高頻度変異癌である。

【0188】

いくつかの実施形態では、がんは、小児高頻度変異癌である。

【0189】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖が、第1の容器内で行われ、急速な第2の増殖が、第2の容器内で行われ、第1及び第2の容器の各々が、GREX-10である。

【0190】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖が、第1の密閉容器内で行われ、急速な第2の増殖が、第2の密閉容器内で行われ、第1及び第2の密閉容器の各々が、GREX-100である。

30

【0191】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖が、第1の密閉容器内で行われ、急速な第2の増殖が、第2の密閉容器内で行われ、第1及び第2の密閉容器の各々が、GREX-500である。

【0192】

いくつかの実施形態では、対象は、以前に抗PD-1抗体で治療されている。

【0193】

いくつかの実施形態では、対象は、以前に抗PD-1抗体で治療されていない。

40

【0194】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖ステップが、第1のTIL集団を抗PD-1抗体と接触させて、第1のTIL集団において抗PD-1抗体とTIL細胞との第1の複合体を形成し、次いで、第1の複合体を単離して、PD-1陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団を取得することによって、PD-1陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団に対して行われる。

【0195】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体が、Fc領域を含み、第1の複合体を形成するステップの後に、かつ第1の複合体を単離するステップの前に、方法が、第1の複合体を抗PD-1抗体のFc領域に結合する抗Fc抗体と接触させて、抗Fc抗体と第1の複

50

合体との第2の複合体を形成するステップをさらに含み、第1の複合体を単離するステップが、第2の複合体を単離することにより行われる。

【0196】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体が、EH12.2H7、PD1.3.1、SYM021、M1H4、A17188B、ニボルマブ（BMS-936558、Bristol-Myers Squibb；Opdivo（登録商標））、ペムブロリズマブ（ラムプロリズマブ、MK03475またはMK-3475、Merck；Keytruda（登録商標））、H12.1、PD1.3.1、NAT 105、ヒト化抗PD-1抗体JS001（Shanghai Junshi）、モノクローナル抗PD-1抗体TSR-042（Tesarro, Inc.）、ピジリズマブ（抗PD-1 mAb CT-011、Medivation）、抗PD-1モノクローナル抗体BGB-A317（Beigene）、及び／または抗PD-1抗体SHR-1210（Shanghai HengRui）、ヒトモノクローナル抗体REGN2810（Regeneron）、ヒトモノクローナル抗体MDX-1106（Bristol-Myers Squibb）、ヒト化抗PD-1 IgG4抗体PDR001（Novartis）、及びRMP1-14（ラットIgG）-BioXcellカタログ番号BP0146からなる群から選択される。

10

【0197】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、EH12.2H7である。

【0198】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブまたはペムブロリズマブとは異なるエピトープに結合する。

20

【0199】

いくつかの実施形態では、PD-1抗体は、EH12.2H7またはニボルマブと同じエピトープに結合する。

【0200】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブである。

【0201】

いくつかの実施形態では、対象が、以前に第1の抗PD1抗体で治療されており、プライミングによる第1の増殖ステップが、第1のTIL集団を第2の抗PD-1抗体と接触させて、第1のTIL集団において第2の抗PD-1抗体とTIL細胞との第1の複合体を形成し、次いで、第1の複合体を単離して、PD-1陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団を取得することによって、PD-1陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団に対して行われ、第2の抗PD-1抗体が、第1のTIL集団で不溶化された第1の抗PD-1抗体によって、第1のTIL集団と結合することから遮断されない。

30

【0202】

いくつかの実施形態では、対象が、以前に第1の抗PD1抗体で治療されており、プライミングによる第1の増殖ステップが、第1のTIL集団を第2の抗PD-1抗体と接触させて、第1のTIL集団において第2の抗PD-1抗体とTIL細胞との第1の複合体を形成し、次いで、第1の複合体を単離して、PD-1陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団を取得することによって、PD-1陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団に対して行われ、第2の抗PD-1抗体が、第1のTIL集団で不溶化された第1の抗PD-1抗体によって、第1のTIL集団と結合することから遮断される。

40

【0203】

いくつかの実施形態では、第1の抗PD-1抗体及び第2の抗PD-1抗体は、Fc領域を含み、第1の複合体を形成するステップの後に、かつ第1の複合体を単離するステップの前に、方法が、第1の複合体を第1の抗PD-1抗体のFc領域及び第2の抗PD-1抗体のFc領域に結合する抗Fc抗体と接触させて、抗Fc抗体と第1の複合体との第

50

2の複合体を形成するステップをさらに含み、第1の複合体を単離するステップは、第2の複合体を単離することにより行われる。

【0204】

いくつかの実施形態では、対象が、以前に第1の抗PD-1抗体で治療されており、プライミングによる第1の増殖ステップが、(i)第1のTIL集団を第2の抗PD-1抗体と接触させて、第2の抗PD-1抗体と第1のTIL集団との第1の複合体を形成することであって、第2の抗PD-1抗体が、第1のTIL集団で不溶化された第1の抗PD-1抗体によって、PD-1陽性TILと結合することから遮断され、第1の抗PD-1抗体及び第2の抗PD-1抗体が、Fc領域を含む、形成することと、(ii)第1の複合体を第2の抗PD-1抗体のFc領域と結合する抗Fc抗体と接触させ、抗Fc抗体と第1の複合体との第2の複合体を形成し、第1のTIL集団で不溶化された第1の抗PD-1抗体を抗Fc抗体と接触させ、抗Fc抗体と第1のTIL集団で不溶化された第1の抗PD-1抗体との第3の複合体を形成することと、(iii)第2及び第3の複合体を分離して、PD-1陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団を取得することと、によってPD-1陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団に対して行われる。

10

【0205】

いくつかの実施形態では、本発明は、患者から取得された腫瘍組織試料の消化物から選択されたPD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性細胞から調製された治療用腫瘍浸潤リンパ球(TIL)集団であって、治療用TIL集団が、増加した有効性及び／または増加したインターフェロンガンマ産生を提供する、治療用TIL集団を提供する。

20

【0206】

いくつかの実施形態では、治療用TIL集団は、増加したインターフェロンガンマ産生の増加を提供する。

【0207】

いくつかの実施形態では、治療用TIL集団は、増加した有効性を提供する。

【0208】

いくつかの実施形態では、療用TIL集団が、16日間より長いプロセスにより調製される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。

30

【0209】

いくつかの実施形態では、療用TIL集団が、16～22日間より長いプロセスにより調製される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。

【0210】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖ステップが、少なくとも11.27%～74.4%のPD-1陽性TILを伴うPD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団に対して行われる。

【0211】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖ステップが、
(i)第1のTIL集団及びPBMC集団を、PD-1のIgVドメインの外側のN末端ループによってPD-1に結合する過剰のモノクローナル抗PD-1 IgG4抗体に曝露するステップと、

40

(ii)フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4抗体を追加するステップと、

(iii)蛍光活性化細胞選別法(FACS)により行われた場合のPBMC集団の強度と比較した第1のTIL集団中のPD-1陽性TILのフルオロフォアの強度に基づいて、PD-1陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団を取得するステップと、によってPD-1陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL

50

集団に対して行われる。

【0212】

いくつかの実施形態では、第1のTIL集団及びPBMC集団の両方におけるフルオロフォアの強度を使用して、それぞれPD-1陰性TIL、PD-1中間TIL、及びPD-1陽性TILに対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するためのFACSゲートを設定する。

【0213】

いくつかの実施形態では、FACSゲートは、ステップ(a)の後に設定される。

【0214】

いくつかの実施形態では、PD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILが、PD-1高、LAG3高、TIM3高、及び／またはTIGIT高TILである。

10

【0215】

いくつかの実施形態では、PD-1陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団の少なくとも80%が、PD-1陽性TILであり、LAG3陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団の少なくとも80%が、LAG3陽性TILであり、TIM3陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団の少なくとも80%が、TIM3陽性TILであり、及び／またはTIGIT陽性TILについて選択または濃縮される第1のTIL集団の少なくとも80%が、TIGIT陽性TILである。

20

【0216】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用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、及び／または受容することと、

(b) (a)の第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することであって、第1のTIL集団の少なくとも10%~80%の範囲が、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILである、取得することと、

30

(c) PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、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の増殖が、約1~7、8、9、10、または11日の第1の期間行われ、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、産生することと、

40

(d) 第2のTIL集団の細胞培養培地に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の増殖に追加されるAPCの数が、ステップ(c)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の増殖が、約1~11日の第2の期間行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、産生することと、

(e) ステップ(d)から取得された治療用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。

【0217】

50

いくつかの実施形態では、ステップ（b）の選択は、

（i）第1のTIL集団及びPBMC集団を、PD-1のIgVドメインの外側のN末端ループによってPD-1に結合する過剰のモノクローナル抗PD-1 IgG4抗体に曝露するステップと、

（ii）フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4抗体を追加するステップと、

（iii）蛍光活性化細胞選別法（FACS）により行われた場合のPBMC集団の強度と比較した第1のTIL集団中のPD-1陽性TILのフルオロフォアの強度に基づいて、PD-1に富むTIL集団を取得するステップと、を含む。

【0218】

いくつかの実施形態では、第1の集団及びPBMC集団の両方におけるフルオロフォアの強度を使用して、

i）それぞれ、PD-1陰性TIL、PD-1低TIL、PD-1中間TIL、及びPD-1陽性TIL、

ii）それぞれ、CD39陰性TIL、CD39低TIL、CD39中間TIL、及びCD39陽性TIL、

iii）それぞれ、CD38陰性TIL、CD38低TIL、CD38中間TIL、及びCD38陽性TIL、

iv）それぞれ、CD103陰性TIL、CD103低TIL、CD103中間TIL、及びCD103陽性TIL、

v）それぞれ、CD101陰性TIL、CD101低TIL、CD101中間TIL、及びCD101陽性TIL、

vi）それぞれ、LAG3陰性TIL、LAG3低TIL、LAG3中間TIL、及びLAG3陽性TIL、

vii）それぞれ、TIM3陰性TIL、TIM3低TIL、TIM3中間TIL、及びTIM3陽性TIL、及び／または

viii）それぞれ、TIGIT陰性TIL、TIGIT低TIL、TIGIT中間TIL、及びTIGIT陽性TILに対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するためのFACSゲートを設定する。

【0219】

いくつかの実施形態では、FACSゲートは、ステップ（a）の後に設定される。

【0220】

いくつかの実施形態では、PD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILが、PD-1高、LAG3高、TIM3高、及び／またはTIGIT高TILである。

【0221】

いくつかの実施形態では、PD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団の少なくとも80%が、PD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILである。

【0222】

いくつかの実施形態では、第3のTIL集団は、容器内に少なくとも約 1×10^8 のTILを含む。

【0223】

いくつかの実施形態では、第3のTIL集団は、容器内に少なくとも約 1×10^9 のTILを含む。

【0224】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖におけるPD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTILの数が、約 1×10^4 ～約 1×10^6 である。

【0225】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖におけるPD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTILの数が、約 5×10^4 ～約 1×10^6 である。

【0226】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖におけるPD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTILの数が、約 2×10^5 ～約 1×10^6 である。

【0227】

いくつかの実施形態では、この方法は、ステップ(a)を行う前に、対象から切除された腫瘍からの第1のTIL集団を凍結保存するステップをさらに含む。

【0228】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用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、及び／または受容することと、

(b) (a)の第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することと、

(c) 第1の細胞培養培地、IL-2、及び

i) 抗原提示フィーダー細胞(APC)の第1の培養物から取得された第1の培養上清であって、第1の培養上清が、OKT-3を含む、第1の培養上清、または

ii) APC及びOKT-3のいずれかを含む第1のTIL細胞培養物中で第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の増殖を行うことであって、

プライミングによる第1の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日の第1の期間、第1のガス透過性表面積を含む第1の容器内で第1のTIL細胞培養物を培養することによって行われ、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、プライミングによる第1の増殖を行うことと、

(d) 第2の細胞培養培地、IL-2、及び

i) APCの第2の培養物から取得された第2の培養上清であって、第2の培養上清が、OKT-3を含む、第2の培養上清、または

ii) APC及びOKT-3のいずれかを補充した第2のガス透過性表面積を含む第2の容器に第1のTIL細胞培養物を移すことによって、急速な第2の増殖を行って、

第2のTIL細胞培養物を形成することであって、急速な第2の増殖が、約1～11日の第2の期間第2のTIL細胞培養物を培養することによって行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、第1のTIL細胞培養物が、第1の培養上清及びAPCの両方を含まず、第2のTIL細胞培養物が、第2の培養上清及び補充APCの両方を含まない、形成することと、

(e) ステップ(d)から取得された治療用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。

【0229】

いくつかの実施形態では、ステップ(c)のプライミングによる第1の増殖において、第1のTIL細胞培養物が、第1の培養上清を含み、ステップ(d)の急速な第2の増殖において、第1のTIL細胞培養物にOKT-3及びAPCを補充して、第2のTIL細胞培養物を形成する。

【0230】

いくつかの実施形態では、ステップ(c)のプライミングによる第1の増殖において、

第 1 の T I L 細胞培養物が、O K T - 3 及び A P C を含み、ステップ (d) の急速な第 2 の増殖において、第 1 の T I L 細胞培養物に第 2 の培養上清を補充して、第 2 の T I L 細胞培養物を形成する。

【 0 2 3 1 】

いくつかの実施形態では、ステップ (c) のプライミングによる第 1 の増殖において、第 1 の T I L 細胞培養物が、第 1 の培養上清を含み、ステップ (d) の急速な第 2 の増殖において、第 1 の T I L 細胞培養物に第 2 の培養上清を補充して、第 2 の T I L 細胞培養物を形成する。

【 0 2 3 2 】

いくつかの実施形態では、ステップ (c) で使用するための第 1 の培養上清を取得することが、

10

1) I L - 2 及び O K T - 3 を含む A P C 細胞培養培地を提供することと、

2) 1) からの A P C 細胞培養培地中で少なくとも約 5×10^8 A P C を約 3 ~ 4 日間培養して、第 1 の培養上清を生成することと、

3) 2) の細胞培養から第 1 の培養上清を収集することと、を含む。

【 0 2 3 3 】

いくつかの実施形態では、ステップ (d) で使用するための第 2 の培養上清を取得することが、

1) I L - 2 及び O K T - 3 を含む A P C 細胞培養培地を提供することと、

2) 1) からの A P C 細胞培養培地中で少なくとも約 1×10^7 A P C を約 3 ~ 4 日間培養して、第 2 の培養上清を生成することと、

20

3) 2) の細胞培養から第 2 の培養上清を収集することと、を含む。

【 0 2 3 4 】

いくつかの実施形態では、ステップ (d) の急速な第 2 の増殖が、

i) ステップ (d) における第 2 の期間の開始から約 3 または 4 日後に、第 2 の T I L 細胞培養物に追加の I L - 2 を補充するステップをさらに含む。

【 0 2 3 5 】

いくつかの実施形態では、A P C が、対象に対して外因性である。

【 0 2 3 6 】

いくつかの実施形態では、A P C は、末梢血単核細胞 (P B M C) である。

30

【 0 2 3 7 】

いくつかの実施形態では、ステップ (d) の急速な第 2 の増殖が、

i) 第 2 の期間の開始時、または約 3 もしくは 4 日後に、第 2 の T I L 細胞培養物を第 2 の容器から複数の第 3 の容器に移して、複数の第 3 の容器の各々において第 2 の T I L 細胞培養物の継代培養物を形成するステップと、

i i) 第 2 の期間の残りの間、複数の第 3 の容器の各々において第 2 の T I L 細胞培養物の継代培養物を培養するステップと、を含む。

【 0 2 3 8 】

いくつかの実施形態では、ステップ i) において、等量の第 2 の T I L 細胞培養物が、複数の第 3 の容器に移される。

40

【 0 2 3 9 】

いくつかの実施形態では、第 3 の容器の各々が、第 2 の容器とサイズが等しい。

【 0 2 4 0 】

いくつかの実施形態では、第 3 の容器の各々が、第 2 の容器よりも大きい。

【 0 2 4 1 】

いくつかの実施形態では、第 3 の容器は、サイズが等しい。

【 0 2 4 2 】

いくつかの実施形態では、第 3 の容器が、第 2 の容器よりも大きい。

【 0 2 4 3 】

いくつかの実施形態では、第 3 の容器が、第 2 の容器よりも小さい。

50

【0244】

いくつかの実施形態では、第2の容器が、G-Rex 100Mフラスコである。

【0245】

いくつかの実施形態では、第2の容器が、G-Rex 100Mフラスコであり、複数の第3の容器の各々が、G-Rex 100Mフラスコである。

【0246】

いくつかの実施形態では、複数の第3の容器が、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、及び20個の第2の容器からなる群から選択される。

【0247】

いくつかの実施形態では、複数の第2の容器が、2個の第3の容器である。

【0248】

いくつかの実施形態では、ステップii)の前に、方法が、第2のTIL細胞培養物の各継代培養物に追加のIL-2を補充することをさらに含む。

【0249】

いくつかの実施形態では、ステップii)の前に、方法が、第2のTIL細胞培養物の各継代培養物に第2の細胞培養培地及びIL-2を補充することをさらに含む。

【0250】

いくつかの実施形態では、第1の細胞培養培地及び第2の細胞培養培地が、同じである。

【0251】

いくつかの実施形態では、第1の細胞培養培地及び第2の細胞培養培地が、異なる。

【0252】

いくつかの実施形態では、第1の細胞培養培地がDM1であり、第2の細胞培養培地がDM2である。

【0253】

いくつかの実施形態では、TILが、PD-1陽性(PD-1+)、LAG3陽性(LAG3+陽性)、CD38陽性(CD38+)、及びCD101陽性(CD101+)として選択される。

【0254】

いくつかの実施形態では、TILが、PD-1高、LAG3高、CD38低、及びCD101低として選択される。

【0255】

いくつかの実施形態では、TILが、PD-1陽性(PD-1+)、LAG3陽性(LAG3+陽性)、及びCD38陽性(CD38+)として選択される。

【0256】

いくつかの実施形態では、TILが、PD-1高、LAG3高、及びCD38低として選択される。

【0257】

いくつかの実施形態では、TILが、PD-1陽性(PD-1+)、LAG3陽性(LAG3+陽性)、及びCD101陽性(CD101+)として選択される。

【0258】

いくつかの実施形態では、TILが、PD-1高、LAG-3高、及びCD101低として選択される。

【0259】

いくつかの実施形態では、TILが、PD-1陽性(PD-1+)、及びCD38陽性(CD38+)として選択される。

【0260】

いくつかの実施形態では、TILが、PD-1高、及びCD38低として選択される。

【0261】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、T I L が、P D - 1 陽性 (P D - 1 +)、及び C D 1 0 1 陽性 (C D 1 0 1 +) として選択される。

【 0 2 6 2 】

いくつかの実施形態では、T I L が、P D - 1 高、及び C D 1 0 1 低として選択される。

【 0 2 6 3 】

いくつかの実施形態では、選択が、フローサイトメトリー（例えば、F A C S を含む）、抗体系ビーズ選択、及び抗体系磁気ビーズ選択からなる群から選択される選択方法を含む。

【 0 2 6 4 】

いくつかの実施形態では、選択方法は、フローサイトメトリー（例えば、F A C S ）を含む。

【 0 2 6 5 】

いくつかの実施形態では、選択方法は、抗体系ビーズ選択を含む。

【 0 2 6 6 】

いくつかの実施形態では、選択は、抗体系磁気ビーズ選択を含む。

【 0 2 6 7 】

いくつかの実施形態では、選択が、2 ステップ選択を含み、

i) P D - 1 +、L A G 3 +、T I M 3 +、及び／または T I G I T + を選択する方法を含む第 1 の選択ステップと、

i i) C D 3 8 + 及び／または C D 1 0 1 + を選択する方法を含む第 2 の選択ステップと、を含む。

【 0 2 6 8 】

いくつかの実施形態では、第 1 の選択ステップが、P D - 1 高、L A G 3 高、T I M 3 高、及び／または T I G I T 高を選択する方法を含む。

【 0 2 6 9 】

いくつかの実施形態では、第 1 の選択ステップが、P D - 1 高または L A G 3 高を選択する方法を含む。

【 0 2 7 0 】

いくつかの実施形態では、第 2 の選択ステップが、C D 3 8 低及び／または C D 1 0 1 低を選択する方法を含む。

【 0 2 7 1 】

いくつかの実施形態では、第 1 の選択ステップが、フローサイトメトリー（例えば、F A C S を含む）を含み、第 2 の選択ステップが、フローサイトメトリー（例えば、F A C S を含む）を含む。

【 0 2 7 2 】

いくつかの実施形態では、第 1 の選択ステップが、抗体系ビーズ選択を含み、第 2 の選択ステップが、フローサイトメトリー（例えば、F A C S を含む）を含む。

【 0 2 7 3 】

いくつかの実施形態では、第 1 の選択ステップが、抗体系磁気ビーズ選択を含み、第 2 の選択ステップが、フローサイトメトリー（例えば、F A C S を含む）を含む。

【 0 2 7 4 】

いくつかの実施形態では、第 1 の選択ステップが、抗体系ビーズ選択または抗体系磁気ビーズ選択を含み、第 2 の選択ステップが、抗体系ビーズ選択または抗体系磁気ビーズ選択を含む。

【 0 2 7 5 】

いくつかの実施形態では、P D - 1 +、L A G 3 +、T I M 3 +、及び／または T I G I T + T I L の抗体系ビーズ選択に使用されるビーズが、それぞれ、抗 P D - 1、抗 L A G 3、抗 T I M 3 及び／または抗 T I G I T 抗体複合ビーズである。

【 0 2 7 6 】

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態では、CD38+またはCD101+TILの抗体系ビーズ選択に使用されるビーズが、それぞれ、抗CD38または抗CD101抗体複合ビーズである。

【0277】

いくつかの実施形態では、PD-1+、LAG3+、TIM3+、及び／またはTIGIT+TILの抗体系磁気ビーズ選択に使用されるビーズが、それぞれ、抗PD-1、抗LAG3、抗TIM3及び／または抗TIGIT抗体複合磁気ビーズである。

【0278】

いくつかの実施形態では、CD38+またはCD101+TILの抗体系磁気ビーズ選択に使用されるビーズが、それぞれ、抗CD38または抗CD101抗体複合磁気ビーズである。

【0279】

いくつかの実施形態では、PD-1+、LAG3+、TIM3+、及びTIGIT+TILが、それぞれ、抗PD-1、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGIT抗体複合ビーズと結合し、PD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陰性TILが、それぞれ、抗PD-1、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGIT抗体複合ビーズと結合しない。

【0280】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖ステップが、患者または対象から取得された腫瘍試料の消化物から選択または濃縮される第1のTIL集団に対して行われる。

【0281】

いくつかの実施形態では、消化物が、酵素の混合物を用いて行われる。

【0282】

いくつかの実施形態では、酵素の混合物が、中性プロテアーゼ、コラゲナーゼ、及びDNaseを含む。

【図面の簡単な説明】

【0283】

【図1A】2Aプロセス（およそ22日プロセス）と、TIL製造のためのPD-1 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1B】ステップA～F（およそ14日間～22日間のプロセス）の概要を提供する例示的なプロセスPD-1 Gen3のチャート。

【図1C】ステップA～F（およそ14日間～22日間のプロセス）の概要を提供する例示的なプロセスPD-1 Gen3の図。

【図1D】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～18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1E】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～18日プロセス）の概要とともに3つの例示的なPD-1 Gen3プロセスを提供するチャート。

【図1F】ステップA～F（およそ14日～18日プロセス）の概要とともに例示的なPD-1 Gen3プロセスを提供するチャート。

【図1G】ステップA～F（およそ14日～18日プロセス）の概要とともに例示的なPD-1 Gen3プロセスを提供するチャート。

【図1H】ステップA～F（およそ14日～18日プロセス）の概要とともに例示的なPD-1 Gen3プロセスを提供するチャート。

【図2】GEN2（プロセス2A）とPD-1 GEN3との間の比較可能性についての実験フローチャートを提供する。

【図3】様々なGen2（2Aプロセス）とGen3.1プロセス実施形態との比較を示す。

【図4】Gen2、Gen2.1、及びGen3.0プロセスの実施形態の様々な特徴を

10

20

30

40

50

説明する表。

【図5】Gen3.1と称されるGen3プロセスの実施形態の培地条件の概要。

【図6】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7】増殖前のPD-1選択の概略図。

【図8】ニボルマブのPD-1との結合構造。Tan, S. et al. (Tan, S. et al., Nature Communications, 8:14369 | DOI:10.1038/ncomms14369 (2017))からの図5を参照されたい。

【図9】ペンブロリズマブのPD-1との結合構造。Tan, S. et al. (Tan, S. et al., Nature Communications, 8:14369 | DOI:10.1038/ncomms14369 (2017))からの図5を参照されたい。

【図10】合理化されたプロトコルを開発して、PD1+TILを臨床的に適切なレベルに拡張させた。腫瘍を患者から切除し、研究所に移送する。到着時に、腫瘍を消化させ、単細胞懸濁液を、CD3及びPD1に染色する。PD1+TILを、FX500機器（Sony）を使用してFACSにより選別する。PD1+細胞画分を、抗ヒトCD3抗体（OKT3、30ng/ml）を含むフラスコ内に入れ、同種異系PBMC（フィーダー）を1:100（TIL:フィーダー）の比率で照射し、22日間急速に拡張させる（REP）。

【図11】腫瘍組織消化方法の特定。

【図12】腫瘍消化、及びPD-1高選択を含むPD-1+選択のステップの例示的な実施形態の概略図。

【図13】PD1で選択されたTIL用に開発された、修飾されたGen2プロセスの例示的な実施形態の概略図。

【図14】PD1で選択されたTIL用に開発された、修飾された増殖プロセスの例示的な実施形態の概略図。

【図15】PD1で選択されたTIL用に開発された、修飾された増殖プロセスの例示的な実施形態の概略図。

【図16】PD1 TIL培養のフルスケールプロセス実施形態の概略図。

【図17】小規模プロセスの実施形態：PD1-Aは、このプロトコルに概説されるニボルマブ染色手順を使用する条件である。PD1-Bは、抗PD1-PE（クローン番号EH12.2H7）染色法を使用する条件である。バルク条件は、対照として機能する。

【図18】PD-1+高Gen-2プロセスの実施形態の概要。

【図19】PD-1+TIL培養のプロセスの例示的な実施形態（研究/PD-1+Gen2/合成培地/初期REP）

【図20】構造I-A及びI-Bを提供し、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、4-1BBLまたは4-1BBに結合する抗体から誘導される3つの線形に結合したTNFRSF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と一緒にして、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。

【図21】多数のがん種におけるPD-1高TILの同定及びPD-1選択TILの増殖。

【図22】自己腫瘍反応性を示したエキスピボで拡張されたPD-1選択TIL。

【図23】いくつかのインビトロアッセイでエフェクター活性を示したエキスピボで拡張されたPD1+TIL。データは、PD1+で選択されたTILが抗原特異的であり、よ

10

20

30

40

50

り大きなエフェクター機能を有することを示す。

【図 2 4】例示的な選択及び増殖プロトコルの場合の概略図。

【図 2 5】CD 3 9 + 陽性細胞の表現型特性を示すデータ。

【図 2 5】CD 3 9 + 陽性細胞の特性を示すデータ。

【図 2 6】PD - 1 選択 T I L の腫瘍消化物における表現型評価の結果を示すデータ。

【図 2 7】PD - 1 選択 T I L の腫瘍消化物における表現型評価の結果を示すデータ。

【図 2 8】PD 1 + 選択 Gen - 2 プロセスの概要。

【図 2 9】フェーズ - 1 実験概要。

【図 3 0】フェーズ - 2 フルスケール PD 1 + 選択 Gen - 2 プロセスの実験概要。

【図 3 1】実施例 7 の細胞集団ゲーティングを示すデータ。

【図 3 2】実施例 7 の細胞集団ゲーティングを示すデータ。

【図 3 3】2 つの例示的な PD - 1 選択方法の模式図。

【図 3 4】抗 PD - 1 マイクロビーズ複合及び検出。

【図 3 5】抗 PD - 1 (E H 1 2 . 2 H 7) を使用した PD - 1 + T I L の磁気選択の際に、> 8 5 % 純度を示すデータを得た。2 e 6 R E P T I L を 1 0 μ l のカクテル (E H 1 2 . 2 H 7) + 5 μ l のマイクロビーズに追加し、R T で 1 5 分間インキュベートし、R T で 1 分間磁気中でインキュベートし、磁気を 2 回使用して陽性選択した。選別後の細胞は、二次 m I g G 1 - P E、a C D 3 F I T C で染色した。

【図 3 6】抗 PD - 1 (M 1 H 4) を使用した PD - 1 + T I L の磁気選択の際に、> 8 5 % 純度を示すデータを得た。

【図 3 7】実験設計。2 つの例示的な選択実施形態の比較：流動選別対磁気選別。

【図 3 8】磁気法 (E H 1 2 . 2 H 7) を使用した選別後 T V C 収量は、流動選別法よりも高かった。

【図 3 9】PD - 1 選択 T I L の成長特性、同一性、磁気選択 T I L の機能は、流動選別 T I L と同等であった。

【図 4 0】分化、活性化、枯渇 (C D 4 +) 表現型マーカーは同等であった。

【図 4 1】分化、活性化、及び枯渇 (C D 8 +) 表現型マーカーは同等であった。

【図 4 2】流動選別 PD - 1 選択 T I L の > 9 9 % の T C R V b e t a クローンが、磁気選別 (E H 1 2 . H 7) 中に存在した。データは、すべての試験試料の固有の C D R 3 数及びシャノン多様性指数 (S h a n n o n D i v e r s i t y i n d e x) を示す。

【図 4 3】流動選別 PD - 1 選択 T I L の > 9 9 % の T C R V b e t a クローンが、磁気選別 (E H 1 2 . H 7) 中に存在した。データは、試験試料間の重複する u C D R 3 試料を示す。

【図 4 4】CD 3 9 での事前選択。PD 1 高 CD 3 9 - は、大部分が CD 4 + 細胞で構成されていた。PD 1 高 CD 3 9 + は、非選択 T I L と比較して、有意に低減した CD 6 9 のレベルを有した。PD - 1 高 CD 3 9 + は、抗 CD 3 / 抗 CD 2 8 / 抗 4 1 B B で刺激した場合、非選択及び PD - 1 高 CD 3 9 - T I L の両方と比較して、有意に低減した I F N γ 分泌を有した。自己腫瘍に応答した I F N γ 分泌は、6 つの評価可能な腫瘍のうちの 4 つにおいて、PD - 1 高 CD 3 9 + T I L において検出された (2 つの腫瘍は評価されなかった)。

【0 2 8 4】

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。

【0 2 8 5】

配列番号 2 は、ムロモナブの軽鎖のアミノ酸配列である。

【0 2 8 6】

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。

【0 2 8 7】

配列番号 4 は、アルデスロイキンのアミノ酸配列である。

【0 2 8 8】

10

20

30

40

50

配列番号 5 は、組換えヒト I L - 4 タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 2 8 9 】

配列番号 6 は、組換えヒト I L - 7 タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 2 9 0 】

配列番号 7 は、組換えヒト I L - 1 5 タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 2 9 1 】

配列番号 8 は、組換えヒト I L - 2 1 タンパク質のアミノ酸配列である。

【 0 2 9 2 】

配列番号 9 は、ヒト 4 - 1 B B のアミノ酸配列である。

【 0 2 9 3 】

配列番号 1 0 は、マウス 4 - 1 B B のアミノ酸配列である。

【 0 2 9 4 】

配列番号 1 1 は、4 - 1 B B 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。

【 0 2 9 5 】

配列番号 1 2 は、4 - 1 B B 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。

【 0 2 9 6 】

配列番号 1 3 は、4 - 1 B B 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。

【 0 2 9 7 】

配列番号 1 4 は、4 - 1 B B 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。

【 0 2 9 8 】

配列番号 1 5 は、4 - 1 B B 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 C D R 1 である。

【 0 2 9 9 】

配列番号 1 6 は、4 - 1 B B 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 C D R 2 である。

【 0 3 0 0 】

配列番号 1 7 は、4 - 1 B B 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 C D R 3 である。

【 0 3 0 1 】

配列番号 1 8 は、4 - 1 B B 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 C D R 1 である。

【 0 3 0 2 】

配列番号 1 9 は、4 - 1 B B 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 C D R 2 である。

【 0 3 0 3 】

配列番号 2 0 は、4 - 1 B B 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 C D R 3 である。

【 0 3 0 4 】

配列番号 2 1 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（B M S - 6 6 3 5 1 3）の重鎖である。

【 0 3 0 5 】

配列番号 2 2 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（B M S - 6 6 3 5 1 3）の軽鎖である。

【 0 3 0 6 】

配列番号 2 3 は、4 - 1 B B アゴニストモノクローナル抗体ウレルマブ（B M S - 6 6 3 5 1 3）の重鎖可変領域（V H）である。

10

20

30

40

50

【0307】

配列番号24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。

【0308】

配列番号25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。

【0309】

配列番号26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。

【0310】

配列番号27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。

【0311】

配列番号28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。

【0312】

配列番号29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。

【0313】

配列番号30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。

【0314】

配列番号31は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のFcドメインである。

【0315】

配列番号32は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0316】

配列番号33は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0317】

配列番号34は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0318】

配列番号35は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0319】

配列番号36は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0320】

配列番号37は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0321】

配列番号38は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0322】

配列番号39は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0323】

配列番号40は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0324】

配列番号41は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0325】

配列番号42は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のFcドメインである。

【0326】

配列番号43は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0327】

配列番号44は、TNFRSFアゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0328】

10

20

30

40

50

配列番号 45 は、TNFRSF アゴニスト融合タンパク質のリンカーである。

【0329】

配列番号 46 は、4-1BB リガンド (4-1BBL) アミノ酸配列である。

【0330】

配列番号 47 は、4-1BBL ポリペプチドの可溶性部分である。

【0331】

配列番号 48 は、4-1BB アゴニスト抗体 4B4-1-1 バージョン 1 の重鎖可変領域 (VH) である。

【0332】

配列番号 49 は、4-1BB アゴニスト抗体 4B4-1-1 バージョン 1 の軽鎖可変領域 (VL) である。

【0333】

配列番号 50 は、4-1BB アゴニスト抗体 4B4-1-1 バージョン 2 の重鎖可変領域 (VH) である。

【0334】

配列番号 51 は、4-1BB アゴニスト抗体 4B4-1-1 バージョン 2 の軽鎖可変領域 (VL) である。

【0335】

配列番号 52 は、4-1BB アゴニスト抗体 H39E3-2 の重鎖可変領域 (VH) である。

【0336】

配列番号 53 は、4-1BB アゴニスト抗体 H39E3-2 の軽鎖可変領域 (VL) である。

【0337】

配列番号 54 は、ヒト OX40 のアミノ酸配列である。

【0338】

配列番号 55 は、マウス OX40 のアミノ酸配列である。

【0339】

配列番号 56 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MED I-0562) の重鎖である。

【0340】

配列番号 57 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MED I-0562) の軽鎖である。

【0341】

配列番号 58 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MED I-0562) の重鎖可変領域 (VH) である。

【0342】

配列番号 59 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MED I-0562) の軽鎖可変領域 (VL) である。

【0343】

配列番号 60 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MED I-0562) の重鎖 CDR1 である。

【0344】

配列番号 61 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MED I-0562) の重鎖 CDR2 である。

【0345】

配列番号 62 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MED I-0562) の重鎖 CDR3 である。

【0346】

配列番号 63 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 タボリキシズマブ (MED I

10

20

30

40

50

－ 0 5 6 2) の軽鎖 C D R 1 である。

【 0 3 4 7 】

配列番号 6 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 2 である。

【 0 3 4 8 】

配列番号 6 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 3 である。

【 0 3 4 9 】

配列番号 6 6 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の重鎖である。

【 0 3 5 0 】

配列番号 6 7 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖である。

【 0 3 5 1 】

配列番号 6 8 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の重鎖可変領域 (V
H) である。

【 0 3 5 2 】

配列番号 6 9 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖可変領域 (V
L) である。

【 0 3 5 3 】

配列番号 7 0 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の重鎖 C D R 1 であ
る。

【 0 3 5 4 】

配列番号 7 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 2 であ
る。

【 0 3 5 5 】

配列番号 7 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 3 であ
る。

【 0 3 5 6 】

配列番号 7 3 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 1 D 4 の軽鎖 C D R 1 であ
る。

【 0 3 5 7 】

配列番号 7 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 2 であ
る。

【 0 3 5 8 】

配列番号 7 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 3 であ
る。

【 0 3 5 9 】

配列番号 7 6 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖である。

【 0 3 6 0 】

配列番号 7 7 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖である。

【 0 3 6 1 】

配列番号 7 8 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖可変領域 (V
H) である。

【 0 3 6 2 】

配列番号 7 9 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の軽鎖可変領域 (V
L) である。

【 0 3 6 3 】

配列番号 8 0 は、O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 1 8 D 8 の重鎖 C D R 1 であ
る。

【 0 3 6 4 】

配列番号 8 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 2 であ

10

20

30

40

50

る。

【0365】

配列番号82は、OX40アゴニストモノクローナル抗体18D8の重鎖CDR3である。

【0366】

配列番号83は、OX40アゴニストモノクローナル抗体18D8の軽鎖CDR1である。

【0367】

配列番号84は、OX40アゴニストモノクローナル抗体18D8の軽鎖CDR2である。

【0368】

配列番号85は、OX40アゴニストモノクローナル抗体18D8の軽鎖CDR3である。

【0369】

配列番号86は、OX40アゴニストモノクローナル抗体Hu119-122の重鎖可変領域(VH)である。

【0370】

配列番号87は、OX40アゴニストモノクローナル抗体Hu119-122の軽鎖可変領域(VL)である。

【0371】

配列番号88は、OX40アゴニストモノクローナル抗体Hu119-122の重鎖CDR1である。

【0372】

配列番号89は、OX40アゴニストモノクローナル抗体Hu119-122の重鎖CDR2である。

【0373】

配列番号90は、OX40アゴニストモノクローナル抗体Hu119-122の重鎖CDR3である。

【0374】

配列番号91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。

【0375】

配列番号92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。

【0376】

配列番号93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。

【0377】

配列番号94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(VH)である。

【0378】

配列番号95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(VL)である。

【0379】

配列番号96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。

【0380】

配列番号97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。

【0381】

10

20

30

40

50

配列番号 98 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。

【0382】

配列番号 99 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。

【0383】

配列番号 100 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。

【0384】

配列番号 101 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。 10

【0385】

配列番号 102 は、OX40 リガンド (OX40L) アミノ酸配列である。

【0386】

配列番号 103 は、OX40L ポリペプチドの可溶性部分である。

【0387】

配列番号 104 は、OX40L ポリペプチドの代替可溶性部分である。

【0388】

配列番号 105 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 008 の重鎖可変領域 (VH) である。 20

【0389】

配列番号 106 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 008 の軽鎖可変領域 (VL) である。

【0390】

配列番号 107 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 011 の重鎖可変領域 (VH) である。

【0391】

配列番号 108 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 011 の軽鎖可変領域 (VL) である。

【0392】

配列番号 109 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 021 の重鎖可変領域 (VH) である。 30

【0393】

配列番号 110 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 021 の軽鎖可変領域 (VL) である。

【0394】

配列番号 111 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 023 の重鎖可変領域 (VH) である。

【0395】

配列番号 112 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体 023 の軽鎖可変領域 (VL) である。 40

【0396】

配列番号 113 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域 (VH) である。

【0397】

配列番号 114 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体の軽鎖可変領域 (VL) である。

【0398】

配列番号 115 は、OX40 アゴニストモノクローナル抗体の重鎖可変領域 (VH) である。 50

【 0 3 9 9 】

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の軽鎖可変領域（V L）である。

【 0 4 0 0 】

配列番号 1 1 7 は、ヒト化 O X 4 0 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。

【 0 4 0 1 】

配列番号 1 1 8 は、ヒト化 O X 4 0 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。

【 0 4 0 2 】

配列番号 1 1 9 は、ヒト化 O X 4 0 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。

【 0 4 0 3 】

配列番号 1 2 0 は、ヒト化 O X 4 0 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。

【 0 4 0 4 】

配列番号 1 2 1 は、ヒト化 O X 4 0 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。

【 0 4 0 5 】

配列番号 1 2 2 は、ヒト化 O X 4 0 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。

【 0 4 0 6 】

配列番号 1 2 3 は、ヒト化 O X 4 0 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。

【 0 4 0 7 】

配列番号 1 2 4 は、ヒト化 O X 4 0 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。

【 0 4 0 8 】

配列番号 1 2 5 は、O X 4 0 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。

【 0 4 0 9 】

配列番号 1 2 6 は、O X 4 0 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。

【 0 4 1 0 】

配列番号 1 2 7 ～ 4 6 2 は、現在割り当てられていない。

【 0 4 1 1 】

配列番号 4 6 3 は、P D - 1 阻害剤ニボルマブの重鎖アミノ酸配列である。

【 0 4 1 2 】

配列番号 4 6 4 は、P D - 1 阻害剤ニボルマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【 0 4 1 3 】

配列番号 4 6 5 は、P D - 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。

【 0 4 1 4 】

配列番号 4 6 6 は、P D - 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。

【 0 4 1 5 】

配列番号 4 6 7 は、P D - 1 阻害剤ニボルマブの重鎖 C D R 1 アミノ酸配列である。

【 0 4 1 6 】

配列番号 4 6 8 は、P D - 1 阻害剤ニボルマブの重鎖 C D R 2 アミノ酸配列である。

【 0 4 1 7 】

10

20

30

40

50

配列番号 469 は、PD-1 阻害剤ニボルマブの重鎖 CDR3 アミノ酸配列である。

【0418】

配列番号 470 は、PD-1 阻害剤ニボルマブの軽鎖 CDR1 アミノ酸配列である。

【0419】

配列番号 471 は、PD-1 阻害剤ニボルマブの軽鎖 CDR2 アミノ酸配列である。

【0420】

配列番号 472 は、PD-1 阻害剤ニボルマブの軽鎖 CDR3 アミノ酸配列である。

【0421】

配列番号 473 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。

【0422】

配列番号 474 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。

【0423】

配列番号 475 は、PD-1 阻害剤ペムブロリズマブの重鎖可変領域 (VH) アミノ酸配列である。

【0424】

配列番号 476 は、PD-1 阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖可変領域 (VL) アミノ酸配列である。

【0425】

配列番号 477 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。

【0426】

配列番号 478 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。

【0427】

配列番号 479 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。

【0428】

配列番号 480 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。

【0429】

配列番号 481 は、PD-1 阻害剤ペムブロリズマブの軽鎖 CDR2 アミノ酸配列である。

【0430】

配列番号 482 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。

【0431】

配列番号 483 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。

【0432】

配列番号 484 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。

【0433】

配列番号 485 は、PD-L1 阻害剤デュルバルマブの重鎖可変領域 (VH) アミノ酸配列である。

【0434】

配列番号 486 は、PD-L1 阻害剤デュルバルマブの軽鎖可変領域 (VL) アミノ酸配列である。

【0435】

配列番号 487 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。

【0436】

配列番号 488 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

10

20

30

40

50

る。

【 0 4 3 7 】

配列番号 4 8 9 は、P D - L 1 阻害剤デュルバルマブの重鎖 C D R 3 アミノ酸配列である。

【 0 4 3 8 】

配列番号 4 9 0 は、P D - L 1 阻害剤デュルバルマブの軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列である。

【 0 4 3 9 】

配列番号 4 9 1 は、P D - L 1 阻害剤デュルバルマブの軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列である。

10

【 0 4 4 0 】

配列番号 4 9 2 は、P D - L 1 阻害剤デュルバルマブの軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列である。

【 0 4 4 1 】

配列番号 4 9 3 は、P D - L 1 阻害剤アベルマブの重鎖 アミノ酸配列である。

【 0 4 4 2 】

配列番号 4 9 4 は、P D - L 1 阻害剤アベルマブの軽鎖 アミノ酸配列である。

【 0 4 4 3 】

配列番号 4 9 5 は、P D - L 1 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。

20

【 0 4 4 4 】

配列番号 4 9 6 は、P D - L 1 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。

【 0 4 4 5 】

配列番号 4 9 7 は、P D - L 1 阻害剤アベルマブの重鎖 C D R 1 アミノ酸配列である。

【 0 4 4 6 】

配列番号 4 9 8 は、P D - L 1 阻害剤アベルマブの重鎖 C D R 2 アミノ酸配列である。

【 0 4 4 7 】

配列番号 4 9 9 は、P D - L 1 阻害剤アベルマブの重鎖 C D R 3 アミノ酸配列である。

【 0 4 4 8 】

配列番号 5 0 0 は、P D - L 1 阻害剤アベルマブの軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列である。

30

【 0 4 4 9 】

配列番号 5 0 1 は、P D - L 1 阻害剤アベルマブの軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列である。

【 0 4 5 0 】

配列番号 5 0 2 は、P D - L 1 阻害剤アベルマブの軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列である。

【 0 4 5 1 】

配列番号 5 0 3 は、P D - L 1 阻害剤アテゾリズマブの重鎖 アミノ酸配列である。

【 0 4 5 2 】

配列番号 5 0 4 は、P D - L 1 阻害剤アテゾリズマブの軽鎖 アミノ酸配列である。

【 0 4 5 3 】

配列番号 5 0 5 は、P D - L 1 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。

40

【 0 4 5 4 】

配列番号 5 0 6 は、P D - L 1 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。

【 0 4 5 5 】

配列番号 5 0 7 は、P D - L 1 阻害剤アテゾリズマブの重鎖 C D R 1 アミノ酸配列である。

【 0 4 5 6 】

配列番号 5 0 8 は、P D - L 1 阻害剤アテゾリズマブの重鎖 C D R 2 アミノ酸配列であ

50

る。

【 0 4 5 7 】

配列番号 5 0 9 は、P D - L 1 阻害剤アテゾリズマブの重鎖 C D R 3 アミノ酸配列である。

【 0 4 5 8 】

配列番号 5 1 0 は、P D - L 1 阻害剤アテゾリズマブの軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列である。

【 0 4 5 9 】

配列番号 5 1 1 は、P D - L 1 阻害剤アテゾリズマブの軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列である。

10

【 0 4 6 0 】

配列番号 5 1 2 は、P D - L 1 阻害剤アテゾリズマブの軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列である。

【 0 4 6 1 】

配列番号 5 1 3 は、C T L A - 4 阻害剤イピリムマブの重鎖アミノ酸配列である。

【 0 4 6 2 】

配列番号 5 1 4 は、C T L A - 4 阻害剤イピリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【 0 4 6 3 】

配列番号 5 1 5 は、C T L A - 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。

20

【 0 4 6 4 】

配列番号 5 1 6 は、C T L A - 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。

【 0 4 6 5 】

配列番号 5 1 7 は、C T L A - 4 阻害剤イピリムマブの重鎖 C D R 1 アミノ酸配列である。

【 0 4 6 6 】

配列番号 5 1 8 は、C T L A - 4 阻害剤イピリムマブの重鎖 C D R 2 アミノ酸配列である。

【 0 4 6 7 】

配列番号 5 1 9 は、C T L A - 4 阻害剤イピリムマブの重鎖 C D R 3 アミノ酸配列である。

30

【 0 4 6 8 】

配列番号 5 2 0 は、C T L A - 4 阻害剤イピリムマブの軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列である。

【 0 4 6 9 】

配列番号 5 2 1 は、C T L A - 4 阻害剤イピリムマブの軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列である。

【 0 4 7 0 】

配列番号 5 2 2 は、C T L A - 4 阻害剤イピリムマブの軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列である。

40

【 0 4 7 1 】

配列番号 5 2 3 は、C T L A - 4 阻害剤トレメリムマブの重鎖アミノ酸配列である。

【 0 4 7 2 】

配列番号 5 2 4 は、C T L A - 4 阻害剤トレメリムマブの軽鎖アミノ酸配列である。

【 0 4 7 3 】

配列番号 5 2 5 は、C T L 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。

【 0 4 7 4 】

配列番号 5 2 6 は、C T L A - 4 阻害剤トレメリムマブの軽鎖可変領域 (V L) アミノ

50

酸配列である。

【 0 4 7 5 】

配列番号 5 2 7 は、CTL A-4 阻害剤トレメリマブの重鎖 CDR 1 アミノ酸配列である。

【 0 4 7 6 】

配列番号 5 2 8 は、CTL A-4 阻害剤トレメリマブの重鎖 CDR 2 アミノ酸配列である。

【 0 4 7 7 】

配列番号 5 2 9 は、CTL A-4 阻害剤トレメリマブの重鎖 CDR 3 アミノ酸配列である。

【 0 4 7 8 】

配列番号 5 3 0 は、CTL A-4 阻害剤トレメリマブの軽鎖 CDR 1 アミノ酸配列である。

【 0 4 7 9 】

配列番号 5 3 1 は、CTL A-4 阻害剤トレメリマブの軽鎖 CDR 2 アミノ酸配列である。

【 0 4 8 0 】

配列番号 5 3 2 は、CTL A-4 阻害剤トレメリマブの軽鎖 CDR 3 アミノ酸配列である。

【 0 4 8 1 】

配列番号 5 3 3 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。

【 0 4 8 2 】

配列番号 5 3 4 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。

【 0 4 8 3 】

配列番号 5 3 5 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの重鎖可変領域 (VH) アミノ酸配列である。

【 0 4 8 4 】

配列番号 5 3 6 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの軽鎖可変領域 (VL) アミノ酸配列である。

【 0 4 8 5 】

配列番号 5 3 7 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの重鎖 CDR 1 アミノ酸配列である。

【 0 4 8 6 】

配列番号 5 3 8 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの重鎖 CDR 2 アミノ酸配列である。

【 0 4 8 7 】

配列番号 5 3 9 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの重鎖 CDR 3 アミノ酸配列である。

【 0 4 8 8 】

配列番号 5 4 0 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの軽鎖 CDR 1 アミノ酸配列である。

【 0 4 8 9 】

配列番号 5 4 1 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの軽鎖 CDR 2 アミノ酸配列である。

【 0 4 9 0 】

配列番号 5 4 2 は、CTL A-4 阻害剤ザリフレリマブの軽鎖 CDR 3 アミノ酸配列である。

【 0 4 9 1 】

配列番号 5 4 3 は、IL-2 配列である。

【 0 4 9 2 】

10

20

30

40

50

- 配列番号 5 4 4 は、I L - 2 ムテイン配列である。
- 【 0 4 9 3 】
- 配列番号 5 4 5 は、I L - 2 ムテイン配列である。
- 【 0 4 9 4 】
- 配列番号 5 4 6 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 1 __ I L - 2 である。
- 【 0 4 9 5 】
- 配列番号 5 4 7 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 2 である。
- 【 0 4 9 6 】
- 配列番号 5 4 8 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 3 である。
- 【 0 4 9 7 】 10
- 配列番号 5 4 9 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 1 __ I L - 2 カバットである。
- 【 0 4 9 8 】
- 配列番号 5 5 0 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 2 カバットである。
- 【 0 4 9 9 】
- 配列番号 5 5 1 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 3 カバットである。
- 【 0 5 0 0 】
- 配列番号 5 5 2 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 1 __ I L - 2 クロチアである。
- 【 0 5 0 1 】 20
- 配列番号 5 5 3 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 2 クロチアである。
- 【 0 5 0 2 】
- 配列番号 5 5 4 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 3 クロチアである。
- 【 0 5 0 3 】
- 配列番号 5 5 5 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の H C D R 1 __ I L - 2 I M G T である。
- 【 0 5 0 4 】
- 配列番号 5 5 6 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。
- 【 0 5 0 5 】
- 配列番号 5 5 7 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。
- 【 0 5 0 6 】 30
- 配列番号 5 5 8 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の V H 鎖である。
- 【 0 5 0 7 】
- 配列番号 5 5 9 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の重鎖である。
- 【 0 5 0 8 】
- 配列番号 5 6 0 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。
- 【 0 5 0 9 】
- 配列番号 5 6 1 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。
- 【 0 5 1 0 】
- 配列番号 5 6 2 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。
- 【 0 5 1 1 】 40
- 配列番号 5 6 3 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 1 クロチアである。
- 【 0 5 1 2 】
- 配列番号 5 6 4 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 2 クロチアである。
- 【 0 5 1 3 】
- 配列番号 5 6 5 は、I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1 の L C D R 3 クロチアである。
- 【 0 5 1 4 】
- 配列番号 5 6 6 は、V L 鎖である。
- 【 0 5 1 5 】
- 配列番号 5 6 7 は、軽鎖である。
- 50

【0516】

配列番号568は、軽鎖である。

【0517】

配列番号569は、軽鎖である。

【0518】

I. 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。

【0519】

「インビボ」という用語は、対象の体内で起こる事象を指す。

【0520】

「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、無傷の細胞が用いられない無細胞アッセイも含み得る。

【0521】

「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。

【0522】

「急速な増殖」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。いくつかの急速な増殖プロトコルが以下で概説されている。

【0523】

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（「新たに取得された」または「新たに単離された」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。

【0524】

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、数にして、概して $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^{10}$ 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増殖は、一般に、注入用 $1.5 \times 10^9 \sim 1.5 \times 10^{10}$ 細胞の集団を提供するために行われる。

【0525】

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。

【0526】

本明細書における「解凍された凍結保存 T I L」とは、以前に凍結保存され、その後、細胞培養温度または T I L 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、室温以上に昇るように処理された T I L の集団を意味する。

【0527】

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 $\alpha \beta$ 、C D 2 7、C D 2 8、C D 5 6、C C R 7、C D 4 5 R α 、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。

10

【0528】

「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 % ~ 1 0 % の D M S O を含む培地を含むことができる。例示的な培地には、CryoStor CS10、Hyperthermasol、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、D M S O を含む無血清の動物成分を含まない培地である。

20

【0529】

「セントラルメモリー T 細胞」という用語は、ヒトでは C D 4 5 R 0 + であり、C C R 7 (C C R 7 高) 及び C D 6 2 L (C D 6 2 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、T C R、C D 3、C D 1 2 7 (I L - 7 R)、及び I L - 1 5 R も含まれる。セントラルメモリー T 細胞の転写因子には、B C L - 6、B C L - 6 B、M B D 2、及び B M I 1 が含まれる。セントラルメモリー T 細胞は、T C R トリガー後、エフェクター分子として I L - 2 及び C D 4 0 L を主に分泌する。セントラルメモリー T 細胞は、血液中の C D 4 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。

【0530】

「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 C D 4 5 R 0 + であるが、C C R 7 の構成的発現を失い (C C R 7 低)、C D 6 2 L 発現が不均一であるかまたは低い (C D 6 2 L 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、T C R、C D 3、C D 1 2 7 (I L - 7 R)、及び I L - 1 5 R も含まれる。セントラルメモリー T 細胞の転写因子には、B L I M P 1 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、I L - 4、及び I L - 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 C D 8 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。C D 8 + 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。

30

40

【0531】

「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、T I L 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。

【0532】

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。

50

【0533】

「末梢血単核細胞」及び「P B M C」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（P B M C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。

【0534】

「末梢血リンパ球」及び「P B L」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、P B Lは、ドナーからの全血またはアフエレーシス産物から分離される。いくつかの実施形態では、P B Lは、C D 3 + C D 4 5 + 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レーシス産物から分離される。

【0535】

「抗C D 3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C D 3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C D 3抗体には、ムロモナブとしても知られるO K T - 3が含まれる。抗C D 3抗体には、T 3及びC D 3 εとしても知られるU H C T 1クローンも含まれる。他の抗C D 3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。

【0536】

「O K T - 3」（本明細書では「O K T 3」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C D 3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、O K T - 3（30 ng / mL、M A C S G M P C D 3 p u r e、M i l t e n y i B i o t e c h, I n c., S a n D i e g o, C A, U S A）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）。O K T - 3を産生することができるハイブリドーマは、A m e r i c a n T y p e C u l t u r e C o l l e c t i o nに寄託され、A T C C受託番号C R L 8 0 0 1が割り当てられている。O K T - 3を産生することができるハイブリドーマは、E u r o p e a n C o l l e c t i o n o f A u t h e n t i c a t e d C e l l C u l t u r e s（E C A C C）にも寄託され、カタログ番号8 6 0 2 2 7 0 6が割り当てられている。

【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	QVQLQSGAE LARFASGVN SCASGVTT RYTHNVRQR PQGLEWIGY INFSGVTNY 60
ムロモナブ重鎖	NKPFQKATL ITWSSSTAY MQLSLTSED SAVVYCARVY DSHVCLVWG QDTLTLYESA 120
	KTTAPSVYPL APVCGGTGS SVTLGCLVKG YFEFPTLTW NSGLSSGVH TFAVLQSDL 180
	YTLSSSVTVT SFTWPGSIT CHVAHPAST KYDKIEPRP KSCCKWTCP PCAPFELGG 240
	PFELFPFPR KTLMLRPT EYTCVGVVS HDPRVQPM YGQGEVNSA KTFPRSGVN 300
	STYKRVSLT VLHQDLNGK EYCKVSNKA LPAPIKTIS KAGQGFEPQ VYTLFPERDE 360
	LTKNQSLTC LVKGFPSDI AVENENGGP ENNYKTFPV LQSGGFELY SKLTVDKRW 420
	QQGVFSCSV MHEALNNHT QSLSLSPK 480
配列番号2	QIVLTQSFAL MSAPGERVT MTCASSSVS YHWYQKSG TSFERNIYDT SKLGGVPAH 60
ムロモナブ軽鎖	FRSGSGSTY SLTSGDAE DASTYQQW SNVYTFGSG TKLEINWAGT APTVSIFFPS 120
	SEQLTSGGAS VVCFANFYP KDINVKKID GSERQGVLM SWTQDSKDS TYGNSSTILT 180
	TYDEVERHNS YTEATHKTS TSPIVKFNR NEC 213

【0537】

「I L - 2」（本明細書では「I L 2」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、I L - 2のすべての形態を含む。I L - 2は、例えば、N e l s o n, J. I m m u n o l. 2 0 0 4, 1 7 2, 3 9 8 3 - 8 8及びM a l e k, A n n u. R e v. I m m u n o l. 2 0 0 8, 2 6, 4 5 3 - 7 9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I L - 2のアミノ酸配列を表2に示す（配列番号3）。例えば、I L - 2という用語は、アルデスロイキン（P R O L E U K I N、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I L -

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15 kDa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、当技術分野で公知の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に組み込まれる。

10

20

30

40

50

【0538】

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US2020/0181220 A1号及び同第US2020/0330601 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、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

、E 6 2、E 6 8、K 6 4、P 6 5、V 6 9、L 7 2、及び Y 1 0 7 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、N 6 -アジドエトキシ-L-リジン (A z K)、N 6 -プロパルギルエトキシ-L-リジン (P r a K)、B C N-L-リジン、ノルボルネンリジン、T C O-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 (p A M F)、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-フェニルアラニン、3-メチル-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-G l c N A c 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、I L-2 複合体は、野生型 I L-2 ポリペプチドと比較して、I L-2 受容体 α (I L-2 R 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 I L-2 ポリペプチドと比較して、I L-2 R α に対する結合親和性の約 1 0 %、2 0 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 %、9 0 %、9 5 %、9 9 %、または 9 9 % 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 I L-2 ポリペプチドと比較して、約 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、6 倍、7 倍、8 倍、9 倍、1 0 倍、3 0 倍、5 0 倍、1 0 0 倍、2 0 0 倍、3 0 0 倍、5 0 0 倍、1 0 0 0 倍以上である。いくつかの実施形態では、複合部分は、I L-2 と I L-2 R 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 (P E G)、ポリ(プロピレングリコール) (P P G)、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 (P O Z)、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、P E G を含む。いくつかの実施形態では、P E G は、直鎖状 P E G または分岐状 P E G 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 (P S A)、ヒアルロン酸 (H A)、アミロース、ヘパリン、ヘパランサルフェート (H S)、デキストリン、またはヒドロキシエチルデンプン (H E S) 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、F c 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、I g G の F c 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、X T E N ペプチド、グリシンリッチホモアミノ酸ポリマ

10

20

30

40

50

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 (BAS-ED)、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'-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)、スクシンイミジルオキシカルボニル-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) シクロヘキサン-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) シクロヘキサン-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) シクロヘキサン-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) シクロヘキサン-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- (

10

20

30

40

50

N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-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-メチルクマリナー-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-メチルクマリナー-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、任意にジペプチドリリンカーを含む、切断可能なリンカーを含む。いくつかの実施形態では、ジペプチドリリンカーは、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、任意に、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、スペーサーをさらに含む。いくつかの実施形態では、スペーサーは、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US2020/0181220 A1号及び米国特許出願公開第US2020/0330601 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。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 570 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。

10

20

30

40

50

【0539】

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 571) としても知られるネムバルキンアルファであり、ALKermes, Inc. から入手可能である。ネムバルキンアルファは、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 (133GSGGGS138) 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)、バリエーション (Cys125>Ser51) ; G2 ペプチドリリンカー (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、GSG3S ペプチドリリンカー (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。ネムバルキンアルファのアミノ酸配列は、配列番号 571 に示されている。いくつかの実施形態では、ネムバルキンアルファは、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 571 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 571 の番号付けを使用した N187、N206、T212。ネムバル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 571 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 571

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569を含むI g Gクラス軽鎖及び配列番号568を含むI g Gクラス重鎖、配列番号567を含むI g Gクラスの軽鎖及び配列番号559を含むI g Gクラスの重鎖、配列番号569を含むI g Gクラス軽鎖及び配列番号559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568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。

【0541】

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。

【0542】

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。

【0543】

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。

【0544】

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544または配列番号545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。

【0545】

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546、配列番号549、配列番号552、及び配列番号555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543、及び配列番号546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547、配列番号550、配列番号553、及び配列番号556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548、配列番号551、配列番号554、及び配列番号557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

10

20

30

40

50

体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 5 5 8 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、抗体サイトカイン移植タンパク質は、配列番号 5 5 9 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 5 6 6 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 5 6 7 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 2 8 のアミノ酸配列を含む V_H 領域及び配列番号 5 6 6 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 5 5 9 のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号 5 6 7 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 5 5 9 のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号 5 6 9 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 5 6 8 のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号 5 6 7 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 5 6 8 のアミノ酸配列を含む重鎖領域及び配列番号 5 6 9 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 2 0 2 0 / 0 2 7 0 3 3 4 A 1 号の I g G . I L 2 F 7 1 A . H 1 もしくは I g G . I L 2 R 6 7 A . H 1、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 8 0 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、または少なくとも 9 8 % 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 C D R 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 I L - 2 分子よりも長い血清半減期を有する。

【表 3 - 1】

表 3 : 例示的なパブリズマブ抗体-IL-2移植タンパク質の配列

識別子	配列番号	配列
US 2020/0270334		
配列番号 2 IL-2	543 IL-2	MYRMOLLSCI ALSALVTNS APTSSSTKRT QLQLEHLLLD LQMLNGINN 50 YRNFALTRML TFKFMPKKA TELKHLQCLE EELKPLEEV NLAQSKNFHL 100 RPRDLISNIN VIVLEKGE TTFMCEYADE TATVEFLNR WITFCQSIIS 150 TLT 153
配列番号 4 IL-2 ユニティン	544 IL-2 ユニティン	APTSSSTKRT QLQLEHLLLD LQMLNGINN YRNFALTRML TFKFMPKKA 50 TELKHLQCLE EELKPLEEV NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLEKGE 100 TTFMCEYADE TATVEFLNR WITFCQSIIS TLT 133
配列番号 6 IL-2 ユニティン	545 IL-2 ユニティン	APTSSSTKRT QLQLEHLLLD LQMLNGINN YRNFALTRML TFKFMPKKA 50 TELKHLQCLE EELKPLEEV NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLEKGE 100 TTFMCEYADE TATVEFLNR WITFCQSIIS TLT 133
IgG, IL2R67A, H1	67A, H1	
配列番号 7 HCDR1_IL-2	546 HCDR1_IL-2	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMLN GINNKNPKL TAMLTFKFM 50 PKKATELKH LQCLEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINIVLEL 100 KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMSVG 145
配列番号 8 HCDR2	547 HCDR2	DIWDDKKDY NPSLKS 16
配列番号 9 HCDR3	548 HCDR3	SMITNWFYDV 10
配列番号 10 HCDR1_IL-2 カバット	549 HCDR1_IL-2 カバット	TELKHLQCLE EELKPLEEV NLAQSKNFHL RPRDLISNIN VIVLEKGE 100 TTFMCEYADE TATVEFLNR WITFCQSIIS TLTSTSGMSV G 141
配列番号 11 HCDR2 カバット	550 HCDR2 カバット	DIWDDKKDY NPSLKS 16
配列番号 12 HCDR3 カバット	551 HCDR3 カバット	SMITNWFYDV 10
配列番号 13 HCDR1_IL-2 クロチア	552 HCDR1_IL-2 クロチア	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMLN GINNKNPKL TAMLTFKFM 50 PKKATELKH LQCLEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINIVLEL 100 KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GM 142
配列番号 14 HCDR2 クロチア	553 HCDR2 クロチア	WDDK 5
配列番号 15 HCDR3 クロチア	554 HCDR3 クロチア	SMITNWFYDV 10
配列番号 16 HCDR1_IL-2 IMGT	555	GFSLAPTSSS TKKTQLQLEH LLLDLQMLN GINNKNPKL TAMLTFKFM 50 PKKATELKH LQCLEELKPL EEVLNLAQSK NFHLRPRDLI SNINIVLEL 100 KGSETTFMCE YADETATIVE FLNRWITFCQ SIISTLTSTS GMS 143

10

20

30

40

50

【表 3 - 2】

	HCDR1 I L-2 IMGT	
配列番号17 HCDR2 IMGT	配列番号 556 HCDR2 IMGT	IHWDDKK 7
配列番号18 HCDR3 IMGT	配列番号 557 HCDR3 IMGT	ARSMITNWF DV 12
配列番号19 VH	配列番号 558 VH	QVTLRESGFA LVKPTQTLLT TCTFSGFSLA PTSSSTKKTK QLEHLLLDL 50 QMLINGINNY KNFKLTAMLT PKFYMKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVIN 100 LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 150 ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL EWLADINWDD KKDYNFSLKS 200 RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWF DVWGAGTTVT 250 VSS 253
配列番号21 重鎖	配列番号 559 重鎖	QMLINGINNY KNFKLTAMLT PKFYMKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVIN 100 LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 150 ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL EWLADINWDD KKDYNFSLKS 200 RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWF DVWGAGTTVT 250 VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT 300 SGVHTFAVL QSSGLYSLS VVTVPSSSLG TOTYICNVNH KFSNTKVDKR 350 VEPKSCDKTH TCPFCAPPEL LGGPSVFLFF PKFKDTLMIS RPEVTCVVV 400 AVSHDEPEVK FNNYVDGVEV HNARTKPRE QYNSTYRVV VLTVLHQDWL 450 NGKEYKCVS NKALAAPIEK TISKAKGQPR EPQVTLFPS REEMTKNQS 500 LTCVLKGFYP SDIAVEWESN GQENNYKTT PFVLDSDGSF FLYSKLTVDK 550 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLG PGK 583
配列番号26 LCDR1カバット	配列番号 560 LCDR1 カバット	KAQLSVGYMH 10
配列番号27 LCDR2カバット	配列番号 561 LCDR2 カバット	DTSKLAS 7
配列番号28 LCDR3カバット	配列番号 562 LCDR3 カバット	FQSGGYPT 9
配列番号29 LCDR1 クロチア	配列番号 563 LCDR1 クロチア	QLSVGY 6
配列番号30 LCDR2 クロチア	配列番号 564 LCDR2 クロチア	DTS 3
配列番号31 LCDR3 クロチア	配列番号 565 LCDR3 クロチア	SGGYFF 6
配列番号35 VL	配列番号 566 VL	DIQMTQSPST LSASVGRVT ITCKAQLSVG YMHYQKQFG KAPKLLIYDT 50 SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG 100 TKLEIK 106
配列番号37 軽鎖	配列番号 567	DIQMTQSPST LSASVGRVT ITCKAQLSVG YMHYQKQFG KAPKLLIYDT 50 SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG 100 TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNIFY REAKVQWKVD 150

10

20

【表 3 - 3】

	軽鎖	NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKKHV YACEVTHQGL 200 SSPVTKSFNR GEC 213
配列番号53 軽鎖	配列番号 568 軽鎖	QVTLRESGFA LVKPTQTLLT TCTFSGFSLA PTSSSTKKTK QLEHLLLDL 50 QMLINGINNY KNFKLTAMLT AKFYMKKAT ELKHLQCLEE ELKPLEEVIN 100 LAQSKNFHLR PRDLISNINV IVLELKGSET TFMCEYADET ATIVEFLNRW 150 ITFCQSIIST LTSTSGMSVG WIRQPPGKAL EWLADINWDD KKDYNFSLKS 200 RLTISKDTSK NQVVLKVTNM DPADTATYYC ARSMITNWF DVWGAGTTVT 250 VSSASTKGPS VFPLAPSSKS TSGGTAALGC LVKDYFPEPV TVSWNSGALT 300 SGVHTFAVL QSSGLYSLS VVTVPSSSLG TOTYICNVNH KFSNTKVDKR 350 VEPKSCDKTH TCPFCAPPEL LGGPSVFLFF PKFKDTLMIS RPEVTCVVV 400 AVSHDEPEVK FNNYVDGVEV HNARTKPRE QYNSTYRVV VLTVLHQDWL 450 NGKEYKCVS NKALAAPIEK TISKAKGQPR EPQVTLFPS REEMTKNQS 500 LTCVLKGFYP SDIAVEWESN GQENNYKTT PFVLDSDGSF FLYSKLTVDK 550 SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLG PGK 583
配列番号69 軽鎖	配列番号 569 軽鎖	DIQMTQSPST LSASVGRVT ITCKAQLSVG YMHYQKQFG KAPKLLIYDT 50 SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISSLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG 100 TKLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNIFY REAKVQWKVD 150 NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKKHV YACEVTHQGL 200 SSPVTKSFNR GEC 213

30

【0546】

「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5）。

40

【0547】

「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

50

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 α 及び共通 γ 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6)。

10

【0548】

「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7)。

20

【0549】

「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8)。

30

40

【0550】

「抗腫瘍有効量」、「腫瘍阻害有効量」、または「治療量」が示された場合、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、腫瘍の大きさ、感染または転移の程度、及び状態の個人差を考慮して、医師によって決定することができる。本明細書に記載される腫瘍浸潤リンパ球(例えば、二次TILまたは遺伝子修飾細胞傷害性リンパ球)を含む薬学的組成物が、 $10^4 \sim 10^{11}$ 細胞/kg体重(例えば、 $10^5 \sim 10^6$ 、 $10^5 \sim 10^{10}$ 、 $10^5 \sim 10^{11}$ 、 $10^6 \sim 10^{10}$ 、 $10^6 \sim 10^{11}$ 、 $10^7 \sim 10^{11}$ 、 $10^7 \sim 10^{10}$ 、 $10^8 \sim 10^{11}$ 、 $10^8 \sim 10^{10}$ 、 $10^9 \sim 10^{11}$)

50

、または $10^9 \sim 10^{10}$ 細胞/kg体重）（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と概説され得る。腫瘍浸潤リンパ球（いくつかの事例では、遺伝子修飾細胞傷害性リンパ球を含む）組成物も、これらの投与量で複数回投与され得る。腫瘍浸潤リンパ球（場合によっては、遺伝的を含む）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り投与することができる（例えば、Rosenberg et al., New Eng. J. of Med. 319:1676, 1988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。

【0551】

「血液学的悪性腫瘍」、「血液系悪性腫瘍」という用語、または相関する意味の用語は、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造血及びリンパ組織の哺乳動物の癌及び腫瘍を指す。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）、急性単球性白血病（AMoL）、ホジキンリンパ腫、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。

【0552】

「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、肉腫、がん腫、及びリンパ腫、例えば、肺癌、乳癌、前立腺癌、結腸癌、直腸癌、及び膀胱癌が含まれるが、これらに限定されない。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。

【0553】

「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、骨髓腫、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、本明細書では骨髓浸潤リンパ球（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。

【0554】

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。本明細書で使用される腫瘍微小環境は、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。

【0555】

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の注入前に骨髓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の注入前に骨髓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、骨髓非破壊的化学療法は、シクロホスファミド 60 mg/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 25 mg/m^2 /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、骨髓非破壊的化学療法は、シクロホスファミド 60 mg/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 25 m

10

20

30

40

50

g / m² / 日で3日間（TIL注入の27日前～25日前）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）、続いてフルダラビン25mg / m² / 日で3日間（TIL注入の25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。

【0556】

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rTILの導入前に、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。

【0557】

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（本発明の好ましい実施形態では、例えば、複数のTILと組み合わせた少なくとも1つのカリウムチャネルアゴニスト）の投与を包含し、これにより、医薬品有効成分及び／またはそれらの代謝物の両方が、対象に同時に存在するようになる。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。

【0558】

「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。

【0559】

「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。本明細書で使用される「治療」は、哺乳動物、特にヒトにおける疾患のあらゆる治療を包含し、（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。

【0560】

「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

10

20

30

40

50

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）。

【0561】

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」、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。

【0562】

本明細書で使用される場合、「バリエーション」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。バリエーションは、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。バリエーションは、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。バリエーションという用語は、ペグ化抗体またはタンパク質も含む。

【0563】

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（「新たに取得された」または「新たに単離された」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ように拡張または増殖された任意のTIL細胞集団であり、本明細書で考察されるバルクTIL、拡張TIL（「REP TIL」）、ならびに「reREP TIL」が含まれるが、これらに限定されない。reREP TILは、例えば、第2の増殖TILまたは第2の追加の増殖TIL（例えば、reREP TILと称されるTILを含む、図27のステップDに記載されているものなど）を含み得る。

【0564】

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50pg/mLを超える、約100pg/mLを超える、約150pg/mLを超える、または約200pg/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50pg/mLを超える、約100pg/mLを超える、約150pg/mLを超える、または約200pg/mLを超える、約300pg/mLを超える、約400pg/mLを超える、約500pg/mLを超える、約600pg/mLを超える、約700pg/mLを超える、約800pg/mLを超える、約900pg/mL、約1000pg/mLを超える場合、TILは強力であるとみなされ得る。

10

【0565】

「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。

20

【0566】

「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。

30

【0567】

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。

40

【0568】

「PD-1高（PD-1 high）」または「PD-1高（PD-1 high）」または「PD-1高（PD-1 high）」という用語は、健康な対象からの対照細胞と比

50

較した、これらに限定されないが腫瘍浸潤リンパ球またはT細胞などの細胞による高レベルのPD-1タンパク質発現を指す。いくつかの実施形態では、PD-1発現のレベルは、フローサイトメトリー、蛍光活性化細胞選別法（FACS）、免疫細胞化学などの、細胞上に存在するタンパク質レベルを測定するための当業者に知られている標準的な方法を使用して決定される。場合によっては、PD-1高TILは、健康な対象からの免疫細胞と比較して、より高いレベルのPD-1を発現する。場合によっては、PD-1高TIL集団は、健康な対象または健康な対象群からの免疫細胞（例えば、末梢血単核細胞）集団と比較して、より高いレベルのPD-1を発現する。PD-1高細胞は、PD-1明細胞と称され得る。

【0569】

「PD-1中間（PD-1 intermediate）」または「PD-1中間（PD-1 int）」または「PD-1中間（PD-1^{int}）」という用語は、健康な対象からの対照細胞と比較した、これらに限定されないが腫瘍浸潤リンパ球またはT細胞などの細胞による中間または中程度レベルのPD-1タンパク質発現を指す。例えば、PD-1中間T細胞は、健康な対象からの対照細胞（例えば、末梢血単核細胞）により発現される最高範囲のPD-1タンパク質と類似または実質的に同等レベルもしくは範囲でPD-1タンパク質を発現する。言い換えれば、PD-1中間TILは、健康な対象からの対照免疫細胞によるバックグラウンドレベルのPD-1発現と類似または実質的に同等であるPD-1発現レベルを有する。PD-1中間細胞は、PD-1 dim細胞と称され得る。当業者は、PD-1陽性TILが、PD-1高TILまたはPD-1中間TILであり得ることを認識している。

【0570】

「PD-1陰性（PD-1 negative）」または「PD-1陰性（PD-1 neg）」または「PD-1陰性（PD-1^{neg}）」という用語は、健康な対象からの対照細胞と比較した、これらに限定されないが腫瘍浸潤リンパ球またはT細胞などの細胞による陰性または低レベルのPD-1タンパク質発現を指す。例えば、PD-1陰性T細胞は、PD-1タンパク質を発現しない。いくつかの事例では、PD-1陰性T細胞は、健康な対象からの対照細胞（例えば、末梢血単核細胞）により発現される最低レベルのPD-1タンパク質と類似または実質的に同等レベルでPD-1タンパク質を発現する。PD-1陰性リンパ球は、対照集団の大多数のリンパ球と同じレベルまたは範囲でPD-1を発現することができる。

【0571】

PD-1高、PD-1中間、及びPD-1陰性TILは別個のものであり、本明細書に記載される方法に従ってエキスピボで拡張されたTILの異なるサブセットである。いくつかの実施形態では、エキスピボで拡張されたTIL集団は、PD-1高TIL、PD-1中間TIL、及びPD-1陰性TILを含む。

【0572】

II. TIL製造プロセス（Gen3プロセスの実施形態、任意で合成培地を含む）

本明細書に記載の方法に加えて、国際出願第PCT/US2019/059716号は、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。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の増殖と、それに続くT細胞の活性化を促進する急速な第2の増殖により、「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、培養下での増殖によってあまり疲弊せ

10

20

30

40

50

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の増殖ステップは、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の増殖を行うことと、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、急速な増殖ステップは、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、(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、かかる第2の容器に移された第1の小規模培養由来の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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられ、(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の増殖を行うことと、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、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられ、(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の増殖を行うことと、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、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の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

50

【0573】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、プライミングによる第1の増殖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。

【0574】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、プライミングによる第1の増殖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。

【0575】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、プライミングによる第1の増殖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。

【0576】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、プライミングによる第1の増殖によ

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。

【0577】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、プライミングによる第1の増殖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。

10

【0578】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、プライミングによる第1の増殖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、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

【0579】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖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ガンマの量の減少によって決定される。

30

【0580】

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の増殖は、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。

【0581】

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の増殖は、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。

【0582】

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の増殖は、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。

【0583】

いくつかの実施形態では、T細胞の急速な第2の増殖は、最大で正確にまたは約11日の期間中に行われる。

40

【0584】

いくつかの実施形態では、T細胞の急速な第2の増殖は、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。

【0585】

いくつかの実施形態では、T細胞の急速な第2の増殖は、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。

【0586】

50

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の増殖は、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の増殖は、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。

【0587】

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の増殖は、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の増殖は、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。

【0588】

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の増殖は、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の増殖は、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。

【0589】

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の増殖は、8日の期間中に行われ、T細胞の急速な第2の増殖は、9日の期間中に行われる。

【0590】

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の増殖は、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の増殖は、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。

【0591】

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の増殖は、7日の期間中に行われ、T細胞の急速な第2の増殖は、9日の期間中に行われる。

【0592】

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。

【0593】

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。

【0594】

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。

【0595】

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。

【0596】

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。

【0597】

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。

【0598】

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、ドナーは、血液系悪性腫瘍に罹患している。

【0599】

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

10

20

30

40

50

いが多い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。

【0600】

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、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、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）、膠芽腫（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、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。

10

【0601】

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、アフエーシスによって取得される。アフエーシス産物は、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い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。

20

30

【0602】

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、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）、膠芽腫（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、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の増殖は、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の増殖ステップに

40

50

従って、プライミングによる第1の増殖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。

【0603】

これらの特徴のうちのいくつかを含有するプロセス3（本明細書ではGEN3とも称される）として知られる例示的なTILプロセスは、図1（特に、例えば、図1B）に示され、プロセス2Aに関する本発明のこの実施形態の利点のうちのいくつかは、図1、2、30、及び31（特に、例えば、図1B）に記載されている。プロセス3の2つの実施形態は、図1及び30（特に、例えば、図1B）に示される。プロセス2AまたはGen2はまた、米国特許公開第2018/0280436号に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。Gen3プロセスは、2018年11月5日に提出されたUS 62/755,954（116983-5045-PR）にも記載されている。

10

【0604】

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増殖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、増殖前または増殖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。

【0605】

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、プライミングによる第1の増殖（本明細書では急速な増殖前（REP前）と称されるプロセス、ならびに図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）でステップ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の増殖（本明細書では急速な増殖プロトコル（REP）と称されるプロセス、ならびに図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）でステップDとし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で詳細に考察されるように、プライミングによる第1の増殖（本明細書では急速な増殖前（REP前）と称されるプロセス、ならびに図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）でステップ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の増殖（本明細書では急速な増殖プロトコル（REP）と称されるプロセス、ならびに図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）でステップDとして示されるプロセスを含む）は、1～8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、プライミングによる第1の増殖（本明細書では急速な増殖前（REP前）と称されるプロセス、ならびに図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）でステップBとして示されるプロセスを含む）は、1～7日に短縮され、急速な第2の増殖（本明細書では急速な増殖プロトコル（REP）と称されるプロセス、ならびに図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）でステップDとし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で詳細に考察されるように、プライミングによる第1の増殖（本明細書では急速な増殖前（REP前）と称されるプロセス、ならびに図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）でステップBとして示されるプロセスを含む）は、1～7日であり、急速な第2の増殖（本明細書では急速な増殖プロト

20

30

40

50

50

、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) でステップ B として記載される増殖) は、7 日であり、急速な第 2 の増殖 (例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) でステップ D に記載される増殖) は、9 ～ 10 日である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖 (例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) でステップ B として記載される増殖) は、7 日に短縮され、急速な第 2 の増殖 (例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) でステップ D に記載される増殖) は、7 ～ 9 日である。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、プライミングによる第 1 の増殖と急速な第 2 の増殖 (例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) でステップ B 及びステップ D として記載される増殖) との組み合わせは、14 ～ 16 日である。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 の増殖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 の増殖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

【0606】

以下の「ステップ」表記 A、B、C などは、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) における非限定的な例を参照し、かつ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する。以下及び図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) 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。

30

【0607】

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、任意に凍結保存され、任意に 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。

【0608】

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る場合もある。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、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。

40

50

【0609】

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の小片に断片化され、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 グルタメート、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、その後、5%CO₂中37℃で30分間インキュベートし、続いて、小さい組織片しか存在しなくなるまで、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され得る。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。

10

【0610】

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pain、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。

20

【0611】

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、HBSSなどの滅菌緩衝液の量で再構成される。

【0612】

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、2892PZ U/バイアルの濃度であり得る。いくつかの実施形態において、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100PZ U/mL～約400PZ U/mLの範囲、例えば、約100PZ U/mL～約400PZ U/mL、約100PZ U/mL～約350PZ U/mL、約100PZ U/mL～約300PZ U/mL、約150PZ U/mL～約400PZ U/mL、約100PZ U/mL、約150PZ U/mL、約200PZ U/mL、約210PZ U/mL、約220PZ U/mL、約230PZ U/mL、約240PZ U/mL、約250PZ U/mL、約260PZ U/mL、約270PZ U/mL、約280PZ U/mL、約289.2PZ U/mL、約300PZ U/mL、約350PZ U/mL、または約400PZ U/mLである。

30

40

【0613】

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、175DMCU/バイアルの濃度であり得る。凍結乾燥ストック酵素は、175DMC/mL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100DMC/mL～約400DMC/mLの範囲、例えば、約100DMC/mL～約400DMC/mL、約100DMC/mL～約350DMC/mL、約100DMC/mL～約300DMC/mL、約

50

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。

【0614】

いくつかの実施形態において、DNase I は、1 ml の滅菌 HBS S 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、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。

10

【0615】

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確認し、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ことに留意されたい。

【0616】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、中性プロテアーゼ、DNase、及びコラゲナーゼを含む。

20

【0617】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約 4.7 ml 中の滅菌 HBS S 中に約 10.2 µl の中性プロテアーゼ (0.36 DMC U / ml)、21.3 µl のコラゲナーゼ (1.2 PZ / ml)、及び 250 µl の DNase I (200 U / ml) を含む。

【0618】

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 °C、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 °C、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。いくつかの実施形態では、腫瘍は、37 °C、5 % CO₂ で一定の回転を伴って一晩消化される。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。いくつかの実施形態では、腫瘍は消化され、次いで選択プロセスを続ける前に凍結される。いくつかの実施形態では、腫瘍は消化され、次いで増殖プロセスを続ける前に凍結される。

30

40

【0619】

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 HBS S である。

【0620】

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 mg / ml の 10 倍作業ストックである。

【0621】

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 IU / ml の 10 倍作業ストックである。

50

【0622】

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 mg/ml の10倍作業ストックである。

【0623】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、 10 mg/ml のコラゲナーゼ、 1000 IU/ml のDNAse、及び 1 mg/ml のヒアルロニダーゼを含む。

【0624】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、 10 mg/ml のコラゲナーゼ、 500 IU/ml のDNAse、及び 1 mg/ml のヒアルロニダーゼを含む。

10

【0625】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約 10 mg/ml のコラゲナーゼ、約 1000 IU/ml のDNAse、及び約 1 mg/ml のヒアルロニダーゼを含む。

【0626】

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。

【0627】

いくつかの実施形態では、消化物は、プライミングによる第1の増殖、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）のステップBを進める前に凍結することができる。

20

【0628】

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、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。

30

【0629】

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（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）に提供される）で得られた後に、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の増殖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の増殖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の増殖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 27 mm^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 1300 mm^3 ～約 1500 mm^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 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。

40

【0630】

50

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。

10

【0631】

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。

20

【0632】

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% 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% CO_2 中37°Cで30分間再びインキュベートした後、腫瘍は、3回目の機械的破壊がおよそ1分間行われ得る。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% 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。

30

40

【0633】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖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。

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) に、任意選択で凍結され得、ステップBに記載の増殖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 (特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H) にも例示される。

【0634】

50

1. コア／小生検由来のTIL

いくつかの実施形態では、TIL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TIL」）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。

【0635】

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、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（NSCLC）から選択される。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。

【0636】

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TIL細胞集団は、抗原提示細胞、IL-2、及びOKT-3を含む細胞培養培地に曝露される。

【0637】

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、肺もしくは肝臓転移性病変、あるいは腹腔内もしくは胸部リンパ節またはそれらの小生検が用いられ得る。

【0638】

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分を含む。

【0639】

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取得される。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。

【0640】

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。

【0641】

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。

【0642】

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ら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。

【0643】

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。

【0644】

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。

【0645】

「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、肉腫、がん腫、及びリンパ腫、例えば、肺癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、前立腺癌、結腸癌、直腸癌、及び膀胱癌が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、がんは、子宮頸癌、頭頸部癌、神経膠芽細胞腫、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。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。

【0646】

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-Rex 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-Rex 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-Rex 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び／または小生検試料が存在する場合、試料は、最初にG-Rex 500に入れられる。

【0647】

FNAは、肺、黒色腫、頭頸部、子宮頸部、卵巣、脾臓、神経膠芽腫、結腸直腸、及び肉腫からなる群から選択される腫瘍から得られ得る。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。

【0648】

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。

【0649】

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。

【0650】

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。

【0651】

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。

【0652】

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、腫瘍は、3回目の機械的破壊がおよそ1分間行われ得る。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。

【0653】

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。

10

【0654】

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。

【0655】

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、HBSSなどの滅菌緩衝液の量で再構成される。

20

【0656】

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において、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。

30

【0657】

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。凍結乾燥ストック酵素は、175 DMC/ml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。

40

【0658】

いくつかの実施形態において、DNase Iは、1mlの滅菌HBSSまたは別の緩

50

衝液中で再構成される。凍結乾燥ストック酵素は、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。

【0659】

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ことに留意されたい。

【0660】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、中性プロテアーゼ、コラゲナーゼ、及びDNaseを含む

【0661】

いくつかの実施形態では、酵素混合物は、約4.7 ml中の滅菌HBSS中に約10.2 µlの中性プロテアーゼ(0.36 DMCU/ml)、21.3 µlのコラゲナーゼ(1.2 PZ/ml)、及び250 µlのDNase I(200 U/ml)を含む。

【0662】

2. 胸水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増殖のための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増殖のための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。

【0663】

いくつかの実施形態では、TILと思われる、及び／またはTIL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、NSCLCもしくはSCLC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、本明細書に記載の増殖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、本明細書に記載の増殖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、TIL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、TIL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TIL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。

【0664】

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、EDTA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Cell Save(登録商標)チューブ(Veridex)に入れられる。いくつかの実施形態では、試料は、生存TILの数の減少を避けるために、患者から採取した直後にCell Saveチューブに入れられる。生存TIL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。

【0665】

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。他の実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1:9である。他の実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1:8である。他の実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1:5である。他の実施形態では、希釈は、胸腔内液対希釈剤が1:2である。他の実施形態では、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CellSave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。

10

【0666】

さらに別の実施形態では、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。

20

【0667】

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使用することができる。

30

【0668】

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）、希釈胸水、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

40

50

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。

【0669】

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、本明細書に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。

【0670】

3. 末梢血から末梢血リンパ球 (PBL) を拡張する方法

PBL 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。

【0671】

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。

【0672】

PBL 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。

【0673】

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。

【0674】

PBL 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。

【0675】

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。

【0676】

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、増殖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。

【0677】

本発明のいくつかの実施形態では、P B M C 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。

【0678】

いくつかの実施形態では、P B M C 試料は、キナーゼ阻害剤またはI T K 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I T K 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、P B M C 試料は、キナーゼ阻害剤またはI T K 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、P B M C は、イブルチニブなどのI T K 阻害剤レジメンを現在受けている患者に由来する。

10

【0679】

いくつかの実施形態では、P B M C 試料は、キナーゼ阻害剤またはI T K 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I T K 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。

【0680】

いくつかの実施形態では、P B M C 試料は、キナーゼ阻害剤またはI T K 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I T K 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、P B M C 試料は、キナーゼ阻害剤またはI T K 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I T K 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、P B M C は、I T K 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。

20

【0681】

本発明のいくつかの実施形態では、0日目に、細胞がC D 1 9 +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P B M C から単離される。

30

【0682】

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I T K 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P B M C を産生し、これは、次いで、約 5.5×10^7 のP B L を産生する。

【0683】

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I T K 阻害剤で前治療された患者の場合、増殖プロセスは、約 20×10^9 のP B L 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P B M C は、約 4.7×10^5 のP B L を産生する。

40

【0684】

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、アフエレーションによって、バフィーコートから、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。

【0685】

4. 骨髄由来のP B M C から骨髄浸潤リンパ球(M I L)を拡張する方法

M I L 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P B M C を取得す

50

ることを含む。0日目に、P B M CがC D 3 + / C D 3 3 + / C D 2 0 + / C D 1 4 +について選択され、選別され、非C D 3 + / C D 3 3 + / C D 2 0 + / C D 1 4 +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。

【0686】

本発明のいくつかの実施形態では、M I L法3は、以下のように行われる：0日目に、凍結保存されたP B M C試料を解冻し、P B M Cを計数する。細胞を、C D 3、C D 3 3、C D 2 0、及びC D 1 4抗体で染色し、選別されたS 3 e細胞（B i o - R a d）を使用して選別する。細胞を、免疫細胞画分（またはM I L画分）（C D 3 + C D 3 3 + C D 2 0 + C D 1 4 +）及びA M L芽球画分（非C D 3 + C D 3 3 + C D 2 0 + C D 1 4 +）の2つの画分に選別する。

10

【0687】

本発明のいくつかの実施形態では、P B M Cは、骨髓から取得される。いくつかの実施形態では、P B M Cは、アフエレーシス、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髓から取得される。いくつかの実施形態では、P B M Cは、新鮮である。他の実施形態では、P B M Cは、凍結保存される。

【0688】

本発明のいくつかの実施形態では、M I Lは、10～50mlの骨髓吸引物から拡張される。本発明のいくつかの実施形態では、10mlの骨髓吸引物が患者から取得される。他の実施形態では、20mlの骨髓吸引物が患者から取得される。他の実施形態では、30mlの骨髓吸引物が患者から取得される。他の実施形態では、40mlの骨髓吸引物が患者から取得される。他の実施形態では、50mlの骨髓吸引物が患者から取得される。

20

【0689】

本発明のいくつかの実施形態では、約10～50mlの骨髓吸引物から産生されたP B M Cの数は、約 5×10^7 ～約 10×10^7 のP B M Cである。他の実施形態では、産生されるP B M Cの数は、約 7×10^7 のP B M Cである。

【0690】

本発明のいくつかの実施形態では、約 5×10^7 ～約 10×10^7 のP B M Cが、約 0.5×10^6 ～約 1.5×10^6 の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 のM I Lが産生される。

30

【0691】

本発明のいくつかの実施形態では、骨髓吸引物から取得された 12×10^6 のP B M Cは、およそ 1.4×10^5 のM I Lを産生する。

【0692】

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、アフエレーシスによって、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。

【0693】

5. P D - 1 - P D - 1の選択の事前選択（図1のステップA2に例示される）

本発明の方法によれば、T I Lは、プライミングによる第1の増殖の前に、P D - 1陽性（P D - 1 +）であるように事前選択される。

40

【0694】

いくつかの実施形態では、最低3,000個のT I Lが、第1の増殖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個のT I Lをもたらす。いくつかの実施形態では、最低4,000個のT I Lが、第1の増殖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個のT I Lをもたらす。いくつかの実施形態では、最低5,000個のT I Lが、第1の増殖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個のT I Lをもたらす。いくつかの実施形態では、最低6,000個のT I Lが、第1の増殖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

50

択ステップは、最低 6,000 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、第 1 の増殖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 の増殖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 の増殖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 の増殖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 個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、細胞を、200,000 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 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 の TIL を提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、150,000 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 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 の TIL を提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、250,000 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 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 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 の増殖を開始するための 10×10^6 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 の増殖を開始するための 10×10^6 の播種密度は、 1×10^9 を超える TIL をもたらし得る。

【0695】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための TIL は、PD-1 陽性 (PD-1+) である (例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前)。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための TIL は、少なくとも 75% PD-1 陽性、少なくとも 80% PD-1 陽性、少なくとも 85% PD-1 陽性、少なくとも 90% PD-1 陽性、少なくとも 95% PD-1 陽性、少なくとも 98% PD-1 陽性、または少なくとも 99% PD-1 陽性である (例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前)。いくつかの実施形態では、PD-1 集団は、PD-1 高である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための TIL は、少なくとも 25% PD-1 高、少なくとも 30% PD-1 高、少なくとも 35% PD-1 高、少なくとも 40% PD-1 高、少なくとも 45% PD-1 高、少なくとも 50% PD-1 高、少なくとも 55% PD-1 高、少なくとも 60% PD-1 高、少なくとも 65% PD-1 高、少なくとも 70% PD-1 高、少なくとも 75% PD-1 高、少なくとも 80% PD-1 高、少なくとも 85% PD-1 高、少なくとも 90% PD-1 高、少なくとも 95% PD-1 高、少なくとも 98% PD-1 高、または少なくとも 99% PD-1 高である (例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前)。

【0696】

いくつかの実施形態では、PD-1 高は、少なくとも 75% PD-1 陽性、少なくとも 80% PD-1 陽性、少なくとも 85% PD-1 陽性、少なくとも 90% PD-1 陽性、少なくとも 95% PD-1 陽性、少なくとも 98% PD-1 陽性、または少なくとも 99% PD-1 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、PD-1 高は、少なくとも 80% PD-1 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、PD-1 高は、少なくとも 85% PD-1 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、PD-1 高は、少なくとも 90% PD-1 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、PD-1 高は、少なくとも 95% PD-1 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、PD-1 高は、少なくとも 98% PD-1 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、PD-1 高は、少なくとも 99% PD-1 陽

性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、PD-1高は、100%PD-1陽性であるTIL集団によって示される。

【0697】

いくつかの実施形態では、PD-1高は、TILが対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも25%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも30%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも35%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも40%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも45%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも50%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも55%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも60%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも65%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも70%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも75%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも80%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも85%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも90%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも95%高いPD-1を発現する、対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも少なくとも99%高いPD-1を発現する、または対照もしくはベースラインPD-1レベルよりも100%高いPD-1を発現する、TIL集団によって示される。

【0698】

いくつかの実施形態では、PD-1高は、TILが対照またはベースラインPD-1レベルよりも1倍以上のPD-1を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、PD-1高は、TILが対照またはベースラインPD-1レベルよりも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍以上のPD-1を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、PD-1高は、TILが対照またはベースラインPD-1レベルよりも1倍以上のPD-1を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、PD-1高は、TILが対照またはベースラインPD-1レベルよりも2倍以上のPD-1を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、PD-1高は、TILが対照またはベースラインPD-1レベルよりも3倍以上のPD-1を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、PD-1高は、TILが対照またはベースラインPD-1レベルよりも4倍以上のPD-1を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、PD-1高は、TILが対照またはベースラインPD-1レベルよりも5倍以上のPD-1を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、PD-1高は、TILが対照またはベースラインPD-1レベルよりも10倍以上のPD-1を発現する、TIL集団によって示される。

【0699】

いくつかの実施形態では、PD-1陽性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PD-1抗体で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトPD-1ポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトPD-1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PD-1抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体には、例えば、EH12.2H7、PD1.3.1、SYM021、M1H4、A17188B、ニボルマブ(BMS-936558、Bristol-Myers Squibb; Opdivo (登録商標))、ペムブロリズマブ(ラムプロリズマブ、MK03475またはMK-3475、Merck; Keytruda (登録商標))、H12.1、PD1.3.1、NAT 105、ヒト化抗PD-1抗

10

20

30

40

50

体 JS001 (ShangHai JunShi)、モノクローナル抗PD-1抗体TSR-042 (Tesar o, Inc.)、ピジリズマブ (抗PD-1 mAb CT-011、Medi vation)、抗PD-1モノクローナル抗体BGB-A317 (BeiGene)、及び／または抗PD-1抗体SHR-1210 (ShangHai HengRui)、ヒトモノクローナル抗体REGN2810 (Regeneron)、ヒトモノクローナル抗体MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb)、及び／またはヒト化抗PD-1 IgG4抗体PDR001 (Novartis)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、PD-1抗体は、クローン：RMP1-14 (ラットIgG)-BioXcellカタログ番号BP0146に由来する。本明細書に記載されるように、ステップA～Fにより例示されるように、本発明の方法によるTILの増殖において使用するためのPD-1陽性TILの事前選択において使用するための他の好適な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,008,449号に開示される抗PD-1抗体である。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、ニボルマブ (BMS-936558、Bristol-Myers Squibb; Opdivo (登録商標))とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、ペンブロリズマブ (ランブロリズマブ、MK03475またはMK-3475、Merck; Keytruda (登録商標))とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、ヒト化抗PD-1抗体JS001 (ShangHai JunShi)とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、モノクローナル抗PD-1抗体TSR-042 (Tesar o, Inc.)とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、ピジリズマブ (抗PD-1 mAb CT-011、Medi vation)とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、抗PD-1モノクローナル抗体BGB-A317 (BeiGene)とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、抗PD-1抗体SHR-1210 (ShangHai HengRui)とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、ヒトモノクローナル抗体REGN2810 (Regeneron)とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、ヒトモノクローナル抗体MDX-1106 (Bristol-Myers Squibb)とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、ヒト化抗PD-1 IgG4抗体PDR001 (Novartis)とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、RMP1-14 (ラットIgG)-BioXcellカタログ番号#BP0146とは異なるエピトープに結合する。ニボルマブ及びペンブロリズマブのPD-1への結合の構造は既知であり、例えば、Tan, S. et al. (Tan, S. et al., Nature Communications, 8:14369 | DOI:10.1038/ncomms14369 (2017)、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)に記載されている。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、EH12.2H7である。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、PD1.3.1である。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、PD1.3.1ではない。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、M1H4である。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、M1H4ではない。

【0700】

いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗PD-1抗体は、PD-1を発現してい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1

10

20

30

40

50

00%に結合する。

【0701】

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、化学療法治療後及び抗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

【0702】

患者が以前に第1の抗PD-1抗体で治療されているいくつかの実施形態では、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、一次TIL細胞集団の表面上でPD-1に結合することから第1の抗PD-1抗体により遮断されていない第2の抗PD-1抗体で染色することにより行われる。

【0703】

患者が以前に抗PD-1抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次TIL細胞集団を、一次TIL細胞集団の表面上で不溶化された抗PD-1抗体のFc領域に結合する抗体（「抗Fc抗体」）で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗Fc抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトFcポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトFc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Fc抗体は、モノクローナル抗体である。患者が以前に抗PD-1ヒトまたはヒト化IgG抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG抗体で染色される。患者が以前に抗PD-1ヒトまたはヒト化IgG1抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG1抗体で染色される。患者が以前に抗PD-1ヒトまたはヒト化IgG2抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG2抗体で染色される。患者が以前に抗PD-1ヒトまたはヒト化IgG3抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG3抗体で染色される。患者が以前に抗PD-1ヒトまたはヒト化IgG4抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG4抗体で染色される。

20

30

【0704】

患者が以前に抗PD-1抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次TIL細胞集団を、同じ抗PD-1抗体と接触させることと、次いで、一次TIL細胞集団を、一次TIL細胞集団の表面上で不溶化された抗PD-1抗体のFc領域に結合する抗Fc抗体で染色することにより行われる。

【0705】

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、第1の集団及びPBMC集団の両方におけるフルオロフォアの強度を使用して、それぞれPD-1陰性TIL、PD-1中間TIL、及びPD-1陽性TILに対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するためのFACSゲートを設定する。いくつかの実施形態では、細胞選別方法は、PBMC、FMO対照、及び試料自体を使用して3つの集団を区別して、ゲートが高、中（中間とも称される）、及び低（陰性とも称される）に設定されるように行われる。いくつかの実施形態では、PBMCは、ゲーティング対照として使用される。いくつかの実施形態では、PD-1高集団は、PBMCにおいて観察されるものを超えるPD-1に対して陽性である細胞

40

50

集団として定義される。いくつかの実施形態では、T I LのP D - 1 + 中間集団は、P B M C中のP D - 1 + 細胞を包含する。いくつかの実施形態では、陰性は、F M Oに基づいてゲートされる。いくつかの実施形態では、F A C S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T I L集団を取得及び／または受容す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、選別ごとに設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、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、ゲーティングは、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、10日、20日、30日、40日、50日、または60日毎にP B M Cから設定される。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から設定される。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。

10

【0706】

いくつかの実施形態では、P D - 1 事前選択のゲーティングは、事前選択手順毎に固定される。いくつかの実施形態では、固定されるゲーティング手順は、C D 3 + ゲーティング手順である。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別中に取得された集団に基づいて決定される。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別事象中に取得された集団がC D 3 + ゲーティング手順であることに基づいて決定される。

20

【0707】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (M F I) のゲーティング及び補正は、約0.5% ± 0.25%の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (M F I) のゲーティング及び補正は、約1.75% ± 0.25%の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (M F I) のゲーティング及び補正は、P B M CでP D - 1 高ゲートを設定する場合、約1.75% ± 0.25%の範囲である。いくつかの実施形態では、M F I 計算は、P B M Cの1、2、3、もしくは4以上のロットまたはバッチから測定される平均値を使用する。いくつかの実施形態では、M F I 計算は、P B M Cの1、2、3、もしくは4以上のロットまたはバッチから測定される中央値を使用する。

30

【0708】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (M F I) を決定するために使用されるF A C S選別のゲーティング及び補正方法は、対照P B M C (例えば、健康なドナーからのP B M C) に対するP D - 1のM F Iが、P D - 1 高ゲートに対して約0.5% ~ 2.0% (例えば、約0.5%、0.55%、0.6%、0.65%、0.7%、0.75%、0.8%、0.85%、0.9%、0.95%、1.0%、1.05%、1.1%、1.15%、1.2%、1.25%、1.3%、1.35%、1.4%、1.45%、1.5%、1.55%、1.6%、1.65%、1.7%、1.75%、1.8%、1.85%、1.9%、1.95%、または2.0%) の範囲になるように調整される。いくつかの実施形態では、M F I 計算は、P B M Cの少なくとも2つの試料を使用して測定された平均値である。いくつかの実施形態では、M F I 計算は、P B M Cの少なくとも2つの試料を使用して測定された中央値である。

40

【0709】

いくつかの実施形態では、P D - 1 陽性 (P D - 1 +) 細胞は、F A C 及び／または他のフローサイトメトリー法によって選別される。いくつかの実施形態では、P D - 1 陽性T I Lは、P D - 1 高T I Lである。いくつかの実施形態では、P D - 1 陽性T I Lは、P D - 1 中間T I Lである。いくつかの実施形態では、P D - 1 + 細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、P D - 1 + 細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、M i l t e n y i またはF i s h e r な

50

どの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、PD-1+高細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、PD-1+高細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、MiltenyiまたはFisherなどの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ビーズと直接的または間接的に複合される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択プロセスは、PD-1+及びCD3+TILの両方を選択する。いくつかの実施形態では、ビーズ選択法で利用される抗PD-1抗体には、例えば、EH12.2 H7、PD1.3.1、SYM021、M1H4、A17188B、ニボルマブ（BMS-936558、Bristol-Myers Squibb; Opdivo（登録商標））、ペンブロリズマブ（ラムプロリズマブ、MK03475またはMK-3475、Merck; Keytruda（登録商標））、H12.1、PD1.3.1、NAT 105、ヒト化抗PD-1抗体JS001（ShangHai JunShi）、モノクローナル抗PD-1抗体TSR-042（Tesar, Inc.）、ピジリズマブ（抗PD-1 mAb CT-011、Medivation）、抗PD-1モノクローナル抗体BGB-A317（BeiGene）、及び／または抗PD-1抗体SHR-1210（ShangHai HengRui）、ヒトモノクローナル抗体REGN2810（Regeneron）、ヒトモノクローナル抗体MDX-1106（Bristol-Myers Squibb）、及び／またはヒト化抗PD-1 IgG4抗体PDR001（Novartis）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、PD-1抗体は、クローン：RMP1-14（ラットIgG）-BioXcellカタログ番号BP0146に由来する。本明細書に記載されるように、ステップA～Fにより例示されるように、本発明の方法によるTILの増殖において使用するためのPD-1陽性TILの事前選択において使用するための他の好適な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,008,449号に開示される抗PD-1抗体である。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、ニボルマブ（BMS-936558、Bristol-Myers Squibb; Opdivo（登録商標））とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、ペンブロリズマブ（ラムプロリズマブ、MK03475またはMK-3475、Merck; Keytruda（登録商標））とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、ヒト化抗PD-1抗体JS001（ShangHai JunShi）とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、モノクローナル抗PD-1抗体TSR-042（Tesar, Inc.）とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、ピジリズマブ（抗PD-1 mAb CT-011、Medivation）とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、抗PD-1モノクローナル抗体BGB-A317（BeiGene）とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、抗PD-1抗体SHR-1210（ShangHai HengRui）とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、ヒトモノクローナル抗体REGN2810（Regeneron）とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、ヒトモノクローナル抗体MDX-1106（Bristol-Myers Squibb）とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、ヒト化抗PD-1 IgG4抗体PDR001（Novartis）とは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、事前選択において使用するための抗PD-1抗体は、RMP1-14（ラットIgG）-BioXcellカタログ番号#BP0146とは異なるエピトープに結合する。ニボルマブ及びペンブロリズマブのPD-1へ

10

20

30

40

50

の結合の構造は既知であり、例えば、Tan, S. et al. (Tan, S. et al., Nature Communications, 8:14369 | DOI:10.1038/ncomms14369 (2017)、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)に記載されている。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、EH12.2H7である。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、PD1.3.1である。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、PD1.3.1ではない。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、M1H4である。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、M1H4ではない。

【0710】

いくつかの実施形態では、PD-1+細胞及び／またはPD-1陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含まない。いくつかの実施形態では、PD-1+細胞及び／またはPD-1陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含む。いくつかの実施形態では、PD-1+細胞及び／またはPD-1陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、選別緩衝液と下流緩衝液及び／または培地との間の粘度差を軽減または低減する成分を含む。いくつかの実施形態では、PD-1+細胞及び／またはPD-1陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、ヒト血清アルブミン(HSA)のみを含む。いくつかの実施形態では、PD-1+細胞及び／またはPD-1陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、等量のHSA及びPBS/EDTA緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、PD-1+細胞及び／またはPD-1陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、HSA及びPBS/EDTA緩衝液を1:1、1:2、1:3、1:4、2:1、3:1、または4:1の比率で含む。

【0711】

いくつかの実施形態では、事前選択は、第1のTIL集団からPD-1陽性TILを選択して、PD-1に富むTIL集団を取得することに関与し、少なくとも11.27%~74.4%がPD-1陽性TILである第1のTIL集団からTIL集団を選択することを含む。いくつかの実施形態では、第1のTIL集団は、少なくとも20~80%PD-1陽性TIL、少なくとも20~80%PD-1陽性TIL、少なくとも30~80%PD-1陽性TIL、少なくとも40~80%PD-1陽性TIL、少なくとも50~80%PD-1陽性TIL、少なくとも10~70%PD-1陽性TIL、少なくとも20~70%PD-1陽性TIL、少なくとも30~70%PD-1陽性TIL、または少なくとも40~70%PD-1陽性TILである。

【0712】

いくつかの実施形態では、選択ステップ(例えば、PD-1陽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、PD-1のIgVドメインの外側のN末端ループによってPD-1に結合する過剰のモノクローナル抗PD-1 IgG4抗体に曝露するステップと、

(ii) フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4抗体を追加するステップと、

(iii) 蛍光活性化細胞選別法(FACS)により行われた場合のPBMC集団の強度と比較した第1のTIL集団中のPD-1陽性TILのフルオロフォアの強度に基づいて、PD-1に富むTIL集団を取得するステップと、を含む。

【0713】

いくつかの実施形態では、PD-1陽性TILは、PD-1高TILである。

【0714】

いくつかの実施形態では、PD-1高発現は、約80%、約70%、約60%、約50%、約40%、約30%、約20%、または約10%からなる群から選択される正規化された蛍光強度の最小カットオフを使用するフローサイトメトリーによって決定される。

【0715】

いくつかの実施形態では、PD-1に富むTIL集団の少なくとも70%が、PD-1

陽性 T I L である。いくつかの実施形態では、P D - 1 に富む T I L 集団の少なくとも 80 % が、P D - 1 陽性 T I L である。いくつかの実施形態では、P D - 1 に富む 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、P D - 1 に富む T I L 集団の少なくとも 95 % が、P D - 1 陽性 T I L である。いくつかの実施形態では、P D - 1 に富む T I L 集団の少なくとも 99 % が、P D - 1 陽性 T I L である。いくつかの実施形態では、P D - 1 に富む T I L 集団の 100 % が、P D - 1 陽性 T I L である。

【0716】

いくつかの実施形態では、P D - 1 陽性 T I L の選択は、少なくとも 1×10^4 T I L の P D - 1 陽性 T I L 、少なくとも 1×10^5 T I L の P D - 1 陽性 T I L 、少なくとも 1×10^6 T I L の P D - 1 陽性 T I L 、少なくとも 1×10^7 T I L の P D - 1 陽性 T I L 、少なくとも 1×10^8 T I L の P D - 1 陽性 T I L が存在するまで行われる。いくつかの実施形態では、P D - 1 陽性 T I L の選択は、少なくとも 1×10^6 T I L の P D - 1 陽性 T I L が存在するまで行われる。

10

【0717】

異なる抗 P D - 1 抗体は、P D - 1 内の異なるエピトープに対して異なる結合特性を示す。いくつかの実施形態では、抗 P D - 1 抗体は、ペンプロリズマブとは異なるエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗 P D 1 抗体は、P D - 1 の I g V ドメインの外側の N 末端ループ内のエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、抗 P D 1 抗体は、P D - 1 の I g V ドメインの外側の N 末端ループによって結合する。いくつかの実施形態では、抗 P D - 1 抗体は、P D - 1 に結合する抗 P D - 1 抗体であり、P D - 1 の I g V ドメインの外側の N 末端ループによって結合する。いくつかの実施形態では、抗 P D - 1 抗体は、P D - 1 に結合するモノクローナル抗 P D - 1 抗体であり、P D - 1 の I g V ドメインの外側の N 末端ループによって結合する。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗 P D - 1 抗体は、P D - 1 に結合する抗 P D - 1 I g G 4 抗体であり、P D - 1 の I g V ドメインの外側の N 末端ループによって結合する。例えば、T a n , S . N a t u r e C o m m . V o l 8 , A r g i c l e 14369 : 1 - 10 (2017) を参照されたい。

20

【0718】

いくつかの実施形態では、図 1 のステップ A 2 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、P D - 1 の I g V ドメインの外側の N 末端ループによって P D - 1 に結合する過剰のモノクローナル抗 P D - 1 I g G 4 抗体に曝露するステップと、(i i) フルオロフォアに複合した過剰の抗 I g G 4 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流動系細胞選別を行って、P D - 1 に富む T I L 集団を取得するステップと、を含む。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗 P D - 1 I g G 4 抗体は、ニボルマブ、またはそのバリエーション、断片、もしくは複合体である。いくつかの実施形態では、抗 I g G 4 抗体は、クローン抗ヒト I g G 4 、クローン H P 6023 である。いくつかの実施形態では、ステップ (b) における選択において使用するための抗 P D - 1 抗体は、E H 12 . 2 H 7 またはニボルマブと同じエピトープに結合する。

30

【0719】

いくつかの実施形態では、W O 2019156568 の P D - 1 ゲーティング法が用いられる。腫瘍試料に由来する T I L が P D - 1 高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 P D - 1 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 P D - 1 陽性細胞は、蛍光から 1 つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、P D - 1 の発現レベルは、健康な対象からの C D 3 + / P D - 1 + 末梢 T 細胞 (例えば、参照細胞) において測定され、腫瘍から取得された T I L における P D - 1 の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、P D - 1 高 T 細胞の P D - 1 免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、P D - 1 発現が閾値と同じかそれを超える T I L は、P D - 1

40

50

高細胞とみなすことができる。いくつかの事例では、PD-1 高 TIL は、全 CD3+細胞の最大 1% 以下に相当する PD-1 免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、PD-1 高 TIL は、全 CD3+細胞の最大 0.75% 以下に相当する PD-1 免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、PD-1 高 TIL は、全 CD3+細胞の最大 0.50% 以下に相当する PD-1 免疫染色の強度が最も高いものを表す。1つの事例では、PD-1 高 TIL は、全 CD3+細胞の最大 0.25% 以下に相当する PD-1 免疫染色の強度が最も高いものを表す。

【0720】

NSCLC 患者。要するに、PD-1 高、PD-1 中間、及び PD-1 陰性サブセットは、それらの測定された蛍光強度に基づいて特定することができる。

10

【0721】

いくつかの実施形態では、選択された PD-1 陽性 (PD-1+) 細胞は、プライミングによる第 1 の増殖、例えば、図 1 (特に、例えば、図 1B 及び／または図 1C 及び／または図 1D 及び／または図 1E 及び／または図 1F 及び／または図 1G 及び／または図 1H) のステップ B を進める前に凍結することができる。

【0722】

a. 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 PD-1 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 PD-1 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、抗 PD-1-PE、抗 CD3-FITC、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 PD-1 抗体とのインキュベーション後、PD-1 陽性細胞は、本明細書に記載される、例えば、ステップ B におけるプライミングによる第 1 の増殖による増殖のために選択される。

20

【0723】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、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-カルボキシローダミン誘導体、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

30

40

50

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、Cy 3、Cy 3 B、Cy 3. 5、Cy 5、Cy 5. 5、及び Cy 7 が含まれるが、これらに限定されない。

【0724】

6. CD39-CD39 の選択の事前選択 (図 1 のステップ A 2 に例示される)

本発明の方法によれば、TIL は、プライミングによる第 1 の増殖の前に、CD39 陽性 (CD39+) であるように事前選択される。

【0725】

いくつかの実施形態では、本発明の TIL は、CD39 などの枯渇マーカーについて事前選択される (例えば、Canale, F. P., et al. Cancer Res. 78: 115-128 (2018)、及び/または Duhne, T., et al., Nat Commun. 9: 2724 (2018) を参照されたい)。本発明の方法によれば、TIL は、プライミングによる第 1 の増殖の前に、CD39 陽性 (CD39+) であるように事前選択される。

【0726】

いくつかの実施形態では、最低 3, 000 個の TIL が、第 1 の増殖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 の増殖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 の増殖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 の増殖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、第 1 の増殖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 の増殖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 の増殖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 の増殖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 個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、細胞を、200, 000 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 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 の TIL を提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、150, 000 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 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 の TIL を提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、250, 000 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 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 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 の増殖を開始するための 10×10^6 を与えるために 10×10^6 個の細胞である。いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖を開始するための 10×10^6 の播種密度は、 1×10^9 を超える TIL をもたらし得る。

【0727】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための TIL は、CD39 陽性 (CD39+) である (例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前)。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖におい

10

20

30

40

50

て使用するための T I L は、少なくとも 7 5 % C D 3 9 陽性、少なくとも 8 0 % C D 3 9 陽性、少なくとも 8 5 % C D 3 9 陽性、少なくとも 9 0 % C D 3 9 陽性、少なくとも 9 5 % C D 3 9 陽性、少なくとも 9 8 % C D 3 9 陽性、または少なくとも 9 9 % C D 3 9 陽性である（例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前）。いくつかの実施形態では、C D 3 9 集団は、C D 3 9 高である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための T I L は、少なくとも 2 5 % C D 3 9 高、少なくとも 3 0 % C D 3 9 高、少なくとも 3 5 % C D 3 9 高、少なくとも 4 0 % C D 3 9 高、少なくとも 4 5 % C D 3 9 高、少なくとも 5 0 % C D 3 9 高、少なくとも 5 5 % C D 3 9 高、少なくとも 6 0 % C D 3 9 高、少なくとも 6 5 % C D 3 9 高、少なくとも 7 0 % C D 3 9 高、少なくとも 7 5 % C D 3 9 高、少なくとも 8 0 % C D 3 9 高、少なくとも 8 5 % C D 3 9 高、少なくとも 9 0 % C D 3 9 高、少なくとも 9 5 % C D 3 9 高、少なくとも 9 8 % C D 3 9 高、または少なくとも 9 9 % C D 3 9 高である（例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前）。

10

【 0 7 2 8 】

いくつかの実施形態では、C D 3 9 高は、少なくとも 7 5 % C D 3 9 陽性、少なくとも 8 0 % C D 3 9 陽性、少なくとも 8 5 % C D 3 9 陽性、少なくとも 9 0 % C D 3 9 陽性、少なくとも 9 5 % C D 3 9 陽性、少なくとも 9 8 % C D 3 9 陽性、少なくとも 9 9 % C D 3 9 陽性、または 1 0 0 % C D 3 9 陽性である T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 9 高は、少なくとも 8 0 % C D 3 9 陽性である T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 9 高は、少なくとも 8 5 % C D 3 9 陽性である T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 9 高は、少なくとも 9 0 % C D 3 9 陽性である T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 9 高は、少なくとも 9 5 % C D 3 9 陽性である T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 9 高は、少なくとも 9 8 % C D 3 9 陽性である T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 9 高は、少なくとも 9 9 % C D 3 9 陽性である T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 9 高は、1 0 0 % C D 3 9 陽性である T I L 集団によって示される。

20

【 0 7 2 9 】

いくつかの実施形態では、C D 3 9 高は、T I L が対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 2 5 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 3 0 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 3 5 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 4 0 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 4 5 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 5 0 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 5 5 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 6 0 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 6 5 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 7 0 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 7 5 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 8 0 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 8 5 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 9 0 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 9 5 % 高い C D 3 9 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも少なくとも 9 9 % 高い C D 3 9 を発現する、または対照もしくはベースライン C D 3 9 レベルよりも 1 0 0 % 高い C D 3 9 を発現する、T I L 集団によって示される。

30

40

【 0 7 3 0 】

いくつかの実施形態では、C D 3 9 高は、T I L が対照またはベースライン C D 3 9 レベルよりも 1 倍以上の C D 3 9 を発現する、T I L 集団によって示される。いくつかの実

50

施形態では、CD39高は、TILが対照またはベースラインCD39レベルよりも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍以上のCD39を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD39高は、TILが対照またはベースラインCD39レベルよりも1倍以上のCD39を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD39高は、TILが対照またはベースラインCD39レベルよりも2倍以上のCD39を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD39高は、TILが対照またはベースラインCD39レベルよりも3倍以上のCD39を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD39高は、TILが対照またはベースラインCD39レベルよりも4倍以上のCD39を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD39高は、TILが対照またはベースラインCD39レベルよりも5倍以上のCD39を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD39高は、TILが対照またはベースラインCD39レベルよりも10倍以上のCD39を発現する、TIL集団によって示される。

10

【0731】

いくつかの実施形態では、CD39陽性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抗体で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗CD39抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトCD39ポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトCD39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抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗CD39抗体には、例えば、BY40 (Nikolova, M., et al. PLoS Pathog. 7, e1002110 (2011))、IPH5201、TTX-0303、SRF617、及び／または5F2が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0732】

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を発現してい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。

【0733】

いくつかの実施形態では、患者は、抗CD39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CD39抗体治療ナীবである。いくつかの実施形態では、対象は、抗CD39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CD39抗体治療後である。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後及び抗CD39抗体治療後である。いくつかの実施形態では、患者は、抗CD39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CD39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であり、かつ化学療法治療後であるが、抗CD39抗体治療ナীবである。

30

40

【0734】

患者が以前に第1の抗CD39抗体で治療されているいくつかの実施形態では、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、一次TIL細胞集団の表面上でCD39に結合することから第1の抗CD39抗体により遮断されていない第2の抗CD39抗体で染色することにより行われる。

【0735】

患者が以前に抗CD39抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次TIL細胞集団を、一次TIL細胞集団の表面上で不溶化された抗CD39抗体のFc領域に結合する抗体（「抗Fc抗体」）で染色することにより行われる。いくつかの実

50

施形態では、抗Fc抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトFcポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトFc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Fc抗体は、モノクローナル抗体である。患者が以前に抗CD39ヒトまたはヒト化IgG抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG抗体で染色される。患者が以前に抗CD39ヒトまたはヒト化IgG1抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG1抗体で染色される。患者が以前に抗CD39ヒトまたはヒト化IgG2抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG2抗体で染色される。患者が以前に抗CD39ヒトまたはヒト化IgG3抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG3抗体で染色される。患者が以前に抗CD39ヒトまたはヒト化IgG4抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG4抗体で染色される。

10

【0736】

患者が以前に抗CD39抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次TIL細胞集団を、同じ抗CD39抗体と接触させることと、次いで、一次TIL細胞集団を、一次TIL細胞集団の表面上で不溶化された抗CD39抗体のFc領域に結合する抗Fc抗体で染色することにより行われる。

【0737】

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、第1の集団及びPBMC集団の両方におけるフルオロフォアの強度を使用して、それぞれCD39陰性TIL、CD39中間TIL、及びCD39陽性TILに対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するためのFACSゲートを設定する。いくつかの実施形態では、細胞選別方法は、PBMC、FMO対照、及び試料自体を使用して3つの集団を区別して、ゲートが高、中(中間とも称される)、及び低(陰性とも称される)に設定されるように行われる。いくつかの実施形態では、PBMCは、ゲーティング対照として使用される。いくつかの実施形態では、CD39高集団は、PBMCにおいて観察されるものを超えるCD39に対して陽性である細胞集団として定義される。いくつかの実施形態では、TILのCD39+中間集団は、PBMC中のCD39+細胞を包含する。いくつかの実施形態では、陰性は、FMOに基づいてゲートされる。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／または受容す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、選別ごとに設定される。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、10日、20日、30日、40日、50日、または60日毎にPBMCから設定される。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から設定される。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

30

40

【0738】

いくつかの実施形態では、CD39事前選択のゲーティングは、事前選択手順毎に固定される。いくつかの実施形態では、固定されるゲーティング手順は、CD3+ゲーティング手順である。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別中に取得された集団に基づいて決定される。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別事象中に取得された集団がCD3+ゲーティング手順であることに基づいて決定される。

【0739】

50

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度（MFI）のゲーティング及び補正は、約0.5%±0.25%の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度（MFI）のゲーティング及び補正は、約1.75%±0.25%の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度（MFI）のゲーティング及び補正は、PBMCでCD39高ゲートを設定する場合、約1.75%±0.25%の範囲である。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの1、2、3、もしくは4以上のロットまたはバッチから測定される平均値を使用する。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの1、2、3、もしくは4以上のロットまたはバッチから測定される中央値を使用する。

【0740】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度（MFI）を決定するために使用されるFACS選別のゲーティング及び補正方法は、対照PBMC（例えば、健康なドナーからのPBMC）に対するCD39のMFIが、CD高ゲートに対して約0.5%～2.0%（例えば、約0.5%、0.55%、0.6%、0.65%、0.7%、0.75%、0.8%、0.85%、0.9%、0.95%、1.0%、1.05%、1.1%、1.15%、1.2%、1.25%、1.3%、1.35%、1.4%、1.45%、1.5%、1.55%、1.6%、1.65%、1.7%、1.75%、1.8%、1.85%、1.9%、1.95%、または2.0%）の範囲になるように調整される。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの少なくとも2つの試料を使用して測定された平均値である。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの少なくとも2つの試料を使用して測定された中央値である。

【0741】

いくつかの実施形態では、CD39陽性（CD39+）細胞は、FACS及び／または他のフローサイトメトリー法によって選別される。いくつかの実施形態では、CD39陽性TILは、CD39高TILである。いくつかの実施形態では、CD39陽性TILは、CD39中間TILである。いくつかの実施形態では、CD39+細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、CD39+細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、MiltenyiまたはFisherなどの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、CD39+高細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、CD39+高細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、MiltenyiまたはFisherなどの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、抗CD39抗体は、ビーズと直接的または間接的に複合される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択プロセスは、CD39+及びCD3+TILの両方を選択する。いくつかの実施形態では、ビーズ選択法で使用される抗CD39抗体には、例えば、BY40（Nikolova, M., et al. PLoS Pathog. 7, e1002110 (2011)）、IPH5201、TTX-0303、SRF617、及び／または5F2が含まれるが、これらに限定されない。

【0742】

いくつかの実施形態では、CD39+細胞及び／またはCD39陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含まない。いくつかの実施形態では、CD39+細胞及び／またはCD39陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含む。いくつかの実施形態では、CD39+細胞及び／またはCD39陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、選別緩衝液と下流緩衝液及び／または培地との間の粘度差を軽減または低減する成分を含む。いくつかの実施形態では、CD39+細胞及び／またはCD39陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、ヒト血清アルブミン（HSA）のみを含む。いくつかの実施形態では、CD39+細胞及び／またはCD39陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、等量のHSA及びPBS/EDTA緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、CD39+細胞及び／またはCD39陰性細胞を収

集するために利用される収集緩衝液は、HSA及びPBS／EDTA緩衝液を1：1、1：2、1：3、1：4、2：1、3：1、または4：1の比率で含む。

【0743】

いくつかの実施形態では、事前選択は、第1のTIL集団からCD39陽性TILを選択して、CD39に富むTIL集団を取得することに関与し、少なくとも11.27%～74.4%がCD39陽性TILである第1のTIL集団からTIL集団を選択することを含む。いくつかの実施形態では、第1のTIL集団は、少なくとも20～80%CD39陽性TIL、少なくとも20～80%CD39陽性TIL、少なくとも30～80%CD39陽性TIL、少なくとも40～80%CD39陽性TIL、少なくとも50～80%CD39陽性TIL、少なくとも10～70%CD39陽性TIL、少なくとも20～70%CD39陽性TIL、少なくとも30～70%CD39陽性TIL、または少なくとも40～70%CD39陽性TILである。

10

【0744】

いくつかの実施形態では、選択ステップ（例えば、CD39陽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のIgVドメインの外側のN末端ループによってCD39に結合する過剰のモノクローナル抗CD39 IgG4抗体に曝露するステップと、

（ii）フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4抗体を追加するステップと、

20

（iii）蛍光活性化細胞選別法（FACS）により行われた場合のPBMC集団の強度と比較した第1のTIL集団中のCD39陽性TILのフルオロフォアの強度に基づいて、CD39に富むTIL集団を取得するステップと、を含む。

【0745】

いくつかの実施形態では、CD39陽性TILは、CD39高TILである。

【0746】

いくつかの実施形態では、CD39に富むTIL集団の少なくとも70%が、CD39陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD39に富むTIL集団の少なくとも80%が、CD39陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD39に富むTIL集団の少なくとも90%が、CD39陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD39に富むTIL集団の少なくとも95%が、CD39陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD39に富むTIL集団の少なくとも99%が、CD39陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD39に富むTIL集団の100%が、CD39陽性TILである。

30

【0747】

いくつかの実施形態では、CD39陽性TILの選択は、少なくとも 1×10^4 TILのCD39陽性TIL、少なくとも 1×10^5 TILのCD39陽性TIL、少なくとも 1×10^6 TILのCD39陽性TIL、少なくとも 1×10^7 TILのCD39陽性TIL、少なくとも 1×10^8 TILのCD39陽性TILが存在するまで行われる。いくつかの実施形態では、CD39陽性TILの選択は、少なくとも 1×10^6 TILのCD39陽性TILが存在するまで行われる。

40

【0748】

いくつかの実施形態では、図1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、CD39のIgVドメインの外側のN末端ループによってCD39に結合する過剰のモノクローナル抗CD39 IgG4抗体に曝露するステップと、（ii）フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4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流動系細胞選別を行って、CD39に富むTIL集団を取得するステップと、を含む。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗CD39 IgG4抗体は、ニボルマブ、またはそのバリエーション、断片、もしくは複合体である。いくつかの実施形態では、抗IgG4抗体は、クローン抗ヒトIgG4、クローンHP6023で

50

ある。いくつかの実施形態では、ステップ（b）における選択において使用するための抗CD39抗体は、EH12、2H7またはニボルマブと同じエピトープに結合する。

【0749】

腫瘍試料に由来するTILがCD39高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陽性細胞は、蛍光から1つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、CD39の発現レベルは、健康な対象からのCD3+/CD39+末梢T細胞（例えば、参照細胞）において測定され、腫瘍から取得されたTILにおけるCD39の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、CD39高T細胞のCD39免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、CD39発現が閾値と同じかそれを超えるTILは、CD39高細胞とみなすことができる。いくつかの事例では、CD39高TILは、全CD3+細胞の最大1%以下に相当するCD39免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、CD39高TILは、全CD3+細胞の最大0.75%以下に相当するCD39免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、CD39高TILは、全CD3+細胞の最大0.50%以下に相当するCD39免疫染色の強度が最も高いものを表す。1つの事例では、CD39高TILは、全CD3+細胞の最大0.25%以下に相当するCD39免疫染色の強度が最も高いものを表す。

10

20

【0750】

いくつかの実施形態では、WO2019156568のPD-1ゲーティング法がCD39に用いられる。腫瘍試料に由来するTILがCD39高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陽性細胞は、蛍光から1つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、CD39の発現レベルは、健康な対象からのCD3+/CD39+末梢T細胞（例えば、参照細胞）において測定され、腫瘍から取得されたTILにおけるCD39の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、CD39高T細胞のCD39免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、CD39発現が閾値と同じかそれを超えるTILは、CD39高細胞とみなすことができる。いくつかの事例では、CD39高TILは、全CD3+細胞の最大1%以下に相当するCD39免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、CD39高TILは、全CD3+細胞の最大0.75%以下に相当するCD39免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、CD39高TILは、全CD3+細胞の最大0.50%以下に相当するCD39免疫染色の強度が最も高いものを表す。1つの事例では、CD39高TILは、全CD3+細胞の最大0.25%以下に相当するCD39免疫染色の強度が最も高いものを表す。

30

【0751】

いくつかの実施形態では、選択されたCD39陽性（CD39+）細胞は、プライミングによる第1の増殖、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）のステップBを進める前に凍結することができる。

40

【0752】

a. 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、抗CD39-PE、抗CD3-FITC、及びlive/dead青色染色（ThermoFisher

50

r、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PD1抗体とのインキュベーション後、CD39陽性細胞は、本明細書に記載される、例えば、ステップBにおけるプライミングによる第1の増殖による増殖のために選択される。

【0753】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、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。

【0754】

7. CD38-CD38の選択の事前選択 (図1のステップA2に例示される)

本発明の方法によれば、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、CD38陽性 (CD38+) であるように事前選択される。

【0755】

いくつかの実施形態では、本発明のTILは、CD38などの枯渇マーカーについて事前選択される (例えば、Canale, F. P., et al. Cancer Res. 78:115-128 (2018)、及び/またはDuhne, T., et al., Nat Commun. 9:2724 (2018)を参照されたい)。本発明の方法によれば、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、CD38陽性 (CD38+) であるように事前選択される。

【0756】

いくつかの実施形態では、最低3,000個のTILが、第1の増殖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の増殖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の増殖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 の増殖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、第 1 の増殖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 の増殖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 の増殖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 の増殖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 個の TIL をもたらす。いくつかの実施形態では、細胞を、200,000 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 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 の TIL を提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、150,000 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 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 の TIL を提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、250,000 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 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 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 の増殖を開始するための 10×10^6 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 の増殖を開始するための 10×10^6 の播種密度は、 1×10^9 を超える TIL をもたらし得る。

10

20

30

40

【0757】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための TIL は、CD38 陽性 (CD38+) である (例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前)。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための TIL は、少なくとも 75% CD38 陽性、少なくとも 80% CD38 陽性、少なくとも 85% CD38 陽性、少なくとも 90% CD38 陽性、少なくとも 95% CD38 陽性、少なくとも 98% CD38 陽性、または少なくとも 99% CD38 陽性である (例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前)。いくつかの実施形態では、CD38 集団は、CD38 低 (CD38 低) 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 の増殖において使用するための TIL は、少なくとも 25% CD38 低、少なくとも 30% CD38 低、少なくとも 35% CD38 低、少なくとも 40% CD38 低、少なくとも 45% CD38 低、少なくとも 50% CD38 低、少なくとも 55% CD38 低、少なくとも 60% CD38 低、少なくとも 65% CD38 低、少なくとも 70% CD38 低、少なくとも 75% CD38 低、少なくとも 80% CD38 低、少なくとも 85% CD38 低、少なくとも 90% CD38 低、少なくとも 95% CD38 低、少なくとも 98% CD38 低、または少なくとも 99% CD38 低である (例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前)。

【0758】

いくつかの実施形態では、CD38 低は、5% 以下の CD38 陽性、10% 以下の CD38 陽性、15% 以下の CD38 陽性、20% 以下の CD38 陽性、25% 以下の CD38 陽性、30% 以下の CD38 陽性、35% 以下の CD38 陽性、40% 以下の CD38 陽性、45% 以下の CD38 陽性、50% 以下の CD38 陽性、55% 以下の CD38 陽性、60% 以下の CD38 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 低は、5% 以下の CD38 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 低は、10% 以下の CD38 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 低は、15% 以下の CD38 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 低は、20% 以下の C

50

D 3 8 陽性である T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 8 低は、2 5 % 以下の C D 3 8 陽性である T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 8 低は、3 0 % 以下の C D 3 8 陽性である T I L 集団によって示される。

【 0 7 5 9 】

いくつかの実施形態では、C D 3 8 低は、T I L が対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 2 5 % 低い C D 3 8 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 3 0 % 低い C D 3 8 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 3 5 % 低い C D 3 8 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 4 0 % 低い C D 3 8 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 4 5 % 低い C D 3 8 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 5 0 % 低い C D 3 8 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 5 5 % 低い C D 3 8 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 6 0 % 低い C D 3 8 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 6 5 % 低い C D 3 8 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 7 0 % 低い C D 3 8 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 7 5 % 低い C D 3 8 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 8 0 % 低い C D 3 8 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 8 5 % 低い C D 3 8 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 9 0 % 低い C D 3 8 を発現する、対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 9 5 % 低い C D 3 8 を発現する、または対照もしくはベースライン C D 3 8 レベルと比較して 9 9 % 低い C D 3 8 を発現する、T I L 集団によって示される。

10

20

【 0 7 6 0 】

いくつかの実施形態では、C D 3 8 低は、T I L が対照またはベースライン C D 3 8 レベルよりも 1 倍以下の C D 3 8 を発現する、T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 8 低は、T I L が対照またはベースライン C D 3 8 レベルよりも 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、1 0 倍以下の C D 3 8 を発現する、T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 8 低は、T I L が対照またはベースライン C D 3 8 レベルよりも 1 倍以下の C D 3 8 を発現する、T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 8 低は、T I L が対照またはベースライン C D 3 8 レベルよりも 2 倍以下の C D 3 8 を発現する、T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 8 低は、T I L が対照またはベースライン C D 3 8 レベルよりも 3 倍以下の C D 3 8 を発現する、T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 8 低は、T I L が対照またはベースライン C D 3 8 レベルよりも 4 倍以下の C D 3 8 を発現する、T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 8 低は、T I L が対照またはベースライン C D 3 8 レベルよりも 5 倍以下の C D 3 8 を発現する、T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 8 低は、T I L が対照またはベースライン C D 3 8 レベルよりも 1 0 倍以下の C D 3 8 を発現する、T I L 集団によって示される。

30

【 0 7 6 1 】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための T I L は、C D 3 8 陽性 (C D 3 8 +) である (例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前)。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための T I L は、少なくとも 7 5 % C D 3 8 陽性、少なくとも 8 0 % C D 3 8 陽性、少なくとも 8 5 % C D 3 8 陽性、少なくとも 9 0 % C D 3 8 陽性、少なくとも 9 5 % C D 3 8 陽性、少なくとも 9 8 % C D 3 8 陽性、または少なくとも 9 9 % C D 3 8 陽性である (例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前)。いくつかの実施形態では、C D 3 8 集団は、C D 3 8 高である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための T I L は、少なくとも 2 5 % C D 3 8 高、少なくとも 3 0 % C D 3 8 高、少なくとも 3 5 % C D 3 8 高、少なくとも 4 0 % C D 3 8 高、少なくとも 4 5 % C D 3 8 高、少なくとも 5 0 % C D 3 8 高、少なくとも 5 5 % C D

40

50

38 高、少なくとも 60 % CD38 高、少なくとも 65 % CD38 高、少なくとも 70 % CD38 高、少なくとも 75 % CD38 高、少なくとも 80 % CD38 高、少なくとも 85 % CD38 高、少なくとも 90 % CD38 高、少なくとも 95 % CD38 高、少なくとも 98 % CD38 高、または少なくとも 99 % CD38 高である（例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前）。

【0762】

いくつかの実施形態では、CD38 高は、少なくとも 75 % CD38 陽性、少なくとも 80 % CD38 陽性、少なくとも 85 % CD38 陽性、少なくとも 90 % CD38 陽性、少なくとも 95 % CD38 陽性、少なくとも 98 % CD38 陽性、少なくとも 99 % CD38 陽性、または 100 % CD38 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 高は、少なくとも 80 % CD38 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 高は、少なくとも 85 % CD38 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 高は、少なくとも 90 % CD38 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 高は、少なくとも 95 % CD38 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 高は、少なくとも 98 % CD38 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 高は、少なくとも 99 % CD38 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 高は、100 % CD38 陽性である TIL 集団によって示される。

【0763】

いくつかの実施形態では、CD38 高は、TIL が対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 25 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 30 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 35 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 40 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 45 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 50 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 55 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 60 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 65 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 70 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 75 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 80 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 85 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 90 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 95 % 高い CD38 を発現する、対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも少なくとも 99 % 高い CD38 を発現する、または対照もしくはベースライン CD38 レベルよりも 100 % 高い CD38 を発現する、TIL 集団によって示される。

【0764】

いくつかの実施形態では、CD38 高は、TIL が対照またはベースライン CD38 レベルよりも 1 倍以上の CD38 を発現する、TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 高は、TIL が対照またはベースライン CD38 レベルよりも 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍以上の CD38 を発現する、TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 高は、TIL が対照またはベースライン CD38 レベルよりも 1 倍以上の CD38 を発現する、TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 高は、TIL が対照またはベースライン CD38 レベルよりも 2 倍以上の CD38 を発現する、TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 高は、TIL が対照またはベースライン CD38 レベルよりも 3 倍以上の CD38 を発現する、TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD38 高は

、T I L が対照またはベースラインC D 3 8 レベルよりも4 倍以上のC D 3 8 を発現する、T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 8 高は、T I L が対照またはベースラインC D 3 8 レベルよりも5 倍以上のC D 3 8 を発現する、T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、C D 3 8 高は、T I L が対照またはベースラインC D 3 8 レベルよりも1 0 倍以上のC D 3 8 を発現する、T I L 集団によって示される。

【0 7 6 5】

いくつかの実施形態では、C D 3 8 陽性T I L 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T I L を抗C D 3 8 抗体で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗C D 3 8 抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトC D 3 8 ポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトC D 3 8 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C D 3 8 抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗C D 3 8 抗体には、例えば、M O R 0 3 0 8 7、ダラツムマブ、G S K 2 8 5 7 9 1 6、M O R 2 0 2、S T I - 6 1 2 9、イサツキシマブ（S A R 6 5 0 9 8 4）、及び／またはT A K - 0 7 9 が含まれるが、これらに限定されない。

【0 7 6 6】

いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗C D 3 8 抗体は、C D 3 8 を発現している細胞の少なくとも7 5 %、少なくとも8 0 %、少なくとも8 5 %、少なくとも9 0 %、少なくとも9 5 %、少なくとも9 8 %、少なくとも9 9 %、または少なくとも1 0 0 %に結合する。

【0 7 6 7】

いくつかの実施形態では、患者は、抗C D 3 8 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C D 3 8 抗体治療ナীবである。いくつかの実施形態では、対象は、抗C D 3 8 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C D 3 8 抗体治療後である。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後及び抗C D 3 8 抗体治療後である。いくつかの実施形態では、患者は、抗C D 3 8 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C D 3 8 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であり、かつ化学療法治療後であるが、抗C D 3 8 抗体治療ナীবである。

【0 7 6 8】

患者が以前に第1の抗C D 3 8 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、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T I L を、一次T I L 細胞集団の表面上でC D 3 8 に結合することから第1の抗C D 3 8 抗体により遮断されていない第2の抗C D 3 8 抗体で染色することにより行われる。

【0 7 6 9】

患者が以前に抗C D 3 8 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次T I L 細胞集団を、一次T I L 細胞集団の表面上で不溶化された抗C D 3 8 抗体のF c 領域に結合する抗体（「抗F c 抗体」）で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗F c 抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトF c ポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトF c 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F c 抗体は、モノクローナル抗体である。患者が以前に抗C D 3 8 ヒトまたはヒト化I g G 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次T I L 細胞集団は、抗ヒトI g G 抗体で染色される。患者が以前に抗C D 3 8 ヒトまたはヒト化I g G 1 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次T I L 細胞集団は、抗ヒトI g G 1 抗体で染色される。患者が以前に抗C D 3 8 ヒトまたはヒト化I g G 2 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次T I L 細胞集団は、抗ヒトI g G 2 抗体で染色される。患者が以前に抗C D 3 8 ヒトまたはヒト化I g G 3 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次

T I L 細胞集団は、抗ヒト I g G 3 抗体で染色される。患者が以前に抗 C D 3 8 ヒトまたはヒト化 I g G 4 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次 T I L 細胞集団は、抗ヒト I g G 4 抗体で染色される。

【 0 7 7 0 】

患者が以前に抗 C D 3 8 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次 T I L 細胞集団を、同じ抗 C D 3 8 抗体と接触させることと、次いで、一次 T I L 細胞集団を、一次 T I L 細胞集団の表面上で不溶化された抗 C D 3 8 抗体の F c 領域に結合する抗 F c 抗体で染色することにより行われる。

【 0 7 7 1 】

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 (F A C S) である。いくつかの実施形態では、第 1 の集団及び P B M C 集団の両方におけるフルオロフォアの強度を使用して、それぞれ C D 3 8 陰性 T I L 、 C D 3 8 中間 T I L 、 及び C D 3 8 陽性 T I L に対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するための F A C S ゲートを設定する。いくつかの実施形態では、細胞選別方法は、 P B M C 、 F M O 対照、及び試料自体を使用して 3 つの集団を区別して、ゲートが高、中 (中間とも称される) 、 及び低 (陰性とも称される) に設定されるように行われる。いくつかの実施形態では、 P B M C は、ゲーティング対照として使用される。いくつかの実施形態では、 C D 3 8 高集団は、 P B M C において観察されるものを超える C D 3 8 に対して陽性である細胞集団として定義される。いくつかの実施形態では、 T I L の C D 3 8 + 中間集団は、 P B M C 中の C D 3 8 + 細胞を包含する。いくつかの実施形態では、陰性は、 F M O に基づいてゲートされる。いくつかの実施形態では、 F A C S 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 T I L 集団を取得及び／または受容す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、選別ごとに設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、 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、ゲーティングは、 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、 1 0 日、 2 0 日、 3 0 日、 4 0 日、 5 0 日、または 6 0 日毎に P B M C から設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、 6 0 日毎に P B M C から設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングテンプレートは、 1 0 日、 2 0 日、 3 0 日、 4 0 日、 5 0 日、または 6 0 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、 6 0 日毎に P B M C の各試料に対して設定される。

【 0 7 7 2 】

いくつかの実施形態では、 C D 3 8 事前選択のゲーティングは、事前選択手順毎に固定される。いくつかの実施形態では、固定されるゲーティング手順は、 C D 3 + ゲーティング手順である。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別中に取得された集団に基づいて決定される。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別事象中に取得された集団が C D 3 + ゲーティング手順であることに基づいて決定される。

【 0 7 7 3 】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (M F I) のゲーティング及び補正は、約 0 . 5 % ± 0 . 2 5 % の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (M F I) のゲーティング及び補正は、約 1 . 7 5 % ± 0 . 2 5 % の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (M F I) のゲーティング及び補正は、 P B M C で C D 3 8 高ゲートを設定する場合、約 1 . 7 5 % ± 0 . 2 5 % の範囲である。いくつかの実施形態では、 M F I 計算は、 P B M C の 1 、 2 、 3 、もしくは 4 以上のロットまたはバッチから測定される平均値を使用する。いくつかの実施形態では、 M F I 計算は、 P B M C の 1 、 2 、 3 、もしくは 4 以上のロットまたはバッチから測定される中央値を使用する。

【 0 7 7 4 】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度（MFI）を決定するために使用されるFACS選別のゲーティング及び補正方法は、対照PBMC（例えば、健康なドナーからのPBMC）に対するCD38のMFIが、CD38高ゲートに対して約0.5%～2.0%（例えば、約0.5%、0.55%、0.6%、0.65%、0.7%、0.75%、0.8%、0.85%、0.9%、0.95%、1.0%、1.05%、1.1%、1.15%、1.2%、1.25%、1.3%、1.35%、1.4%、1.45%、1.5%、1.55%、1.6%、1.65%、1.7%、1.75%、1.8%、1.85%、1.9%、1.95%、または2.0%）の範囲になるように調整される。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの少なくとも2つの試料を使用して測定された平均値である。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの少なくとも2つの試料を使用して測定された中央値である。

10

【0775】

いくつかの実施形態では、CD38陽性（CD38+）細胞は、FAC及び／または他のフローサイトメトリー法によって選別される。いくつかの実施形態では、CD38陽性TILは、CD38高TILである。いくつかの実施形態では、CD38陽性TILは、CD38中間TILである。いくつかの実施形態では、CD38+細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、CD38+細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、MiltenyiまたはFisherなどの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、CD38+高細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、CD38+高細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、MiltenyiまたはFisherなどの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、抗CD38抗体は、ビーズと直接的または間接的に複合される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択プロセスは、CD38+及びCD3+TILの両方を選択する。いくつかの実施形態では、ビーズ選択法で使用する抗CD38抗体には、例えば、MOR03087、ダラツムマブ、GSK2857916、MOR202、STI-6129、イサツキシマブ（SAR650984）、及び／またはTAK-079が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0776】

いくつかの実施形態では、CD38+細胞及び／またはCD38陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含まない。いくつかの実施形態では、CD38+細胞及び／またはCD38陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含む。いくつかの実施形態では、CD38+細胞及び／またはCD38陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、選別緩衝液と下流緩衝液及び／または培地との間の粘度差を軽減または低減する成分を含む。いくつかの実施形態では、CD38+細胞及び／またはCD38陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、ヒト血清アルブミン（HSA）のみを含む。いくつかの実施形態では、CD38+細胞及び／またはCD38陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、等量のHSA及びPBS/EDTA緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、CD38+細胞及び／またはCD38陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、HSA及びPBS/EDTA緩衝液を1:1、1:2、1:3、1:4、2:1、3:1、または4:1の比率で含む。

40

【0777】

いくつかの実施形態では、事前選択は、第1のTIL集団からCD38陽性TILを選択して、CD38に富むTIL集団を取得することに関与し、少なくとも11.27%～74.4%がCD38陽性TILである第1のTIL集団からTIL集団を選択することを含む。いくつかの実施形態では、第1のTIL集団は、少なくとも20～80%CD38陽性TIL、少なくとも20～80%CD38陽性TIL、少なくとも30～80%CD38陽性TIL、少なくとも40～80%CD38陽性TIL、少なくとも50～80

50

%CD38陽性TIL、少なくとも10～70%CD38陽性TIL、少なくとも20～70%CD38陽性TIL、少なくとも30～70%CD38陽性TIL、または少なくとも40～70%CD38陽性TILである。

【0778】

いくつかの実施形態では、選択ステップ（例えば、CD38陽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、CD38のIgVドメインの外側のN末端ループによってCD38に結合する過剰のモノクローナル抗CD38 IgG4抗体に曝露するステップと、

（ii）フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4抗体を追加するステップと

10

、
（iii）蛍光活性化細胞選別法（FACS）により行われた場合のPBMC集団の強度と比較した第1のTIL集団中のCD38陽性TILのフルオロフォアの強度に基づいて、CD38に富むTIL集団を取得するステップと、を含む。

【0779】

いくつかの実施形態では、CD38陽性TILは、CD38高TILである。

【0780】

いくつかの実施形態では、CD38に富むTIL集団の少なくとも70%が、CD38陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD38に富むTIL集団の少なくとも80%が、CD38陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD38に富むTIL集団の少なくとも90%が、CD38陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD38に富むTIL集団の少なくとも95%が、CD38陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD38に富むTIL集団の少なくとも99%が、CD38陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD38に富むTIL集団の100%が、CD38陽性TILである。

20

【0781】

いくつかの実施形態では、CD38陽性TILの選択は、少なくとも 1×10^4 TILのCD38陽性TIL、少なくとも 1×10^5 TILのCD38陽性TIL、少なくとも 1×10^6 TILのCD38陽性TIL、少なくとも 1×10^7 TILのCD38陽性TIL、少なくとも 1×10^8 TILのCD38陽性TILが存在するまで行われる。いくつかの実施形態では、CD38陽性TILの選択は、少なくとも 1×10^6 TILのCD38陽性TILが存在するまで行われる。

30

【0782】

いくつかの実施形態では、図1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、CD38のIgVドメインの外側のN末端ループによってCD38に結合する過剰のモノクローナル抗CD38 IgG4抗体に曝露するステップと、（ii）フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4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流動系細胞選別を行って、CD38に富むTIL集団を取得するステップと、を含む。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗CD38 IgG4抗体は、ニボルマブ、またはそのバリエーション、断片、もしくは複合体である。いくつかの実施形態では、抗IgG4抗体は、クローン抗ヒトIgG4、クローンHP6023である。いくつかの実施形態では、ステップ（b）における選択において使用するための抗CD38抗体は、EH12、2H7またはニボルマブと同じエピトープに結合する。

40

【0783】

腫瘍試料に由来するTILがCD38高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CD38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CD38陽性細胞は、蛍光から1つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、CD38の発現レベルは、健康な対象からのCD3+ / CD38+末梢T細胞（例えば、参照細胞）において測定され、腫瘍から取得された

50

T I LにおけるC D 3 8の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、C D 3 8高T細胞のC D 3 8免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、C D 3 8発現が閾値と同じかそれを超えるT I Lは、C D 3 8高細胞とみなすことができる。いくつかの事例では、C D 3 8高T I Lは、全C D 3 +細胞の最大1 %以下に相当するC D 3 8免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、C D 3 8高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 8免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、C D 3 8高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 8免疫染色の強度が最も高いものを表す。1つの事例では、C D 3 8高T I Lは、全C D 3 +細胞の最大0 . 2 5 %以下に相当するC D 3 8免疫染色の強度が最も高いものを表す。

10

【0784】

いくつかの実施形態では、W O 2 0 1 9 1 5 6 5 6 8のP D - 1ゲーティング法がC D 3 8に用いられる。腫瘍試料に由来するT I LがC D 3 8高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 8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 8陽性細胞は、蛍光から1つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、C D 3 8の発現レベルは、健康な対象からのC D 3 + / C D 3 8 +末梢T細胞（例えば、参照細胞）において測定され、腫瘍から取得されたT I LにおけるC D 3 8の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、C D 3 8高T細胞のC D 3 8免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、C D 3 8発現が閾値と同じかそれを超えるT I Lは、C D 3 8高細胞とみなすことができる。いくつかの事例では、C D 3 8高T I Lは、全C D 3 +細胞の最大1 %以下に相当するC D 3 8免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、C D 3 8高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 8免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、C D 3 8高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 8免疫染色の強度が最も高いものを表す。1つの事例では、C D 3 8高T I Lは、全C D 3 +細胞の最大0 . 2 5 %以下に相当するC D 3 8免疫染色の強度が最も高いものを表す。

20

【0785】

いくつかの実施形態では、選択されたC D 3 8陽性（C D 3 8 +）細胞は、プライミングによる第1の増殖、例えば、図1（特に、例えば、図1 B及び／または図1 C及び／または図1 D及び／または図1 E及び／または図1 F及び／または図1 G及び／または図1 H）のステップBを進める前に凍結することができる。

30

【0786】

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 8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 8抗体（例えば、P E、l i v e / d e a d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、抗C D 3 8 - P E、抗C D 3 - F I T C、及びl i v e / d e a d青色染色（T h e r m o F i s h e r、M A、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 8抗体とのインキュベーション後、C D 3 8陽性細胞は、本明細書に記載される、例えば、ステップBにおけるプライミングによる第1の増殖による増殖のために選択される。

40

【0787】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、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

50

h t 550、A l e x a F l u o r 647、D y L i g h t 650、及びA l e x a F l u o r 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、P E - A l e x a F l u o r（登録商標）647、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）750、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G A B A、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-c y s - C y 5、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（T E X A S R E D（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、C y 3、C y 3 B、C y 3.5、C y 5、C y 5.5、及びC y 7が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0788】

8. C D 1 0 3 - C D 1 0 3 の選択の事前選択（図1のステップA2に例示される）

本発明の方法によれば、T I L は、プライミングによる第1の増殖の前に、C D 1 0 3 陽性（C D 1 0 3 +）であるように事前選択される。

【0789】

いくつかの実施形態では、本発明のT I L は、C D 1 0 3 などの枯渇マーカーについて事前選択される（ $\alpha e \beta 7$ または $\alpha E \beta 7$ としても知られており、例えば、D u h n e , T . , e t a l . , N a t C o m m u n . 9 : 2 7 2 4（2018）を参照されたい）。本発明の方法によれば、T I L は、プライミングによる第1の増殖の前に、C D 1 0 3 陽性（C D 1 0 3 +）であるように事前選択される。

【0790】

いくつかの実施形態では、最低3,000個のT I L が、第1の増殖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個のT I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低4,000個のT I L が、第1の増殖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個のT I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低5,000個のT I L が、第1の増殖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個のT I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低6,000個のT I L が、第1の増殖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個のT I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低7,000個のT I L が、第1の増殖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個のT I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低8,000個のT I L が、第1の増殖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個のT I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低9,000個のT I L が、第1の増殖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個のT I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低10,000個のT I L が、第1の増殖に播種する

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個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、細胞を、200,000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の密度まで成長または拡張させて、急速な第2の増殖を開始するための約 2×10^8 のTILを提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、150,000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の密度まで成長または拡張させて、急速な第2の増殖を開始するための約 2×10^8 のTILを提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、250,000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の密度まで成長または拡張させて、急速な第2の増殖を開始するための約 2×10^8 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の増殖を開始するための 10×10^6 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の増殖を開始するための 10×10^6 の播種密度は、 1×10^9 を超えるTILをもたらし得る。

10

【0791】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖において使用するためのTILは、CD103陽性(CD103+)である(例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第1の増殖の前)。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖において使用するためのTILは、少なくとも75%CD103陽性、少なくとも80%CD103陽性、少なくとも85%CD103陽性、少なくとも90%CD103陽性、少なくとも95%CD103陽性、少なくとも98%CD103陽性、または少なくとも99%CD103陽性である(例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第1の増殖の前)。いくつかの実施形態では、CD103集団は、CD103高である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖において使用するためのTILは、少なくとも25%CD103高、少なくとも30%CD103高、少なくとも35%CD103高、少なくとも40%CD103高、少なくとも45%CD103高、少なくとも50%CD103高、少なくとも55%CD103高、少なくとも60%CD103高、少なくとも65%CD103高、少なくとも70%CD103高、少なくとも75%CD103高、少なくとも80%CD103高、少なくとも85%CD103高、少なくとも90%CD103高、少なくとも95%CD103高、少なくとも98%CD103高、または少なくとも99%CD103高である(例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第1の増殖の前)。

20

30

【0792】

いくつかの実施形態では、CD103高は、少なくとも75%CD103陽性、少なくとも80%CD103陽性、少なくとも85%CD103陽性、少なくとも90%CD103陽性、少なくとも95%CD103陽性、少なくとも98%CD103陽性、少なくとも99%CD103陽性、または100%CD103陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD103高は、少なくとも80%CD103陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD103高は、少なくとも85%CD103陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD103高は、少なくとも90%CD103陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD103高は、少なくとも95%CD103陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD103高は、少なくとも98%CD103陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD103高は、少なくとも99%CD103陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD103高は、100%CD103陽性であるTIL集団によって示される。

40

【0793】

いくつかの実施形態では、CD103高は、TILが対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも25%高いCD103を発現する、対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも30%高いCD103を発現する、対照もしくはベ

50

ースラインCD103レベルよりも少なくとも35%高いCD103を発現する、対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも40%高いCD103を発現する、対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも45%高いCD103を発現する、対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも50%高いCD103を発現する、対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも55%高いCD103を発現する、対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも60%高いCD103を発現する、対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも65%高いCD103を発現する、対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも70%高いCD103を発現する、対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも75%高いCD103を発現する、対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも80%高いCD103を発現する、対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも85%高いCD103を発現する、対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも90%高いCD103を発現する、対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも95%高いCD103を発現する、対照もしくはベースラインCD103レベルよりも少なくとも99%高いCD103を発現する、または対照もしくはベースラインCD103レベルよりも100%高いCD103を発現する、TIL集団によって示される。

10

【0794】

いくつかの実施形態では、CD103高は、TILが対照またはベースラインCD103レベルよりも1倍以上のCD103を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD103高は、TILが対照またはベースラインCD103レベルよりも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍以上のCD103を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD103高は、TILが対照またはベースラインCD103レベルよりも1倍以上のCD103を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD103高は、TILが対照またはベースラインCD103レベルよりも2倍以上のCD103を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD103高は、TILが対照またはベースラインCD103レベルよりも3倍以上のCD103を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD103高は、TILが対照またはベースラインCD103レベルよりも4倍以上のCD103を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD103高は、TILが対照またはベースラインCD103レベルよりも5倍以上のCD103を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD103高は、TILが対照またはベースラインCD103レベルよりも10倍以上のCD103を発現する、TIL集団によって示される。

20

30

【0795】

いくつかの実施形態では、CD103陽性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CD103抗体で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗CD103抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトCD103ポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトCD103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CD103抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗CD103抗体には、例えば、APC（17-1031-82）、Ber-ACT8、及び／またはM290が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0796】

いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗CD103抗体は、CD103を発現してい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。

【0797】

いくつかの実施形態では、患者は、抗CD103抗体で治療されている。いくつかの実

50

施形態では、対象は、抗CD103抗体治療ナীবである。いくつかの実施形態では、対象は、抗CD103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CD103抗体治療後である。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後及び抗CD103抗体治療後である。いくつかの実施形態では、患者は、抗CD103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CD103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であり、かつ化学療法治療後であるが、抗CD103抗体治療ナীবである。

10

【0798】

患者が以前に第1の抗CD103抗体で治療されているいくつかの実施形態では、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、一次TIL細胞集団の表面上でCD103に結合することから第1の抗CD103抗体により遮断されていない第2の抗CD103抗体で染色することにより行われる。

【0799】

患者が以前に抗CD103抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次TIL細胞集団を、一次TIL細胞集団の表面上で不溶化された抗CD103抗体のFc領域に結合する抗体（「抗Fc抗体」）で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗Fc抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトFcポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトFc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Fc抗体は、モノクローナル抗体である。患者が以前に抗CD103ヒトまたはヒト化IgG抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG抗体で染色される。患者が以前に抗CD103ヒトまたはヒト化IgG1抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG1抗体で染色される。患者が以前に抗CD103ヒトまたはヒト化IgG2抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG2抗体で染色される。患者が以前に抗CD103ヒトまたはヒト化IgG3抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG3抗体で染色される。患者が以前に抗CD103ヒトまたはヒト化IgG4抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG4抗体で染色される。

20

30

【0800】

患者が以前に抗CD103抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次TIL細胞集団を、同じ抗CD103抗体と接触させることと、次いで、一次TIL細胞集団を、一次TIL細胞集団の表面上で不溶化された抗CD103抗体のFc領域に結合する抗Fc抗体で染色することとにより行われる。

【0801】

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、第1の集団及びPBMC集団の両方におけるフルオロフォアの強度を使用して、それぞれCD103陰性TIL、CD103中間TIL、及びCD103陽性TILに対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するためのFACSゲートを設定する。いくつかの実施形態では、細胞選別方法は、PBMC、FMO対照、及び試料自体を使用して3つの集団を区別して、ゲートが高、中（中間とも称される）、及び低（陰性とも称される）に設定されるように行われる。いくつかの実施形態では、PBMCは、ゲーティング対照として使用される。いくつかの実施形態では、CD103高集団は、PBMCにおいて観察されるものを超えるCD103に対して陽性である細胞集団として定義される。いくつかの実施形態では、TILのCD103+中間集団は、PBMC中のCD103+細胞を包含する。いくつかの実施形態では、陰性は、FMOに基づいてゲートされる。いくつかの実施形態では、FACSゲートは、対象から

40

50

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／または受容す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、選別ごとに設定される。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、10日、20日、30日、40日、50日、または60日毎にPBMCから設定される。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から設定される。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。

10

【0802】

いくつかの実施形態では、CD103事前選択のゲーティングは、事前選択手順毎に固定される。いくつかの実施形態では、固定されるゲーティング手順は、CD3+ゲーティング手順である。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別中に取得された集団に基づいて決定される。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別事象中に取得された集団がCD3+ゲーティング手順であることに基づいて決定される。

【0803】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度(MFI)のゲーティング及び補正は、約0.5%±0.25%の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度(MFI)のゲーティング及び補正は、約1.75%±0.25%の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度(MFI)のゲーティング及び補正は、PBMCでCD103高ゲートを設定する場合、約1.75%±0.25%の範囲である。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの1、2、3、もしくは4以上のロットまたはバッチから測定される平均値を使用する。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの1、2、3、もしくは4以上のロットまたはバッチから測定される中央値を使用する。

20

【0804】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度(MFI)を決定するために使用されるFACS選別のゲーティング及び補正方法は、対照PBMC(例えば、健康なドナーからのPBMC)に対するCD103のMFIが、CD103高ゲートに対して約0.5%~2.0%(例えば、約0.5%、0.55%、0.6%、0.65%、0.7%、0.75%、0.8%、0.85%、0.9%、0.95%、1.0%、1.05%、1.1%、1.15%、1.2%、1.25%、1.3%、1.35%、1.4%、1.45%、1.5%、1.55%、1.6%、1.65%、1.7%、1.75%、1.8%、1.85%、1.9%、1.95%、または2.0%)の範囲になるように調整される。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの少なくとも2つの試料を使用して測定された平均値である。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの少なくとも2つの試料を使用して測定された中央値である。

30

【0805】

いくつかの実施形態では、CD103陽性(CD103+)細胞は、FACS及び／または他のフローサイトメトリー法によって選別される。いくつかの実施形態では、CD103陽性TILは、CD103高TILである。いくつかの実施形態では、CD103陽性TILは、CD103中間TILである。いくつかの実施形態では、CD103+細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、CD103+細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、MiltenyiまたはFisherなどの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、CD103+高細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、CD103+高細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別され

40

50

る。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、M i l t e n y i または F i s h e r などの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、抗 C D 1 0 3 抗体は、ビーズと直接的または間接的に複合される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択プロセスは、C D 1 0 3 + 及び C D 3 + T I L の両方を選択する。いくつかの実施形態では、ビーズ選択法で使用する抗 C D 1 0 3 抗体には、例えば、A P C (1 7 - 1 0 3 1 - 8 2) 、 B e r - A C T 8 、 及び / または M 2 9 0 が含まれるが、これらに限定されない。

【0806】

いくつかの実施形態では、C D 1 0 3 + 細胞及び / または C D 1 0 3 陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含まない。いくつかの実施形態では、C D 1 0 3 + 細胞及び / または C D 1 0 3 陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含む。いくつかの実施形態では、C D 1 0 3 + 細胞及び / または C D 1 0 3 陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、選別緩衝液と下流緩衝液及び / または培地との間の粘度差を軽減または低減する成分を含む。いくつかの実施形態では、C D 1 0 3 + 細胞及び / または C D 1 0 3 陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、ヒト血清アルブミン (H S A) のみを含む。いくつかの実施形態では、C D 1 0 3 + 細胞及び / または C D 1 0 3 陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、等量の H S A 及び P B S / E D T A 緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、C D 1 0 3 + 細胞及び / または C D 1 0 3 陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、H S A 及び P B S / E D T A 緩衝液を 1 : 1 、 1 : 2 、 1 : 3 、 1 : 4 、 2 : 1 、 3 : 1 、 または 4 : 1 の比率で含む。

【0807】

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 C D 1 0 3 陽性 T I L を選択して、C D 1 0 3 に富む T I L 集団を取得することに関与し、少なくとも 1 1 . 2 7 % ~ 7 4 . 4 % が C D 1 0 3 陽性 T I L である第 1 の T I L 集団から T I L 集団を選択することを含む。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 2 0 ~ 8 0 % C D 1 0 3 陽性 T I L 、 少なくとも 2 0 ~ 8 0 % C D 1 0 3 陽性 T I L 、 少なくとも 3 0 ~ 8 0 % C D 1 0 3 陽性 T I L 、 少なくとも 4 0 ~ 8 0 % C D 1 0 3 陽性 T I L 、 少なくとも 5 0 ~ 8 0 % C D 1 0 3 陽性 T I L 、 少なくとも 1 0 ~ 7 0 % C D 1 0 3 陽性 T I L 、 少なくとも 2 0 ~ 7 0 % C D 1 0 3 陽性 T I L 、 少なくとも 3 0 ~ 7 0 % C D 1 0 3 陽性 T I L 、 または 少なくとも 4 0 ~ 7 0 % C D 1 0 3 陽性 T I L である。

【0808】

いくつかの実施形態では、選択ステップ (例えば、C D 1 0 3 陽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 1 0 3 の I g V ドメインの外側の N 末端ループによって C D 1 0 3 に結合する過剰のモノクローナル抗 C D 1 0 3 I g G 4 抗体に曝露するステップと、

(i i) フルオロフォアに複合した過剰の抗 I g G 4 抗体を追加するステップと、

(i i i) 蛍光活性化細胞選別法 (F A C S) により行われた場合の P B M C 集団の強度と比較した第 1 の T I L 集団中の C D 1 0 3 陽性 T I L のフルオロフォアの強度に基づいて、C D 1 0 3 に富む T I L 集団を取得するステップと、を含む。

【0809】

いくつかの実施形態では、C D 1 0 3 陽性 T I L は、C D 1 0 3 高 T I L である。

【0810】

いくつかの実施形態では、C D 1 0 3 に富む T I L 集団の少なくとも 7 0 % が、C D 1 0 3 陽性 T I L である。いくつかの実施形態では、C D 1 0 3 に富む T I L 集団の少なくとも 8 0 % が、C D 1 0 3 陽性 T I L である。いくつかの実施形態では、C D 1 0 3 に富む T I L 集団の少なくとも 9 0 % が、C D 1 0 3 陽性 T I L である。いくつかの実施形態では、C D 1 0 3 に富む T I L 集団の少なくとも 9 5 % が、C D 1 0 3 陽性 T I L である

。いくつかの実施形態では、CD103に富むTIL集団の少なくとも99%が、CD103陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD103に富むTIL集団の100%が、CD103陽性TILである。

【0811】

いくつかの実施形態では、CD103陽性TILの選択は、少なくとも 1×10^4 TILのCD103陽性TIL、少なくとも 1×10^5 TILのCD103陽性TIL、少なくとも 1×10^6 TILのCD103陽性TIL、少なくとも 1×10^7 TILのCD103陽性TIL、少なくとも 1×10^8 TILのCD103陽性TILが存在するまで行われる。いくつかの実施形態では、CD103陽性TILの選択は、少なくとも 1×10^6 TILのCD103陽性TILが存在するまで行われる。

10

【0812】

いくつかの実施形態では、図1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、CD103のIgVドメインの外側のN末端ループによってCD103に結合する過剰のモノクローナル抗CD103 IgG4抗体に曝露するステップと、(ii)フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4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流動系細胞選別を行って、CD103に富むTIL集団を取得するステップと、を含む。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗CD103 IgG4抗体は、ニボルマブ、またはそのバリエーション、断片、もしくは複合体である。いくつかの実施形態では、抗IgG4抗体は、クローン抗ヒトIgG4、クローンHP6023である。いくつかの実施形態では、ステップ(b)における選択において使用するための抗CD103抗体は、EH12、2H7またはニボルマブと同じエピトープに結合する。

20

【0813】

腫瘍試料に由来するTILがCD103高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CD103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CD103陽性細胞は、蛍光から1つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、CD103の発現レベルは、健康な対象からのCD3+/CD103+末梢T細胞（例えば、参照細胞）において測定され、腫瘍から取得されたTILにおけるCD103の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、CD103高T細胞のCD103免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、CD103発現が閾値と同じかそれを超えるTILは、CD103高細胞とみなすことができる。いくつかの事例では、CD103高TILは、全CD3+細胞の最大1%以下に相当するCD103免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、CD103高TILは、全CD3+細胞の最大0.75%以下に相当するCD103免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、CD103高TILは、全CD3+細胞の最大0.50%以下に相当するCD103免疫染色の強度が最も高いものを表す。1つの事例では、CD103高TILは、全CD3+細胞の最大0.25%以下に相当するCD103免疫染色の強度が最も高いものを表す。

30

【0814】

いくつかの実施形態では、WO2019156568のPD-1ゲーティング法がCD103に用いられる。腫瘍試料に由来するTILがCD103高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CD103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CD103陽性細胞は、蛍光から1つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、CD103の発現レベルは、健康な対象からのCD3+/CD103+末梢T細胞（例えば、参照細胞）において測定され、腫瘍から取得されたTILにおけるCD103の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、CD103高T細胞のCD103免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、CD103発現が閾値と同じか

40

50

それを超える T I L は、C D 1 0 3 高細胞とみなすことができる。いくつかの事例では、C D 1 0 3 高 T I L は、全 C D 3 + 細胞の最大 1 % 以下に相当する C D 1 0 3 免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、C D 1 0 3 高 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 1 0 3 免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、C D 1 0 3 高 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 1 0 3 免疫染色の強度が最も高いものを表す。1 つの事例では、C D 1 0 3 高 T I L は、全 C D 3 + 細胞の最大 0 . 2 5 % 以下に相当する C D 1 0 3 免疫染色の強度が最も高いものを表す。

【 0 8 1 5 】

いくつかの実施形態では、選択された C D 1 0 3 陽性 (C D 1 0 3 +) 細胞は、プライミングによる第 1 の増殖、例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 D 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G 及び / または図 1 H) のステップ B を進める前に凍結することができる。

【 0 8 1 6 】

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 1 0 3 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 1 0 3 抗体 (例えば、P E 、 l i v e / d e a d 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、抗 C D 1 0 3 - P E 、抗 C D 3 - F I T C 、及び l i v e / d e a d 青色染色 (T h e r m o F i s h e r 、 M A 、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 P D 1 抗体とのインキュベーション後、C D 1 0 3 陽性細胞は、本明細書に記載される、例えば、ステップ B におけるプライミングによる第 1 の増殖による増殖のために選択される。

【 0 8 1 7 】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、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 G A B A 、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 - c y s - C y 5 、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 1 1 0 、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 1 0 1 スルホニルクロリド (T E X A S R E D (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

10

20

30

40

50

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、Cy 3、Cy 3 B、Cy 3 . 5、Cy 5、Cy 5 . 5、及びCy 7が含まれるが、これらに限定されない。

【0818】

9. CD101-CD101の選択の事前選択（図1のステップA2に例示される）

本発明の方法によれば、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、CD101陽性（CD101+）であるように事前選択される。

【0819】

いくつかの実施形態では、本発明のTILは、CD101などの枯渇マーカーについて事前選択される（Philip, M., et al., Nature. 545 (7655) : 452-456 (2017)）。本発明の方法によれば、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、CD101陽性（CD101+）であるように事前選択される。

【0820】

いくつかの実施形態では、最低3,000個のTILが、第1の増殖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の増殖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の増殖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の増殖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、第1の増殖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の増殖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の増殖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の増殖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個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、細胞を、200,000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の密度まで成長または拡張させて、急速な第2の増殖を開始するための約 2×10^8 のTILを提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、150,000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の密度まで成長または拡張させて、急速な第2の増殖を開始するための約 2×10^8 のTILを提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、250,000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の密度まで成長または拡張させて、急速な第2の増殖を開始するための約 2×10^8 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の増殖を開始するための 10×10^6 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の増殖を開始するための 10×10^6 の播種密度は、 1×10^9 を超えるTILをもたらし得る。

【0821】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖において使用するためのTILは、CD101陽性（CD101+）である（例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第1の増殖の前）。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖において使用するためのTILは、少なくとも75%CD101陽性、少なくとも80%CD101陽性、少なくとも85%CD101陽性、少なくとも90%CD101陽性、少なくとも95%CD101陽性、少なくとも98%CD101陽性、または少なくとも99%CD101陽性である（例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第1の増殖

の前)。いくつかの実施形態では、CD101集団は、CD101高である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖において使用するためのTILは、少なくとも25%CD101高、少なくとも30%CD101高、少なくとも35%CD101高、少なくとも40%CD101高、少なくとも45%CD101高、少なくとも50%CD101高、少なくとも55%CD101高、少なくとも60%CD101高、少なくとも65%CD101高、少なくとも70%CD101高、少なくとも75%CD101高、少なくとも80%CD101高、少なくとも85%CD101高、少なくとも90%CD101高、少なくとも95%CD101高、少なくとも98%CD101高、または少なくとも99%CD101高である（例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第1の増殖の前）。

10

【0822】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖において使用するためのTILは、CD101陽性（CD101+）である（例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第1の増殖の前）。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖において使用するためのTILは、少なくとも75%CD101陽性、少なくとも80%CD101陽性、少なくとも85%CD101陽性、少なくとも90%CD101陽性、少なくとも95%CD101陽性、少なくとも98%CD101陽性、または少なくとも99%CD101陽性である（例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第1の増殖の前）。いくつかの実施形態では、CD101集団は、CD101低（CD101低）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の増殖において使用するためのTILは、少なくとも25%CD101低、少なくとも30%CD101低、少なくとも35%CD101低、少なくとも40%CD101低、少なくとも45%CD101低、少なくとも50%CD101低、少なくとも55%CD101低、少なくとも60%CD101低、少なくとも65%CD101低、少なくとも70%CD101低、少なくとも75%CD101低、少なくとも80%CD101低、少なくとも85%CD101低、少なくとも90%CD101低、少なくとも95%CD101低、少なくとも98%CD101低、または少なくとも99%CD101低である（例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第1の増殖の前）。

20

【0823】

いくつかの実施形態では、CD101低は、5%以下のCD101陽性、10%以下のCD101陽性、15%以下のCD101陽性、20%以下のCD101陽性、25%以下のCD101陽性、30%以下のCD101陽性、35%以下のCD101陽性、40%以下のCD101陽性、45%以下のCD101陽性、50%以下のCD101陽性、55%以下のCD101陽性、60%以下のCD101陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101低は、5%以下のCD101陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101低は、10%以下のCD101陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101低は、15%以下のCD101陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101低は、20%以下のCD101陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101低は、25%以下のCD101陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101低は、30%以下のCD101陽性であるTIL集団によって示される。

30

40

【0824】

いくつかの実施形態では、CD101低は、TILが対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して25%低いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して30%低いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して35%低いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して40%低いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して45%低いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して50%低いCD101を発現する、対照もしくはベース

50

ラインCD101レベルと比較して55%低いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して60%低いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して65%低いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して70%低いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して75%低いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して80%低いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して85%低いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して90%低いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して95%低いCD101を発現する、または対照もしくはベースラインCD101レベルと比較して99%低いCD101を発現する、TIL集団によって示される。

10

【0825】

いくつかの実施形態では、CD101低は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも1倍以下のCD101を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101低は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍以下のCD101を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101低は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも1倍以下のCD101を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101低は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも2倍以下のCD101を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101低は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも3倍以下のCD101を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101低は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも4倍以下のCD101を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101低は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも5倍以下のCD101を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101低は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも10倍以下のCD101を発現する、TIL集団によって示される。

20

【0826】

いくつかの実施形態では、CD101高は、少なくとも75%CD101陽性、少なくとも80%CD101陽性、少なくとも85%CD101陽性、少なくとも90%CD101陽性、少なくとも95%CD101陽性、少なくとも98%CD101陽性、少なくとも99%CD101陽性、または100%CD101陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101高は、少なくとも80%CD101陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101高は、少なくとも85%CD101陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101高は、少なくとも90%CD101陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101高は、少なくとも95%CD101陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101高は、少なくとも98%CD101陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101高は、少なくとも99%CD101陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101高は、100%CD101陽性であるTIL集団によって示される。

30

40

【0827】

いくつかの実施形態では、CD101高は、TILが対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも25%高いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも30%高いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも35%高いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも40%高いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも45%高いCD101を

50

発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも50%高いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも55%高いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも60%高いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも65%高いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも70%高いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも75%高いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも80%高いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも85%高いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも90%高いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも95%高いCD101を発現する、対照もしくはベースラインCD101レベルよりも少なくとも99%高いCD101を発現する、または対照もしくはベースラインCD101レベルよりも100%高いCD101を発現する、TIL集団によって示される。

10

【0828】

いくつかの実施形態では、CD101高は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも1倍以上のCD101を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101高は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍以上のCD101を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101高は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも1倍以上のCD101を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101高は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも2倍以上のCD101を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101高は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも3倍以上のCD101を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101高は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも4倍以上のCD101を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101高は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも5倍以上のCD101を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、CD101高は、TILが対照またはベースラインCD101レベルよりも10倍以上のCD101を発現する、TIL集団によって示される。

20

30

【0829】

いくつかの実施形態では、CD101陽性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CD101抗体で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗CD101抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトCD101ポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトCD101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CD101抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗CD101抗体には、例えば、BB27が含まれるが、これに限定されない。

40

【0830】

いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗CD101抗体は、CD101を発現してい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。

【0831】

いくつかの実施形態では、患者は、抗CD101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CD101抗体治療ナীবである。いくつかの実施形態では、対象は、抗CD101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

50

象は、化学療法治療後または抗CD101抗体治療後である。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後及び抗CD101抗体治療後である。いくつかの実施形態では、患者は、抗CD101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CD101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であり、かつ化学療法治療後であるが、抗CD101抗体治療ナীবである。

【0832】

患者が以前に第1の抗CD101抗体で治療されているいくつかの実施形態では、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、一次TIL細胞集団の表面上でCD101に結合することから第1の抗CD101抗体により遮断されていない第2の抗CD101抗体で染色することにより行われる。

10

【0833】

患者が以前に抗CD101抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次TIL細胞集団を、一次TIL細胞集団の表面上で不溶化された抗CD101抗体のFc領域に結合する抗体（「抗Fc抗体」）で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗Fc抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトFcポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトFc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Fc抗体は、モノクローナル抗体である。患者が以前に抗CD101ヒトまたはヒト化IgG抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG抗体で染色される。患者が以前に抗CD101ヒトまたはヒト化IgG1抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG1抗体で染色される。患者が以前に抗CD101ヒトまたはヒト化IgG2抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG2抗体で染色される。患者が以前に抗CD101ヒトまたはヒト化IgG3抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG3抗体で染色される。患者が以前に抗CD101ヒトまたはヒト化IgG4抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG4抗体で染色される。

20

【0834】

患者が以前に抗CD101抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次TIL細胞集団を、同じ抗CD101抗体と接触させることと、次いで、一次TIL細胞集団を、一次TIL細胞集団の表面上で不溶化された抗CD101抗体のFc領域に結合する抗Fc抗体で染色することとにより行われる。

30

【0835】

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、第1の集団及びPBMC集団の両方におけるフルオロフォアの強度を使用して、それぞれCD101陰性TIL、CD101中間TIL、及びCD101陽性TILに対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するためのFACSゲートを設定する。いくつかの実施形態では、細胞選別方法は、PBMC、FMO対照、及び試料自体を使用して3つの集団を区別して、ゲートが高、中（中間とも称される）、及び低（陰性とも称される）に設定されるように行われる。いくつかの実施形態では、PBMCは、ゲーティング対照として使用される。いくつかの実施形態では、CD101高集団は、PBMCにおいて観察されるものを超えるCD101に対して陽性である細胞集団として定義される。いくつかの実施形態では、TILのCD101+中間集団は、PBMC中のCD101+細胞を包含する。いくつかの実施形態では、陰性は、FMOに基づいてゲートされる。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／または受容す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、選別ごとに設定される。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

40

50

ングは、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、10日、20日、30日、40日、50日、または60日毎にP B M C から設定される。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 から設定される。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。

【0836】

いくつかの実施形態では、C D 1 0 1 事前選択のゲーティングは、事前選択手順毎に固定される。いくつかの実施形態では、固定されるゲーティング手順は、C D 3 +ゲーティング手順である。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別中に取得された集団に基づいて決定される。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別事象中に取得された集団がC D 3 +ゲーティング手順であることに基づいて決定される。

10

【0837】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (M F I) のゲーティング及び補正は、約0.5% ± 0.25% の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (M F I) のゲーティング及び補正は、約1.75% ± 0.25% の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (M F I) のゲーティング及び補正は、P B M C でC D 1 0 1 高ゲートを設定する場合、約1.75% ± 0.25% の範囲である。いくつかの実施形態では、M F I 計算は、P B M C の1、2、3、もしくは4以上のロットまたはバッチから測定される平均値を使用する。いくつかの実施形態では、M F I 計算は、P B M C の1、2、3、もしくは4以上のロットまたはバッチから測定される中央値を使用する。

20

【0838】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (M F I) を決定するために使用されるF A C S 選別のゲーティング及び補正方法は、対照P B M C (例えば、健康なドナーからのP B M C) に対するC D 1 0 1 のM F I が、C D 1 0 1 高ゲートに対して約0.5% ~ 2.0% (例えば、約0.5%、0.55%、0.6%、0.65%、0.7%、0.75%、0.8%、0.85%、0.9%、0.95%、1.0%、1.05%、1.1%、1.15%、1.2%、1.25%、1.3%、1.35%、1.4%、1.45%、1.5%、1.55%、1.6%、1.65%、1.7%、1.75%、1.8%、1.85%、1.9%、1.95%、または2.0%) の範囲になるように調整される。いくつかの実施形態では、M F I 計算は、P B M C の少なくとも2つの試料を使用して測定された平均値である。いくつかの実施形態では、M F I 計算は、P B M C の少なくとも2つの試料を使用して測定された中央値である。

30

【0839】

いくつかの実施形態では、C D 1 0 1 陽性 (C D 1 0 1 +) 細胞は、F A C 及び／または他のフローサイトメトリー法によって選別される。いくつかの実施形態では、C D 1 0 1 陽性T I L は、C D 1 0 1 高T I L である。いくつかの実施形態では、C D 1 0 1 陽性T I L は、C D 1 0 1 中間T I L である。いくつかの実施形態では、C D 1 0 1 +細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、C D 1 0 1 +細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、M i l t e n y i またはF i s h e r などの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、C D 1 0 1 +高細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、C D 1 0 1 +高細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、M i l t e n y i またはF i s h e r などの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、抗C D 1 0 1 抗体は、ビーズと直接的または間接的に複合される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択プロセスは、C D 1 0 1 +及びC D 3 +T I L の

40

50

両方を選択する。いくつかの実施形態では、ビーズ選択法で使用される抗CD101抗体には、例えば、BB27が含まれるが、これに限定されない。

【0840】

いくつかの実施形態では、CD101+細胞及び／またはCD101陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含まない。いくつかの実施形態では、CD101+細胞及び／またはCD101陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含む。いくつかの実施形態では、CD101+細胞及び／またはCD101陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、選別緩衝液と下流緩衝液及び／または培地との間の粘度差を軽減または低減する成分を含む。いくつかの実施形態では、CD101+細胞及び／またはCD101陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、ヒト血清アルブミン（HSA）のみを含む。いくつかの実施形態では、CD101+細胞及び／またはCD101陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、等量のHSA及びPBS／EDTA緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、CD101+細胞及び／またはCD101陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、HSA及びPBS／EDTA緩衝液を1：1、1：2、1：3、1：4、2：1、3：1、または4：1の比率で含む。

10

【0841】

いくつかの実施形態では、事前選択は、第1のTIL集団からCD101陽性TILを選択して、CD101に富むTIL集団を取得することに関与し、少なくとも11.27%～74.4%がCD101陽性TILである第1のTIL集団からTIL集団を選択することを含む。いくつかの実施形態では、第1のTIL集団は、少なくとも20～80%CD101陽性TIL、少なくとも20～80%CD101陽性TIL、少なくとも30～80%CD101陽性TIL、少なくとも40～80%CD101陽性TIL、少なくとも50～80%CD101陽性TIL、少なくとも10～70%CD101陽性TIL、少なくとも20～70%CD101陽性TIL、少なくとも30～70%CD101陽性TIL、または少なくとも40～70%CD101陽性TILである。

20

【0842】

いくつかの実施形態では、選択ステップ（例えば、CD101陽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、CD101のIgVドメインの外側のN末端ループによってCD101に結合する過剰のモノクローナル抗CD101 IgG4抗体に曝露するステップと、

30

（ii）フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4抗体を追加するステップと、

（iii）蛍光活性化細胞選別法（FACS）により行われた場合のPBMC集団の強度と比較した第1のTIL集団中のCD101陽性TILのフルオロフォアの強度に基づいて、CD101に富むTIL集団を取得するステップと、を含む。

【0843】

いくつかの実施形態では、CD101陽性TILは、CD101高TILである。

【0844】

いくつかの実施形態では、CD101に富むTIL集団の少なくとも70%が、CD101陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD101に富むTIL集団の少なくとも80%が、CD101陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD101に富むTIL集団の少なくとも90%が、CD101陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD101に富むTIL集団の少なくとも95%が、CD101陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD101に富むTIL集団の少なくとも99%が、CD101陽性TILである。いくつかの実施形態では、CD101に富むTIL集団の100%が、CD101陽性TILである。

40

【0845】

いくつかの実施形態では、CD101陽性TILの選択は、少なくとも 1×10^4 TIL

50

LのCD101陽性TIL、少なくとも 1×10^5 TILのCD101陽性TIL、少なくとも 1×10^6 TILのCD101陽性TIL、少なくとも 1×10^7 TILのCD101陽性TIL、少なくとも 1×10^8 TILのCD101陽性TILが存在するまで行われる。いくつかの実施形態では、CD101陽性TILの選択は、少なくとも 1×10^6 TILのCD101陽性TILが存在するまで行われる。

【0846】

いくつかの実施形態では、図1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、CD101のIgVドメインの外側のN末端ループによってCD101に結合する過剰のモノクローナル抗CD101 IgG4抗体に曝露するステップと、(ii)フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4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流動系細胞選別を行って、CD101に富むTIL集団を取得するステップと、を含む。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗CD101 IgG4抗体は、ニボルマブ、またはそのバリエーション、断片、もしくは複合体である。いくつかの実施形態では、抗IgG4抗体は、クローン抗ヒトIgG4、クローンHP6023である。いくつかの実施形態では、ステップ(b)における選択において使用するための抗CD101抗体は、EH12、2H7またはニボルマブと同じエピトープに結合する。

【0847】

腫瘍試料に由来するTILがCD101高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CD101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CD101陽性細胞は、蛍光から1つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、CD101の発現レベルは、健康な対象からのCD3+/CD101+末梢T細胞（例えば、参照細胞）において測定され、腫瘍から取得されたTILにおけるCD101の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、CD101高T細胞のCD101免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、CD101発現が閾値と同じかそれを超えるTILは、CD101高細胞とみなすことができる。いくつかの事例では、CD101高TILは、全CD3+細胞の最大1%以下に相当するCD101免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、CD101高TILは、全CD3+細胞の最大0.75%以下に相当するCD101免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、CD101高TILは、全CD3+細胞の最大0.50%以下に相当するCD101免疫染色の強度が最も高いものを表す。1つの事例では、CD101高TILは、全CD3+細胞の最大0.25%以下に相当するCD101免疫染色の強度が最も高いものを表す。

【0848】

いくつかの実施形態では、WO2019156568のPD-1ゲーティング法がCD101に用いられる。腫瘍試料に由来するTILがCD101高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CD101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CD101陽性細胞は、蛍光から1つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、CD101の発現レベルは、健康な対象からのCD3+/CD101+末梢T細胞（例えば、参照細胞）において測定され、腫瘍から取得されたTILにおけるCD101の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、CD101高T細胞のCD101免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、CD101発現が閾値と同じかそれを超えるTILは、CD101高細胞とみなすことができる。いくつかの事例では、CD101高TILは、全CD3+細胞の最大1%以下に相当するCD101免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、CD101高TILは、全CD3+細胞の最大0.75%以下に相当するCD101免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、CD101高TILは、全CD3+細胞の最大0.50%以下に相当するC

10

20

30

40

50

D 1 0 1 免疫染色の強度が最も高いものを表す。1つの事例では、C D 1 0 1 高 T I L は、全 C D 3 + 細胞の最大 0 . 2 5 % 以下に相当する C D 1 0 1 免疫染色の強度が最も高いものを表す。

【 0 8 4 9 】

いくつかの実施形態では、選択された C D 1 0 1 陽性 (C D 1 0 1 +) 細胞は、プライミングによる第 1 の増殖、例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び / または図 1 C 及び / または図 1 D 及び / または図 1 E 及び / または図 1 F 及び / または図 1 G 及び / または図 1 H) のステップ B を進める前に凍結することができる。

【 0 8 5 0 】

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 1 0 1 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 1 0 1 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、抗 C D 1 0 1 - P E、抗 C D 3 - F I T C、及び live / dead 青色染色 (T h e r m o F i s h e r、M A、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 P D 1 抗体とのインキュベーション後、C D 1 0 1 陽性細胞は、本明細書に記載される、例えば、ステップ B におけるプライミングによる第 1 の増殖による増殖のために選択される。

【 0 8 5 1 】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、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 G A B A、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 - c y s - C y 5、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 1 1 0、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 1 0 1 スルホニルクロリド (T E X A S R E D (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、C y 3、C y 3 B、C y 3 . 5、C y 5、C y 5 . 5、及び C y 7 が含まれるが、これらに限定されない。

【 0 8 5 2 】

1 0 . L A G 3 - L A G 3 の選択の事前選択 (図 1 のステップ A 2 に例示される)

本発明の方法によれば、T I L は、プライミングによる第 1 の増殖の前に、L A G 3 陽性 (L A G 3 +) であるように事前選択される。

【0853】

いくつかの実施形態では、本発明の T I L は、L A G 3 などの枯渇マーカーについて事前選択される (Philip, M., et al., Nature. 545 (7655) : 452-456 (2017))。本発明の方法によれば、T I L は、プライミングによる第 1 の増殖の前に、L A G 3 陽性 (L A G 3 +) であるように事前選択される。

【0854】

いくつかの実施形態では、最低 3, 000 個の T I L が、第 1 の増殖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 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 4, 000 個の T I L が、第 1 の増殖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 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 5, 000 個の T I L が、第 1 の増殖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 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 6, 000 個の T I L が、第 1 の増殖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 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 7, 000 個の T I L が、第 1 の増殖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 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 8, 000 個の T I L が、第 1 の増殖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 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 9, 000 個の T I L が、第 1 の増殖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 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 10, 000 個の T I L が、第 1 の増殖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 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、細胞を、200, 000 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 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 の T I L を提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、150, 000 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 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 の T I L を提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、250, 000 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 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 の T I L 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 の増殖を開始するための 10×10^6 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 の増殖を開始するための 10×10^6 の播種密度は、 1×10^9 を超える T I L をもたらし得る。

【0855】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための T I L は、L A G 3 陽性 (L A G 3 +) である (例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前)。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための T I L は、少なくとも 75% L A G 3 陽性、少なくとも 80% L A G 3 陽性、少なくとも 85% L A G 3 陽性、少なくとも 90% L A G 3 陽性、少なくとも 95% L A G 3 陽性、少なくとも 98% L A G 3 陽性、または少なくとも 99% L A G 3 陽性である (例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前)。いくつかの実施形態では、L A G 3 集団は、L A G 3 高である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための T I L は、少なくとも 25% L A G 3 高、少なくとも 30% L A G 3 高、少なくとも 35% L A G 3 高、少なくとも 40% L A G 3 高、少なくとも 45% L A G 3 高、少なくとも 50% L A G 3 高、少なくとも 55% L A G 3 高、少なくとも 60% L A G 3 高、少なくとも 65% L A G 3 高、少なくとも 70%

LAG3 高、少なくとも 75% LAG3 高、少なくとも 80% LAG3 高、少なくとも 85% LAG3 高、少なくとも 90% LAG3 高、少なくとも 95% LAG3 高、少なくとも 98% LAG3 高、または少なくとも 99% LAG3 高である（例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前）。

【0856】

いくつかの実施形態では、LAG3 高は、少なくとも 75% LAG3 陽性、少なくとも 80% LAG3 陽性、少なくとも 85% LAG3 陽性、少なくとも 90% LAG3 陽性、少なくとも 95% LAG3 陽性、少なくとも 98% LAG3 陽性、少なくとも 99% LAG3 陽性、または 100% LAG3 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、LAG3 高は、少なくとも 80% LAG3 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、LAG3 高は、少なくとも 85% LAG3 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、LAG3 高は、少なくとも 90% LAG3 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、LAG3 高は、少なくとも 95% LAG3 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、LAG3 高は、少なくとも 98% LAG3 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、LAG3 高は、少なくとも 99% LAG3 陽性である TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、LAG3 高は、100% LAG3 陽性である TIL 集団によって示される。

10

【0857】

いくつかの実施形態では、LAG3 高は、TIL が対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 25% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 30% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 35% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 40% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 45% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 50% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 55% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 60% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 65% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 70% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 75% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 80% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 85% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 90% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 95% 高い LAG3 を発現する、対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも少なくとも 99% 高い LAG3 を発現する、または対照もしくはベースライン LAG3 レベルよりも 100% 高い LAG3 を発現する、TIL 集団によって示される。

20

30

【0858】

いくつかの実施形態では、LAG3 高は、TIL が対照またはベースライン LAG3 レベルよりも 1 倍以上の LAG3 を発現する、TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、LAG3 高は、TIL が対照またはベースライン LAG3 レベルよりも 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍以上の LAG3 を発現する、TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、LAG3 高は、TIL が対照またはベースライン LAG3 レベルよりも 1 倍以上の LAG3 を発現する、TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、LAG3 高は、TIL が対照またはベースライン LAG3 レベルよりも 2 倍以上の LAG3 を発現する、TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、LAG3 高は、TIL が対照またはベースライン LAG3 レベルよりも 3 倍以上の LAG3 を発現する、TIL 集団によって示される。いくつかの実施形態では、LAG3 高は、TIL が対照またはベースライン LAG3 レベルよりも 4 倍以上の LAG3 を発現する

40

50

、T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、L A G 3 高は、T I L が対照またはベースライン L A G 3 レベルよりも 5 倍以上の L A G 3 を発現する、T I L 集団によって示される。いくつかの実施形態では、L A G 3 高は、T I L が対照またはベースライン L A G 3 レベルよりも 10 倍以上の L A G 3 を発現する、T I L 集団によって示される。

【0859】

いくつかの実施形態では、L A G 3 陽性 T I L 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 T I L を抗 L A G 3 抗体で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗 L A G 3 抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒト L A G 3 ポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒト L A G 3 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 L A G 3 抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗 L A G 3 抗体には、例えば、T S R - 0 3 3、S y m 0 2 2 (抗 L A G - 3)、B M S 9 8 6 0 1 6、G S K 2 8 3 1 7 8 1、及び／または L A G 5 2 5 が含まれるが、これらに限定されない。

【0860】

いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗 L A G 3 抗体は、L A G 3 を発現してい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。

【0861】

いくつかの実施形態では、患者は、抗 L A G 3 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 L A G 3 抗体治療ナীবである。いくつかの実施形態では、対象は、抗 L A G 3 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 L A G 3 抗体治療後である。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後及び抗 L A G 3 抗体治療後である。いくつかの実施形態では、患者は、抗 L A G 3 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 L A G 3 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であり、かつ化学療法治療後であるが、抗 L A G 3 抗体治療ナীবである。

【0862】

患者が以前に第 1 の抗 L A G 3 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、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 T I L を、一次 T I L 細胞集団の表面上で L A G 3 に結合することから第 1 の抗 L A G 3 抗体により遮断されていない第 2 の抗 L A G 3 抗体で染色することにより行われる。

【0863】

患者が以前に抗 L A G 3 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次 T I L 細胞集団を、一次 T I L 細胞集団の表面上で不溶化された抗 L A G 3 抗体の F c 領域に結合する抗体 (「抗 F c 抗体」) で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗 F c 抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒト F c ポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒト F c 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 F c 抗体は、モノクローナル抗体である。患者が以前に抗 L A G 3 ヒトまたはヒト化 I g G 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次 T I L 細胞集団は、抗ヒト I g G 抗体で染色される。患者が以前に抗 L A G 3 ヒトまたはヒト化 I g G 1 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次 T I L 細胞集団は、抗ヒト I g G 1 抗体で染色される。患者が以前に抗 L A G 3 ヒトまたはヒト化 I g G 2 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次 T I L 細胞集団は、抗ヒト I g G 2 抗体で染色される。患者が以前に抗 L A G 3 ヒトまたはヒト化 I g G 3 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次 T I L 細胞集団は、抗ヒト I g G 3 抗体で染色される。患者が以前に抗 L A G 3 ヒトまた

10

20

30

40

50

はヒト化 I g G 4 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次 T I L 細胞集団は、抗ヒト I g G 4 抗体で染色される。

【0864】

患者が以前に抗 L A G 3 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次 T I L 細胞集団を、同じ抗 L A G 3 抗体と接触させることと、次いで、一次 T I L 細胞集団を、一次 T I L 細胞集団の表面上で不溶化された抗 L A G 3 抗体の F c 領域に結合する抗 F c 抗体で染色することにより行われる。

【0865】

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、第 1 の集団及び P B M C 集団の両方におけるフルオロフォアの強度を使用して、それぞれ L A G 3 陰性 T I L、L A G 3 中間 T I L、及び L A G 3 陽性 T I L に対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するための FACS ゲートを設定する。いくつかの実施形態では、細胞選別方法は、P B M C、F M O 対照、及び試料自体を使用して 3 つの集団を区別して、ゲートが高、中 (中間とも称される)、及び低 (陰性とも称される) に設定されるように行われる。いくつかの実施形態では、P B M C は、ゲーティング対照として使用される。いくつかの実施形態では、L A G 3 高集団は、P B M C において観察されるものを超える L A G 3 に対して陽性である細胞集団として定義される。いくつかの実施形態では、T I L の L A G 3 + 中間集団は、P B M C 中の L A G 3 + 細胞を包含する。いくつかの実施形態では、陰性は、F M O に基づいてゲートされる。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 T I L 集団を取得及び／または受容す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、選別ごとに設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、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、ゲーティングは、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、10 日、20 日、30 日、40 日、50 日、または 60 日毎に P B M C から設定される。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 から設定される。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。

【0866】

いくつかの実施形態では、L A G 3 事前選択のゲーティングは、事前選択手順毎に固定される。いくつかの実施形態では、固定されるゲーティング手順は、C D 3 + ゲーティング手順である。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別中に取得された集団に基づいて決定される。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別事象中に取得された集団が C D 3 + ゲーティング手順であることに基づいて決定される。

【0867】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (MFI) のゲーティング及び補正は、約 0.5 % ± 0.25 % の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (MFI) のゲーティング及び補正は、約 1.75 % ± 0.25 % の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (MFI) のゲーティング及び補正は、P B M C で L A G 3 高ゲートを設定する場合、約 1.75 % ± 0.25 % の範囲である。いくつかの実施形態では、MFI 計算は、P B M C の 1、2、3、もしくは 4 以上のロットまたはバッチから測定される平均値を使用する。いくつかの実施形態では、MFI 計算は、P B M C の 1、2、3、もしくは 4 以上のロットまたはバッチから測定される中央値を使用する。

【0868】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (MFI) を決定するために使用される F A C

10

20

30

40

50

S選別のゲーティング及び補正方法は、対照P B M C（例えば、健康なドナーからのP B M C）に対するL A G 3のM F Iが、L A G 3高ゲートに対して約0.5%～2.0%（例えば、約0.5%、0.55%、0.6%、0.65%、0.7%、0.75%、0.8%、0.85%、0.9%、0.95%、1.0%、1.05%、1.1%、1.15%、1.2%、1.25%、1.3%、1.35%、1.4%、1.45%、1.5%、1.55%、1.6%、1.65%、1.7%、1.75%、1.8%、1.85%、1.9%、1.95%、または2.0%）の範囲になるように調整される。いくつかの実施形態では、M F I計算は、P B M Cの少なくとも2つの試料を使用して測定された平均値である。いくつかの実施形態では、M F I計算は、P B M Cの少なくとも2つの試料を使用して測定された中央値である。

10

【0869】

いくつかの実施形態では、L A G 3陽性（L A G 3+）細胞は、F A C S及び／または他のフローサイトメトリー法によって選別される。いくつかの実施形態では、L A G 3陽性T I Lは、L A G 3高T I Lである。いくつかの実施形態では、L A G 3陽性T I Lは、L A G 3中間T I Lである。いくつかの実施形態では、L A G 3+細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、L A G 3+細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、M i l t e n y iまたはF i s h e rなどの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、L A G 3+高細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、L A G 3+高細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、M i l t e n y iまたはF i s h e rなどの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、抗L A G 3抗体は、ビーズと直接的または間接的に複合される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択プロセスは、L A G 3+及びC D 3+T I Lの両方を選択する。いくつかの実施形態では、ビーズ選択法で使用される抗L A G 3抗体には、例えば、T S R - 0 3 3、S y m 0 2 2（抗L A G - 3）、B M S 9 8 6 0 1 6、G S K 2 8 3 1 7 8 1、及び／またはL A G 5 2 5が含まれるが、これらに限定されない。

20

【0870】

いくつかの実施形態では、L A G 3+細胞及び／またはL A G 3陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含まない。いくつかの実施形態では、L A G 3+細胞及び／またはL A G 3陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含む。いくつかの実施形態では、L A G 3+細胞及び／またはL A G 3陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、選別緩衝液と下流緩衝液及び／または培地との間の粘度差を軽減または低減する成分を含む。いくつかの実施形態では、L A G 3+細胞及び／またはL A G 3陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、ヒト血清アルブミン（H S A）のみを含む。いくつかの実施形態では、L A G 3+細胞及び／またはL A G 3陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、等量のH S A及びP B S / E D T A緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、L A G 3+細胞及び／またはL A G 3陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、H S A及びP B S / E D T A緩衝液を1:1、1:2、1:3、1:4、2:1、3:1、または4:1の比率で含む。

30

40

【0871】

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L A G 3陽性T I Lを選択して、L A G 3に富むT I L集団を取得することに関与し、少なくとも11.27%～74.4%がL A G 3陽性T I Lである第1のT I L集団からT I L集団を選択することを含む。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20～80% L A G 3陽性T I L、少なくとも20～80% L A G 3陽性T I L、少なくとも30～80% L A G 3陽性T I L、少なくとも40～80% L A G 3陽性T I L、少なくとも50～80% L A G 3陽性T I L、少なくとも10～70% L A G 3陽性T I L、少なくとも20～70% L A G 3陽性T I L、少なくとも30～70% L A G 3陽性T I L、または少なく

50

とも40～70%LAG3陽性TILである。

【0872】

いくつかの実施形態では、選択ステップ（例えば、LAG3陽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、LAG3のIgVドメインの外側のN末端ループによってLAG3に結合する過剰のモノクローナル抗LAG3 IgG4抗体に曝露するステップと、

（ii）フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4抗体を追加するステップと、

（iii）蛍光活性化細胞選別法（FACS）により行われた場合のPBMC集団の強度と比較した第1のTIL集団中のLAG3陽性TILのフルオロフォアの強度に基づいて、LAG3に富むTIL集団を取得するステップと、を含む。

【0873】

いくつかの実施形態では、LAG3陽性TILは、LAG3高TILである。

【0874】

いくつかの実施形態では、LAG3に富むTIL集団の少なくとも70%が、LAG3陽性TILである。いくつかの実施形態では、LAG3に富むTIL集団の少なくとも80%が、LAG3陽性TILである。いくつかの実施形態では、LAG3に富むTIL集団の少なくとも90%が、LAG3陽性TILである。いくつかの実施形態では、LAG3に富むTIL集団の少なくとも95%が、LAG3陽性TILである。いくつかの実施形態では、LAG3に富むTIL集団の少なくとも99%が、LAG3陽性TILである。いくつかの実施形態では、LAG3に富むTIL集団の100%が、LAG3陽性TILである。

【0875】

いくつかの実施形態では、LAG3陽性TILの選択は、少なくとも 1×10^4 TILのLAG3陽性TIL、少なくとも 1×10^5 TILのLAG3陽性TIL、少なくとも 1×10^6 TILのLAG3陽性TIL、少なくとも 1×10^7 TILのLAG3陽性TIL、少なくとも 1×10^8 TILのLAG3陽性TILが存在するまで行われる。いくつかの実施形態では、LAG3陽性TILの選択は、少なくとも 1×10^6 TILのLAG3陽性TILが存在するまで行われる。

【0876】

いくつかの実施形態では、図1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、LAG3のIgVドメインの外側のN末端ループによってLAG3に結合する過剰のモノクローナル抗LAG3 IgG4抗体に曝露するステップと、（ii）フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4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流動系細胞選別を行って、LAG3に富むTIL集団を取得するステップと、を含む。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗LAG3 IgG4抗体は、ニボルマブ、またはそのバリエーション、断片、もしくは複合体である。いくつかの実施形態では、抗IgG4抗体は、クローン抗ヒトIgG4、クローンHP6023である。いくつかの実施形態では、ステップ（b）における選択において使用するための抗LAG3抗体は、EH12、2H7またはニボルマブと同じエピトープに結合する。

【0877】

腫瘍試料に由来するTILがLAG3高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LAG3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LAG3陽性細胞は、蛍光から1つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、LAG3の発現レベルは、健康な対象からのCD3+LAG3+末梢T細胞（例えば、参照細胞）において測定され、腫瘍から取得されたTILにおけるLAG3の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、LAG3高T細胞のLAG3免疫染色の最小強度として定義することが

10

20

30

40

50

できる。そのため、LAG3発現が閾値と同じかそれを超えるTILは、LAG3高細胞とみなすことができる。いくつかの事例では、LAG3高TILは、全CD3+細胞の最大1%以下に相当するLAG3免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、LAG3高TILは、全CD3+細胞の最大0.75%以下に相当するLAG3免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、LAG3高TILは、全CD3+細胞の最大0.50%以下に相当するLAG3免疫染色の強度が最も高いものを表す。1つの事例では、LAG3高TILは、全CD3+細胞の最大0.25%以下に相当するLAG3免疫染色の強度が最も高いものを表す。

【0878】

いくつかの実施形態では、WO2019156568のPD-1ゲーティング法がLAG3に用いられる。腫瘍試料に由来するTILがLAG3高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LAG3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LAG3陽性細胞は、蛍光から1つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、LAG3の発現レベルは、健康な対象からのCD3+/LAG3+末梢T細胞（例えば、参照細胞）において測定され、腫瘍から取得されたTILにおけるLAG3の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、LAG3高T細胞のLAG3免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、LAG3発現が閾値と同じかそれを超えるTILは、LAG3高細胞と見なすことができる。いくつかの事例では、LAG3高TILは、全CD3+細胞の最大1%以下に相当するLAG3免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、LAG3高TILは、全CD3+細胞の最大0.75%以下に相当するLAG3免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、LAG3高TILは、全CD3+細胞の最大0.50%以下に相当するLAG3免疫染色の強度が最も高いものを表す。1つの事例では、LAG3高TILは、全CD3+細胞の最大0.25%以下に相当するLAG3免疫染色の強度が最も高いものを表す。

【0879】

いくつかの実施形態では、選択されたLAG3陽性（LAG3+）細胞は、プライミングによる第1の増殖、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）のステップBを進める前に凍結することができる。

【0880】

a. 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LAG3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LAG3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、抗LAG3-PE、抗CD3-FITC、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PD1抗体とのインキュベーション後、LAG3陽性細胞は、本明細書に記載される、例えば、ステップBにおけるプライミングによる第1の増殖による増殖のために選択される。

【0881】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、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

10

20

30

40

50

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。

10

20

【0882】

11. TIM3-TIM3の選択の事前選択（図1のステップA2に例示される）

本発明の方法によれば、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、TIM3陽性（TIM3+）であるように事前選択される。

【0883】

いくつかの実施形態では、本発明のTILは、TIM3などの枯渇マーカーについて事前選択される。本発明の方法によれば、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、TIM3陽性（TIM3+）であるように事前選択される。

【0884】

いくつかの実施形態では、最低3,000個のTILが、第1の増殖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の増殖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の増殖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の増殖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、第1の増殖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の増殖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の増殖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の増殖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個のTILをもたらす。いくつかの実施形態では、細胞を、200,000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の密度まで成長または拡張させて、急速な第2の増殖を開始するための約 2×10^8 のTILを提供する。い

30

40

50

いくつかの実施形態では、細胞を、150,000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の密度まで成長または拡張させて、急速な第2の増殖を開始するための約 2×10^8 のTILを提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、250,000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の密度まで成長または拡張させて、急速な第2の増殖を開始するための約 2×10^8 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の増殖を開始するための 1×10^6 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の増殖を開始するための 1×10^6 の播種密度は、 1×10^9 を超えるTILをもたらし得る。

【0885】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖において使用するためのTILは、TIM3陽性（TIM3+）である（例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第1の増殖の前）。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖において使用するためのTILは、少なくとも75%TIM3陽性、少なくとも80%TIM3陽性、少なくとも85%TIM3陽性、少なくとも90%TIM3陽性、少なくとも95%TIM3陽性、少なくとも98%TIM3陽性、または少なくとも99%TIM3陽性である（例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第1の増殖の前）。いくつかの実施形態では、TIM3集団は、TIM3高である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖において使用するためのTILは、少なくとも25%TIM3高、少なくとも30%TIM3高、少なくとも35%TIM3高、少なくとも40%TIM3高、少なくとも45%TIM3高、少なくとも50%TIM3高、少なくとも55%TIM3高、少なくとも60%TIM3高、少なくとも65%TIM3高、少なくとも70%TIM3高、少なくとも75%TIM3高、少なくとも80%TIM3高、少なくとも85%TIM3高、少なくとも90%TIM3高、少なくとも95%TIM3高、少なくとも98%TIM3高、または少なくとも99%TIM3高である（例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第1の増殖の前）。

【0886】

いくつかの実施形態では、TIM3高は、少なくとも75%TIM3陽性、少なくとも80%TIM3陽性、少なくとも85%TIM3陽性、少なくとも90%TIM3陽性、少なくとも95%TIM3陽性、少なくとも98%TIM3陽性、少なくとも99%TIM3陽性、または100%TIM3陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIM3高は、少なくとも80%TIM3陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIM3高は、少なくとも85%TIM3陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIM3高は、少なくとも90%TIM3陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIM3高は、少なくとも95%TIM3陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIM3高は、少なくとも98%TIM3陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIM3高は、少なくとも99%TIM3陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIM3高は、100%TIM3陽性であるTIL集団によって示される。

【0887】

いくつかの実施形態では、TIM3高は、TILが対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも25%高いTIM3を発現する、対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも30%高いTIM3を発現する、対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも35%高いTIM3を発現する、対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも40%高いTIM3を発現する、対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも45%高いTIM3を発現する、対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも50%高いTIM3を発現する、対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも55%高いTIM3を発現する、対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも60%高いTIM3を発現する、

対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも65%高いTIM3を発現する、対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも70%高いTIM3を発現する、対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも75%高いTIM3を発現する、対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも80%高いTIM3を発現する、対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも85%高いTIM3を発現する、対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも90%高いTIM3を発現する、対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも95%高いTIM3を発現する、対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも少なくとも99%高いTIM3を発現する、または対照もしくはベースラインTIM3レベルよりも100%高いTIM3を発現する、TIL集団によって示される。

10

【0888】

いくつかの実施形態では、TIM3高は、TILが対照またはベースラインTIM3レベルよりも1倍以上のTIM3を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIM3高は、TILが対照またはベースラインTIM3レベルよりも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍以上のTIM3を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIM3高は、TILが対照またはベースラインTIM3レベルよりも1倍以上のTIM3を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIM3高は、TILが対照またはベースラインTIM3レベルよりも2倍以上のTIM3を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIM3高は、TILが対照またはベースラインTIM3レベルよりも3倍以上のTIM3を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIM3高は、TILが対照またはベースラインTIM3レベルよりも4倍以上のTIM3を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIM3高は、TILが対照またはベースラインTIM3レベルよりも5倍以上のTIM3を発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIM3高は、TILが対照またはベースラインTIM3レベルよりも10倍以上のTIM3を発現する、TIL集団によって示される。

20

【0889】

いくつかの実施形態では、TIM3陽性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TIM3抗体で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗TIM3抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトTIM3ポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトTIM3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TIM3抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗TIM3抗体には、例えば、MAB2365、PA1-41295、ab185703、TSR-022、LY3321367、BGB-A425、Sym023、MBG453、及び／またはINCAGN02390が含まれるが、これらに限定されない。

30

【0890】

いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗TIM3抗体は、TIM3を発現してい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。

40

【0891】

いくつかの実施形態では、患者は、抗TIM3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TIM3抗体治療ナীবである。いくつかの実施形態では、対象は、抗TIM3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TIM3抗体治療後である。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後及び抗TIM3抗体治療後である。いくつかの実施形態では、患者は、抗

50

TIM3 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TIM3 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であり、かつ化学療法治療後であるが、抗TIM3 抗体治療ナীবである。

【0892】

患者が以前に第1の抗TIM3 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、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、一次TIL細胞集団の表面上でTIM3 に結合することから第1の抗TIM3 抗体により遮断されていない第2の抗TIM3 抗体で染色することにより行われる。

【0893】

患者が以前に抗TIM3 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次TIL細胞集団を、一次TIL細胞集団の表面上で不溶化された抗TIM3 抗体のFc領域に結合する抗体（「抗Fc抗体」）で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗Fc抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトFcポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトFc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Fc抗体は、モノクローナル抗体である。患者が以前に抗TIM3 ヒトまたはヒト化IgG抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG抗体で染色される。患者が以前に抗TIM3 ヒトまたはヒト化IgG1抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG1抗体で染色される。患者が以前に抗TIM3 ヒトまたはヒト化IgG2抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG2抗体で染色される。患者が以前に抗TIM3 ヒトまたはヒト化IgG3抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG3抗体で染色される。患者が以前に抗TIM3 ヒトまたはヒト化IgG4抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG4抗体で染色される。

【0894】

患者が以前に抗TIM3 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次TIL細胞集団を、同じ抗TIM3 抗体と接触させることと、次いで、一次TIL細胞集団を、一次TIL細胞集団の表面上で不溶化された抗TIM3 抗体のFc領域に結合する抗Fc抗体で染色することにより行われる。

【0895】

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、第1の集団及びPBMC集団の両方におけるフルオロフォアの強度を使用して、それぞれTIM3 陰性TIL、TIM3 中間TIL、及びTIM3 陽性TILに対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するためのFACSゲートを設定する。いくつかの実施形態では、細胞選別方法は、PBMC、FMO対照、及び試料自体を使用して3つの集団を区別して、ゲートが高、中（中間とも称される）、及び低（陰性とも称される）に設定されるように行われる。いくつかの実施形態では、PBMCは、ゲーティング対照として使用される。いくつかの実施形態では、TIM3 高集団は、PBMCにおいて観察されるものを越えるTIM3 に対して陽性である細胞集団として定義される。いくつかの実施形態では、TILのTIM3 + 中間集団は、PBMC中のTIM3 + 細胞を包含する。いくつかの実施形態では、陰性は、FMOに基づいてゲートされる。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／または受容す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、選別ごとに設定される。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、10日、20日、30日、40日、50日、または60日毎にPBMCから設定される

10

20

30

40

50

。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から設定される。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。

【0896】

いくつかの実施形態では、TIM3事前選択のゲーティングは、事前選択手順毎に固定される。いくつかの実施形態では、固定されるゲーティング手順は、CD3+ゲーティング手順である。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別中に取得された集団に基づいて決定される。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別事象中に取得された集団がCD3+ゲーティング手順であることに基づいて決定される。

10

【0897】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度(MFI)のゲーティング及び補正は、約0.5%±0.25%の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度(MFI)のゲーティング及び補正は、約1.75%±0.25%の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度(MFI)のゲーティング及び補正は、PBMCでTIM3高ゲートを設定する場合、約1.75%±0.25%の範囲である。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの1、2、3、もしくは4以上のロットまたはバッチから測定される平均値を使用する。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの1、2、3、もしくは4以上のロットまたはバッチから測定される中央値を使用する。

20

【0898】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度(MFI)を決定するために使用されるFACS選別のゲーティング及び補正方法は、対照PBMC(例えば、健康なドナーからのPBMC)に対するTIM3のMFIが、TIM3高ゲートに対して約0.5%~2.0%(例えば、約0.5%、0.55%、0.6%、0.65%、0.7%、0.75%、0.8%、0.85%、0.9%、0.95%、1.0%、1.05%、1.1%、1.15%、1.2%、1.25%、1.3%、1.35%、1.4%、1.45%、1.5%、1.55%、1.6%、1.65%、1.7%、1.75%、1.8%、1.85%、1.9%、1.95%、または2.0%)の範囲になるように調整される。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの少なくとも2つの試料を使用して測定された平均値である。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの少なくとも2つの試料を使用して測定された中央値である。

30

【0899】

いくつかの実施形態では、TIM3陽性(TIM3+)細胞は、FACS及び/または他のフローサイトメトリー法によって選別される。いくつかの実施形態では、TIM3陽性TILは、TIM3高TILである。いくつかの実施形態では、TIM3陽性TILは、TIM3中間TILである。いくつかの実施形態では、TIM3+細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、TIM3+細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、MiltenyiまたはFisherなどの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、TIM3+高細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、TIM3+高細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、MiltenyiまたはFisherなどの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、抗TIM3抗体は、ビーズと直接的または間接的に複合される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択プロセスは、TIM3+及びCD3+TILの両方を選択する。いくつかの実施形態では、抗TIM3抗体には、例えば、MAB2365、PA1-41295、ab185703、TSR-022、LY3321367、BGB-A425、Sym0

40

50

23、MBG453、及び／またはINCAGN02390が含まれるが、これらに限定されない。

【0900】

いくつかの実施形態では、TIM3+細胞及び／またはTIM3陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含まない。いくつかの実施形態では、TIM3+細胞及び／またはTIM3陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含む。いくつかの実施形態では、TIM3+細胞及び／またはTIM3陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、選別緩衝液と下流緩衝液及び／または培地との間の粘度差を軽減または低減する成分を含む。いくつかの実施形態では、TIM3+細胞及び／またはTIM3陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、ヒト血清アルブミン（HSA）のみを含む。いくつかの実施形態では、TIM3+細胞及び／またはTIM3陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、等量のHSA及びPBS/EDTA緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、TIM3+細胞及び／またはTIM3陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、HSA及びPBS/EDTA緩衝液を1:1、1:2、1:3、1:4、2:1、3:1、または4:1の比率で含む。

10

【0901】

いくつかの実施形態では、事前選択は、第1のTIL集団からTIM3陽性TILを選択して、TIM3に富むTIL集団を取得することに関与し、少なくとも11.27%~74.4%がTIM3陽性TILである第1のTIL集団からTIL集団を選択することを含む。いくつかの実施形態では、第1のTIL集団は、少なくとも20~80%TIM3陽性TIL、少なくとも20~80%TIM3陽性TIL、少なくとも30~80%TIM3陽性TIL、少なくとも40~80%TIM3陽性TIL、少なくとも50~80%TIM3陽性TIL、少なくとも10~70%TIM3陽性TIL、少なくとも20~70%TIM3陽性TIL、少なくとも30~70%TIM3陽性TIL、または少なくとも40~70%TIM3陽性TILである。

20

【0902】

いくつかの実施形態では、選択ステップ（例えば、TIM3陽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、TIM3のIgVドメインの外側のN末端ループによってTIM3に結合する過剰のモノクローナル抗TIM3 IgG4抗体に曝露するステップと、

30

(ii) フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4抗体を追加するステップと、

(iii) 蛍光活性化細胞選別法（FACS）により行われた場合のPBMC集団の強度と比較した第1のTIL集団中のTIM3陽性TILのフルオロフォアの強度に基づいて、TIM3に富むTIL集団を取得するステップと、を含む。

【0903】

いくつかの実施形態では、TIM3陽性TILは、TIM3高TILである。

【0904】

いくつかの実施形態では、TIM3に富むTIL集団の少なくとも70%が、TIM3陽性TILである。いくつかの実施形態では、TIM3に富むTIL集団の少なくとも80%が、TIM3陽性TILである。いくつかの実施形態では、TIM3に富むTIL集団の少なくとも90%が、TIM3陽性TILである。いくつかの実施形態では、TIM3に富むTIL集団の少なくとも95%が、TIM3陽性TILである。いくつかの実施形態では、TIM3に富むTIL集団の少なくとも99%が、TIM3陽性TILである。いくつかの実施形態では、TIM3に富むTIL集団の100%が、TIM3陽性TILである。

40

【0905】

いくつかの実施形態では、TIM3陽性TILの選択は、少なくとも 1×10^4 TILのTIM3陽性TIL、少なくとも 1×10^5 TILのTIM3陽性TIL、少なくとも

50

1×10^6 T I L の T I M 3 陽性 T I L、少なくとも 1×10^7 T I L の T I M 3 陽性 T I L、少なくとも 1×10^8 T I L の T I M 3 陽性 T I L が存在するまで行われる。いくつかの実施形態では、T I M 3 陽性 T I L の選択は、少なくとも 1×10^6 T I L の T I M 3 陽性 T I L が存在するまで行われる。

【0906】

いくつかの実施形態では、図1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T I L 集団を、T I M 3 の I g V ドメインの外側のN末端ループによってT I M 3 に結合する過剰のモノクローナル抗T I M 3 I g G 4 抗体に曝露するステップと、(i i) フルオロフォアに複合した過剰の抗I g G 4 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流動系細胞選別を行って、T I M 3 に富むT I L 集団を取得するステップと、を含む。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗T I M 3 I g G 4 抗体は、ニボルマブ、またはそのバリエーション、断片、もしくは複合体である。いくつかの実施形態では、抗I g G 4 抗体は、クローン抗ヒトI g G 4、クローンH P 6 0 2 3 である。いくつかの実施形態では、ステップ(b)における選択において使用するための抗T I M 3 抗体は、E H 1 2、2 H 7 またはニボルマブと同じエピトープに結合する。

10

【0907】

腫瘍試料に由来するT I L がT I M 3 高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T I M 3 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T I M 3 陽性細胞は、蛍光から1つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、T I M 3 の発現レベルは、健康な対象からのC D 3 + / T I M 3 + 末梢T細胞（例えば、参照細胞）において測定され、腫瘍から取得されたT I L におけるT I M 3 の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、T I M 3 高T細胞のT I M 3 免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、T I M 3 発現が閾値と同じかそれを超えるT I L は、T I M 3 高細胞と見なすことができる。いくつかの事例では、T I M 3 高T I L は、全C D 3 + 細胞の最大1%以下に相当するT I M 3 免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、T I M 3 高T I L は、全C D 3 + 細胞の最大0.75%以下に相当するT I M 3 免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、T I M 3 高T I L は、全C D 3 + 細胞の最大0.50%以下に相当するT I M 3 免疫染色の強度が最も高いものを表す。1つの事例では、T I M 3 高T I L は、全C D 3 + 細胞の最大0.25%以下に相当するT I M 3 免疫染色の強度が最も高いものを表す。

20

30

【0908】

いくつかの実施形態では、W O 2 0 1 9 1 5 6 5 6 8 のP D - 1 ゲーティング法がT I M 3 に用いられる。腫瘍試料に由来するT I L がT I M 3 高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T I M 3 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T I M 3 陽性細胞は、蛍光から1つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、T I M 3 の発現レベルは、健康な対象からのC D 3 + / T I M 3 + 末梢T細胞（例えば、参照細胞）において測定され、腫瘍から取得されたT I L におけるT I M 3 の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、T I M 3 高T細胞のT I M 3 免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、T I M 3 発現が閾値と同じかそれを超えるT I L は、T I M 3 高細胞とみなすことができる。いくつかの事例では、T I M 3 高T I L は、全C D 3 + 細胞の最大1%以下に相当するT I M 3 免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、T I M 3 高T I L は、全C D 3 + 細胞の最大0.75%以下に相当するT I M 3 免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、T I M 3 高T I L は、全C D 3 + 細胞の最大0.50%以下に相当するT I M 3 免疫染色の強度が最も高いものを表す。1つの事例では、T I M 3 高T I L は、全C D 3 + 細胞の最大0.25%以下に相当するT I M 3 免疫染色の強度が最も高いものを表す。

40

50

【0909】

いくつかの実施形態では、選択されたTIM3陽性（TIM3+）細胞は、プライミングによる第1の増殖、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）のステップBを進める前に凍結することができる。

【0910】

a. 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TIM3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TIM3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、抗TIM3-PE、抗CD3-FITC、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PD1抗体とのインキュベーション後、TIM3陽性細胞は、本明細書に記載される、例えば、ステップBにおけるプライミングによる第1の増殖による増殖のために選択される。

【0911】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、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。

【0912】

12. TIGIT-TIGITの選択の事前選択（図1のステップA2に例示される）

本発明の方法によれば、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、TIGIT陽性（TIGIT+）であるように事前選択される。

【0913】

いくつかの実施形態では、本発明の T I L は、T I G I T などの枯渇マーカーについて事前選択される (P h i l i p , M . , e t a l . , N a t u r e . 5 4 5 (7 6 5 5) : 4 5 2 - 4 5 6 (2 0 1 7)) 。本発明の方法によれば、T I L は、プライミングによる第 1 の増殖の前に、T I G I T 陽性 (T I G I T +) であるように事前選択される。
【 0 9 1 4 】

いくつかの実施形態では、最低 3 , 0 0 0 個の T I L が、第 1 の増殖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 , 0 0 0 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 4 , 0 0 0 個の T I L が、第 1 の増殖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 , 0 0 0 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 5 , 0 0 0 個の T I L が、第 1 の増殖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 , 0 0 0 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 6 , 0 0 0 個の T I L が、第 1 の増殖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 , 0 0 0 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 7 , 0 0 0 個の T I L が、第 1 の増殖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 , 0 0 0 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 8 , 0 0 0 個の T I L が、第 1 の増殖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 , 0 0 0 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 9 , 0 0 0 個の T I L が、第 1 の増殖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 , 0 0 0 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、最低 1 0 , 0 0 0 個の T I L が、第 1 の増殖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 1 0 , 0 0 0 個の T I L をもたらす。いくつかの実施形態では、細胞を、2 0 0 , 0 0 0 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、2 0 0 , 0 0 0 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 の T I L を提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、1 5 0 , 0 0 0 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、1 5 0 , 0 0 0 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 の T I L を提供する。いくつかの実施形態では、細胞を、2 5 0 , 0 0 0 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、2 5 0 , 0 0 0 の密度まで成長または拡張させて、急速な第 2 の増殖を開始するための約 2×10^8 の T I L 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 の増殖を開始するための 1×10^6 を与えるために 1 0 , 0 0 0 個の細胞である。いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖を開始するための 1×10^6 の播種密度は、 1×10^9 を超える T I L をもたらし得る。

【 0 9 1 5 】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための T I L は、T I G I T 陽性 (T I G I T +) である (例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前)。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための T I L は、少なくとも 7 5 % T I G I T 陽性、少なくとも 8 0 % T I G I T 陽性、少なくとも 8 5 % T I G I T 陽性、少なくとも 9 0 % T I G I T 陽性、少なくとも 9 5 % T I G I T 陽性、少なくとも 9 8 % T I G I T 陽性、または少なくとも 9 9 % T I G I T 陽性である (例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第 1 の増殖の前)。いくつかの実施形態では、T I G I T 集団は、T I G I T 高である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖において使用するための T I L は、少なくとも 2 5 % T I G I T 高、少なくとも 3 0 % T I G I T 高、少なくとも 3 5 % T I G I T 高、少なくとも 4 0 % T I G I T 高、少なくとも 4 5 % T I G I T 高、少なくとも 5 0 % T I G I T 高、少なくとも 5 5 % T I G I T 高、少なくとも 6 0 % T I G I T 高、少なくとも 6 5 % T I G I T 高、少なくとも 7 0 % T I G I T 高、少なくとも 7 5 % T I G I T 高、少なくとも 8 0 % T I G I T 高、少なくとも 8 5 % T I G I T 高、少なくとも 9 0 % T I G I T 高、少なくとも 9 5 % T I G I T 高、少なくとも 9 8 % T I G I T 高、または

少なくとも99% TIGIT高である（例えば、事前選択の後、及びプライミングによる第1の増殖の前）。

【0916】

いくつかの実施形態では、TIGIT高は、少なくとも75% TIGIT陽性、少なくとも80% TIGIT陽性、少なくとも85% TIGIT陽性、少なくとも90% TIGIT陽性、少なくとも95% TIGIT陽性、少なくとも98% TIGIT陽性、少なくとも99% TIGIT陽性、または100% TIGIT陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIGIT高は、少なくとも80% TIGIT陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIGIT高は、少なくとも85% TIGIT陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIGIT高は、少なくとも90% TIGIT陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIGIT高は、少なくとも95% TIGIT陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIGIT高は、少なくとも98% TIGIT陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIGIT高は、少なくとも99% TIGIT陽性であるTIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIGIT高は、100% TIGIT陽性であるTIL集団によって示される。

10

【0917】

いくつかの実施形態では、TIGIT高は、TILが対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも25%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも30%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも35%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも40%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも45%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも50%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも55%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも60%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも65%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも70%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも75%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも80%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも85%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも90%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも95%高いTIGITを発現する、対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも少なくとも99%高いTIGITを発現する、または対照もしくはベースラインTIGITレベルよりも100%高いTIGITを発現する、TIL集団によって示される。

20

30

【0918】

いくつかの実施形態では、TIGIT高は、TILが対照またはベースラインTIGITレベルよりも1倍以上のTIGITを発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIGIT高は、TILが対照またはベースラインTIGITレベルよりも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍以上のTIGITを発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIGIT高は、TILが対照またはベースラインTIGITレベルよりも1倍以上のTIGITを発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIGIT高は、TILが対照またはベースラインTIGITレベルよりも2倍以上のTIGITを発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIGIT高は、TILが対照またはベースラインTIGITレベルよりも3倍以上のTIGITを発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIGIT高は、TILが対照またはベースラインTIGITレベル

40

50

よりも4倍以上のTIGITを発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIGIT高は、TILが対照またはベースラインTIGITレベルよりも5倍以上のTIGITを発現する、TIL集団によって示される。いくつかの実施形態では、TIGIT高は、TILが対照またはベースラインTIGITレベルよりも10倍以上のTIGITを発現する、TIL集団によって示される。

【0919】

いくつかの実施形態では、TIGIT陽性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TIGIT抗体で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗TIGIT抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトTIGITポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトTIGIT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TIGIT抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態では、抗TIGIT抗体には、例えば、チラゴルマブ（抗TIGIT、RG6058）、BMS-986207、OMP-313M32、BGB-A1217、IBI939、COM902、EOS884448（EOS-448）、エチギリマブ、MK-7684、及び／またはAB154が含まれるが、これらに限定されない。

【0920】

いくつかの実施形態では、事前選択で使用するための抗TIGIT抗体は、TIGITを発現してい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。

【0921】

いくつかの実施形態では、患者は、抗TIGIT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TIGIT抗体治療ナীবである。いくつかの実施形態では、対象は、抗TIGIT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TIGIT抗体治療後である。いくつかの実施形態では、対象は、化学療法治療後及び抗TIGIT抗体治療後である。いくつかの実施形態では、患者は、抗TIGIT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TIGIT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であり、かつ化学療法治療後であるが、抗TIGIT抗体治療ナীবである。

【0922】

患者が以前に第1の抗TIGIT抗体で治療されているいくつかの実施形態では、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、一次TIL細胞集団の表面上でTIGITに結合することから第1の抗TIGIT抗体により遮断されていない第2の抗TIGIT抗体で染色することにより行われる。

【0923】

患者が以前に抗TIGIT抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次TIL細胞集団を、一次TIL細胞集団の表面上で不溶化された抗TIGIT抗体のFc領域に結合する抗体（「抗Fc抗体」）で染色することにより行われる。いくつかの実施形態では、抗Fc抗体は、ポリクローナル抗体、例えば、マウス抗ヒトFcポリクローナル抗体、ヤギ抗ヒトFc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Fc抗体は、モノクローナル抗体である。患者が以前に抗TIGITヒトまたはヒト化IgG抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG抗体で染色される。患者が以前に抗TIGITヒトまたはヒト化IgG1抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG1抗体で染色される。患者が以前に抗TIGITヒトまたはヒト化IgG2抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次TIL細胞集団は、抗ヒトIgG2抗体で染色される。患者が以前に抗TIGITヒトまたはヒト化IgG3抗体で治療されているいくつかの実施形

態では、一次 T I L 細胞集団は、抗ヒト I g G 3 抗体で染色される。患者が以前に抗 T I G I T ヒトまたはヒト化 I g G 4 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、一次 T I L 細胞集団は、抗ヒト I g G 4 抗体で染色される。

【0924】

患者が以前に抗 T I G I T 抗体で治療されているいくつかの実施形態では、事前選択は、一次 T I L 細胞集団を、同じ抗 T I G I T 抗体と接触させることと、次いで、一次 T I L 細胞集団を、一次 T I L 細胞集団の表面上で不溶化された抗 T I G I T 抗体の F c 領域に結合する抗 F c 抗体で染色することにより行われる。

【0925】

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、第 1 の集団及び P B M C 集団の両方におけるフルオロフォアの強度を使用して、それぞれ T I G I T 陰性 T I L、T I G I T 中間 T I L、及び T I G I T 陽性 T I L に対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するための FACS ゲートを設定する。いくつかの実施形態では、細胞選別方法は、P B M C、F M O 対照、及び試料自体を使用して 3 つの集団を区別して、ゲートが高、中 (中間とも称される)、及び低 (陰性とも称される) に設定されるように行われる。いくつかの実施形態では、P B M C は、ゲーティング対照として使用される。いくつかの実施形態では、T I G I T 高集団は、P B M C において観察されるものを超える T I G I T に対して陽性である細胞集団として定義される。いくつかの実施形態では、T I L の T I G I T + 中間集団は、P B M C 中の T I G I T + 細胞を包含する。いくつかの実施形態では、陰性は、F M O に基づいてゲートされる。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 T I L 集団を取得及び／または受容す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、選別ごとに設定される。いくつかの実施形態では、ゲーティングは、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、10 日、20 日、30 日、40 日、50 日、または 60 日毎に P B M C から設定される。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 から設定される。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。

【0926】

いくつかの実施形態では、T I G I T 事前選択のゲーティングは、事前選択手順毎に固定される。いくつかの実施形態では、固定されるゲーティング手順は、C D 3 + ゲーティング手順である。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別中に取得された集団に基づいて決定される。いくつかの実施形態では、ゲーティング手順は固定されていないが、各選別事象中に取得された集団が C D 3 + ゲーティング手順であることに基づいて決定される。

【0927】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (MFI) のゲーティング及び補正は、約 0.5 % ± 0.25 % の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (MFI) のゲーティング及び補正は、約 1.75 % ± 0.25 % の範囲である。いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (MFI) のゲーティング及び補正は、P B M C で T I G I T 高ゲートを設定する場合、約 1.75 % ± 0.25 % の範囲である。いくつかの実施形態では、MFI 計算は、P B M C の 1、2、3、もしくは 4 以上のロットまたはバッチから測定される平均値を使用する。いくつかの実施形態では、MFI 計算は、P B M C の 1、2、3、もしくは 4 以上のロットまたはバッチから測定される中央値を使用する。

【0928】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度 (MFI) を決定するために使用される FACS 選別のゲーティング及び補正方法は、対照 PBMC (例えば、健康なドナーからの PBMC) に対する TIGIT の MFI が、TIGIT 高ゲートに対して約 0.5%~2.0% (例えば、約 0.5%、0.55%、0.6%、0.65%、0.7%、0.75%、0.8%、0.85%、0.9%、0.95%、1.0%、1.05%、1.1%、1.15%、1.2%、1.25%、1.3%、1.35%、1.4%、1.45%、1.5%、1.55%、1.6%、1.65%、1.7%、1.75%、1.8%、1.85%、1.9%、1.95%、または 2.0%) の範囲になるように調整される。いくつかの実施形態では、MFI 計算は、PBMC の少なくとも 2 つの試料を使用して測定された平均値である。いくつかの実施形態では、MFI 計算は、PBMC の少なくとも 2 つの試料を使用して測定された中央値である。

10

【0929】

いくつかの実施形態では、TIGIT 陽性 (TIGIT+) 細胞は、FACS 及び／または他のフローサイトメトリー法によって選別される。いくつかの実施形態では、TIGIT 陽性 TIL は、TIGIT 高 TIL である。いくつかの実施形態では、TIGIT 陽性 TIL は、TIGIT 中間 TIL である。いくつかの実施形態では、TIGIT+ 細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、TIGIT+ 細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、Miltenyi または Fisher などの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、TIGIT+ 高細胞は、ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、TIGIT+ 高細胞は、磁気ビーズ選択法を利用することによって選別される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択は、抗体結合ビーズ、例えば、限定されないが、Miltenyi または Fisher などの市販のビーズを選択のために利用する。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT 抗体は、ビーズと直接的または間接的に複合される。いくつかの実施形態では、ビーズ選択プロセスは、TIGIT+ 及び CD3+ TIL の両方を選択する。いくつかの実施形態では、抗 TIGIT 抗体には、例えば、チラゴルマブ (抗 TIGIT、RG6058)、BMS-986207、OMP-313M32、BGB-A1217、IBI939、COM902、EOS884448 (EOS-448)、エチギリマブ、MK-7684、及び／または AB154 が含まれるが、これらに限定されない。

20

30

【0930】

いくつかの実施形態では、TIGIT+ 細胞及び／または TIGIT 陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含まない。いくつかの実施形態では、TIGIT+ 細胞及び／または TIGIT 陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、血清を含む。いくつかの実施形態では、TIGIT+ 細胞及び／または TIGIT 陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、選別緩衝液と下流緩衝液及び／または培地との間の粘度差を軽減または低減する成分を含む。いくつかの実施形態では、TIGIT+ 細胞及び／または TIGIT 陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、ヒト血清アルブミン (HSA) のみを含む。いくつかの実施形態では、TIGIT+ 細胞及び／または TIGIT 陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、等量の HSA 及び PBS / EDTA 緩衝液を含む。いくつかの実施形態では、TIGIT+ 細胞及び／または TIGIT 陰性細胞を収集するために利用される収集緩衝液は、HSA 及び PBS / EDTA 緩衝液を 1:1、1:2、1:3、1:4、2:1、3:1、または 4:1 の比率で含む。

40

【0931】

いくつかの実施形態では、事前選択は、第 1 の TIL 集団から TIGIT 陽性 TIL を選択して、TIGIT に富む TIL 集団を取得することに関与し、少なくとも 11.27%~74.4% が TIGIT 陽性 TIL である第 1 の TIL 集団から TIL 集団を選択することを含む。いくつかの実施形態では、第 1 の TIL 集団は、少なくとも 20~80%

50

TIGIT陽性TIL、少なくとも20～80% TIGIT陽性TIL、少なくとも30～80% TIGIT陽性TIL、少なくとも40～80% TIGIT陽性TIL、少なくとも50～80% TIGIT陽性TIL、少なくとも10～70% TIGIT陽性TIL、少なくとも20～70% TIGIT陽性TIL、少なくとも30～70% TIGIT陽性TIL、または少なくとも40～70% TIGIT陽性TILである。

【0932】

いくつかの実施形態では、選択ステップ（例えば、TIGIT陽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、TIGITのIgVドメインの外側のN末端ループによってTIGITに結合する過剰のモノクローナル抗TIGIT IgG4抗体に曝露するステップと、

10

（ii）フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4抗体を追加するステップと、

（iii）蛍光活性化細胞選別法（FACS）により行われた場合のPBMC集団の強度と比較した第1のTIL集団中のTIGIT陽性TILのフルオロフォアの強度に基づいて、TIGITに富むTIL集団を取得するステップと、を含む。

【0933】

いくつかの実施形態では、TIGIT陽性TILは、TIGIT高TILである。

【0934】

いくつかの実施形態では、TIGITに富むTIL集団の少なくとも70%が、TIGIT陽性TILである。いくつかの実施形態では、TIGITに富むTIL集団の少なくとも80%が、TIGIT陽性TILである。いくつかの実施形態では、TIGITに富むTIL集団の少なくとも90%が、TIGIT陽性TILである。いくつかの実施形態では、TIGITに富むTIL集団の少なくとも95%が、TIGIT陽性TILである。いくつかの実施形態では、TIGITに富むTIL集団の少なくとも99%が、TIGIT陽性TILである。いくつかの実施形態では、TIGITに富むTIL集団の100%が、TIGIT陽性TILである。

20

【0935】

いくつかの実施形態では、TIM3陽性TILの選択は、少なくとも 1×10^4 TILのTIGIT陽性TIL、少なくとも 1×10^5 TILのTIGIT陽性TIL、少なくとも 1×10^6 TILのTIGIT陽性TIL、少なくとも 1×10^7 TILのTIGIT陽性TIL、少なくとも 1×10^8 TILのTIGIT陽性TILが存在するまで行われる。いくつかの実施形態では、TIGIT陽性TILの選択は、少なくとも 1×10^6 TILのTIGIT陽性TILが存在するまで行われる。

30

【0936】

いくつかの実施形態では、図1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、TIGITのIgVドメインの外側のN末端ループによってTIGITに結合する過剰のモノクローナル抗TIGIT IgG4抗体に曝露するステップと、（ii）フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4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流動系細胞選別を行って、TIGITに富むTIL集団を取得するステップと、を含む。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗TIGIT IgG4抗体は、ニボルマブ、またはそのバリエーション、断片、もしくは複合体である。いくつかの実施形態では、抗IgG4抗体は、クローン抗ヒトIgG4、クローンHP6023である。いくつかの実施形態では、ステップ（b）における選択において使用するための抗TIGIT抗体は、EH12、2H7またはニボルマブと同じエピトープに結合する。

40

【0937】

腫瘍試料に由来するTILがTIGIT高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TIGIT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TIGIT陽性

50

細胞は、蛍光から1つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、TIGITの発現レベルは、健康な対象からのCD3+/TIGIT+末梢T細胞（例えば、参照細胞）において測定され、腫瘍から取得されたTILにおけるTIGITの免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、TIGIT高T細胞のTIGIT免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、TIGIT発現が閾値と同じかそれを超えるTILは、TIGIT高細胞とみなすことができる。いくつかの事例では、TIGIT高TILは、全CD3+細胞の最大1%以下に相当するTIGIT免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、TIGIT高TILは、全CD3+細胞の最大0.75%以下に相当するTIGIT免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、TIGIT高TILは、全CD3+細胞の最大0.50%以下に相当するTIGIT免疫染色の強度が最も高いものを表す。1つの事例では、TIGIT高TILは、全CD3+細胞の最大0.25%以下に相当するTIGIT免疫染色の強度が最も高いものを表す。

10

【0938】

いくつかの実施形態では、WO2019/156568のPD-1ゲーティング法がTIGITに用いられる。腫瘍試料に由来するTILがTIGIT高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TIGIT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TIGIT陽性細胞は、蛍光から1つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、TIGITの発現レベルは、健康な対象からのCD3+/TIGIT+末梢T細胞（例えば、参照細胞）において測定され、腫瘍から取得されたTILにおけるTIGITの免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、TIGIT高T細胞のTIGIT免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、TIGIT発現が閾値と同じかそれを超えるTILは、TIGIT高細胞とみなすことができる。いくつかの事例では、TIGIT高TILは、全CD3+細胞の最大1%以下に相当するTIGIT免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、TIGIT高TILは、全CD3+細胞の最大0.75%以下に相当するTIGIT免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、TIGIT高TILは、全CD3+細胞の最大0.50%以下に相当するTIGIT免疫染色の強度が最も高いものを表す。1つの事例では、TIGIT高TILは、全CD3+細胞の最大0.25%以下に相当するTIGIT免疫染色の強度が最も高いものを表す。

20

30

【0939】

いくつかの実施形態では、選択されたTIGIT陽性（TIGIT+）細胞は、プライミングによる第1の増殖、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）のステップBを進める前に凍結することができる。

【0940】

a. 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TIGIT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TIGIT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、抗TIGIT-PE、抗CD3-FITC、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PD1抗体とのインキュベーション後、TIGIT陽性細胞は、本明細書に記載される、例えば、ステップBにおけるプライミングによる第1の増殖による増殖のために選択される。

40

【0941】

50

いくつかの実施形態では、フルオロフォアには、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 (ペリジニクロロフィルタンパク質)、D y L i g h t 405、A l e x a F l u o r 405、P a c i f i c B l u e、A l e x a F l u o r 488、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 550、A l e x a F l u o r 647、D y L i g h t 650、及びA l e x a F l u o r 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、P E - A l e x a F l u o r (登録商標) 647、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) 750、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G A B A、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-c y s - C y 5、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 (T E X A S R E D (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、C y 3、C y 3 B、C y 3.5、C y 5、C y 5.5、及びC y 7が含まれるが、これらに限定されない。

10

20

30

40

50

【0942】

13. 複数の事前選択 (図1のステップA2に例示される)

いくつかの実施形態では、T I L は、プライミングによる第1の増殖の前に、P D - 1 陽性 (P D - 1 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、プライミングによる第1の増殖の前に、C D 3 9 陽性 (C D 3 9 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、プライミングによる第1の増殖の前に、C D 3 8 陽性 (C D 3 8 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、プライミングによる第1の増殖の前に、C D 1 0 3 陽性 (C D 1 0 3 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、プライミングによる第1の増殖の前に、L A G 3 陽性 (L A G 3 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、プライミングによる第1の増殖の前に、T I M 3 陽性 (T I M 3 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、プライミングによる第1の増殖の前に、T I G I T 陽性 (T I G I T +) であるように事前選択される。

【0943】

いくつかの実施形態では、T I L は、プライミングによる第1の増殖の前に、P D - 1 陽性 (P D - 1 +) 及びC D 3 9 陽性 (C D 3 9 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、プライミングによる第1の増殖の前に、P D - 1 陽性 (P D - 1 +) 及びC D 1 0 3 陽性 (C D 1 0 3 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、プライミングによる第1の増殖の前に、C D 3 9 陽性 (C D 3 9 +) 及びC D 1 0 3 陽性 (C D 1 0 3 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、プライミングによる第1の増殖の前に、C D 3 9 陽性 (C D 3 9 +) 及びC D 1 0 1 陽性 (C D 1 0 1 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、プライミングによる第1の増殖の前に、P D - 1 陽性 (P D -

1+)、CD39陽性(CD39+)、及びCD103陽性(CD103+)であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、PD-1陽性(PD-1+)及びCD101陽性(CD101+)であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、CD39陽性(CD39+)及びCD103陽性(CD103+)であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、PD-1陽性(PD-1+)、CD39陽性(CD39+)、CD103陽性(CD103+)、及びCD101陽性(CD101+)であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、CD39陽性(CD39+)、CD103陽性(CD103+)、及びCD101陽性(CD101+)であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、PD-1陽性(PD-1+)及びLAG3陽性(LAG3+陽性)であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、PD-1陽性(PD-1+)及びTIM3陽性(TIM3+)であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、PD-1陽性(PD-1+)及びTIGIT陽性(TIGIT+)であるように事前選択される。

10

【0944】

いくつかの実施形態では、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、PD-1陽性(PD-1+)、CD39陽性(CD39+)、CD38陽性(CD38+)、CD103陽性(CD103+)、CD101陽性(CD101+)、LAG3陽性(LAG3+陽性)、TIM3陽性(TIM3+)、及び／またはTIGIT陽性(TIGIT+)であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、PD-1陽性(PD-1+)、CD39陽性(CD39+)、CD38陽性(CD38+)、CD103陽性(CD103+)、CD101陽性(CD101+)、LAG3陽性(LAG3+陽性)、TIM3陽性(TIM3+)、及び／またはTIGIT陽性(TIGIT+)のうちのいずれか2つに対して陽性であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、PD-1陽性(PD-1+)、CD39陽性(CD39+)、CD38陽性(CD38+)、CD103陽性(CD103+)、CD101陽性(CD101+)、LAG3陽性(LAG3+陽性)、TIM3陽性(TIM3+)、及び／またはTIGIT陽性(TIGIT+)のうちのいずれか3つに対して陽性であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、PD-1陽性(PD-1+)、CD39陽性(CD39+)、CD38陽性(CD38+)、CD103陽性(CD103+)、CD101陽性(CD101+)、LAG3陽性(LAG3+陽性)、TIM3陽性(TIM3+)、及び／またはTIGIT陽性(TIGIT+)のうちのいずれか4つに対して陽性であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、PD-1陽性(PD-1+)、CD39陽性(CD39+)、CD38陽性(CD38+)、CD103陽性(CD103+)、CD101陽性(CD101+)、LAG3陽性(LAG3+陽性)、TIM3陽性(TIM3+)、及び／またはTIGIT陽性(TIGIT+)のうちのいずれか5つに対して陽性であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、PD-1陽性(PD-1+)、CD39陽性(CD39+)、CD38陽性(CD38+)、CD103陽性(CD103+)、CD101陽性(CD101+)、LAG3陽性(LAG3+陽性)、TIM3陽性(TIM3+)、及び／またはTIGIT陽性(TIGIT+)のうちのいずれか6つに対して陽性であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、TILは、プライミングによる第1の増殖の前に、PD-1陽性(PD-1+)、CD39陽性(CD39+)、CD38陽性(CD38+)、CD103陽性(CD103+)、CD101陽性(CD101+)、LAG3陽性(LAG3+陽性)、TIM3陽性(TIM3+)、及び／またはTIGIT陽性(TIGIT+)

20

30

40

50

G I T +) のすべてに対して陽性であるように事前選択される。

【0945】

いくつかの実施形態では、T I L が、P D - 1 陽性 (P D - 1 +)、L A G 3 陽性 (L A G 3 + 陽性)、C D 3 8 陽性 (C D 3 8 +)、及び C D 1 0 1 陽性 (C D 1 0 1 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、P D - 1 高、L A G 3 高、C D 3 8 低、及び C D 1 0 1 低であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L が、P D - 1 陽性 (P D - 1 +)、L A G 3 陽性 (L A G 3 + 陽性)、及び C D 3 8 陽性 (C D 3 8 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、P D - 1 高、L A G 3 高、及び C D 3 8 低であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L が、P D - 1 陽性 (P D - 1 +)、L A G 3 陽性 (L A G 3 + 陽性)、及び C D 1 0 1 陽性 (C D 1 0 1 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、P D - 1 高、L A G 3 高、及び C D 1 0 1 低であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L が、P D - 1 陽性 (P D - 1 +) 及び C D 3 8 陽性 (C D 3 8 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、P D - 1 高及び C D 3 8 低であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L が、P D - 1 陽性 (P D - 1 +) 及び C D 1 0 1 陽性 (C D 1 0 1 +) であるように事前選択される。いくつかの実施形態では、T I L は、P D - 1 高及び C D 1 0 1 低であるように事前選択される。

10

【0946】

a. 蛍光方法 / アッセイ

20

本発明は、例えば、F A C S などのフローサイトメトリー法を含む方法を提供し、アッセイは、検出のために蛍光標識抗体を用いる。これらのアッセイ及び実施形態で使用されるフルオロクロムは、当該技術分野で周知である。いくつかの実施形態では、蛍光色素には、例えば、P E、A P C、P E - C y 5、A l e x a F l u o r 6 4 7、P E - C y - 7、P e r C P - C y 5. 5、A l e x a F l u o r 4 8 8、P a c i f i c B l u e、F I T C、A m C y a n、A P C - C y 7、P e r C P、及び A P C - H 7 が含まれるが、これらに限定されない。

【0947】

いくつかの実施形態において、W O 2 0 1 9 1 5 6 5 6 8 の P D - 1 ゲーティング法は、P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び / または T I G I T に用いられる。腫瘍試料に由来する T I L が T I G I T 高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 P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び / または T I G I T 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 P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び / または T I G I T 陽性細胞は、蛍光から 1 つ差し引いた対照と、一致するアイソタイプ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、P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び / または T I G I T の発現レベルは、健康な対象からの C D 3 + / (P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び / または T I G I T +) 末梢 T 細胞 (例えば、参照細胞) において測定され、腫瘍から取得された T I L における P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び / または T I G I T の免疫染色強度の閾値またはカットオフ値を確立するために使用される。閾値は、P D - 1 高、C D 3 9 高、C D 3 8 高、C D 1 0 3 高、C D 1 0 1 高、L A G 3 高、T I M 3 高、及び / または T I G I T 高 T 細胞の P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び / または T I G I T 免疫染色の最小強度として定義することができる。そのため、P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び / または T I G I T 発現が閾値と同じかそれを超える T I L は、P D - 1 高、C D 3 9 高、C D 3 8 高、C D 1 0 3 高、C D 1 0 1 高、L A G 3 高、T I M 3 高、及び / または T I G I T 高細胞とみなすことができる。い

30

40

50

くつかの事例では、PD-1 高、CD39 高、CD38 高、CD103 高、CD101 高、LAG3 高、TIM3 高、及び／またはTIGIT 高TILは、全CD3+細胞の最大1%以下に相当するPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT免疫染色の強度が最も高いものを表す。他の事例では、PD-1 高、CD39 高、CD38 高、CD103 高、CD101 高、LAG3 高、TIM3 高、及び／またはTIGIT 高TILは、全CD3+細胞の最大0.75%以下に相当するPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT免疫染色の強度が最も高いものを表す。いくつかの事例では、PD-1 高、CD39 高、CD38 高、CD103 高、CD101 高、LAG3 高、TIM3 高、及び／またはTIGIT 高TILは、全CD3+細胞の最大0.50%以下に相当するPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT免疫染色の強度が最も高いものを表す。一事例では、PD-1 高、CD39 高、CD38 高、CD103 高、CD101 高、LAG3 高、TIM3 高、及び／またはTIGIT 高TILは、全CD3+細胞の最大0.25%以下に相当するPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT免疫染色の強度が最も高いものを表す。

10

【0948】

いくつかの実施形態では、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT+TILの数を定量化することは、陽性TILが、所定の参照値1（例えば、REF1と称される）と同等またはそれ以上である、それぞれのPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに対する免疫染色の強度を示し、腫瘍試料中のTILの総数または参照試料中のPBMCの総数と比較して、腫瘍試料中のPD-1+、CD39+、CD38+、CD103+、CD101+、LAG3+、TIM3+、及び／またはTIGIT+TILのパーセント（%）を取得する。

20

【0949】

いくつかの実施形態では、PD-1の免疫染色の強度の所定の参照値1（REF1）を確立するための方法は、i)健康なヒトドナーから少なくとも1つの血液試料を提供するステップと、ii)当該血液試料から末梢血単核細胞（PBMC）を単離するステップと、iii)ステップ（ii）のPBMC試料を、ヒトTリンパ球マーカー（CD3などのM）に対する（例えば、標識された）抗体及びPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに対する標識された抗体との特異的抗原-抗体結合を可能にする、当該PBMC試料中のPD-1+、CD39+、CD38+、CD103+、CD101+、LAG3+、TIM3+、及び／またはTIGIT+T細胞及びM+／（PD-1+、CD39+、CD38+、CD103+、CD101+、LAG3+、TIM3+、及び／またはTIGIT+TIL）T細胞を含むM+細胞の検出を可能にする条件下でインキュベートするステップと、iv)ステップ（iii）のM+／（PD-1+、CD39+、CD38+、CD103+、CD101+、LAG3+、TIM3+及び／またはTIGIT+T細胞）についてPD-1の免疫染色の強度を測定するステップと、v)PD-1について最も高い免疫染色強度を有するステップ（iv）のM+／（PD-1+、CD39+、CD38+、CD103+、CD101+、LAG3+、TIM3+、及び／またはTIGIT+）T細胞の上位0.50%～上位1.5%、好ましくは上位1%を選択するステップと、vi)ステップ（v）のM+／（PD-1+、CD39+、CD38+、CD103+、CD101+、LAG3+、TIM3+、及び／またはTIGIT+）T細胞の上位0.50%～上位1.5%、好ましくは上位1.0%におけるPD-1についての最小の免疫染色強度を決定し、これにより、所定の参照値（REF）またはベースライン値を確立するステップと、を含む。

30

40

【0950】

この実施形態では、抗PD-1、抗CD39、抗CD38、抗CD103、抗CD101、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGIT抗体と付着した蛍光色素剤を使

50

用して、フローサイトメーターがサイズ、粒度、及び蛍光光に基づいて選別できるようにすることは、非常に有利である。したがってフローサイトメーターは、細胞試料の相対サイズ（前方散乱または「FSC」）、粒度または内部複雑性（側方散乱または「SSC」）、及び相対蛍光強度に関する情報を提供するように構成され得る。蛍光は、PD-1発現、CD39発現、CD38発現、CD103発現、CD101発現、LAG3発現、TIM3発現、及び／またはTIGIT発現に基づいて選別され、サイトメーターがこれらの単球を識別し、濃縮することを可能にする。

【0951】

いくつかの実施形態では、蛍光法またはアッセイは、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療用TIL集団に拡張するための方法の一部として使用される。方法は、

10

（a）対象から切除され、消化された腫瘍試料から第1のTIL集団を取得及び／または受容し、第1のTIL集団を含む腫瘍消化物を産生するステップと、

（b）（a）の第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することであって、第1のTIL集団の少なくとも0.5%～90%の範囲が、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILである、取得するステップと、

（c）PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、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の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日の第1の期間行われ、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、産生するステップと、

20

（d）第2のTIL集団の細胞培養培地に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の増殖に追加される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の増殖が、約1～11日の第2の期間行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、産生するステップと、

30

（e）ステップ（d）から取得された治療用TIL集団を採取するステップと、

（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ステップとを含む。

【0952】

いくつかの実施形態では、ステップ（b）における選択は、第1のTIL集団の少なくとも0.5%～90%の範囲が、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILであることを選択することを含む。いくつかの実施形態では、ステップ（b）における選択は、第1のTIL集団の少なくとも0.5%～80%の範囲が、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILであることを選択することを含む。いくつかの実施形態では、ステップ（b）における選択は、第1のTIL集団の少なくとも0.5%～70%の範囲が、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILであることを選択することを含む。いくつかの実施形態では、ステップ（b）における選択は、第1のTIL集団の少なくとも0.5%～60%の範囲が、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILであることを選択することを含む。いくつかの実施形態では、ステップ（b）における選択は、

40

50

40

いくつかの実施形態では、ステップ (b) の選択は、

50

の抗PD-1、抗CD39、抗CD38、抗CD103、抗CD101、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGIT抗体に曝露するステップ、

(ii) フルオロフォアに複合した過剰の抗IgG4抗体（または抗PD-1、抗CD39、抗CD38、抗CD103、抗CD101、抗LAG3、抗TIM3、及び／または抗TIGITに結合する他の抗体）を追加するステップ、

(iii) 蛍光活性化細胞選別法（FACS）により行われた場合のPBMC集団の強度と比較した第1のTIL集団中のPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILのフルオロフォアの強度に基づいて、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得するステップ、を含む。

10

【0954】

いくつかの実施形態では、第1の集団及びPBMC集団の両方におけるフルオロフォアの強度を使用して、PD-1、CD39、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITのうちのいずれか1つ以上について陰性、中間、高のTIL陽性に対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するためのFACSゲートを設定する。

【0955】

いくつかの実施形態では、FACSゲートは、ステップ（a）の後に設定される。

【0956】

いくつかの実施形態では、PD-1陽性TILは、PD-1高TILである。いくつかの実施形態では、PD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILが、PD-1高、LAG3高、TIM3高、及び／またはTIGIT高TILである。いくつかの実施形態では、PD-1に富むTIL集団の少なくとも80%が、PD-1陽性TILである。いくつかの実施形態では、PD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団の少なくとも80%が、PD-1、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILである。

20

【0957】

いくつかの実施形態では、第1の集団及びPBMC集団の両方におけるフルオロフォアの強度を使用して、それぞれPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陰性TIL、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT中間TIL、及びPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILに対応する低、中、及び高レベルの強度を確立するためのFACSゲートを設定する。いくつかの実施形態では、FACSゲートは、ステップ（a）の後に設定される。いくつかの実施形態では、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILが、PD-1高、LAG3高、TIM3高、及び／またはTIGIT高TILである。いくつかの実施形態では、PD-1、CD39、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団の少なくとも80%が、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILである。いくつかの実施形態では、PD-1に富むTIL集団の少なくとも80%が、PD-1陽性TILであり、LAG3に富むTIL集団の少なくとも80%が、LAG3陽性TILであり、TIM3に富むTIL集団の少なくとも80%が、TIM3陽性TILであり、及び／またはTIGIT高に富むTIL集団の少なくとも80%が、PD-1陽性TILである。

30

40

【0958】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアの強度は、直接強度または正規化された強度によって測定され得る。いくつかの実施形態では、強度は、対照または参照強度と比較される。いくつかの実施形態では、蛍光強度は、参照または対照強度と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%

50

以上増加する。いくつかの実施形態では、参照または対照強度と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%以上の蛍光強度の増加は、参照マーカーについての陽性TIL集団を示す。

【0959】

いくつかの実施形態では、フルオロフォアの強度は、直接強度または正規化された強度によって測定され得る。いくつかの実施形態では、強度は、対照または参照強度と比較される。いくつかの実施形態では、蛍光強度は、参照または対照強度と比較して、少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍以上増加する。いくつかの実施形態では、参照または対照強度と比較して、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、150%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%以上の蛍光強度の増加は、参照マーカーについての陽性TIL集団を示す。

【0960】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度(MFI)を決定するために使用されるFACS選別のゲーティング及び補正方法は、対照PBMC(例えば、健康なドナーからのPBMC)に対するPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/またはTIGITのMFIが、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び/またはTIGIT高ゲートに対して約0.5%~2.0%(例えば、約0.5%、0.55%、0.6%、0.65%、0.7%、0.75%、0.8%、0.85%、0.9%、0.95%、1.0%、1.05%、1.1%、1.15%、1.2%、1.25%、1.3%、1.35%、1.4%、1.45%、1.5%、1.55%、1.6%、1.65%、1.7%、1.75%、1.8%、1.85%、1.9%、1.95%、または2.0%)の範囲になるように調整される。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの少なくとも2つの試料を使用して測定された平均値である。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの少なくとも2つの試料を使用して測定された中央値である。

【0961】

いくつかの実施形態では、平均蛍光強度(MFI)を決定するために使用されるFACS選別のゲーティング及び補正方法は、対照PBMC(例えば、健康なドナーからのPBMC)に対するPD-1のMFIが、PD-1高ゲートに対して約0.5%~2.0%(例えば、約0.5%、0.55%、0.6%、0.65%、0.7%、0.75%、0.8%、0.85%、0.9%、0.95%、1.0%、1.05%、1.1%、1.15%、1.2%、1.25%、1.3%、1.35%、1.4%、1.45%、1.5%、1.55%、1.6%、1.65%、1.7%、1.75%、1.8%、1.85%、1.9%、1.95%、または2.0%)の範囲になるように調整される。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの少なくとも2つの試料を使用して測定された平均値である。いくつかの実施形態では、MFI計算は、PBMCの少なくとも2つの試料を使用して測定された中央値である。

【0962】

いくつかの実施形態では、PD-1高発現、LAG3高発現、TIM3高発現、及び/またはTIGIT高発現は、約80%、約70%、約60%、約50%、約40%、約30%、約20%、または約10%からなる群から選択される正規化された蛍光強度の最小カットオフを使用するフローサイトメトリーによって決定される。

【0963】

対照、対照値、参照、参照値、または参照レベルは、特定の対照またはベースライン値と比較して、絶対値、相対値、上限または下限を有する値、値の範囲、平均値、特定の対照もしくはベースライン値と比較した中央値、平均値、または値であり得る。参照値は、

例えば、試験対象由来の試料から取得された値などの個々の試料値に基づくが、より早い時点であり得る。参照値は、年代的に一致した群の対象の集団からのものなどの多数の試料に基づくか、または試験される試料を含むもしくは除外する試料のプールに基づき得る。

【0964】

B. ステップB：プライミングによる第1の増殖

いくつかの実施形態では、本方法は、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、より若いTILを提供する。若いTILの特徴は、文献、例えば、Donia, et al., *Scandinavian Journal of Immunology*, 75:157-167 (2012)、Dudley et al., *Clin Cancer Res*, 16:6122-6131 (2010)、Huang et al., *J Immunother*, 28(3):258-267 (2005)、Besser et al., *Clin Cancer Res*, 19(17):OF1-OF9 (2013)、Besser et al., *J Immunother* 32:415-423 (2009)、Robbins, et al., *J Immunol* 2004;173:7125-7130、Shen et al., *J Immunother*, 30:123-129 (2007)、Zhou, et al., *J Immunother*, 28:53-62 (2005)、及びTran, et al., *J Immunother*, 31:742-751 (2008)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。いくつかの実施形態では、プロセスは、図1Aで提供されるプロセス、及びPCT/US2018/012633に記載されているプロセスである。

【0965】

例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）のステップAに記載されるような腫瘍断片及び／または腫瘍断片の（例えば、全腫瘍消化物及び／または全腫瘍細胞懸濁液を取得するための）剥離または消化後、取得された細胞は、腫瘍及び他の細胞よりもTILの成長に有利な条件下、IL-2、OKT-3、及びフィーダー細胞（例えば、抗原提示フィーダー細胞または照射された同種異系PBMC）を含有する血清中で培養される。いくつかの実施形態では、IL-2、OKT-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、容器当たり（断片が用いられる実施形態では）最大60個の断片及び6000IU/mLのIL-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1～8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、この期間は活性化Iと呼ばれる。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1～7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の増殖は、1～8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。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖は、1～7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、プライミングによる第1の増殖は、1～3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、プライミングによる第1の増殖は、1～4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、プライミングによる第1の増殖は、1～5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、プライミングによる第1の増殖は、1～6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の増殖は、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の増殖は、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の増殖は、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の増殖は、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の増殖は、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の増殖は、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の増殖は、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

【0966】

いくつかの実施形態では、このプライミングによる第1の増殖は、約6～11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の増殖は、約7～11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の増殖は、約8～11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の増殖は、約9～11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の増殖は、約10～11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の増殖は、約9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の増殖は、約10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の増殖は、約11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。

20

30

【0967】

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} 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、治療上有効な投与量は、約 1.2×10^{10} ～約 4.3×10^{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 3×10^{10} ～約 12×10^{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 4×10^{10} ～約 10×10^{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 5×10^{10} ～約 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 6×10^{10} ～約 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 7×10^{10} ～約 8×10^{10} のTILである。

40

50

【0968】

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。

【0969】

いくつかの実施形態では、TILの増殖は、以下及び本明細書に記載のプライミングによる第1の増殖ステップ（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、かつ0日目及び／または培養開始からフィーダー細胞を含む、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）のステップBに記載されるものなど）、その後、以下のステップD及び本明細書に記載の急速な第2の増殖（ステップD、急速な増殖プロトコル（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、その後、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。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。

【0970】

いくつかの実施形態では、第1の増殖培養培地は、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。いくつかの実施形態では、第1の増殖培地は、2-メルカプトエタノール（ベーターメルカプトエタノールとも称される）を含む。いくつかの実施形態では、第1の増殖培養培地（例えば、CM1または第1の細胞培養培地とも称される）は、 $55 \mu\text{M}$ の2-メルカプトエタノールを含む。

【0971】

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、GEX100 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容器あたり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、容器あたり 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、容器あたり 30 ng/mL のOKT-3を含む。いく

かの実施形態では、容器は、GREX100 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。

【0972】

腫瘍断片、全腫瘍消化物、及び／または全腫瘍細胞懸濁液の調製後、取得された細胞（すなわち、一次細胞集団である断片及び／または消化物）は、腫瘍及び他の細胞よりもTILの成長に有利な条件下、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、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。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の増殖中の成長培地は、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の増殖中の成長培地は、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 $20-30 \times 10^6$ 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、 $4-8 \times 10^6$ 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、 $5-7 \times 10^6$ 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の増殖培養培地は、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の増殖培養培地は、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の増殖培養培地は、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の増殖培養培地は、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の増殖培養培地は、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の増殖細胞培養培地は、約3000 IU/mLのIL-2を含む。ある実施形態では、プライミングによる第1の増殖細胞培養培地は、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の増殖細胞培養培地は、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の増殖細胞培養培地は、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800

10

20

30

40

50

0 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の増殖細胞培養培地は、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。

【0973】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖培養培地は、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、プライミングによる第1の増殖培養培地は、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、プライミングによる第1の増殖培養培地は、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、プライミングによる第1の増殖培養培地は、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、プライミングによる第1の増殖培養培地は、約200 IU/mLのIL-15を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-15を含む。ある実施形態では、プライミングによる第1の増殖細胞培養培地は、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の増殖細胞培養培地は、約180 IU/mLのIL-15を含む。

10

20

【0974】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖培養培地は、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、プライミングによる第1の増殖培養培地は、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、プライミングによる第1の増殖培養培地は、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、プライミングによる第1の増殖培養培地は、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、プライミングによる第1の増殖培養培地は、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、プライミングによる第1の増殖培養培地は、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、プライミングによる第1の増殖培養培地は、約2 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖細胞培養培地は、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の増殖細胞培養培地は、約1 IU/mLのIL-21を含む。

30

40

【0975】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖細胞培養培地は、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の増殖細胞培養培地は、約30 ng/mLのOKT-3抗体を含む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖細胞培養培地は、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5

50

0 0 n g / m L、及び約 1 μ g / m L の O K T - 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 n g / m L ~ 1 n g / m L、1 n g / m L ~ 5 n g / m L、5 n g / m L ~ 1 0 n g / m L、1 0 n g / m L ~ 2 0 n g の間、2 0 n g / m L ~ 3 0 n g / m L、3 0 n g / m L ~ 4 0 n g / m L、4 0 n g / m L ~ 5 0 n g / m L、及び 5 0 n g / m L ~ 1 0 0 n g / m L の O K T - 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 1 5 n g / m L ~ 3 0 n g / m L の O K T - 3 抗体を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、3 0 n g / m L の O K T - 3 抗体を含む。いくつかの実施形態では、O K T - 3 抗体は、ムロモナブである。

【0976】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖細胞培養培地は、細胞培養培地中に1つ以上のT N F R S Fアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、T N F R S Fアゴニストは、4-1 B Bアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、T N F R S Fアゴニストは4-1 B Bアゴニストであり、4-1 B Bアゴニストは、ウレルマブ、ウトミルマブ、E U - 1 0 1、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、T N F R S Fアゴニストは、0 . 1 μ g / m L ~ 1 0 0 μ g / m L 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、T N F R S Fアゴニストは、2 0 μ g / m L ~ 4 0 μ g / m L 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。

【0977】

いくつかの実施形態では、1つ以上のT N F R S Fアゴニストに加えて、プライミングによる第1の増殖細胞培養培地は、I L - 2を約3 0 0 0 I U / m Lの初期濃度で、及びO K T - 3を約3 0 n g / m Lの初期濃度でさらに含み、1つ以上のT N F R S Fアゴニストが、4-1 B Bアゴニストを含む。いくつかの実施形態では、1つ以上のT N F R S Fアゴニストに加えて、プライミングによる第1の増殖細胞培養培地は、I L - 2を約6 0 0 0 I U / m Lの初期濃度で、及びO K T - 3を約3 0 n g / m Lの初期濃度でさらに含み、1つ以上のT N F R S Fアゴニストが、4-1 B Bアゴニストを含む。

【0978】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖培養培地は、培養培地の略語である「C M」と称される。いくつかの実施形態では、それは、C M 1（培養培地1）と称される。いくつかの実施形態では、C Mは、1 0 % ヒトA B血清、2 5 m M H e p e s、及び1 0 m g / m L ゲンタマイシンを補充した、G l u t a M A Xを含むR P M I 1 6 4 0からなる。いくつかの実施形態では、C Mは、実施例に記載されるC M 1であり、実施例Aを参照されたい。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖は、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の増殖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、I L - 2、O K T - 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。

【0979】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される増殖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。

【0980】

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、C T S（商標）O p T m i z e r（商標）T - c e l l E x p a n s i o n B a s a l M e d i u m、C T S（商標）O p T m i z e r（商標）T - C e l l E x p a n s i o n S F M、C T S（商標）A I M - V M e d i u m、C T S（商標）A I M - V

10

20

30

40

50

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。

【0981】

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

【0982】

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

【0983】

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

【0984】

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

50

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細胞増殖SFMは、約3%のCTS（商標）免疫細胞血清代替物（SR）（ThermoFisher Scientific）を補充される。いくつかの実施形態では、CTS（商標）Optmizer（商標）T細胞増殖SFMは、55mMの2-メルカプトエタノールとともに、約3%のCTS（商標）免疫細胞血清代替物（SR）（ThermoFisher Scientific）を補充される。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

【0985】

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）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

20

30

40

50

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。

【0986】

10

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。

【0987】

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

【0988】

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β-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

40

50

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

【0989】

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

【0990】

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。

40

50

【表 4】

表 4：非微量元素部分成分の濃度

成分	サブリメント 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-トレオニン	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

【0991】

いくつかの実施形態では、合成培地の浸透圧は、約 260~350 mOsmol である。いくつかの実施形態では、浸透圧は、約 280~310 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 μM）、2-メルカプトエタノール（最終濃度約 100 μM）がさらに補充されていてもよい。

【0992】

いくつかの実施形態では、Smith, et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement," Clin Transl Immunology, 4 (1) 2015 (doi:10.1038/cti.2014.31) に記載の合成培地は、本発明において有用である。簡潔には、RPMI または CTS (商標) Optmizer 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。

【0993】

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、β-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。

【0994】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第 1 の増殖（例えば、図 1（特に、例えば、図 1B 及び／または図 1C 及び／または図 1D 及び／または図 1E 及び／または図 1F 及び／または図 1G 及び／または図 1H）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論じられるように、1~8 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 の増殖（例えば、図 1（特に、例えば、図 1B 及び／または図 1C 及び／または図 1D 及び／または図 1E 及び／または図 1F 及び／または図 1G 及び／または図 1H）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、2~8 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 の増殖

50

ミングによる第1のTIL増殖は、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の増殖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増殖は、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の増殖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増殖は、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の増殖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。

【0996】

いくつかの実施形態では、TILのプライミングによる第1の増殖は、1日、2日、3日、4日、5日、6日、7日、8日、9日、10日、または11日間進行することができる。いくつかの実施形態では、第1のTIL増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、2日～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1のTIL増殖は、3日～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1のTIL増殖は、4日～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1のTIL増殖は、5日～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1のTIL増殖は、6日～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1のTIL増殖は、2日～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増殖は、3日～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増殖は、4日～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増殖は、5日～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増殖は、6日～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増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、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増殖は、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1のTIL増殖は、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増殖は、11日間続行することができる。

【0997】

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の増殖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（特に、例えば、図1B）による、ならびに本明細書に記載されるステップBのプロセス中を含む、プライミングによる第1の増殖中に含まれ得る。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の増殖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、I L-2、I L-15、及びI L-21、ならびにそれらの任意の組み合わせは、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）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。

【0998】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）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増殖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-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-10である。

【0999】

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の増殖手順（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）からのステップBに記載されるもの、ならびにp r e-R E PまたはプライミングによるR E Pと称されるものなどの増殖を含む）は、TIL増殖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の増殖（プライミングによるR E P）中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の増殖手順（例えば、図1（特に、例えば、図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）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増殖を含む）は、TIL増殖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日目の任意の時点でプライミングによる第1の増殖中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の増殖手順（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）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増殖を含む）は、TIL増殖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、4～7日目の任意の時点でプライミングによる第1の増殖中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の増殖手順（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）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増殖を含む）は、TIL増殖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日目の任意の時点でプライミングによる第1の増殖中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の増殖手順（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）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増殖を含む）は、TIL増殖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、5～7日目の任意の時点でプライミングによる第1の増殖中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第1の増殖手順（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／

または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) 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増殖を含む)) は、T I L 増殖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 日目の任意の時点でプライミングによる第 1 の増殖中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第 1 の増殖手順 (例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) 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増殖を含む)) は、T I L 増殖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 日目の任意の時点でプライミングによる第 1 の増殖中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第 1 の増殖手順 (例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) 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増殖を含む)) は、T I L 増殖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 日目の任意の時点でプライミングによる第 1 の増殖中に追加される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のプライミングによる第 1 の増殖手順 (例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) 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増殖を含む)) は、T I L 増殖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 日目の任意の時点でプライミングによる第 1 の増殖中に追加される。

10

20

30

40

50

【1000】

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 の増殖手順 (例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) 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増殖を含む)) は、T I L 増殖の開始時及びプライミングによる第 1 の増殖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。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 の増殖中に使用される。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 の増殖中に使用される。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 の増殖中に使用される。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 の増殖中に使用される。

【1001】

一般に、同種異系 P B M C は、放射線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、放射線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。

【1002】

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の増殖の0日目に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、PBM Cは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のTIL増殖手順での使用が認められる。

【1003】

いくつかの実施形態では、7日目のOKT3及びIL-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の増殖の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、PBM Cは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のTIL増殖手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、PBM C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、PBM C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。

【1004】

いくつかの実施形態では、7日目のOKT3及びIL-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の増殖の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、PBM Cは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のTIL増殖手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、PBM Cは、5~60 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、PBM Cは、10~50 ng/mLのOKT3抗体及び2000~5000 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、PBM Cは、20~40 ng/mLのOKT3抗体及び2000~4000 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、PBM Cは、25~35 ng/mLのOKT3抗体及び2500~3500 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、PBM C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。いくつかの実施形態では、PBM Cは、15 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、PBM Cは、15 ng/mLのOKT3抗体及び6000 IU/mLのIL-2の存在下で培養される。

【1005】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、PBM 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の増殖におけるTILの抗原提示フィーダー細胞に対する比率は、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の増殖におけるTILの抗原提示フィーダー細胞に対する比率は、1:50~1:300である。いくつかの実施形態では、第2の増殖におけるTILの抗原提示フィーダー細胞に対する比率は、1:100~1:200である。

【1006】

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の増殖手順は、約 2.5×10^8 フィーダー細胞:約 100×10^6 TILの比率を必要とする。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の増殖手順は、約 2.5×10^8 フィーダー細胞:約 50×10^6 TILの比率を必要とする。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の増殖手順は、約 2.5×10^8 フィーダー細胞:約 25×10^6 TIL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の増殖は、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の増殖は、急速な第2の増殖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。

【1007】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖における培地は、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の増殖における培地は、 6000 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の増殖における培地は、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の増殖における培地は、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の増殖における培地は、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 のOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、容器は、G R E X 1 0 0 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 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OKT-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OKT-3を含む。いくつかの実施形態では、容器は、G R E X 1 0 0 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、ならびに 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、1容器当たり 500 mL の培養培地、 6000 IU/mL のIL-2、 $15 \mu\text{g}$ 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 $15 \mu\text{g}$ のOKT-3を含む。

10

20

【1008】

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の増殖手順は、第2の増殖中に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、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(aAPC)細胞がPBMCの代わりに使用される。

【1009】

一般に、同種異系PBMCは、放射線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増殖手順で使用される。

30

【1010】

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の増殖において使用される。

【1011】

2. サイトカイン

本明細書に記載の増殖方法は、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。

【1012】

40

あるいは、国際公開第W O 2 0 1 5 / 1 8 9 3 5 6 号及び同第W O 2 0 1 5 / 1 8 9 3 5 7 号(参照によりそれらの全体が本明細書に明示的に組み込まれる)に一般に概説されているように、IL-2、IL-15、及びIL-21のうちの2つ以上の組み合わせで、TILのプライミングによる第1の増殖のためにサイトカインの組み合わせを使用することもさらに可能である。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。

50

【表 5】

表 5：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 (hIL-2)	NAFTSSSTKQ TQQLLEHLL DLQWILNGIN NYENFRLTH LTFKFMFK ATELEHLQCL EELKPLEVIN LHLAQSNFH LEPFLISNI NVYLELGG EITFMCEYAD ETATIVFELN RWITFCQSII STLT	60 120 134
配列番号4 アルデスロイキン (hIL-4)	PTSSSTKATQ LQENLLDL QMILNGINNY KNPLTMMET PKYMHKAT ELKHLQCLEE ELKPLEVIN LAQSNFHL FROLISINIV IVLELGGSET TFMCEYADET ATIVEFINRW ITFSQSIIST LT	60 120 132
配列番号5 組換えヒトIL-4 (hIL-4)	MKRCITLQF IIRYLSLITE QRLCTELTV TDIPAASNT TERETFCRAA TVLRQFYSHH EKPTCLGAT AQQFHHWQL IEPFLISNI LNLGLAGNSC FYKEMQSTL ENFLERLATI MREKYSKCS	60 120 130
配列番号6 組換えヒトIL-7 (hIL-7)	MCCDEGKG KQIESVLMYS IQQLDSMKE LGSNCLNEF NFFKHLICDA NKEGHLEFA ARKLPQFLN NSTGDFDLH LKVSGETTIL LNCQGVGR KPAALGEAQP TSLLEENSL KEQKLNOLC FLKRLQELK TOWNKIMGT KEH	60 120 153
配列番号7 組換えヒトIL-15 (hIL-15)	NNVNVISL KKIEDLQSH HIDATLYTES DVHPSKVTA MKCFLELQV ISLESQASI HOTVENLIL ANNSLSSNGN VTSGCECE ELEENKEEF LQSFVHIVQM FINTS	60 115
配列番号8 組換えヒトIL-21 (hIL-21)	MDRSHRMH QLIIDIVQLK NYNDLVPEF LPASRDVETN CEMSAFSCFQ KAGLESANTQ NNEKINYSI KKLKRFEPST NAGRKQHL TCPCSDSYEK KPFKEFLERF KSLQKMIHQ HLSSRTHGSE DS	60 120 132

10

【1013】

C. ステップC：プライミングによる第1の増殖から急速な第2の増殖への移行

いくつかの事例では、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）に示されるステップ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の増殖から取得されたバルクTIL集団（REP前と称されることもある増殖を含み得る）は、急速な第2の増殖（急速な増殖プロトコル（REP）と称されることもある増殖を含み得る）に供され、その後、以下で論じら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の増殖由来の拡張TIL集団または急速な第2の増殖由来の拡張TIL集団は、増殖ステップ前またはプライミングによる第1の増殖後及び急速な第2の増殖前に好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

20

【1014】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖から（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）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の増殖から（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）に示されるステップBから）取得されたTILは保管されず、急速な第2の増殖に直接進む。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖から取得されたTILは、プライミングによる第1の増殖後及び急速な第2の増殖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の増殖から第2の増殖への移行は、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の増殖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の増殖から急速な第2の増殖への移行は、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の増殖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の増殖から第2の増殖への移行は、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の増殖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の増殖から第2の増殖への移行は、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の増殖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の増殖から第2の増殖への移行は、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の増殖ステップが開始されたときから約5

30

40

50

10

10

20

30

40

50

の増殖への移行は、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の増殖ステップが開始されたときから8日で起こる。

【1016】

いくつかの実施形態では、TILは、一次の第1の増殖後及び急速な第2の増殖前に保管されず、TILは、急速な第2の増殖に直接進む（例えば、いくつかの実施形態では、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）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、プライミングによる第1の増殖由来のTILである第2のTIL集団は、移行期間なしで急速な第2の増殖に直接進む。

10

【1017】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖から急速な第2の増殖への移行、例えば、図1（特に、例えば、図1B）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増殖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の増殖から急速な第2の増殖への移行は、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の増殖は、急速な第2の増殖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の増殖は、GREX-100内で行われ、急速な第2の増殖は、GREX-500内で行われる。

20

【1018】

いくつかの実施形態では、最大 1×10^6 細胞のTILが、プライミングによる第1の増殖の終了時に取得される。いくつかの実施形態では、 0.1×10^6 、 0.2×10^6 、 0.3×10^6 、 0.4×10^6 、 0.5×10^6 、 0.6×10^6 、 0.7×10^6 、 0.8×10^6 、 0.9×10^6 、 1.0×10^6 、 1.1×10^6 、 1.2×10^6 、 1.3×10^6 、 1.4×10^6 、または 0.5×10^6 のTILが、プライミングによる第1の増殖の終了時に取得される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖の終了時のTILは、約9%～約40%のPD-1+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の増殖の終了時のTILは、約10%～約40%のPD-1+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の増殖の終了時のTILは、約15%～約30%のPD-1+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の増殖の終了時のTILは、約20%～約40%のPD-1+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の増殖の終了時のTILは、約20%～約30%のPD-1+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の増殖の終了時のTILは、約10%～約20%のPD-1+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の増殖の終了時のTILは、約9%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、または約40%のPD-1+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の増殖の終了時のTILは、約9%～約40%のPD-1高である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖の終了時のTILは、約15%～約30%のPD-1高である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖の終了時のTILは、約20%～約40%のPD-1高である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖の終了時のTILは、約20%～約30%のPD-1高である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖の終了時のTILは、約10%～約20%のPD-1高である。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖の終了時のTILは、約9%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、または約40%のPD-1高である。

30

40

【1019】

50

D. ステップD：急速な第2の増殖

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の増殖後、ステップA及びステップB、ならびに図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）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。このさらなる増殖は、本明細書では急速な第2の増殖と称され、これは、当該技術分野で概して急速な増殖プロセス（急速な増殖プロトコルまたはREP、ならびに図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）のステップDに示されるプロセス）と称される増殖プロセスを含み得る。急速な第2の増殖は、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の増殖開始の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。いくつかの実施形態では、この急速な第2の増殖は、活性化IIと称される。

10

【1020】

いくつかの実施形態では、最大 1×10^6 細胞のTILが、急速な第2の増殖の開始時に追加される。いくつかの実施形態では、 0.1×10^6 、 0.2×10^6 、 0.3×10^6 、 0.4×10^6 、 0.5×10^6 、 0.6×10^6 、 0.7×10^6 、 0.8×10^6 、 0.9×10^6 、 1.0×10^6 、 1.1×10^6 、 1.2×10^6 、 1.3×10^6 、 1.4×10^6 、または 0.5×10^6 のTILが、急速な第2の増殖の開始時に追加される。いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖からの最大細胞密度は、 1×10^6 細胞であり、急速な第2の増殖を開始するための 1×10^9 を提供する。

20

【1021】

いくつかの実施形態では、TILの急速な第2の増殖（REPと称されることもある増殖、ならびに図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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2のTIL増殖は、急速な第2の増殖の開始後、約1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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速

30

40

50

な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、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増殖は、急速な第2の増殖の開始後、約10日間続行することができる。

10

【1022】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、急速な第2の増殖内の活性化II期、続いて分裂または分割、及びさらなる成長期を含む、2つの期間として生じる。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1～11日間起こる。いくつかの実施形態において、急速な第2の増殖は、1～10日間起こり、バルクTIL集団をもたらす。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1～9日間起こる。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1～8日間起こる。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1～4日の活性化II期間、続いて分裂または分割、及び1～7日のさらなる成長期間を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1～3日の活性化II期間、続いて分裂または分割、及び1～6日のさらなる成長期間を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1～4日の活性化II期間、続いて分裂、及び1～6日のさらなる成長期間を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1～7日の活性化II期間、続いて分裂または分割、及び1～7日のさらなる成長期間を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1～3日の活性化II期間、続いて分裂または分割、及び1～7日のさらなる成長期間を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、1日、2日、3日、または4日の活性化II期間、続いて分裂または分割、及び1日、2日、3日、4日、5日、6日、または7日のさらなる成長期間を含む。いくつかの実施形態では、分裂または分割はまた、容器（例えば、バッグ及び／またはGREX容器を含む）の増加した数へのスケールアップを含むことができる。いくつかの実施形態では、分裂または分割はまた、活性化IIステップ中の容器の数から、さらなる成長期間中の容器の数の増加まで、容器（例えば、バッグ及び／またはGREX容器を含む）の増加した数へのスケールアップを含むことができる。

20

30

【1023】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖は、本開示の方法（例えば、REPと称される増殖、ならびに図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）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。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の増殖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の増殖において拡張され、フィーダー細胞は、プライミングによる第1の増殖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

40

50

ー 2 (I L - 2) またはインターロイキンー 1 5 (I L - 1 5) 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 細胞受容体刺激物には、例えば、抗 C D 3 抗体、例えば、約 3 0 n g / m L の O K T 3 、マウスモノクローナル抗 C D 3 抗体 (O r t h o - M c N e i l , R a r i t a n , N J または M i l t e n y i B i o t e c h , A u b u r n , C A から市販されている) 、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 から市販されている) が含まれ得る。T I L 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 の増殖中に 1 つ以上の抗原を含むことによって、インビトロで T I L 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 A 2 (H L A - A 2) 結合ペプチド、例えば、0 . 3 μ M M A R T - 1 : 2 6 - 3 5 (2 7 L) または g p l 0 0 : 2 0 9 - 2 1 7 (2 1 0 M) から、任意選択で 3 0 0 I U / m L の I L - 2 または I L - 1 5 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 - A 3 、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。T I L は、H L A - A 2 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、T I L は、例えば、例として放射線照射された自己リンパ球または放射線照射された H L A - A 2 + 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 の増殖の一部として起こる。いくつかの実施形態では、第 2 の増殖は、放射線照射された自己リンパ球の存在下で、または放射線照射された H L A - A 2 + 同種異系リンパ球及び I L - 2 を用いて起こる。

10

20

【 1 0 2 4 】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、I L - 2 さらにを含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約 3 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、約 1 0 0 0 I U / m L 、約 1 5 0 0 I U / m L 、約 2 0 0 0 I U / m L 、約 2 5 0 0 I U / m L 、約 3 0 0 0 I U / m L 、約 3 5 0 0 I U / m L 、約 4 0 0 0 I U / m L 、約 4 5 0 0 I U / m L 、約 5 0 0 0 I U / m L 、約 5 5 0 0 I U / m L 、約 6 0 0 0 I U / m L 、約 6 5 0 0 I U / m L 、約 7 0 0 0 I U / m L 、約 7 5 0 0 I U / m L 、または約 8 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、1 0 0 0 ~ 2 0 0 0 I U / m L 、2 0 0 0 ~ 3 0 0 0 I U / m L 、3 0 0 0 ~ 4 0 0 0 I U / m L 、4 0 0 0 ~ 5 0 0 0 I U / m L 、5 0 0 0 ~ 6 0 0 0 I U / m L 、6 0 0 0 ~ 7 0 0 0 I U / m L 、7 0 0 0 ~ 8 0 0 0 I U / m L 、または 8 0 0 0 I U / m L の I L - 2 を含む。

30

【 1 0 2 5 】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、O K T - 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 3 0 n g / m L の O K T - 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 n g / m L 、約 0 . 5 n g / m L 、約 1 n g / m L 、約 2 . 5 n g / m L 、約 5 n g / m L 、約 7 . 5 n g / m L 、約 1 0 n g / m L 、約 1 5 n g / m L 、約 2 0 n g / m L 、約 2 5 n g / m L 、約 3 0 n g / m L 、約 3 5 n g / m L 、約 4 0 n g / m L 、約 5 0 n g / m L 、約 6 0 n g / m L 、約 7 0 n g / m L 、約 8 0 n g / m L 、約 9 0 n g / m L 、約 1 0 0 n g / m L 、約 2 0 0 n g / m L 、約 5 0 0 n g / m L 、及び約 1 μ g / m L の O K T - 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 n g / m L ~ 1 n g / m L 、1 n g / m L ~ 5 n g / m L 、5 n g / m L ~ 1 0 n g / m L 、1 0 n g / m L ~ 2 0 n g / m L の間、2 0 n g / m L ~ 3 0 n g / m L 、3 0 n g / m L ~ 4 0 n g / m L 、4 0 n g / m L ~ 5 0 n g / m L 、及び 5 0 n g / m L ~ 1 0 0 n g / m L の O K T - 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 3 0 n g / m L ~ 6 0 n g / m L の O K T - 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 6 0 n g / m L の O K T - 3 を含む。いくつかの実施形態では、O K T - 3 抗体は、ムロモナブである。

40

【 1 0 2 6 】

50

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖における培地は、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の増殖における培地は、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、急速な第2の増殖における培地は、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の増殖における培地は、OKT-3を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖培地中に、容器当たり500 mLの培養培地及び30 µgのOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、容器は、G R E X 1 0 0 M C S フラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖培地中に、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 µgのOKT-3、及び 7.5×10^8 の抗原提示フィーダー細胞を含む。

10

【1027】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖における培地は、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の増殖における培地は、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の増殖における培地は、OKT-3を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖における培地は、容器当たり500 mLの培養培地及び30 µgのOKT-3を含む。いくつかの実施形態では、容器は、G R E X 1 0 0 M C S フラスコである。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖における培地は、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、第2の急速な増殖における培地は、容器当たり500 mLの培養培地、ならびに6000 IU/mLのIL-2、30 µg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。

20

【1028】

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、バリエント、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。

30

【1029】

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。

40

【1030】

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の増殖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（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）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の増殖中に含まれ得る。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2の増殖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、

50

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（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）による、及び本明細書に記載されるステップDプロセス中に含まれ得る。

【1031】

いくつかの実施形態では、第2の増殖は、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の増殖は、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の増殖は、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

【1032】

いくつかの実施形態では、第2の増殖培養培地は、約500IU/mLのIL-15、約400IU/mLのIL-15、約300IU/mLのIL-15、約200IU/mL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2の増殖培養培地は、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2の増殖培養培地は、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2の増殖培養培地は、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2の増殖培養培地は、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さらにを含む。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。

20

【1033】

いくつかの実施形態では、第2の増殖培養培地は、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2の増殖培養培地は、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2の増殖培養培地は、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2の増殖培養培地は、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2の増殖培養培地は、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2の増殖培養培地は、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2の増殖培養培地は、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さらにを含む。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。

30

40

【1034】

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、急速な増殖及び／または第2の増殖におけるTILのPBMC及び／または抗原提示細胞に対する比率は、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

50

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、急速な増殖及び／または第 2 の増殖における TIL の P BMC に対する比率は、1 : 50 ~ 1 : 300 である。いくつかの実施形態では、急速な増殖及び／または第 2 の増殖における TIL の P BMC に対する比率は、1 : 100 ~ 1 : 200 である。

【1035】

いくつかの実施形態では、REP 及び／または迅速な第 2 の増殖は、バルク TIL を 100 倍または 200 倍過剰の不活化フィーダー細胞と混合してフラスコ内で行われ、フィーダー細胞濃度は、150 ml 培地中のプライミングによる第 1 の増殖、30 ng/ml の OKT3 抗 CD3 抗体及び 6000 IU/ml の IL-2 におけるフィーダー細胞濃度の少なくとも 1.1 倍 (1.1 times) (1.1 倍 (1.1 X))、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ーに移されるまで行われる。代替の成長チャンバーには、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。

【1036】

いくつかの実施形態では、急速な第 2 の増殖 (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 の増殖は、7 日間である。いくつかの実施形態では、第 2 の増殖は、8 日間である。いくつかの実施形態では、第 2 の増殖は、9 日間である。

【1037】

いくつかの実施形態では、第 2 の増殖 (REP と称される増殖、ならびに図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) のステップ D で参照される増殖を含み得る) は、100 cm のガス透過性シリコン底部を有する 500 ml 容量のガス透過性フラスコ (G-Rex 100、Wilson Wolf Manufacturing Corporation, New Brighton, MN, USA から市販されている) 内で行われ得、 5×10^6 または 10×10^6 の TIL が、5 % ヒト AB 血清、3000 IU/ml の IL-2、及び 60 ng/ml の抗 CD3 (OKT3) を補充した 400 ml の 50 / 50 培地中で P BMC とともに培養され得る。G-Rex 100 フラスコは、5 % CO₂ 中 37 °C でインキュベートされ得る。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。TIL ペレットが、5 % ヒト AB 血清、6000 IU/ml の IL-2 を含む 150 ml 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ー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 3 分の 2 の吸引及び等量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ーには、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。

【1038】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される増殖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

10

20

30

40

50

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。

【1039】

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

【1040】

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

30

【1041】

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。

40

【1042】

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。

50

【1043】

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、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

【1044】

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）Imm

20

30

40

50

une 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 (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。いくつかの実施形態では、CTS (商標) Optmizer (商標) T 細胞増殖 SFM は、約 3% の CTS (商標) 免疫細胞血清代替物 (SR) (ThermoFisher Scientific) を補充され、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。いくつかの実施形態では、無血清培地または合成培地は、約 0.1mM ~ 約 10mM、0.5mM ~ 約 9mM、1mM ~ 約 8mM、2mM ~ 約 7mM、3mM ~ 約 6mM、または 4mM ~ 約 5mM の濃度のグルタミン (すなわち、GlutaMAX (登録商標)) を補充される。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。

10

20

30

40

50

【1045】

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。

【1046】

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 β -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

【1047】

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

【1048】

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。

【1049】

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

【1050】

いくつかの実施形態では、Smith, et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement," Clin Transl

50

Immunology, 4 (1) 2015 (doi:10.1038/cti.2014.31)に記載の合成培地は、本発明において有用である。簡潔には、RPMIまたはCTS (商標) OpTmizer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。

【1051】

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、 β -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

【1052】

いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、急速な第2の増殖 (REPと称される増殖を含む) の9~17日目の間にさらなる細胞培養培地が補充される。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、急速な第2の増殖 (REPと称される増殖を含む) の15~17日目の間にさらなる細胞培養培地が補充される。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、急速な第2の増殖 (REPと称される増殖を含む) の16日目にさらなる細胞培養培地が補充される。いくつかの実施形態では、細胞培養培地は、急速な第2の増殖 (REPと称される増殖を含む) の9、10、11、12、13、14、15、16、または17日目の間にさらなる細胞培養培地が補充される。いくつかの実施形態では、さらなる細胞培養培地は、IL-2、OKT-3、及びGlutaMAX (商標) を含む。いくつかの実施形態では、さらなる細胞培養培地は、本明細書及び実施例に記載されるように、CM4と称される。

20

【1053】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖 (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。

【1054】

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の増殖 (REP増殖と称される増殖を含む) 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自動細胞カウンター (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。

30

【1055】

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の増殖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

40

50

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。

【1056】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖培養培地(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の増殖培養培地(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/フラスコの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の増殖培養培地(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の増殖培養培地(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/フラスコの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。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖培養培地(例えば、CM2または第2の細胞培養培地とも称される)は、2-メルカプトエタノール(ベーターメルカプトエタノールとも称される)を含む。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖培養培地(例えば、CM2または第2の細胞培養培地とも称される)は、55 μ の2-メルカプトエタノールを含む。

【1057】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖、例えば、図1(特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H)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増殖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-Rex-100またはG-Rex-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-Rex-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-Rex-500である。

【1058】

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、本明細書に記載の急速な第2の増殖手順(例えば、図1(特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H)のステップDに記載されるような増殖、ならびにREPと称されるものを含む)は、REP TIL増殖中及び／または急速な第2の増殖中に及び／またはOKT-3を含むフィーダー細胞(例えば、APC)の培養物からの培養上清を過剰に必要とする。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。

【1059】

一般に、同種異系PBMCは、放射線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、放射線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。

【1060】

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の増殖の0日目（すなわち、第2の増殖の開始日）に培養された初期の生細胞数よりも少ない場合、PBM Cは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のTIL増殖手順での使用が認められる。

【1061】

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の増殖の0日目（すなわち、第2の増殖の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、PBM Cは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のTIL増殖手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、PBM C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、PBM C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、PBM C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、PBM C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。

【1062】

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の増殖の0日目（すなわち、第2の増殖の開始日）に培養された初期の生細胞数から増加しなかった場合、PBM Cは、複製能力がないとみなされ、本明細書に記載のTIL増殖手順での使用が認められる。いくつかの実施形態では、PBM C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、PBM Cは、30～60 ng/mLのOKT3抗体及び2000～5000 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、PBM Cは、30～60 ng/mLのOKT3抗体及び2000～4000 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、PBM Cは、30～60 ng/mLのOKT3抗体及び2500～3500 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、PBM Cは、30～60 ng/mLのOKT3抗体及び6000 IU/mLのIL-2の存在下で培養される。

【1063】

いくつかの実施形態では、抗原提示フィーダー細胞は、PBM 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の増殖におけるTILの抗原提示フィーダー細胞に対する比率は、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の増殖におけるTILの抗原提示フィーダー細胞に対する比率は、1：50～1：300である。いくつかの実施形態では、第2の増殖におけるTILの抗原提示フィーダー細胞に対する比率は、1：100～1：200である。

【1064】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第2の増殖手順は、約 5×10^8 フィーダー細胞：約 100×10^6 TILの比率を必要とする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の第2の増殖手順は、約 7.5×10^8 フィーダー細胞：約 100×10^6 TILの比率を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の急速な第2の増殖手順は、約 5×10^8 フィーダー細胞：約 50×10^6 TILの比率を必要とする。他の実施形態では、本明細書に記載の急速な第2の増殖手順は、約 7.5×10^8 フィーダー細胞：約 50×10^6 TILの比率を必要とする。さらに他の実施形態では、本明細書に記載の第2の増殖手順は、約 7.5×10^8 フィーダー細胞：約 25×10^6 TIL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の増殖手順は、約 7.5×10^8 フィーダー細胞：約 25×10^6 TILを必要とする。さらに他の実施形態では、急速な第2の増

【 1 0 6 5 】

【 1 0 6 6 】

【 1 0 6 7 】

50

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の急速な第2の増殖手順は、急速な第2の増殖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の増殖に追加されたP B M Cの2倍の濃度で、急速な第2の増殖に追加される。

【1068】

一般に、同種異系P B M Cは、放射線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増殖手順で使用される。

10

【1069】

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の増殖において使用される。

【1070】

任意の好適な用量のT I Lが投与され得る。いくつかの実施形態では、特にがんが黒色腫である場合、約 2.3×10^{10} ～約 13.7×10^{10} のT I Lが投与され、平均約 7.8×10^{10} T I L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T I L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T I L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T I L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T I L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T I L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T I L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 1.2×10^{10} ～約 4.3×10^{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 3×10^{10} ～約 12×10^{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 4×10^{10} ～約 10×10^{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 5×10^{10} ～約 8×10^{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 6×10^{10} ～約 8×10^{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 7×10^{10} ～約 8×10^{10} のT I Lである。

20

30

【1071】

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 1×10^6 、 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、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{11} \sim 5 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ である。

40

50

$0 \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、及び $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲内である。

【1072】

2. サイトカイン

本明細書に記載の急速な第2の増殖方法は、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。

【1073】

代替的に、国際公開第WO2015/189356号及び同第WO2015/189357号（参照によりそれらの全体が本明細書に明示的に組み込まれる）に一般に概説されているように、IL-2、IL-15、及びIL-21のうちの2つ以上の組み合わせで、TILの急速な第2の増殖のためにサイトカインの組み合わせを使用することもさらに可能である。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。

【1074】

E. ステップE：TILを採取する

急速な第2の増殖ステップ後、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（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）に提供されるように、1、2、3、4つ、またはそれ以上の増殖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（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）に提供されるように、2つの増殖ステップ後に採取される。いくつかの実施形態では、TILは、2つの増殖ステップ、例えば、図1（特に、例えば、図1B）に提供されるように、1回のプライミングによる第1の増殖及び1回の急速な第2の増殖の後に採取される。

【1075】

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、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、TILは、自動化システムを使用して採取される。

【1076】

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。

【1077】

いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／また

は図 1 G 及び／または図 1 H) 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 T I L 増殖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-1 0 0 または G-R E X-5 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 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-5 0 0 である。

【1 0 7 8】

いくつかの実施形態では、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) 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、閉鎖系の滅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。

【1 0 7 9】

いくつかの実施形態では、T I L は、本明細書に記載される方法に従って採取される。いくつかの実施形態では、1 4 ~ 1 6 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 1 4 日目に採取される。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 1 5 日目に採取される。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 1 6 日目に採取される。

【1 0 8 0】

F. ステップ F : 最終製剤／注入バッグへの移行

図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) 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、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 が上記の増殖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。

【1 0 8 1】

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 T I L 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 T I L 懸濁液である。本明細書に開示されるように拡張された 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 I L 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 3 0 ~ 6 0 分続く。他の好適な投与経路には、腹腔内、髄腔内、及びリンパ内が含まれる。

【1 0 8 2】

G. P B M C フィーダー細胞比率

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の増殖方法で使用する培養培地 (例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) は、抗 C D 3 抗体、例えば、O K T-3 を含む。I L-2 と組み合わせた抗 C D 3 抗体は、T I L 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 F a b 及び F (a b ') 2 断片で見ることができ、前者が一般に好まれ、例えば、T s o u k a s e t a l . , J . I m m u n o l . 1 9 8 5 , 1 3 5 , 1 7 1 9 を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【1 0 8 3】

いくつかの実施形態では、P B M C フィーダー層の数は、以下のように計算される：

A. T 細胞の体積 (1 0 μ m 直径) : $V = (4 / 3) \pi r^3 = 523.6 \mu m^3$

B. $40\text{ }\mu\text{m}$ (4細胞)の高さを有するG-Rex 100 (M)のカラム： $V = (4/3) \pi r^3 = 4 \times 10^{12} \mu\text{m}^3$

C. カラムBを充填するために必要な細胞数： $4 \times 10^{12} \mu\text{m}^3 / 523.6 \mu\text{m}^3 = 7.6 \times 10^8 \mu\text{m}^3 * 0.64 = 4.86 \times 10^8$

D. 四次元空間で最適に活性化され得る細胞の数： $4.86 \times 10^8 / 24 = 20.25 \times 10^6$ E. G-Rex 500に外挿されるフィーダー及びTILの数：TIL： 100×10^6 及びフィーダー： 2.5×10^9

【1084】

この計算では、 100 cm^2 の底部を有するシリンジ中でのTIL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。この計算により、T細胞の閾値活性化のために約 5×10^8 が必要であるという実験結果が導き出され、これはNCI実験データを密接に反映する⁽¹⁾。(C)乗数(0.64)は、1992年にJaeger及びNagelによって計算された等価球のランダムパッキング密度である⁽²⁾。(D)除数24は、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「ニュートン数」である。⁽³⁾

【1085】

⁽¹⁾ Jin, Jianjian, et. al., Simplified Method of the Growth of Human Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Gas-Permeable Flasks~Numbers Needed for Patient Treatment. J Immunother. 2012 Apr; 35 (3): 283-292.

【1086】

⁽²⁾ Jaeger HM, Nagel SR. Physics of the granular state. Science. 1992 Mar 20; 255 (5051): 1523-31.

【1087】

⁽³⁾ O. R. Musin (2003). "The problem of the twenty-five spheres". Russ. Math. Surv. 58 (4): 794-795.

【1088】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖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の増殖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の増殖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の増殖を行うことを含む。

【1089】

他の実施形態では、急速な第2の増殖中に外因的に供給される抗原提示フィーダー細胞(APC)の数は、プライミングによる第1の増殖中に外因的に供給されるAPCの数よりも多い。

【1090】

他の実施形態では、急速な第2の増殖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の増殖中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、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。

【1091】

他の実施形態では、急速な第2の増殖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の増殖中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、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。

【1092】

他の実施形態では、急速な第2の増殖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の増殖中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、正確にまたは約

10

20

30

40

50

2 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 5 : 1 の範囲から選択される。

【1118】

他の実施形態では、急速な第2の増殖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の増殖中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、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。

【1119】

他の実施形態では、急速な第2の増殖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の増殖中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、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。

【1120】

他の実施形態では、急速な第2の増殖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の増殖中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、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。

【1121】

他の実施形態では、急速な第2の増殖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の増殖中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、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。

【1122】

他の実施形態では、急速な第2の増殖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の増殖中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、正確にまたは約2 : 1 である。

【1123】

他の実施形態では、急速な第2の増殖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の増殖中に外因的に供給されるAPCの数に対する比率は、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。

【1124】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖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 、 1.1×10^8 、 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であり、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPC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である。

【1125】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖中に外因的に供給されるAPCの数は、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の増殖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 7.5×10^8 APCの範囲から選択される。

【1126】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖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 2.5×10^8 APCの範囲から選択され、急速な第2の増殖中に外因的に供給されるAPCの数は、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。

【1127】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖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の増殖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。

【1128】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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の増殖の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の増殖の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。

【1129】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給されるPBMCの数よりも多い。

【1130】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖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/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培養フラスコに播種される。

【1131】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖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/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培養フラスコに播種される。

【1132】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖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/cm²～正確にまたは約 3×10^6 APC/cm²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。

【1133】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖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/cm²の密度で培養フラスコに播種される。

【1134】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖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

$\times 10^6$ 、 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/cm²の密度で培養フラスコに播種される。

【1135】

他の実施形態では、急速な第2の増殖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/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培養フラスコに播種される。

【1136】

他の実施形態では、急速な第2の増殖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/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培養フラスコに播種される。

【1137】

他の実施形態では、急速な第2の増殖において外因的に供給されるAPCは、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培養フラスコに播種される。

【1138】

他の実施形態では、急速な第2の増殖において外因的に供給されるAPCは、正確にまたは約 4.0×10^6 APC/cm²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。

【1139】

他の実施形態では、急速な第2の増殖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/cm²、 2.6×10^6 APC/cm²、 2.7×10^6 APC/cm²、 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 7.5×10^6 APC/cm²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。

【1140】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖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/cm²の密度で培養フラスコに播種され、急速な第2の増殖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/cm²、 2.6×10^6 APC/cm²、 2.7×10^6 APC/cm²、 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 、 $5.4 \times$

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 7.5×10^6 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。

【1141】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖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、急速な第2の増殖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。

10

【1142】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖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、急速な第2の増殖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 6×10^6 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

【1143】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖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、急速な第2の増殖において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 4×10^6 APC / cm^2 ~ 正確にまたは約 5.5×10^6 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。

【1144】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖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、急速な第2の増殖において外因的に供給される APC は、正確にまたは約 4×10^6 APC / cm^2 の密度で培養フラスコに播種される。

30

【1145】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給される P BMC の数に対する比率は、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。

【1146】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給される P BMC の数に対する比率は、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。

40

【1147】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給される P BMC の数に対する比率は、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。

【1148】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、正確にまたは約 1.1 : 1 ~ 正確

50

にまたは約 8 : 1 の範囲から選択される。

【1149】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、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。

【1150】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 6 : 1 の範囲から選択される。

10

【1151】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 5 : 1 の範囲から選択される。

【1152】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 4 : 1 の範囲から選択される。

20

【1153】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、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。

【1154】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 9 : 1 の範囲から選択される。

30

【1155】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 8 : 1 の範囲から選択される。

【1156】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 7 : 1 の範囲から選択される。

40

【1157】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確にまたは約 2 . 6 : 1 の範囲から選択される。

【1158】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、正確にまたは約 1 . 1 : 1 ~ 正確

50

にまたは約 2.5 : 1 の範囲から選択される。

【1159】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比率は、正確にまたは約1.1 : 1 ~ 正確にまたは約2.4 : 1 の範囲から選択される。

【1160】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比率は、正確にまたは約1.1 : 1 ~ 正確にまたは約2.3 : 1 の範囲から選択される。

10

【1161】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比率は、正確にまたは約1.1 : 1 ~ 正確にまたは約2.2 : 1 の範囲から選択される。

【1162】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比率は、正確にまたは約1.1 : 1 ~ 正確にまたは約2.1 : 1 の範囲から選択される。

20

【1163】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比率は、正確にまたは約1.1 : 1 ~ 正確にまたは約2 : 1 の範囲から選択される。

【1164】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比率は、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。

30

【1165】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比率は、正確にまたは約2 : 1 ~ 正確にまたは約15 : 1 の範囲から選択される。

【1166】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比率は、正確にまたは約2 : 1 ~ 正確にまたは約14 : 1 の範囲から選択される。

40

【1167】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比率は、正確にまたは約2 : 1 ~ 正確にまたは約13 : 1 の範囲から選択される。

【1168】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の0日目に外因的に供給されるAPC（例えば、PBM Cを含む）の数に対する比率は、正確にまたは約2 : 1 ~ 正確にま

50

たは約 2.9 : 1 の範囲から選択される。

【1169】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、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。

【1170】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、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。

10

【1171】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、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。

【1172】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、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。

20

【1173】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、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。

【1174】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、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。

30

【1175】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、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。

【1176】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、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。

40

【1177】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、正確にまたは約 2 : 1 である。

【1178】

他の実施形態では、急速な第 2 の増殖の 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 の増殖の 0 日目に外因的に供給される APC (例えば、P BMC を含む) の数に対する比率は、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、

50

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。

【1179】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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 、 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（例えば、PBMCを含む）であり、急速な第2の増殖の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。

【1180】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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。

【1181】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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。

【1182】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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。

【1183】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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。

【1184】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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。

10

【1185】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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。

20

【1186】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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の増殖の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を含み、0日目に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。

【1187】

他の実施形態では、急速な第2の増殖の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の増殖の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。

30

【1188】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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。

【1189】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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。

40

【1190】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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。

【1191】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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

50

第2の増殖の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、PBM Cを含む）の存在下で起こる。

【1192】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の増殖の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、PBM Cを含む）の存在下で起こる。

10

【1193】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の増殖の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、PBM Cを含む）の存在下で起こる。

20

【1194】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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、PBM Cを含む）の存在下で起こり、急速な第2の増殖の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。

【1195】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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。

30

【1196】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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。

【1197】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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率は、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。

40

【1198】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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）の存在下で起こる。

50

Cを含む)の存在下で起こり、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数のAPC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に対する比率は、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。

【1199】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の0日目は、APC(例えば、P BMC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、P BMCを含む)の存在下で起こり、急速な第2の増殖の7日目は、APC(例えば、P BMC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、P BMCを含む)の存在下で起こり、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数のAPC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に対する比率は、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。

10

【1200】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の0日目は、APC(例えば、P BMC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、P BMCを含む)の存在下で起こり、急速な第2の増殖の7日目は、APC(例えば、P BMC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、P BMCを含む)の存在下で起こり、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数のAPC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に対する比率は、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。

【1201】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の0日目は、APC(例えば、P BMC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、P BMCを含む)の存在下で起こり、急速な第2の増殖の7日目は、APC(例えば、P BMC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、P BMCを含む)の存在下で起こり、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数のAPC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に対する比率は、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。

20

【1202】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の0日目は、APC(例えば、P BMC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、P BMCを含む)の存在下で起こり、急速な第2の増殖の7日目は、APC(例えば、P BMC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、P BMCを含む)の存在下で起こり、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数のAPC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に対する比率は、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。

30

【1203】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の0日目は、APC(例えば、P BMC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、P BMCを含む)の存在下で起こり、急速な第2の増殖の7日目は、APC(例えば、P BMC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、P BMCを含む)の存在下で起こり、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数のAPC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に対する比率は、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。

40

【1204】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の0日目は、APC(例えば、P BMC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、P BMCを含む)の存在下で起こり、急速な第2の増殖の7日目は、APC(例えば、P BMC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、P BMCを含む)の存在下で起こり、APC(例えば、P BMCを含む)の第1の層の数のAPC(例えば、P BMCを含む)の第2の層の数に対する比率は、正確にまたは約1:1.

50

1～正確にまたは約1：2の範囲から選択される。

【1205】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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率は、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。

【1206】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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率は、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。

【1207】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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率は、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。

【1208】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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率は、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。

【1209】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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率は、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。

【1210】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の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の増殖の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率は、約1：1.7～約1：3.5の範囲から選択される。

【1211】

10

20

30

40

50

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の0日目は、APC（例えば、P BMC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、P BMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の増殖の7日目は、APC（例えば、P BMC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、P BMCを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、P BMCを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、P BMCを含む）の第2の層の数に対する比率は、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。

【1212】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の0日目は、APC（例えば、P BMC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、P BMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の増殖の7日目は、APC（例えば、P BMC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、P BMCを含む）の存在下で起こり、APC（例えば、P BMCを含む）の第1の層の数のAPC（例えば、P BMCを含む）の第2の層の数に対する比率は、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。

【1213】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の0日目は、第1のAPC（例えば、P BMCを含む）層の数に等しい第1の平均厚さを有する層状APC（例えば、P BMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の増殖の7日目は、第2のAPC（例えば、P BMCを含む）層の数に等しい第2の平均厚さを有する層状APC（例えば、P BMCを含む）の存在下で起こり、第1のAPC（例えば、P BMCを含む）層の数の第2のAPC（例えば、P BMCを含む）層の数に対する比率は、正確にまたは約1：2である。

【1214】

他の実施形態では、プライミングによる第1の増殖の0日目は、APC（例えば、P BMC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、P BMCを含む）の存在下で起こり、急速な第2の増殖の7日目は、APC（例えば、P BMC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、P BMCを含む）の存在下で起こり、第1のAPC（例えば、P BMCを含む）層の数の第2のAPC（例えば、P BMCを含む）層の数に対する比率は、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。

【1215】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖におけるAPCの数は、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、急速な第2の増殖におけるAPCの数は、約 $2.5 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ ～約 $7.5 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の範囲から選択される。

【1216】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖におけるAPCの数は、約1

・ $5 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2 \sim 3.5 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の範囲から選択され、急速な第2の増殖におけるAPCの数は、約 $3.5 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2 \sim 6.0 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の範囲から選択される。

【1217】

いくつかの実施形態では、プライミングによる第1の増殖におけるAPCの数は、約 $2.0 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2 \sim 3.0 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の範囲から選択され、急速な第2の増殖におけるAPCの数は、約 $4.0 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2 \sim 5.5 \times 10^6 \text{ APC} / \text{cm}^2$ の範囲から選択される。

【1218】

H. 任意の細胞培地成分

1. 抗CD3抗体

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の増殖方法で使用される培養培地（例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）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を参照されたく、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【1219】

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。特定の実施形態では、抗CD3抗体である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）。

【1220】

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の増殖及び／または急速な第2の増殖の細胞培養培地は、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')₂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

10

20

30

40

50

鎖抗 4-1 BB 断片、軽鎖抗 4-1 BB 断片、抗 4-1 BB 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 4-1 BB 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、4-1 BB アゴニストは、アゴニスト、抗 4-1 BB 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、4-1 BB 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、4-1 BB 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

10

【1221】

いくつかの実施形態では、4-1 BB アゴニストまたは 4-1 BB 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 4-1 BB 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 4-1 BB 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（4-1 BBL）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, 12, 2735-47 に記載されている。

20

【1222】

アゴニスト 4-1 BB 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、4-1 BB アゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式で 4-1 BB 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、4-1 BB 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 4-1 BB 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、4-1 BB 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 4-1 BB 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、4-1 BB 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 4-1 BB 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、4-1 BB アゴニストは、Fc 領域機能性を抑制するアゴニスト 4-1 BB モノクローナル抗体または融合タンパク質である。

30

【1223】

いくつかの実施形態では、4-1 BB アゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒト 4-1 BB（配列番号 9）に結合することの特徴とする。いくつかの実施形態では、4-1 BB アゴニストは、ヒト 4-1 BB（配列番号 9）に結合する結合分子である。いくつかの実施形態では、4-1 BB アゴニストは、マウス 4-1 BB（配列番号 10）に結合する結合分子である。4-1 BB アゴニストまたは結合分子が結合する 4-1 BB 抗原のアミノ酸配列を表 6 に要約する。

40

【表 6】

表 6. 4-1 BB 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 9 ヒト 4-1BB、 細胞膜抗原受容体 スーパーファミリー、 メンバー 9 (ホモセピュラス)	MGNHCYNIVA TLLVILNFER TRSLQDFCSN CPAGTFCDNN RNQICSPCFP NFFSSAGGQR 60 TCDICRCRG VFRTRKESG TSNAECDDTP GFHCLGAGCS MCEQCKQGG ELTRGCKDC 120 CPFTFQDGE GICRWTNCS LGKRVILGT TKEKVVCGP SPADLSPGAS SVTFPAPAE 180 PGRSPQIISF FLALTSTALL FLILFTLIR SVKRGREKL LYIFQPFNR PVQITQEDG 240 CSCRFEERE GGEEL 255
配列番号 10 マウス 4-1BB、 細胞膜抗原受容体 スーパーファミリー、 メンバー 9 (ハウスカズミ)	MGNHCYNIV IVLLVCGEK VGAVQNSCN CPAGTFCKRY NPKKSCFFE TFSIGGQPN 60 CHCKRCAGY FRFRKESG TSNAECDDTP GFHCLGAGCS MCEQCKQGG ELTRGCKDC 120 LGTFNDQNGT GVCRTNCS LGKRVILGT TKEKVVCGP PVVSPFSTT ISVTGEGGQ 180 GHSIQVILIF LALTSALLA LIFITLLSV LKWRKKFPH IFKPFKKT GAAGEEDACS 240 CRCPQEEGG GGEEL 255

50

【1224】

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。

【1225】

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 $7.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $7.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約 $8 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 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。

【1226】

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。

【1227】

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10 nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約9 nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約8 nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約7 nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約6 nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約5 nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約4 nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約3 nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約2 nM以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス4-1BBに約1 nM以下の IC_{50} で結合する4-1BBアゴニストを含む。

【1228】

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- λ 、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

10

20

30

40

50

胞抗原 I L A、C D 1 3 7)]、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 7 に示す。ウトミルマブは、A s n 5 9 及び A s n 2 9 2 にグリコシル化部位、2 2 - 9 6 位 (V_H-V_L)、1 4 3 - 1 9 9 位 (C_H1-C_L)、2 5 6 - 3 1 6 位 (C_H2)、及び 3 6 2 - 4 2 0 位 (C_H3) に重鎖鎖内ジスルフィド架橋、2 2' - 8 7' 位 (V_H-V_L) 及び 1 3 6' - 1 9 5' 位 (C_H1-C_L) に軽鎖鎖内ジスルフィド架橋、I g G 2 A アイソフォーム 2 1 8 - 2 1 8、2 1 9 - 2 1 9、2 2 2 - 2 2 2、及び 2 2 5 - 2 2 5 位、I g G 2 A / B アイソフォーム 2 1 8 - 1 3 0、2 1 9 - 2 1 9、2 2 2 - 2 2 2、及び 2 2 5 - 2 2 5 位、ならびに I g G 2 B アイソフォーム 2 1 9 - 1 3 0 (2)、2 2 2 - 2 2 2、及び 2 2 5 - 2 2 5 位に鎖間重鎖-重鎖ジスルフィド架橋、ならびに I g G 2 A アイソフォーム 1 3 0 - 2 1 3' (2) 位、I g G 2 A / B アイソフォーム 2 1 8 - 2 1 3' 位、及び 1 3 0 - 2 1 3' 位、ならびに I g G 2 B アイソフォーム 2 1 8 - 2 1 3' (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, 8 2 1, 8 6 7 号、同第 8, 3 3 7, 8 5 0 号、及び同第 9, 4 6 8, 6 7 8 号、ならびに国際特許出願公開第 W O 2 0 1 2 / 0 3 2 4 3 3 A 1 (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、F i s h e r, e t a l., C a n c e r I m m u n o l o g. & I m m u n o t h e r. 2 0 1 2, 6 1, 1 7 2 1 - 3 3 に記載される。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 c l i n i c a l t r i a l s. g o v 識別子 N C T 0 2 4 4 4 7 9 3、N C T 0 1 3 0 7 2 6 7、N C T 0 2 3 1 5 0 6 6、及び N C T 0 2 5 5 4 8 1 2 が含まれる。

10

20

【1 2 2 9】

いくつかの実施形態では、4 - 1 B B アゴニストは、配列番号 1 1 によって示される重鎖及び配列番号 1 2 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 - 1 B B アゴニストは、それぞれ、配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 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、4 - 1 B B アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 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、4 - 1 B B アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 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、4 - 1 B B アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 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、4 - 1 B B アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 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、4 - 1 B B アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 1 及び配列番号 1 2 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。

30

【1 2 3 0】

いくつかの実施形態では、4 - 1 B B アゴニストは、ウトミル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、4 - 1 B B アゴニスト重鎖可変領域 (V_H) は、配列番号 1 3 に示される配列を含み、4 - 1 B B アゴニスト軽鎖可変領域 (V_L) は、配列番号 1 4 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 - 1 B B アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 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、4 - 1 B B アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 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、4 - 1 B B アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 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、4 - 1 B B アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号 1 3 及び配列番号 1 4 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

40

50

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13及び配列番号14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13及び配列番号14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。

【1231】

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15、配列番号16、及び配列番号17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18、配列番号19、及び配列番号20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。

【1232】

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生物学的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生物学的製品と比較して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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、ウトミルマブである。

【表7】

表7. 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11 ウトミルマブの 重鎖	EVQLVDSGAE VKRPGESLR SCGSGSYFS TYNISWRQM FGRGLEHNGE IYFGDSYTHY SPSPGQVTT SAKGISFAT LQWSSSLKAS TANYCYARG GFIDYWGQT LITVSSASTK GFSVFLAPC SRSTSESTAA LGLVVDYFF EPVTVSNNSG ALTSQVHTFP AVLQSSGLYS LSQVTVFSS NFGQVITCN VHKPKNTRY DKTVERKCCV ECPFCFAFV AGSFVFLFP KFKDTLMSR TRPVYCVVD VSHPEQVQF HWYDGVENV HAKTFKSEQ PNSTFRQGV LTVVQGNILN GREYKCKVSN KGLFPIEKT ISKTKGQPRE PQVTLFPR EEMTKNQVSL TCLVKGFFYS DIAVENESNG QPENNYKTF PMLDSGSHF LYSKLTVKS RMQQQNVFSC SVNHEALNNH YIQKSLSLF S	60 120 180 240 300 360 420 480
配列番号12 ウトミルマブの 軽鎖	SYELTPFFSV SVSPGQTASI TCSGNIGDQ YAHWYQKRG QSPVLVIYQD KNRPSGIFER FSGNSGNTA TLITISGTQAH DEADYCATY TGFSLAVFG GGTGLTVLQ FKAAPSVTLF PFSSELQAH KATLVCLISD FYPCAVTAM KADSSPVKAG VETTFPSQS MNKAASSYL SLTFQWQHSH RYSGQVTHE GATVSETVAF TCS	60 120 180 216
配列番号13 ウトミルマブの 重鎖可変領域	EVQLVDSGAE VKRPGESLR SCGSGSYFS TYNISWRQM FGRGLEHNGE KIYFGDSYTHY YSPSPGQVTT ISADKISSTA YLQWSSSLKAS DTANYCYARG YGIFDYWGQ GTLAVTSS	60 118
配列番号14 ウトミルマブの 軽鎖可変領域	SYELTPFFSV SVSPGQTASI TCSGNIGDQ YAHWYQKRG QSPVLVIYQD KNRPSGIFER FSGNSGNTA TLITISGTQAH DEADYCATY TGFSLAVFG GGTGLTVL	60 108
配列番号15 ウトミルマブの 重鎖CDR1	STYVIS	6
配列番号16 ウトミルマブの 重鎖CDR2	KIYFGDSYTH YSPSPQ	17
配列番号17 ウトミルマブの 重鎖CDR3	RGYGFY	8
配列番号18 ウトミルマブの 軽鎖CDR1	SGDNIGDQYA H	11
配列番号19 ウトミルマブの 軽鎖CDR2	QDKNPS	7
配列番号20 ウトミルマブの 軽鎖CDR3	ATYTFGSLA V	11

【1233】

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

10

20

30

40

50

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-κ、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 8 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'' 位に鎖間重鎖-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。

10

20

30

40

50

【1234】

いくつかの実施形態では、4-1BB アゴニストは、配列番号 21 によって示される重鎖及び配列番号 22 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 21 及び配列番号 22 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 21 及び配列番号 22 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 21 及び配列番号 22 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 21 及び配列番号 22 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 21 及び配列番号 22 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 21 及び配列番号 22 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。

【1235】

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 23 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 24 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 23 及び配列番号 24 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 23 及び配列番号 24 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 23 及び配列番号 24 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 23 及び配列番号 24 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 23 及び配列番号 24 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 23 及び配列番号 24 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。

【1236】

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 25、配列番号 26、及び配列番号 27 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 28、配列番号 29、及び配列番号 30 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。

【1237】

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生物学的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生物学的製品と比較して 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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、ウレルマブである。

【表 8】

表 8：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 21 ウレルマブの重鎖	QVQLQWQAG LKPFSETLS TCAYVGSFS GYNWIRQS FEGLEWIGE INHGGVYTN FELESRTVIS VDTSKNQFSL KLSVTAADT AVYCARDIG FGNIDWYFDL WGRGTLVTYS SASTGQGVF FLAPSRSTG ESTALQICV KYFPEFTV SNNGALDGS VHTFPAVLQS SGLYSLSEV TVPESLSGTR TYTCNVDRKP SNTKVDKRV SKYGFPCFPC PAPEFLGGS VELFPKPKD TIMSRTEFV TCVVVDSQE DPEVQWYV DGEVNRHAT KFREEQFNST YKVVVLYVL NGWLNHKEY KGVNKKSLP SIETKISPA HQFPEFQY TLPFQSEMT KNQVSLTCLV KGFPSDIAV EWESNGQFEN NYKTFPVLD SGGFFLSTN LVYSGRWCE GNVFCVNMH EALNHRVTK SLSLSLGK 60
配列番号 22 ウレルマブの軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPERAT LSCRASQVS SYLAWYQRP GQAFRLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSDT FTLTISLEP EDFAVYVQQ RHNPALAT CGGTVKIKR VAAKSVFIF PSDEQLKSG TASVCLLN FYFPEAKVQV KVDNALQSN SQSVTEQGS KDSYSLST LTLKADYEK HKYVACEVTH QGLSPFTKS FNNQEC 60
配列番号 23 ウレルマブの 可変重鎖	MKHLFFLL VAFNRVLSG VQCGWAGL LKPFSETLS TCAYVGSFS GYNWIRQSP EKLEWIGE INHGGVYTN FELESRTVIS VDTSKNQFSL LSVTAADTA VYCARDYGP 120
配列番号 24 ウレルマブの 可変軽鎖	MEAPALLFL LLIMLPTTG EIVLTQSPAT LSLSPERAT LSCRASQVS SYLAWYQRP GQAFRLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSDT FTLTISLEP EDFAVYVQQ 110
配列番号 25 ウレルマブの重鎖 CDR1	GYNS 5
配列番号 26 ウレルマブの重鎖 CDR2	EINHGGVYTY NFLES 16
配列番号 27 ウレルマブの重鎖 CDR3	DYGFQNYWY FDL 13
配列番号 28 ウレルマブの軽鎖 CDR1	RASQSVSSYL A 11
配列番号 29 ウレルマブの軽鎖 CDR2	DASNRAT 7
配列番号 30 ウレルマブの軽鎖 CDR3	QQRSDNFFAL T 11

【1238】

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WO2012/177788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。

10

20

【1239】

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。

30

【1240】

いくつかの実施形態では、4-1BBアゴニストは、図20に提供されるような構造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、複合体、多様体、もしくはバイオシミラーである。

【1241】

構造I-A及びI-B (図20を参照されたい) 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

40

50

., 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。

【1242】

構造 I-A の他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表 9 に示す。Fc ドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号 31 のアミノ酸 17~230）、完全なヒンジドメイン（配列番号 31 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 31 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 32~配列番号 41 に示される実施形態から選択され得る。

【表 9】

表 9：C 末端 Fc 抗体断片融合タンパク質設計（構造 I-A）を有する、4-1BB アゴニスト融合タンパク質を含む TNFRSF 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31 Fcドメイン	KSCDKTHTCP CPAPPELLGG FSVFLFPPK KDTIMISRTF EVTCVVVDVPS HEDPEVKNN YVQVQVFNNA KTRFPEQYN STYRVSVLT VLAQDQGNR EYECFYNNR LPAFIENTIS KAKQGPPEQ VITLPPSRRE MTKNQVSLTQ LVKGFPSDI AVENESNGQF ENNYITTFY LSDGSEFLY SKLTVDKRW QGNVFSQSV MHEALRNHYT QESLSLSPGK	60 120 180 230
配列番号32 リンカー	GGGSSSSSSD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号33 リンカー	GGGSSSSSSD KTHTCPPCPA PE	22
配列番号34 リンカー	GGGSSSSSSS SKSCDKTHTC PFCPAPE	27
配列番号35 リンカー	GGGSSSSSSS SKSCDKTHTC PFCPAPE	27
配列番号36 リンカー	GGGSSSSSSS SSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号37 リンカー	GGGSSSSSSS SSKSCDKTH TCPPCPAPE	29
配列番号38 リンカー	GGGSSSSSSS SKTHTCPPC PAFE	24
配列番号39 リンカー	GGGSSSSSSS DKTHTCPPC PAFE	23
配列番号40 リンカー	GGGSSSSSSS THTCPPCPA E	21
配列番号41 リンカー	GGSSSSSSSS GSKTHTCPPC CPAPE	25

【1243】

構造 I-B の他のポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表 10 に示す。Fc 抗体断片が構造 I-B にあるような TNFRSF アゴニスト融合タンパク質の 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 42 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 43~配列番号 45 に示される実施形態から選択される。

【表 10】

表 10：N 末端 Fc 抗体断片融合タンパク質設計（構造 I-B）を有する、4-1BB アゴニスト融合タンパク質を含む TNFRSF 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42 Fcドメイン	NETDILLRW ILLWVAGNG DKTHTCPPC APPELLGGSV FLFFPSPQDS LMISRTFEV CVVQVQVSHED PEVKENWYVD GVEVHNARKT PREQYNSTY RVISVLEVLH QDLNGKEYK CKVSKALPA PIKRTISKAK GQPREPQVIT LPFSREEMTK NQVELTCLVK GFYPSDIAVE NESNGQFENN YETTFPVLDG DGSFELYSKL TVQKSRWQQG NVFSCSYNHE ALRNHYTKQS LSLSPG	60 120 180 240 246
配列番号43 リンカー	SGSGSGSGSG S	11
配列番号44 リンカー	SSSSSGSGSG GS	12
配列番号45 リンカー	SSSSSGSGSG GSGSGS	16

【1244】

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、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、ウトミルマブの可変重鎖及び可変軽鎖、表 11 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 4-1BB 結合ドメインを含む。

【1245】

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、配列番号 46 による配列を含む 1 つ以上の 4-1 BB 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 4-1 BB アゴニスト融合タンパク質は、可溶性 4-1 BB L 配列を含む 1 つ以上の 4-1 BB 結合ドメインを含む。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 4-1 BB アゴニスト融合タンパク質は、配列番号 47 による配列を含む 1 つ以上の 4-1 BB 結合ドメインを含む。

【1246】

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 BB アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号 13 及び配列番号 14 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 4-1 BB 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 4-1 BB アゴニスト融合タンパク質は、各々が、それぞれ、配列番号 23 及び配列番号 24 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 4-1 BB 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 4-1 BB アゴニスト融合タンパク質は、各々が、表 11 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 scFv ドメインである 1 つ以上の 4-1 BB 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。

【表 11】

表 11：融合タンパク質における 4-1 BB 結合ドメインとしてまたは scFv 4-1 BB 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 46 4-1BBL	MEYASDASLD PEAFWFFAPK ARACRVLPWA LVAGLLLLL LAACAVFLA CPWAVSGARA SGKASRRL REGFLSPD PAGLDRQC HPQLVAGWV LAIDPLSWY SPGLAGVSL TGGLSYKEDT KELVWAKGV YVFFQLRL RVVAGEGSG VSLALHQLL RBAAGAAALA LTVLFPASS EARNHAFGQ GRLLHLSAQ RLGVHLHTEA RAKAWQLTQ GATVGLFLRV TETIAGLPS FRIE	60 120 180 240 254
配列番号 47 4-1BBL 可溶性 ドメイン	LQQHPADLV AQNVLLIDGF LSWYSDPLA GVSLTGLSY KEDEKELVA RAGVTVVFFQ LELRVYVAGE GSGVSLALH LQPLRSAGA AALALTVDLP FASSEARNSA FQFGRLLHL SAGRLGVHL HTEARASDAV QLTQCATVIG LFRVTFEIPA GLPFPFSE	60 120 168
配列番号 48 4B4-1-1バージョン 1の可変重鎖	QVQLQPGAE LVKFGASVRL SKASGYTFS SYNHWYQKR FQVLEWIGE INFQNGHTNY NEKFKSKATL TVKSSSTAY MQLSSLTSD SAVYCARSP TTARGFATWG QGTLVTVA	60 118
配列番号 49 4B4-1-1バージョン 1の可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQKS HEPRLIRY ASQISGIPS RFGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVIYQD GHSPFTFGG GTKLEIK	60 107
配列番号 50 4B4-1-1バージョン2の 可変重鎖	QVQLQPGAE LVKFGASVRL SKASGYTFS SYNHWYQKR FQVLEWIGE INFQNGHTNY NEKFKSKATL TVKSSSTAY MQLSSLTSD SAVYCARSP TTARGFATWG QGTLVTVA	60 119
配列番号 51 4B4-1-1バージョン2の 可変軽鎖	DIVMTQSPAT QSVTPGDRVS LSCRASQTIS DYLHWYQKS HEPRLIRY ASQISGIPS RFGSGSGSD FTLSINSVEP EDVGVIYQD GHSPFTFGG GTKLEIK	60 108
配列番号 52 H39E3-2の可変重鎖	MDNTWRLFL VAAATGASE VOLVESGGGL VQFSGSGLSLAS CAASGFTFD VNNHWYQAP GGLERVADI KNGSYTHYA FSLTNRFTIS RNANSLYL QNSLRAREY AVTYCARELT	60 120
配列番号 53 H39E3-2の可変軽鎖	MEAPQQLFL LLMLPTDTG DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQRL SSGNQKMYL WYQQKPGQPP KLLIYYASTR QSGVPDRFSG SGSGTFTLT ISSLQAEIVA	60 110

【1247】

いくつかの実施形態では、4-1 BB アゴニストは、(i) 第 1 の可溶性 4-1 BB 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 4-1 BB 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 4-1 BB 結合ドメインを含む 4-1 BB 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、4-1 BB アゴニストは、(i) 第 1 の可溶性 4-1 BB 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 4-1 BB 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 4-1 BB 結合ドメインを含む 4-1 BB 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 4-1 BB ドメインは各々、茎領域（三量体化に寄与し、細胞膜まである特定の距離を提供するが、4-1 BB 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。

【1248】

いくつかの実施形態では、4-1 BB 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ドメインは、4-1BB結合ドメインである。

【1249】

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。

10

【1250】

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。

【1251】

3. OX40 (CD134) アゴニスト

20

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。

30

40

【1252】

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O

50

X 4 0 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（O X 4 0 L）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 T N F R S F 結合ドメイン及び I g G 1 - F c 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、G i e f f e r s , e t a l . , M o l . C a n c e r T h e r a p e u t i c s 2 0 1 3 , 1 2 , 2 7 3 5 - 4 7 に記載されている。

【1 2 5 3】

アゴニスト O X 4 0 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。C u r t i , e t a l . , C a n c e r R e s . 2 0 1 3 , 7 3 , 7 1 8 9 - 9 8 。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、毒性を低減するのに十分な様式で O X 4 0 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、O X 4 0 アゴニストは、抗体依存性細胞毒性（c e l l u l a r t o x i c i t y ）（A D C C ）、例えば、NK 細胞細胞傷害性（c y t o t o x i c i t y ）を抑制するアゴニスト O X 4 0 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、O X 4 0 アゴニストは、抗体依存性細胞食作用（A D C P ）を抑制するアゴニスト O X 4 0 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、O X 4 0 アゴニストは、補体依存性細胞傷害性（C D C ）を抑制するアゴニスト O X 4 0 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、O X 4 0 アゴニストは、F c 領域機能性を抑制するアゴニスト O X 4 0 モノクローナル抗体または融合タンパク質である。

【1 2 5 4】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、高い親和性及びアゴニスト活性でヒト O X 4 0 （配列番号 5 4 ）に結合することの特徴とする。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、ヒト O X 4 0 に結合する結合分子である（配列番号 5 4 ）。いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、マウス O X 4 0 に結合する結合分子である（配列番号 5 5 ）。O X 4 0 アゴニストまたは結合分子が結合する O X 4 0 抗原のアミノ酸配列を表 1 2 に要約する。

【表 1 2】

表 1 2 : O X 4 0 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54 ヒトOX40 (ホモサビエンズ)	MCVGRRLGR GPCNALLLG LGLSTVGLN CVGDTYFND ECCHERFON GWISRCSSQ NTVCRPGPG FYNVSSSK CKPCWNLK SGSRKQLCT ATQDTVCRK AGTQPLDSK FGVDCAPCF GHFSPGNQA CKFWNCTLA GKHLQPAEN SDAICEDRD PFATQFQRTQ GFAPSPITVQ PFANFRTSQ GSTRFVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLP LALLAALYL RQGLLPFA HFFGGGSEF TTIQEKADH HETIAM	60 120 180 240 277
配列番号55 マウスOX40 (ハツカネズミ)	MYVWQPTA LLLGLTGV TARRLNCVKR TYFSGHKCCR ECQPGHGVN RCDHRTDLC HPCETGYNE AVNIDCKQC TQCHRSQSE LKQNTFTPD TVCRCPGTQ PRQDSYKLG VDCVCFPG FFGNNKACH FNTKTLQSK QPRFASDEL DAVCESRL ATLWETQRP TFRPTVQST TVWFRTSELP SPPLVTPFG PAFVLLGLG LGLLAPLTV LALYLKRW RLPNTKPKCN GNSFRFIQE ENTDAFTLA KI	60 120 180 240 272

【1 2 5 5】

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 O X 4 0 に約 1 0 0 p M 以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 9 0 p M 以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 8 0 p M 以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 7 0 p M 以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 6 0 p M 以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 5 0 p M 以下の K_D で結合する、ヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 4 0 p M 以下の K_D で結合する、またはヒトもしくはマウス O X 4 0 に約 3 0 p M 以下の K_D で結合する O X 4 0 アゴニストを含む。

【1 2 5 6】

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 O X 4 0 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 O X 4 0 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 O X 4 0 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 O X 4 0 に約 8.5×10^5 l / M · s 以上の k_{assoc} で結合する、ヒ

トもしくはマウス OX 40 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 OX 40 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 OX 40 に約 $1 \times 10^6 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する OX 40 アゴニストを含む。

【1257】

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 OX 40 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 OX 40 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 OX 40 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 OX 40 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 OX 40 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 OX 40 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 OX 40 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 OX 40 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 OX 40 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 OX 40 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 OX 40 に約 $3 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、OX 40 アゴニストを含む。

【1258】

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 OX 40 に約 10 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス OX 40 に約 9 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス OX 40 に約 8 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス OX 40 に約 7 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス OX 40 に約 6 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス OX 40 に約 5 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス OX 40 に約 4 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス OX 40 に約 3 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス OX 40 に約 2 nM 以下の IC_{50} で結合する、ヒトもしくはマウス OX 40 に約 1 nM 以下の IC_{50} で結合する OX 40 アゴニストを含む。

【1259】

いくつかの実施形態では、OX 40 アゴニストは、MED I 0 5 6 2 または MED I 0 5 6 2 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- κ 、抗 [ホモサピエンス TNFRSF 4 (腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) スーパーファミリーメンバー 4、OX 40、CD 134)]、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 13 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' 位に鎖間重鎖-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。

【1260】

いくつかの実施形態では、OX 40 アゴニストは、配列番号 56 によって示される重鎖及び配列番号 57 によって示される軽鎖を含む。いくつかの実施形態では、OX 40 アゴニストは、それぞれ、配列番号 56 及び配列番号 57 に示される配列を有する重鎖及び軽

10

20

30

40

50

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 4 0アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号56及び配列番号57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 4 0アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号56及び配列番号57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 4 0アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号56及び配列番号57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 4 0アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号56及び配列番号57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 4 0アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号56及び配列番号57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

【1261】

いくつかの実施形態では、O X 4 0アゴニストは、タボリキシ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、O X 4 0アゴニスト重鎖可変領域（V_H）は、配列番号58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59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58及び配列番号59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 4 0アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号58及び配列番号59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 4 0アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号58及び配列番号59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 4 0アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号58及び配列番号59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 4 0アゴニストは、各々が、それぞれ、配列番号58及び配列番号59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 4 0アゴニストは、各々が、配列番号58及び配列番号59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

【1262】

いくつかの実施形態では、O X 4 0アゴニストは、それぞれ、配列番号60、配列番号61、及び配列番号62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63、配列番号64、及び配列番号65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。

30

【1263】

いくつかの実施形態では、O X 4 0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 4 0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生物学的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生物学的製品と比較して1つ以上の翻訳後修飾を含むO X 4 0抗体を含み、参照医薬品または参照生物学的製品は、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 4 0アゴニスト抗体であり、O X 4 0アゴニスト抗体は、参照医薬品または参照生物学的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生物学的製品は、タボリキシズマブである。O X 4 0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

40

50

上の賦形剤は、参照医薬品または参照生物学的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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、タボリキシズマブである。

【表 13】

表 13：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56 タボリキシズマブの 重鎖	QVQLQESGPG LVRFSQTLSL TCAVYGGSF SGNWNIRRH FKGLEYIGY ISINGITYHN FLKSRITIN RFSKRNQSL QLSNVTFEDT AVYVCARYK DYDGRAMDY WQQTLYTVS SASTEGPSV PLAPSSKSTG GGTALGCLV KDYFEVTV SNNSGALTS VHTFAVLQS SGLYSLSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHPK SNTVDKRVK FSCDKRTHC PCPAPFELLG GFSVELFPFK PRTIMLSRT PEVTCVVVDV SHEDPEVRH WYDQGEVHN AKTPFEECH NETPVPVPL TVLQDMING KEYCKVSNK ALPAFIETI SWAGQSPREP QYTLFPERE ENTKQVSLT CLVKGFPD IAVENESNGQ PENNYKTFE VLSDGGSFFL YSKLTVDKSR WQQNFFSCS VMHEALNNHY TKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 480
配列番号57 タボリキシズマブの 軽鎖	DIQMTPSPSS LEASVGRVT ITCRASQDIS NYLNNYQKFP GRAPKLLIYV TSKLHSGVPS RFGSGSGSDT YTLTISLQF EDFATYYCQ GSAFPWTFQ GTKVEIKRV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SYVCLIMNFY PREAKVQKRV DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSLSTLT LSADEVKHK VYACEVYHQ LSPYTFSPK RHC	60 120 180 210
配列番号58 タボリキシズマブの 重鎖可変領域	QVQLQESGPG LVRFSQTLSL TCAVYGGSF SGNWNIRRH FKGLEYIGY ISINGITYHN FLKSRITIN RFSKRNQSL QLSNVTFEDT AVYVCARYK DYDGRAMDY WQQTLYTV	60 118
配列番号59 タボリキシズマブの 軽鎖可変領域	DIQMTPSPSS LEASVGRVT ITCRASQDIS NYLNNYQKFP GRAPKLLIYV TSKLHSGVPS RFGSGSGSDT YTLTISLQF EDFATYYCQ GSAFPWTFQ GTKVEIKR	60 108
配列番号60 タボリキシズマブの 重鎖CDR1	GSFSSGVNN	9
配列番号61 タボリキシズマブの 重鎖CDR2	YIGYISYNGI TTR	13
配列番号62 タボリキシズマブの 重鎖CDR3	RKYDYDGRH ANDY	14
配列番号63 タボリキシズマブの 軽鎖CDR1	QDISNYLN	8
配列番号64 タボリキシズマブの 軽鎖CDR2	LLIYTTSKLR S	11
配列番号65 タボリキシズマブの 軽鎖CDR3	QGSALPW	8

【1264】

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 14 に示す。

【1265】

いくつかの実施形態では、OX40 アゴニストは、配列番号 66 によって示される重鎖及び配列番号 67 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 66 及び配列番号 67 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 66 及び配列番号 67 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 66 及び配列番号 67 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 66 及び配列番号 67 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 66 及び配列番号 67 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 66 及び配列番号 67 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。

【1266】

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 68 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 69 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 68 及び配列番号 6

9 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 68 及び配列番号 69 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 68 及び配列番号 69 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 68 及び配列番号 69 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 68 及び配列番号 69 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。

【1267】

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 70、配列番号 71、及び配列番号 72 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 73、配列番号 74、及び配列番号 75 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。

【1268】

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生物学的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生物学的製品と比較して 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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、11D4 である。

【表 14】

表 14：11D4 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66 11D4の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCASGFTFS SYSNHWVQA FGRLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRGNARNSLY LQNSLRDED TAVYICARES GWLFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGSPVFFLA FCRSTIDEST AALGLDQYD FFEPTVYSHN SGALTSGVWT FFAVLQSSGL YSLASVQVTP SNNFQDTYIT CVNQHSEST FVQDVVERG CYGEPFPCAP PVAGSGVFLF PEKFKDTIMI SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV QFNWYDQVE VHNATKFEF EQFNSTFRV SVLTVVHQGM LNKQEVCKVY SHKGLPAPIE KTIKTKGQF REQVYTLFP SREMTKNGV SLCLVGFY FDIADVNES HQFNENWYT TPPLDSGDS FFLSKLTVD KSNWQGVNF SCVNHIALH NHTVQKLSL SPK	60 120 180 240 300 360 420 444
配列番号67 11D4の軽鎖	DIQMTQSFSS LSASVGRVY ITCRASQGIS SWLWYQKRF EKAFKSLIYA ASSLQSGVFS RFGSGSGSDT FTLTISSLQF EDFATYICQY YNSYPTFGG GTRVEIKRTV AAFSVVIFPP SDEQLASQTA SVYCLINNFY FPEAKVQKVV DNALQSGNSQ ESVEQDSKD STYLSLSTLT	60 120 180
配列番号68 11D4の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCASGFTFS SYSNHWVQA FGRLEWVSY ISSSSSTIDY ADSVKGRFTI SRGNARNSLY LQNSLRDED TAVYICARES GWLFDYWGQ GTLVTVSS	214 60 118
配列番号69 11D4の重鎖 可変領域	DIQMTQSFSS LSASVGRVY ITCRASQGIS SWLWYQKRF EKAFKSLIYA ASSLQSGVFS RFGSGSGSDT FTLTISSLQF EDFATYICQY YNSYPTFGG GTRVEIK	60 107
配列番号70 11D4の重鎖CDR1	SYSNH	5
配列番号71 11D4の重鎖CDR2	YISSSSSTID YADSVWG	17
配列番号72 11D4の重鎖CDR3	ESGWLFDY	9
配列番号73 11D4の軽鎖CDR1	RASQGISNL A	11
配列番号74 11D4の軽鎖CDR2	AASSLQ	7
配列番号75 11D4の軽鎖CDR3	QQNSYPTF	9

10

20

30

40

50

【1269】

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15に示す。

【1270】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、配列番号76によって示される重鎖及び配列番号77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76及び配列番号77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76及び配列番号77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76及び配列番号77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76及び配列番号77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76及び配列番号77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76及び配列番号77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。

【1271】

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78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79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78及び配列番号79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78及び配列番号79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78及び配列番号79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78及び配列番号79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78及び配列番号79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。

【1272】

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80、配列番号81、及び配列番号82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83、配列番号84、及び配列番号85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。

【1273】

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生物学的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生物学的製品と比較して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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、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。

10

20

30

40

50

【表15】

表15：18D8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76 18D8の重鎖	EVQLVESGGG LVQPGSLRL SCAASGFTD DYAMHWRA FGRGLEWVSG ISNNSGSGY ADSVKGRFTI SDGNKNSLY LQMSLRAED TALYCAKQ STADYFTYTG MDVWGQGTIV TVSSASTKGP SVFFLAFCR STSESTAALG CLVDYFPEF VTSMNSGAL TSGVHTFFAV LQSSGLYSL SVTVPSNP GTQYTCNVG HKFNTKVK TVERKCCVC PCFAPFVAG FQFLFFPEF KFLMISRTF EYTCVTVGVS HDGVSQPM VYDQVHRA HTSFREQPN STFRVSVLT VVHQDLNGK EYCKVSNKG LPAIEKTIK RTGQGFREFQ VYTLPSREE NTRKQVSLTC LVNGFYSDI AVEKSNQGP ENNYKTFPM LQSGSFLLY SKLTVKRSK QQQWFFGVV MREALHWYT QKSLSLPEK	60 120 180 240 300 360 420 450
配列番号77 18D8の軽鎖	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSV SYLAWYQRF GQAPRLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYCCQ RSNWFTFGG TRVEIKRTA AFSVFIFPS DEQLSGSTAS VVCLDNFYP REARVQWVSD HALQSGNSQE SYTEQSGSDS TISLSSTLTL SQADESHV YACEFHQGL SPVFTSEKNG GEC	60 120 180 210
配列番号78 18D8の重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGSLRL SCAASGFTD DYAMHWRA FGRGLEWVSG ISNNSGSGY ADSVKGRFTI SDGNKNSLY LQMSLRAED TALYCAKQ STADYFTYTG MDVWGQGTIV TVSS	60 120 124
配列番号79 18D8の軽鎖可変領域	EIVVTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSV SYLAWYQRF GQAPRLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYCCQ RSNWFTFGG TRVEIK	60 106
配列番号80 18D8の重鎖CDR1	DYAMH	5
配列番号81 18D8の重鎖CDR2	GISNNSGSGY YADSVKG	17
配列番号82 18D8の重鎖CDR3	DQSTADYFTF YGNDV	15
配列番号83 18D8の軽鎖CDR1	RASQSVSYL A	11
配列番号84 18D8の軽鎖CDR2	DASNRAT	7
配列番号85 18D8の軽鎖CDR3	QQRSHWFT	8

【1274】

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、Hu119-122である。Hu119-122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、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。Hu119-122のアミノ酸配列を表16に示す。

【1275】

いくつかの実施形態では、OX40アゴニストは、Hu119-122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86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87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86及び配列番号87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86及び配列番号87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86及び配列番号87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86及び配列番号87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86及び配列番号87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。

【1276】

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88、配列番号89、及び配列番号90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91、配列番号92、及び配列番号93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。

【1277】

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生物学的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生物学的製品と比較して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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、Hu119-122である。

【表16】

表16：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86 Hu19-122の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVPGGGSLRL SCASSEYEFF SHHSHWRQA FQSGLELVAA INSDGGSTTY FDYMERREFTI SRNAKMSLY LQMSLRAD TAVYICARHY DQYAFAYW GQGMVTYSS	60 120
配列番号87 Hu19-122の 軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLSGERAT LSCRSKSVS TSGYSYMHY QKPGQAPRL LIYLSANLES GVPARFSGSG SGTDFLTIS SLEFEDFAVY YQHSRELFY TFGGGTKVEI K	60 111
配列番号88 Hu19-122の重鎖CDR1	SHHSH	5
配列番号89 Hu19-122の重鎖CDR2	AINSDGGSTTY YFDYMER	17
配列番号90 Hu19-122の重鎖CDR3	HYDQYAFAYW Y	11
配列番号91 Hu19-122の軽鎖CDR1	RASKSVSTSG YSYMH	15
配列番号92 Hu19-122の軽鎖CDR2	LASNLES	7
配列番号93 Hu19-122の軽鎖CDR3	YQHSRELFY	9

【1278】

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17に示す。

【1279】

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(VH)は、配列番号94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95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94及び

配列番号 95 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 94 及び配列番号 95 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 94 及び配列番号 95 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 94 及び配列番号 95 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 94 及び配列番号 95 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。

10

【1280】

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 96、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 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 99、配列番号 100、及び配列番号 101 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。

【1281】

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生物学的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生物学的製品と比較して 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生物学的製品は、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生物学的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生物学的製品は、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。

20

30

【表 17】

表 17：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 94 Hu106-222 の 重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKPPGASVRY SCRASGYTFT DYSHRWYQA PQQGLKKNQW INTETGEFTY ADDFKGRFVF SLOTSVSTAY LQISLKAED TAVYICANFY YDVSYSIAND YWQGGTTVTY SS	60 120 122
配列番号 95 Hu106-222 の 軽鎖可変領域	DIGNTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQDVS TAYAWYQQRP GKAFELIYS ASLYTVGFS RFGSGSGSDT PFTTISLQF EDIATITCQQ HYSTPRTFQQ GYKLEIR	60 107
配列番号 96 Hu106-222 の重鎖 CDR1	DYSHR	5
配列番号 97 Hu106-222 の重鎖 CDR2	WINTETGEFT YADDFKRG	17
配列番号 98 Hu106-222 の重鎖 CDR3	FYYDYVSYYA MDY	13
配列番号 99 Hu106-222 の軽鎖 CDR1	KASQDVSTAY A	11
配列番号 100 Hu106-222 の軽鎖 CDR2	SASLYT	7
配列番号 101 Hu106-222 の軽鎖 CDR3	QQHYSTPRT	9

40

【1282】

50

いくつかの実施形態では、OX40アゴニスト抗体は、MEDI6469（9B12とも称される）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。

10

【1283】

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。

20

【1284】

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。

30

【1285】

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。構造I-Aのポリペプチドドメインのアミノ酸配列を表9に示す。Fcドメインは、好ましくは、完全な定常ドメイン（配列番号31のアミノ酸17～230）、完全なヒンジドメイン（配列番号31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31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32～配列番号41に示される実施形態から選択され得る。同様に、構造I-Bのポリペプチドド

40

50

メインのアミノ酸配列を表 10 に示す。Fc 抗体断片が構造 I-A にあるような TNFRSF 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 42 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 43 ~ 配列番号 45 に示される実施形態から選択される。

【1286】

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 18 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

【1287】

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、OX40 L 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 102 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 OX40 L 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 103 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 104 による配列を含む 1 つ以上の OX40 結合ドメインを含む。

20

【1288】

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 58 及び配列番号 59 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 68 及び配列番号 69 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 78 及び配列番号 79 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 86 及び配列番号 87 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 94 及び配列番号 95 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 18 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 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

50

【表 18-1】

表 18：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102 OX40L	NERVQPLEEN VGNARPPFE NKKLLVASV IQGLGILLCP TYICLRFSAL QVSHRYPRIQ SIRVQPTTEK EKGGLITLQ KEDINHWQN RSVINGDGF YLISLGGTFE QEVNHLRLVQ KDEELFGLA KVSQNSLWV ASYVYKGVV LNVYDTSFL DDFVGGSEL LLHQGRGEF CVL	60 120 180 193
配列番号103 OX40L可溶性 ドメイン	SHRYPRIGSI RVQPTTEKRE KGFILTSQKE TEINRWQNS VINCQGFYL ISLKGTFSGE VNSIATVQD EEFILQGRVY RSVNSLWAS LTVKRYTAM VTCTDTHLSD FHWGSGELL IHKQNFGEFV L	60 120 131
配列番号104 OX40L可溶性 ドメイン（代替）	YFRIGSIKIV PTETREKGF ILKSQKSESI NQVQNSVII NGDGYLISL EGFYQEVNI SIRVQGRGEF LFQKSEFVW NISLWASLTV KRYVINYVT DTFELDGFV NGGELLILNQ NFGEFCVL	60 120 128
配列番号105 008の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGSELRL SCASGFTFS RYTNHWYQA FGKLEWVA ISGGGGSTTY ADSVGRFTI SRDSSNTLY LQNSLRAED TAVYICARQ YQVHYALDY NGQGLTVTS	60 120
配列番号106 008の可変重鎖	DIYMTQSPDS LFTVTPGEAS ICRSSQSLL RSNQYNLDM YLQKAGQSFQ LLILYLGNSRA SGVDFRFSQS GSOTDFLKI SRVEADGVV YTCQQTINRF TTFQGTKE	60 108
配列番号107 011の可変重鎖	EVQLVESGGG VVQPGSELRL SCASGFTFS RYTNHWYQA FGKLEWVA ISGGGGSTTYAD SRKGRFTISR DSKNTLYLQ MNLSRAEDTA VYICARQYF RQNAFDVWG QGTLVTVSSA	60 120
配列番号108 011の可変重鎖	DIYMTQSPDS LFTVTPGEAS ICRSSQSLL RSNQYNLDM YLQKAGQSFQ LLILYLGNSRA SGVDFRFSQS GSOTDFLKI SRVEADGVV YTCQQTINRF TTFQGTKE	60 108
配列番号109 021の可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGSELRL SCASGFTFS RYTNHWYQA FGKLEWVA ISYDGSNKYY ADSVGRFTI SRDSSNTLY LQNSLRAED TAVYICARQ YITLPHALDY NGQGLTVTS	60 120
配列番号110 021の可変重鎖	DIYMTQSPFS LFTVTPGEAS ICRSSQSLL RSNQYNLDM YLQKAGQSFQ LLILYLGNSRA SGVDFRFSQS GSOTDFLKI SRVEADGVV YTCQQTINRF TTFQGTKE	60 108
配列番号111 023の可変重鎖	EVQLVESGGG LVNPGSELRL SCASGFTFS RYTNHWYQA FGKLEWVA ISYDGGTYA DSVGRFTIS RDSKNTLYL QMSLRAEDT AVYICARYN VGLNHWYDQ QGTLVTVSS	60 120
配列番号112 023の可変重鎖	EIVLTQSPAT LSLPGERAT LCRASQSVS SYLAWYQRF QGAPRLITD ASNRATGIRA RFGSGSGSD FTILISLEP EDFAVYVQQ RSNFFPAFG GTVLEIKR	60 108
配列番号113 重鎖可変領域	EVQLQSGPE LVKPGASVSM SCASGYTFT RYTNHWYQA FGKLEWVA ISYDGGTYA NERFGRATL TCRSSSTAY HELSLTSED SAVYICARYN GGLNHWYDQ QGTVTVSS	60 119
配列番号114 軽鎖可変領域	DIYMTQSPDS LSLPGERAT ICRASQSVS SYLAWYQRF QGAPRLITD ASNRATGIRA RFGSGSGSD FTILISLEP EDFAVYVQQ RSNFFPAFG GTVLEIKR	60 108
配列番号115 重鎖可変領域	EVQLQSGPE LVKPGASVRI SCRTSGYTF RYTNHWYQA FGKLEWVA ISYDGGTYA NMFGRATL TVCRSSSTAY HFRSLTSED SAVYICARYN YGFLNHWYDQ NGATTVTVSS F	60 120 121
配列番号116 軽鎖可変領域	DIYMTQSPFS MSLPGERAT ICRASQSVS SYLAWYQRF QGAPRLITD ASNRATGIRA RFGSGSGSD FTILISLEP EDFAVYVQQ RSNFFPAFG GTVLEIKR	60 108
配列番号117 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	QIQLVQSGPE LKPGASVRI SCASGYTFT RYTNHWYQA FGKLEWVA INTETGEFTY ADDFGRGVF SLDSSTAY LQNSLRAED TAVYICARYN YDVTYIAMD YHGQGLTVTS SS	60 120 122
配列番号118 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	QVQLVQSGSE LKPGASVRY SCASGYTFT RYTNHWYQA FGKLEWVA INTETGEFTY ADDFGRGVF SLDSSTAY LQNSLRAED TAVYICARYN YDVTYIAMD YHGQGLTVTS SS	60 120 122
配列番号119 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIYMTQSPFS MSLPGERAT ICRASQSVS SYLAWYQRF QGAPRLITD ASNRATGIRA RFGSGSGSD FTILISVQA EDLAVYVQQ RYSTPRTFG GTVLEIKR	60 107
配列番号120 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIYMTQSPFS MSLPGERAT ICRASQSVS SYLAWYQRF QGAPRLITD ASNRATGIRA RFGSGSGSD FTILISVQA EDLAVYVQQ RYSTPRTFG GTVLEIKR	60 107
配列番号121 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGSELRL SCASGYEFTF RSNHWYRT FKKLELVA ISGGGGSTTY FOTHSRFTI SRDSSNTLY LQNSLRAED TAVYICARYN DDTANFATW QGQTLVTVSSA	60 120

【表 18-2】

配列番号122 ヒト化抗体の 重鎖可変領域	EVQLVESGGG LVQPGSELRL SCASGYEFTF RSNHWYRT FKKLELVA ISGGGGSTTY FOTHSRFTI SRDSSNTLY LQNSLRAED TAVYICARYN DDTANFATW QGQTLVTVSS	60 120
配列番号123 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	DIYMTQSPAS LAVLQGRAT ICRASQSVS TSOVSYNHWY QKPGQPFPL LLILYLSLES GVDFRFSQS GSOTDFLINH PVEEDAAVY YQNSRELF TFGAGTLEL R	60 111
配列番号124 ヒト化抗体の 軽鎖可変領域	EIVLTQSPAT LSLPGERAT LCRASQSVS TSOVSYNHWY QKPGQAFPL LLILYLSLES GVDFRFSQS GSOTDFLITIS SLDFEDAVY YQNSRELF TFGAGTLEI R	60 111
配列番号125 重鎖可変領域	NTGLNIVTI VGLNHWYQRE VLESQGLL VQPGSGHLS CAAGSTFSD AHWNTWQSF EGKLEWVAI RSKANNHATV YAESNGRFT ISRDSKESV YLQNSLRAE DTGIVCTWG SVFFYDFWQ GTILTVSS	60 120 138
配列番号126 軽鎖可変領域	RRFTQGLG LKPLNQAQK DIYMTQSPFS LSLPGERAT ICRASQSVS RYTNHWYQ GSGFLINHY TSTLQPGIFP RFGSGSGSD YPSISLEP EDATVYVQ YGNLTPGAG TLEIKR	60 120 126

【1289】

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。

【1290】

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、

10

20

30

40

50

(i i i) 第 2 の可溶性 T N F スーパーファミリーサイトカインドメイン、(i v) 第 2 のペプチドリンカー、及び (v) 第 3 の可溶性 T N F スーパーファミリーサイトカインドメインを含む O X 4 0 アゴニスト一本鎖融合ポリペプチドであり、可溶性 T N F 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、T N F スーパーファミリーサイトカインドメインは、O X 4 0 結合ドメインである。

【 1 2 9 1 】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、M E D I 6 3 8 3 である。M E D I 6 3 8 3 は、O X 4 0 アゴニスト融合タンパク質であり、米国特許第 6 , 3 1 2 , 7 0 0 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。

10

【 1 2 9 2 】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 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 O X 4 0 アゴニスト s c F v 抗体である。

【 1 2 9 3 】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、C r e a t i v e B i o l a b s , I n c . , S h i r l e y , N Y , U S A から市販されている C r e a t i v e B i o l a b s O X 4 0 アゴニストモノクローナル抗体 M O M - 1 8 4 5 5 である。

【 1 2 9 4 】

いくつかの実施形態では、O X 4 0 アゴニストは、B i o L e g e n d , I n c . , S a n D i e g o , C A , U S A から市販されている O X 4 0 アゴニスト抗体クローン B e r - A C T 3 5 である。

20

【 1 2 9 5 】

I . 任意の細胞生存率分析

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 の増殖（初期バルク増殖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 の増殖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 T I L 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、アラマーブルーアッセイ及び M T T アッセイが含まれるが、これらに限定されない。

30

【 1 2 9 6 】

1 . 細胞数、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。C D 3 、C D 4 、C D 8 、及び C D 5 6 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、F A C S C a n t o (商標) フローサイトメーター (B D B i o s c i e n c e s) を使用して、例えば、B D B i o - s c i e n c e s (B D B i o s c i e n c e s , S a n J o s e , C A) 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 (V W R , B a t a v i a , I L) 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、参照により全体が本明細書に組み込まれる U S S N 1 5 / 8 6 3 , 6 3 4 に基づいてアッセイすることもできる。細胞生存率は、米国特許公開第 2 0 1 8 / 0 2 8 0 4 3 6 号または国際特許公開第 W O / 2 0 1 8 / 0 8 1 4 7 3 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。

40

【 1 2 9 7 】

いくつかの事例では、バルク T I L 集団は、以下で考察されるプロトコルを使用して直

50

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。

【1298】

2. 細胞培養

いくつかの実施形態では、上記で論じられるもの、ならびに図1、特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1Hに例示されるものを含む、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み得る。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の増殖における培地は、無血清である。いくつかの実施形態では、第2の増殖における培地は、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の増殖及び第2の増殖（急速な第2の増殖とも称される）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。

【1299】

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、β-メルカプトエタノール（BME）を欠いている。

【1300】

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の増殖として約1～8日間、例えば、約8日間にわたってIL-2、1×抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を収容する第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、2×抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を収容する第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。

【1301】

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の増殖として約1～7日間、例えば、約7日間にわたってIL-2、1×抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を収容する第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、2×抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を収容する第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7日間、または約9日間にわたって拡張することと、を含む。

【1302】

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得ることと、第1のプライミング増殖として約1～7日間、例えば、約7日間にわたってIL-2、1×抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を収容する第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、2×抗原提示フィーダー細胞、及びOKT-3を含む細胞培地を収容する第2のガス透

過性容器内でTILの数を約7～10日間、例えば、約7日間、約8日間、約9日間、または約10日間にわたって拡張することと、を含む。

【1303】

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を拡張する細胞増殖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を拡張する細胞増殖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、細胞増殖システムは、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。

10

【1304】

いくつかの実施形態では、TILは、G-Rex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～ 10×10^6 ～ 30×10^6 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-Rex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。

20

30

【1305】

J. TILの任意の遺伝子操作

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、各々本明細書に提供されるように、閉鎖滅菌製造プロセス中を含む、増殖ステップ前、増殖ステップ中、または増殖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。

40

50

【1306】

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。

【1307】

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。

10

【1308】

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1(特に
図1B及び図1C)に示されるようなステップAから取得されたTIL集団を含む、第1
の増殖前のバルクTIL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1(例えば、図1B)に示されるように、例えば、ステッ
プBで拡張されたTIL集団におけるものを含む、第1の増殖中に起こる。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1に示されるように、ステッ
プBから得られ、ステップCに含まれるTIL集団である、例えば、第1の増殖と第2の
増殖との間の移行中のTIL集団(例えば、本明細書に記載の第2のTIL集団)を含む
、第1の増殖後に起こる。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1に示されるように、例えば、ステップCから得られ、ステップDでのその増
殖前のTIL集団を含む、第2の増殖前のバルクTIL集団に起こる。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1に示されるように、例えば、ス
テップDで拡張されたTIL集団(例えば、第3のTIL集団)を含む、第2の増殖中に
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1に示
されるように、例えば、ステップDでの増殖から取得されたTIL集団を含む、第2の増
殖後に起こる。

20

【1309】

いくつかの実施形態では、TIL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、Tsong, Biophys. J. 1991, 60, 29
7-306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。いくつかの実施形態では、T
IL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、Graham and van der Eb, Virology 1
973, 52, 456-467、Wigler, et al., Proc. Natl. A
cad. Sci. 1979, 76, 1373-1376、及びChen and Oka
yarea, 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(DOTMA)及び
ジオレオ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., Bi
otechniques 1991, 10, 520-525及びFelgner, et
al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1987, 84, 7413-

30

40

50

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5,766,902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。

【1310】

いくつかの実施形態では、本発明のTILは、国際特許出願第WO2019/136456A1号または同第WO2019/210131A1号に記載の方法を使用して、1つ以上の遺伝子の発現を一過性または永続的に抑制するようにさらに修飾され、TILを遺伝的に編集して、PD-1及びCTLA-4をコードする遺伝子などの特定の標的遺伝子をノックアウトするためにそこに記載されている方法を含む、各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。

【1311】

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(TSCM)の増加をもたらす。TSCMは、抗原を経験したセントラルメモリーT細胞の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(Gattinoni et al. Nat Med 2009, 2011、Gattinoni, Nature Rev. Cancer, 2012、Cieri et al. Blood 2013)。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を有する治療用TIL集団をもたらす。

【1312】

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。

【1313】

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。

【1314】

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、PD-1 (PDCD1またはCC279とも称される)、TGFB β 2、CCR4/5、CBLB (CBLB)、CISH、CCR (キメラ共刺激受容体)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、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) 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、CBLB (CBLB)、CISH、CCR (キメラ共刺激受容体)、IL-2、IL-12、IL-15、IL-21、NOTCH 1/2 ICD、TIM3、LAG3、TIGIT、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) 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、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、TGFB β 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、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、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の変化は、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、NOTCH 1/2 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、TGFB 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、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

10

20

30

40

50

施形態では、タンパク質発現の一過性の変化は、C S C R 3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、C C L 2 (M C P - 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、C C L 3 (M I P - 1 α)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、C C L 4 (M I P 1 - 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、C C L 5 (R A N T E S)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、C X C L 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、C X C L 8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、C C L 2 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、C C L 1 7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、V H L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、C D 4 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の変化は、P I K 3 C D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、S O C S 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変化は、胸腺細胞選択関連高移動度群 (H M G) ボックス (T O X)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 1 1 (A N K R D 1 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変化は、B C L 6 コリプレッサー (B C O R)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、c A M P タンパク質キナーゼ A (P K A)を標的とする。

10

20

【1315】

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、C C L 2 (M C P - 1)、C C L 3 (M I P - 1 α)、C C L 4 (M I P 1 - β)、C C L 5 (R A N T E S)、C X C L 1、C X C L 8、C C L 2 2、及び／またはC C L 1 7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。

【1316】

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、P D - 1、C T L A - 4、T I M - 3、L A G - 3、T I G I T、T G F β R 2、及び／またはT G F β の発現の低下及び／または減少をもたらす（例えば、T G F β 経路の遮断をもたらすを含む）。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、C B L B (C B L - 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、C I S Hの発現の低下及び／または減少をもたらす。

30

【1317】

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T I L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、C C R (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、C C R 1、C C R 2、C C R 4、C C R 5、C X C R 1、C X C R 2、及び／またはC S C R 3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。

40

【1318】

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、I L - 2、I L - 1 2、I L - 1 5、及び／またはI L - 2 1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。

【1319】

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、N O T C H 1 / 2 I C D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

50

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。

【1320】

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)の発現の低下及び／または減少をもたらす。

【1321】

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、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、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、PD-1、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、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、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、LAG3、CISH、CBLB、TIM3、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LAG3、CISH、CBLB、TIM3、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、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、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、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。

【1322】

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）。

【1323】

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、LAG3、TIM3、CTLA-4、TIGIT、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、C

10

20

30

40

50

X3CR1、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、PD-1、LAG3、TIM3、CISH、CBLB、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。

【1324】

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。

【1325】

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。

【1326】

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し、米国特許出願公開第US2019/0093073 A1号、同第US 2018/0201889 A1号、及び同第US 2019/0017072 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。

【1327】

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% TSCMの増加をもたらす。

10

【1328】

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、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。

20

30

40

【1329】

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、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) によって誘導され、一般に19~25塩基対の長さの二本鎖RNA分子である。si

50

RNAは、RNA干渉（RNAi）で使用され、それが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を妨害する。siRNAは、本発明に従ってCCRに修飾されたTIL中の遺伝子を一過性にノックダウンするために使用され得る。

【1330】

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、高パーセンテージの2'-OH置換（典型的にはフッ素または-OCH₃）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）によって誘導される発現の減少であり、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、同第US2019/0211337 A1号、同第US2009/0131360 A1、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10,913,948B2号にも広く記載されており、その各々の開示は参照により本明細書に組み込まれる。sdRNA構造、化学的性質、標的位置、配列優先性などを最適化するために、アルゴリズムが開発され、sdRNAの効力予測に利用されている。これらの分析に基づいて、機能的なsdRNA配列は、一般に、1μM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。

【1331】

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。

【1332】

いくつかの実施形態では、方法は、siRNAまたはsdRNAの使用を含む、TILの集団におけるタンパク質発現の一過性の変化を含む。sdRNAを使用する方法は、Khvorova and Watts, Nat. Biotechnol. 2017, 35, 238-248、Byrne, et al., J. Ocul. Ther. 2013, 29, 855-864、及びLigtenberg, et al., Mol. Therapy, 2018（印刷中）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。ある実施形態では、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1μM/10,000TIL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1μM/10,000TILの濃度のsiRNAまたは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siRNAまたはsdRNAの送達は、TIL集団が培地中10μM/10,000TILの濃度でsiRNAまたは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

L 集団への s i R N A または s d R N A の送達は、T I L 集団が培地中 5 0 μ M / 1 0 , 0 0 0 T I L の濃度で s i R N A または s d R N A 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、T I L 集団への s i R N A または s d R N A の送達は、T I L 集団が培地中 0 . 1 μ M / 1 0 , 0 0 0 T I L ~ 5 0 μ M / 1 0 , 0 0 0 T I L の濃度で s d R N A 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、T I L 集団への s i R N A または s d R N A の送達は、T I L 集団が培地中 0 . 1 μ M / 1 0 , 0 0 0 T I L ~ 5 0 μ M / 1 0 , 0 0 0 T I L の濃度で s i R N A または s d R N A に曝露される 1 ~ 3 日の期間を使用して達成され、s i R N A または s d R N A への曝露は、新鮮な s i R N A または s d R N A を培地に追加することによって、2 回、3 回、4 回、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 U S 2 0 1 1 / 0 0 3 9 9 1 4 A 1 号、同第 U S 2 0 1 3 / 0 1 3 1 1 4 1 A 1 号、及び同第 U S 2 0 1 3 / 0 1 3 1 1 4 2 A 1 号、ならびに米国特許第 9 , 0 8 0 , 1 7 1 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。

10

【1333】

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、製造中に T I L 集団に挿入される。いくつかの実施形態では、s i R N A または s d R N A は、N O T C H 1 / 2 I C D、P D - 1、C T L A - 4 T I M - 3、L A G - 3、T I G I T、T G F β、T G F B R 2、c A M P プロテインキナーゼ A (P K A)、B A F F B R 3、C I S H、及び／または C B L B に干渉する R N A 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 q P C R 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 1 0 %、約 1 0 %、約 2 0 %、約 2 5 %、約 3 0 %、約 3 5 %、約 4 0 %、約 4 5 %、約 5 0 %、約 5 5 %、約 6 0 %、約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、または約 9 5 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 6 5 %、約 7 0 %、約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、または約 9 5 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 7 5 %、約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、または約 9 5 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 8 0 %、約 8 5 %、約 9 0 %、または約 9 5 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 8 5 %、約 9 0 %、または約 9 5 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 8 0 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 8 5 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 9 0 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 9 5 % 減少する。いくつかの実施形態では、発現が少なくとも約 9 9 % 減少する。

20

30

【1334】

s i R N A または s d R N A の化学修飾に基づく自己送達可能な R N A i 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、s i R N A または s d R N A を T I L に首尾よく送達することができる。非対称 s i R N A または s d R N A 構造の骨格修飾と疎水性リガンドとの組み合わせ（例えば、L i g t e n b e r g , e t a l . , M o l . T h e r a p y , 2 0 1 8 及び U S 2 0 1 6 / 0 3 0 4 8 7 3 を参照されたい）により、s i R N A または s d R N A は、s i R N A または s d R N A のヌクレアーゼ安定性を利用する培養培地への単純な追加によって、追加の製剤及び方法なしで、培養された哺乳動物細胞に浸透することができる。この安定性により、単に培地中の s i R N A または s d R N A 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 R N A i 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、s i R N A または s d R N A 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。

40

【1335】

いくつかの実施形態では、T I L の 9 5 % を超えるトランスフェクション効率及び様々な特定の s i R N A または s d R N A 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 s i R N A または s d R N A は、R N A

50

10

20

30

40

50

は、本発明で使用される s i R N A または s d R N A 配列は、約 4 . 0 μ M 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。

【1337】

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。追加の特定の実施形態では、化学修飾されたヌクレオチドは、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(-OCH₂CH=CH₂)、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。一実施形態では、糖部分はヘキソースであり得、Augustyns, et al., Nucl. Acids. Res. 18:4711 (1992)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、その開示は参照により本明細書に組み込まれる。

10

20

【1338】

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。

30

【1339】

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 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 s i R N A または s d R N A 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。

40

【1340】

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、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、米国特許第5,849,902号及びWO98/13526)。例えば、オリゴヌクレオチドは、「ブロック基」を含めることによって耐性にすることができる。本明細書で使用する「ブロック基」という用語は、合成のための保護基またはカップリ

50

ング基のいずれかとして、オリゴヌクレオチドまたはヌクレオモノマーに結合することができる置換基（例えば、OH基以外）を指す（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-} ）、ホスホン酸水素、またはホスホルアミダイト）。「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。

【1341】

いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNA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。

10

【1342】

いくつかの実施形態では、化学修飾は、siRNAまたはsdRNA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、500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。

20

【1343】

いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNA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（RISC負荷後に廃棄される分子の一部分）に組み込まれる。いくつかの実施形態では、本発明のsiRNAまたはsdRNA化合物は、二重鎖領域（10～15塩基長の効率的なRISC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、siRNAまたはsdRNAの一本鎖領域は、2～12個のホスホロチオエートインテムクレオチド結合（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インテムクレオチド結合が用いられる。いくつかの実施形態では、本発明のsiRNAまたはsdRNA化合物は、安定性を提供し、かつRISC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、RISC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。

30

40

【1344】

いくつかの実施形態では、siRNAまたはsdRNA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、siRNAまたはsdRNA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%

50

、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1000%が修飾されている。

【1345】

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。

10

【1346】

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 d - r x R N Aは、12時間以上の培地中での半減期を有する。

20

【1347】

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、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、R N A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'-オメチル（2' O M e）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、R N A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、s d R N A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。

30

【1348】

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、R I S C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' O M e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' O M e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' O M e修飾

40

50

されている場合もある。例えば、19 nt 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修飾されている。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。

【1349】

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、高いインビボ活性、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。sdRNAi法により、化学合成された化合物をエクスピボ及びインビ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。

【1350】

siRNAまたは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、例えば、Byrne et al., December 2013, J. Ocular Pharmacology and Therapeutics, 29(10): 855-864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。

【1351】

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TILに送達され得る。ある特定の実施形態では、方法は、siRNAまたはsdRNAオリゴヌクレオチドを送達するためにTIL集団の滅菌エレクトロポレーションを含む。

【1352】

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、ウイルスベクターなどを含む。いくつかの実施形態では、オリゴヌクレオチド剤は、自己送達RNAi剤であり、いかなる送達剤も必要としない。特定の実施形態では、方法は、TILの集団にsiRNAまたはsdRNAオリゴヌクレオチドを送達するための膜貫通送達システムの使用を含む。

【1353】

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TIL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）、TILによって取り込まれる（TILによる受動的取り込みを含む）。siRNAまたはsdRNAは、第1の増殖中、例えば、ステップB、第1の増殖後、例えば、ステップC中、第2の増殖前または増殖中、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最中、ならびにステップFにおける任意の凍結保存ステップ前に、本明細書に記載のTILに追加され得る。さらに、siRNAまたはsdRNA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追加され得る。いくつかの実施形態では、PD-1、LAG-3、TIM-3、CTSH、及びCBLBを含む、本明細書に記載の1つ以上のsiRNAまたはsdRNA標

10

20

30

40

50

的遺伝子が、100 nM～20 mM、200 nM～10 mM、500 nM～1 mM、1 μM～100 μM、及び1 μM～100 μMからなる群から選択される濃度でTIL及び他の薬剤を含む細胞培養培地に追加され得る。いくつかの実施形態では、PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、及びCBLBを含む、本明細書に記載の1つ以上のsiRNAまたはsdRNA標的遺伝子は、0.1 μM siRNAまたはsdRNA/10,000 TIL/100 μL培地、0.5 μM siRNAまたはsdRNA/10,000 TIL/100 μL培地、0.75 μM siRNAまたはsdRNA/10,000 TIL/100 μL培地、1 μM siRNAまたはsdRNA/10,000 TIL/100 μL培地、1.25 μM siRNAまたはsdRNA/10,000 TIL/100 μL培地、1.5 μM siRNAまたはsdRNA/10,000 TIL/100 μL培地、2 μM siRNAまたはsdRNA/10,000 TIL/100 μL培地、5 μM siRNAまたはsdRNA/10,000 TIL/100 μL培地、または10 μM siRNAまたはsdRNA/10,000 TIL/100 μL培地からなる群から選択される量でTIL及び他の薬剤を含む細胞培養培地に追加され得る。いくつかの実施形態では、PD-1、LAG-3、TIM-3、CISH、及びCBLBを含む、本明細書に記載の1つ以上のsdRNA標的遺伝子は、REP前段階またはREP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TIL培養物に追加され得る。

10

【1354】

siRNAまたはsdRNA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siRNAまたはsdRNA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、増殖プロセス中に本明細書に記載のTIL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、TIL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、方法は、オリゴヌクレオチド、例えば、siRNAまたはsdRNAを細胞培養培地に溶解することと、細胞培養培地をTIL集団と接触させることとを含む。TIL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。

20

【1355】

いくつかの実施形態では、細胞へのsiRNAまたはsdRNAオリゴヌクレオチドの送達は、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当該技術分野で認められている方法によって、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（例えば、WO90/14074、WO91/16024、WO91/17424、米国特許第4,897,355号、Bergan et al 1993, Nucleic Acid Research, 21:3567を参照されたい）。

30

【1356】

いくつかの実施形態では、1つを超えるsiRNAまたはsdRNA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、PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3、及び／またはCISHを標的とするsiRNAまたはsdRNA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 siRNAまたはsdRNA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、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 siRNAまたはsdRNA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siRNAまたはsdRNA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PD-1、TIM-3、CBLB、LAG3、及び／またはCISHのうちの1つ以上を標的とするsiRNAまたはsdRNAは、Advirna LLC (Worcester, MA, USA) から市販されている。

40

【1357】

50

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、P D-1、L A G 3、T I M 3、C T L A-4、T I G I T、C I S H、T G F β R 2、P K A、C B L B、B A F F (B R 3)、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、P D-1、L A G 3、T I M 3、C T L A-4、T I G I T、C I S H、T G F β R 2、P K A、C B L B、B A F F (B R 3)、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、P D-1を標的とし、別のs i R N Aまたはs d R N Aは、L A G 3、T I M 3、C T L A-4、T I G I T、C I S H、T G F β R 2、P K A、C B L B、B A F F (B R 3)、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、P D-1、L A G-3、C I S H、C B L B、T I M 3、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、P D-1、ならびにL A G 3、C I S H、C B L B、T I M 3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、P D-1を標的とし、1つのs i R N Aまたはs d R N Aは、L A G 3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、P D-1を標的とし、1つのs i R N Aまたはs d R N Aは、C I S H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、P D-1を標的とし、1つのs i R N Aまたはs d R N Aは、C B L B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、L A G 3を標的とし、1つのs i R N Aまたはs d R N Aは、C I S H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、L A G 3を標的とし、1つのs i R N Aまたはs d R N Aは、C B L B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、C I S Hを標的とし、1つのs i R N Aまたはs d R N Aは、C B L B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、T I M 3を標的とし、1つのs i R N Aまたはs d R N Aは、P D-1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、T I M 3を標的とし、1つのs i R N Aまたはs d R N Aは、L A G 3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、T I M 3を標的とし、1つのs i R N Aまたはs d R N Aは、C I S H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、T I M 3を標的とし、1つのs i R N Aまたはs d R N Aは、C B L Bを標的とする。

10

20

30

40

50

【1358】

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 を治療用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。

【1359】

いくつかの実施形態では、この方法は、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、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、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、T I L 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. Virol

ogy 1998, 72, 8463-71、及び米国特許第6,627,442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、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。【1360】

いくつかの実施形態では、この方法は、TIL集団、例えば、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の集団を遺伝子修飾する方法を含む。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、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（こ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

10

20

30

40

50

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/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、 100 V/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、 100 V/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)及びジオレオ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

【1361】

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。

【1362】

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、ジंक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。

【1363】

本発明のTIL増殖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、GEN3プロセス）に従って、またはPCT/US 2017/058610、PCT/US 2018/012605、もしくはPCT/US 2018/012633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。

【1364】

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 (Cell electric icon)、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増殖法の残りとともに、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増殖法の残りとともに、滅菌閉鎖系を形成する。

【1365】

TIL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GEN3）に従って、または米国特許出願公開第US 2020/0299644 A1号及び同第US 2020/0121719 A1号ならびに米国特

許第10,925,900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、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増殖プロセス中の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、治療用TIL集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。あるいは、TIL増殖プロセス中の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、治療用TIL集団の少なくとも一部において増強させる。

【1366】

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。

【1367】

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。

【1368】

CRISPR法によりTILを永久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、PD-1、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、TOX、SOCS1、ANKRD11、及びBCORが含まれる。

【1369】

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。

【1370】

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

【1371】

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。

【1372】

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 増殖プロセス中の 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、治療用 T I L 集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。あるいは、T I L 増殖プロセス中の 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、治療用 T I L 集団の少なくとも一部において増強させる。

20

【1373】

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

【1374】

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

50

aceuticals (Lexington, KY, USA)、及びLife Technologies (Grand Island, NY, USA) から市販されている。本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US 2011/0201118 A1、US 2013/0117869 A1、US 2013/0315884 A1、US 2015/0203871 A1、及びUS 2016/0120906 A1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。

【1375】

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、PD-1、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、及びGUCY1B3が含まれる。

10

【1376】

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、CCR2、CCR4、CCR5、CXCR2、CXCR3、CX3CR1、IL-2、IL12、IL-15、及びIL-21が含まれる。

20

【1377】

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8,586,526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。

【1378】

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GEN3）に従って、または米国特許出願公開第US 2020/0299644 A1号及び同第US 2020/0121719 A1号ならびに米国特許第10,925,900号に記載されているように実施することができ、それらの各々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増殖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、治療用T I L集団の少なくとも一部においてサイレンスまたは減少させる。あるいは、T I L増殖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、治療用T I L集団の少なくとも一部において増強させる。

30

【1379】

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。

40

【1380】

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。

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。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。

10

【1381】

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、PD-1、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、TOX、SOCS1、ANKRD11、及びBCORが含まれる。

20

【1382】

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、CXCR1、IL-2、IL12、IL-15、及びIL-21が含まれる。

【1383】

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。

30

【1384】

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

【1385】

いくつかの実施形態では、TILは、高親和性T細胞受容体（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。ある特定の実施形態では、この方法は、高親和性T細胞受容体（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

50

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。

【1386】

K. 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。

【1387】

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。

【1388】

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、例えば、実施例9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、閉鎖系の滅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9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9の「最終製剤及び充填」の節に記載の方法に従って、最終製品製剤容器に製剤化される。

【1389】

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を特徴とする。

【1390】

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。

【1391】

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。

【1392】

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。

【1393】

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。

【1394】

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。

【1395】

L. TILの任意の凍結保存

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、任意に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、治療用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の増殖後に採取されたTILに起こる。いくつかの実施形態では、凍結保存は、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）の例示的なステップFにおいてTILで生じる。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℃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。

【1396】

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、任意選択で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。

【1397】

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。

【1398】

上で考察され、かつ図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1

D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H)に提供されるステップA～Eに例示されるように、凍結保存は、TIL増殖プロセスを通じて多数の時点で起こり得る。いくつかの実施形態では、第2の増殖後の拡張されたTIL集団(例えば、図1のステップDによると(特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H)が凍結保存され得る。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、細胞培養培地+5%DMSO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Dに提供される方法に従って凍結保存される。

10

【1399】

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。

【1400】

いくつかの事例では、以下で考察されるプロトコルを使用して、ステップBのTIL集団が直ちに凍結保存され得る。あるいは、バルクTIL集団がステップC及びステップDに供され、ステップDの後に凍結保存され得る。同様に、遺伝子修飾されたTILが治療に使用される場合、ステップBまたはステップDのTIL集団が好適な治療のために遺伝子修飾に供され得る。

20

【1401】

M. 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、増殖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、ステップBにおける第1の増殖後に分析される。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、ステップCにおける移行中に分析される。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、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、ステップDによる第2の増殖後に分析される。いくつかの実施形態では、TILの表現型特徴は、ステップDによる2回以上の増殖後に分析される。

30

【1402】

いくつかの実施形態では、マーカーは、CD8及びCD28からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、CD8の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、CD28の発現が調べられる。いくつかの実施形態では、CD8及び／またはCD28の発現は、他のプロセス(例えば、例えば図1(特に、例えば図1B)に提供されるGen3プロセス)と比較して、例えば図1(特に、例えば図1B)に提供される2Aプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生されたTIL上でより高い。いくつかの実施形態では、CD8の発現は、他のプロセス(特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H)に提供される、例えば、Gen3プロセス)と比較して、例えば、図1(特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H)に提供される2Aプロセスと比較して、本発明のプロセスに従って産生されたTILでより高い。いくつかの実施形態では、CD28の発現は、他のプロセス(例えば、例えば図1(特に、例えば図1B及び／または図1C)に提供されるGen3プロセス)と比較して、例えば図1(特に、例えば、図1B及

40

50

び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) に提供される 2 A プロセスと比較して、本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 0 3】

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 0 4】

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 1 (特に、例えば図 1 B) に提供される G e n 3 プロセス) と比較して、例えば図 1 (特に、例えば図 1 A) に提供される 2 A プロセスと比較して、本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 0 5】

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 0 6】

いくつかの実施形態では、T I L 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、T I L は、グランザイム B を発現する。いくつかの実施形態では、T I L は、パーフォリンを発現する。いくつかの実施形態では、T I L は、グラニュライシンを発現する。

【1 4 0 7】

いくつかの実施形態では、再刺激された T I L 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、T I L は、インターフェロンガンマ (I F N - γ) 分泌について評価され得る。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、E L I S A アッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H) に提供されるステップ D の後の急速な第 2 の増殖ステップ後に E L I S A アッセイによって測定される。いくつかの実施形態では、T I L の健康は、I F N - ガンマ (I F N - γ) 分泌によって測定される。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、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、C D 3、C D 2 8、及び C D 1 3 7 / 4 - 1 B B に対する抗体で刺激された T I L の培地中のサイトカイン I F N - γ のレベルを決定することによって測定され得る。これらの刺激された T I L からの培地中の I F N - γ レベルは、I F N - 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 1 (特に、例えば、図 1 A) に提供される 2 A プロセスのステップ D と比較した、例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／

10

20

30

40

50

または図 1 H) に提供される、例えば、Gen 3 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、エクスピボでの 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 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H 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 においてエクスピボで測定される。

10

【1408】

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 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H の方法を含む、本発明の増殖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 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H の方法を含む、本発明の増殖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 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H の方法を含む、本発明の増殖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 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H の方法を含む、本発明の増殖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 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H の方法を含む、本発明の増殖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 5 倍多くの IFN- γ 分泌が可能な TIL は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H の方法を含む、本発明の増殖方法によって産生された TIL である。

20

30

【1409】

いくつかの実施形態では、少なくとも 100 pg/ml ~ 約 1000 pg/ml 以上の IFN- γ 分泌が可能な TIL は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H の方法を含む、本発明の増殖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 pg/ml、少なくとも 250 pg/ml、少なくとも 300 pg/ml、少なくとも 350 pg/ml、少なくとも 400 pg/ml、少なくとも 450 pg/ml、少なくとも 500 pg/ml、少なくとも 550 pg/ml、少なくとも 600 pg/ml、少なくとも 650 pg/ml、少なくとも 700 pg/ml、少なくとも 750 pg/ml、少なくとも 800 pg/ml、少なくとも 850 pg/ml、少なくとも 900 pg/ml、少なくとも 950 pg/ml、または少なくとも 1000 pg/ml 以上の IFN- γ 分泌が可能な TIL は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H の方法を含む、本発明の増殖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 pg/ml の IFN- γ 分泌が可能な TIL は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H の方法を含む、本発明の増殖方法によって産生された T

40

50

50

30

40

50

50

50

【 1 4 1 1 】

または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H を含む、本発明

50

50

50

30

40

50

50

1 G 及び／または図 1 H を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、9 0 0 0 0 p g / m l 超のグランザイム B を示す T I L は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、1 0 0 0 0 0 p g / m l 超のグランザイム B を示す T I L は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、1 2 0 0 0 0 p g / m l 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、1 4 0 0 0 0 p g / m l 超のグランザイム B を示す T I L は、T I L グランザイム B 分泌が、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、1 6 0 0 0 0 p g / m l 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、1 8 0 0 0 0 p g / m l 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、2 0 0 0 0 0 p g / m l 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、2 2 0 0 0 0 p g / m l 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、2 4 0 0 0 0 p g / m l 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、2 6 0 0 0 0 p g / m l 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、2 8 0 0 0 0 p g / m l 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。いくつかの実施形態では、3 0 0 0 0 0 p g / m l 超のグランザイム B 分泌を示す T I L は、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H を含む、本発明の増殖方法によって産生される T I L である。

【 1 4 1 3 】

いくつかの実施形態では、本発明の増殖方法は、拡張されていない T I L 集団と比較して、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H に提供されるような T I L を含む、インビトロで増加したグランザイム B 分泌を示す拡張された T I L 集団を産生する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 集団と比較して、少なくとも 1 倍～5 0 倍以上増加する。いくつかの実施形態では、I F N - γ 分泌は、拡張されていない T I L 集団と比較して、1 倍、少なくとも 2 倍、少なくとも 3 倍、少なくとも 4 倍、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 1 0 倍、少なくとも 2 0 倍、少なくとも 3 0 倍、少なくとも 4 0 倍、少なくとも 5 0 倍以上増加する。いくつかの実施形態では、本発明の拡張された T I L 集団のグランザイム B 分泌は、拡張されていない T I L 集

団と比較して、少なくとも1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2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3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4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5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6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7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

20

30

40

50

【1414】

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倍以上の低レベルのTNF- α （すなわち、TNF-アルファ）分泌が可能なTILは、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1Hの方法を含む、本発明の増殖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1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1Hの方法を含む、本発明の増殖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1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1Hの方法を含む、本発明の増殖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1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1Hの方法を含む、本発明の増殖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1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1Hの方法を含む、本発明の増殖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1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1Hの方法を含む、本発明の増殖方法によって産生されたTILである。

【1415】

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

40

50

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1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1Hの方法を含む、本発明の増幅方法によって産生さ

れたTILの表現型特性を決定する。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1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1Hの方法を含む、本発明の増幅方法によって産生されたTILの表現型特性を決定する。いくつかの実施形態では、グランザイムB及びTNF- α のレベルを測定して、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1Hの方法を含む、本発明の増幅方法によって産生されたTILの表現型特性を決定する。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1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1Hの方法を含む、本発明の増幅方法によって産生されたTILの表現型特性を決定する。

10

【1417】

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（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）に具体化される方法以外の方法を含む、本明細書に提供される方法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1（特に、例えば、図1A）に例示されるプロセス2A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の増殖で取得された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、 α 、 β 、 γ 、及び δ 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） α 及び／または β 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） α 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） β 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。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Gen2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（例えば、図12～14を参照されたい）。

20

30

【1418】

いくつかの実施形態では、例えば図1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

40

50

、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

【1419】

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、CD3、PD-1、2B4／CD244、CD8、CD25、BTLA、KLRG、TIM-3、CD194／CCR4、CD4、TIGIT、CD183、CD69、CD95、CD127、CD103、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、BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、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、BTLA、CTLA-4、ICOS、Ki67、LAG-3、CD103+／CD69+、CD103+／CD69-、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、TIGIT、CD3、FoxP3、Tim-3、PD-1、CD103、CTLA-4、LAG-3、BTLA-4、ICOS、Ki67、CD8、CD25、CD45、CD4、及び／またはCD59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。

20

30

【1420】

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。

40

【1421】

N. 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）を治療用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、及び／または受容することと、（b）（a）の第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することと、（c）PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／また

50

は T I G I T に富む T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び任意で抗原提示細胞 (A P C) を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第 1 の増殖を行って、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 の増殖が、約 1 ~ 7、8、9、10、または 11 日の第 1 の期間行われ、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、産生することと、(d) 第 2 の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び A P C を含む細胞培養培地と接触させることにより、急速な第 2 の増殖を行って、第 3 の T I L 集団を産生することであって、急速な第 2 の増殖が、約 1 ~ 11 日の第 2 の期間行われ、第 3 の T I L 集団を取得し、第 3 の T I L 集団が、治療用 T I L 集団である、産生することと、e) ステップ (d) から取得された治療用 T I L 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 の増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 の増殖を行うことと、その後、(2) 小規模培養由来の第 2 の T I L 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 T I L 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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 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 T I L 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 T I L 集団の一部が、第 2 の小規模培養で約 4 ~ 8 日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 T I L 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 T I L 集団の一部が、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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 T I L 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 E X 500 M C S 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 T I L 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。

10

20

30

40

【1422】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療用 T I L 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 集団を取得すること、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 P D - 1、C D 39、C D 38、C D 103、C D 101、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T 陽性 T I L を選択して、P D - 1、C D 39、C D 38、C D 103、C D 101、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T に富む T I L 集団を取得することと、(c) P D - 1、C D 39、C D 38、C D 103、C D 101、L A G 3、T I M 3、及び／また

50

は T I G I T に富む T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び任意で抗原提示細胞 (A P C) を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第 1 の増殖を行って、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 の増殖が、約 1 ~ 7、8、9、10、または 11 日の第 1 の期間行われ、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、産生することと、(d) 第 2 の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び A P C を含む細胞培養培地と接触させることにより、急速な第 2 の増殖を行って、第 3 の T I L 集団を産生することであって、急速な第 2 の増殖が、約 1 ~ 11 日の第 2 の期間行われ、第 3 の T I L 集団を取得し、第 3 の T I L 集団が、治療用 T I L 集団である、産生することと、e) ステップ (d) から取得された治療用 T I L 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 の増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 の増殖を行うことと、その後、(2) 小規模培養由来の第 2 の T I L 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 T I L 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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 T I L 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 T I L 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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 T I L 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 T I L 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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 T I L 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 E X 500 M C S 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 T I L 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

【1423】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療用 T I L 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 集団を取得すること、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 P D - 1、C D 39、C D 38、C D 103、C D 101、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T 陽性 T I L を選択して、P D - 1、C D 39、C D 38、C D 103、C D 101、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T に富む T I L 集団を取得することと、(c) P D - 1、C D 39、C D 38、C D 103、C D 101、L A G 3、T I M 3、及び／また

はTIGITに富むTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び任意で抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日の第1の期間行われ、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、産生することと、（d）第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む細胞培養培地と接触させることにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の増殖が、約1～11日の第2の期間行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団である、産生することと、e）ステップ（d）から取得された治療用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の増殖ステップは、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）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、急速な増殖ステップは、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、急速な増殖ステップは、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、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、急速な増殖ステップは、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5日間培養される。

10

20

30

40

50

【1424】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療用TIL集団に拡張するための方法であって、（a）PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性であるように選択されている第1のTIL集団であって、腫瘍消化により対象からの腫瘍試料を処理し、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択することにより取得可能な当該第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞（APC）を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、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の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日の第1の期間行われ、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、産生することと、(b)第2のTIL集団に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2のTIL集団の細胞培養培地と接触させることによって、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、速な第2の増殖におけるAPCの数が、ステップ(a)のAPCの数の少なくとも2倍であり、急速な第2の増殖が、約1～11日の第2の期間行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、産生することと、(c)ステップ(b)から取得された治療用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の増殖ステップは、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の増殖を行うことと、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、急速な増殖ステップは、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4～8日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な増殖ステップは、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4～8日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な増殖ステップは、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5～7日間培養される。

10

20

30

40

【1425】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に拡張するための方法であって、(a)PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性であるように選択されている第1のTIL集団であって、腫瘍消化により対象からの腫瘍試料を処理し、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択することにより取得可能な当該第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライ

50

ミングによる第1の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日の第1の期間行われ、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、産生することと、(b)第2のTIL集団に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2のTIL集団の細胞培養培地と接触させることによって、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、速な第2の増殖におけるAPCの数が、ステップ(a)のAPCの数の少なくとも2倍であり、急速な第2の増殖が、約1～11日の第2の期間行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、産生することと、(c)ステップ(b)から取得された治療用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の増殖ステップは、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の増殖を行うことと、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、急速な増殖ステップは、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、急速な増殖ステップは、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4～6日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な増殖ステップは、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

【1426】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に拡張するための方法であって、(a)PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性であるように選択されている第1のTIL集団であって、腫瘍消化により対象からの腫瘍試料を処理し、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択することにより取得可能な当該第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、第1のガス透過性表面積を含む容器内で行われ、プライ

50

ミングによる第1の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日の第1の期間行われ、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、產生することと、(b)第2のTIL集団に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを含む第2のTIL集団の細胞培養培地と接触させることによって、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を產生することであって、速な第2の増殖におけるAPCの数が、ステップ(a)のAPCの数の少なくとも2倍であり、急速な第2の増殖が、約1～11日の第2の期間行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、產生することと、(c)ステップ(b)から取得された治療用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の増殖ステップは、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)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、急速な増殖ステップは、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、急速な増殖ステップは、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、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、急速な増殖ステップは、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5日間培養される。

10

20

30

40

50

【1427】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に拡張するための方法であって、(a)第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び任意で抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で培養することにより、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性であるように選択されている第1のTIL集団のプライミングによる第1の増殖を行って、第2のTIL集団を產生することであって、プライミングによる第1の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日の第1の期間行われ、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、產生することと、(b)第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む細胞培養培地と接触させ

ることにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の増殖が、約1～11日の第2の期間行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団である、産生することと、(c)ステップ(b)から取得された治療用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の増殖ステップは、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の増殖を行うことと、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、急速な増殖ステップは、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4～8日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な増殖ステップは、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4～8日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な増殖ステップは、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5～7日間培養される。

10

20

30

40

50

【1428】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用TIL集団に拡張するための方法であって、(a)第1のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び任意で抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で培養することにより、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性であるように選択されている第1のTIL集団のプライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日の第1の期間行われ、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、産生することと、(b)第2のTIL集団を、IL-2、OKT-3、及びAPCを含む細胞培養培地と接触させることにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の増殖が、約1～11日の第2の期間行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団である、産生することと、(c)ステップ(b)から取得された治療用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の増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1)第2

の T I L 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 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) 小規模培養由来の第 2 の T I L 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 T I L 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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 T I L 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 T I L 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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 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 T I L 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 5 0 0 M C S 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 T I L 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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 T I L 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 E X 5 0 0 M C S 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 T I L 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

【 1 4 2 9 】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を治療用 T I L 集団に拡張するための方法であって、(a) 第 1 の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び任意で抗原提示細胞 (A P C) を含む細胞培養培地中で培養することにより、P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T 陽性であるように選択されている第 1 の T I L 集団のプライミングによる第 1 の増殖を行って、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 の増殖が、約 1 ～ 7、8、9、10、または 11 日の第 1 の期間行われ、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、産生することと、(b) 第 2 の T I L 集団を、I L - 2、O K T - 3、及び A P C を含む細胞培養培地と接触させることにより、急速な第 2 の増殖を行って、第 3 の T I L 集団を産生することであって、急速な第 2 の増殖が、約 1 ～ 11 日の第 2 の期間行われ、第 3 の T I L 集団を取得し、第 3 の T I L 集団が、治療用 T I L 集団である、産生することと、(c) ステップ (b) から取得された治療用 T I L 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 の増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 の増殖を行うことと、その後、(2) 小規模培養由来の第 2 の T I L 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 T I L 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、急速な増殖ステップは、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－ＲＥＸ １００ＭＣＳ容器内の第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、急速な増殖ステップは、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－ＲＥＸ １００ＭＣＳ容器内の小規模培養で約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、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－ＲＥＸ ５００ＭＣＳ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、急速な増殖ステップは、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－ＲＥＸ １００ＭＣＳ容器内の小規模培養で約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－ＲＥＸ ５００ＭＣＳ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

【１４３０】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する対象を治療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、及び／または受容することと、（ｂ）（ａ）の第１のＴＩＬ集団からＰＤ－１、ＣＤ３９、ＣＤ３８、ＣＤ１０３、ＣＤ１０１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、及び／またはＴＩＧＩＴ陽性ＴＩＬを選択して、ＰＤ－１、ＣＤ３９、ＣＤ３８、ＣＤ１０３、ＣＤ１０１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、及び／またはＴＩＧＩＴに富むＴＩＬ集団を取得することと、（ｃ）ＰＤ－１、ＣＤ３９、ＣＤ３８、ＣＤ１０３、ＣＤ１０１、ＬＡＧ３、ＴＩＭ３、及び／またはＴＩＧＩＴに富むＴＩＬ集団を、ＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及び抗原提示細胞（ＡＰＣ）を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第１の増殖を行って、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の増殖が、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の増殖が、約１～７、８、９、１０、または１１日行われ、第２のＴＩＬ集団を取得する、産生することと、（ｄ）第２のＴＩＬ集団の細胞培養培地に追加のＩＬ－２、ＯＫＴ－３、及びＡＰＣを補充することにより、急速な第２の増殖を行って、第３のＴＩＬ集団を産生することであって、急速な第２の増殖に追加される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の増殖が、約１～１１日間行われ、第３のＴＩＬ集団を取得し、第３のＴＩＬ集団が、治療用ＴＩＬ集団であり、急速な第２の増殖が、第２のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、産生することと、（ｅ）ステップ（ｃ）から取得された治療用ＴＩＬ集団を採取することと、（ｆ）ステップ（ｄ）からの採取されたＴＩＬ集団を注入バッグに移すことと、（ｇ）治療上有効な投与量のステップ（ｅ）からのＴＩＬを対象に投与することと、を含む、拡張した腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）を投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第２の増殖ステップは、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－ＲＥＸ １００ＭＣＳ

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の増殖を行うことと、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 E X 500 M C S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、急速な増殖ステップは、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 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4～8日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な増殖ステップは、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 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 E X 500 M C S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4～8日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な増殖ステップは、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 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 E X 500 M C S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。

10

20

30

40

50

【1431】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する対象を治療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、及び／または受容することと、(b)(a)の第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することと、(c)PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、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の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日行われ、第2のTIL集団を取得する、産生することと、(d)第2のTIL集団の細胞培養培地に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の増殖に追加される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の増殖が、約1～11日間行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、産生することと、(e)ステップ(c)から取得された治療用TIL集団を採取することと、(f)ステップ(d)からの採取されたTIL集団を注入バッグ

に移すことと、(g) 治療上有効な投与量のステップ(e)からのTILを対象に投与することと、を含む、拡張した腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖ステップは、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 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の増殖を行うことと、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 E X 500 M C S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、急速な増殖ステップは、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 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、急速な増殖ステップは、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 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 E X 500 M C S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、急速な増殖ステップは、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 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 E X 500 M C S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

【1432】

いくつかの実施形態では、本発明は、がんを有する対象を治療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、及び／または受容することと、(b)(a)の第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することと、(c)PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を、IL-2、OKT-3、及び抗原提示細胞(APC)を含む細胞培養培地中で培養することにより、プライミングによる第1の増殖を行って、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の増殖が、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の増殖が、約1~7、8、9、10、または11日行われ、第2のTIL集団を取得する、産生することと、(d)第2のTIL集団の細胞培養培地に追加のIL-2、OKT-3、及びAPCを補充することにより、急速な第2の増殖を行って、第3のTIL集団を産生することであって、急速な第2の増殖に追加される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の増殖が、約1～11日間行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、急速な第2の増殖が、第2のガス透過性表面積を含む容器内で行われる、産生することと、(e)ステップ(c)から取得された治療用TIL集団を採取することと、(f)ステップ(d)からの採取されたTIL集団を注入バッグに移すことと、(g)治療上有効な投与量のステップ(e)からのTILを対象に投与することと、を含む、拡張した腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖ステップは、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)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、急速な増殖ステップは、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、急速な増殖ステップは、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、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、急速な増殖ステップは、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5日間培養される。

10

20

30

40

50

【1433】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用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、及び／または受容することと、(b)(a)の第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することと、(c)第1の細胞培養培地、IL-2、及びi)抗原提示フィーダー細胞(APC)の第1の培養物から取得された第1の培養上清であって、第1の培養上清が、OKT-3を含む、第1の培養上清、またはii)APC及びOKT-3のいずれかを含む第1のTIL細胞培養物中で第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の増殖を行うことであって、プライミングによる第1の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日

の第1の期間、第1のガス透過性表面積を含む第1の容器内で第1のTIL細胞培養物を培養することによって行われ、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、プライミングによる第1の増殖を行うことと、(d)第2の細胞培養培地、IL-2、及びi) APCの第2の培養物から取得された第2の培養上清であって、第2の培養上清が、OKT-3を含む、第2の培養上清、またはii) APC及びOKT-3のいずれかを補充した第2のガス透過性表面積を含む第2の容器に第1のTIL細胞培養物を移すことによって、急速な第2の増殖を行って、第2のTIL細胞培養物を形成することであって、急速な第2の増殖が、約1～11日の第2の期間第2のTIL細胞培養物を培養することによって行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、第1のTIL細胞培養物が、第1の培養上清及びAPCの両方を含まず、第2のTIL細胞培養物が、第2の培養上清及び補充APCの両方を含まない、形成することと、(e)ステップ(d)から取得された治療用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。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖ステップは、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の増殖を行うことと、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、急速な増殖ステップは、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4～8日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な増殖ステップは、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4～8日間培養される。いくつかの実施形態では、急速な増殖ステップは、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5～7日間培養される。

10

20

30

40

50

【1434】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を治療用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、及び／または受容することと、(b)(a)の第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽

性 T I L を選択して、P D - 1、C D 3 9、C D 3 8、C D 1 0 3、C D 1 0 1、L A G 3、T I M 3、及び／または T I G I T に富む T I L 集団を取得することと、(c) 第 1 の細胞培養培地、I L - 2、及び i) 抗原提示フィーダー細胞 (A P C) の第 1 の培養物から取得された第 1 の培養上清であって、第 1 の培養上清が、O K T - 3 を含む、第 1 の培養上清、または i i) A P C 及び O K T - 3 のいずれかをを含む第 1 の T I L 細胞培養物中で第 1 の 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 の増殖を行うことであって、プライミングによる第 1 の増殖が、約 1 ~ 7、8、9、1 0、または 1 1 日の第 1 の期間、第 1 のガス透過性表面積を含む第 1 の容器内で第 1 の T I L 細胞培養物を培養することによって行われ、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、プライミングによる第 1 の増殖を行うことと、(d) 第 2 の細胞培養培地、I L - 2、及び i) A P C の第 2 の培養物から取得された第 2 の培養上清であって、第 2 の培養上清が、O K T - 3 を含む、第 2 の培養上清、または i i) A P C 及び O K T - 3 のいずれかを補充した第 2 のガス透過性表面積を含む第 2 の容器に第 1 の T I L 細胞培養物を移すことによって、急速な第 2 の増殖を行って、第 2 の T I L 細胞培養物を形成することであって、急速な第 2 の増殖が、約 1 ~ 1 1 日の第 2 の期間第 2 の T I L 細胞培養物を培養することによって行われ、第 3 の T I L 集団を取得し、第 3 の T I L 集団が、治療用 T I L 集団であり、第 1 の T I L 細胞培養物が、第 1 の培養上清及び A P C の両方を含まず、第 2 の T I L 細胞培養物が、第 2 の培養上清及び補充 A P C の両方を含まない、形成することと、(e) ステップ (d) から取得された治療用 T I L 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、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 の増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 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) 小規模培養由来の第 2 の T I L 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 T I L 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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 T I L 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、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、または 2 0 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 2 の T I L 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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 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 T I L 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、1 0、1 1、1 2、1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、1 8、1 9、または 2 0 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 T I L 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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられて、(1) 第 2 の T I L 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 T I L 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 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 T I L 集

10

20

30

40

50

団の一部が、より大規模な培養で約4～5日間培養される。

【1435】

いくつかの実施形態では、本発明は、腫瘍浸潤リンパ球（TIL）を治療用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、及び／または受容することと、（b）（a）の第1のTIL集団からPD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGIT陽性TILを選択して、PD-1、CD39、CD38、CD103、CD101、LAG3、TIM3、及び／またはTIGITに富むTIL集団を取得することと、（c）第1の細胞培養培地、IL-2、及びi）抗原提示フィーダー細胞（APC）の第1の培養物から取得された第1の培養上清であって、第1の培養上清が、OKT-3を含む、第1の培養上清、またはii）APC及びOKT-3のいずれかを含む第1のTIL細胞培養物中で第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の増殖を行うことであって、プライミングによる第1の増殖が、約1～7、8、9、10、または11日の第1の期間、第1のガス透過性表面積を含む第1の容器内で第1のTIL細胞培養物を培養することによって行われ、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、プライミングによる第1の増殖を行うことと、（d）第2の細胞培養培地、IL-2、及びi）APCの第2の培養物から取得された第2の培養上清であって、第2の培養上清が、OKT-3を含む、第2の培養上清、またはii）APC及びOKT-3のいずれかを補充した第2のガス透過性表面積を含む第2の容器に第1のTIL細胞培養物を移すことによって、急速な第2の増殖を行って、第2のTIL細胞培養物を形成することであって、急速な第2の増殖が、約1～11日の第2の期間第2のTIL細胞培養物を培養することによって行われ、第3のTIL集団を取得し、第3のTIL集団が、治療用TIL集団であり、第1のTIL細胞培養物が、第1の培養上清及びAPCの両方を含まず、第2のTIL細胞培養物が、第2の培養上清及び補充APCの両方を含まない、形成することと、（e）ステップ（d）から取得された治療用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。いくつかの実施形態では、急速な第2の増殖ステップは、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）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、急速な増殖ステップは、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、急速な増殖ステップは、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、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

10

20

30

40

50

間培養される。いくつかの実施形態では、急速な増殖ステップは、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 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 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。

【1436】

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の増殖が、第1の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。

10

【1437】

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。

【1438】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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ように修正された、上記の該当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

【1439】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1440】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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ように修正された、上記の該当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

【1441】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の方法を提供する。

【1442】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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ように修正された、上記の該当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

【1443】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、正確にまたは約1.1:1~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。

【1444】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖において追加されるAPCの数の、ス

50

ステップ（b）において追加されるAPCの数に対する比率が、正確にまたは約1.1：1～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。

【1445】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、正確にまたは約1.1：1～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。

【1446】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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ように修正された、上記の該当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

【1447】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、正確にまたは約1.1：1～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。

【1448】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、正確にまたは約1.1：1～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

【1449】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、正確にまたは約1.1：1～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。

【1450】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、正確にまたは約1.1：1～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

【1451】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、正確にまたは約1.1：1～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。

【1452】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、正確にまたは約1.1：1～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

【1453】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、正確にまたは約1.1：1～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。

【1454】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、正確にまたは約1.1：1～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。

【1455】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、正確にまたは約1.1：1～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。

【1456】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、正確にまたは約1.1：1～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。

10

【1457】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

【1458】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

20

【1459】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

【1460】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

30

【1461】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

【1462】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

40

【1463】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

【1464】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

【1465】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

【1466】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

【1467】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

【1468】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

【1469】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

【1470】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

【1471】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖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の数に対する比率が、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。

【1472】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の増殖に追加される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の増殖において追加されるAPCの

10

20

30

40

50

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。

10

【1473】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の増殖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の増殖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。

20

【1474】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の増殖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の増殖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。

【1475】

他の実施形態では、本発明は、一次の第1の増殖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の増殖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。

30

【1476】

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の増殖に追加され、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。

【1477】

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。

40

【1478】

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用 TIL 集団が組み合わせられて、ステップ (d) から採取された 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。

【1479】

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。

50

【1480】

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。

【1481】

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。

【1482】

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。

【1483】

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。

【1484】

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。

【1485】

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。

【1486】

他の実施形態では、本発明は、プライミングによる第1の増殖がステップ（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の増殖が、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。

【1487】

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。

【1488】

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。

【1489】

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。

【1490】

他の実施形態では、ステップ（b）において、一次の第1の増殖が、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。

【1491】

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。

【1492】

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。

【1493】

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。

【1494】

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。

10

【1495】

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。

【1496】

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。

【1497】

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。

20

【1498】

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の増殖が、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の増殖が、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。

30

【1499】

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。

【1500】

他の実施形態では、ステップ（b）において、一次の第1の増殖が、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。

40

【1501】

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。

【1502】

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

50

該当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、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、該当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、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。

10

【1505】

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。

【1506】

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。

20

【1507】

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。

【1508】

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の増殖が、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の増殖が、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。

30

【1509】

他の実施形態では、ステップ（b）において、一次の第1の増殖が、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。

40

【1510】

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。

【1511】

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。

【1512】

50

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。

【1513】

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。

【1514】

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。

【1515】

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。

【1516】

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。

【1517】

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に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することにより一次の第1の増殖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率が、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。

【1518】

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に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することにより一次の第1の増殖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率が、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。

【1519】

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に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することにより一次の第1の増殖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率が、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。

【1520】

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に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することにより一次の第1の増殖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率が、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。

【1521】

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に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することにより一次の第1の増殖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率が、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。

【1522】

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に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することにより一次の第1の増殖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率が、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。

【1523】

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に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することにより一次の第1の増殖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率が、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。

【1524】

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に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することにより一次の第1の増殖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率が、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。

【1525】

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に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することにより一次の第1の増殖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率が、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。

【1526】

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

10

20

30

40

50

培地に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより一次の第１の増殖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率が、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。

【１５２７】

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に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより一次の第１の増殖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率が、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。

【１５２８】

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に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより一次の第１の増殖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率が、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。

【１５２９】

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に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより一次の第１の増殖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率が、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。

【１５３０】

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に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより一次の第１の増殖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率が、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。

【１５３１】

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に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより一次の第１の増殖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）において追加された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率が、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。

【１５３２】

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に追加の抗原提示細胞（ＡＰＣ）を補充することにより一次の第１の増殖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率が、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。

【1533】

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に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することにより一次の第1の増殖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率が、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、方法を提供する。

10

【1534】

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に追加の抗原提示細胞（APC）を補充することにより一次の第1の増殖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率が、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。

20

【1535】

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の増殖が、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率が、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。

30

40

【1536】

いくつかの実施形態では、本発明は、第2のTIL集団におけるTILの数と第1のTIL集団におけるTILの数との比率が、約1．5：1～約100：1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。

【1537】

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の数に対する比率が、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。

【1538】

50

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の数に対する比率が、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。

【1539】

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の数に対する比率が、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。

【1540】

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の数に対する比率が、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。

10

【1541】

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。

【1542】

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。

20

【1543】

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。

【1544】

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、上記の該当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

【1545】

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、任意に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。

【1546】

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。

【1547】

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率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

【1548】

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。

【1549】

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。

【1550】

50

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A P C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。

【1551】

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A P C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。

【1552】

他の実施形態では、本発明は、A P CがP B M C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。

【1553】

他の実施形態では、本発明は、P B M C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。

【1554】

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。

【1555】

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。

【1556】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（d）での採取がL O V O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。

【1557】

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。

【1558】

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。

【1559】

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。

【1560】

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。

【1561】

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。

【1562】

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。

【1563】

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

10

20

30

40

50

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。

【1564】

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。

【1565】

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。

【1566】

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。

【1567】

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。

【1568】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 27 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。

【1569】

他の実施形態では、本発明は、各断片が正確にまたは約 20 mm^3 ～正確にまたは約 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。

【1570】

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。

【1571】

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。

【1572】

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。

【1573】

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。

【1574】

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。

【1575】

10

20

30

40

50

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。

【1576】

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。

【1577】

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。

【1578】

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。

【1579】

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。

【1580】

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。

【1581】

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 $5,000 \text{ IU/mL}$ 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ずれかに記載の方法を提供する。

【1582】

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 $6,000 \text{ IU/mL}$ 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ずれかに記載の方法を提供する。

【1583】

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。

【1584】

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。

【1585】

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。

【1586】

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。

【1587】

10

20

30

40

50

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。

【1588】

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。

【1589】

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。

【1590】

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。

【1591】

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。

【1592】

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。

【1593】

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。

【1594】

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。

【1595】

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。

【1596】

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。

【1597】

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。

【1598】

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。

【1599】

10

20

30

40

50

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。

【1600】

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。

【1601】

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。

10

【1602】

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。

【1603】

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。

【1604】

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。

20

【1605】

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。

【1606】

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。

30

【1607】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（d）で採取された治療用 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。

【1608】

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。

【1609】

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。

40

【1610】

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。

【1611】

50

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。

【1612】

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。

【1613】

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。

【1614】

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。

【1615】

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。

【1616】

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。

【1617】

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-100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。

【1618】

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-500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、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（TIL）の治療的集団を提供する。

【1620】

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（TIL）の治療用集団を提供し、この治療用TIL集団は、第1のTIL増殖が抗原提示細胞（APC）またはOKT3を追加せずに行われるプロセスによって調製されたTIL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。

【1621】

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（TIL）の治療用集団を提供し、この治療用TIL集団は、第1のTIL増殖が抗原提示細胞（APC）を追加せずに行われるプロセスによって調製されたTIL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。

【1622】

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（TIL）の治療用集団を提供し、この治療用TIL集団は、第1のTIL増殖がOKT3を追加せずに行われるプロセスによって調製されたTIL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。

10

20

30

40

50

【1623】

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（TIL）の治療用集団を提供し、この治療用TIL集団は、第1のTIL増殖が抗原提示細胞（APC）もOKT3も追加せずに行われるプロセスによって調製されたTIL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。

【1624】

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（TIL）の治療用集団を提供し、この治療用TIL集団は、16日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TILと比較して、増加した有効性、増加したインターフェ

10

【1625】

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（TIL）の治療用集団を提供し、この治療用TIL集団は、17日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TILと比較して、増加した有効性、増加したインターフェ

【1626】

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（TIL）の治療用集団を提供し、この治療用TIL集団は、18日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TILと比較して、増加した有効性、増加したインターフェ

20

【1627】

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用TIL集団を提供する。

【1628】

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用TIL集団を提供する。

【1629】

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用TIL集団を提供する。

30

【1630】

他の実施形態では、本発明は、治療用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用TIL集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療用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用TIL集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療用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用TIL集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、本明細書に記載される、例えば、上記のステップA～Fに記載される、または上記のステップA～Fに従う（また、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）に示される）増殖プロセスにより、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。

40

【1631】

他の実施形態では、本発明は、治療用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用TIL集

50

団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療用 T I L 集団が、17 日より長い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ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用 T I L 集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療用 T I L 集団が、18 日より長い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ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用 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、本明細書に記載される、例えば、上記のステップ A ~ F に記載される、または上記のステップ A ~ F に従う（また、例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H）に示される）増殖プロセスにより、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。

10

【1632】

他の実施形態では、本発明は、治療用 T I L 集団が、16 日より長い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ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用 T I L 集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療用 T I L 集団が、17 日より長い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ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用 T I L 集団を提供する。他の実施形態では、本発明は、治療用 T I L 集団が、18 日より長い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ように修正された、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用 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、本明細書に記載される、例えば、上記のステップ A ~ F に記載される、または上記のステップ A ~ F に従う（また、例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H）に示される）増殖プロセスにより、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。

20

【1633】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の T I L 増殖が抗原提示細胞（A P C）を追加せずに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）の治療用集団を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、本明細書に記載される、例えば、上記のステップ A ~ F に記載される、または上記のステップ A ~ F に従う（また、例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H）に示される）増殖プロセスにより、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。

30

【1634】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の T I L 増殖が O K T 3 を追加せずに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）の治療用集団を提供する。いくつかの実施形態では、T I L は、本明細書に記載される、例えば、上記のステップ A ~ F に記載される、または上記のステップ A ~ F に従う（また、例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B 及び／または図 1 C 及び／または図 1 D 及び／または図 1 E 及び／または図 1 F 及び／または図 1 G 及び／または図 1 H）に示される）増殖プロセスにより、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。

40

【1635】

他の実施形態では、本発明は、第 1 の T I L 増殖が A P C を追加せずに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 T I L の治療用集団を提供する。

50

【1636】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL増殖がAPCを追加せずに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2倍多いインターフェロンガンマ産生が可能であるTILの治療用集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、本明細書に記載される、例えば、上記のステップA～Fに記載される、または上記のステップA～Fに従う（また、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）に示される）増殖プロセスにより、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。

【1637】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL増殖がOKT3を追加せずに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用TIL集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、本明細書に記載される、例えば、上記のステップA～Fに記載される、または上記のステップA～Fに従う（また、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）に示される）増殖プロセスにより、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。

【1638】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL増殖がAPCを追加せずに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用TIL集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、本明細書に記載される、例えば、上記のステップA～Fに記載される、または上記のステップA～Fに従う（また、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）に示される）増殖プロセスにより、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。

【1639】

他の実施形態では、本発明は、第1のTIL増殖がOKT3を追加せずに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用TIL集団を提供する。いくつかの実施形態では、TILは、本明細書に記載される、例えば、上記のステップA～Fに記載される、または上記のステップA～Fに従う（また、例えば、図1（特に、例えば、図1B及び／または図1C及び／または図1D及び／または図1E及び／または図1F及び／または図1G及び／または図1H）に示される）増殖プロセスにより、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。

【1640】

他の実施形態では、本発明は、（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の増殖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の増殖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細胞集団を得ることと、（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の増殖ステップは、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の増殖を行うことと、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の容器内での大規模培養で約4～7日間培養することとによって、培養のスケールアップを達成する。他の実施形

10

20

30

40

50

態では、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられ、(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、(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、かかる第2の容器に移された第1の小規模培養由来の第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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられ、(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の増殖を行うことと、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、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の第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、急速な増殖ステップは、複数のステップに分けられ、(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の増殖を行うことと、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、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の第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

30

40

50

【1641】

他の実施形態では、本発明は、急速な第2の増殖ステップが、複数のステップに分けられ、(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の増殖を行うことと、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の容器内での大規模培養で約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。

【1642】

他の実施形態では、本発明は、急速な増殖ステップが、複数のステップに分けられ、(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、(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であって、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された第1の小規模培養由来の第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、方法を提供する。

【1643】

他の実施形態では、急速な増殖ステップが、複数のステップに分けられ、(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の増殖を行うことと、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、1

9、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であって、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の第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、方法を提供する。

【1644】

他の実施形態では、本発明は、急速な増殖ステップが、複数のステップに分けられ、(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の増殖を行うことと、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であって、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の第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、方法を提供する。

10

【1645】

他の実施形態では、本発明は、急速な増殖ステップが、複数のステップに分けられ、(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の増殖を行うことと、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であって、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の第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、方法を提供する。

20

【1646】

他の実施形態では、本発明は、急速な増殖ステップが、複数のステップに分けられ、(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の増殖を行うことと、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であって、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の第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、方法を提供する。

30

【1647】

他の実施形態では、本発明は、急速な増殖ステップが、複数のステップに分けられ、(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の増殖を行うことと、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であって、各第2の容器内で、かかる第2の容器に移された小規模培養由来の第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、方法を提供する。

40

【1648】

他の実施形態では、本発明は、ステップ(a)のプライミングによる第1の増殖が最大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。

【1649】

50

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）の急速な第2の増殖が最大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。

【1650】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）の急速な第2の増殖が最大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。

【1651】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）の急速な第2の増殖が最大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。

【1652】

他の実施形態では、本発明は、ステップ（b）の急速な第2の増殖が最大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。

【1653】

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の増殖が7日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の増殖が最大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。

【1654】

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の増殖が7日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の増殖が最大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。

【1655】

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の増殖が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の増殖が最大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。

【1656】

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の増殖が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の増殖が最大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。

【1657】

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の増殖が8日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の増殖が最大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。

【1658】

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の増殖が8日の期間中に行われ、かつステップ（b）の急速な第2の増殖が最大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。

【1659】

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。

【1660】

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。

【1661】

他の実施形態では、本発明は、第1の培養培地がOKT-3、IL-2、及び抗原提示細胞(APC)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。

【1662】

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、IL-2、及び抗原提示細胞(APC)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。

【1663】

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、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、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。

【1664】

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、4-1BB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、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。

【1665】

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、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。

【1666】

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、4-1BB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。

【1667】

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の数に対する比率が約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。

10

【1668】

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 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。

【1669】

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。

【1670】

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。

20

【1671】

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率は、2:1である。

【1672】

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 $1.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 4.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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。

30

【1673】

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 $1.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 3.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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。

【1674】

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 $2.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 3.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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

【1675】

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 $2.0 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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。

【1676】

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 $2.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2 \sim 7.5 \times 10^6 \text{ APC/cm}^2$ 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。

50

【1677】

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 / 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。

【1678】

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 / cm^2 ~ 正確にまたは約 5.5×10^6 APC / 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。

10

【1679】

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 / 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。

【1680】

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 / 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 / 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。

20

【1681】

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 / 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 / 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。

【1682】

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 / cm^2 ~ 正確にまたは約 3.0×10^6 APC / 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、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 / cm^2 ~ 正確にまたは約 5.5×10^6 APC / 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。

30

【1683】

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 / cm^2 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 / 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。

40

【1684】

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。

【1685】

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。

【1686】

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

50

された、上記の該当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、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。

【1688】

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。

【1689】

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

【1690】

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。

【1691】

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。

【1692】

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。

20

【1693】

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の増殖を行う前に、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細胞の増殖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細胞の増殖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細胞の増殖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細胞の増殖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細胞の増殖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細胞の増殖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細胞の増殖のために利用される。

30

40

【1694】

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の増殖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。

【1695】

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の増殖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

50

【 1 6 9 6 】

【 1 6 9 7 】

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。

【 1 6 9 8 】

【1699】

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、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^9 \sim 5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{10} \sim 5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11} \sim 1 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{12} \sim 5 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{13} \sim 5 \times 10^{13}$ である。

$1.2 \sim 5 \times 10^{12}$ 、及び $5 \times 10^{12} \sim 1 \times 10^{13}$ の範囲内である。

【1700】

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。

10

【1701】

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%、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。

20

30

【1702】

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。

40

【1703】

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。

【1704】

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、10 g、9.5 g、9.0 g、8.5 g、8.0 g、7.5 g、7.0 g、6.5 g、6.0 g

50

、 5.5 g、5.0 g、4.5 g、4.0 g、3.5 g、3.0 g、2.5 g、2.0 g、1.5 g、1.0 g、0.95 g、0.9 g、0.85 g、0.8 g、0.75 g、0.7 g、0.65 g、0.6 g、0.55 g、0.5 g、0.45 g、0.4 g、0.35 g、0.3 g、0.25 g、0.2 g、0.15 g、0.1 g、0.09 g、0.08 g、0.07 g、0.06 g、0.05 g、0.04 g、0.03 g、0.02 g、0.01 g、0.009 g、0.008 g、0.007 g、0.006 g、0.005 g、0.004 g、0.003 g、0.002 g、0.001 g、0.0009 g、0.0008 g、0.0007 g、0.0006 g、0.0005 g、0.0004 g、0.0003 g、0.0002 g、または0.0001 g 以下である。

【1705】

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、0.0001 g、0.0002 g、0.0003 g、0.0004 g、0.0005 g、0.0006 g、0.0007 g、0.0008 g、0.0009 g、0.001 g、0.0015 g、0.002 g、0.0025 g、0.003 g、0.0035 g、0.004 g、0.0045 g、0.005 g、0.0055 g、0.006 g、0.0065 g、0.007 g、0.0075 g、0.008 g、0.0085 g、0.009 g、0.0095 g、0.01 g、0.015 g、0.02 g、0.025 g、0.03 g、0.035 g、0.04 g、0.045 g、0.05 g、0.055 g、0.06 g、0.065 g、0.07 g、0.075 g、0.08 g、0.085 g、0.09 g、0.095 g、0.1 g、0.15 g、0.2 g、0.25 g、0.3 g、0.35 g、0.4 g、0.45 g、0.5 g、0.55 g、0.6 g、0.65 g、0.7 g、0.75 g、0.8 g、0.85 g、0.9 g、0.95 g、1 g、1.5 g、2 g、2.5 g、3 g、3.5 g、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。

【1706】

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。

【1707】

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。

【1708】

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

$\times 10^{13}$ 、 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。

【1709】

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。

【1710】

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 $198 \sim 207 \text{ mg}$ の範囲内である。

【1711】

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。

【1712】

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治療用TIL集団を含む注入バッグを提供する。

【1713】

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治療用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。

【1714】

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TIL組成物を含む注入バッグを提供する。

【1715】

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治療用

T I L 集団の凍結保存された調製物を提供する。

【1716】

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治療用 T I L 集団及び凍結保存された培地を含む腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) 組成物を提供する。

【1717】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が D M S O 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 T I L 組成物を提供する。

【1718】

他の実施形態では、本発明は、凍結保存培地が 7 ~ 1 0 % D M S O 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 T I L 組成物を提供する。

【1719】

いくつかの実施形態では、本発明は、無血清培地または合成培地中の T I L を含む T I L 組成物を提供する。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。

【1720】

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、C T S (商標) O p T m i z e r (商標) T - c e l l E x p a n s i o n B a s a l M e d i u m、C T S (商標) O p T m i z e r (商標) T - C e l l E x p a n s i o n S F M、C T S (商標) A I M - V M e d i u m、C T S (商標) A I M - V S F M、L y m p h o O N E (商標) T - C e l l E x p a n s i o n X e n o - F r e e M e d i u m、ダルベッコ改変イーグル培地 (D M E M)、最小必須培地 (M E M)、イーグル基礎培地 (B M E)、R P M I 1 6 4 0、F - 1 0、F - 1 2、最小必須培地 (α M E M)、グラスゴー最小必須培地 (G - M E M)、R P M I 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。

【1721】

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、C T S (商標) O p T m i z e r T - C e l l E x p a n s i o n S e r u m S u p p l e m e n t、C T S (商標) I m m u n e C e l l S e r u m R e p l a c e m e n t、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 $A g^{+}$ 、 $A l^{3+}$ 、 $B a^{2+}$ 、 $C d^{2+}$ 、 $C o^{2+}$ 、 $C r^{3+}$ 、 $G e^{4+}$ 、 $S e^{4+}$ 、 $B r$ 、 T 、 $M n^{2+}$ 、 P 、 $S i^{4+}$ 、 V^{5+} 、 $M o^{6+}$ 、 $N i^{2+}$ 、 $R b^{+}$ 、 $S n^{2+}$ 、及び $Z r^{4+}$ 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。

【1722】

いくつかの実施形態では、C T S (商標) O p T m i z e r (商標) T - c e l l I m m u n e C e l l S e r u m R e p l a c e m e n t は、C T S (商標) O p T m i z e r (商標) T - c e l l E x p a n s i o n B a s a l M e d i u m、C T S (商標) O p T m i z e r (商標) T - c e l l E x p a n s i o n S F M、C

10

20

30

40

50

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1000IU/mL〜約8000IU/mLのIL-2をさらに含む。

zer (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) Optimizer (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) Optimizer (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) Optimizer (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) Optimizer (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) Optimizer (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) Optimizer (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) Optimizer (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。

10

20

30

40

50

【1726】

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。

【1727】

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。

【1728】

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 P C T 公開第 W O / 1 9 9 8 / 0 3 0 6 7 9 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β-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 $A g^{+}$ 、 $A l^{3+}$ 、 $B a^{2+}$ 、 $C d^{2+}$ 、 $C o^{2+}$ 、 $C r^{3+}$ 、 $G e^{4+}$ 、 $S e^{4+}$ 、 $B r$ 、 T 、 $M n^{2+}$ 、 P 、 $S i^{4+}$ 、 V^{5+} 、 $M o^{6+}$ 、 $N i^{2+}$ 、 $R b^{+}$ 、 $S n^{2+}$ 、及び $Z r^{4+}$ 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 (D MEM)、最小必須培地 (M E M)、イーグル基礎培地 (B M E)、R P M I 1 6 4 0、F-1 0、F-1 2、最小必須培地 (α M E M)、グラスゴー最小必須培地 (G-M E M)、R P M I 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

【1729】

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 ~ 2 0 0 m g / L の範囲であり、L-ヒスチジンの濃度は、約 5 ~ 2 5 0 m g / L であり、L-イソロイシンの濃度は、約 5 ~ 3 0 0 m g / L であり、L-メチオニンの濃度は、約 5 ~ 2 0 0 m g / L であり、L-フェニルアラニンの濃度は、約 5 ~ 4 0 0 m g / L であり、L-プロリンの濃度は、約 1 ~ 1 0 0 0 m g / L であり、L-ヒドロキシプロリンの濃度は、約 1 ~ 4 5 m g / L であり、L-セリンの濃度は、約 1 ~ 2 5 0 m g / L であり、L-スレオニンの濃度は、約 1 0 ~ 5 0 0 m g / L であり、L-トリプトファンの濃度は、約 2 ~ 1 1 0 m g / L であり、L-チロシンの濃度は、約 3 ~ 1 7 5 m g / L であり、L-バリンの濃度は、約 5 ~ 5 0 0 m g / L であり、チアミンの濃度は、約 1 ~ 2 0 m g / L であり、還元型グルタチオンの濃度は、約 1 ~ 2 0 m g / L であり、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩の濃度は、約 1 ~ 2 0 0 m g / L であり、鉄飽和トランスフェリンの濃度は、約 1 ~ 5 0 m g / L であり、インスリンの濃度は、約 1 ~ 1 0 0 m g / L であり、亜セレン酸ナトリウムの濃度は、約 0 . 0 0 0 0 0 1 ~ 0 . 0 0 0 1 m g / L であり、アルブミン (例えば、A l b u M A X (登録商標) I) の濃度は、約 5 0 0 0 ~ 5 0 , 0 0 0 m g / L である。

【1730】

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

列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。

【1731】

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。

【1732】

いくつかの実施形態では、Smith, et al., "Ex vivo expansion of human T cells for adoptive immunotherapy using the novel Xeno-free CTS Immune Cell Serum Replacement," Clin Transl Immunology, 4 (1) 2015 (doi:10.1038/cti.2014.31)に記載の合成培地は、本発明において有用である。簡潔には、RPMIまたはCTS（商標）Optmizer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。

【1733】

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、β-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。

【1734】

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TIL組成物の凍結保存された調製物を提供する。

【1735】

IV. 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。

【1736】

本明細書に記載される方法に従って、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（特に、例えば図1B）に示されるように）産生される拡張された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、Goff, et al., J. Clinical Oncology, 2016, 34 (20): 2389-239、及び補足内容（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）。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。2mm³～3mm³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

10

20

30

40

50

内に配置され、高用量 I L - 2 (6 , 0 0 0 I U / m L) を含む成長培地中で維持され、腫瘍の破壊及び／または T I L 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。

【 1 7 3 7 】

いくつかの実施形態では、成功裏に成長した T I L は、表現型分析 (C D 3 、 C D 4 、 C D 8 、 及び C D 5 6) 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 (I F N - γ) レベルが 2 0 0 p g / m L を超え、バックグラウンドの 2 倍になった場合、T I L は反応性があるとみなされ得る。(G o f f , e t a l . , J I m m u n o t h e r . , 2 0 1 0 , 3 3 : 8 4 0 - 8 4 7 、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、急速な増殖 (R E P) と称されることもある第 2 の増殖を含む、第 2 の増殖 (例えば、図 1 (特に、図 1 B) のステップ D に従って提供される第 2 の増殖) 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 の増殖中の高い増殖) を有する拡張 T I L が、追加の第 2 の増殖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 (特に、図 1 B) のステップ D において提供されるような第 2 の増殖中の高い増殖) を有する T I L が、図 1 (特に、図 1 B) のステップ D に従って追加の第 2 の増殖のために選択される。

【 1 7 3 8 】

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。

【 1 7 3 9 】

いくつかの実施形態では、患者は A C T (養子細胞移植) に直接移されず、例えば、いくつかの実施形態では、腫瘍採取及び／または第 1 の増殖後、細胞はすぐには利用されない。いくつかの実施形態では、T I L は、凍結保存され、患者への投与の 2 日前に解凍され得る。いくつかの実施形態では、T I L は、凍結保存され、患者への投与の 1 日前に解凍され得る。いくつかの実施形態では、T I L は、凍結保存され、患者への投与の直前に解凍され得る。

【 1 7 4 0 】

注入バッグ T I L の凍結保存試料の細胞表現型は、表面マーカー C D 3 、 C D 4 、 C D 8 、 C C R 7 、 及び C D 4 5 R A (B D B i o S c i e n c e s) のフローサイトメトリー (例えば、F l o w J o) 、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 I F N - γ の上昇は、1 0 0 p g / m L 超及び 4 3 ベースラインレベルを超えると定義された。

【 1 7 4 1 】

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 (特に、例えば、図 1 B) に例示される方法によって産生される T I L は、T I L 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 (特

に、例えば、図 1 B) に例示される方法によって產生される T I L は、例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B) 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產生される T I L 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方法以外の方法は、プロセス 1 C 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、D C R、O R R、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 (特に、例えば、図 1 B) に例示される方法によって產生される T I L は、例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B) に例示されるもの以外の方法、例えば、Gen 1 プロセスを含む、本明細書に記載されるもの以外の方法によって產生される T I L 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。

10

【1742】

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 產生の効力アッセイが用いられる。I F N- γ 產生は、細胞傷害能の別の尺度である。I F N- γ 產生は、例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B) 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り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產生された 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 (特に、例えば、図 1 B) 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、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、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 (特に、例えば、図 1 B) 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、1 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 (特に、例えば、図 1 B) 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、2 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 (特に、例えば、図 1 B) 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 (特に、例えば、図 1 B) 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 (特に、例えば、図 1 B) 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、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、I F N- γ は、例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B) 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 (特に、例えば、図 1 B) 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 (特に、例えば、図 1 B) 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。

20

30

40

【1743】

いくつかの実施形態では、例えば、図 1 (特に、例えば、図 1 B) 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

50

などの、図 1（特に、例えば、図 1 B）に例示されていないものを含む他の方法によって產生される T I L 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、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產生された 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、ポリクローン性は、例えば、図 1（特に、例えば、図 1 B）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（特に、例えば、図 1 B）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、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（特に、例えば、図 1 B）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、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（特に、例えば、図 1 B）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、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（特に、例えば、図 1 B）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、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（特に、例えば、図 1 B）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、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（特に、例えば、図 1 B）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、1000 倍増加する。

【1744】

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。

【1745】

1. がん及び他の疾患を治療する方法

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、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。

【1746】

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、グリア芽腫（GBM）、胃腸癌、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）、結腸、結腸直腸、膵臓、トリプルネガティブ乳癌（TNBC）、肉腫、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、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、固形腫瘍癌は、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、及びマントル細胞リンパ腫からなる群から選択される。

【1747】

いくつかの実施形態では、がんは、高頻度変異癌表現型である。高頻度変異癌は、C a

mpbell, et al. (参照により全体がすべての目的のために本明細書に組み込まれる、Cell, 171:1042-1056 (2017))に広く記載されている。いくつかの実施形態では、高頻度変異腫瘍は、1メガベース (Mb) 当たり9~10個の変異を含む。いくつかの実施形態では、小児高頻度変異腫瘍は、1メガベース (Mb) 当たり9.91個の変異を含む。いくつかの実施形態では、成人高頻度変異腫瘍は、1メガベース (Mb) 当たり9個の変異を含む。いくつかの実施形態では、増強された高頻度変異腫瘍は、1メガベース (Mb) 当たり10~100個の変異を含む。いくつかの実施形態では、増強された小児高頻度変異腫瘍は、1メガベース (Mb) 当たり10~100個の変異を含む。いくつかの実施形態では、増強された成人高頻度変異腫瘍は、1メガベース (Mb) 当たり10~100個の変異を含む。いくつかの実施形態では、超高頻度変異腫瘍は、1メガベース (Mb) 当たり100個を超える変異を含む。いくつかの実施形態では、小児超高頻度変異腫瘍は、1メガベース (Mb) 当たり100個を超える変異を含む。いくつかの実施形態では、成人超高頻度変異腫瘍は、1メガベース (Mb) 当たり100個を超える変異を含む。

10

20

30

40

50

【1748】

いくつかの実施形態では、高頻度変異腫瘍は、複製修復経路に変異を有する。いくつかの実施形態では、高頻度変異腫瘍は、複製修復関連DNAポリメラーゼに変異を有する。いくつかの実施形態では、高頻度変異腫瘍は、マイクロサテライト不安定性を有する。いくつかの実施形態では、超高頻度変異腫瘍は、複製修復関連DNAポリメラーゼに変異を有し、マイクロサテライト不安定性を有する。いくつかの実施形態では、腫瘍における高頻度変異は、免疫チェックポイント阻害剤への応答と相関している。いくつかの実施形態では、高頻度変異腫瘍は、免疫チェックポイント阻害剤での治療に耐性を示す。いくつかの実施形態では、高頻度変異腫瘍は、本発明のTILを使用して治療され得る。いくつかの実施形態では、腫瘍の高頻度変異は、環境要因 (外因性曝露) によって引き起こされる。例えば、UV光は、悪性黒色腫における多数の変異の主な原因となり得る (例えば、Pfeifer, G. P., You, Y. H., and Besaratinia, A. (2005). *Mutat. Res.* 571, 19-31.; Sage, E. (1993). *Photochem. Photobiol.* 57, 163-174. を参照されたい)。いくつかの実施形態では、腫瘍における高頻度変異は、直接変異原曝露に起因する、肺腫瘍及び喉頭腫瘍、ならびに他の腫瘍の場合、タバコの煙中の60を超える発がん物質によって引き起こされ得る (例えば、Pleasance, E. D., Stephens, P. J., O'Meara, S., McBride, D. J., Meynert, A., Jones, D., Lin, M. L., Beare, D., Lau, K. W., Greenman, C., et al. (2010). *Nature* 463, 184-190 を参照されたい)。いくつかの実施形態では、腫瘍における高頻度変異は、アポリポタンパク質B mRNA編集酵素触媒ポリペプチド様 (APOBEC) ファミリーメンバーの調節不全によって引き起こされ、これは、広範囲のがんにおいてCからTへの移行のレベルの増加をもたらすことが示されている (例えば、Roberts, S. A., Lawrence, M. S., Klimczak, L. J., Grimm, S. A., Fargo, D., Stojanov, P., Kiezun, A., Kryukov, G. V., Carter, S. L., Saksena, G., et al. (2013). *Nat. Genet.* 45, 970-976 を参照されたい)。いくつかの実施形態では、腫瘍における高頻度変異は、主要な複製酵素Pol3及びPolδによって行われる校正を損なう変異によるDNA複製修復欠陥によって引き起こされる。いくつかの実施形態では、腫瘍における高頻度変異は、結腸直腸癌、子宮内膜癌、及び他のがんにおける高頻度変異に関連するDNAミスマッチ修復の欠陥によって引き起こされる (例えば、Kandoth, C., Schultz, N., Cherniack, A. D., Akbani, R., Liu, Y., Shen, H., Robertson, A. G., Pashtan, I., Shen, R., Benz, C. C., et al.; (2013). *Nature* 497, 67-73.、Muzny, D. M., Bainbridge, M. N., Cha

ng, K., Dinh, H. H., Drummond, J. A., Fowler, G., Kovar, C. L., Lewis, L. R., Morgan, M. B., Newsham, I. F., et al.; (2012). Nature 487, 330–337を参照されたい)。いくつかの実施形態では、DNA複製修復変異は、構成的または二対立遺伝子ミスマッチ修復欠損症 (CMMRD)、リンチ症候群、及びポリメラーゼ校正関連ポリポーシス (PPAP) などのがん素因症候群にも見られる。

【1749】

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、がんは、高頻度変異癌である。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、がんは、増強された高頻度変異癌である。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、がんは、超高頻度変異癌である。

【1750】

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、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド 60 mg/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 25 mg/m^2 /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、骨髄非破壊的化学療法は、シクロホスファミド 60 mg/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 25 mg/m^2 /日で3日間 (TIL注入の27日前～25日前) 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 60 mg/kg /日で2日間 (TIL注入の27日前及び26日前)、続いてフルダラビン 25 mg/m^2 /日で3日間 (TIL注入の25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 $720,000\text{ IU/kg}$ でIL-2の静脈内注入を受ける。

【1751】

示される疾患または障害の治療、予防、及び／または管理における本明細書に記載の化合物及び化合物の組み合わせの有効性は、ヒト疾患の治療のためのガイダンスを提供する当技術分野で知られている様々なモデルを使用して試験され得る。例えば、卵巣癌の治療の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Mullany, et al., Endocrinology 2012, 153, 1585–92、及びFong, et al., J. Ovarian Res. 2009, 2, 12に記載されている。膵臓癌の治療の有効性を決定するためのモデルは、Herreros-Villanueva, et al., World J. Gastroenterol. 2012, 18, 1286–1294に記載されている。乳癌の治療の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Fantozzi, Breast Cancer Res. 2006, 8, 212に記載されている。黒色腫の治療の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Damsky, et al., Pigment Cell & Melanoma Res. 2010, 23, 853–859に記載されている。肺癌の治療の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Meuwissen, et al., Genes & Development, 2005, 19, 643–664に記載されている。肺癌の治療の有効性を決定するためのモデルは、例えば、Kim, Clin. Exp. Otorhinolaryngol. 2009, 2, 55–60、及びSano, Head Neck Oncol. 2009, 1, 32に記載されている。

【1752】

いくつかの実施形態では、IFN-ガンマ (IFN- γ) は、過剰増殖性障害治療の治療有効性を示す。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 (特に、例えば図1B) 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り測定することができる。いくつかの実施形態では、本方法によって取得されたT I Lは、図1（特に、例えば図1 B）及びこの出願全体に例示されるように、G e n 3プロセスと称される方法を使用して調製されたT I Lで治療された対象と比較して、本方法のT I Lで治療された対象の血液中の増加したI F N - γを提供する。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（特に、例えば、図1 B）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、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、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（特に、例えば、図1 B）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、1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（特に、例えば、図1 B）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、2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（特に、例えば、図1 B）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（特に、例えば、図1 B）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（特に、例えば、図1 B）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、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、本発明の方法によって産生されたT I Lで治療された患者由来のエキスピボでのT I L中で測定される。いくつかの実施形態では、I F N - γは、本発明の方法によって産生されたT I Lで治療された患者由来の血液中で測定される。いくつかの実施形態では、I F N - γは、本発明の方法によって産生されたT I Lで治療された患者由来の血清中で測定される。

10

20

30

40

50

【1753】

いくつかの実施形態では、例えば、図1（特に、例えば、図1 B）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法と称される方法などの、図1（特に、例えば、図1 B）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、ポリクローン性は、例えば、図1（特に、例えば、図1 B）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（特に、例えば、図1 B）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、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（特に、例えば、図1 B）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（特に、例えば、図1B）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（特に、例えば、図1B）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（特に、例えば、図1B）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（特に、例えば、図1B）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

【1754】

2. 同時投与方法

いくつかの実施形態では、例えば、図1（特に、例えば、図1B）のステップAからFに記載される方法に由来するTILを含む、本明細書に記載されるように産生されるTILは、以下に記載される抗体などの1つ以上の免疫チェックポイント調節剤と組み合わせて投与され得る。例えば、PD-1を標的とし、本発明のTILと同時投与することができる抗体には、例えば、ニボルマブ（BMS-936558、Bristol-Myers Squibb；Opdivo（登録商標））、パンプロリズマブ（ラムプロリズマブ、MK03475またはMK-3475、Merck；Keytruda（登録商標））、H12.1、PD1.3.1、SYM021、NAT105、ヒト化抗PD-1抗体JS001（ShangHai JunShi）、モノクローナル抗PD-1抗体TSR-042（Tesarco, Inc.）、ピジリズマブ（抗PD-1 mAb CT-011、Medivation）、抗PD-1モノクローナル抗体BGB-A317（Beigene）、及び／または抗PD-1抗体SHR-1210（ShangHai HengRu）、ヒトモノクローナル抗体REGN2810（Regeneron）、ヒトモノクローナル抗体MDX-1106（Bristol-Myers Squibb）、及び／またはヒト化抗PD-1 IgG4抗体PDR001（Novartis）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、PD-1抗体は、クローン：RMP1-14（ラットIgG）-BioXcellカタログ番号BP0146に由来する。本明細書に記載のステップA～Fに従って産生されたTILとの同時投与方法における使用に好適な他の好適な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第8,008,449号に開示される抗PD-1抗体である。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合部分は、PD-L1に特異的に結合し、PD-1との相互作用を阻害し、それにより、免疫活性を増加させる。PD-L1に結合し、PD-1とPD-L1との間の相互作用を妨害し、かつ抗腫瘍免疫応答を刺激する当技術分野で知られているいずれの抗体も、本明細書に記載のステップA～Fに従って産生されたTILとの同時投与方法における使用に好適である。例えば、PD-L1を標的とし、かつ臨床試験中である抗体には、BMS-936559（Bristol-Myers Squibb）及びMPDL3280A（Genentech）が含まれる。PD-L1を標的とする他の好適な抗体は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第7,943,743号に開示されている。PD-1またはPD-L1に結合し、PD-1／PD-L1相互作用を妨害し、かつ抗腫瘍免疫応答を刺激するいずれの抗体も、本明細書に記載のステップA～Fに従って産生されたTILとの同時投与方法における使用に好適であることが当業者に理解されるであろう。いくつかの実施形態では、ステップA～Fに従って産生されたTILの組み合わせを投与された対象は、患者が抗PD-1抗体単独の投与に不応性であるがん型を有する場合

、抗PD-1抗体と同時投与される。いくつかの実施形態では、患者が難治性黒色腫を有する場合、患者は、TILを抗PD-1と組み合わせて投与される。いくつかの実施形態では、患者が非小細胞肺癌（NSCLC）を有する場合、患者は、TILを抗PD-1と組み合わせて投与される。

【1755】

3. PD-1及びPD-L1阻害剤

いくつかの実施形態では、がん患者に提供されるTIL療法は、TIL単独の治療集団による治療を含んでもよく、またはTIL及び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。

【1756】

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）スーパーファミリードメイン、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に記載されているように、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。

【1757】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、当該技術分野で知られている任意のPD-1阻害剤またはPD-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PD-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、PD-1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-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、多様体、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-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。

【1758】

いくつかの実施形態では、PD-1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-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、PD-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、PD-1阻害剤は、PD-1との結合について競合し、及び／またはPD-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、PD-1との結合について競合し、及び／または

10

20

30

40

50

PD-1 上のエピトープに結合する。

【1759】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ヒト PD-1 に約 100 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 90 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 80 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 70 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 60 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 50 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 40 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 30 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 20 pM 以下の KD で結合する、ヒト PD-1 に約 10 pM 以下の KD で結合する、またはヒト PD-1 に約 1 pM 以下の KD で結合するものである。

10

【1760】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ヒト PD-1 に約 $7.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $7.5 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $8 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-1 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 PD-1 に約 $9 \times 10^5 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合する、ヒト PD-1 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 PD-1 に約 $1 \times 10^6 \text{ l/M} \cdot \text{s}$ 以上の k_{assoc} で結合するものである。

【1761】

いくつかの実施形態では、PD-1 阻害剤は、ヒト PD-1 に約 $2 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.1 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.2 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.3 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.4 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.5 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.6 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、またはヒト PD-1 に約 $2.7 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 に約 $2.8 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合する、ヒト PD-1 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 PD-1 に約 $3 \times 10^{-5} \text{ l/s}$ 以下の k_{dissoc} で結合するものである。

20

30

【1762】

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。

40

【1763】

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、もしくは多様体である。ニボルマブは、PD-1

50

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G4κ、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、こ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19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（H₂CH284.4）を有する。

10

20

30

40

50

【1764】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号463によって与えられる重鎖及び配列番号464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463及び配列番号464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）、多様体、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463及び配列番号464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463及び配列番号464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463及び配列番号464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463及び配列番号464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463及び配列番号464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。

【1765】

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（VH）は、配列番号465に示される配列を含み、PD-1阻害剤軽鎖可変領域（VL）は、配列番号466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、PD-1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号465及び配列番号466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-1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号465及び配列番号466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-1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号465及び配列番号466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-1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号465及び配列番号466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-1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号465及び配列番号466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。

【1766】

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467、配列番号468、及び配列番号469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470、配列番号471、及び配列番号472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。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。

【1767】

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ている場合がある。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、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。

【表19】

表19. 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463 ニボルマブ重鎖	QVQLVESGGG VVQPGESLR LCKASGITFS NSGRHWVRQA FGRGLEWAV IWDGSKRY ADGVKGRFTI SRNSNHWLF LQNNLAED TAVYCATND DYWGQGLVT VSSATYKGS VFPLAPCSRS TSESTAALGC LFKDYFPEPV TVSNNSGALT SGVSTFAVL QSSGLYSLS VVTPSSSLG TKTYTCNVDR KFSNTKVDKR VESKYGPCCP PCPAPEFLGG PSVFLFPKP KDTLMLSRTP EVTCVVVDVS QEDPEVQFN VYDGEVHNA KTFPREEGFN STYRVSVLT VLRGQWLNK EYCKYVSKG LPSSTKPTIS KASQGPPEP VYTLFPQGE MYKQVSLTC LVKGFYPSDI AVENESNGQF ENNYKTPPV LDSGGSFLY SRLTVKSRW QEGNVFSCSV MHEALNNHTY QKSLSLSLGK	60 120 180 240 300 360 420 480
配列番号464 ニボルマブ軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSFGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQKRF QGAPFLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSDT FTLTISSELP EDFAVYTCQ SSNPFPTFG GTKVEIKRTV AAPSVTIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNHYF PREAKVQWV DNALQSGNSQ ESVTQDSEK STYLSSTLT LSKADYERKK YVACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEK	60 120 180 214
配列番号465 ニボルマブ 可変重鎖	QVQLVESGGG VVQPGESLR LCKASGITFS NSGRHWVRQA FGRGLEWAV IWDGSKRY ADGVKGRFTI SRNSNHWLF LQNNLAED TAVYCATND DYWGQGLVT VSS	60 113
配列番号466 ニボルマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSFGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQKRF QGAPFLIYD ASNRATGIPA RFSGSGSDT FTLTISSELP EDFAVYTCQ SSNPFPTFG GTKVEIK	60 107
配列番号467 ニボルマブ 重鎖CDR1	NSGRHWVRQA	5
配列番号468 ニボルマブ 重鎖CDR2	VYDGEVHNA	17
配列番号469 ニボルマブ 重鎖CDR3	NDY	4
配列番号470 ニボルマブ 軽鎖CDR1	RASQSVSYL A	11
配列番号471 ニボルマブ 軽鎖CDR2	DASNRAT	7
配列番号472 ニボルマブ 軽鎖CDR3	QSSNPFPT	9

【1768】

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

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。

10

【1769】

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。

20

【1770】

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。

30

【1771】

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投与され、約1mg/kg、続いてイピリムマブ3mg/kgを同じ日に3週間毎に4回、次いで240mgを2週間毎、または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

50

【1772】

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。

10

【1773】

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のイピリムマブと共に投与される。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、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共に投与される。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。

20

【1774】

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。

30

【1775】

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で、6週間毎に1mg/kgのイピリムマブと共に投与される。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

【1776】

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、ニボルマブは、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、ニボルマブは、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

50

ボルマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、約 $3 \text{ mg} / \text{kg}$ で投与され、それに続いてイピリムマブが同日に約 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ で3週間毎に4用量投与され、その後 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、進行性腎細胞癌を治療するために、約 $3 \text{ mg} / \text{kg}$ で投与され、それに続いてイピリムマブが同日に約 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ で3週間毎に4用量投与され、その後 240 mg を2週間毎、 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

【1777】

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 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、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 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。

20

【1778】

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 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、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 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。

30

【1779】

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 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、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 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

【1780】

いくつかの実施形態では、ニボルマブは、高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

50

。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、40 kg以上の成人及び小児患者における高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、40 kg以上の成人及び小児患者における高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。

10

【1781】

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、それに続いてイピリムマブが同日に約1 mg/kgで3週間毎に4用量投与され、その後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、それに続いてイピリムマブが同日に約1 mg/kgで3週間毎に4用量投与され、その後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。

20

30

【1782】

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において、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、それに続いてイピリムマブが同日に約3 mg/kgで3週間毎に4用量投与され、その後240 mgを2週間毎に投与される。いくつかの実施形態において、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、それに続いてイピリムマブが同日に約3 mg/kgで3週間毎に4用量投与され、その後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。

40

【1783】

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

50

。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240mg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。

【1784】

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、もしくは多様体を含む。ペムブロリズマブには、CAS登録番号1374853-91-4が割り当てられており、ラムブロリズマブ、MK-3475、及びSCH-900475としても知られている。ペムブロリズマブは、免疫グロブリンG4、抗（ヒトタンパク質PDCD1（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。ペムブロリズマブの構造は、免疫グロブリンG4、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（226-226'':229-229'）-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[228-L-プロリン（H10-S>P）]γ4重鎖（134-218'）-ジスルフィドとしても記載され得る。ペムブロリズマブの特性、使用、及び調製は、国際特許公開第WO2008/156712A1号、米国特許第8,354,509号、ならびに米国特許出願公開第US2010/0266617A1号、同第US2013/0108651A1号、及び同第US2013/0109843A2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ブロリズマブの臨床的安全性及び有効性は、Fuerst, Oncology Times, 2014, 36, 35-36、Robert, et al., Lancet, 2014, 384, 1109-17、及びThomas, et al., Exp. Opin. Biol. Ther., 2014, 14, 1061-1064に記載されている。ペムブロリズマブのアミノ酸配列を表20に示す。ペムブロリズマブは、ジスルフィド架橋：22-96、22'-96'、23'-92'、23''-92''、134-218'、134'-218''、138'-198'、138''-198''、147-203、147'-203'、226-226'、229-229'、261-321、261'-321'、367-425、及び367'-425'、ならびにグリコシル化部位（N）：Asn-297及びAsn-297'を含む。ペムブロリズマブは、Fc領域に安定化S228P変異を有するIgG4/κアイソタイプであり、この変異をIgG4ヒンジ領域に挿入すると、IgG4抗体で典型的に観察される半分子の形成が防止される。ペムブロリズマブは、各重鎖のFcドメイン内のAsn297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およそ149kDaになる。ペムブ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（G0F）である。

【1785】

いくつかの実施形態では、PD-1阻害剤は、配列番号473によって与えられる重鎖及び配列番号474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473及び配列番号474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）、多様体、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473及び配列番号474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、

10

20

30

40

50

配列番号 473 及び配列番号 474 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 473 及び配列番号 474 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 473 及び配列番号 474 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 473 及び配列番号 474 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。

【1786】

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 (VH) は、配列番号 475 に示される配列を含み、PD-1 阻害剤軽鎖可変領域 (VL) は、配列番号 476 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、PD-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 475 及び配列番号 476 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-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 475 及び配列番号 476 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-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 475 及び配列番号 476 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-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 475 及び配列番号 476 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-1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 475 及び配列番号 476 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。

【1787】

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 477、配列番号 478、及び配列番号 479 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 480、配列番号 481、及び配列番号 482 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。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。

【1788】

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ている場合がある。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。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。

【表 20】

表 20. 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473 ペムブロリズマブ 重鎖	QVQLVQSGVE VKKFGASVKV SCKASGYTFT NYHYWVRQA PGQGLENNGG INFSNGGTNF NEKFKMRVTL TDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYICARRD YRFDMGFDYW GGGTTVTVSS ASTGGSVFF LANCSTSE STRALGLVK DIFFEYVTVS WNGALTSOV HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGKTK YTCNVDSQED NTKVDKRVES KYGPPCPFCP AFEELGGESV FLPPFPKPT LMSKTFEVT CVVVDVSQED FEVQFNHYVD GVEVHNATKT FFEELGGESV RVSVSLTVLH QDWLNGKEVK CHVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVIT LPFSQEMTK HQSILCTLVK GTFPSDIATV WESNQVRENH YKTFPVLDS DGSFFLYSRL TVDKRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTKS LSLSLGK 60
配列番号474 ペムブロリズマブ 軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQRPGQAPRL LIYLAAYLES GVFAFSGSG SGTDFLTLS SLEPEDFAVY YQHSRDLPL TFGGGTKVEI KRTVAAPSVF IFFPSQLK SGTASVCLL NNYFRAHY QKQVNALQS GNSQESVTEQ DSDGSTYSL STLTLSKADY EKHVYACEV THQGLSPVT KSFNRGEC 120
配列番号475 ペムブロリズマブ 可変重鎖	QVQLVQSGVE VKKFGASVKV SCKASGYTFT NYHYWVRQA PGQGLENNGG INFSNGGTNF NEKFKMRVTL TDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYICARRD YRFDMGFDYW GGGTTVTVSS 120
配列番号476 ペムブロリズマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASKGVS TSGYSYLHWY QQRPGQAPRL LIYLAAYLES GVFAFSGSG SGTDFLTLS SLEPEDFAVY YQHSRDLPL TFGGGTKVEI K 111
配列番号477 ペムブロリズマブ 重鎖CDR1	NYHY 5
配列番号478 ペムブロリズマブ 重鎖CDR2	GINFSNGGTN FNEFK 16
配列番号479 ペムブロリズマブ 重鎖CDR3	RDYRFMGFD Y 11
配列番号480 ペムブロリズマブ 軽鎖CDR1	RASKGVSTSG YSYLH 15
配列番号481 ペムブロリズマブ 軽鎖CDR2	LASYLES 7
配列番号482 ペムブロリズマブ 軽鎖CDR3	QHSRDLPLT 9

【1789】

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。

【1790】

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 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、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 200 mg、約 220 mg、約 240 mg、約 260 mg、約 280 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、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。

【1791】

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

10

20

30

40

50

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、I L - 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、I L - 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。

【1792】

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、ペムブロリズマブ投与は、I L - 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、I L - 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。

【1793】

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、ペムブロリズマブは、NSCLC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、I L - 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、I L - 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。

【1794】

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、I L - 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、I L - 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。

【1795】

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、I L - 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、I L - 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。

【1796】

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）または縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫（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）または縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫（PMBCL）を治療するために、成人に対して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、古典的ホジキンリンパ腫（cHL）または縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫（PMBCL）を治療するために、小児に対して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。

【1797】

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。

【1798】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高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、成人に対して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、小児に対して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。

ら腫瘍試料を取得する前に) 投与することができる。

【1799】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高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。

10

【1800】

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。

20

【1801】

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。

30

【1802】

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。

40

【1803】

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

50

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。

【1804】

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、成人に対して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、成人に対して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、小児に対して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
10
20
30
40
50

【1805】

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、5mgのアキシチニブと共に1日2回で経口投与される。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
30
40
50

【1806】

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、20mgのレンパチニブと共に1日1回で経口投与される。いくつかの実
40
50

【1807】

いくつかの実施形態では、ペムブロリズマブは、高遺伝子変異数（TMB-H）癌を治療するために、成人に対して3週間毎に約200mgで投与される。いくつかの実施形態

10

20

30

40

50

では、ペムブロリズマブは、TMB-H癌を治療するために、成人に対して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、小児に対して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。

10

【1808】

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。

20

【1809】

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。

30

【1810】

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。

40

【1811】

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。

【1812】

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

50

米国特許出願公開第2010/0266617A1号、同第2013/0108651A1号、同第2013/0109843A2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2009/0028857A1号、同第2010/0285013A1号、同第2013/0022600A1号、及び同第2011/0008369A1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8,735,553B1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。

10

【1813】

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。

20

【1814】

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、多様体、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。

30

【1815】

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。

40

【1816】

50

【 1 8 1 7 】

10

20

30

40

50

d i s s o cで結合する、ヒトPD-1に約 2.6×10^{-5} l / s以下のk d i s s o cで結合する、ヒトPD-L1もしくはPD-L1に約 2.7×10^{-5} l / s以下のk d i s s o cで結合する、またはヒトPD-L1もしくはPD-L2に約 3×10^{-5} l / s以下のk d i s s o cで結合するものである。

【1822】

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。

【1823】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、MED I 4 7 3 6としても知られるデュルバルマブ（これは、A s t r a Z e n e c a p l c .の子会社であるMedimmune, 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、もしくは多様体である。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., Ann. Rev. Med., 2014, 65, 185-202、Brahmer, et al., J. Clin. Oncol. 2014, 32, 5s（補足、要約8021）、及びMc Dermott, 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21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。

【1824】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号483によって与えられる重鎖及び配列番号484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483及び配列番号484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）、多様体、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483及び配列番号484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483及び配列番号484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 483 及び配列番号 484 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 483 及び配列番号 484 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 483 及び配列番号 484 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。

【1825】

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。実施形態では、PD-L1 阻害剤重鎖可変領域 (VH) は、配列番号 485 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 486 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、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 485 及び配列番号 486 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 485 及び配列番号 486 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 485 及び配列番号 486 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 485 及び配列番号 486 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 485 及び配列番号 486 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。

【1826】

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 487、配列番号 488、及び配列番号 489 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 490、配列番号 491、及び配列番号 492 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。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。

【1827】

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ている場合がある。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。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。

10

20

30

40

50

【表 2 1】

表 2 1. デュルバルマブに関連する PD-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483 デュルバルマブ 重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYMNSWVRQA FKGLEWYAN IKQDSEKYY VDSVKGRTFI SRDIAKNSLY LQMSLRARD TAVVYCAREG GWFGLAFDY WQQTGLTVTS SASTKGPVSF PLAPSSKETS GGTAALGCLV KQYFPEVTY SNNSGALTSQ VHTFFAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ TYICNVNHPK SNTKVDKRVK FKSCDKTHC FFCPAPEFEG QSVFLPFKK PKDTIAISTT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYDQGVNAN AKTKPREEQT NSTYRVSVLT CLVHQDLWNG KEYCKVSNK ALPASIEKI SKAKGQPREP QVTLTPSRRE EMTKNQVSLT CLVKGFPYSD IAVENESNGQ PENNYKTTFF VLDSGDSFFL YSKLTVDKSR WQCNVVFCSL VMHEALAHNY TKSLSLSPG K	60 120 180 240 300 360 420 480 491
配列番号484 デュルバルマブ 軽鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYMNSWVRQA FKGLEWYAN EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVV SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFGSGSGST DFTLTISRLE PEDFAVYICQ QYGLSWTFGQ QGKVEIKRT VAAPSVFIFP PSEDLKSGT ASVVCLLNHF YFPAKVVQK VDNLQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLRADYKHK RYTACEYTHQ SLSPSTPSF NREG	60 120 180 240 265
配列番号485 デュルバルマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS RYMNSWVRQA FKGLEWYAN IKQDSEKYY VDSVKGRTFI SRDIAKNSLY LQMSLRARD TAVVYCAREG GWFGLAFDY WQQTGLTVTS S	60 120 121
配列番号486 デュルバルマブ 可変軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQRVV SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY DASSRATGIP DRFGSGSGST DFTLTISRLE PEDFAVYICQ QYGLSWTFGQ QGKVEIK	60 108
配列番号487 デュルバルマブ 重鎖CDR1	RYMNS	5
配列番号488 デュルバルマブ 重鎖CDR2	NIKQDSEKYY TVDSVKG	17
配列番号489 デュルバルマブ 重鎖CDR3	EGWFGELAF DY	12
配列番号490 デュルバルマブ 軽鎖CDR1	RASQVSSSY LA	12
配列番号491 デュルバルマブ 軽鎖CDR2	DASSRAT	7
配列番号492 デュルバルマブ 軽鎖CDR3	QYGLSWTF	9

【1 8 2 8】

いくつかの実施形態では、PD-L 1 阻害剤は、MSB0010718C (Merck KGaA / EMD Serono 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、もしくは多様体である。アベルマブの調製及び特性は、米国特許出願公開第US2014 / 0341917A1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22に示す。アベルマブは、22-96、147-203、264-324、370-428、22'-96'、147'-203'、264'-324'、及び370'-428'における重鎖内ジスルフィド結合(C23-C104)；22'-90'、138'-197'、22'-'-90'-'、及び138'-'-'-197'-'-'における軽鎖内ジスルフィド結合(C23-C104)；223-215'及び223'-'-215'-'-'における重鎖-軽鎖内ジスルフィド結合(h5-CL126)；229-229'-'及び232-232'-'における重鎖-重鎖内ジスルフィド結合(h11、h14)；300、300'-'におけるN-グリコシル化部位(H CH2 N84.4)；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 CHSK2 C末端リジンクリッピングを有する。

【1 8 2 9】

いくつかの実施形態では、PD-L 1 阻害剤は、配列番号493によって与えられる重鎖及び配列番号494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-L 1 阻害剤は、それぞれ、配列番号493及び配列番号494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)、多様体、もしくは複合体を含む。いくつかの実施形態では、PD-L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号493及び配列番号494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-L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号493及び配列番号494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-L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号493及び配列番号494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-L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号493及び配列番号494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-L 1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号493及び配列番号494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

20

30

40

50

【1830】

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495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496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、PD-L1阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号495及び配列番号496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496及び配列番号496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495及び配列番号496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495及び配列番号496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495及び配列番号496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。

10

【1831】

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497、配列番号498、及び配列番号499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500、配列番号501、及び配列番号502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。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。

20

【1832】

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ている場合がある。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。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。

30

40

【表 2 2】

表 2 2. 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493 アベルマブ 重鎖	EVQLLEGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVQA PGKLEWVSS IYFSGGIFTY ADTVKGRFTI SRDINSKNTLY LQMSLRAED TAVYICARIK LGTVTVTVDM GQGTLLTVSS ASTGSGFVEP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DFFPEFVTVS WNSGALTSGV HTFFAVLQSS GLYLSSGVVTF VPSGLGTQ YICWVHNFPS NTKVKVKEP KSCDKHTCP PCPAPELLGG FSTVLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVDVS HEDPEVKFNH YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVSVLT VLNQWLNKG EYKCKVSNKA LEAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVENESNGQP ENNYKTTFFV LQSDGSFFLY SKLTVEKSRW QCNVFCSCV MEHALNNIT QKLEISPKK	60 120 180 240 300 360 420 480
配列番号494 アベルマブ 軽鎖	QSAITQPAIV SSGSGGSIIT SCTGTSSDVG GYNYVMYQQ HPGKAPKIMI YDVSNRPSGV SNRFGSGKSG NTASLTISGL QAEDDAIYC SSYTSSSTRV FGTGKTVTL GQFKANPTVT LFFPSSEELQ ANKATLVCLL SDFYFGAVTV AKRADGSPVK AGVETTKPSK QSNKNTAASS YLSLFPQWK SHRYSCQQT HGSSTVEVTV APTES	60 120 180 216
配列番号495 アベルマブ 可変重鎖	EVQLLEGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYIMMWVQA PGKLEWVSS IYFSGGIFTY ADTVKGRFTI SRDINSKNTLY LQMSLRAED TAVYICARIK LGTVTVTVDM GQGTLLTVSS	60 120
配列番号496 アベルマブ 可変軽鎖	QSAITQPAIV SSGSGGSIIT SCTGTSSDVG GYNYVMYQQ HPGKAPKIMI YDVSNRPSGV SNRFGSGKSG NTASLTISGL QAEDDAIYC SSYTSSSTRV FGTGKTVTL	60 110
配列番号497 アベルマブ 重鎖CDR1	SYIMM	5
配列番号498 アベルマブ 重鎖CDR2	SIYFSGGIFT YADTVKG	17
配列番号499 アベルマブ 重鎖CDR3	IKLGTVTVDM Y	11
配列番号500 アベルマブ 軽鎖CDR1	TGTSSDVGGY NYVS	14
配列番号501 アベルマブ 軽鎖CDR2	DVSNRFS	7
配列番号502 アベルマブ 軽鎖CDR3	SSYTSSSTRV	10

【1833】

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TECENTRIQとして市販されている）、またはその抗原結合断片、複合体、もしくは多様体である。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23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（H-CH2N84.4>A）を有する。

【1834】

いくつかの実施形態では、PD-L1阻害剤は、配列番号503によって与えられる重鎖及び配列番号504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503及び配列番号504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）、多様体、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503及び配列番号504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503及び配列番号504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

10

20

30

40

50

れ、配列番号 503 及び配列番号 504 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 503 及び配列番号 504 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 503 及び配列番号 504 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。

【1835】

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 505 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 506 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、PD-L1 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 505 及び配列番号 506 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 505 及び配列番号 506 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 505 及び配列番号 506 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 505 及び配列番号 506 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 505 及び配列番号 506 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。

【1836】

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 507、配列番号 508、及び配列番号 509 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 510、配列番号 511、及び配列番号 512 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。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。

【1837】

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ている場合がある。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。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。

10

20

30

40

50

【表 2 3】

表 2 3. 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503 アテゾリズマブ 重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHVRQA FGRGLEWVAM ISFYGGSTYY ADSVKGRFTI SADTSKNATY LQMSLRAED TAVVYCARRH WFGGFDYWGQ GTLVTVSSAR TKGSPVEFLA PPSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTSNM SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVTP SSSLOTQTYI CNVNHKPSNT KVRKVEPES CDRHTCPFC PAFELLQGPS VLPFPKPKD TLMSSFTTEV TCVVTVSHE DREVENKIV DGVYDAMAT KPEEGVAST YRVSVLTVL HQDMLNGKEY KCKVSNKALP APIETISKA KGQFPFQVY TLPSPREEMT KNQVSLTCLV KGFYFSDIAV EWESNGQDEN NYKTFPVLD SDGSFFLYSK LTVEKSRWQ GRVFSQVNH EALNNITQK SLISLPOK 60 448
配列番号504 アテゾリズマブ 軽鎖	DIQMTQSPFS LSASVGRVT ITCRASQDVS TAVAMYQKRP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFGSGSGTD FTLTISLQF EDFATYYCQ YLVHPATFGQ GTKVEIKRTV AAFSVFIFFP SDQLKSGTA SVVCLLNIF FREAKVQKV DNALQSGNSQ ESVTEQDSK STYLSSTLT LSADYKHK VYACEVWGG LSPVTKFVW RQEC 120 180 214
配列番号505 アテゾリズマブ 可変重鎖	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS DSWIHVRQA FGRGLEWVAM ISFYGGSTYY ADSVKGRFTI SADTSKNATY LQMSLRAED TAVVYCARRH WFGGFDYWGQ GTLVTVSA 60 118
配列番号506 アテゾリズマブ 可変軽鎖	DIQMTQSPFS LSASVGRVT ITCRASQDVS TAVAMYQKRP GKAPKLLIYS ASFLYSGVPS RFGSGSGTD FTLTISLQF EDFATYYCQ YLVHPATFGQ GTKVEIKR 60 108
配列番号507 アテゾリズマブ 重鎖CDR1	GTFFSDSWIR 10
配列番号508 アテゾリズマブ 重鎖CDR2	AWISPYGGST YYADSVKG 18
配列番号509 アテゾリズマブ 重鎖CDR3	RHPGGFDY 9
配列番号510 アテゾリズマブ 軽鎖CDR1	RASQDVSTAV A 11
配列番号511 アテゾリズマブ 軽鎖CDR2	SASFLYS 7
配列番号512 アテゾリズマブ 軽鎖CDR3	QOYLHPAT 9

【1 8 3 8】

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。

【1 8 3 9】

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 - L 1 抗体が、当業者に知られている。

【1 8 4 0】

いくつかの実施形態では、P D - L 2 阻害剤は、B I O L E G E N D 2 4 F . 1 0 C 1 2 マウス I g G 2 a、κ アイソタイプ (カタログ番号 3 2 9 6 0 2 B i o l e g e n d , I n c . , S a n D i e g o , C A)、S I G M A 抗 P D - L 2 抗体 (カタログ番号 S A B 3 5 0 0 3 9 5 , S i g m a - A l d r i c h C o . , S t . L o u i s , M O)、または当業者に知られている他の市販の P D - L 2 抗体などの市販のモノクローナル抗体である。

【1 8 4 1】

4 . C T L A - 4 阻害剤

いくつかの実施形態では、がん患者に提供される T I L 療法は、T I L 単独の治療集団による治療を含んでもよく、または T I L 及び 1 つ以上の C T L A - 4 阻害剤を含む併用治療を含んでもよい。

【1 8 4 2】

細胞傷害性 T リンパ球抗原 4 (C T L A - 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。C T L A - 4 は、C D 2 8 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。

10

20

30

40

50

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)。様々な前臨床研究は、モノクローナル抗体などのCTLA-4阻害剤によるCTLA-4遮断が、免疫原性腫瘍に対する宿主免疫応答を増強し、確立された腫瘍を排除することさえ可能であることを示している。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。

10

【1843】

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での言及は、化合物またはその抗原結合断片、多様体、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。

20

【1844】

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WO00/37504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。本発明の方法で利用できる他の抗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号に開示されているものが含まれ、各々の開示が参照により本明細書に組み込まれる。

30

40

【1845】

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

50

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、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。

10

【1846】

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結合のイピリマブ媒介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。

20

30

【1847】

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。

40

【1848】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、イピリマブ（Bristol-Myers Squibb Co. からYervoyとして市販されている）、またはその

50

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WO01/14424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516を含む軽鎖可変領域を有し、配列番号515を含む重鎖可変領域を有する）を含む。CTLA-4と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部位を表す。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、ビヒクル及び／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、PCT公開第WO2007/67959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。

10

【1849】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号513によって与えられる重鎖及び配列番号514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513及び配列番号514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）、多様体、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513及び配列番号514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513及び配列番号514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513及び配列番号514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513及び配列番号514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513及び配列番号514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

【1850】

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CDR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515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516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、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号515及び配列番号516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、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号515及び配列番号516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、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号515及び配列番号516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、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号515及び配列番号516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、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号515及び配列番号516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。

30

40

【1851】

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517、配列番号518、及び配列番号519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520、配列番号521、及び配列番号522に示される配列を有する軽鎖CDR1、CDR2、

50

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。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。

【 1 8 5 2 】

いくつかの実施形態では、C T L 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 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、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、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。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、イピリムマブである。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ている場合がある。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。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。

【表 2 4】

表 2 4. 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513 イピリムマブ 重鎖	1 QVQLVESGGG VVQPGSRSLRL SCAASGFTFS SYTHRWVRQA FGKGLEWVTF ISYDGNKKY 61 ADSVKGFTI SRNSKNTLY LQNSLRAD TAIYCARTG WLGPFDTYWGQ GTLVTSSAS 121 TRGFSVFLA FSKSTSGT AALGCLVVDY FPEFTVSNW SGALTSQVHT FPAVLQSSGL 181 YLSLVVTVF SSSLGSTVYI CHVNHKEST KYDKVEVKS CKTH
配列番号514 イピリムマブ 軽鎖	1 EIVLTQSPGT LSLPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 61 DRFGSGSGT DFTLTISRL FEDFAVYVYQ QYGSFPWTFG QSTKVEIKRT VAAPSVFIFF 121 FSEGLKSGT ASVCLLNF FPEAKVQW VDNALQSNW QESVTEQDSK DSTYLSSTL 181 TLSKADYKH KYACEVTHQ GLSPVTKSF NRGE
配列番号515 イピリムマブ 可変重鎖	1 QVQLVESGGG VVQPGSRSLRL SCAASGFTFS SYTHRWVRQA FGKGLEWVTF ISYDGNKKY 61 ADSVKGFTI SRNSKNTLY LQNSLRAD TAIYCARTG WLGPFDTYWGQ GTLVTSS
配列番号516 イピリムマブ 可変軽鎖	1 EIVLTQSPGT LSLPGERAT LSCRASQSVG SSYLAWYQK PGQAPRLLIY GAFSRATGIP 61 DRFGSGSGT DFTLTISRL FEDFAVYVYQ QYGSFPWTFG QSTKVEIK
配列番号517 イピリムマブ 重鎖CDR1	GTFSST 8
配列番号518 イピリムマブ 重鎖CDR2	TFISYDGNKK 10
配列番号519 イピリムマブ 重鎖CDR3	ARTGWLGPFD Y 11
配列番号520 イピリムマブ 軽鎖CDR1	QSVGSY 7
配列番号521 イピリムマブ 軽鎖CDR2	GAF 3
配列番号522 イピリムマブ 軽鎖CDR3	QYGSFPWT 9

【 1 8 5 3 】

いくつかの実施形態では、C T L A - 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 m g / k g ~ 約 1 0 m g / k g の用量で投与される。いくつかの実施形態では、C T L A - 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 m g / k g、約 1 m g / k g、約 1 . 5 m g / k g、約 2 m g / k g、約 2 . 5 m g / k g、約 3 m g / k g、約 3 . 5 m g / k g、約 4 m g / k g、約 4 . 5 m g / k g、約 5 m g / k g、約 5 . 5 m g / k g、約 6 m g / k g、約 6 . 5 m g / k g、約 7 m g / k g、約 7 . 5 m g / k g、約 8 m g / k g、約 8 . 5 m g / k g、約 9 m g / k g、約 9 . 5 m g / k g、または約 1 0 m g / k g 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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。

【1854】

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、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、イピリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。

10

【1855】

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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。

20

【1856】

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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。

【1857】

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、3週間毎に約10mg/kgで4用量投与され、その後12週間毎に10mg/kgで最大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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。

30

【1858】

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において、イピリムマブは、進行性腎細胞癌を治療するために、同日に3mg/kgのニボルマブの直後に約1mg/kgで、3週間毎に4用量で投与される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。

40

【1859】

いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高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

50

る。いくつかの実施形態では、イピリムマブは、高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、同日に $3 \text{ mg} / \text{kg}$ のニボルマブを30分にわたって静脈内に投与した直後に、3週間毎に4用量で、約 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ で30分にわたって静脈内投与される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。

10

【1860】

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、同日に $1 \text{ mg} / \text{kg}$ のニボルマブを30分にわたって静脈内に投与した直後に、3週間毎に4用量で、約 $3 \text{ mg} / \text{kg}$ で30分にわたって静脈内投与される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。

20

【1861】

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 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ で、2週間毎に $3 \text{ mg} / \text{kg}$ のニボルマブと共に投与される。いくつかの実施形態において、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 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ 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ルット化学療法と共に投与される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。

30

【1862】

いくつかの実施形態において、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 $1 \text{ mg} / \text{kg}$ で、3週間毎に 360 mg のニボルマブと共に投与される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。

【1863】

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は、それぞれ配列番号xx及びxxに記載されている。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 $15 \text{ mg} / \text{kg}$ 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 $5 \sim 200 \text{ mg} / \text{用量}$ の範囲である。いくつかの

40

50

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10～150mg／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200mg／用量である。

【1864】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号523によって与えられる重鎖及び配列番号524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523及び配列番号524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)、多様体、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523及び配列番号524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523及び配列番号524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523及び配列番号524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523及び配列番号524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523及び配列番号524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。

【1865】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、トレメリムマブの重鎖及び軽鎖のCDR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525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526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、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号525及び配列番号526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、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号525及び配列番号526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、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号525及び配列番号526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、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号525及び配列番号526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、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号525及び配列番号526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。

【1866】

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527、配列番号528、及び配列番号529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530、配列番号531、及び配列番号532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。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CTLA-4上の同じエピトープに結合する。

【1867】

いくつかの実施形態では、CTLA-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CTLA-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、CTLA-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。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CTLA-4抗体であり、抗CTLA-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CTLA-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ている場合がある。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。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。

10

20

30

40

50

【表25】

表25、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523 トレメリムマブ 重鎖	1 QVQLVESGGG VVQPGKSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVQA FGKGLEWAV INYDGSNKYY 61 ADSVKGFTI SRNSKNTLY LQNSLRAED TAVTICARDF RGATLYITYY GMDVWGQGT 121 VTYSASTGTS PSVPLAPCS ASTSESTAAL GCIVVDVFF FVTYSHRGA LTGQUTFFA 181 VLQSSGLYSI SSVTVPSN FGQTYTQNV DHKFSNTKVD KTVRGKCCVE CPCKPAPFVA 241 GSVFLEPPK PKDILMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVQFM WYVDGVEVHN AKTKPREEQF 301 NSTFRVVSVL TVHQDMLNG KEVKCKVSHK GLPAPIETI SKTKGQPREP QVYTLFPSRE 361 EPTENQVSLF CLVHGPFPSD IAVRWGNSQ FENNVTCTFP MLDGSGFFL YSKLTVDKSR 421 WQGNVFSCS VMHEALHHY TQKSLSLSPG K
配列番号524 トレメリムマブ 軽鎖	1 DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQIN SYLWYQQKFP GKAFKLLIYA ASSLQSGVFS 61 RFSGSGSDTD FTLTISLQP EDFATYICQ YSTFTTFFG GTRVEIKRTV AAPSVFIFPP 121 SIKOLSKGTA SYVCLLANNY FREAKYQWV DIALGSGNSQ ESTVQSSKK STYLSSTLT 181 LSKADYERHK VYACEVTHQG LSPVTKSFN RGEK
配列番号525 トレメリムマブ 可変重鎖	1 GVVPQSRSLR LSCASGFTF SYGMHWVQA APGKLEWVA VINYDGSNKY YADVKGFTI 61 ISRNSKNTLY LQNSLRAED TAVTICARDF RGATLYITYY YGHWGQGT TVYSSASTK 121 GSVFLEPPK SRSTSESTA LGCLVKDYFF EPTVSHRGA ALTSQVH
配列番号526 トレメリムマブ 可変軽鎖	1 FESLSASVGD RVITCRASQ SINSYLDWYQ KFGKAPKLL IYAASSLQSG VFSRFSGSGS 61 GTFSTLISL LQPDATYI CQYISTFTF FGPGRVEIK RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS 121 GTASVCLLN NFYPKRV
配列番号527 トレメリムマブ 重鎖CDR1	GFTFSYGMH 10
配列番号528 トレメリムマブ 重鎖CDR2	VINYDGSNKY YADV 15
配列番号529 トレメリムマブ 重鎖CDR3	DFRGATLYITY YGMDV 16
配列番号530 トレメリムマブ 軽鎖CDR1	RASQSINSYL D 11
配列番号531 トレメリムマブ 軽鎖CDR2	AASSLQS 7
配列番号532 トレメリムマブ 軽鎖CDR3	CQYISTFTF 9

【1868】

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0.5mg/kg～約10mg/kgの用量で投与される。いくつかの実施形態では、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0.5mg/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、トレメリムマブ投与は、切除前1、2、3、4、または5週間（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。

【1869】

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260m

g、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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。

【1870】

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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。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（すなわち、対象または患者から腫瘍試料を取得する前に）で開始される。

10

【1871】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、Adgenus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、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。

20

【1872】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、配列番号533によって与えられる重鎖及び配列番号534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533及び配列番号534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)、多様体、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533及び配列番号534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533及び配列番号534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533及び配列番号534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533及び配列番号534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533及び配列番号534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

【1873】

いくつかの実施形態では、CTLA-4阻害剤は、ザリフレリマブの重鎖及び軽鎖のCDR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535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536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、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号535及び配列番号536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、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号535及び配列番号536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、CTLA-4阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号535及び配列番号536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

40

50

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 5 3 5 及び配列番号 5 3 6 に示される配列と少なくとも 9 6 % 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、C T L A－4 阻害剤は、各々が、それぞれ、配列番号 5 3 5 及び配列番号 5 3 6 に示される配列と少なくとも 9 5 % 同一である V_H 及び V_L 領域を含む。

【1 8 7 4】

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 5 3 6、配列番号 5 3 8、及び配列番号 5 3 9 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 5 4 0、配列番号 5 4 1、及び配列番号 5 4 2 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。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。

【1 8 7 5】

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、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。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ている場合がある。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。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。

【表 2 6】

表 2 6. ザ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 533 ザリフレリマブ 重鎖	1 EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYNNRWVQA FKGLEWVSS ISSSSSYIYY 61 ADSVKGRTTI SRDANKSLY LQNSLRARD TAVYICARVG LMGFDINGQ GTMTVSSAS 121 TKGFSVFPLA PRKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPTVSNW SGALTSGVHT FPAVLGGSL 181 YSLSSVTVTP SSLGTQTVII CNVNHKPSNT KVDKRVKPS CDRTHCTPFC PAPELLGGPS 241 VFLFPPFEPD TILMSTRFEV TCVVDVSHNE DPEVKFNWTV DQVEHNAKT FPREQYNST 301 YKVQVILTVL HGMWLMQREY KCVSNKALP APEKTIKA KQFSEPVYI TLPSPREEDT 361 KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNQQPN NYKTTFPVLD SDGSFFLYSK LTVKSRWQ 421 GNVFSCSNH EALNNHYTK SLSLSPK
配列番号 534 ザリフレリマブ 軽鎖	1 EIVLTQSPGT LSLPGERAT LCRASQSVS RYLGWQQKF QAPRLLIYQ ASTRATGIPD 61 RFSSGSGSDT FTLTITRLEP EDAVYICQY YGSSPWTFGQ GTKVEIKSTV AAPSVPFIFP 121 SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV DNALQSGNSQ ESVTQDSKD STYLSLSTLT 181 LSKADYEKKH VNACEVTHQG LSPVTESFN RGEK
配列番号 535 ザリフレリマブ 可変重鎖	1 EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYNNRWVQA FKGLEWVSS ISSSSSYIYY 61 ADSVKGRTTI SRDANKSLY LQNSLRARD TAVYICARVG LMGFDINGQ GTMTVSSAS
配列番号 536 ザリフレリマブ 可変軽鎖	1 EIVLTQSPGT LSLPGERAT LCRASQSVS RYLGWQQKF QAPRLLIYQ ASTRATGIPD 61 RFSSGSGSDT FTLTITRLEP EDAVYICQY YGSSPWTFGQ GTKVEIK
配列番号 537 ザリフレリマブ 重鎖 CDR1	GPTFSSYS 8
配列番号 538 ザリフレリマブ 重鎖 CDR2	ISSSSSYI 8
配列番号 539 ザリフレリマブ 重鎖 CDR3	ARVGLMGFPD I 11
配列番号 540 ザリフレリマブ 軽鎖 CDR1	QSVRY 6
配列番号 541 ザリフレリマブ 軽鎖 CDR2	GAS 3
配列番号 542 ザリフレリマブ 軽鎖 CDR3	QOYGSFPWT 9

10

20

30

40

50

【1876】

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。

【1877】

いくつかの実施形態では、抗CTLA-4抗体は、以下の特許公開（参照により本明細書に組み込まれる）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、EP1212422 B1、WO2018/204760、WO2018/204760、WO20010/14424、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。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、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, 95(17):10067-10071(1998)、Camacho et al., J. Clin. Oncol., 22(145):Abstract No. 2505(2004)（抗体CP-675206）、Mokyr et al., Cancer Res., 58:5301-5304(1998)（参照により本明細書に組み込まれる）に開示されているものである。

【1878】

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。

【1879】

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-4 RNAi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Mello及びFireによっ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-4 RNAi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Tuschlによっ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-4 RNAi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Tuschlによっ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、PCT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。

【1880】

他の実施形態では、本発明の抗CTLA-4 RNAi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Crookeによって記載されたRNA分子である。

【1881】

5. 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。

【1882】

実験結果は、腫瘍特異的Tリンパ球の養子移入前のリンパ球枯渇が、調節性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している。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。

【1883】

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。

【1884】

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、フルダラビン治療は、25mg/kg/日で4～5日間投与される。

【1885】

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、0.5µg/mL～10µg/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、1µg/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、 $100\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $150\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $175\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $200\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $225\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $250\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、 $275\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 、または $300\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 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、 $35\text{ mg}/\text{kg}/\text{日}$ 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、 $250\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 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、 $250\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ で4日間 i.v. 投与される。

【1886】

10

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、 $25\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ で i.v. 投与され、シクロホスファミドは、 $250\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ で4日間にわたって i.v. 投与される。

【1887】

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日間投与することによって行われる。

【1888】

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2日間投与し、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。

20

【1889】

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 $50\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 $25\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 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。

【1890】

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 $50\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 $20\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 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

【1891】

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 $40\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 $20\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 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。

【1892】

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 $40\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ の用量で2日間投与し、フルダラビンを約 $15\text{ mg}/\text{m}^2/\text{日}$ 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

【1893】

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。

【1894】

いくつかの実施形態では、シクロホスファミドは、メスナと共に投与される。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

50

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。

【1895】

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。

【1896】

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。

【1897】

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、メスナと共に投与される。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。

【1898】

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。

【1899】

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。

【1900】

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。

【1901】

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。

【1902】

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 1 日間投与するステップを含む。

【1903】

いくつかの実施形態では、非骨髄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。

10

20

30

40

50

【表 2 7】

表 2 7. 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	X	X					
TIL注入						X				

【1904】

いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 2 8 に従って投与される。

【表 2 8】

表 2 8. 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 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	X					
TIL注入					X				

【1905】

いくつかの実施形態では、非骨髄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。

【表 2 9】

表 2 9. 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				

【1906】

いくつかの実施形態では、非骨髄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。

【表 3 0】

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 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				

【1907】

いくつかの実施形態では、非骨髄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。

【表 3 1】

表 3 1. 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				

【1908】

いくつかの実施形態では、非骨髄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。

10

20

30

40

50

【表 3 2】

表 3 2. 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				

【1909】

いくつかの実施形態では、非骨髄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。

【表 3 3】

表 3 3. 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				

【1910】

いくつかの実施形態では、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンは、表 3 4 に従って投与される。

【表 3 4】

表 3 4. 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				

【1911】

6. 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、治療用 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、0.037mg/kg または 0.044mg/kg IU/kg (患者の体重) の用量で 15 分のボー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。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 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 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 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 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。

【1912】

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 18×10^6 IU/m²、続いて12時間にわたって静脈内投与される 18×10^6 IU/m²、続いて24時間にわたって静脈内投与される 18×10^6 IU/m²、続いて72時間かけて静脈内投与される 4.5×10^6 IU/m²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 IU/m²、2日目の9,000,000 IU/m²、3日目及び4日目の4,500,000 IU/m²を含む。

10

【1913】

一実施形態では、IL-2レジメンは、低用量IL-2レジメンを含む。Dominguez-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に記載されている低用量IL-2レジメンを含む、当技術分野で即知の任意の低用量IL-2レジメンを使用することができ、これらの開示は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態では、低用量IL-2レジメンは、m²当たり 18×10^6 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、その後任意に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m²当たり 18×10^6 IUの連続的注入として、その後任意に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。

20

【1914】

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。

30

40

【1915】

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pegylated 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。

【1916】

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。

50

【1917】

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、ネムバルキンアルファ、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を投与することを含む。

【1918】

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559及び配列番号568からなる群から選択される重鎖と、配列番号567及び配列番号569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。

【1919】

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。

【1920】

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。

【1921】

6. 追加の治療方法

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用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。

【1922】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の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。

【1923】

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用TIL集団及び上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載のTIL組成物を投与する前に、非骨髄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、上記の該当する前段落のうちのいずれか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、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンが、60mg/m²/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、25mg/m²/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、上記の該当する前段

落のうちのいずれか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、対象にTIL細胞を投与した翌日に開始する高用量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、上記の該当する前段落のうちのいずれか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、高用量IL-2レジメンが、許容範囲まで8時間ごとに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、上記の該当する前段落のうちのいずれか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、がんが固形腫瘍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、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）、膠芽腫（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、上記の該当する前段落のうちのいずれか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。

【1929】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれか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

【1930】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれか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。他の実施形態では、本発明は、がんが難治性または切除不能な黒色腫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HNSCC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、がんが子宮頸癌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NSCLC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がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

40

【1934】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれか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、がんが胃腸癌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がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1936】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれか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

50

る。

【1937】

他の実施形態では、本発明は、がんが小児高頻度変異癌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がんを有する対象を治療するための方法を提供する。

【1938】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療用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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団を提供する。

【1939】

他の実施形態では、本発明は、TIL組成物の治療上有効な投与量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に使用するための、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載のTIL組成物を提供する。

【1940】

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治療用TIL集団または上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載のTIL組成物の治療上有効な投与量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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団または上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載のTIL組成物を提供する。

【1941】

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、 $60\text{ mg}/\text{m}^2$ ／日の用量でシクロホスファミドを2日間投与するステップ、続いて $25\text{ mg}/\text{m}^2$ ／日の用量でフルダラビンを5日間投与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治療用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、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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団またはTIL組成物を提供する。

【1943】

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 $720,000\text{ IU}/\text{kg}$ 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治療用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、固形腫瘍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用TIL集団またはTIL組成物を提供する。

【1945】

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）、膠芽腫（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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用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、黒色腫、HNSCC、子宮頸癌、NSCLC、膠芽腫（GBMを含む）、及び胃腸癌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用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、黒色腫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用TIL集団またはTIL組成物を提供する。

【1948】

10

20

30

40

50

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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用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、子宮頸癌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用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、NSCLC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用TIL集団またはTIL組成物を提供する。

【1951】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用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、胃腸癌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用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、がんが、高頻度変異癌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用TIL集団またはTIL組成物を提供する。

【1954】

他の実施形態では、本発明は、がんが、小児高頻度変異癌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用TIL集団またはTIL組成物を提供する。

【1955】

他の実施形態では、本発明は、治療上有効な投与量の治療用TIL集団を対象に投与することを含む、対象のがんを治療する方法におけ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用TIL集団の使用を提供する。

【1956】

他の実施形態では、本発明は、TIL組成物の治療上有効な投与量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、上記の該当す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。

【1957】

他の実施形態では、本発明は、非骨髄破壊的リンパ球枯渇レジメンを対象に投与すること、次いで治療上有効な投与量の、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団または治療上有効な投与量の、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載のTIL組成物を対象に投与することと、を含む、対象におけるがんを治療する方法における、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団または上記の該当す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。

【1958】

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 ／日の用量でシクロホスファミドを2日間投与するステップ、続いて 25 mg/m^2 ／日の用量でフルダラビンを5日間投与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治療用TIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

【1959】

他の実施形態では、本発明は、患者へのTIL細胞の投与の翌日に開始する高用量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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

10

20

30

40

50

。

【1960】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

【1961】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

10

【1962】

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）、膠芽腫（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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

【1963】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

20

。

【1964】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

【1965】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

【1966】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

30

【1967】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

【1968】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

40

【1969】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

【1970】

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、上記の該当する前段落のうちのいずれかに記載の治療用TIL集団またはTIL組成物の使用を提供する。

【1971】

50

他の実施形態では、本発明は、がんが、小児高頻度変異癌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用 T I L 集団または T I L 組成物の使用を提供する。

【実施例】

【1972】

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、本明細書に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。

【1973】

実施例 1：R E P 前プロセス及び R E P プロセス用の培地の調製

この実施例は、転移性黒色腫、頭頸部扁平上皮癌（H N S C C）、卵巣癌、トリプルネガティブ乳癌、及び肺腺癌を含むが、これらに限定されない、様々な腫瘍タイプに由来する腫瘍浸潤リンパ球（T I L）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、本出願及び実施例に記載の T I L のうちのいずれかの調製に使用することができる。

【1974】

C M 1 の調製

以下の試薬を冷蔵から取り出し、37℃の水浴中で温めた。（R P M I 1 6 4 0、ヒト A B 血清、200 m M L - グルタミン）。濾過される体積に適した 0.2 μ m フィルターユニットの上部に成分の各々を追加することによって、以下の表 3 5 に従って C M 1 培地を調製した。4℃で保管した。

【表 3 5】

表 3 5：C M 1 の調製

成分	最終濃度	最終体積 500 m l	最終体積 1 L
R P M I 1 6 4 0	該当なし	450 m l	900 m l
ヒト A B 血清、熱不活性化 10%	50 m l	100 m l	
200 m M L - グルタミン	2 m M	5 m l	10 m l
55 m M B M E	55 μ M	0.5 m l	1 m l
50 m g / m l 硫酸ゲンタマイシン	50 μ g / m l	0.5 m l	1 m l

【1975】

使用日に、37℃の水浴中で必要量の C M 1 を事前に温め、6000 I U / m l の I L - 2 を追加した。

【1976】

表 3 6 に従って必要に応じた追加の補充。

【表 3 6】

表 3 6：必要に応じた C M 1 の追加の補充。

サブプリメント	ストック濃度	希釈	最終濃度
G l u t a M A X（商標）	200 m M	1：100	2 m M
ペニシリン／ストレプトマイシン	10,000 U / m l ペニシリン 10,000 μ g / m l ストレプトマイシン	1：100	100 U / m l ペニシリン 100 μ g / m l ストレプトマイシン
アンホテリシン B	250 μ g / m l	1：100	2.5 μ g / m l

【1977】

C M 2 の調製

調製した C M 1 を冷蔵庫から取り出すか、または上の表 3 5 に従って新鮮な C M 1 を調製した。A I M - V（登録商標）を冷蔵庫から取り出し、調製した C M 1 を滅菌培地ボトル内で同等体積の A I M - V（登録商標）と混合することによって、必要な量の C M 2 を調製した。使用日に 3000 I U / m l の I L - 2 を C M 2 培地に追加した。使用日に 3

10

20

30

40

50

000IU/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／調製した日、2週間の有効期限でラベル付けし、組織培養に必要なまで4℃で保管した。

【1978】

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」とラベル付けした。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。

10

【1979】

CM4の調製

CM4は、CM3と同じであり、2mM GlutaMAX（商標）（最終濃度）を追加を補充した。1LのCM3毎に、10mlの200mM GlutaMAX（商標）を追加した。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。

20

【1980】

実施例2：IL-2ストック溶液（CELLGENIX）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、rhIL-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。

【1981】

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。50mLのコニカルチューブに1mLの1N酢酸を追加した。チューブを2～3回反転させながら十分に混合した。Steri-Flipフィルターを使用した濾過によってHAc溶液を滅菌した。

30

【1982】

PBS中1%HSAを調製した。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。

【1983】

rhIL-2ストック溶液を調製した（最終濃度 6×10^6 IU/ml）。rhIL-2の各ロットは異なり、1）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）推奨される0.2%HAc再構成体積（mL）などの製造業者の分析証明書（COA）に見られる情報を必要とした。

40

【1984】

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。

【数1】

$$\left(\frac{\text{バイアル質量 (mg)} \times \text{生物活性} \left(\frac{\text{IU}}{\text{mg}} \right)}{6 \times 10^6 \frac{\text{IU}}{\text{mL}}} \right) - \text{HAc 体積 (mL)} = 1\% \text{HSA 体積 (mL)}$$

50

【1985】

例えば、CellGenixのrhIL-2ロット10200121 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。

【数2】

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

【1986】

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旋回させた。栓を慎重に取り外し、アルコールワイプ上に置いた。計算した体積の1% HSAをバイアルに追加した。

【1987】

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、使用の準備が整うまで-20℃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ヶ月の有効期限を記録した。Rh-IL-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。

【1988】

実施例3：凍結保存プロセス

この実施例では、CryoMed冷却速度制御フリーザー、モデル7454（Thermo Scientific）を使用して、実施例9に記載の簡略化された閉鎖手順で調製したTILの凍結保存プロセス方法について説明する。

【1989】

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）。

【1990】

凍結プロセスは、核形成から-20℃まで0.5℃の速度、及び-80℃の終了温度まで毎分1℃の冷却速度を提供した。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℃で待つ、ステップ2：-4℃まで1.0℃/分（試料温度）、ステップ3：-45℃まで20.0℃/分（チャンバー温度）、ステップ4：-10.0℃まで10.0℃/分（チャンバー温度）、ステップ5：-20℃まで0.5℃/分（チャンバー温度）、及びステップ6：-80℃まで1.0℃/分（試料温度）。

【1991】

実施例4：合成培地を用いた腫瘍増殖プロセス。

実施例1～7に開示されるプロセスは、CM1培地及びCM2培地を、本発明による合成培地（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る。

【1992】

実施例5：臨床製造のためのフルスケールでのフローサイトメトリー選別及び増殖によるニボルマブを使用したPD-1+TILの選択

目的

この報告書では、本発明の実施例に記載されるフルスケールの製造実験における選択の

10

20

30

40

50

ためにニボルマブを使用してPD-1で選択したTILの増殖からの結果について説明する。

【1993】

範囲

作業範囲は、黒色腫、または肺、頭頸部、もしくは卵巣腫瘍からのPD-1で選択されたTILを増殖することであった。

【1994】

0日目に、腫瘍消化物を2つのアームに均等に分布し、実験の各アームの腫瘍消化物を、ニボルマブまたは抗PD1クローン番号EH12.2H7（研究グレード）を一次抗体及びFITC複合抗IgG4二次抗体として使用して染色した。次いで、染色された集団からTILを発現するPD-1を、流動選別によって選択した。2ステップの増殖プロセスを使用して、PD-1で選択されたTILをフルスケールの臨床製造のために増殖させた。第1の増殖（「活性化」）のステップは、0日目から11日目まで実施された。第2の増殖プロセスのステップ（「急速な増殖相」、または「REP」、16日目の分割を含む）は、11日目から22日目まで実施された。最終製品は、22日目に採取された。

【1995】

小規模プロセス（1/100スケール）のために、活性化は、最も低い選別結果を用いてPD-1で選択されたTILの10%を使用し、IL-2培地を含むフィーダー及びOKT-3を含有するそれぞれのG-Rep-10Mフラスコに各選別からのTILの数を移して、0日目に開始した。REP、分割、及び採取は、TP-19-004に従って開始された。関連する時点の簡単な説明は、以下の方法のセクションで概説されている。

【1996】

フルスケールプロセスの場合、活性化は、同様の細胞数のPD-1で選択されたTILを使用し、100e6同種異系フィーダー細胞及び30ng/mLのOKT3を11日間使用して0日目に開始した。REPは、採取された産物から11日目に開始された。REP（11日目）ならびにそれに続く16日目（分割）及び22日目（採取）のプロセスは、IOVA製造バッチ記録毎に実行された。関連する時点の簡単な説明は、以下の実験設計で概説されている（表37）。

【1997】

増殖された最終製品TILは、細胞増殖、生存率、表現型、及び機能（刺激時の、IFN-γ及びグランザイムB分泌、CD107a動員）について評価された。

【1998】

EH12.2H7及びニボルマブの同等性を確立するために、拡張された特徴付けデータに対してさらなる分析が実施された。

【1999】

背景情報

PE複合抗PD-1抗体（クローン番号EH12.2H7）を使用して腫瘍消化物からPD-1を発現するTILを選択し、自己腫瘍反応性T細胞のTIL産物を濃縮するように設計された、以前に開発されたプロトコルが、実施例21に提供される。

【2000】

現在の研究では、実施例9及び実施例21は、PE複合クローン番号EH12.2H7の代わりに抗PD1抗体としてニボルマブを使用し、二次染色抗体としてFITCでコンジュゲートされた抗IgG4抗体を使用して、PD1で選択されたTILを取得するために適合された。

【2001】

実験設計

TP-19-004に従って、2回の小規模実験及びバルク制御条件が実施された。

【2002】

1回のフルスケール実験を実施例6に従って行った。

【2003】

10

20

30

40

50

小規模及びフルスケールの概要を、表 3 7 及び 3 8 に提供した。

【表 3 7】

表 3 7. 小規模な PD-1 で選択された TIL プロセスの概要 (1/100 スケール)

条件	1/100 スケール
活性化 (1/10 スケール) TIL フィーダー CM1 IL-2 OKT3 (30 ng/mL) G-Rex	0 日目: 活性化 PD-1 で選択された TIL の 10 % 10 ^{e6} 100 mL 6000 IU/mL 30 ng/mL 10M
REP (1/100 スケール) TIL フィーダー CM2 IL-2 OKT3 (30 ng/mL) G-Rex	11 日目: REP 10% TVC 50 ^{e6} 50 mL 3000 IU/mL 30 ng/mL 5M
分割 (1/100 スケール)	16 日目: 最大 5 つの 5M フラスコを減容して 分割する (TVC/10 ^{e6} 、切り上げ)
REP 採取 (1/100 スケール)	22 日目: REP 採取
外挿計算: 活性化 REP、分割、採取	活性化採取 TVC に 10 を乗算する REP 採取に 100 倍の分割した フラスコ数を 乗算する

10

【表 3 8】

表 3 8. フルスケールの PD-1 で選択された TIL プロセスの概要 (図 1 6 も参照)

条件	フルスケール
活性化 TIL フィーダー CM1 IL-2 OKT3 (30 ng/mL) G-Rex	0 日目: 活性化 PD-1 で選択された TIL 100 ^{e6} 1000 mL 6000 IU/mL 30 ng/mL 100 MCS
REP TIL フィーダー CM2 IL-2 OKT3 (30 ng/mL) G-Rex	11 日目: REP 5 ^{e6} ~200 ^{e6} TVC 5 ^{e9} 5 L 3000 IU/mL 30 ng/mL 500 MCS
分割	16 日目: 分割 CM4+3000 IU/mL の IL-2 で最 大 5 つの G-Rex 500 MCS を減容し て分割する
REP 採取	22 日目: 採取 REP 採取

20

30

【2004】

結果

以下の表 3 9 は、小規模（外挿した TVC）及びフルスケール実験の性能を評価するた
めに使用された合格基準を示す。

【表 3 9】

表 3 9. インプロセス及び採取産物放出試験ならびに合格基準

試験タイプ	方法	合格判定基準
インプロセス試験		
選別後の純度 (PD1+ (%))	フローサイトメトリー	≥ 80 %
放出試験		
外観	目視検査*	バッグは無傷で、塊の兆候 なし
細胞生存率	蛍光	≥ 70 %
総生細胞数	蛍光	1×10 ⁹ ~150×10 ⁹
純度 (CD45+CD3+ (%))	フローサイトメトリー	≥ 90 % の CD45+CD 3+細胞
IFNγ (刺激-非刺激)	ビーズ刺激及び ELISA	≥ 500 pg/mL

*フルスケール実験にのみ適用される。

40

50

【 2 0 0 5 】

結果

以下の表 4 0 は、この研究で使用した腫瘍及び関連する組織学の一覧であった。

【表 4 0】

表 4 0 : この研究で使用した腫瘍

実験	組織学	I D
PD-1 で選択された T I L のプロセス (意図された臨床製造プロセス)		
小規模 1	卵巣	O V 8 0 7 4
小規模 2	黒色腫	M 1 1 5 6
フルスケール 1	頭頸部	H 3 0 4 6

【 2 0 0 6 】

流動選別の出力。

【表 4 1】

表 4 1 : フローサイトメトリーによる PD-1 で選択された T I L の選別前及び選別後の純度。

パラメータ	合格判定基準	OV8074 (ニボルマブ)	OV8074 (EH12.2.H7)	M1156 (ニボルマブ)	M1156 (EH12.2.H7)	H3046 (ニボルマブ)	H3046 (EH12.2.H7)
(FSC/BSC、一重項の)選別前の CD3+(%)	該当なし	66	62	5	5	49	44
(CD3+の)選別前の PD-1+(%)	該当なし	80	70	90	93	14	13
選別前の TVC	該当なし	6.3e6	2.6e6	1.3e7	1.3e7	1.6e7	1.6e7
選別された TVC (収率(%))	該当なし	3.5e5 (6%)	4.1e5 (16%)	1.1e5 (13%)	1.1e5 (13%)	1e5 (9%)	2.4e5 (23%)
選別後の PD-1 濃縮(倍)	該当なし	1.24	1.4	1.07	1.08	6.8	7.4
*(CD3+(%) の)選別後の PD-1 純度(%)	≥ 80%	99%	98%	96%	100%	95%	96%

*純度は、(FSC/BSC/CD3 でゲートされた) PD-1 + (%) に基づいていた

【 2 0 0 7 】

3 つの腫瘍すべての選別後の純度 (PD-1 + (%)) は、8 0 % 超の基準を満たしていた。

【 2 0 0 8 】

活性化及び R E P 採取の出力

以下の表 4 2 は、2 回の小規模なフルスケール実験及び 1 回のフルスケール実験からの総生細胞数及び製品属性、ならびにそれらのバルク対照物 (括弧内に記載される) を要約する。

10

20

30

40

50

【表 4 2 - 1】

表 4 2 : 活性化及び R E P からの製品属性の要約

段階	腫瘍 ID/条件	合格判定基準	OV8074		M1156		H3046	
			ニボルマブ染色	EH12.2H7 染色	ニボルマブ染色	EH12.2H7 染色	ニボルマブ染色	EH12.2H7 染色
活性化	播種された TVC (バルク)	該当なし	3.48e5 (3.48e5)	3.48e5	1.05e5 (1.05e5)	1.05e5	1.02e5 (1.02e5)	1.02e5
	採取された TVC (バルク)	該当なし	1.03e9 (1.14e9)	1.71e9	2.08e8 (2.19e8)	1.50e8	1.3e8 (1.37e9)	1.52e8
	倍率増殖 ³ (バルク)	該当なし	2960 (3262)	4905	1975 (2079)	1427	1291 (1334)	1486
	倍加数 0 日目～11 日目から ⁴	該当なし	12	12	11	10	10	11
R E P	播種された TVC (バルク)	5～200e6 ²	2.00e8 (2.00e8)	2.00e8	2.00e8 (2.00e8)	1.50e8	1.32e8 (2.00e8)	1.52e8
	採取された TVC (バルク)	該当なし	114.08e9 (99e9)	95.94e9	86.82e9 (105.00e9)	84.14e9	95.2e9 (80.81e9)	80.98e9
	生存率(%)	該当なし	89	84	97	93	97	97
	倍率増殖 ³ (バルク)	該当なし	570 (495)	480	434 (525)	559	720	612
	倍加数 11 日目～22 日目から ⁴	該当なし	9.2	8.9	8.8	9.1	9.5	9.1
	LOVO 後の TVC (回復(%))	1～150e9	該当なし ⁵				88.5e9 (93%) ⁷	該当なし ⁶
	LOVO 後の生存率 (%)	>70%	該当なし ⁵				85	該当なし ⁶
	CD45+/CD3+(%)	>90%	99.7	99.8	99.8	99.9	99.7	99.9
	IFN γ (pg/mL)	≥500	948	1547	4555	4371	2795	3130
	グランザイム B (pg/mL)	該当なし	9524	9777	41603	68354	33147	47603
	(刺激した) CD4+CD107A(%)	該当なし	49	58	34	41	37	38
	(刺激した) CD8+CD107A(%)	該当なし	82	84	85	85	66	67

10

20

30

40

50

【表 4 2 - 2】

¹上記に示されるバルク条件 TVC は、ニボルマブ及び EH12.2H7 の対照であるフルスケールに外挿されている

²Gen 2 R E P プロセスの現在確立されている範囲に基づいた R E P で播種された 5～200e6 TVC の範囲であり、このプロトコルの正式な合格基準ではない

³倍率増殖＝採取された TVC / 播種された TVC

⁴細胞倍加は、式「 $\text{LOG} (22 \text{ 日目の TVC} / 11 \text{ 日目の TVC}) / \text{LOG} (2)$ 」に基づいて計算された。

⁵ロットは小規模であり、LOVO は実行されなかった

⁶単一の LOVO 操作が利用可能であった。ニボルマブ条件が LOVO 処理のために選択され、これは、PD-1 で選択された TIL プロセスの臨床製造を表す。

⁷NC-200 細胞カウンターの問題は、LOVO 後の計数プロセス中に識別された。安定性試験 (SP-19-003) からの解凍後の回収率を使用して、回収率 (%) を計算した。

【2009】

プロセス収率：活性化の終わりに、ニボルマブまたは EH12 染色のいずれかを使用して選択された TIL は、R E P 培養を開始するために十分な収率で、100e6 を超える細胞数 (1200 倍超の増殖、平均 9.1 回の細胞倍加) をもたらした。

【2010】

R E P 採取では、すべての培養は、80e9 超の TVC をもたらした。11 日目～22 日目までの間に平均 9 回の細胞倍加が観察された。細胞倍加の数は、以前の前臨床実験 (TP-19-004 R 及び実施例 21 R) で観察された結果と非常に類似していた。

【2011】

用量：フルスケールの実行 (H3046) から、ニボルマブ染色を使用した最終製品の用量は、85% の生存率及び 99.7% の CD45 + CD3 + 細胞を伴う 88.5e9 TVC であった。最終産物は、高度に濃縮された TIL 産物であった。

【2012】

機能：TIL の機能性は、aCD3 / aCD28 / aCD137 Dynabeads による最終製品の一晩の刺激に基づいて特徴付けられた。刺激の 24 時間後に上清を収集し、凍結させた。上清に放出された IFN γ 及びグランザイム B の濃度をアッセイするために ELISA を実施した。IFN γ の放出は、合格基準を満たし、TIL 培養物すべて

が、刺激時に高レベルのグランザイム B を分泌した。事前研究において生成された T I L 産物と同様に、最終製品からの高い画分の T I L は、P M A / I O (C D 4 + T I L 及び C D 8 + T I L の両方) で刺激された場合に、C D 1 0 7 A を発現した。

【2013】

T I L テロメア長及びテロメラーゼ活性：データは、保留中である。報告書は、利用可能になったときに、このデータを含めるように修正される。

【2014】

クローン性：データは、保留中である。報告書は、利用可能になったときに、このデータを含めるように修正される。

【2015】

増殖表現型：表 4 3、4 4、及び 4 5 は、T I L の増殖表現型分析を説明する。マルチカラーフローサイトメトリーを使用して、R E P T I L の T I L 純度、同一性、メモリーサブセット、活性化、及び疲弊状態を特徴付けた。検出可能な B 細胞、単球、N K 細胞の 1 % 未満が、最終的に採取された T I L に存在した (表 4 3)。R E P T I L は、主に、エフェクターメモリー分化を伴う T C R α / β でほとんど構成された。ニボルマブと E H 1 2 . 2 H 7 との間の C D 8 / C D 4 比率は、卵巣腫瘍を除いて同等である。C D 8 / C D 4 比率の歪度は、卵巣腫瘍タイプの不均一性、ならびに選択手順における C D 4 及び C D 8 の選択マーカーの欠如によるものであり得る。

【表 4 3】

表 4 3 : TIL の純度、同一性、及びメモリー表現型の特徴付け

特徴	OV8074 (ニボルマブ)	OV8074M1156 (EH12)	M1156 (ニボルマブ)	M1156 (EH12)	H3046 (ニボルマブ)	H3046 (EH12)
純度						
NK 細胞(CD3- CD56+)(%)	0.5	0.4	0.2	0.6	0.0	0.0
B 細胞(CD3- CD19+)(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
単球(CD14+)(%)	0.5	0.5	0.9	0.8	0.8	0.9
同一性						
TCRα/β(%)	97.1	95.8	98.4	97.9	98.4	98.6
T 細胞						
TCRγ/δ(%)	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.1
TCRα/β+CD4+(%)	19.0	40.7	19.7	10.0	64.7	62.0
TCRα/β+CD8+(%)	80.5	57.2	79.9	89.5	34.6	37.6
TCRα/β+CD8/CD4 比	4.2	1.4	4.1	9.0	0.5	0.6
メモリー表現型						
ナイーブ: CCR7+CD45RA+(%)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
T-EM: CCR7- CD45RA-(%)	98.4	98.2	98.6	98.2	98.4	97.1
T-CM: CCR7+CD45RA-(%)	1.4	1.8	1.4	1.7	1.6	2.8
T-EFF/TEMRA: CCR7-CD45RA+(%)	0.2	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0

注記：T I L 純度のゲーティングアルゴリズムを、以下に示す。

単球：生細胞、C D 1 4 + (%)

N K (ナチュラルキラー) 細胞：生細胞、C D 1 4 -、C D 3 -、C D 5 6 + C D 1 6 + (%)

B 細胞：生細胞、C D 1 4 -、C D 3 -、C D 1 9 + (%)

【2016】

T I L の T C R 刺激による増殖により、P D - 1 で選択された T I L 条件はすべて、C D 2 8 発現のアップレギュレーション及び C D 2 7 発現のダウンレギュレーションを示した。さらに、P D - 1 で選択された T I L はすべて、K L R G 1 発現が低く、分化の少ない表現型を示した。

【2017】

C D 2 7、C D 2 8、C D 5 6、C D 5 7、B T L A、C D 2 5、及び C D 6 9 レベルは、G e n 2 製造プロセスを使用して生成された黒色腫 T I L の結果と同様であった。

【2018】

分化、活性化、及び疲弊状態に関してニボルマブ及び E H 1 2 . 2 H 7 選択手順の間に顕著な違いはない。

【表 4 4】

表 4 4 : CD 4 + T I L の活性化及び疲弊状態

特徴 (生細胞、CD3+、CD4+で ゲートされた)	OV8074 (ニボルマブ)	OV8074 (EH12)	M1156 (ニボルマブ)	M1156 (EH12)	H3046 (ニボルマブ)	H3046 (EH12)
分化	CD27+(%)	5.1	6.1	5.5	12.7	39.3
	CD28+(%)	99.9	99.9	99.9	99.9	100.0
	CD57+(%)	27.1	16.2	65.1	37.6	13.2
	KLRG1+(%)	12.0	19.9	41.9	31.5	3.4
活性化	2B4+(%)	4.1	8.7	4.8	4.0	6.1
	BTLA4+(%)	99.4	99.7	99.8	99.7	99.9
	CD25+(%)	4.8	3.4	2.6	4.1	2.4
	CD69+(%)	79.4	77.0	84.6	77.3	75.9
	CD95+(%)	96.7	97.5	98.9	99.6	99.5
	CD103+(%)	0.6	0.4	1.0	0.5	1.0
疲弊	LAG3+(%)	1.9	3.0	2.7	1.4	1.6
	PD1+(%)	11.8	12.0	16.5	24.1	16.2
	TIGIT+(%)	15.0	24.0	33.3	51.7	31.4
	TIM3+(%)	11.1	20.7	36.4	26.3	18.4

10

【表 4 5】

表 4 5 : CD 8 + T I L の活性化及び疲弊状態

特徴 (生細胞、CD3+、CD8+で ゲートされた)	OV8074 (ニボルマブ)	OV8074 (EH12)	M1156 (ニボルマブ)	M1156 (EH12)	H3046 (ニボルマブ)	H3046 (EH12)
分化	CD27+(%)	10.3	8.7	27.2	24.5	23.1
	CD28+(%)	99.9	99.8	99.9	99.9	99.8
	CD57+(%)	39	17.7	52.8	38.7	15.5
	KLRG1+(%)	36.9	23.7	15.5	9.9	4.1
活性化	2B4+(%)	3.2	3.5	2.3	2.1	4.0
	BTLA4+(%)	99.7	99.8	99.8	99.8	99.9
	CD25+(%)	0.5	0.9	0.2	0.4	0.6
	CD69+(%)	76.1	74.4	81.6	84.4	86.2
	CD95+(%)	95.3	88.7	98.9	98.5	96.5
	CD103+(%)	0.5	0.5	0.8	0.3	0.9
疲弊	LAG3+(%)	0.6	1.8	1.9	0.9	1.5
	PD1+(%)	12.1	4.7	11.7	14.6	7.6
	TIGIT+(%)	51.6	42.7	78.7	85.5	17
	TIM3+(%)	15.3	22.1	27.3	49.1	21

20

【2 0 1 9】

EH12、2H7及びニボルマブの同等性を確立するための表現型の特徴付けデータに対する追加の分析。

PD-1+TILを取得するためにEH12、2H7及びニボルマブを使用して生成されたPD-1で選択されたTILを、フローサイトメトリーにより、CD4、CD8、CCR7、CD45RA、及びPD-1の発現について評価した。ニボルマブ及びEH12、2H7を使用して派生したPD-1で選択された細胞におけるCD4及びCD8の発現に有意差は観察されなかった。3つのアッセイした腫瘍では、両方のTIL産物がCD4+T細胞と比較してCD8+T細胞のより高い割合をもたらした(図1)。3つのPD-1で選択されたTIL産物におけるCD4及びCD8の発現の類似性は、ニボルマブを使用してPD-1+を選択しても、EH12、2H7と比較してCD4/CD8の比率が変化しなかったことを示唆している。

30

【2 0 2 0】

T細胞系統と同様に、TILのメモリー状態は、EH12、2H7及びニボルマブを使用して生成されたPD-1で選択されたTILで類似していた。TIL集団は、主に、エフェクターメモリーT細胞で構成されており、ニボルマブ及びEH12、2H7を使用して生成されたPD-1で選択されたTILは、IovanceのLN-145治療薬に類似しており、いずれかの抗PD-1クローンを使用してPD-1を選択しても、TILのメモリー表現型を歪まないことを示唆している。

40

【2 0 2 1】

PD-1発現が培養時に同様に低減したかどうかを評価するために、ニボルマブ及びEH12、2H7を使用して生成されたPD-1で選択されたTILを、増殖前及び増殖後に評価した。選別後、PD-1+TILの割合は、新たに選別されたTIL調製物の両方で100%近くであった(上記の表)。PD-1の発現は、EH12、2H7及びニボルマブを使用して生成されたPD-1で選択されたものにおいて増殖後に有意かつ同等に低減した。予測されたように、増殖時のPD-1発現の減少は、EH12、2H7及びニボ

50

ルマブを使用してPD-1+で選別されたTILの以前の高いPD-1発現体が、増殖によりほとんどPD-1に戻ったことを示唆している。

【2022】

EH12、2H7及びニボルマブで選別されたPD-1+TILから生成されたPD-1で選択されたTILの機能的特徴付け

ニボルマブを使用して生成された増殖したPD-1+TILがEH12、2H7クローンを使用して派生したTILと同様に機能するかどうかを評価するために、3つの腫瘍からPD-1で選択されたTILをαCD3/αCD28/α41BB活性化ビーズで非特異的に刺激し、IFNγ及びグランザイムB分泌について評価した。ニボルマブ及びEH12、2H7由来のPD-1で選択されたTILは、刺激に応答して同様のレベルのIFNγ及びグランザイムBを産生した。ニボルマブ及びEH12、2H7を使用して生成されたPD-1で選択されたTILは、非特異的刺激(αCD3/αCD28/αCD137ビーズ)に応答してかなりのレベルのIFNγ及びグランザイムBを分泌し、選択されたTILが増殖後に非常に機能的であることを示唆している。

【2023】

情報

0日目、ロジスティックな問題により、この実施例では新鮮な腫瘍を受け取ることができなかった。実験はすべて、新鮮な腫瘍の代わりに冷凍した腫瘍消化物を使用して実行された。調査研究からのデータは、新鮮な腫瘍または凍結した腫瘍を試験した場合、PD-1の発現に違いがないことを示唆している。

【2024】

結論及び推奨事項

PD-1で選択されたTILプロセスは、PD-1+TILを22日で80e9超に増殖させるためにフルスケールで開発された。開発規模で製造された6つのロット(ニボルマブ及びEH12染色法の両方、2つのフルスケールと4つの小規模)はすべて、放出パラメータの合格判定基準を満たしていた。

【表46】

表46：要約表：

試験パラメータ	合格判定基準	OV8074 (ニボルマブ) (EH12)	OV8074 (EH12)	M1156 (ニボルマブ) (EH12)	M1156 (EH12)	H3046 (ニボルマブ) (EH12)	H3046 (EH12)
外観	バッグは無傷で、塊の兆候なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	合格	合格
細胞生存率	≥70%	合格	合格	合格	合格	合格	合格
総生細胞数	1×10 ⁹ ～150×10 ⁹	合格	合格	合格	合格	合格	合格
同一性 (CD45+/CD3+(%))	>90%のCD45+/CD3+細胞	合格	合格	合格	合格	合格	合格
IFNγ (刺激-非刺激)	≥500pg/mL	合格	合格	合格	合格	合格	合格

NA、該当なし、細胞は小規模に採取された

【2025】

全体として、この実施例は、ニボルマブを使用してPD-1で選別されたTILから生成されたPD-1で選択されたTILが、EH12、2H7クローンを使用して生成されたTILと同等であり、それによって臨床製造におけるPD-1選択のためのニボルマブの使用を支持していることを実証した。

【2026】

実施例6：臨床製造のためのフルスケールでのフローサイトメトリー選別及び増殖によるニボルマブを使用したPD-1+TILの選択

0日目のためのCM1培地及び11日目のためのCM2培地の調製

情報：CM1の1つのバッチは10Lであった。

【2027】

IL-2に関する情報。優先順位、次いで、可用性に従ってIL-2を選択した。それ

に応じて計算を完了した。

【2028】

第1：1 mLのIL-2 Akronを事前充填されたシリンジの使用の準備ができていた。6000 IU/mLでCM1の1つの10 Lバッグを調製するために必要なIL-2の体積を計算した： $(10,000 \text{ mL} \times 6000 \text{ IU/mL} = 60 \times 10^6 \text{ IU/バッグ})$ 。移すIL-2： $60 \times 10^6 \text{ IU} / \text{IL-2 比活性} = 10 \text{ LのRPMIバッグ当たり}$ _____ mLのIL-2（小数第1位）。必要なシリンジの数を計算した：IL-2の総体積/シリンジ当たりの体積 = _____ mL / 1 mL = _____ シリンジ（小数点以下0で切り上げ）。

【2029】

第2：1 mLのWFIと再構成するIL-2 Akron粉末。6000 IU/mLでCM1の1つの10 Lバッグを調製するために必要なIL-2のmgを計算した： $(10000 \text{ mL} \times 6000 \text{ IU/mL} = \text{バッグ当たり } 60 \times 10^6 \text{ IU})$ 。 $60 \times 10^6 \text{ IU} / \text{IL-2 比活性}$ は、10 LのRPMIバッグ当たりのIL-2のmgに変換される（小数第1位）。移すIL-2（1 mg = 1 mL）は、10 LのRPMIバッグ当たりのIL-2のmLに変換される（小数第1位）。IL-2の必要なmgの総数を計算した。必要なバッグ及びバイアルの数を計算した。

【2030】

最後：2 mLの酢酸と再構成するIL-2 Cellgenix粉末。6000 IU/mLでCM1の1つの10 Lバッグを調製するために必要なIL-2のmgを計算した： $(10000 \text{ mL} \times 6000 \text{ IU/mL} = \text{バッグ当たり } 60 \times 10^6 \text{ IU})$ 。 $60 \times 10^6 \text{ IU} / \text{IL-2 比活性}$ は、10 LのRPMIバッグ当たりのIL-2のmgに変換される（小数第1位）。移すIL-2；IL-2の必要な総mgを計算した。1つのバッグ当たりのIL-2のmg及びバッグの数を計算した。

【2031】

ヒトAB血清の解凍：調製する10 LのCM1当たり10本のボトル×100 mLのヒトAB血清。

【2032】

予備調製

セクション1から使用するIL-2：Akron IL-2が事前充填されたシリンジ内にある場合、再構成は必要とされなかった。Akron IL-2が粉末である場合、ステップ2.2に進み、再構成を進めた。Cellgenix IL-2が粉末である場合、ステップ2.5に進み、再構成を進めた。再構成するバイアルの数を記録した。材料をBSCの中に移した。

【2033】

10 mLシリンジを使用して注射用水（WFI）ボトルをスパイクし、1 mLのWFIを引き出した。18 G針をシリンジに接続し、1 mLのWFIをIL-2のバイアルに移した。バイアルを2～3回反転させ、すべての粉末が溶解するまで旋回させた。発泡を回避し、激しく混合しなかった。必要な数のバイアルを再構成するためにこのステップを繰り返した（必要に応じて新しいシリンジを使用する）。使用までBSC内で保管した。再構成するバイアルの数を記録した。材料をBSCの中に移した。

【2034】

18 G針が接続された10 mLシリンジまたはポンプマティックピペットを使用して、HAcボトルを開き、2 mLのHAcを引き出した。隔壁をとおしてIL-2バイアルの中に2 mLのHAcを移した。バイアルを2～3回反転させ、すべての粉末が溶解するまで旋回させた。発泡を回避し、激しく混合しなかった。セクション5で必要な数のバイアルを再構成するためにこのステップを繰り返し、使用までBSC内で保管した。

【2035】

CM1培地を調製し、ラベル付けした。2つの5 LのRPMI+GlutaMAXバッグを使用するとき、CM1プール培地とラベル付けされた10 LのLabtainerを

10

20

30

40

50

B S Cの中に移し、拡張セットを取り付けた。ポンプブーツの一方の端部をC M 1 プール培地に取り付け、他方の端部を第1の5 LのR P M I + G l u t a M A X バッグに取り付けた。体積全体をC M 1 プール培地にポンプで注入した。C M 1 プール培地中のR P M I + G l u t a M A X の総体積が10 Lであるように、5 LのR P M + G l u t a M A X の第2のバッグを用いて繰り返した。

【2036】

10 mLの2-メルカプトエタノールをチューブ2-メルカプトエタノールの中にピペットで採取した。10 mLのゲンタマイシンをヒトA B血清の1本のボトルの中に追加し、均質化した。追加を示すためにボトルをマークした。10 Lバッグのための必要な量のI L-2を引き出し（セクション5を参照）、ヒトA B血清の1本のボトルの中に移し、均質化した。ピペットの先端を2-メルカプトエタノールに入れ、10 mLをC M 1 プール培地に吸引した。

10

【2037】

I L-2が追加された100 mLのヒトA B血清ボトルをC M 1 プール培地に吸引した。ゲンタマイシンが追加された100 mLのヒトA B血清ボトルをC M 1 プール培地に吸引した。ヒトA B血清の残りの8本のボトルをC M 1 プール培地に吸引した。

【2038】

C M 1 培地を天秤及び釣合い錘の上に置いた。C M 1 プール培地からC M 1 培地に990 ± 10 mLをポンプで注入した。1 gが1 mLに等しいことを仮定した。ステップ12.20でC M 1 培地の体積を記録した。C M 1 培地を熱融着し、取り出した。残りのC M 1 培地バッグを用いて繰り返した。2 ~ 8 °Cでバッグを保管した。

20

【2039】

C M 1 プール培地を熱融着し、ポンプブーツから取り出し、滅菌性滅菌性試験のために保持した。20 mLの培地を滅菌性C M 1 バッグから取り出した。10 mLを嫌気性B a c T / A l e r t ボトルに接種し、10 mLを好気性B a c T / A l e r t ボトルに接種した。バッグは、試料採取後に廃棄することができた。試験のために送る場合：滅菌性C M 1 バッグを2 ~ 8 °Cに置いた。滅菌性は、膜濾過による滅菌性のために外部ベンダーに試料を送ることによって行われた。適用可能な微生物培養物のための後処理を行い、受入番号を記録した。

【2040】

I L-2 P r o l e u k i n アリコート調製

P l a s m a L y t e A 中の1 % H A D の調製

【2041】

すべての試薬及び供給品の外側を70 % イソプロパノールアルコールで拭き、B S Cに入れた。

【2042】

16 mLの25 % I - I S A ストック溶液を、滅菌フィルターユニット内の384 mLのP l a s m a L y t e A に追加した。体積を以下に記録した。注記：上記の体積は、 6×10^4 I U / mL の最終濃度で1つのI L-2 バイアルを調製するために十分であった。

40

【2043】

0.22 g m フィルターユニットをとおして培地を濾過した。

【2044】

P l a s m a L y t e A 中の1 % F B A としてラベル付けした。

【2045】

r h I L-2 ストック溶液の調製。

【2046】

P l a s m a L y t e A 中の1 % H S A 中でr h I L-2 ストック溶液を調製した（ 6×10^8 I U / mL の最終濃度）。

【2047】

50

18 G 針を 3 mL シリンジに取り付け、1.2 mL の W F I を引き上げた。I L - 2 のバイアルに注入した。バイアルからシリンジを取り出さなかった。

【2048】

バイアルを 2 ～ 3 回反転させ、すべての粉末が溶解するまで旋回させた。泡立ちを防ぐために振盪またはボルテックスしなかった。バイアルからシリンジを取り出すことなく、バイアルから溶液を引き出し、測定し（ステップ 2.4 の表に A として記録される）、500 mL 滅菌ボトルに入れた。

【2049】

必要とされる 1 % H S A 希釈液の体積を計算した。注：製造業者の指示によると、1.2 mL の W F I で再構成した後、各バイアルは 18×10^6 I U / mL を含んだ。

10

【2050】

500 mL 滅菌ボトルを I L - 2 作業ストック 6×10^4 I U / mL とラベル付けした。計算された量の 1 % H S A（ステップ 2.4 からの D）を、再構成された I L - 2 がすでに追加された 500 mL 滅菌ボトルの中に移した。十分に混合した。等分を容易にするために必要であれば、適切な量を滅菌検体カップに移した。I L - 2 作業ストック 6×10^4 I U / mL とラベル付けした。

【2051】

1 mL アリコートにおける I L - 2 作業ストック 6×10^4 I U / mL から再構成された I L - 2 をラベル付けされたチューブに等分した。

●チューブを P r o l e u k i n I L - 2、 6×10^4 I U / mL としてラベル付けした。

20

●調製日、ロット番号、有効期限、体積、及びオペレーターのイニシャルを記録した。

● -80°C で保管した。

●調製から 3 ヶ月後に有効期限が切れた。

【2052】

等分が完了した後、調製された 1 mL アリコートの数を記録した。

【2053】

P D - 1 で選択された T I L のプロセス 0 日目

C M 1 培地インキュベーションの開始日時を記録した。処理前に C M 1 培地バッグ（複数可）を一晩インキュベーションした。S o n y 細胞選別機で行われた最新のゲーティング及び補正日を記録した。過去 30 日間に S o n y F X 500 H 細胞選別機がオンになっていた、または動作していたことを検証した。

30

【2054】

腫瘍洗浄培地、選別緩衝液、及び収集緩衝液の調製。空の 500 mL ボトルを選別緩衝液としてラベル付けした。血漿移送セットをクランプで固定し、スパイクを使用して P B S / E D T A バッグをスパイクした。シリンジを使用して、490 mL の P B S / E D T A を選別緩衝液ボトルに移した。10 mL の F B S を 490 mL の P B S / E D T A に追加した。使用しないときは $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ で保管した。

【2055】

40

H B S S の 500 mL ボトルのうちの 1 つを腫瘍洗浄培地としてラベル付けした。5 mL のゲンタマイシン ($50 \text{ mg} / \text{mL}$) を、腫瘍洗浄培地とラベル付けされた H B S S の 500 mL ボトルに追加した。

【2056】

15 mL コニカルチューブを収集緩衝液とラベル付けした。7 mL の H B S S 及び 7 mL のヒト A B 血清を 15 mL コニカルチューブに追加した。使用しないときは $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ で保管した。

【2057】

酵素の再構築：コラゲナーゼ A F - 1（1）、中性プロテアーゼ（1）、D N a s e I（2）。該当する場合、以下のステップで試薬を再構成し、使用しないときは $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$

50

で保管した。事前にアリコート調製した場合、適用可能なステップ（複数可）が該当しなかった。

【2058】

該当する場合、適切なサイズのシリンジ及び針を使用して、10 mLの滅菌HBSS中でコラゲナーゼAF-1（Nordmark, Sweden、N0003554）の凍結乾燥したバイアルを再構成した。凍結乾燥したストック酵素は、2892 PZ U／バイアルの濃度であった。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。

【2059】

該当する場合、適切なサイズのシリンジ及び針を使用して、1 mLの滅菌HBSS中で中性プロテアーゼ（Nordmark, Sweden、N0003553）を再構成した。凍結乾燥したストック酵素は、175 DMC U／バイアルの濃度であった。凍結乾燥したストック酵素は、175 DMC／mLの濃度であり得る。

【2060】

適切なサイズのシリンジ及び針を使用して、1 mLの滅菌HBSS中でDNase I（Roche, Switzerland、03724751）を再構成した。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。再構成後、DNase Iストックは、4 KU／mLであった。2つのバイアルを調製した。

【2061】

組織解剖の準備。「Cチューブ1用の断片」プレートの4つのウェルを、「1」、「2」、「3」、「4」とラベル付けした。「Cチューブ1用の断片」プレートの残りのウェルを、「H」とラベル付けした。「Cチューブ2用の断片」プレートの4つのウェルを、「5」、「6」、「7」、及び「8」とラベル付けした。5 mLの「腫瘍洗浄培地」を、「Cチューブ1用の断片」及び「Cチューブ2用の断片」とラベル付けされた6ウェルプレートのすべてのラベル付けされたウェルの中に追加した。50 mLの腫瘍洗浄培地を、「洗浄01」、「洗浄__02」、「洗浄03」、及び「好ましくない」とラベル付けされた各100 mmペトリ皿に追加した。20 mLの腫瘍洗浄培地を、「鉗子洗浄培地」、「メス洗浄培地」とラベル付けされた50 mLコニカルチューブの各々の中に追加した。さらなる使用のために、腫瘍洗浄培地をBSC内で保管した。解剖のみのために、「鉗子洗浄培地」、「メス洗浄培地」とラベル付けされた適切なチューブの中にメス及び鉗子を入れた。

【2062】

組織解剖

腫瘍容器をBSCの中に移した。長い鉗子を使用し、腫瘍（複数可）を検体ボトルから洗浄__01」とラベル付けされた100 mmペトリ皿に移した。腫瘍を洗浄__01」内で周囲温度で3分間インキュベートした。時間を記録した。検体ボトルに再びキャップをし、秤に移した。検体ボトルの重量を記録し、腫瘍組織の重量差を計算した。以下をBSCの中に移した：10 mL血清学的ピペット、「腫瘍輸送培地」とラベル付けされた50 mLコニカルチューブ。10 mLの腫瘍輸送培地を「腫瘍輸送培地」とラベル付けされたチューブの中に移した。18 G針を用いて、10 mLの腫瘍輸送培地をシリンジに引き込んだ。1本の各嫌気性及び好気性滅菌ボトルに5 mLの腫瘍輸送培地を接種した。腫瘍のインキュベーション停止時間（インキュベーション後3分）を記録した。長い鉗子を使用して、腫瘍を「洗浄__02」とラベル付けされた100 mmペトリ皿に移し、腫瘍を周囲温度で3分間インキュベートした。インキュベーション停止時間を記録した。長い鉗子を使用して、腫瘍を「洗浄__03」とラベル付けされた100 mmペトリ皿に移し、腫瘍を周囲で3分間インキュベートした。腫瘍のインキュベーション停止時間を記録した。100 mmペトリ皿の蓋（皿蓋）の下に定規を置き、長い鉗子を使用して、測定及び解剖のために腫瘍を蓋に移した。腫瘍の長さ及び受容した断片の数を測定し、記録した。腫瘍の長さを、すべての個々の断片の長さの総和として測定した。

【2063】

皿の蓋の上で腫瘍の初期解剖を行った。3つの中間片に解剖するか、または同等の体積の4つの群に分けた。切断しながら、注意して各中間片の腫瘍構造を温存した。積極的に解剖されていない任意の中間腫瘍片を、「Cチューブ1用の断片」6ウェルプレートの別個の「H」ウェルの中に移し、組織を水和状態で保った。

【2064】

解剖開始：各中間断片の解剖標的時間は、平均して20分以内であった。第1の中間断片の最終断片化を開始した。第1の中間断片の解剖開始時間を記録した。

【2065】

参照として100mmペトリ皿の蓋の下で定規を使用して、腫瘍を216mm³断片（6×6×6mm）に穏やかに解剖した。迅速に作業し、組織全体を断片に解剖した。移送ピペット、メス、または鉗子を使用して、培養のために最大4つの組織断片を選択し、断片を「Cチューブ用の断片」6ウェルプレートの番号付けされたウェルに移した。断片を別のウェルに追加する前に、各ウェルを4つの断片で充填した。各ウェルは、消化物で使用されたCチューブを表す。常に注意して、解剖手技の全体をとおして組織を水和状態で保った。好ましくない組織及び廃棄物を「好ましくない組織」皿の中に移した。好ましくない組織は、黄色の脂肪組織または壊死組織によって示された。中間断片当たり6ウェルプレートの最大3つのウェルを使用した。必要に応じて、最大8本のCチューブを収容するために第2の6ウェルプレートのウェルを使用した。オペレーターの裁量に従って、新品のメスまたは鉗子を使用した。

【2066】

すべての断片の解剖停止時間を記録した。3つの中間断片から解剖された全断片を数えた。使用された各ウェルは、4つの破片を有したはずである。余分な断片が存在した場合、最大5つの断片のために、ウェル当たり1つの余分な断片を追加した。Cチューブ当たり4つの断片が任意選択的であり、利用可能な全断片の数に応じて、3～5つの断片が許容された。ウェル1～8内の断片の最終的な数を記録した。必要とされるまで6ウェルプレート内で断片を保管し、組織が水和状態のままであることを確実にした。各ウェルは、1本のCチューブを表した。Octodissociatorのために最大8本のCチューブを調製した。40を超える全断片の場合、患者識別子でラベル付けされた50mLコニカル及び適切な量の腫瘍洗浄培地中で過剰分を保持して、組織が水和状態のままであることを確実にした。利用可能な過剰な腫瘍についてIovanceに通知した。過剰な腫瘍を48時間後に廃棄した。

【2067】

腫瘍消化物溶媒の調製

各Cチューブについて、第1のチューブから始まる番号を伴う「腫瘍消化物としてラベル付けし、以下の体積を追加した：

4. 7mLの滅菌HBSS

10. 2pLの中性プロテアーゼ

21. 3pLのコラゲナーゼAF-1

250pLのDNase 1

調製されたCチューブの数を記録した。

【2068】

消化される断片を含む各ウェルについて、鉗子を使用して、すべての腫瘍断片をステップ6.2で指示されたようにラベル付けされた対応するCチューブに移した。（1）

【2069】

腫瘍消化物

Cチューブ（「腫瘍消化物1」、「腫瘍消化物2」、「腫瘍消化物3」など）をGentleMACS OctoDissociatorのブラケットに挿入した。

【2070】

列挙された型を記録した。GentleMACS OctoDissociatorを、腫瘍組織型のリストに基づいて適切なプログラムに設定し、どのプログラムが選択さ

れたかをマークした。表 4 7（以下）。

【表 4 7】

腫瘍組織型	指定
黒色腫、卵巣、結腸、下咽頭、及び腎臓	軟らかい
肺（NSCLC）、前立腺、及び結腸直腸癌	中程度
乳房、脾臓、肝細胞、頭頸部扁平上皮細胞（HNSCC）、TNBC	固い

【2071】

OctoDissociatorを始動させた。消化開始時間を記録した。Cチューブを取り出した。消化停止時間を記録した。

【2072】

腫瘍消化後の治療

消化後1チューブ上に70µm細胞ストレーナーを位置付け、25mL血清学的ピペットを使用して、フィルターをとおして「消化後1」チューブの中に腫瘍消化物の内容物を移した。最大4本の「腫瘍消化物」チューブについて繰り返した。必要に応じて、または各Cチューブについて、ストレーナーを交換した。4本を超える腫瘍消化物Cチューブの場合、70µm細胞ストレーナーを使用し、各残りのCチューブをラベル付けされた消化後2チューブの中に濾過した。Cチューブ間で必要に応じてストレーナーを交換した。

【2073】

血清学的ピペットを使用して、各腫瘍消化物Cチューブの内側を5mLのHBSSで穏やかにすすいだ。Cチューブを反転させて完全にすすぎ、70µm細胞ストレーナーをとおして5mLを対応する消化後チューブの中に濾過した。すべてのチューブをすすいだ後に細胞ストレーナーを廃棄した。

【2074】

血清学的ピペットを使用して、50mLマークまでHBSSを消化後チューブ（複数可）に追加した。「消化後」チューブ（複数可）を遠心分離機に移し、全加速度で室温において400×gで5分間遠心分離し、ブレーキをかけた。

【2075】

CM1の1つのバッグをインキュベーターから取り出した。シリンジを使用して、約30mLのCM1を収集し、「CM1」とラベル付けされた50mLコニカルに入れた。450µLのCM1をC1～C4とラベル付けされたクライオバイアルの各々の中に移した。

【2076】

消化後チューブ（複数可）をBSCに移した。上清を穏やかに吸引し、廃棄した。5mL血清学的ピペットを使用して、細胞ペレット（複数可）を5mLの温かいCM1中に再懸濁させた。上下に6回ピペット操作し、細胞ペレット（複数可）を再懸濁させた。「消化後2」チューブがあった場合、内容物を「消化後1」チューブに移した。「消化後1」チューブの体積を測定し、記録した。

【2077】

ペレットを再懸濁させた直後に、50µLを「C1」、「C2」、「C3」、及び「C4」に移した。試料を採取する前に、上下に3回ピペット操作して先端を湿潤させた。

【2078】

NC-200で「生存率及び細胞数Iovance」プロトコルを使用した。NC-200を使用して、試料1で細胞計数を行った。試料を1：10希釈で調製した。必要に応じて、追加の適切な希釈液を調製した。使用された希釈倍率を記録した。必要に応じて、生存（生）細胞濃度及び生存率を記録した。試料2、3、及び4について繰り返した。情報を記録した。

【2079】

ステップ 8. 9 で記録されたデータを使用して、4 つの計数の平均を計算した（消化後 1 + 消化後 2 + 消化後 3 + 消化後 4）／ 4

【 2 0 8 0 】

総生細胞の数を計算した。〔細胞懸濁液の体積－計数については 0. 2 mL〕×平均濃度。

【 2 0 8 1 】

腫瘍消化物染色

5×10^5 個の生細胞の体積を計算した。消化後チューブから P E F M O プレップ及び F I T C F M O プレップチューブにその体積を移した。使用しないときは 2 ～ 8 °C に置いた。

10

【 2 0 8 2 】

消化後チューブに残っている T V C を計算した。

【 2 0 8 3 】

10 mL の H B S S を P E F M O プレップ及び F I T C F M O プレップチューブに追加した。5 mL の H B S S を消化後チューブに追加した。

【 2 0 8 4 】

すべてのチューブを遠心分離機に移した。全加速度及び全ブレーキで室温において $40 \times g$ で 5 分間遠心分離した。

【 2 0 8 5 】

以下のように 1 : 100 希釈を行うことによって、濃縮ニボルマブ溶液 [10 mg / mL] を希釈した。10 p L のニボルマブをクライオバイアル内の 990 p L の選別緩衝液に追加し、5 秒間穏やかにボルテックスして完全に混合した。さらに使用するまで 2 ～ 8 °C に置いた。

20

【 2 0 8 6 】

抗 I g G 4 - P E : 以下のように 1 : 50 希釈を行うことによって、抗 I g G 4 - P E 溶液 [0. 5 mg / mL] を希釈した。10 p L の抗 I g G 4 - P E をクライオバイアル内の 490 p L の選別緩衝液に追加し、5 秒間穏やかにボルテックスして完全に混合した。さらに使用するまで 2 ～ 8 °C に置いた。

【 2 0 8 7 】

消化後、P E F M O プレップ、及び F I T C F M O プレップチューブを B S C に戻して移した。各チューブから上清を吸引して廃棄し、以下のように再懸濁させた。

30

【 2 0 8 8 】

消化後は、以下のように計算することによって 10×10^6 細胞 / mL で細胞を再懸濁させた。（ステップ 9. 3 からの T V C ） $\div 10 \times 10^6$ 細胞 / mL = 追加する選別緩衝液（mL）。ペレットを攪拌し、次いで、選別緩衝液の体積を計算した（次の mL に切り上げた）。上下に 5 回ピペット操作した。_____ 個の（T V C）細胞 / 10×10^6 細胞 / mL = _____ mL（小数第 1 位）。

【 2 0 8 9 】

F I T C F M O プレップは、ペレットを攪拌し、マイクロピペットを用いて 300 p L の選別緩衝液を追加することによって再懸濁させた。上下に 3 回ピペット操作した。

40

【 2 0 9 0 】

P E F M O プレップは、ペレットを攪拌し、マイクロピペットを用いて 300 p L の選別緩衝液を追加することによって再懸濁させた。上下に 3 回ピペット操作した。30 分のニボルマブインキュベーションが終了するまで、P E F M O プレップを 2 ～ 8 °C で保管した。

【 2 0 9 1 】

消化後に追加された（ステップ 9. 9）1 mL の選別緩衝液毎に、10 u L の 1 : 100 希釈ニボルマブ溶液を追加した。10 u L の 1 : 100 希釈ニボルマブ溶液を F I T C F M O プレップに追加した。

【 2 0 9 2 】

50

フリックすることによって両方のチューブを穏やかに混合し、細胞を2～8℃で30分間インキュベートした。完全な染色を確実にするために、インキュベーション中に10分毎に穏やかにフリックすることにより攪拌した。各周期的攪拌後に以下のボックスにチェックを入れた。

【2093】

インキュベーション後、10mLの選別緩衝液を全加速度及び全ブレーキで室温において消化後及びFITC FMOプレップに追加した。

【2094】

消化後及びFITC FMOプレップチューブをBSCに戻して移した。上清を穏やかに吸引し、廃棄した。細胞を以下のステップで以下のように再懸濁させた。

【2095】

消化後：ペレットを攪拌し、マイクロピペットを用いて400pLの選別緩衝液を追加することによって再懸濁させた。上下に3回ピペット操作した。

【2096】

FITC FMOプレップ：ペレットを攪拌し、マイクロピペットを用いて300pLの選別緩衝液を追加することによって再懸濁させた。上下に3回ピペット操作した。

【2097】

ピペット補助とともに1mL血清学的ピペットを使用して、消化後及びFITC FMOプレップチューブの体積を測定し、以下に体積を記録した：消化後の体積FITC FMOプレップの体積

【2098】

消化後及びFITC FMOプレップに、ステップ10.22及び10.23における以下の計算に従って、0.1mLの体積当たり10pLの中間希釈抗IgG4-PEを追加した。次いで、「FITC FMOプレップ」を2～8℃に置いた。

【2099】

計算： $10\text{ uLの中間希釈抗IgG4-PE} \times (\text{消化後体積} / 0.1\text{ mL})$

【2100】

計算： $10\text{ uLの中間希釈抗IgG4-PE} \times (\text{「FITC FMOプレップ」体積} / 0.1\text{ mL})$ PE FMOプレップをBSCに移した。PE FMOプレップの体積を測定した。消化後及びPE FMOプレップに、計算に従って、0.1mLの体積当たり3pLの抗CD3-FITCを追加した。

【2101】

計算： $3\text{ uLの抗CD3-FITC} (PE\ FMO\text{プレップ体積} / 0.1\text{ mL})$ 。

【2102】

計算： $3\text{ uLの抗CD3-FITC} (PE\ FMO\text{プレップ体積} / 0.1\text{ mL})$ 。

【2103】

穏やかに攪拌することによって、消化後、FITC FMOプレップ、及びPE FMOプレップチューブを混合し、細胞を2～8℃で30分間インキュベートした。完全な染色を確実にするために、インキュベーション中に10分毎に穏やかにフリックすることにより攪拌した。

【2104】

インキュベーション後、10mLの選別緩衝液を「消化後」、「FITC FMOプレップ」、及び「PE FMOプレップ」チューブに追加した。

【2105】

各チューブを、30uM分離前フィルターをとおして、それぞれ、消化後、PE FMO、及びFITC FMOとラベル付けされた15mLコニカルチューブの中に濾過した。

【2106】

消化後選別、PE FMO、及びFITC FMOチューブを、全加速度及び全ブレーキで室温において400×gで5分間遠心分離した。

【2107】

10

20

30

40

50

消化後選別、PE FMO、及びFITC FMOをBSCに戻して移した。各チューブから上清を吸引して廃棄し、残留上清中で穏やかに再懸濁させた。以下のようにさらに再懸濁させた。

【2108】

消化後選別：ペレットを攪拌し、計算された選別緩衝液の体積を追加することによって、 510×10^6 細胞/mLで細胞を再懸濁させた。最初の体積を使用し、次のmLまで切り上げなかった。穏やかに上下に3回ピペット操作し、完全に混合した。選別の準備が整うまで、覆われたチューブを2～8℃で暗所に置いた。

【2109】

PE FMO：ペレットを攪拌し、時間とともに300 pLの選別緩衝液を追加することによって再懸濁させた。選別の準備が整うまで、覆われたチューブを2～8℃で暗所に置いた。

【2110】

FITC FMO：ペレットを攪拌し、時間とともに300 pLの選別緩衝液を追加することによって再懸濁させた。選別の準備が整うまで、覆われたチューブを暗所で2～8℃に置いた。

【2111】

2 mLの収集緩衝液を、PD-1陽性とラベル付けされた15 mLコニカルチューブに追加し、PD-1陰性チューブについて繰り返した。

【2112】

腫瘍消化物からのPD-1で選択されたTILのフローサイトメトリー選別を開始した。PD-1陽性チューブが 1×10^6 個を超える細胞を取得した場合、選別は停止され得る。G-Rex 100 MCSフラスコに播種するためのPD-1で選択されたTILの最大数は、 $1 \times 10^6 \pm 10\%$ の細胞であった。PD-1陰性チューブが 4×10^6 個を超える選別された細胞を取得した場合、そのチューブを、2 mLの収集緩衝液を含む別の15 mLコニカルチューブと交換し、複数のチューブを区別するための接尾語として数字をラベルに追加した。G-Rex 100 MCSフラスコに入れる準備が整うまで、選別された細胞を常に2～8℃で保管した。選別後に収集されたPD-1で選択されたTILの総数を記録した。

【2113】

CM1を含むG-Rex 100 MCSフラスコを調製した。

【2114】

インキュベーターからCM1培地バッグを取り出し、日時を記録した。培地が一晩温められることを確実にした。

【2115】

G-Rex 100 MCSのすべてのクランプを閉じた。G-Rex 100 MCS上のフィルタラインのクランプを閉じなかった。

【2116】

CM1培地バッグをG-Rex 100 MCSの赤色ラインに溶接した。

【2117】

G-Rex 100 MCSを秤及び釣合い錘の上に置いた。400 tの重力によって10 mLのCM1をG-Rex 100 MCSの中に移した。移された体積を記録した。1 gは1 mLに等しいと考慮した。

【2118】

G-Rex 100 MCSの赤色ラインを熱融着した。

【2119】

G-Rex 100 MCSをPD-1で選択されたTIL D0とラベル付けし、さらに使用するまで、フラスコ及びCM1培地バッグを37℃のインキュベーターに移した。

【2120】

G-Rex 100 MCSの識別「PD-1で選択されたTIL D0」

10

20

30

40

50

【2121】

フィーダーバッグを調製した。CM1バッグをフィーダー細胞バッグに滅菌溶接した。フィーダー細胞バッグを天秤及び釣合い錘の上に置いた。重力によって、100 mL ± 10 mLのCM1をフィーダー細胞バッグの中に移し、追加された体積を記録した。1 gは* 1 mLに等しいと考慮した。フィーダーバッグを熱融着し、同じ元の長さのチューブを残して拡張セットから取り出した。

【2122】

フィーダー細胞を調製した。フィーダー細胞バッグのロット番号を記録した。フィーダーの解凍前の水浴の温度を記録した。小さな氷の塊のみが残るまで、フィーダー細胞バッグを37℃の水浴中で3～5分間解凍した。解凍の開始時間、解凍の終了時間を記録した。フィーダー細胞バッグを水浴から取り出し、バッグが乾燥していることを検証した。

10

【2123】

ルアーコネクタを使用して、または滅菌溶接によって、フィーダー細胞バッグをハーネスに接続した。シリンジハーネスを新しい50 mLシリンジと交換した。解凍されたフィーダー細胞バッグを、ハーネスからのスパイクで、解凍されたフィーダーバッグの単一のポートの中にスパイクした。フィーダー細胞バッグが「オフ」位置になるように、活栓バルブを回転させた。バルブは閉じられているものを示した。1回引くことにより、クランプを解凍されたフィーダーバッグラインに開き、約10 mLのフィーダーをフィーダー細胞バッグからシリンジの中に入れた。解凍されたフィーダー細胞バッグが「オフ」位置になるように、活栓バルブを回転させて、すべてのクランプをフィーダー細胞バッグの方向に開いた。穏やかに混合しながら、シリンジの内容物をフィーダー細胞バッグの中に分注した。必要に応じて、バッグから空気を引き戻し、ラインを完全に一掃するために使用した。フィーダー細胞のバッグが「オフ」位置になるように、活栓を回転させた。「フィーダー細胞」バッグ内の細胞を十分に混合した。10 mLシリンジを「フィーダー」バッグのNISポートに取り付け、バッグを混合し、NISポートをとおして1 mLの試料を取り出した。試料をクライオバイアル1の中に移した。各試料に新しいシリンジを使用して、クライオバイアル2～4についてこれを繰り返した。

20

【2124】

フィーダー細胞の体積を計算した。

フィーダー細胞数。適切な希釈（1：10が推奨された）を調製し、NC-200を使用して、試料1で細胞計数を行い、使用された希釈倍率を記録した。以下に生存（生）細胞濃度及び生存率を記録した。試料2、3、及び4について繰り返した。ステップ13.2で記録されたデータを使用して、4つの計数の平均生細胞濃度を計算した（フィーダー細胞1 + フィーダー細胞2 + フィーダー細胞3 / フィーダー細胞4） / 4。全生存フィーダー細胞の数を計算した。総生細胞数が 1×10^8 個の細胞を超えた場合、セクション14に進んだ。

30

【2125】

G-Rex 100 MCSへのフィーダー細胞の追加。 100×10^6 個の細胞についてフィーダーの体積を計算した。大量のフィーダー細胞を取り出さなければならない場合、減容を完了し、ラインを一掃するために、第2のシリンジを使用することができる。取り出す体積を決定した。適切なサイズのシリンジを使用して、計算された体積（ステップ14.3）をフィーダーバッグから取り出した。バッグからの各体積の取り出しについて、新品のシリンジを使用して必要に応じて繰り返した。新しいシリンジを使用して、適切な量の空気を引き上げ、空気を分注してラインを一掃した。取り出された細胞の体積を廃棄した。取り出された体積を記録した。18 G針が取り付けられた1 mLシリンジを使用して、0.030 mLのOKT3を引き上げた。針を取り出し、NISによってOKT3を「フィーダーセル」の中に分注した。少なくとも0.5 mLのフィーダー細胞懸濁液でシリンジを洗い流し、すべてのOKT3がバッグの中に追加されていることを確実にした。十分な空気がG-Rex 100 MCSの中への重力供給を可能にするためにフィーダーセル内にあることを確実にした。必要に応じて、十分な体積の空気を新しいシリンジに引

40

50

き込み、NISをとおしてフィーダー細胞に追加して、ラインを一掃した。将来の溶接のために十分なチューブを残して、「フィーダー」バッグを熱融着した。

【2126】

G-Rex 100 MCSのPD-1で選択されたTIL DOをインキュベーターから取り出し、溶接機の傍に置いた。未使用のチューブのうちの1本を使用して、「フィーダー細胞」バッグをG-Rex 100 MCS上の赤色ラインに滅菌溶接した。

【2127】

ラインをクランプ解除し、フィーダー細胞を重力によってG-Rex 100 MCSに流入させた。クランプを閉じ、元の溶接部の近くで「フィーダーセル」バッグを熱融着した。

【2128】

G-Rex 100 MCSの中へのPD-1で選択されたTILの追加及び最終CM1培地追加

【2129】

4インチ血漿移送セットまたは拡張セットをGREX 100 MCSの赤色ラインに滅菌溶接し、使用可能なルアー接続を赤色ラインに追加した。G-Rex 100 MCSをBSCに移した。

【2130】

PD-1陽性チューブにキャップを付け、5～10回穏やかに反転させた。キャップを取り外し、ポンプマティックピペットを使用して、PD-1陽性チューブの内容物を吸引した。追加のPD-1陽性チューブがある場合は繰り返した。体積を記録した。ポンプマティックピペットを反転させ、2 mLの空気をシリンジに注入した。

【2131】

ポンプマティックピペットをシリンジから接続解除した。G-Rex 100 MCSの赤色ラインに接続した。シリンジ内の体積を赤色ラインの中に分注し、シリンジ内の空気を使用してラインを一掃した。必要に応じて、より多くの空気とともに新しいシリンジを使用してラインを一掃した。G-Rex 100 MCSの赤色ラインを熱融着した。

【2132】

G-Rex 100 MCSに追加して最終体積を1000 mLにするために必要な体積を計算した。

【2133】

CM1バッグをG-Rex 100 MCSの赤色ラインに滅菌溶接した。G-Rex 100 MCSを秤及び釣合い錘の上に置いた。標的体積（ステップ15、 5 ± 10 mL）に達するまで、CM1を重力によってフラスコに流入させた。追加された体積を記録した。フラスコの赤色ラインを熱融着した。注記：1 gは1 mLに等しいと考慮した。

【2134】

フラスコをBSCに戻した。時間を記録した。TILが定着するまで20分待ち、次いで、1本の10 mLシリンジを青色キャップ付きNISに接続し、2 mLの培地を引き出した。引き出された体積を記録した。1本の嫌気性BacT/Aler tボトル及び1本の好気性BacT/Aler tボトルに各々、1 mLのフラスコ上清を接種した。時間を記録した。

【2135】

G-Rex 100 MCSをインキュベーターに入れた。処理の停止時間を記録した。

【2136】

インキュベーション条件を検証及び記録し、インキュベーターIDを記録した。

細胞数結果

10

20

30

40

50

【表 4 8】

表 4 8 : C 1 4 5 0 3 - 1 0 1 0 - 1 0 1 / F I T C F M O (データソース-1)

名称	事象	親 (%)	合計 (%)
すべての事象	6 8 , 9 8 1	0 . 0 0	1 0 0
一重項 1	4 2 , 9 2 5	6 2 . 2 3	6 2 . 2 3
一重項 2	3 5 , 6 4 9	8 3 . 0 5	5 1 . 6 8
C D 3 - F I T C	2 5 3	0 . 7 1	0 . 3 7
P D - 1 陽性	1 5 4	6 0 . 8 7	0 . 2 2
P D - 1 陰性	3 5	1 3 . 8 3	0 . 0 5

【表 4 9】

表 4 9 : C 1 4 5 0 3 - 1 0 1 0 - 1 0 1 / P E F M O (データソース-1)

名称	事象	親 (%)	合計 (%)
すべての事象	7 1 , 3 0 2	0 . 0 0	1 0 0
一重項 1	4 3 , 2 8 4	6 0 . 7 1	6 0 . 7 1
一重項 2	3 5 , 1 6 3	8 1 . 2 4	4 9 . 3 2
C D 3 - F I T C	1 8 , 2 7 2	5 1 . 9 6	2 5 . 6 3
P D - 1 陽性	1 0 1	0 . 5 5	0 . 1 4
P D - 1 陰性	1 7 , 8 8 8	9 7 . 9 0	2 5 . 0 9

10

【表 5 0】

表 5 0 : C 1 4 5 0 3 - 1 0 1 0 - 1 0 1 / 消化後選別 (データソース-1)

名称	事象	親 (%)	合計 (%)
すべての事象	1 0 0 , 0 0 0	0 . 0 0	1 0 0
一重項 1	6 0 . 0 7 1	6 0 . 0 7	6 0 . 0 7
一重項 2	4 8 , 9 0 8	8 1 . 4 2	4 8 . 9 1
C D 3 - F I T C	1 8 , 2 8 8	3 7 . 3 9	1 8 . 2 9
P D - 1 陽性	1 , 9 1 0	1 0 . 4 4	1 . 9 1
P D - 1 陰性	1 3 , 6 9 8	7 4 . 9 0	1 3 . 7 0

20

【表 5 1】

表 5 1 : C 1 4 5 0 3 - 1 0 1 0 - 1 0 1 / 消化後選別純度 (データソース-1)

名称	事象	親 (%)	合計 (%)
すべての事象	1 , 0 2 2	0 . 0 0	1 0 0
一重項 1	6 1 0	5 9 . 6 9	5 9 . 6 9
一重項 2	5 1 2	8 3 . 9 3	5 0 . 1 0
C D 3 - F I T C	3 1 3	6 1 . 1 3	3 0 . 6 3
P D - 1 陽性	1 7 6	5 6 . 2 3	1 7 . 2 2
P D - 1 陰性	2 4	7 . 6 7	2 . 3 5

【2 1 3 7】

P Dで選択されたT I Lのプロセス1 1 日目

30

予備操作

C M 2 インキュベーションの開始時間及び日付を記録した。処理前の一晩のC M 2 培地バッグのインキュベーション。事前に温められた温かいパックが利用可能であることを確実にした。

【2 1 3 8】

フィーダーバッグ及びC M 2 を含むG - R e x 5 0 0 M C S フラスコを調製した。インキュベーターからC M 2 を取り出した。取り出した日時を記録した。経過したC M 2 インキュベーション時間が許容可されるかどうかを決定した。C M 2 は、少なくとも一晩インキュベートされるべきである。

【2 1 3 9】

プールされたフィーダー細胞上のすべてのクランプを閉じた。C M 2 バッグをプールされたフィーダー細胞に滅菌溶接した。プールされたフィーダー細胞を分析天秤及び釣合い錘の上に置いた。重力によって約5 0 0 ± 1 0 m L のC M 2 をプールされたフィーダー細胞の中に移した。移された体積を記録した。注記：1 g は1 m L と同等であった。

40

【2 1 4 0】

プールされたフィーダー細胞を熱融着し、C M 2 バッグから取り出した。プールされたフィーダー細胞をB S C の中に移した。

【2 1 4 1】

ポンプブーツ及びG - R e x 5 0 0 M C S フラスコをB S C の中に移した。フラスコ上のすべてのクランプが大型フィルターラインを除いて閉じられていることを確実にした

50

。ルアー接続を使用して、ポンプブーツの出口ラインをフラスコ上の赤色ラインに接続した。ポンプブーツの入口ラインをC M 2 バッグに滅菌溶接した。G - R e x 5 0 0 M C S を秤及び釣合い錘の上に置いた。

【2 1 4 2】

体積が4 0 0 0 ± 1 0 m L に達するまで、C M 2 をG - R e x 5 0 0 M C S フラスコにポンプで注入した。フラスコに追加された体積を記録した。クランプで固定し、熱融着した。必要とされるまでフラスコをインキュベーターに入れた。インキュベーターI D を記録した。注記：1 g は1 m L と同等であった。

【2 1 4 3】

フィーダー細胞を調製した。少なくとも2つの異なるロットからフィーダー細胞の3つのバッグを回収した。ロット番号を記録した。バッグを目視検査し、それらが許容される（いずれの亀裂、破損したポート、及び不良シールもない）ことを確実にした。水浴の温度を記録した。3つすべてのフィーダーバッグについて解凍の開始時間を記録した。3つすべてのフィーダーバッグについて解凍の停止時間を記録した。フィーダー細胞をプールし、計数した。

【2 1 4 4】

以下の適切な接続を必要に応じてスパイクすること、滅菌溶接すること、または必要に取り付けることによって、フィーダー細胞ハーネスを調製した。最小限でもハーネスの片側に3つのスパイクがあることを確実にした。ハーネスは、中心に3方向活栓を有すべきである。加えて、1つのルアー／スパイク接続が、ステップ4. 2でプールされたフィーダー細胞を熱融着するためにハーネスの反対側で利用可能でなくてはならない。ハーネスを作製するために使用された構成要素を記録した。注記：使用されなかった任意の接続は熱融着された。

【2 1 4 5】

プールされたフィーダー細胞をハーネスに滅菌溶接したか、または取り付けした。プールされたフィーダー細胞が取り付けられたフィーダー細胞ハーネス（1）。クライオバイアルを11日目のフィーダー細胞1～4としてラベル付けした。新しい100 m L シリンジを開き、20 m L の空気を引き込んだ。フィーダー細胞ハーネス上のシリンジを新しい100 m L シリンジと交換した。3つの解凍されたフィーダー細胞バッグの各々の単一ポートを、フィーダー細胞ハーネスからのスパイクでスパイクした。プールされたフィーダー細胞がオフ位置になるように、活栓を回転させた。プールされたフィーダー細胞の下に温かいバックを置いた。

【2 1 4 6】

すべてのクランプを解凍されたフィーダー細胞バッグに開いた。すべてのフィーダー細胞バッグの内容物全体を引き上げ、すべてのバッグの内容物をともにプールした。回収されたフィーダー細胞の総体積を記録した。

【2 1 4 7】

解凍されたフィーダーバッグがオフ位置になるように、活栓を回転させた。すべてのクランプをプールされたフィーダー細胞の方向に開いた。細胞をシリンジからプールされたフィーダー細胞に移した。

【2 1 4 8】

10 m L シリンジをN I S ポートに取り付け、バッグを十分に混合し、1 m L の試料を取り出し、試料をクライオバイアルに入れた。新品の10 m L シリンジ及びクライオバイアルを使用して繰り返し、合計4つの1 m L の試料を取得した。

【2 1 4 9】

プールされたフィーダー細胞内の体積を計算した。必要に応じて、試料をA I M - V 中で希釈した（1：10希釈が開始することを推奨された）。希釈倍率を記録した。4つすべての試料について繰り返し、以下のデータを記録した。注記：N C - 2 0 0 のための最適な濃度範囲は、未希釈で $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞／m L であった。この範囲外の計数は、メッセージでユーザーに指示するであろう。以下のように、4つの計数の平均生細胞

10

20

30

40

50

胞濃度及び生存率を計算した。(計数1+計数2+計数3+計数4)÷4 プールされたフィーダー細胞中の総生細胞を計算した。プールされたフィーダー細胞中のTVCが 5×10^9 個の細胞を超えたか？

【2150】

追加のフィーダー細胞の解凍。解凍する追加のフィーダー細胞のバッグを要求した。使用されたフィーダー細胞のロット番号を記録した。

【2151】

バッグを目視検査し、それらが許容される(いずれの亀裂、破損したポート、及び不良シールもない)ことを確実にした。水浴の温度を記録した。フィーダーバッグについて解凍の開始時間を記録した。フィーダーバッグについて解凍の停止時間を記録した。バッグを目視検査し、それらが許容される(いずれの裂け及び漏出もない)ことを確実にした。

10

【2152】

フィーダー細胞ハーネス上のシリンジを新品の100mLシリンジと交換した。解凍されたフィーダー細胞バッグの単一ポートを、フィーダー細胞ハーネスからのスパイクでスパイクした。必要に応じて、滅菌溶接によって追加のスパイクを追加した。プールされたフィーダー細胞がオフ位置になるように、活栓を回転させた。プールされたフィーダー細胞の下に温かいパックを置いた。

【2153】

解凍されたフィーダー細胞バッグへのクランプを開いた。1回引くことにより、解凍されたフィーダー細胞バッグの内容物全体を引き上げた。回収されたフィーダー細胞の総体積を記録した。

20

【2154】

解凍されたフィーダーバッグがオフ位置になるように、活栓を回転させた。すべてのクランプをプールされたフィーダー細胞の方向に開いた。細胞をシリンジからプールされたフィーダー細胞に移した。

【2155】

10mLシリンジをNISポートに取り付け、バッグを十分に混合し、1mLの試料を取り出し、試料をクライオバイアルに入れた。新品の10mLシリンジ及びクライオバイアルを使用して繰り返し、合計4つの1mLの試料を取得した。

【2156】

プールされたフィーダー細胞内の新しい体積を計算した。必要に応じて、試料をAIM-V中で希釈した(1:10希釈が開始することを推奨された)。希釈倍率を記録した。4つすべての試料について繰り返し、以下のデータを記録した。注記:NC-200のための最適な濃度範囲は、未希釈で $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/mLであった。この範囲外の計数は、メッセージでユーザーに指示するであろう。

30

【2157】

以下のように、4つの計数の平均生細胞濃度及び生存率を計算した。(計数5+計数6+計数7+計数8)÷4。プールされたフィーダー細胞中の総生細胞を計算した。プールされたフィーダー細胞中のTVCが 5×10^9 個の細胞を超えたか？

【2158】

G-Rex 500MCSへのフィーダー細胞の追加。 5×10^9 個の生細胞に必要な体積を計算した。 5×10^9 個の細胞をバッグに残すためにプールされたフィーダー細胞から取り出す体積を計算した。プールされたフィーダー細胞から計算された体積を取り出し、 5×10^9 個の細胞をバッグに残した。取り出された体積を記録した。必要に応じて、プールされたフィーダー細胞へのラインを一掃するために十分な空気とともに新しいシリンジを使用した。

40

【2159】

18G針が取り付けられた1mLシリンジを使用して、0.15mLのOKT-3を引き上げた。針を取り出し、NISポートを介してOKT-3をプールされたフィーダー細胞の中に分注した。0.5mLのフィーダー細胞でシリンジを洗い流し、すべてのOKT

50

ー 3 がバッグの中に追加されていることを確実にした。ラインを一掃した。G-Rex 500 MCS フラスコに流入する重力を促進するために十分な空気がフィーダーバッグ内にあることを確実にし、次いで、将来の溶接のために十分なチューブを残して、プールされたフィーダー細胞を熱融着した。

【2160】

G-Rex 500 MCS をインキュベーターから取り出し、滅菌溶接機の傍に置いた。プールされたフィーダー細胞を G-Rex 500 MCS 上の赤色ラインに滅菌溶接した。IV 極上にプールされたフィーダー細胞を吊るし、内容物全体を重力によってバッグから G-Rex 500 MCS フラスコに流入させた。フィーダー細胞の追加後、ラインが空であることを確実にした。

10

【2161】

クランプを閉じ、フラスコのプールされたフィーダー細胞を熱融着した。フラスコを TIL 培養+フィーダー細胞として (11 日目) としてラベル付けし、フラスコをインキュベーターに入れた。フラスコがインキュベーターに戻された時間及びインキュベーター ID を記録した。

【2162】

TIL の調製

EV1000N バッグまたは EXP-1L を TIL 採取としてラベル付けした。メス型ルアー接続のうちの 1 つを熱融着し、クランプを取り外した。空の袋の重量を量り、重量を記録した。適切なサイズのバッグを廃棄物としてラベル付けした。廃棄物バッグを G-Rex 100 MCS フラスコ上の赤色ラインに滅菌溶接した。

20

【2163】

PD-1 で選択された TIL を処理する場合、血液フィルターは必要ではなく、G-Rex 100 MCS の空の収集ラインを TIL 採取バッグに直接溶接することができた。Gen 2.1 TIL を処理する場合、血液フィルターの入口チューブラインのうちの 1 つを G-Rex 100 MCS フラスコの空の収集ラインに滅菌溶接した。漏出を防止するために、他方の入口ラインを熱融着した。フィルターの出口ラインを TIL 採取バッグに滅菌溶接した。

【2164】

約 900 mL の上清を第 1 の G-Rex 100 MCS フラスコから取り出した。上清の取り出しが完了すると、温かいパックとして使用するための廃棄物バッグの上に TIL 採取を置いた。すべての細胞が膜から引き離されるまで、フラスコを旋回させ、軽く叩いた。細胞収集ストローが壁及び膜の接合部になかった場合、フラスコを 45° の角度で傾けながら軽くたたき、ストローを適切に位置付けた。該当する場合、断片がフラスコの反対側に残るように、フラスコを収集チューブに向かってゆっくりと傾けた。

30

【2165】

G-Rex 100 MCS フラスコを傾いた状態で保ちながら、残りの細胞懸濁液を TIL 採取バッグに移した。血液フィルターを垂直に保持して、それを懸濁液で充填させた。該当する場合、腫瘍断片を G-Rex 100 MCS フラスコから移出させることを回避した。

40

【2166】

細胞収集が完了すると、空のライン上のクランプを閉じ、赤色培地ラインへのクランプを開いた。廃棄物バッグを穏やかに圧搾して、フラスコ内への培地の流動を開始し、フラスコの底部上の膜の 3 分の 1 ～ 半分が覆われるまで充填を続けた。赤色ラインをクランプで固定した。フラスコを激しく旋回させて叩き、空のライン上のクランプを開いた。残りの細胞懸濁液を収集した。収集が完了すると、赤色ライン及び空のラインをクランプで固定し、熱融着した。

【2167】

すべての G-Rex 100 MCS フラスコが採取されるまで、ステップ 7.2 ～ 7.10 を繰り返した。廃棄物バッグを廃棄した。天秤に釣合い錘を置き、TIL 採取バッグ

50

の重量を量った。

【2168】

T I L 採取における細胞懸濁液の体積を計算した。注記：1 g は 1 m L に等しいと考慮されたい。

【2169】

10 m L シリンジを N I S ポートに取り付け、バッグを十分に混合し、1 m L の試料を取り出し、試料をクライオバイアルに入れた。新品の 10 m L シリンジ及びクライオバイアルを使用して繰り返し、合計 4 つの 1 m L の試料を取得した。

【2170】

T I L 採取における新しい体積を計算した。T I L 採取をインキュベーターに入れた。インキュベーターに入れた時間及びインキュベーター I D を記録した。

10

【2171】

T I L 細胞数。必要に応じて、試料を A I M - V 中で希釈した（1：10 希釈が開始することを推奨された）。希釈倍率を記録した。4 つすべての試料について繰り返し、以下のデータを記録した。注記：N C - 200 のための最適な濃度範囲は、未希釈で $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞 / m L であった。この範囲外の計数は、メッセージでユーザーに指示するであろう。

【2172】

以下のように、4 つの計数の平均生細胞濃度、全細胞濃度、及び生存率を計算した。（計数 1 + 計数 2 + 計数 3 + 計数 4） / 4。T I L 採取における総生細胞を計算した。T I L 採取における総生細胞数が 55×10^6 個の細胞を超えたか？

20

【2173】

Q C 試料採取

フローサイトメトリーのために 5×10^6 個の細胞を取り出すための体積を計算した。T I L 採取から上記で計算された体積を取り出し、ロット番号及び試料採取の日付とともに D 1 1 フロー 5×10^6 個の細胞とラベル付けされた容器に移した。試験のために Q C に送った。Q C 試料採取後に残っている T I L 採取の体積を計算した。Q C 試料採取後に T I L 採取に残っている生細胞を計算した。残っている総生細胞数が 200×10^6 個を超える生細胞であったか？

【2174】

30

G - R e x 500 M C S に 200×10^6 個の生細胞を播種するために必要とされる体積を計算した。T I L 採取において 200×10^6 個の生細胞を保持するために取り出す体積を計算した。

【2175】

適切なサイズのシリンジを T I L 採取に接続した。T I L 採取から上記で計算された体積を取り出し、過剰 T I L とラベル付けされた適切なサイズのコニカルチューブに入れた。取り出された体積を記録した。さらに処理するまでインキュベーターに入れた。インキュベーター I D を記録した。

【2176】

G - R e x 500 M C S への T I L の追加

40

G - R e x 500 M C S T I L 培養 + フィーダー細胞（11 日目）をインキュベーターから取り出し、それを滅菌溶接機の隣に置いた。T I L 採取を G - R e x 500 M C S フラスコの赤色ラインに滅菌溶接した。T I L 採取から G - R e x 500 M C S フラスコまでつながるすべてのクランプを解放し、T I L 採取の内容物全体をフラスコの中に重力供給した。ラインを一掃し、熱融着し、T I L 採取を廃棄した。

【2177】

G - R e x 500 M C S フラスコ上のすべてのクランプが大型フィルターラインを除いて閉じられていることを確実にした。フラスコをインキュベーターに入れ、インキュベーター情報を記録した。インキュベーターシェルフに静置するときに、G - R e x 500 M C S フラスコ内の培地が水平であることを確実にした。

50

【2178】

過剰 T I L の凍結保存

【2179】

過剰 T I L に追加する C S 1 0 の量を計算した。注記：C S 1 0 の体積について整数に切り上げた。細胞濃度は、約 100×10^6 細胞 / mL であろう。過剰 T I L を 350 G において 20 °C で 10 分間遠心分離した。

【2180】

適切なサイズの血清学的ピペットを使用して、過剰 T I L から上清を吸引し、廃棄物ボトル内に廃棄した。チューブの底部を穏やかに軽く叩いて、残りの流体中で細胞を再懸濁させた。針及び適切なサイズのシリンジを使用して、計算された C S 1 0 の体積を引き上げた。C S 1 0 の体積を過剰 T I L の中に滴下して追加した。適切なサイズのピペットを使用して十分に混合した。クライオバイアル内で過剰 T I L の 1 mL アリコート調製した。調製されたクライオバイアルの数を記録した。1 mL の C S 1 0 をブランクとラベル付けされた 1.8 mL クライオバイアルに追加することによって、C R F 内でバイアルプローブとともに使用されるブランクバイアルを調製した。凍結させた。

10

【2181】

過剰 T I L の凍結保存後。実行の完了後に冷凍庫を停止させ、保管情報を記録した。

【2182】

16 日目のための C M 4 培地の調製

調製する C M 4 の総体積。注記：25 L の培地が 1 つの製品に必要とされた。バッチは、10 L 増分で調製されるべきである。

20

【2183】

調製する C M 4 バッグの数（1 つの C M 4 バッグは 5 L であった）： $n = \text{調製する C M 4 の総体積} / 5 \text{ L}$

【2184】

選択されたタイプの A I M - V 容器：A I M - V 容器 10 L バッグ。必要なバッグの数量： $A = \text{調製する C M 4 の総数量} / 10 \text{ L}$ 、I M - V 容器 1 L ボトル、必要なボトルの数量： $B = \text{調製する C M 4 の数量} / 1 \text{ L}$ 。

【2185】

第 1：1 mL の I L - 2 A k r o n を事前充填されたシリンジの使用の準備ができていた。

30

A I M - V 容器 10 L バッグ。

【2186】

$3000 \text{ IU} / \text{mL}$ で C M 4 の 1 つの 10 L バッグを調製するために必要な I L - 2 の体積を計算した： $(10000 \text{ mL} \times 3000 \text{ IU} / \text{mL} = \text{バッグで } 30 \times 10^6 \text{ IU})$
→ 移す I L - 2： $30 \times 10^6 \text{ UI} / \text{I L - 2 比活性}$ 。

【2187】

I L - 2 の必要な総体積を計算する：バッグによる I L - 2 の体積 $\times$ A I M - V の 10 L バッグの数 (A) = _____ mL $\times$ _____ mL (小数第 1 位)。

【2188】

必要なシリンジ数の数を計算した：I L - 2 の総体積 / シリンジ当たりの体積 = _____ mL / 1 mL = _____ シリンジ (複数可) (整数に切り上げた)。

40

A I M - V 容器 1 L ボトル (C M 4 の 1 つのバッグ = 10 本の 1 L の A I M - V ボトル)

【2189】

1 つの 10 L バッグを調製するために必要な I L - 2 の体積を計算した ($10000 \text{ mL} \times 3000 \text{ IU} / \text{mL} = \text{バッグで } 30 \times 10^6 \text{ IU}$)、移す I L - 2： $30 \times 10^6 \text{ UI} / \text{I L - 2 比活性} = 10 \text{ L の A I M - V バッグによる}$ _____ mL の I L - 2 (小数第 1 位)。

【2190】

I L - 2 の必要な総体積を計算する：バッグによる I L - 2 の体積 $\times$ 10 L の C M 4 バ

50

ッグの数 (n) = _____ mL × _____ mL (小数第 1 位)。

第 2 : 1 mL の WFI と再構成する IL-2 Akron 粉末

【2191】

AIM-V 容器 10 L バッグ

【2192】

3000 IU/mL において CM4 の 1 つの 10 L バッグを調製するために必要な IL-2 の mg の数を計算した (10000 mL × 3000 IU/mL = バッグによる 30×10^6 IU) 30×10^6 IU / IL-2 比活性 - 10 L の AIM-V バッグによる _____ mg の IL-2 (小数第 1 位)、移す IL-2 (1 mg = 1 mL) = 10 L の AIM-V バッグによる _____ mL の IL-2 (小数第 1 位)。

【2193】

IL-2 の必要な mg の総数を計算した : バッグによる IL-2 の mg の数 × AIM-V の 10 L バッグの数 (A) = _____ mg × _____ = _____ mg (小数第 1 位)

。

【2194】

必要なバイアルの数を計算した (1 つのバイアルが 1 mg を含む) : _____ 個のバイアル (複数可) (整数に切り上げた)。

AIM-V 容器 1 L ボトル (CM4 の 1 つのバッグ = 10 本の 1 L の AIM-V ボトル

【2195】

3000 IU/mL において CM4 の 1 つの 10 L バッグを調製するために必要な IL-2 の mg の数を計算した (10000 mL × 3000 IU/mL = バッグによる 30×10^6 IU) 30×10^6 IU / IL-2 比活性 = 10 L の CM4 バッグによる _____ mg の IL-2 (小数第 1 位)、移す IL-2 (1 mg = 1 mL) = 10 L の CM4 バッグによる _____ mL の IL-2 (小数第 1 位)。

【2196】

IL-2 の必要な mg の総数を計算した : バッグによる IL-2 の mg の数 × CM4 の 10 L バッグの数 (n) = _____ mg × _____ = _____ mg (小数第 1 位)。

【2197】

必要なバイアルの数を計算した (1 つのバイアルが 1 mg を含む) : _____ 個のバイアル (複数可) (整数に切り上げた)。

最後 : 2 mL の酢酸と再構成する IL-2 Cellgenix 粉末

【2198】

AIM-V 容器 10 L バッグ

【2199】

3000 IU/mL において CM4 の 1 つの 10 L バッグを調製するために必要な IL-2 の mg の数を計算した (10000 mL × 3000 IU/mL = バッグによる 30×10^6 IU) 30×10^6 IU / IL-2 比活性 - 10 L の AIM-V バッグによる _____ mg の IL-2 (小数第 1 位)、移す IL-2 (1 mg = 1 mL) = 10 L の AIM-V バッグによる _____ mL の IL-2 (小数第 1 位)。

【2200】

IL-2 の必要な mg の総数を計算した : バッグによる IL-2 の mg の数 × AIM-V の 10 L バッグの数 (A) = _____ mg × _____ = _____ mg (小数第 1 位)

。

【2201】

必要なバイアルの数を計算した (1 つのバイアルが 1 mg を含む) : _____ 個のバイアル (複数可) (整数に切り上げた)。

【2202】

AIM-V 容器 1 L ボトル (CM4 の 1 つのバッグ = 10 本の 1 L の AIM-V ボトル)

【2203】

10

20

30

40

50

3000 IU/mLにおいてCM4の1つの10Lバッグを調製するために必要なIL-2のmgの数を計算した(10000 mL×3000 IU/mL=バッグによる30×10⁶ IU) 30×10⁶ IU/IL-2比活性=10LのCM4バッグによる____mgのIL-2(小数第1位)、移すIL-2(1mg=1mL)=10LのCM4バッグによる____mLのIL-2(小数第1位)

【2204】

IL-2の必要なmgの総数を計算した：バッグによるIL-2のmgの数×CM4の10Lバッグの数(n)=____mg×____=____mg(小数第1位)

【2205】

必要なバイアルの数を計算した(1つのバイアルが1mgを含む)：____個のバイアル(複数可)(整数に切り上げた)

10

【2206】

使用するIL-2についてはセクション1を参照されたい：Akron IL-2が事前充填されたシリンジ内にある場合、再構成はなく、セクション3に進んだ。Akron IL-2が粉末である場合、ステップ2.2に進み、再構成を進めた。Cellgenix IL-2が粉末である場合、ステップ11.7に進み、再構成を進めた。

【2207】

再構成するバイアルの数を記録した。10mLシリンジを使用してWFIボトルをスライクし、1mLのWFIを引き出した。18G針をシリンジに接続し、1mLのWFIをIL-2バイアル(複数可)の中に移した。バイアル(複数可)を2~3回反転させ、すべての粉末が溶解するまで旋回させた。発泡を回避し、激しく混合しなかった。必要な数のバイアルを再構成するためにこのステップを繰り返した(必要に応じて新しいシリンジを使用する)。hl BSCを使用するまで保管した。10LのAIM-Vバッグを使用する場合はセクション12、またはAIM-Vの1Lボトルを使用する場合はセクション4に進んだ。

20

【2208】

ポンプマティックピペットまたは18G針を伴う10mLシリンジを使用して、バイアル当たり2mLのHAcを引き出して再構成した。必要に応じて18G針をシリンジに接続し、2mLのHAcをバイアルの中に移した。バイアルを2~3回反転させ、すべての粉末が溶解するまで旋回させた。

30

【2209】

発泡を回避し、激しく混合しなかった。セクション1で必要な数のバイアルを再構成するためにこのステップを繰り返した。10mLのHAc当たり1つのポンプマティックピペットを使用して移した。使用までBSC内で保管した。10LのAIM-Vバッグを使用する場合はセクション3、またはAIM-Vの1Lボトルを使用する場合はセクション4に進んだ。

【2210】

AIM-V培地10Lバッグを用いたCM4培地調製。ルアーロックを介して第1の拡張セットを第1のCM4培地5Lバッグに接続した。各CM4培地5Lバッグでこのステップを繰り返した。BSCからCM4培地5Lバッグを取り出した。CM4培地としての5LのLabtainerバッグの識別。

40

【2211】

以下の数量は、調製するAIM-Vの10Lバッグの数Aで乗算される必要があった。以下をBSCの中に移した：以下の量は、総体積の調製のためのAIM-Vの10Lバッグの数Aで乗算される必要があった。AIM-Vの10LバッグをCM4プール培地番号としてラベル付けした。

【2212】

適切な容積のシリンジ及び18G針を使用して、1つの10Lバッグのために必要な体積のIL-2を引き出し(セクション5を参照)、GlutaMAX 1の中に移した。追加を示すためにボトルをマークした。調製されるであろう10LのAIM-Vバッグの

50

数に従って必要な G l u t a M A X の各ボトルでこのステップを繰り返した。各 10 L の A I M V バッグ当たり G l u t a m a x + I L - 2 の 1 本のボトルが使用されるであろう。

【2213】

適切なサイズのシリンジ及び流体分注コネクタを使用して、I L - 2 のセクション 5 で計算された体積を事前充填されたシリンジから G l u t a M A X 1 の中に移した。追加を示すためにボトルをマークした。調製されるであろう 10 L の A I M V バッグの数に従って必要な G l u t a M A X の各ボトルでこのステップを繰り返した。各 10 L の A I M V バッグ当たり G l u t a m a x + I L - 2 の 1 本のボトルが使用されるであろう。

【2214】

第 1 の C M 4 プール培地バッグを B S C の中に移した。第 1 の C M 4 プール培地を 4 インチ血漿移送セットでスパイクし、ルアーロックを介して拡張セットを取り付けた。C M 4 プール培地の各バッグでこのステップを繰り返した。

【2215】

以下を B S C の中に移した：ポンプブーツ（1）。ポンプブーツを C M 4 プール培地 1 に接続した。

【2216】

ポンプブーツを A c a c i a ポンプに入れ、パラメータを設定した。

【2217】

B S C では、ポンプブーツの残りの端部をポンプマティックピペットに接続した。ポンプ付きピペットを使用して、1 本の G l u t a M A X ボトルの内容物全体を 1 つの C M 4 プール培地バッグの中に移した。完了すると、調製された各バッグをマークした。すなわち、G l u t a M A X 1 が C M 4 プール培地バッグ 1 の中に移されるなどである。C M 4 プール培地の各バッグについて、このステップを繰り返した。

【2218】

C M 4 培地バッグに滅菌溶接した。速度 100 R P M を使用して、C M 4 培地につながるラインを手動でブライミングした。C M 4 培地バッグを天秤及び釣合い錘の上に置いた。A c a c i a ポンプのパラメータを設定した。4900 ± 10 m L の培地を C M 4 プール培地バッグから C M 4 培地バッグにポンプで注入した。体積を記録した。クランプを閉じ、熱融着して、充填された C M 4 培地バッグを取り出した。2 つの C M 4 培地バッグを充填した後、各 C M 4 プール培地を熱融着した。滅菌性試験のために保持した。残りの C M 4 培地バッグについて繰り返した。滅菌性番号としての C M 4 プール培地バッグの識別。

【2219】

各 C M 4 培地バッグに追加された C M 4 の体積を記録した。バッグを 2 ~ 8 °C で保管した。

【2220】

A I M - V 培地の 1 L ボトルを用いた C M 4 培地調製。以下の数量は、調製する C M 4 バッグの数で乗算される必要があった。

【2221】

適切な容積のシリンジ及び 18 G 針を使用して、1 つの 10 L バッグのために必要な体積の I L - 2 を引き出し（セクション 1 を参照）、G l u t a M A X 1 のボトルの中に移した。調製されるであろう C M 4 プール培地バッグの数に従って必要な G l u t a M A X の各ボトルでこのステップを繰り返した。各 C M 4 プール培地バッグ当たり G l u t a m a x + I L - 2 の 1 本のボトルが使用されるであろう。

【2222】

適切なサイズのシリンジ及び流体分注コネクタを使用して、I L - 2 のセクション 1 で計算された体積を事前充填されたシリンジから G l u t a M A X 1 の中に移した。調製されるであろう C M 4 プール培地バッグの数に従って必要な G l u t a M A X の各ボトルでこのステップを繰り返した。各 C M プール培地バッグ当たり G l u t a m a x + I L -

10

20

30

40

50

2の1本のボトルが使用されるであろう。

【2223】

第1のCM4プール培地バッグをBSCの中に移した。必要に応じて、拡張セットをCM4プール培地に取り付けた。ポンプブーツをBSCの中に移した。ポンプブーツをCM4プール培地に接続した。

【2224】

ポンプブーツをAcciaポンプに入れ、パラメータを設定した。ポンプブーツの残りの端部をポンプマテックピペットに接続した。ポンプ付きピペットを使用して、1つのGlutaMAX++IL-2 1の内容物全体を1つのCM4プール培地バッグにポンプで注入した。AIM-Vの10本の1Lボトルで継続した。すべてのCM4プール培地バッグについて繰り返し、必要に応じて延長セットを追加した。完了すると、調製された各バッグをマークした。すなわち、GlutaMAX 1がCM4プール培地バッグ1の中に移されるなどである。拡張セットをすべてのCM4培地バッグに取り付けた。赤色キャップを伴うポンプブーツの端部をCM4培地バッグ上に滅菌溶接した。速度100RPMを使用して、CM4培地につながるラインを手動でプライミングした。

10

【2225】

CM4培地を天秤及び釣合い錘の上に置いた。Acciaポンプのパラメータを設定した。4900±10mLの培地をCM4プール培地バッグからCM4培地バッグにポンプで注入した。ステップ4.13で体積を記録した。クランプを閉じ、熱融着して、充填されたCM4培地バッグを取り出した。2つのCM4培地バッグを充填した後、各CM4プール培地を熱融着した。滅菌性試験のために保持した。残りのCM4培地バッグについてステップ4.8～4.10を繰り返した。

20

【2226】

滅菌性番号としてのCM4プール培地バッグの識別。滅菌性オプションをマークする：自社で滅菌性を試験する場合：20mLの培地を滅菌性番号バッグから取り出した。10mLを嫌気性BacT/Aler tボトルに接種し、10mLを好気性BacT/Aler tボトルに接種した。バッグは、試料採取後に廃棄することができた。試験のために送る場合：滅菌性番号バッグを2～8℃に置いた。滅菌性は、膜濾過による滅菌のために外部ベンダーに試料を送ることによって行われる。

30

【2227】

各CM4培地バッグに追加されたCM4の体積を記録した。2～8℃でバッグを保管した。

【2228】

PD-1で選択されたTILのプロセス16日目

CM4インキュベーションの開始時間及び日付を記録した。処理前の一晩のCM4培地バッグのインキュベーション。製造の開始時間を記録した。

【2229】

上清収集のために10LのLab tainerバッグ上のすべてのクランプを閉じた。バッグを上清とラベル付けした。ルアーを使用して、拡張セットを取り付けた。G-Rex 500MCSフラスコをインキュベーターから取り出し、GatheRexの隣に置いた。すべてのクランプが大型フィルターラインを除いて閉じられていることをチェックした。

40

【2230】

上清バッグをG-Rex上の赤色採取ラインに滅菌溶接した。EV1000NバッグまたはEXP-1Lを細胞画分(CF)としてラベル付けした。バッグの1つのラインを端部の近くで熱融着し、クランプを取り外した。CFバッグの乾燥重量を記録した。

【2231】

細胞画分(CF)バッグの識別。CFバッグをG-Rex 500MCS上の空のラインに滅菌溶接した。赤色ライン及び空のラインをGatheRexの対応するスロットに挿入した。GatheRexラインをG-Rex 500MCSのフィルターラインに接

50

続した。上清収集：上清バッグにつながるすべてのクランプを解放し、フラスコ体積を低減した。

【2232】

G a t h e R e x を始動させた。G a t h e R e x は、空気がラインに進入したときに停止するであろう。完了すると、クランプを閉じた。

【2233】

細胞画分収集

収集中に C F バッグを上清バッグの上に置いて保温した。代替的に、インキュベーター内で一晚調整された温かいパックの上に置いた。T I L 採取開始時間を記録した。

【2234】

フラスコを軽く叩き、培地を旋回させて、膜から細胞を解放し、すべての細胞が引き離されたかどうかをチェックした。ホースを傾けることによって、ホースがフラスコの縁にあり、流体中にあることを確実にした。次のステップの間に傾いた縁を維持した。

【2235】

C F バッグにつながるクランプを解放した。G a t h e R e x を始動させて、細胞画分を収集した。終了すると、クランプを閉じた。

【2236】

細胞収集ライン上のクランプを閉じ、赤色培地ライン上のクランプを開いた。以下のステップによって、より多くの細胞を逆洗し、C F バッグに移した。赤色ライン上のクランプを解放した。G - R e x 500 M C S 表面の底部の 1 / 3 を覆うために、十分な培地を重力によってフラスコに流入させた。クランプを閉じた。細胞が依然として膜に付着していた場合、逆洗ステップを繰り返し、細胞懸濁液バッグを反復逆洗からの空気で過剰に膨張させないように注意した。

【2237】

すべてのクランプを閉じ、赤色ライン及び空のライン上の以前のシール付近で熱融着した。C F バッグについては、乾燥重量がステップ 2 . 6 で記録されたときと同じ長さのチューブを残した。培養分割で再利用されないように、G - R e x 500 M C S を廃棄した。さらなる使用のために上清バッグを保持した。

【2238】

C F の体積を計算した。1 g は 1 m L に等しいと考慮した。

【2239】

10 m L シリンジを N I S ポートに取り付け、バッグを十分に混合し、1 m L を取り出した。C F の N I S ポートをアルコールワイプで拭いた。10 m L シリンジを N I S ポートに取り付け、バッグを十分に混合し、1 m L を取り出した。

【2240】

必要とされるまで C F バッグをインキュベーター内に移した。残りの細胞画分 (C F) の体積を計算した。

【2241】

N C - 200 上で生存率及び細胞数 l o v a n c e を使用して細胞計数を行った。必要に応じて、試料を A I M - V 中で希釈した (1 : 10 希釈が開始することを推奨された) 。希釈倍率を記録した。4 つすべての試料について繰り返し、以下のデータを記録した。注記 : N C - 200 のための最適な濃度範囲は、未希釈で $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞 / m L であった。この範囲外の計数は、メッセージでユーザーに指示するであろう。

【2242】

以下のように、4 つの計数の平均生細胞濃度及び生存率を計算した。(計数 1 + 計数 2 + 計数 3 + 計数 4) ÷ 4。マイコプラズマ試料のために 1×10^6 個の細胞を取り出すための C F の体積を計算した。

【2243】

3 本の 15 m L コニカルチューブをマイコプラズマ D 16 1 ~ 3 とラベル付けし、2 本の 15 m L コニカルチューブをマイコプラズマ D 16 参照 1 ~ 2 とラベル付けした。ラ

10

20

30

40

50

ベル上に試料採取日を含んだ。

【2244】

適切なサイズのシリンジを使用して、上記で決定された細胞画分の体積を取り出し（ステップ3.16）、マイコプラズマD16 1とラベル付けされたチューブの中に移した。マイコプラズマD16 2、マイコプラズマ016 3、マイコプラズマ参照D16 1、及びマイコプラズマ参照D16 2について、新しいシリンジを用いて試料採取を繰り返した。CFバッグをインキュベーターに戻して入れた。取り出された総体積を計算した。

【2245】

各マイコプラズマD16チューブが合計10mLを有するために必要な上清の体積を計算した。

10

【2246】

適切なサイズのシリンジを使用して、ステップ3.20で計算された上清バッグからの上清の体積を取り出し、マイコプラズマD16 1に移した。ステップ3.19で調製されたすべての残りのチューブについて繰り返した。

【2247】

BacT/Aler t 試料調製

適切なサイズのシリンジを使用して、上清バッグから10mLでシリンジを3回洗い流した。10mLの上清を取り出した。18G針をシリンジに取り付け、5mLを1本の嫌気性ボトルに、5mLを1本の好気性ボトルに注入した。

20

【2248】

播種するG-Rex 500MCSの数を計算した。残っている細胞画分の体積を計算した。残っている総生細胞を計算した。播種するG-Rex 500MCSの数を計算した。最も近い整数に切り上げた。播種するG-Rex 500MCSの数が5を超える場合、播種するG-Rex 500MCSの数は5であろう。5×10⁹超の細胞懸濁液は、すべてのフラスコ間で均等に分割されるであろう。各G-Rex 500MCSフラスコについて播種する細胞画分の体積を計算した。TILでG-Rex 500MCSフラスコ（複数可）を播種した。必要とされたG-Rex フラスコは、BSC内で開かれるものであった。ルアーロックが頑丈であり、任意のプラスチッククランプが大型フィルターラインを除いて閉じられていることを確実にした。新しいG-Rex フラスコにラベル付けした。

30

【2249】

細胞画分バッグをG-Rex 500MCSフラスコ上の赤色ラインに滅菌溶接した。バッグを吊るし、細胞画分バッグの定期的な混合を確実にした。G-Rex フラスコを分析天秤及び釣合い錘の上に置いた。ラインは、次のG-Rexの正味重量を量る前に第1のG-Rex上で一掃されなければならない、そうでなければ重量が正しくなかった。

【2250】

すべてのラインをクランプ解除し、重量による細胞画分の計算された体積（ステップ5.5）をG-Rex 500MCSフラスコ1の中に重力によって移した。1gをG-Rex 500MCSフラスコに移された1mLに等しいとみなす。フラスコに追加された細胞画分の量を記録した。必要な体積が重力によってG-Rex フラスコに移されると、G-Rexにより近いチューブ付近のクランプを閉じて、フラスコの中へのTILの追加を停止させた。ラインを一掃し、赤色チューブを熱融着し、必要に応じて次の溶接のために十分なチューブを保持した。G-Rexをインキュベーターに入れた。

40

【2251】

G-Rex 2、3、4、5：追加の新しいG-Rex 500MCSフラスコについては、播種と同じ操作を繰り返した。細胞懸濁液追加体積を記録した。TIL追加の終了時間を記録した。

【2252】

培地の追加

50

インキュベーターからCM4培地バッグ（複数可）を取り出した。ポンプブーツの一方の端部をCM4培地バッグに滅菌溶接した。ポンプブーツの他方の端部をG-Rex 500 MCSの赤色ラインに滅菌溶接し、CM4を吊るした。

【2253】

ポンプチューブを設定し、以下の設定でポンプをプログラムした：プログラム：体積、速度300 rpm。5000 mLマークにおいてG-Rex 500 MCSフラスコの目盛り上にマークした。目盛り上のマークまでCM4をフラスコにポンプで注入した。フラスコを熱融着し、取り出した。37℃及び5%CO₂におけるインキュベーターに入れた。残りのフラスコについて繰り返した。インキュベーション開始の時間（最後のフラスコをインキュベーターに入れた時間）、温度、及びインキュベーターのCO₂読取値を記録した。

10

【2254】

PD-1で選択されたTILのプロセス22日目

洗浄緩衝液の調製（1%HAS/PlasmaLyte A）5 LのLabtainer上のすべてのクランプを閉じ、PlasmaLyte 1% HSA洗浄緩衝液として識別した。調製された洗浄緩衝液は、1日で有効期限が切れる。

【2255】

ルアー接続を使用して、拡張セットを5 LのLabtainerバッグに取り付けた。各HSAボトルをミニスパイクでスパイクし、適切なサイズのシリンジを使用して、125 mLの25% HSAを5 LのLabtainerに移した。追加された体積を記録した。ポンプブーツを5 LのLabtainerに取り付けられた拡張セットに滅菌溶接した。4S-4M60または同等のハーネス上のすべてのクランプを閉じた。PlasmaLyteの1 Lバッグの各々をスパイクした。BSCからPlasmaLyteバッグを取り出し、PlasmaLyteバッグからポンプブーツの残りの端部までハーネスの反対側の接続を滅菌溶接した。PlasmaLyteバッグにつながるすべてのクランプを開き、体積全体を5 LのLabtainerにポンプで注入した。追加された体積を記録した。ラインを熱融着し、5 LのLabtainerを取り出した。将来の溶接のために十分なラインを残した。

20

【2256】

PlasmaLyte 1% HSA洗浄緩衝液をBSCの内側に戻して置いた。50 mLシリンジを使用して、50 mLの洗浄緩衝液をCS750バッグに移した。クライオバッグを、製造ロット番号、イニシャル、及び日付とともにLOVO洗浄緩衝液を含むブランクとしてラベル付けした。洗浄緩衝液は、再び必要とされるまで室温でBSCの外側に保管され得る。

30

【2257】

IL-2を新たに調製するか、または事前に調製するかどうかを選択した。

【2258】

適切なサイズのシリンジを使用して、40 mLの洗浄緩衝液を、IL-2 6×10^4 IU/mLとラベル付けされた50 mLコニカルチューブの中に移した。このチューブをIL-2調製のためにBSC内で保持した。

40

【2259】

IL-2調製（Proleukin）

IL-2バイアルのラベルから以下の情報を記録した。製造業者の指示に従ってIL-2を再構成した。使用の準備が整うまで、再構築されたIL-2を2～8℃で保管した。

【2260】

洗浄緩衝液に追加する再構成されたIL-2の体積を計算した。注記： 6.0×10^4 IU/mL $\times$ 40 mL = 2.4×10^6 IU

【2261】

シリンジ及び針を使用して、上記で計算された再構成されたIL-2の体積を取り出し、IL-2 6×10^4 IU/mLとラベル付けされた50 mLコニカルチューブに移し

50

た。

【2262】

採取前の調製

処理されるであろう G-Rex 500 MCS フラスコの数記録した。フラスコのすべてから上清を収集するために必要な 10 L の Lab tainer の数を計算し、最も近い整数に切り上げた。

【2263】

細胞懸濁液を採取するために必要であろう EV3000N、EXP-3L、または同等のバッグの数を決定した。2 本以下のフラスコは、1 つのバッグを必要とする。3～4 本のフラスコは、2 つのバッグを必要とする。5 本のフラスコは、3 つのバッグを必要とする。2 本を超えるフラスコを単一のバッグの中に採取しなかった。注記：EV3000N または EXP-3L バッグを過剰充填せず、最大充填体積は 2000 mL であった。10 L の Lab tainer 上のクランプを閉じ、ルアー接続によって拡張セットを各 Lab tainer に取り付け、印刷されたラベルまたはマーカーを用いてバッグを上清とラベル付けした。2 つ以上の 10 L の廃棄物 Lab tainer が使用される場合、第 2 の Gatherex ポンプが同時に使用され得る。第 1 の G-Rex 500 MCS が減容されている間に、次のフラスコが減容のために準備され得る。

【2264】

LOVO を用いた G-Rex 500 MCS 採取及び細胞濃度。第 1 の G-Rex 500 MCS フラスコからの細胞採取の開始時間を記録した。

【2265】

Gatherex を使用して、G-Rex 500 MCS フラスコから上清を取り出し、G-Rex 500 MCS フラスコを旋回させて細胞を膜から引き離した。細胞収集プールにつながるクランプを解放した。Gatherex を始動し、空のラインを介してセルを収集し始めた。細胞収集が進行している間にフラスコを穏やかに攪拌して、細胞を懸濁状態で保った。収集ストローがフラスコの角に位置付けられ、そこで細胞懸濁液のすべてを収集し得るように、フラスコを傾いた状態で維持した。細胞収集が完了すると、空のライン上のクランプを閉じた。

【2266】

逆洗に進んだ：赤色ライン上のクランプを解放した。G-Rex 500 MCS の底部の 1/3 を覆うために、十分な培地を重力によってフラスコに流入させた。赤色ライン上のクランプを閉じ、フラスコを激しく叩いて旋回させ、細胞を解放した。細胞分画を細胞収集プールに移した。細胞が依然として膜に接着されている場合、逆洗ステップを繰り返した。細胞懸濁液バッグを空気または生成物で過剰に膨張させないように注意した。

【2267】

すべての G-Rex 500 MCS フラスコが採取される（減容され、細胞が収集される）まで繰り返した。

【2268】

5 本の 15 mL コニカルチューブを以下のようにラベル付けした。

上清-マイコプラズマ 1

上清-マイコプラズマ 2

上清-マイコプラズマ 3

上清-マイコプラズマ参照 1

上清-マイコプラズマ参照 2

【2269】

50 mL シリンジを使用して、下記の試料採取計画に従って 50 mL の上清を上清バッグ（複数可）から取り出し、試料を取得した。

【2270】

10 mL の上清を各 15 mL コニカルチューブに等分した。QC に移されるまで 2～8 °C で保管した。上清バッグ（複数可）を廃棄した。移送の完了時に、すべてのクランプを

10

20

30

40

50

閉じ、L O V Oソースバッグを熱融着し、他のチューブポート上のマークをガイドとして使用して、チューブの長さが乾燥重量を量ったときとほぼ等しいことを確実にした。

【2271】

細胞懸濁液を含むL O V Oソースバッグの重量を量った。細胞画分体積（C F）を計算した。1 gを1 mLに等しいとみなした。

【2272】

L O V Oソースバッグを十分に混合した。10 mLシリンジを使用して、N I Sを介して1 mLの細胞画分を取り出し、1.8 mLクライオバイアルに移した。各アリコートに新しい10 mLシリンジを使用して、次の3つのクライオバイアルについて繰り返した。クライオバイアルを1～4とラベル付けした。L O V Oソースバッグをインキュベーターに入れた。インキュベーター及び時間を記録した。

10

【2273】

4つの1 mL試料を取り出した後、L O V Cソースバッグ内の体積を再計算した。

【2274】

必要に応じて、試料をA I M - V中で希釈した（1：10希釈が開始することを推奨された）。希釈倍率を記録した。4つすべての試料について繰り返し、以下のデータを記録した。注記：N C - 200のための最適な濃度範囲は、未希釈で $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞/mLであった。この範囲外の計数は、メッセージでユーザーに指示するであろう。

【2275】

4つの計数の平均（計数1 + 計数2 + 計数3 + 計数4）/ 4、平均総生細胞濃度を計算した。平均総細胞濃度平均生存率（%）

20

【2276】

（L O V O前の）全細胞の数を計算した：平均総細胞濃度 × L O V Oソースバッグの体積

【2277】

（L O V O前の）総生細胞を計算した：平均総生細胞濃度 × L O V Oソースバッグの体積

【2278】

いくつかの実施形態では、全細胞が 5×10^9 を超えた場合、M D A保持試料として凍結保存される 5×10^8 個の細胞を取り出した。 5×10^8 / 総細胞濃度 = 取り出す体積。全細胞が 5×10^9 であった場合、M D A保持試料として凍結保存凍結保存される 4×10^6 個の細胞を取り出した。 4×10^6 / 総細胞濃度 = 取り出す体積。適切なサイズのシリンジを使用して、L O V Oソースバッグから必要な体積を取り出し、M D A保持とラベル付けされた50 mLコニカルチューブに入れた。凍結保存ステップまでインキュベーター内で保持した。

30

【2279】

L O V Oソースバッグに残っている体積を計算した。L O V Oソースバッグの体積 - M D A保持バイアルのために取り出された体積 = L O V Oソースバッグに残っている体積。

【2280】

L O V Oソースバッグに残っている全細胞が 150×10^9 を超えるかどうかを決定した。L O V Oソースバッグに残っている体積 × 総細胞濃度 = L O V Oソースバッグに残っている全細胞。

40

【2281】

150×10^9 個の生細胞を保持するために取り出す細胞の体積を計算した。L O V Oソースバッグに残っている全細胞 - 150×10^9 個の細胞 = L O V Oソースバッグから取り出す細胞の数

【2282】

L O V Oソースバッグから取り出す細胞の体積を計算した。L O V Oソースバッグから取り出す細胞の数 / 細胞総濃度（ステップ5.23） = L O V Oソースバッグから取り出す細胞の体積。

50

【2283】

適切なサイズのシリンジを使用して、計算された細胞懸濁液の体積を取り出し、廃棄した。

【2284】

LOVOソースバッグに含まれる細胞画分の残りの体積を計算した。LOVOソースバッグの元の体積－ 150×10^9 個の生細胞を保持するために取り出された体積＝LOVOソースバッグに残っている体積

【2285】

LOVOソースバッグをインキュベーターに戻して入れた。インキュベーターID及び時間を記録した。10LのLabtainerをLOVO廃棄物とラベル付けし、クランプを閉じ、ルアー接続を介して拡張セットを取り付けた。LOVOデバイス上のスイッチを入れ、処理のための指示に従った。LOVO実行の終了。

10

【2286】

IL-2追加

18G針を3mLシリンジに接続した。選択されたIL-2 6×10^4 IU/mLから上記でマークされたIL-2の体積を引き上げた。シリンジから針を取り外し、バッグ上のNISを介してシリンジをLOVO後のFCFに移した。シリンジを3回洗い流して、すべてのIL-2が生成物に追加されていることを確実にした。空気でラインを一掃した。追加されたIL-2の体積を記録した。

【2287】

IL-2がLOVO後のFCFに追加されると、残りのコネクタのうちの1つに溶接することによって、LOVO後のFCFをハーネスに取り付けた（ステップ7.7の図を参照）。マニホールドのクランプを保持した。

20

【2288】

最終製剤

50mLコニカルチューブをFCF保持とラベル付けした。100mLシリンジをマニホールド／活栓に取り付け、LOVO後のFCFに追加するCS10の体積を引き上げた。CS10をLOVO後のFCFバッグに分注した。該当する場合、MDA保持バイアルのために残りのCS10を保持した。CS10が分注を終了した時間を記録した。LOVO後のFCFに追加されたCS10の体積を記録した。

30

【2289】

DPバッグ当たり追加されるFCF体積、ならびにDPバッグ当たり取り出される保持体積を検証した。一度に単一のバッグを操作した。マニホールド上のシリンジを取り外し、それを新品の100mLシリンジと交換した。すべてのクランプをLOVO後のFCFの方向に開き、細胞生成物を十分に混合し、適切な体積の細胞懸濁液をシリンジに引き込んだ。LOVO後のFCFにつながるクランプを閉じ、それらをDPバッグ1の方向に開いた。シリンジの内容物をDPバッグ1に分注した。DPバッグ1を十分に混合し、保持する適切な量の細胞懸濁液を引き上げ、バッグからすべての過剰な空気を除去した。シリンジ内の体積を、FCF保持とラベル付けされた50mLコニカルチューブに分注した。取り出された体積を記録した。DPバッグ1にちかい微細部を三重に熱融着し、中間シールを切断し、BSCからDPバッグ1を取り出した。残りのDPバッグについて繰り返した。

40

【2290】

50mLコニカルチューブをLOVO後のFCFとしてラベル付けした。10mLシリンジを用いてLOVO後のFCFのすべての残りの体積を引き上げ、LOVO後のFCFとラベル付けされたチューブの中に移した。これは、サテライトバイアルを作成するために使用される。

【2291】

凍結実行の開始。すべてのクライオバッグ及び適用可能なクライオバイアルを冷凍庫の内側に置き、CRFへのドアを閉じ、冷凍庫の条件を記録した。試料温度が $8 \pm 1^\circ\text{C}$ に達

50

するまで待ち、チャンバー温度が $4 \pm 1^\circ\text{C}$ に達するまで待ち、次いで、実行を押してプログラムを開始した。開始時間を記録した。C S 1 0 内の細胞について経過した時間を計算した。

【2292】

最終細胞製剤数及び生存率

F C F 試料が計数されるための希釈液を調製した。1 : 1 0 0 希釈が推奨された。(2 つの 1 : 1 0 連続希釈液を用いて調製した)。N C 2 0 0 のための最適な範囲は、 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 細胞 / mL であった。

【2293】

N C - 2 0 0 で生存率及び細胞数 l o v a n c e プロトコルを使用した。4 つすべての T I L 試料で細胞計数を行った。試料及び希釈液の体積が各試料実行で記録されていることを確実にした。

【2294】

4 つの計数の平均を計算した：(計数 + 計数 2 + 計数 3 + 計数 4) / 4、平均総生細胞濃度 (生)、平均総細胞濃度 (生 + 死)、平均生存率 (%)。

【2295】

生細胞の数を計算した。生細胞濃度 $\times$ F C F の体積 (バッグの数 $\times$ バッグの体積)。

【2296】

全細胞の数を計算した：総細胞濃度 $\times$ F C F の体積 (バッグ数 $\times$ バッグの体積)

【2297】

C R F 実行の完了

核形成が存在し、温度が 0°C を超えないことを検証した。凍結実行が完了すると、バイアル及びバッグを即時に L N 2 貯蔵タンクに移した。

【2298】

現在のプロセス G E N 3 中の T I L 集団による I F N - γ 分泌の測定

22 日目における現在のプロセス G e n 3 中の T I L による I F N - γ 分泌。

【2299】

以下の表は、現在のプロセス G e n 3 中の様々な日における T I L 集団による I F N - γ 分泌の測定結果を示す。表 5 2 (以下)。

【表 5 2】

ロット番号	プロセス日	結果
W329020207363	D22	5428.25 pg/mL

【2300】

実施例 7：フルスケール製造のための P D - 1 + T I L の選択及び増殖
序論

自己腫瘍浸潤リンパ球 (T I L) を用いた養子 T 細胞療法は、転移性黒色腫患者のコホートにおいて持続的な奏効率を実証している (Rosenberg, S. A., et al., Clin Cancer Res, 2011. 17 (13): p. 4550-7)。治療に使用される T I L 産物は、腫瘍特異的抗原、変異由来の患者特異的新抗原、及び非腫瘍関連抗原を認識する異質 T 細胞で構成されている (Kvistborg, P., et al., Oncoimmunology, 2012. 1 (4): p. 409-418、Simoni, Y., et al., Nature, 2018. 557 (7706): p. 575-579)。研究は、新抗原特異的 T 細胞が T I L の抗腫瘍活性に大きく寄与することを実証している (Schumacher, T. N. and R. D. Schreiber, Science, 2015. 348 (6230): p. 69-74)。腫瘍反応性について T I L を濃縮する方略は、特にバイスタンダー T 細胞を高い割合で含むことが知られている上皮癌において、より強力な治療薬を生み出すことが期待されている (Turcotte, S., et al., J Immunol, 2013. 191 (5): p. 2217-25)。いくつかの研究は、T I L での T 細胞枯渇に関連することが多

いマーカーであるPD-1の発現が、自己腫瘍反応性T細胞を同定することを実証している(Inozume, T., et al., J Immunother, 2010. 33 (9): p. 956-64、Gros, A., et al., J Clin Invest, 2014. 124 (5): p. 2246-59、Thommen, D. S., et al., Nat Med, 2018)。この実施例は、PD-1陽性(PD-1+)細胞を選択して、自己腫瘍反応性T細胞のTIL産物を濃縮するように設計されたプロトコルを提供する。

【2301】

この実施例は、PD-1+TILを選別し、増殖させるための臨床規模製造プロトコルを提供する。例えば、図28を参照されたい。

10

【2302】

この実施例は、2-REPプロトコル(例えば、本明細書に記載されるGEN3ベースのプロトコル)を使用して、黒色腫、肺癌、及び頭頸部癌から選別されたPD-1+TILを増殖させることに関する作業を詳述する。増殖されたTILは、細胞増殖、生存率、表現型、テロメア長、及び機能(IFN γ 及びグランザイムB分泌、CD107a動員)について評価される。

【2303】

このプロトコルは、以下のような実験の2つのフェーズを含むであろう。

【2304】

フェーズ1：TIL増殖プロセスを臨床規模にスケールアップ及び最適化するための実現可能性研究(図29参照)。

20

【2305】

フェーズ1は、PD-1+TILがPD1+で選択されたGen 2プロセス「PD1+Gen 2」において十分に増殖すること確実にするために行われるであろう(図1)。小規模培養は、PD-1+で選択されたTIL、PD-1-で選択されたTIL、及びバルクCD3+TILで行われるであろう。

【2306】

加えて、研究プロトコル、合成培地(CTS Optimizer+3%SR)、及び17日間の初期REPプロセス(REP2開始及び分割のための短縮された時点を伴う)が試験されるであろう。関連する時点の簡単な説明は、以下の方法のセクションで概説されている(図28)。

30

【2307】

フェーズ2：PD1+で選択されたGen 2プロセス(選択及び増殖)を臨床製造のためにフルスケールで試験する(図2)。

【2308】

3つのフルスケールのPD1+で選択されたGen 2プロセス培養が、0日目を除き、製造バッチ記録毎にPD-1+で選択されたTILで行われるであろう。0日目については、腫瘍処理及び断片化ステップのみがBR毎に従われるであろう。11日目のREP、16日目のスケールアップ、及び22日目の採取は、添付資料2~4に記載されるIOVA製造バッチ記録毎に行われるであろう。

40

【2309】

0日目に、腫瘍消化物が、中性プロテアーゼ、DNase I、及びコラゲナーゼを含むGMP消化カクテルを使用して単離されるであろう。消化物は、PD-1+TILを精製するために洗浄、染色、及び流動選別されるであろう。

【2310】

REP 1は、100e6同種フィーダー細胞及び30ng/mLのOKT3とともに精製されたPD-1+TILを11日間使用して、0日目に開始されるであろう。

【2311】

REP 2は、採取されたREP1産物を使用して11日目に開始されるであろう。REP 2(11日目)ならびにそれに続く16日目及び22日目のプロセスは、添付資料

50

2～4に記載されるIOVA製造バッチ記録毎に行われるであろう。関連する時点の簡単な説明は、以下の方法のセクションで概説されている（図30）。

【表53】

表53：主要な用語及び略語

ACT	養子細胞移植
BSC	生物学的安全キャビネット
CD	分化抗原群
EDTA	2, 2', 2'', 2' ' ' - (エタノール-1, 2-ジイルジニトリロ) テトラ酢酸
FACS	蛍光活性化細胞選別機
FBS	ウシ胎児血清
FMO	蛍光マイナス1
FITC	フルオレセインイソチシアネート
GEN2	第2世代 (IOVANCE TIL増殖プロトコル)
PD1+GEN 2	PD1+で選択されたGEN 2
IL-2	インターロイキン-2
HL	マイクロリットル
MIN	分
OKT3	抗CD3抗体
PD-1	プログラムされた死受容体1
PE	フィコエリトリン
REP	急速増殖プロトコル
ETOH	エタノール
SR	CTS免疫細胞血清代替物

10

【2312】

材料

腫瘍組織

様々な組織構造が受容される。

20

【2313】

以下を含むTIL増殖用の標準試薬：

G-Rex 5M、10M、100M、及び500 MCSフラスコ（それぞれ、Wilson Wolf、カタログ番号80055S、80110S、81100、85500S-CS）

【2314】

GMP組換えIL-2 (Cell-Genix、Germany、カタログ番号1020-1000)

【2315】

CM1、CM2、及びCM4用の培地試薬。

30

【2316】

CTS Optimizer + 3% SR用の合成培地試薬

【2317】

CTS Optimizer SFM (ThermoFisher、カタログ番号A1048501)

【2318】

GlutaMAX 100X (ThermoFisher、カタログ番号35050061)

【2319】

ゲンタマイシン50mg/mL (ThermoFisher、カタログ番号15750060)

40

【2320】

CTS (商標) 免疫細胞SR (ThermoFisher、カタログ番号A2596101)

フローサイトメトリー染色及び分析試薬

【2321】

フローサイトメトリー抗体：

●抗PD-1 PE、クローンEH12.2H7、BioLegend、カタログ番号329906

50

●抗CD3 FITC、クローンOKT3、Biolegend、カタログ番号317306

●抗IgG4 Fc-PE、クローンHP6025、Southern Biotech、カタログ番号9200-09

【2322】

選別緩衝液：2% FBSを含むHBSS、滅菌濾過されている。

【2323】

収集緩衝液：hAB血清。

【2324】

手順

腫瘍の調製

腫瘍の処理。

【2325】

新たに切除された腫瘍試料が、研究提携及び組織調達ベンダーから受容されるであろう。腫瘍は、HypoThermosol (Biolyfe Solutions、Washington、カタログ番号101104) (抗生物質を含む) で一晩輸送される。

【2326】

パッケージから腫瘍を取り出し、腫瘍洗浄緩衝液 (50 µg/mLのゲンタマイシンを含む濾過されたHBSS) で1回の洗浄当たり2分間、3回洗浄する。

【2327】

腫瘍消化のための調製において腫瘍全体を4~6 mmの断片に断片化する。10 mLの腫瘍洗浄緩衝液を含む6ウェルプレートのウェル内で6 mmの断片を保持する。

【2328】

腫瘍消化のための酵素の調製

フェーズ1研究については、腫瘍が、調製された研究グレードのDNase、コラゲナーゼ、及びヒアルロニダーゼを使用して消化されるであろう。

【2329】

フェーズ2研究については、腫瘍は、以下に記載されるように、GMPコラゲナーゼ及び中性プロテアーゼを使用して消化されるであろう。

【2330】

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。

【2331】

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/バイアルの濃度である。したがって、再構成後、コラゲナーゼストックは、289.2 PZ U/mLである。**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確認し、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ことに留意されたい**。100 µLのアリコートに等分し、-20°Cで保存する。

【2332】

中性プロテアーゼ (Nordmark, Sweden、N0003553) を1 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、175 DMC U/バイアルの濃度である。したがって、再構成後、中性プロテアーゼストックは、175 DMC/mLである。**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確認し、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ことに留意されたい**。20 µLのアリコートに等分し、-20°Cで保存する。

【2333】

DNase I (Roche, Switzerland、03724751) を1 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、4 KU/バイアルの濃度

10

20

30

40

50

である。したがって、再構成後、DNAseストックは、4 KU／バイアルである。＊＊
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確認し、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ことに留意されたい＊＊。25
0 uLのアリコートに等分し、-20℃で保存する。

【2334】

GMP消化カクテルの3つの構成要素を解凍し、以下のように作業用GMP消化カク
テルを調製する：10.2 μLの中性プロテアーゼ（0.36 DMC U／mL）、21
.3 μLのコラゲナーゼAF-1（1.2 PZ／mL）、及び250 μLのDNAse
I（200 U／mL）を4.7 mL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。

【2335】

腫瘍の処理及び消化

GentleMACS OctoDissociatorに、上記に示される5 mLの
消化カクテルにおいて、最大（4つの）6 mm腫瘍断片を各GentleMACS Cチ
ューブ（Cチューブ）に移した。追加の腫瘍断片には、追加のGentleMACS C
チューブを使用する。

【2336】

各CチューブをGentleMACS OctoDissociatorに移す。表5
4で以下に列挙されるそれぞれの腫瘍組織学のための適切なプログラムに解離機を設定す
ることによって消化する。解離は、およそ1時間であろう。

【表54】

表54. 腫瘍組織型に基づくMiltenyi OctoDissociatorプログラ
ム。

腫瘍組織型	指定	プログラム
黒色腫、卵巣、結腸、下咽頭、及び腎臓	軟らかい	37C_h_TDK_1
肺及び前立腺	中程度	37C_h_TDK_2
乳房、脾臓、肝細胞、頭頸部扁平上皮細胞 (HNSCC)	固い	37C_h_TDK_3

【2337】

表53：消化後、OctodissociatorまたはローテーターからBSCの中
にCチューブ（複数可）を取り外す。25 mL血清学的ピペットを用いて各Cチューブか
ら消化物を取り出し、70 μm細胞ストレーナーにとおして50 mLコニカルチューブの
中にバルク消化物を通過させる。腫瘍の消化されていない部分は、ストレーナーを通過し
ない場合があり、ピペッターからの圧力により消化物を跳ね上がらせない。さらに10 m
LのHBSSを用いてCチューブ（複数可）を洗浄し、洗浄液を細胞ストレーナーに通過
させる。HBSSを用いて50 mLコニカルを50 mLに適量にする。

【2338】

消化物を室温において400×Gで5分間遠心分離する（全加速及び全ブレーキ）。

【2339】

コニカルをBSCに移し、上清を吸引またはデカントする。ペレットを5 mLの温かい
CM-1+6000 IU／mLのIL-2中で再懸濁させ、上下に5～6回ピペット操作
する。LAB-056に従って、希釈せずにNC-200で2回の細胞計数を行う。

【2340】

CD3+バルク対照用に1 mLの消化物を脇に置き、腫瘍反応性アッセイ用に消化物の
2つの500 uLアリコートを凍結保存する。氷上で消化物を保管する。

【2341】

フローサイトメトリー分析及び細胞選別のための消化された腫瘍の染色

PE FMO用の少量の試料（約1e5細胞）を、15 mLコニカルチューブの中にと
っておく。

【2342】

残りの腫瘍消化物は、以下のプロトコルに従って、染色PD-1-PE、抗IgG4

10

20

30

40

50

Fc-PE（ニボルマブ及びペンブロリズマブの二次抗体）、ならびにCD3-FITCを含むカクテルで染色される。FMO試料は、CD3-FITCのみで染色されるであろう。

【2343】

細胞計数後、10 mLのHBSSを消化物に追加し、室温において400×Gで5分間遠心分離する（全加速及び全ブレーキ）。

【2344】

コニカルをBSCに移し、上清をデカントする。マイクロピペッターを使用して、デカント後に残っている消化物の体積を取得する。この体積の選別緩衝液をチューブに3回追加する。取得された体積が150 µLである場合、600 µLの総体積のために450 µLの選別緩衝液を追加する。

10

【2345】

100 µL当たり3 µLの抗CD3-FITCを追加する（すなわち、体積が600 µLである場合、 $6 \times 3 = 18$ µLの抗体を追加する）。（両方の試料に追加する）。

【2346】

100 µL当たり2.5 µLの抗PD-1-PEを追加する（すなわち、体積が600 µLである場合、 $6 \times 2.5 = 12.5$ µLの抗体を追加する）。（FMOに追加しない）。

【2347】

1:500希釈で抗IgG4-Fc-PEを追加する（すなわち、500 µLの体積毎に、1 µLの抗体を追加する）。（FMOに追加しない）。

20

【2348】

1 mLマイクロピペッターを用いて消化物を穏やかに混合し、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。完全な染色を確実にするために、インキュベーション中に10分毎に穏やかにフリックすることによって攪拌する。

【2349】

完全に染色された細胞を20 mLの選別緩衝液中で再懸濁させ、10 mLの選別緩衝液をFMOに追加する。

【2350】

完全に染色された溶液を、30 µm細胞ストレーナーをとおして新しい50 mLコニカルの中に通過させ、同様にFMOを、30 µm細胞ストレーナーをとおして新しい50 mLコニカルの中に通過させる。

30

【2351】

室温において400×Gで5分間遠心分離する（全加速及び全ブレーキ）。最大 10×10^6 / mLの全細胞（生＋死）において細胞を選別緩衝液中で再懸濁させる。最小体積は、300 µLである。

【2352】

15 mLコニカルチューブに移す。さらに使用するまで、チューブをアルミホイルで覆って氷の中で保管する。

【2353】

選別された集団用に15 mL収集チューブを準備する。2 mLの収集緩衝液（2% hA B血清を含むD-PBS）をチューブに入れる。さらに使用するまで、収集チューブを氷の中で保管する。

40

【2354】

細胞計数及び生存率

Chemometec NC-200細胞カウンターを使用して細胞及び生存率の計数を取得するための手順が、LAB-056に記載されている。

【2355】

FACS選別（FX500スタートアップ）

BSCをオンにする。JUN-AIR真空ポンプをオンにする。機器の前面にある電源

50

／スタンバイボタンを押すことによってF X 5 0 0をオンにする。細胞選別機ソフトウェアを開き、実行する。校正試薬を使用して自動校正を実行する。

【2356】

試料収集

試料チャンバー及び収集チャンバーが5℃であり、攪拌試料アイコンが選択されていることを検証し、試料及び補正のためのサイトメータープロンプトに従う。細胞集団が正しくゲートされていることを検証する。図31を参照されたい。

【2357】

B S CまたはF S C設定を調整する必要があると得る。いずれの他のチャンネルについても電圧を調整しない。必要に応じて、P D - 1ゲートを調整する。図32を参照されたい。

【2358】

ゲートが満たされている場合、できるだけ多くの事象（または最大20,000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10に設定してもよい。

【2359】

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15m 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。C D 3ゲートに事象がなくなるまで繰り返す。収集される試料を装填プラットフォーム上に追加する。設定が正しいことを検証する。

【2360】

15m l収集チャンバブロックをチャンバーに装填する。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。1本のチューブを試料名及びプラス記号でラベル付けする。キャップを取り外し、これを左のチャンバーに入れる。第2のチューブを試料名及びマイナス記号でラベル付けする。キャップを取り外し、これを右のチャンバーに入れる。

【2361】

収集装填アイコンを実行し、細胞が画面上に現れるまで待つ。約15秒。1秒当たりの全事象が5,000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85%の選別効率を維持するように試料圧力を調整する。50,000件のC D 3事象を記録する。記録は自動的に停止する。

【2362】

いずれかの画分に収集された4.5×10⁶個超の細胞がある場合、収集チューブ（複数可）を交換する必要がある。

【2363】

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。チューブを氷上に置く。P D - 1画分の選択性パーセンテージを検証する。陰性選択試料の処理を繰り返す。データをエクスポート及び保存し、フローサイトメーターを動作停止させる。

【2364】

フェーズ1（実現可能性研究）

0日目－R E P 1

培地の調製

500m lのC M - 1 + 6000 I U / m lのI L - 2を調製するか、または温める。

【2365】

合成培地の調製

100m lのC T S O p T i m i z e r + 3 % S R及び6000 I U / m lのI L - 2を調製するか、または温める。C T S O p T i m i z e rの1 Lボトルから30m lを取り出す。30m lのC T S免疫細胞S R、1m lの50m g / m lゲンタマイシン、10m lの100X G l u t a M A X、及びC T Sサプリメント（注文時にC T S O p T i m i z e rとともに提供される）の1本のボトルを追加する。必要とされるまで培地を4℃で保存する。

10

20

30

40

50

【2366】

PBMCFीडァー細胞の調製

REP1用に適切な数のバイアルを解凍する（1mLバイアル当たり $60 \times 10^6 \sim 80 \times 10^6$ 個のPBMCFीडァー細胞を想定して、 10×10^6 個のPBMCFीडァー細胞が各条件に必要とされるであろう）。40mLの温かいCM1+IL-2を50mLコニカルに入れ、1mLのPBMCFीडァーバイアルをコニカルの中にピペットで採取する。解凍されたPBMCFीडァーを上下にピペット操作し、完全に混合し、NC-200上で2回の細胞計数を行う。

【2367】

10×10^6 個のPBMCFीडァー細胞を移すために各G-Rex 10Mに移す適切な体積を計算する。3μLのaCD3（OKT-3）を各フラスコに追加し、フラスコをインキュベーターに入れる。

【2368】

REP1用のTILを播種する

PD-1+選別体積の10%（血清学的ピペットによって得られる）を、PD-1+、PD-1+DM、及びPD-1+初期REPとラベル付けされたG-Rex 10Mフラスコに入れる。PD-1+及びPD-1+初期REPをCM-1+IL-2で100mLまで充填し、PD-1+DMを合成培地+IL-2で100mLまで充填する。

【2369】

同等数のPD-1-細胞をPD-1-G-Rex 10Mフラスコの中に播種するためのPD-1-の適切な体積を計算する。フラスコをCM-1+IL-2で100mLまで充填する。CD3+バルクTIL対照条件は、同等数のCD3+細胞を他の条件にあるPD-1+細胞に追加するであろう。適切な体積の消化物を取得するために、以下のステップに従う。ステップ9.3.5において取得された消化物TVCを選別報告書から得られた生細胞のCD3+（%）で乗算することによって、消化物におけるCD3+TVC/mLを計算する。この数を取得した後、各条件に播種されたPD-1+細胞の数をこの数で除算する（すなわち、 $1 \times 10^5 / 1 \times 10^6 = 0.1 \text{ mL}$ ）。この体積（0.1mL）の消化物をバルクCD3+TILフラスコに追加し、CM1+IL-2で100mLまで充填する。すべてのフラスコを37℃、5%CO₂のインキュベーターに入れる。

【2370】

5日目（初期REP）及び11日目-REP

培地の調製

250mLのCM2+3000IU/mLを調製するか、または温める。

【2371】

合成培地の調製。

セクション9.12.1に従って温かい50mLの合成培地を調製する。（6000IU/mLの代わりに3000IU/mLのIL-2）。

【2372】

REP1採取

フラスコを減容し、培養物を適切にラベル付けされた50mLコニカルに入れる。NC-200上で各試料に2回の細胞計数を行う。各採取されたREP1の体積の10%（最大 2×10^6 個の細胞がREP2の中に許容される）をそれぞれのG-Rex 5Mフラスコに入れ、温かいCM2+IL-2（PD-1+、PD-1+、PD-1+初期REP、PD-1-、及びバルクCD3+TIL）または温かい合成培地（PD-1+DM）で50mLまで充填する。

【2373】

PBMCFीडァー細胞の調製

REP1用に適切な数のバイアルを解凍する（1mLバイアル当たり $60 \times 10^6 \sim 80 \times 10^6$ 個のPBMCFीडァー細胞を想定して、 50×10^6 個のPBMCFीडァー細胞が各条件に必要とされるであろう）。40mLの温かいCM1+IL-2を50mLコニカルに入れ、1mLのPBMCFीडァーバイアルをコニカルの中にピペットで採取する。解凍されたPBMCFीडァーを上

10

20

30

40

50

下にピペット操作し、完全に混合し、NC-200上で2回の細胞計数を行う。移す適切な体積を計算し、フィーダーを新しい適切にラベル付けされたG-Rex 5Mに移し、 5.0×10^6 個のPBMCを移す。1.5 mLのaCD3 (OKT-3)を各フラスコに追加し、フラスコをインキュベーターに入れる。すべてのフラスコを37℃、5%CO₂のインキュベーターに入れる。

【2374】

12日目（初期REP）及び16日目のスケールアップ

培地の調製

250 mLのCM4 + 3000 IU/mLを調製するか、または温める。

【2375】

培地の調製

セクション9.12.1に従って温かい50 mLの合成培地を調製する。（6000 IU/mLの代わりに3000 IU/mLのIL-2）。

【2376】

REP2採取

フラスコを減容し、培養物を適切にラベル付けされた50 mLコニカルに入れる。NC-200上で各試料に2回の細胞計数を行う。

【2377】

スケールアップ

スケールアップする娘フラスコの適切な数を決定するための計算を行う。最大5の切り上げたTVC/ 1.0×10^6 。採取されたフラスコの体積を娘フラスコの数で除算し、その体積をそれぞれのG-Rex 5Mフラスコに戻して入れる。フラスコを温かいCM4 + IL-2 (PD-1+、PD-1+、PD-1+初期REP、PD-1-、及びバルクCD3 + TIL)、または温かい合成培地 (PD-1 + DM)で50 mLまで充填する。

【2378】

17日目（初期REP）及び22日目の採取

採取

フラスコを減容し、培養物を適切にラベル付けされた50 mLコニカルに入れる。

【2379】

NC-200上で各試料に2回の細胞計数を行う。

【2380】

凍結保存

PBSを採取生成物に50 mLまで追加し、室温において400 × Gで5分間遠心分離する（全加速及び全ブレーキ）。

【2381】

各培養物を3 mLの冷たいCS-10中で再懸濁させ、1.8 mL凍結バイアルに等分する。

【2382】

クライオバイアルをMr. Frostyに入れ、-80℃に一晩置く。翌日、LN₂貯蔵庫に入れる。

【2383】

フェーズ2

0日目 - REP1

培地の調製

1 LのCM-1 + 6000 IU/mLのIL-2を調製するか、または温める。

【2384】

PBMCフィーダー細胞の調製

REP1用に適切な数のバイアルを解凍する（1 mLバイアル当たり $6.0 \times 10^6 \sim 8.0 \times 10^6$ 個のPBMCを想定して、 1.0×10^6 個のPBMCがフルスケールに必要とされ、 1.0×10^6 個がバルクCD3 + 対照に必要とされるであろう）。

10

20

30

40

50

【2385】

40 mL の温かい CM1 + IL-2 を 50 mL コニカルに入れ、1 mL の PBMC フィーダーバイアルをコニカルの中にピペットで採取する。

【2386】

解凍された PBMC フィーダーを上下にピペット操作し、完全に混合し、NC-200 上で2回の細胞計数を行う。

【2387】

それぞれ、 1.0×10^6 個及び 1.0×10^6 個の PBMC を移すために G-Rex 100 M 及び G-Rex 10 M に移す適切な体積を計算する。

【2388】

30 μ L の aCD3 (OKT-3) を G-Rex 100 M に追加し、3 μ L を G-Rex 10 M の中に追加する。フラスコをインキュベーターに入れる。

【2389】

REP1 用の TIL を播種する

PD-1 + 選別のすべてを G-Rex 100 M に入れる。

【2390】

CD3 + バルク TIL 対照条件は、1 / 10 の比で、フルスケールにおける PD-1 + 細胞と同等数の CD3 + 細胞を追加するであろう。適切な体積の消化物を取得するために、以下のステップに従う。

【2391】

ステップ 9.3.5 において取得された消化物 TVC を選別報告書から取得された生細胞の CD3 + (%) で乗算することによって、消化物における CD3 + TVC / mL を計算する (すなわち、 $1.0 \times 10^6 * 10\% = 1 \times 10^5$)。

【2392】

この数を取得した後、フルスケール条件に播種された PD-1 + 細胞の数をこの数で除算する (すなわち、 $1 \times 10^5 / 1 \times 10^6 = 0.1$ mL)。

【2393】

この体積 (0.1 mL) の消化物をバルク CD3 + TIL フラスコに追加し、CM1 + IL-2 で 100 mL まで充填する。

【2394】

すべてのフラスコを 37 °C、5 % CO₂ のインキュベーターに入れる。

【2395】

11 日目、16 日目、22 日目

フルスケールプロセスは、IOVA 製造バッチ記録毎に従われるであろう。

【2396】

バルク CD3 + TIL 条件は、小規模実現可能性研究についてフェーズ 1 に記載されるステップと同様に処理されるであろう。

【2397】

最終製品についての放出試験

フェーズ 2 研究については、微生物学的及び内毒素を除く、すべての選択された放出試験が行われるであろう。

10

20

30

40

50

【表 5 5】

表 5 5 : 製品放出試験パラメータ		
パラメータ	試験方法	合格判定基準
外観	目視検査	バッグは無傷で、塊の兆候なし
細胞生存率	細胞選別機	≧ 7 0 %
総生細胞	細胞選別機	$1.0 \times 10^9 \sim 1.50 \times 10^9$
同一性	フローサイトメトリー	≧ 9 0 % の CD 3 + CD 4 5 + 細胞
アッセイ	IFN- γ	≧ 5 0 0 p g / m L (刺激-非刺激)
微生物学的研究	好気性及び嫌気性 B a c T	増殖なし
	A l e r t	
	グラム染色	陰性
	マイコプラズマに対するリアルタイム PCR	検出されず
純度-内毒素	リムルスアッセイ	≦ 0. 7 E U / m L

10

【 2 3 9 8】

最終製品についての拡張試験

【 2 3 9 9】

フェーズ 1 及び 2 については、追加の特性評価が、研究プロトコル (T P - 1 8 - 0 1 5) に従って行われ、結果が、情報のみのために記録されるであろう。

【 2 4 0 0】

結果及び合否判定基準。

【表 5 6】

表 5 6 : 採取生成物試験及び拡張結果		
試験タイプ	方法	期待される結果
流動選別		
選別後の純度 (P D 1 + (%))	フローサイトメトリー	≧ 8 0 %
放出試験		
外観	目視検査	バッグは無傷で、塊の兆候なし
細胞生存率	蛍光	≧ 7 0 %
総生細胞数	蛍光	$1 \times 10^9 \sim 1.50 \times 10^9$
同一性 (C D 3 (%) / C D 4 5 + (%))	フローサイトメトリー	9 0 % 超の C D 3 + C D 4 5 + 細胞
純度及びメモリー T 細胞サブセット表現型	フローサイトメトリー (L A B - 0 5 5)	報告結果
活性化及び疲弊マーカーの表現型	フローサイトメトリー (L A B - 0 6 1)	報告結果
テロメア長	フロー F I S H (添付資料-1)	報告結果
IFN γ (刺激-非刺激)	ビーズ刺激及び E L I S A	≧ 5 0 0 p g / m L
グランザイム B	ビーズ刺激及び E L I S A (L A B - 0 6 4)	報告結果
CD 1 0 7 A	マイトジェン刺激及びフローサイトメトリー (L A B - 0 6 1)	報告結果
TCR V β 配列決定	ディープ配列決定 (I r e p e r t o i r e , I n c)	入手可能な場合、報告結果
代謝物分析	C e d e x 生化学分析装置	報告結果

20

30

【 2 4 0 1】

実施例 8 : 腫瘍消化物からの P D - 1 + T I L の陽性選択についての抗 P D 1 結合マイクロビーズの試験

40

磁気ビーズ選択のための背景／根拠

抗体／磁気ビーズ複合方法抗 P D - 1 磁気ビーズを使用した抗 P D - 1 + T I L の選択

【 2 4 0 2】

結果：

P D - 1 + T I L が、抗 P D - 1 (E H 1 2 . H 7) マイクロビーズを使用して R E P T I L から選択され得る (図 3 5) 。

【 2 4 0 3】

P D - 1 + T I L が、抗 P D - 1 (M 1 H 4) マイクロビーズを使用して R E P T I L から選択され得る (図 3 6) 。

【 2 4 0 4】

50

フローサイトメトリー方法または磁気ビーズ方法を使用したPD-1+TILの直接比較研究、選択及び増殖（図37）。

【2405】

0日目の選別前／後TVC

最終製品の製品属性を分析する。最終製品の拡張表現型特性評価。

【2406】

TCRクローン型分析を行う。

【2407】

流動選別の代替実施形態として、PD-1選択のための磁気ビーズ選別プロトコルを開発する。

10

●より速い処理

●より高いスループット

●より安価

●オペレーターに必要とされる技術的な専門知識が少ない（流動選別は面倒なプロセスである）。

●閉鎖系処理を有効にする

【2408】

磁気選択を使用したPD-1で選択されたTILは、PD-1⁺（現在は流動方法）に類似しない場合がある。

【2409】

20

軽減

PD-1⁺のみを選択するであろうThermoFisher（Clone MIH4）からの代替的な抗PD-1抗体を考慮する。

【2410】

いくつかの実施形態では、StemCell TechnologiesのEasySep「Do-It-Yourself」陽性選択キットを、複合プロセスに使用した。

【2411】

複合のために選択される抗体：

●CD279（PD-1）モノクローナル抗体（クローン-MIH4）、eBioscience（商標）

30

●GoInVivo（商標）精製抗ヒトCD279（PD-1）抗体（クローン-EH12.2H7）

【2412】

複合方法

15ugの一次抗体を、100uLの成分A（抗体の独自ブレンド）及び100uLの成分B（抗体の独自ブレンド）に追加する。

●混合物を370Cにおいて4℃で一晩インキュベートする。

●翌日、PBSを用いて1mLに適量にする。

●さらに使用するまで、複合抗PD-1マイクロビーズを4℃で保管する。

●腫瘍消化物濃度を1e8細胞/mL（100uLの最小体積）に調整する。

40

●100uLの複合抗PD-1マイクロビーズを1000uLの腫瘍消化液に追加する。

●室温で15分間インキュベートする。

●RapidSphereを30秒間ボルテックスし、RapidSphere（50uL/mL）を細胞に追加し、室温で10分間インキュベートする。

●2.5mLに適量にする。

●EasySep磁石で5～10分間インキュベートする。

●上清を廃棄する。

●ステップ4～6を1回繰り返す。

●単離された細胞をCM1中に再懸濁させる。

50

【2413】

腫瘍（M1149）を処理し、GMP酵素（コラゲナーゼ、Dnase I、及び中性プロテアーゼ）を使用して酵素的に消化した。

【2414】

Sony細胞選別機、ならびに2つの異なる抗体クローン（EH12、2H7及びM1H4）で作製された幹細胞抗PD-1磁気ビーズを介して、腫瘍消化物の等しい部分をPD-1+TILについて選別した。

【2415】

EH12、2H7を使用した選別後の細胞数収率は、流動選別方法よりも高かった。

【2416】

しかしながら、流動選別法を使用したPD-1+純度は、磁気選別方法よりも高かった。これは、純度を確認するために磁気方法で使用する二次抗体に起因し得る（図34を参照）。

【2417】

使用されるビーズキット：EasySep（商標）Human「Do-It-Yourself」陽性選択キットII：カタログ番号17699。

【2418】

予備データは、磁気ビーズベースの選別がPD-1+TILを選択するために使用され得ることを示唆している。

【2419】

現在、我々の染色方法は、2つのステップを伴う。ニボルマブ、続いて、抗CD3 FITC及び抗IgG4 PEを用いた腫瘍消化物の染色。

【2420】

磁気ビーズ方法については、我々は抗IgG4（HP-6023）を使用している磁気ビーズと複合させることを提案している。

●Miltenyi（CliniMACS）からのBiotin角度マイクログラフを伴う抗Biotin角度抗体。

●Sepmag。

●Dyna磁石。

【2421】

実施形態1

腫瘍消化物が、ニボルマブで染色され、続いて、ビーズ結合抗IgG4（HP6023）を使用したPD-1+TILの磁気選択が行われる。

【2422】

実施形態2

PD-1+TIL集団を選択するために抗体（抗PD-1）クローンを分析する必要がある。M1H4クローン及び（A17188B）Biolegendクローンからの新しい抗PD-1クローンを分析する。

【2423】

実施例9：凍結保存TIL細胞療法の例示的生産

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-Rex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。

10

20

30

40

50

【表 5 7】

表 5 7：プロセス拡張の例示的計画

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 個以下の望ましい腫瘍断片	1つのG-Rex 100 MCS フラスコ	≤ 1000
11	REP 播種	G-Rex 500MCS 当たり 5~200×10 ⁶ 個の生細胞	1つのG-Rex 500 MCS フラスコ	≤ 5000
16	REP 分割	G-Rex 500MCS 当たり 1×10 ⁶ 個の生細胞	5つ以下のG-Rex 500 MCS 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

【表 5 8】

表 5 8：フラスコ体積

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 4 2 4】

主要なプロセス情報

0 日目の CM 1 培地の調製

BSC 内で、試薬を RPMI 1640 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 AB 血清 (100.0 mL)、GlutaMax (10.0 mL)、硫酸ゲンタマイシン、50 mg/mL (1.0 mL)、2-メルカプトエタノール (1.0 mL) を加熱した。

【2 4 2 5】

BSC から不要な材料を取り出した。BSC 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 HBSS を BSC の中に残した。

【2 4 2 6】

IL-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 mL の IL-2 アリコート (6×10⁶ IU/mL) (BR71424) を解凍した。IL-2：ロット番号及び有効期限を記録した。

【2 4 2 7】

IL-2 ストック溶液を培地に移した。BSC 内で、1.0 mL の IL-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 IL-2 (6×10⁶ IU/mL) 1.0 mL を追加した。

【2 4 2 8】

G-Rex 100MCS を BSC の中に通過させた。無菌的に G-Rex 100MCS (W3013130) を BSC の中に通過させた。

【2 4 2 9】

すべての完全な CM 1 の 0 日目培地を G-Rex 100MCS フラスコにポンプで注入した。組織断片円錐形または G-Rex 100MCS。

【2 4 3 0】

0 日目の腫瘍洗浄培地の調製

BSC 内で、5.0 mL のゲンタマイシン (W3009832 または W3012735) を 1 本の 500 mL の HBSS 培地 (W3013128) ボトルに追加した。ボトル当たりの追加：HBSS (500.0 mL)、硫酸ゲンタマイシン、50 mg/mL (5.0 mL)。1 L 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 HBSS を濾過した。

【2 4 3 1】

0 日目の腫瘍処理

腫瘍を取得した。QAR から腫瘍検体を取得し、即時に処理のために 2~8℃における部屋に移した。

10

20

30

40

50

【2432】

腫瘍洗浄培地を等分した。

【2433】

8インチ鉗子(W3009771)を使用した腫瘍洗浄1、検体ボトルから腫瘍を取り出し、調製された「洗浄1」皿に移した。腫瘍洗浄2及び腫瘍洗浄3が続いた。

【2434】

腫瘍を測定した。腫瘍を評価した。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。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。

10

【2435】

メス及び／または鉗子の組み合わせを使用して、腫瘍を解剖し、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。腫瘍断片をサイズが約3×3×3mmの切片に解剖した。乾燥を防止するために中間断片を保存した。

【2436】

中間断片解剖を繰り返した。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。

20

【2437】

コニカルチューブを準備した。腫瘍片を50mLコニカルチューブに移した。G-R E X 100 M C SのためにB S Cを準備した。インキュベーターからG-R E X 100 M C Sを取り出した。無菌的にG-R e x 100 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 100 M C S フラスコに追加した。切片を均等に分配した。

【2438】

以下のパラメータにおいてG-R e x 100 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L E Dディスプレイ：37.0±2.0℃、C O 2の割合：5.0±1.5% C O 2。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

【2439】

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。

【2440】

11日目－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 O 2の割合：5.0±1.5% C O 2。

【2441】

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)をインキュベーター内で30分間以上温めた。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 / m L) (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

【2442】

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 にポンプで注入した。L a b t a i n e r バッグからポンプマティックを取り出した。

50

【2443】

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試料採取した。20.0 mLの培地を取り出し、50 mLコニカルチューブに入れた。BSC内で細胞計数希釈チューブを準備し、「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℃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。

【2444】

10

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℃、CO₂の割合：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。

【2445】

TIL採取及びTIL採取の開始のためにフラスコを準備した。TILが採取された。Gatherexを使用して、血液フィルターをとおして300 mL移送パックの中に細胞懸濁液を移した。付着した細胞について膜を点検した。

【2446】

20

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。試料採取のために上清移送パックを準備した。

【2447】

Bac-T試料を引き出した。BSC内で、1 L「上清」移送パックから約20.0 mLの上清を引き上げ、滅菌50 mLコニカルチューブに分注する。

【2448】

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

【2449】

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。

【2450】

TIL懸濁液の体積を調製し、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した。総TIL細胞体積(A)。除去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

【2451】

総生TIL細胞を計算した。平均総細胞濃度*：総体積、総生細胞：C=A×B。

【2452】

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。

【2453】

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： 1.0×10^7 個の細胞Aで除算された生細胞濃度。

50

【2454】

2. 0×10^8 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。

【2455】

凍結のための標的細胞濃度が 1.0×10^8 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。

【2456】

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クライオ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、容量が 0.5 mL になるまで C S 10 をバイアルに追加する。

【2457】

試料の T I L 凍結保存

【2458】

凍結保存のための 1×10^7 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。

試料の凍結保存

【2459】

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 を記録した。

【2460】

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 $\pm$ 2.0 $^{\circ}$ 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。フィーダーセル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。

【2461】

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。

【2462】

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 $\times$ 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。

【2463】

フィーダー細胞懸濁液の体積を調整した。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。全生存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 $\pm$ 2.0 $^{\circ}$ 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。

【2464】

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。各試料に別個の3 mL シリンジを使用して、

10

20

30

40

50

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 $4 \times 1.0 \text{ mL}$ 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、細胞計数試料を除去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。 5×10^9 個の生存フィーダー細胞を取得するた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。

【2465】

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。

【2466】

11日目のG-Rex充填及び播種

G-Rex 500 MCS を設定した。「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-Rex 500 MCS にポンプで注入した。 4.5 L の培地をG-Rex 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。フィーダーセルの懸濁液移送パックをG-Rex 500 MCS に溶接した。フィーダー細胞をG-Rex 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-Rex 500 MCS に追加した。熱融着した。 $37.0 \pm 2.0^\circ \text{C}$ でG-Rex 500 MCS をインキュベートし、 CO_2 の割合： $5.0 \pm 1.5\% \text{ CO}_2$ であった。

【2467】

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-Rex 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。

【2468】

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。

【2469】

16日目の培地の調製

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Labtainer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Labtainer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Labtainerを設定し、ラベル付けした。上清用の 10 L のLabtainer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、培地調製と同時に進行得るTIL採取中に使用された。

【2470】

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つのバッグ当たりIL-2 ($6 \times 10^6 \text{ IU/mL}$) (BR71424) の $5 \times 1.1 \text{ mL}$ アリコート解凍した。 100.0 mL のGlutaMaxを等分した。IL-2をGlutaMax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 + 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： $37.0 \pm 2.0^\circ \text{C}$ 、 CO_2 の割合： $5.0 \pm 1.5\% \text{ CO}_2$ 。完全なCM4の16日目培地を温めた。希釈液を調製した。

10

20

30

40

50

【2471】

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 ± 2.0 °C、CO₂の割合： $5.0 \pm 1.5\%$ CO₂。インキュベーターからG-Rex 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。

【2472】

G-Rex 500 MCSの減容。約4.5 Lの培養上清をG-Rex 500 MCSから10 LのLab tainerに移した。

【2473】

TIL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。

【2474】

TIL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。

【2475】

TIL採取。TIL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。Gatherexを使用して、細胞懸濁液をTIL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-Rex 500 MCS上のクランプを閉じた。TILを含む移送パックを熱融着した。上清を含む10 LのLab tainer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。

【2476】

滅菌性及びBacT試験試料採取：調製されたBacTとラベル付けされた15 mLのコニカルから1.0 mLの試料を取り出した。細胞計数試料を取り出した。BSC内で、各試料に別個の3 mLシリンジを使用して、「TIL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。

【2477】

マイコプラズマ試料を取り出した。3 mLシリンジを使用して、TIL懸濁液移送パックから1.0 mL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15 mLコニカルに入れた。

【2478】

播種用の移送パックを準備した。TILをインキュベーターに入れた。細胞懸濁液をBSC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 mLの細胞懸濁液を調製された4.5 mLのAIM-V培地に追加することによって、細胞計数試料を希釈し、1:10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。TIL懸濁液の体積を調整した。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した。5.0 mLを差し引いた総TIL細胞体積が試験のために取り出された。

【2479】

総生TIL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-Rex 500 MCS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。

【2480】

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-Rex-500Mフラスコ毎に「CM4の16日目培地」の1つの10 Lバッグを準備した。追加の培地が調製さ

10

20

30

40

50

れ、温められている間に、続けて第1のGREX-500M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。GREX500MCsを充填した。培地をポンプで注入することを準備し、4.5Lの培地をGREX500MCs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GREX500MCsフラスコに追加するTIL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GREX500MCsを取り出した。ポンプ用のGREX500MCs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TIL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）「TIL懸濁液」移送パックをポンプ入口ラインに滅菌溶接した。TIL懸濁液バッグを秤の上に置いた。

10

【2481】

フラスコにTIL懸濁液を播種した。計算されたTIL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。

【2482】

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： $37.0 \pm 2.0^{\circ}\text{C}$ 、CO₂の割合： $5.0 \pm 1.5\%$ CO₂。フラスコをインキュベートした。

【2483】

22日目にインキュベーターからGREX500MCsを取り出す時間範囲を決定した。

20

【2484】

22日目の洗浄緩衝液の調製

10LのLabtainerバッグを準備した。BSC内で、ルアー接続を介して4インチ血漿移送セットを10LのLabtainerバッグに取り付けた。10LのLabtainerバッグを準備した。BSC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GREX500MCsフラスコ毎に、10LのLabtainerバッグを準備した。Plasmalyteを3000mL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、3000mLのOrigénバッグから空気を除去した。ヒトアルブミン25%を3000mLバッグに追加した。120.0mLの最終体積のヒトアルブミン25%を取得した。

30

【2485】

IL-2希釈液を調製した。10mLシリンジを使用して、LOVO洗浄緩衝液バッグ上の無針注入ポートを使用して、5.0mLのLOVO洗浄緩衝液を取り出した。LOVO洗浄緩衝液を50mLコニカルチューブに分注した。

【2486】

CRFブランクバッグLOVO洗浄緩衝液が等分された。100mLシリンジを使用して、無針注入ポートから70.0mLのLOVO洗浄緩衝液を引き上げた。

【2487】

IL-2を解凍した。すべての氷が融解するまで、1つの1.1mLのIL-2（ $6 \times 106\text{ IU/mL}$ ）を解凍した。IL-2の調製。50 μL のIL-2ストック（ $6 \times 106\text{ IU/mL}$ ）を、「IL-2希釈液」とラベル付けされた50mLコニカルチューブに追加した。

40

【2488】

凍結保存調製。5つのクリオカセットを2~8℃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。

【2489】

細胞計数希釈液を調製した。BSC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4.5mLのAIM-V培地を4本の別個の15mLコニカルチューブに追

50

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BSCの下でバイアルを保存した。

【2490】

22日目のTIL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LEDディスプレイ： $37 \pm 2.0^\circ\text{C}$ 、CO₂の割合： $5\% \pm 1.5\%$ 。インキュベーターからG-Rex 500 MCSフラスコを取り外した。TIL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-Rex 500 MCSから上清バッグに移した。

【2491】

TIL採取用のフラスコを準備した。TIL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。TILの収集を開始した。TIL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。TIL採取。Gatherexを使用して、TIL懸濁液を3000 mL収集バッグの中に移した。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-Rex 500 MCS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LOVO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。

【2492】

細胞計数を行った。NC-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AIM-V培地の中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。LOVOソースバッグの重量を量った。総生TIL細胞を計算した。総有核細胞を計算した。

【2493】

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。

【2494】

LOVO

「TIL G-Rex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。PlasmaLyteを取り付けた。PlasmaLyteが取り付けられていることを検証し、PlasmaLyte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。PlasmaLyteが動いていることを確認した。

【2495】

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CS-10及びLOVO洗浄緩衝液の体積を計算した。CRFブランクを調製した。

【2496】

最終製品に追加するIL-2の体積を計算した。所望される最終IL-2濃度（IU/mL）-300 IU/mL。IL-2作業ストック： 6×10^4 IU/mL。接続装置を組み立てた。4S-4M60をCC2細胞接続に滅菌溶接した。（プロセス注記5.11に従って）CS750クライオバッグを準備されたハーネスに滅菌溶接した。CS-10バッグを4S-4M60のスパイクに溶接した。IL-2を用いてTILを調製した。適切なサイズのシリンジを使用して、「IL-2 6×10^4 」アリコートから決定されたIL-2の量を取り出した。配合されたTILバッグをラベル付けした。配合されたTILバッグを装置に追加した。CS10を追加した。シリンジを交換した。約10 mLの空

10

20

30

40

50

気を100 mL シリンジに引き込み、装置上の60 mL シリンジを交換した。CS10を追加した。CS-750 バッグを準備した。細胞を分注した。

【2497】

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 のシリンジに引き込み、装置上のシリンジを交換した。保持液を50 mL コニカルチューブに分注し、チューブを「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。

【2498】

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℃で保持した。

【2499】

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ために15 mL コニカルチューブに入れた。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。

【2500】

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。

【表59】

表59：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	15 mL コニカル
内毒素	2	1.0 mL	2 mL クライオバイアル
グラム染色	1	1.0 mL	2 mL クライオバイアル
IFN-γ	1	1.0 mL	2 mL クライオバイアル
フローサイトメトリー	1	1.0 mL	2 mL クライオバイアル
**Bac-T滅菌性	2	1.0 mL	Bac-T ボトル
QC保持	4	1.0 mL	2 mL クライオバイアル
サテライトバイアル	10	0.5 mL	2 mL クライオバイアル

【2501】

滅菌性及びBac-T。試験試料採取。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。

【2502】

最終製品の凍結保存

速度制御された冷凍庫を準備した。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℃±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。

【2503】

後処理の概要

後処理：最終医薬品

(22日目) フローサイトメトリーによる22日目のREPでのCD3+細胞の決定

【2504】

(22日目) グラム染色方法 (GMP)

【2505】

(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

【2506】

(1 6 日 目) B a c T 無 菌 性 ア ッ セ イ (G M P)

【 2 5 0 7 】

(1 6 日 目) T D - P C R (G M P) に よ る マ イ コ プ ラ ズ マ D N A 検 出

【 2 5 0 8 】

許 容 さ れ る 外 観 属 性

【 2 5 0 9 】

(2 2 日 目) B a c T 無 菌 性 ア ッ セ イ (G M P) (2 2 日 目)

【 2 5 1 0 】

(2 2 日 目) I F N - γ ア ッ セ イ

【 2 5 1 1 】

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。

【 2 5 1 2 】

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。

【 2 5 1 3 】

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。

【 2 5 1 4 】

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。

10

20

30

40

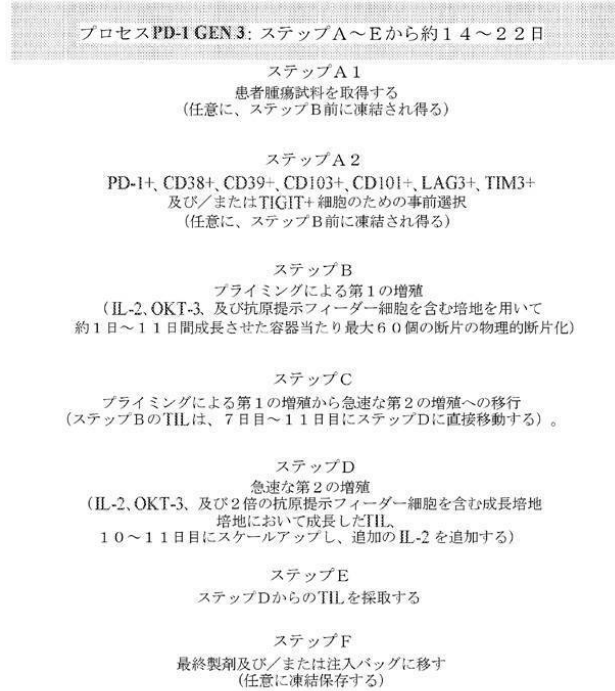
50

【図面】

【図 1 A】



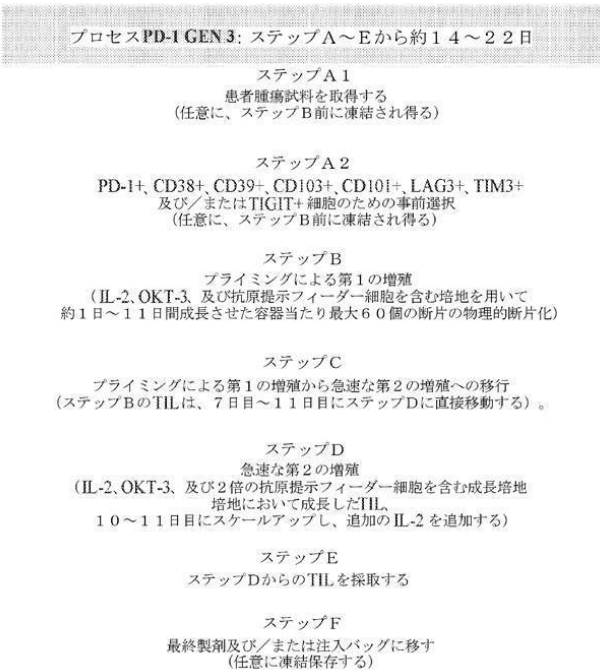
【図 1 B】



10

20

【図 1 C】



【図 1 D】



30

40

50

【図 1 E】

実施形態 GEN 3.0 : ステップ A～E から約 1 4～1 8 日			実施形態 GEN 3.1 : ステップ A～E から約 1 4～1 8 日			実施形態 GEN 3.1 : ステップ A～E から約 1 4～1 8 日		
ステップ A 1 患者腫瘍試料を取得する (任意に、ステップ B 前に 凍結され得る)			ステップ A 1 患者腫瘍試料を取得する (任意に、ステップ B 前に 凍結され得る)			ステップ A 1 患者腫瘍試料を取得する (任意に、ステップ B 前に 凍結され得る)		
ステップ A 2 PD-1+, CD38+, CD39+, CD103+, CD101+, LAG3+, TIM3+ 及び/または TIGIT+ 細胞のための事前選択 (任意に、 消化後及びステップ B 前に 凍結され得る)			ステップ A 2 PD-1+, CD38+, CD39+, CD103+, CD101+, LAG3+, TIM3+ 及び/または TIGIT+ 細胞のための事前選択 (任意に、消化後及びステップ B 前に凍結され得る)			ステップ A 2 PD-1+, CD38+, CD39+, CD103+, CD101+, LAG3+, TIM3+ 及び/または TIGIT+ 細胞のための事前選択 (任意に、消化後及びステップ 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 の増殖 (IL-2 を含む培地による約 1 日～7 / 8 日間成長させた容器当たり最大 6 0 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 の増殖 (IL-2 及び OKT-3 を含む培地 による約 1 日～7 / 8 日間成長 させた容器当たり最大 6 0 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 の増殖 (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 成長させた容器当たり最大 6 0 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 の増殖から 急速な第 2 の増殖への移行 (ステップ B の TIL は、7 / 8 日 目にステップ D に直接移動する)。			ステップ C ブライミングによる第 1 の 増殖から急速な第 2 の増殖 への移行 (ステップ B の TIL は、7 / 8 日目にステップ D に直接移動 する)。			ステップ C ブライミングによる第 1 の 増殖から急速な第 2 の増殖 への移行 (ステップ B の TIL は、7 / 8 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 の増殖 (IL-2, OKT-3, 及び抗原提示 フィーダー細胞を含む成長培地 培地において成長した TIL、 1 0～1 1 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 D 急速な第 2 の増殖 (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において 成長した TIL、1 0～1 1 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 D 急速な第 2 の増殖 (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において 成長した TIL、1 0～1 1 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 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 バッグに移す (任意に凍結保存する)			ステップ F 最終製剤及び/または注入 バッグに移す (任意に凍結保存する)			ステップ F 最終製剤及び/または注入 バッグに移す (任意に凍結保存する)		

【図 1 G】

第 2 世代プロセス GEN 3 (B) : ステップ A～E から約 1 4～1 8 日		
ステップ A 1 患者腫瘍試料を取得する (任意に、ステップ B 前に凍結され得る)		
ステップ A 2 PD-1+, CD38+, CD39+, CD103+, CD101+, LAG3+, TIM3+ 及び/または TIGIT+ 細胞のための事前選択 (任意に、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 の増殖 (IL-2, OKT-3, 及び APC を含む培地による約 1 日～7 / 8 日間成長させた容器当たり 最大 6 0 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 の増殖から急速な第 2 の増殖への移行 (ステップ B の TIL は、7 / 8 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 の増殖 (IL-2 及び APC の培養物から得られた培養上清を含む成長培地培地において成長した TIL、1 0～1 1 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 (任意に凍結保存する)		

【図 1 F】

第 2 世代プロセス GEN 3 (A) : ステップ A～E から約 1 4～1 8 日		
ステップ A 1 患者腫瘍試料を取得する (任意に、ステップ B 前に凍結され得る)		
ステップ A 2 PD-1+, CD38+, CD39+, CD103+, CD101+, LAG3+, TIM3+ 及び/または TIGIT+ 細胞のための事前選択 (任意に、ステップ B 前に凍結され得る)		
ステップ B (IL-2 及び抗体提示フィーダー細胞 (A P C) の培養物から得られた培養上清を含む培地 による約 1 日～7 / 8 日間成長させた容器当たり最大 6 0 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 の増殖から急速な第 2 の増殖への移行 (ステップ B の TIL は、7 / 8 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 の増殖 (IL-2, OKT-3, 及び A P C を含む成長培地培地において成長した TIL、 1 0～1 1 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 (任意に凍結保存する)		

【図 1 H】

第 2 世代プロセス GEN 3 (C) : ステップ A～E から約 1 4～1 8 日		
ステップ A 1 患者腫瘍試料を取得する (任意に、ステップ B 前に凍結され得る)		
ステップ A 2 PD-1+, CD38+, CD39+, CD103+, CD101+, LAG3+, TIM3+ 及び/または TIGIT+ 細胞のための事前選択 (任意に、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 の増殖 (IL-2 及び APC の培養物から得られた培養上清を含む培地による約 1 日～7 / 8 日間成長 させた容器当たり最大 6 0 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 の増殖から急速な第 2 の増殖への移行 (ステップ B の TIL は、7 / 8 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 の増殖 (IL-2 及び APC の培養物から得られた培養上清を含む成長培地培地において成長した TIL、1 0～1 1 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 (任意に凍結保存する)		

10

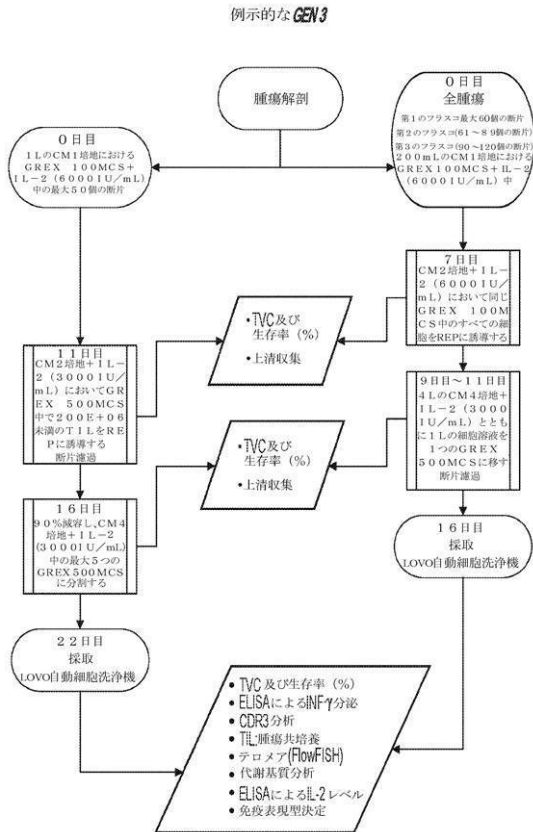
20

30

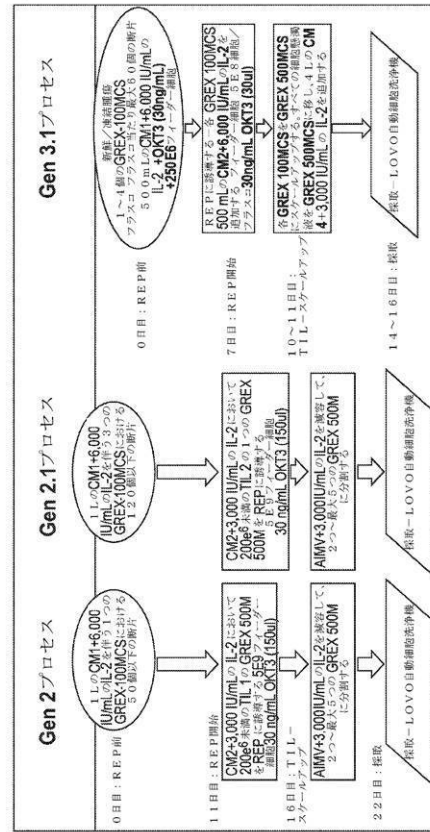
40

50

【図 2】



【図 3】



【圖 4】

ステップ	Gen 2	Gen 2.1	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、 事前配合したCM1 100MCS-11日	断片または凍結前液 1つのG-REX当たり30個以下の断片／最大 6.0個の断片を有する前液 (G-REX)、 断片に配合した前液 (G-REX)、 REP前、ラーゲル-2、5 E8細胞 +OKT-3 (30ng/mL)
REP開始	REPに移植する-11日目- 200 E6末のTIL 1つのG-REX 500MCS	REPに移植する-11日目- 2つのG-REX 500MCS 2つの事前配合したCM2 100MCS-11日	REPに移植する-7日目- 500MCSの断片TILと同G- REX 500MCSの断片TIL (30ng/mL) 5 E8細胞+OKT-3 (30ng/mL) 断片のラーゲル-
TILの培養または スライディングラブ	1~5つのG-REX 500MCS 16日に分ける	2~5つのG-REX 500MCS 事前配合したCM4 16日に分ける	G-REX 100MCSから、TIL細胞液をG-REX 500MCSの断片TIL (30ng/mL)とG- REX 500MCSに移す 10日にまたは11日にスケールアップする
採取	22日に採取する。 LOVO自動細胞流液機	22日に採取する。 LOVO自動細胞流液機 (5回の洗浄サイクル)	14日または16日に採取する。 LOVO自動細胞流液機 (5回の洗浄サイクル)
最終製剤	凍結前液に凍結品 1.1~2-GS10、 複製のアリコート	凍結前液に凍結品 1.1~2-GS10、 複製のアリコート	凍結前液に凍結品 1.1~2-GS10 U/mlの 複製のアリコート
プロセス時間	22日	22日	16日

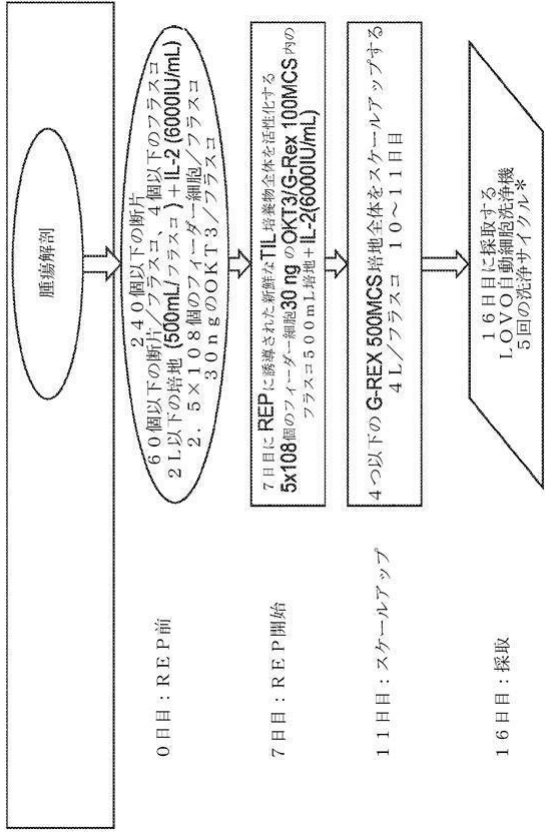
【図 5】

プロセス日	条件	Gen 3.1
	培地 CM1	
	IL-2 (6000 IU/mL)	500 mL
	OKT-3 (30ng/mL)	+
0 日目 - R E P 開始前	フィーダー (250 E+06)	+

プロセス日	条件	Gen 3.1
	培地 CM2	
	IL-2 (6000 IU/mL)	500 mL
	7 日目に追加された OKT-3 (30ng/mL)	+
7 日目 - R E P 開始	7 日目に追加された	+
	日数での総フィーダー	500 E06
		750 E+06

プロセス日	条件	Gen 3.1
9 ~ 11 日目 - ステールアップ	G-REX 100MCS から、TIL 懸濁液を 1 つの G-REX 500MCS、最大 3 つの G-REX 500MCS に移す	あり
16 日目 - 総収	LOWC-自動細胞洗浄	あり

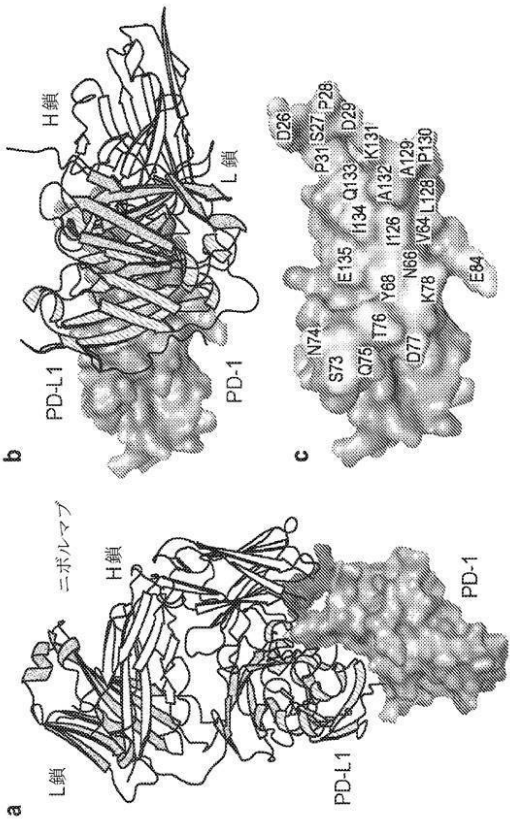
【図 6】



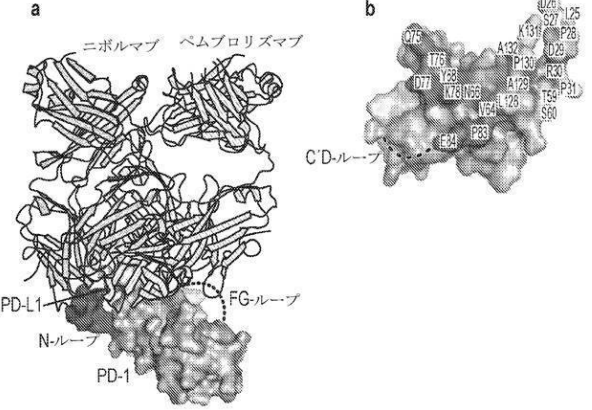
【図 7】



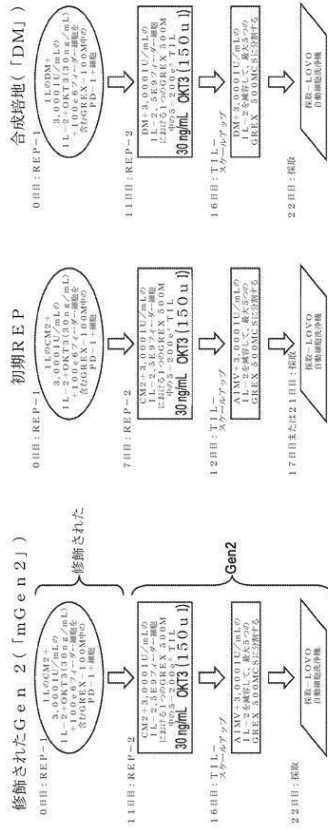
【図 8】



【図 9】

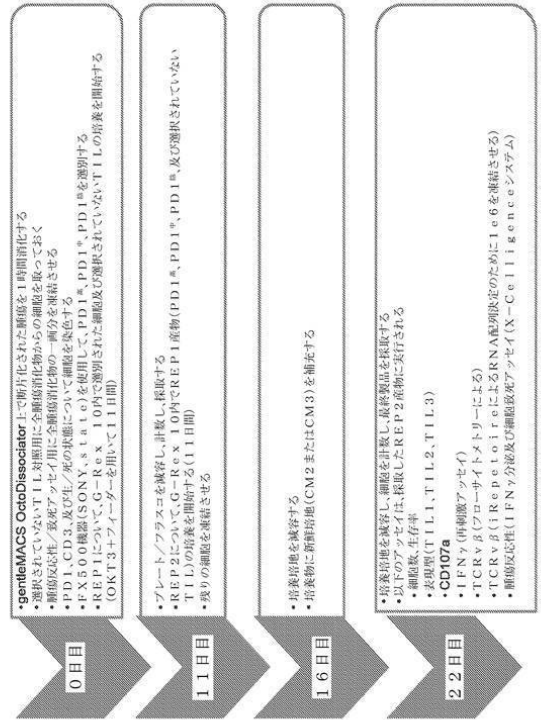


【図 1 4】



【図 1 5】

Attorney Docket No.: 116983-5076-WO

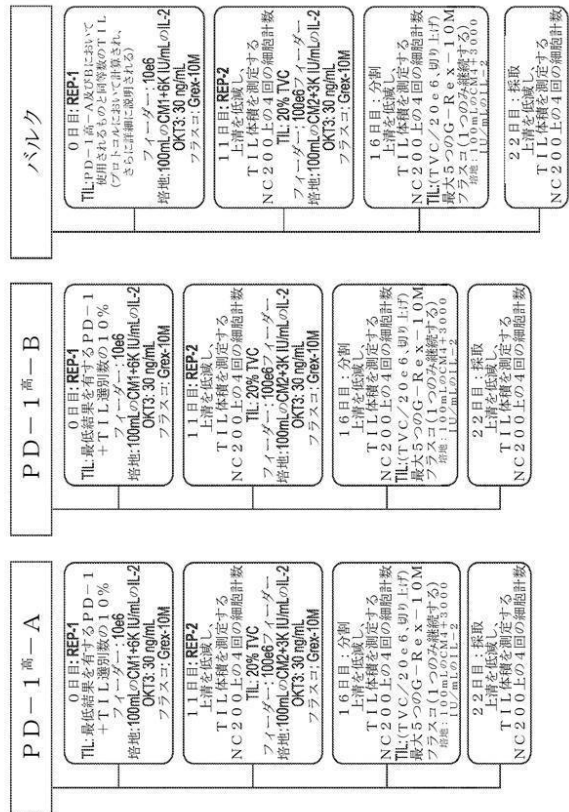


【図 1 6】

Attorney Docket No.: 116983-5076-WO

条件	フルスケールプロセス
REP-1 TIL フィーダー CM1 IL-2 OKT3 (30 ng/mL) G-Rex	0日目: REP-1 PD1 選別数 100e6 6000 IU/mL 30 ng/mL 100MCS
REP-2 TIL フィーダー CM2 IL-2 OKT3 (30 ng/mL) G-Rex	11日目: REP-2 5e6-200e6 TVC 5e9 3000 IU/mL 30 ng/mL 500MCS
スケールアップ	16日目: CM4 + 3,000 IU/mL の IL-2 を 減容して, 最大 5 つの G-Rex 500MCS に分別する
REP-2 採取	22日目: REP-2 採取

【図 1 7】



Doc/ 121148396.2

10

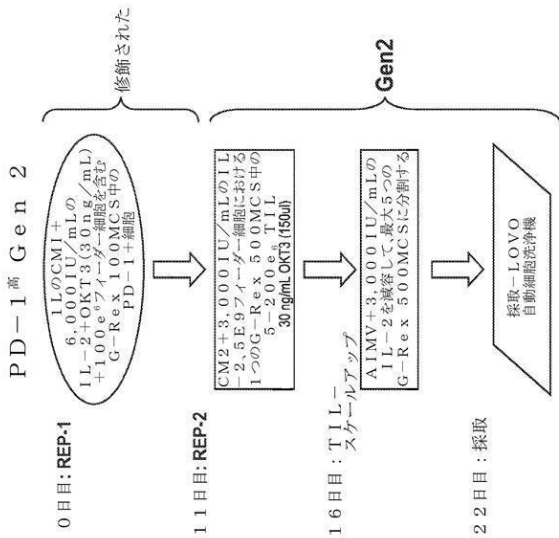
20

30

40

50

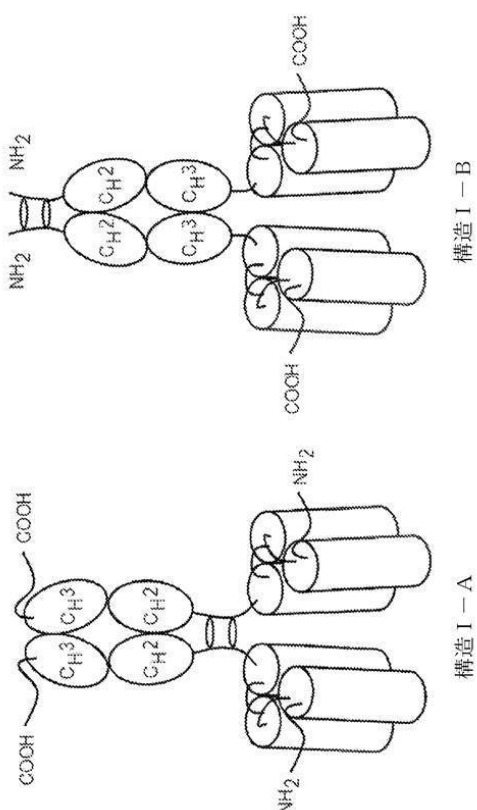
【図 18】



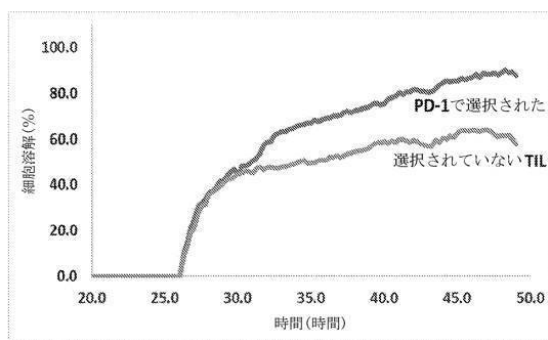
【図 19】

PD-1+TIL培養のための例示的実施形態/プロセス (研究/PD-1+Gen 2/合成培養地/初期REP)					
条件	PD-1+研究	PD-1+Gen 2	PD-1+合成培養地 Gen 2	PD-1+初期REP	
REP-1 TIL フューダー CM2 IL-2 OKT3 (30 ng/mL) G-Rex	0日目: REP-1 PD-1+細胞の10% 100e ⁶ 3000 IU/mL 30 ng/mL 10e ⁶	0日目: REP-1 PD-1+細胞の10% 100e ⁶ 3000 IU/mL 30 ng/mL 10e ⁶	0日目: REP-1 PD-1+細胞の10% 100e ⁶ 3000 IU/mL 30 ng/mL 10e ⁶	0日目: REP-1 PD-1+細胞の10% 100e ⁶ 3000 IU/mL 30 ng/mL 10e ⁶	
REP-2 TIL フューダー CM2 IL-2 OKT3 (30 ng/mL) G-Rex	11日目: REP-2 100e ⁶ TVC 3000 IU/mL 30 ng/mL 10e ⁶	11日目: REP-2 100e ⁶ TVC 3000 IU/mL 30 ng/mL 10e ⁶	11日目: REP-2 100e ⁶ TVC 3000 IU/mL 30 ng/mL 10e ⁶	11日目: REP-2 100e ⁶ TVC 3000 IU/mL 30 ng/mL 10e ⁶	
スケールアップ	3スケールアップなし	16日目: 最大5つの10M プラスミドを減容して分割する (TVC/20e ⁶ , 50e ⁶ 以上)	16日目: 最大5つの10M プラスミドを減容して分割する (TVC/20e ⁶ , 50e ⁶ 以上)	16日目: 最大5つの10M プラスミドを減容して分割する (TVC/20e ⁶ , 50e ⁶ 以上)	
REP-2採取	22日目: REP-2採取	22日目: REP-2採取	22日目: REP-2採取	22日目: REP-2採取	
外周品質:					
REP-1	100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する 100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する	100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する 100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する	100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する 100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する	100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する 100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する	
REP-2	100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する 100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する	100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する 100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する	100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する 100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する	100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する 100e ⁶ TVCに10e ⁶ を乗算する	

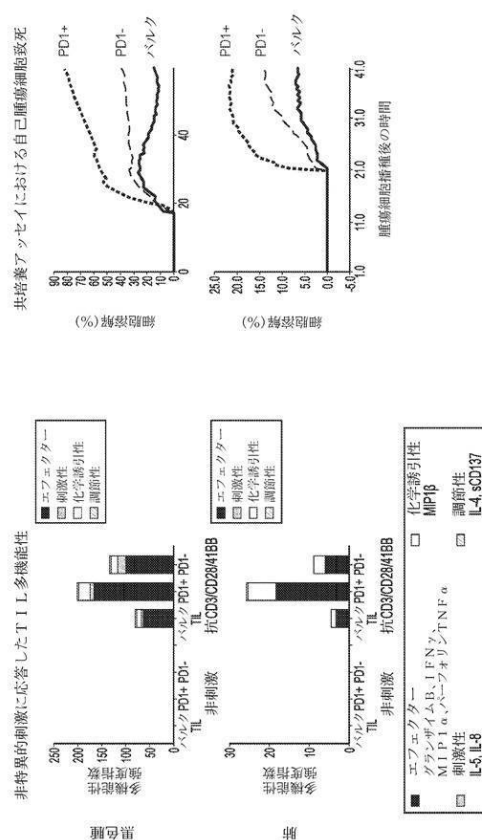
【図 20】



【圖 22】

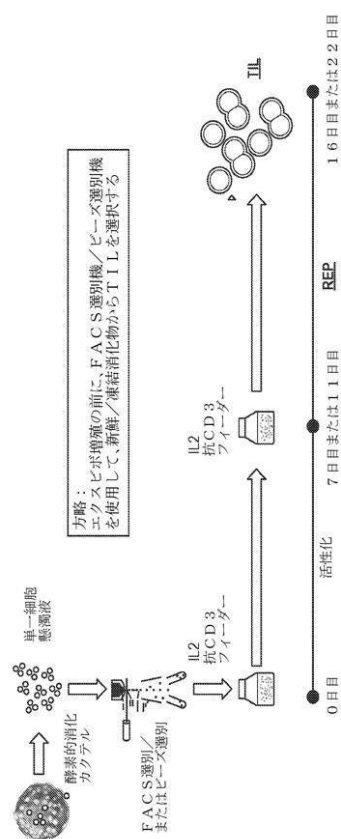


【圖 23】

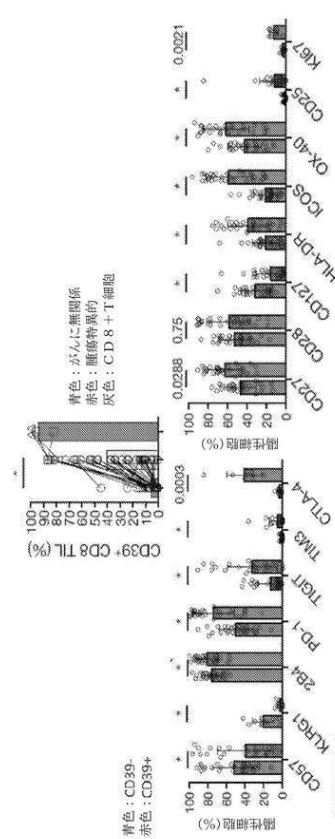


10

【圖 24】



【圖 25】



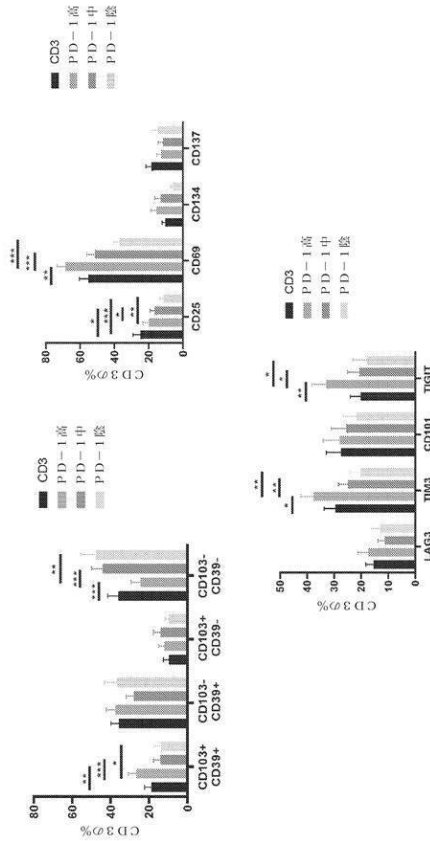
20

30

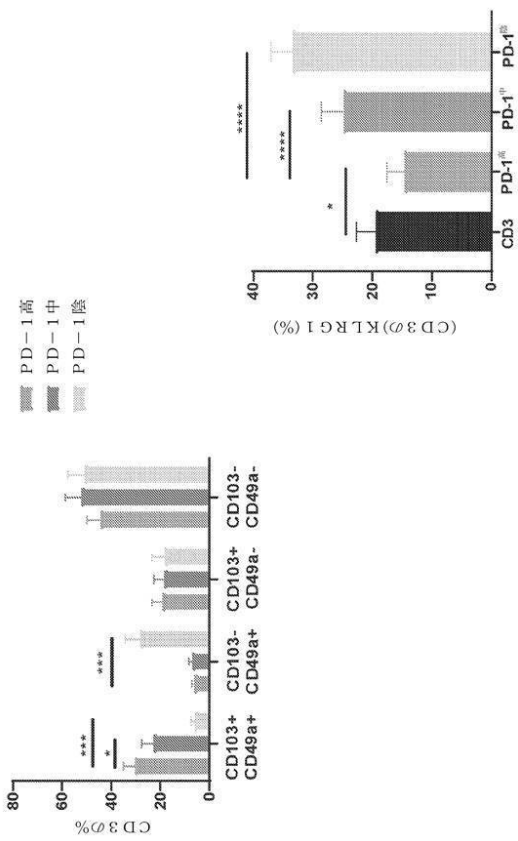
40

50

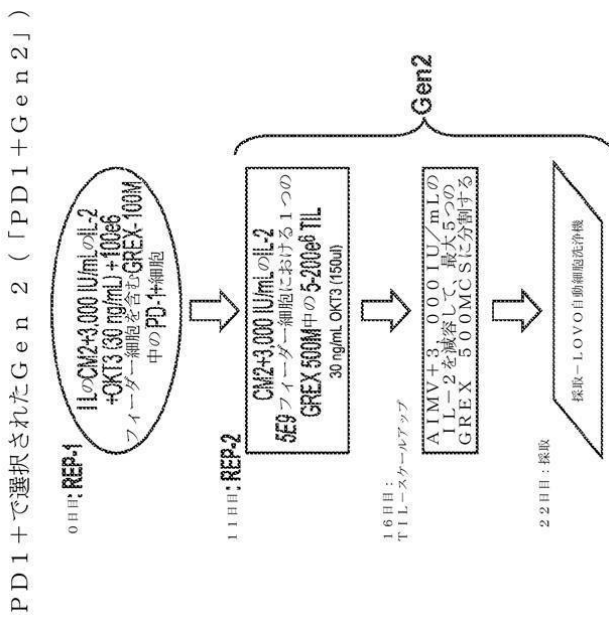
【図 26】



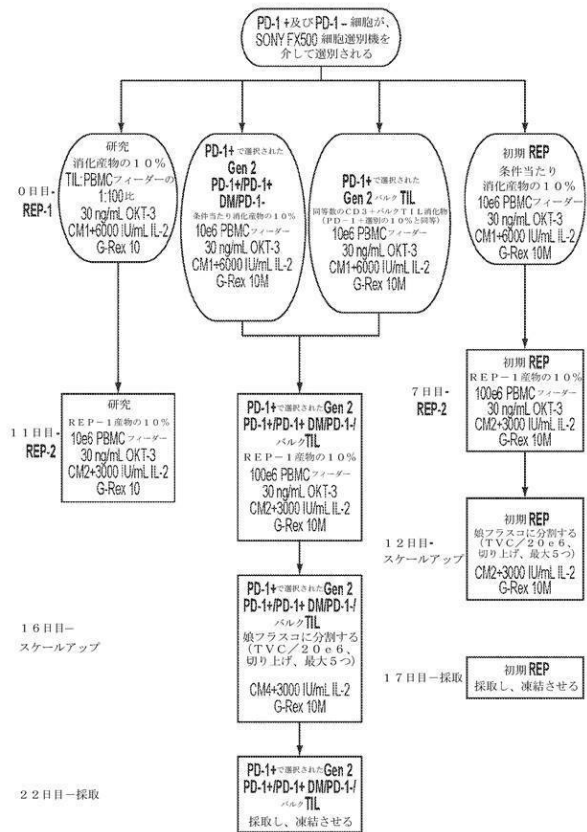
【図 27】



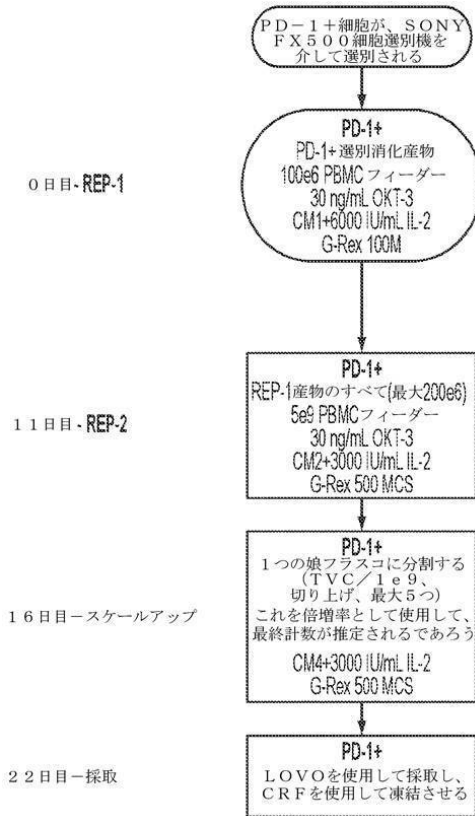
【圖 28】



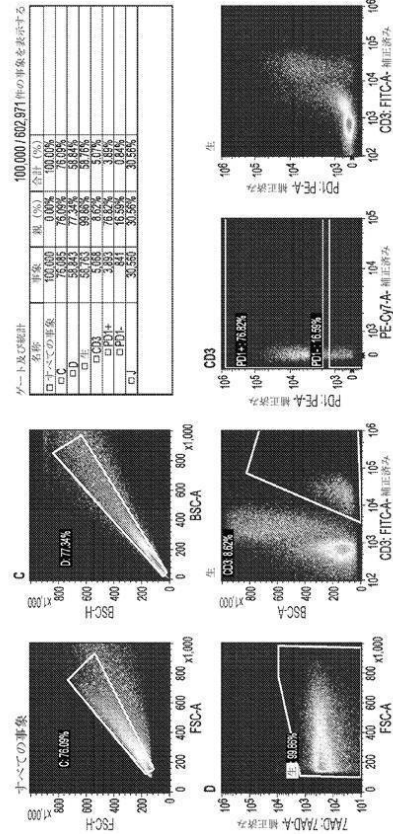
【圖 29】



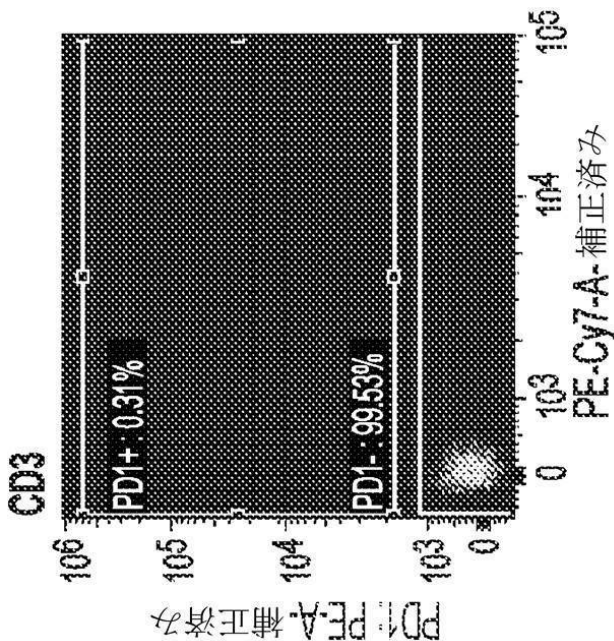
【図 30】



【図 3 1】



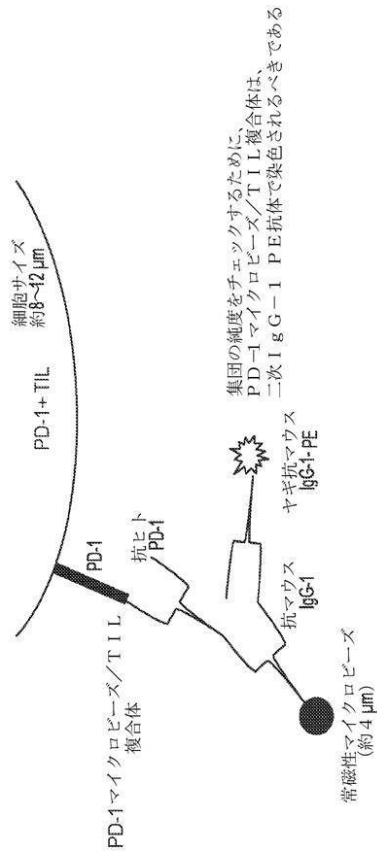
【図 3 2】



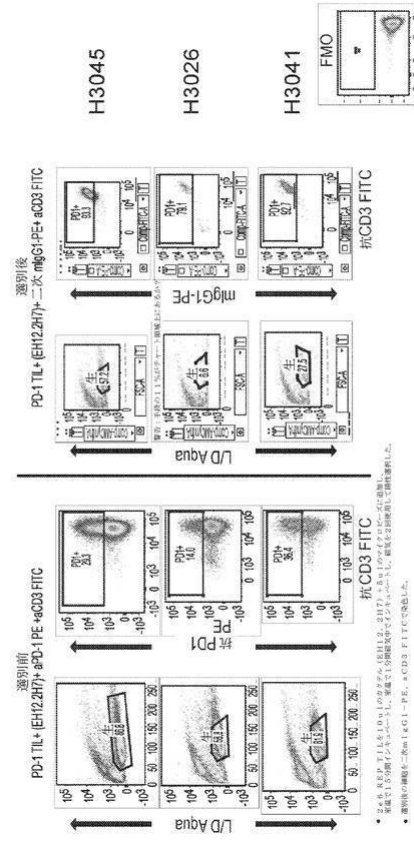
【図 3 3】

	流動方法 (Sony選別機) を使用した選択	磁気ビーズ (CliniMACS) を使用した選択
システム処理	開放系、フェーズ2、3試験の ために実装する課題	CliniMACS を使用した閉鎖系
細胞回復	低い細胞回復 (<30%)	高い細胞回復 (約70~99%)
処理時間	10~14時間	6~8時間
ユニット動作	2人の訓練を受けたオペレーターを 必要とし、流動選別について特殊な訓練を 必要とする	高いスループット、複数のロットを 取り扱うことができる
機器	少なくとも2つの流動選別機が必要 とされる、ユニット当たり 約500,000ドル	少なくとも2つのCliniMACS が必要とされる、ユニット当たり 約100,000ドル
消耗品	約4000/ロット	約3000~5000/ロット
保守	日常的な保守及び補正制御設定が 3カ月毎に必要とされる	年1回の保守、複雑ではない手順

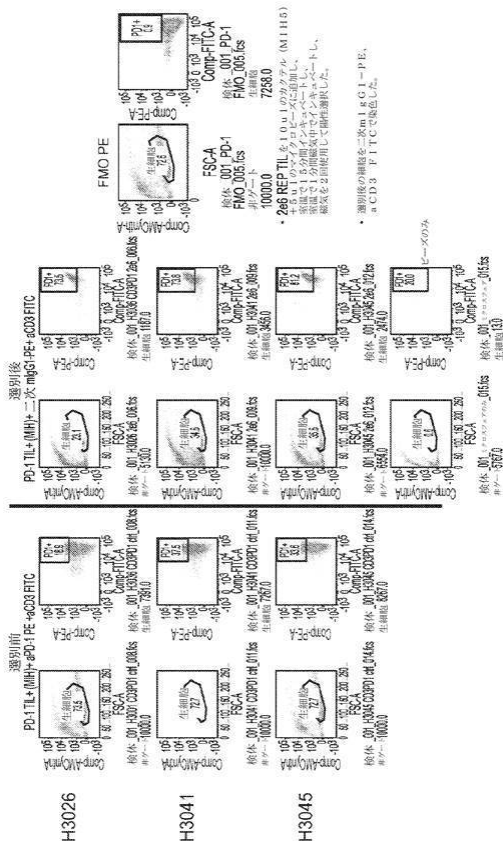
【図 3 4】



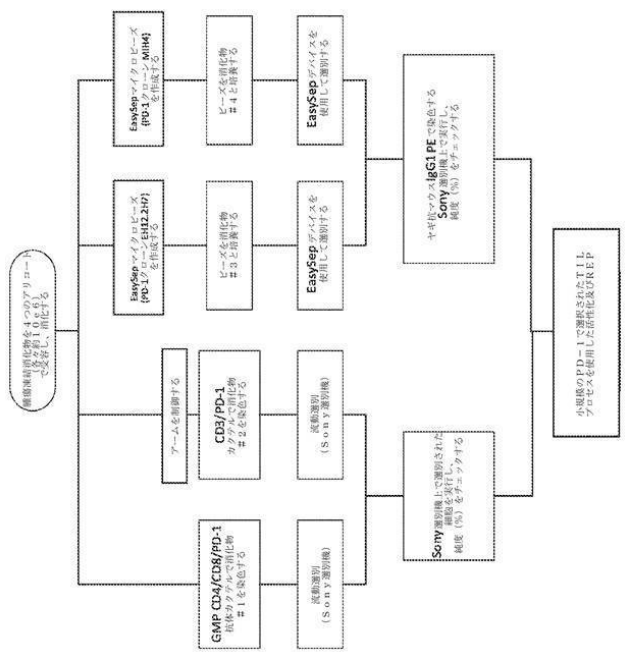
【図 3 5】



【図 3 6】



【図 3 7】



10

20

30

40

50

【図 3 8】

パラメータ	流動選別	磁気ビーズ (M1H4)
【生細胞の】選別前のCD3+ (%)	6.11	6.11
【CD3+の】選別前のPD-1+ (%)	50.34	50.34
選別前のTVC	1.19 x 10 ⁶	1.19 x 10 ⁶
【生細胞の】選別前のPD-1+ TVC	3.57 x 10 ⁴	3.57 x 10 ⁴
選別されたTVC (収率 (%))	1.04 x 10 ⁷ (29.1%)	4.80 x 10 ⁷ (133%)
【CD3+ (%) の】選別後のPD-1+ の純度 (%)	94.12	44.5
36.9		

【図 3 9】

生成物の属性	M1149	
	Sony 選別	クロンM1H4ビーズ選別
0日に採取されたTVC (PD-1で選別された)	5 x 10 ⁴	5 x 10 ⁴
22日に採取されたTVC	111 x 10 ⁶	33 x 10 ⁶
22日に採取されたTVC	62 x 10 ⁹	78 x 10 ⁹
倍加数		
0~11日目、11~22日分	78.45	6.66
採取時の生存率 (%)	97	95
%CD45+/CD3+	99.9	95.9
IFNg (pg/mL)	3963	4040
グランザイムB (pg/mL)	15834	13658
%CD4+CD107A 細胞/非細胞	50.9 / 3.4	59.0 / 3.8
%CD8+CD107A 細胞/非細胞	64.9 / 0.7	65.7 / 0.8
		58.6 / 2.7

【図 4 0】

	M1149 - Sony 選別	M1149 - M1H4 ビーズ選別	M1149 - EH12.2H7 ビーズ選別
分化			
CD27+ (%)	12.1	22.7	11.1
CD28+ (%)	100.0	99.9	100.0
CD57+ (%)	42.4	18.1	31.4
KLRG1+ (%)	24.2	29.5	24.9
2B4+ (%)	11.2	6.7	9.6
BTLA4+ (%)	99.9	99.9	99.8
CD25+ (%)	4.8	8.2	3.6
CD69+ (%)	84.2	83.9	86.8
CD95+ (%)	99.0	99.1	97.6
CD103+ (%)	0.8	1.2	2.0
LAG3+ (%)	6.5	2.7	7.5
PDI+ (%)	17.4	12.7	13.0
TIGIT+ (%)	40.1	55.1	32.5
TIM3+ (%)	46.2	67.9	41.3
疲労			

【図 4 1】

	M1149 - Sony 選別	M1149 - M1H4 ビーズ選別	M1149 - EH12.2H7 ビーズ選別
分化			
CD27+ (%)	15.0	10.3	10.8
CD28+ (%)	99.9	99.8	99.4
CD57+ (%)	12.2	5.2	26.6
KLRG1+ (%)	11.5	15.6	47.3
2B4+ (%)	4.5	4.6	15.9
BTLA4+ (%)	99.9	100.0	99.8
CD25+ (%)	0.5	1.8	0.9
CD69+ (%)	90.6	89.3	84.3
CD95+ (%)	94.3	94.5	90.6
CD103+ (%)	0.5	0.7	1.7
LAG3+ (%)	4.9	5.3	7.6
PDI+ (%)	8.9	3.3	11.5
TIGIT+ (%)	32.2	65.5	34.5
TIM3+ (%)	65.2	74.2	68.0
活性化			
疲労			

10

20

30

40

50

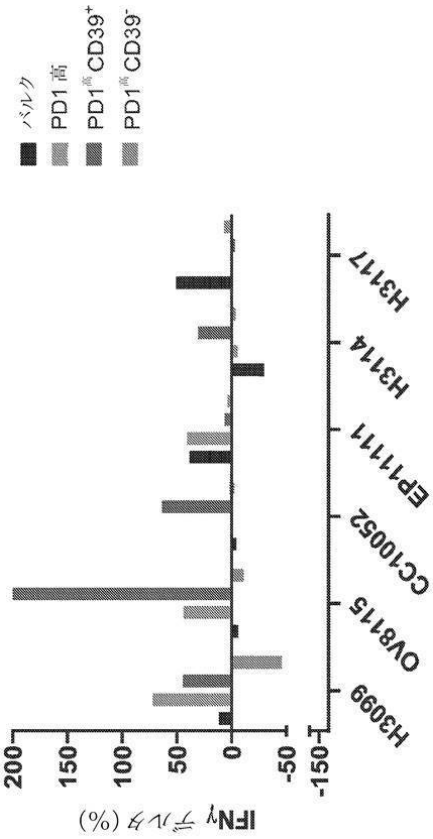
【図 4 2】

	流動選別方法による M1149 PD-1 で選別されたTIL	磁気選別方法による 磁気ビーズ (EH12.2H7) を使用した M1149 PD-1 で選別されたTIL	磁気選別方法による磁気ビーズ (MIH4)を使用した M1149 PD-1 で選別されたTIL
固有の CDR3 (uCDR3)	1444	2102	2720
多様性指数 (エントロピー)	3.7	3.8	6

【図 4 3】

	流動選別	磁気選別 (EH12.H7)	磁気選別(MIH4)
流動選別	1444 (100,100)	530 (99,99)	207 (95,69)
磁気選別(EH12.H7)	該当なし	2102 (100,100)	147 (30,17)
磁気選別(MIH4)	該当なし	該当なし	2720 (100,100)

【図 4 4】



10

20

30

40

50

【配列表】

2023524108000001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2021/030655
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).	10
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.	20
3.	Additional comments:	30
		40
		50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2021/030655

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N5/0783 A61K35/17 A61P35/00 C12Q1/6886 G01N33/566
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 A61K A61P C12Q G01N

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, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2019/210131 A1 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 31 October 2019 (2019-10-31) cited in the application page 1; claim 1	1-277
X	WO 2018/226336 A1 (PROVIDENCE HEALTH & SERVICES OREGON [US]; AGONOX INC [US]) 13 December 2018 (2018-12-13)	200-204
Y	page 41; claims 21-23	1-277
	----- -/--	

☒ 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 August 2021

Date of mailing of the international search report

11/08/2021

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

Paresce, Donata

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2021/030655

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SALAS-BENITO DIEGO ET AL: "Pre-selection of PD-1+ Tumor-Infiltrating CD8+ T cells improves the efficacy of adoptive T-cell Therapy", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL SCIENCES, vol. 2, no. 1, 1 January 2018 (2018-01-01), pages 55-59, XP055828177, Retrieved from the Internet: URL:https://immunologyresearchjournal.com/articles/preselection-of-pd1-tumorinfiltrating-cd8-t-cells-improves-the-efficacy-of-adoptive-tcell-therapy.pdf> page 55 - page 57	200-204
Y	-----	1-277
X	SARITA M. FERNANDEZ-POMA ET AL: "Expansion of Tumor-Infiltrating CD8 + T cells Expressing PD-1 Improves the Efficacy of Adoptive T-cell Therapy", CANCER RESEARCH, vol. 77, no. 13, 1 July 2017 (2017-07-01), pages 3672-3684, XP055685039, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0236 page 3672	200-204
Y	-----	1-277
X	ALENA GROS ET AL: "PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors", JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, vol. 124, no. 5, 1 May 2014 (2014-05-01), pages 2246-2259, XP055193068, ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI173639 page 2246	200-204
Y	-----	1-277
X	WO 2016/179006 A1 (US HEALTH [US]) 10 November 2016 (2016-11-10) claims 1-4	200-204
Y	-----	1-277
X	WO 2014/133567 A1 (US HEALTH [US]) 4 September 2014 (2014-09-04) claim 1	200-204
Y	-----	1-277
A	RAMI YOSSEF ET AL: "Enhanced detection of neoantigen-reactive T cells targeting unique and shared oncogenes for personalized cancer immunotherapy", JCI INSIGHT, vol. 3, no. 19, 4 October 2018 (2018-10-04), XP055542887, DOI: 10.1172/jci.insight.122467 the whole document	1-277
X,P	WO 2020/096986 A2 (IOVANCE BIOTHERAPEUTICS INC [US]) 14 May 2020 (2020-05-14) the whole document	1-277

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2021/030655

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2019210131 A1	31-10-2019	AU 2019257749 A1 BR 112020021660 A2 CA 3098303 A1 CN 112368003 A EP 3784254 A1 KR 20210005138 A SG 11202010319R A TW 202014195 A US 2021130779 A1 WO 2019210131 A1	22-10-2020 02-02-2021 31-10-2019 12-02-2021 03-03-2021 13-01-2021 27-11-2020 16-04-2020 06-05-2021 31-10-2019
WO 2018226336 A1	13-12-2018	AU 2018281830 A1 BR 112019024291 A2 CA 3061959 A1 CN 110719799 A EP 3634584 A1 JP 2020523018 A KR 20200015717 A US 2020149008 A1 WO 2018226336 A1	05-12-2019 28-07-2020 13-12-2018 21-01-2020 15-04-2020 06-08-2020 12-02-2020 14-05-2020 13-12-2018
WO 2016179006 A1	10-11-2016	AU 2016258845 A1 CA 2984234 A1 US 2018148690 A1 US 2020095548 A1 WO 2016179006 A1	09-11-2017 10-11-2016 31-05-2018 26-03-2020 10-11-2016
WO 2014133567 A1	04-09-2014	AU 2013379772 A1 AU 2018274874 A1 AU 2020220209 A1 CA 2902423 A1 CN 105163744 A EP 2961415 A1 EP 3821898 A1 JP 6416131 B2 JP 6788629 B2 JP 2016509839 A JP 2018148898 A JP 2021019634 A RU 2015138483 A RU 2018136226 A US 2016010058 A1 WO 2014133567 A1	17-09-2015 28-02-2019 10-09-2020 04-09-2014 16-12-2015 06-01-2016 19-05-2021 31-10-2018 25-11-2020 04-04-2016 27-09-2018 18-02-2021 13-04-2017 21-03-2019 14-01-2016 04-09-2014
WO 2020096986 A2	14-05-2020	AU 2019375416 A1 CA 3118616 A1 SG 11202104630P A TW 202039829 A WO 2020096986 A2	27-05-2021 14-05-2020 29-06-2021 01-11-2020 14-05-2020

10

20

30

40

50

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)

A 6 1 P 11/00 (2006.01)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)
C 1 2 N 5/0781(2010.01)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)
C 1 2 M 1/00 (2006.01)
C 1 2 M 3/04 (2006.01)

A 6 1 P 11/00
G 0 1 N 33/543 5 9 7
G 0 1 N 33/53 Y
G 0 1 N 33/543 5 4 1 A
C 1 2 N 5/0781
C 0 7 K 16/28
C 1 2 M 1/00 D
C 1 2 M 3/04 A

,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,D
 K,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),O
 A(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,B
 B,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,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,Z
 W

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

ナタラジャン, アーヴィンド

アメリカ合衆国, ニュージャージー州 0 7 9 2 0, バスキング リッジ, スモーク ライズ ロード
 1 7 4

F ターム (参考)

4B029 AA01 AA21 BB11 CC02 GB09
 4B065 AA90X AC14 BB40 CA44
 4C084 AA02 BA44 DA14 MA66 NA05 ZA591 ZA592 ZA661 ZA662 ZB261
 ZB262
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 DA31 NA05 ZA59 ZA66 ZB26
 4H045 AA10 AA30 BA09 CA40 DA04 DA18 DA76 EA20 FA74